

Center for Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy (CeMOS)
der Hochschule Mannheim
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Rädle

Entwicklung und Erprobung der tomografischen Raman-Bildgebung zur
Bewertung diagnostischer Optionen im dreidimensionalen (3D) Gewebe-
verband

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Shaun Paul Keck

aus
Heidelberg
2024

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Rädle

vincit qui se vincit

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|--|-------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | I |
| TABELLENVERZEICHNIS | XI |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 1 |
| 1 EINLEITUNG | 2 |
| 1.1 Zielsetzung der Arbeit | 5 |
| 1.2 Theoretischer Hintergrund zur Auslegung der Messsysteme | 7 |
| 1.2.1 Raman-Effekt | 7 |
| 1.2.2 Rayleigh Streuung..... | 10 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 12 |
| 2.1 Planung und Aufbau des Raman-Photometers zur Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung | 12 |
| 2.2 Planung und Aufbau eines spektrophotometerischen Hybriddetektors für Raman-Streuung | 14 |
| 2.3 Raman-Spektrophotometer-Hybrid Iteration 2..... | 32 |
| 2.4 Raman-Spektrophotometer-Hybrid Iteration 3..... | 40 |
| 2.5 Lichtscheibenbeleuchtung und Detektion | 46 |
| 2.5.1 Aufbau des multimodalen Lichtscheibenmikroskops..... | 48 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.5.2 | Probenpositionierung | 56 |
| 2.5.3 | Zellkultur und Sphäroidbildung..... | 57 |
| 2.5.4 | Arbeitsablauf der Bildgebung | 59 |
| 2.5.5 | Software zur Bedienung des Mikroskops | 62 |
| 2.5.6 | Software zur Bildbearbeitung | 65 |
| 2.5.7 | Software zur 3D Rekonstruktion..... | 67 |
| 3 | ERGEBNISSE | 68 |
| 3.1 | Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung der Probenbeleuchtung | 68 |
| 3.2 | Untersuchung von lokalen Konzentrationsprofilen einer zweiphasigen Strömung mit einer Mikroskop-Objektiv-Sonde in Kombination mit spektrophotometrischer Raman-Detektion | 74 |
| 3.3 | Erhöhung der spektralen Auflösung und Reduzierung der Anregungsleistung von spektrophotometrischer Raman Detektion..... | 84 |
| 3.4 | Multimodale Lichtscheiben-Mikroskopie..... | 95 |
| 4 | DISKUSSION | 121 |
| 4.1 | Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung der Probenbeleuchtung | 122 |
| 4.2 | Untersuchung von lokalen Konzentrationsprofilen einer zweiphasigen Strömung mit einer Mikroskop-Objektiv-Sonde in Kombination mit spektrophotometrischer Raman-Detektion | 123 |
| 4.3 | Erhöhung der spektralen Auflösung von spektrophotometrischer Raman Detektion | 126 |
| 4.4 | Multimodale Lichtscheiben-Mikroskopie..... | 128 |

| | |
|------------------------------|-----|
| 5 ZUSAMMENFASSUNG..... | 130 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS..... | 134 |
| 7 TABELLARISCHER ANHANG..... | 140 |
| 8 LEBENSLAUF | 152 |
| 9 DANKSAGUNG..... | 155 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Anregung des Raman-Effekts ²⁵ | 8 |
| Abbildung 2: Symmetrische und asymmetrische Valenzschwingungen von CO ₂ mit Änderungen der Polarisierbarkeit α und des Dipolmoments $\mu^{25,28}$ | 9 |
| Abbildung 3: Raytracing Simulation Raman-Photometer. 1: Faserkopplung; 2-4: Plankonvexe Linsen zur Kollimation bzw. Fokussierung; 5: Langpassfilter > 785 nm; 6: Strahlteiler 1:1; 7, 8: Bandpassfilter; 9, 10: MPPC-Detektoren. Für weitere Details zu den Komponenten vgl. Tabelle 1. | 13 |
| Abbildung 4: Basismodell zur Simulation eines dispersiven Beugungsgitters. 1: Raman-Signal; 2: Kollimatorlinse; 3: reflexives Blaze-Gitter; 4: Fokuslinse; 5: Glasfaserzeile..... | 15 |
| Abbildung 5: Spektrale Auftrennung des Basismodells. Linsenbrennweiten 25,4 mm; Gitterfrequenz 600 mm ⁻¹ | 16 |
| Abbildung 6: Dispersion von 0 cm ⁻¹ zu 240 cm ⁻¹ (785 nm und 800 nm) sowie 240 cm ⁻¹ zu 470 cm ⁻¹ (800 nm und 815 nm) als Funktion der Brennweite. | 17 |
| Abbildung 7: Dispersion von 470 cm ⁻¹ zu 690 cm ⁻¹ (815 nm und 830 nm) sowie 690 cm ⁻¹ zu 905 cm ⁻¹ (830 nm und 845 nm) als Funktion der Brennweite..... | 18 |
| Abbildung 8: Dispersion als Funktion des Gitteranstellwinkels..... | 20 |
| Abbildung 9: Dispersion als Funktion der Gitterfrequenz..... | 21 |
| Abbildung 10: Anpassung der Zentralwellenlänge zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers. | 22 |
| Abbildung 11: Erhöhung des Linsendurchmessers zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers. | 23 |
| Abbildung 12: Einsatz asphärischer Linsen zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers. Kollimation plankonvex / Fokussierung plankonvex; Kollimation | |

| | |
|--|----|
| plankonvex / Fokussierung asphärisch; Kollimation asphärisch / Fokussierung asphärisch. | 24 |
| Abbildung 13: Einsatz asphärischer Linsen zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers. Kollimation 1" plankonvex/Fokussierung 2" plankonvex; Kollimation 1" plankonvex/Fokussierung 2" asphärisch; Kollimation 1" asphärisch/Fokussierung 2" asphärisch. | 26 |
| Abbildung 14: Fokusradien plankonvexer und asphärischer Linsen bei nomineller Brennweite..... | 27 |
| Abbildung 15: Feinjustierung der Brennweite. Plankonvexe Fokuslinse mit $d=25,4$ mm und $f=60,0$ mm..... | 28 |
| Abbildung 16: Erweitertes Simulationsmodell. 1: Einkopplung und Kollimation des Lasers; 2: Laserlinienfilter; 3: Umlenkspiegel; 4: dichroiter Strahlteiler; 5: Zwischenfokussierung mit Irisblende; 6: Fokussierung in Analyt; 7: Langpassfilter; 8: Reflexives Blaze-Gitter; 9: Fokuslinse; 10: Glasfaserzeile..... | 29 |
| Abbildung 17: Versatz der Strahlkoordinaten aufgrund der Brechung am dichroitischen Spiegel..... | 30 |
| Abbildung 18: Draufsicht der Spektrophotometer-Baugruppe. Die Beschreibung der Komponenten gemäß Nummerierung ist in Tabelle 4 aufgelistet..... | 31 |
| Abbildung 19: Optische Messanordnung. 1-3: Laser mit Faserkopplung; 4-7 und 9-12: koaxiale Mikroskopobjektiv-Sonde; 8: Mikrokanal; 13-18: Spektrophotometrische Detektion; 19: PC mit Software..... | 33 |
| Abbildung 20: Darstellung des mittels Mikroskopobjektiv (vgl. Position 7 in Abbildung 19) fokussierten Lasers in Wasser. | 35 |
| Abbildung 21: 1: Spritzenpumpe, 2: Spritze mit Toluol-Aceton-Mischung, 3: Spritze mit Wasser, 4: Mikrokanal, 5: Abfallbehälter ²² | 36 |
| Abbildung 22: Raman-Spektren von Toluol, Aceton und Wasser (RXN1-Spektrometer, Kaiser Optical Systems). Versatz von 500, 1000 und 2000 Counts. Analyt Peak von Aceton bei 1710 cm^{-1} rot hervorgehoben..... | 36 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 23: Ausschnitt der Raman-Spektren von Toluol, Aceton und Wasser. Die spektralen Bandbreiten der Detektionsfasern (300 cm^{-1}) sind mit vertikalen Linien gekennzeichnet. Durchgehende Linien: Analyt-Faser. Gestrichelte Linien: Referenzfaser. | 37 |
| Abbildung 24: Kalibrierungsdaten der Analyt-Signalintensität als Funktion der Aceton-Konzentration 0 mol/l bis 13,6 mol/l (0 Vol.-% bis 100 Vol.-%). Daten von strömenden Fluiden im Mikrokanal erfasst. Alle Konzentrationsstufen sind auf die maximale Acetonintensität skaliert, um die Vergleichbarkeit verschiedener Datensätze zu gewährleisten. | 38 |
| Abbildung 25: Draufsicht des Aluminium-Mikrokanals mit T-Verzweigung, zwei Einlasskanälen und einem Auslasskanal. Quadratischer Kanalquerschnitt von $500 \times 500\ \mu\text{m}$, hydraulischem Durchmesser von $500\ \mu\text{m}$ und 70 mm Kanallänge (aufgenommen mit VHX-7000, (Keyence Corp., Osaka, Japan)). | 40 |
| Abbildung 26: Schematische Darstellung des Raman-Spektrophotometers. 1: Sonde; 2: Laser; 3. Dichroiter Spiegel; 4: Fokuslinse; 5: Probe; 6: Notch-Filter (532 nm); 7: Fokuslinse; 8: Glasfaser; 9: Kollimatorlinse; 10: Reflexives Hohlgitter; 11: Glasfaserzeile; 12: Custom Photon Multiplier. | 41 |
| Abbildung 27: Raman-Spektren von Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumsulfat und Ethanol. Gesättigte Salzlösungen in entionisiertem Wasser bzw. Ethanol als Reinstoff. Anregungsleistung 100 mW, Integrationszeit 10 s, akkumulierte Spektren 3. Roter Rahmen: Messbereich des Spektrophotometers. | 44 |
| Abbildung 28: Charakteristische Größen der Lichtscheibenbeleuchtung. | 46 |
| Abbildung 29: Schematische Draufsicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops mit angeschlossener sCMOS-Kamera. 1-12: Beleuchtungspfad; 13-22a: Detektionspfad; 1: Laser 1 (660 nm), 2: Laser 2 (785 nm), 3-6 und 8: Breitbandspiegel; 7: dichroiter Spiegel, 9: sphärische Linse ($f = 25\text{ mm}$); 10: sphärische Linse ($f = 50\text{ mm}$); 11: Zylinderlinse ($f = 50\text{ mm}$); 12: Beleuchtungsobjektiv (10x); 13: Detektionsobjektiv (20x); 14: AOTF; 15: Polarisationsfilter; 16: Filterrad; 17-20: Langpassfilter; 21a: Tubuslinse; 22a: sCMOS-Kamera; 23: Verfahrereinheit; 24: Probenkammer. Eine ausführliche Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8. | 49 |

- Abbildung 30: Isometrische Ansicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops (CAD-Modell) mit angeschlossener sCMOS-Kamera. Die farbigen Linien zeigen den optischen Pfad der Beleuchtungslaser. Rot: 660 nm Strahlengang. Grün: 785 nm Strahlengang. Blau: koaxiale Überlagerung der 660 nm und 785 nm Laser. Eine ausführliche Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8. 49
- Abbildung 31: Schematische Draufsicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops mit angeschlossenem Spektrometer. 1: Laser 1 (660 nm), 2: Laser 2 (785 nm), 3-6 und 8: Breitbandspiegel; 7: dichroiter Spiegel, 9: sphärische Linse ($f = 25$ mm); 10: sphärische Linse ($f = 50$ mm); 11: Zylinderlinse ($f = 50$ mm); 12: Beleuchtungsobjektiv (10x); 13: Detektionsobjektiv (20x); 14: AOTF; 15: Polarisationsfilter; 16: Filterrad; 17-20: Langpassfilter; 21b: asphärische Linse ($f = 25$ mm) mit optischer Faser ($\varnothing 550$ μ m); 22b: Raman-Spektrometer tec5 MultiSpec®; 23: Positioniertisch; 24: Probenkammer; Eine detaillierte Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8. 53
- Abbildung 32: Isometrische Ansicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops (CAD-Modell) mit Faserkopplung für spektrometrische Detektion ergänzend zur Bildgebung. Die farbigen Linien zeigen den optischen Pfad der Beleuchtungslaser. Rot: 660 nm Strahlengang. Grün: 785-nm-Strahlpropagation. Blau: koaxiale Überlagerung von 660 nm und 785 nm Strahlengang. Eine ausführliche Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8. 54
- Abbildung 33: CAD-Modell eines Multiperspektiven-Probenträgers und des zugehörigen Rahmens für die Einbettung von Sphäroid-Proben in Hydrogelen. 56
- Abbildung 34: Probenhaltersystem bestehend aus fenestrierter Gelkammer mit zylindrischer Verlängerung, Gussrahmen und Negativform zur genauen, reproduzierbaren Einbettung von Sphäroiden in Hydrogel. 57
- Abbildung 35: Benutzeroberfläche der Mikroskop-Steuerungssoftware. 65
- Abbildung 36: Raman Spektrum einer wässrigen Lösung von Wasserstoffperoxid. Rote vertikale Linien: Grenzen des Analytkanals. Blaue vertikale Linien: Grenzen des Referenzkanals. 68
- Abbildung 37: Raman Spektrum von Monoethanolamin (MEA) als Reinstoff. 69

| | |
|--|----|
| Abbildung 38: Zunehmende Bindung von CO ₂ an Monomethanolamin über einen Zeitraum von 12 Minuten..... | 70 |
| Abbildung 39: Vergleichsmessungen von H ₂ O ₂ mit dem Raman-Photometer und einem Raman-Spektrometer..... | 71 |
| Abbildung 40: Signalstabilität des Raman-Photometers in Langzeitmessungen unter Laborbedingungen und in Pilotanlagenbetrieb. Labormessung: Überwachung von 12,9 mol/l H ₂ O ₂ (30 Vol.-%), Messzeit 5 Tage, Integrationszeit 1 Minute. Pilotanlage: Überwachung von 5,65 mol/l Ethanol (33 Vol.-%) in geschlossenem Kreislauf, Messzeit 4 Tage, Integrationszeit 1 Minute..... | 72 |
| Abbildung 41: Photometrische Messdaten der Reaktionskinetik einer Chemiesorption von CO ₂ an Monoethanolamin..... | 73 |
| Abbildung 42: Spektrometrische Messdaten der Reaktionskinetik einer Chemiesorption von CO ₂ an Monoethanolamin..... | 74 |
| Abbildung 43: Prototyp des entwickelten Raman-Spektrophotometers..... | 75 |
| Abbildung 44: Grundlegende Funktionsprüfung des Spektrophotometers. Spektrale Auftrennung einer Halogenlichtquelle (CLH 600, Zeiss AG). Kerndurchmesser der Detektionsfaser: 200 µm. Integrationszeit: 3ms..... | 75 |
| Abbildung 45: Peak-Abstände und Halbwertsbreiten der Glasfaserzeile. Vgl. Abbildung 44..... | 76 |
| Abbildung 46: Voruntersuchung zur Ablenkung der Anregungswellenlänge 532 nm durch das Blaze Gitter. Kerndurchmesser der Detektionsfaser: 200 µm. Integrationszeit: 1750 ms..... | 77 |
| Abbildung 47: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,1 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 6,67 mm/s und 1,5 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen..... | 79 |
| Abbildung 48: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,06 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 4,0 mm/s und 2,5 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 49: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,04 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 2,67 mm/s und 3,75 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen. | 80 |
| Abbildung 50: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,02 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 1,33 mm/s und 7,5 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen. | 81 |
| Abbildung 51: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,014 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 0,93 mm/s und 10,71 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen. | 82 |
| Abbildung 52: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,006 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 0,4 mm/s und 25 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen. | 82 |
| Abbildung 53: Änderung der Acetonkonzentration in Toluol- und Wassertropfen in Abhängigkeit des Volumenstroms. | 83 |
| Abbildung 54: Falschfarbendarstellung der Diffusion von Aceton aus Toluol in Wasser. Der Helligkeitsgradient beschreibt die Acetonkonzentration in der Bildebene. | 84 |
| Abbildung 55: Verringerung der Faserbandbreite mittels Schlitzapertur vor dem Faserarray. Auftrennung einer Halogenlichtquelle (CLH 600, Zeiss AG) detektiert mit einem UV/VIS-Spektrometer (Zeiss, MCS621 VIS II). | 85 |
| Abbildung 56: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Ammoniumnitratmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3. | 86 |
| Abbildung 57: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Di-Natriumhydrogenphosphatmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3. | 87 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 58: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Kaliumsulfatmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3. | 88 |
| Abbildung 59: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Ethanolmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3. | 88 |
| Abbildung 60: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Ammoniumnitrat-Lösungen (NH_4NO_3). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min. 90 | |
| Abbildung 61: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösungen (Na_2HPO_4). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min. | 91 |
| Abbildung 62: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Di-Kaliumsulfat-Lösungen (K_2SO_4). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min. ... | 92 |
| Abbildung 63: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Ethanol-Lösungen ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min. | 93 |
| Abbildung 64: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Ammoniumnitrat- (NH_4NO_3) und Di-Kaliumsulfat-Lösungen (K_2SO_4). Integrationszeit: 6 s. Messzeit pro Konzentration: 2 min. Anregungsleistung 1 mW. | 94 |
| Abbildung 65: Lichtscheibendimensionen beider Laser (Emissionswellenlängen 785 nm und 660 nm) bei koaxialer Überlagerung. | 95 |
| Abbildung 66: Bild eines kugelförmigen PMMA-Partikeln mit 100 μm Durchmesser zur Bestimmung des Bildfelds. Beleuchtung mit 660 nm und 1 mW Emissionsleistung. AOTF-Transmission bei 660 nm. Gelb hervorgehoben: quadratisches Gitter absierend auf dem Partikeldurchmesser. | 96 |
| Abbildung 67: Verteilungsdichte der Schrittweiten aller Linearachsen. | 97 |
| Abbildung 68: Wiederholgenauigkeit der Linearachsen. Dargestellt sind Minimum, Maximum, Median, 25%- und 75%-Quartil sowie Mittelwerte. | 98 |

- Abbildung 69: Genauigkeiten und Halbwertsbreiten des acousto optical tunable filters im Fingerprint-Bereich und Hochfrequenzbereich des Raman-Spektrums. Spektrale Unterteilung einer CHL 600 Halogenlichtquelle in 2 nm Inkrementen durch den AOTF. Fingerprint-Bereich vermessen mit einem RNX1 Raman-Spektrometer. Hochfrequenzbereich vermessen mit einem MultiSpec® Raman-Spektrometer. 99
- Abbildung 70: Bildbereiche und untersuchte Pixel für die Bestimmung der Signalfuktuation des Kamerachips mit (a) Rayleigh- und (b) Raman-Einstellungen. Emissionswellenlänge 660 nm, Emissionsleistung 1 mW (a) und 130 mW (b). Detektionswellenlänge 660 nm (a) und 815 nm (b). 100
- Abbildung 71: Prozentuale Signalschwankung von 27 zufällig ausgewählten Pixeln. Berechnet aus drei Bildsätzen von je 10 Bildern mit 130 mW Emissionsleistung bei 660 nm und Detektion bei 815 nm bzw. 2800 cm^{-1} sowie 1 mW Emissionsleistung bei 785 nm und 660 nm sowie Detektion bei 785 nm und 660 nm. Dargestellte Quartile von 270 Intensitätswerten pro Wellenlänge. 101
- Abbildung 72: Vergleich von Rayleigh-Bildern eines Fibroblasten HT29-Sphäroids. Beleuchtung bei 785 nm (a) und 660 nm (b). Emissionsleistung bei 785 nm und 660 nm: 1 mW. Belichtungszeit: 100 ms. AOTF-Einstellung: 785 nm (a) bzw. 660 nm (b). 102
- Abbildung 73: Raman-Spektrum und zugehöriges Bild eines Fibroblasten-HT29-Sphäroids. Beleuchtet bei 660 nm mit 130 mW Emissionsleistung. Detektiert bei 815 nm bzw. 2881 cm^{-1} . Belichtungs- bzw. Integrationszeit jeweils 5000 ms. 103
- Abbildung 74: Vergleich der gleichen optischen Schnittebene eines Fibroblasten-HT29-Sphäroiden vor Färbung (a) und nach Färbung (b) mit Draq5. Die Peak-Intensität des zugehörigen Spektrums ist bei gefärbten Proben ca. 400 % höher. . 104
- Abbildung 75: Sequenz ausgewählter optischer Schnitte eines Fibroblasten-HT29-Sphäroids entlang der z-Achse des Mikroskops (a bis i). Beleuchtungswellenlänge: 660 nm. Emissionsleistung: 130 mW. AOTF-Transmission: 815 nm bzw. 2881 cm^{-1} . Belichtungszeit: 5000 ms. 105

| | |
|--|-----|
| Abbildung 76: Dreidimensionale Rekonstruktion eines Fibroblasten-HT29-Sphäroids aus einer Raman-Bildserie. (a) 0 Grad (Frontalansicht), (b) 90 Grad (Seitenansicht) und (c) 180 Grad (Rückansicht). Die Serie besteht aus 52 Bildern. Beleuchtungswellenlänge: 660 nm. Emissionsleistung: 130 mW. AOTF-Transmission: 815 nm bzw. 2882 cm^{-1} . Belichtungszeit: 5000 ms..... | 106 |
| Abbildung 77: 14C Set 1 (keine Behandlung mit Cisplatin bzw. 0 h) Bild A16 und 14C Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 48 h) Bild A19..... | 108 |
| Abbildung 78: 14 C Set 2 (keine Behandlung mit Cisplatin bzw. 0 h) Bild A18 und 14 C Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 72 h) Bild A12..... | 108 |
| Abbildung 79: 11 B Set 1 (keine Behandlung mit Cisplatin bzw. 0 h) Bild A12 und 11 B Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 48 h) Bild A24..... | 108 |
| Abbildung 80: 11B Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 72 h) Bild A29 und 11 B Set 3 (72h) Bild A18..... | 109 |
| Abbildung 81: Abgrenzbare innere Strukturen in Sphäroiden 11B Set 1 (keine Behandlung mit Cisplatin) Bild A08 und 11B Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 72 h) Bild A32. | 110 |
| Abbildung 82: Exemplarischer Ausschnitt von vier benachbarten Schnittebenen aus dem Bildstapel eines 11 B Monokultur-Sphäroids (Set 1 72h, Bilder A24, A25, A26, und A27) nach Anwendung der Bildbearbeitungssequenz 1 (vgl. Tabelle 15). | 115 |
| Abbildung 83: Verlauf der Fehlerresiduen (links) und Genauigkeiten (rechts) des Deep-Learning-Modells zur Klassifizierung von Sphäroiden in unbehandelt und Cisplatin behandelt bei zunehmender Epochenzahl. Alle Bilder wurden vor Training und Klassifizierung gemäß Sequenz 1 (vgl. Tabelle 15) bearbeitet. | 117 |
| Abbildung 84: Confusion Matrix der Klassifizierung von Monokultur-Sphäroid-Schnittbildern der Zelltypen 11B und 14C in die Kategorien unbehandelt (0 h) und Cisplatin behandelt (72 h). Das Training und die anschließende Klassifizierung basieren auf Bildern die entsprechend Sequenz 1 (vgl. Tabelle 15) bearbeitet wurden. | 118 |

Abbildung 85: Verlauf der Verlustfunktion (links) und Genauigkeiten (rechts) des Deep Learning Modells zur Klassifizierung von Sphäroiden in unbehandelt und Cisplatin behandelt bei zunehmender Epochenzahl. Alle Bilder wurden vor Training und Klassifizierung in reduziertem Umfang bearbeitet (vgl. Tabelle 15 bis einschließlich Schritt 1 von 5). 119

Abbildung 86: Confusion Matrix der Klassifizierung von Monokultur-Sphäroiden der Zelltypen 11B und 14C in die Kategorien unbehandelt (0 h) und Cisplatin behandelt (72 h). Das Training und die Klassifizierung basieren auf Bildern die entsprechend Sequenz 1 oder 2 in reduziertem Umfang bearbeitet wurden (vgl. Tabelle 15 bis einschließlich Schritt 1 von 5). 119

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Komponentenliste des Raman-Photometers zur Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung. Nummerierung gemäß Abbildung 3. | 14 |
| Tabelle 2: Pearson Korrelationskoeffizienten der Quartile der Dispersion als Funktion der Brennweite für alle simulierten Wellenlängenkombinationen. Untersuchte Brennweiten: 25,4 mm, 30 mm, 35 mm, 40 mm, 50 mm. | 18 |
| Tabelle 3: Untersuchte Kombinationen von Kollimation und Fokussierung. | 25 |
| Tabelle 4: Teileliste der optischen Bauteile und Halterungskomponenten. | 32 |
| Tabelle 5: Zuordnung der Raman-Peaks unterhalb der Stokes-Verschiebung von 1500 cm^{-1} zu den untersuchten Analyten Ammoniumnitrat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Di-Kaliumsulfat und Ethanol. | 45 |
| Tabelle 6: Übersicht der Stoffwerte von Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dikaliumsulfat, Ethanol und des Lösemittels Wasser. | 45 |
| Tabelle 7: Spektrophotometrisch untersuchte Konzentrationsstufen von Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dikaliumsulfat und Ethanol. Vier äquidistante Verdünnungsschritte ausgehend von 60 Gew.-% NH_4NO_3 , 7 Gew.-% Na_2HPO_4 , 8 Gew.-% K_2SO_4 und 100 Gew.-% $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ | 46 |
| Tabelle 8: Teileliste des Mikroskop-Prototyps. Nummerierung entsprechend Abbildung 29 bis Abbildung 32. | 55 |
| Tabelle 9: Arbeitsablauf der Bildgebung und zugehörige Geräteparameter. | 61 |
| Tabelle 10: Geschwindigkeitsstufen und Verfahrensgeschwindigkeit der Linearachsen. | 62 |
| Tabelle 11: Korrekturfaktoren des DC Controllers KDC101 zur Steuerung des PT1/M-Z8-Einachsen-Lineartischs. | 63 |
| Tabelle 12: Zuordnung von Glasfasern der Detektionszeile zu den Analyt-spezifischen Signalen. | 89 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 13: Raman-Peak-Grenzen und Schwingungsmoden. | 103 |
| Tabelle 14: Übersicht der untersuchten Zelllinien, Wirkdauer des Cytotoxikums Cisplatin, und Größe der Bildserien zu Anwendung des Deep-Learning-Algorithmus. | 107 |
| Tabelle 15: Gegenüberstellung der Bildbearbeitungssequenzen zur Hervorhebung von internen Strukturen in Sphäroiden der Zelllinien 11B und 14C. | 111 |
| Tabelle 16: Inkrementelle Darstellung aller Zwischenergebnisse der Bildbearbeitungssequenz 1 am Beispiel 11B Set 1 (0 h) Bild A 13. | 113 |
| Tabelle 17: Inkrementelle Darstellung aller Zwischenergebnisse der Bildbearbeitungssequenz 2 am Beispiel 11B Set 1 (0 h) Bild A 13. | 114 |
| Tabelle 18: Übersicht der untersuchten Sphäroid-Zellkulturen innerhalb der ersten Klassifizierung mittels Deep-Learning..... | 116 |
| Tabelle 19: Übersicht der untersuchten Sphäroid-Zellkulturen innerhalb der zweiten Klassifizierung mittels Deep Learning..... | 118 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------|---|
| AOTF | Acousto-optic tunable filter |
| CPM | Custom Photon Multiplier |
| FPGA | Field Programmable Gate Array |
| FWHM | Full Width at Half Maximum bzw. Halbwertsbreite |
| MPPC | Multi-Pixel-Photon-Counter |
| NA | Numerische Apertur |
| TTL-Puls | Transistor-Transistor-Logik-Puls |

1 EINLEITUNG

In der klassischen molekularen medizinischen Diagnostik werden vorwiegend hochselektive Molekülinteraktionen, wie die Wechselwirkung zwischen Antikörpern und Antigenen oder auch Toxinen, genutzt, um spezifische Zellen bzw. zelluläre Strukturen und Zellbestandteile zu markieren. Durch die Markierung dieser Moleküle kann eine selektive Visualisierung diagnostisch relevanter Strukturen erfolgen. Diese Vorgehensweise stellt allerdings einen verändernden Eingriff in das zu untersuchende System dar. Alternativ hierzu ist die Nutzung inhärenter Moleküleigenschaften als markierungsfreie Nachweisverfahren. So wird die Wechselwirkung von Materie und Licht bereits seit dem 19. Jahrhundert genutzt, um qualitative Aussagen über Gewebezustände zu treffen¹. Zur Untersuchung von Gewebsstrukturen auf molekularer Ebene eignen sich die Fluoreszenz-, Reflexions- und Raman-Spektroskopie. Die Raman-Spektroskopie zeichnet sich im Vergleich zu ihren genannten Konkurrenzmethoden als die detaillierteste bezüglich der Darstellung chemischer Zusammensetzungen aus². Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Raman-Effekt die Schwingungen funktioneller Gruppen in Molekülen darstellt, sodass für jedes Molekül ein individueller spektraler Fingerabdruck entsteht³. Zu medizinischen Anwendungsbeispielen der Raman-Spektroskopie zählen u. a. die nicht-invasive, in-vivo Echtzeitmessung von menschlichem Gewebe zur Detektion von Hautkrebs⁴⁻⁶, die Identifikation von entartetem Gewebe während der Resektion von Hirntumoren an Ratten⁷, die ex-vivo Unterscheidung von Adenokarzinomen und gesundem Darmgewebe⁸, und die nicht-invasive, in-vivo Erfassung des Mineralisierungsgrades von distalen Knochen an Ratten⁹. Braun et al. entwarfen eine MRT-kompatible (Magnetresonanztomographie) multispektrale Nitinol-Sonde für In-vivo-Messungen zur Erkennung von Gewebeveränderungen auf der Grundlage biomolekularer Informationen aus markierungsfreien spektroskopischen Techniken, u.a. der Raman-Spektroskopie¹⁰.

Allerdings enthält das bei der konventionellen Raman-Spektroskopie erzeugte Spektrum lediglich chemische Informationen eines einzelnen Messpunkts, da punktförmig fokussierende Optiken unterschiedlicher Brennweite als Standardbauform für Sonden zum Einsatz kommen. Der Zwischenschritt zu letztendlich räumlichem Verständnis physiologischer und pathologischer Vorgänge, wie z. B. Wundheilung und Muskelregeneration oder Krebswachstum, geht jedoch über die flächige spektrale Information.

Um flächendeckende Informationen zur Verteilung verschiedener Komponenten in einer Probe zu erhalten, muss der zur Anregung verwendete Messkopf den zu untersuchenden Bereich mit einer auf die Probengröße angepassten Schrittweite abscannen. Pully et al. haben in einem multimodalen Ansatz, der Spektroskopie und Mikroskopie kombiniert, eingefärbte menschliche Stammzellen bildhaft dargestellt. Die Generierung eines Raman-Bildes einer Probe der Größe $4,9 \mu\text{m} \times 4,9 \mu\text{m}$ mit 32×32 Pixel bei einer Laserleistung von 100 mW und einer Emissionswellenlänge von 647,1 nm dauerte fast 8 Minuten¹¹. Wagner et al. erreichten bei der Untersuchung von Graphenmembranen mit einem konfokalen Raman-Mikroskop eine Scan-Zeit von 13 Minuten für eine Fläche von $530 \mu\text{m} \times 530 \mu\text{m}$ ¹². Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Anregung im Gegensatz zu Pully et al. mit einer Wellenlänge von 532 nm erfolgte und unterschiedliche Matrixeffekte aufgrund der verschiedenen Analyten berücksichtigt werden müssen.

Zur Aufnahme der Spektren ist, im Gegensatz zur Aufnahme von Intensitäten bei einzelnen Wellenlängen, ein Spektrometer erforderlich. Des Weiteren benötigt die Erstellung eines Bildes auf Basis eines Spektralbereichs wesentlich mehr Zeit als auf Basis diskreter Wellenlängen. Um zu dem Schritt der wirklichen 3D-Abmusterung zu kommen, müssen noch mehr Informationen gesammelt werden. Damit sich diese Messtechnik in der medizinischen Diagnostik etabliert, ist es notwendig die Messzeit zur Aufnahme einzelner Pixel wesentlich zu reduzieren. Hierzu wurden im Rahmen dieser Dissertation alternative, technisch exklusive Verfahren untersucht und hierfür die entsprechenden Geräte gebaut, angepasst oder optimiert. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt folglich in der instrumentellen Entwicklung der optomechanischen Detektionskonzepte sowie der zugehörigen Sonden und Messanordnungen.

Der initiale Ansatz bewertet die Möglichkeit zur Reduktion der Messzeit durch die Implementierung eines Arrays höchstempfindlicher Einzelphotonenzähler in Kombination mit durchstimmbaren Filtern zur Generierung des Raman-Bildes. Hierzu findet eine Technologie speziell angepasster Photonverstärker, sogenannte CPMs (Custom Photon Multiplier), Anwendung. Die Technologie besteht aus der Kombination einer Multiwellenlängen-Optik mit parallel geschalteten CPMs sowie geeigneten Messköpfen und Auswertalgorithmen. Eine alternative Technik besteht darin, Detektionsstrategien aus dem Bereich des Hyperspectral Imagings und hochempfindlichen sCMOS Kamerasystemen zu verwenden. Wegen der notwendigen Ortsauflösung nicht nur in

X- und Y-Richtung, sondern auch in Z-Richtung, müssen adäquate Beleuchtungsgeometrien entwickelt werden, die die SPIM-Technologie (Selective Plane Illumination) mit Raman-Nachweissystemen verbinden.

Bislang untersuchte Ansätze zur räumlichen Darstellung chemischer Signaturen stützen sich vorwiegend auf multimodale Messsysteme. Die grundlegende Strategie hierbei ist, Messtechniken mit hoher räumlicher Auflösung als Leitsysteme für die Raman-Spektrometrie zu verwenden, sodass morphologisch auffällige Strukturen auf ihre chemische Zusammensetzung untersucht werden und somit eine eindeutige Unterscheidung von gesunden und krankhaften Strukturen erfolgen kann. Lloyd et al. nutzten eine Kombination aus Mikrocomputertomographie (MikroCT) und Raman-Spektrometrie zur Untersuchung der Mineralisierung von Blutgefäßen und des Unterhautfettgewebes an Gewebeproben von Patienten mit Kalziphylaxie¹³. Die berichteten Integrationszeiten der Raman-Messungen waren 120 und 60 Sekunden, allerdings handelte es sich hierbei um punktuelle Messungen einzelner Spektren. Schulmerich et al. erreichten mit der Kombination von MikroCT und Raman-Spektrometrie eine tomographische Rekonstruktion von Hundeknochen bei einer Messzeit von 65 Minuten¹⁴. Ein weiteres häufig verwendetes multimodales Konzept ist die Kombination von Raman-Spektrometrie mit optischer Kohärenztomographie (OCT)^{8,15–17}. Alle Ansätze haben jedoch gemeinsam, dass die OCT lediglich zur Identifizierung auffälliger Strukturen genutzt wird, mit anschließender Verifizierung durch punktuelle Raman-Messungen. Eine tomographische Rekonstruktion spektraler Informationen findet nicht statt.

Kallepitis et al. nutzten ein Raman-Mikrospektroskop zum quantitativen volumetrischen Raman Imaging dreidimensionaler Zellkulturen. Eine Darstellung der Zellmorphologie und -biochemie in bioinerten und bioaktiven Hydrogelen konnte durch punktförmiges Rastern mit einem Konfokalmikroskop und der Bildung hyperspektraler Datenwürfel erreicht werden. Hierbei wurden insgesamt 10 Bildebenen im Abstand von jeweils 1 μm aufgenommen, mit Schrittweiten von 650 nm innerhalb einer Ebene und einer Integrationszeit von 300 ms pro Spektrum¹⁸. Chen et al. erreichten durch die Erzeugung von Bessel-Strahlen, stimulierter Raman-Streuung und einer rotierenden Probenhalterung bei der Messung von Lipidtropfen in einer 3T3-L1 Zelle eine Messzeit von 162 s für ein Volumen von $150 \times 150 \times 150 \mu\text{m}^3$ ¹⁹. Heintz et al. entwickelten auf der Plattform eines Leica DM R Lichtmikroskops ein multimodales System mit erweiterten Bildgebungsoptionen durch VIS/NIR Reflektion und Raman-Spektroskopie. Die Auf-

nahme konventioneller Transmissionsbilder gefärbter Kryoschnitte blieb hierbei erhalten, sodass eine breite, modulare Auswahl an kontrastgebenden Effekten zur Verfügung steht. In einer Untersuchung von ex-vivo Gehirngewebe von Mäusen konnte eine molekülspezifische Unterscheidung von myelinisiertem und nicht-myelinisiertem Gewebe mittels Raman-Mikrospektroskopie gezeigt werden. Aufgrund der benötigten Integrationszeit und der Bildgebung mittels Punktrasterung empfehlen die Autoren jedoch relevante Regionen in Gewebeschnitten anhand konventioneller Mikroskopie zu identifizieren und molekulare Scans auf diese Bereiche zu begrenzen²⁰.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Projektarbeit steht die Entwicklung optischer Module, welche die Möglichkeiten der Raman-Spektroskopie für die minimalinvasive Darstellung endogener, chemischer Informationen im dreidimensionalen Zellverband von Sphäroiden nutzbar machen. Der Messbereich der zu entwickelnden Raman-Scanner soll sich über den sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich erstrecken. Bei der Auswertung der aufgenommenen Spektren ist der Fokus die inelastische Raman-Streuung, weiterhin soll die Detektion der elastischen Rayleigh-Streuung möglich sein. Dies erfordert essentielle Geräteparameter zur Anregung der gewünschten Photonen-Molekülinteraktionen an die spezifischen Voraussetzungen biologischen Probenmaterials anzupassen. Technische Randbedingungen wie die Leistung und Anregungswellenlänge des Lasers sind dahingehend zu optimieren, dass ein ausreichend hohes Messsignal ohne Auslöschung des Raman-Effekts beispielsweise durch Fluoreszenzüberlagerung und weitere Hintergrundeffekte oder eine Gefährdung der Probenintegrität durch den eingestrahlt Laser erfolgt. Hierfür gilt es potenzielle Lösungsansätze in analytischen Simulationen zu erstellen und zu optimieren. Vor der Konstruktion optischer Aufbauten, werden geeignete optische Geometrien durch Simulation der Strahlengänge mittels Raytracing und daraus abgeleiteter Photonenflussanalyse herausgearbeitet. Aufbauend auf mehreren Parameterstudien werden Prototypen umgesetzt.

Anhand zunehmend komplexer Prototypen werden Simulationsergebnisse bewertet und die optomechanischen Lösungen basierend auf den Erkenntnissen angepasst. Hierbei werden alternative Beleuchtungskonzepte hinsichtlich der Effektanregung sowie komplementäre Detektionsstrategien für die gewünschten spektralen Informationen parallel verfolgt. In Proof-of-Concept-Experimenten dienen initial Vergleichssysteme als Bewertungsgrundlage, wobei die Anforderung zunehmender Komplexität

auch hierbei gestellt wird. Vergleichssysteme adressieren unter dieser Voraussetzung neben statischen Systemen wie Konzentrationsreihen wässriger Analytlösungen auch dynamische Messaufgaben wie die Reaktionsverfolgung einer Chemiesorption sowie Mischprozesse strömender Fluide.

Ein Teilziel ist es hochsensitive Photodetektoren bis hin zur Einzelphotonenzählung simultan für mehrere Signalwellenlängen in einer spektrophotometrischen Hybridlösung zugänglich zu machen. Die höhere Empfindlichkeit photometrischer Detektoren soll die Geschwindigkeit gegenüber dem Stand der Technik spektrometrischer Analyse deutlich verbessern. Wesentliche Aspekte sind die verkürzte Analysezeit und die erhöhte Aussagekraft durch Multispektral-Scanning. Ebenso ist die Entwicklung von Optiken, die hinsichtlich ihrer lateralen Auflösung und Schärfentiefe die Darstellung von Schnittbildern im zellulären Maßstab erlauben, ein essentieller Bestandteil dieses Vorhabens. Hierfür stellen die Strahlformungsprinzipien der Lichtscheibenmikroskopie den Ausgangspunkt für die Entwicklungsarbeit. Zusätzlich zu den in der Raman-Spektroskopie etablierten Anregungswellenlängen 785 nm und 532 nm wird die Eignung eines Lasers mit 660 nm Emissionswellenlänge hinsichtlich Effektausbeute und Probenintegrität für die spektrale Effektanregung untersucht.

Messergebnisse sollen letztendlich als 4-dimensionales Array vorliegen (drei räumliche Dimensionen sowie spektrale Informationen). Eine zu lösende Herausforderung bei der Raman-Messung biologischer Proben ist die Überlagerung der Raman-Signale durch störenden Fluoreszenz-Untergrund. Dieser Störeinfluss soll bereits geräteseitig durch den Einsatz von wellenlängenselektierenden Elementen wie Beugungsgittern oder durchstimmbaren Filtern berücksichtigt werden. Die Raman-Information muss ggf. durch Verrechnung mehrerer Wellenlängen extrahiert werden. Das Training dieser Verrechnungsmethoden geschieht zunächst klassisch an Einzelpunkten mit chemometrischen Methoden. Für jedes gesuchte Objekt muss eine Analyt-spezifische Auswertevorschrift erarbeitet werden. Neben literaturbekannten Methoden werden auch selbst entwickelte Ansätze aus dem Bereich der multivariaten Analyse und Verrechnung mehrerer Wellenlängen bei sowohl inelastischer als auch elastischer Lichtstreuung entwickelt.

Die Unterscheidung von Zellstrukturen anhand ihrer chemischen Zusammensetzung ist aufgrund teilweise wiederkehrender Bindungssequenzen in unterschiedlichen Molekülen erschwert. Eine Abgrenzung muss deshalb durch die Identifikation komplexer Muster stattfinden, die potentiell Interpretationsproblematiken bergen. In Sphäroiden

sollen deshalb zunächst die Signaturen signifikanter Moleküle, wie beispielsweise Purin- und Pyrimidinbasen im Zellkern für die räumliche, Molekül-selektive Darstellung genutzt werden. Eine Validierung kann durch geeignete Fluoreszenzfarbstoffe wie Draq5 erfolgen. Durch die Verwendung von zwei Beleuchtungswellenlängen (660 nm und 785 nm) soll ein hohes Maß an Flexibilität durch die Auslösung von Photonenwechselwirkungen zwischen mehreren Molekülen ermöglicht werden.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab publiziert²¹⁻²⁴.

1.2 Theoretischer Hintergrund zur Auslegung der Messsysteme

Im Folgenden sind die theoretischen Grundlagen der untersuchten Photonen-Molekül-Interaktionen zusammengefasst. Hiermit soll der Verlauf der beschriebenen Geräteentwicklungen fundamental ergänzt werden.

1.2.1 Raman-Effekt

Die Raman-Spektroskopie ist eine analytische Methode zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von Zielmolekülen und basiert auf der Erfassung von Molekülschwingungen und -rotationen. Beim Raman-Effekt kommt es zu einer indirekten Wechselwirkung von Photonen mit der Elektronenhülle von Molekülen. Die fundamentale Voraussetzung für diese Art der Wechselwirkung ist, dass die Schwingung mit einer Änderung der Polarisierbarkeit α einhergeht, d.h. eine Deformierung der Elektronenhülle stattfindet. Zwischen dem im Molekül induzierten Dipolmoment μ und der Feldstärke E einer Lichtwelle besteht der folgende Zusammenhang^{25,26}:

$$\mu(t) = \alpha \cdot E(t) \quad (1)$$

Durch den Zusammenstoß von Photon und Molekül können Valenzelektronen in einen virtuellen Schwingungszustand angehoben werden, der sich energetisch zwischen zwei elektronischen Zuständen befindet. Die Abregung aus diesem Zustand kann auf unterschiedlichen Wegen stattfinden, von denen die Emission eines Photons mit identischer Frequenz zum anregenden Lichtquant der wahrscheinlichste ist. Dies entspricht einem elastischen Stoß an der Elektronenhülle und hat keine weiteren Auswirkungen auf den Schwingungszustand des Moleküls. Dieser Vorgang wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Es kann allerdings auch ein Photon mit niedrigerer Frequenz emittiert werden. Die verbleibende Energie regt dann im Molekül eine Schwingung an, was einem inelastischen Stoß an der Elektronenhülle entspricht und als Stokes-Streuung bezeichnet wird (vgl. roter Pfeil in Abbildung 1). Des Weiteren können Moleküle,

die sich bereits in einem angeregten Schwingungszustand befinden weiter auf virtuelle Schwingungsniveaus angehoben werden. Die Frequenz des während der Relaxation in den Grundzustand emittierten Photons ist dann um den Betrag der Molekülschwingung erhöht (vgl. blauer Pfeil in Abbildung 1). Dieses Ereignis wird als Anti-Stokes-Streuung bezeichnet und entspricht ebenfalls einem inelastischen Stoß. Man spricht deshalb beim Raman-Effekt auch von inelastischer Streuung des Lichts.

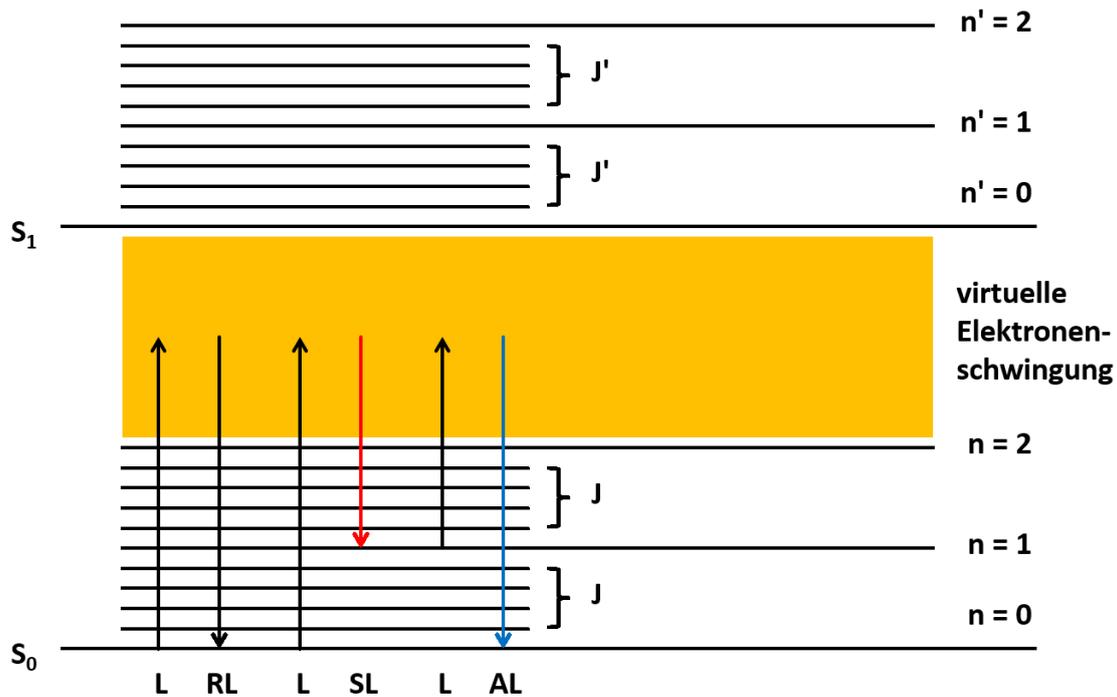


Abbildung 1: Anregung des Raman-Effekts²⁵.

Die Veränderungen der Energieniveaus der Photonen bilden ein spezifisches Spektrum der Probe, da die spektralen Positionen diskreter Peaks charakteristische Gruppen von Molekülverbindungen anzeigen. Die Höhe der Peaks korreliert mit der Menge der charakteristischen Gruppen und damit mit den Molekülkonzentrationen.

Wird Licht in eine Probe eingestrahlt durchläuft der größte Teil der Lichtquanten diese ohne Materieinteraktion. Elastische Streuung tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-5} auf. Die Photonen ausbeuten der inelastischen Streuung sind deutlich geringer mit 10^{-8} für Stokes- und 10^{-11} für Anti-Stokes-Streuung. Die Rayleigh-Linie würde also alle Raman-Signale um den Faktor 10^3 bzw. 10^6 übersteigen und muss deshalb herausgefiltert werden. Für die Intensität I von Raman-Signalen gilt folgender mathematischer Zusammenhang²⁷:

$$I \propto \nu^4 \cdot I_0 \cdot N \cdot \left(\frac{\delta\alpha}{\delta r} \right) \quad (2)$$

Die Intensität einer Raman-Bande ist demnach linear von der eingestrahlteten Intensität I_0 , der Polarisationsänderung $\delta\alpha/\delta r$ und der Anzahl der streuenden Moleküle N abhängig. Den stärksten Einfluss hat allerdings die Frequenz der Strahlung ν bzw. invers deren Wellenlänge λ , die in der vierten Potenz in die Signalintensität eingeht. Zur Anregung von Raman-Signalen bieten sich also vor allem kurzwellige monochromatische Lichtwellen an. Hinzu kommt, dass die Änderung in der Frequenz beim Raman-Effekt ausgedrückt als Raman-Shift in cm^{-1} relativ zur Anregungswellenlänge ist, sodass auch aus diesem Grund eine monochromatische Anregung zwingend erforderlich ist. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass kleine Wellenlängen das Auftreten von Fluoreszenz begünstigen²⁵.

Wie bereits erwähnt treten Raman-aktive Molekülschwingungen nur bei Veränderung der Polarisierbarkeit α (siehe Gleichung (1)) auf, IR-aktive bei Veränderung des molekularen Dipolmoments μ . Die Zusammenhänge dieser Größen können beispielsweise am linearen CO_2 -Molekül erläutert werden. CO_2 verfügt über ein Symmetriezentrum, das Molekül ist also punktsymmetrisch. Folglich kann zwischen Schwingungen unterschieden werden, die zum Verlust des Zentrums führen und Schwingungen, bei denen es erhalten bleibt. Die symmetrische Valenzschwingung von CO_2 führt nicht zum Verlust des Symmetriezentrums. Die Elektronenhülle wird jedoch im Wechsel gestaucht und gestreckt was einer Änderung der Polarisierbarkeit entspricht (vgl. Abbildung 2). Die Schwingung ist Raman-aktiv.

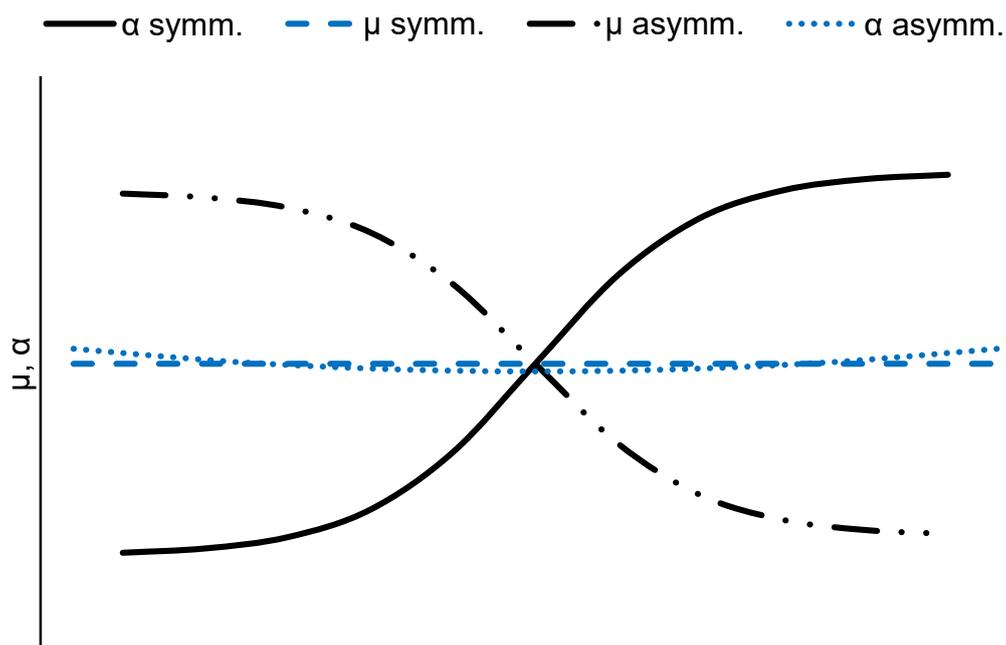


Abbildung 2: Symmetrische und asymmetrische Valenzschwingungen von CO_2 mit Änderungen der Polarisierbarkeit α und des Dipolmoments μ ^{25,28}.

Während der asymmetrischen Valenzschwingung des CO₂ nähern und distanzieren sich die Sauerstoffatome dem Kohlenstoff wechselseitig. Das Symmetriezentrum geht verloren, die Elektronenhülle bleibt jedoch weitestgehend unverändert. Die Schwingung ist also IR-aktiv. Dieser Zusammenhang wird als Alternativ-Verbot von Raman- und IR-Schwingungen bezeichnet und erklärt die Ähnlichkeit bzw. den ergänzenden Charakter beider Spektren.

1.2.2 Rayleigh Streuung

Rayleigh-Streuung tritt auf, wenn elektromagnetische Strahlung mit Partikeln in Wechselwirkung tritt, die kleiner als ca. 10 % der Wellenlänge des einfallenden Lichts sind. Bei den Partikeln kann es sich um Atome, Moleküle oder kleine Partikel in einem Medium handeln. Wenn Photonen auf diese kleinen Partikel treffen, erzeugen sie ein Dipolmoment, das proportional zum elektrischen Feld der Lichtwelle ist. Da die Teilchen viel kleiner sind als die Wellenlänge des Lichts, schwingen die induzierten Dipole und strahlen das Licht isotrop, d. h. gleichmäßig in alle Richtungen ab²⁹⁻³¹.

Die Intensität des gestreuten Lichts I hängt von der Intensität des einfallenden Lichts I_0 , der vierten Potenz der Frequenz ν bzw. umgekehrt von der vierten Potenz der Wellenlänge λ , und dem Durchmesser des streuenden Partikels ab. Diese Abhängigkeit ist in der Rayleigh-Streuungsformel mathematisch beschrieben³²:

$$I = I_0 \cdot \frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \cdot R^2} \cdot \left(\frac{2 \cdot \pi}{\lambda}\right)^4 \cdot \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^6 \quad (3)$$

wobei θ der Streuwinkel, R der Abstand zwischen dem Teilchen und dem Beobachter, n der Brechungsindex des Mediums, und λ die Wellenlänge des einfallenden Lichts ist.

Gemittelt über alle Winkel ist der Streuquerschnitt σ eines einzelnen Teilchens für die Rayleigh-Streuung durch folgenden Zusammenhang gegeben³³:

$$\sigma = \frac{8 \cdot \pi}{3} \cdot \left(\frac{2 \cdot \pi}{\lambda}\right)^4 \cdot d^6 \cdot \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \quad (4)$$

wobei d der Durchmesser des streuenden Teilchens ist. Der Querschnitt gibt die effektive Fläche an, die jedes Teilchen als Hindernis für den Fluss der Lichtwelle darstellt. Wie aus Gleichung (3) und (4) hervorgeht sind neben der Partikelgröße der Brechungsindex und die Wellenlänge maßgebliche Einflussfaktoren der Streuintensität.

Gerade in Hinblick auf dreidimensionale Zellkulturen können Änderungen des Brechungsindex und damit des Streuverhaltens durch variierende Umstände in der Kultur

hervorgerufen werden^{34,35}. Hierzu zählen u.a. die Zelldichte, die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix wie z.B. Kollagene oder Proteoglykane, sowie physiologische und pathologische Prozesse wie Apoptose oder Nekrose, die beide sowohl die Zelldichte als auch auf die Extrazellulärmatrix beeinflussen. Da die Rayleigh-Streuung keinerlei exogene Markierung bzw. externe Kontrastmittel erfordert, ermöglicht sie eine völlig nicht-invasive Bildgebung.

2 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Kapitel werden alle verwendeten Materialien (experimentelle Aufbauten inkl. ihrer optischen Bauteile, Chemikalien, Zellmodelle, sonstige Modellsysteme) und verwendete Methoden vorgestellt und deren Aufbau und Funktionsweise näher erläutert.

2.1 Planung und Aufbau des Raman-Photometers zur Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung

Die Emissionsleistung monochromatischer Lichtquellen zur Anregung des Raman-Effekts ist technisch über weite Bereiche variierbar und ist somit eine charakteristische Größe für alle nachfolgenden Entwicklungsschritte. Die eingestrahlte Leistung kann insbesondere bei der spektralen Analyse von biologischen Materialien wie Zellen und Zellverbänden die Probenintegrität negativ beeinflussen. Um in diesem Kontext die untere Nachweisgrenze des Raman-Effekts bei geringen Anregungsleistungen zu evaluieren wurden unterschiedliche Detektionskonzepte entwickelt und umgesetzt.

Die Signalintensität des Raman-Effekts ist gemäß Gleichung (2) direkt proportional zur Anregungsleistung. Die Erhöhung der Signalausbeute steht also in direktem Gegensatz zur Vermeidung potenzieller Strahlungsschäden an Zellproben aufgrund zunehmender Lichtleistung. Die grundlegende Machbarkeitsuntersuchung zur Anregung ausreichend hoher Raman-Signale bei geringer Laserleistung erfolgt an einem hierfür entwickelten photometrischen Modellaufbau. Photometer kommen in mehreren Bereichen u.a. der fertigen chemischen und pharmakologischen Industrie (z.B. Überwachung von Gaszusammensetzungen und Grenzwertüberwachung von Spureneuchte), sowie in sicherheitsrelevanten Anwendungen zum Einsatz zeigen aber auch grundsätzlich für medizinische Anwendungen Potenzial (z.B. Pulsoximeter). Sie zeichnen sich durch eine vergleichsweise simple und konsequenterweise robuste und günstige Bauform aus. Folglich sind sie für Prototyping und grundsätzliche Voruntersuchungen von im Vorfeld definierten Fragestellungen gut geeignet. Im UV/VIS- und NIR-Bereich zählen Transmission und Remission zu den gängigen optischen Anordnungen, was eine Vergleichbarkeit zu mikroskopischen Anwendungen zulässt. Der hier umgesetzte optische Aufbau besteht aus zwei separaten Funktionseinheiten, einer koaxialen Raman-Sonde und der Detektionseinheit. In Abbildung 3 ist die Ray-Tracing-Simulation (Software OptiCAD®; OptiCAD Corporation, Santa Fe, USA) des Detektionsprinzips dargestellt:

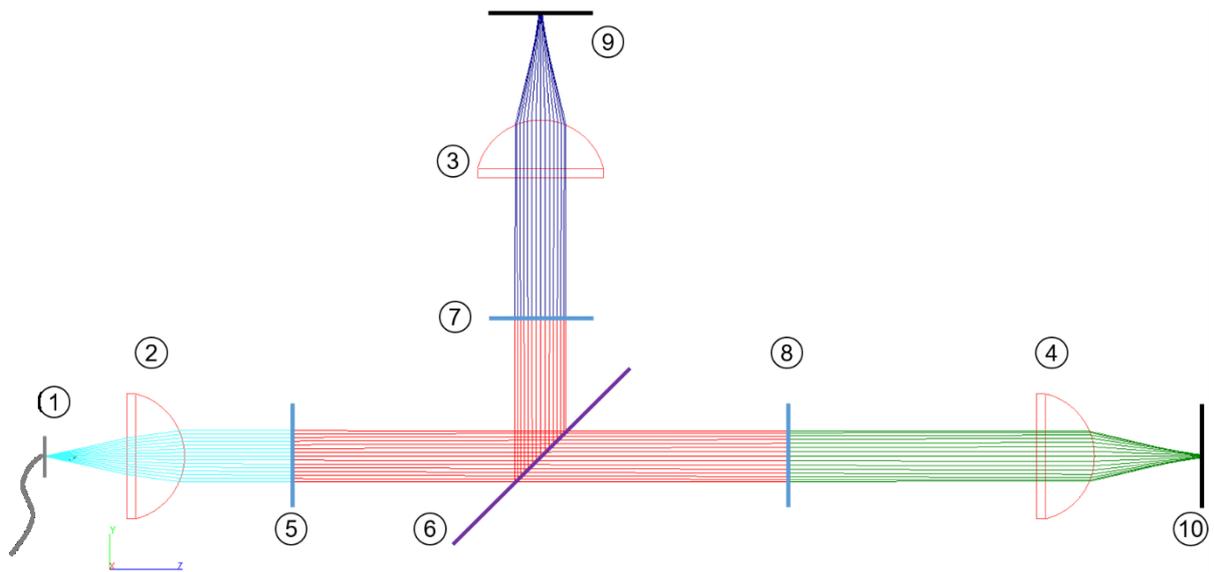


Abbildung 3: Raytracing Simulation Raman-Photometer. 1: Faserkopplung; 2-4: Plankonvexe Linsen zur Kollimation bzw. Fokussierung; 5: Langpassfilter $> 785 \text{ nm}$; 6: Strahlteiler 1:1; 7, 8: Bandpassfilter; 9, 10: MPPC-Detektoren. Für weitere Details zu den Komponenten vgl. Tabelle 1.

Die Detektionseinheit verfügt über eine Lichtwellenleiterkopplung als Schnittstelle zur Messsonde (vgl. Position 1 in Abbildung 3). Aus dieser Kopplung tritt gemäß der numerischen Apertur der Faser elektromagnetische Strahlung konisch aus. Das Strahlenbündel wird durch eine Plankonvexlinse (vgl. Position 2 in Abbildung 3) kollimiert. Die Kollimation ist eine strikte Voraussetzung, um die Spezifikationen der folgenden optischen Bauteile hinsichtlich Transmission- und Reflexionseigenschaften zu erfüllen. Die im Rohsignal der Strahlung enthaltene Rayleigh-Streuung der Anregungswellenlänge wird durch einen Langpassfilter entfernt (vgl. Position 5 in Abbildung 3), damit das im Vergleich mehrere Größenordnungen geringere Raman-Signal messbar wird. Das Photometer ist als Zweikanalkonzept ausgeführt, weswegen ein Strahlteiler das bereinigte Signal im Verhältnis 1:1 aufteilt (vgl. Position 6 in Abbildung 3). Im Anschluss an den Strahlteiler befinden sich in beiden Kanälen jeweils ein Bandpassfilter (vgl. Positionen 7 und 8 in Abbildung 3), der alle Photonen außerhalb der gewünschten Spektralbereiche abblockt. Abschließend fokussieren zwei Plankonvexlinsen (vgl. Positionen 3 und 4 in Abbildung 3) die isolierten Raman-Photonen auf Multi-Pixel-Photon-Counter (MPPC)-Detektoren (Hamamatsu, Hamamatsu-shi, Japan). MPPC-Detektoren (vgl. Positionen 9 und 10 in Abbildung 3) sind Einzelphotonenzähler und basieren auf Avalanche-Dioden. Der Einsatz von Einzelphotonenzählern erhöht die Nachweisempfindlichkeit, sodass geringere Lichtintensitäten wie im Falle des Raman-Effekts mit geringeren Integrationszeiten oder Anregungsleistungen messbar werden. Die Vergrö-

ßerung der sensitiven Fläche eines MPPC-Detektors ergibt sich aus dem Zusammenschluss mehrerer Avalanche-Dioden. Der Detektor leitet Photonen Signale als Transistor-Transistor-Logik (TTL)-Pulse an ein Field Programmable Gate Array (FPGA). Dieser zählt die Pulse und stellt sie als quantifiziertes Signal der Auswerteeinheit zur Verfügung.

Tabelle 1: Komponentenliste des Raman-Photometers zur Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung. Nummerierung gemäß Abbildung 3.

| Position | Komponente | Hersteller |
|----------|---|---------------------|
| 1 | Faserkopplung | Thorlabs Inc. |
| 2 – 4 | Plankonvexlinse | Thorlabs Inc. |
| 5 | Langpassfilter, Blockierung ab 790 nm | Semrock Inc. |
| 6 | Strahlteiler Teilungsverhältnis 1:1 | Thorlabs Inc. |
| 7 | Bandpassfilter, Zentralwellenlänge 840 nm, FWHM 10 nm | Thorlabs Inc. |
| 8 | Bandpassfilter, Zentralwellenlänge 830 nm, FWHM 10 nm | Thorlabs Inc. |
| 9, 10 | MPPC-Detektor, Einzelphotonenzähler, aktive Fläche 1,35 mm | Hamamatsu Photonics |
| 11 | Laser, Emissionswellenlänge 785 nm, Optische Leistung 40 mW (nicht dargestellt in Abbildung 3) | eagleyard photonics |
| 12 | tecSaaS CB, embedded platform (nicht dargestellt in Abbildung 3) | tec5 AG |

Das Setup wird durch die Messung diskreter Konzentrationsstufen von ausgewählten Chemikalien evaluiert, sowie in einem Proof-of-Concept für die Reaktionsverfolgung einer Aminwäsche eingesetzt²¹.

