

ECHTZEITBESTIMMUNG VON GESCHWINDIGKEITS- UND DICHTEFELDERN IN MIKROSTRÖMUNGEN MIT HILFE OPTISCH NICHTLINEARER BILDAUFNAHME

Frank Holtmann¹, Mike Wördemann¹, Mathias Eversloh¹, Oliver Grothe¹, Hendrik Deitmar¹, Vishnu Vardhan Krishnamachari² und Cornelia Denz¹

¹Institut für Angewandte Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Corrensstraße 2, 48149 Münster, Germany

²University of California Irvine, CA 92697, USA

Zusammenfassung

In den Lebenswissenschaften und der Chemie ist in den letzten Jahren ein großes Interesse an der Erforschung und Anwendung von mikroskaligen Strömungsvorgängen, wie sie etwa in „Lab-on-a-chip“- Systemen auftreten, entstanden. Wir stellen in diesem Beitrag eine optisch nichtlineare Methode auf Basis photorefraktiver Bewegungsdetektion vor, die sowohl die quantitative Bestimmung von Geschwindigkeitsfeldern als auch die Vermessung von Konzentrationsänderungen in Mikromischsystemen zulässt. Die Echtzeitfähigkeit und die extrem geringe Lichtbelastung des Untersuchungsobjektes von wenigen Mikrowatt machen dieses System zu einem geeigneten Messverfahren in der Mikrofluidik.

1 Einleitung

In den Lebenswissenschaften und der Chemie ist in den letzten Jahren ein großes Interesse an der Erforschung und Anwendung von mikroskaligen Strömungsvorgängen entstanden. So versprechen neue chemische Analyse- und Synthesemethoden von z.B. Wirkstoffen eine hoch effiziente Arbeitsweise durch Verwendung von Mikrolaboreinheiten so genannten „Lab-on-a-chip“- Systemen. Bei diesen Systemen ist eine Kontrolle der Strömungseigenschaften zur Optimierung der Prozessabläufe von besonderer Bedeutung. Aufgrund der Größenordnung treten überwiegend laminare Strömungen auf, wodurch gewünschte Mischprozesse erschwert werden und durch geeignete Mischerkonfigurationen bzw. aktive Durchmischung ermöglicht werden müssen. Insbesondere stellt hierbei das „online monitoring“ von Konzentrationsänderungen der Prozesskomponenten eine Herausforderung an die Detektionstechnik dar. Zunehmend werden strömungsmechanische Fragestellungen auch in den Lebenswissenschaften interessant, etwa bei Stoffwechselfvorgängen. Hierbei interessieren nicht nur die auftretenden Geschwindigkeiten der Transportprozesse, sondern auch direkt die umgesetzten Stoffmengen und die dadurch auftretenden Dichte-Gradienten. Eine potentielle Messtechnik für diese Felder sollte daher eine Vollfeldtechnik sein, die kontaktfrei, nicht invasiv, markerfrei, und besonders bei biologischen Abläufen, in-vivo-tauglich ist. Zusätzlich sollte das System phasensensitiv sein, da Prozesskomponenten häufig reine Phasenobjekte darstellen.

Für die Lösung dieses Problems haben wir eine Mikroskopietechnik [Krishnamachari2004] entwickelt, die es ermöglicht Strömungsprozesse in Echtzeit zu detektieren [Krishnamachari2003].

Basierend auf optisch nichtlinearer Filterung mittels photorefraktiver Strahlkopplung [Anderson1987] ermöglicht diese Methode die Echtzeitbestimmung und Kontrasterhöhung von Bewegungsabläufen etwa von Tracerpartikeln zur Geschwindigkeitsbestimmung mit PIV bzw. PTV Verfahren. Gleichzeitig ist eine quantitative Detektion von Konzentrationsänderungen in Fluiden möglich. Die benötigten Laserleistungen liegen dabei nur bei einem Mikrowatt am Ort des zu untersuchenden Objektes.

