

Bildgebende Differenz-Raman-Spektroskopie mit "Nod and Shuffle"-Technik

Elmar Schmälzlin¹, Tanya Urrutia¹, Florian Korinth², C. Stiebing², C. Krafft², J. Popp^{2,3} und Martin M. Roth¹

¹Leibniz-Institut für Astrophysik (AIP), Potsdam

²Leibniz-Institut für Photonische Technologien e. V., Jena

³Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena
Kontakt: eschmaelzlin@aip.de

Einleitung

Trifft monochromatisches Laserlicht auf eine Probe, so entstehen im Streulicht Farbverschiebungen, die mit den Schwingungsniveaus von Molekülen korrespondieren. Ein Ramanspektrum stellt somit einen Fingerabdruck dar, mit dem sich chemische Substanzen markerfrei identifizieren lassen. In Bezug auf die Wellenlänge treten Ramanbanden relativ zum Anregungslaserlicht auf. Ramanspektroskopie ist bei geeigneter Wahl der Laserwellenlänge insbesondere für biologische Proben geeignet, deren schwingungsspektroskopischer Fingerabdruck aufgrund der Absorptionseigenschaften von Wasser nicht mit der traditionellen Infrarotabsorptionsspektroskopie untersucht werden kann [1]. Allerdings sind Ramansignale relativ intensitätsschwach und die Überlagerung mit Störuntergrund stellt oft eine Herausforderung dar. Gerade biologische Proben weisen oft eine sog. natürliche Autofluoreszenz auf, die die Ramansignale intensitätsmäßig um mehrere Größenordnungen übersteigt. Die Abtrennung des Untergrunds erfolgt meistens durch eine mathematische Nachbehandlung der Messkurven.

Eine Verbesserung stellt die Differenz-Raman-Spektroskopie (SERDS, shifted excitation Raman difference spectroscopy) dar. Bei dieser Technik werden zwei Ramanspektren hintereinander mit leicht unterschiedlichen Anregungswellenlängen λ_1 und λ_2 aufgenommen [2]. Da sich die Ramansignale als Funktion der Anregungswellenlänge spektral verschieben, die Untergrundsignale dagegen nicht, ist das Differenzspektrum aus beiden Messungen idealerweise untergrundfrei. Durch die Differenzbildung werden nicht nur die Probenfluoreszenz, sondern auch noch weitere systematische Störeinflüsse, wie die Kurvencharakteristik optischer Filter, Empfindlichkeitsunterschiede auf den Detektorflächen und Umgebungslicht ausgeblendet. Aus dem Differenzspektrum, das von seiner Gestalt her einer ersten Ableitung entspricht, kann das Ramanspektrum durch einen geeigneten Integrationsalgorithmus rekonstruiert werden.

Voraussetzung für eine funktionierende Untergrundausscheidung ist aber, dass sich während der Aufnahme eines Messkurvenpaares weder die Probe noch die Untergrundsignale ändern. Gerade biologische Proben neigen bei Laserbestrahlung zum Ausbleichen und damit zu einer raschen Veränderung der Autofluoreszenz während der Messzeit. In der Praxis ist es daher vorteilhaft, viele kurze Einzelmessungen im Millisekundenbereich in schneller Folge aufzunehmen. Erfolgt die Aufnahme eines Messkur-

venpaares mit λ_1 und λ_2 in einem hinreichend kleinen Zeitraum, so sind alle Veränderungen vernachlässigbar klein und der Untergrund wird bei der Differenzbildung eliminiert.

Bei Einkanalspektrographen mit kleinen Detektoren und damit kurzen Auslesezeiten lässt sich ein schnelles Hin- und Herschalten einfach realisieren. Bei bildgebenden Spektrographen, die nach dem Prinzip der integralen Feldspektroskopie (IFS) arbeiten [3], werden aber großflächige CCD (charged coupled device)-Detektoren mit Auslesezeiten von über 1 min verwendet. IFS wird an astronomischen Observatorien verwendet, um komplette Bilder von kosmischen Objekten ohne Abtastprozess spektral aufgelöst in einem einzigen Belichtungsvorgang aufzunehmen und damit Zeit und Kosten zu sparen. Das Bild wird dabei optisch von einer sogenannten integralen Feldeinheit (IFU) in schmale Streifen zerlegt. Die Streifen werden dann vor dem ungewöhnlichen langen Eingangsspalt eines IFS-Spektrographen aneinandergereiht. Realisieren lässt sich das beispielsweise mit einem Faserbündel. In der probenseitigen Bildebene sind dabei die Faserstirnflächen in Form einer zweidimensionalen Matrix angeordnet. Auf der Spektrographenseite liegen die Fasern nebeneinander in einer Reihe. Die dispergierten Lichtspuren des Streifens werden auf einen großflächigen Detektorchip abgebildet. Aus dem Rohsignal generiert eine Software einen Datenkubus, der die vollständige räumliche und spektrale Information enthält. Der derzeit leistungsstärkste IFS Spektrograph "MUSE" [4] am Very Large Telescope Observatory in Paranal, Chile erfasst in einem Belichtungsvorgang 90.000 Bildpunkte mit einer spektralen Auflösung von 0,25 nm im Bereich von 465 bis 930 nm. Eine MUSE-Einheit mit 400 Bildpunkten wurde erfolgreich benutzt, um IFS in die bildgebende Ramanspektroskopie zu übertragen [5].