2.2 Planung und Aufbau eines spektrophotometerischen Hybriddetektors für Raman-Streuung

Das zuvor beschriebene Photometerkonzept wird in seinem Funktionsumfang erweitert, sodass die parallele Detektion mehrerer spektraler Informationen möglich ist. Hierfür wird ein optisch beugendes Gitter ergänzt, dass die räumliche Trennung unterschiedlicher Wellenlängen ermöglicht.

Die im folgenden beschriebene Entwicklung des Spektrophotometers umfasst die zugrundeliegende Raytracing Simulation, Parameterstudien von Schlüsselkomponente und die daraus abgeleitete Teileliste. Als allgemeine Randbedingung wird die Unterbringung in einem Ex d-Gehäuse der Reihe 8264 (R. Stahl AG, Waldenburg, Deutschland) vorgesehen, wodurch die maximale Gerätegeometrie in ihrer Grundfläche auf 157 mm und 282 mm begrenzt ist. Ziel der Simulation war es, soweit möglich, eine Vorauswahl der optischen Komponenten zu treffen. Folglich wurde das Modell Schrittweise durch verschiedene optische Bauteile ergänzt.

Die spektrale Auftrennung am Blaze-Gitter stellt die zentrale Funktionseinheit des behandelten Spektrophotometeransatzes dar. Zu Beginn wird die Simulation deshalb auf den Signalpfad, bestehend aus einer Punktlichtquelle, zwei Plankonvexlinsen, dem Blaze-Gitter und einer Detektionsfläche, reduziert. An diesem Basismodell erfolgte die Untersuchung der direkten Gitterparameter Anstellwinkel und Gitterfrequenz sowie der Brennweite der fokussierenden Linse. Die Auswahl optischer Bauteile orientiert sich an Produktkatalogen gängiger Anbieter wie Thorlabs Inc. (Newton, USA), Edmund Optics Inc. (Barrington, USA) und Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland). Die Startbedingungen sind ein Gitter mit Blaze-Wellenlänge von 750 nm, einer Gitterfrequenz von 600 mm^{-1} und einem Anstellwinkel von 45° sowie unbeschichtete N-BK7 Linsen mit einem Zoll Brennweite und einem Zoll Durchmesser zur Kollimation und Fokussierung der Raman-Signale. Die Blaze-Wellenlänge ist hierbei auf eine Anregung bei 785 nm abgestimmt. Das Basismodell ist in Abbildung 4 dargestellt.

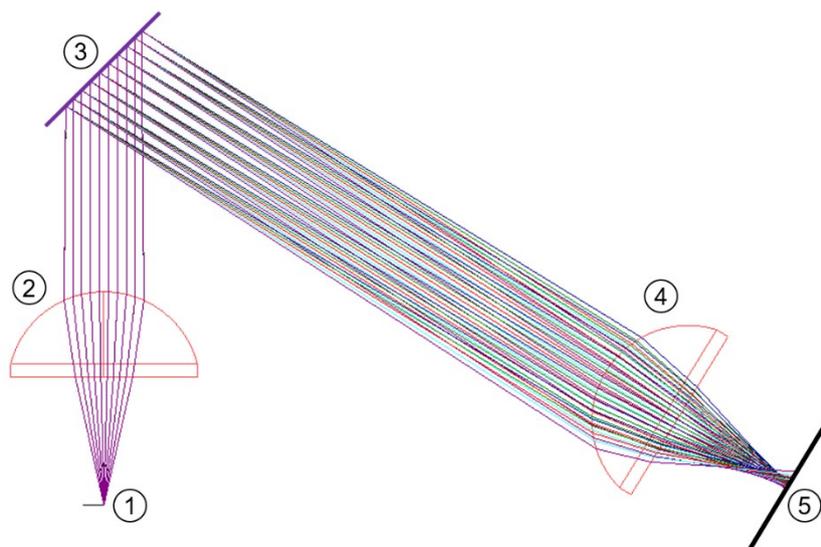


Abbildung 4: Basismodell zur Simulation eines dispersiven Beugungsgitters. 1: Raman-Signal; 2: Kollimatorlinse; 3: reflexives Blaze-Gitter; 4: Fokuslinse; 5: Glasfaserzeile.

Die Abstände der Planseiten der Linsen zur Lichtquelle bzw. Detektionsfläche entsprechen der hinteren Brennweite von 17,6 mm. Der Abstand des Gittermittelpunkts zum Apex der Fokulinse beträgt 8 cm, der Abstand der Mittelpunkte der gekrümmten Kollimatorlinse und des Gitters 3,7 cm. Die Fokulinse ist so ausgerichtet, dass ein am Gittermittelpunkt gebeugter Strahl mit 785 nm Wellenlänge orthogonal auf den Fokulinseapex trifft und demnach die Linse ungebrochen durchläuft. Die Darstellung des Raman-Effektes wird durch die Integration vier weiterer Wellenlängen in äquidistanten Abständen von 15 nm simuliert. Für benachbarte Wellenlängen betragen die entsprechenden Raman-Shifts beginnend bei 785 nm 0 cm^{-1} und 240 cm^{-1} , 240 cm^{-1} und 470 cm^{-1} , 470 cm^{-1} und 690 cm^{-1} , sowie 690 cm^{-1} und 905 cm^{-1} . Die gängige numerische Apertur von Glasfasern ($NA = 0,22$) gibt einen Öffnungswinkel der Lichtquelle von $25,42^\circ$ vor.

Um die spektrale Auftrennung zu beurteilen, werden pro Wellenlänge 100 Strahlengänge simuliert. Als Beurteilungsgröße dient die Dispersion, d.h. die Abstände korrespondierender Strahlengänge direkt benachbarter Wellenlängen auf der Detektionsfläche bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

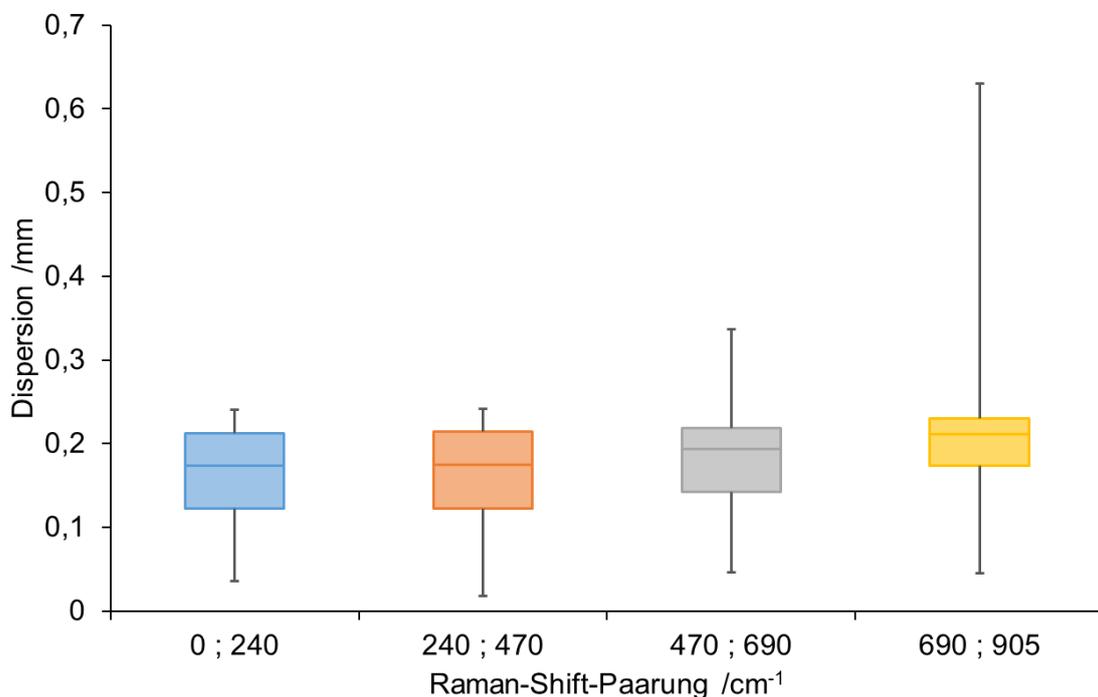


Abbildung 5: Spektrale Auftrennung des Basismodells. Linsenfokallängen 25,4 mm; Gitterfrequenz 600 mm^{-1} .

Aus Abbildung 5 geht hervor, dass die Range mit zunehmendem Abstand zur Anregungswellenlänge ansteigt. Während die ersten beiden Wellenlängenpaarungen nur geringfügig voneinander abweichen, weichen die Dritte um einen Faktor von 1,4 und der Vierte um 2,9 ab. Andererseits verhält sich der Interquartilsabstand gegenläufig

zur Range. Dies zeigt einen deutlichen Einfluss der Linsenfehler auf die Abbildung, was sich in einer schlechteren Fokussierung von Strahlengängen im Randbereich der Linse äußert. Die Medianwerte der Strahlabstände bewegen sich zwischen 173 nm und 210 nm. Eine ausreichende Dispersion der Wellenlängen für eine Abbildung auf Glasfasern mit Durchmessern von $\leq 200 \mu\text{m}$ ist unter Berücksichtigung der Range nicht gegeben.

Um eine größere Dispersion zu erreichen kann zum einen die Brennweite der Fokusslinse erhöht und zum anderen ein Gitter mit höherer Gitterfrequenz eingesetzt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Brennweite auf die Dispersion wird bei konstantem Abstand von Fokusslinse und Gitter und konstantem Linsendurchmesser die Brennweite der Linse schrittweise auf 50 mm erhöht. Als Beurteilungsgröße wird die Dispersion direkt benachbarter Wellenlängen herangezogen und über der Brennweite aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt.

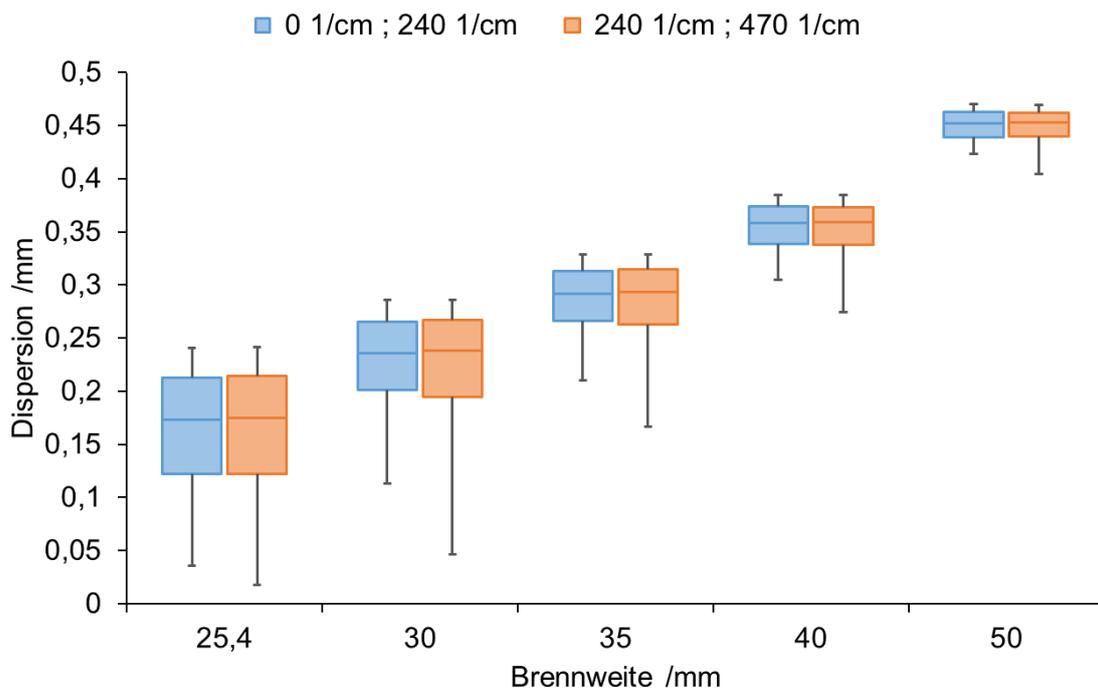


Abbildung 6: Dispersion von 0 cm^{-1} zu 240 cm^{-1} (785 nm und 800 nm) sowie 240 cm^{-1} zu 470 cm^{-1} (800 nm und 815 nm) als Funktion der Brennweite.

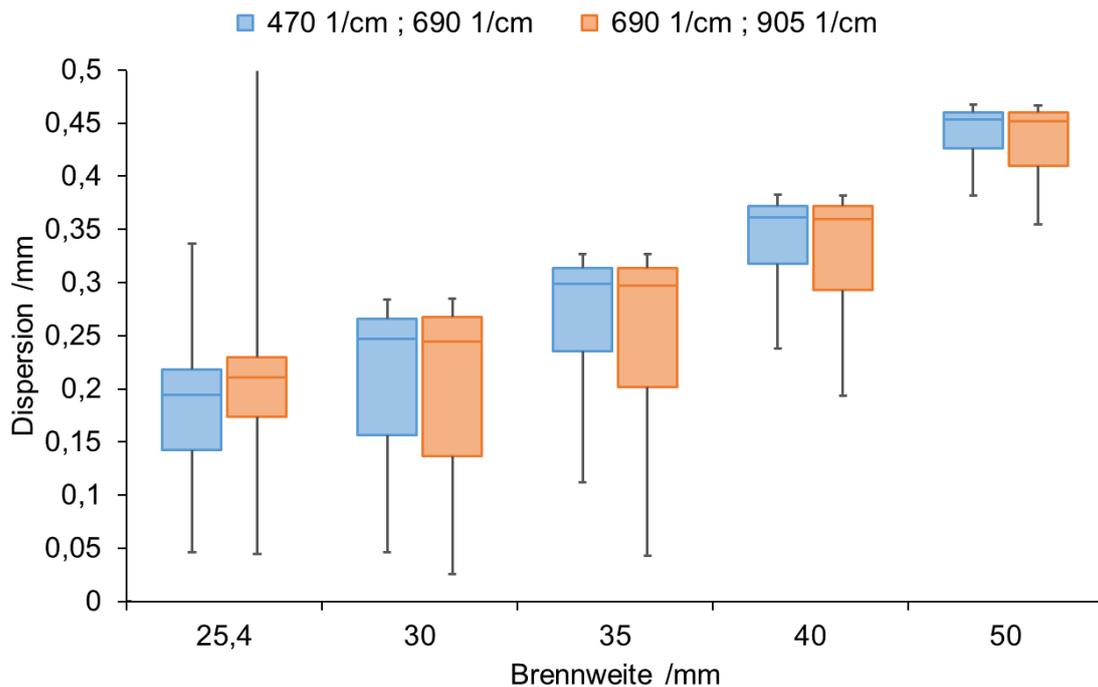


Abbildung 7: Dispersion von 470 cm^{-1} zu 690 cm^{-1} (815 nm und 830 nm) sowie 690 cm^{-1} zu 905 cm^{-1} (830 nm und 845 nm) als Funktion der Brennweite.

Für alle betrachteten Wellenlängen ist eine Zunahme der Dispersion mit größeren Brennweiten bei abnehmender Spannweite zu erkennen (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7). Es findet also neben verbesserter Dispersion auch eine bessere Fokussierung statt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei konstantem Linsendurchmesser und steigender Brennweite der Krümmungsradius der Linsen zunimmt, wodurch die sphärische Aberration abnimmt. Die Median-, Quartils- und Extremwerte der untersuchten Wellenlängenpaarungen verhalten sich mit wenigen Ausnahmen linear. Zur besseren Übersicht sind die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Pearson Korrelationskoeffizienten der Quartile der Dispersion als Funktion der Brennweite für alle simulierten Wellenlängenkombinationen. Untersuchte Brennweiten: $25,4\text{ mm}$, 30 mm , 35 mm , 40 mm , 50 mm .

| Raman-Shift | $R^2\text{ Q}_0$ | $R^2\text{ Q}_1$ | $R^2\text{ Q}_2$ | $R^2\text{ Q}_3$ | $R^2\text{ Q}_4$ |
|---|-----------------------|-----------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| $0\text{ cm}^{-1} / 240\text{ cm}^{-1}$ | 0,987835 | 0,989122 | 0,994166 | 0,997189 | 0,998494 |
| $240\text{ cm}^{-1} / 470\text{ cm}^{-1}$ | 0,978789 | 0,991225 | 0,994349 | 0,997284 | 0,998472 |
| $470\text{ cm}^{-1} / 690\text{ cm}^{-1}$ | 0,951137 | 0,979530 | 0,996921 | 0,998064 | 0,771308 (0,99759) |
| $690\text{ cm}^{-1} / 845\text{ cm}^{-1}$ | 0,867605 (0,95771) | 0,897108 (0,99224) | 0,995730 | 0,997774 | 0,024967 (0,99762) |

Wie zuvor (vgl. Abbildung 5) zeigen Wellenlängen mit größerem Abstand zur Anregung schlechtere Ergebnisse. Insbesondere die Raman-Shift-Paarung 690 cm^{-1} und 905 cm^{-1} korreliert z. T. in sehr geringem Maße mit der Brennweite. Ausschlaggebend ist hierbei die Brennweite von 25,4 mm. Die in Klammern angegebenen Korrelationskoeffizienten in Tabelle 2 vernachlässigen diese Brennweite, was zu einer deutlichen Verbesserung der Korrelation von Dispersion und Brennweite führt. Auch hierin ist der Einfluss der sphärischen Aberration zu erkennen. Die Linse mit dem kleinsten Krümmungsradius zeigt für Strahlen, die in ihrer Peripherie gebrochen werden die schlechteste Abbildung.

Die Medianwerte der Dispersion aller Wellenlängenpaarungen weichen bei 50 mm Brennweite nur geringfügig voneinander ab und erreichen ca. $452\text{ }\mu\text{m}$. Dies stellt eine Verbesserung um einen Faktor von 2,14 bis 2,6 dar gegenüber der Brennweite von 25,4 mm dar (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7). Die Spannweite verkleinert sich bei 50 mm Brennweite um 70 % bis 80 % im Vergleich zu 25,4 mm Brennweite, weicht aber im direkten Vergleich der Wellenlängenpaarungen deutlich voneinander ab. So beträgt die Spannweite bei der 0 cm^{-1} und 240 cm^{-1} Paarung $46\text{ }\mu\text{m}$, bei 690 cm^{-1} und 905 cm^{-1} $112\text{ }\mu\text{m}$. Ähnlich verhält es sich beim Interquartilsabstand. Dieser sinkt zwischen 56 und 76 %, beträgt aber bei der Dispersion von 0 cm^{-1} und 240 cm^{-1} $24\text{ }\mu\text{m}$ und bei 690 cm^{-1} und 905 cm^{-1} $50\text{ }\mu\text{m}$.

Die wesentliche Stellgröße in der Anordnung optischer Komponenten ist der Anstellwinkel des Gitters und der hieraus resultierende Lichtweg des Detektionspfads. Um den zugänglichen Einstellbereich zu ermitteln und potentielle Einflüsse auf die Dispersion aufzuklären wird der Anstellwinkel zwischen 30° und 60° in äquidistanten Schritten von $7,5^\circ$ variiert. Als Beurteilungsgröße wird wie zuvor die Dispersion direkt benachbarter Wellenlängen berechnet und über dem Gitteranstellwinkel aufgetragen (vgl. Abbildung 8).

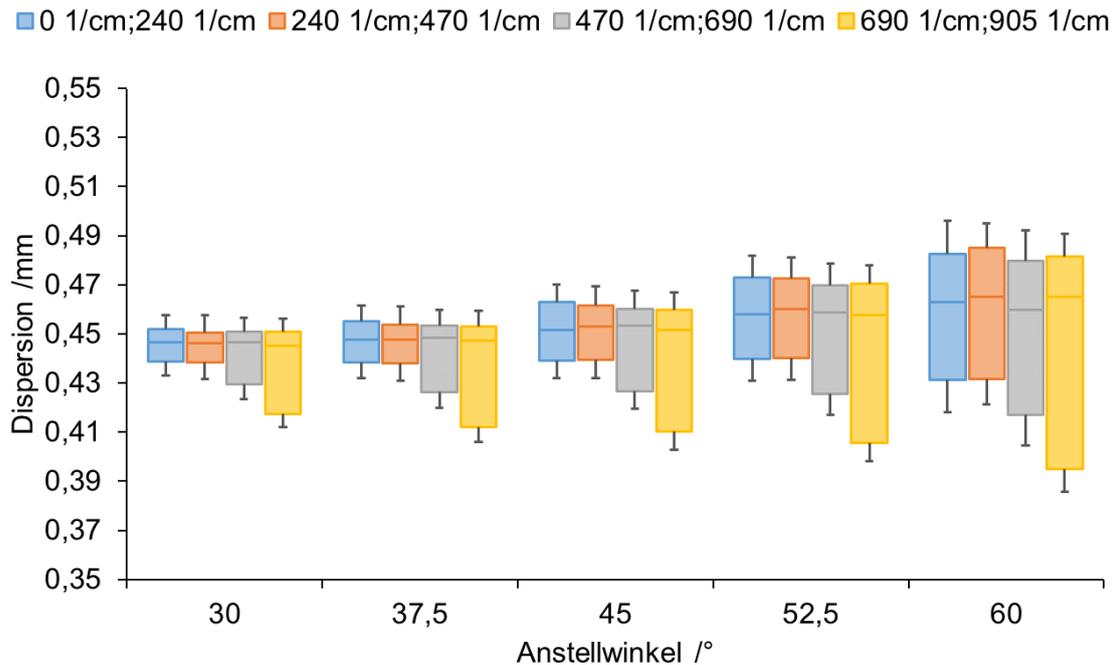


Abbildung 8: Dispersion als Funktion des Gitteranstellwinkels.

In Abbildung 8 sind insgesamt drei Effekte erkennbar. Es erfolgt eine geringfügige Zunahme der Dispersion mit zunehmendem Gitteranstellwinkel in allen Wellenlängenpaarungen. Ebenso steigen die Spannweiten bzw. die Interquartilsabstände mit dem Gitteranstellwinkel. Des Weiteren nehmen bei konstantem Anstellwinkel Interquartilsabstände bzw. Ranges mit ansteigender Wellenlänge zu. Die nur geringe Zunahme in der Dispersion entspricht unter Berücksichtigung der Gittergleichung den Erwartungen. Die Gittergleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen Beugungswinkel θ , Beugungsordnung m , Gitterfrequenz b^{-1} , Wellenlänge λ und Einfallswinkel θ_e ³⁶:

$$\sin \theta = \pm m \cdot \lambda \cdot b^{-1} + \sin \theta_e \quad (5)$$

Wie in Gleichung (5) zu sehen ist vergrößert sich der Beugungswinkel nur mit starken Änderungen des Einfallswinkels d.h. des Anstellwinkels des Gitters. Die Zunahme der Spannweiten und Interquartilsabstände mit dem Anstellwinkel ist vor allem darauf zurückzuführen, dass bei größerem Anstellwinkel eine zunehmend ellipsenförmige Fläche auf dem Gitter ausgeleuchtet wird. Dies führt wiederum zu höheren Gangunterschieden der Strahlen und einer großflächigeren Ausleuchtung der Randbereiche der fokussierenden Linse. Die Zunahme in Ranges und Interquartilsabständen bei konstantem Anstellwinkel ist auf den sphärischen Linsenfehler zurückzuführen, da mit ansteigender Wellenlänge ein Fortschreiten in die Linsenperipherie stattfindet.

Als dritter Parameter des Grundmodells wird die Gitterfrequenz, d.h. die Anzahl der Linienpaare pro Millimeter Gitterlänge untersucht. Laut Gleichung (5) stellt die Gitterfrequenz die maßgebliche Stellgröße der spektralen Auftrennung dar. Basierend auf den Voruntersuchungen zu Brennweite und Anstellwinkel wird im Basismodell eine zöllige Linse mit 25,4 mm Brennweite zur Kollimation, eine zöllige Linse mit 50 mm Brennweite zur Fokussierung und ein Gitteranstellwinkel von 45° simuliert. Insgesamt werden für den gewählten Spektralbereich drei Blaze-Gitter untersucht. Die Ergebnisse der Simulation sind in Abbildung 9 dargestellt.

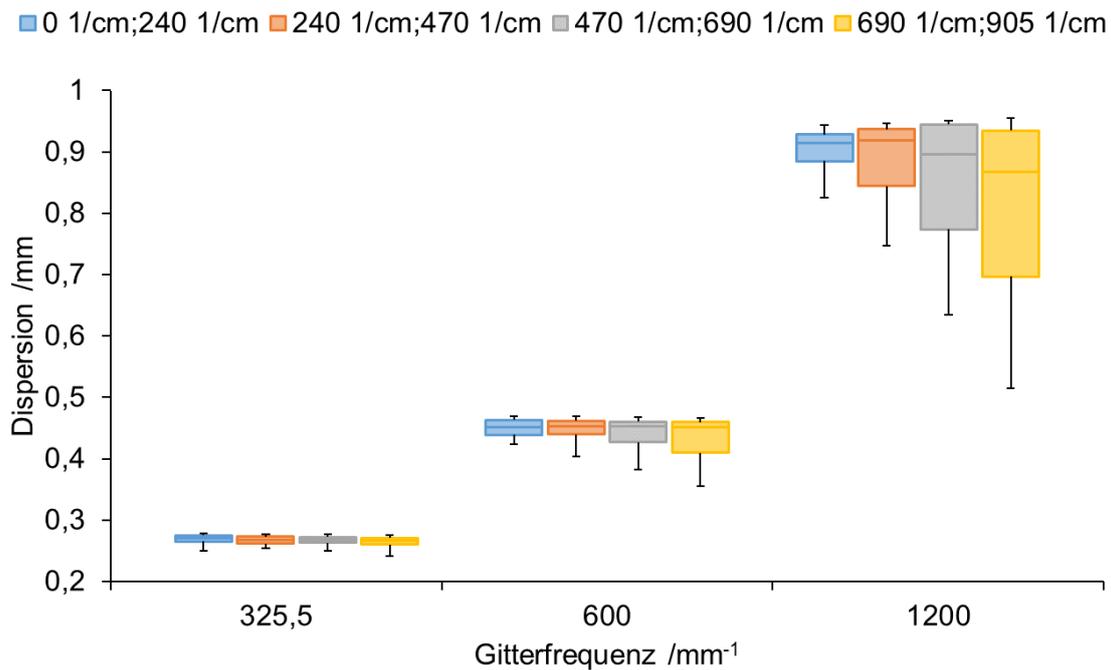


Abbildung 9: Dispersion als Funktion der Gitterfrequenz.

Analog zu den vorherigen Parameterstudien sind insgesamt drei Effekte in Abbildung 9 zu erkennen. Eine Zunahme der Dispersion sowie der Spannweiten und Interquartilsabstände mit der Gitterfrequenz und steigende Ranges und Interquartilsabstände mit größeren Wellenlängen bei konstanter Gitterfrequenz. Die ersten beiden Effekte können mit Gleichung (5) erklärt werden. In dieser ist zu sehen, dass der Sinus des Beugungswinkels Θ_e und damit die Dispersion direkt proportional zur Gitterfrequenz b^{-1} und zur Wellenlänge λ ist. Demnach steigt die Dispersion mit zunehmender Wellenlänge oder Gitterfrequenz. Werden Winkeländerungen durch die Variation der Gitterfrequenz bei konstanter Wellenlänge betrachtet zeigen sich Änderungen von $13,2^\circ$ bis $14,1^\circ$ für die Frequenzerhöhung von $325,5 \text{ mm}^{-1}$ auf 600 mm^{-1} und Änderungen von $27,2^\circ$ bis $29,4^\circ$ bei der Frequenzerhöhung von $27,2^\circ$ bis $29,4^\circ$. Hierdurch kommt

es auch zu einer großflächigeren Ausleuchtung der randnahen Bereiche der Fokulinse und einem größeren Einfluss des sphärischen Linsenfehlers auf die Abbildung. Für die gewählte Wellenlängendifferenz von 15 nm ergeben sich Winkeländerungen von ca. $0,3^\circ$, $0,5^\circ$ und $1,1^\circ$ pro Wellenlängendifferenz bei den zugehörigen Gitterfrequenzen von $325,5 \text{ mm}^{-1}$, 600 mm^{-1} und 1200 mm^{-1} . Dies resultiert ebenfalls in einer stärkeren Ausleuchtung der Linsenperipherie und einer Begünstigung des sphärischen Linsenfehlers, was sich in den größeren Interquartilsabständen und Ranges bei konstanter Gitterfrequenz äußert.

In allen Parameterstudien sind Einflüsse der Linsenfehler im Basismodell deutlich erkennbar. Zur Korrektur der Linsenfehler werden insgesamt drei Lösungsansätze untersucht, die Anpassung der Zentralwellenlänge, die Erhöhung des Fokuslinsendurchmessers und der Einsatz asphärischer Linsen. Zunächst erfolgt eine Anpassung des zentral abgebildeten Raman-Shifts von 0 cm^{-1} auf 470 cm^{-1} (bzw. 785 nm auf 815 nm). Im Basismodell erfolgt eine Anpassung der Ausrichtung von Fokulinse und Detektorschirm entsprechend der Zentralwellenlängen. Kollimator- und Fokulinse bleiben unverändert mit zölligem Durchmesser und Brennweiten von $25,4 \text{ mm}$ bzw. 50 mm . Der Gitteranstellwinkel beträgt 45° , die Gitterfrequenz 600 mm^{-1} . Die Simulationsergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

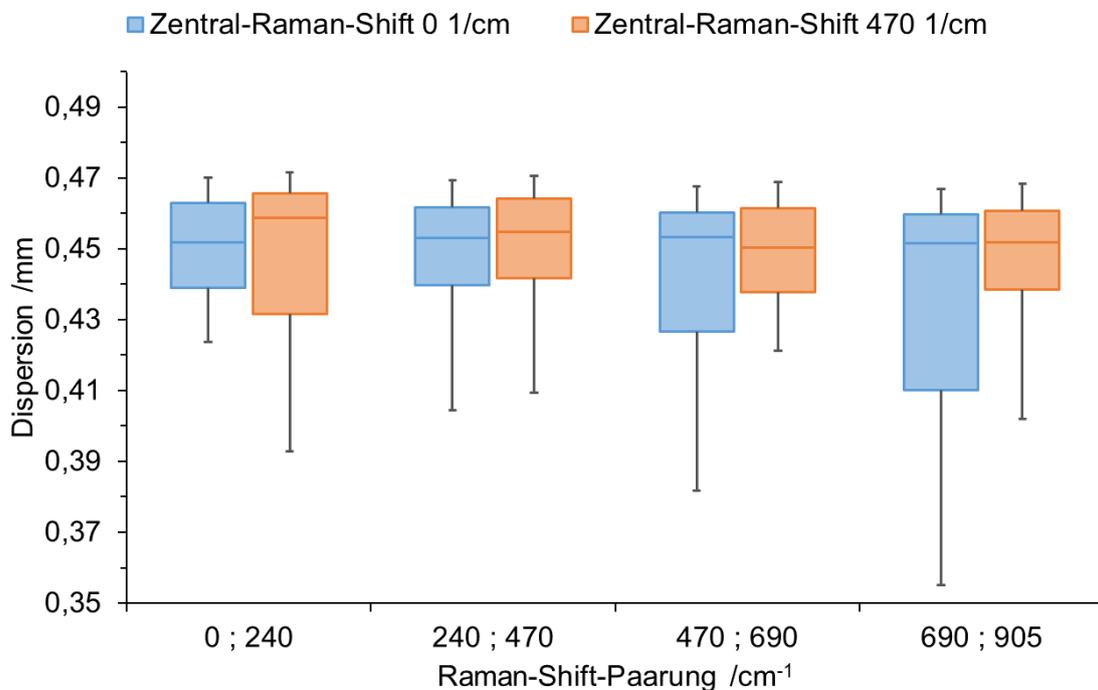


Abbildung 10: Anpassung der Zentralwellenlänge zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers.

Die Ausgangssituation mit 0 cm^{-1} (bzw. 785 nm) als Zentralwellenlänge zeigt in Abbildung 10 wie erwartet zunehmende Ranges und Interquartilsabstände mit zunehmender Wellenlänge. Durch die Anpassung auf 470 cm^{-1} (bzw. 815 nm) wird im Vergleich der einzelnen Wellenlängenpaarungen eine deutlich homogenere Abbildungsqualität erreicht. Insbesondere die ursprünglich randständigen Wellenlängen profitieren, was sich in Verminderungen der Spannweiten um die Faktoren 1,8 bzw. 1,7 sowie der Interquartilsabstände um die Faktoren 1,4 und 2,2 für die Raman-Shift-Paarungen 470 cm^{-1} zu 690 cm^{-1} (815 nm und 830 nm) und 690 cm^{-1} zu 905 cm^{-1} (830 nm und 845 nm) äußert.

Zur Reduktion der Abbildungsfehler von Linsen empfiehlt sich eine maximale Ausleuchtung von $2/3$ ihrer Projektionsfläche. In diesem Sinne wird als zweiter Lösungsansatz zur Minimierung des sphärischen Linsenfehlers der Durchmesser der Fokulinse bei konstanter Brennweite ($f = 60\text{ mm}$) auf zwei Zoll erhöht. Ebenfalls wird die Gitterfrequenz gemäß den Erkenntnissen der Parameterstudie auf 1200 cm^{-1} erhöht. Die Dispersionen aller Wellenlängenpaarungen ist für beide Linsendurchmesser in Abbildung 11 dargestellt.

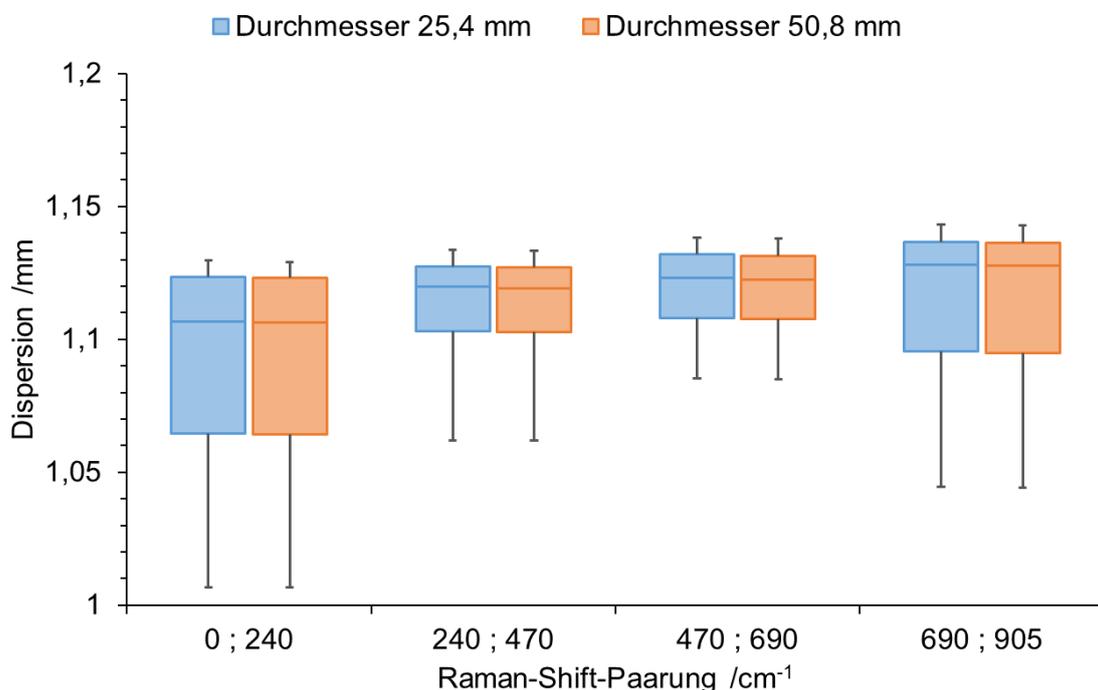


Abbildung 11: Erhöhung des Linsendurchmessers zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers.

Die in Abbildung 11 aufgeführten Box-Whisker-Plots weisen nahezu identische Quartilswerte, Medianwerte und Extrema auf. Abweichungen bewegen sich zwischen $0,2\%$ und $1,6\%$ und können somit vernachlässigt werden. Laut Simulation hat der Linsendurchmesser also keinen Einfluss auf die Dispersion oder die Abbildungsqualität. Um

einen späteren Spektrophotometer-Prototyp möglichst flexibel gestalten zu können werden als Durchmesser der Fokuslinse zwei Zoll beibehalten.

Asphärische Linsen weichen in einer gekrümmten Fläche von der allgemeinen Kugel- form ab und sind bezüglich ihrer Längsachse rotationssymmetrisch. Durch diese For- manpassung können Abbildungsfehler vermieden oder reduziert werden. Der Einsatz asphärischer Linsen stellt folglich den dritten Lösungsansatz zu Minimierung der Lin- senfehler dar. Im Basismodell werden sowohl einzöllige als auch ein- und zweizöllige Linsenpaarungen untersucht. In der Referenzsimulation für einzöllige Linsen erfolgt Kollimation und Fokussierung durch plankonvexe Linsen mit Brennweiten von jeweils 25,4 mm. Zum Vergleich wird zunächst die Fokuslinse durch eine asphärische Linse mit 16 mm Brennweite und anschließend auch die Kollimationslinse durch eine asphä- rische Linse gleicher Brennweite ersetzt. Die Dispersion aller Wellenlängenpaarungen ist für die beschriebenen Linsenkombinationen in Abbildung 12 dargestellt.

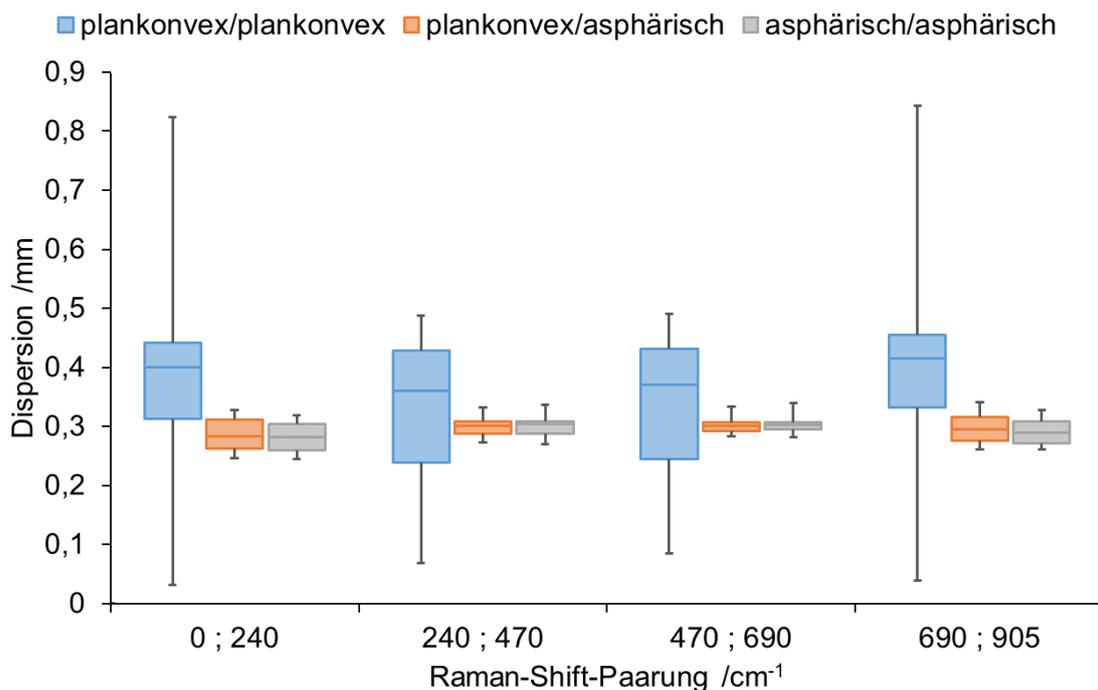


Abbildung 12: Einsatz asphärischer Linsen zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers. Kollimation plankonvex / Fokussierung plankonvex; Kollimation plankonvex / Fokussierung asphärisch; Kollimation asphärisch / Fokussierung asphärisch.

Wie in Abbildung 12 deutlich zu erkennen ist wird durch den Einsatz einer asphärischen Linse in der Fokussierung eine deutliche Abnahme in den Ranges und Interquartilsabständen und damit eine Verbesserung der Abbildungsqualität erreicht. Die Spannweiten verkleinern sich hierbei um den Faktor 7,2 bis 10,1 und Interquartilsab-

stände um 2,7 bis 12,4. Wird auch die Kollimation durch eine asphärische Linse umgesetzt kommt es zu geringfügigen Abnahmen der Spannweiten und Interquartilsabstände der in der Linsenperipherie gebrochenen Wellenlängen (vgl. Abbildung 12 Wellenlängenpaarungen 0 cm^{-1} mit 240 cm^{-1} und 690 cm^{-1} mit 905 cm^{-1}) und geringfügigen Zunahmen der Spannweiten und Interquartilsabstände der im Linsenzentrum gebrochenen Wellenlängen (vgl. Abbildung 12 Wellenlängenpaarung $800\text{ nm}/815\text{ nm}$ und $815\text{ nm}/830\text{ nm}$). Ein Vergleich der Medianwerte zeigt bei asphärischer Fokussierung eine um ca. 25% geringere Dispersion im Vergleich zu plankonvexer Fokussierung. Dies ist auf die kleinere Brennweite der asphärischen Linse zurückzuführen.

Für die Untersuchung einzölliger und zweizölliger Linsenpaarungen wurde ein Referenzmodell mit einzölliger, plankonvexer Kollimatorlinse und zweizölliger, plankonvexer Fokuslinse erstellt. Anschließend erfolgte Anpassungen der Linsen. Die untersuchten Linsenpaarungen waren:

Tabelle 3: Untersuchte Kombinationen von Kollimation und Fokussierung.

| Variante | Kollimatorlinse | | | Fokuslinse | | |
|----------|-----------------|------------|----------------|----------------|------------|----------------|
| | Durchmesser /" | Form | Brennweite /mm | Durchmesser /" | Form | Brennweite /mm |
| 1 | 1 | plankonvex | 25,4 | 2 | plankonvex | 60 |
| 2 | 1 | asphärisch | 16 | 2 | plankonvex | 60 |
| 3 | 1 | plankonvex | 25,4 | 2 | asphärisch | 32 |
| 4 | 1 | asphärisch | 16 | 2 | asphärisch | 32 |

Die Einstellungen der weiteren Modellparameter sind:

- Gitterfrequenz: 1200 mm^{-1}
- Gitteranstellwinkel: 45°
- Linsenmaterial asphärischer Linsen: B270
- Linsenmaterial plankonvexer Linsen: N-BK7

Die Dispersion aller Wellenlängenpaarungen ist für die beschriebenen Linsenvariationen in Abbildung 13 dargestellt.

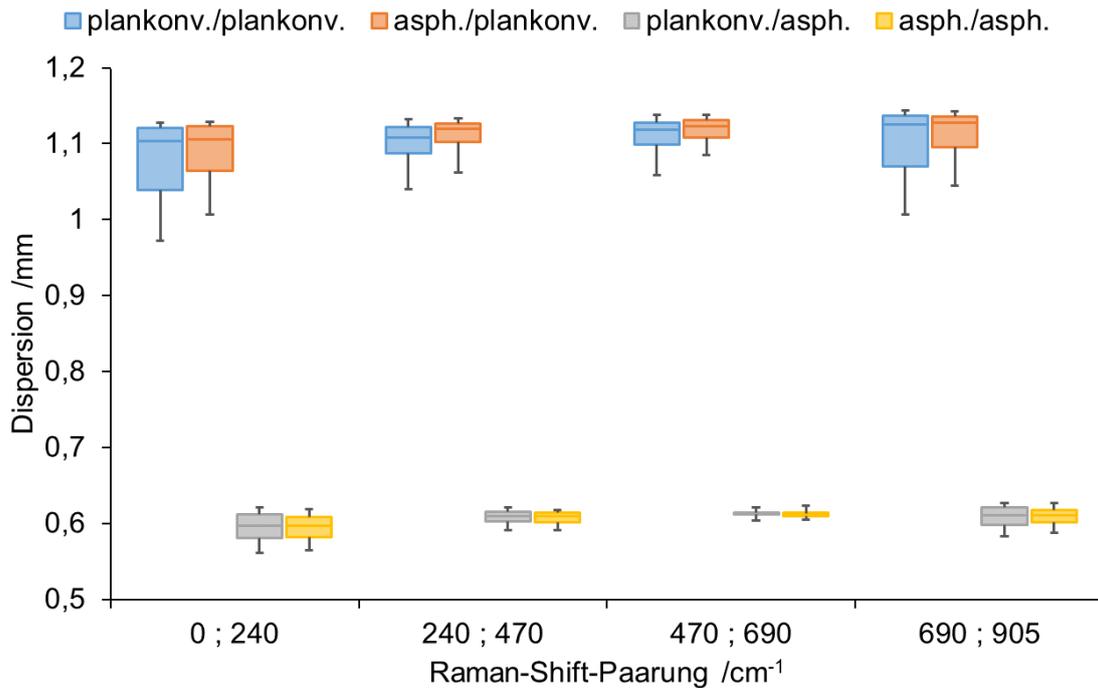


Abbildung 13: Einsatz asphärischer Linsen zur Korrektur des sphärischen Linsenfehlers. Kollimation 1" plankonvex/Fokussierung 2" plankonvex; Kollimation 1" plankonvex/Fokussierung 2" asphärisch; Kollimation 1" asphärisch/Fokussierung 2" asphärisch.

Der Vergleich der Medianwerte in Abbildung 13 zeigt eine Abweichung der Dispersion um den Faktor 1,8 zwischen asphärischer und plankonvexer Fokussierung. Dies war hinsichtlich der unterschiedlichen Brennweiten zu erwarten. Die Spannweiten und Interquartilsabstände der Dispersion bei zweizölliger, plankonvexer Fokussierung werden durch den Einsatz einer einzölligen, asphärischen Kollimatorlinse um den Faktor 1,3 bis 1,5 bzw. 1,2 bis 1,6 verbessert. Bei zweizölliger, asphärischer Fokussierung werden durch den Einsatz eines asphärischen Kollimators wie zuvor die in der Linsenperipherie gebrochenen Wellenlängen im Vergleich zu zentral gebrochene Wellenlängen begünstigt. Die Gegenüberstellung von plankonvexer und asphärischer Fokussierung zeigt eine Reduzierung von Ranges und Interquartilsabständen auf Seiten der asphärischen Linse um den Faktor 2,2 bis 2,9 bzw. 1,9 bis 6,5 für asphärische Kollimation und 2,6 bis 4,4 bzw. 2,6 bis 10,6 für plankonvexe Kollimation (vgl. Abbildung 14).

Als abschließende Beurteilungsgröße des Basismodells werden die Abstände der einzelnen Strahlen einer Wellenlänge vom Mittelpunkt des jeweiligen Wellenlängenflecks ermittelt, um die Fokusradien hinsichtlich der Glasfaserdurchmesser überprüfen zu können. Hierzu diene die Gegenüberstellung von zweizölliger, plankonvexer Fokus-

sierung und zweizölliger, asphärischer Fokussierung jeweils mit einzölliger, asphärischer Kollimation. Die Fokusradien aller Wellenlängen sind für beide Modelle in Abbildung 14 dargestellt.

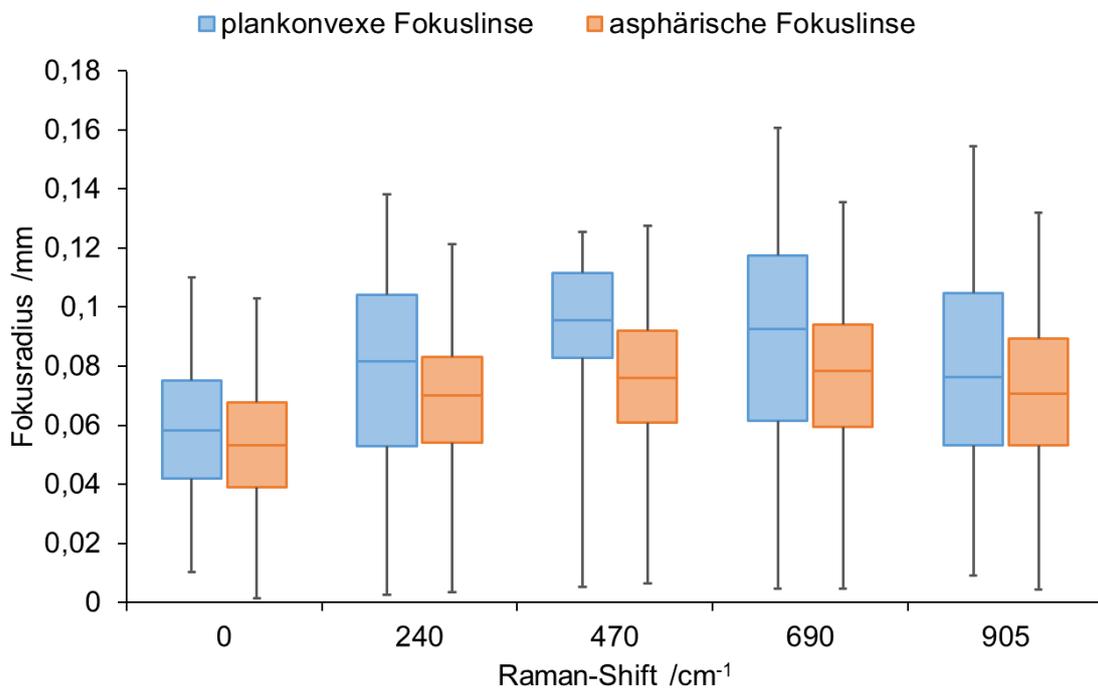


Abbildung 14: Fokusradien plankonvexer und asphärischer Linsen bei nomineller Brennweite.

Bei asphärischer Fokussierung werden für alle Wellenlängen kleinere Fokusradien erreicht. Der Vergleich der Medianwerte zeigt eine Abnahme zwischen 8% und 21% (vgl. Abbildung 14). Insbesondere die Interquartilsabstände verkleinern sich und zeigen eine gleichmäßigere Ausdehnung für alle Wellenlängen. Hier werden Verringerungen zwischen 12% und 43% erreicht. Auch die Spannweiten zeigen eine geringere Ausdehnung mit Verkleinerungen zwischen 13% und 16%.

Zur Erhöhung der Auflösung wird die Maximierung der Dispersion priorisiert. Folglich wurde im Weiteren die zweizöllige, plankonvexe Fokuslinse beibehalten und ausgehend von der Herstellerangabe die Feinjustierung der Brennweite in Inkrementen von 250 μm simuliert. Die Ergebnisse der Simulation sind in Abbildung 15 dargestellt.

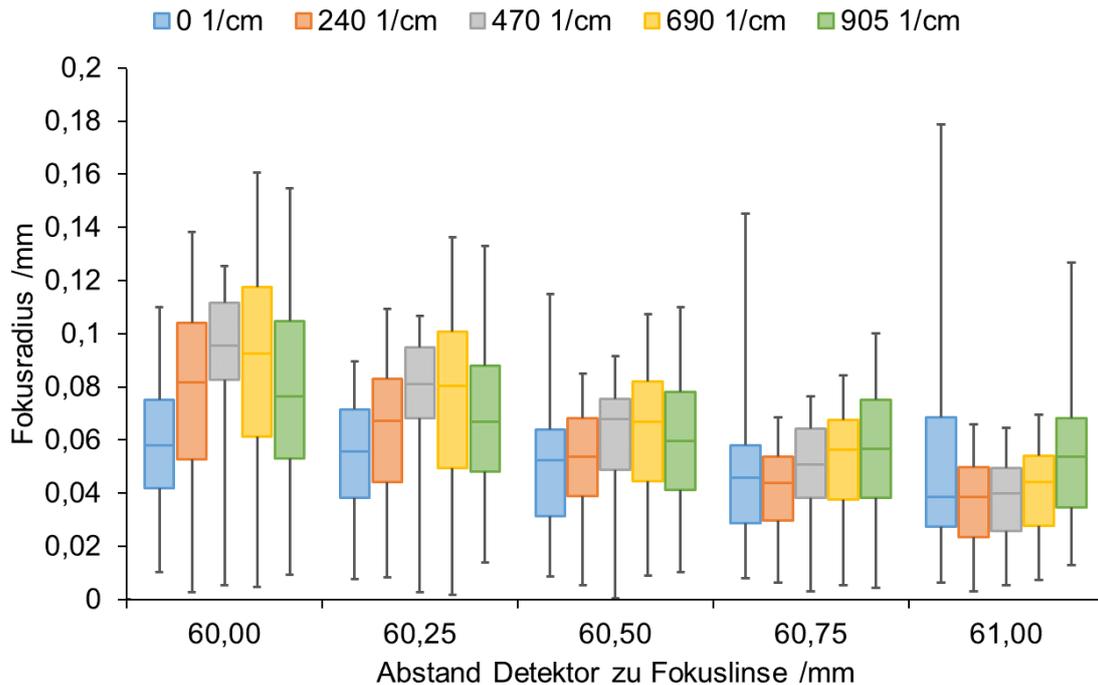


Abbildung 15: Feinjustierung der Brennweite. Plankonvexe Fokuslinse mit $d=25,4$ mm und $f=60,0$ mm.

Die Median-, Q1- und Q3-Werte zeigen für alle Wellenlängen eine fallende Tendenz bei Erhöhung des Abstandes zwischen Fokuslinse und Glasfaserzeile (vgl. Abbildung 15). Die Spannweiten und Interquartilsabständen hingegen zeigen unterschiedliches Verhalten. So durchlaufen die Spannweiten von 0 cm^{-1} und 905 cm^{-1} (bzw. 785 nm und 845 nm) ein Minimum an unterschiedlichen Stellen des betrachteten Bereichs, wohingegen die Spannweiten von 240 cm^{-1} , 470 cm^{-1} und 690 cm^{-1} (bzw. 800 nm , 815 nm und 830 nm) abnehmenden Trends mit zunehmendem Abstand von Fokuslinse und Glasfaserzeile zeigen. Der Interquartilsabstand von 785 nm bleibt von 60 mm bis $60,75\text{ mm}$ nahezu konstant steigt dann jedoch an. Der Interquartilsabstand von 240 cm^{-1} (bzw. 800 nm) durchläuft ein Minimum bei $60,75\text{ mm}$, der von 470 cm^{-1} (bzw. 815 nm) zeigt eine geringfügig fallende Tendenz und die von 690 cm^{-1} und 905 cm^{-1} (bzw. 830 nm und 845 nm) eine unregelmäßig fallende Tendenz. Prinzipiell ist eine Verbesserung der Fokussierung der Raman-Shifts 240 cm^{-1} , 470 cm^{-1} und 690 cm^{-1} (bzw. 800 nm , 815 nm und 830 nm) mit zunehmendem Abstand von Glasfaserzeile und Fokuslinse zu erkennen. Die Fokussierung von 0 cm^{-1} und 905 cm^{-1} (bzw. 785 nm und 845 nm) verschlechtert sich jedoch bei $60,75\text{ mm}$ bzw. 61 mm .

Eine Fokussierung auf Glasfasern mit Kerndurchmessern von $400\text{ }\mu\text{m}$ ist also problemlos möglich. Ebenso ist die Fokussierung auf einen Faserdurchmesser von $200\text{ }\mu\text{m}$ durch Feinjustierung der Brennweite möglich. Es kommt jedoch z.T. zu geringfügigen Verlusten am Faser-Cladding.

Im nächsten Schritt der Simulation wird im Basismodell, welches bisher nur den Signalpfad des Spektrophotometers umfasste, der Anregungspfad ergänzt. Die Simulation des vollständigen Spektrophotometers ist in Abbildung 16 dargestellt.

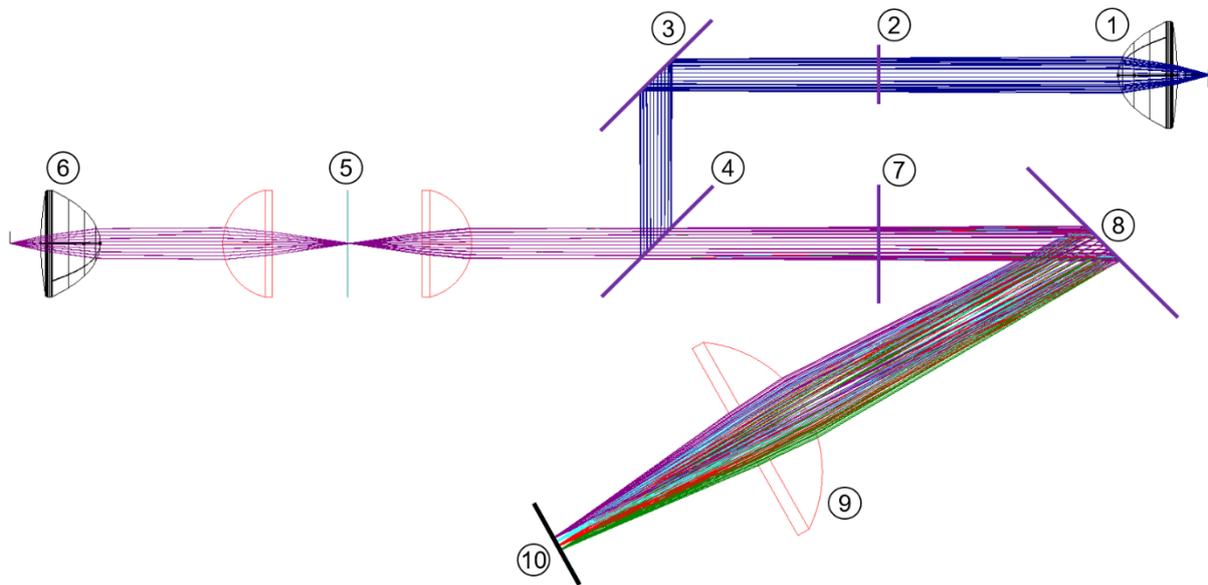


Abbildung 16: Erweitertes Simulationsmodell. 1: Einkopplung und Kollimation des Lasers; 2: Laserlinienfilter; 3: Umlenkspiegel; 4: dichroiter Strahlteiler; 5: Zwischenfokussierung mit Irisblende; 6: Fokussierung in Analyt; 7: Langpassfilter; 8: Reflexives Blaze-Gitter; 9: Fokuslinse; 10: Glasfaserzeile.

Der Anregungspfad umfasst die Einkopplung des Lasers mit anschließender Kollimation an einer einzölligen, asphärischen Linse (Abbildung 16 Position 1). Die Laserwellenlänge passiert anschließend einen Laserlinienfilter (Abbildung 16 Position 2) und wird über zwei Spiegel (Positionen 3 und 4) und eine Zwischenfokussierung (Abbildung 16 Position 5) in bzw. auf den Analyten fokussiert (Abbildung 16 Position 6). Optional kann die Fokussierung der Anregungswellenlänge auch auf eine Glasfaser erfolgen, sodass Messsonden an das Spektrophotometer angeschlossen werden können. Die Zwischenfokussierung dient der Unterbindung von Streulichteinflüssen bei direkter Fokussierung in den Analyten. Stokes-Raman-Shifts wiederum werden zunächst kollimiert (Abbildung 16 Position 6) durchlaufen die Zwischenfokussierung (Abbildung 16 Position 5) und treffen erneut auf den dichroiten Spiegel dessen Reflexionseigenschaften einen oberen Grenzwert haben oberhalb dessen Photonen transmittieren können. Stokes-Photonen können also aufgrund ihrer langwelligen Frequenzverschiebung den dichroiten Spiegel (Abbildung 16 Position 4) passieren. Die Raman-Signale durchlaufen einen Langpassfilter (Abbildung 16 Position 7), der die

restliche Laserwellenlänge blockiert. Anschließend werden die bereinigten Signalwellenlängen am Blaze-Gitter gebeugt (Abbildung 16 Position 8) und auf die Glasfaserzeile fokussiert (Abbildung 16 Positionen 9 und 10).

Die Filter und der dichroite Spiegel werden in OptiCAD durch die Zuweisung entsprechender Absorptions- und Reflexionseigenschaften für die simulierten Anregungs- und Signalwellenlängen realisiert. Die asphärischen Linsen konnten als Modelle der jeweiligen Anbieter in das Simulationsmodell importiert werden.

Am nun vollständigen Spektrophotometermodell wurde abschließend die Brechung der Raman-Signale am dichroiten Spiegel untersucht. Hierzu wurde ein Volumenkörper in der CAD-Software Inventor (Autodesk Inc., San Francisco, USA) erzeugt und anschließend in das Modell importiert, wo die Zuweisung der Reflexionseigenschaften und des Brechungsindex erfolgte. Anschließende Simulationen mit zwei- und dreidimensionalem dichroiten Spiegel weisen unterschiedliche Strahlkoordinaten auf der Detektionsfläche der Glasfaserzeile auf. Die Abweichung der Strahlkoordinaten ist für die Signal-Raman-Shifts in Abbildung 17 dargestellt.

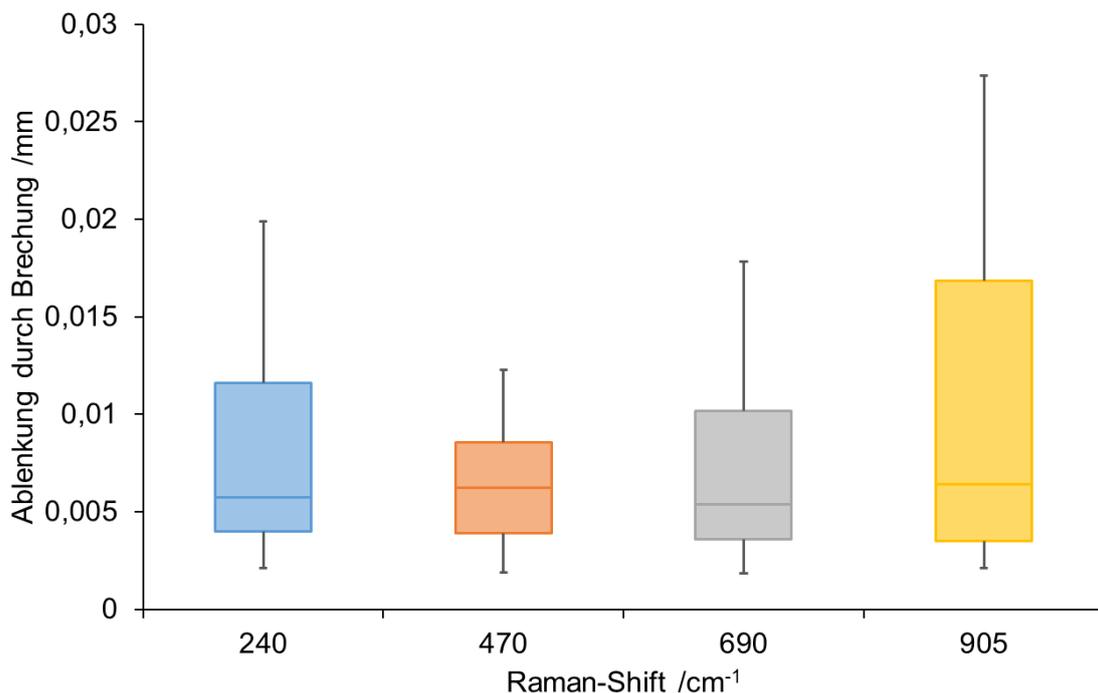


Abbildung 17: Versatz der Strahlkoordinaten aufgrund der Brechung am dichroiten Spiegel.

Durch die Brechung am dichroiten Spiegel weichen die Strahlkoordinaten von ihren ursprünglichen Positionen im Median um ca. 6 μm ab (vgl. Abbildung 17). Die Spannweiten bewegen sich zwischen 10 μm und 25 μm , die Interquartilsabstände zwischen 5 μm und 13 μm . In Hinblick auf Faserdurchmesser von 200 μm entspricht dies also

Ortsänderungen von bis zu 12,5 %. Um die Brechung zu kompensieren erfolgte eine Neuausrichtung der Fokuslinse und Detektionsfläche.

Die konstruktive Planung des Spektrophotometers erfolgte in der CAD-Software Inventor (Autodesk Inc., San Francisco, USA). Alle Modelle von Halterungselementen und optischen Bauteilen wurden direkt von Thorlabs Inc. (Newton, USA), Misumi Group (Honsha, Tokio, Japan) und AHF analysetechnik AG (Tübingen, Deutschland) bezogen. Das Spektrophotometer ist als Baugruppe in Abbildung 18 dargestellt.

