

10. Spektroskopische Methoden

10.1 Spektroskopie

10.2 Spektrometer

10.3 Hyperspektrale Bildgebung

10.4 Spektroskopische Methoden in der Mikroskopie

10. Spektroskopische Methoden

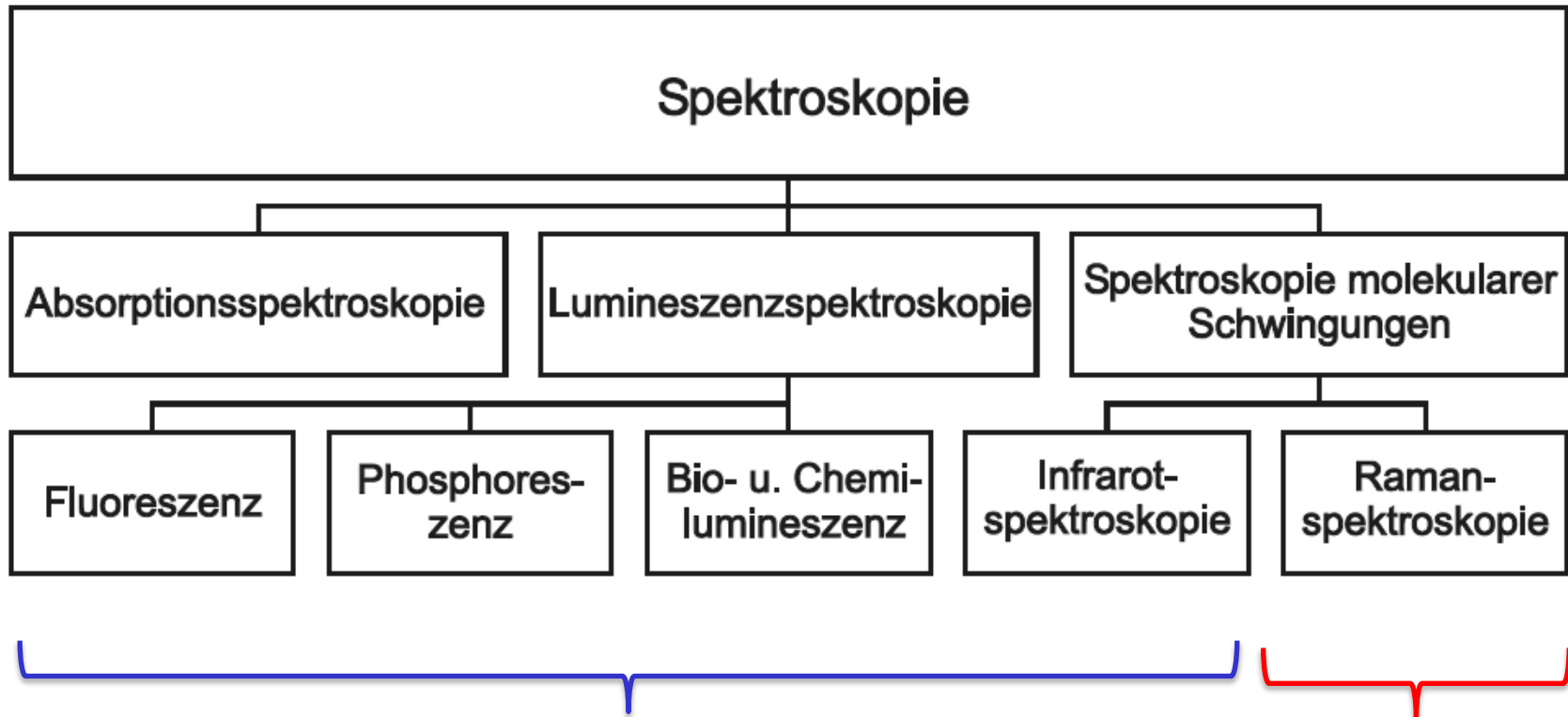
10.1 Spektroskopie

10.2 Spektrometer

10.3 Hyperspektrale Bildgebung

10.4 Spektroskopische Methoden in der Mikroskopie

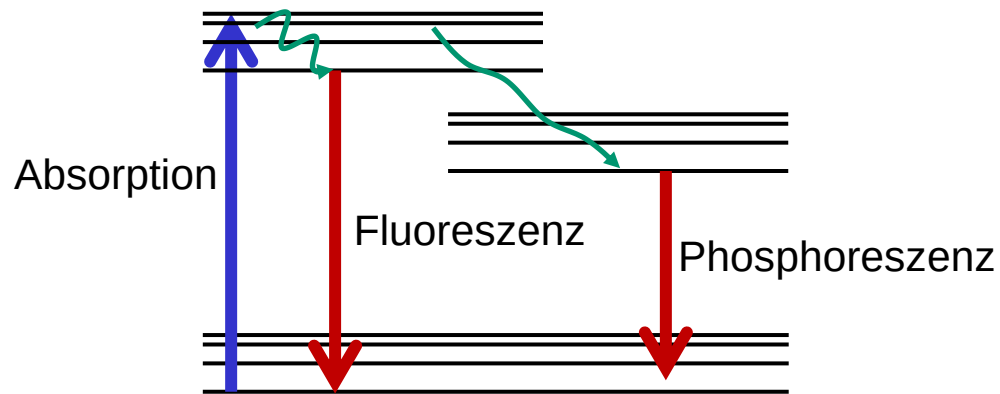
Abgrenzung Spektroskopie / Fluoreszenz:



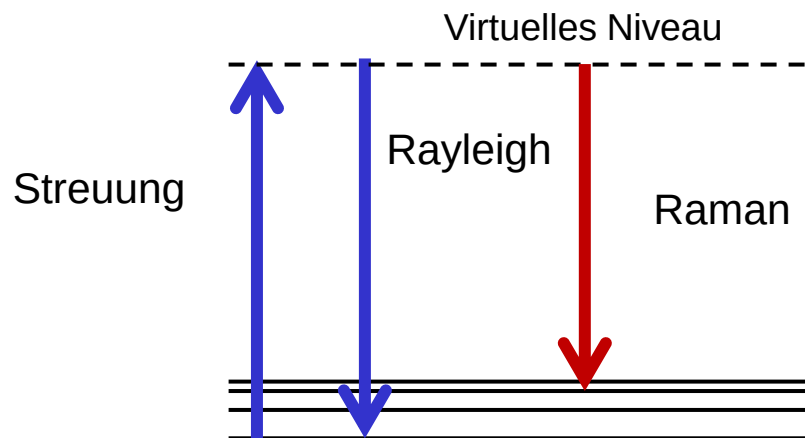
Absorption

Streuung

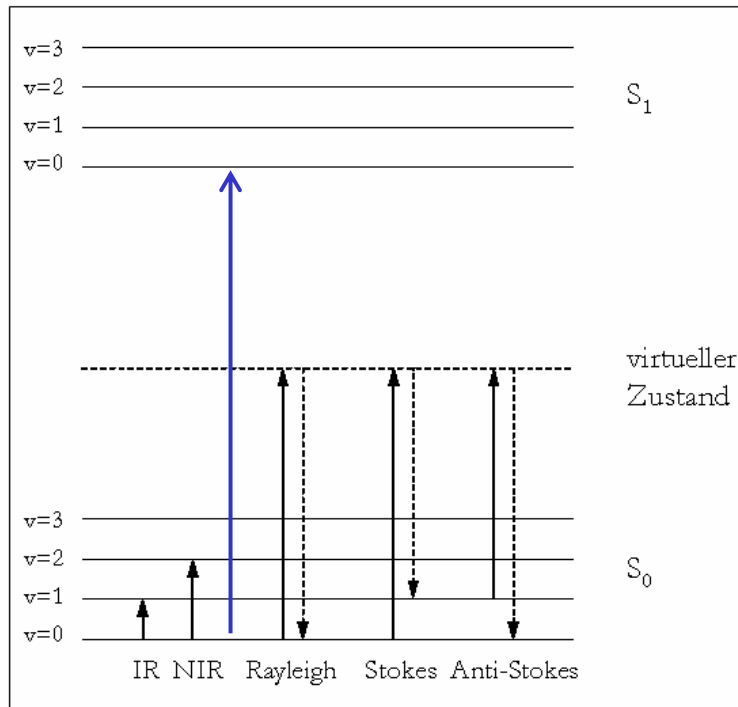




Fluoreszenz und Phosphoreszenz basieren auf Absorption, d.h. das Photon wird komplett absorbiert, und später ein Photon emittiert:
➔ Spezifische Absolut-Wellenlänge für Absorption und Emission



Bei Streuprozessen wechselwirken die Photonen mit atomaren/molekularen System (Schwingungen) und werden mit gleicher Wellenlänge (elastisch = Rayleigh) oder verschobener Wellenlängen (inelastisch = Raman) gestreut
➔ Beliebige Anregungs-Wellenlänge
➔ Ergebnis: Spezifische Wellenlängen- Verschiebung



Absorption:

Schwingungsübergänge
meist im IR und NIR-Bereich
Elektronische Übergänge im
VIS, UV und Röntgenbereich

Photonen-Energie

$$E_{Ph} = \hbar\omega = \frac{2\pi \cdot \hbar \cdot c}{\lambda}$$

Vgl. (7.1)

$$\hbar = 1.05 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$$

Plancksches Wirkungsquantum

Raman-Streuung

→ Energieübertrag in
Schwingungszustände
→ Stokes-Verschiebungen
im IR/NIR-Bereich

Wellenlängen / Wellenzahlen

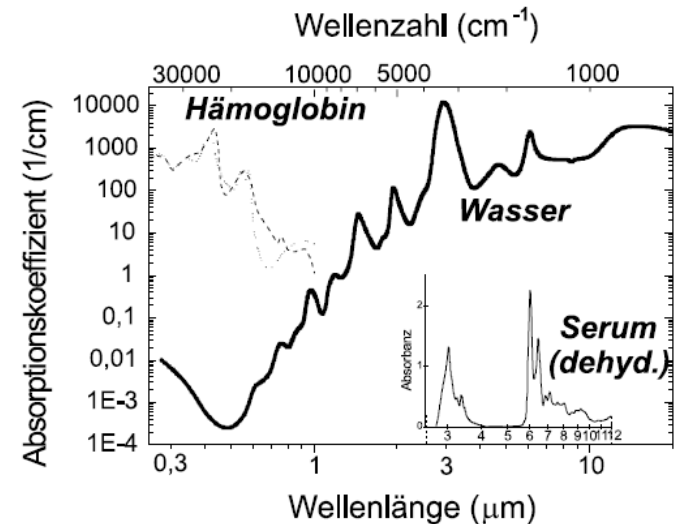


In der Spektroskopie ist die Angabe in Wellenzahlen (cm^{-1}) gebräuchlich

Wellenzahl
(Angabe in cm^{-1})

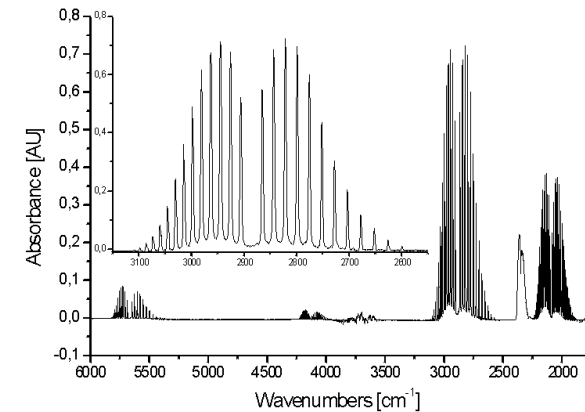
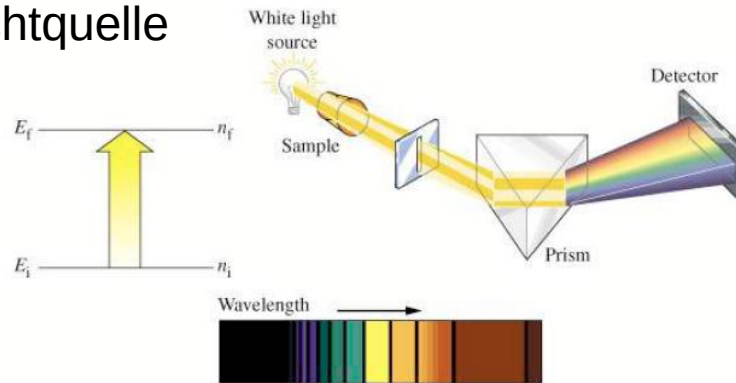
$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

(10.1)

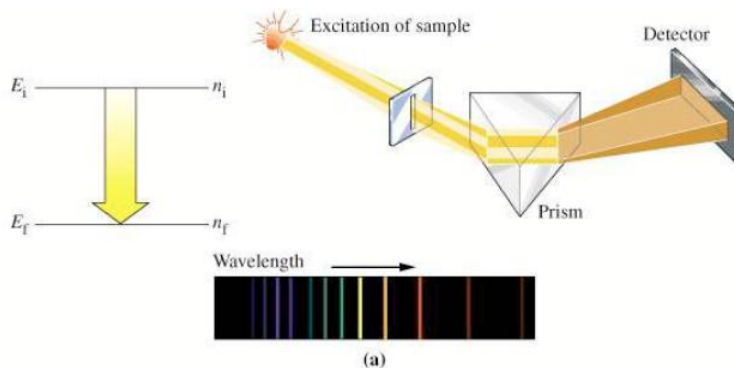


Energieübertragung	Molekül Rotation				Molekül-Schwingung				Elektronenanregung			
Spektroskopische Methode	Mikrowellen Absorption				Infrarot Spektroskopie				UV-VIS Spektroskopie			
Spektralbereich	Radiowellen	Mikrowellen			Infrarot (IR) fernes mittleres nahes				Sichtbar	UV	Röntgen	
Wellenlänge [m]	10	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
$\lambda = \frac{c}{\nu}$		1 m			1 mm			1 μm			1 nm	
Frequenz [Hz]	10^7	10^9			10^{11}	10^{13}			10^{15}	10^{17}		
$\nu = \frac{c}{\lambda}$												
Wellenzahl [cm^{-1}]	10^{-3}	10^{-1}			10	10^3			10^5	10^7		
$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$												

Absorptionsspektrum: Spektral Breite Lichtquelle



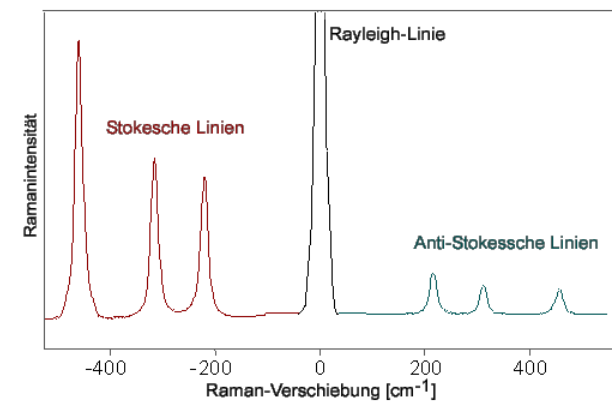
Emissionsspektrum: Z.B. Lichtquellen / Fluoreszenz