Um schnelle SERDS-Messfolgen nun auch mit einem großflächigen CCD-Detektor durchführen zu können, wird auf ein Verfahren zurückgegriffen, das in der Astronomie als "Nod and Shuffle" bekannt ist [6]. Dieses Verfahren wurde im PMAS-Instrument am Calar Alto Observatorium, Südspanien, erstmals als "interlaced Nod and Shuffle" implementiert und damit auch für bildgebende Spektroskopie verfügbar gemacht [7, 8]. In der erdgebundenen Astronomie gibt es das Problem einer zeitlichen und räumlichen Untergrundfluktuation, verursacht durch das Nachthimmelsleuchten: Durch das Sonnenlicht ionisieren und dissoziieren in der Ionosphäre tagsüber Gasmoleküle, die in der Nacht rekombinieren und dabei ein zeitlich variables

Emissionslinienspektrum aussenden. Zur Erfassung und zur anschließenden Eliminierung dieses Untergrundes, ist es erforderlich, eine Serie von Messkurvenpaaren (Signal des Himmelskörpers und Untergrund in unmittelbarer Nähe) mit kurzen Einzelmesszeiten in schneller Folge aufzunehmen. Zunächst wird das Signal des Himmelskörpers erfasst. Anschließend wird die Optik des Teleskops ein klein wenig verkippt (Nod), so dass der Untergrund in unmittelbarer Nähe des Himmelskörpers aufgenommen wird. Der CCD-Detektor wird vor der Untergrundmessung aber nicht ausgelesen. Stattdessen werden die Ladungen nur um ein paar Pixel in ungenutzte Zwischenräume verschoben (Shuffle), was sehr schnell erfolgt. Nach der Untergrundaufnahme wird wieder das Objekt anvisiert und die Ladungen auf dem CCD-Chip zurückverschoben. Dabei gelangen jetzt die Ladungsspuren des Untergrundsignals in die ungenutzten Zwischenräume. Das Signal, was bei der erneuten Himmelskörpermessung erfasst wird, addiert sich zu dem bereits vorhandenen. Die Messzyklen werden wiederholt, bis ausreichend Signal vorhanden ist. Wenn am Ende der CCD-Chip ausgelesen wird, sind im Rohsignal zwei Datensätze vorhanden: Einer für das spektral aufgelöste Bild des Himmelskörpers, einer für den Untergrund. Je kürzer die Einzelmesszeiten sind, desto geringer machen sich Signalfuktuationen bemerkbar. An einem Raman-Einkanal-Spektrometer mit CCD-Detektor konnte bereits gezeigt werden, dass schnelles Hin- und Herschalten auch für SERDS vorteilhaft ist [9]. Diese Technik wurde nun auf einem IFS-Spektrographen mit großflächigem CCD-Chip implementiert, um damit bildgebende SERDS bei sich verändernden Proben und Umgebungsbedingungen zu ermöglichen. Abb. 1 veranschaulicht die Funktionsweise.

Methoden und Materialien

Laserquellen

Für die Experimente standen Laser im blauen und im nahen Infrarotbereich (NIR) zur Verfügung:

(1) Eine Laserquelle mit zwei blauen Laserdioden in einem CS-Mount Gehäuse, 457,74 und 458,90 nm, spektrale Breite $\Delta\lambda_{400}$ mW; FWHW = 40 pm, optische Ausgangsleistung je 0,4 W bei 0,5 A [10]. Die Wellenlängenstabilisierung erfolgt über Bragg-Gitter und eine Temperierung auf 40° C. Gefertigt wurde die blaue Laserquelle vom Ferdinand-Braun-Institut, Berlin. Zum Betrieb wurde ein Lasertreiber-Kühlkörper System (dsp- bzw. hsa-Serie) der Firma Ostech, Berlin, verwendet.

(2) Eine fasergekoppelte NIR-SERDS-Laserquelle LS 2-VBG, Ushio, Tokyo, Japan (vormals PD-LD, Pennington, USA), mit 784,5 und 785,5 nm. Maximale Ausgangsleistung 400 mW.