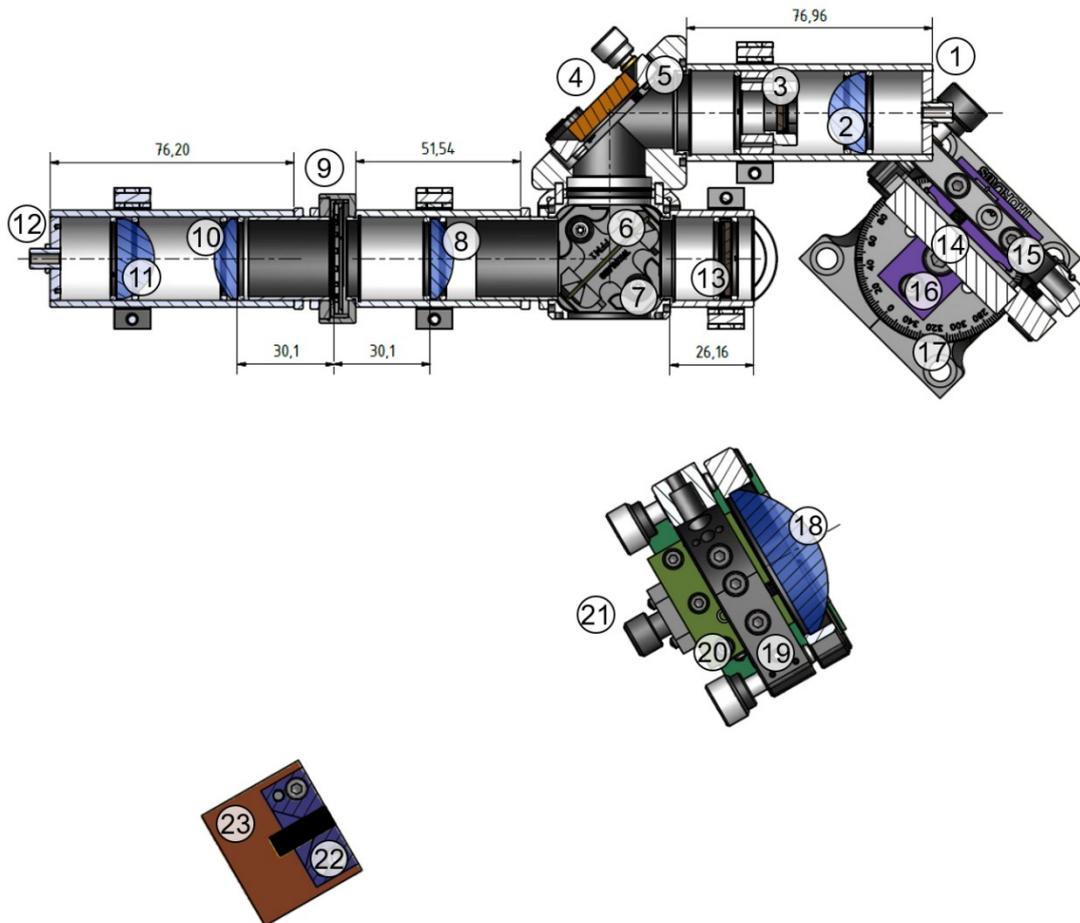


Abbildung 18: Draufsicht der Spektrophotometer-Baugruppe. Die Beschreibung der Komponenten gemäß Nummerierung ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Um die Mittelpunkte aller Linsen, des Blaze-Gitters und der zentralen Glasfaser der Glasfaserzeile auf eine optische Achse zu bringen, war die Konstruktion einiger Adapter nötig. Als zusätzlich Anforderung an die Gitterhalterung musste gewährleistet werden, dass der Mittelpunkt der reflexiven Fläche auf der Drehachse des Gitters liegt. Die Auslegung und Fertigung dieser Adapter erfolgte intern. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 18 funktionelle Komponenten entlang des Lichtweges nummeriert. Die Beschreibung der Komponenten ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Teileliste der optischen Bauteile und Halterungskomponenten.

| Position | Komponente | Hersteller |
|------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 (und 12) | SMA Glasfaseradapter SM1SMA | Thorlabs Inc. |
| 2 (und 11) | B270 Asphärische Linse ACL25416U | Thorlabs Inc. |
| 3 | Bandpassfilter F94-785 | AHF analysetechnik AG |
| 4 | Aluminium Spiegel PF10-03-G01 | Thorlabs Inc. |
| 5 | Einstellbare Spiegelhalterung KCB1/M | Thorlabs Inc. |
| 6 | Dichroiter Spiegel F38-785 | AHF analysetechnik AG |
| 7 | Filterhalterung CM1-DCH/M | Thorlabs Inc. |
| 8 (und 10) | Plankonvexlinse LA1027 | Thorlabs Inc. |
| 9 | Irisblende SM1D25 | Thorlabs Inc. |
| 13 | Langpassfilter F76-787 | AHF analysetechnik AG |
| 14 | Beugungsgitter GR50-1208 | Thorlabs Inc. |
| 15 | Einstellbare Spiegelhalterung KM200S | Thorlabs Inc. |
| 16 | Adapter CeMOS 1 | CeMOS |
| 17 | Rotationsplattform RP01/M | Thorlabs Inc. |
| 18 | Plankonvexlinse LA1401 | Thorlabs Inc. |
| 19 | Einstellbare Linsenhalterung KS2 | Thorlabs Inc. |
| 20 | Adapter CeMOS 2 | CeMOS |
| 21 | Lineartisch XEG40 | Misumi |
| 22 | Faserhalter | CeMOS |
| 23 | Faserhalterpodest | CeMOS |

2.3 Raman-Spektrophotometer-Hybrid Iteration 2

Um die Einsatzflexibilität der im vorherigen Abschnitt beschriebene Spektrophotometer-Konfiguration zu erhöhen, erfolgt eine Entkopplung der beleuchtenden optischen Komponenten vom wellenlängenselektierenden Beugungsgitter und der abbildenden Detektion. Dadurch entstehen räumlich trennbare Anregungs- und Detektionsbaugruppen. Dies erlaubt die Neugestaltung der Anregung in Form einer mit Mikroskopobjektiven ausstattbaren koaxialen optischen Sonde, die beliebig räumlich orientiert werden kann.

Zusätzlich zur komplementär aufgebauten Sonde wurde der spektrophotometrische Sensor mit einer Laserkopplung und hochempfindlichen photometrischen Detektoren ergänzt. Das komplette System ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt:

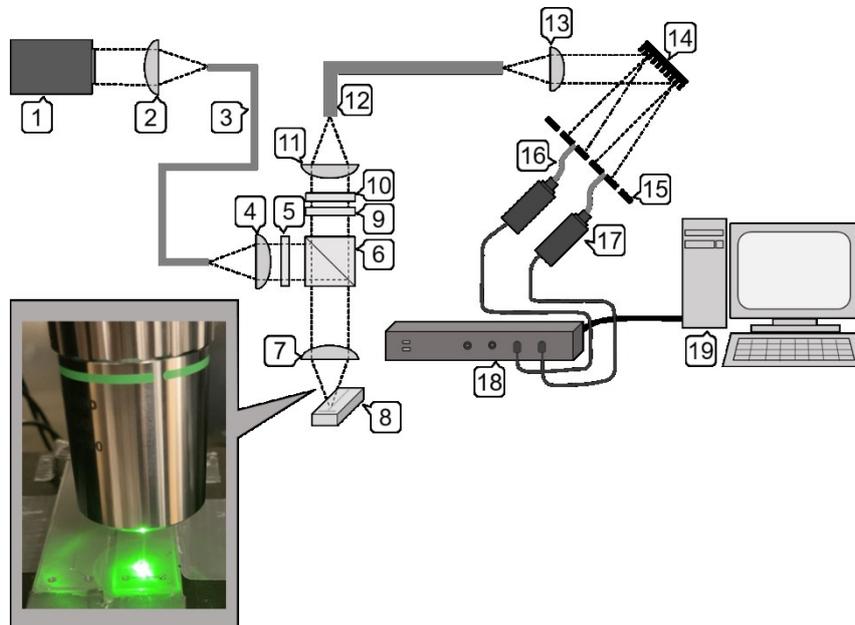


Abbildung 19: Optische Messanordnung. 1-3: Laser mit Faserkopplung; 4-7 und 9-12: koaxiale Mikroskopobjektiv-Sonde; 8: Mikrokanal; 13-18: Spektrophotometrische Detektion; 19: PC mit Software.

Sowohl die Anregung der Raman-Streuung als auch das Auffangen der gestreuten Photonen wird durch die nicht-invasive Sonde realisiert (vgl. Abbildung 19 Position 7). Hier wird ein fasergekoppelter Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm und maximaler Emissionsleistung von 500 mW (gem532, Novanta, Bedford, USA) im Dauerstrichmodus mithilfe eines dichroitischen Spiegels und eines Mikroskopobjektivs mit einem Arbeitsabstand von 20 mm (Apochromatic Objective MY20X-804, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japan) in den Flüssigkeitsstrom fokussiert. (vgl. Abbildung 19 Positionen 1 bis 8). Der Raman-Effekt tritt sofort auf, und es findet eine sphärische Streuung in alle Raumrichtungen statt. Das Objektiv sammelt begrenzt durch seine numerische Apertur ($NA=0,42$) Photonen und bildet einen kollimierten Strahl. Die Zunahme der Wellenlänge durch die Stokes-Verschiebung ermöglicht den Durchgang der Raman-Photonen durch den dichroitischen Spiegel und den Sperrfilter (vgl. Abbildung 19 Positionen 6,9,10; AHF analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) und ihre Einkopplung in die Glasfasern (vgl. Abbildung 19 Position 12). Zur Positionierung und zum spektralen Scannen in Draufsicht ist die Sonde in vertikaler Ausrichtung auf einer dreidimensionalen Verfahrereinheit (MP130-50 Steinmeyer GmbH & Co. KG, Albstadt, Deutschland) mit drei linearen Achsen montiert. Die Detektion von Stokes-verschobenen Photonen erfolgt mit einer spektrophotometrischen Hybridoptik, die zwei Schlüsselemente

kombiniert, das Beugungsgitter und eine parallele Anordnung von Glasfasern (vgl. Abbildung 19 Positionen 14 und 16). Linsen (vgl. Abbildung 19 Positionen 2, 4, 11 und 13) sind vor und nach den Glasfasern angeordnet um das Licht je nach Bedarf zu kollimieren und zu fokussieren. Inelastisch gestreute Photonen aus dem Inneren des Detektionsvolumens werden durch eine Glasfaser von der Koaxialsonde weitergeleitet und in einem kollimierten Strahl auf ein dispersives Gitter projiziert (Gitterkonstante 1800 mm^{-1} , Thorlabs Inc., Newton, USA). Diese Art von Gitter zeichnet sich durch geringe periodische Fehler und wenig Streulicht aus, was insbesondere bei Messungen mit kritischem Signal-Rausch-Verhältnis wie der Raman-Spektroskopie von Vorteil ist. Der Austrittswinkel der von der Gitteroberfläche einfallenden Photonen ist eine Funktion der Wellenlänge, was eine wellenlängenspezifische Auswahl ermöglicht. Der ursprünglich kreisförmige Querschnitt des Strahls wird dann in einer linearen Form auf die Glasfasern fokussiert. Die Fasern, die die relevanten molekularen Informationen übertragen, sind an Custom Photon Multiplier (CM92N, Proxivision GmbH, Bensheim, Deutschland, vgl. Abbildung 19 Position 17) angeschlossen. Die hier erfassten Informationen werden dann in weiteren Hardware- und Softwareschritten verarbeitet (vgl. Abbildung 19 Positionen 18 und 19). Die optische Leistung wird bei 70 % der eingestellten Leistung am Sondenkopf mit einem PS 19 Thermopile-Sensor (Coherent Corp., Saxonburg, USA) in Kombination mit einem FieldMax II (Coherent Corp., Saxonburg, USA) gemessen. Die Linearität der Anregungsleistung wird für den Aufbau mit $R^2 = 0,9969$ durch Messung der Peak-Intensität von Aceton bei 1710 cm^{-1} Raman-Verschiebung bei unterschiedlichen Leistungseinstellungen bestätigt.

Der Spotdurchmesser des fokussierten Lasers und seine Tiefe sind die ausschlaggebenden Faktoren für die räumliche Auflösung des Aufbaus und werden mit einem Scanning-Split Optical Beam Profiler (BP209-VIS/M, Thorlabs Inc., Newton, USA) gemessen. Der Strahldurchmesser wird hierbei entlang der optischen Achse erfasst. Es ist zu beachten, dass diese Messungen in Luft stattfinden. Da der Brechungsindex von Wasser und Toluol höher ist als der von Luft, verkleinert sich der Strahldurchmesser im jeweiligen Medium aufgrund der Brechung, wodurch sich die räumliche Auflösung im Anwendungsfall erhöht.

Die gemessene Schärfentiefe ist ca. $85 \mu\text{m}$ bei einem Fokusdurchmesser von ca. $45 \mu\text{m}$ (vgl. Abbildung 20). Durch den Arbeitsabstand von 20 mm eignet sich diese Anordnung für nicht-invasive Scananwendungen.

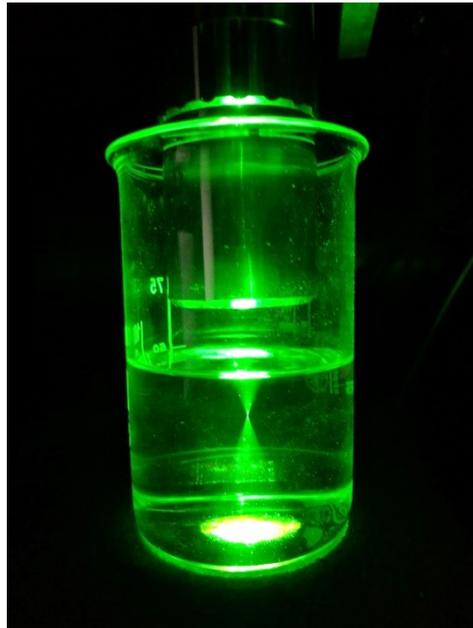


Abbildung 20: Darstellung des mittels Mikroskopobjektiv (vgl. Position 7 in Abbildung 19) fokussierten Lasers in Wasser.

Die oben erwähnten Custom Photon Multiplier (CPM) werden speziell für ihre Anwendbarkeit in der Detektion schwacher Lichtintensitäten ausgewählt. CPMs zeichnen sich durch die Detektion von einzelnen Photonen, einen hohen Dynamikbereich und ein geringes Hintergrundrauschen aus. Eine hohe Verstärkung ermöglicht die Detektion selbst kleiner Photonenmengen. Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit kann durch Anpassung des Kathodenmaterials für bestimmte oder große Spektralbereiche erreicht werden. Mit einer Signalverstärkung um den Faktor 10^8 gehören CPMs zu den empfindlichsten Photodetektoren. Aufgrund des geringen Rauschens von weniger als 10 Counts pro Millisekunde eignen sie sich besonders für den Nachweis geringer Photonsignale, wie sie beim Raman-Effekt auftreten. Der funktionelle Schwachpunkt von Photonenvervielfachern im Allgemeinen ist ihre Empfindlichkeit gegenüber starken Lichteinflüssen (z. B. Tageslicht, Streulicht oder reflektiertes Licht). Die daraus resultierende hohe Anzahl von Primärelektronen führt zur Zerstörung der Dynoden. Bei CPMs wird eine solche Überbelichtung durch ein automatisches Quenching System verhindert, dass die Exposition auf 180 ns begrenzt.

Das Spektrophotometerkonzept wird in einem Proof-of-Concept für die Überwachung einer Flüssig-Flüssig-Extraktion in einem Mikrokanal eingesetzt²². Das für die Versuchsreihe gewählte ternäre Stoffsystem ist Toluol, Aceton, und Wasser. Wie in Abbildung 21 schematisch dargestellt, werden die verschiedenen Flüssigkeiten mit einer Spritzenpumpe mit unterschiedlichen Volumenströmen in den Mikrokanal gefördert.

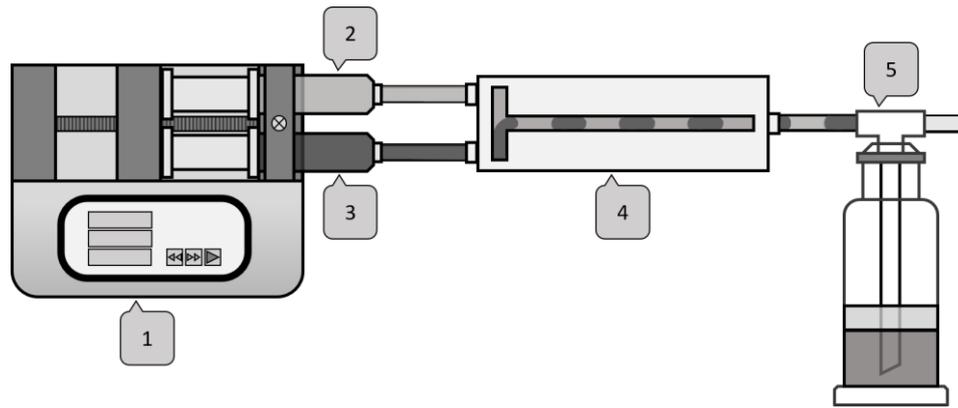


Abbildung 21: 1: Spritzenpumpe, 2: Spritze mit Toluol-Aceton-Mischung, 3: Spritze mit Wasser, 4: Mikrokanal, 5: Abfallbehälter²².

Die Raman-Spektren der untersuchten Reinstoffe (vgl. Abbildung 22) werden mit einem RXN1-Spektrometer (Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA) gemessen.

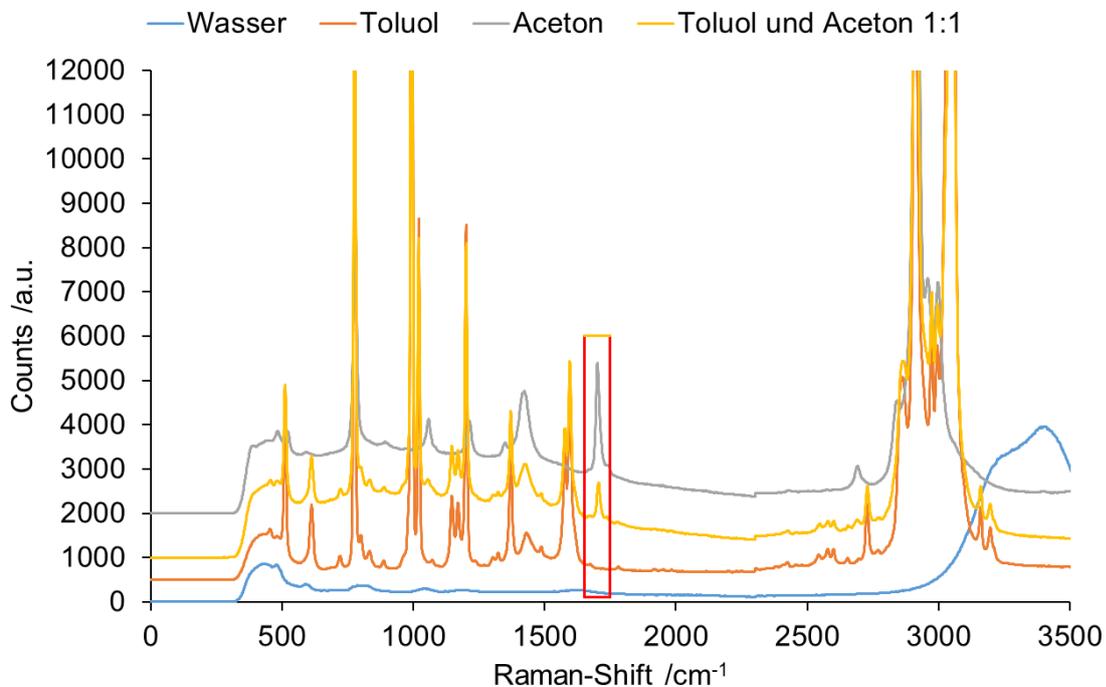


Abbildung 22: Raman-Spektren von Toluol, Aceton und Wasser (RXN1-Spektrometer, Kaiser Optical Systems). Versatz von 500, 1000 und 2000 Counts. Analyt Peak von Aceton bei 1710 cm^{-1} rot hervorgehoben.

Das Stoffsystem wurde aus den folgenden Gründen ausgewählt: Die Dreiphasen-Flüssig-Flüssig-Extraktion dieses Systems ist in der Literatur gut dokumentiert^{37–40}. Außerdem ist eine saubere Trennung relevanter spektraler Informationen von Aceton bei 1710 cm^{-1} von Toluol und Wasser möglich, wie in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt. Des Weiteren haben die Glasfasern für die Detektion eine spektrale Bandbreite von ca. 300 cm^{-1} bzw. 10 nm , die hinsichtlich der zentralen Detektionswellenlängen-

gen der Fasern berücksichtigt werden muss. Der spezifische Aceton-Peak wurde aufgrund dieser Überlegungen trotz seiner vergleichsweise geringeren Signalintensität für die Detektion ausgewählt, da es in dem gegebenen ternären System bei der realisierten Bandbreite pro Faser keine Überschneidung mit anderen Peaks im Spektrum gibt. Abbildung 23 zeigt die Spektralbereiche des angestrebten Aceton-Signals und den Signalhintergrund.

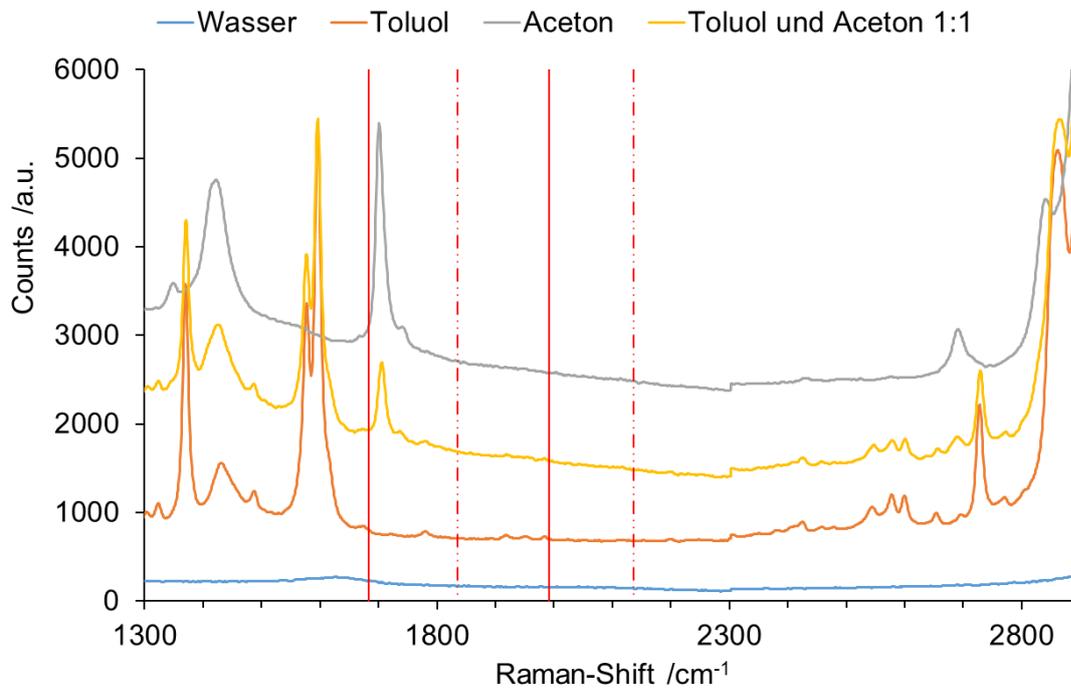


Abbildung 23: Ausschnitt der Raman-Spektren von Toluol, Aceton und Wasser. Die spektralen Bandbreiten der Detektionsfasern (300 cm^{-1}) sind mit vertikalen Linien gekennzeichnet. Durchgezogene Linien: Analyt-Faser. Gestrichelte Linien: Referenzfaser.

Periphere Fasern zeigen eine leicht reduzierte Signalintensität, die auf eine Krümmung in der Fokusebene zurückzuführen ist. Dies wird kompensiert, indem die Signalintensität der höchsten untersuchten Konzentration als feste Referenz für die Signalverarbeitung verwendet wird.

Abbildung 23 zeigt einen Ausschnitt aus jedem Raman-Spektrum des Wasser-Toluol-Aceton-Systems, wobei die durchgezogenen und gestrichelten vertikalen Linien die Spektralbereiche der Analyt- und der Referenzfaser angeben. Die Überlappung resultiert aus einer Vergrößerung der endständigen Fokussierung. Bei dem untersuchten ternären System und dem gewählten Spektralbereichen ist dieser Umstand zur Verbesserung der Hintergrundsignalkorrektur nutzbar, da die Steigung des Hintergrunds des unbearbeiteten Analytsignals aufgrund der spektralen Nähe des Referenzkanals

besser als photometrische Zählrate angenähert werden kann. Mit dem Prototyp werden bei einer Emissionsleistung von 300 mW binäre Gemische von reinem Aceton bis zu reinem Wasser und einer Mindestkonzentration von 1,56 % Aceton gemessen. Pro Konzentrationsstufe wurden 12.000 Datenpunkte erfasst. Alle Signale sind für Leerbedingungen mit ca. 5 s^{-1} Nulllinien-korrigiert und auf den Maximalwert von reinem Aceton normiert (vgl. Abbildung 24). Die Kalibrierung des Systems zeigt mit einem Pearson-Koeffizienten von $R^2 = 0,9775$ lineares Verhalten des gemessenen Raman-Signals als Funktion der Analyt-Konzentration. Die Normierung erleichtert die Vergleichbarkeit verschiedener experimenteller Datensätze, die zwischen einzelnen Experimenten variieren, aber in jedem Experiment in sich konsistent sind.

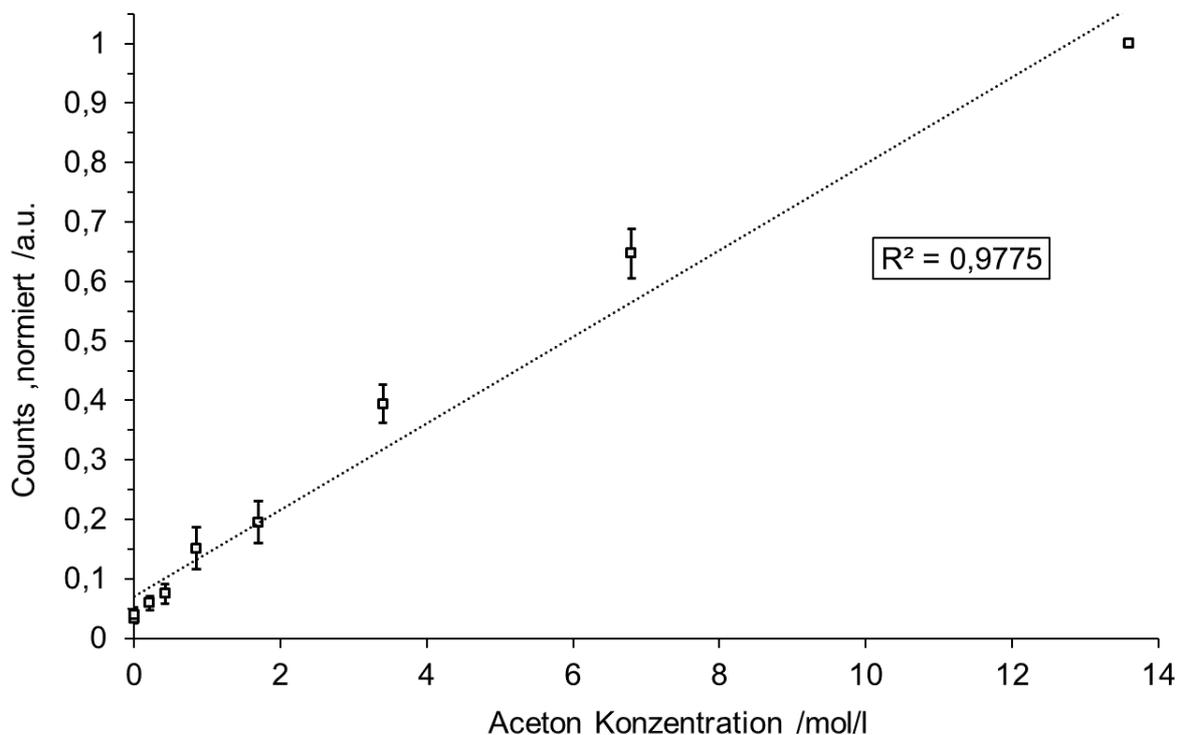


Abbildung 24: Kalibrierungsdaten der Analyt-Signalintensität als Funktion der Aceton-Konzentration 0 mol/l bis 13,6 mol/l (0 Vol.-% bis 100 Vol.-%). Daten von strömenden Fluiden im Mikrokanal erfasst. Alle Konzentrationsstufen sind auf die maximale Acetonintensität skaliert, um die Vergleichbarkeit verschiedener Datensätze zu gewährleisten.

Zur Validierung werden die bei unterschiedlichen Durchflussraten gemessenen Rohdaten wie beschrieben behandelt und Konzentrationen mit der Kalibrierfunktion berechnet.

Als Testsystem für Raman-basiertes molekulares Scanning im mikroskaligen Raum bzw. bei hoher Ortsauflösung wurden diffusionslimitierte Stoffübergänge ausgewählt. Eine geeignete Umgebung zur Untersuchung von derartigen Mischprozessen wie der Flüssig-Flüssig-Extraktion sind Mikrokanäle. Mikrostrukturierte Bauteile kommen u.a.

in den chemischen, pharmazeutischen und biologischen Wissenschaften zum Einsatz. Die Bauelemente sind für den Einsatz als Wärmetauscher, Reaktoren, statische Mischer und andere Einsatzgebiete konzipiert und variieren daher in Größe und Form^{41,42}. Das wesentliche Merkmal bei allen Anwendungen ist das extrem hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnis, das sich aus den geringen linearen Abmessungen ergibt und die Grundlage für die meisten Vorteile gegenüber chemischen Prozessanlagen herkömmlicher Größe ist⁴³. Diese Eigenschaft verbessert die Selektivität und erhöht die Ausbeute der chemischen Reaktion, während sie gleichzeitig einen effizienteren Wärmeübergang ermöglicht⁴². Darüber hinaus weicht das Verhalten von Flüssigkeiten innerhalb mikroskaliger Dimensionen von Strömung in makroskopischen Geometrien ab. Aufgrund der dominierenden viskosen Effekte führen kleinere Dimensionen zu niedrigen Reynolds-Zahlen, was wiederum turbulente Strömungsinstabilitäten verhindert⁴⁴. Dementsprechend bilden Newtonsche Flüssigkeiten in mikrostrukturierten Bauteilen wie Mikrokanälen eine laminare Strömung mit ihren begrenzenden Einflüssen auf Stofftransport und Vermischung aus⁴⁵.

Alle Mischexperimente wurden in einem Aluminium-Mikrokanal mit T-Verbindung durchgeführt (CN AW 2007 AlCu4PbMgMn). Das Material zeigt keine Wechselwirkungen mit den in den Experimenten verwendeten Chemikalien und ist wie alle Metalle nicht Raman-aktiv. Zur Verringerung von Reflexionen und zur Optimierung des Wandflusses wurden die Kanaloberflächen durch Kugelstrahlen mit sphärischen Glasperlen (40-70 μm , DIN 52 900) homogenisiert. Der Mikrokanal (vgl. Abbildung 25) hat einen quadratischen Querschnitt mit den Abmessungen 500 x 500 μm , einen hydraulischen Durchmesser von 500 μm und eine Kanallänge von 70 mm.

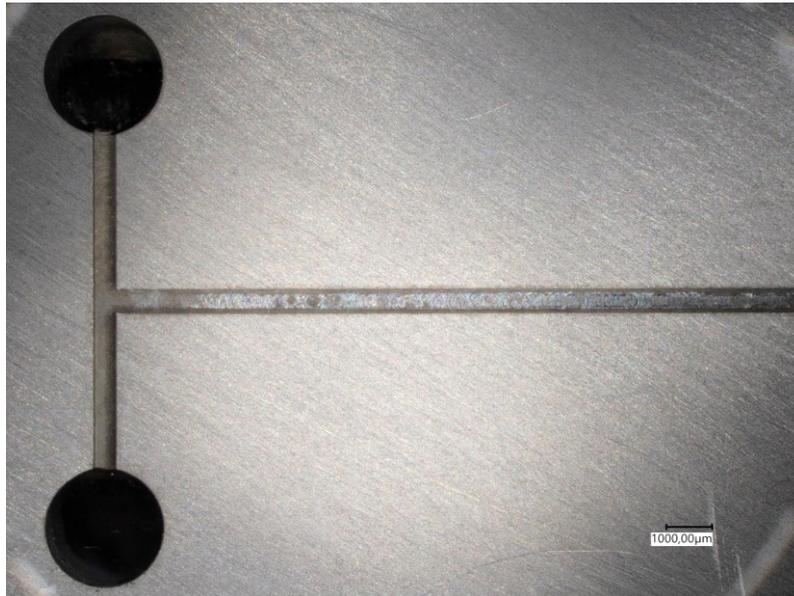


Abbildung 25: Draufsicht des Aluminium-Mikrokanals mit T-Verzweigung, zwei Einlasskanälen und einem Auslasskanal. Quadratischer Kanalquerschnitt von 500 x 500 μm, hydraulischem Durchmesser von 500 μm und 70 mm Kanallänge (aufgenommen mit VHX-7000, (Keyence Corp., Osaka, Japan)).

Der Mikrokanal ist mit einem transparenten Quarzglasdeckel abgedeckt, der die Lasereinstrahlung und die Detektion inelastisch gestreuter Photonen sowie die visuelle Kontrolle der fließenden Phasen ermöglicht. Quarzglas verursacht ein geringes Hintergrundsignal im Vergleich zur labor- und industrieüblichen Alternative Borosilikat. Um die Dichtigkeit zu gewährleisten, ist der Deckel mit einem UV-Kleber (Norland Optical Adhesive 61 LOT 415) am Grundkörper befestigt. Der Klebstoff wird in der Nähe der Mikrokanalränder auf den Grundkörper aufgetragen und anschließend durch UV-Lichtbestrahlung (Philips BLB F8T5) ausgehärtet.

2.4 Raman-Spektrophotometer-Hybrid Iteration 3

Als abschließender Optimierungsschritt des beschriebenen Spektrophotometerkonzepts erfolgt eine Anpassung der Detektionsoptik zur Verbesserung der Abbildungsqualität und dadurch der spektralen Auflösung. Zusätzlich werden alle nicht-essentielle optische Bauteile entfernt, um die Robustheit des Aufbaus zu maximieren. Die schematische Darstellung des Messsystems ist in Abbildung 26 zu sehen:

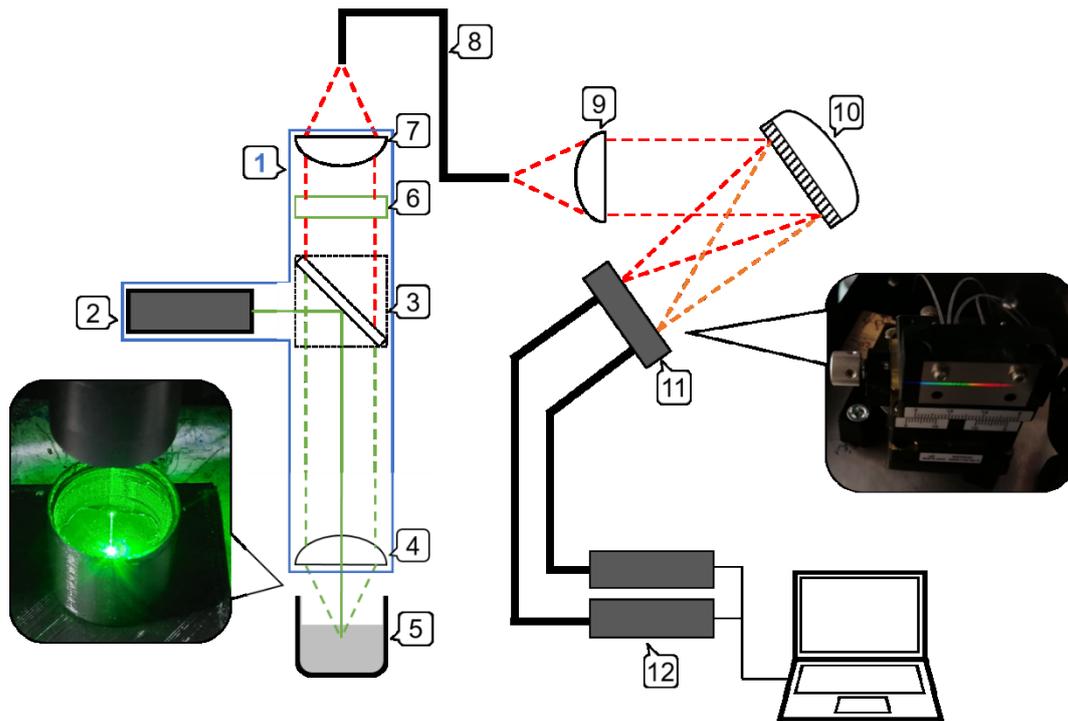


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Raman-Spektrophotometers. 1: Sonde; 2: Laser; 3: Dichroiter Spiegel; 4: Fokuslinse; 5: Probe; 6: Notch-Filter (532 nm); 7: Fokuslinse; 8: Glasfaser; 9: Kollimatorlinse; 10: Reflexives Hohlgitter; 11: Glasfaserzeile; 12: Custom Photon Multiplier.

Die beleuchtende Lichtquelle ist ein kollimierter Dauerstrichlaser mit einer Emissionswellenlänge von 532 nm und einer optischen Leistung von 100 mW (CW532-100, Roithner Laser Technik GmbH, Wien, Österreich). Die Standardwellenlängen für Laser in der Raman-Spektroskopie sind 532 nm, 785 nm, und 1064 nm. Da die Intensität des Raman-Signals proportional zur Wellenlänge in der vierten Potenz ist, hat die Anregungswellenlänge als technischer Parameter eine große Hebelwirkung. Das ausgelöste Raman-Signal ist bei niedrigeren Wellenlängen stärker ausgeprägt als bei höheren Wellenlängen. Bei fluoreszierenden Materialien ist jedoch auch die Fluoreszenz stärker ausgeprägt, so dass die Gefahr eines ungünstig hohen Signalhintergrunds besteht. Daher muss ein Kompromiss gefunden werden, der für die Anwendung optimal ist. Ein zweiter 532 nm Laser mit 1 mW optischer Leistung (CW532-001, Roithner Laser Technik GmbH, Wien, Österreich) ist für die Untersuchung der Grenzen spektrophotometrischer Detektion von Stokes-Streuung integriert, was u.a. für den Einsatz an biologischen Proben oder in explosionsgefährdeten Bereichen relevant ist. Der Laser wird wie zuvor mittels eines dichroitischen Spiegels (RT 532 rdc, AHF analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) in den konfokalen Aufbau der Sonde reflektiert. Am Ende eines 40 cm langen Sondenkopfes wird der Laserstrahl durch eine plankonvexe Linse ($f = 25$ mm) auf bzw. in die Probe fokussiert. Die durch den Raman-Effekt erzeugten

Photonen werden in alle Raumrichtungen gestreut. Die im Linsenfokus erzeugte Raman-Strahlung wird dem Linsendurchmesser und der numerischen Apertur entsprechend kollimiert und an den dichroiten Spiegel weitergeleitet. Der dichroite Spiegel entfernt in Kombination mit einem nachgeschalteten Notch-Filter (zet532TopNotch, AHF analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) Photonen der Wellenlänge 532 nm, die z.B. durch Rayleigh-Strahlung in den Detektionspfad eindringen können. Dies ist wegen des geringen Wirkungsquerschnitts des Raman-Effekts im Vergleich zur emittierten Laserleistung notwendig. Das gefilterte Licht wird durch eine plankonvexe Linse ($f = 50 \text{ mm}$) auf eine optische Faser ($d = 600 \text{ }\mu\text{m}$) fokussiert. Die Brennweite bzw. die numerische Apertur der Linse von $NA = 0,4$ ist hierbei auf die numerische Apertur der optischen Faser von $NA = 0,42$ abgestimmt. Die geringere Linsenapertur reduziert den Lichtverlust an der Faserschnittstelle. Darüber hinaus passt das Brennweitenverhältnis der Linsen die fokussierte Fleckgröße an den Faserquerschnitt an. Die optische Faser ist in einem zweiachsigen Lineartisch (CXY1Q, Thorlabs Inc., Newton, USA) montiert, der eine präzise Positionierung der Faser im Fokuspunkt ermöglicht und alle vorherigen Brechungsabweichungen kompensiert, was zu einer weiteren Reduzierung von Lichtverlusten an der Faserkopplung führt. Die optische Faser überträgt das gesammelte Licht an die spektrophotometrische Detektionsoptik. Die aus dem Lichtwellenleiter austretenden Photonen werden mit einer dritten plankonvexen Linse ($f = 25 \text{ mm}$) kollimiert und auf ein konkaves Gitter projiziert. Das Gitter hat eine Konstante von 1300 mm^{-1} und fokussiert als Hohlspiegel das resultierende Spektrum im Gegensatz zu planaren Blaze-Gittern in einer ungekrümmten Ebene. Ein lineares Faserarray, bestehend aus 14 Glasfasern mit Durchmessern von $600 \text{ }\mu\text{m}$, ist in dieser Ebene positioniert, um die gestreuten Raman-Photonen in diskreten Detektionskanälen zu sammeln. Die Halterung des Faserarrays besteht aus einer Drehachse (RP01, Thorlabs Inc., Newton, USA) und zwei Lineartischen (DSXYEG40, Misumi Group Honsha, Tokio, Japan). Durch diese Kombination kann das Faserarray präzise in der Ebene positioniert werden, um die Signalausbeute zu optimieren bzw. den Aufbau ohne konstruktive Maßnahmen an unterschiedliche Messaufgaben anzupassen.

Eine direkt vor dem Faserarray positionierte Schlitzblende kann die spektrale Auflösung, und damit den Erfordernissen der angestrebten Anwendung entsprechend die Analyt-Selektivität erhöhen. Die Breite der Schlitze kann ab $50 \text{ }\mu\text{m}$ bei einer Höhe von 1 mm betragen. Mit der verbesserten Auflösung sinkt jedoch die Signalintensität. Die einzelnen optischen Fasern des Faserarrays sind wie zuvor an CPMs (Proxivision

GmbH, Bensheim, Deutschland) angeschlossen. Die hohe Empfindlichkeit der Detektoren ist gleichzeitig eine technische Herausforderung, da Streulicht von anderen Lichtquellen, wie Umgebungslicht aber auch das Anregungslicht des Lasers, das gewünschte Messsignal vollständig überlagern kann. Die Überladung des Detektors durch Primärelektronen aus dem Laser kann zur Zerstörung der Dynode führen. Aus diesem Grund verfügen CPMs über einen internen Shutter, der bei Erreichen der Schwellenintensitäten die Belichtungszeit auf 180 ns begrenzt. Eine Totzeit von 420 ns wird zur Neutralisierung der Elektronen verwendet. Durch dieses automatische Quenching- und Schutzsystem wird die minimale Integrationszeit von CPMs auf 1 ms festgelegt. Als zusätzliche, konstruktive Schutzmaßnahme ist die Detektionseinheit durch eine Einhausung mit schwarz lackierten, diffus streuenden Innenoberflächen optisch isoliert, sodass Hintergrundlicht im angestrebten Detektionsbereich praktisch vollständig vermieden wird.

Das Spektrophotometer ist für den Nachweis der Stokes-Raman-Streuung ausgelegt. Ein RXN1-Spektrometer (Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA) wird als Referenzsystem verwendet. Sondenausgangsleistung und Emissionswellenlänge des Lasermoduls im Spektrophotometer sind auf das Referenz-Spektrometer abgestimmt.

Die Betriebssoftware für den Prototyp wurde in LabVIEW (National Instruments, Austin, USA) entwickelt. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Komponenten findet über eine serielle Schnittstelle statt. Die Kernfunktionen der Software sind die Konfiguration des Messsystems und die Auswertung der Messdaten. In einer grafischen Benutzeroberfläche werden entsprechend der einstellbaren Messparameter Ergebnisse in Echtzeit angezeigt. Zur Konfiguration des Messsystems gibt es einen Wartungsmodus, der die Kernfunktionen in reduzierter Form enthält sowie eine Live-View-Funktion für die Kalibrierung der optischen Komponenten. Im Messmodus werden benutzerspezifische Grenzwerte z.B. Anfangskonzentrationen der Reaktanden und Zielkonzentrationen der Produkte gespeichert. Bei Erreichen der Grenzwerte gibt die Software ein optisches Signal in der Bedienoberfläche aus. Um die Funktionstüchtigkeit des Geräts zu sichern wird die Temperatur im Inneren des Prototyps mit einem Temperatursensor überwacht. Bei kritischen Temperaturen wird zunächst ein Warnsignal ausgegeben, bei Überschreiten des eingestellten Grenzwertes erfolgt eine Notabschaltung des Messsystems. In diesem Fall werden die Messdaten durch einen integrierten Notspeicher gesichert. Gleiches gilt auch bei Eintreten eines Stromausfalls.

Das optimierte Spektrophotometer wird anhand von Messungen wässriger Lösungen der Salze Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumsulfat sowie Ethanol bewertet. Diese Referenzsysteme kommen u.a. in der industriellen Chargenproduktion von Düngemitteln und Sprengstoffen sowie in der Lebensmittelverarbeitung zum Einsatz. Referenzspektren von gesättigten Lösungen aller Analyte werden mit einem RXN1-Spektrometer (Kaiser Optical System Inc., Ann Arbor, USA) aufgenommen (vgl. Abbildung 27).

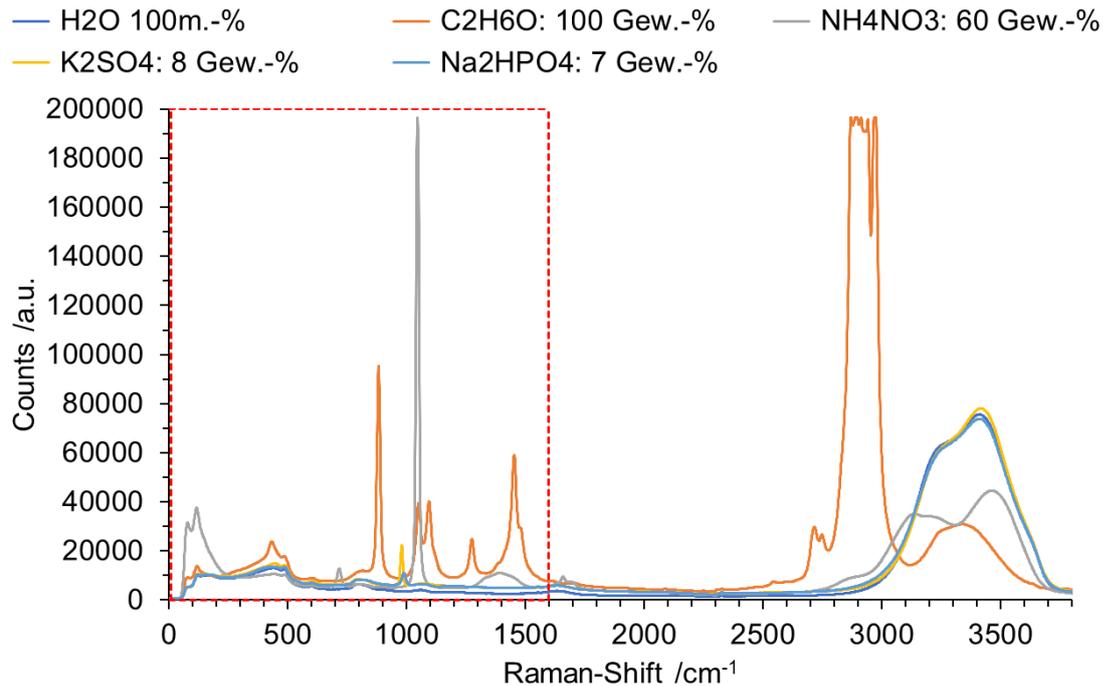


Abbildung 27: Raman-Spektren von Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumsulfat und Ethanol. Gesättigte Salzlösungen in entionisiertem Wasser bzw. Ethanol als Reinstoff. Anregungsleistung 100 mW, Integrationszeit 10 s, akkumulierte Spektren 3. Roter Rahmen: Messbereich des Spektrophotometers.

Die Spektren sollen den geräteseitig möglichen Messbereich von 0 cm⁻¹ bis 1600 cm⁻¹ veranschaulichen, die prinzipiell vom Nutzer frei im Spektrum platziert werden kann. Anhand der Spektren werden außerdem Analyt-spezifische Raman-Peaks identifiziert. In Tabelle 5 sind die Peaks den zugehörigen Molekülschwingungen zugeordnet. Ausschließlich Peaks unterhalb von 1500 cm⁻¹ werden für die Signalauswertung berücksichtigt. Hier befindet sich der sogenannte Fingerprint-Bereich, der aufgrund seines hohen Informationsgehalt molekulspezifischer kovalenter Schwingungen zur Differenzierung unterschiedlicher Analyte geeignet ist.

Tabelle 5: Zuordnung der Raman-Peaks unterhalb der Stokes-Verschiebung von 1500 cm^{-1} zu den untersuchten Analyten Ammoniumnitrat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Di-Kaliumsulfat und Ethanol.

| NH ₄ NO ₃ | | Na ₂ HPO ₄ | | K ₂ SO ₄ | | C ₂ H ₆ O | |
|---------------------------------|---|----------------------------------|--|--------------------------------|---|---------------------------------|------------------------------------|
| Peak /cm ⁻¹ | Schwingung | Peak /cm ⁻¹ | Schwingung | Peak /cm ⁻¹ | Schwingung | Peak /cm ⁻¹ | Schwingung |
| 715 | v ₄ (NO ₃ ⁻) | 995 | v ₁ (HPO ₄ ²⁻) | 449 | v ₂ (SO ₄ ²⁻) | 882 | v ₁ (C-C) |
| 1047 | v ₁ (NO ₃ ⁻) | | | 616 | v ₄ (SO ₄ ²⁻) | 1054 | v ₁ (C-O) |
| 1288 | v ₃ (NO ₃ ⁻) | | | 982 | v ₁ (SO ₄ ²⁻) | 1099 | v ₂ (-CH ₃) |
| 1416 | v ₃ (NO ₃ ⁻) | | | 1107 | v ₃ (SO ₄ ²⁻) | 1277 | v ₃ (-CH ₂) |
| 1459 | v ₄ '(NH ₄ ⁺) | | | 1145 | v ₃ (SO ₄ ²⁻) | 1454 | v ₂ (-CH ₃) |

Alle Messungen des Spektrophotometers beziehen sich auf die hier aufgeführten Peaks. Alle aufgeführten Peaks stimmen mit Literaturwerten überein^{46–49}.

Weitere relevante Materialeigenschaften aller Analyte sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die in Versuchsmessungen verwendeten Peak-Positionen sind Tabelle 5 entnommen. Die übrigen Stoffwerte sind den Datenblättern der Hersteller entnommen.

Tabelle 6: Übersicht der Stoffwerte von Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dikaliumsulfat, Ethanol und des Lösemittels Wasser.

| Stoffwerte | | NH ₄ NO ₃ | Na ₂ HPO ₄ | K ₂ SO ₄ | C ₂ H ₆ O | H ₂ O |
|--------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Peak | / cm ⁻¹ | 1047 | 995 | 982 | 882 | 3430 |
| Dichte | / g/l | 1720 | 1700 | 2660 | 790 | 998 |
| Wasserlöslichkeit | / g/l | 1920 | 77 | 110 | - | - |
| Löslichkeitsgrenze | / Gew.-% | 65,80 | 7,16 | 9,93 | - | - |

Die angesetzten Konzentrationen aller Verdünnungsreihen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Jede Messreihe enthält fünf diskrete Konzentrationen, die durch die maximale Löslichkeit und ein festgelegtes Minimum von 1 Gew.-% begrenzt sind. Für die ca. äquidistanten Konzentrationsunterschiede ist in den Messungen ein lineares Verhalten des Raman-Effekts zu erwarten. Tabelle 7 zeigt alle Konzentrationsstufen der Analyte.

Tabelle 7: Spektrophotometrisch untersuchte Konzentrationsstufen von Ammoniumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dikaliumsulfat und Ethanol. Vier äquidistante Verdünnungsschritte ausgehend von 60 Gew.-% NH_4NO_3 , 7 Gew.-% Na_2HPO_4 , 8 Gew.-% K_2SO_4 und 100 Gew.-% $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$.

| $\text{NH}_4\text{NO}_3 / \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ | $\text{K}_2\text{SO}_4 / \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ | $\text{C}_2\text{H}_6\text{O} / \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ |
|---|--|--|---|
| 0,21 | 0,06 | 0,15 | 0,17 |
| 3,22 | 0,11 | 0,31 | 4,28 |
| 6,45 | 0,22 | 0,61 | 8,57 |
| 9,67 | 0,33 | 0,92 | 12,85 |
| 12,89 | 0,44 | 1,22 | 17,13 |

2.5 Lichtscheibenbeleuchtung und Detektion

Die funktionelle Basis der Lichtscheibenmikroskopie liegt in der Formgebung der beleuchtenden bzw. anregenden Lichtquelle. Die charakteristischen Größen der Lichtscheibe und beteiligte Parameter des Beleuchtungsobjektivs sind in der folgenden Abbildung 28 dargestellt:

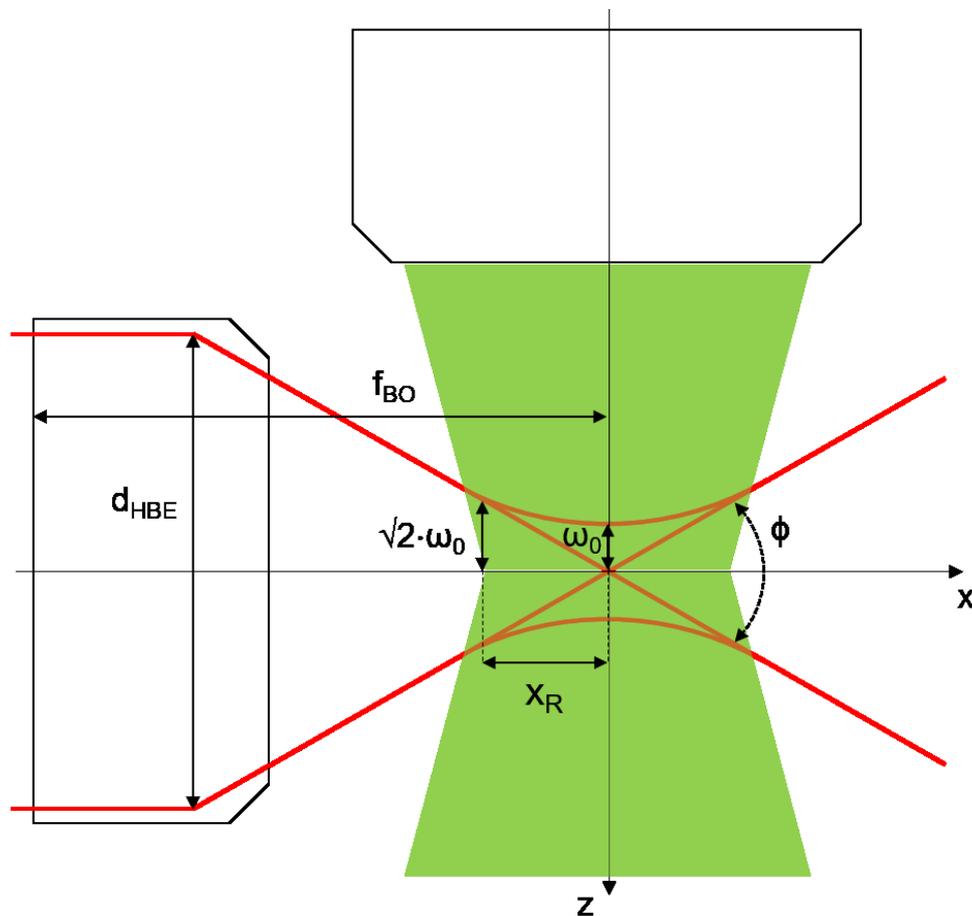


Abbildung 28: Charakteristische Größen der Lichtscheibenbeleuchtung.

Die Dimensionierung der Lichtscheibe wird maßgebend durch die verwendeten optischen Bauteile bestimmt. Die mathematischen Zusammenhänge werden im Folgenden erläutert. Das Definitionskriterium für die Länge der Lichtscheibe ist die Rayleigh Länge x_R . Diese beschreibt die Distanz von der Strahltaile bzw. dem Fokus ω_0 bis zu der Ebene, in der sich der Strahl um den Faktor $\sqrt{2} \cdot \omega_0$ aufgeweitet hat. Es gilt also der Zusammenhang⁵⁰:

$$\omega(x_R) = \sqrt{2} \cdot \omega_0 \quad (6)$$

Unter Annahme eines Gauß'schen Strahlprofils, das von Lasern erfüllt wird, kann die Rayleighlänge anhand der Wellenlänge und des Brechungsindex des Mediums wie folgt beschrieben werden⁵⁰:

$$x_R = \frac{\pi \cdot n \cdot \omega_0^2}{\lambda} \quad \text{oder} \quad \omega_0 = \sqrt{\frac{x_R \cdot \lambda}{\pi \cdot n}} \quad (7)$$

Des Weiteren besteht folgender Zusammenhang zwischen dem Öffnungswinkel der Strahltaile ϕ , der Brennweite des beleuchtenden Mikroskopobjektivs und dem Strahldurchmesser in der hinteren Fokusebene des Mikroskopobjektivs⁵⁰:

$$\frac{\phi}{2} \approx \tan\left(\frac{\phi}{2}\right) = \frac{d_{HBE}}{2 \cdot f_{BO}} \quad \text{oder} \quad \phi \approx \frac{d_{HBE}}{f_{BO}} \quad (8)$$

Zwischen der Winkelspreizung eines Gauß-Strahls und der Strahltaile ω_0 gilt folgende Beziehung⁵⁰:

$$\phi = \frac{2 \cdot \lambda}{\pi \cdot n \cdot \omega_0} \quad (9)$$

Aus den Gleichungen (8) und (9) ergibt sich demnach die Beziehung zwischen Strahldurchmesser in der hinteren Fokusebene und der Strahltaile⁵⁰:

$$\frac{d_{HBE}}{f_{BO}} = \frac{2 \cdot \lambda}{\pi \cdot n \cdot \omega_0} \quad (10)$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung (7) wird der Zusammenhang zwischen der Rayleigh Länge x_R ; dem Strahldurchmesser in der hinteren Fokusebene d_{BFP} und der Brennweite des Beleuchtungsobjektivs f_{BO} hergestellt⁵⁰:

$$d_{HBE} = \frac{2 \cdot \lambda \cdot f_{BO}}{\pi \cdot n} \cdot \sqrt{\frac{\pi \cdot n}{x_R \cdot \lambda}} = 2 \cdot f_{BO} \cdot \sqrt{\frac{\lambda}{\pi \cdot n \cdot x_R}} \quad (11)$$

Detektionsseitig sollte das Bildfeld mindestens der Breite der Lichtscheibe entsprechen. Hierbei muss die Größe des Kamera-Chips sowie die Vergrößerung des detek-

tierenden Mikroskopobjektivs. Unter Berücksichtigung der Pixelzahl und deren Kantenlänge besteht folgender Zusammenhang zwischen Rayleighlänge x_R , Kamera-Chipgröße und Vergrößerung des Detektionsobjektivs⁵⁰:

$$2 \cdot x_R = \frac{N_x^{px} \cdot d^{px}}{M_{DO}} \quad (12)$$

Die Breite des ins Beleuchtungsobjektiv eintretenden Strahls wird durch die Brennweiten des Teleskopliniensystems bestimmt⁵⁰:

$$d_{HBE} = d_b \cdot \frac{f_{T2}}{f_{T1}} = d_b \cdot M_T \text{ oder } d_b = \frac{d_{HBE}}{M_T} \quad (13)$$

Die Höhe der Lichtscheibe kann folgendermaßen formuliert werden⁵⁰:

$$d_h = \alpha_y \cdot d_b \cdot \frac{f_{T1}}{f_{ZY}} \cdot \frac{f_{BO}}{f_{T2}} = \alpha_y \cdot d_b \cdot \frac{1}{M_T} \cdot \frac{f_{IO}}{f_{CY}} \text{ oder } d_b = \frac{d_h \cdot M_T \cdot f_{ZY}}{\alpha_y \cdot f_{IO}} \quad (14)$$

Hierbei beschreibt f_{ZY} die Brennweite der Zylinderlinse und α_y den Anteil des Beleuchtungsstrahls, der von einer ggf. vorhandenen Schlitzeblende abgeblendet wird, um eine möglichst uniforme Intensitätsverteilung über die Höhe des Strahls umzusetzen.

Aus den Gleichungen (13) und (14) ergibt sich folgende Beziehung⁵⁰:

$$\frac{d_{HBE}}{M_T} = \frac{d_h \cdot M_T \cdot f_{ZY}}{\alpha_y \cdot f_{BO}} \text{ or } M_T = \sqrt{\frac{d_{HBE} \cdot f_{BO} \cdot \alpha_y}{d_h \cdot f_{ZY}}} \quad (15)$$

Hierin ist d_h die Höhe des anwendungsspezifisch angestrebten Bildfelds. Die hierfür benötigte Vergrößerung durch das Teleskop M_T kann mithilfe d_{HBE} durch Gleichung (11) ausgedrückt werden.

2.5.1 Aufbau des multimodalen Lichtscheibenmikroskops

Das entwickelte Mikroskop zielt darauf ab, mehrere Abbildungsmodalitäten zu integrieren, nämlich Rayleigh-Streuung sowie Raman-Streuung und Fluoreszenzemission. Das Beleuchtungsschema für die Probe ist ein statischer Lichtbogen mit orthogonaler Ausrichtung der Abbildungs- und Beleuchtungsoptiken. Das Mikroskop basiert auf der OpenSPIM-Plattform⁵¹. Um alle Kontrastmechanismen zu integrieren, verwendet der Aufbau einen über einen weiten Bereich abstimmbaren Spektralfilter zur Auswahl diskreter spektraler Informationen. Um verschiedene Photonen-Molekül-Wechselwirkungen zu initiieren, werden zwei verschiedene Dauerstrichlaser eingesetzt und koaxial ausgerichtet, bevor die Strahlquerschnitte zu statischen Lichtscheiben geformt werden. Die Probenpositionierung erfolgt dann in einer Wasserimmersionskammer. Der optische Aufbau des Mikroskops ist als Top-Down-Schema und als Inventor CAD-Modell (Autodesk Inc., San Francisco, USA) in isometrischer Ansicht in Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt.

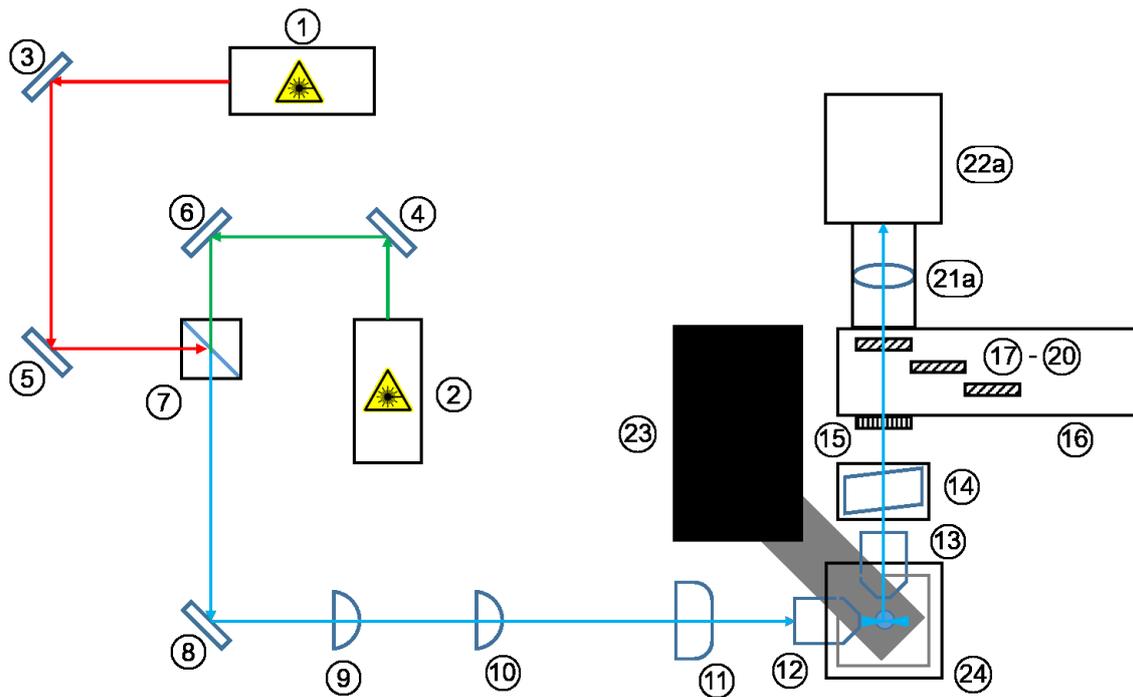


Abbildung 29: Schematische Draufsicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops mit angeschlossener sCMOS-Kamera. 1-12: Beleuchtungspfad; 13-22a: Detektionspfad; 1: Laser 1 (660 nm), 2: Laser 2 (785 nm), 3-6 und 8: Breitbandspiegel; 7: dichroiter Spiegel, 9: sphärische Linse ($f = 25 \text{ mm}$); 10: sphärische Linse ($f = 50 \text{ mm}$); 11: Zylinderlinse ($f = 50 \text{ mm}$); 12: Beleuchtungsobjektiv (10x); 13: Detektionsobjektiv (20x); 14: AOTF; 15: Polarisationsfilter; 16: Filterrad; 17-20: Langpassfilter; 21a: Tubuslinse; 22a: sCMOS-Kamera; 23: Verfahrenseinheit; 24: Probenkammer. Eine ausführliche Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8.

