

## OPTISCH VERSTÄRKTE BEWEGUNGSDETEKTION ZUR ZEITAUFGELÖSTEN GESCHWINDIGKEITSFELDVERMESSUNG IN MIKROSTRÖMUNGEN

### OPTICAL MOTION DETECTION FOR TIME RESOLVED FLOW VELOCIMETRY IN MICRO-FLOWS

**Frank Holtmann, Mike Wördemann, Michael Oevermann, Cornelia Denz**

Institut für Angewandte Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Corrensstr. 2, 48149 Münster

$\mu$ PIV, optische Bewegungsdetektion, Nichtlineare Optik, Mikroskopie, Phasenkontrast  
 $\mu$ PIV, novelty filter, nonlinear optics, microscopy, phase contrast

#### Zusammenfassung

In diesem Beitrag wird die Anwendung der optischen Bewegungsdetektion zur tiefenaufgelösten Echtzeitvermessung von Geschwindigkeitsfeldern in Mikroströmungen vorgestellt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für die Vermessung von Geschwindigkeitsfeldern, bei denen fluoreszierende Tracerpartikel nicht eingesetzt werden können. Dieser Vorteil wird durch die Kontrastverstärkung von bewegten Objekten, insbesondere auch von transparenten Phasenobjekten, die in der konventionellen Mikroskopie keinen ausreichenden Partikelkontrast für nachfolgende PIV-Auswertungen bereitstellen, erreicht. Die für die Tiefenselektion entscheidende Schärfentiefe der Mikroskoptechnik wird im Vergleich mit herkömmlicher Hellfeldmikroskopie vermessen und diskutiert. Wir können zeigen, dass die Schärfentiefe beider Verfahren unter Verwendung absorbierender Tracerpartikel gleich ist, jedoch bei teiltransparenten Partikeln erhebliche Unterschiede aufweist. Die bewegungsdetektierende Mikroskopie erzeugt im Gegensatz zur Hellfeldmikroskopie eine symmetrische axiale Intensitätsverteilung defokussierter Partikel und kann daher eine genauere axiale Positionsbestimmung ermöglichen. Die Evaluation dieser Erkenntnisse anhand realer Geschwindigkeitsfelder wird mit Hilfe von tiefenaufgelösten Vermessungen des Geschwindigkeitsfeldes einer Kanalströmung mit teiltransparenten Tracerpartikeln demonstriert.

#### Einleitung

Mikrofluidische Elemente wie „Lab-on-a-chip“ Systeme werden aktuell in immer weiteren Anwendungskreisen wie etwa der medizinischen Diagnostik, der mikrobiologischen Untersuchung oder der chemischen Analytik eingesetzt [Whitesides 2006]. Diese Anwendungsgebiete nutzen die Miniaturisierung von Strömungsprozessen zur präzisen und reproduzierbaren Analyse kleinster Probenvolumina unter gesteigertem Probendurchsatz. Als Kernfunktionen sind hierbei Vermischungs-, Dosier- und Resuspendiervorgänge elementar. Daher ist in diesen Systemen eine Kontrolle der Strömungseigenschaften zur Optimierung der Prozessabläufe von besonderer Bedeutung.

Eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung mikrofluidischer Bauelemente ist das Geschwindigkeitsfeld. Zur Quantifizierung des Geschwindigkeitsfeldes muss dieses derzeit mit Hilfe von tracerbasierten Verfahren, wie etwa  $\mu$ -PIV (Micro Particle Image Velocimetry), vermessen werden. Diese tracerbasierten Methoden stoßen auf Grund der kleinen Abmessung