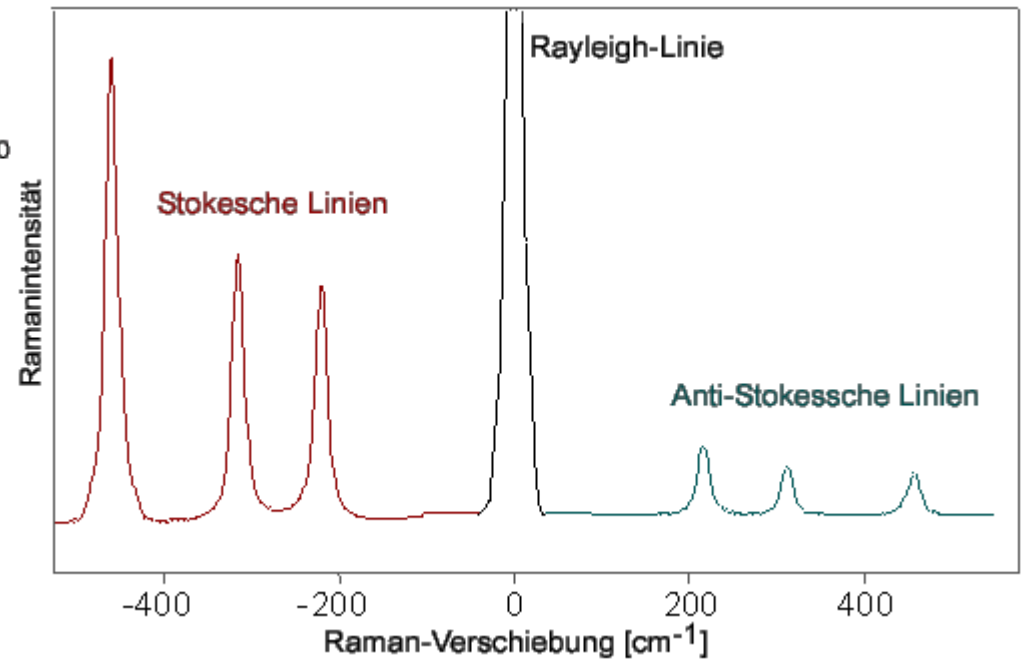
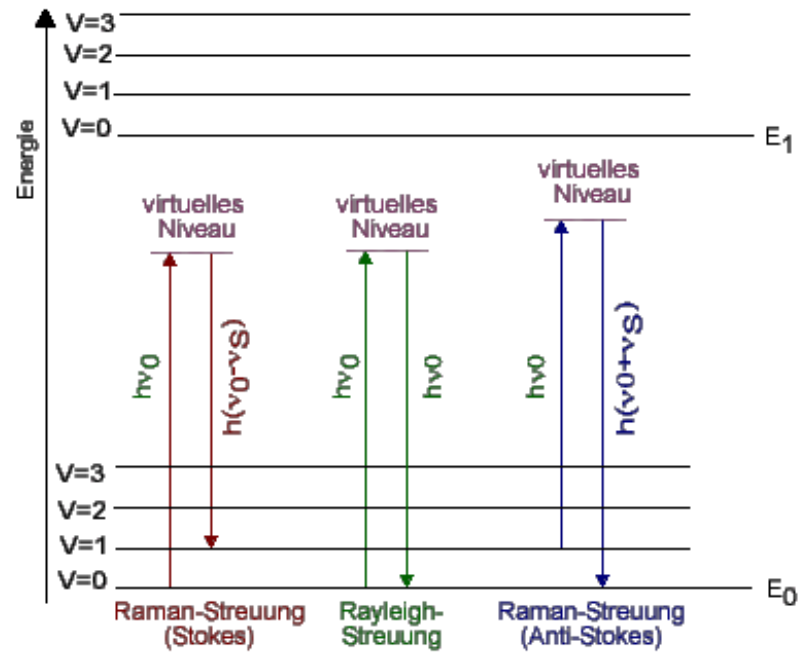
Raman-Spektrum

Sehr schmalbandige Anregung

➔ Messung der Linienverschiebung



Beispiel: Raman-Spektrum



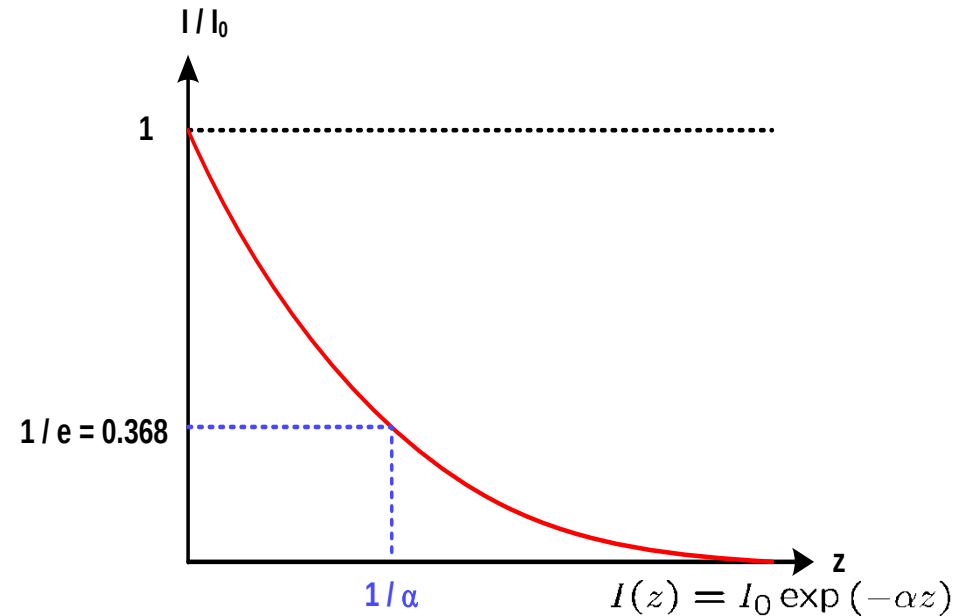
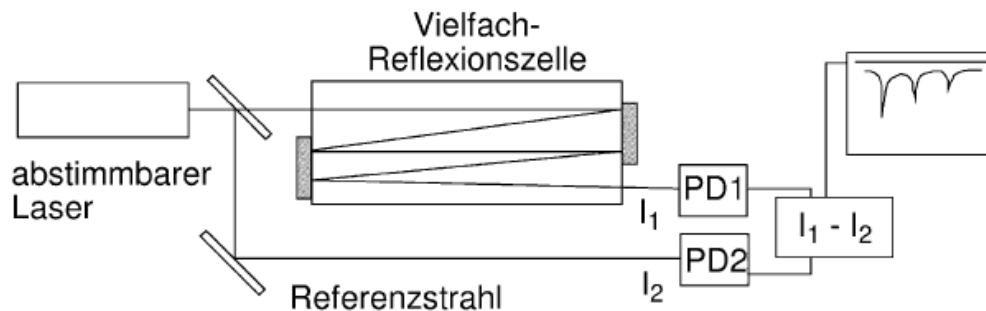
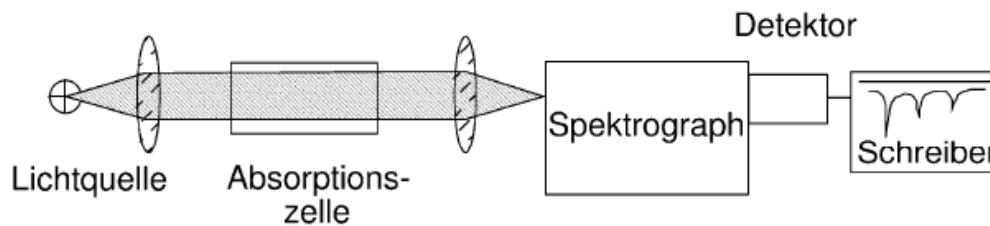
Absorptions-Spektrometrie

Erinnerung Absorptionsgesetz:

$$I(z) \propto \langle \vec{E}^2 \rangle = I_0 \exp(-\alpha \cdot z) \quad (10.2)$$

= Lambert-Beersches Gesetz

Absorptions-Spektroskopie $\alpha = \alpha(\lambda)$



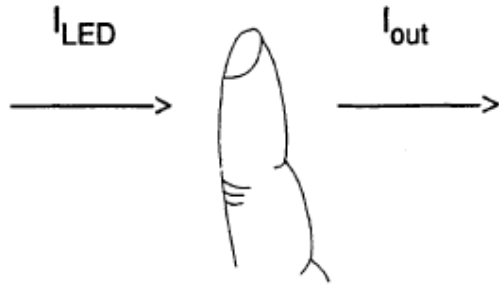
J. Bille W. Schlegel (Hrsg.)

Medizinische Physik 3

Medizinische Laserphysik

Anwendungsbeispiel - Pulsoxymetrie

Pulsoximetrie:



$$I_{OUT} = I_0 \exp(-\alpha \cdot z)$$

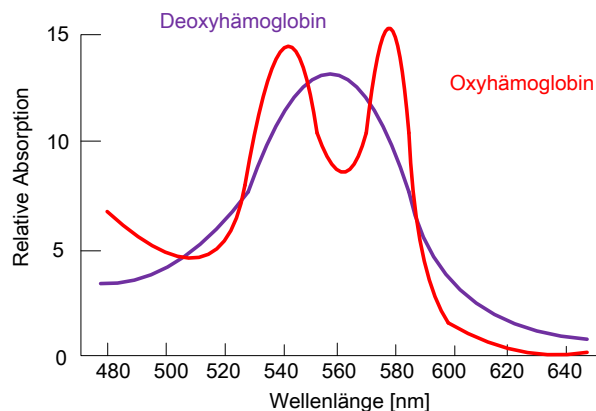
Für Flüssigkeiten gilt:

$$\alpha(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i$$

(10.3)



Abb. aus: Wikipedia

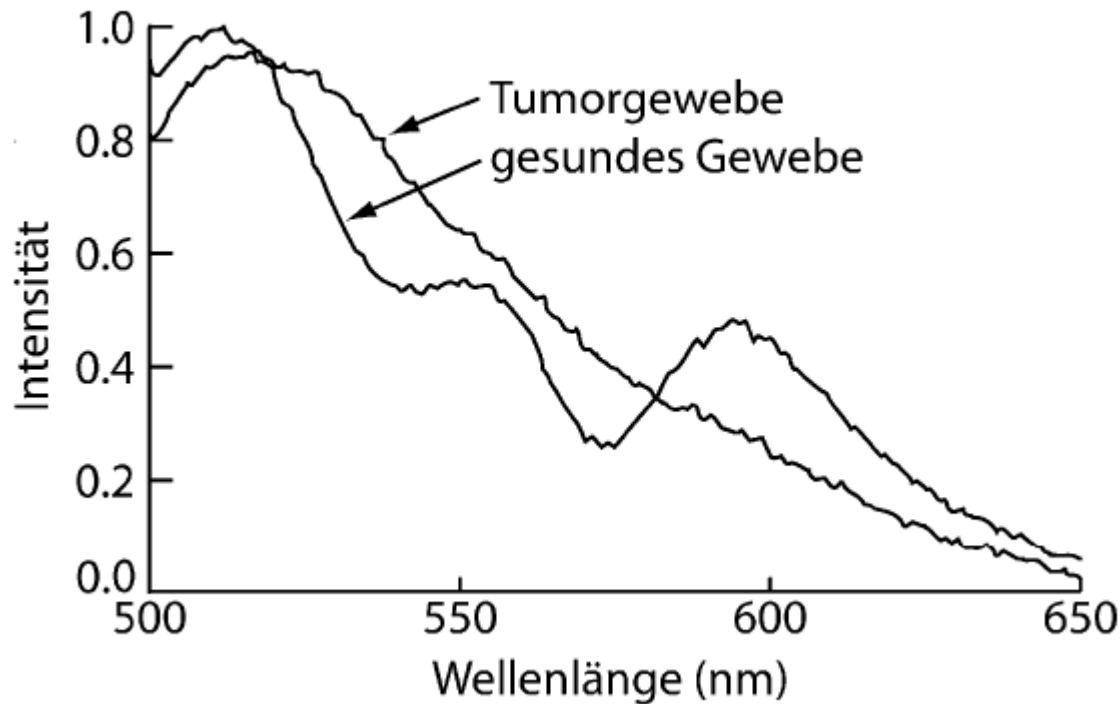


α Absorptionskoeffizient
 ε_i molarer Extinktionskoeffizient des Stoffes i
 c_i Konzentration des Stoffes i in mol/l
 λ Wellenlänge

- ➔ Aus Signal bei 2 Wellenlängen kann der Sauerstoffgehalt des Blutes bestimmt werden
- ➔ (Verhältnis Deoxy- zu Oxyhämoglobin)

Anwendungsbeispiel – Spektrometrie zur Diagnose

➔ Spektrum erlaubt Gewebe-Differenzierung



J. Bille W. Schlegel (Hrsg.)

Medizinische Physik 3

Medizinische Laserphysik

10. Spektroskopische Methoden

10.1 Spektroskopie

10.2 Spektrometer

10.3 Hyperspektrale Bildgebung

10.4 Spektroskopische Methoden in der Mikroskopie

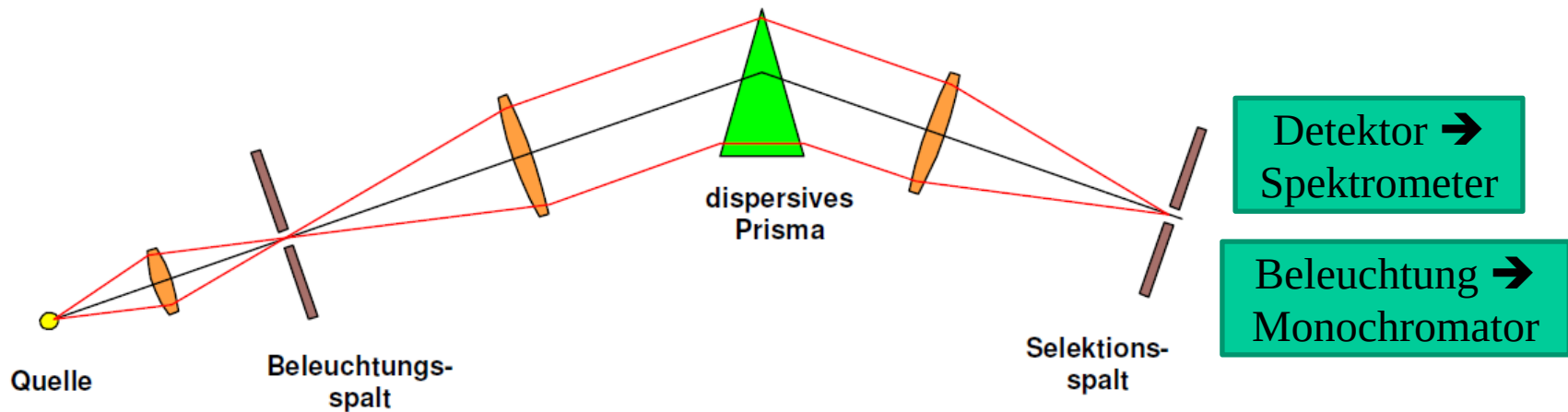
Spektrometer:

Dienen zur genauen Vermessung von der spektralen Verteilung von Licht (Wieviel Licht bei welcher Wellenlänge ?)

Monochromatoren:

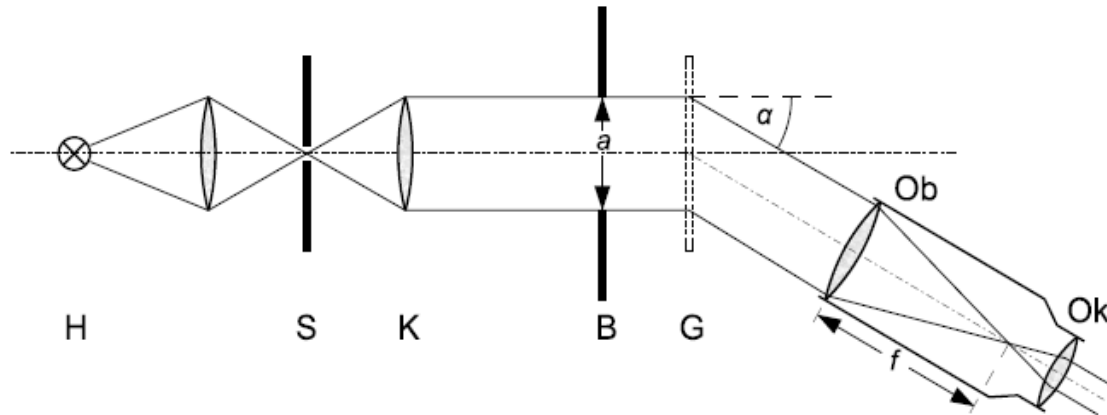
Dienen zur spektralen Filterung von Licht.