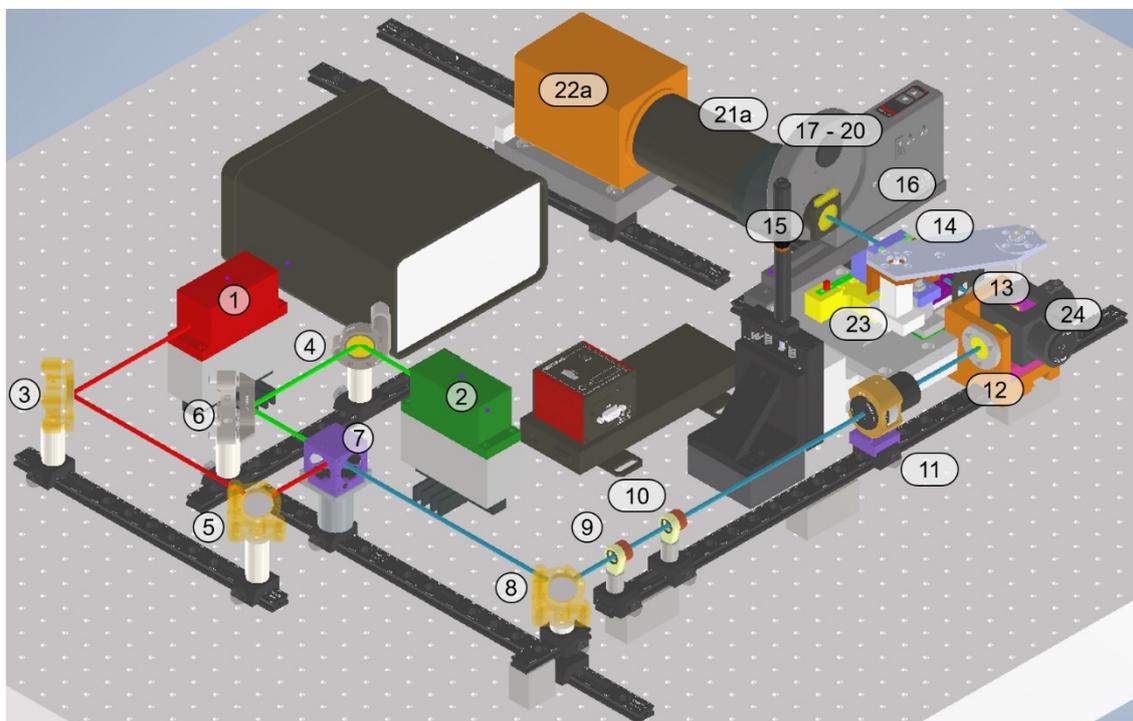


Abbildung 30: Isometrische Ansicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops (CAD-Modell) mit angeschlossener sCMOS-Kamera. Die farbigen Linien zeigen den optischen Pfad der Beleuchtungslaser. Rot: 660 nm Strahlengang. Grün: 785 nm Strahlengang. Blau: koaxiale Überlagerung der 660 nm und 785 nm Laser. Eine ausführliche Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8.

Das Mikroskop besteht aus drei funktionellen Untereinheiten: der Strahlformungs- und Beleuchtungsoptik, der Spektralselektions- und Abbildungsoptik und schließlich an der Schnittstelle der optischen Einheiten die mechanische Einheit zur Probenpositionierung (vgl. Abbildung 29). Die Beleuchtungseinheit besteht aus beiden Lasern mit Emissionswellenlängen 660 nm und 785 nm, fünf kinematisch gelagerten Spiegeln und einem dichroitischen Spiegel zur Ausrichtung und coaxialen Überlagerung der Laserstrahlen, zwei sphärischen Linsen und einer einzelnen Zylinderlinse zur Strahlformung und schließlich einem Mikroskopobjektiv zur Projektion des Lichtbogens in die Probenkammer. Die Abbildungseinheit besteht aus einem Mikroskopobjektiv für die Lichtdetektion der beleuchteten Probe, dem akustisch durchstimmbaren Filter (AOTF) und Polarisationsfiltern, gefolgt von einem Filterrad mit Lang- und Kurzpassfiltern, das in eine sCMOS-Kamera mit montiertem Tubusobjektiv mündet. Beide Diodenlaser (785 nm und 660 nm Emissionswellenlänge) emittieren kollimierte Strahlen mit einstellbaren Leistungen von 1 bis 130 mW bzw. 0,5 bis 200 mW für die Emissionswellenlängen 660 nm und 785 nm. Die Strahlen werden dann mit Hilfe von zwei Spiegeln, die jeweils in individuell einstellbaren Halterungen in einem Winkel von 45° zum einfallenden Strahl ausgerichtet sind, kongruent auf das Zentrum des dichroitischen Strahlteilers ausgerichtet. Das Reflexionsvermögen der Spiegel ist auf die jeweils einfallenden Strahlen optimiert. Am dichroitischen Spiegel transmittiert elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 785 nm, während Strahlung ab 685 nm reflektiert wird. Ein fünfter, justierbar montierter Breitbandspiegel leitet dann die coaxialen Laser durch das Zentrum der strahlquerschnittsformenden optischen Elemente weiter. Die individuellen Wege beider Laser sowie deren überlagerter Verlauf werden mit einem optischen Scanning Slit Beam Profiler BP209-VIS/M (Thorlabs Inc., Newton, USA) auf einer eigens entwickelten Halterung gemessen, um die Messung entlang der Achse des Strahlverlaufs zu ermöglichen. Nach der Reflexion am fünften Spiegel werden die Strahldurchmesser mit zwei achromatischen Linsendoubletten verdoppelt, um die Ausleuchtung des beleuchtenden Mikroskopobjektivs zu erhöhen. Die Linsen sind hierfür analog zu einem Kepler-Teleskop angeordnet. Die kollimierten Strahlen werden dann durch eine achromatische Zylinderlinse als horizontale Linie auf die hintere Brennebene des beleuchtenden 10x-Mikroskopobjektivs fokussiert. Anschließend projiziert das Beleuchtungsobjektiv die vertikale Laserlinie als horizontalen Lichtstrahl in die Brennebene des detektierenden Mikroskopobjektivs in der Probenkammer. Die Pro-

benpositionierung wird durch einen USB-4D-Tisch umgesetzt, der eine lineare Translation entlang der X-, Y- und Z-Achse sowie eine Rotation um die Z-Achse erlaubt. Die linearen Achsen haben einen Bereich von jeweils 9 mm und eine Auflösung von 1,5 μm pro Schritt. Die Rotationsachse hat eine Auflösung von 0,5 Grad pro Schritt. Der 4D-Tisch ist auf einem PT1/M-Z8-Einachsen-Lineartisch mit einem Verfahrbereich von 25 mm und einer Auflösung von 0,03 μm montiert. Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen, mehrere Proben nacheinander abzubilden, indem der Verfahrbereich entlang der Z-Achse erweitert wird. Mit diesem kombinierten Positionierungssystem werden die Proben-Sphäroide dann sowohl innerhalb des Lichtbogens als auch in der Brennebene des detektierenden Mikroskopobjektivs platziert.

Die Lichtscheibe selbst ist der Schnittpunkt zwischen der Beleuchtungs- und der Detektionsoptik. Das detektierende 20x-Mikroskopobjektiv ist orthogonal zur Lichtscheibe angeordnet und sammelt gestreute und emittierte Photonen entsprechend seiner numerischen Apertur. Die Spektralselektion erfolgt mit Hilfe des nachfolgend angeordneten acousto-optic tunable filter (AOTF). Hier ist ein Telluroxidkristall als nicht kollinear konfiguriert. Dies führt zu unterschiedlichen Ausbreitungswinkeln von akustischen und optischen Wellen im Inneren des Kristalls. Die Hochfrequenzwellen versetzen den Kristall in Schwingungen, wobei sich die Gitterkompression und -relaxation abwechseln, wodurch der Brechungsindex variiert und nur die gewünschten Spektralbereiche durchgelassen werden, so dass er wie ein einstellbarer Bandpassfilter mit einer wellenlängenabhängigen Bandbreite von 2,2 nm bei 589 nm und 7 nm bei 1060 nm funktioniert. Die ausgewählten Spektralbereiche werden in einem von der gewünschten Wellenlänge abhängigen Ablenkungswinkel, bezogen auf die 0-te Ordnung, abgelenkt. Diese Ablenkung sorgt dafür, dass nur der gewünschte Wellenlängenbereich den Detektor erreicht. Außerdem wird das Durchlicht polarisiert. Entsprechend der Herstellerempfehlung werden Polarisationsfilter hinter dem AOTF platziert. Je nach Beleuchtungswellenlänge und Abbildungsmodus können weitere Sperrfilter mit einem Filterrad in den Strahlengang eingebracht werden. Dies ist besonders wichtig, wenn Raman-Streuung oder Fluoreszenz in unmittelbarer spektraler Nähe der Anregungswellenlänge abgebildet werden soll. Eine U-TLU-Tubulinse (Evident Europe GmbH, Hamburg, Deutschland) bildet im vom AOTF definierten Spektralbereich Bilder des Sphäroids auf den wissenschaftlichen komplementären Metall-Oxid-Halbleiter-Chip (sCMOS) einer ORCA Flash 4.0 V3 LT+ Kamera (Hamamatsu, Hamamatsu-shi, Ja-

pan) ab. Die Kamera hat eine effektive Anzahl von 2048 x 2048 Pixeln bei einer Pixelgröße von 6,5 μm x 6,5 μm . Durch Binning wird die Anzahl der Pixel auf 1024 x 1024 Pixel und die Zellgröße auf 13 x 13 μm angepasst, wodurch die Empfindlichkeit des Chips um den Faktor 4 erhöht wird.

Es wurden Laser mit einer Emissionswellenlänge von 785 nm und 660 nm implementiert. Der Hauptgrund für diese Wellenlängen ist der Zugang zu möglichst vielen Photonen-Molekül-Wechselwirkungen, von denen die Raman-Streuung am wichtigsten ist. Wie aus Gleichung (2) ersichtlich, ist die Laserfrequenz und damit die Wellenlänge der stärkste Parameter zur Anregung des Raman-Effekts geht. Die Signalausbeute an inelastisch gestreuten Photonen nimmt mit abnehmender Wellenlänge zu. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass die Fluoreszenz bei niedrigeren Wellenlängen effizienter bzw. breiter angeregt werden kann. Außerdem ist zu beachten, dass die optimale Anregungswellenlänge für eine maximale Fluoreszenzeffizienz von den spezifischen Absorptionseigenschaften der einzelnen Fluorophore abhängt. Daher ist es wichtig, Absorptionsspektren zu berücksichtigen und die geeignete Anregungswellenlänge entsprechend zu wählen. Im Allgemeinen steigt also die Wahrscheinlichkeit der Überlagerung von Raman-Signalen mit Fluoreszenzsignalen, wenn niedrigere Anregungswellenlängen verwendet werden. Angesichts des geringen Wirkungsquerschnitts des Raman-Effekts sind inelastisch gestreute Raman-Photonen aufgrund der ungleichen Signalintensitäten dann nicht mehr von Fluoreszenzsignalen zu unterscheiden. Um beide gewünschten Effekte zu erreichen, wurden Laserwellenlängen im visuellen Rot und im nahen Infrarot gewählt. 785 nm wird in der Regel verwendet, um bei industriellen Raman-Messverfahren im Vergleich zu 532 nm den Fluoreszenzhintergrund zu reduzieren. Eine weitere Reduzierung von Fluoreszenz ist zwar durch den Einsatz von 1064 nm möglich, würde aber mit einer Reduzierung der Effektanregung um den Faktor 3,4 einhergehen. 785 nm stellt also den Mittelweg hinsichtlich der größtmöglichen gewünschten Effektausbeute und der Reduzierung des im Vorfeld unbekanntem Signalthintergrunds des Probenmaterials dar. Bei 3D-Zellkulturen übersteigt die molekulare Vielfalt der Probe bei weitem jeden industriellen Prozess. Außerdem sind die molekularen Konzentrationsbereiche deutlich geringer als bei industriellen Anwendungen. Um den Raman-Effekt effektiver anregen zu können und gleichzeitig einer übermäßigen Anregung von Fluoreszenz entgegenzuwirken, wird zusätzlich die Wellenlänge 660 nm eingesetzt. Die Anregung des Raman-Effekts wird dadurch um den Faktor 2 und das optische Fenster von Gewebe vermieden. Die Wellenlänge 660 nm

ermöglicht auch den Zugang zum Fluoreszenzfarbstoff Draq5⁵². Um die spektrale Information der Kamera zu überprüfen, werden Anpassungen am Detektionspfad vorgenommen. Die Kamera wird auf Schwalbenschwanz-Schienen nach hinten verschoben und an ihrer ursprünglichen Position ein Spektrometeradapter angebracht. Der modifizierte Aufbau ist schematisch in Draufsicht und als CAD-Modell in isometrischer Ansicht in Abbildung 31 und Abbildung 32 zu sehen.

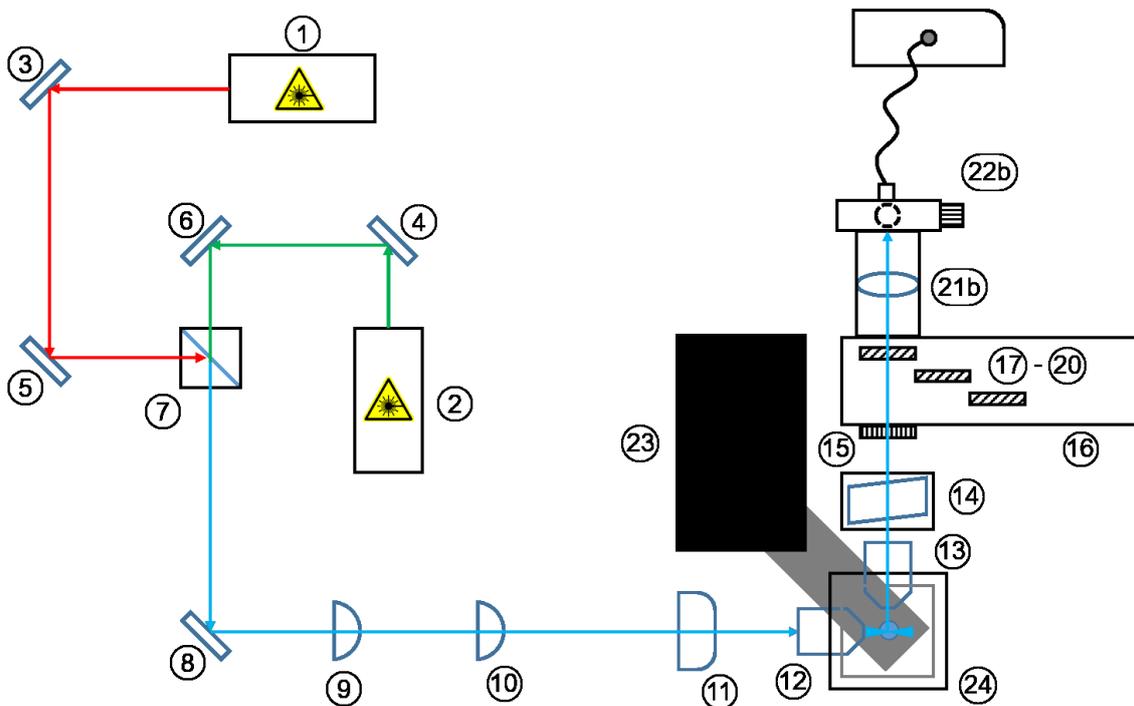


Abbildung 31: Schematische Draufsicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops mit angeschlossenem Spektrometer. 1: Laser 1 (660 nm), 2: Laser 2 (785 nm), 3-6 und 8: Breitbandspiegel; 7: dichroiter Spiegel, 9: sphärische Linse ($f = 25 \text{ mm}$); 10: sphärische Linse ($f = 50 \text{ mm}$); 11: Zylinderlinse ($f = 50 \text{ mm}$); 12: Beleuchtungsobjektiv (10x); 13: Detektionsobjektiv (20x); 14: AOTF; 15: Polarisationsfilter; 16: Filterrad; 17-20: Langpassfilter; 21b: asphärische Linse ($f = 25 \text{ mm}$) mit optischer Faser ($\varnothing 550 \mu\text{m}$); 22b: Raman-Spektrometer tec5 MultiSpec®; 23: Positioniertisch; 24: Probenkammer; Eine detaillierte Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8.

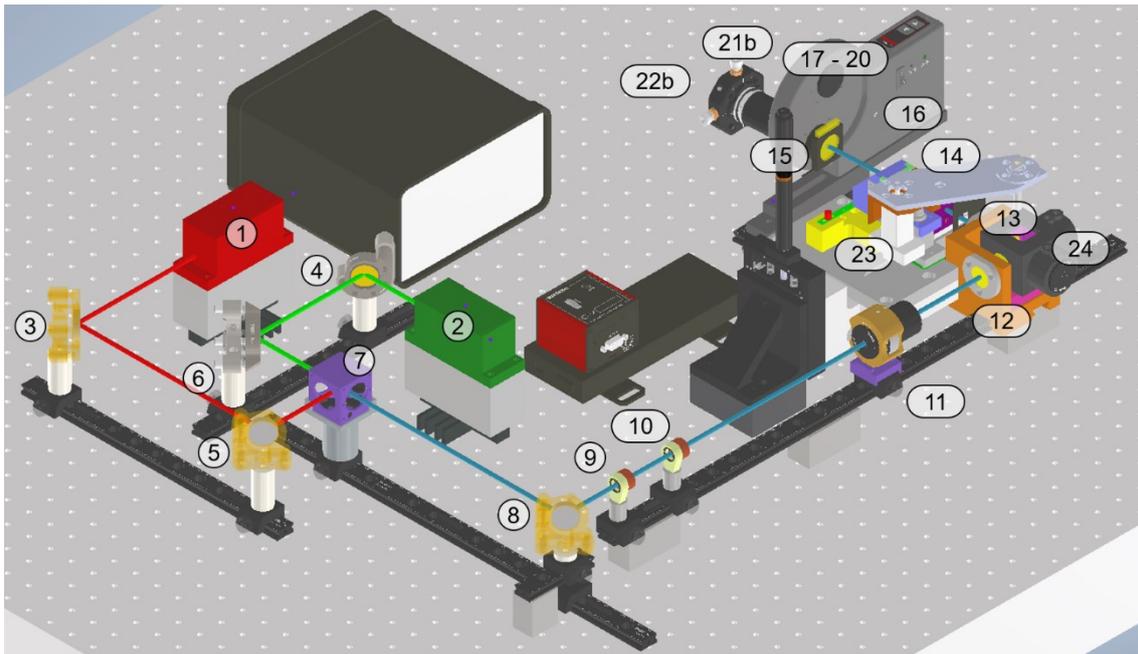


Abbildung 32: Isometrische Ansicht des Raman-Lichtscheibenmikroskops (CAD-Modell) mit Faserkopplung für spektrometrische Detektion ergänzend zur Bildgebung. Die farbigen Linien zeigen den optischen Pfad der Beleuchtungslaser. Rot: 660 nm Strahlengang. Grün: 785-nm-Strahlpropagation. Blau: koaxiale Überlagerung von 660 nm und 785 nm Strahlengang. Eine ausführliche Beschreibung der Komponenten befindet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Komponenten. Die fortlaufende Nummerierung entspricht den Nummern aus Abbildung 29 bis Abbildung 32.

Tabelle 8: Teileliste des Mikroskop-Prototyps. Nummerierung entsprechend Abbildung 29 bis Abbildung 32.

| Position | Komponente | Hersteller | |
|----------|--|-------------------|---------------|
| 1 | LuxX Laser 785 nm, Emissionsleistung 0.5 – 200 mW | Omicron GmbH | Laserage |
| 2 | LuxX Laser 660 nm, Emissionsleistung 0.5 – 130 mW | Omicron GmbH | Laserage |
| 3 | Spiegel, Ø25,4 mm, EO2 Beschichtung, Halterung Polaris K1 | Thorlabs Inc. | |
| 4 | Spiegel, Ø25,4 mm, EO3 Beschichtung, Halterung Polaris K1 | Thorlabs Inc. | |
| 5 | Spiegel, Ø25,4 mm, EO2 Beschichtung, Halterung Polaris K1 | Thorlabs Inc. | |
| 6 | Spiegel, Ø25,4 mm, EO3 Beschichtung, Halterung Polaris K1 | Thorlabs Inc. | |
| 7 | Dichroiter Spiegel, 25 mm x 36 mm, Reflektion 350 – 671 nm, Transmission 702 – 1200 nm | Semrock | |
| 8 | Spiegel, Ø25,4 mm, EO2 Beschichtung, Halterung Polaris K1 | Thorlabs Inc. | |
| 9 | Achromatische Linse, Ø12,7 mm, Brennweite 25 mm, Anti-Reflex-Beschichtung 400 – 1100 nm | Thorlabs Inc. | |
| 10 | Achromatische Linse, Ø12,7 mm, Brennweite 50 mm, Anti-Reflex-Beschichtung 400 – 1100 nm | Thorlabs Inc. | |
| 11 | Zylindrische achromatische Linse, Ø25,4 mm, Brennweite 50 mm, Anti-Reflex-Beschichtung 650 – 1050 nm | Thorlabs Inc. | |
| 12 | UMPLFLN10XW Tauchobjektiv, Vergrößerung 10x, NA 0,3, Arbeitsabstand 3,5 mm, Semiapochromat | Evident | |
| 13 | UMPLFLN20XW Tauchobjektiv, Vergrößerung 20x, NA 0,5, Arbeitsabstand 3,5 mm, Semiapochromat | Evident | |
| 14 | Acousto optic tunable filter, Spektralbereich 550 – 1000 nm | Brimrose | |
| 15 | Polarisationsfilter | Thorlabs Inc. | |
| 16 | Filterrad mit 6 Kammern | Thorlabs Inc. | |
| 17 | Langpassfilter 660 nm | Semrock | |
| 18 | Notch Filter 660 nm | Semrock | |
| 19 | Kurzpassfilter 660 nm | Semrock | |
| 20 | Langpassfilter 785 nm | Semrock | |
| 21a | Tubus-Linse U-TLU mit C-mount (U-TV0.5XC-3) | Evident | |
| 21b | Asphärische Linse, Ø25 mm, Brennweite 20 mm, Anti-Reflex Beschichtung 650 – 1050 nm | Thorlabs Inc. | |
| 22a | sCMOS Kamera ORCA Flash 4.0 LT+ | Hamamatsu | |
| 22b | CXY1 positionierbare Linsenhalterung, Glasfaser Ø550 µm | Thorlabs Inc. | |
| 23 | USB-4D-stage (X, Y, Z, R) PT1/M-Z8-Einachsen-Lineartisch | Picard-Industries | Thorlabs Inc. |
| 24 | Probenkammer, Aluminium Halterung, Acrylglas Wasserkammer | CeMOS | |
| 25 | MultiSpec® Raman Spektrometer | tec5 AG | |

2.5.2 Probenpositionierung

Die Probenpositionierung wurde speziell für den Aufbau entwickelt und hergestellt. Anfängliche Strategien zur Probenbefestigung mit Kapillaren und Schläuchen erwiesen sich als unzureichend, da die Proben bei der Durchführung durch verschiedene Experimentatoren eine hohe lokale Variabilität aufwiesen und Probleme wie die Haftung von Sphäroiden an Glasoberflächen auftraten. Um diese Herausforderungen zu beheben, wurde ein Halter mit einer quaderförmigen Gelkammer mit einem Volumen von 90 mm^3 konstruiert, die an einer zylindrischen Verlängerung befestigt ist. Der Zylinder ist durch einen passgenauen, elastischen Ring in der 4D-Verfahrenheit formschlüssig fixiert. Die Rückwand der Gelkammer ist fenestriert, sodass eine Bildgebung der Probe in mehreren räumlichen Orientierungen möglich ist. Es wird eine diesbezüglich eine Positionierung der Probe in der im verlängerten Schwerpunkt des Zylinders und damit der Drehachse des Positioniersystems angestrebt. Die ideale Positionierung ist in Abbildung 33 dargestellt.

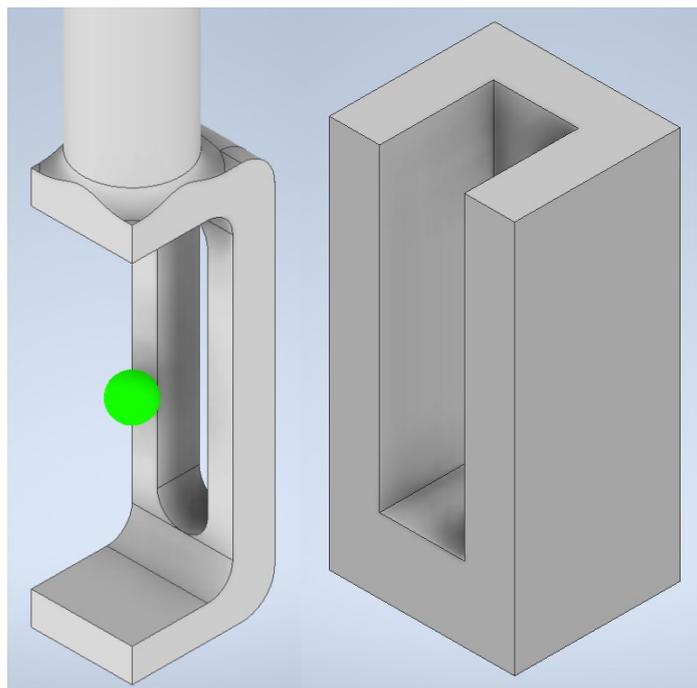


Abbildung 33: CAD-Modell eines Multiperspektiven-Probenträgers und des zugehörigen Rahmens für die Einbettung von Sphäroid-Proben in Hydrogelen.

Zur Probenaufnahme wird der Träger in einen komplementären Gussrahmen eingesetzt. Anschließend wird eine Negativform aufgesetzt, die formschlüssig über einen Anschlagsarm die Spitze eines asymmetrischen Quaderstumpfs in der Längsachse des Zylinders positioniert (vgl. Abbildung 34). Die Höhe des Kegelstumpfs überschreitet die Längsachse um den halben Durchmesser der zu vermessenden Sphäroide,

sodass die Achse zentral durch Sphäroide verläuft. Anschließend wird ein Hydrogel in den Leerraum innerhalb des Rahmens pipettiert und nach Aushärten des Gels die Negativform entfernt. Das Ergebnis ist ein trichterförmiger Hohlraum im Gel mit Tiefpunkt in der Drehachse des Probenpositioniersystems auf halber Höhe des Fensters der Gelkammer. Ein Sphäroid kann in den Hohlraum pipettiert werden und sedimentiert aufgrund der Formgebung an den gewünschten Punkt. Zur endgültigen Fixierung wird der Flüssigkeitsüberstand der Probe entfernt und das Hohlvolumen mit Hydrogel gefüllt. Die Asymmetrie des Kegelstumpfs verhindert, dass das Sphäroid durch das Einbringen des fixierenden Hydrogels aus der gewünschte Position bewegt wird.

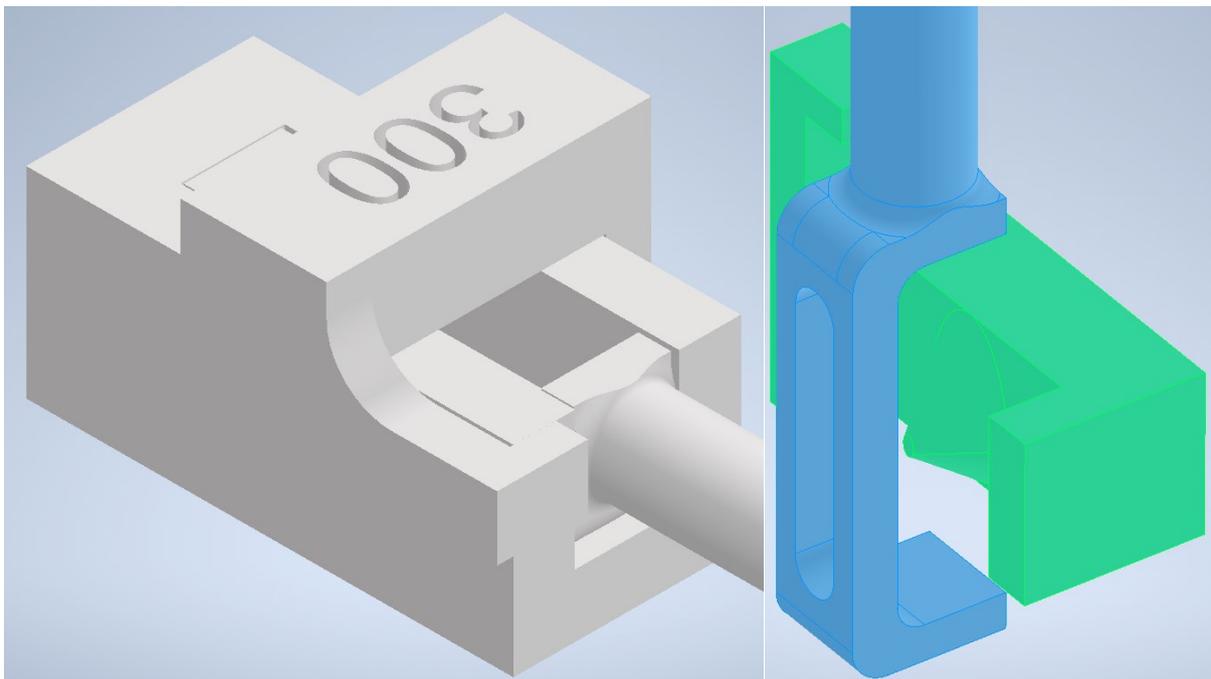


Abbildung 34: Probenhaltersystem bestehend aus fenestrierter Gelkammer mit zylindrischer Verlängerung, Gussrahmen und Negativform zur genauen, reproduzierbaren Einbettung von Sphäroiden in Hydrogel.

Probenträger und -rahmen sowie Negativform werden mittels 3D-Druck aus schwarzem V4-Harz (Formlabs, Boston, USA) mit Form 3-Druckern (Formlabs, Boston, USA) hergestellt, und sind für den einmaligen Gebrauch gedacht. Durch die Umstellung auf Hochtemperatur-V2-Harz (Formlabs, Boston, USA) sind die Träger und Rahmen autoklavierbar und können somit auch mehrfach verwendet werden.

2.5.3 Zellkultur und Sphäroidbildung

Zur Herstellung von Sphäroiden in Mono- und Co-Kulturen wurde die entsprechende Anzahl von Zellen in 96-Well-U-Bodenplatten (Corning) mit ultra low attachment (ULA) und dem entsprechenden Medium ausgesät und 2 Minuten lang bei 20x g zentrifugiert. Alle Zellen wurden in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung

gehalten und für 3 Tage kultiviert. HT-29-Kolonkrebszellen (ATCC) wurden in McCoy's 5A-Medium (Capricorn) kultiviert, das mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Pen/Strep ergänzt wurde. Für die Sphäroidbildung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgetrennt und in 96-Well-ULA-Platten mit einer Konzentration von 1×10^3 Zellen pro Well ausgesät. Nach drei Tagen Kultivierung wurde ein Durchmesser von ca. 300 μm erreicht. CCD-1137SK-Fibroblastenzellen aus menschlicher Vorhaut (ATCC) wurden in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Capricorn) kultiviert, das mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Pen/Strep ergänzt wurde. Für die Sphäroidbildung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgetrennt und in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung auf ULA-Platten mit 96 Vertiefungen ausgesät und drei Tage lang kultiviert. Zur Herstellung von Co-Kulturen wurden die HT29-Tumorzellen im Verhältnis 1:5 mit CCD-1137SK-Fibroblasten gemischt. Folglich wurden $5 \cdot 10^2$ Tumorzellen mit $2,5 \cdot 10^3$ CCD-1137SK-Fibroblastenzellen gemischt und drei Tage lang in 96-Well-ULA-Platten mit gleichem Volumen des entsprechenden Mediums kultiviert. Abschließend wurden alle Sphäroide zur weiteren Verarbeitung in 4 % Formalin fixiert.

Die verwendeten HPV-negativen HNSCC-Zelllinien, UMSCC 11B und 14C, wurden von Thomas Carrey von der Universität Michigan zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinien stammen von Kehlkopfkarzinomen (UMSCC-11B) und einem Mundhöhlenkarzinom (UMSCC-14C). Die HNSCC-Zelllinien wurden mit Eagle's Minimum Essential Medium mit L-Glutamin (EMEM) (Lonza, Visp, Schweiz), 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B in 2D-Kulturflaschen kultiviert. Die Inkubation erfolgte unter kontrollierten Bedingungen bei 37°C in vollständig befeuchteter Luft und CO₂. Sobald die Zellen einen dichten Rasen gebildet hatten, wurden sie mit Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure abgelöst. Die Gesamtzahl der abgelösten Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die HNSCC-Zelllinien wurden in einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$ Zellen/Vertiefung in 96-Well Nunc™ ultra-low attachment round (RBPs) Bodenplatten (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) exponiert. Die Medien wurden an den Tagen 3, 5 und 8 gewechselt.

Zur Behandlung der Sphäroide der Zelllinien UMSCC-11B und UMSCC-14C (Monokultur, 25.000 Zellen/Sphäroid) wurde Cisplatin (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) am Tag 4 nach der Sphäroidbildung in einer Konzentration von 50 μM oder

100 μM verwendet. Zellen, die mit der entsprechenden Konzentration von DMSO kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Die behandelten und die Kontroll-Sphäroide wurden 48 bzw. 72 Stunden lang inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide zur weiteren Verarbeitung in 4 % Formalin fixiert.

2.5.4 Arbeitsablauf der Bildgebung

Die bildgebenden Messungen der Sphäroide bestehen aus 11 aufeinanderfolgenden Scans pro räumlicher Orientierung. Bei drei um jeweils 90° rotierten Orientierungen waren 27 Scans bildgebend und die restlichen 6 spektroskopisch. Insgesamt wurden 3 verschiedene Modalitäten gemessen, wobei die Probe vor und nach der Fluoreszenzfärbung bei unterschiedlichen Anregungs- und Detektionswellenlängen abgebildet wurde.

Zur reproduzierbaren Positionierung waren Sphäroide in 2 %ige Agarose auf dem anwendungsspezifischen Träger eingebettet und in der Wasserimmersionskammer aufgehängt. Das Probenpositionierungssystem, die Kamera sowie der AOTF werden während des gesamten Scanvorgangs von einem selbst entwickelten Python3-Programm (Version 3.7.6) angesteuert. Das Sphäroid wird in der Mitte des Sichtfeldes entlang der X- und Y-Achse positioniert und dann entlang der Z-Achse optisch geschnitten, während an jedem Messpunkt entweder Bilder oder Spektren aufgenommen werden. Folglich wurden vierdimensionale Datensätze (X, Y, Z, I) erfasst, wobei X, Y und Z die Raumkoordinaten sind und I die Intensität der detektierten Wellenlänge beschreibt.

Vor jeder Messung wurden individuelle Scan-Koordinaten für die untersuchten Sphäroide manuell bestimmt, um die räumlichen Randbedingungen für alle nachfolgenden Scans festzulegen. Um die Belastung der Zellen durch die optische Leistung während dieses ersten Schrittes zu minimieren, wurde das Mapping bei 1 mW bei 785 nm in der Live-Ansicht der Kamera durchgeführt. Anschließend wurden Rayleigh-Bilder bei 785 nm und 660 nm mit 1 mW Ausgangsleistung für jede Wellenlänge und einer Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen. Schnittebenen werden zwischen den Grenzkordinaten bei jedem Inkrement fotografiert. Am Ende eines Bildstapels wird das Sphäroid in die Ausgangsposition zurückgesetzt. Nachdem Rayleigh-Daten gesammelt wurden, folgten Raman-Stokes-Bilder. Zur Unterdrückung aller Rayleigh-Photonen während der Raman-Bildgebung wurde ein Langpassfilter für die Beleuch-

tungswellenlänge im Detektionslichtweg positioniert. Aufgrund der geringen Effektwahrscheinlichkeit wurde die Laserleistung auf die maximale Ausgangsleistung erhöht und die Belichtungszeit auf den maximalen Wert von 5000 ms eingestellt. Das Sphäroid wurde dann in allen vorherigen Schnittebenen der Rayleigh-Messung positioniert. Damit war die Abbildung inhärenter, markerfreier Effekte abgeschlossen. Die Konfiguration der Detektoroptik wurde dann angepasst, um die Aufnahme der entsprechenden Raman-Spektren jedes optischen Abschnitts zu ermöglichen. Anstelle der Kamera wurde eine Faserkopplung platziert, die wiederum in ein MultiSpec® Raman-Spektrometer einkoppelt. Um ein für die Peak-Detektion ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurde die Integrationszeit auf 20000 ms erhöht.

Der letzte Schritt innerhalb einer Scanserie war die Aufnahme des DraQ5 gefärbten Sphäroids. Zur Färbung mit dem Fluoreszenzmarker musste das eingebettete Sphäroid aus der Messkammer entnommen werden, weswegen das manuelle Mapping und die anschließenden Rayleigh-Scans mit den zuvor festgelegten Parametern wiederholt wurde. Die Anregung von DraQ5 erfolgte bei 660 nm mit 35 mW. Die Belichtungszeit pro Aufnahme war 1000 ms. Die Detektionswellenlänge des AOTF wurde auf 815 nm eingestellt, was einer zentralen Peak-Position von 2881 cm^{-1} entspricht. Die Bandbreite des AOTF von 4 nm definierte also einen Signalbereich von 2851 cm^{-1} bis 2911 cm^{-1} .

Der Arbeitsablauf der Datenerfassung zur Rayleigh-, Raman-, und Fluoreszenzbildgebung ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Arbeitsablauf der Bildgebung und zugehörige Geräteparameter.

| Scan Nr. | Modalität | Beleuchtungs- wellenlänge | Emissions- leistung | Integrations- zeit | Detektierte Wellenlänge | Sphäroidzustand | Detektor |
|----------|-----------------------|------------------------------|--|-----------------------|--|--|----------------------------|
| 1* | Rayleigh Streuung | 785 nm | 1 mW | 100 ms | 785 nm | PFA fixiert, in 2% Agarose eingebettet, ungefärbt | ORCA Flash 4.0 LT+ |
| 2 | | 785 nm | | | 785 nm | | |
| 3 | | 660 nm | | | 660 nm | | |
| 4 | Stokes Streuung | 660 nm | 130 mW | 5000 ms | 817 nm | PFA fixiert, in 2% Agarose eingebettet, ungefärbt | ORCA Flash 4.0 LT+ |
| 5 | 785 nm | 200 mW | 5000 ms | 2881 cm ⁻¹ | | | |
| 6 | Stokes Streuung | 660 nm | 130 mW | 20000 ms | 817 nm | PFA fixiert, in 2% Agarose eingebettet, ungefärbt | MultiSpec® Spektrometer |
| 7 | 785 nm | 200 mW | 20000 ms | 2881 cm ⁻¹ | PFA fixiert, in 2% Agarose eingebettet, Draq5 gefärbt | ORCA Flash 4.0 LT+ | |
| 8 | Rayleigh Streuung | 785 nm | 1 mW | 100 ms | | | 785 nm |
| 9 | | 785 nm | | | | | 785 nm |
| 10 | 660 nm | 660 nm | PFA fixiert, in 2% Agarose eingebettet, Draq5 gefärbt | ORCA Flash 4.0 LT+ | | | |
| 11 | Fluoreszenz Marker | 660 nm | | | 35 mW | 1000 ms | 817 nm |

* manuelle Bestimmung der räumlichen Scan-Grenzen anhand des Sphäroid-Durchmessers

2.5.5 Software zur Bedienung des Mikroskops

Die Automatisierung des Mikroskops basiert auf einem in der Programmiersprache Python3 selbstgestalteten Programm. Die Schnittstelle zu allen angesteuerten Komponenten ist USB. Die Ansteuerung der vier Schrittmotoren der USB-Stage, die PT1/M-Z8-Linearachse, sowie die Ansteuerung des Filtrerrades erfolgt über von den jeweiligen Herstellern angebotene dll-Libraries. Hierin sind über das Python-Modul Ctypes abrufbare Funktionen enthalten. Das Verwenden der .dll-Files hat zur Folge, dass das Programm lediglich auf Windows einsetzbar ist.

Das Filtrerrad wird über Angabe der Baudrate und des COM-Ports initialisiert und kann mit einem Integer zwischen 1 und 6 auf alle 6 Positionen gefahren werden. Es ist ebenso möglich auszulesen an welcher Position sich das Filtrerrad aktuell befindet und Positionseinstellung auf dem Port zu speichern.

Die Motoren der USB Stage werden mit Hilfe der Seriennummer initialisiert, was zusätzlich eine Zuordnung der Achsen vereinfacht. Die Initialisierung wurde direkt mit einer Funktion verknüpft, welche die Motoren auf ihre Home Position fährt, beziehungsweise den Rotationsmotor auf 0 setzt. Die Bewegung erfolgt durch Angabe eines Integers zwischen 0 und 5800 für die möglichen Positionen der Translationsmotoren. Jeder der vorgegebenen Schritte weist eine Schrittweite von 1,5 μm auf. Durch Vorgabe des Integer wird somit die Absolute Position festgelegt auf welche sich der betreffende Schrittmotor stellt. Die Geschwindigkeit der Motoren wird ebenfalls durch einen Integer festgelegt, welcher repräsentativ für einen Wert an Schritten pro Sekunde steht (vgl. Tabelle 10):

Tabelle 10: Geschwindigkeitsstufen und Verfahrensgeschwindigkeit der Linearachsen.

| V | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| s^{-1} | 133 | 143 | 154 | 167 | 182 | 200 | 222 | 250 | 286 | 333 | 400 | 500 |

Dieser Wert wurde im Skript auf 8 festgelegt. Langsamere Geschwindigkeiten sind ebenfalls denkbar, gehen dann allerdings mit höherem Zeitaufwand bei der seriellen Datenakquisition einher. Selbiges gilt für den Rotationsmotor mit dem Unterschied, dass für diesen eine Verrechnung des Integers zur Positionierung implementiert wurde, sodass der eingegebene Integer für einen Winkel in Grad relativ zur Initialisierungsposition 0 steht.

Die zusätzliche Linearachse, die als Verlängerung der Y-Achse als Grundlage für die sequenzielle Untersuchung mehrerer Proben implementiert ist enthält in der Library eine Funktion mit der sich alle angeschlossenen Achsen, die mit der Library betreiben lassen zurückgegeben werden. Die Rückgabe erfolgt über einen Integer als Identifier. Dieser ist im Anschluss initialisierbar. Wie bei den anderen Achsen wurde auch hier die Bewegung auf Home an die Initialisierung angehängt. Zur Bewegung der Achse wird ein Float angegeben, welcher die Endposition in Millimeter nach dem Verfahren angibt. Dieser wird allerdings mit einem Korrekturfaktor verrechnet (vgl. Tabelle 11) Zusätzlich wird eine Geschwindigkeit und eine Beschleunigung als Integer angegeben, die ebenfalls mit Korrekturfaktoren übersetzt werden. Die zugehörigen Rechenoperationen sind in den folgenden Gleichungen (16) bis (18) dargestellt.

$$POS_{APT} = EncCnt \cdot Pos \quad (16)$$

$$VEL_{APT} = EncCnt \cdot T \cdot 65636 \cdot Vel \quad (17)$$

$$ACC_{APT} = EncCnt \cdot T^2 \cdot 65636 \cdot Acc \quad (18)$$

Wobei $T = 2048 / (6 \cdot 10^6)$ ist. Die zugehörigen Korrekturfaktoren sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Korrekturfaktoren des DC Controllers KDC101 zur Steuerung des PT1/M-Z8-Einachsen-Lineartischs.

| EncCnt | Scaling Factor Velocity | Scaling Factor Acceleration |
|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| /mm ⁻¹ | /mm·s ⁻¹ | /mm·s ⁻² |
| 1919,6418578623391 | 42941,66 | 14,66 |

Die Kamera wird über die Hersteller API angesteuert und wird über eine ID initialisiert. Anschließend bestehen die Optionen ein Bild kontinuierlich auszugeben oder ein Bild mit definierter Belichtungszeit aufzunehmen. Die Belichtungszeit wird als Integer in Millisekunden vorgegeben und gibt ein Array mit Werten zwischen 0 und 65535 (16 Bit) zurück. Das Bild wird in einem sich automatisch öffnendem Fenster angezeigt und zusätzlich in einem Ordner mit den aktuellen Messdaten und allen in der GUI eingestellten Parametern gespeichert.

Die Benutzeroberfläche basiert auf dem Modul PyQt5. Die verschiedenen Bereiche der Oberfläche schalten sich nach erfolgreichem Initialisieren der dafür benötigten Komponenten frei. Dies ermöglicht auch den Betrieb einzelner Komponenten unabhängig des gesamten Systems. Die Achsen besitzen je eine Eingabefläche für die

Zielposition und eine ergänzende Schaltfläche zum Ausführen der Bewegung, ebenso wie eine Schaltfläche zum Verfahren auf die Home Position. Die sechs Positionen des Filterrads werden mit sechs Schaltflächen gesteuert. Die Belichtungszeit wird über ein Eingabefeld festgelegt und über eine Schaltfläche bestätigt. Ebenso kann das Livebild über Schaltflächen gestartet und gestoppt werden, sowie Einzelaufnahmen des Bildes ausgelöst werden. Für die Profilfunktion anhand derer voreingestellt Fahrwege mit Bildaufnahme nach jedem Schritt ablaufen sind Auswahlfelder vorgesehen über die auswählbar sind, welche der Linearachsen im Ablauf integriert werden sollen. In der Grundfunktionalität des Mikroskops ist zunächst nur die Z-Achse also die optische Schnittachse relevant. Hinsichtlich einer geplanten Funktionserweiterung mit sequenziellen Scan mehrerer Proben sind in der Profilfunktion bereits alle Linearachsen hinterlegt. Über Eingabefelder werden dementsprechend Schrittweiten und Endpositionen des Profils festgelegt. Als Startwert dient die aktuelle Position des Verfahrens. Sollte die Schrittweite außerhalb des vorhandenen Strecke liegen wird eine alternative Endposition vorgeschlagen. Zuletzt kann im Profil für jede Richtung noch die Priorität festgesetzt werden. Je nach Priorität fährt das Profil zuerst in X-Richtung und bewegt sich im Laufe der Messung langsam Richtung Y oder umgekehrt. Um den aktuellen Status anzuzeigen, wurde ein Informationsfenster sowie ein Ladebalken integriert. Alle beschriebenen Eingabe- und Steuerungsoptionen sind im folgenden Screenshot der Benutzeroberfläche (vgl. Abbildung 35) zu finden

Raman James

Kamera Setup

SNAPSHOT

PREVIEW

Profile

| | Step-Size [μ] | End-Position | Priority |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <input type="radio"/> X-Achse | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| <input type="radio"/> Y-Achse | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| <input type="radio"/> Z-Achse | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |

24%

Movement Setup

Long Y-Axis

Filter-Wheel

Status: None

660 nm Laser

785 nm Laser

Abbildung 35: Benutzeroberfläche der Mikroskop-Steuerungssoftware.

2.5.6 Software zur Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitungssoftware besteht aus drei individuell konfigurierbaren in Python geschriebenen Modulen: Plotter, Cropping und Background Removal. Das Plotter-Modul verknüpft die erfassten Spektren mit den aufgenommenen nativen Bildern und ist über eine grafische Benutzeroberfläche bedienbar. Es identifiziert in Spektren die höchste Signalintensität in vorausgewählten Spektralbereichen bzw. spezifischer Molekülschwingungen und weist den Wert des höchsten Signalpeaks dem höchsten Pixelwert zu. Diese Anpassung reduziert den ursprünglichen Graustufenbereich der Bilder von 0 bis 65535 auf 0 bis zum jeweiligen Maximalwert der Messreihe, um den Bildkontrast zu erhöhen. Signale hochenergetischer, zufällig auf der Spektrometer-Detektorzeile eintreffenden kosmischer Strahlung werden aus den Rohspektren durch Anwendung eines Algorithmus zum spektralen Despiking entfernt. Anschließend erfolgt eine Glättung der Raman-Spektren, um das Rauschen zu reduzieren durch einen Savitzky-Golay-Filter mit einer polynomischen Anpassung dritter Ordnung und einer Fenstergröße von 110 cm^{-1} bzw. 7 nm . Beim Start der Software werden Bilder und

Spektren automatisch durch die inkrementelle Laufnummer der Benennungskonvention zugeordnet. Der Maximalwert jeder Kombination wird ermittelt, wobei der höchste Wert der geladenen Messserie als Grundlage für die weitere Verarbeitung verwendet wird.

Das Paar aus Bild und Spektrum mit dem globalen Maximum der Serie wird in der Benutzeroberfläche zu Beginn angezeigt. Über das Feld Image IDX sind die restlichen Daten der Serie paarweise anhand ihrer Laufnummer darstellbar. Eine weitere Bearbeitung durch den Anwender ist mit Schieberegler für die Parameter Schwellenwertfarbe und Max Value möglich. Das Bedienfeld Reset stellt den ursprünglichen Zustand der Bilder her. Änderungen werden durch das Bedienfeld Process Data auf alle Bilder angewendet, sodass eine einheitliche Verarbeitung stattfindet. Die Ursprungsdateien bleiben hierbei erhalten und werden nicht überschrieben. Das Modul Cropping Image ändert das Format zu TIFF mit einer Bildgröße von 1024 x 1024 Pixeln.

Das Modul Backgroundremoval dient dazu die Probe isoliert darzustellen, indem der Bildhintergrund entfernt wird. Es stehen zwei Schieberegler zur Einstellung des unteren und oberen Grenzwertes der zusammenhängenden Fläche, sowie zwei weitere Schieberegler für die Ober- und Untergrenze eines HSV-Filters (Hue, Saturation, und Value bzw. Farbwert, Farbsättigung, und Hellwert) zur Verfügung. Die Benutzeroberfläche zeigt sechs Zwischenergebnisse der Bildbearbeitung als Vorschau an. Das Originalbild wird hierbei mittels HSV-Filter in ein Falschfarbenbild umgewandelt, sodass mittels Farbwahrnehmung die Sichtbarkeit von Details für menschliche Anwender verbessert wird. Ein Canny-Filter identifiziert anhand der eingestellten Grenzwerte Objektkanten. Detektierte Kanten werden hervorgehoben und die Fläche als Anzahl eingegrenzter Pixel angegeben. Anhand der abgegrenzten Fläche wird eine Maske erstellt die allen Pixeln außerhalb den Wert Null und innerhalb den Wert 1 zuweist. Die Maske wird mit eine UND-Verknüpfung über das Originalbild gelegt, sodass ausschließlich Bereiche, die mit 1 Verknüpft sind erhalten bleiben. Hierdurch werden alle Objekte bzw. Artefakte außerhalb der Interessensregion eliminiert und das Datenvolumen reduziert.

2.5.7 Software zur 3D Rekonstruktion

Zur Erzeugung der dreidimensionalen Darstellungen von Sphäroiden wird das Python-Plugin Napari angewendet. Napari wurde als mehrdimensionale Bilddarstellungsoberfläche für die wissenschaftliche Anwendung entwickelt. Das Modul erlaubt eine einfache Integration mit anderen Softwarelösungen zur Bildverarbeitung und erlaubt Daten in verschiedenen Ansichten darzustellen. Die dreidimensionale Darstellung benötigt hier eine Vorbereitung der Bilddaten, wofür die Beleuchtungsgeometrie des Mikroskops hinsichtlich der Lichtscheibendicke entscheidend ist. Die Lichtscheibendicke bestimmt den Abstand zwischen den einzelnen Bildern einer Serie. Aufgrund der realen, nicht infinitesimal kleinen Schichtdicke der Beleuchtung müssen entsprechende Abstände zwischen den Bildebenen eingefügt werden, um eine Stauchung des erzeugten Modells bei unmittelbarer Stapelung der Bildebenen zu vermeiden.

Würden jedoch lediglich Abstände zwischen den Bildern eingefügt, hätte dies aufgrund fehlender Messdaten innerhalb dieser Abstände während einer Drehung des 3D-Modells scheinbare Lücken zur Folge. Mittels linearer Interpolation des Intensitätsverlaufs aller korrespondierender Pixel füllen berechnete Zwischenwerte die Lücken. Bei der Bildgebung mit 8 μm Lichtscheibendicke werden hier 7 Ebenen mit jeweils 1 μm Dicke eingefügt. Durch diese Vorverarbeitung wird der Datensatz aufgrund der eingefügten Ebenen um den Faktor 7 vergrößert. Das resultierende 3D-Objekt wird anschließend in der Bedienoberfläche von Napari dargestellt.

Die Bedienoberfläche erlaubt mehrere Datensätze definiert aneinandergereiht als Objekt darzustellen und mehrere Objekte zu überlagern. Individuelle Bilder sind aus einer Liste anwählbar. Des Weiteren ist ein freier Wechsel zwischen zweidimensionaler und dreidimensionaler Darstellung möglich. Bei der zweidimensionalen Darstellung werden die Ebenen der betrachteten Datensätze sequenziell aneinandergereiht. Im dreidimensionalen Darstellungsmodus kann das Objekt frei in einem dreiachsigen kartesischen Koordinatensystem rotiert und positioniert werden. Das 3D-Objekt kann gespeichert und in verschiedene Formate konvertiert werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung der Probenbeleuchtung

Aufgrund der Sensitivität der MPPC-Detektoren sowie der Minimierung potenzieller Fluoreszenzsignale und der Verfügbarkeit von Referenzgeräten wurde als Emissionswellenlänge 785nm ausgewählt, um die Reduzierung der Anregungsleistung isoliert zu untersuchen. Die verwendeten MPPC-Detektoren sind bis zu einer Wellenlänge von 900 nm spektral sensitiv, was bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm einer oberen Grenze im Raman-Spektrum von ca. 1630 cm^{-1} entspricht und folglich den Finger-Print-Bereich umfasst. Als Analyte wurden Wasserstoffperoxid und Monoethanolamin ausgewählt und geeignete optische Spektralfilter in die Detektionskanäle verbaut. Hierbei ist zu beachten, dass im Analytkanal ein möglichst stark ausgeprägter Raman-Peak durch den Filter isoliert darstellbar ist. Im Referenzkanal hingegen muss ein nah angrenzender Spektralbereich erfasst werden, in dem sich keinerlei Signaleinflüsse des angestrebten Analyts befinden. Dies erlaubt Fremdlichteinflüsse und Änderungen des Signalhintergrunds aufgrund wechselnder Zusammensetzungen der Messmatrix rechnerisch zu kompensieren.

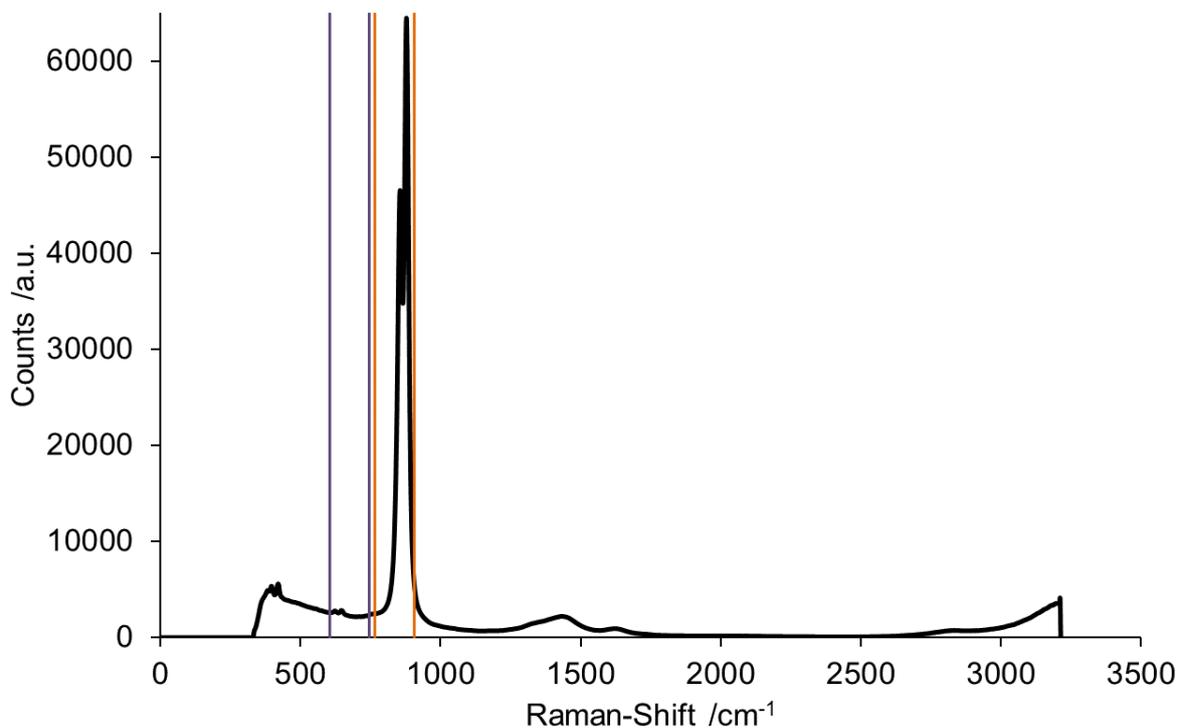


Abbildung 36: Raman Spektrum einer wässrigen Lösung von Wasserstoffperoxid. Rote vertikale Linien: Grenzen des Analytkanals. Blaue vertikale Linien: Grenzen des Referenzkanals.

In Abbildung 36 ist das Raman-Spektrum einer wässrigen Lösung von Wasserstoffperoxid dargestellt. Das Spektrum zeigt eine dominante Signalbande bei ca. 880 cm^{-1} . Der Signalbereich unterhalb von 500 cm^{-1} ist auf Eigensignale der verwendeten Messsonde und des Lasers zurückzuführen. Unter 300 cm^{-1} sind die Detektionspixel des Spektrometers softwareseitig auf den Wert 0 gesetzt, um eine Verzerrung der 0 cm^{-1} nahen Spektralbereiche durch Rayleigh-Streuung bzw. sonstige Reflexe der Emissionswellenlänge zu verhindern. Der an die relevante Signalbande angrenzende Spektralbereich zeigt keine weiteren Analyt-spezifischen Peaks, weswegen er als Referenzsignal geeignet ist.

In Abbildung 37 ist ein Reinstoffspektrum von Monoethanolamin (MEA) dargestellt. Im Vergleich zu Wasserstoffperoxid zeigt dieses Molekül ebenfalls Raman-Signale im Bereich um ca. 880 cm^{-1} .

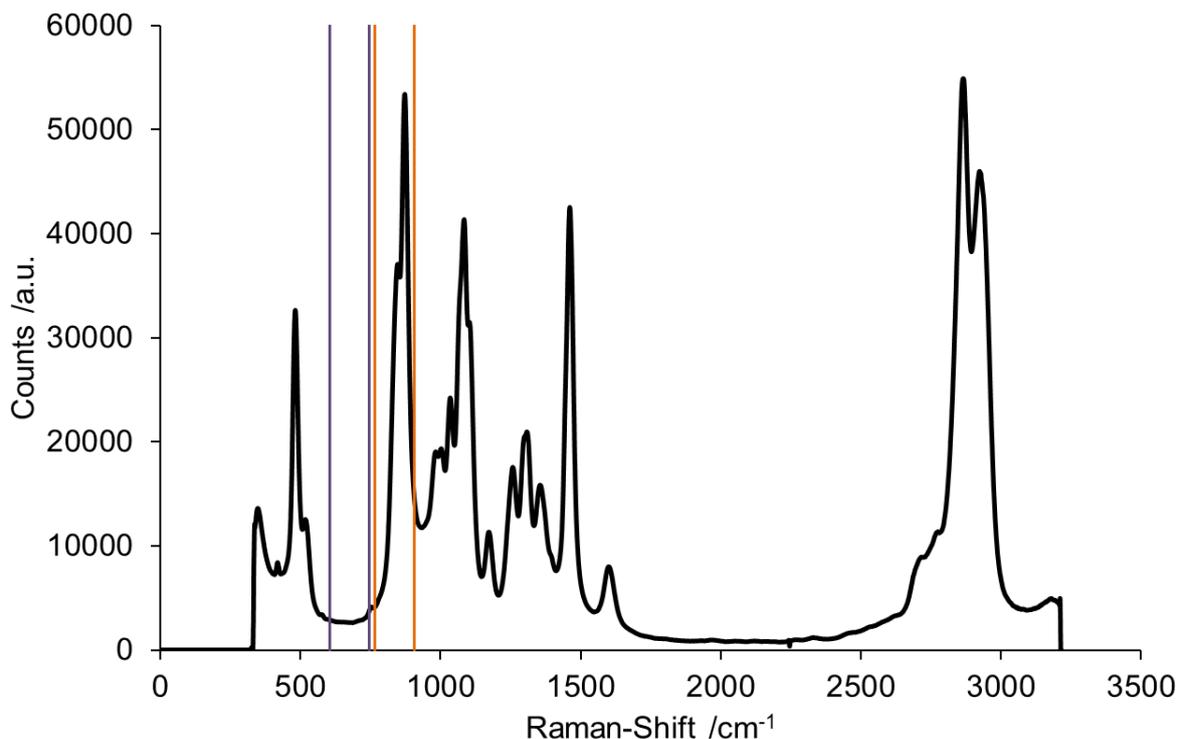


Abbildung 37: Raman Spektrum von Monoethanolamin (MEA) als Reinstoff.

Abweichend zur Wasserstoffperoxid-Messung wurde MEA als Modell für die Überwachung kontinuierlich verändernder Konzentrationen, vermittelt durch die Reaktion mit CO_2 , ausgewählt. Hierbei wird CO_2 über einen getauchten Schlauch kontinuierlich durch flüssiges MEA geleitet und währenddessen Änderungen im Raman-Spektrum gemessen. Der Verlauf der fortschreitenden Aminwäsche ist in Abbildung 38 durch eine Zeitserie von Raman-Spektren veranschaulicht.

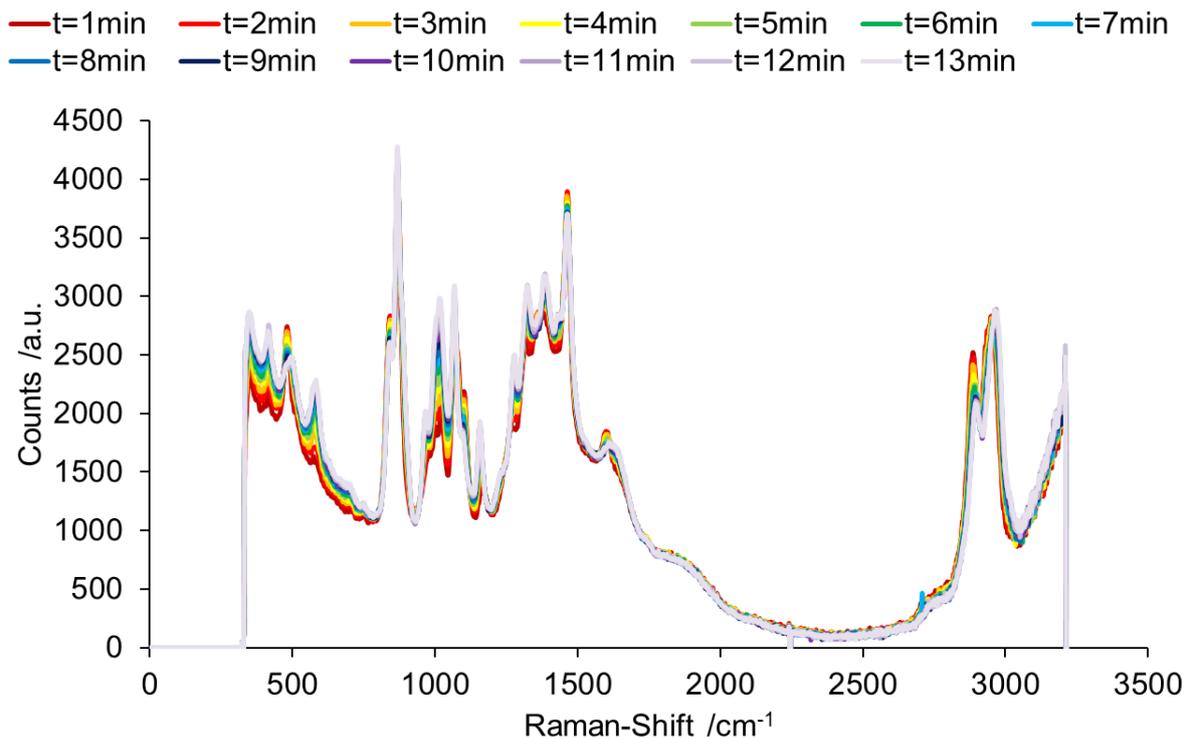


Abbildung 38: Zunehmende Bindung von CO_2 an Monomethanolamin über einen Zeitraum von 12 Minuten.