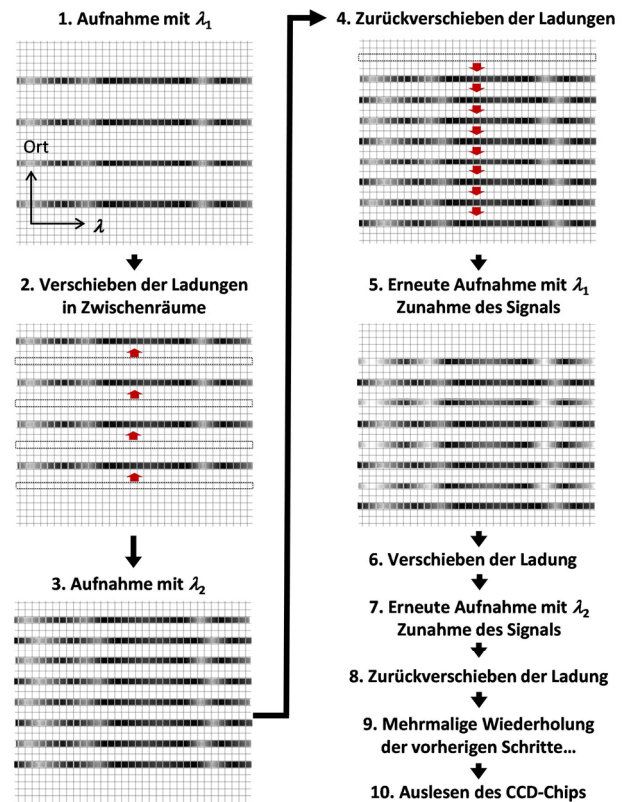


Abb. 1: Funktionsweise der bildgebenden SERDS mit Nod and Shuffle. Die karierten Hintergründe deuten einen CCD-Chip mit seinen Pixeln an. Jede Faser der IFU erfasst einen Punkt des Ramanbildes. Das spektrographenseitig aus den Fasern austretende Licht erzeugt Signalspuren, die hier exemplarisch für 4 Fasern als waagrecht gestreifte dargestellt sind. Helle Stellen bedeuten Signal, d.h. Ladung aufgrund von Ramanbanden. λ_1 und λ_2 sind die beiden Anregungswellenlängen. Da sich die Ramanbanden mit der Anregungswellenlänge verschieben, sind auch die Ladungen entlang der Wellenlängenachse verschoben.

Spektrograph

Verwendet wurde eine Spektrographeneinheit des MU-SE-Systems, gefertigt von der Firma Winlight Systems, Pertuis, Frankreich, mit einem großflächigen 4K × 4K CCD-Chip (CCD231, Teledyne e2v, UK). Ausführliche Beschreibungen der Spektrographen und des Detektors finden sich in [11] und [12]. Der grundlegende Versuchsaufbau für Ramanmessungen wurde bereits in [5] beschrieben. In Kürze: Als IFU wird ein Faserbündel mit 400 Fasern verwendet, die auf der Probenseite eine 20 × 20-Matrix mit 1 cm Kantenlänge bilden. Ein Optikaufbau mit entsprechenden Spiegeln und Filtern lenkt das Laserlicht auf die Probe und projiziert das Ramanbild auf die Fasermatrix. Ein Mikrolinsenarray (MLA) vor der Matrix verbessert die Einkopplung in die Fasern. Zur Untersuchung von Proben mit einer Fläche von etwa 1 cm² steht ein Messkopf mit einem zweiten MLA auf der Probenseite zur Verfügung. Eine schematische Darstellung des Aufbaus mit den für Nod and Shuffle erforderlichen Modifikationen findet sich in Abb. 2. Für kleine Proben kann das probensei-

tige MLA durch eine Objektivlinse sowie die beiden 50 mm Dublets durch eine 200 mm-Tubuslinse ersetzt werden.

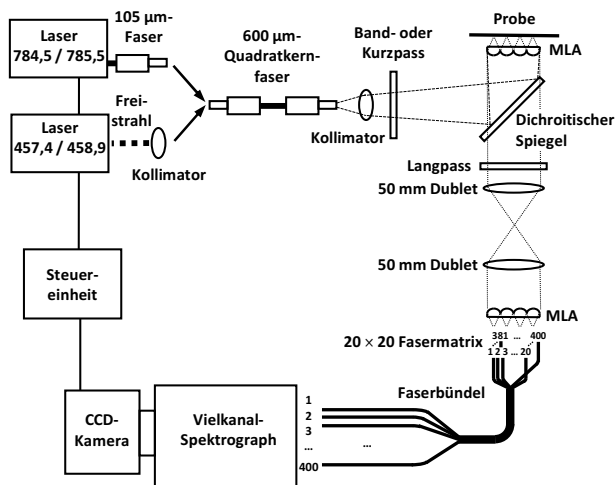


Abb. 2: Versuchsaufbau für bildgebende SERDS. Wahlweise kann ein blauer oder ein NIR-Laser mit jeweils zwei leicht unterschiedlichen Laserwellenlängen verwendet werden. Die optischen Komponenten sind entsprechend austauschbar. Eine Steuereinheit koordiniert das Hin- und Herschieben der Ladungen auf dem CCD-Detektor und das Umschalten der Laserwellenlängen. Die Quadratkernfaser sorgt für eine gleichmäßige Ausleuchtung der Probe.