## 54.2

und der häufig auftretenden Phasennatur der einzusetzenden Tracerpartikel auf Probleme durch kontrastarme Partikelbilder. Ein oft angewandter Lösungsansatz besteht in dem Einsatz von fluoreszierenden Tracern in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie. Hierdurch konnte eine Vielzahl von erfolgreichen Untersuchungen mikrofluidischer Systeme vorgenommen werden [Santiago 1998, Hoffmann 2005]. Insbesondere in Systemen, in denen der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen aufgrund von ungewünschten Wechselwirkungen mit den Untersuchungsobjekten, etwa in medizinischen Anwendungen, ungeeignet ist, sind neue Techniken zur Erfassung von Partikelbildern gesucht. Hierzu haben wir eine Mikroskopietechnik [Krishnamachari, Holtmann 2006, Petermeier 2007] entwickelt, die es ermöglicht Strömungsprozesse in Echtzeit zu detektieren. Basierend auf optisch nichtlinearer Filterung mittels photorefraktiver Strahlkopplung ermöglicht diese Methode die Echtzeitbestimmung und Kontrasterhöhung von Bewegungsabläufen, etwa von Tracerpartikeln zur Geschwindigkeitsbestimmung mit PIV bzw. PTV Verfahren. Die benötigten Laserleistungen liegen dabei nur bei einem Mikrowatt am Ort des zu untersuchenden Objektes. Gleichzeitig ist eine quantitative Detektion von Dichteänderungen in Fluiden möglich. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass wir Dichteänderungen ab  $2,2 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$  auflösen können, ohne Kontrastmittel oder eine nachgeschaltete Datenaufbereitung verwenden zu müssen [Krishnamachari 2005, Holtmann 2006].

In diesem Beitrag wird insbesondere die optische Tiefenauflösung im Vergleich zu konventionellen Mikroskopieverfahren anhand der Impulsantwort des Systems diskutiert. Die hieraus resultierenden Auswirkungen auf die Geschwindigkeitsfeldvermessung in Mikroströmungen werden anhand von tiefenaufgelösten Kanalströmungsmessungen demonstriert.

### Messverfahren und experimentelle Realisierung

Das verwendete Messverfahren beruht auf der optisch nichtlinearen Zweistrahlkopplung, bei der zwei kohärente Lichtwellen in einem photorefraktiven Material überlagert werden [Yeh 1989]. Das entstehende Interferenzmuster wird durch das Material in eine Brechungsindexmodulation umgesetzt, an dem beide 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 [Krishnamachari 2003]. Dieses System kann demnach als zeitlicher Hochpassfilter beschrieben werden, bei dem sich zeitlich ändernde Signalanteile verstärkt

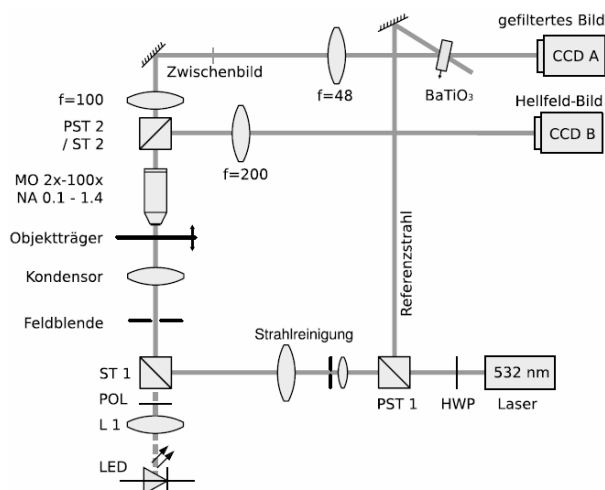


Abb. 1: Experimenteller Aufbau eines bewegungsdetektierenden Mikroskopsystems für die Analyse von Mikroströmungen.

- BaTiO<sub>3</sub>: photorefraktiver Bariumtitanatkristall,  
PST: Polarisierender Strahlteiler,  
HWP: Polarisationsdrehendes Wellenplättchen,  
LED: kurzkohärente Lichtquelle,  
POL: Polarisator,  
MO: Mikroskopobjektiv  
CCD: Digitalkamera

und statische Hintergründe unterdrückt werden [Anderson1989]. Diese Eigenschaften sind insbesondere in der Mikrogeschwindigkeitsfeldanalyse mittels  $\mu$ -PIV von Vorteil, bei der kontrastarme Phasenobjekte als Tracerpartikel vor einem unregelmäßigen Hintergrund in Echtzeit detektiert werden sollen [Holtmann2006].

Die experimentelle Realisierung dieses Prinzips in Kombination mit einem Mikroskop ist in Abb.1 zu sehen. Ein Nd:YAG – Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm wird aufgespalten in einen Signal und einen Referenzstrahl. Über einen Piezospiegel kann dem Referenzarm ein definierter Phasenhub aufgeprägt werden, um eine Kalibration des Systems auf Phasenänderungen durchzuführen. Der Signalstrahl wird aufgeweitet und durch eine Fourierfilterung homogenisiert, um durch eine Kondensorlinse auf das zu untersuchende Probenvolumen 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 Weißlicht- oder Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen. Die benötigte Leistung im Signalstrahl beträgt dabei nur einige Nanowatt bis zu einem Mikrowatt und die des Referenzstrahls bis zu wenigen Milliwatt.