Die zunehmende Bindung von CO_2 an MEA spiegelt sich in Zu- und Abnahmen der Signalbanden. Es muss beachtet werden, dass überlagerte Signalbanden teilweise gegenläufige Trends im Reaktionsverlauf haben. Dies ist am Farbgradient der einzelnen Spektren verdeutlicht. Der Reaktionsfortschritt kann u.a. am Signalzuwachs bei 590 cm^{-1} isoliert verfolgt werden.

Bandpassfilter 1 hat eine Zentralwellenlänge von 840 nm , was bei einer Anregungswellenlänge bei 785 nm einem Raman-Shift von ca. 835 cm^{-1} entspricht. Die Zentralwellenlänge von Bandpassfilter 2 liegt als Referenz kürzer wellig versetzt bei 830 nm , bei gleicher Anregung also bei ca. 675 cm^{-1} . Beide Filter haben eine Halbwertsbreite (engl. full width at half maximum, FWHM) von 10 nm bzw. 140 cm^{-1} . Die spektralen Signale von Wasserstoffperoxid liegen damit im Transmissionsbereich der Filter. Eine formelle Trennung der Kanäle ist anhand des FWHM-Kriteriums gegeben, eine geringfügige Überlagerung ist jedoch aufgrund der Basisbreite der Filter möglich, was aufgrund der Verfügbarkeit optischer Filter in diesem Spektralbereich zum Zeitpunkt der Messungen unvermeidbar ist. Eine Trennung der Raman-Signale ist unter diesen Voraussetzungen trotzdem möglich, insofern die Position der Bande innerhalb des Filterbands ausreichend nahe an der oberen Grenzwellenlänge liegt bzw. die Breite der Bande schmal ist. Wasserstoffperoxid erfüllt beide Voraussetzungen, sodass eine Verfälschung des Analytsignals durch das Referenzsignal ausgeschlossen werden kann.

Die höhere Signaldichte im Spektrum von MEA erfordert eine Anpassung des Filterkonzepts. Weder die FWHM der Bandpassfilter noch die Zentralwellenlängen eignen sich zur Überwachung des Reaktionsverlaufs. Durch die serielle Verschaltung von zwei durchstimmbaren Filtern pro Messkanal verkleinert sich die transmittierende Bandbreite auf ca. 80 cm^{-1} bei prinzipiell frei wählbaren Zentralwellenlängen zwischen 300 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} .

Die Validierung des Photometers erfolgt anhand von Vergleichsmessungen mit einem MultiSpec® Spektrometer (tec5 AG, Steinbach, Deutschland). Als Bewertungsparameter dienen hierbei die Linearität und die Stabilität des Messsignals. Der Raman-Effekt skaliert linear mit der Konzentration des untersuchten Analyten, weswegen unterschiedliche Wasserstoffperoxid-Konzentrationen zwischen 0 Vol.-% und 30 Vol.-% bzw. 0 mol/l und 12,9 mol/l angesetzt sind. Die Messparameter sind für die Vergleichssysteme Photometer und Spektrometer identisch bei 1 s Integrationszeit und einer Akkumulation von 10 Messungen pro Konzentrationsstufe eingestellt.

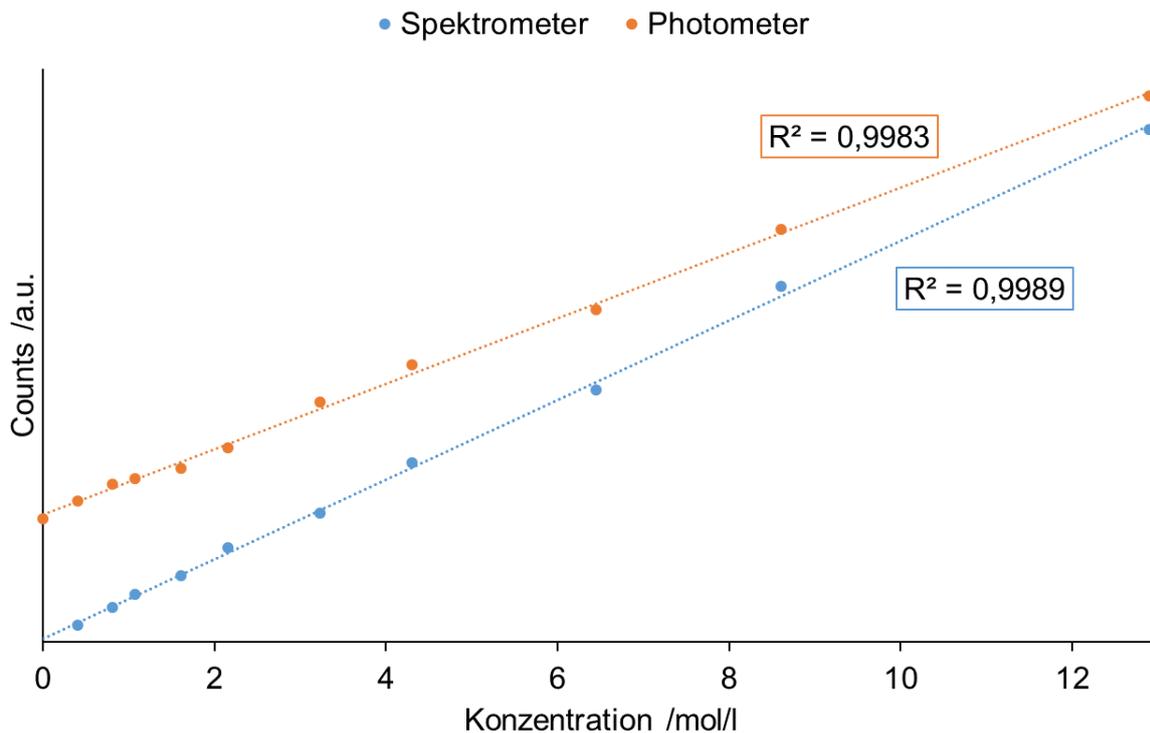


Abbildung 39: Vergleichsmessungen von H_2O_2 mit dem Raman-Photometer und einem Raman-Spektrometer.

Da das System für Überwachungszwecke konzipiert ist, muss die Langzeitstabilität des Messsignals beurteilt werden. Als Referenz dienen Langzeitmessungen von Ethanol und Wasserstoffperoxid. Um eine ausreichend hohe Wertemenge zu erhalten, wurden mit dem Photometer Messungen über einen Zeitraum von fünf Tagen durchge-

führt. Die Datenerfassungsrate lag bei einer Messung pro 60 s mit einer Integrationszeit von 1 s pro Messung. Die Versuche an Wasserstoffperoxid fanden unter Laborbedingungen statt. Eine analoge Untersuchung von Ethanol erweitert die Messbedingungen um eine geschlossene Kreisstromführung durch einen Wärmeübertrager.

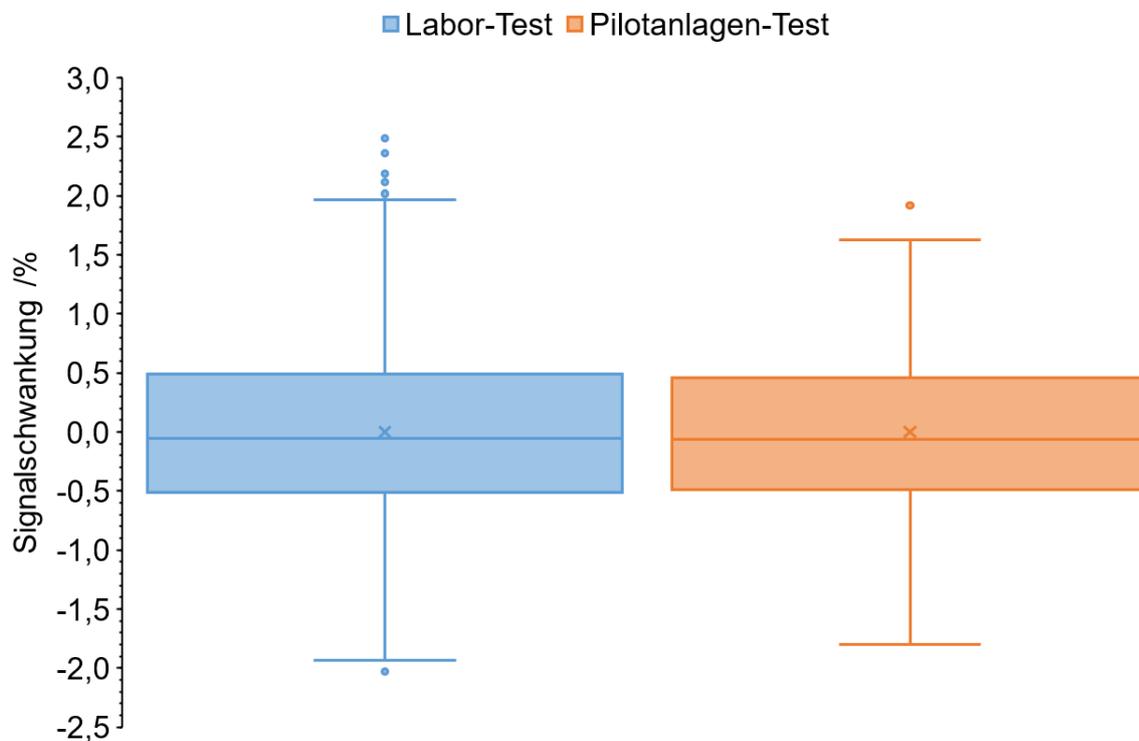


Abbildung 40: Signalstabilität des Raman-Photometers in Langzeitmessungen unter Laborbedingungen und in Pilotanlagenbetrieb. Labormessung: Überwachung von 12,9 mol/l H_2O_2 (30 Vol.-%), Messzeit 5 Tage, Integrationszeit 1 Minute. Pilotanlage: Überwachung von 5,65 mol/l Ethanol (33 Vol.-%) in geschlossenem Kreislauf, Messzeit 4 Tage, Integrationszeit 1 Minute.

Das Signal schwankt unter Laborbedingungen um weniger als $\pm 2,5$ % (vgl. Spannweite in Abbildung 40). Da es sich bei dem Raman-Photometer um einen Prototyp für ein Prozessinstrument handelt, sind Stabilitätsmessungen unter Laborbedingungen ein Indikator für die Einsatzfähigkeit unter anspruchsvollen Bedingungen. Aus diesem Grund wurde ein ähnlicher Test in einer kontinuierlichen Pilotanlage durchgeführt, die aus einem Lagertank, einem Wärmetauscher und einer Kreiselpumpe besteht. Die Anlage wurde in einem geschlossenen Kreislauf mit einer 5,65 mol/l Ethanol-Wasser-Mischung (33 Vol.-%) zur Überwachung betrieben. Als weiterer Unsicherheitsfaktor wurde anstelle von V.E. Wasser unbehandeltes Leitungswasser verwendet. Die Geräteparameter, wie Integrationszeit und Anregungsleistung, wurden nicht verändert. Abbildung 40 zeigt auch die Ergebnisse des Langzeittests unter Anlagenbetrieb.

Das Messsignal zeigt im Vergleich zu den Laborbedingungen eine höhere Stabilität, mit Schwankungen von weniger als $\pm 2,0\%$. Referenzmessungen mit Spektrometern zeigen eine vergleichbare Signalstabilität.

Die anspruchsvollste Messaufgabe des Systems ist die Reaktionsverfolgung während einer Aminwäsche. Aminoalkohole wie MEA reagieren in der Anwesenheit von CO_2 unter der Bildung von Carbamat-Ionen. Da es sich hierbei um eine Reaktion zwischen einer Flüssigphase und einer Gasphase handelt sind die Messbedingungen für das optische System erschwert. Das CO_2 wird über eine Schlauchführung durch einen MEA-Batch als disperse Phase geführt. Die Blasenbildung im Flüssigvolumen bedeutet ständige Änderungen des Brechungsindex und damit schwankende Matrixbedingungen für die Lichtleitung. Zusätzlich ändert sich entsprechend der fortschreitenden Konzentrationsänderungen das eigentliche Messsignal. Es kommt also zu einer Überlagerung dieser Effekte.

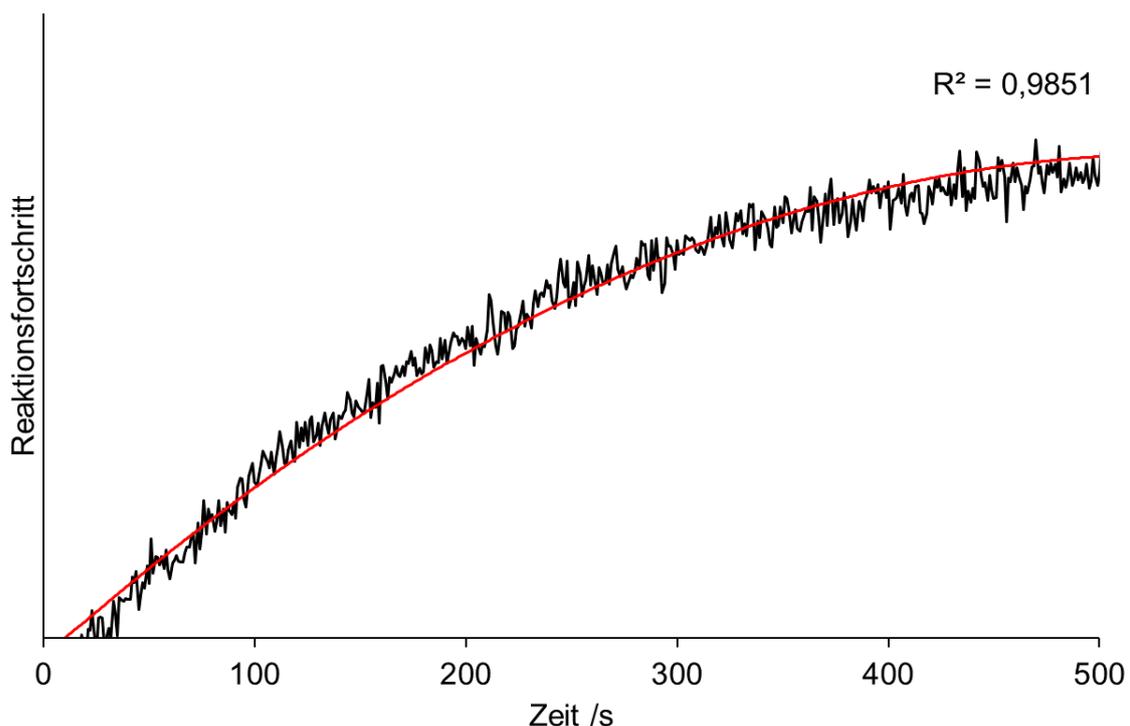


Abbildung 41: Photometrische Messdaten der Reaktionskinetik einer Chemisorption von CO_2 an Monoethanolamin.

Die anfänglich hohe Umsatzrate der Reaktion verlangsamt sich mit der Zeit und geht schließlich in eine Sättigung über. Stark dispergierte CO_2 -Blasen in der flüssigen Medium bewirken eine deutliche Erhöhung des Signalrauschens im Vergleich zu blasenfreien Proben. Die Messpunkte zeigen mit einem Pearson-Koeffizienten von

$R^2 = 0,9851$ eine hohe Übereinstimmung mit der entsprechenden Trendlinie. Referenzmessungen für den photometrischen Sensor wurden mit einem MultiSpec® Raman-Spektrometer (tec5 AG, Steinbach, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt.

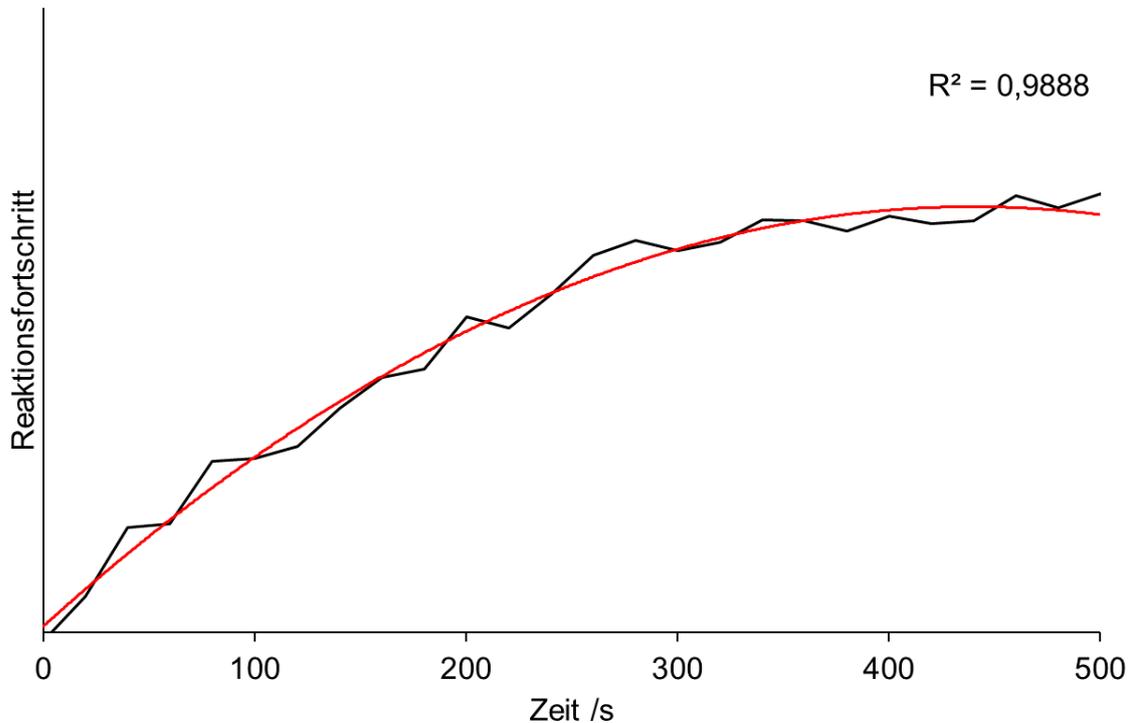


Abbildung 42: Spektrometrische Messdaten der Reaktionskinetik einer Chemisorption von CO_2 an Monoethanolamin.

Die spektrometrische Messung zeigt einen geringfügig höheren Pearson-Koeffizient von $R^2 = 0,9888$. Der Vergleich von Abbildung 41 und Abbildung 42 zeigt, dass Reaktionstrends mit einem Raman-Photometer ohne vollständige Spektralinformationen überwacht werden können.

3.2 Untersuchung von lokalen Konzentrationsprofilen einer zweiphasigen Strömung mit einer Mikroskop-Objektiv-Sonde in Kombination mit spektrophotometrischer Raman-Detektion

Die erste Iteration des Spektrophotometers ist in Abbildung 43 dargestellt. Die verwendeten Halterungskomponenten verfügen über SM1 1,035"-40 Feingewinde. Für die Positionierung von Linsen wurde insofern vorhanden die plane Fläche als Bezugsfläche verwendet, ansonsten wurde über die Kreisgeometrie oder die asphärische Linsengleichung die Ausdehnung der Linsenkrümmungen in Bezug auf die zugehörigen Stellringen der Linsen ermittelt um eindeutige Abstände einstellen zu können.

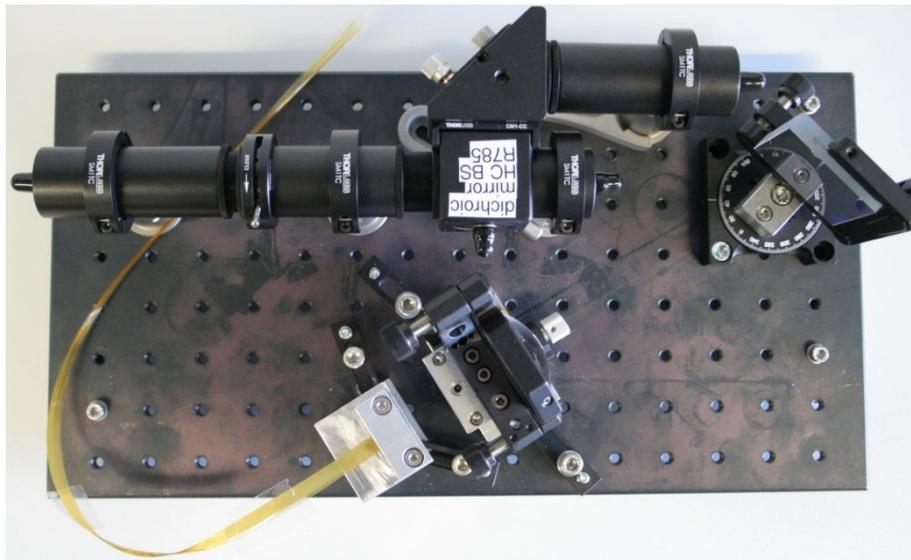


Abbildung 43: Prototyp des entwickelten Raman-Spektrophotometers.

Die spektrale Auflösung der Detektionskanäle konnte durch die Dispersion einer Halogenlichtquelle CLH 600 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) gezeigt werden. Hierzu wurde die Lichtquelle in den Signalpfad über eine Glasfaser mit 50 μm Kerndurchmesser eingekoppelt. Die Erfassung der Signale erfolgte an einem MultiSpec® Raman-System (tec5 AG, Steinbach, Deutschland), in welches ein leerer SMA-Stecker eingeschraubt und die einzelnen Glasfasern der Faserzeile eingeführt wurden. Die Integrationszeit betrug 3 ms, der Kerndurchmesser der Detektionsfasern 200 μm . Die Messergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt.

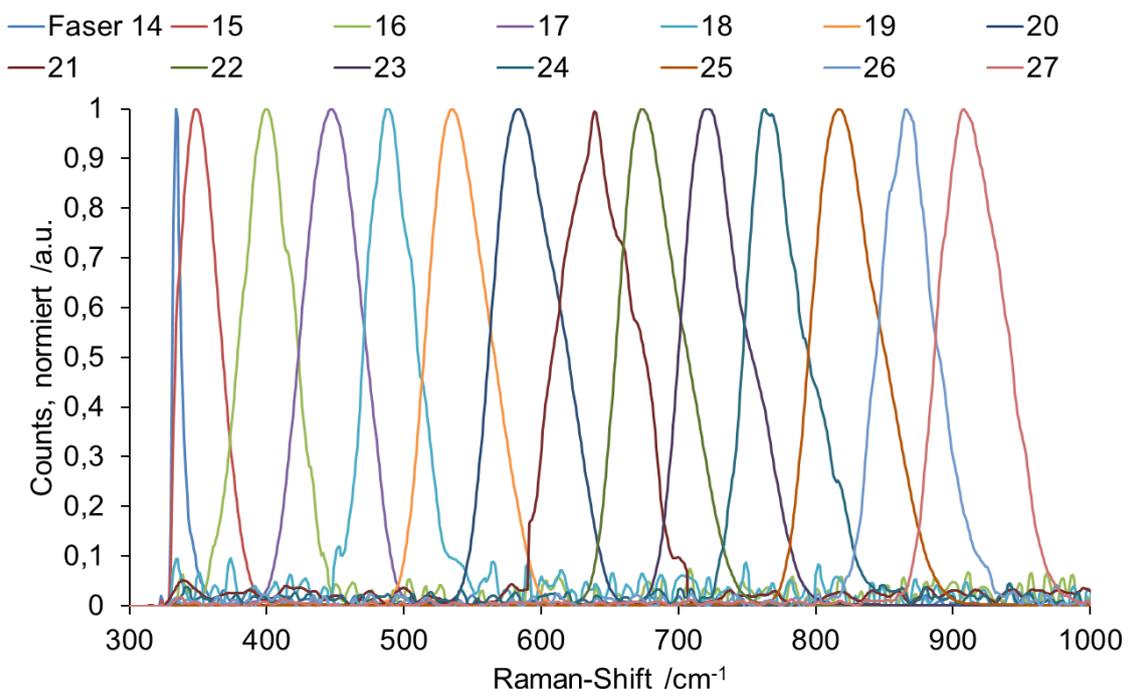


Abbildung 44: Grundlegende Funktionsprüfung des Spektrophotometers. Spektrale Auftrennung einer Halogenlichtquelle (CLH 600, Zeiss AG). Kerndurchmesser der Detektionsfaser: 200 μm . Integrationszeit: 3ms.

Die Glasfaserzeile mit 200 μm Faserkerndurchmessern umfasst insgesamt 27 Fasern. Da die Detektion des MultiSpec® Raman-Systems softwareseitig bei 320 cm^{-1} begrenzt ist, sind die 13 Fasern der linken Zeilenflanke in der Messung nicht zugänglich. Die Abweichung von Form und Position des Signalpeaks der zentralen Faser (vgl. Abbildung 44) ist ebenfalls auf diese Begrenzung zurückzuführen. Die Signalpeaks der verbleibenden 13 Fasern der rechten Zeilenflanke zeigen in Position und Halbwertsbreite ein homogenes Bild. Eine Normierung der Peaks war erforderlich, da die detektionsseitigen Glasfaserenden zum Zeitpunkt der Messung unbearbeitet waren. Hierdurch kam es zu Abweichungen in der Signalintensität um Faktoren von 10^2 bis 10^3 . Die Abstände der Signalpeaks betragen im Median 47 cm^{-1} mit einem Interquartilsabstand von 8 cm^{-1} und einer Range von 17 cm^{-1} . Die Halbwertsbreiten der Signalpeaks erreichen im Median 51 cm^{-1} bei einem Interquartilsabstand von 11 cm^{-1} und einer Range von 30 cm^{-1} . Median- und Quartilswerte sowie Minima und Maxima der Peak-Abstände und Halbwertsbreiten sind in Abbildung 45 zusammengefasst.

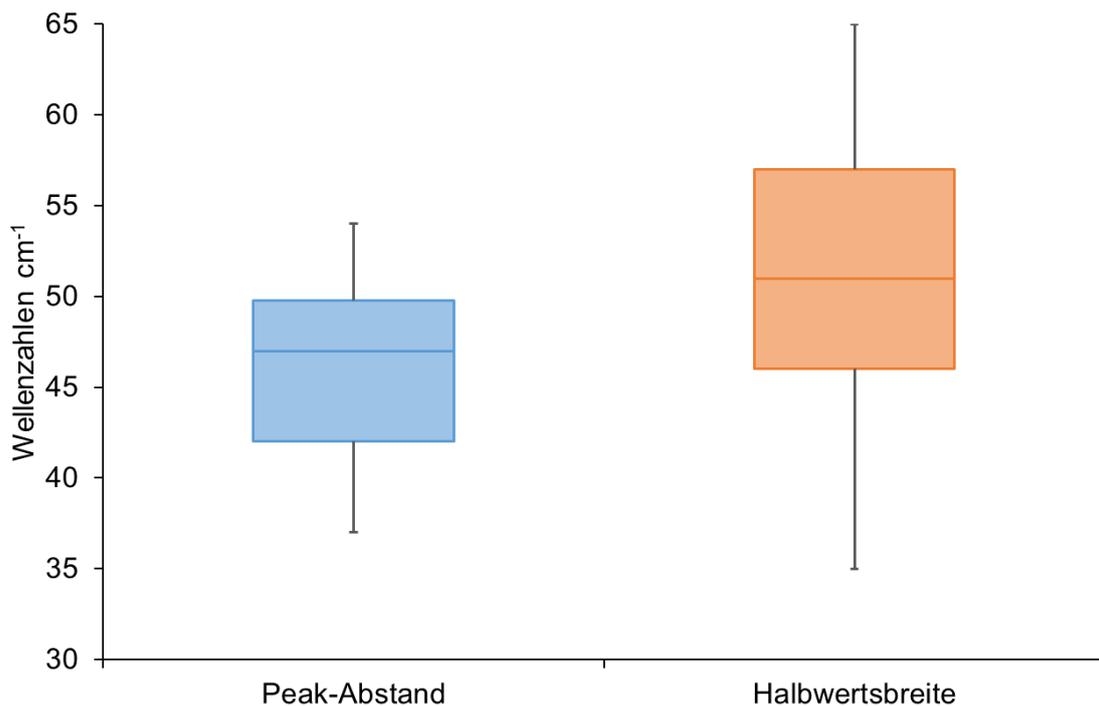


Abbildung 45: Peak-Abstände und Halbwertsbreiten der Glasfaserzeile. Vgl. Abbildung 44.

Als initiale Funktionsprüfung ist die Detektion von Raman-Signale mittels Custom Photon Multiplier (CPM, Proxivision GmbH, Bensheim, Deutschland) vorgesehen. Da zum Zeitpunkt der Fertigstellung der ersten Iteration des Spektrophotometers die spektrale Empfindlichkeit dieser Detektoren bei $\leq 750\text{ nm}$ begrenzt war, musste das Spektrophotometer für eine Anregung bei 532 nm angepasst werden. Als Analyt diente das binäre Gemisch von Wasser und Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen. Als

Ziel der Messung wurde der Signal-Peak bei 2927 cm^{-1} festgelegt. Um diesen Spektralbereich auf der Glasfaserzeile abbilden zu können war eine Neuausrichtung der Zeile und Fokuslinse erforderlich. Um ausschließen zu können, dass durch die hohe Signalintensität der Anregungswellenlänge Schäden an den Detektoren verursacht werden, wurde eine Voruntersuchung durchgeführt anhand derer festgestellt werden sollte, ob das Blaze-Gitter die Anregungswellenlänge ausreichend ablenkt. Der Versuchsaufbau umfasste neben dem Spektrophotometer die Einkopplung eines 300 mW MGL-III-532 Lasers (Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd.) über eine Glasfaser mit 400 μm Kerndurchmesser sowie ein Zeiss Spektrometer vom Typ MCS CCD/UV-NIR (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) zur Detektion. Die Fokussierung der Anregungswellenlänge erfolgte ohne den Einsatz einer Sonde unmittelbar über das Linsensystem des Spektrophotometers in ein Becherglas. Wie schon in der Untersuchung der spektralen Auflösung wurde in das Spektrometer ein leerer SMA Stecker eingeschraubt und in diesen das freie Faserende der Peak-spezifischen Detektionsfaser führt. Der untersuchte Konzentrationsbereich umfasst reines Wasser und reines Ethanol in einer Schrittweite von 25 Vol.-%. Die Spektrenaufnahme erfolgte mit einer Integrationszeit von 1750 ms. Die Messergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.

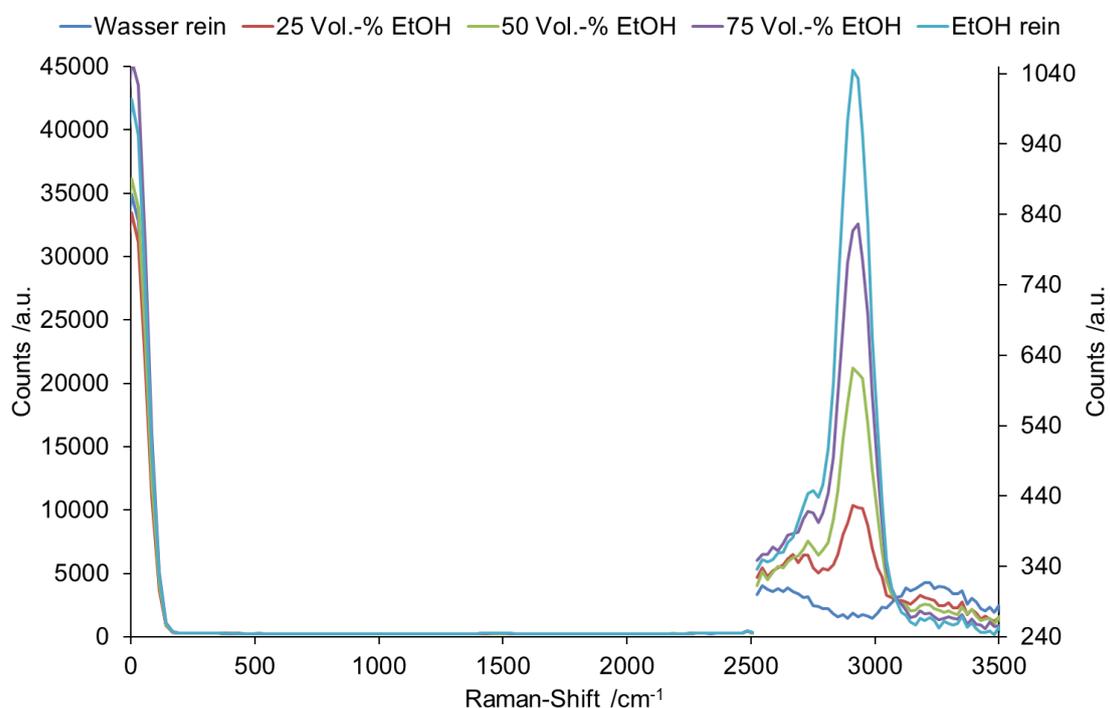


Abbildung 46: Voruntersuchung zur Ablenkung der Anregungswellenlänge 532 nm durch das Blaze Gitter. Kerndurchmesser der Detektionsfaser: 200 μm . Integrationszeit: 1750 ms.

Die Anregung bei 532 nm bzw. 0 cm^{-1} tritt mit Zählraten von bis zu 45000 deutlich über das eigentliche Messsignal bei 630 nm bzw. 2927 cm^{-1} heraus (vgl. Abbildung 46). Dass die Anregungswellenlänge trotz dispersiver Auftrennung auf der Signalfaser sichtbar ist, kann auf eine Kombination mehrerer Einflussfaktoren zurückgeführt werden. Zum einen ist die Halterung der Glasfaserzeile während der Nachbearbeitung der Fasern ebenfalls auf Hochglanz poliert worden. Zum anderen ist die Fokulinse nicht Antireflexbeschichtet. Des Weiteren wurde die Einhausung des dichroiten Spiegels zur Zeile hin geöffnet, da die Abdeckung auf ihrer Innenseite einen Reflex verursachte. Folglich kann es durch ungünstige Reflexe zwischen Glasfaserzeile und Fokulinse zu einer Teilbeleuchtung der entsprechenden Signalfaser gekommen sein. Eine ausreichende Unterdrückung der Anregung ist für den Einsatz der CPMs somit nicht gewährleistet. Die hohe Verstärkung der CPMs von 10^8 würde bei der vorhandenen Signalstärke der Anregungswellenlänge das eigentliche Messsignal um ein Vielfaches überlagern und ggf. zur Zerstörung des Detektors führen. Der Einsatz der CPMs zur Detektion der Raman-Signale konnte aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit entsprechender Langpassfilter zur Blockierung der Anregungswellenlänge nicht erfolgen. Der Signalverlauf des gewünschten Raman-Shifts zeigt jedoch gute Linearität im betrachteten Konzentrationsbereich. Erfolgt eine Korrektur des Signaluntergrunds bei einer Referenz von 660 nm bzw. 3646 cm^{-1} ergibt sich ein Pearson-Koeffizient von $R^2 = 0,9958$.

Nach Anpassung des Spektrophotometers als Testsystem für Raman-basiertes molekulares Scanning im mikroskaligen Raum (bzw. bei hoher Ortsauflösung) wurde in einer Proof-of-Concept Messreihe Aceton gelöst in Toluol (Mischungsverhältnis 1:3) und VE Wasser als Extraktionsmittel in einen Mikrokanalmischer eingeströmt. Ein repräsentativer Ausschnitt von 24 Sekunden aus der Überwachung der Strömungsbedingungen bei einem Volumenstrom von 0,1 ml/min bzw. einer Fließgeschwindigkeit von 6,67 mm/s ist in Abbildung 47 dargestellt.

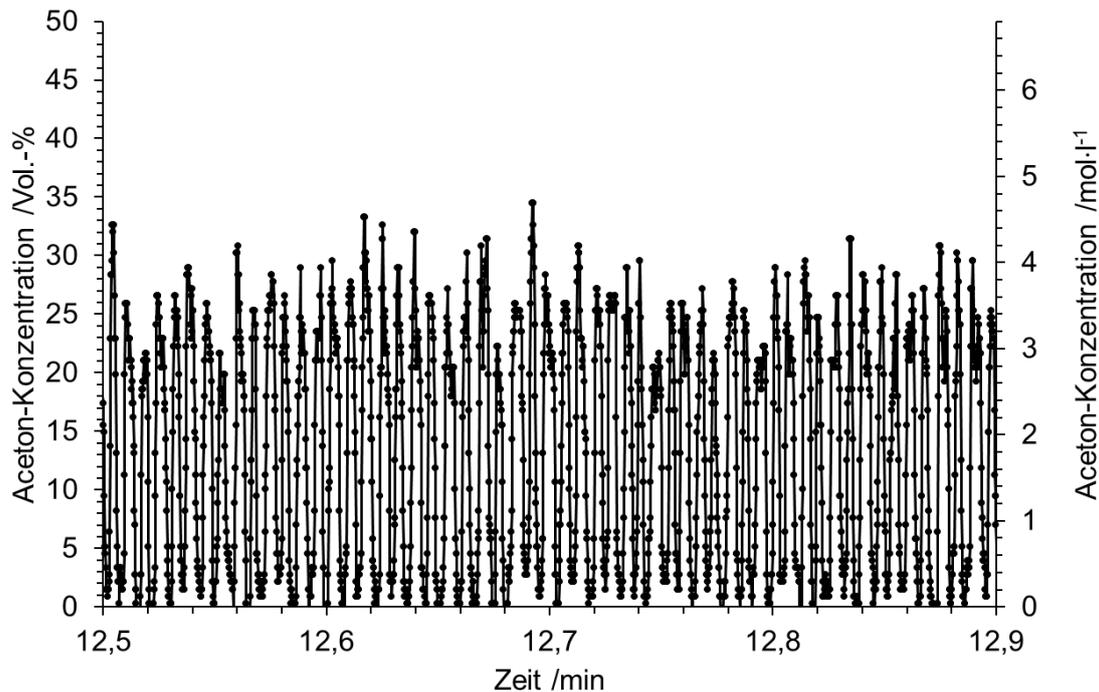


Abbildung 47: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,1 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 6,67 mm/s und 1,5 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen.

Das Messsignal wechselt unter diesen Versuchsbedingungen periodisch zwischen einem Maximalsignal von ca. 24 % (Aceton in Toluol) und 0,9 % (Aceton in Wasser), 10 mm von der T-Kreuzung im Mikrokanal entfernt. Die Messposition und der Volumenstrom entsprechen einer Verweilzeit von 1,5 s im Kanal nach der Ausbildung der Wasser-Toluol-Grenzflächen. Während die Tröpfchen von Toluol und Wasser unterscheidbar sind, deutet der Signalverlauf auf einen vernachlässigbaren Aceton-Massentransfer von Toluol zu Wasser für den gegebenen Volumenstrom hin. Um den Massentransfer weiter zu untersuchen, wurde die Durchflussrate schrittweise verringert, wodurch sich die Verweilzeit sukzessive erhöhte. Ein Volumenstrom von 0,06 ml/min resultiert in 2,5 s Verweilzeit bei einer Fließgeschwindigkeit von 4,0 mm/s sowie einer gemessenen Maximalkonzentration von ca. 21,7 % Aceton in der Toluolphase und ca. 2,15 % in der Wasserphase (vgl. Abbildung 48).

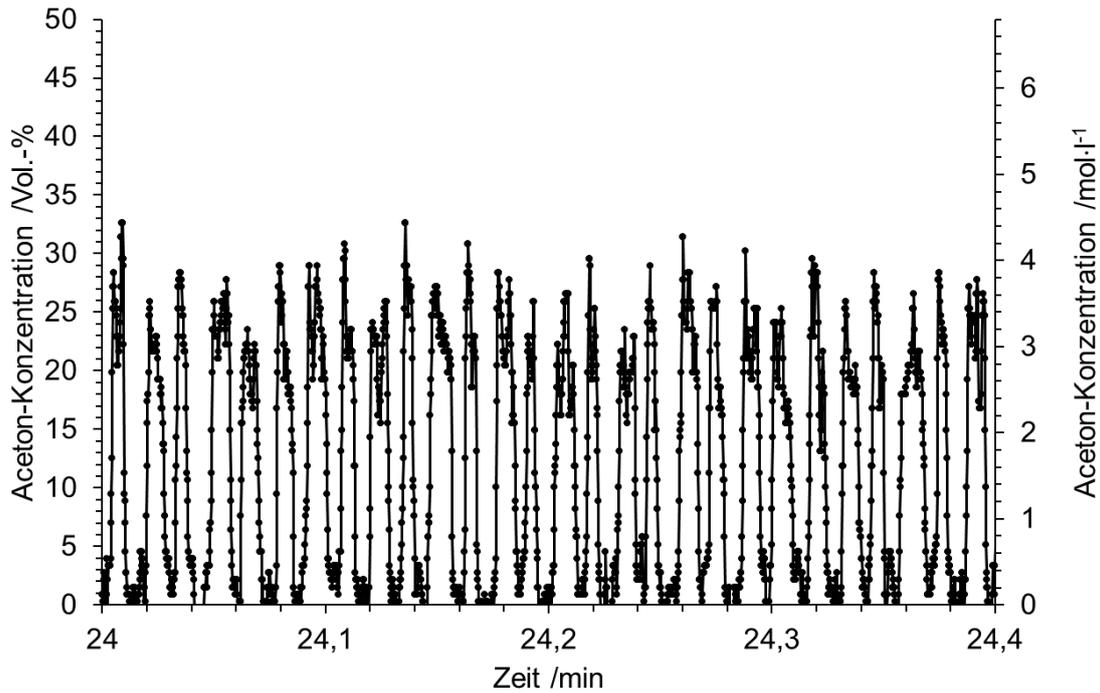


Abbildung 48: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,06 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 4,0 mm/s und 2,5 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen.

Bei 0,04 ml/min Volumenstrom (vgl. Abbildung 49) zeigt sich eine Abnahme des Aceton-Signals in Toluol auf ca. 19,15 % und eine Zunahme des auf ca. 3,65 % in Wasser. Die Zeitspannen der minimalen und maximalen Signale sind erwartungsgemäß verlängert. An den Grenzflächen der unmischbaren Lösemittel treten Messartefakte auf.

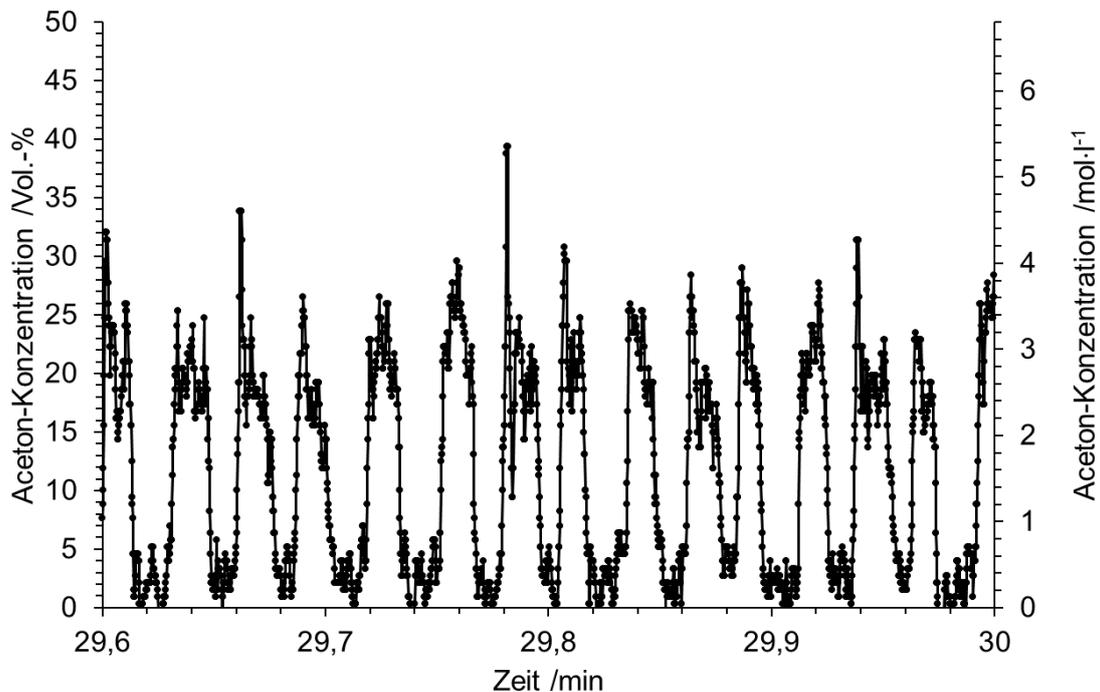


Abbildung 49: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,04 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 2,67 mm/s und 3,75 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen.

Eine weitere Verringerung des Volumenstroms auf 0,02 ml/min führt zu den in Abbildung 50 dargestellten lokalen Aceton-Konzentrationen. Hier wird eine weitere Abnahme des Acetons in Toluol auf ca. 16 % sowie ein Anstieg von Aceton in Wasser auf ca. 8,1 % beobachtet. Innerhalb der Tropfengrenzflächen zeigt sich eine Mischkonzentration von ca. 12 %. Diese Mischungskonzentration scheint asymmetrisch zu sein, was sich im Signalverlauf von Vorderseite zur Rückseite des Tropfens ausprägt. Darüber hinaus sind die Messartefakte stärker ausgeprägt.

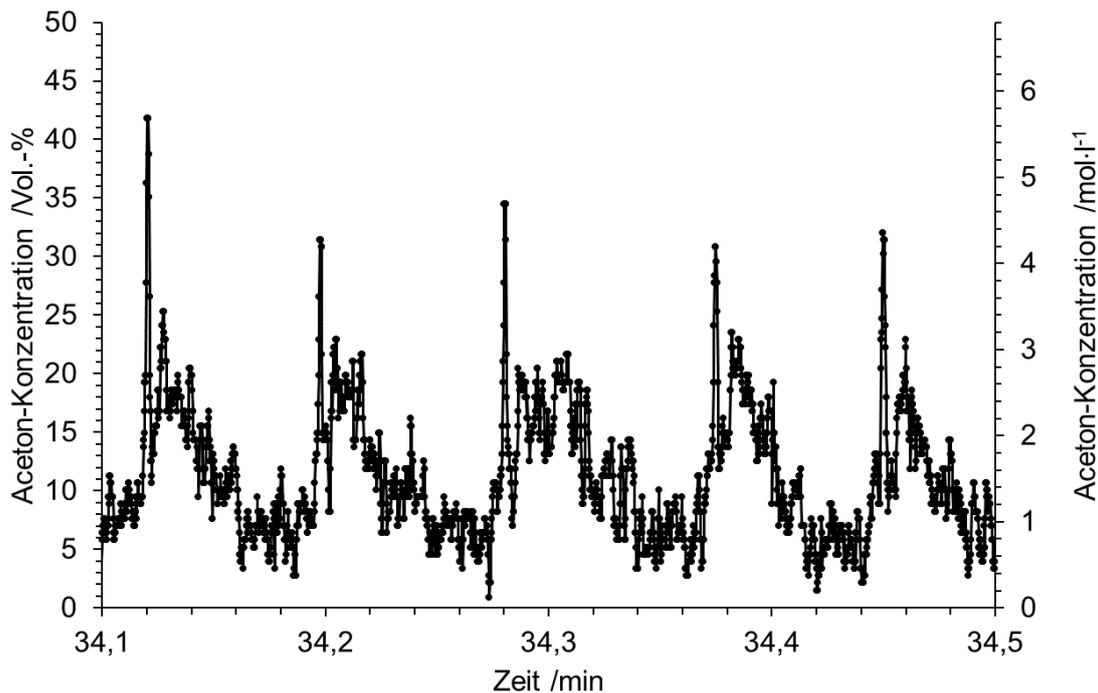


Abbildung 50: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,02 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 1,33 mm/s und 7,5 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen.

Eine weitere Erhöhung des Extraktionsgrads von Aceton aus der Toluolphase in die Wasserphase wird bei einem Volumenstrom von 0,014 ml/min oder 0,93 mm/s Fließgeschwindigkeit erreicht (vgl. Abbildung 51). Die Acetonkonzentrationen in beiden Lösungsmitteln nähern sich zunehmend an, was die spektrale Unterscheidung beider Phasen erschwert.

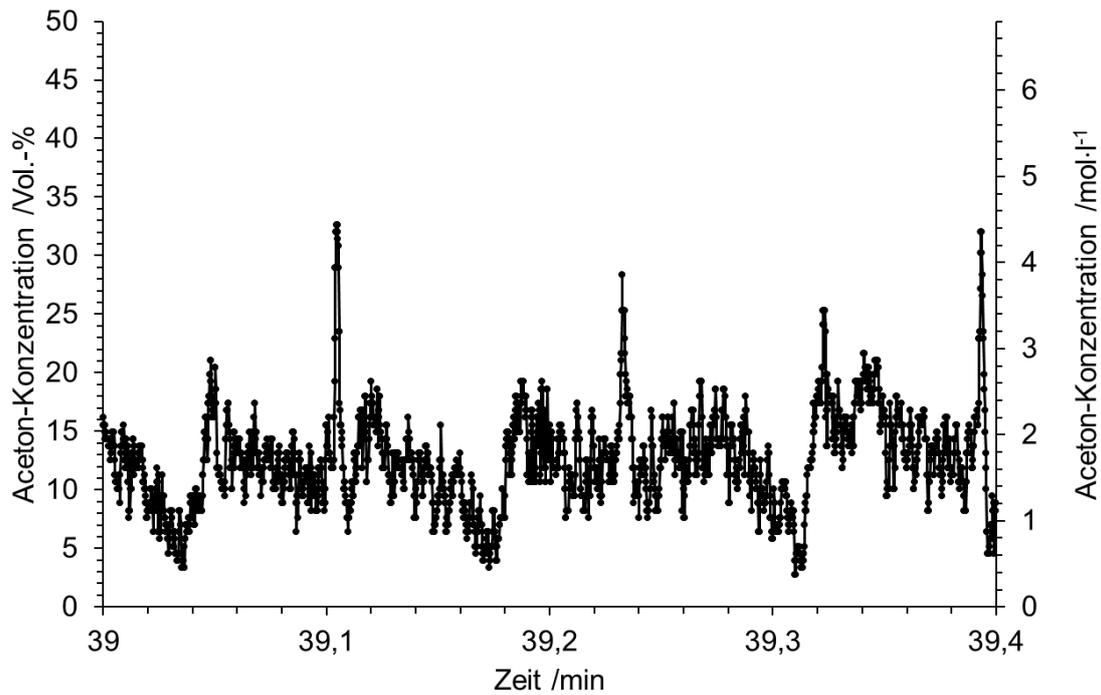


Abbildung 51: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,014 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 0,93 mm/s und 10,71 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen.

Schließlich ist bei einer Durchflussrate von 0,006 ml/min (vgl. Abbildung 52) die Verweilzeit ausreichend lang, dass bei einer gemessenen Acetonkonzentration von ca. 12,6 % die Hälfte des Acetons aus den Toluoltropfen in die Wassertropfen diffundiert.

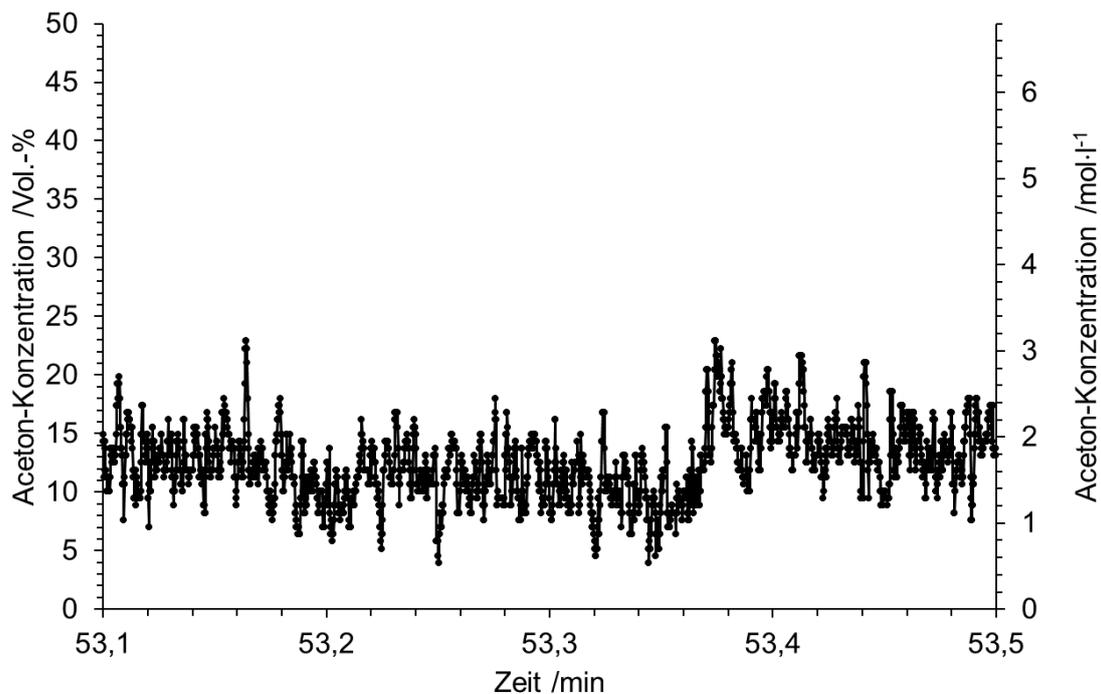


Abbildung 52: Acetonkonzentration in fließenden Toluol- und Wassertropfen. Volumenstrom 0,006 ml/min bzw. Fließgeschwindigkeit 0,4 mm/s und 25 s Verweilzeit im Kanal nach Kontakt der Toluol- und Wasserphasen.

In Abbildung 53 sind alle Durchflussdaten in einem Diagramm vergleichend zusammengefasst, um einen vollständigen Überblick des Mischverhaltens zu geben.

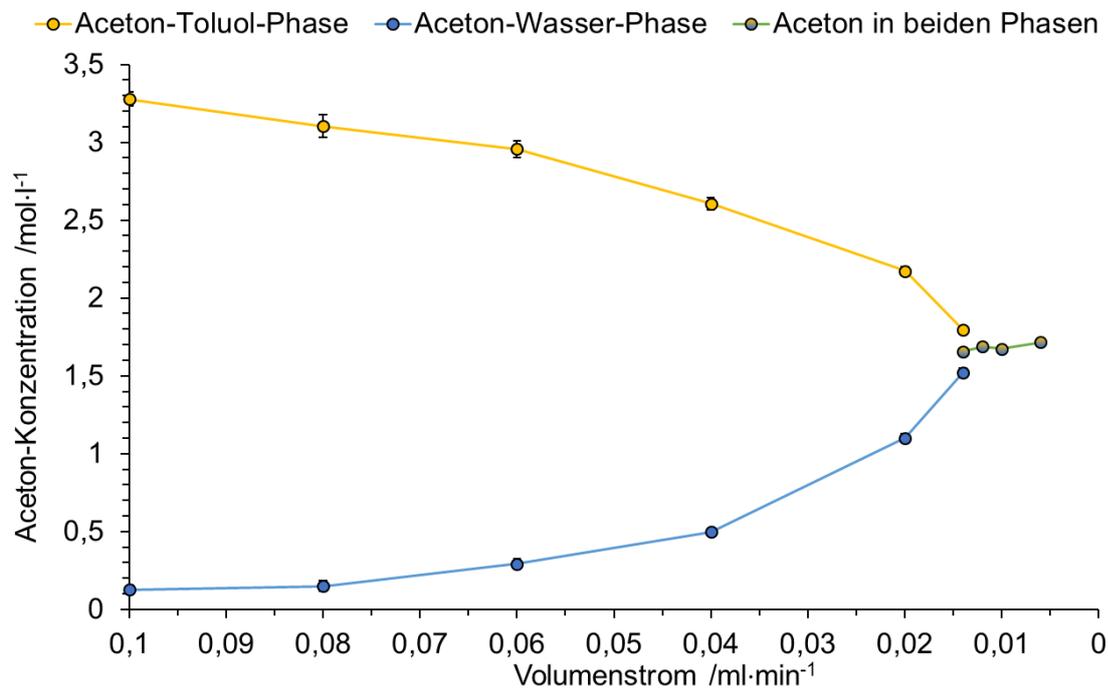


Abbildung 53: Änderung der Acetonkonzentration in Toluol- und Wassertropfen in Abhängigkeit des Volumenstroms.

Durch den Einsatz eines Mikroskopobjektivs in der Funktionserweiterung des Spektrophotometer-Hybrids und der damit verbundenen Ortsauflösung, der mehrkanaligen, parallelen Detektion verschiedener Spektralbereiche sowie der automatisierten Verfahrenheit der koaxialen Sonde sind die technischen Voraussetzungen für eine Raman-Bildgebung durch die Rekonstruktion des Messpunkterasters grundsätzlich gegeben. Dieses Prinzip wurde während der Beobachtung der Diffusion von Aceton aus einer Toluolphase in eine darüber ruhende Wasserphase in einer Messküvette dargestellt (vgl. Abbildung 54).

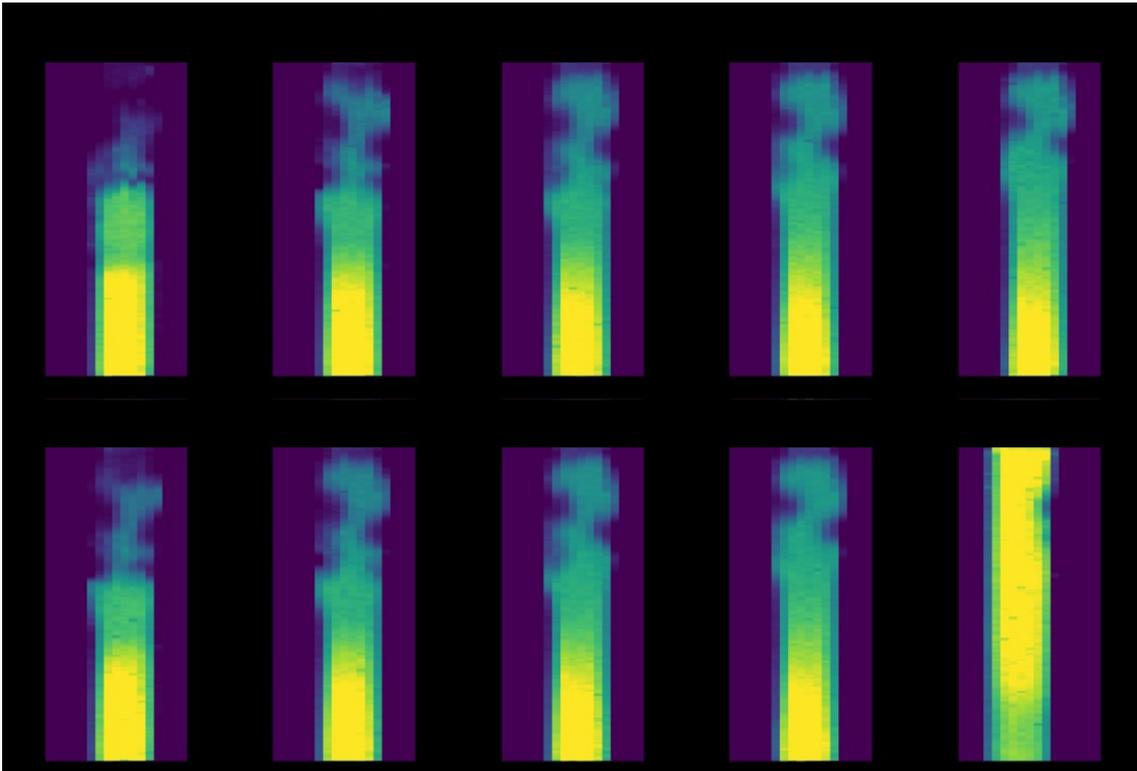


Abbildung 54: Falschfarbendarstellung der Diffusion von Aceton aus Toluol in Wasser. Der Helligkeitsgradient beschreibt die Acetonkonzentration in der Bildebene.

In Abbildung 54 ist durch den Farbgradient das durch Diffusion aufsteigende Aceton im zeitlichen Verlauf bis zum Erreichen eines Mischungsgleichgewichts qualitativ erkennbar. Dies stellt prinzipiell auch die Eignung des Messsystems für die nicht-invasive, markerfreie, molekulspezifische Bildgebung basierend auf dem Raman-Effekt als Kontrastgeber dar.

3.3 Erhöhung der spektralen Auflösung und Reduzierung der Anregungsleistung von spektrophotometrischer Raman Detektion

Die vorherige Iteration des Raman-Spektrophotometers zeigt vor allem in der Erhöhung der spektralen Auflösung der diskreten Detektionskanäle Verbesserungspotenzial. Zunächst wird hierfür der Einfluss einer Spaltblende auf die spektrale Auflösung der Fasern des Arrays untersucht. Um den Lichtverlust bzw. den Signalverlust so gering wie möglich zu halten, ist der Durchmesser der Glasfasern hierbei an die Höhe der durch das Konkavgitter erzeugten Abbildungsebene angepasst. Durch Überlagerung der freien Faserenden mit der Spaltblende werden die in die Glasfasern eintretenden Photonen teilweise blockiert und die spektrale Auflösung erhöht. Abbildung 55 zeigt den letztgenannten Effekt.

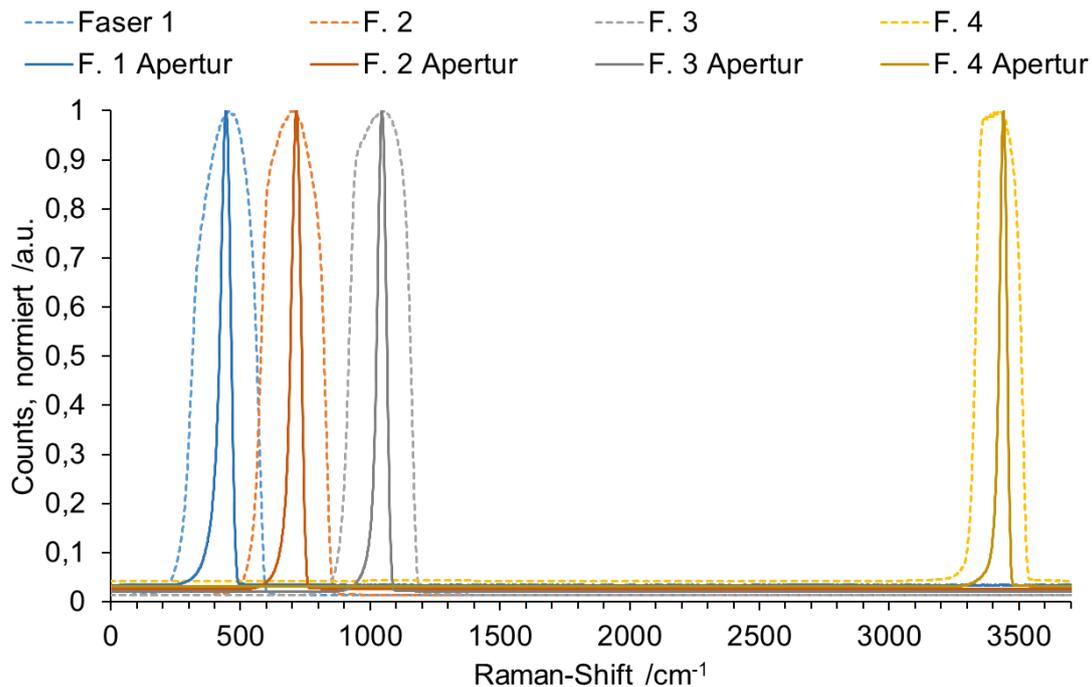


Abbildung 55: Verringerung der Faserbandbreite mittels Schlitzapertur vor dem Faserarray. Auftrennung einer Halogenlichtquelle (CLH 600, Zeiss AG) detektiert mit einem UV/VIS-Spektrometer (Zeiss, MCS621 VIS II).