Zur Implementierung der Nod and Shuffle-Funktion wurden am Spektrographen verschiedene Anpassungen vorgenommen. Eine Ladungsverschiebung ist nur in Richtung der Ausleseregister möglich. Die Wellenlängenachse muss daher parallel zu denjenigen Detektorchipkanten verlaufen, an denen sich die Ausleseregister befinden. Da das in der ursprünglichen Konfiguration nicht der Fall war, musste der CCD-Chip um 90° gedreht werden. Der bereits eingebaute CCD-Chip war dafür aber ungeeignet, da er eine Antireflexbeschichtung besitzt, die sich entlang der ursprünglichen Wellenlängenachse ändert. Nach einer 90°-Drehung hätte der Antireflexverlauf nicht mehr gepasst. Deshalb wurde ein CCD-Chip gleicher Bauart mit einer gleichmäßigen Antireflexbeschichtung beschafft. Deren Transmission ist etwas geringer, dafür ist der Chip aber in beliebiger Orientierung einbaubar. Die Steuereinheit der Kamera wurde so verändert, dass die Ladungen gemäß den Einstellungen in der Bedienoberfläche kontrolliert hin- und hergeschoben werden können und die Laser über Triggersignale entsprechend geschaltet werden können. Außerdem wurde die Datenreduktionssoftware so erweitert, dass aus dem Detektorrohsignal, welches nun doppelt so viele Signalspuren wie ursprünglich enthält, wiederum ein Datenkubus mit Einzel- und Differenzspektren generiert wird. Für die Rekonstruktion der untergrundfreien Ramanspektren aus den Differenzspektren wurde ein in [13] beschriebener Algorithmus verwendet.

Proben

Der Aufbau wurde mit folgenden Proben getestet: (1) Gemisch aus Mikrokugeln aus Polystyrol (PS) und Poly-

methylmethacrylat (PMMA) mit etwa 50 bzw. 120 µm Durchmesser, (2) ein Fettstück aus einem Schweinekotelett und (3) zwei Stücke einer Aspirin- und Paracetamoltablette.

Die Messbedingungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

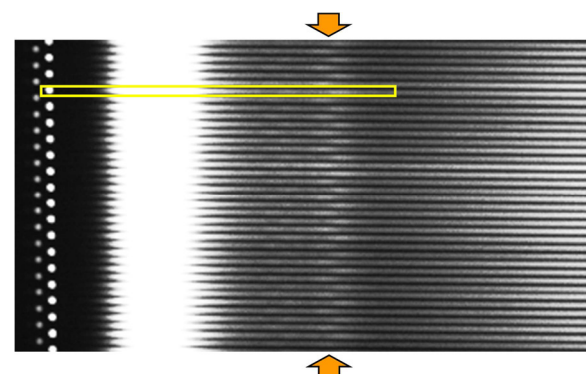
Tab. 1: Messbedingungen bei den Proben

Probe	Laser	Intensität W / mm ²	Bildfeld cm ²	Messungen (bei λ_1 und λ_2)
PS, PMMA	blau	0,1	0,02	je 40 × 100 ms
Kotelett	blau	0,2	0,02	je 40 × 50 ms und je 1 × 2 s
Aspirin, Parac.	NIR	0,004*)	1	je 200 × 200 ms

*) Das probenseitige MLA erzeugt 400 0,25 mm²-Laserlichtspots mit jeweils ca. 1 mW Leistung.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 3 oben zeigt einen Ausschnitt des Rohsignals des Ramanbildes der Mikrokugeln auf dem CCD-Chip. Die horizontalen Signalspuren entlang der Wellenlängenachse stammen abwechselnd von den Messungen bei λ_1 und bei λ_2 . Größere Helligkeit bedeutet mehr Signal. Die Ladungen wurden um 5 Pixel in vertikaler Richtung hin- und hergeschoben. Damit wird die Fläche auf dem CCD-Chip optimal ausgenutzt. Die Punkte links sind Reste des Anregungslaserlichts, das trotz des Langpassfilters noch zum Detektor gelangt. Rechts davon ist intensive Fluoreszenz erkennbar, die teilweise im Messkopf entsteht. Im Bereich, der durch die Pfeile markiert ist, sind Ramanbanden von PS und PMMA als etwas hellere Stellen erkennbar, die sich mit der Anregungslaserwellenlänge hin und her verschieben. Abb. 3 unten zeigt die Profilkurve der durch das Rechteck markierten Signalspur. Die orange Kurve im Bereich von Pixel 110 bis 205 ist eine 250-fache Vergrößerung, um die im Vergleich zur Fluoreszenz sehr schwachen Ramanbanden sichtbar zu machen.