### Laterales und axiales Auflösungsvermögen der optischen Bewegungsdetektion

Zur Untersuchung dreidimensionaler mikrofluidischer Geschwindigkeitsfelder ist die laterale und axiale Auflösung der verwendeten Mikroskopietechnik das entscheidende Kriterium für eine hochwertige Bildaufnahme für eine nachfolgende PIV- (Particle Image Velocimetry) Auswertung. Zur Beurteilung dieser Größen werden in der Mikroskopie üblicherweise die Punkttransferfunktionen der Mikroskope herangezogen. Hierzu werden die beugungsbeugrenzten Abbildungen von Partikeln mit Durchmessern kleiner der optischen Auflösungsgrenze des Mikroskops aufgezeichnet und als Impulsantwort des Systems interpretiert.

Für eine dreidimensionale Geschwindigkeitsfeldanalyse unter Ausnutzung der Schärfentiefe des Mikroskopsystems mit PIV Verfahren ist jedoch die Verwendung von Tracerpartikeln mit Durchmessern etwas oberhalb der Auflösungsgrenze der Mikroskopoptik im Bereich von einigen hundert Nanometern bis wenigen Mikrometern üblich. Deshalb ist für die Geschwindigkeitsfeldbestimmung die Auswirkung von Partikeln dieser Größenordnung auf andere Höhenschnitte wichtiger als die Punkttransferfunktion des Systems. Für Fluoreszenzmikroskopische PIV-Verfahren ist dies z.B. von Bourdon et al. 2004 untersucht worden.

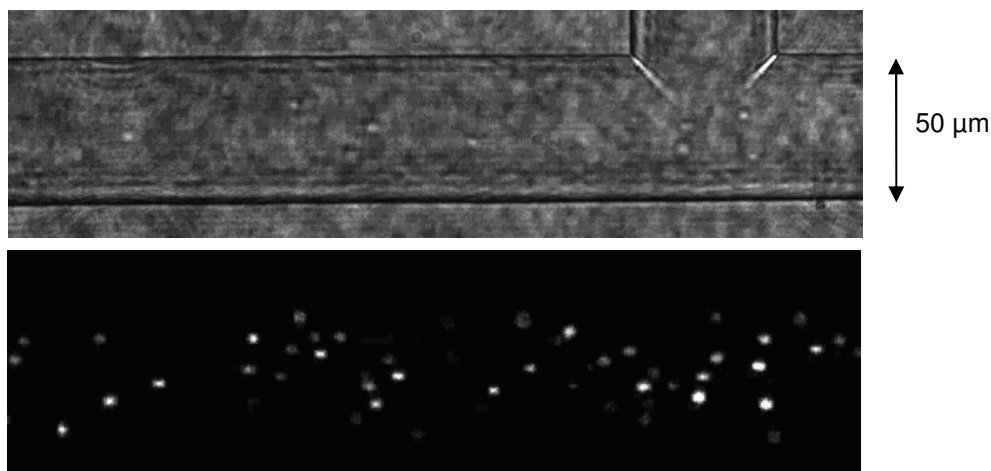


Abb.2: Kanalströmung mit menschlichen Erythrozyten in einem 50  $\mu\text{m}$  breiten und 30  $\mu\text{m}$  hohen Kanal. Oben: Weißlichtaufnahme, unten: simultan aufgenommene Aufnahme derselben Szene mit bewegungsdetektierender Mikroskopie.

## 54.4

Das hier vorgestellte Verfahren der optischen Bewegungsdetektion ist nicht auf fluoreszierende Tracerpartikel beschränkt, sondern kann verschiedenste absorbierende oder Phasenobjekte als Tracerpartikel, insbesondere auch biologische Objekte wie etwa Bakterien oder Blutzellen, mit hohem Partikelkontrast darstellen.