Monochromatoren sind teilweise ähnlich aufgebaut wie Spektrometer



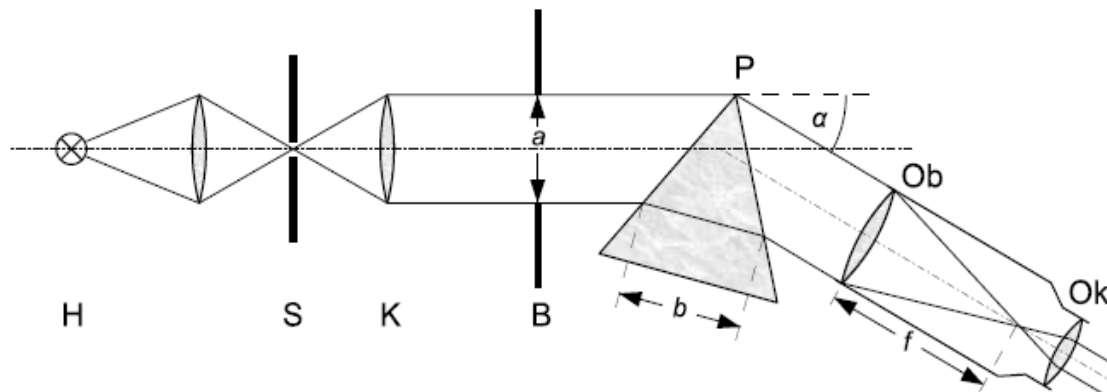
Prismen und **Gitter-Anordnungen** sind hier sehr gebräuchlich

Gitter-Spektrometer



- H – Hg-Lampe
- S – Spalt
- K – Kollimator
- B – Bündelbegrenzung
- G – Gitter
- Ob – Fernrohrobjektiv
- Ok – Okular

Prismen-Spektrometer



- H – Hg-Lampe
- S – Spalt
- K – Kollimator
- B – Bündelbegrenzung
- P – Prisma
- Ob – Fernrohrobjektiv
- Ok – Okular

Sowohl Gitter, als auch Prismen-Spektrometer beruhen auf der **Winkeldispersion** – d.h. Licht wird abhängig von der Wellenlänge mit unterschiedlichem Winkel abgelenkt

Winkeldispersion (Definition):

$$D = \frac{d\theta}{d\lambda} \quad (10.4)$$

Grenz-Auflösungsvermögen:

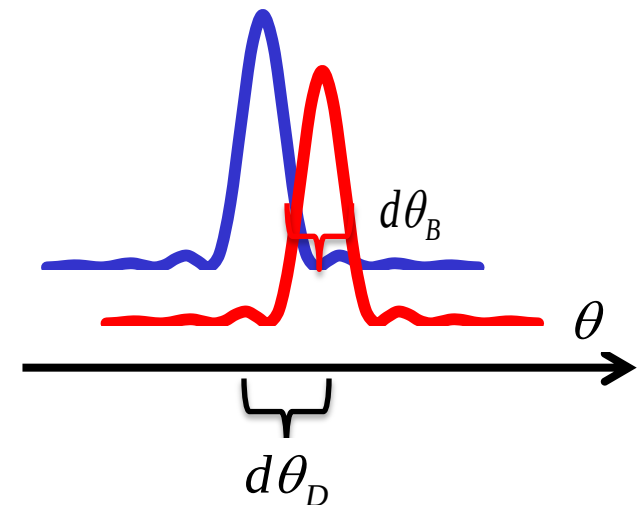
Limitiert durch
Beugung an der
Öffnung a des
Spektrometers

$$\underbrace{d\theta_B = \frac{\lambda}{a}}_{\text{Beugung}} = \underbrace{d\theta_D = D \cdot d\lambda}_{\text{Dispersion}}$$

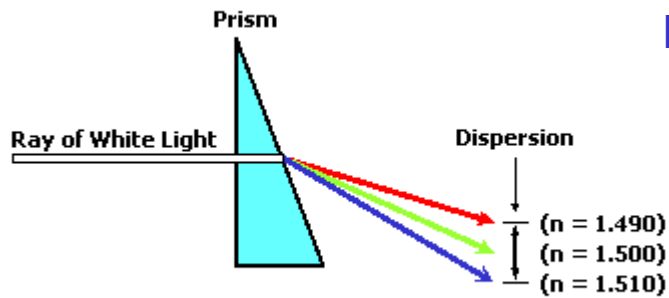
➔ **Auflösungsvermögen**

$$A = \frac{\lambda}{d\lambda} = a \cdot D \quad (10.5)$$

Auflösungsvermögen ist gegeben durch die **Öffnung a** des Spektralapparates und durch die **Winkeldispersion D**



Prismenspektrometer

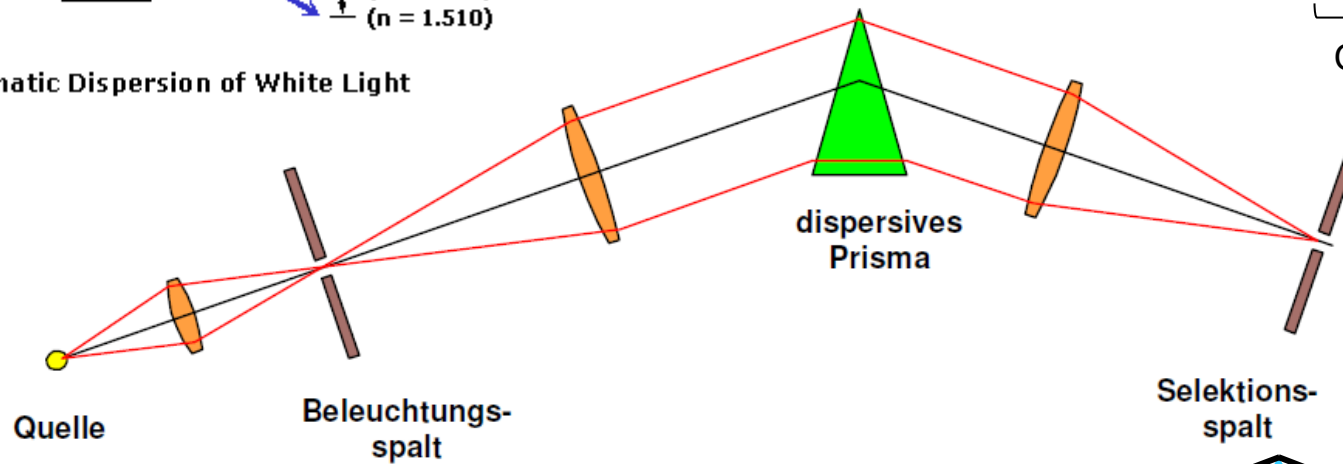


Chromatic Dispersion of White Light

Prisma → Material-Dispersion

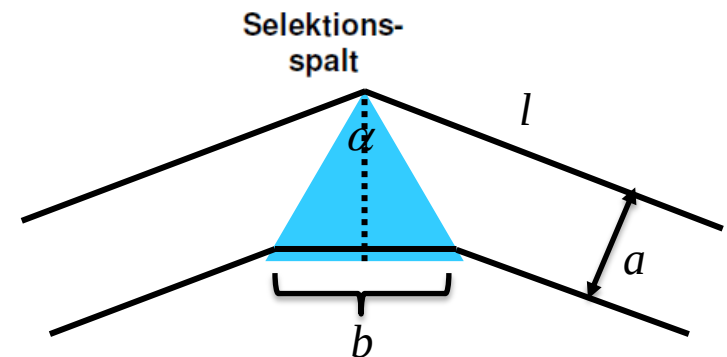
$$D = \frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{d\theta}{dn} \cdot \frac{dn}{d\lambda}$$

$$A = a \cdot D = a \cdot \underbrace{\frac{d\theta}{dn}}_{\text{Geometrie}} \cdot \underbrace{\frac{dn}{d\lambda}}_{\text{Material}}$$



Auflösungsvermögen Prisma
Materialdispersion & Geometrie

$$A = b \cdot \frac{dn}{d\lambda} \quad (10.6)$$



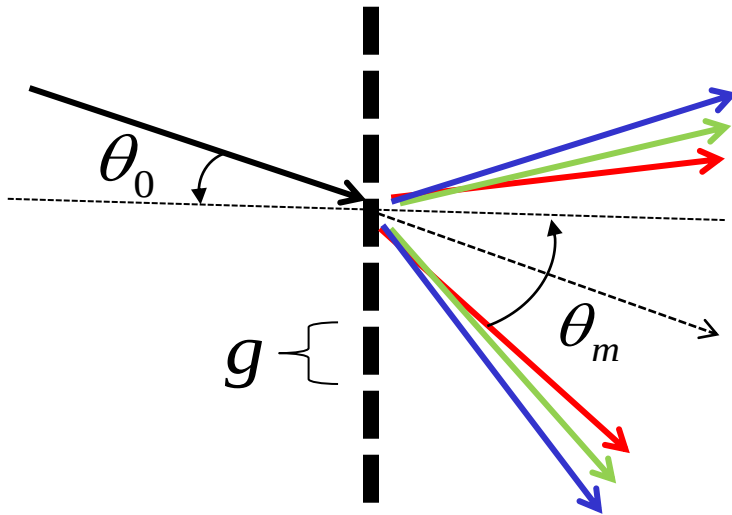
b Basislänge Prisma
 $dn/d\lambda$ Materialdispersion

Allgemeine **Gittergleichung**

(Wellenlänge λ , Beugungsordnung m , Gitterperiode g)

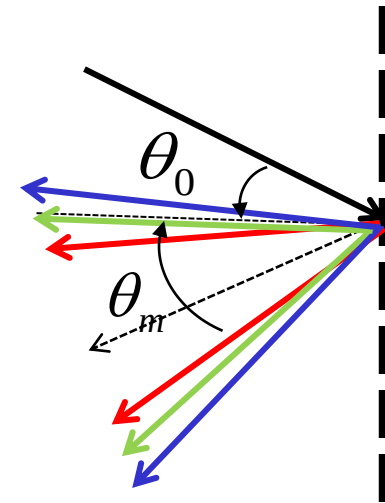
Transmissions-Gitter

$$\sin \theta_m - \sin \theta_0 = m \cdot \frac{\lambda}{g} \quad (10.7)$$



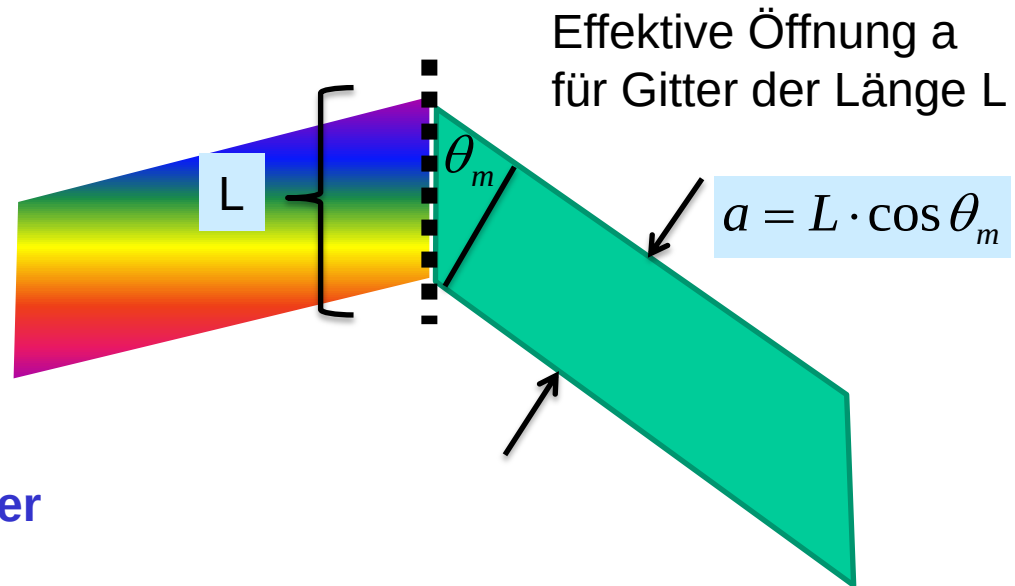
Reflexions-Gitter

$$\sin \theta_m + \sin \theta_0 = m \cdot \frac{\lambda}{g}$$



Winkeldispersion Gitter (aus der Gittergleichung)

$$D = \frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{m}{g \cdot \cos \theta_m}$$



Auflösungsvermögen Gitter

$$A = \frac{\lambda}{d\lambda} = a \cdot D$$

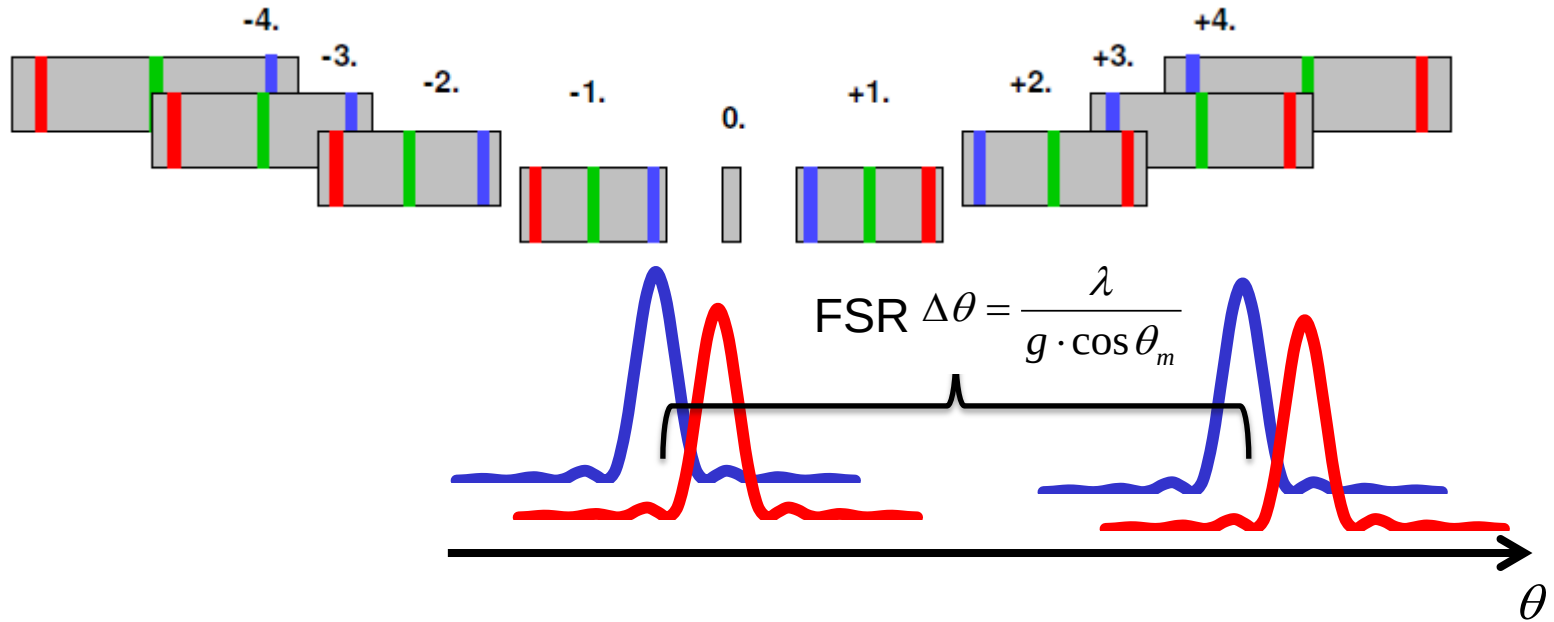
$$A = \frac{m \cdot L}{g} = m \cdot N$$

(10.8)

m Beugungsordnung
 N Anzahl Spalte

➔ Um möglichst große Auflösung zu erhalten möglichst hohe Anzahl von Strichen (hohe Gitterperiode) oder sehr hohe Ordnung verwenden.

Freier Spektralbereich Gitter



Wegen der unterschiedlichen Ordnungen (m) komme es zu Überschneidungen der Spektrallinien.

Der Wellenlängen-Bereich zwischen den Ordnungen wird „**Freier Spektralbereich** oder „**Free spectral range**“ (FSR) genannt.

Aus Gittergleichung $\Delta\theta = \frac{\lambda}{g \cdot \cos\theta_m}$ in Wellenlängen $\Delta\lambda = \frac{\Delta\theta}{D} = \frac{\lambda}{m}$ $FSR = \frac{\lambda}{m}$

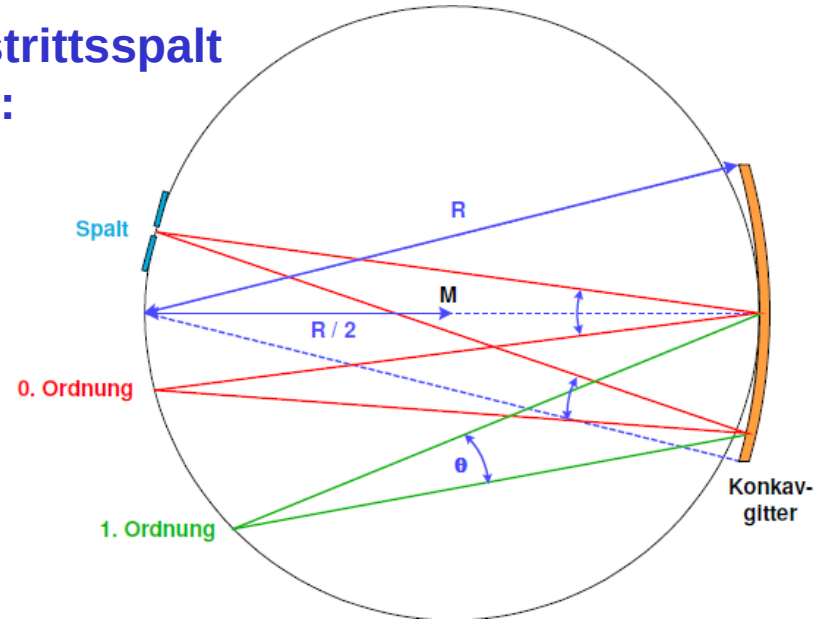
(10.9)

Die Abbildung von Eintritts- auf Austrittsspalt muss bzgl. Bildfehler korrigiert sein:

Rowland – Anordnung:

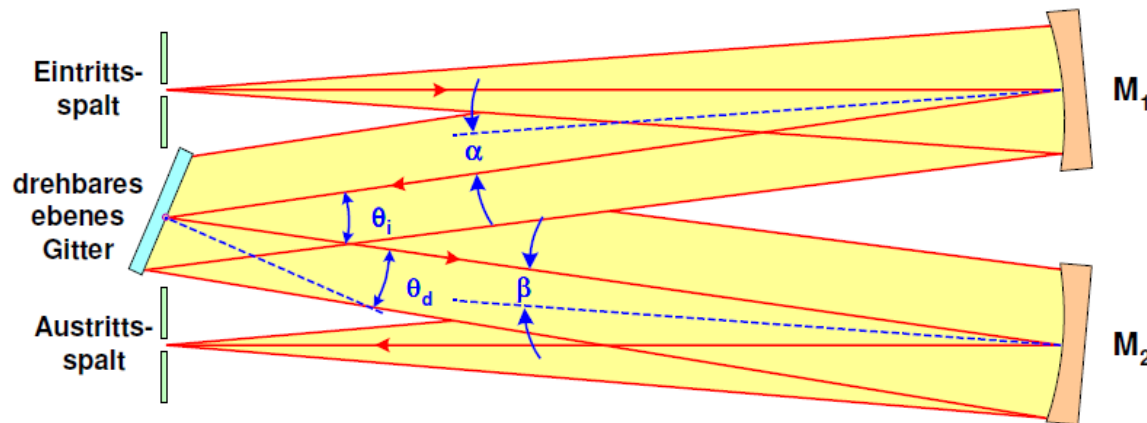
Zylindrisch gekrümmtes Gitter – Radius R :

→ Aberrationsfreie Spaltbilder entstehen auf einem Kreis mit Radius $R/2$



Czerny-Turner (Ebenes Gitter)

Korrektur durch Symmetrie



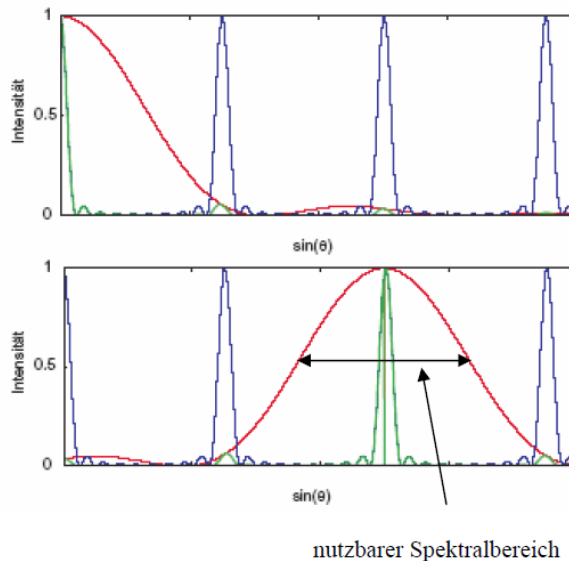
Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

Für hohe Auflösung ist eine hohe Beugungsordnung wünschenswert.