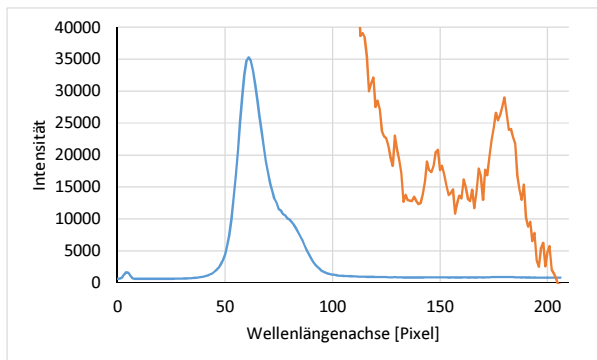


Abb. 3: Oben: Rohsignal (= Signalspuren) auf den CCD-Chip. Punkte links: Restsignal der blauen Anregungslaser. Im Bereich der Pfeile schwache Ramanbanden, deren Positionen dem Anregungslaserlicht folgen. Unten: Profilkurve der rechteckig markierten Spur. Restliches Laserlicht um Pixel 5, Fluoreszenz von Pixel 50 bis 100. Orange Kurve: 250-fache Vergrößerung zur Sichtbarmachung der Ramanbanden.

Bei Anregung im blauen Spektralbereich entsprechen 0,25 nm-Wellenlängenauflösung des Spektrographen einer Verschiebungsauflösung für Ramanbanden von etwa 30 cm^{-1} . Die damit verbundene Bandenverbreiterung erschwert eine artefaktfreie Rekonstruktion des Spektrums und damit die Erstellung von Ramanbildern. Dennoch lassen sich die Positionen von PS und PMMA mit einfachen Falschfarbendarstellung von Intensitäten visualisieren. Abb. 4 oben zeigt die Ramanbilder von PMMA (links) und PS (rechts). Darunter die rekonstruierten untergrundfreien Ramanspektren und rot markiert die Auswahlbereiche für die Falschfarbenbilder. Für die PMMA-Darstellung wurde die Ramanbande bei 2957 cm^{-1} verwendet, für PS wurde der Bereich um 1005 cm^{-1} gewählt, also die Flanke der PS-Bande bei 1001 cm^{-1} .

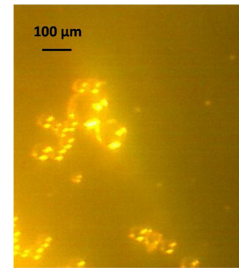
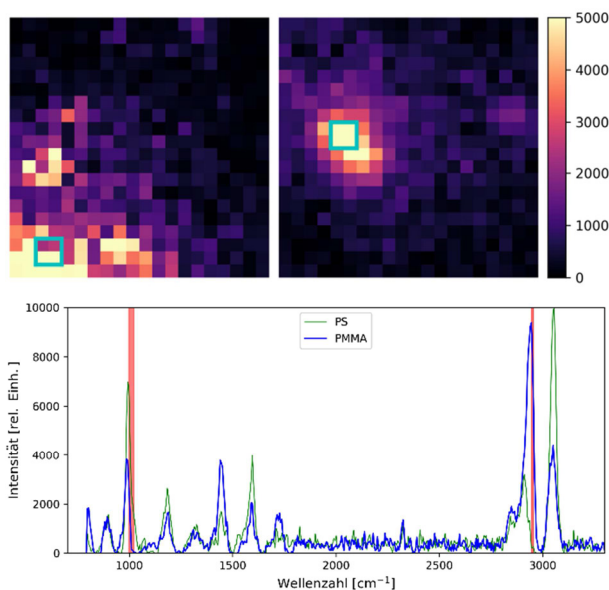


Abb. 4, oben: Ramanbilder von PS- (links) und PMMA-Kügelchen (rechts). Mitte: Rekonstruierte Ramanspektren (blaue Anregungslaser) an den durch das Quadrat in den Ramanbildern markierten Stellen. Unten: Kamerabild der Probe.

Das Kamerabild unten zeigt die Probe: zwei größere PMMA-Kügelchen mit etwa $120 \mu\text{m}$ Durchmesser und Gruppen aus PS-Kügelchen mit etwa $50 \mu\text{m}$ Durchmesser. Die Lage der Kugelgruppen stimmt mit den Ramanbildern überein. Die Kombination aus SERDS und Nod and Shuffle ist in der Lage, ohne Abtastprozess untergrundfreie Ramanspektren zu messen und daraus Ramanbilder zu erstellen.

Anhand der Proben 2 und 3 werden im Folgenden die Vorteile einer Ramansignalakkumulation mit vielen kurzen Messintervallen gezeigt.

Durch die Anregung mit blauem Laserlicht kommt es bei den meisten biologischen Proben zu einer starken Fluoreszenz. In Abb. 5 sind die Differenzspektren zweier Ramanbilder als Schattierungen und deren Mittelwerte als durchgezogene Linien für ein Fettstück eines Schweinekoteletts (Probe 2) dargestellt. Bei der Aufnahmezeit von einmal 2 s je Wellenlänge und der anschließenden Subtraktion verbleibt ein Untergrund in den Differenzspektren (graue Spektren).