In Abb. 2 ist beispielhaft eine Strömung in einem Kanal von 50  $\mu\text{m}$  Breite und einer Höhe von 30  $\mu\text{m}$  gezeigt. Als Tracerpartikel wurden hier, wie in der Flow Cytometry von Interesse, menschliche Erythrozyten mit einer Größe von 5 bis 7  $\mu\text{m}$  verwendet. Der Vergleich einer Partikelabbildung in Abb. 3 von konventioneller Weißlichtmikroskopie und der bewegungsdetektierenden Mikroskopie zeigt die deutliche Optimierung des Partikelkontrastes durch das bewegungsdetektierende System. Ersichtlich wird auch, dass die laterale Auflösung des Mikroskops nicht durch die Bewegungsdetektion, sondern durch die beugungsbedingte Auflösungsgrenze der Mikroskopoptik bestimmt wird. Um die axiale Auflösung des bewegungsdetektierenden Systems definiert zu bestimmen, wurden synthetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  auf einer optisch ebenen, rotierenden Glasscheibe untersucht. Die Partikelbewegung wurde parallel zur Abbildungsebene ausgerichtet. Die Schnitte durch die Abbildung der Partikel in Abhängigkeit von der Defokussierung können in so genannten z-Stapeln dargestellt werden. Dabei werden die Schnitte einzelner Höhenebenen zu einem Bild zusammengefasst. In Abb. 4 sind die z-Stapel für absorbierende Partikel dargestellt. Ein vertikaler Schnitt durch die Mitte dieses z-Stapels repräsentiert den Einfluss des Partikels auf andere Höhenebenen. Es zeigt sich, dass bei Verwendung von absorbierenden Partikeln als Tracer, der Schärfentiefebereich identisch für Weißlicht und bewegungsdetektierende Mikroskopie ist. Die Tiefenselektion für PIV Messungen ist demnach bei absorbierenden Partikeln als gleich anzusehen. Ein anderes Verhalten zeigt sich bei teiltransparenten bzw. transparenten Tracerpartikeln. Diese Phasenobjekte führen in der

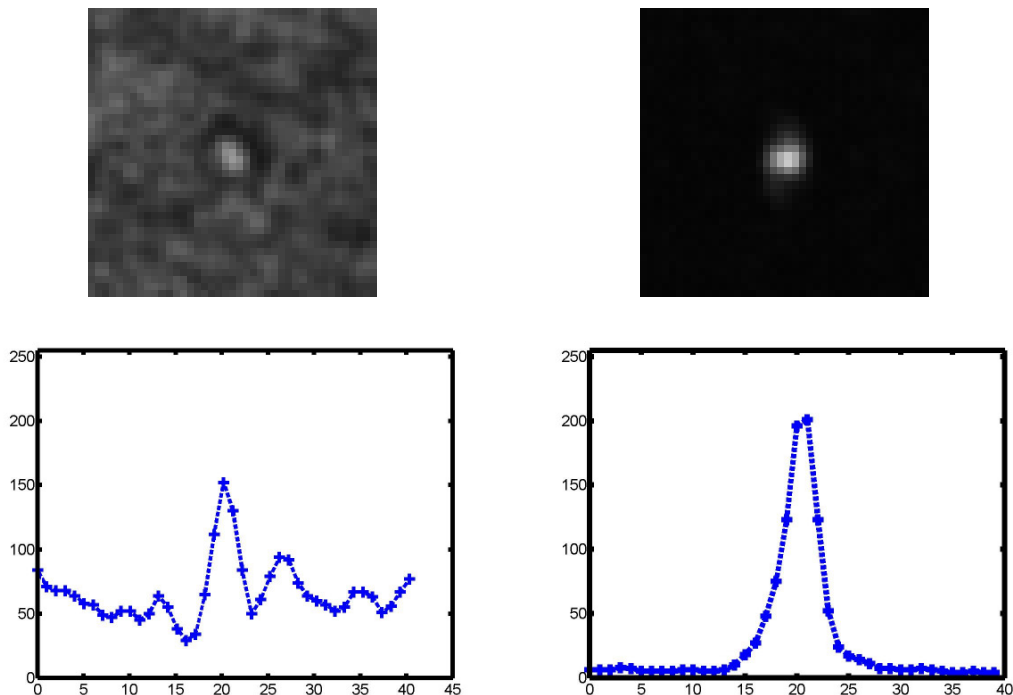


Abb. 3: Vergrößerung repräsentativer Tracerpartikel aufgenommen mit Weißlicht (links) und bewegungsdetektierender Mikroskopie (rechts). Unter den Abbildungen der Partikel ist jeweils ein Schnitt durch das Partikel dargestellt. Die Hintergrundunterdrückung und Signalverstärkung durch die Bewegungsdetektion führt zu einer Kontrastverbesserung um den Faktor zwei.