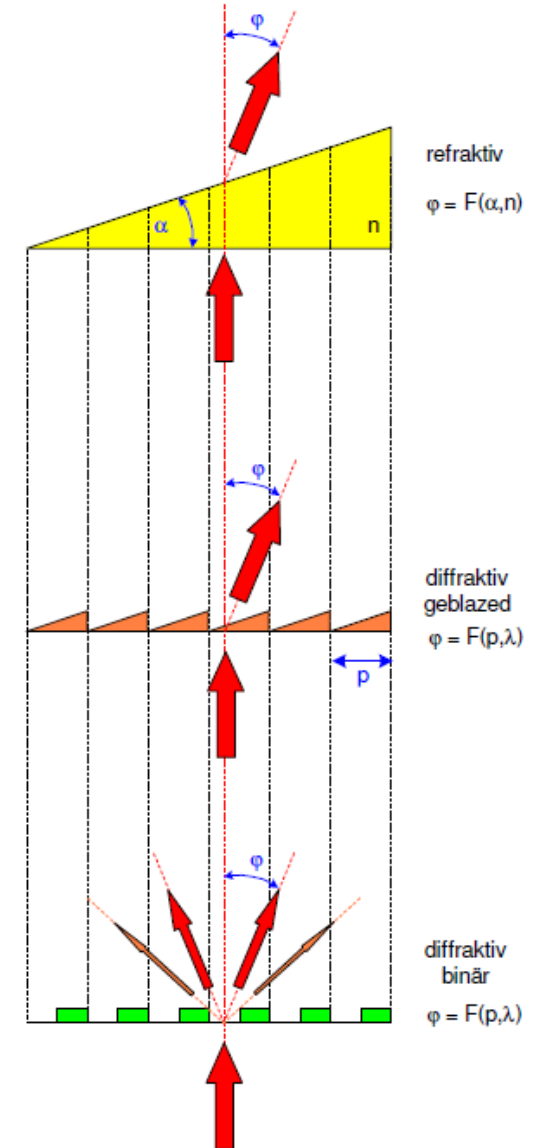
Problem → Beugungseffizienz

Lösung → Blaze-Gitter

(alles Licht in
eine Ordnung)



- **refraktiv**
keine Oberflächenstru
- **diffraktiv geblazed**
nur eine Beugungsord
- **diffraktiv binär**
mehrere Ordnungen



Reflexions-Gitter

$$\sin \theta_m + \sin \theta_0 = m \cdot \frac{\lambda}{g}$$

Littrow-Bedingung

Beugungswinkel
= Einfallswinkel

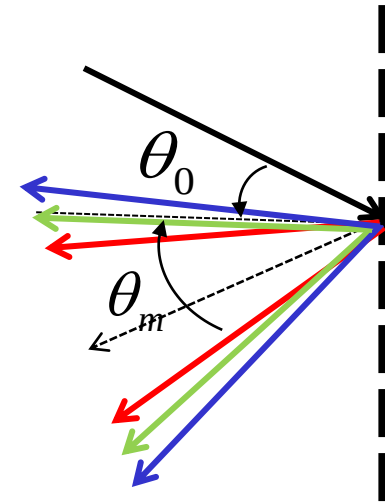
$$\sin \theta_m = \sin \theta_0$$

$$2 \cdot \sin \theta_L = m \cdot \frac{\lambda}{g} \quad (10.10)$$

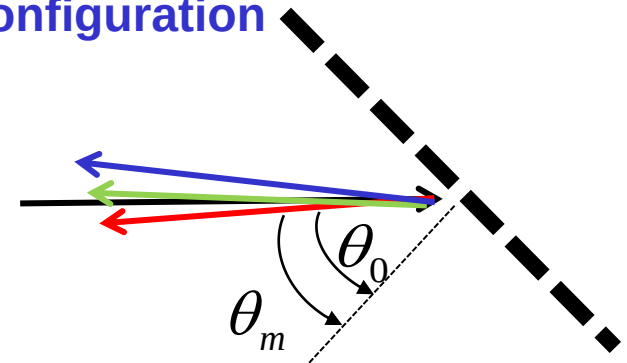
Dispersion

$$D = \frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{m}{g \cdot \cos \theta_L} = 2 \cdot \frac{\tan \theta_L}{\lambda}$$

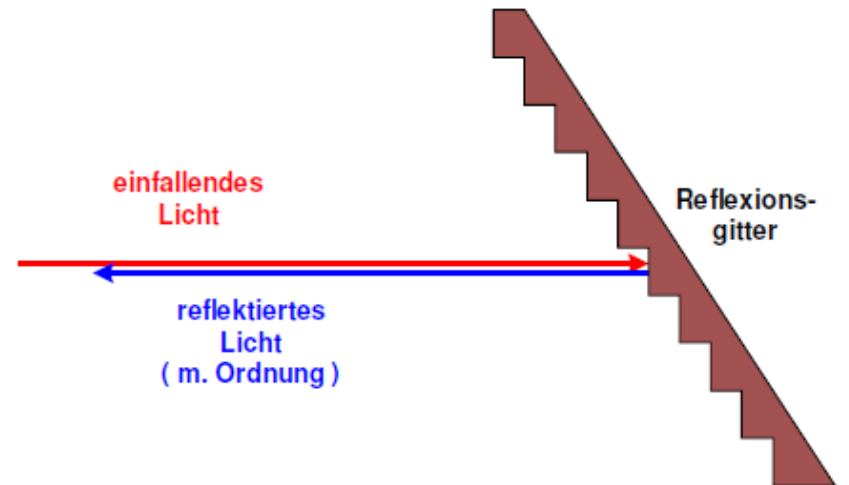
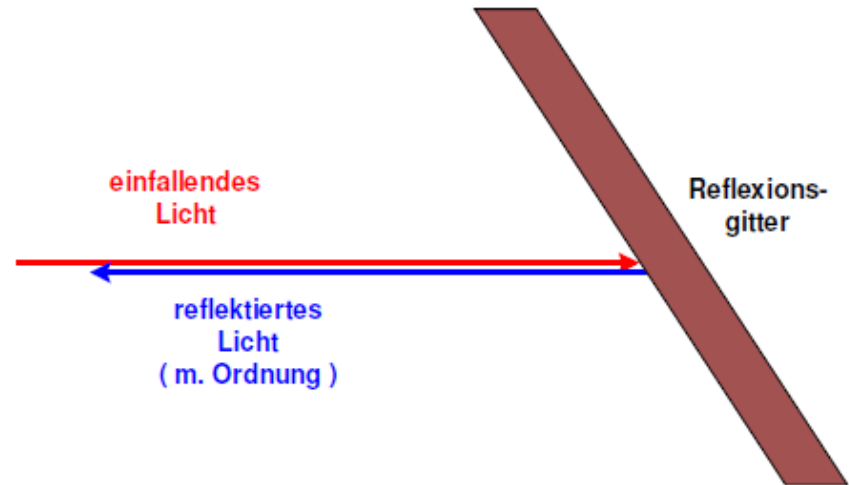
- ➔ nur von Gitter-Neigungswinkelabhängig
- ➔ Hoher Winkel kann über hohe Blaze-Ordnung erreicht werden (Typ. 50-100 Ordnung)



Littrow-Konfiguration



- Makroskopische Sicht :
Strahlengang nicht plausibel
- Mikroskopische Sicht des Blaze-gitters :
reguläre Reflexion an jeder
Wirkflanke,
Stufenhöhe gibt Beugungsordnung
an



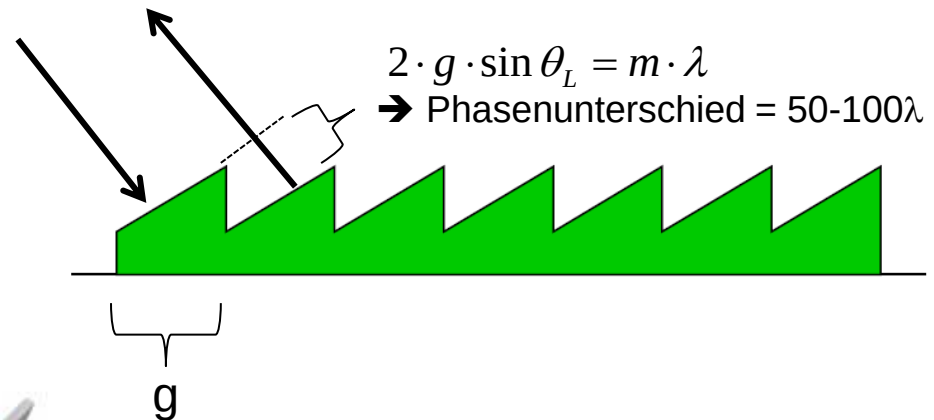
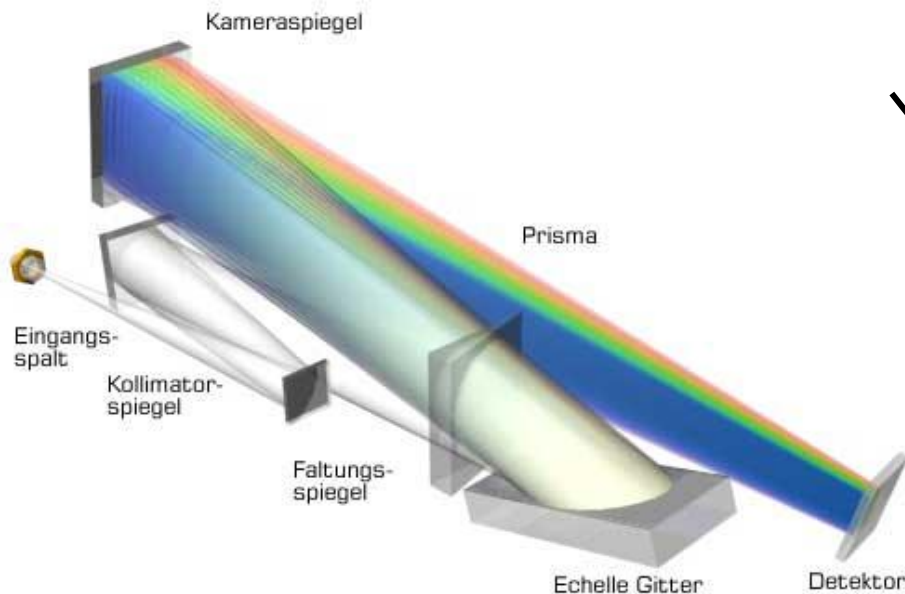
Typische Ausführung von Echelle-Gittern:

Niedrige Periode z.B. 80Linien/mm $\rightarrow g=12.5\mu\text{m}$

Hohe Blaze-Winkel / Ordnung: z.B. für $\theta_L=60^\circ \rightarrow$ Ordnung $m=72$ ($\lambda=300\text{nm}$)

$\rightarrow$ Sehr hohe Winkeldispersion $D = \frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{m}{g \cdot \cos \theta_m} = 2 \cdot \frac{\tan \theta_L}{\lambda} = 0.6^\circ / \text{nm}$

$\rightarrow$ Hohe spektrale Auflösung: z.B. 100mm-Gitter $\rightarrow A = \frac{m \cdot L}{g} = 5.7 \cdot 10^5$



Quelle: www.ltb.com

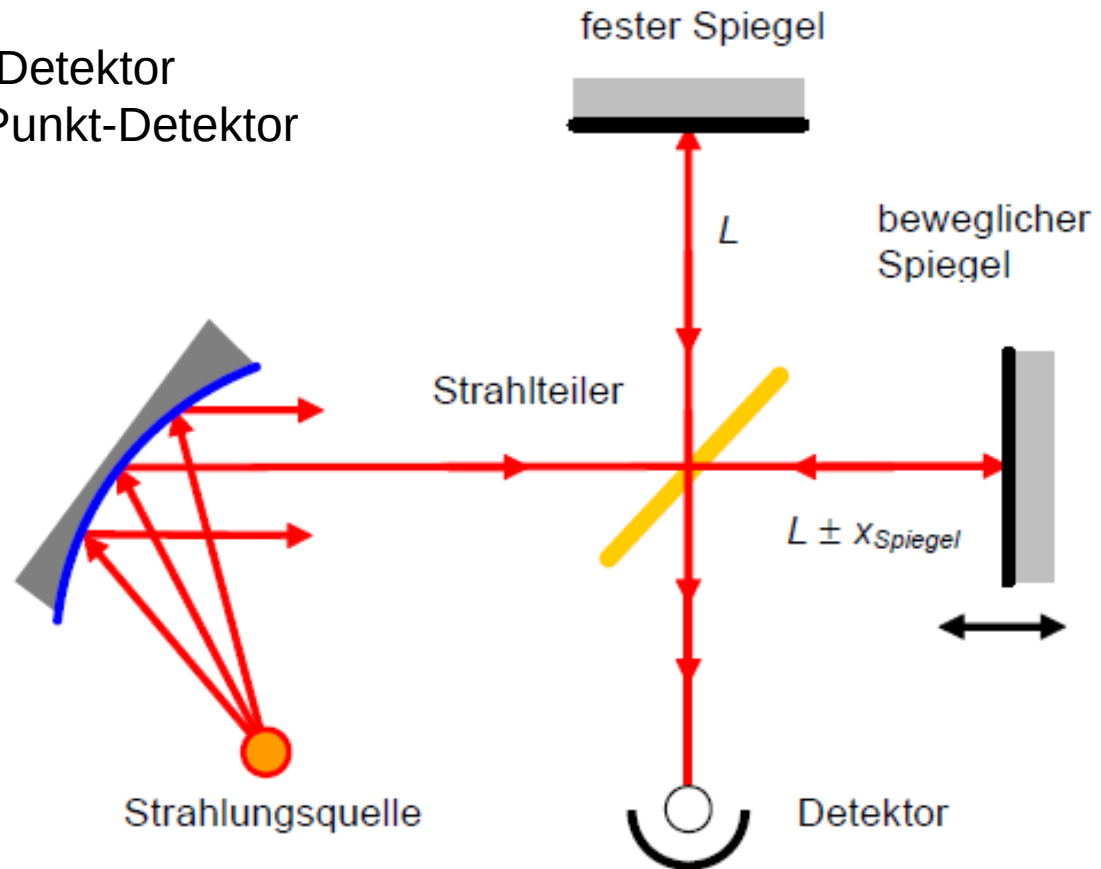
Fourier-Transform Spektrometer



Fourier-Transform-Spektrometer

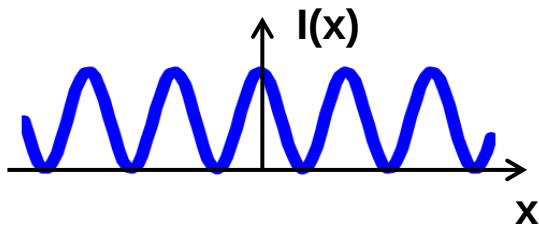
→ basiert auf einem Interferometer

Vorteil: Es ist kein Linien-Detektor
sondern nur ein Punkt-Detektor
zur Analyse nötig