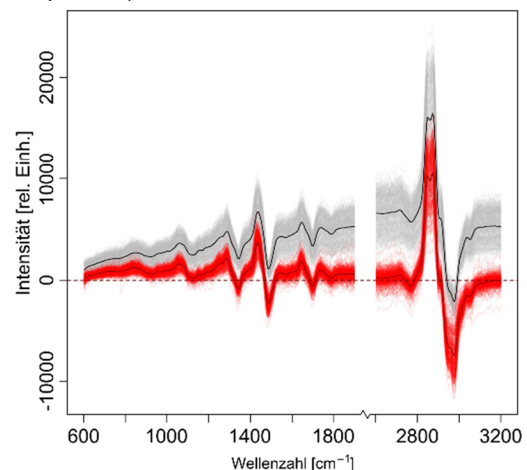


Abb. 5: Durch Subtraktion zweier Ramanbilder (blaue Anregungslaser) eines Fettstücks eines Koteletts erhaltene Differenzspektren. Graue Differenzspektren mit schwarzer Mittelwertlinie: Zwei Messungen mit je 2 s Messzeit bei λ_1 und λ_2 . Rote Differenzspektren mit dunkelroter Mittelwertlinie: jeweils 40 Messungen mit je 50 ms Messzeit aufgenommen mit Nod and Shuffle.

Dieser Untergrund kommt dadurch zu Stande, dass im Verlauf der Messungen die Probe ausbleicht und sich dadurch der Autofluoreszenzuntergrund ändert. Bei jeweils langen Messzeiten wird der Untergrund ungleichmäßig auf die Messpaare verteilt und er kann durch die Subtraktion nicht eliminiert werden. Wenn hingegen die 2 s Messzeit pro Anregungswellenlänge auf 40 akkumulierte Messintervalle zu je 50 ms aufgeteilt werden, also alle 50 ms ein Wechsel der Anregungswellenlänge erfolgt, sind die resultierenden Differenzspektren nahezu untergrundfrei (rote Differenzspektren mit dunkelroter Mittelwertlinie in Abb. 5.).

Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Ausbleichen durch die jeweils kurzen Messintervalle bei beiden Wellenlängen gleichmäßig verteilt wird. Bei kurzen Messzeiten ist die Veränderung des Untergrundes vernachlässigbar klein. Durch die Kombination von bildgebender SERDS mit Nod and Shuffle ist es gelungen, sehr kurze Messzeiten zu realisieren und die jeweiligen Ramansignale zu akkumulieren. Dadurch kann ein auftretendes Ausbleichen der Probe und die damit verbundene Änderung des Fluoreszenzuntergrundes gleichmäßig auf die jeweiligen Ramanbilder verteilt werden. Das resultierende Ramandifferenzbild bzw. dessen Differenzspektren sind untergrundfrei.

Eine weitere Stärke der Aufnahme von Ramanbildern mittels SERDS und Nod and Shuffle ist die Fähigkeit, Raumlicht mit einem diskreten Linienprofil herauszufiltern. Dies konnte an Probe 3, bestehend aus einer Paracetamoltablette P und einer Aspirintablette A, demonstriert werden (siehe Abb. 6).

Hierfür wurden die beiden Tabletten wie im Bild in Abb. 6 gezeigt auf dem 1 cm × 1 cm großen Probenkopf mit probenseitigem MLA platziert und mit dem NIR-Laser Ramanbilder mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommen ($\lambda_1 = 784,5$ nm und $\lambda_2 = 785,5$ nm). Für die Aufnahme wurden pro Anregungswellenlänge 200 Messintervalle zu je 200 ms gewählt, so dass sich eine Gesamtaufnahmezeit von 2×40 s ergab. 1 s nach Beginn der Messung wurde das Raumlicht (Leuchtstoffröhren) für 3 s eingeschaltet. Aufgrund des schnellen Hin- und Herschaltens wird das Raumlicht auf beide Ramanbilder verteilt.

Die Spektren der beiden Ramanbilderpaare wurden dann subtrahiert ($\lambda_2 - \lambda_1$) und die resultierenden Differenzspektren mittels einer hierarchischen Clusteranalyse in drei verschiedene Cluster unterteilt. Hierfür wurde erst der Pearson-Abstand zwischen den Spektren errechnet und die Cluster nach dem Minimum-Varianz-Kriterium nach Ward aufgebaut [14].