Wie Abbildung 55 zeigt, wird die spektrale Bandbreite der einzelnen optischen Fasern von 300 cm^{-1} auf 50 cm^{-1} reduziert. Die Signalintensität pro Faser wird jedoch durch die Maskierung des Faserquerschnitts um den Faktor 5 verringert. Im Detektionsband der maskierten Fasern ist die Selektivität um den Faktor 6 erhöht. Anwendungsspezifisch erlaubt das System durch die Feinjustierung der Schlitze bzw. der optischen Fasern zwei eng angrenzende Raman-Peaks zu detektieren. Aufgrund der Spaltabstände der Blende und der Kreisdurchmesser der optischen Fasern befinden sich die Schlitze bei der beschriebenen Anordnung exzentrisch zum Mittelpunkt der Faserquerschnitte, was zwangsläufig zu einem zusätzlichen Intensitätsverlust führt. Dementsprechend ist durch die Anpassung von Faserdurchmessern und Bemaßung der Blende eine weitere Optimierung von Intensität und Auflösung möglich.

Das Faserarray wurde für die Detektion aller Test-Analyte eingestellt und die jeweilige maximale Signalintensität bestimmt. Hierzu wurden zusätzlich zu spektrophotometrischen Messungen korrespondierende Spektren aufgezeichnet. Hiermit können Analyt-Spektren den diskreten Fasern zugeordnet und differenzierbare Peaks als photometrische Zählraten dargestellt werden. Abbildung 56 zeigt diesen Ablauf für Ammoniumnitrat. Die einzelnen Punktmarkierungen zeigen die zentralen Wellenzahlen und Bandbreiten der einzelnen Glasfasern, der von den entsprechenden CPMs erfasst wird, die

innerhalb des Detektionsbandes ihrer spektralen Sensitivität entsprechend alle eintreffenden Photonen unabhängig von der jeweiligen Wellenlänge registrieren und zählen.

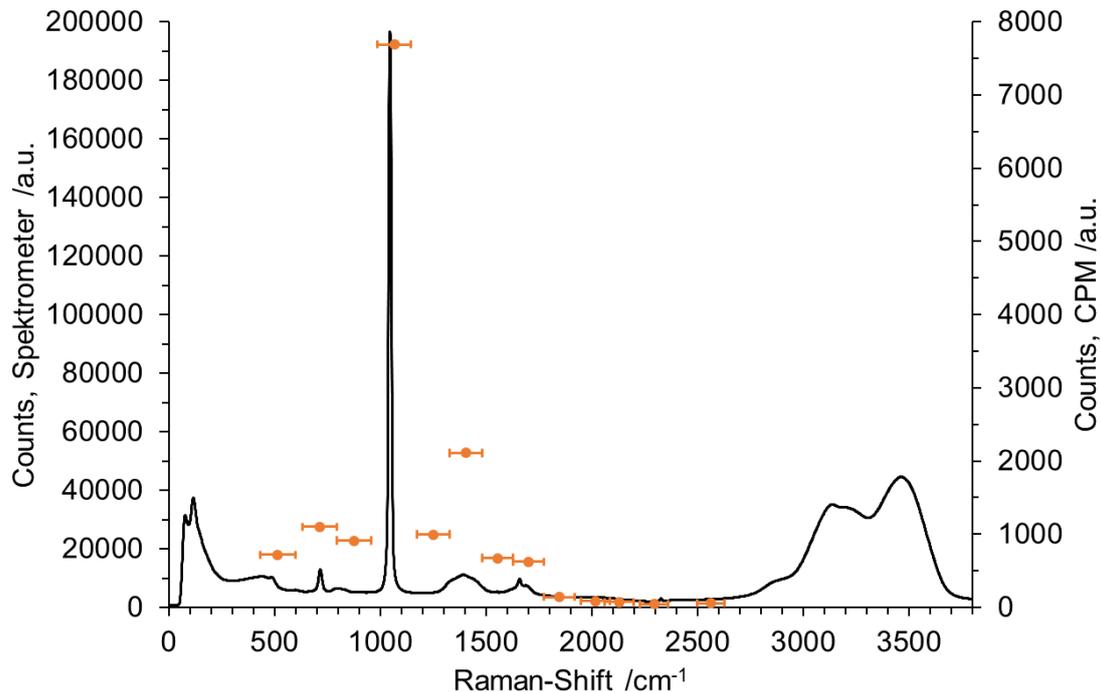


Abbildung 56: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Ammoniumnitratmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3.

Die Überlagerung des Ammoniumnitratspektrums mit den Daten des Faserarrays zeigt, dass die vierte Glasfaser im Array den spezifischen Peak bei 1047 cm^{-1} registriert und konform mit dem Spektrum die höchste Signalintensität erfasst. Folglich wurde diese Faser für die Konzentrationsmessungen verwendet. Das Spektrum zeigt weitere spezifische Peaks im Fingerprint-Bereich unterhalb 1500 cm^{-1} , diese wurden für weitere Betrachtung aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Messsignale nicht herangezogen.

Der Überlagerung des Raman-Spektrums von Natriumphosphat mit den Detektionskanälen der Faserzeile ist in Abbildung 57 dargestellt.

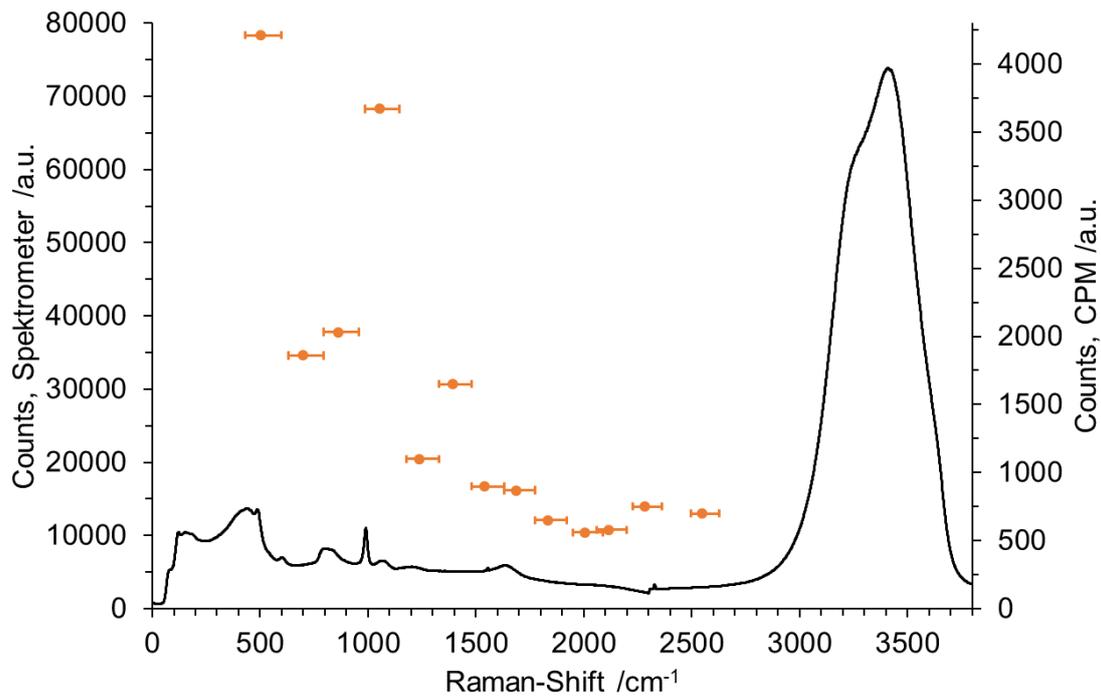


Abbildung 57: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Di-Natriumhydrogenphosphatmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3.

Im Gegensatz zu Ammoniumnitrat wird für Natriumphosphat die höchste gemessene Signalintensität von Glasfaser 1 übertragen. Der Peak in diesem Bereich ist jedoch aufgrund eines breitbandigen Hintergrunds mit variierender Steigung nicht geeignet. Glasfaser 4 hingegen zeigt ein vergleichbares Signal zu Faser 1 für den phosphatspezifischen Peak bei 995 cm^{-1} und wird daher für Konzentrationsmessungen von Natriumphosphat ausgewählt. Die Gegenüberstellung des Kaliumsulfat-Spektrums mit den entsprechenden spektrophotometrischen Zählraten zeigt Abbildung 58.

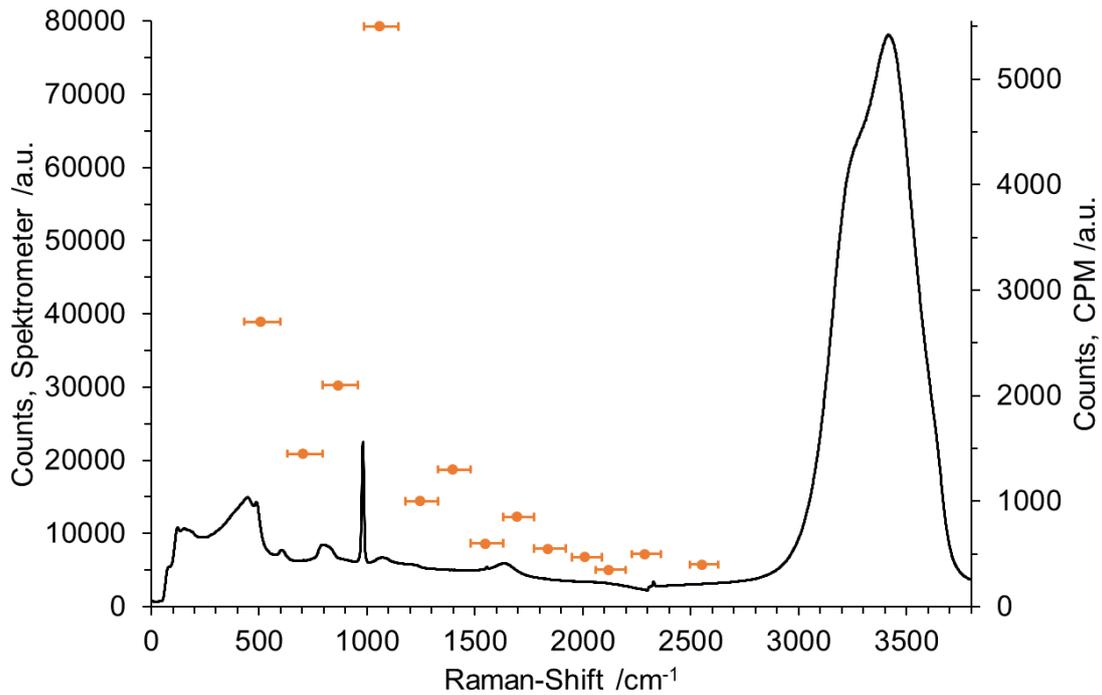


Abbildung 58: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Kaliumsulfatmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3.

Der spezifische Kaliumsulfat-Peak bei 982 cm^{-1} fällt auch in das Detektionsband der vierten Glasfaser und dient als Lichtleiter für die Untersuchungen der Sulfat-Konzentrationsreihe.

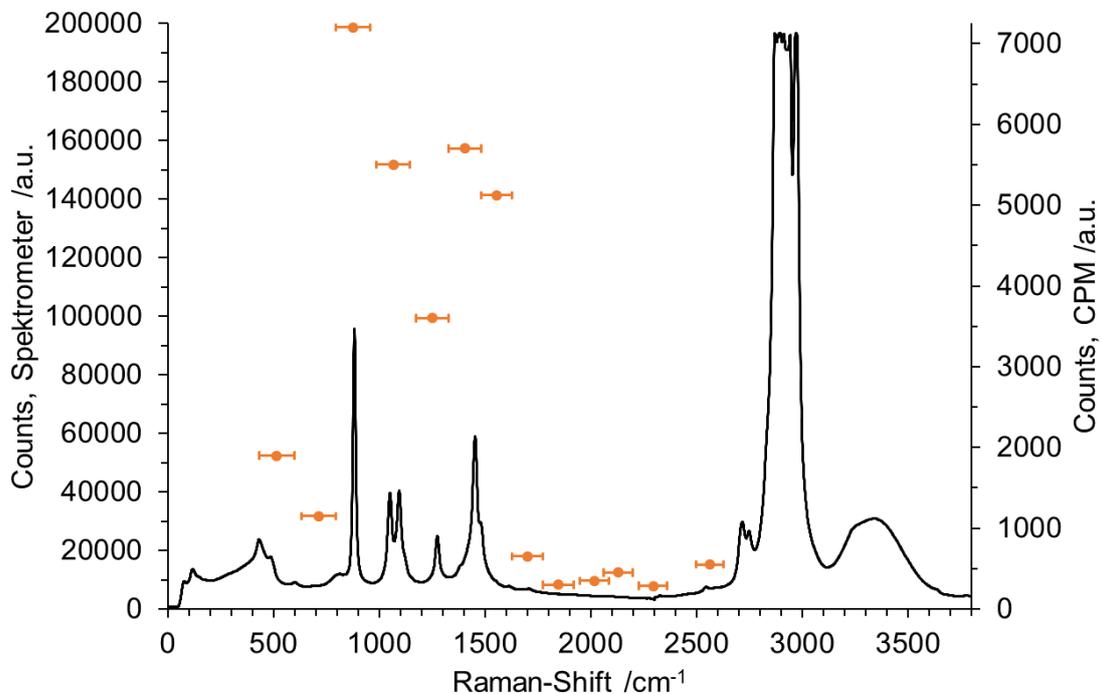


Abbildung 59: Vergleich von spektrometrischen und spektrophotometrischen Ethanolmessungen. Integrationszeit CPMs: 1 s. Integrationszeit Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems): 10 s. Akkumulation Spektrometer: 3.

Bei der Messung von Ethanol zeigen sich mehrere geeignete Peaks, die für die Konzentrationsüberwachung ausgewählt werden können (vgl. Abbildung 59). Der auffälligste Signal-Peak im Fingerprint-Bereich liegt bei 882 cm^{-1} , und wird von Glasfaser 3 übertragen. Alternativ kommt auch die optische Faser 6 in Frage, die den Peak bei 1454 cm^{-1} abdeckt. Abweichend von allen vorher genannten Analyten zeigt sich im Spektrum eine Ansammlung mehrerer Peaks von CH-Schwingungen, die im Bereich von 2800 cm^{-1} bis 3000 cm^{-1} formell das höchste Signal aufweisen. Dieses Peak-Cluster ist jedoch unspezifisch, da es sich für alle Kohlenwasserstoffmoleküle ausbildet und liegt für die Konfiguration des Aufbaus außerhalb des messbaren Bereichs.

In Tabelle 12 ist die Zuordnung der optischen Fasern zu den Analyt-Peaks zusammengefasst.

Tabelle 12: Zuordnung von Glasfasern der Detektionszeile zu den Analyt-spezifischen Signalen.

| Analyt /- | Faserzeilenposition /- | Raman-Peak / cm^{-1} |
|---------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| NH_4NO_3 | 4 | 1047 |
| Na_2HPO_4 | 4 | 995 |
| K_2SO_4 | 4 | 982 |
| $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ | 3 | 882 |

Ergänzend zu Tabelle 12 sind alle weiteren relevanten Nebenbedingungen der durchgeführten Messungen Tabelle 7 zu entnehmen. Die spektrophotometrischen Messdaten aller Proben wurden mit einer Integrationszeit von 100 ms über einen Zeitraum von jeweils 2 min aufgenommen. Der Laser war auf eine Emissionsleistung von 100 mW eingestellt. Pro Konzentrationsstufe wurden fünf separate Lösungen zur Vermessung angesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt, beginnend mit Ammoniumnitrat in Abbildung 60.

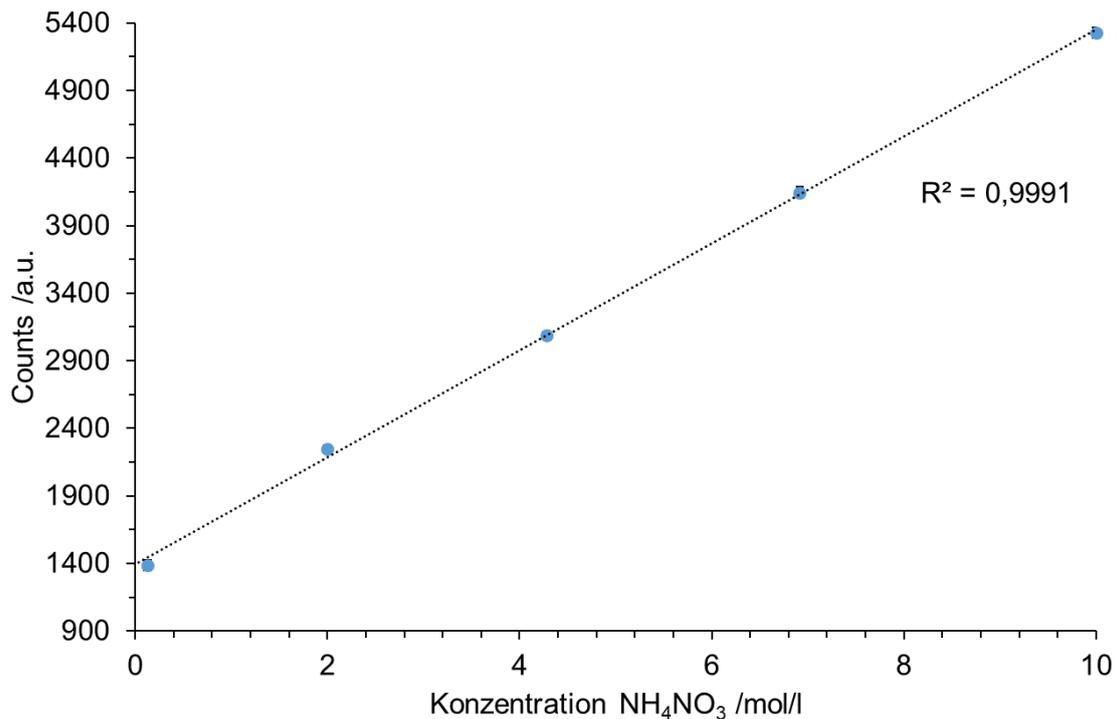


Abbildung 60: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Ammoniumnitrat-Lösungen (NH_4NO_3). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min.

Die Messdaten von Ammoniumnitrat zeigen ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9991$. Die detektierte Mindestkonzentration von Ammoniumnitrat beträgt 125,9 mmol/l oder 1,01 Gew.-%. Die Standardabweichungen der gemessenen Konzentrationssignale liegen zwischen 2,72 % bei der gemessenen Mindestkonzentration und 1,52 % bei der Höchstkonzentration. Die mittlere Signalschwankung der Messreihe ist 2,21 %. Der auflösbare Konzentrationsunterschied ist 86,8 mmol/l über den gesamten Konzentrationsbereich und 57,3 mmol/l bei der höchsten Signalstabilität innerhalb der Messreihen. Das nächste Diagramm zeigt die Konzentrationsreihe von Di-Natriumhydrogenphosphat.

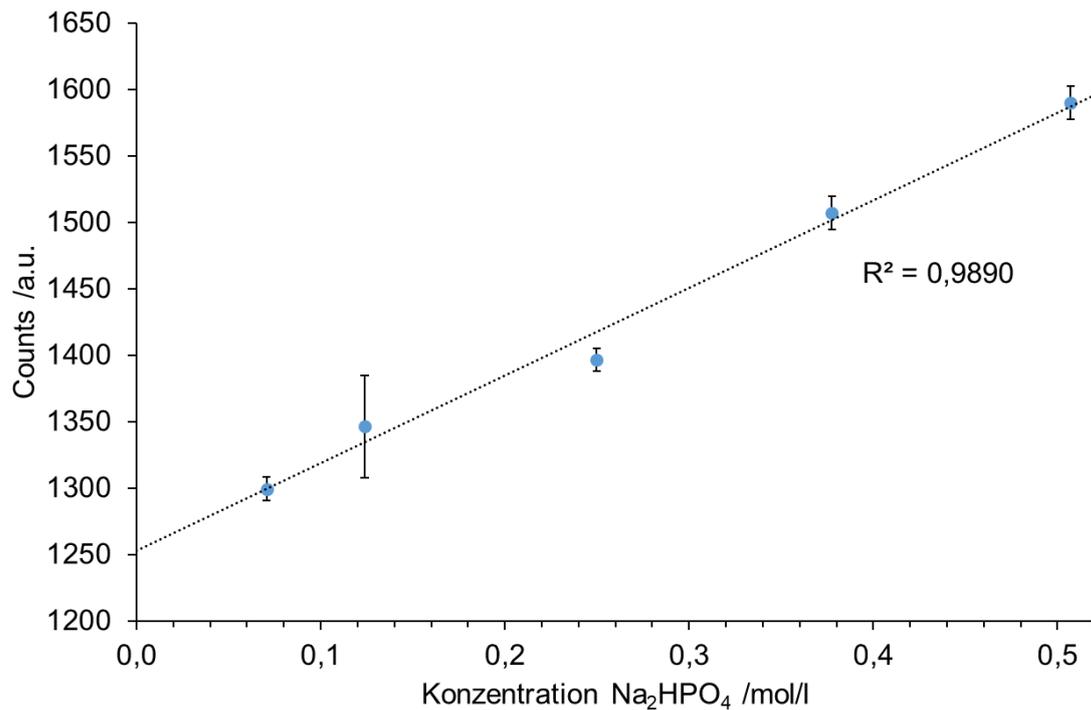


Abbildung 61: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösungen (Na₂HPO₄). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min.

Das Bestimmtheitsmaß für Natriumphosphatmessungen ist $R^2 = 0,9890$. Die niedrigste gemessene Konzentration ist 70,6 mmol/l bzw. 1,00 Gew.-%. Die Standardabweichung der Messsignale liegt bei 1,51 % des Mittelwerts der geringsten untersuchten Konzentration und 1,75 % des Mittelwerts der höchsten Konzentration. Die minimale Auflösung der Konzentrationsunterschiede über den untersuchten Messbereich beträgt 43,7 mmol/l und 14,3 mmol/l bei der höchsten Signalstabilität innerhalb der Messreihen. Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Kaliumsulfatmessungen sind in Abbildung 62 dargestellt.

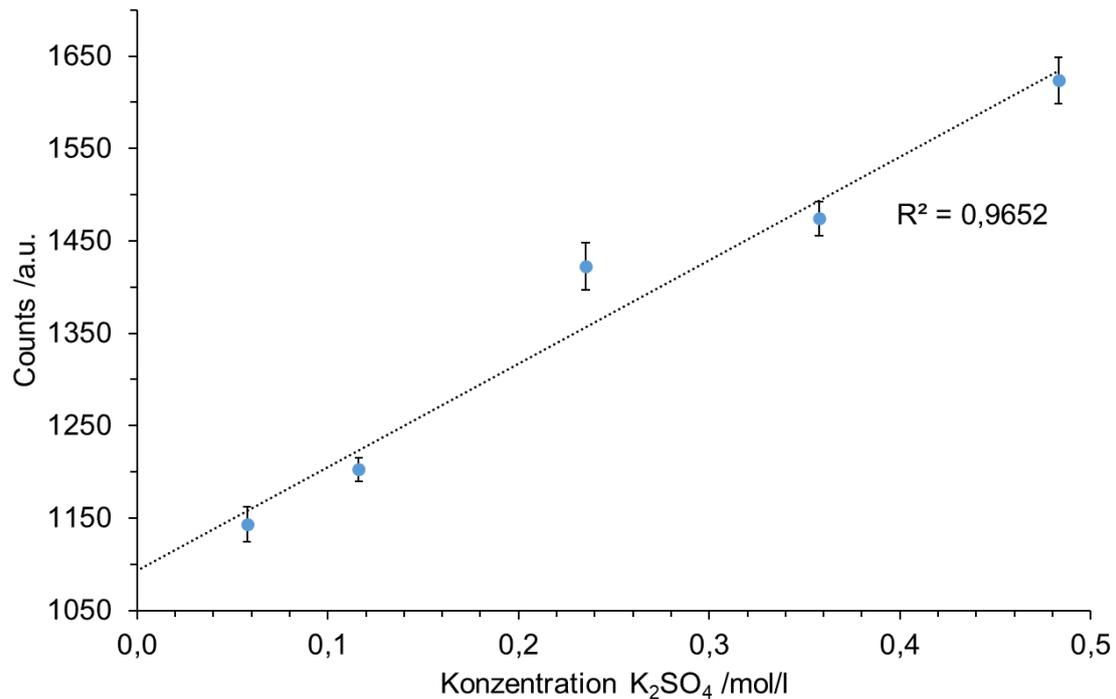


Abbildung 62: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Di-Kaliumsulfat-Lösungen (K_2SO_4). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min.

Die gemessenen Intensitätswerte von Kaliumsulfat zeigen eine lineare Regression mit Bestimmtheit $R^2 = 0,9652$. Die niedrigste untersuchte Konzentration ist 57,7 mmol/l bzw. 1,00 Gew.-%. Die Standardabweichung der Messwerte betragen 3,73 % des durchschnittlichen Signals der Mindestkonzentration und 3,42 % der Höchstkonzentration. Der kleinste auflösbare Konzentrationsunterschied beträgt 28,7 mmol/l über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich und 14,0 mmol/l bei der höchsten Signalstabilität. Die Messergebnisse von wässrigen Ethanolösungen sind in Abbildung 63 dargestellt.

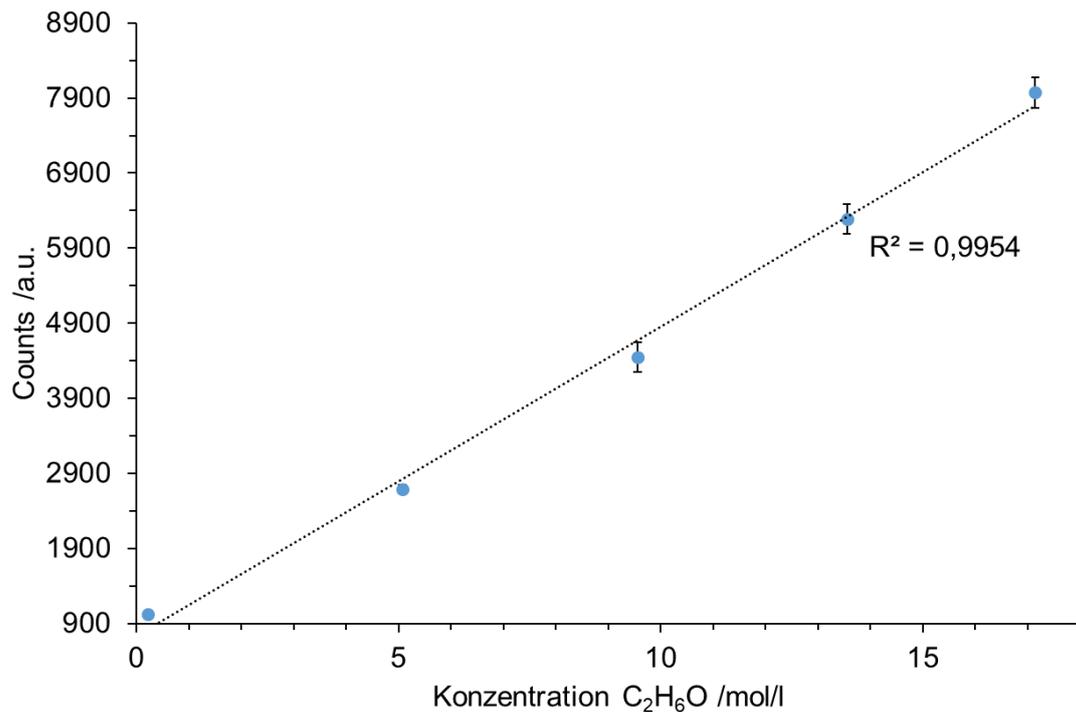


Abbildung 63: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Ethanol-Lösungen (C₂H₆O). Integrationszeit: 100 ms. Messzeit pro Konzentration: 2 min.

Abweichend von den anderen Analyten umfasst der zugängliche Konzentrationsbereich von Ethanol 1 Gew.-% bis 100 Gew.-% bzw. 219,1 mmol/l bis 17,14 mol/l, mit Konzentrationsunterschieden von 25 Gew.-% pro Verdünnungsstufe. Hierbei ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9954$. Somit zeigen alle untersuchten Analyte die erwartete lineare Korrelation von Konzentration und Signalintensität der Stokes-Streuung. Die Standardabweichungen der mittleren Signalintensitäten liegen bei 4,18 % der gemessenen Mindestkonzentration von 219,1 mmol/l und 5,72 % bei der Höchstkonzentration. Der differenzierbare Konzentrationsunterschied beträgt 382,5 mmol/l über den gesamten Messbereich und 174,3 mmol/l bei der höchsten Signalstabilität.

In der abschließenden Versuchsreihe der Spektrophotometerkonfiguration wurden Konzentrationsreihen von Ammoniumnitrat und Kaliumsulfat mit einer optischen Anregungsleistung von 1 mW gemessen. Hiermit soll die Detektionsgrenze des Raman-Effekts bei geringen Anregungsleistungen für spektrophotometrische Detektion hinsichtlich dem Einsatz zur Vermessung empfindlicher Analyte bewertet werden. Zusätzlich ist hiermit die grundlegende Eignung des Spektrophotometers für die Anwendung in explosiven Atmosphären nachweisbar.

Pro Konzentrationsstufe wurden fünf separate Lösungen angesetzt. Jede Konzentration wurde über 2 min mit einer Integrationszeit von 6 s vermessen. Die Erhöhung der

Integrationszeit kompensiert die Reduzierung der Laserleistung und unterschreitet zudem die Integrationszeit spektrometrischer Vergleichsmessungen der vorherigen Versuchsbedingungen. Die folgende Abbildung zeigt die Messergebnisse beider Analyte bei geringer Anregungsleistung.

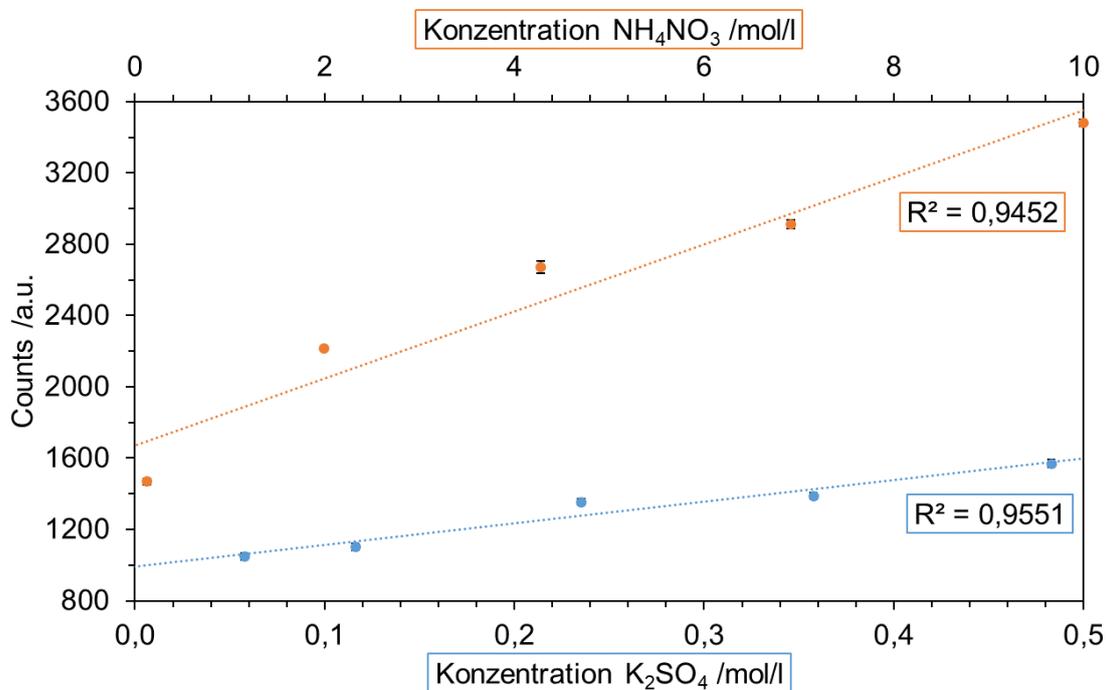


Abbildung 64: Spektrophotometrische Messung von wässrigen Ammoniumnitrat- (NH_4NO_3) und Di-Kaliumsulfat-Lösungen (K_2SO_4). Integrationszeit: 6 s. Messzeit pro Konzentration: 2 min. Anregungsleistung 1 mW.

Bei einer Reduzierung der Anregungsleistung um den Faktor 100 betragen die Pearson-Koeffizienten der untersuchten Konzentrationsreihen für Ammoniumnitrat $R^2 = 0,9452$ und für Kaliumsulfat ist $R^2 = 0,9551$. Die Ergebnisse beider Messreihen zeigen demnach auch für Anregungsleistungen deutlich unterhalb herkömmlicher Leistungsniveaus spektrometrischer Messungen hohe Übereinstimmung mit der linearen Beziehung zwischen gemessener Signalintensität und Analytkonzentrationen. Die mittleren Signalintensitäten von Ammoniumnitrat haben eine Standardabweichung von 5,25 % bei der geringsten untersuchten Konzentration von 125,9 mmol/l und 2,78 % bei der höchsten Konzentration. Für Ammoniumnitrat sind Konzentrationsunterschiede von 180,0 mmol/l über den untersuchten Konzentrationsbereich und 38,6 mmol/l bei der höchsten Signalstabilität mit dem Spektrophotometer darstellbar. Kaliumsulfat-Messwerte zeigen Standardabweichungen von 4,16 % der mittleren Intensität der Mindestkonzentration von 57,7 mmol/l und 3,21 % bei der Höchstkonzentration. Der differenzierbare Konzentrationsunterschied von Kaliumsulfat ist 27,1 mmol/l über den untersuchten Konzentrationsbereich und 9,6 mmol/l bei der höchsten Signalstabilität.

3.4 Multimodale Lichtscheiben-Mikroskopie

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse zur Veranschaulichung der grundlegenden Funktionsweise und der technischen Möglichkeiten des multimodalen Raman-Lichtscheibenmikroskops dargestellt. Zunächst werden kritische Geräteparameter erläutert beginnend mit den Maßen der geformten Lichtscheiben.

Die axiale Auflösung von Lichtscheibenmikroskopen ist durch die Strahltaille definiert. Zur Bestimmung der Strahltaillen wurde die Strahlform beider Laser nach Projektion durch das Beleuchtungsobjektiv entlang der Projektionsachse mit einem BP209-VIS/M Scanning-Slit Optical Beam Profiler (Thorlabs Inc., Newton, USA) aufgenommen. Die gemessenen Dimensionen sind in der folgenden Abbildung 65 veranschaulicht:

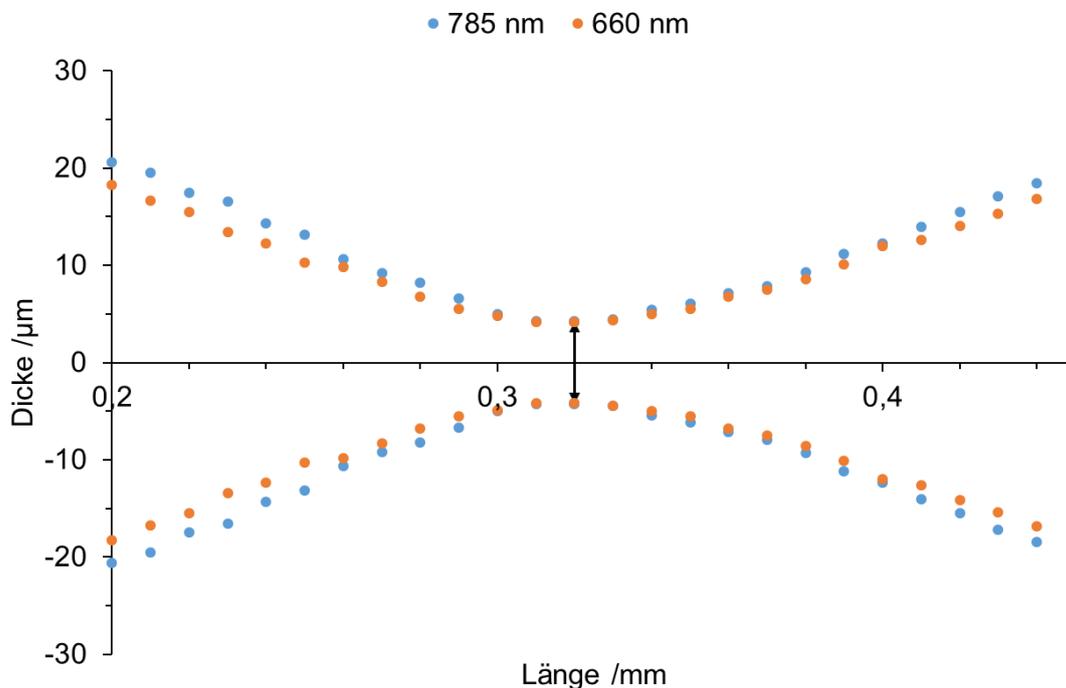


Abbildung 65: Lichtscheibendimensionen beider Laser (Emissionswellenlängen 785 nm und 660 nm) bei koaxialer Überlagerung.

Die gemessenen Daten zeigen Lichtscheibentaillen von ca. 8 μm für beide Laser. Dementsprechend beträgt die axiale Auflösung des Mikroskops unabhängig der Lichtquelle 8 μm . Hieraus abgeleitet wird die minimale Schrittweite der Verfahrenseinheit entlang der optischen Schnittachse mit 10 μm in der gleichen Größenordnung angestrebt. Als weiterer Geräteparameter muss das darstellbare Bildfeld bezüglich der Probenabmessungen bekannt sein. Zur Bestimmung der Bildfeldmaße wurden monodisperse, sphärische Polymethylmethacrylat (PMMA)-Partikel mit einem Durchmesser von 100 μm in ein 2 %iges Agarose-Hydrogel eingebettet, bei 660 nm beleuchtet und mit

einer Belichtungszeit von 100 ms unter Verwendung der Rayleigh-Spezifikationen für die AOTF-Einstellungen (vgl. Tabelle 9) abgebildet. Die Anzahl der Pixel des größten Partikelkreisquerschnitts wurde hiermit festgestellt und ausgehend vom Partikeldurchmesser die volle Ausdehnung des Bildes berechnet. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 66 dem mittig im Bild platzierten Partikel ein quadratisches Raster überlagert.

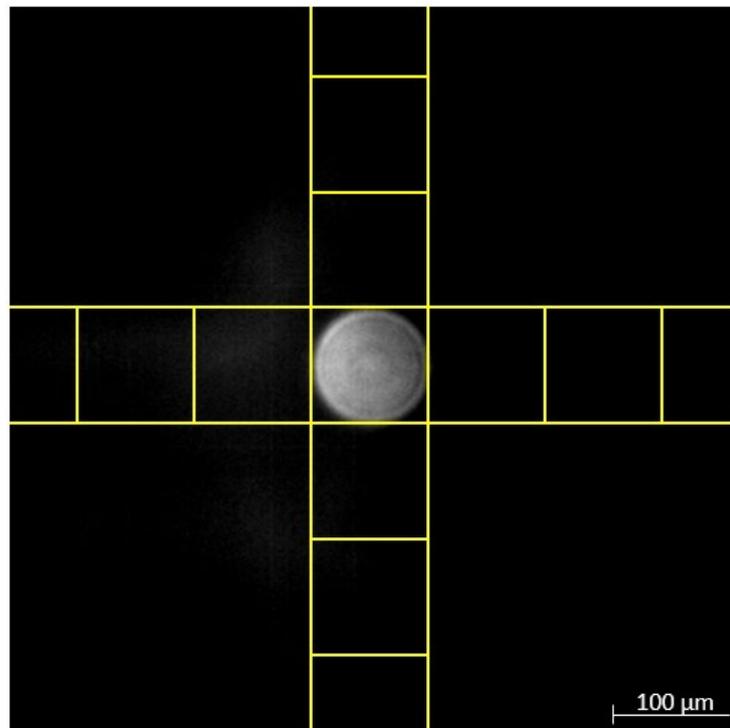


Abbildung 66: Bild eines kugelförmigen PMMA-Partikeln mit 100 µm Durchmesser zur Bestimmung des Bildfelds. Beleuchtung mit 660 nm und 1 mW Emissionsleistung. AOTF-Transmission bei 660 nm. Gelb hervorgehoben: quadratisches Gitter absiernd auf dem Partikeldurchmesser.

Aus dem PMMA-Partikel-Durchmesser ergibt sich für die optischen Komponenten des Abbildungsaufbaus ein Bildfeld von ca. 635 µm x 635 µm. Folglich sind Sphäroide bzw. sonstiges Probenmaterial auf einen Durchmesser von 635 µm begrenzt, um die Abbildung vollständiger optischer Schnitte zu ermöglichen.

Da die multimodale Bildgebung ein mehrfaches sequenzielles Durchfahren des gleichen Objekts erfordert ist die Genauigkeit des Probenpositionierungssystems ausschlaggebend für die Vergleichbarkeit der optischen Schnittebenen. Insbesondere die Genauigkeit des Positioniersystems entlang der Z- bzw. der Schnittachse ist ein entscheidender Faktor für die Bildgebung und muss abgestimmt auf die Lichtscheibendicke hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Bildgebung bei wiederholter Bildaufnahme unterschiedlicher kontrastgebender Effekte berücksichtigt werden. Zur Beurteilung aller Linearachsen werden Verfahrenserien von 10 Schritten für jede Achse untersucht und der tatsächliche Verfahrensweg mit einer hochpräzisen Messuhr in µm festgestellt.

Alle Verfahrenwege wurden dreimal in der gleichen Richtung durchlaufen, um das mechanische Spiel zu kompensieren. Der Nullpunkt für jeden Antrieb ist für alle Messungen identisch. Beim Zurücksetzen wird der Ursprung gezielt überfahren und für spätere Messungen in Fahrtrichtung neu gestartet. Aus den Datensätzen wird ein mittlerer Verfahrenweg pro Schritt berechnet. In Anlehnung an die Beurteilung einer Trennschärfe sind die Wertemengen der berechneten Schrittweiten für alle Achse als Verteilungsdichte in Abbildung 67 dargestellt.

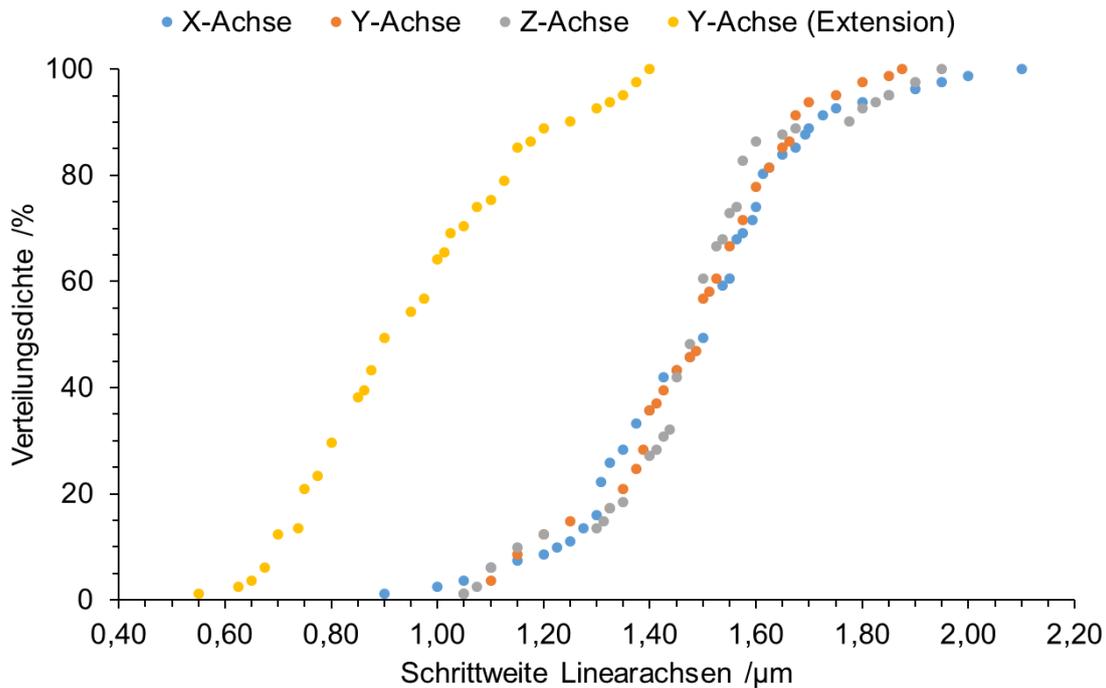


Abbildung 67: Verteilungsdichte der Schrittweiten aller Linearachsen.

Ein Verhältnis der Verteilungsdichte bei 25 % und 75 % dient als Bewertungskriterium. Eine ideale Trennung ist durch ein Verhältnis von 1 definiert, was einer unendlichen Kurvensteigung in Abbildung 67 entspräche und würde im vorliegenden Fall einer vollumfänglich reproduzierbaren, konstanten Schrittweite entsprechen. Mit 0,83 für die X-Achse, 0,86 für die Y-Achse, 0,90 für die Z-Achse erreichen alle Linearachsen der 4D-Stage eine hohe analytische Trennschärfe bzw. eine hohe Reproduzierbarkeit der eingestellten Schrittweiten. Die Erweiterung der Y-Achse zeigt ein Verhältnis von 0,70. Da diese Achse lediglich für eine Erweiterung des Fahrweges umgesetzt ist hier keine technisch hochgenaue Anforderung gegeben. Die deskriptive Beschreibung der Wiederholgenauigkeiten aller Linearachsen ist vergleichend in Abbildung 68 dargestellt.

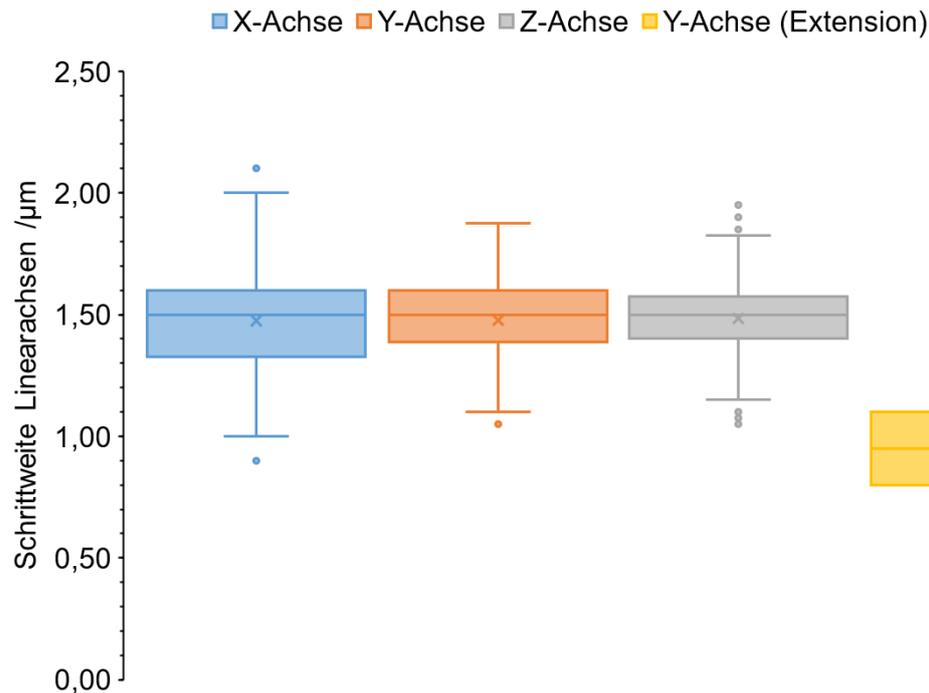


Abbildung 68: Wiederholgenauigkeit der Linearachsen. Dargestellt sind Minimum, Maximum, Median, 25%- und 75%-Quartil sowie Mittelwerte.

Wie Abbildung 68 zu entnehmen ist erreichen alle Linearachsen der Verfahreinheit von Picard Industries (X-, Y- und Z-Achse) einen Medianwert von 1,5 µm pro Schritt und Mittelwerte von 1,47 µm (X-Achse) bzw. 1,48 µm (Y- und Z-Achse). Die Erweiterung der Y-Achse zeigt einen Medianwert von 0,95 µm und einen Mittelwert von 0,96 µm. Die Spannweiten der 3-achsigen Verfahreinheit sind 1,1 µm, 0,76 µm und 0,67 µm jeweils für X-, Y- und Z-Achse, die der Y-Achsen-Erweiterung 0,85 µm. Sowohl die Spannweiten als auch die Interquartilsabstände der 3-achsigen Verfahreinheit zeigen eine leicht asymmetrische Verteilung hin zu geringeren Schrittweiten wohingegen der Interquartilsabstand der erweiterten Y-Achse eine symmetrische Verteilung der Schrittweite beschreibt. Die Z-Achse bzw. die optische Schnittachse zeigt die geringste Schwankungsbreite mit ca. ± 22 %, die X-Achse die höchste mit ca. ± 50 %, was Ortsauflösungen von ±450 nm bzw. ±600 nm entspricht.

Die Reproduzierbarkeit der Bildgebung wird neben der räumlichen Positionierung der Probe auch durch die spektrale Begrenzung des detektierten Lichts durch den AOTF bestimmt. Hierzu wurde der sowohl der Fingerprint-Bereich als auch der Hochfrequenzbereich des Raman-Spektrums in 2 nm Inkrementen durchfahren und das detektierte Signal hinsichtlich Zentralwellenlänge zur Bewertung der Genauigkeit und die Halbwertsbreite des detektierten Bands bewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 69 dargestellt.

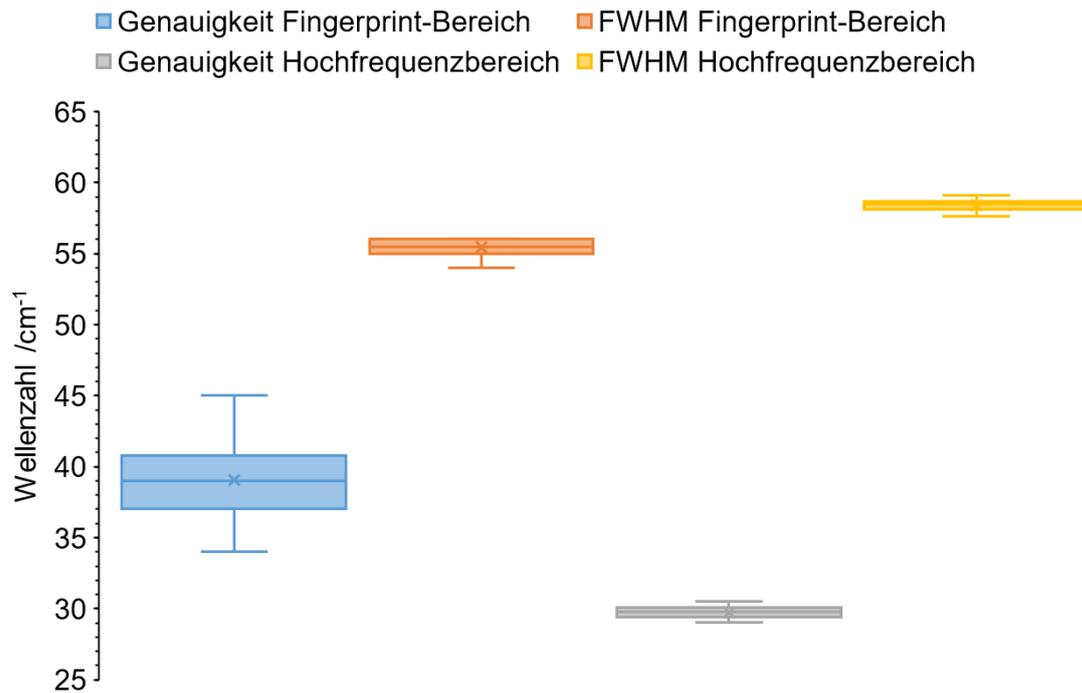


Abbildung 69: Genauigkeiten und Halbwertsbreiten des acousto optical tunable filters im Fingerprint-Bereich und Hochfrequenzbereich des Raman-Spektrums. Spektrale Unterteilung einer CHL 600 Halogenlichtquelle in 2 nm Inkrementen durch den AOTF. Fingerprint-Bereich vermessen mit einem RNX1 Raman-Spektrometer. Hochfrequenzbereich vermessen mit einem MultiSpec® Raman-Spektrometer.

Die Messergebnisse in Abbildung 69 zeigen Halbwertsbreiten von 56 cm^{-1} im Fingerprint-Bereich und 58 cm^{-1} im Hochfrequenzbereich bzw. $1,8 \text{ nm}$ und $3,9 \text{ nm}$. Die Spannweiten der Halbwertsbreiten zeigen, dass diese einstellbaren Bandbreiten mit einer spektralen Auflösung von $\pm 130 \text{ pm}$ bzw. $\pm 127 \text{ pm}$ im gesamten Raman-Spektrum erreicht werden. Die Abstände der eingestellten Zentralwellenlängen erreichen im Fingerprintbereich eine Genauigkeit von 11 cm^{-1} bzw. 250 pm und 92 pm .

Für die Vergleichbarkeit der generierten Bilder muss außerdem die Schwankungsbreite der während der Bildgebung detektierten Signalintensität bekannt sein. Hierfür wurden drei Bildserien mit jeweils zehn Bildern einer konstanten Probenschnittebene aufgenommen und 3 Bildbereiche bestehend aus jeweils 9 Pixeln zufällig ausgewählt und die Pixelwerte verglichen. In Abbildung 70 sind die untersuchten Bereiche der Vergleichsanalyse in zwei Beispielbildern der Bildserien hervorgehoben.

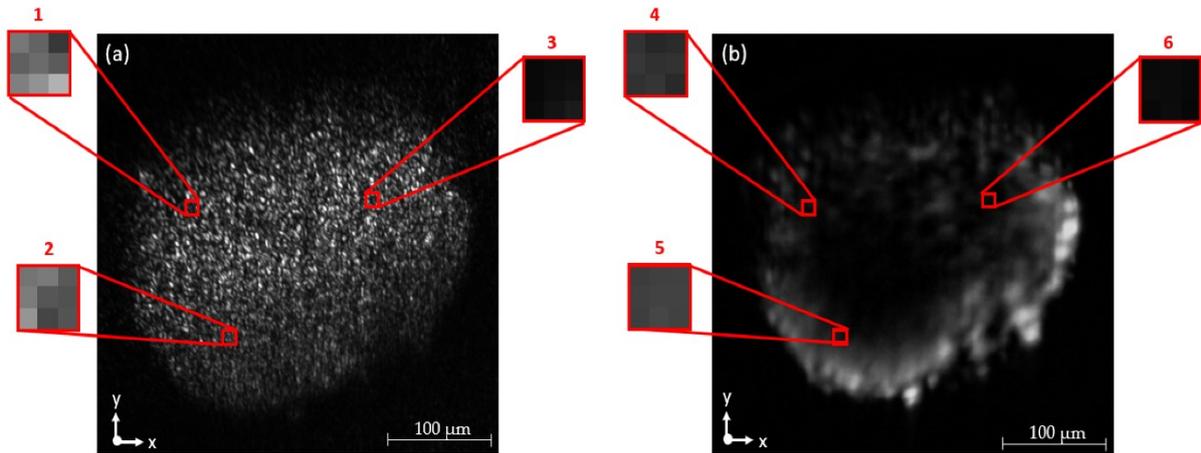


Abbildung 70: Bildbereiche und untersuchte Pixel für die Bestimmung der Signalfuktuation des Kamerachips mit (a) Rayleigh- und (b) Raman-Einstellungen. Emissionswellenlänge 660 nm, Emissionsleistung 1 mW (a) und 130 mW (b). Detektionswellenlänge 660 nm (a) und 815 nm (b).

In der ersten Bildserie (Rayleigh-Einstellungen, vgl. Tabelle 9) wurde der Sphäroid bei einer Emissionsleistung von 1 mW bei 660 nm beleuchtet, während die Transmission des AOTFs bei 660 nm lag. Die zweite Bildserie (Raman-Einstellungen, vgl. Tabelle 9) wurde mit der gleichen Wellenlänge bei 130 mW optischer Ausgangsleistung aufgenommen, während der AOTF auf 815 nm bzw. 2881 cm^{-1} eingestellt war und zusätzlich ein Sperrfilter eingesetzt wurde, um eine Überlagerung des Bildes mit der Anregungswellenlänge zu vermeiden. In der dritten Bildserie wurde die Rayleigh-Bildgebung für 785 nm vermessen. Die relativen Intensitätsschwankungen der Pixel wurden für jede Bildserie berechnet und sind in Abbildung 71 zusammengefasst.

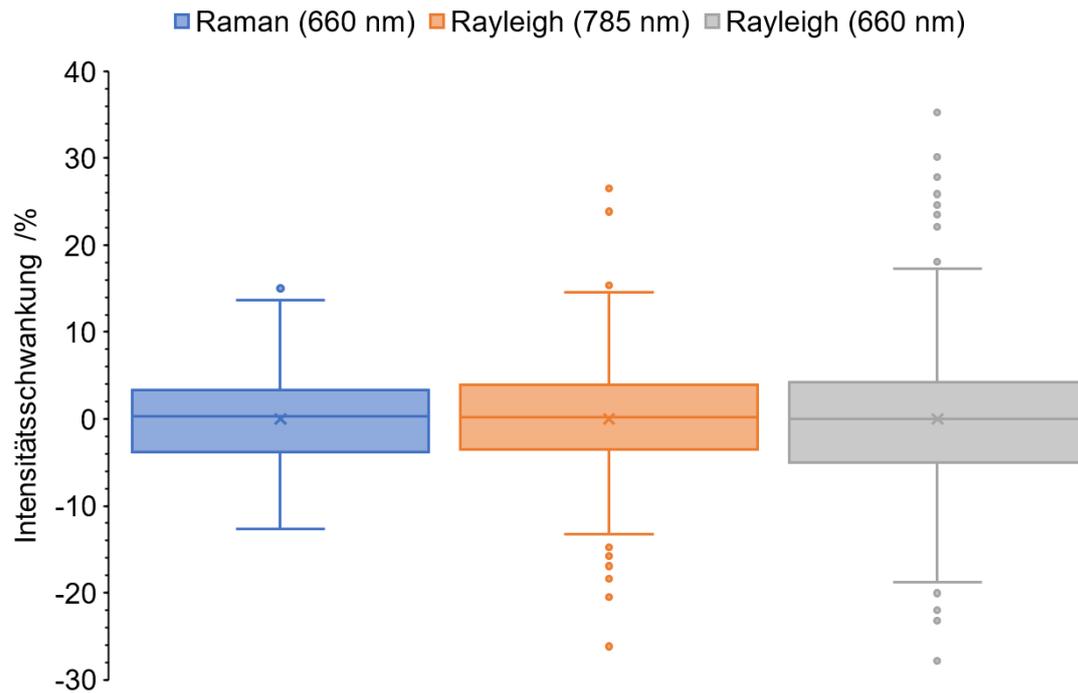


Abbildung 71: Prozentuale Signalschwankung von 27 zufällig ausgewählten Pixeln. Berechnet aus drei Bildsätzen von je 10 Bildern mit 130 mW Emissionsleistung bei 660 nm und Detektion bei 815 nm bzw. 2800 cm^{-1} sowie 1 mW Emissionsleistung bei 785 nm und 660 nm sowie Detektion bei 785 nm und 660 nm. Dargestellte Quartile von 270 Intensitätswerten pro Wellenlänge.

Die variierende Pixelhelligkeit bei Raman-Einstellungen des Mikroskops zeigt Intensitätsschwankungen von ca. $\pm 14,0\%$ basierend auf der Spannweite der Werte. Der Interquartilsabstand zeigt eine Schwankungsbreite von $7,1\%$. Rayleigh-Einstellungen und 785 nm Emissionswellenlänge zeigen ebenfalls Intensitätsschwankungen von ca. $\pm 14\%$ basierend auf der Spannweite der Messwerte, es kommen Ausreißer hinzu die ca. $\pm 26\%$ umfassen. Der Interquartilsabstand zeigt eine hierbei eine Intensitätsschwankung von $7,4\%$. Bei 660 nm Emissionswellenlänge schwankt die Pixelhelligkeit für Rayleigh-Einstellungen basierend auf der Spannweite um ca. $\pm 18\%$, ausreißende Intensitätswerte umfassen ca. $\pm 31,0\%$. Der Interquartilsabstand zeigt eine Intensitätsschwankung von $9,2\%$.

Die mit dem Mikroskop-Prototyp erzeugten Messergebnisse sind beispielhaft in den folgenden Abbildungen dargestellt. Abbildung 72 zeigt Bilder einer Fibroblasten-HT29-Co-Kultur. Das Sphäroid wurde mit 785 nm und 660 nm bei, Emissionsleistungen von jeweils 1 mW und selektiv an den Emissionswellenlängen mit einer Belichtungszeit von 100 ms abgebildet.

Durch die Nutzung der Rayleigh-Streuung können morphologische Informationen über Sphäroide gewonnen werden. Dies wird durch die Analyse des Streulichts der Emissionswellenlängen u.a. an Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechungsindices erreicht. Die Änderungen der Richtung und der Intensitätsverteilung des gestreuten Lichts geben Aufschluss über die Größe, Form und innere Struktur der Sphäroide. In Rayleigh-Bildern sind für beide Beleuchtungswellenlängen morphologische Strukturen entlang des gesamten Querschnitts des Sphäroids sichtbar. Der Abbildungsmodus wird verwendet, um die Ausdehnung des Sphäroids zu bestimmen und seine Ränder vom Bildhintergrund zu unterscheiden. Bei identischer optischer Leistung und Belichtungszeit zeigen die Ergebnisse für 660 nm eine Kontraststeigerung um 40% gegenüber 785 nm, berechnet aus den Einzelpixelwerten der Pixel mit der höchsten Intensität. Der Signalgewinn ist auf die höhere Quanteneffizienz der Kamera bei geringeren Wellenlängen sowie die bessere Transmission kürzerer Wellenlängen durch den Telluroxidkristall im AOTF zurückzuführen.

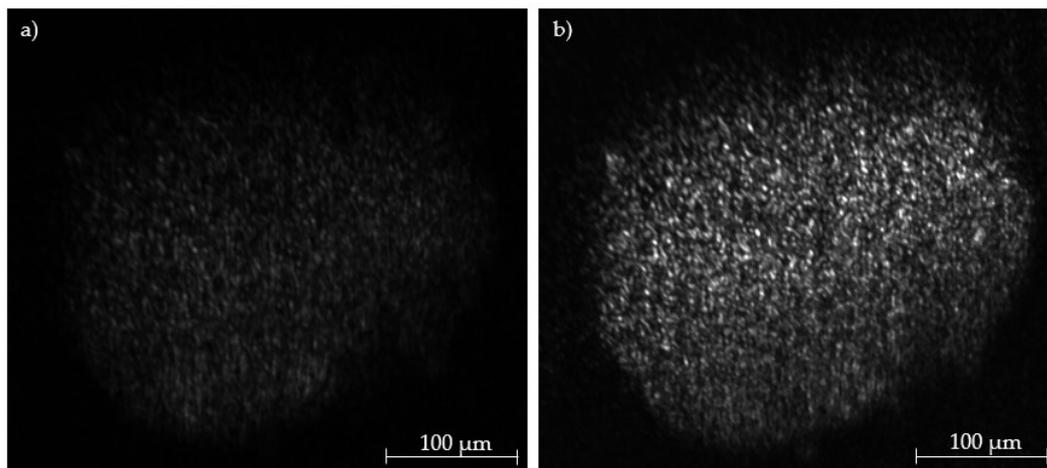


Abbildung 72: Vergleich von Rayleigh-Bildern eines Fibroblasten HT29-Sphäroids. Beleuchtung bei 785 nm (a) und 660 nm (b). Emissionsleistung bei 785 nm und 660 nm: 1 mW. Belichtungszeit: 100 ms. AOTF-Einstellung: 785 nm (a) bzw. 660 nm (b).

Abbildung 73 zeigt den gleichen optischen Schnitt des Sphäroids wie die vorherige Abbildung 72 bei Abbildung des Raman-Effekts. Ergänzend zum Schnittbild wird das Spektrum der Bildebene angezeigt. Das Bild entspricht der Darstellung inelastischer Streuung bei oder 2881 cm^{-1} oder 815 nm bei einer Belichtungsleistung von 130 mW und einer Belichtungszeit von 5000 ms.