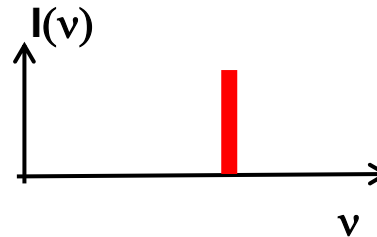


Monochromatisches Licht

→ Detektorsignal

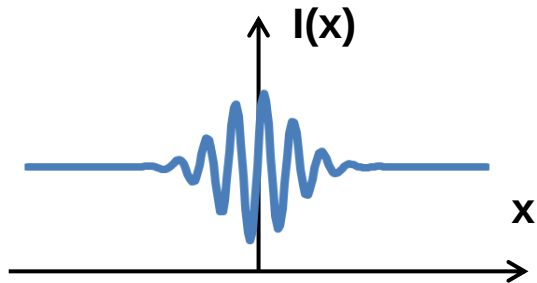


→ Fourier-Transformierte

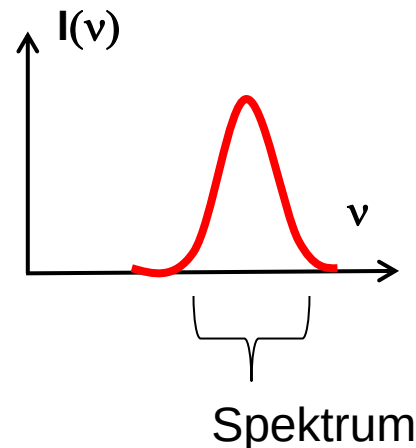


Polychromatisches Licht

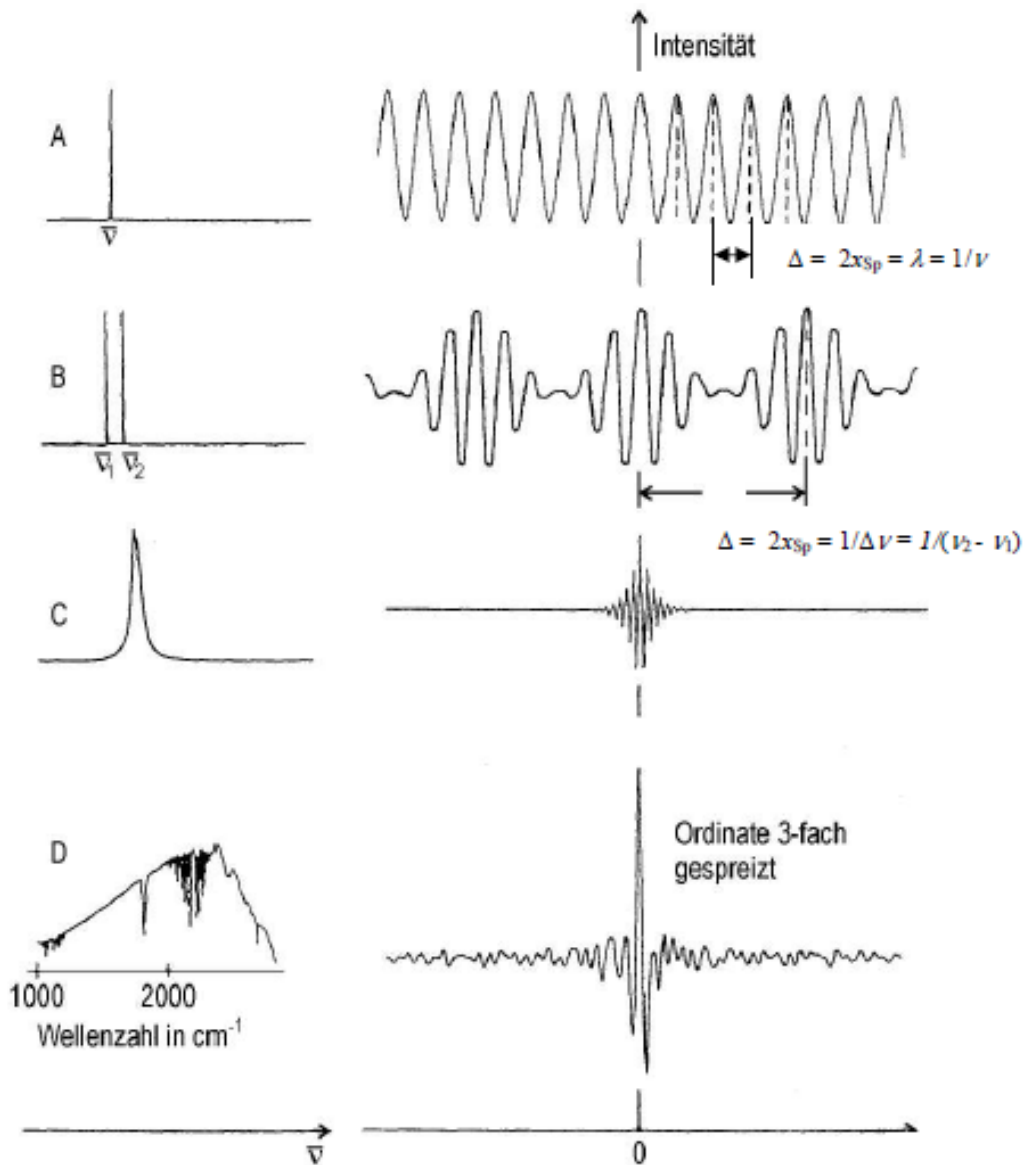
→ Detektorsignal



→ Fourier-Transformierte

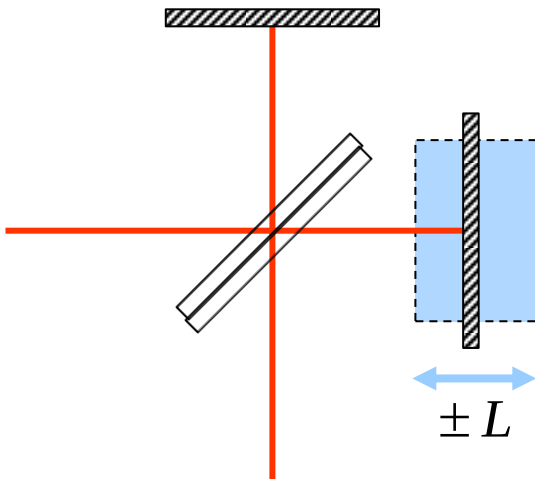


Spektren und
entsprechende
Detektorsignale am
FT-Spektrometer



Spektrale Auflösung FT-Spektrometer

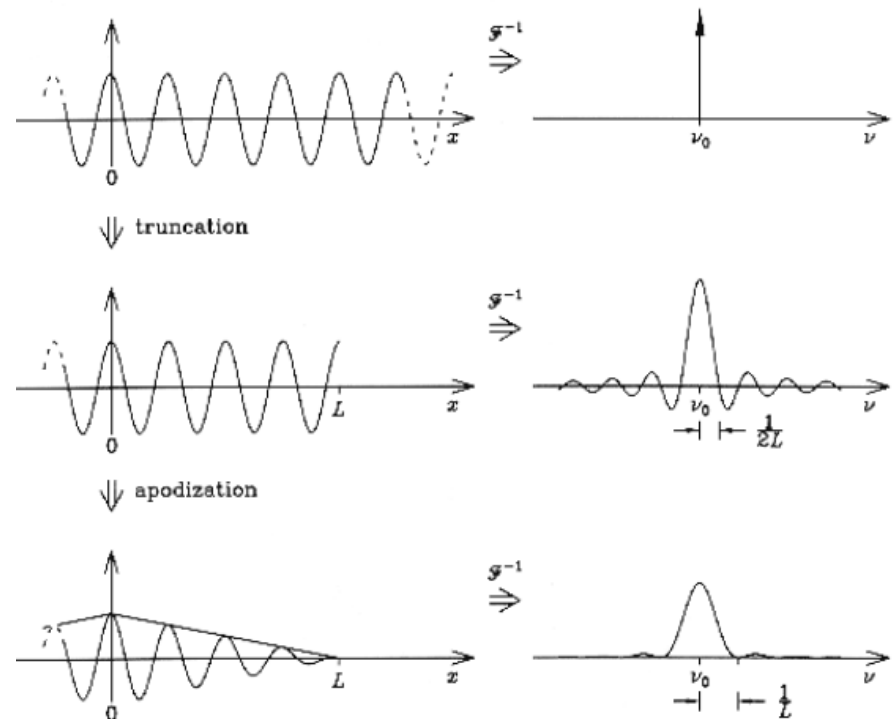
Die **Auflösung der FT-Spektrometers** hängt von der maximalen Weglängendifferenz des Interferometers zusammen:



$$\Delta \tilde{\nu} \approx \frac{1}{2L}$$

(10.11)

Monochromatisches Licht



10. Spektroskopische Methoden

10.1 Spektroskopie

10.2 Spektrometer

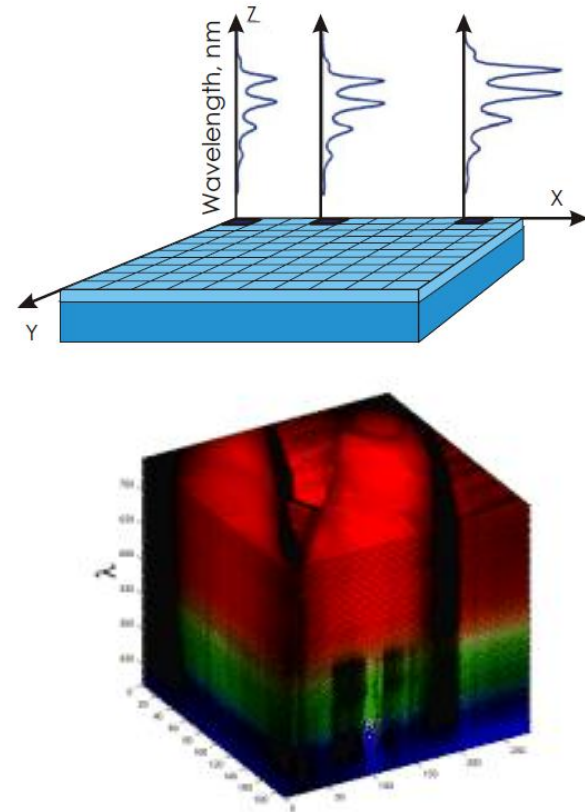
10.3 Hyperspektrale Bildgebung

10.4 Spektroskopische Methoden in der Mikroskopie

Hyperspectral Imaging = Bild bei verschiedenen Frequenzen
(Abbildung + Spektrum)



Frühdiagnose von
Durchblutungsstörungen bei Diabetis

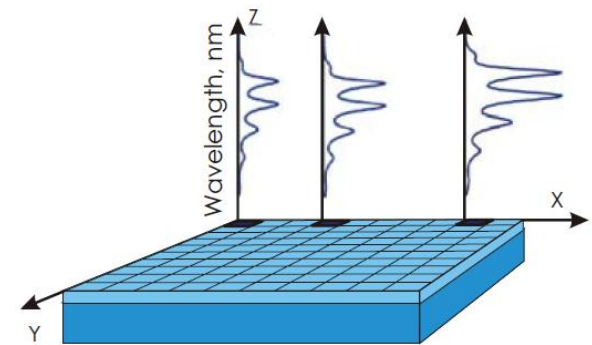
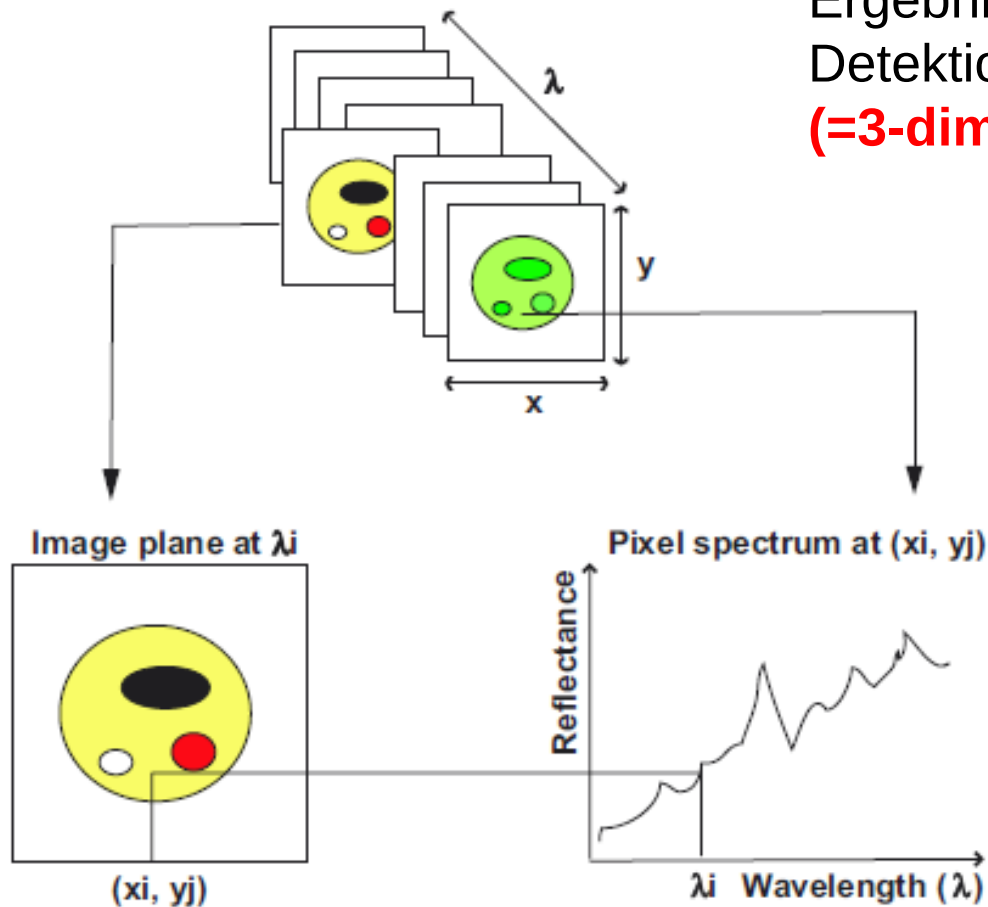


Bilder: <http://panaworks.com/lana/hyper/diabetes.htm>

Hyperspektrales Bild = Daten-Würfel

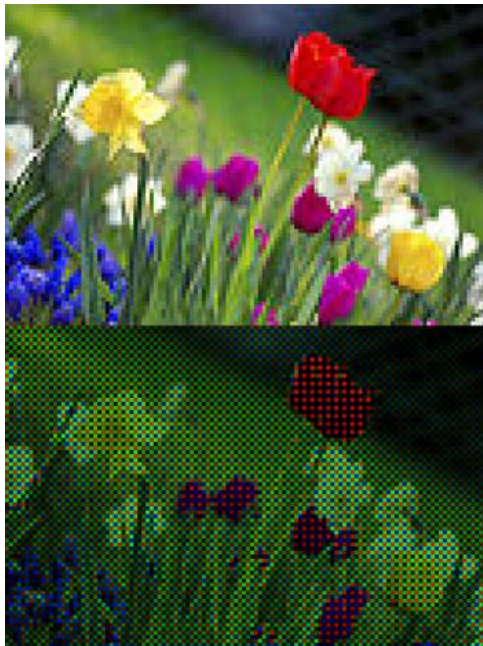
Ergebnis der hyperspektralen Detektion ist ein **Daten-Würfel**
(=3-dimensionale Matrix)

Datenwürfel, zeigt Relation zwischen lateralen und spektralen Dimensionen.