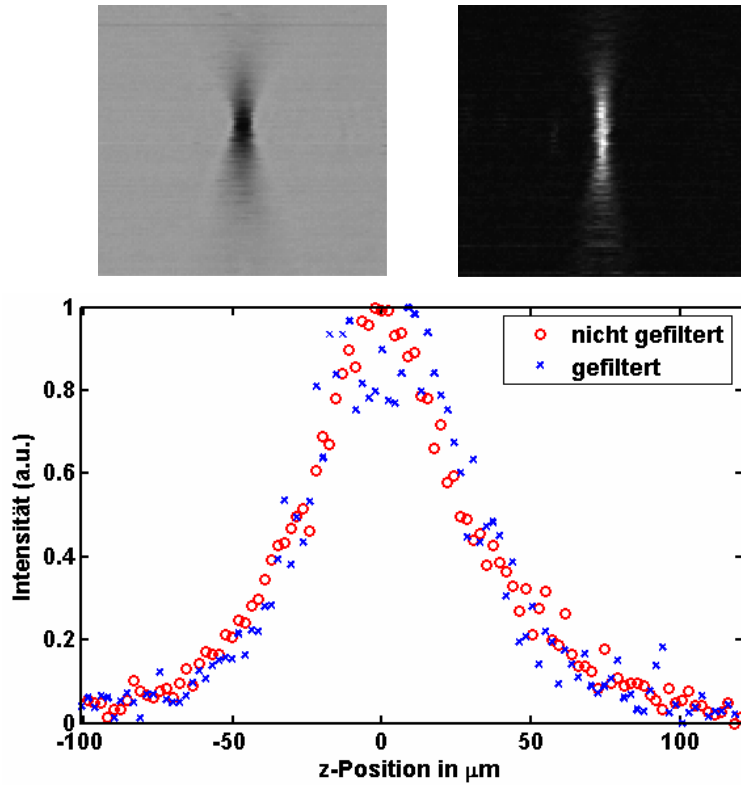


Abb. 4: Z-Stapel für ein absorbierendes Partikel mit einem Durchmesser von 5,6 μm. Links: Hellfeldaufnahme. Rechts: Bewegungsdetektierte Aufnahme. Unten: Schnitt durch den z-Stapel für beide Mikroskopiertechniken. Die Breite der Kurve gibt die Schärfentiefe des Systems an.