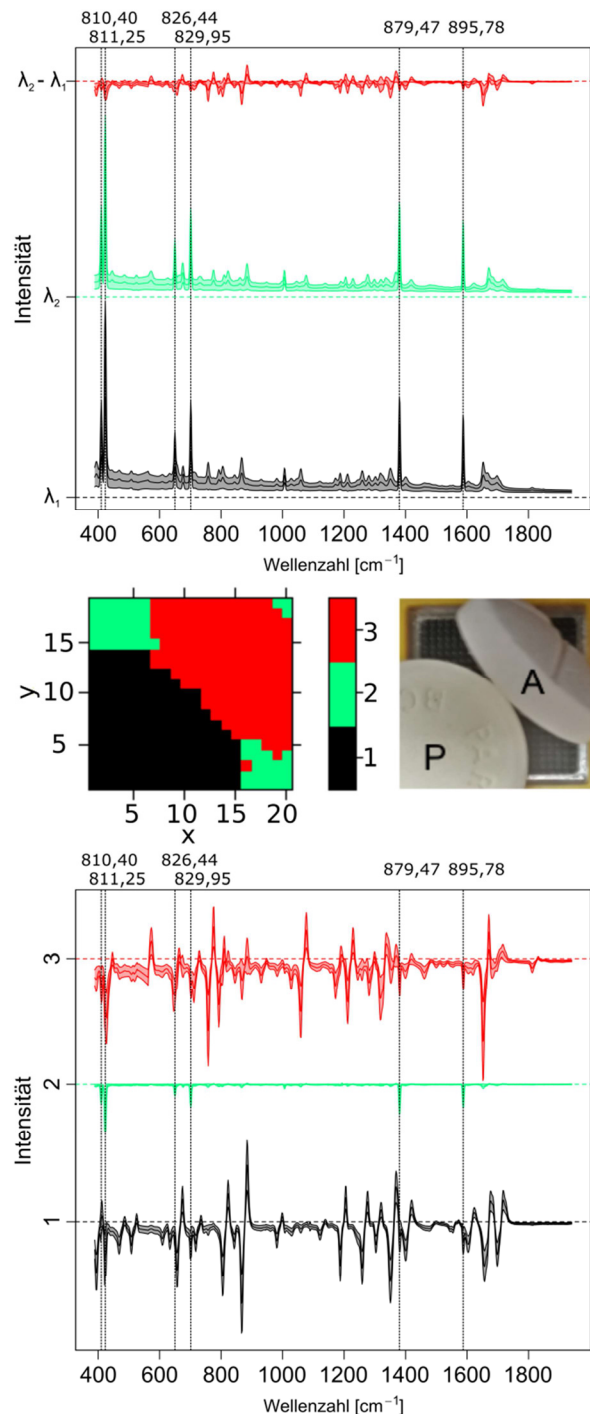


Abb. 6: Messung zweier Ramanbilder (NIR-Anregungslaser) mit 200×200 ms Aufnahmezeit pro Wellenlänge mittels Nod and Shuffle. 1 s nach Start der Messung wurde das Raumlicht für 3 s eingeschaltet. Oben: Ramanspektren bei λ_1 und λ_2 und deren Differenz (Mittelwerte mit Standardabweichungen). Mitte: Clusterbilder der Cluster 1 – 3 und Kamerabild der Probe (Paracetamoltablette P und Aspirintablette A) auf dem 1 cm²-Messkopf. Unten: Differenzspektren der drei Cluster (Mittelwerte mit Standardabweichungen; Cluster 1, schwarz: Paracetamol; Cluster 2, grün: freie Fläche; Cluster 3, rot: Aspirin). Die senkrechten schwarzen Linien markieren die Raumlichtbanden (Leuchtstoffröhren) und ihre spektrale Lage in nm.

Abb. 6 oben zeigt die Ramanspektren, die mit λ_1 und λ_2 aufgenommen wurden (schwarz bzw. grün) und die resultierenden Differenzspektren $\lambda_2 - \lambda_1$ (rot) in Form ihrer Mittelwertspektren und ihrer Standardabweichungen. In den Ramanspektren dominieren die Raumlichtbanden. In den Differenzspektren sind sie nahezu eliminiert. Als Orientierungshilfe wurden an den Stellen der Raumlichtbanden schwarze, senkrechte Linien durchgelegt und darüber die Position der Raumlichtbanden in nm angegeben.

Eine Charakterisierung von Paracetamol (Cluster 1, schwarz) und Aspirin (Cluster 3, rot) kann sehr leicht erfolgen. Die Clusterkarte in Abb. 6 zeigt eine sehr gute räumliche Übereinstimmung von Cluster 1 mit der Lage der Paracetamoltabelle und von Cluster 3 mit der Lage der Aspirintablette. In Abb. 6 unten sind die Differenzspektren der Cluster dargestellt. An den freien Stellen (Cluster 2, grün) sind die Raumlichtbanden noch deutlich zu erkennen. Das hängt damit zusammen, dass ohne Abdeckung durch eine Probe besonders viel Raumlicht eindringt. Hauptursache ist aber, dass die 200 ms-Intervalle noch zu lang waren, um das Raumlicht exakt gleichmäßig auf beide Anregungswellenlängen zu verteilen. Im vorhandenen Versuchsaufbau, konnten aber mit dem NIR-Laser aus technischen Gründen noch keine kürzeren Beleuchtungsintervalle generiert werden.