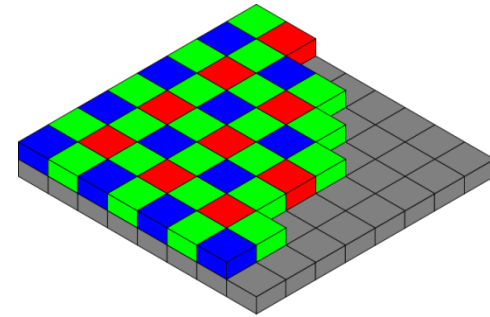


Quelle: A.A. Gowen et al. / Trends in Food Science & Technology 18 (2007) 590–598

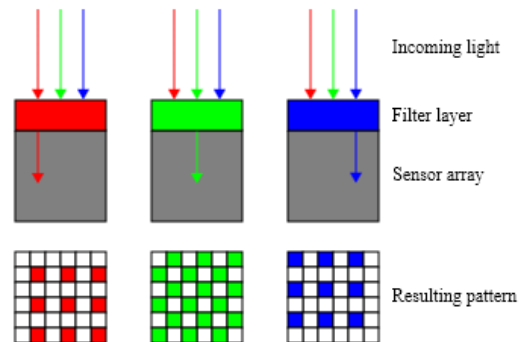
**Einfache Hyperspektrale
Bildgebung**
= Bild bei verschiedenen
Farben
→ Farb-Kamera (RGB)



Standard:
3-Farben (RGB) → Bayer-Filter



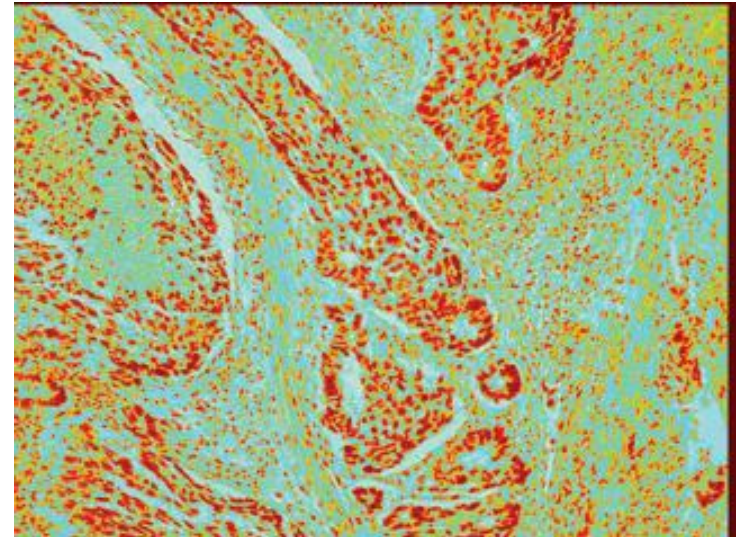
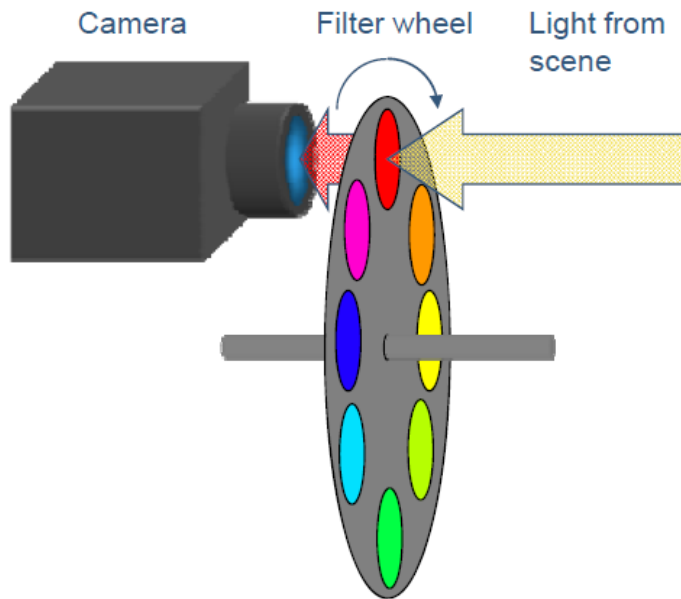
Wikimedia – User:Cburnett



Filterrad-Prinzip

Für mehr Farbkanäle:

→ **Filterrad** (=zeitl. Spektrum)



Lungenkrebs mit 8-Band
Filterrad und Mikroskop.

Quelle:

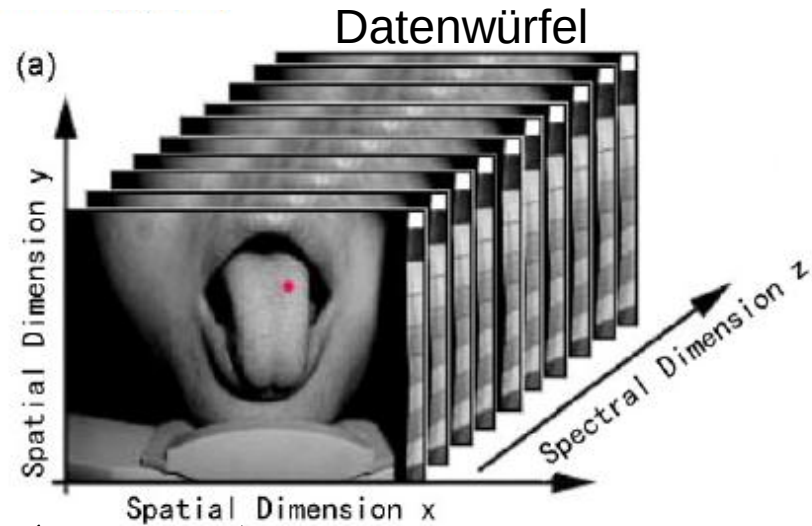
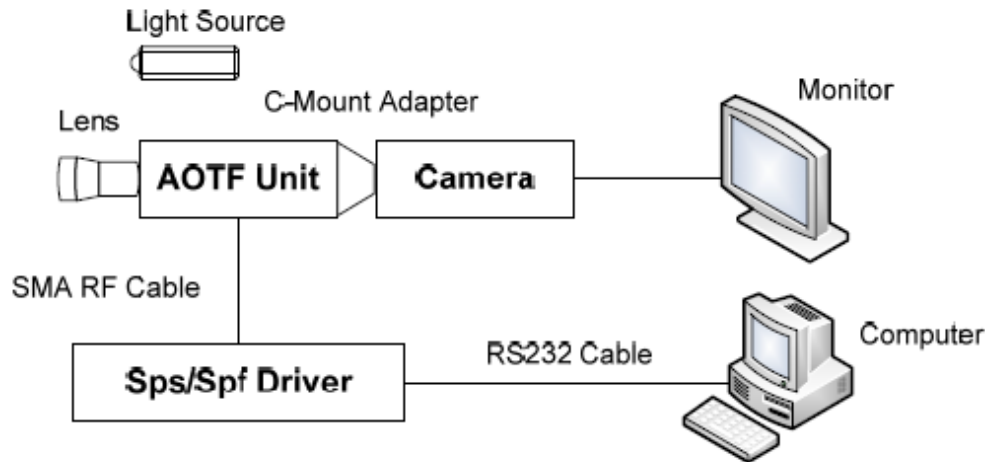
April 2012 | 21



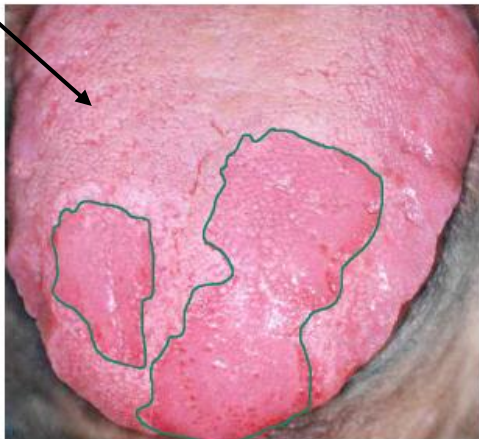
SpectroCam mit 8 Filtern,
350nm bis 1.000 nm

Schnelle Filter: z.B. Akusto-Optische Filter

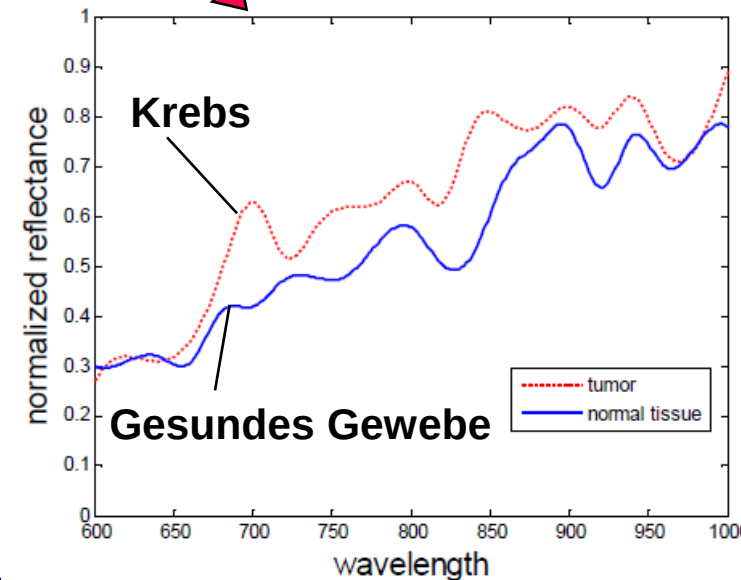
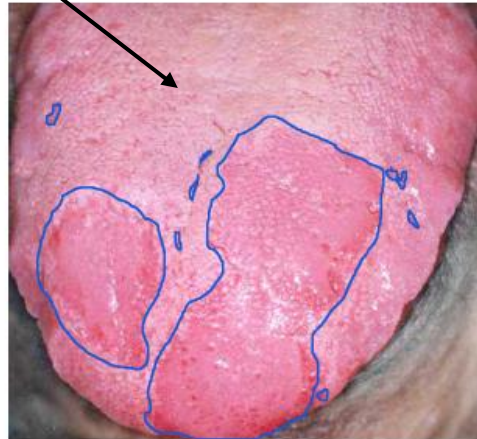
AOTF – Acousto-optic tunable Filter
600 nm -1000 nm, Fa. Brimrose



Experten-Meinung

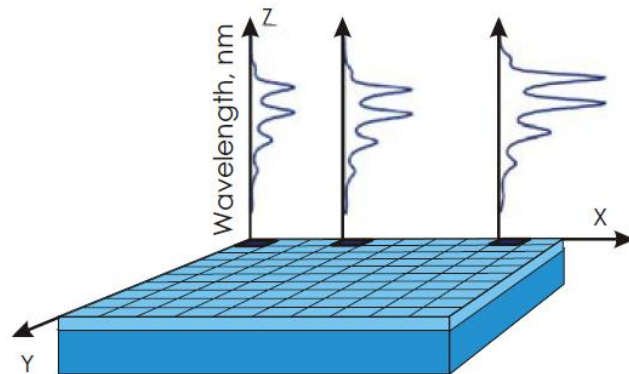


Classifier-Ergebnis



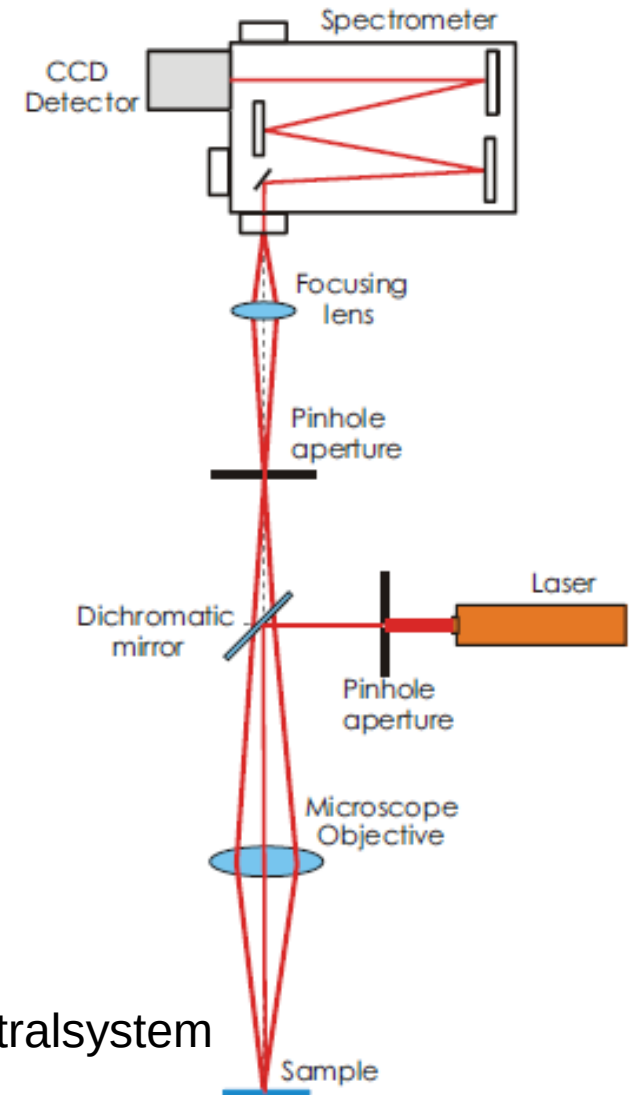
Grundproblem → Insgesamt 3 Dimensionen
Bild (x, y) & Wellenlänge

→ Detektoren sind aber 2-dimensional

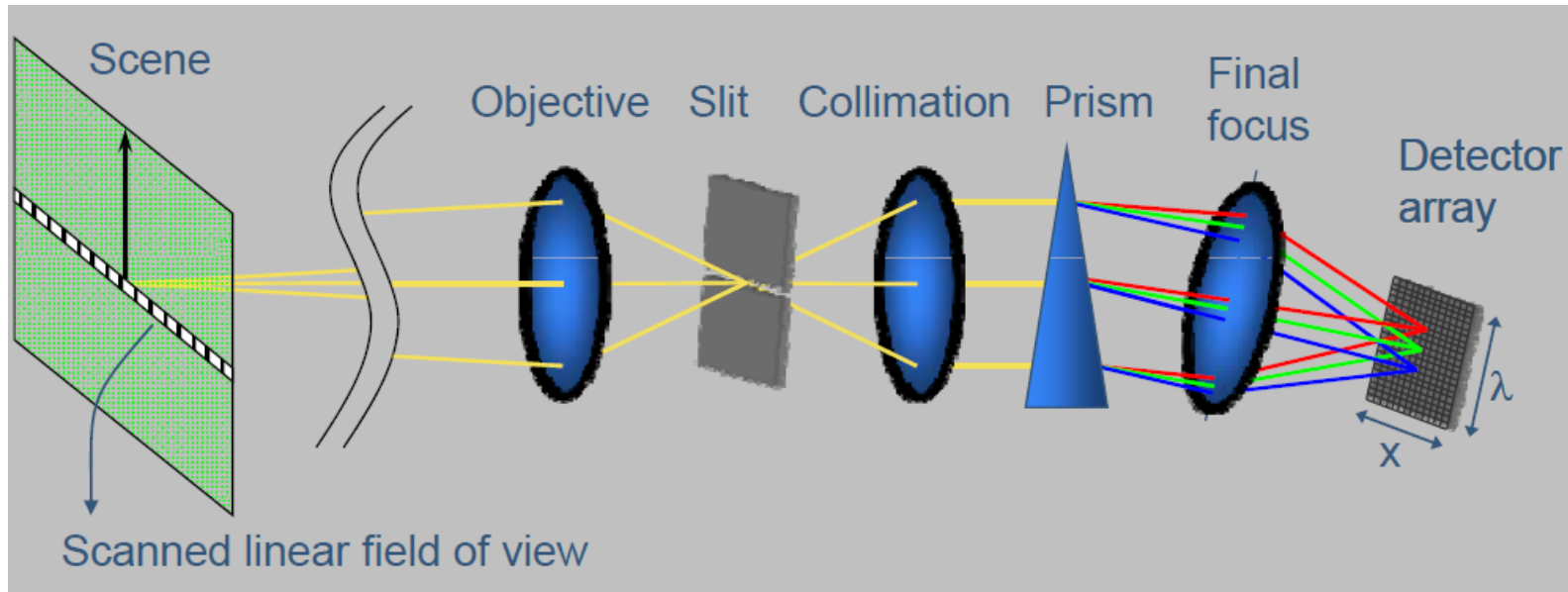


→ Scannendes Verfahren

→ Z.B. Konfokales Hyperspektralsystem



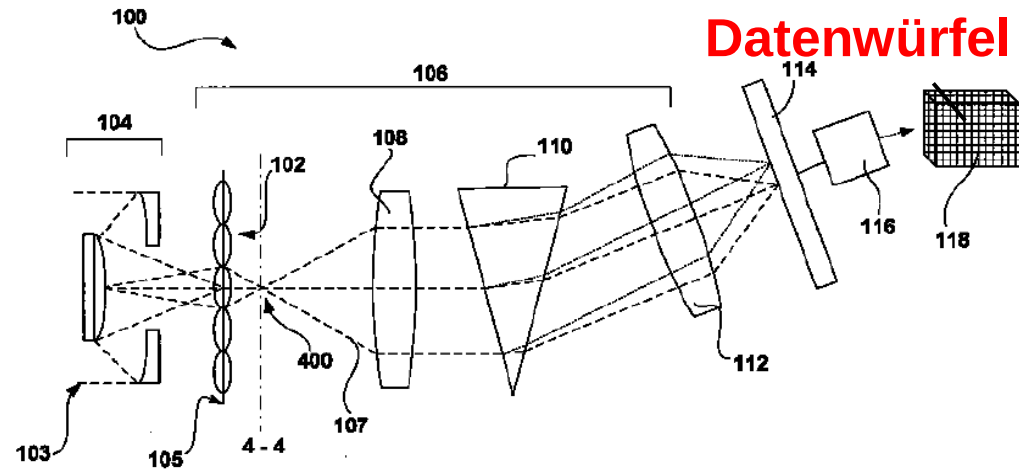
Linien-Scan Verfahren – Pushbroom Scan



Array Verfahren

**Spektrale Abtastung
des Objekts mit Hilfe eines
2D-Arrays**

- ➔ Flächenhaft
- ➔ Jedes Array besteht aus mehreren
spektralen Pixeln



Produkt-Beispiel:

VNIR-20B von Bodkin-Design

Data Cube:

spatial: 90 x 75

spectral: 20 (Channels)

Spectral Resolution: 11.2 nm

Spectral Range:

425 nm - 675 nm

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**
Bodkin et al.