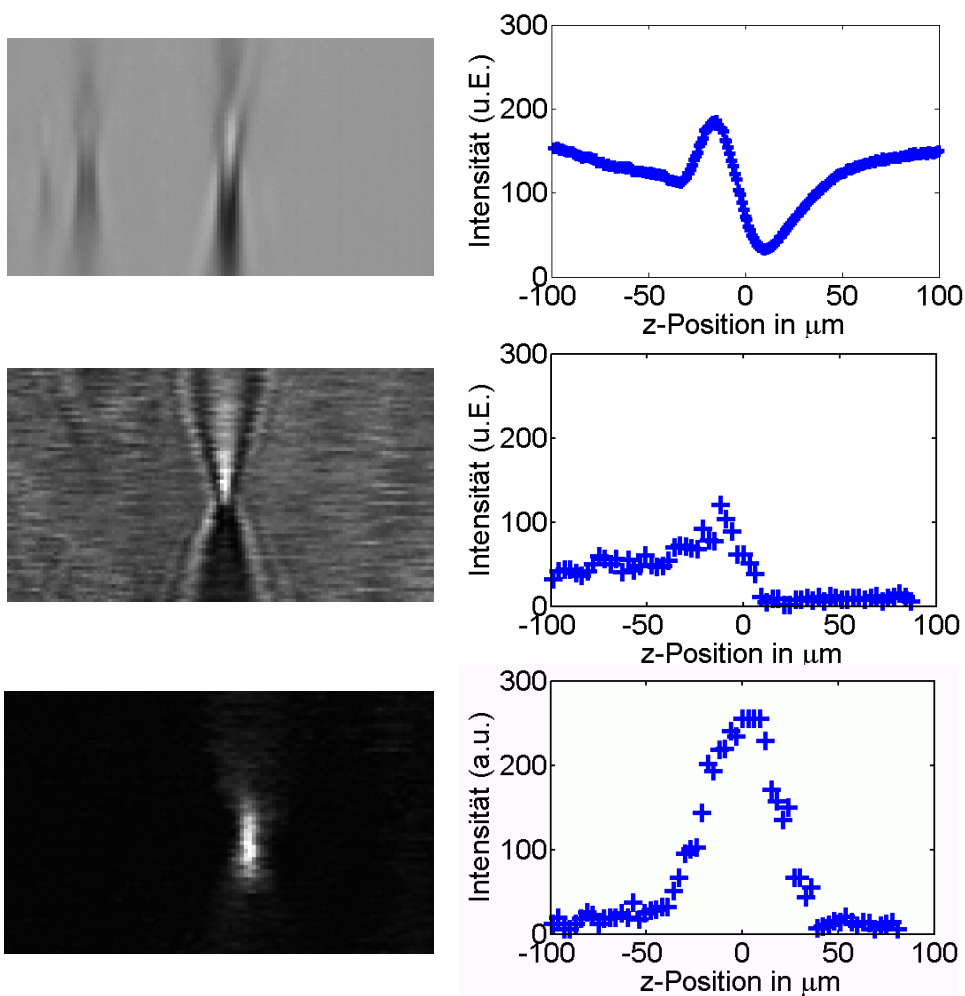


Abb. 5: Z-Stapel und Schärfentiefe für ein teiltransparentes Partikel mit einem Durchmesser von 4,4 μm. Oben: Kurzkohärente Hellfeldaufnahme. Mitte: Kohärente Hellfeldaufnahme. Unten: bewegungsdetektierende Mikroskopie. Links ist jeweils ein Schnitt von oben nach unten durch die Mitte der z-Stapel gezeigt.

## 54.6

Weißlichtmikroskopie aufgrund der Brechung des Lichtes zu einer asymmetrischen Tiefenabhängigkeit der Partikelintensität (Abb. 5). Diese Asymmetrie ist auch in der kohärenten Hellfeldmikroskopie erkennbar, wobei hier aufgrund der höheren Kohärenz ein größerer Einflussbereich des Partikels auf andere Schichten zu beobachten ist. Diese Asymmetrie der Partikeltransferfunktion bewirkt eine zusätzliche Messungenauigkeit in der axialen Positionsbestimmung der Partikel. Die Partikelposition ist hierbei am Übergang zwischen heller und dunkler Abbildung des Partikels gegeben (siehe Lee et al. 2007).

Bei nachfolgenden PIV Auswertungen von Weißlichtaufnahmen mit teiltransparenten Partikeln ist daher die Distanz zwischen Intensitätsmaximum und Partikelposition, die in den hier dargestellten Messungen mit einem 10fach Objektiv  $20\ \mu\text{m}$  betragen, zu berücksichtigen. Die Abhängigkeit dieses Korrekturterms von der jeweiligen Mikroskopoptik und insbesondere der Wahl des Mikroskopobjektivs machen eine Vermessung der Partikeltransferfunktion für jede Partikelsorte und Mikroskopoptik unerlässlich.

Die bewegungsdetektierende Mikroskopie minimiert den Einflussbereich eines Partikels deutlich, so dass eine bessere Tiefenselektion über die Schichtbildung erreicht werden kann. Zusätzlich wird aufgrund der Phasensensitivität der Bewegungsdetektion die axiale Partikeltransferfunktion symmetrisiert (Abb.5 unten). Dies bewirkt eine direkte Anwendbarkeit der Partikelbilder in PIV Auswertungen, da die axiale Position eindeutig durch das Intensitätsmaximum bestimmt wird.

### Evaluation der bewegungsdetektierenden Mikroskopie in der tiefenaufgelösten Geschwindigkeitsfeldvermessung

Die zuvor dargestellten tiefenselektiven Eigenschaften machen die bewegungsdetektierende Mikroskopie zu einem geeigneten Aufnahmeverfahren von Partikelbildern teiltransparenter Tracer für die mikrofluide tiefenaufgelöste Geschwindigkeitsfeldvermessung. Beispielhaft ist in Abb. 6 das laterale Geschwindigkeitsprofil einer Kanalströmung gezeigt, das mit der bewegungsdetektierenden Mikroskopie vermessen wurde. Die Kanalbreite beträgt  $1\ \text{mm}$  bei einer Höhe von  $500\ \mu\text{m}$ , so dass hier nur die Hälfte des Geschwindigkeitsprofils abgebildet ist. Die Geschwindigkeitskomponente senkrecht zur Kanalachse liegt um Null. Die Maximal-