2 Messverfahren und experimentelle Realisierung

Das verwendete Messverfahren beruht auf der photorefraktiven Zweistrahlkopplung, bei der zwei kohärente Lichtwellen in einem photorefraktiven Material überlagert werden. Das entstehende Interferenzmuster wird durch das Material in eine Brechungsindexmodulation umgesetzt, an dem die beiden Wellen gebeugt werden. Ist diese Brechungsindexmodulation zum initialen Interferenzmuster räumlich verschoben, so kommt es zum Energietransfer zwischen den beiden Wellen. Je nach Kopplungsstärke kann ein vollständiger Energietransfer von der einen zur anderen Lichtwelle entstehen. Wählt man den abgeschwächten Strahl als Signalstrahl wird das zu messende Signal im statischen Zustand nach durchlaufen des photorefraktiven Materials vollständig auf null abfallen. Treten jedoch Änderungen im Signal auf, etwa Änderungen in der Amplitude oder Phase, so werden diese instantan am Ausgang detektiert [Sedlatschek2003]. Dieses System kann demnach als zeitlicher Hochpassfilter beschrieben werden, bei dem sich zeitlich ändernde Signalanteile detektiert und statische Hintergründe unterdrückt werden [Anderson1989]. Diese Eigenschaften sind insbesondere in der Mikroskopie von Vorteil, bei der kontrastarme Phasenobjekte vor einem unregelmäßigen Hintergrund in Echtzeit detektiert werden sollen. Die experimentelle Realisierung dieses Prinzip in Kombination mit einem Mikroskop ist in Abb.1 zu sehen.

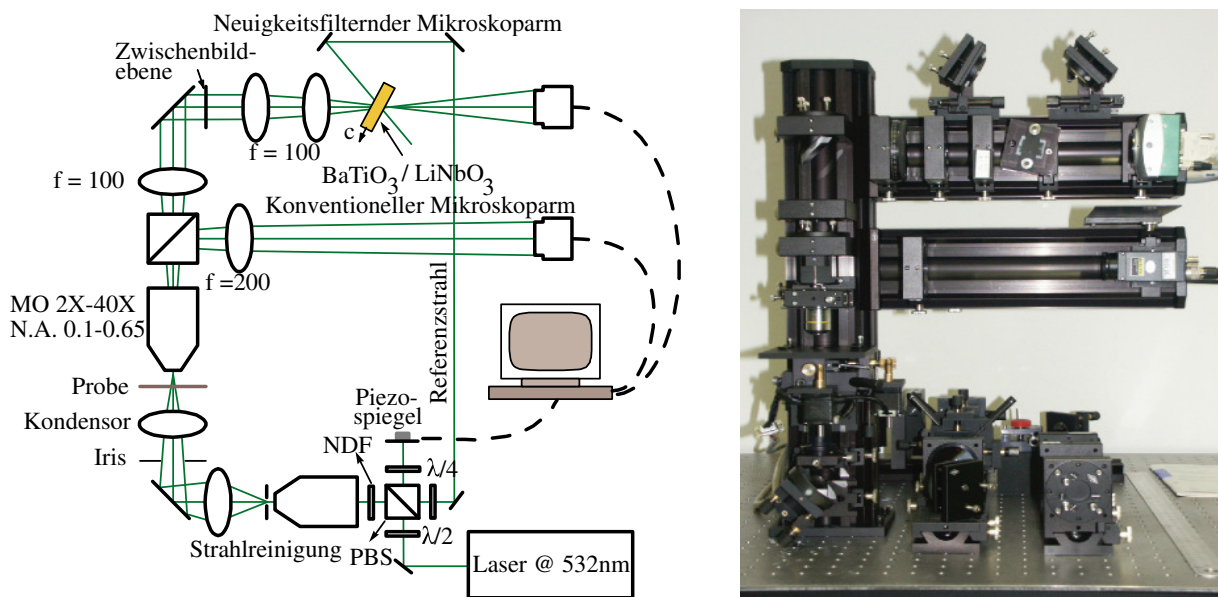


Abb. 1: links: Skizze des phasensensitiven bewegungsdetektierenden Mikroskopsystems, rechts: Fotografie des realisierten Mikroskopes