(10) Pub. No.: US 2008/0088840 A1

(43) Pub. Date: Apr. 17, 2008

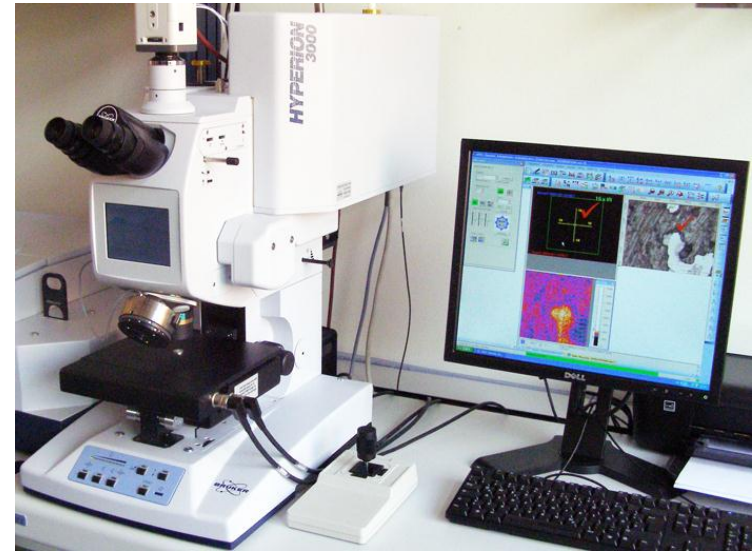
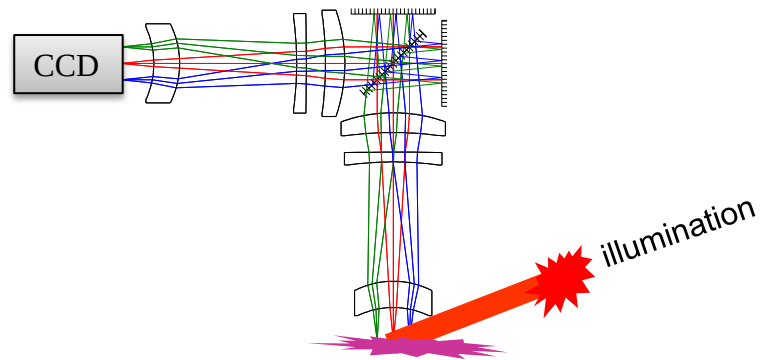


VNIR-20B

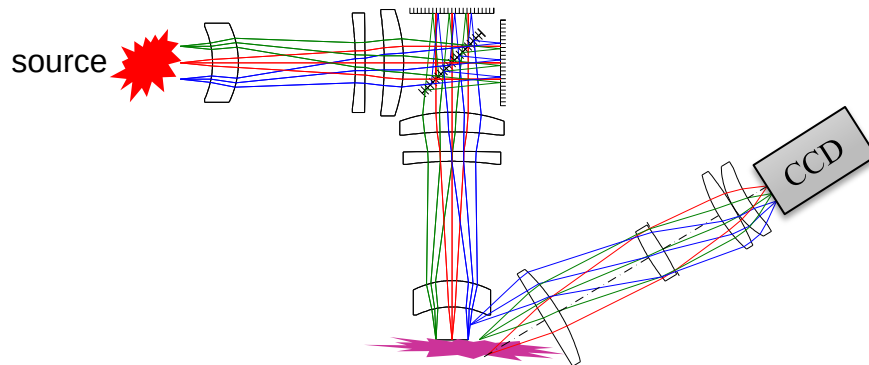
VIDEO RATE HYPERSPECTRAL IMAGER

FT-IR-Imaging Methoden

Interferometer im Abbildungsstrahlengang

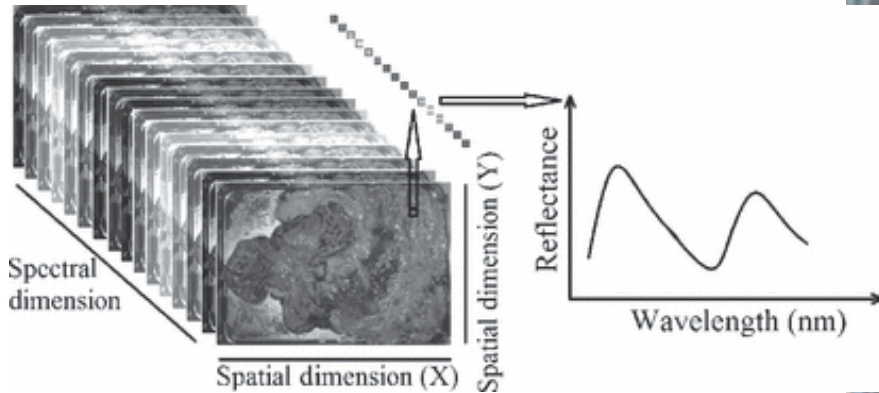


Interferometer im Beleuchtungsstrahlengang



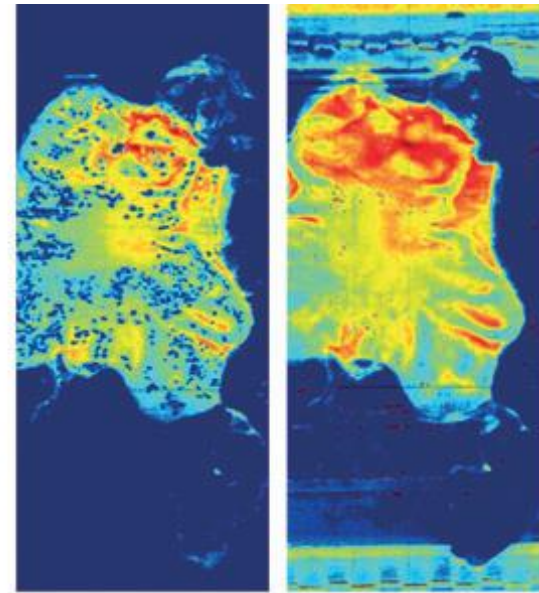
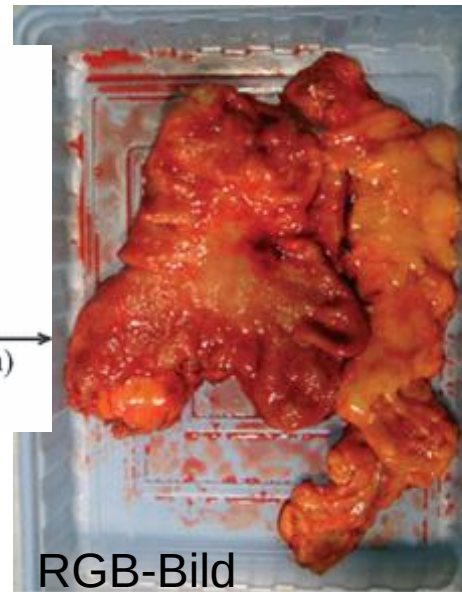
Bundesanstalt für Materialforschung

Beispiel Anwendung: Magenkrebs

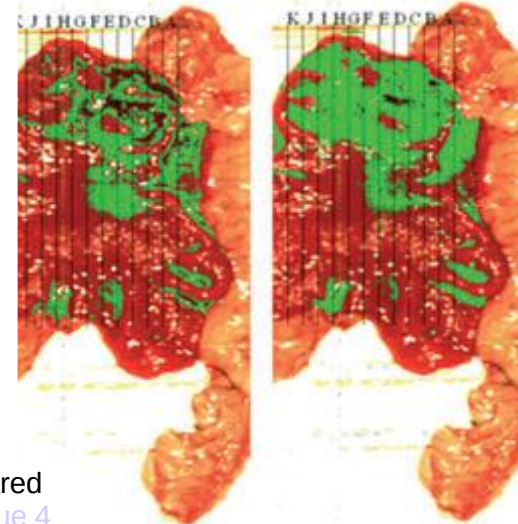


Datenwürfel

Hardware: ImSpector Spectral Camera, SW ver 2.739 (Spectral Imaging Ltd, Oulu, Finland)



mit NDCI
(normalized cancer
index)

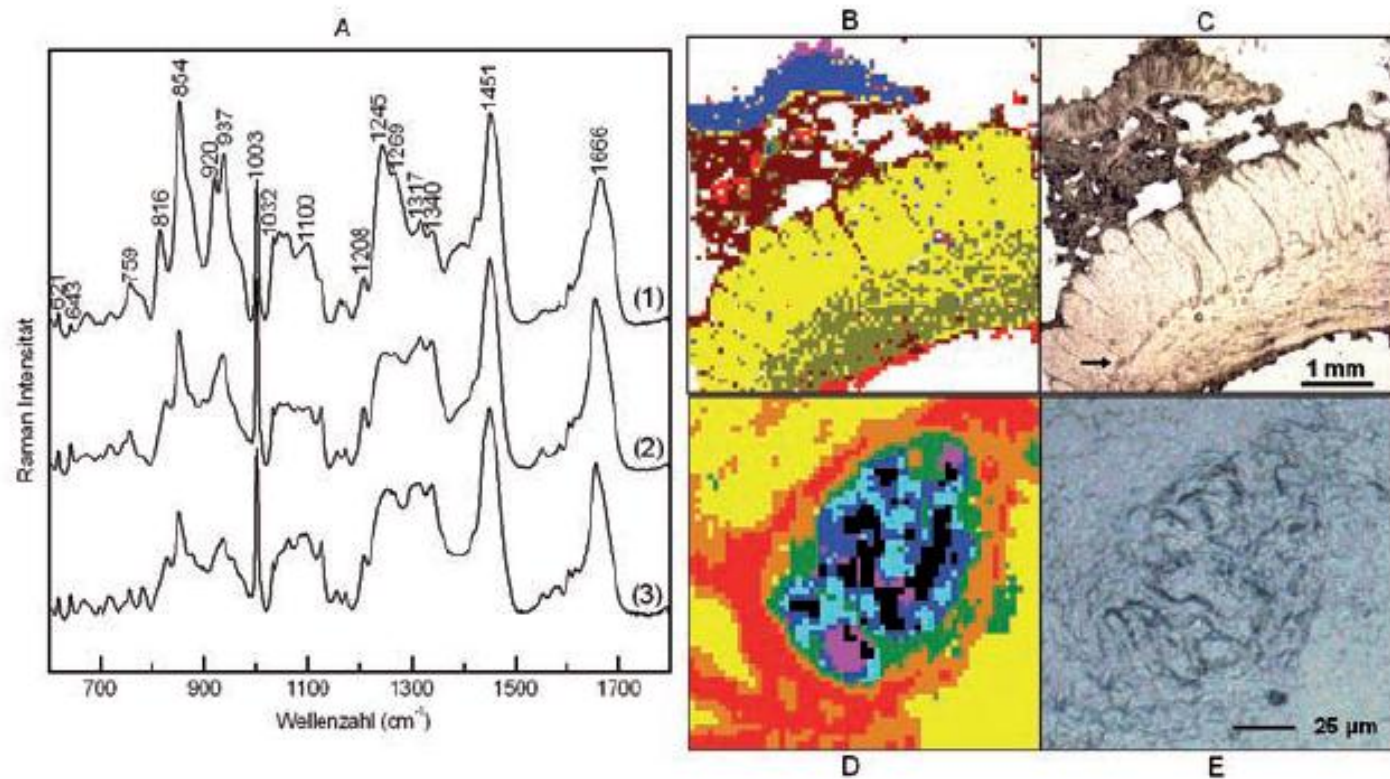


Krebsdetektion

(a) the RGB image; (b) the cancer enhanced regions using integral filter in the hyperspectral image (1057– 2440 nm), the tissues are shown in a blue to red spectrum and the red regions represent the tumor; (c) the cancer enhanced regions using NDCI.

NDCI is the normalized cancer index.

Quelle: Hamed Akbari et al., Cancer detection using infrared hyperspectral imaging, **Cancer Science** [Volume 102, Issue 4](#)



▲ **Abb. 1:** Raman-Spektroskopie einer getrockneten Darmprobe. **A**, repräsentative Raman-Spektren von Bindegewebe (1), Muskelgewebe (2) und Epithelgewebe (3). **B**, 79×79 -Raman-Map mit einer Schrittweite von $62 \mu\text{m}$. **D**, 59×59 -Raman-Map mit einer Schrittweite von $2,5 \mu\text{m}$. Die Farben in den Raman-Maps entsprechen der Gruppenzuordnung einer Cluster-Analyse. **C**, Der Pfeil in der lichtmikroskopischen Aufnahme zeigt die Position eines Ganglions. **E**, vergrößertes Ganglion aus **C**.

10. Spektroskopische Methoden

10.1 Spektroskopie

10.2 Spektrometer

10.3 Hyperspektrale Bildgebung

10.4 Spektroskopische Methoden in der Mikroskopie

Mikroskopie

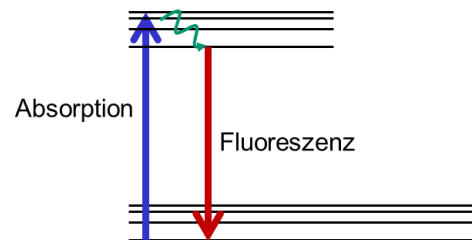
Prinzipiell können alle spektroskopischen Methoden mit Mikroskopie kombiniert werden.

Problem:

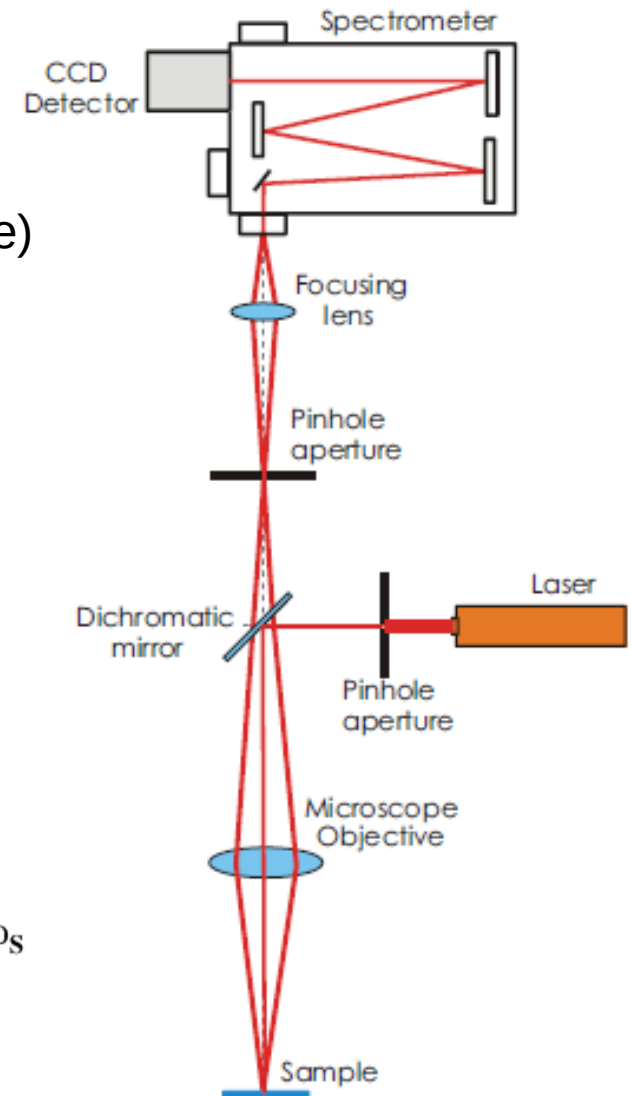
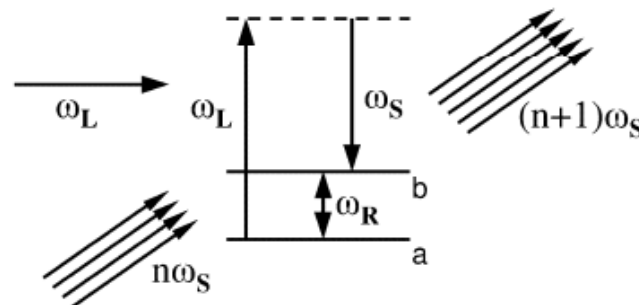
Geringe Signalstärke (z.B. bei Raman-Spektroskopie)

→ Resonante Methoden bieten höhere Signalstärke

→ Laser-Induzierte Fluoreszenz (LIF)



→ Stimulierte Raman Streuung (SRS)