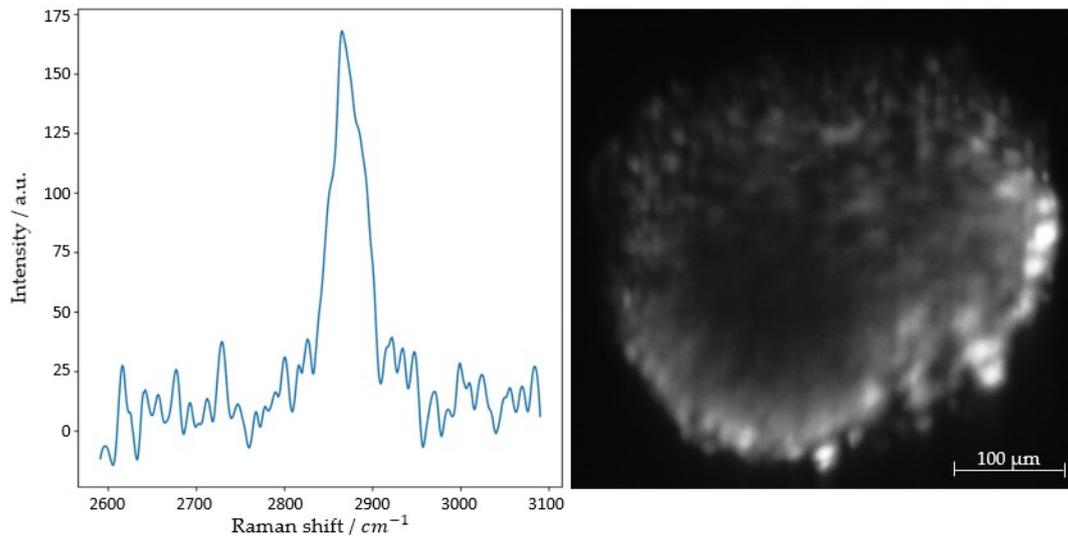


Abbildung 73: Raman-Spektrum und zugehöriges Bild eines Fibroblasten-HT29-Sphäroids. Beleuchtet bei 660 nm mit 130 mW Emissionsleistung. Detektiert bei 815 nm bzw. 2881 cm^{-1} . Belichtungs- bzw. Integrationszeit jeweils 5000 ms.

In allen Messserien war keine Autofluoreszenz vorhanden. Nutzt man den Raman-Effekt für den Bildkontrast, werden einzelne, abgrenzbare Strukturen vor allem in der Peripherie des Sphäroids sichtbar. Die Größe der einzelnen Strukturen beträgt ca. 5 μm . Die inelastisch gestreuten Stokes-Photonen im Signalbereich von 2851 cm^{-1} bis 2911 cm^{-1} ergeben ein von exogen zugeführten Markern freies Bild. Die zugrunde liegenden Schwingungsmodi sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Raman-Peak-Grenzen und Schwingungsmoden.

| Peak-Grenzen / cm^{-1} | Schwingung | Quelle |
|---------------------------------|---------------------------------------|--------|
| 2850 - 2860 | Symmetrische Streckung CH_2 | 53 |
| 2880 - 2895 | Asymmetrische Streckung CH_2 | 54 |
| 2929 - 2937 | Streckung CH_3 | 55 |

Abbildung 74 vergleicht das Bild eines optischen Schnitt markerfreier Raman-Bildgebung mit derselben Schnittebene nach Behandlung des Sphäroids mit dem Fluoreszenzfarbstoff Draq5. Der Farbstoff Draq5 ist ein in der Bildgebung von Zellen bzw. Zellkulturen häufig verwendeter Fluoreszenzmarker. Als Interkalator fügt er sich zwischen den dann-Doppelsträngen ein und markiert damit in Zellkerne. Diese spezifische Färbung ermöglicht eine präzise Lokalisierung von Zellkernen, und u.a. die Analyse von Zellzyklus und Kernprozessen. Aufgrund seiner Zuverlässigkeit und Anwendbarkeit ist Draq5 in der biomedizinischen Forschung weit verbreitet und stellt damit eine etablierte Vergleichsmöglichkeit für die Raman-Bildgebung dar.

In den Vergleichsmessungen wurde die Fluoreszenz von Draq5 mit 660 nm und einer Emissionsleistung von 50 mW angeregt und Bilder bei 815 nm bzw. 2882 cm^{-1} mit einer Belichtungszeit von 2000 ms aufgenommen. Der Raman-Effekt wurde mit einer optischen Ausgangsleistung von 130 mW angeregt, die Detektion erfolgte wie zuvor bei 2882 cm^{-1} und einer Belichtungszeit von 5000 ms.

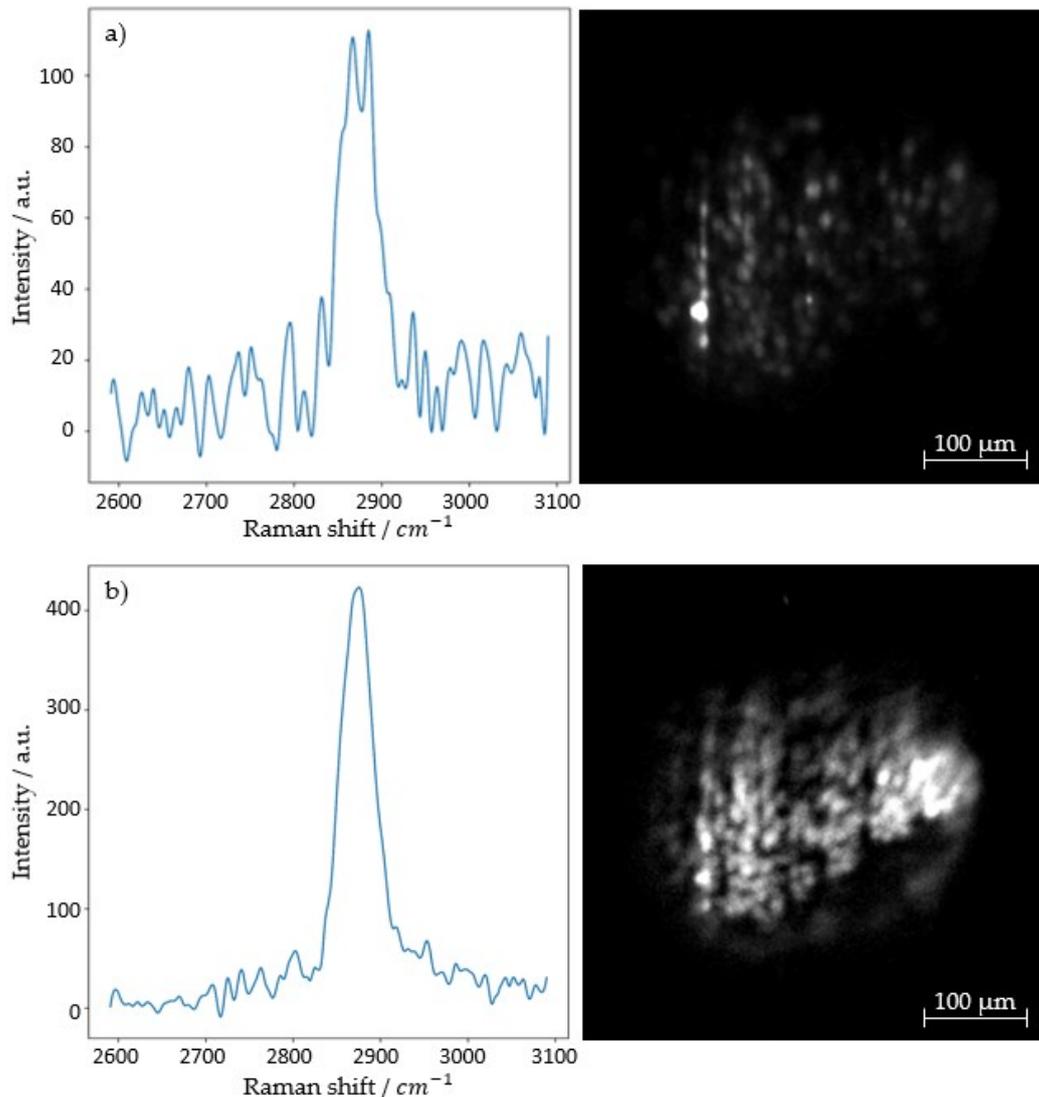


Abbildung 74: Vergleich der gleichen optischen Schnittebene eines Fibroblasten-HT29-Sphäroiden vor Färbung (a) und nach Färbung (b) mit Draq5. Die Peak-Intensität des zugehörigen Spektrums ist bei gefärbten Proben ca. 400 % höher.

Draq5-basierte Fluoreszenzbilder des Mikroskops erreichen im Vergleich zu Raman-Bildern eine um den Faktor 4 höhere Signalintensität bei einer Reduzierung der optischen Leistung um den Faktor 2,6 und der Belichtungszeit um Faktor 3. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs verursacht jedoch einen erhöhten Aufwand bei der Probenvorbereitung.

Auch wenn der Vergleich der Spektren in Abbildung 74 zunächst eine identische spektrale Information vermuten lässt, muss berücksichtigt werden, dass die Emission von Draq5 den Spektralbereich von 660 nm bis 820 nm umfasst und somit den Großteil des Raman-Spektrums überlagert. Die detektierte Bandbreite wird durch den AOTF vorgegeben, sodass aus dem breitbandigen Fluoreszenzspektrum ein schmaler Teilbereich dargestellt wird.

Abbildung 75 zeigt ausgewählte Bilder eines Fibroblasten-HT29-Co-Kultur aus einer den Sphäroid vollständig umfassenden Schnittbildserie. Eine vollständige Serie besteht je nach Größe des Sphäroids aus bis zu 60 Bildern, wobei in Abbildung 75 jedes 6. Bild zur exemplarischen Darstellung ausgewählt wurde. Alle Bilder nutzen den Raman-Effekt und stellen dementsprechend optische Schnittebenen einer ungefärbten Probe dar. Alle Bilder wurden mit einer Emissionsleistung von 130 mW bei 660 nm, einer AOTF-Einstellung von 815 nm oder 2881 cm^{-1} Raman-Shift und einer Belichtungszeit von 5000 ms aufgenommen.

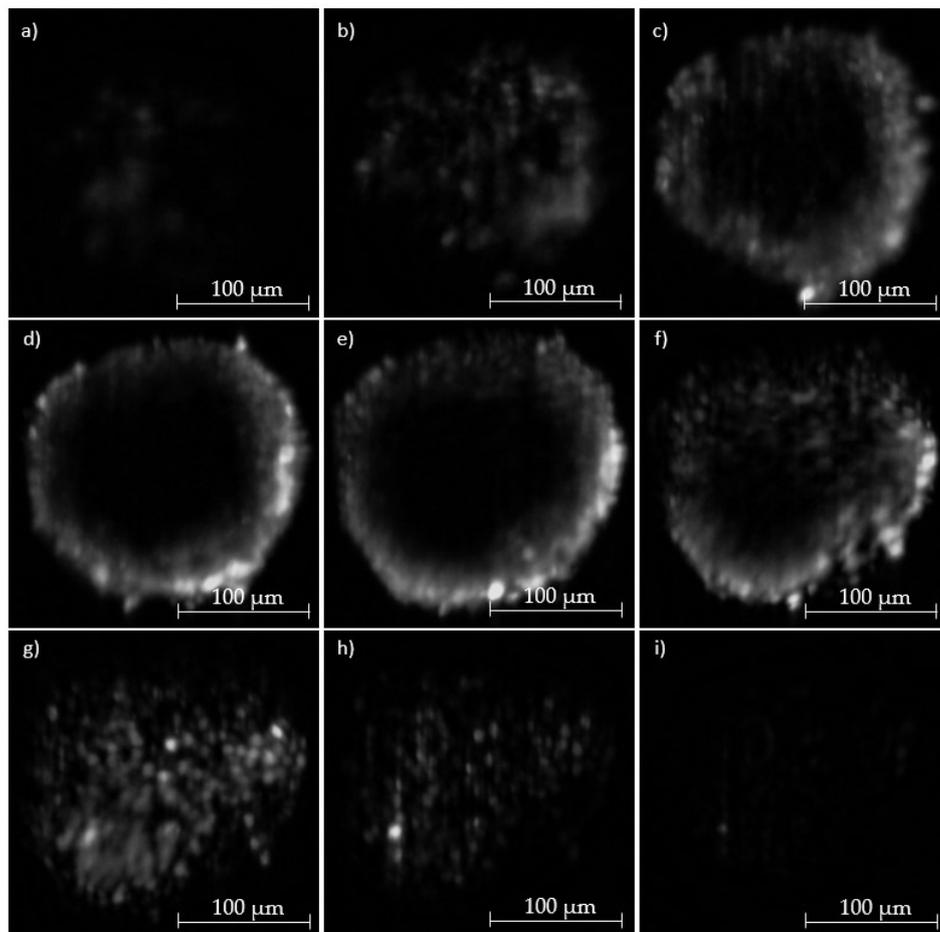


Abbildung 75: Sequenz ausgewählter optischer Schnitte eines Fibroblasten-HT29-Sphäroids entlang der z-Achse des Mikroskops (a bis i). Beleuchtungswellenlänge: 660 nm. Emissionsleistung: 130 mW. AOTF-Transmission: 815 nm bzw. 2881 cm^{-1} . Belichtungszeit: 5000 ms.

Die Schnitte durch Sphäroide zeigen bei der Detektion von inelastisch gestreuten Photonen eine optische Eindringtiefe von ca. 70 μm . Dies bedeutet, dass vorwiegend die äußeren Sphäroid-Ränder abgebildet werden können. Das Zentrum des Sphäroids erscheint aufgrund von Streu- und Absorptionsereignissen der Raman-Photonen dunkel. Raman-Bilder können also ohne weitere Bearbeitung die Sphäroid-Peripherie darstellen. Abgrenzbare Strukturen innerhalb der Bildebenen haben Durchmesser von ca. 5 μm .

Die mit Raman-Einstellungen aufgenommene Schnittbildserie bildet die Grundlage für eine dreidimensionale Rekonstruktion der Sphäroidprobe. Abbildung 76 zeigt das aus den Einzelbildern zusammengesetzte 3D-Modell aus drei Perspektiven, entlang einer einachsigen Drehung um 0 Grad, 90 Grad und 180 Grad. Es entstehen eine Frontalansicht, eine Seitenansicht und eine Rückansicht der Probe. Dieser umfassende Ansatz ermöglichte eine detaillierte, räumliche Beurteilung von Struktur und ggf. abgeleiteten Eigenschaften der Probe.

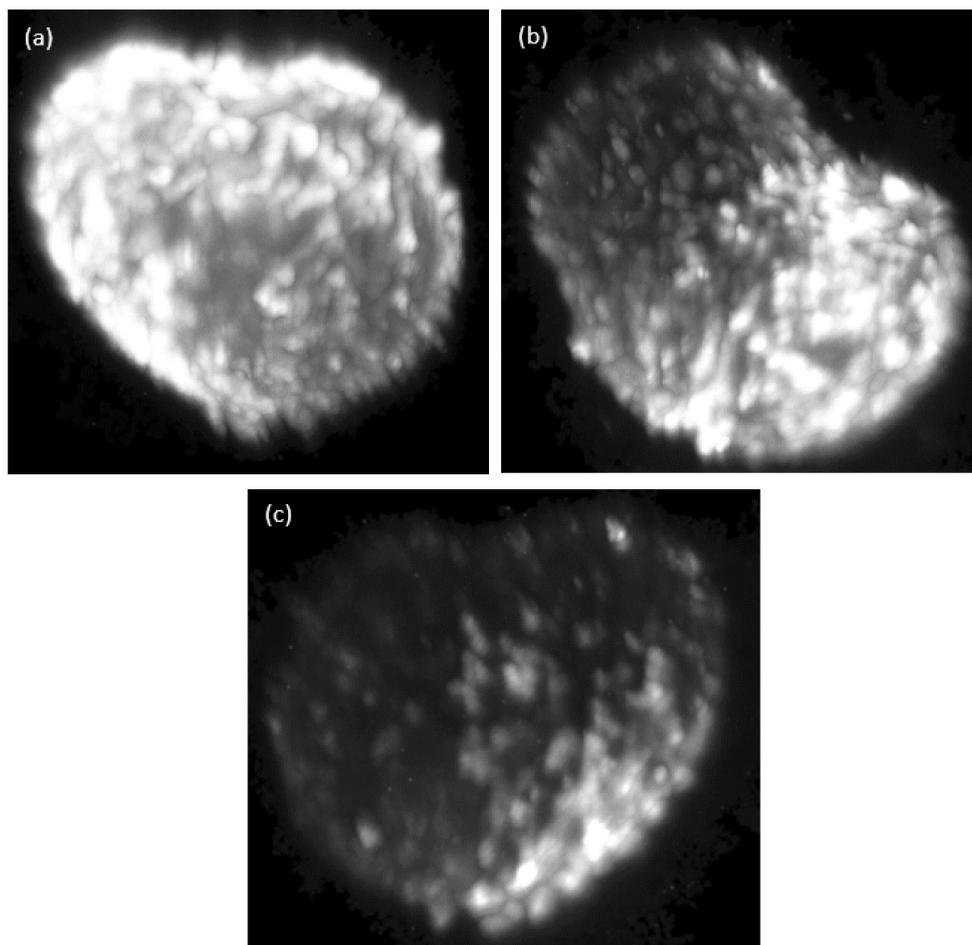


Abbildung 76: Dreidimensionale Rekonstruktion eines Fibroblasten-HT29-Sphäroids aus einer Raman-Bildserie. (a) 0 Grad (Frontalansicht), (b) 90 Grad (Seitenansicht) und (c) 180 Grad (Rückansicht). Die Serie besteht aus 52 Bildern. Beleuchtungswellenlänge: 660 nm. Emissionsleistung: 130 mW. AOTF-Transmission: 815 nm bzw. 2882 cm^{-1} . Belichtungszeit: 5000 ms.

Die Raman-Mikroskopie bietet prinzipiell eine hohe chemische Spezifität, die hiermit verbundene maßgebliche Einschränkung ist jedoch die geringe Signalintensität. Die unmittelbare Konsequenz äußert sich in kontrastarmen Bildern, was vor quantitativen Analysen bereits die qualitative Interpretation erschwert. Um speziell diese Einschränkungen zu adressieren wurden weiterführende Bildbearbeitungssequenzen an entsprechenden Bildern getestet, um Kontrast hinsichtlich struktureller Abgrenzbarkeit zu verbessern. Abschließend wurde ein Kategorisierungsansatz aus dem Bereich des Deep Learnings auf kontrastarme Raman-Bilder angewendet. Durch die Integration von Prinzipien der künstlichen Intelligenz in die spektrale Bildgebung können scheinbar informationsarme Bilder der Raman-Mikroskopie nutzbar und ggf. eine detaillierte Materialcharakterisierung auf mikroskopischer Ebene zugänglich gemacht werden.

Bei den hierfür beispielhaft untersuchten Bildern handelt es sich um Aufnahmen von Sphäroiden der Krebszelllinien 14C und 11B. Um einen strukturell ausgeprägten Effekt darzustellen, wurden Sphäroide mit zytotoxischem Cisplatin behandelt und mit unbehandelten Sphäroiden verglichen.

Alle verwendeten Bilder haben eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel. Des Weiteren sind es 8-Bit Graustufenbilder mit einer Farbtiefe von 256 (Helligkeitswerte von 0 bis 255). Insgesamt liegen 8 Bildserien vor, bestehend aus 35 bis 54 Einzelbildern in Abhängigkeit des Sphäroiddurchmessers. Es ergeben sich in Summe 353 Bilder, von denen ein Teil Null-Durchgangsbilder sind. Auf diesen ist lediglich das Hintergrundrauschen zu sehen. In der folgenden Tabelle 14 sind Zelltyp, Cisplatin-Wirkdauer, und Stapelgröße der untersuchten Sphäroide zusammengefasst.

Tabelle 14: Übersicht der untersuchten Zelllinien, Wirkdauer des Cytotoxikums Cisplatin, und Größe der Bildserien zu Anwendung des Deep-Learning-Algorithmus.

| Zelllinie /- | Wirkdauer Cisplatin /h | Stapelgröße /- |
|--------------|------------------------|----------------|
| 14C Set 1 | 0 | 42 |
| 14C Set 1 | 48 | 41 |
| 14C Set 1 | 72 | 35 |
| 14C Set 2 | 0 | 48 |
| 11B Set 1 | 0 | 50 |
| 11B Set 1 | 48 | 54 |
| 11B Set 1 | 72 | 49 |
| 11B Set 3 | 72 | 34 |

In den folgenden Abbildungen sind beispielhaft größte Querschnitte der untersuchten Sphäroide dargestellt:

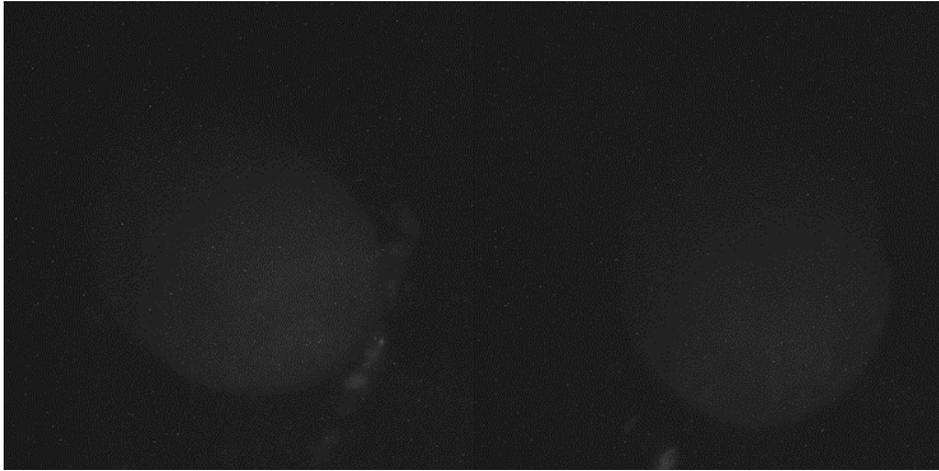


Abbildung 77: 14C Set 1 (keine Behandlung mit Cisplatin bzw. 0 h) Bild A16 und 14C Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 48 h) Bild A19.



Abbildung 78: 14 C Set 2 (keine Behandlung mit Cisplatin bzw. 0 h) Bild A18 und 14 C Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 72 h) Bild A12.

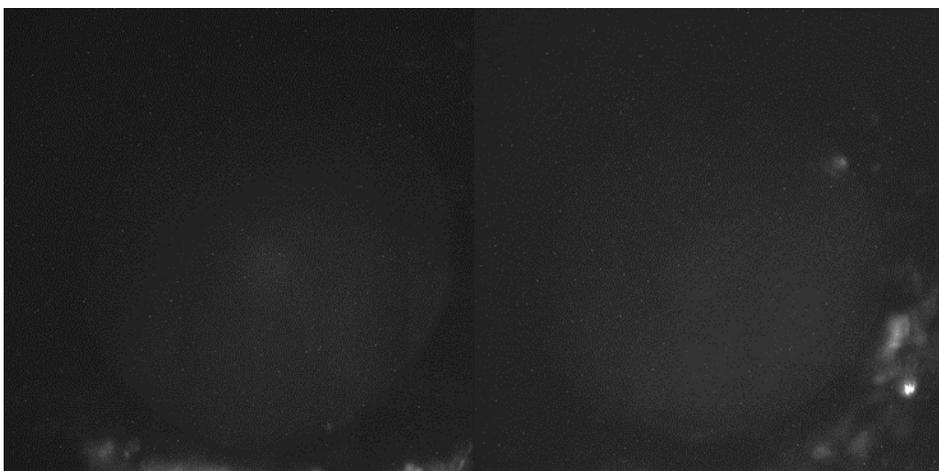


Abbildung 79: 11 B Set 1 (keine Behandlung mit Cisplatin bzw. 0 h) Bild A12 und 11 B Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 48 h) Bild A24.

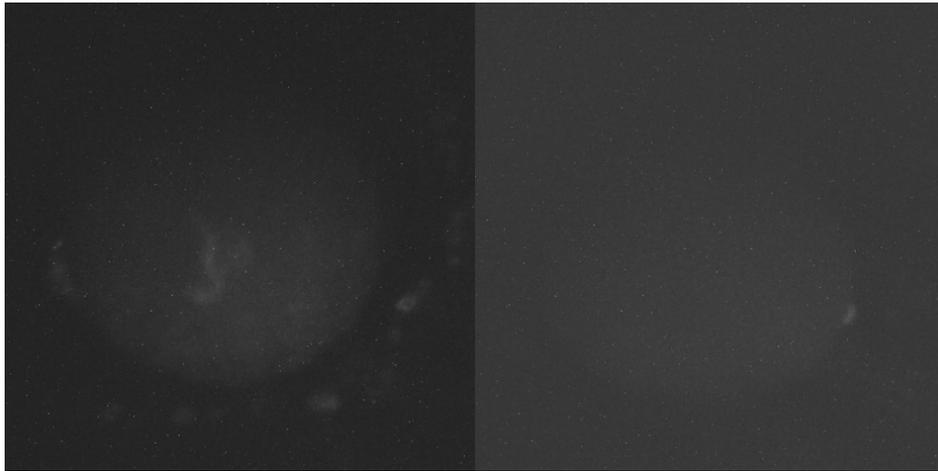


Abbildung 80: 11B Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 72 h) Bild A29 und 11 B Set 3 (72h) Bild A18.

Prinzipiell sind in allen Bildern die Sphäroide von ihrem Bildhintergrund abgrenzbar. Vereinzelt können Strukturen im Sphäroidinneren abgegrenzt werden, überwiegend erscheint das Innere der Zellkulturen als homogener Bereich frei von differenzierbaren Merkmalen. In der algorithmischen Kontrastverbesserung ist das Ziel drei Störfaktoren zu bearbeiten und somit den Informationsgehalt zu erhöhen, diese sind das Salz-Rauschen, der neblige Sphäroid-Saum, sowie der weitestgehend merkmalfreie Sphäroidinnere.

Salz-Rauschen bezeichnet die zufällige Verteilung heller Bildpunkte über das gesamte Bildfeld. Dieser Effekt kann insbesondere bei Bildern mit geringem Kontrast zum Tragen kommen. Systematisch kann die Entfernung in Bildstapeln über die Verrechnung mit einer Bildreferenz stattfinden. Das hierfür erstellte Skript ist dem Anhang zu entnehmen.

Ein wiederkehrendes Merkmal der Bilder äußert sich als diffuser Bereich ähnlich einem nebligen Saum oder Schleier, der die Sphäroide umschließt. Dieser Bereich kann die Genauigkeit von Bildverarbeitungsaufgaben beeinträchtigen, da er irrelevante visuelle Informationen hinzufügt. Der Schleier führt dazu, dass Algorithmen die Grenzen der Sphäroide falsch erkennen oder fehlerhafte Daten einbeziehen, was die präzise Extraktion von Informationen über Zellkulturen erschwert. Die Beseitigung des Bereichs verbessert die Klarheit und Schärfe der Bilder und stellt sicher, dass Analysen auf genauen und relevanten Daten beruhen. Dies wird in der Regel durch Bildverarbeitungstechniken erreicht, die das Sphäroid präzise von umgebenden Artefakten trennen. Der Saum kann durch Ausschneiden des Sphäroids entlang seiner äußeren Abgrenzung entfernt werden. Dies ist beispielsweise manuell durch einen menschlichen Anwender

über das Anlegen einer kreisförmigen Maske oder das polygonale Abfahren der äußeren Kontur machbar.

Es existieren auch Ansätze für eine automatisierte Segmentierung über regelbasierte Algorithmen wie zirkuläre Hough-Transformation, oder nicht regelbasierte Algorithmen wie Weka-Segmentierung. Im Rahmen der initialen Untersuchung wurden die Bildstapel mittels polygonalem Abzeichnen der äußeren Sphäroid-Ränder bearbeitet. Bei größeren Datensätzen sollte jedoch die Anwendung kreisförmiger Techniken, die in allen Fällen Symmetrie gewährleisten, evaluiert werden. Alternativ können für eine komplexere automatisierte Lösung neuronale Faltungsnetzwerke trainiert werden, um das Sphäroid vom Saum zu unterscheiden und genau abzugrenzen, auch bei unregelmäßigen Rändern.

Überwiegend zeigen Schnittbilder der Zelllinien 11B und 14C ein scheinbar merkmalfreies, homogenes Innere der Sphäroide. Vereinzelt sind in den unbearbeiteten Bildern Strukturen im inneren der Sphäroide abgrenzbar (vgl. Abbildung 81).

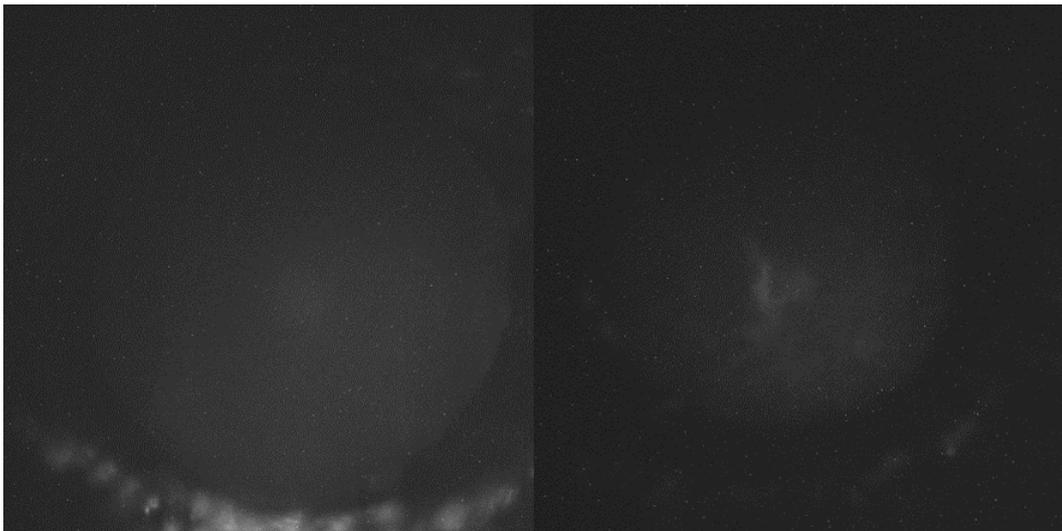


Abbildung 81: Abgrenzbare innere Strukturen in Sphäroiden 11B Set 1 (keine Behandlung mit Cisplatin) Bild A08 und 11B Set 1 (Einwirkdauer von Cisplatin 72 h) Bild A32.

Für beide Zelllinien sind jedoch charakteristische Strukturen in der Größenordnung von $15\ \mu\text{m}$ und $40\ \mu\text{m}$ zu erwarten. Hinsichtlich des Bildfelds des Mikroskops bzw. der Pixelauflösung von $630\ \text{nm}$ entspricht dies Strukturen von 24 bis 64 Bildpunkten im Schnittbild.

Zur Extraktion weiterer Strukturinformationen aus den Bildern wurden zwei Bearbeitungssequenzen empirisch erarbeitet. Beide Sequenzen bestehen aus fünf Bearbeitungsschritten. Die Sequenzen beinhalten die Subtraktion von Referenzbildern zur Entfernung des Salzrauschens, das manuelle Abgrenzen des Sphäroidrandes vom

umgebenden Saum, sowie Bandpassfilterung zur Hervorhebung gesuchter Strukturen. Sie unterscheiden sich durch die wiederholte Anwendung des „Unsharpmaskfilters“ (Sequenz 1) und den Einsatz der „Kontrastdehnung“ (Sequenz 2). Die Abfolge der Bearbeitungsoperationen beider Sequenzen ist in Tabelle 15 gegenübergestellt.

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Bildbearbeitungssequenzen zur Hervorhebung von internen Strukturen in Sphäroiden der Zelllinien 11B und 14C.

| # | Sequenz 1 | Sequenz 2 |
|---|------------------------------------|------------------------------------|
| 0 | Natives Bild laden | Natives Bild laden |
| 1 | Bildsubtraktion Nativ und Referenz | Bildsubtraktion Nativ und Referenz |
| 2 | Applikation Unsharpmaskfilter | Applikation Kontrastspreizung |
| 3 | Manuelle Randabgrenzung | Manuelle Randabgrenzung |
| 4 | Applikation Bandpassfilter | Applikation Bandpassfilter |
| 5 | Applikation Unsharpmaskfilter | Applikation Unsharpmaskfilter |

Der Unsharpmaskfilter wird bei der Bearbeitung von Graustufenbildern von u.a. Sphäroiden eingesetzt, um die Sichtbarkeit und Definition der Kanten und Merkmale im Bild zu verbessern. Die Bildbearbeitung findet mittels zwei Parameter, dem Weichzeichnerradius und dem Gewichtungsfaktor, statt.

Der Weichzeichnerradius gibt an, wie stark die Unschärfe auf das Originalbild angewendet wird, bevor es zur Erstellung der Maske subtrahiert wird. Ein großer Radius erzeugt eine sehr glatte Version des Bildes, bei der nur die größten Strukturen einen Einfluss haben. Hohe Einstellungen können gewählt werden, um z. B. sicherzustellen, dass nur große Merkmale bis hin zur Gesamtform der Sphäroide hervorgehoben werden, während feinere Details und Rauschen ignoriert werden. Dies ist besonders nützlich bei Bildern, bei denen der Schwerpunkt auf der Gesamtform und nicht auf der detaillierten Textur liegen soll. Der Gewichtungsfaktor bestimmt, wie viel des geschärferten Bildes, das Ergebnis der Subtraktion des unscharfen Bildes vom Original, wieder zum Originalbild hinzugefügt wird. Ein hoher Wert nahe bedeutet, dass Kanten stark hervorgehoben werden. Dies ist besonders nützlich für Sphäroid-Bilder, da hier die Kantenschärfe entscheidend ist, um Objekte klar abzugrenzen.

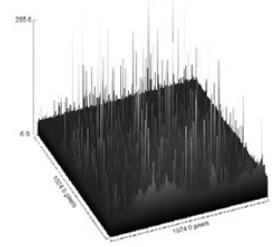
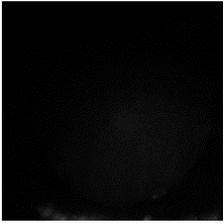
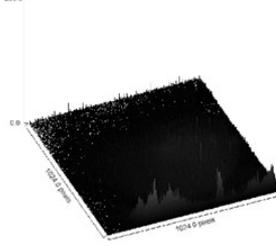
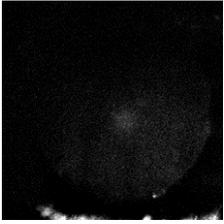
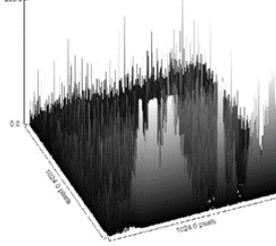
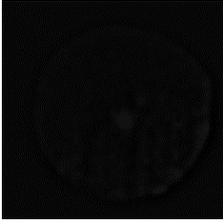
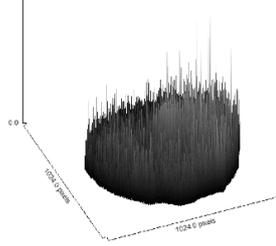
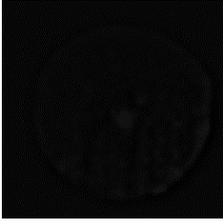
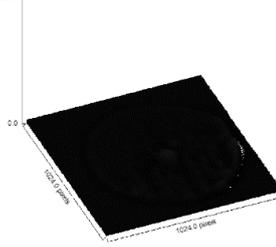
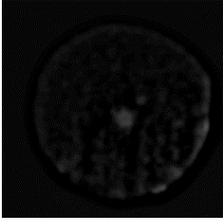
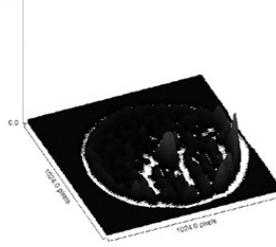
Die Kontrastspreizung ist eine Bildbearbeitungstechnik zur Verbesserung der Sichtbarkeit von Details, indem der Kontrast zwischen den dunkelsten und hellsten Teilen eines Bildes erhöht wird. Dabei wird der Bereich der Intensitätswerte in einem Bild so erweitert, dass sie das gesamte mögliche Spektrum von Schwarz bis Weiß abdecken.

Diese Methode hilft bei der Hervorhebung von Details, die aufgrund des geringen Kontrasts nicht gut sichtbar waren. Hierbei ist beispielsweise die Sättigung eines bestimmten Anteils der Pixel möglich, um den Einfluss von Ausreißern zu vermeiden. Die Kontraststreuung wird häufig in der medizinischen Bildgebung eingesetzt, um Bilddetails zu verdeutlichen. Die Wahl eines unteren Grenzwerts größer als 0 bei der Kontraststreuung zielt darauf ab, die Bildqualität zu verbessern, indem das dunkelste Rauschen und irrelevante Details ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung bedeutet, dass alle Pixelwerte unterhalb dieses Wertes auf Schwarz gesetzt werden, was Rauschen bei geringer Intensität, das sich häufig in dunkleren Regionen befindet, effektiv eliminiert wird. Dies verbessert die Sichtbarkeit aussagekräftiger Bilddetails, indem die Kontrastanpassung auf Bereiche mit tatsächlichen Informationen konzentriert wird und nicht auf die dunkelsten Bereiche, die eventuell keine relevanten Daten liefern und die Gesamtklarheit des Bildes beeinträchtigen könnten.

Der Bandpassfilter wendet zunächst die schnelle Fourier-Transformation (engl. fast Fourier transformation, FFT) an, um das Bild in seine Frequenzkomponenten zu zerlegen. Anschließend werden selektiv Frequenzen außerhalb eines bestimmten Bereichs herausgefiltert, der prinzipiell durch Parameter wie „kleine Strukturen filtern bis“ und „große Strukturen filtern bis“ definiert ist. Dieser Filterprozess findet im Frequenzbereich statt, sodass der Filter auf bestimmte Größenordnungen innerhalb des Bildes abzielen kann. Nach der Filterung konvertiert die inverse FFT das modifizierte Frequenzbereichsbild zurück in den räumlichen Bereich, was zu einem endgültigen Bild mit einem verstärkten Fokus auf den gewünschten Größenbereich der Merkmale führt. Der Bandpassfilter eignet sich in der wissenschaftlichen Bildgebung, wenn Klarheit und Fokussierung auf spezifische Größenordnungen entscheidend sind. Er hilft bei der Verringerung des Hintergrundrauschens und der Hervorhebung der für die Untersuchung wichtigsten Merkmale.

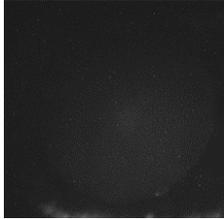
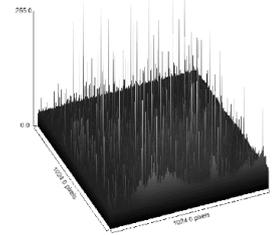
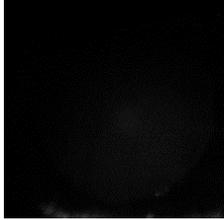
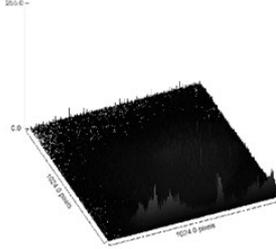
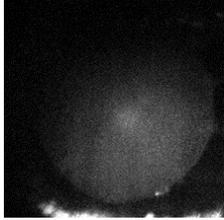
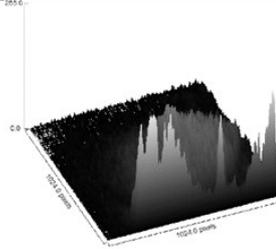
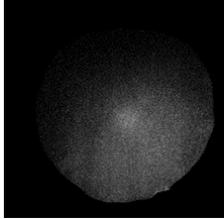
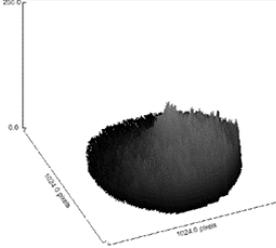
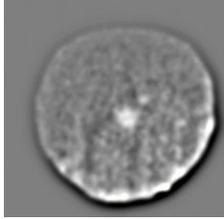
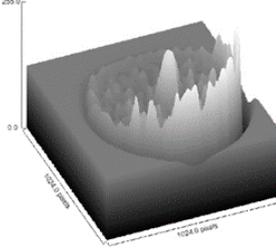
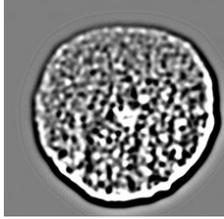
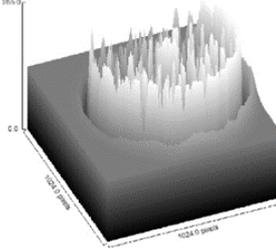
Alle Zwischenergebnisse eines Durchlaufs beider Sequenzen sind beispielhaft in Tabelle 16 und Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Inkrementelle Darstellung aller Zwischenergebnisse der Bildbearbeitungssequenz 1 am Beispiel 11B Set 1 (0 h) Bild A 13.

| # | Bearbeitung | Bild | Surface plot |
|---|---|---|---|
| 0 | Natives Bild |  |  |
| 1 | Bildsubtraktion Nativ und Referenz (Bild A 50) |  |  |
| 2 | Applikation Unsharp-Maskfilter <ul style="list-style-type: none"> • Gewichtungsfaktor $w=0,85$ • Weichzeichnerradius $r=99$ |  |  |
| 3 | Manuelle Rand-abgrenzung |  |  |
| 4 | Applikation Bandpassfilter |  |  |
| 5 | Applikation Unsharp-Maskfilter <ul style="list-style-type: none"> • Gewichtungsfaktor $w=0,85$ • Weichzeichnerradius $r=99$ |  |  |

Die Bildbearbeitung wurde mit ImageJ durchgeführt, das zugehörige Skript ist dem Anhang zu entnehmen:

Tabelle 17: Inkrementelle Darstellung aller Zwischenergebnisse der Bildbearbeitungssequenz 2 am Beispiel 11B Set 1 (0 h) Bild A 13.

| # | Bearbeitung | Bild | Surface plot |
|---|--|---|---|
| 0 | Natives Bild |  |  |
| 1 | Bildsubtraktion Nativ und Referenz (Bild A 50) |  |  |
| 2 | Kontrastdehnung <ul style="list-style-type: none"> • Lower threshold = 42 • Upper threshold = 255 |  |  |
| 3 | Manuelle Randabgrenzung |  |  |
| 4 | Applikation Bandpassfilter |  |  |
| 5 | Applikation Unsharp-Maskfilter <ul style="list-style-type: none"> • Gewichtungsfaktor w=0,95 • Weichzeichnerradius r=90 |  |  |

Der Vergleich von nativen und bearbeiteten Bildern zeigt das durch die beschriebenen Bearbeitungssequenzen in scheinbar merkmalfreien Raman-Bildern räumlich abgrenzbare Strukturen in der für die Zelllinien erwarteten Größenordnung sichtbar werden (vgl. Tabelle 16 und Tabelle 17). Ein Auszug aus dem Bildstapel eines Sphäroids vom Typ 11B (Set 1, 72 h) soll dies weiter veranschaulichen.

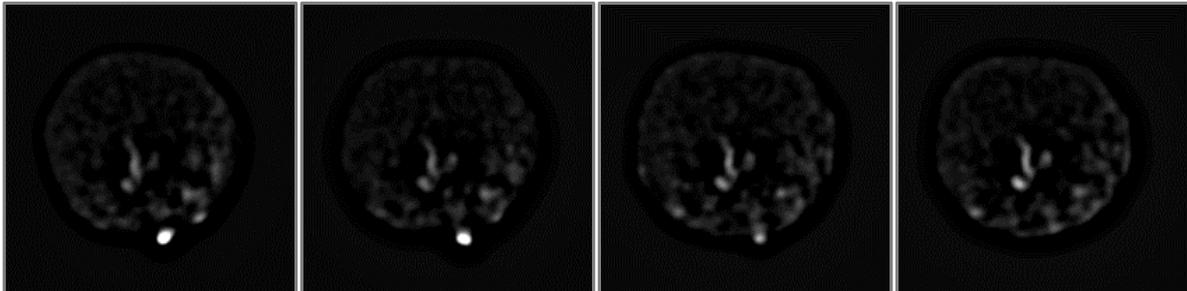


Abbildung 82: Exemplarischer Ausschnitt von vier benachbarten Schnittebenen aus dem Bildstapel eines 11 B Monokultur-Sphäroids (Set 1 72h, Bilder A24, A25, A26, und A27) nach Anwendung der Bildbearbeitungssequenz 1 (vgl. Tabelle 15).

Die Bildstapel können durch Deep Learning analysiert und in die Zustände „unbehandelt“ und „Cisplatin behandelt“ klassifiziert werden. Zunächst ist hierfür die Allokation von Trainings- und Validierungsbildern erforderlich. 80 % der verfügbaren Bilder wurden zufällig mittels Python-Skript als Trainingsdaten ausgewählt sowie 10 % als Validierungsdaten, 10 % verblieben als Testdaten. Das Skript ist dem Anhang zu entnehmen.

Die Klassifizierung durch Deep Learning ist funktionell in fünf Teile gegliedert. Nach dem Ladevorgang der Python-Bibliotheken erfolgt die Aufteilung von Trainings- und Validierungsdaten. Ergänzend zur zufälligen Auftrennung der verfügbaren Daten kommt sog. Data Augmentation zum Einsatz. Diese Technik erstellt künstlich veränderte Versionen der Trainingsdaten, um die Vielfalt der verfügbaren Daten zu erhöhen, was wiederum Overfitting reduziert. Folglich kann das Modell besser generalisieren und sich an verschiedene Arten von Daten anpassen. Hier beinhaltet die Augmentierung drei Transformationen.

- Zufälliges Zuschneiden und Skalieren von Bildern auf eine definierte Größe (224 x 224 Pixel).
- Zufälliges horizontales Spiegeln.
- Normalisierung der Pixelwerte.

Normalisierung beschreibt in diesem Zusammenhang den Prozess der Standardisierung der Pixelwerte eines Bildes auf eine gemeinsame Skala oder Verteilung. Unter dieser Voraussetzung ist sichergestellt, dass die Eingabedaten einem konsistenten

Muster folgen, so dass Algorithmen für maschinelles Lernen sie leichter verarbeiten und daraus lernen können. Hier reicht der Wert von 0 bis 1.

Nach Allokation und Augmentierung werden die maßgeblichen Hyperparameter des Trainingsprozesses definiert. Hierzu zählen das Modell, die Loss function, und die Epochen- oder Iterationsanzahl. Hierauf folgt das Training des Modells anhand der zufällig ausgewählten Bilddaten. Abschließend werden die Ergebnisse der Klassifizierung bewertet und in einer Confusion Matrix dargestellt.

Für das Modell Training wurde GooglesColab-IDE verwendet. Das Skript nutzt das ResNet101 Modell, eine Variante des Residual-Netzwerks, welche häufig im Rahmen von Computer Vision Aufgaben zum Einsatz kommt. Des Weiteren handelt es sich bei der genutzten Trainingsroutine um sog. Transfer-Learning, worin auf ein vortrainiertes Modell zugegriffen wird. Beim Transfer-Learning muss das zuvor trainierte Modell nicht erneut vollständig trainiert werden, da nur eine Anpassung der letzten Ebenen während des Trainings erforderlich ist. Zusätzlich findet eine weitere Verbesserung des Modells durch Fine Tuning des bereits auf dem ImageNet-Datensatz vortrainierten Zustands statt. Das Modell wird geladen, und seine letzte vollständig verknüpfte Ebene geändert, um die Anzahl der Klassen der Fragestellung zu berücksichtigen. Nach dieser Anpassung lernt das Modell, die spezifischen Klassen des untersuchten Datensatzes zu erkennen. Das Deep-Learning-Skript ist dem Anhang zu entnehmen.

Der Deep-Learning-Ansatz zur Klassifizierung wurde in zwei Stufen durchgeführt. In Stufe 1 wurden 99 bearbeitete Bilder für das Training verwendet. In Stufe 2 wurde die Anzahl der Bilder auf 202 erhöht und die Nachbearbeitung der Bilder reduziert. Eine Auflistung der untersuchten Sphäroide in der ersten Klassifizierung ist Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Übersicht der untersuchten Sphäroid-Zellkulturen innerhalb der ersten Klassifizierung mittels Deep-Learning.

| Zelllinie | Set | Wirkdauer Cisplatin |
|-----------|-----|---------------------|
| 11B | 1 | unbehandelt |
| 11B | 1 | 72 h |
| 14C | 1 | unbehandelt |
| 14C | 1 | 72 h |

Die Hyperparameter der Klassifizierung waren:

- Learning rate 0,001
- Momentum 0,8
- Step size 8
- Gamma 0,1
- Epochs 40

Hiermit wurden Bilder nach Bearbeitung gemäß Bildbearbeitungssequenz 1 durch das Deep Learning Modell klassifiziert. Die Klassifizierung kann anhand der Genauigkeit des Trainings und der Validierung sowie der Verlustfunktion des Trainings und der Validierung bewertet werden. In Abbildung 83 sind die Verläufe der Verluste und Genauigkeiten als Funktion der Epochen dargestellt.

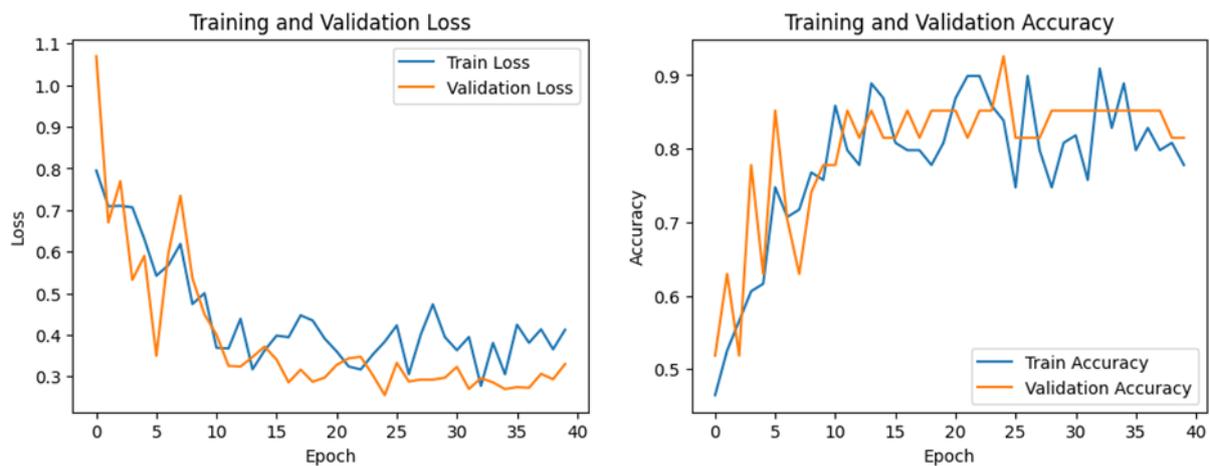


Abbildung 83: Verlauf der Fehlerresiduen (links) und Genauigkeiten (rechts) des Deep-Learning-Modells zur Klassifizierung von Sphäroiden in unbehandelt und Cisplatin behandelt bei zunehmender Epochenzahl. Alle Bilder wurden vor Training und Klassifizierung gemäß Sequenz 1 (vgl. Tabelle 15) bearbeitet.

Die zugehörige Confusion Matrix ist in Abbildung 84 dargestellt.

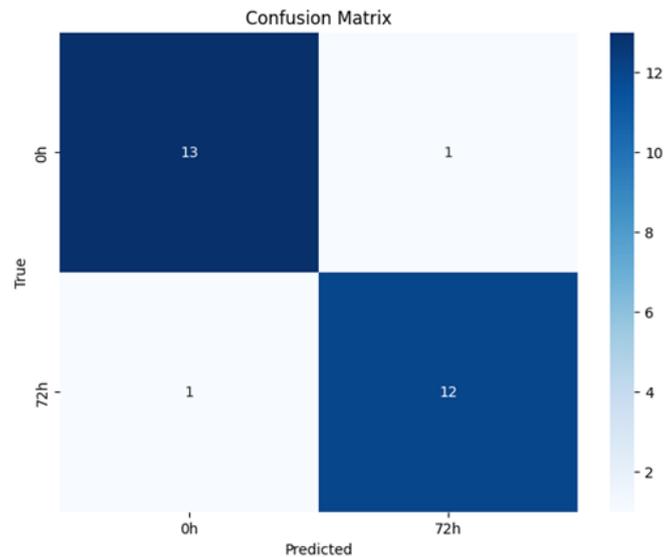


Abbildung 84: Confusion Matrix der Klassifizierung von Monokultur-Sphäroid-Schnittbildern der Zelltypen 11B und 14C in die Kategorien unbehandelt (0 h) und Cisplatin behandelt (72 h). Das Training und die anschließende Klassifizierung basieren auf Bildern die entsprechend Sequenz 1 (vgl. Tabelle 15) bearbeitet wurden.

Wie in Abbildung 84 dargestellt erreicht das Modell True Positive von 13 und False Positive von 1, sowie True Negative für 12 und False Negative von 1.

In einem weiterführenden Anwendungstest des Deep-Learning-Modells erfolgte das Training anhand von Bildern deren Bearbeitung nur die Hintergrundsubtraktion beinhaltet (vgl. Tabelle 15, Tabelle 16, und Tabelle 17). Hier wurde die Gesamtanzahl der verwendeten Bilder für das Training, die Validierung und die Klassifizierung auf insgesamt 520 erhöht. Die Hyperparameter blieben unverändert zum vorherigen Anwendungstest. Die untersuchten Sphäroide sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Übersicht der untersuchten Sphäroid-Zellkulturen innerhalb der zweiten Klassifizierung mittels Deep Learning.

| Zelllinie /- | Set /- | Wirkdauer Cisplatin /h |
|--------------|--------|------------------------|
| 11B | 1 | unbehandelt |
| 11B | 1 | 72 |
| 11B | 3 | unbehandelt |
| 11B | 3 | 72 |
| 14C | 1 | Unbehandelt |
| 14C | 2 | Unbehandelt |
| 14C | 1 | 72 |

Analog zum ersten Anwendungstest wird die Klassifizierung anhand der Genauigkeit und der Verlustfunktion bewertet, welche in Abbildung 85 dargestellt sind.

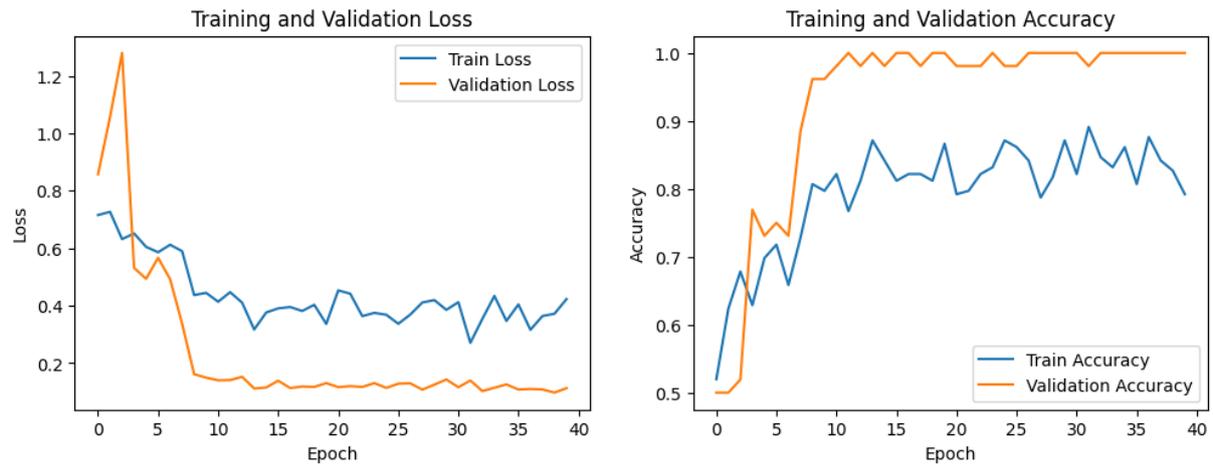


Abbildung 85: Verlauf der Verlustfunktion (links) und Genauigkeiten (rechts) des Deep Learning Modells zur Klassifizierung von Sphäroiden in unbehandelt und Cisplatin behandelt bei zunehmender Epochenzahl. Alle Bilder wurden vor Training und Klassifizierung in reduziertem Umfang bearbeitet (vgl. Tabelle 15 bis einschließlich Schritt 1 von 5).

Die zugehörige Confusion Matrix ist in Abbildung 86 dargestellt.

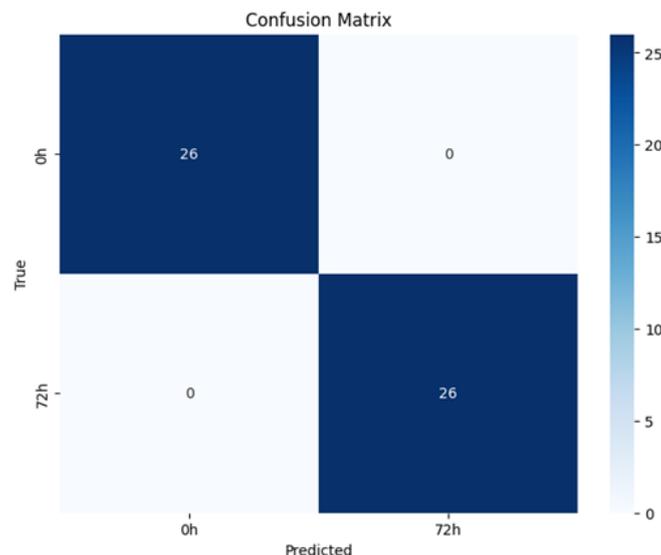


Abbildung 86: Confusion Matrix der Klassifizierung von Monokultur-Sphäroiden der Zelltypen 11B und 14C in die Kategorien unbehandelt (0 h) und Cisplatin behandelt (72 h). Das Training und die Klassifizierung basieren auf Bildern die entsprechend Sequenz 1 oder 2 in reduziertem Umfang bearbeitet wurden (vgl. Tabelle 15 bis einschließlich Schritt 1 von 5).

In der zweiten Klassifizierung per Deep Learning erreicht das trainierte Modell eine korrekte Klassifizierung aller Bilder. Deep-Learning-Algorithmen sind am effektivsten bei großen, diversen Datensätzen. Für die initiale Evaluierungsuntersuchung der Algorithmen waren insgesamt 252 Bilder der Monokultur-Modelle 11B und 14C vorhanden. Hinsichtlich dieser Einschränkung erreichte das Modell im ersten Klassifizierungsversuch eine Validierungsgenauigkeit von 85 % (vgl. Abbildung 83) und im zweiten Klassifizierungsversuch eine Validierungsgenauigkeit von 100 % (vgl. Abbildung 85).

Eine weitere Validierung mit größeren und vielfältigeren Datensätzen ist erforderlich, um die Robustheit und Verallgemeinerbarkeit des Modells sicherzustellen. Die Modelle zeigen anhand der verfügbaren Daten prinzipiell die Fähigkeit die Bedingungen bekannter Daten in hohem Maße zu replizieren.

4 DISKUSSION

Das folgende Kapitel bewertet die entwickelten optischen Sensorkonzepte. Das übergeordnete Ziel war ein Konzept zu erarbeiten und realisieren, um 3D-Zellkulturen räumlich durch inhärente, orts aufgelöst molekülspezifische Eigenschaften darzustellen. Anhand der zugehörigen Messergebnisse werden die Leistungsfähigkeit und das Anwendungspotenzial der unterschiedlichen Kombinationen von Detektionsoptiken und Messsonden diskutiert. Hierbei werden Vor- und Nachteile der Messsysteme gegenübergestellt, deren Grenzen betrachtet und Empfehlungen zur weiteren Optimierung gegeben. Der aufeinander aufbauende wissenschaftliche Erkenntnisfortschritt der Geräte wird erörtert und Messeffekte den zugrundeliegenden Merkmalen der Vergleichssysteme und der Zellstrukturen zugeordnet. Mehrere Messkonzepte wurden entwickelt und in Proof-of-Concept-Studien untersucht, um das vielseitige Anwendungspotenzial der Stokes-Streuung als Werkzeug für die Mikrobiologie zu demonstrieren. Die Detektion des Raman-Effekts wurde grundlegend bei geringen Lichtleistungen untersucht und mit einem Photometer-Konzept in statischen und dynamischen Messaufgaben validiert, um zu zeigen, dass der inhärent schwache Raman-Effekt in ausreichendem Ausmaß anregbar ist. Planerisch dienten zur Reduzierung der Anregungsleistung Kriterien des Explosionsschutzes, die Grenzwerte für die optische Leistung monochromer Lichtquellen definieren. Für die Erweiterung auf synchrone Detektion mehrerer Stokes-Banden bei photometrischer Detektorsensitivität wurde ein Spektrophotometer-Hybriddetektor entwickelt und die Integration von Mikroskopobjektiven für die orts aufgelöste Messung in mikroskaliger Umgebung bei großem Arbeitsabstand des Messkopfs getestet. Durch die gezielte Anpassung von kritischen Komponenten des Hybriddetektors konnte eine Verbesserung der spektralen Auflösung diskreter Messkanäle erreicht werden, um die Teilüberlagerung spektraler Informationen zu beseitigen. Zudem wurde hierbei eine weitere Reduzierung der Anregungsleistung auf 1 mW apparativ umgesetzt. Letztendlich mündeten die gesammelten Erkenntnisse der photometrischen und spektrophotometrischen Raman-Studien in einem Mikroskop-Konzept, das zur bildgebenden Detektion ausgewählter Raman-Banden eine Lichtscheibenbeleuchtung mit spektral hoch aufgelöster, stufenlos durchstimmbarer, mechanisch reibungsfreier, optischer Filtertechnik kombiniert und durch eine für das Gerät optimierte Probenhalterung ergänzt wird.

4.1 Untersuchung des Raman-Effekts bei geringer Anregungsleistung der Probenbeleuchtung

Die Konzeption und der Bau des Raman-Photometers zur Untersuchung der Detektion inelastischer Lichtstreuung bei reduzierter Anregungsleistung wurde erfolgreich umgesetzt. Die Auswahl der Messungen ergab sich aus einer Schnittmenge von häufig vorkommenden Messaufgaben in der chemischen Industrie und der Eignung für den Einsatz eines Raman-Photometers. Der Einsatz von Photometern ist nur dann möglich, wenn die zu untersuchenden Spektren nicht zu komplex und die einzelnen Zielmoleküle in der Spektralanalyse eindeutig unterschiedlich sind. Darüber hinaus bieten Photometer die Möglichkeit, mit deutlich reduzierten Laserleistungen gute Signal-Rausch-Verhältnisse zu erzielen.

Das vorgestellte Raman-Photometer hat gegenüber Spektrometern und dementsprechend virtuellen Photometern Vorteile hinsichtlich der Empfindlichkeit und folglich der benötigten Anregungsleistung, der Echtzeitüberwachung und der Anwendbarkeit an empfindlichen Probenmaterial sowie in explosionsgefährdeten Bereichen. Allerdings werden auch gewisse Nachteile gesehen: Bei einer spektralen Auflösung von 80 cm^{-1} müssen für diese Breite im Raman-Spektrum spezifische Analyt-Peaks isoliert werden, um für eine photometrische Detektion in Frage zu kommen. Außerdem können bei dem derzeitigen Aufbau mit einem Referenzkanal Steigungen in der Basislinie, die z. B. durch Fluoreszenz verursacht werden, nicht berücksichtigt werden, was sich negativ auf Nachweisgrenzen auswirken könnte. Ein Spektrometer kann viel allgemeiner eingesetzt werden und eignet sich besser für die Erkennung gebündelter Raman-Peaks. Der Eingangsspalt des Spektrometers und die CCD-Detektion (Charge-Coupled Device) bestimmen den Photonenfluss und damit die Nachweisempfindlichkeit des Systems. Der Spalt bildet einen Engpass - ein größerer Spalt erhöht den Photonenfluss, verringert aber auch die spektrale Auflösung⁵⁶. Mit einem Photometer können Detektionsfasern bis in den Millimeter-Bereich vollständig auf großflächigen Detektoren abgebildet werden, ohne die Auflösung zu verringern.