Ein Nd:YAG – Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm wird aufgespalten in einen Signal- und einen Referenzstrahl. Der Signalstrahl wird aufgeweitet und durch eine Fourierfilterung homogenisiert, um durch eine Kondensorlinse auf die zu untersuchende Probe gerichtet zu

werden. Mithilfe eines Mikroskopobjektives wird das Objekt vergrößert und durch ein Linsensystem und das photorefraktive Material auf eine Kamera abgebildet. Am Ort des photorefraktiven Materials wird der Signalstrahl mit dem gleichpolarisierten Referenzstrahl überlagert, um die nötige Zweistrahlkopplung zu ermöglichen. Ein zweiter Beobachtungsarm wird nach dem Mikroskopobjektiv ausgekoppelt, um eine gleichzeitige Beobachtung des Objektes mit herkömmlicher Mikroskopie durchzuführen. Die Leistung im Signalstrahl beträgt dabei einige Nanowatt bis zu einem Mikrowatt und die des Referenzstrahls bis zu wenigen Milliwatt. Über einen Piezospiegel kann dem Referenzarm ein definierter Phasenschub aufgeprägt werden, um eine Kalibration des Systems auf Phasenänderungen durchzuführen.



Abb. 2: Fotografie des modularen Filtersystems

Als Weiterentwicklung dieses Laborsystems haben wir ein modulares System entwickelt, das die Integration des Filters in herkömmliche Mikroskope ermöglicht [Krishnamachari2005]. Das Modulsystem, wie es in Abb. 2 zu sehen ist, besteht dabei aus einem Beleuchtungs- und Strahlauflerungsmodul, dem eigentlichen Filtermodul und einem Steuerungsmodul. An diesem System kann je nach Anwenderansprüchen jedes Kamerasystem zur Bildakquise über Standardschnittstellen angeschlossen werden. Für diese Module wurde das Patentierungsverfahren beim Deutschen Patent- und

Markenamt eingeleitet.

3 Experimentelle Ergebnisse

Als wichtigste Eigenschaft des beschriebenen Systems ist die instantane Detektion von Amplituden und Phasenänderungen zu nennen. Diese ist unabhängig von der charakteristischen Zeitkonstante des verwendeten photorefraktiven Materials. Dennoch hat

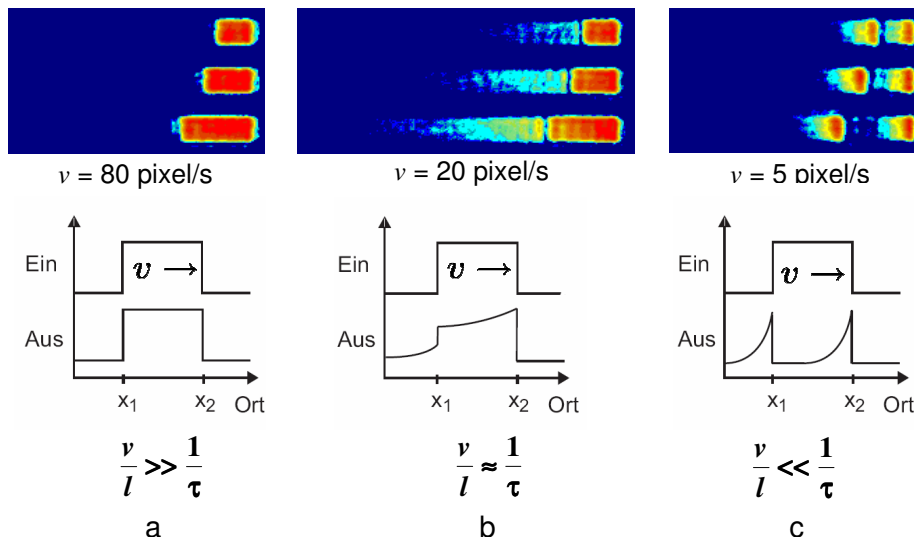


Abb. 3: Antwortverhalten des phasensensitiven Bewegungsdetektors auf π Phasenobjekte, die sich von links nach rechts mit der jeweils angegebenen Geschwindigkeit v und Länge l bewegen. Unten ist ein Schnitt durch die Objekte gezeigt