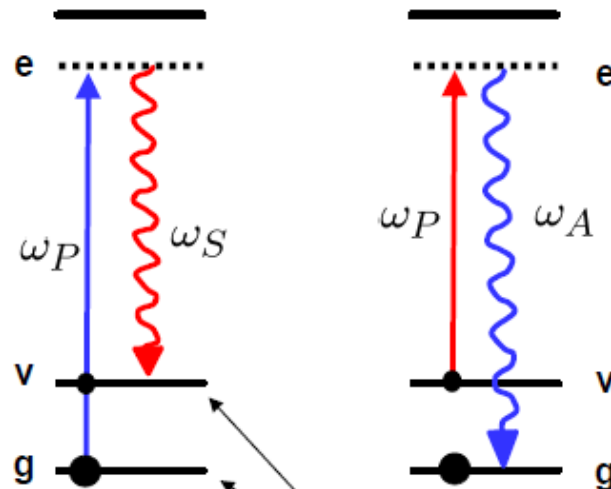
CARS – Spektroskopie

CARS =
„Coherent anti-Stokes Raman Scattering“

Raman-Prozesse

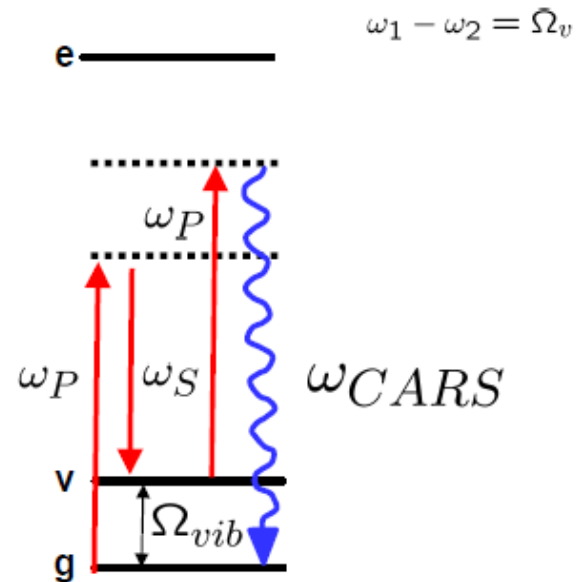
Stokes-Photon

Anti-Stokes-Photon



Ortsaufgelöste Detektion spontaner Raman-Photonen schwierig aufgrund des kleinen Wirkungsquerschnitts des Prozesses
Stattdessen:

Kohärente Erzeugung eines Anti-Stokes-Photons durch 3-Wellenmischung
(resonante Anregung einer Vibrationsmode)



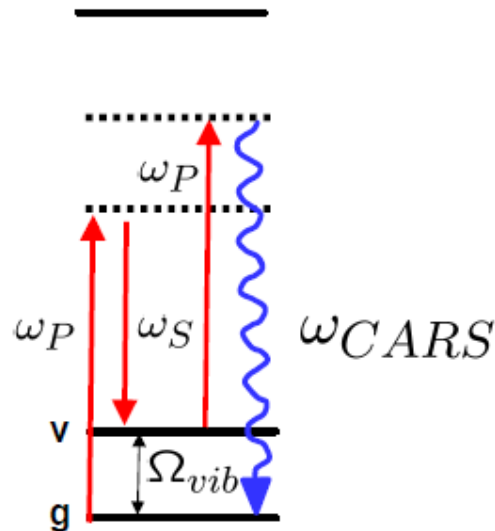
CARS – Spektroskopie

Energie- und Impulserhaltung verlangt

$$2\omega_P = \omega_S + \omega_{CARS}$$

$$2\vec{k}_P = \vec{k}_S + \vec{k}_{CARS}$$

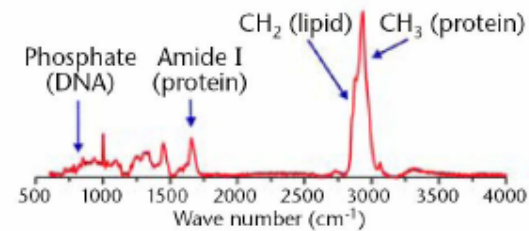
(Phasenanpassungsbedingung)



Intensität des CARS-Signals:

$$I_{CARS} \propto (I_P)^2 I_S$$

Ramanspektrum, gemessen an HeLa-Zellen



(ν_{vib} = einige 10^{13} Hz)

Vorteile von CARS:

- Signalfrequenz > Anregungsfrequenz
- Anregung mit nahinfrarotem Licht möglich

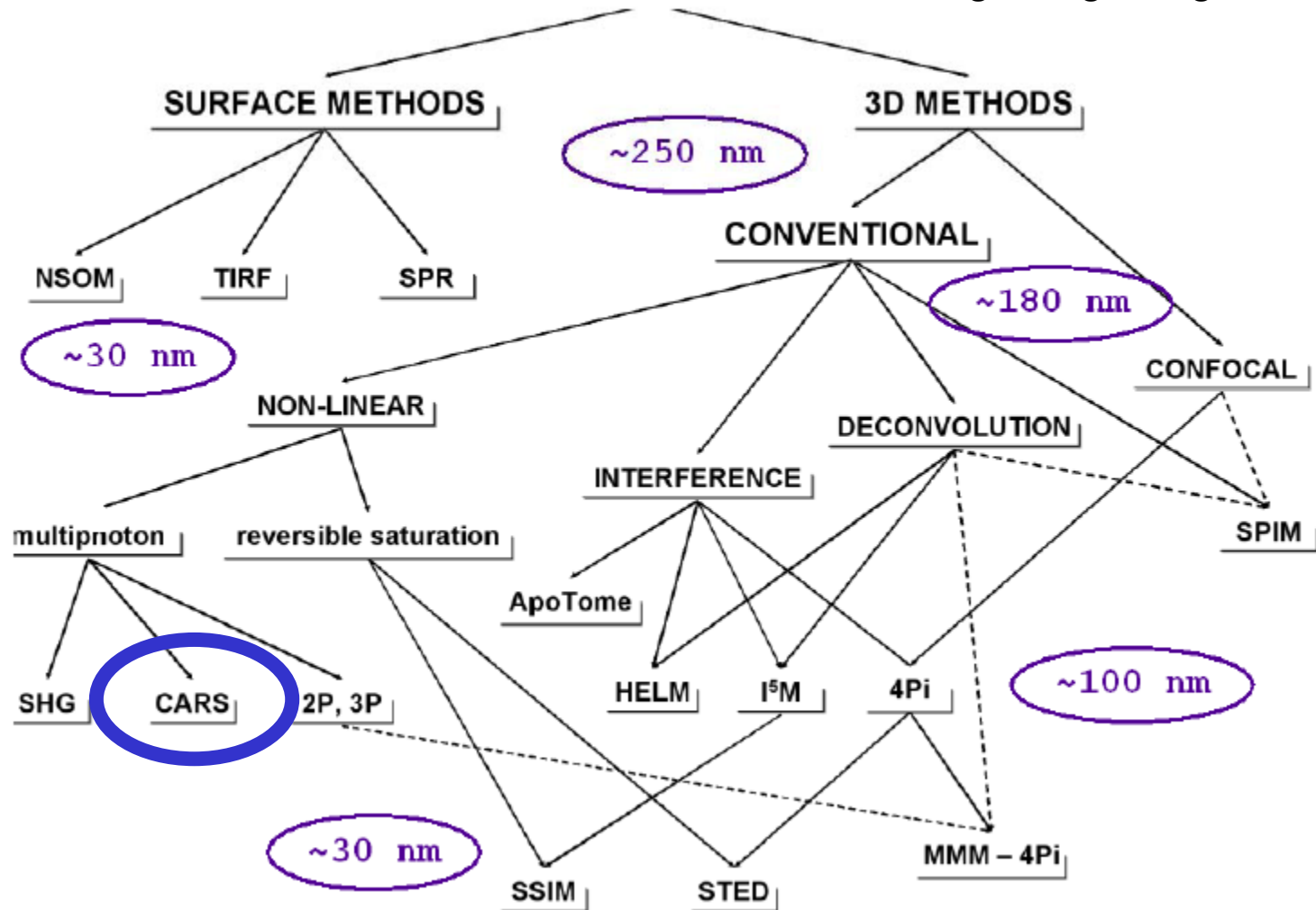
CARS

- benötigt hohe Lichtintensitäten
- Anregung mit Pikosekundenpulsen
- erfordert Synchronisation von 2 Pikosekunden-Lasern

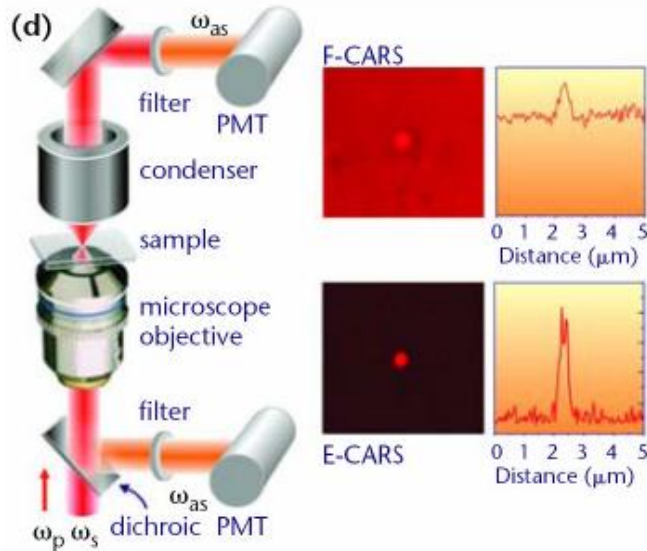
CARS zur Auflösungssteigerung

CARS ist ein Mehr-Photonen-Prozess

- ➔ Anregung nur im Fokus (wenige nm)
- ➔ Auflösungssteigerung

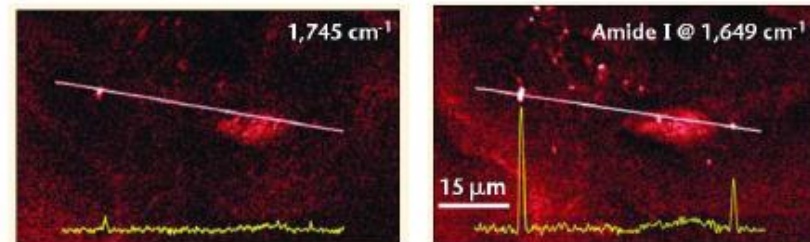


CARS – Mikroskopie



Detektion bestimmter Molekülschwingungen
wie z.B. von -OH, -CH, -CH₂ Gruppen

Bsp.: Proteinverteilung in
Epithel-Zellen.
CARS-Signal bei
1745 und 1649 cm⁻¹



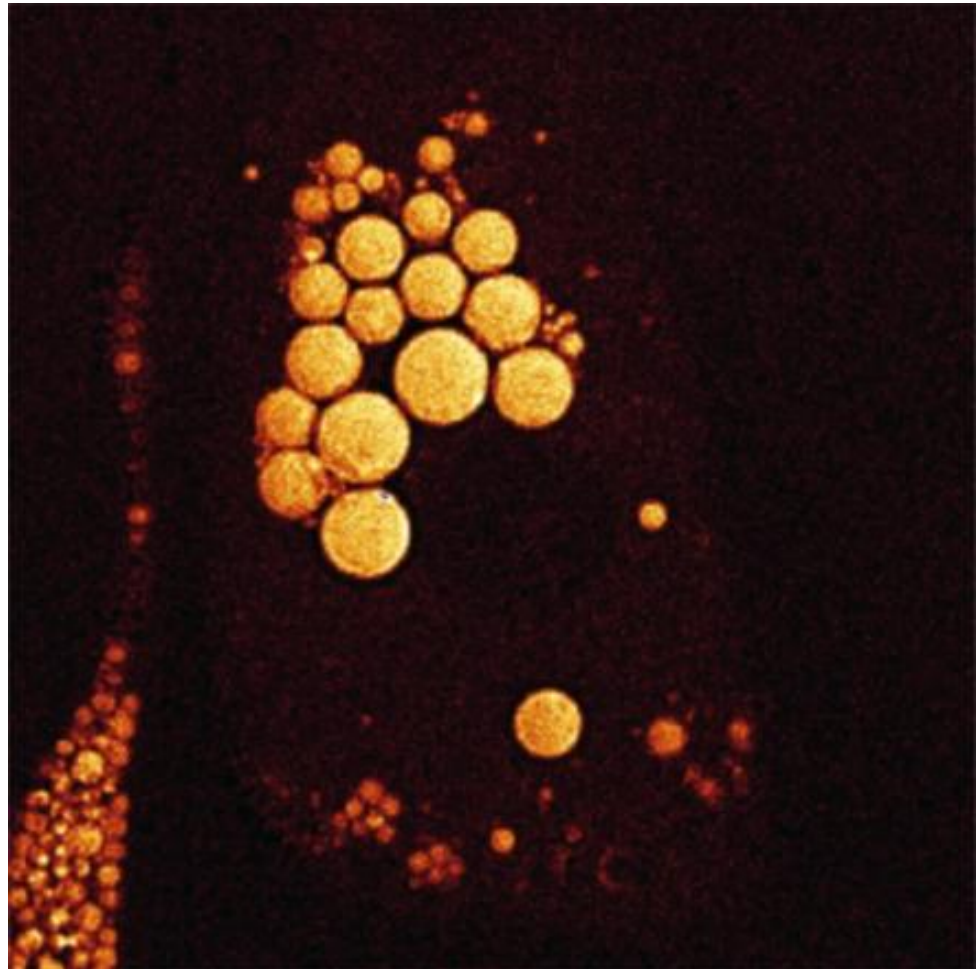
(Cheng et al., Opt. Lett. **26**, 1341 (2001))

CARS erlaubt extrem gute Selektion von bestimmten Molekülen (z.B. Fett)

→ Molecular Imaging

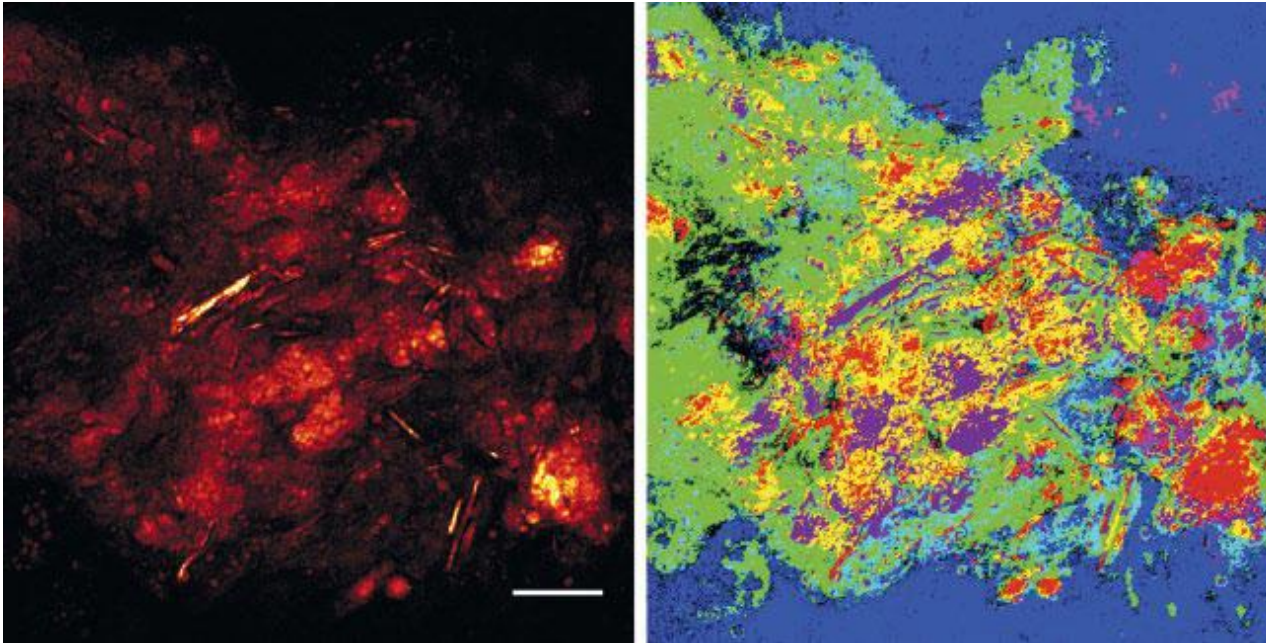
Ähnliche Methoden:

- **SARS**
(Stimulated Anti Stokes Raman Scattering)
- **TERS**
(Tip enhanced Raman Scattering)
- Nahfeldmethode



Fetttröpfchen in einer Fettzelle mit CARS-Mikroskop

<http://gold.uni-graz.at/cars.html>



<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/opph.201290015/pdf>

CARS-Abbildung einer atherosklerotischen Läsion in einer Mauseorta.

Links eine normale CARS-Aufnahme

Rechts: Die spektrale Zerlegung des CARS-Signals