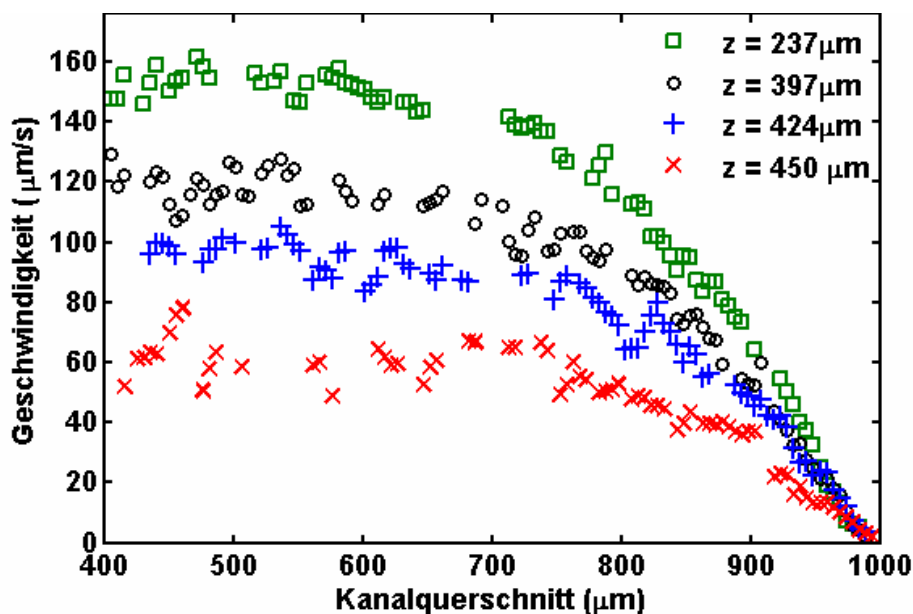


Abb. 6: Geschwindigkeitsprofile einer Kanalströmung vermessen mit der bewegungsdetektierenden Mikroskopie. Die Kanalhöhe beträgt  $500\ \mu\text{m}$ , die Kanalbreite  $1\ \text{mm}$ .

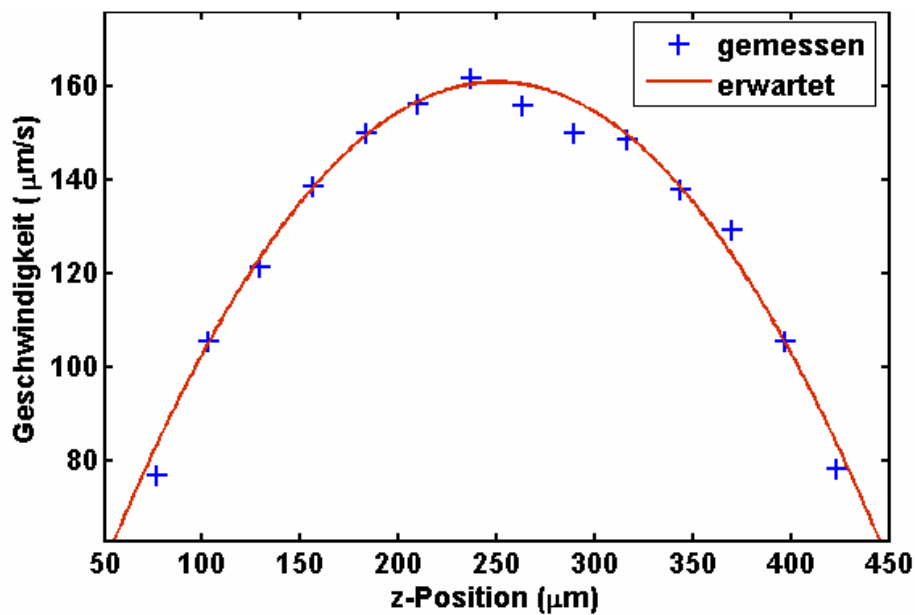


Abb.7: Maximalgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Messebene innerhalb der Kanalströmung.

geschwindigkeit der Strömung wird in der Mitte des Kanals bei einem Wert von  $160 \mu\text{m/s}$  erreicht. Trägt man die Abhängigkeit der Maximalgeschwindigkeit von der Messebene auf, erhält man ein erwartetes parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil, nun auch für den axialen Schnitt durch die Strömung. Die gute Übereinstimmung des erwarteten Geschwindigkeitsprofils mit den gemessenen Werten zeigt deutlich die zuvor bestimmte tiefenselektive Anwendung der optischen Bewegungsdetektion in der Vermessung von Geschwindigkeitsfeldern.