diese Zeitkonstante einen Einfluss auf den Verlauf der Filterantwort und soll hier deshalb etwas genauer betrachtet werden. Beispielhaft sind in Abb.3 drei unterschiedliche Kombinationen von Zeitkonstante des Materials und Geschwindigkeit eines Objektes dargestellt. Zu sehen ist ein Phasenobjekt, das eine Phasenverschiebung von π auf den Signalstrahl

aufprägt und sich von links nach rechts bewegt. Für große Geschwindigkeiten gegenüber der reziproken Zeit-konstante (Abb. 3a) wird das Phasenobjekt direkt abgebildet und in Echtzeit detektiert. Bei langsameren Geschwindigkeiten (Abb. 3b) fügt sich an das eigentliche Objekt ein Nachleuchten, ein so genannter Schweif an, der insbesondere bei Phasenmessungen die eigentliche Messung verfälschen würde, indem Phasenänderungen in Bereichen nach einem Objekt angezeigt würden, die nicht real sind. Im Extremfall sehr kleiner Geschwindigkeiten (Abb. 3c) fällt das Signal bereits im eigentlichen Objekt auf null ab. Zu bemerken ist allerdings, dass die führende Objektkante immer instantan detektiert wird. Für Phasenmessungen ist dieses Verhalten nicht gewünscht, so dass es durch Wahl hoher Zeitkonstanten unterdrückt werden muss [Sedlatschek1995]. Dies kann durch Wahl eines geeigneten photorefraktiven Materials wie etwa Lithiumniobat und durch Einstellung der Zeitkonstanten durch die verwendete Lichtintensität vorgenommen werden. Es sei darauf hingewiesen, dass insbesondere aus der Länge und der Intensität des Schweifes auch eine direkte Geschwindigkeitsbestimmung möglich ist.

3.1 Anwendung der Bewegungsdetektion in Mikro-PIV Messungen

Die Hintergrundunterdrückung der Bewegungsdetektion kann insbesondere bei Mikro-PIV Messungen zu einer Erhöhung des Signal zu Rausch-Verhältnisses und damit zu einer Verbesserung der Auswertegenauigkeit nachgeschalteter PIV Algorithmen ausgenutzt werden. In Abb. 4 sind 10 µm große Tracerpartikel einmal mit normaler Mikroskopie und

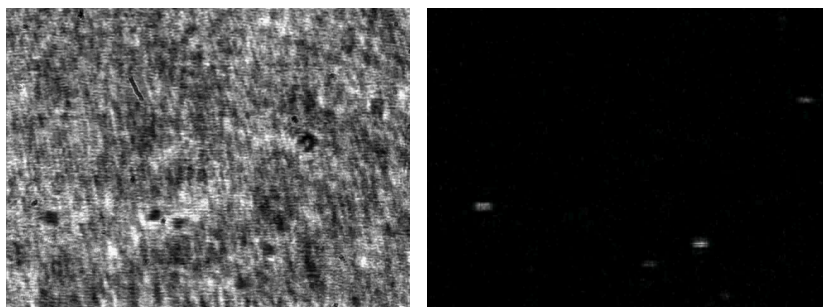
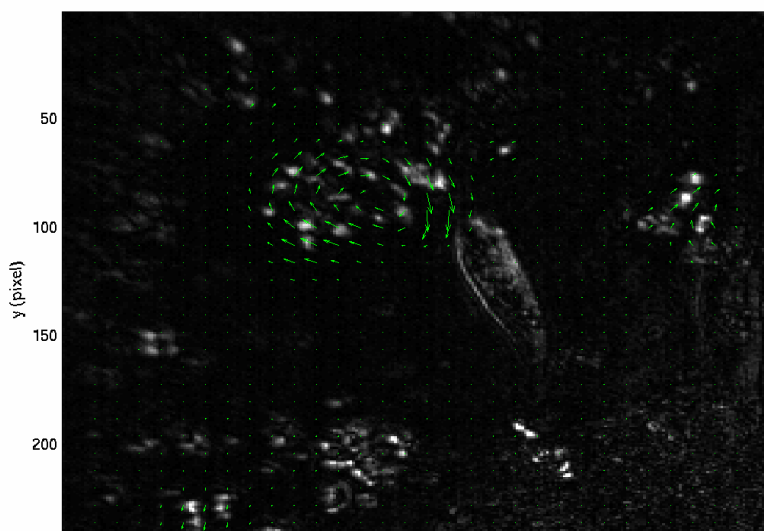