Trotzdem zeigt das Ergebnis, dass es möglich ist, mittels SERDS nicht nur Fluoreszenzuntergrund sondern auch Raumlichtbanden aus einem Ramanbild herauszufiltern. Durch die Akkumulation kurzer Messintervalle, wie sie durch die Nod and Shuffle-Technik möglich ist, lässt sich dieses kurzzeitiges Störlicht mühelos entfernen.

Literatur

- [1] KRAFFT, C.; SCHIE, W.; MEYER, T.; SCHMITT, M.; POPP, J.: Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications. In: *Chem Soc Rev* 45 (2016), S. 1819–1849
- [2] SOWOIDNICH, K.; KRONFELDT, H.-D.: Fluorescence Rejection by Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy at Multiple Wavelengths for the Investigation of Biological Samples. In: *ISRN Spectroscopy* 2012 (2012), Article ID 256326
- [3] AILLINGTON-SMITH, J.: Basic principles of integral field spectroscopy, In: *New Astron Rev*, 50 (2006), S. 244–251
- [4] BACON, R.; MONNET G. (Hrsg.): *Optical 3D Spectroscopy for Astronomy. Recent Trends in Integral Field Spectroscopy*. Wiley-VCH Verlag, 2017, S. 115–127
- [5] SCHMÄLZLIN, S.; MORALEJO B.; BODENMÜLLER, D.; DARVIN, M. E.; TIEHDE, G.; ROTH, M. M.: Ultra-fast imaging Raman spectroscopy of large-area samples without stepwise scanning. In: *J Sens Sens Syst*. 5 (2016), S. 261–271
- [6] GLAZEBROOK, K.; BLAND-HAWTHORN, J.: Karl: Microslit Nod-Shuffle Spectroscopy: A Technique for Achieving Very High Densities of Spectra. In: *PASP* 113 (2001), S. 197–214
- [7] ROTH, M. M.; FECHNER, T.; WOLTER, D.; KELZ, A.; BECKER, T.: Ultra-Deep Optical Spectroscopy with PMAS. Using the Nod-and-Shuffle Technique. In: *Exp Astron* 14 (2002), Nr. 2, S. 99–105
- [8] ROTH, M. M.; CARDIEL, N.; CENARRO, J.; SCHÖNBERNER, D.; STEFFEN, M.: Nod & Shuffle 3D Spectroscopy. In: BELETIC, J. E.; BELETIC, J. W.; AMICO, P. (Hrsg.): *Scientific Detectors for Astronomy 2005*, Springer-Verlag, 2005, S. 99–108
- [9] SOWOIDNICH, K.; TOWRIE, M.; MAIWALD, M.; SUMPF, B.; MATOUSEK, P.: Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy with Charge-Shifting Charge-Coupled Device (CCD) Lock-In Detection. In: *Appl Spectrosc* 73 (2019), Nr. 11, S. 1265–1276
- [10] SUMPF, B.; MÜLLER, A.; MAIWALD, M.: Tailored diode lasers: enabling Raman spectroscopy in the presence of disturbing fluorescence and background light. In: *Tagungsband Proc. SPIE 10894, Plasmonics in Biology and Medicine XVI, 1089411*, San Francisco, USA, Feb. 2019
- [11] MORALEJO, B.; ROTH, M. M.; GODEFROY, P.; FECHNER, T.; BAUER, S. M.; SCHMÄLZLIN, E.; KELZ, A.; HAYNES, R.: The Potsdam MRS spectrograph: heritage of MUSE and the impact of cross-innovation in the process of technology transfer. In: *Tagungsband Proc. SPIE 9912, Advances in Optical and Mechanical Technologies for Telescopes and Instrumentation II, 991222*, Edinburgh, United Kingdom, Juli 2016
- [12] MORALEJO, B.; SCHMÄLZLIN, E.; BODENMÜLLER, D.; FECHNER, T.; ROTH, M. M.: Improving the frame rates of Raman image sequences recorded with integral field spectroscopy using windowing and binning methods, In: *J Raman Spectrosc* 49 (2018), Nr. 2, S. 372–375
- [13] SCHMIDT, H.; KAISER, P.; and MAIWALD, M.: European patent EP 2 480 868 B1, Patent bulletin 2014/02, 2014
- [14] BONIFACIO, A.; BELEITES, C.; SERGO, V.: Application of R-mode analysis to Raman maps: a different way of looking at vibrational hyperspectral data, In: *Anal Bioanal Chem* 407 (2015), S. 1089–1095

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes HYPERAM (SAW-2016-IPHT-2) von der Leibniz-Gesellschaft unterstützt. Wir bedanken uns insbesondere bei Martin Maiwald, André Müller und Bernd Sumpf vom Ferdinand-Braun-Institut für die Entwicklung und Bereitstellung der blauen Laserquelle, bei Thomas Fechner vom Leibniz-Institut für Astrophysik für die Modifizierung des Spektrographen und bei Christer Sandin für die Anpassung der Datenreduktionssoftware.