### Ausblick

In diesem Beitrag wurde das Messverfahren der optischen Bewegungsdetektion zur Vermessung von Geschwindigkeitsfeldern in Mikroströmungen vorgestellt und dessen Auflösungseigenschaften diskutiert. Die Fähigkeit, teiltransparente Phasenobjekte kontrastverstärkt darzustellen, erlaubt es mit unserem Verfahren Geschwindigkeitsfelder zu vermessen, in denen der Einsatz von fluoreszierenden Tracerpartikeln nicht möglich ist. Die symmetrische Tiefenabbildung von Partikeln ermöglicht eine optische Schichtbildung mit definierter Tiefenbestimmung von Tracerpartikeln. Somit wird eine tiefenaufgelöste Vermessung von 3D2C Geschwindigkeitsfeldern auch ohne Fluoreszenzpartikel ermöglicht und wird zukünftig an komplexeren Strömungsvorgängen angewendet werden. Um in Zukunft auch die dritte Geschwindigkeitskomponente vermessen zu können, wird aktuell an der Implementierung der Bewegungsdetektion in ein stereomikroskopisches Messsystem gearbeitet.

### Dankesworte

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1147 „Bildgebende Messverfahren für die Strömungsanalyse“.

**Literatur**

- Anderson, D.Z., Feinberg, J., 1989: Optical novelty filters, *Opt. Lett.* Vol 12, pp. 123-125
- Bourdon, C.J., Olsen, M.G., Gorby, A.D., 2004: Validation of an analytical solution for depth of correlation in microscopic particle image velocimetry. *Meas.Sci.Technol.* Vol.15 pp. 318-327
- Hoffmann, M., Schlüter, M., Rübiger, N., 2006: Experimental investigation of liquid–liquid mixing in T-shaped micro-mixers using  $\mu$ -LIF and  $\mu$ -PIV, *Chemical Engineering Science*, 61, pp. 2968-2976
- Holtmann, F. Wördemann, M., Eversloh, M., Grothe, H., Deitmar, H., Krishnamachari, V.V., Denz, C. 2006: Echtzeitbestimmung von Geschwindigkeits- und Dichtefeldern in Mikroströmungen mit Hilfe optisch nichtlinearer Bildaufnahme., 14. Fachtagung der Deutschen Gesellschaft für Laser-Anemometrie GALa e.V. , Braunschweig, pp. 49.1 – 49.6
- Holtmann, F., Krishnamachari, V.V., Grothe, O., Deitmar, H., Eversloh, M., Wördemann, M., Denz, C., 2006: Measurement of Density Changes in Fluid Flow by an optical Nonlinear Filtering Technique 12th International Symposium on Flow Visualization (ISFV 2006, Göttingen)
- Krishnamachari, V.V., Denz, C., 2003: Real-time phase measurement with a photorefractive novelty filter microscope, *J. Opt. A* Vol. 5 pp. 239-243
- Krishnamachari, V.V., Denz, C., 2004: A phase-triggering technique to extend the phase-measurement range of a photorefractive novelty filter microscope, *Appl. Phys. B* Vol. 79 497-501
- Krishnamachari, V.V.; Grothe, O.; Deitmar, H., Denz, C., 2005: Novelty filtering with a photorefractive lithium-niobate crystal, *Appl. Phys. Lett.* Vol. 87 071105
- Lee, S-H., Grier, D.G., 2007: Holographic microscopy of holographic trapped three-dimensional structures. *Opt. Exp.* Vol. 15, No.4 pp. 1505-1512
- Petermeier, H., Kowalczyk, W., Delgado, A., Denz, C., Holtmann, F., 2007: Detection of microorganismic flows by linear and nonlinear optical methods and automatic correction of erroneous images artefacts and moving boundaries in image generating methods by a neuronumerical hybrid implementing the Taylor's hypothesis as a priori knowledge, *Exp. Fluids* Vol. 42 pp.611-623
- Santiago J.G., Wereley S.T., Meinhart C.D., Beebe D.J., Adrian R.J., 1998: A particle image velocimetry system for microfluidics, *Exp. Fluids* Vol. 25 pp. 316-319
- Whitesides, G.M., 2006: The origins and the future of microfluidics. *Nature* Vol. 442 pp. 368-373
- Yeh, P., 1989: Two-wave mixing in nonlinear media, *IEEE J. Quant. Elect.* Vol. 25, pp. 484- 519