Der Entwurf und die Umsetzung eines Raman-Photometers ist auch für die Bewertung der grundlegenden Einsatztauglichkeit in biomedizinischer Forschung von Bedeutung, insbesondere hinsichtlich der Strahlungsexposition von biologischem Probenmaterial wie Zellkulturen und Gewebemodellen. Die sorgfältige Einhaltung der Ex-d-Normen stellt sicher, dass das Photometer nicht nur robust in seinen Fähigkeiten, sondern auch inhärent sicher für strahlungs-dosiskritische Anwendungen ist. Über die unmittelbare

Anwendung in der chemischen Industrie hinaus dient die Ex-d-Konformität somit als Ausgangspunkt für die Minimierung der Anregungsleistung, die prinzipiell zur Erhöhung der Effektausbeute der Raman-Streuung maximiert werden sollte, um photochemische oder thermische Schäden in Zellkulturen zu vermeiden. Die Betonung von Probenintegrität und Präzision bei der anfänglichen Konstruktion wird zu einem grundlegenden Element für nachfolgende Untersuchungen. Dieses schrittweise Vorgehen unterstreicht die entscheidende Rolle technischer Grundüberlegungen bei der Umsetzung und Integration von Raman-Messungen in die komplexe Landschaft der biomedizinischen Forschungsmethoden. Die iterative Weiterentwicklung der Anregungs- und Detektionskonzepte ermöglicht ein tieferes Verständnis von Anwendungspotenzial und Grenzen des Raman-Effekts. Die maßgebliche funktionelle Einschränkung der Photometer-Optik für komplexere Messaufgaben ist die Anzahl der Messkanäle und die entsprechende Limitierung spektraler Informationen, weswegen der Funktionsumfang auf eine spektrophotometrische Hybridform erweitert wurde.

4.2 Untersuchung von lokalen Konzentrationsprofilen einer zweiphasigen Strömung mit einer Mikroskop-Objektiv-Sonde in Kombination mit spektrophotometrischer Raman-Detektion

Der vorgestellte Prototyp eines spektrophotometrischen Raman-Scanners mit hoher Ortsauflösung wurde durch die Überwachung von Mischprozessen des ternären Systems Toluol-Wasser-Aceton in einem Mikrokanal validiert. Es handelt sich hierbei sowohl um eine Orts- als auch eine Zeitaufgelöste spektrale Überwachung. Die Extraktion von Toluol aus Aceton ausgehend von einer Anfangskonzentration von 25 Vol.-% wurde als Funktion des Volumenstroms bzw. der Verweilzeit in einem T-Mikrokanalmischer untersucht. Die untersuchten Volumenströme lagen zwischen 0,1 ml/min und 0,006 ml/min. Die entsprechenden Verweilzeiten im Mikrokanal bis zum Erreichen des Messpunktes umfassen 1,5 bis 25 Sekunden. Die entwickelte spektrophotometrische Detektionslösung ist mit einer Integrationszeit von 10 ms im Vergleich zur konventionellen, spektrometrischen Messung wesentlich schneller. Die Methode isoliert einen einzelnen Raman-Peak, der spezifisch für Aceton ist, und einen Referenzabschnitt in unmittelbarer Nähe des spektralen Zielbereichs für die Signalverarbeitung. Sowohl Toluol als auch Wasser zeigen im angegebenen Zielbereich keine Raman-Aktivität. Das System erreicht durch den Einsatz von Mikroskopobjektiven ein Messvolumen von $1,35 \cdot 10^{-7}$ ml mit einem Arbeitsabstand der koaxialen Anregung und Detektion von 20

mm. Eine klare Unterscheidung der nicht mischbaren Phasen ist bereits bei Durchflussraten von 0,02 ml/min zu erkennen.

Messartefakte in Abbildung 49 bis Abbildung 51 sind darauf zurückzuführen, dass der fokussierte Laser an den Phasengrenzen gebrochen wird. Dies hat eine Vergrößerung des Brennpunktvolumens zur Folge, da der Laserstrahl an der Phasengrenze nicht senkrecht, sondern schräg in den Tropfen eintritt. Die Artefakte treten als Ausreißer in den Messserien nur auf einer Seite des Tropfens auf, da die Grenzfläche beim Durchgang durch den Brennpunkt wie eine Streulinse und dann wie eine Sammellinse wirkt. Der Einfluss der Grenzfläche kann prinzipiell durch den Einsatz von Hilfsstoffen, die die Brechungsindizes beider Phasen einander angleichen entfernt werden. In Hinblick auf die Anwendung örtlich hochaufgelöster Messungen von Zellkulturen ist jedoch ein ähnlicher Effekt an den Zellmembranen möglich, weswegen der Matrixeinfluss hier als Vergleichssystem für Störeinflüsse diene. Zudem kann dieses Phänomen in der kontrollierten Umgebung des Mikrokanals einfach identifiziert und vernachlässigt werden, da es keine reale Acetonkonzentration darstellt und daher in den Vergleichsdaten nicht berücksichtigt wird.

Die experimentellen Daten zeigen die Machbarkeit und das Potenzial des Messsystems, räumlich und zeitlich aufgelöste Konzentrationsprofile in bewegten Fluiden zu erfassen, ohne deren Strömung zu beeinflussen. Der Mischprozess zeigt sich eindeutig im fortschreitenden Übergang von Aceton aus der Toluolphase in die Wasserphase mit zunehmender Verweilzeit im Mikrokanal. Bei 0,006 ml/min wird eine konstante Acetonkonzentration von etwa 12,6 % gemessen, was darauf hindeutet, dass der Mischprozess das Gleichgewicht des Systems bei 12,5 % praktisch erreicht hat. Dies äußert sich in einer konstanten, durchschnittliche Acetonkonzentration in beiden Lösungsmittephasen (vgl. Abbildung 53), sodass die Tröpfchenkonzentration spektral nicht mehr unterscheidbar ist. Dieser Trend zeigt die Diffusion von Aceton aus der Toluol- in die Wasserphase bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes. Alle durchschnittlichen Konzentrationsdaten werden durch die Signalschwankung begrenzt, die in der Standardabweichung berücksichtigt wird. Der Standardfehler wird aus der Standardabweichung und der Anzahl der Messpunkte berechnet und ist Abbildung 53 zu entnehmen.

Im Vergleich der konkaven und konvexen Phasengrenzflächen (in Bezug auf die Strömungsrichtung), zeigen die Messdaten einen höheren Aceton-Konzentrationsunterschied der Phasen an der Vorderseite der Tropfen als an der Rückseite. Dies deutet

auf unterschiedliche Aceton-Massentransferraten an den beiden Stellen des Tropfens hin, wie in Abbildung 50 zu sehen ist. Zum Benchmarking des entwickelten Spektrophotometers wurden Vergleichsmessungen mit einem handelsüblichen Raman-Spektrometer (RXN1, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA) durchgeführt. Die gemessenen Zählraten des Prototyps übertreffen die des Spektrometers um mindestens eine Größenordnung. Der Schwerpunkt des spektrophotometrischen Raman-Messsystems liegt auf der schnellen Messrate von 100 Datenpunkten pro Sekunde bei hoher räumlicher Auflösung. Die Trends der Signalintensität zeigen, dass die lokale Konzentrationsverteilung innerhalb der Tropfen ungleich ist. Außerdem wurde mithilfe des Spektrophotometers der diffusionsgetriebene Stoffaustausch von Aceton aus Toluol in Wasser in einer Küvette als molekülspezifisches Raman-Bild dargestellt und die grundlegende Tauglichkeit der Stokes-Raman-Streuung für die Bildgebung gezeigt. Hierbei wurde die Intensität der spektralen Information als Farbverlauf mit den Koordinaten der Verfahrenheit verrechnet um zusammenhängende Bildpunkte darzustellen.

Die hohe räumliche und zeitliche Auflösung werden in der Effektanregung durch die Reduzierung der Anregungswellenlänge, und in der Detektion durch die spektrale Bandbreite der Glasfaserkanäle von 300 cm^{-1} umgesetzt. Hierin liegen jedoch auch die Grenzen des Systems: Signalbanden in unmittelbarer Nähe zueinander im Spektrum werden entsprechend der Auflösung in einem nicht voneinander trennbarem Rohsignal erfasst. Die Konsequenz ist, dass auch hier eine Anwendung auf komplexere Messaufgaben nur eingeschränkt möglich ist. Auch die Anregungswellenlänge muss kritisch betrachtet werden. Zwar erlaubt die Nutzung von 532 nm aufgrund der umgekehrten Proportionalität des Raman-Effekts zur Anregungswellenlänge eine Erhöhung der Effektausbeute um den Faktor 4,74 im Vergleich zur konventionellen Anregung bei 785 nm, andererseits wird auch die Anregung von Fluoreszenz begünstigt. Die hohe Signalintensität des Fluoreszenz-Hintergrundsignals kann dann effektiv zu einer Auslöschung des Raman-Signals führen, ein Umstand der durch die Detektion breiter Spektralbereich weiter begünstigt wird. In dem gemessenen Modellsystem wurde ein Fluoreszenzeinfluss auf die Messung durch die Wahl der Chemikalien und die verwendeten Konstruktionsmaterialien des Mikrokanals ausgeschlossen. Zwar kann die Auswahl des Konstruktionsmaterial der Messumgebung prinzipiell an die Messaufgabe angepasst werden, die spektrale Auflösung verbleibt jedoch als Einschränkung hinsichtlich der Anwendbarkeit des Spektrophotometers zur Vermessung von Zellkulturen. Dementsprechend ist das System die Plattform für die weiterführende Anpassung

als spektral hochauflösendes, synchrones Detektionskonzept. Die parallelen und spektral differenzierten Nachweisfähigkeiten dieses Prototyps, unterstreichen die Notwendigkeit, von der photometrischen Detektion zur spektrophotometrischen Detektion überzugehen, hierbei aber die hohe photometrische Nachweisempfindlichkeit zu erhalten.

4.3 Erhöhung der spektralen Auflösung von spektrophotometrischer Raman Detektion

Die abschließende Iteration des Raman-Spektrophotometers adressiert die Erkenntnisse vorheriger Versionen des Hybridbaus und reevaluiert Ansätze des initialen Photometerkonzepts. Hierbei ist eine Verbesserung der spektralen Auflösung parallel erfassbarer Detektionskanäle mit photometrischer Sensitivität bei Reduzierung der Anregungsleistung umgesetzt worden. Der Anwendungsfall für die Validierung ist die Messung von Signalkorrelationen diskreter Konzentrationsstufen von Ammoniumnitrat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Di-Kaliumsulfat und Ethanol, als binäre Mischungen mit VE-Wasser. Im untersuchten Konzentrationsbereich von Ammoniumnitrat waren Konzentrationsunterschiede ab 86,8 mmol/l messbar, bei Natriumphosphat 43,7 mmol/l, bei Kaliumsulfat 28,7 mmol/l, und bei Ethanol 382,6 mmol/l. Niedrige Integrationszeiten von 100 ms wurden durch die Verwendung hochempfindlicher CPMs erreicht. Durch die Überlagerung des Faserarrays mit einer Spaltblende konnte die spektrale Auflösung auf Kosten einer geringeren Signalintensität erhöht werden. Im Allgemeinen führte diese Kombination zu zwei optionalen Geräteausführungen. Die erste Variante mit freiem Faserarray hat ein vergleichsweise geringes spektrales Auflösungsvermögen von 300 cm^{-1} bei hohen Signalintensitäten, was für breite Raman-Peaks bzw. Messbereiche geeignet ist. Bei der zweiten Variante mit Spaltblende wird ein hohes Auflösungsvermögen von 50 cm^{-1} mit funktional vollständiger Trennung aller Detektionskanäle bei niedrigen Signalintensitäten erreicht. Die Parameter Auflösung und Signalintensität können über die Spaltbreite variiert werden. Durch den flexiblen Aufbau können unterschiedliche Messziele verfolgt werden. Die Spaltblende ist eine modulare Erweiterung des Spektrophotometers, um die höchstmögliche Vielseitigkeit zu gewährleisten.

Die Messungen der binären Gemische zeigen eine hohe lineare Korrelation zwischen Konzentration und Signalintensität, wobei Pearson-Koeffizienten zwischen $R^2 = 0,9652$ und $R^2 = 0,9991$ für Kaliumsulfat bzw. Ammoniumnitrat erreicht werden.

Die untersuchten Konzentrationsbereiche bewegten sich zwischen 1 Gew.-% und knapp unterhalb der jeweiligen Löslichkeitsgrenzen der Salze und Wasser bzw. Reinstoffen im Fall von Ethanol und Wasser. Die kleinsten untersuchten Konzentrationen waren dementsprechend 125,9 mmol/l Ammoniumnitrat, 70,6 mmol/l Natriumphosphat, 57,7 mmol/l Kaliumsulfat, und 219,1 mmol/l Ethanol.

Diese Iteration des Hybriddetektors wurde des Weiteren genutzt um die Detektion des Stokes-Raman-Effekts bei weiterer Reduzierung der Anregungsleistung zu untersuchen. In Messungen mit 1 mW optischer Leistung von Ammoniumnitrat und Kaliumsulfat wurden Pearson-Koeffizienten von $R^2 = 0,9452$ und $R^2 = 0,9551$ erreicht. Die messbaren Konzentrationsunterschiede waren hierbei 180,0 mmol/l für Ammoniumnitrat und 27,1 mmol/l für Kaliumsulfat. Bei einer Reduzierung der Laserleistung um den Faktor 100 war lediglich eine Erhöhung der Integrationszeit um den Faktor 6 erforderlich. Insbesondere hinsichtlich der Untersuchung von Zellkulturen durch die Beleuchtung mit monochromatischer Strahlung ist die größtmögliche Reduzierung der optischen Leistung von entscheidender Bedeutung. Ferner kann das vorgestellte System dadurch auch in explosionsgefährdeten Bereichen eingesetzt werden. Andererseits kann das System aufgrund der geringen Integrationszeiten und der hohen Empfindlichkeiten bei hoher Laserleistung prinzipiell auch in kontinuierlichen Prozessen eingesetzt werden.

Die anhand der entwickelten Varianten photometrischer Detektoren und spektrophotometrischer Hybridsysteme durchgeführten Konzentrationsmessungen liefern Einblicke in die analytischen Möglichkeiten der Raman-Techniken. Das detaillierte Verständnis der Konzentrationsmessung, hinsichtlich Linearität und Nachweisempfindlichkeit insbesondere bei geringen Anregungsleistungen, ist für den Übergang zur Mikroskopie von grundlegender Bedeutung. Die gesammelten Erkenntnisse dienen als Voraussetzung für die Aufgabe der Erstellung von molekulspezifischen 3D-Karten in biologischen Systemen. Die verschiedenen Modellmessaufgaben wie die Verfolgung von Misch- und Reaktionsprozessen bilden eine Sammlung an Referenzinformationen, die die Interpretation stark variabler Umstände hinsichtlich der komplexen molekularen und strukturellen Zusammensetzung und der eingeschränkten Vorhersehbarkeit der Sphäroide ermöglicht. Der Übergang von räumlich ein- und zweidimensionaler Konzentrationsüberwachung zur 3D-Bildgebung erfordert diese spektralen Grundlagen, und die aus den Vorstudien gewonnenen apparativen Erkenntnisse.

4.4 Multimodale Lichtscheiben-Mikroskopie

Der Nachweis des Konzepts des Lichtscheibenmikroskop-Prototyps mit den Bildgebungsmodalitäten Rayleigh-Streuung, Raman-Streuung und Fluoreszenz zur Erstellung von molekülspezifischen 3D-Karten wurde in der Untersuchung von Fibroblasten-HT29-Sphäroiden erbracht.

Die Effekt-anregenden Laser mit Emissionswellenlängen 660 nm und 785 nm sind in der Lage Sphäroide optisch zu schneiden, und somit Bildstapel zu erstellen. Beide Laser erzeugen Lichtscheibentaillen von jeweils ca. 8 μm Dicke, was folglich die axiale Auflösung des Mikroskops mit 8 μm definiert. Die laterale Auflösung von 630 nm pro Pixel wurde mittels Bildgebung monodisperser, sphärischer PMMA Partikel mit Durchmessern von 100 μm gemessen. Die laterale Auflösung ist also um ca. das 12,7-fache höher als die axiale Auflösung. Dieses Verhältnis muss während der Stapelbildung optischer Schnittbilder zur Erstellung von 3D-Modellen berücksichtigt werden. Dennoch ermöglichen die Abmessungen der Lichtscheiben die zuverlässige Abbildung von Sphäroiden mit Durchmessern von mehreren 100 μm sowie die anschließende Rekonstruktion als 3D-Modell. Hierbei definiert die Lichtscheibentaille auch die minimale Schrittweite der Schnitt-Achse (Z-Achse) des Positionierungssystems der Proben.

Die mittlere gemessene Schrittweite aller Linearachsen des Positionierungssystems von 1,5 μm wurde mit einer Verfahrensgenauigkeit von ± 450 nm verifiziert. In Bezug auf die Lichtscheibendicke von 8 μm , die den Mindestabstand optischer Schnitte begrenzt, sodass keine Überlappung der Bildebenen stattfindet, entspricht dies einer Genauigkeit von 5,63 %. Damit können Interessenregionen der Sphäroide gezielt mit hoher Wiederholgenauigkeit positioniert werden.

Auch die Stabilität bei wiederholter Bildaufnahme wurde untersucht. Die Bildserien zeigen, dass die Pixelintensitäten eine relative Schwankungsbreite von $\pm 5,39$ % bei der Raman-Bildgebung sowie relative Schwankungsbreiten von $\pm 6,95$ % während der Rayleigh-Bildgebung mit 785 nm Emissionswellenlänge und $\pm 8,84$ % mit Emissionswellenlänge 660 nm haben. Die geringe Abhängigkeit von der Beleuchtungsintensität und Wellenlänge zeigt, dass auch eine hohe Stabilität dieses Geräteparameters gewährleistet ist. Es ist also sichergestellt, dass mehrere Bilder an der gleichen Probenposition die gleiche Aussagekraft aufweisen und Schnittebenen mit hoher Genauigkeit mehrfach angefahren werden können. Somit ist die Funktionsgrundlage für nachfolgende Bildverarbeitungsmethoden zur Extraktion weiterer Information, wie Stapelbildung, gesichert.

Die spektralen Scan-Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Kontrastmodalitäten einen unterschiedlichen Informationsgehalt liefern. Die Anregung des Raman-Effekts ermöglicht eine markierungsfreie Bildgebung im Hochfrequenzbereich des Raman-Spektrums. Die beobachtete Eindringtiefe bei der Bildgebung mittels Stokes-Raman-Shift beträgt ca. 70 μm und verschlechtert sich in axialer Richtung entlang der Schnittachse, wenn Sphäroide in Bereichen mit zunehmenden Durchmessern optisch geschnitten werden. Dies ist auf eine erhöhte Absorption der Raman-Photonen im Inneren des Sphäroids zurückzuführen, was Sphäroiden in diesen Schnittebenen ein kreisringförmiges Erscheinungsbild um ein scheinbar leeres Zentrum gibt. Es kommt also zu einer Selbstverschattung durch das Sphäroidvolumen in Bildebenen mit zunehmender Entfernung vom Detektionsobjektiv. Prinzipiell kann dieses Problem durch die Rotation des Sphäroids um 180° adressiert werden, was durch den selbst entwickelten Probenhalter mit fenestrierter Rückwand möglich ist. Die aus der Draq5-Fluoreszenz gewonnenen optischen Schnittbilder zeigen ähnliche Details wie die Raman-Bilder. Im Vergleich zum Raman-Effekt wird das Fluoreszenzsignal allerdings in deutlich geringerem Ausmaß durch die axial auftretende, verringerte Eindringtiefe beeinträchtigt.

Ein Raman-Spektrometer vom Typ Multispec® (tec5 AG, Steinbach, Deutschland) wird zur Validierung von Raman-Schnittbildern durch Aufnahme der zugehörigen Spektraldaten verwendet. Im Vergleich der Spektraldaten von Raman- und Fluoreszenzbildern erscheinen die Peak-Positionen beider Kontrastmodalitäten zunächst nahezu identisch, bei lediglich unterschiedlichen Signalintensitäten. Es muss hier jedoch berücksichtigt werden, dass das Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs Draq5 660 nm bis 820 nm bzw. 0 cm^{-1} bis 2956 cm^{-1} umfasst und damit praktisch das gesamte Raman-Spektrum überlagert. Folglich isoliert die Bandbreite des AOTF einen Bereich des Emissionsspektrums, was zu scheinbar identischen Peak-Positionen führt. Dies bedeutet auch, dass es nach der Färbung unmöglich ist, Fluoreszenz- und Raman-Signale zu unterscheiden. Der Fluoreszenzfarbstoff Draq5 wurde hierbei ausgewählt, um zu zeigen, dass Raman-Messungen grundlegend eine Methode darstellen, die eine zuverlässige Darstellung von Zellstrukturen ermöglicht, welche üblicherweise mit Farbstoffen markiert werden und vergleichbare Ergebnisse liefert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Raman-basierte Lichtscheibenbildung von 3D-Zellkulturen ist ein aufstrebendes Forschungsgebiet, das durch die Entwicklung hochwertiger, anwendungsspezifisch maßgeschneiderter Messkonzepte vorangetrieben wird. Der Raman-Effekt bietet einen markierungsfreien Einblick in die molekulare Zusammensetzung von Proben, wie z.B. 3D-Zellkulturen und ermöglicht damit grundsätzlich eine zerstörungsfreie, minimalinvasive Beobachtung dreidimensionaler Zellverbände. Der in dieser Arbeit beschriebene multimodale Mikroskop-Prototyp wird zusätzlich durch hochauflösende räumliche Informationen aus der Rayleigh-Streuung ergänzt. Die Fluoreszenzmarkierung von Zellkernen ermöglicht zudem den Vergleich mit etablierten Bildgebungsverfahren. Die Herausforderung bei der Geräteentwicklung liegt in der extrem schwachen Signalstärke der Raman-Streuung, die um mehrere Größenordnungen geringer ist als Fluoreszenzeffekte, und die ihrerseits hundert- bis tausendmal schwächer ist als elastische Rayleigh-Lichtstreuung^{57,58}. Um diese Herausforderungen zu bewältigen, wurde ein spezieller Aufbau mit wellenlängenselektiver Bilddetektion entwickelt, der eine umfassende Kartierung von definierten Schnittebenen innerhalb der Zellkultur für eng umschriebene, frei auswählbare Spektralbereiche ermöglicht. Die Erhöhung der optischen Ausgangsleistung und die Verringerung der Wellenlänge des Anregungslasers sind zwei Parameter, die die Signalintensität erhöhen, wobei jedoch sorgfältig darauf geachtet werden muss, dass die Zellproben durch erhöhte Strahlungsexposition nicht gefährdet werden. Die Geräteparameter Anregungsleistung, Emissionswellenlänge, und Integrationszeit wurden anhand mehreren eigens hierfür entwickelten photometrischen und spektrophotometrische Gerätekonzepten an unterschiedlichen Testanalyten isoliert untersucht. So war es zunächst möglich mit der Emissionswellenlänge 785 nm die benötigte Anregungsleistung für die Detektion der Stokes-Streuung während einer Reaktionsverfolgung auf unter 35 mW zu verringern und in Verdünnungsreihen bei Emissionswellenlänge 532 nm eine weitere Verringerung auf 1 mW zu erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Erfassung von Raman-Stokes-Streuung in zweiphasigen Strömungen mit Messfrequenzen von bis zu 100 s⁻¹ bzw. Integrationszeiten von 10 ms diffusionsgetriebene molekulare Konzentrationsunterschiede bis hin zu einem Konzentrationsgleichgewicht darstellbar sind. Ebenso war es möglich quantifizierbare Konzentrationsunterschiede ab 9,6 mmol/l bei Reduzierung der Anregungsleistung auf 1 mW zu messen. Außerdem konnten in Voruntersuchungen bereits erste

Raman-basierte, molekulspezifische Bilder aus Punktraster-Messreihen rekonstruiert werden.

Um ein breites Spektrum an Molekülen zu erfassen, werden zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen im Mikroskop integriert und abwechselnd betrieben. Die Wellenlängenverschiebung ermöglicht die Erfassung breiter Spektralbereiche, wobei unterschiedliche bildgebende Modalitäten anschließend zusammengeführt werden.

Um die Arbeitsabläufe während der Bildgebung zu optimieren und die Anwenderfreundlichkeit des Mikroskops weiter zu verbessern, wurde ein innovativer Probenhalter zur Einbettung der Sphäroidproben in Hydrogelen entwickelt, der die Probenvorbereitung vereinfacht und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der räumlichen Positionierung maximiert. Darüber hinaus kann der Probenhalter durch kosteneffizientes 3D-Drucken individuell an die Sphäroid-Durchmesser angepasst werden. Die deckungsgleich realisierten Lichtscheiben ergeben ein Bildfeld von $635\ \mu\text{m} \times 635\ \mu\text{m}$ in welchem Bildgebung auf zellulärer Ebene möglich ist. Somit bietet das Mikroskop die funktionelle Eignung eine Vielzahl von 3D-Zellmodellen bildgebend darzustellen.

Acousto-optic tunable filter (AOTFs) ermöglichen eine rasche, stufenlose Auswahl von Spektralbereichen und damit die Aufnahme von Bildern mit verschiedenen Wellenlängeninformationen in schneller Abfolge. Die Geschwindigkeit der Bilderfassung wird durch die Empfindlichkeit der Kamera begrenzt, und es werden Anstrengungen unternommen, die derzeitigen technischen Möglichkeiten voll auszuschöpfen. Gegenwärtig ist eine hochempfindliche 16-Bit-Kamera ORCA Flash 4.0 LT+ installiert, aber künftige Anwendungen könnten den Einsatz von Bildverstärkern beinhalten, um die optischen Leistungsanforderungen hinsichtlich Effektausbeute weiter zu verbessern und die schwache Raman-Signalstärke effektiver zu erfassen.

Die Wahl der Mikroskopobjektive in der Lichtscheibenmikroskopie ergibt sich aus dem gewünschten Sichtfeld⁵⁹. Ein Sichtfeld von mindestens $600 \times 600\ \mu\text{m}$ wurde angestrebt, um die Voraussetzungen zu schaffen eine möglichst große Anzahl unterschiedlicher Sphäroide untersuchen zu können. Objektive mit höherer Vergrößerung können theoretisch die optische Auflösung verbessern, um kleinere Details sichtbar zu machen. Es gibt jedoch inhärente Grenzen bei der Verbesserung der Auflösung mittels zunehmender Vergrößerung⁶⁰. Die Lichtscheibenmikroskopie unterliegt Beugungseffekten und Streuung in der Probe. Lichtbeugung tritt u.a. bei der Passage von Photonen durch kleine Aperturen auf, ein Vorgang, der auch während der Formgebung des Strahlquerschnitts zur Lichtscheibe auftritt und folglich die Auflösung anhand der

Abbe Grenze einschränkt. Eine zunehmende Vergrößerung allein kann diese Beugungseffekte nicht überwinden. Lichtstreuung innerhalb der Probe kann ebenfalls zu Unschärfe und geringerer Auflösung beitragen, insbesondere bei dickeren oder stark streuenden Proben. Außerdem muss die Unversehrtheit der Probe hinsichtlich der eingestrahlten Leistungsdichte berücksichtigt werden. Es können irreversible, verändernde Effekte auftreten, wenn die Probe zu intensivem Licht ausgesetzt wird. Eine höhere Vergrößerung verursacht in der Regel eine höhere flächenspezifische Lichtintensität in der Probe, was das Risiko strahlungsinduzierter Schäden erhöhen kann. Dies kann die Integrität der Zellen beeinträchtigen und zu Artefakten führen. Insgesamt ist die Verbesserung der optischen Auflösung durch die Verwendung von Objektiven mit höherer Vergrößerung in diesem Aufbau für die Detektion des Raman-Effekts eingeschränkt. Eine auf die Proben abgestimmte Auswahl der Vergrößerung in Verbindung mit geeigneten Beleuchtungsmethoden und Bildverarbeitung ist allerdings entscheidend, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Das entwickelte Mikroskop ermöglicht die Bildgebung von unmarkierten Molekülverbindungen zwischen 2700 cm^{-1} und 3000 cm^{-1} und liefert somit Informationen über die Verteilung von Molekülen mit einem hohen Anteil von Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen wie Nukleinsäuren. Eine Unterscheidung verschiedener Peptide, wie z. B. unterschiedlicher Kollagenarten, ist durch erweiternde Anpassungen der aktuellen Gerätekonfiguration erreichbar. Alternative Varianten der modernen Lichtscheiben-Raman-Mikrospektroskopie erlauben beispielsweise die Bestimmung von Lipideinlagerung und -verbrauch, der lokalen Zelldichte und des Wassergehalts zum Beispiel in Zebrafischembryonen oder Pilzen^{61,62}. Die Kombination von einer Lichtscheibenbeleuchtung mit elastischer Lichtstreuung und mehreren Effekten inelastischer Streuung als bildgebende Messmethoden in einem einzigen Gerät ist zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit in keinem weiteren Gerätekonzept vorhanden

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Raman-basierte Lichtscheiben-Bildgebung ein erhebliches Potenzial für die Erforschung des Verhaltens von dreidimensionalen Zelleninteraktionen basierend auf der molekularen Zusammensetzung bietet. Die Möglichkeit, dreidimensionale Zellkulturen zerstörungsfrei zu beobachten und molekulare Informationen zu erhalten, kann neue Erkenntnisse über beispielsweise Arzneimittelwirkungen, Ernährung, genetische Störungen und andere Aspekte des Zellwachstums und -stoffwechsels liefern. Insbesondere die Entwicklung von Organoiden,

dreidimensionalen gewebeartigen Strukturen, eröffnet neue Möglichkeiten zur Untersuchung komplexer Zellkulturen⁶³. Das entwickelte Mikroskop ist als Plattform hierfür bereits geeignet. Um den Funktionsumfang im Kontext komplexerer Fragestellungen auf die Detektion weiterer molekularer Schwingungen mittels inelastischer Lichtstreuung zu erweitern ist eine Ergänzung der verbauten Lasermodule um einen Laser mit 532 nm Emissionswellenlänge notwendig. Hierdurch wird aufgrund der Proportionalität des Raman-Effekts zur anregenden Wellenlänge die Effektausbeute selbst erhöht und synergistisch die Raman-Signale in Bereiche des elektromagnetischen Spektrums verschoben für die der Kamera-Chip eine höhere Sensitivität aufweist, wodurch eine Vielzahl schwächerer Raman-Peaks, die im Rahmen der Arbeit aufgrund technischer Einschränkungen unzugänglich waren, detektierbar werden. Somit kann die Spezifität des Geräts durch die Darstellung von Molekülschwingungen im Fingerprint-Bereich erhöht und die Vielseitigkeit der 3D-Zellkulturbildgebung hinsichtlich einer größeren Probenkomplexität ausgeweitet werden.

Auf diese Weise können in Zukunft z. B. Carbonsäuren unterhalb von 500 cm^{-1} und Wasserverteilungen oberhalb von 3000 cm^{-1} untersucht werden^{64,65}. Zukünftige Anwendungen könnten auch die Untersuchung von deuterierten Proben umfassen, da die Raman-Schwingungen von deuterierten Kohlenwasserstoffen zu noch höheren Wellenzahlen, etwa 4000 cm^{-1} , verschoben sind. Außerdem könnte die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix im Kontext kollagenbildender Zellen oder die Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Abläufen räumlich darstellbar werden⁶⁶.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E: Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual review of physical chemistry* 47: 555–606, 1996
2. Mikla VI, Mikla VV: *Medical imaging technology*, Amsterdam, Boston, Elsevier, 2014
3. Procházka M: *Surface-enhanced raman spectroscopy: Bioanalytical, biomolecular and medical applications*, Cham, Springer, 2016
4. Lui H, Zhao J, McLean D, Zeng H: Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer research* 72(10): 2491–500, 2012
5. Zhao J, Lui H, McLean DI, Zeng H: Integrated real-time Raman system for clinical in vivo skin analysis. *Skin research and technology official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 14(4): 484–92, 2008
6. Huang Z, Zeng H, Hamzavi I, McLean DI, Lui H: Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time in vivo skin measurements. *Optics letters* 26(22): 1782–4, 2001
7. Karabeber H, Huang R, Iacono P, Samii JM, Pitter K, Holland EC, Kircher MF: Guiding brain tumor resection using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and a hand-held Raman scanner. *ACS nano* 8(10): 9755–66, 2014
8. Ashok PC, Praveen BB, Bellini N, Riches A, Dholakia K, Herrington CS: Multi-modal approach using Raman spectroscopy and optical coherence tomography for the discrimination of colonic adenocarcinoma from normal colon. *Biomedical optics express* 4(10): 2179–86, 2013
9. Demers J-LH, Esmonde-White FWL, Esmonde-White KA, Morris MD, Pogue BW: Next-generation Raman tomography instrument for non-invasive in vivo bone imaging. *Biomedical optics express* 6(3): 793–806, 2015
10. Braun F, Schalk R, Nachtmann M, Hien A, Frank R, Beuermann T, Methner F-J, Kränzlin B, Rädle M, Gretz N: A customized multispectral needle probe combined with a virtual photometric setup for in vivo detection of Lewis lung carcinoma in an animal model. *Meas. Sci. Technol.* 30(10): 104001, 2019
11. Pully VV, Lenferink A, Otto C: Raman-fluorescence hybrid microspectroscopy of cell nuclei. *Vibrational Spectroscopy* 53(1): 12–8, 2010

12. Wagner S, Dieing T, Centeno A, Zurutuza A, Smith AD, Östling M, Kataria S, Lemme MC: Noninvasive Scanning Raman Spectroscopy and Tomography for Graphene Membrane Characterization. *Nano letters* 17(3): 1504–11, 2017
13. Lloyd WR, Agarwal S, Nigwekar SU, Esmonde-White K, Loder S, Fagan S, Goverman J, Olsen BR, Jumlongras D, Morris MD, Levi B: Raman spectroscopy for label-free identification of calciphylaxis. *Journal of biomedical optics* 20(8): 80501, 2015
14. Schulmerich MV, Cole JH, Dooley KA, Morris MD, Kreider JM, Goldstein SA, Srinivasan S, Pogue BW: Noninvasive Raman tomographic imaging of canine bone tissue. *Journal of biomedical optics* 13(2): 20506, 2008
15. Evans JW, Zawadzki RJ, Liu R, Chan JW, Lane SM, Werner JS: Optical coherence tomography and Raman spectroscopy of the ex-vivo retina. *Journal of biophotonics* 2(6-7): 398–406, 2009
16. Egawa M, Kunizawa N, Hirao T, Yamamoto T, Sakamoto K, Terui T, Tagami H: In vivo characterization of the structure and components of lesional psoriatic skin from the observation with Raman spectroscopy and optical coherence tomography: a pilot study. *Journal of dermatological science* 57(1): 66–9, 2010
17. Patil CA, Kirshnamoorthi H, Ellis DL, van Leeuwen TG, Mahadevan-Jansen A: A clinical instrument for combined raman spectroscopy-optical coherence tomography of skin cancers. *Lasers in surgery and medicine* 43(2): 143–51, 2011
18. Kallepitis C, Bergholt MS, Mazo MM, Leonardo V, Skaalure SC, Maynard SA, Stevens MM: Quantitative volumetric Raman imaging of three dimensional cell cultures. *Nature communications* 8: 14843, 2017
19. Chen X, Zhang C, Lin P, Huang K-C, Liang J, Tian J, Cheng J-X: Volumetric chemical imaging by stimulated Raman projection microscopy and tomography. *Nature communications* 8: 15117, 2017
20. Heintz A, Sold S, Wühler F, Dyckow J, Schirmer L, Beuermann T, Rädle M: Design of a Multimodal Imaging System and Its First Application to Distinguish Grey and White Matter of Brain Tissue. A Proof-of-Concept-Study. *Applied Sciences* 11(11): 4777, 2021
21. Nachtmann M, Keck SP, Braun F, Eckhardt HS, Mattolat C, Gretz N, Scholl S, Rädle M: A customized stand-alone photometric Raman sensor applicable in explosive atmospheres: a proof-of-concept study. *J. Sens. Sens. Syst.* 7(2): 543–9, 2018

22. Deuerling J, Keck S, Moelyadi I, Repke J-U, Rädle M: In-Line Analysis of Diffusion Processes in Micro Channels by Long Distance Raman Photometric Measurement Technology-A Proof of Concept Study. *Micromachines* 12(2), 2021
23. Manser S, Kommert S, Keck S, Spoor E, Rädle M: New Conceptual Study of a Portable Highly Sensitive Photometric Raman Sensor. *Sensors (Basel, Switzerland)* 22(16), 2022
24. Manser S, Keck S, Vitacolonna M, Wuehler F, Rudolf R, Raedle M: Innovative Imaging Techniques: A Conceptual Exploration of Multi-Modal Raman Light Sheet Microscopy. *Micromachines* 14(9), 2023
25. Hesse M, Bienz S, Meier H, Bigler L, Fox T: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 9th ed., Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 2016
26. Weidlein J, Dehnicke K, Müller U: *Schwingungsspektroskopie: Eine Einführung*, Stuttgart, New York, Thieme, 1982
27. Pudlas M: *Nicht invasive Diagnostik in der regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie*, Stuttgart, Fraunhofer-Verl., 2012
28. Schmidt W: *Optische Spektroskopie: Eine Einführung*, 2nd ed., Weinheim, Germany, Wiley-VCH, 2000
29. Young AT: Rayleigh scattering. *Applied optics* 20(4): 533–5, 1981
30. Bohren CF, Huffman DR: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, 1st ed., Weinheim, Wiley-VCH, 2008
31. Mishchenko MI, Hanel J, Travis LD: Light Scattering by Nonspherical Particles: Theory, Measurements, and Applications. *Meas. Sci. Technol.* 11(12): 1827, 2000
32. Seinfeld JH, Pandis SN: *Atmospheric chemistry and physics of air pollution: From air pollution to climate change*, 2nd ed., New York, John Wiley, 2006
33. Cox AJ, DeWeerd AJ, Linden J: An experiment to measure Mie and Rayleigh total scattering cross sections. *American Journal of Physics* 70(6): 620–5, 2002
34. Pully VV, Lenferink A, Otto C: Hybrid Rayleigh, Raman and two-photon excited fluorescence spectral confocal microscopy of living cells. *J Raman Spectroscopy* 41(6): 599–608, 2010
35. Di Battista D, Merino D, Zacharakis G, Loza-Alvarez P, Olarte OE: Enhanced Light Sheet Elastic Scattering Microscopy by Using a Supercontinuum Laser. *Methods and protocols* 2(3), 2019
36. Schröder G, Treiber H: *Technische Optik: Grundlagen und Anwendungen*, 11th ed., Würzburg, Vogel Buchverlag, 1974

37. Walton JH, Jenkins JD: A STUDY OF THE TERNARY SYSTEM, TOLUENE-ACETONE-WATER. *J. Am. Chem. Soc.* 45(11): 2555–9, 1923
38. Repke J-U, Wozny G: Experimental Investigations of Three-Phase Distillation in a Packed Column. *Chem. Eng. Technol.* 25(5): 513–9, 2002
39. Repke J-U, Wozny G: A Short Story of Modeling and Operation of Three-Phase Distillation in Packed Columns. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43(24): 7850–60, 2004
40. Siegert M, Stichlmair J, Repke J-U, Wozny G: Dreiphasenrektifikation in Packungskolonnen. *Chemie Ingenieur Technik* 71(8): 819–23, 1999
41. Ehrfeld W, Hessel V, Löwe H: *Microreactors: New technology for modern chemistry*, 1st ed., Weinheim, New York, Wiley-VCH, 2010
42. Adeosun JT, Lawal A: Numerical and experimental studies of mixing characteristics in a T-junction microchannel using residence-time distribution. *Chemical Engineering Science* 64(10): 2422–32, 2009
43. Medina I, Schmitt L, Kapoustina V, Scholl S, Rädle M: Untersuchung von lokalen Schichtdickenverteilungen in Fluiden mithilfe der Nahinfrarot-Bildanalyse. *Chemie Ingenieur Technik* 91(7): 1041–8, 2019
44. Delsman ER, Croon MHJM de, Elzinga GD, Cobden PD, Kramer GJ, Schouten JC: The Influence of Differences Between Microchannels on Micro Reactor Performance. *Chem. Eng. Technol.* 28(3): 367–75, 2005
45. Rinke G, Ewinger A, Kerschbaum S, Rinke M: In situ Raman spectroscopy to monitor the hydrolysis of acetal in microreactors. *Microfluid Nanofluid* 10(1): 145–53, 2011
46. Gillen G, Najarro M, Wight S, Walker M, Verkouteren J, Windsor E, Barr T, Staymates M, Urbas A: Particle Fabrication Using Inkjet Printing onto Hydrophobic Surfaces for Optimization and Calibration of Trace Contraband Detection Sensors. *Sensors (Basel, Switzerland)* 15(11): 29618–34, 2015
47. Stammeier JA, Purgstaller B, Hippler D, Mavromatis V, Dietzel M: In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation. *MethodsX* 5: 1241–50, 2018
48. Qiu J, Li X, Qi X: Raman Spectroscopic Investigation of Sulfates Using Mosaic Grating Spatial Heterodyne Raman Spectrometer. *IEEE Photonics J.* 11(5): 1–12, 2019

49. Burikov S, Dolenko T, Patsaeva S, Starokurov Y, Yuzhakov V: Raman and IR spectroscopy research on hydrogen bonding in water-ethanol systems. *Mol. Phys.* 108(18): 2427–36, 2010
50. Kubitscheck, Bloeck F: *Fluorescence Microscopy - From Principles to Biological Applications 2e*, [Place of publication not identified], John Wiley & Sons, Inc, 2017
51. Pitrone PG, Schindelin J, Stuyvenberg L, Preibisch S, Weber M, Eliceiri KW, Huisken J, Tomancak P: OpenSPIM: an open-access light-sheet microscopy platform. *Nature methods* 10(7): 598–9, 2013
52. Smith PJ, Wiltshire M, Errington RJ: DRAQ5 labeling of nuclear DNA in live and fixed cells. *Current protocols in cytometry* Chapter 7: Unit 7.25, 2004
53. Slatinskaya OV, Luneva OG, Deev LI, Orlov SN, Maksimov GV: Conformational Changes that occur in Heme and Globin upon Temperature Variations and Normobaric Hypoxia. *BIOPHYSICS* 65(2): 213–21, 2020
54. Peike C, Kaltenbach T, Weiß K-A, Koehl M: Non-destructive degradation analysis of encapsulants in PV modules by Raman Spectroscopy. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 95(7): 1686–93, 2011
55. Hill IR, Levin IW: Vibrational spectra and carbon–hydrogen stretching mode assignments for a series of n -alkyl carboxylic acids. *The Journal of Chemical Physics* 70(2): 842–51, 1979
56. Braun F, Schwolow S, Seltenreich J, Kockmann N, Röder T, Gretz N, Rädle M: Highly Sensitive Raman Spectroscopy with Low Laser Power for Fast In-Line Reaction and Multiphase Flow Monitoring. *Analytical chemistry* 88(19): 9368–74, 2016
57. Manninen S, Pitkänen T, Koikkalainen S, Paakkari T: Study of the ratio of elastic to inelastic scattering of photons. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 35(2): 93–8, 1984
58. Sivaprakasam V, Killinger DK: Effect of polarization and geometric factors on quantitative laser-induced fluorescence- to-Raman intensity ratios of water samples and a new calibration technique. *J. Opt. Soc. Am. B* 20(9): 1980, 2003
59. Weber M, Mickoleit M, Huisken J: Light sheet microscopy. *Methods in cell biology* 123: 193–215, 2014
60. Chen X, Zheng B, Liu H: Optical and digital microscopic imaging techniques and applications in pathology. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 34(1-2): 5–18, 2011

61. Siddhanta S, Paidi SK, Bushley K, Prasad R, Barman I: Exploring Morphological and Biochemical Linkages in Fungal Growth with Label-Free Light Sheet Microscopy and Raman Spectroscopy. *Chemphyschem a European journal of chemical physics and physical chemistry* 18(1): 72–8, 2017
62. Müller W, Kielhorn M, Schmitt M, Popp J, Heintzmann R: Light sheet Raman micro-spectroscopy. *Optica* 3(4): 452, 2016
63. Sun M, an Liu, Yang X, Gong J, Yu M, Yao X, Wang H, He Y: 3D Cell Culture— Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? *Advanced NanoBiomed Research* 1(5), 2021
64. Cross PC, Burnham J, Leighton PA: The Raman Spectrum and the Structure of Water. *J. Am. Chem. Soc.* 59(6): 1134–47, 1937
65. Ge´nin F, Quilès F, Burneau A: Infrared and Raman spectroscopic study of carboxylic acids in heavy water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3(6): 932–42, 2001
66. Gullekson C, Lucas L, Hewitt K, Kreplak L: Surface-sensitive Raman spectroscopy of collagen I fibrils. *Biophysical journal* 100(7): 1837–45, 2011

7 TABELLARISCHER ANHANG

Skript Salzrauschen

```
import os
import cv2
import numpy as np

def remove_noise(image_folder, subtractor_path, output_folder):

    subtractor = cv2.imread(subtractor_path, cv2.IMREAD_GRAYSCALE)

    if subtractor is None:
        print("Fehler beim Laden des Subtraktors.")
        return

    for filename in os.listdir(image_folder):
        img_path = os.path.join(image_folder, filename)
        img = cv2.imread(img_path)

        if img is None:
            print(f"Error loading {filename}.")
            continue

        gray_img = cv2.cvtColor(img, cv2.COLOR_BGR2GRAY)

        result = cv2.absdiff(gray_img, subtractor)

        diff_image_path = os.path.join(output_folder, f"diff_{filename}")
        cv2.imwrite(diff_image_path, result)

        cv2.imshow('Originalbild', img)
        cv2.imshow('Rauschen entfernt', result)
        cv2.waitKey(0)
        cv2.destroyAllWindows()

if __name__ == "__main__":
    image_folder = 'Ordner_mit_Bildern'
    subtractor_path = 'Hintergrundrauschen.jpg'
    output_folder = 'Ausgabe_Differenzbilder'

    if not os.path.exists(output_folder):
        os.makedirs(output_folder)

    remove_noise(image_folder, subtractor_path, output_folder)
```

Skript Bildbearbeitungssequenz 1

```
inputFolderPath = "Eingabeordner";
outputFolderPath = "Ausgabeordner";
list = getFileList(inputFolderPath);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        if (endsWith(list[i], ".tiff") || endsWith(list[i], ".tif")) {
            open(inputFolderPath + list[i]);
            run("Unsharp Mask...", "radius=99 mask=0.85");
            waitForUser("Drücken Sie 'ok', nach dem Ausschneiden");
            run("Clear Outside", "stack");
            run("Bandpass Filter...", "filter_large=80 filter_small=15
            suppress=None tolerance=5 autscale saturate");
            run("Unsharp Mask...", "radius=99 mask=0.85");
        }
    }
}
```

Skript Bildbearbeitungssequenz 2

```
inputFolderPath = "Eingabeordner";
outputFolderPath = "Ausgabeordner";
list = getFileList(inputFolderPath);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        if (endsWith(list[i], ".tiff") || endsWith(list[i], ".tif")) {
            open(inputFolderPath + list[i]);
            run("Enhance Contrast...", "saturated=0.35");
            setTool("freehand");
            waitForUser("Drücken Sie 'ok', nach dem Ausschneiden");
            run("Clear Outside", "stack");
            run("Bandpass Filter...", "filter_large=64 filter_small=24
            suppress=None tolerance=5 autscale saturate");
            run("Unsharp Mask...", "radius=9 mask=0.95");
        }
    }
}
```

Skript Allokation

```
import os
import random
import shutil
from PIL import Image

def copy_and_renumber_images(source_folder, dest_folder_b, dest_folder_c, split_ratio=0.8):
    if not os.path.exists(dest_folder_b):
        os.makedirs(dest_folder_b)
    if not os.path.exists(dest_folder_c):
        os.makedirs(dest_folder_c)
    image_files = [f for f in os.listdir(source_folder) if os.path.isfile(os.path.join(source_folder, f))]
    total_images = len(image_files)
    num_images_b = int(total_images * split_ratio)
    num_images_c = total_images - num_images_b
    random.shuffle(image_files)
    for i, image_file in enumerate(image_files):
        source_path = os.path.join(source_folder, image_file)
        if i < num_images_b:
            dest_path = os.path.join(dest_folder_b, f"Training{i + 1:03d}.tiff")
        else:
            dest_path = os.path.join(dest_folder_c, f"Validation{i + 1:03d}.tiff")
        with Image.open(source_path) as img:
            img.save(dest_path)
    print(f"{num_images_b} Bilder wurden nach {dest_folder_b} kopiert und neu durchnummeriert.")
    print(f"{num_images_c} Bilder wurden nach {dest_folder_c} kopiert und neu durchnummeriert.")
source_directory = 'Quellordner'
destination_directory_b = 'Zielordner_Training'
destination_directory_c = 'Zielordner_Valiriderung'
copy_and_renumber_images(source_directory, destination_directory_b, destination_directory_c, split_ratio=0.8)
```

Skript Deep Learning

```
import torch
import torch.nn as nn
import torch.optim as optim
from torch.optim import lr_scheduler
import torch.backends.cudnn as cudnn
import numpy as np
import torchvision
from torchvision import datasets, models, transforms
import matplotlib.pyplot as plt
import time
import os
from PIL import Image
from tempfile import TemporaryDirectory

from sklearn.metrics import confusion_matrix
import seaborn as sns

cudnn.benchmark = True
plt.ion()

from google.colab import drive
drive.mount('/content/drive')

data_transforms = {
    'train': transforms.Compose([
        transforms.RandomResizedCrop(224),
        transforms.RandomHorizontalFlip(),
        transforms.ToTensor(),
        transforms.Normalize([0.485, 0.456, 0.406], [0.229, 0.224, 0.225])
    ]),
    'val': transforms.Compose([
        transforms.Resize(256),
        transforms.CenterCrop(224),
        transforms.ToTensor(),
        transforms.Normalize([0.485, 0.456, 0.406], [0.229, 0.224, 0.225])
    ]),
```

```
}
data_dir = '/content/drive/MyDrive/Spheroid_images2'
image_datasets = {x: datasets.ImageFolder(os.path.join(data_dir, x),
                    data_transforms[x])
                    for x in ['train', 'val']}
dataloaders = {x: torch.utils.data.DataLoader(image_datasets[x], batch_size=4,
                    shuffle=True, num_workers=4)
                    for x in ['train', 'val']}
dataset_sizes = {x: len(image_datasets[x]) for x in ['train', 'val']}
class_names = image_datasets['train'].classes

device = torch.device("cuda:0" if torch.cuda.is_available() else "cpu")

def imshow(inp, title=None):
    """Display image for Tensor."""
    inp = inp.numpy().transpose((1, 2, 0))
    mean = np.array([0.485, 0.456, 0.406])
    std = np.array([0.229, 0.224, 0.225])
    inp = std * inp + mean
    inp = np.clip(inp, 0, 1)
    plt.imshow(inp)
    if title is not None:
        plt.title(title)
    plt.pause(0.001)

inputs, classes = next(iter(dataloaders['train']))

out = torchvision.utils.make_grid(inputs)

imshow(out, title=[class_names[x] for x in classes])

def train_model(model, criterion, optimizer, scheduler, num_epochs=25):
    since = time.time()

    epoch_losses = {'train': [], 'val': []}
    epoch_accuracies = {'train': [], 'val': []}
```

```
with TemporaryDirectory() as tempdir:
    best_model_params_path = os.path.join(tempdir, 'best_model_params.pt')

    torch.save(model.state_dict(), best_model_params_path)
    best_acc = 0.0

    for epoch in range(num_epochs):
        epoch_loss_train = 0.0
        epoch_loss_val = 0.0
        epoch_acc_train = 0.0
        epoch_acc_val = 0.0

        for phase in ['train', 'val']:
            if phase == 'train':
                model.train()
            else:
                model.eval()

            running_loss = 0.0
            running_corrects = 0

            for inputs, labels in dataloaders[phase]:
                inputs = inputs.to(device)
                labels = labels.to(device)

                optimizer.zero_grad()

                with torch.set_grad_enabled(phase == 'train'):
                    outputs = model(inputs)
                    _, preds = torch.max(outputs, 1)
                    loss = criterion(outputs, labels)

                if phase == 'train':
                    loss.backward()
                    optimizer.step()

            running_loss += loss.item() * inputs.size(0)
```

```
        running_corrects += torch.sum(preds == labels.data)

    epoch_loss = running_loss / dataset_sizes[phase]

    if phase == 'train':
        epoch_loss_train = epoch_loss
        epoch_acc_train = running_corrects.double() / da-
taset_sizes[phase]

    else:
        epoch_loss_val = epoch_loss
        epoch_acc_val = running_corrects.double() / da-
taset_sizes[phase]

    if phase == 'val':
        epoch_accuracies[phase].ap-
pend(epoch_acc_val.cpu().item())

    epoch_losses[phase].append(epoch_loss)

    if epoch_acc_val > best_acc:
        best_acc = epoch_acc_val
        torch.save(model.state_dict(), best_model_params_path)

    scheduler.step()

time_elapsed = time.time() - since
print(f'Training complete in {time_elapsed // 60:.0f}m {time_elapsed %
60:.0f}s')
print(f'Best val Acc: {best_acc:.4f}')

plt.figure(figsize=(12, 4))

plt.subplot(1, 2, 1)
plt.plot(epoch_losses['train'], label='Train Loss')
plt.plot(epoch_losses['val'], label='Validation Loss')
plt.legend()
plt.xlabel('Epoch')
plt.ylabel('Loss')
```

```
plt.title('Training and Validation Loss')

plt.subplot(1, 2, 2)
plt.plot(epoch_accuracies['train'], label='Train Accuracy')
plt.plot(epoch_accuracies['val'], label='Validation Accuracy')
plt.legend()
plt.xlabel('Epoch')
plt.ylabel('Accuracy')
plt.title('Training and Validation Accuracy')

plt.show()

model.load_state_dict(torch.load(best_model_params_path))

return model

def visualize_model(model, num_images=4):
    was_training = model.training
    model.eval()
    images_so_far = 0
    fig = plt.figure()

    with torch.no_grad():
        for i, (inputs, labels) in enumerate(dataloaders['val']):
            inputs = inputs.to(device)
            labels = labels.to(device)

            outputs = model(inputs)
            _, preds = torch.max(outputs, 1)

            for j in range(inputs.size()[0]):
                images_so_far += 1
                ax = plt.subplot(num_images//2, 2, images_so_far)
                ax.axis('off')
                ax.set_title(f'predicted: {class_names[preds[j]]}')
                imshow(inputs.cpu().data[j])
```

```
        if images_so_far == num_images:
            model.train(mode=was_training)
        return
    model.train(mode=was_training)

model_ft = models.resnet50(weights='IMAGENET1K_V1')
num_fts = model_ft.fc.in_features

model_ft.fc = nn.Linear(num_fts, 2)

model_ft = model_ft.to(device)

criterion = nn.CrossEntropyLoss()

optimizer_ft = optim.SGD(model_ft.parameters(), lr=0.001, momentum=0.8)

exp_lr_scheduler = lr_scheduler.StepLR(optimizer_ft, step_size=8, gamma=0.1)

model_ft = train_model(model_ft, criterion, optimizer_ft, exp_lr_scheduler,
                       num_epochs=50)

model_conv = torchvision.models.resnet50(weights='IMAGENET1K_V1')
for param in model_conv.parameters():
    param.requires_grad = True

num_fts = model_conv.fc.in_features
model_conv.fc = nn.Linear(num_fts, 2)

model_conv = model_conv.to(device)

criterion = nn.CrossEntropyLoss()

optimizer_conv = optim.SGD(model_conv.fc.parameters(), lr=0.001, momentum=0.8) #
exp_lr_scheduler = lr_scheduler.StepLR(optimizer_conv, step_size=7, gamma=0.1)

model_conv = train_model(model_conv, criterion, optimizer_conv,
                          exp_lr_scheduler, num_epochs=50)
```

```
visualize_model(model_conv)

plt.ioff()
plt.show()

def visualize_model_predictions(model, img_path):
    was_training = model.training
    model.eval()

    img = Image.open(img_path)
    img = data_transforms['val'](img)
    img = img.unsqueeze(0)
    img = img.to(device)

    with torch.no_grad():
        outputs = model(img)
        _, preds = torch.max(outputs, 1)

        ax = plt.subplot(2,2,1)
        ax.axis('off')
        ax.set_title(f'Predicted: {class_names[preds[0]]}')
        imshow(img.cpu().data[0])

        model.train(mode=was_training)

def create_confusion_matrix(model, dataloader):
    model.eval()
    all_preds = []
    all_labels = []

    with torch.no_grad():
        for inputs, labels in dataloader['val']:
            inputs = inputs.to(device)
            labels = labels.to(device)

            outputs = model(inputs)
```

```
        _, preds = torch.max(outputs, 1)

    all_preds.extend(preds.cpu().numpy())
    all_labels.extend(labels.cpu().numpy())

    cm = confusion_matrix(all_labels, all_preds)
    return cm

conf_matrix_ft = create_confusion_matrix(model_ft, dataloaders)
conf_matrix_conv = create_confusion_matrix(model_conv, dataloaders)

def plot_confusion_matrix(cm, class_names):
    plt.figure(figsize=(8, 6))
    sns.heatmap(cm, annot=True, fmt="d", cmap="Blues", xticklabels=class_names,
yticklabels=class_names)
    plt.xlabel('Predicted')
    plt.ylabel('True')
    plt.title('Confusion Matrix')
    plt.show()

plot_confusion_matrix(conf_matrix_ft, class_names)
plot_confusion_matrix(conf_matrix_conv, class_names)

def visualize_model_predictions(model, img_path, class_names):
    was_training = model.training
    model.eval()

    img = Image.open(img_path)
    img = data_transforms['val'](img)
    img = img.unsqueeze(0)
    img = img.to(device)

    with torch.no_grad():
        outputs = model(img)
        probs = torch.nn.functional.softmax(outputs, dim=1)[0]
        _, preds = torch.max(outputs, 1)
```

```
predicted_class = class_names[preds[0]]
confidence = probs[preds[0]].item()

plt.figure(figsize=(6, 6))
ax = plt.subplot(1, 1, 1)
ax.axis('off')
ax.set_title(f'Predicted: {predicted_class}, Confidence: {confidence:.3f}')
imshow(img.cpu().data[0])

model.train(mode=was_training)

visualize_model_predictions(model_ft, '/con-
tent/drive/MyDrive/PetImages/Kontrolle/72h_11b015.tiff', class_names)

visualize_model_predictions(model_conv, '/con-
tent/drive/MyDrive/PetImages/Kontrolle/72h_11b015.tiff', class_names)
```

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Shaun Paul Keck

Geburtsdatum: 17.09.1985

Geburtsort: Heidelberg

BERUFLICHER WERDEGANG

| | |
|-------------------|--|
| Seit 02/2023 | Process Technology Expert bei Lummus Novolen Technology GmbH, Mannheim Bereich: Instrumentierung und Prozessanalytik |
| 03/2017 – 01/2023 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Hochschule Mannheim am Institut CeMOS (Center for Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy), Mannheim Bereich: Optische Messtechnik und Spektroskopie |
| 04/2015 – 06/2015 | Wissenschaftliche Hilfskraft an der Hochschule Mannheim in der Fakultät für Verfahrens- und Chemietechnik, Mannheim Bereich: Tutor für mechanische Verfahrenstechnik |
| 09/2014 – 12/2014 | Praktikant im Energy Mangement der Daimler AG, Mannheim Bereich: Planung und Umsetzung von Energie Effizienzmaßnahmen |
| 09/2013 – 02/2014 | Praktikant an der University of Maryland im Center for Environmental Energy Engineering, College Park Bereich: Gaswäsche und Naturumlaufverdampfer |
| 10/2012 – 08/2013 | Wissenschaftliche Hilfskraft an der Hochschule Mannheim in der Fakultät für Verfahrens- und Chemietechnik, Mannheim Bereich: Tutor für allgemeine und anorganische Chemie |
| 04/2012 – 08/2013 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Technoseum, Mannheim Bereich: Konstruktion und Instandhaltung physikalischer Experimente |

11/2010 – 12/2010 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Heidelberg in
 der medizinischen Fakultät
 Bereich: Praktika des Instituts für Physiologie und
 Pathophysiologie

AUSBILDUNG

Seit 07/2017 Doktorand an der Universität Heidelberg
 Medizinische Fakultät Mannheim

03/2015 – 02/2017 Hochschule Mannheim
 Studiengang: Chemieingenieurwesen (Master)
 Abschluss: Master of Science (M.Sc.)
 Note: 1,1 (sehr gut)

09/2011 – 04/2015 Hochschule Mannheim
 Studiengang: Verfahrenstechnik (Bachelor)
 Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.)
 Note: 1,4 (sehr gut)

09/2006 – 08/2011 Universität Heidelberg
 Studiengang: Zahnmedizin (Staatsexamen)
 Note: 3,5 (befriedigend) 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2002 – 07/2005 Hubert-Sternberg-Schule Wiesloch
 Allgemeine Hochschulreife
 Note: 1,8 (gut)

PUBLIKATIONEN

2024 Herdt D, Teumer T, **Keck S**, Kunz T, Schiwiek V, Kühnemuth
 S, Methner F-J, Rädle M: Quantitative Analysis of Chloroge-
 nic Acid during Coffee Roasting via Raman Spectroscopy.
 Chemosensors 2024, 12(6): 106, 2024. doi:10.3390/chemo-
 sensors12060106

2023 Manser S*, **Keck S***, Vitacolonna M, Wühler F, Rudolf R,
 Rädle M: Innovative Imaging Techniques: A Conceptual Ex-
 ploration of Multi-Modal Raman Light Sheet Microscopy.
 Micromachines 14(9): 1739, 2023. doi:10.3390/mi14091739

- 2022 Manser S, Kommert S, **Keck S**, Spoor E, Rädle M: New Conceptual Study of a Highly Sensitive Photometric Raman Sensor. *Sensors* 22(16): 6098, 2022. doi:10.3390/s22166098
- 2021 Deuerling J*, **Keck S***, Moelyadi I, Repke J-U, Rädle M: In-Line Analysis of Diffusion Processes in Micro Channels by Long Distance Raman Photometric Measurement Technology—A Proof of Concept Study. *Micromachines* 12(2): 2021. doi:10.3390/mi12020116
- 2018 Nachtmann M*, **Keck S***, Braun F, Eckhardt H, Mattolat C, Gretz N, Scholl S, Rädle M: A customized stand-alone photometric Raman sensor applicable in explosive atmospheres: a proof-of-concept study. *JSSS* 7: 543, 2018. doi:10.5194/jsss-7-543-2018

* Die Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

FACHVORTRÄGE

- 2021 Development of multimodal Raman Light Sheet Microscopy (mRLSM). *15. Interdisziplinäres Doktorandenseminar des AK PAT*, 07. September 2021, virtuelle Konferenz.
- 2018 Evaluierung eines mehrkanaligen Raman-Spektrophotometers zur Überwachung der Abspaltung von Fluorenylmethoxycarbonyl. *14. Kolloquium Arbeitskreis Prozessanalytik GDCH*, 04. Dezember 2018.
- 2017 Entwicklung eines mehrkanaligen Raman-Spektrophotometers zur industriellen Prozessüberwachung. *Anakon Fachgruppe Analytische Chemie GDCH*, 03.-06.04.2017, Poster Präsentation

9 DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich meinen persönlichen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Matthias Rädle für diese Gelegenheit und das verbundene Vertrauen aussprechen. Seine Betreuung und Unterstützung als geduldiger und beständiger Diskussionspartner haben mir ermöglicht diese Arbeit im interdisziplinären Feld der Raman-Spektroskopie und Mikroskopie anzufertigen. Auch möchte ich mich bei ihm für die Bereitstellung der Fördermittel und die freie, diverse Forschungslandschaft am CeMOS (Center for Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy) bedanken.

Des Weiteren gilt meine Wertschätzung allen meinen Kollegen am CeMOS für die interessante und abwechslungsreiche Zusammenarbeit in diesem und zahlreichen weiteren Projekten. Mein besonderer Dank geht an Felix Wühler, Pooja Kumari und Björn Van Marwick für die Entwicklung und Bereitstellung von Software-Lösungen. Ebenso bedanke ich mich bei Marcel Nachtmann für die unermüdliche Durchsicht aller Iterationen meiner Arbeit und die vielen konstruktiven Vorschläge. Auch möchte ich mich bei meinen ehemaligen Bürokollegen Thomas Hufnagel und Deborah für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gegenseitige Motivation bedanken. Sie wurden zu guten Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und stets für kreative, angeregte Diskussionen bereit waren.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, die bereits in meinen frühesten Erinnerungen ein Umfeld von kritischem und unabhängigem Denken und Neugier geschaffen haben, immer fragend, was hinter der nächsten Ecke verborgen liegen könnte. Vielen Dank auch an meinen Bruder für sein anhaltendes Interesse, die kleinen Momente, und die gelegentliche gemeinsame Auszeit.

Abschließend möchte ich meinen größten Dank meiner Partnerin aussprechen, die mich jederzeit mit vollem Einsatz unterstützt und mir den Rücken während der gesamten Promotionsarbeit freigehalten hat. Ohne ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht erfolgreich abschließen können.