Abb.4 : 10µm große Tracerpartikel in einer Kanalströmung. links: normale Mikroskopie, rechts: bewegungsdetektierende Mikroskopie

einmal mit der bewegungsdetektierenden Mikroskopie dargestellt. Dem linken Bild entspricht ein Kontrast von 0,25 wohingegen das rechte mit der Bewegungsdetektion aufgenommene Bild einen Kontrast von 0,95 aufweist Diese Verbesserung wird in Echtzeit und ohne weitere Bildverarbeitung erreicht, so dass ein zusätzlicher Zeitverlust aufgrund des Wegfalls von Bildnachbearbeitung entfällt. Durch die geringen Lichtleistungen, die für die photorefraktive Bewegungsdetektion im Signalstrahl verwendet werden können, wird die zu untersuchende Probe nur einen geringen Energieeintrag erleiden. Eine Störung des Strömungsfeldes durch die Messung ist damit deutlich minimiert. Insbesondere in biologischen Strömungsfeldern



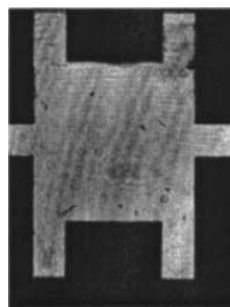
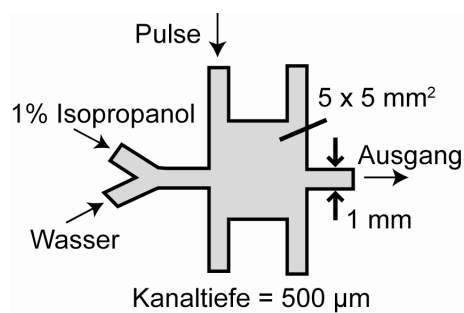
2 Abb.5 : Durch Mikroorganismus induziertes Strömungsfeld. Als Tracer wurden 5 µm große Hefezellen zugeführt.

ist dies von Vorteil, da Zellmaterial und Mikroorganismen bereits bei geringen Temperaturänderungen Veränderungen unterworfen werden.

In Kooperation mit Prof. Delgado wurde gezeigt, dass mit der Bewegungsdetektion eine deutliche längere Beobachtungsdauer von mikroorganismisch induzierten Strömungen gegenüber herkömmlichen Mikroskopiertechniken erreicht werden konnte. Abb.5 zeigt eine durch Mikroorganismen induzierte Strömung, der 5 µm große Hefezellen als biotische Tracer beigesetzt wurden. Die Mikroorganismen selbst werden nur bei einer Eigenbewegung detektiert, so dass hier eine Sequenz abgebildet wurde, bei der die länglichen Umrisse der Organismen erkennbar werden.

3.2 Anwendung der Bewegungsdetektion zur Messung von Konzentrationsänderungen in Mikromischsystemen

Die Phasensensitivität der photorefraktiven Bewegungsdetektion kann zur quantitativen Bestimmung von Phasenänderungen herangezogen werden, wobei keinerlei Farb- oder Kontrastmittel eingesetzt werden müssen [Krishnamachari2005]. Durch die direkte Verknüpfung von Brechungsindex und Konzentration kann aus einer Phasenmessung auch die Konzentrationsänderung in Fluidmischsystemen ermittelt werden. Hierzu muss zunächst die Phasentransferfunktion (PTF) des Systems, also die Beziehung zwischen Grauwert an der Kamera und Phasenänderung durch das Objekt bestimmt werden. Mit Kenntnis dieser



PTF ist es dann möglich unbekannte Phasenänderungen durch einfachen Vergleich zu bestimmen. Beispielhaft wurde ein Mikromischsystem, wie es von Oddy et.al. vorgeschlagen wurde, bei dem zwei Flüssigkeiten vermischt werden, untersucht. Als Referenzzustand wurde das System mit Wasser gefüllt, um dann eine Vermischung von Wasser und 1vol% Isopropanol/Wasser zu beobachten. In Abb. 6 ist das verwendete Mischsystem und eine

Abb. 6: links: Skizze des verwendeten Mikrokanals [nach Oddy2001]. Die zu vermischenden Flüssigkeiten werden zusammengeführt und zur besseren Durchmischung mit einem Pulsmechanismus behandelt. rechts: Beobachtung der beiden Fluide mit normaler Mikroskopie

Aufnahme der beiden Flüssigkeiten ohne Bewegungsdetektion abgebildet. Beide Flüssigkeiten besitzen gleiche Transparenz und sind nicht unterscheidbar. Erst mit dem phasensensitiven Messverfahren ist eine klare Unterscheidung und damit eine Bestimmung der Phasenänderung möglich (Abb. 7). Nach Auswertung der erhaltenen Bilder mit der PTF konnten wir Konzentrationsänderungen von bis zu $2,2 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ bestimmen. Minimale

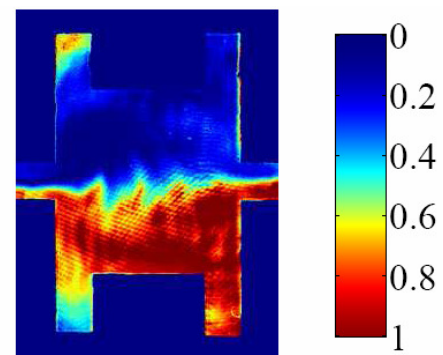
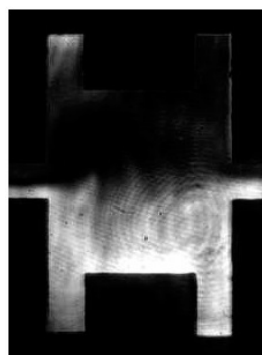


Abb. 7: Mikromischsystem mit dem phasensensitiven bewegungsdetektierenden Mikroskops. Die Skala gibt Phasenänderungen in Vielfachen von π an

Konzentrationsänderungen von bis zu $2,2 \times 10^{-4}$ g/cm³ sind noch auflösbar, wobei diese Minimalangabe durch den Dynamikbereich von 8bit der Kamera bestimmt ist und durch Verwendung anderer Aufnahmesysteme verbessert werden kann. Die Stabilität dieser Messgenauigkeit konnte über 90 Minuten nachgewiesen werden, womit eine ausreichende Messdauer für Mikromischsysteme zur Verfügung steht.

Dankesworte

Die Autoren danken der deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Schwerpunktprogrammes 1147 "Bildgebende Messverfahren für die Strömungsanalyse".

Literatur

- D.Z. Anderson, D.M. Lininger und J. Feinberg, Opt. Lett. **12**, 123 (1987)
D.Z. Anderson and J. Feinberg, IEEE J. Quantum Electron. **25**, 635 (1989)
V.V. Krishnamachari Dissertation WWU Münster (2005)
M. Sedlatschek, J. Trumpfheller, J. Hartmann, M. Müller, C. Denz, and T. Tschudi, Appl.Phys.B.: Lasers Opt. **68** 1047 (1999)
V.V. Krishnamachari und C. Denz, J.Opt.A, Pure Appl. Opt, **5**, S239 (2003)
V.V. Krishnamachari und C. Denz, Appl.Phys. B: Lasers Opt. **79**, 497 (2004)
M. Sedlatschek, T. Rauch, C. Denz und T. Tschudi, Opt. Mater. **4** 376 (1995)
M.H. Oddy, J.G. Santiago und J.C. Mikkelsen, Anal. Chem. **73**, 5822 (2001)
V.V. Krishnamachari, O.Grothe, H. Deitmar und C. Denz, Appl.Phys.Lett., **87**, 071105 (2005)