

Reproduzierbares Raman

So erreichen Sie eine Spektrale Übereinstimmung von mehr als 99,5 % von Gerät zu Gerät

Vielfalt ist die Würze des Lebens, Variabilität jedoch nicht – insbesondere für OEM-Geräteentwickler, die eine Antwort auf der Grundlage der Qualität eines Raman-Spektrums garantieren müssen. Diese Antworten sind wichtig, für ihre Kunden und für diejenigen, die von den Entscheidungen betroffen sind, die auf der Grundlage dieser Ergebnisse getroffen werden. Ein qualitativ hochwertiges OEM-Spektrometer sollte von vorneherein eine geringe Variabilität von Gerät zu Gerät aufweisen; alle verbleibenden kleinen Unterschiede sollten korrigiert werden, um möglichst robuste und wiederholbare Messergebnisse im Feld zu erzielen. In dieser Tech Note demonstrieren wir eine Methode zur Korrektur geringfügiger Abweichungen für die Wellenzahl und Intensität jedes Geräts, bei der eine spektrale Übereinstimmung von mehr als 99,5 % zwischen zwei verschiedenen Raman-Spektrometern desselben Modells und derselben Konfiguration erreicht wird.

DIE NOTWENDIGKEIT DER REPRODUZIERBARKEIT

Applikationsspezifische Raman Spektrometer von OEM Herstellern müssen Tag für Tag konsistente Antworten liefern, unabhängig von der Seriennummer des Gerätes bzw. wo diese weltweit eingesetzt werden. Während Methodenentwicklung, Probenhandhabung und Algorithmenentwicklung die Grundlage hierfür bilden, müssen auch die Raman Spektrometer selber für die Anwendung eine sehr gute Reproduzierbarkeit von Gerät zu Gerät aufweisen.

Wie kann man also sicherstellen, dass jeweils das gleiche Spektrum von einer Vielzahl von Geräten ausgegeben wird, obwohl jedes dieser Geräte individuell justiert und optimiert ist? Egal wie gründlich und sorgfältig die Qualitätskontrolle hierfür ist, es wird wegen der hohen Anzahl von optischen, mechanischen und elektronischen Teilen in jedem Gerät unvermeidliche Unterschiede geben, die zu unterschiedlichen spektralen Resultaten führen, wenn diese Spektrometer in Stückzahlen von 10, 100 oder 100.000 Stück gebaut werden.

REPRODUZIERBARKEIT VERWIRKLICHEN

Ein gewisser Grad an Reproduzierbarkeit kann schon durch ein gutes optisches Design erreicht werden. So ist zum Beispiel das von Wasatch Photonics verwendete Transmission-Design unempfindlich gegenüber

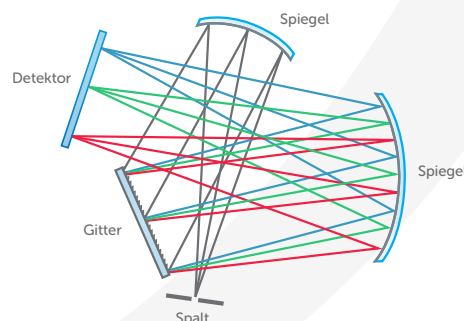
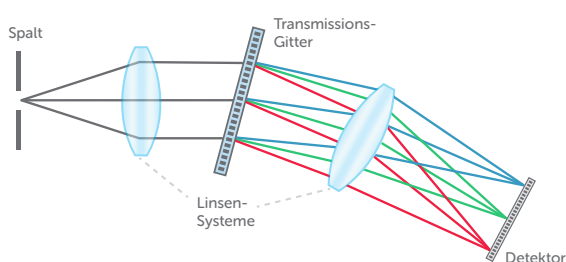
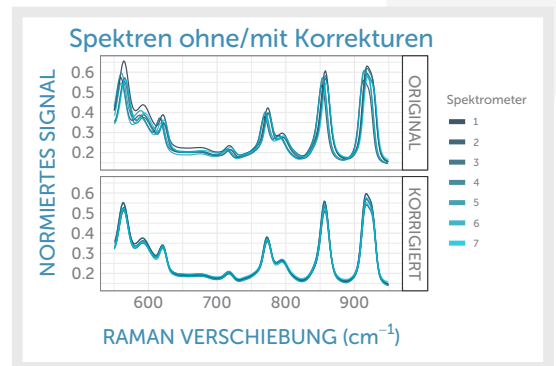


Abbildung 1: (links) Transmissionsspektrometer mit VPH Gitter. (rechts) Crossed Czerny-Turner Spektrometer mit Reflexionsoptik.

kleinen Variationen bei der Justage. Zusammen mit dem hier eingesetzten VPH-Gitter (Holographisches Volumen Phasen Gitter), ergibt sich so ein Aufbau mit hoher Reproduzierbarkeit. Dies ist eine der Gründe, warum OEM Kunden Spektrometer mit einem Transmissionsdesign – im Gegensatz zu Designs mit Reflexionsoptik, replizierten Gittern zum Beispiel im Crossed-Czerny Turner Design – bevorzugen. (Weiterführende Informationen zu diesen Unterschieden erhalten Sie in unserer Tech Note [Extending Raman's Reach](#).)

Auch mit dem bestmöglichen optischen Design und einer guten Herstellungspraxis (GMP) wird es immer zu Variationen bei der spektralen Empfindlichkeit und der Wellenzahlachse kommen. Gerade bei Raman Anwendungen, wie dem Spektrenvergleich mit Datenbanken, kann die Korrektur dieser verbleibenden Variationen zu einer signifikanten Verbesserung in der Reproduzierbarkeit von Gerät zu Gerät führen, und damit letztendlich zu konsistenten Ergebnissen mit jedem Spektrometer. Um dies zu erreichen, sind glücklicherweise nur zwei Korrekturen erforderlich, was letztendlich zu einer unglaublichen Reproduzierbarkeit von Gerät zu Gerät führt, und so auch die anspruchsvollsten OEM-Anwendungen ermöglicht.

EINMALIGE WERKSKALIBRIERUNG MIT TÄGLICHER KORREKTUR

In der US Pharmacopoeia¹ im Kapitel Raman-Geräte werden für die richtige Kalibrierung von Raman-Spektrometern drei Faktoren genannt, die zu berücksichtigen sind: die primäre Wellenlängenkalibrierung (x-Achse), die Intensität (y-Achse) und die Laserwellenlänge.

WELLENLÄNGENKALIBRIERUNG

Bei den Spektrometern von Wasatch Photonics mit einem Detektorarray, wird die Signalintensität als Funktion der Position auf dem Detektorarray im Pixelraum gemessen. Die Übersetzung vom Pixelposition des Detektorarrays auf die Wellenlänge des einfallenden Lichtes basiert auf der Wellenlängenkalibrierung. Für diese Kalibrierung werden während der Produktion Kalibrierlichtquellen mit sehr scharfen und klar definierten Atomemissionslinien verwendet.

Bei der Kalibrierung wird die Position eines vordefinierten Satzes von Emissionspeaks im Pixelraum bestimmt und die bekannten Emissionswellenlängen werden mit einer Polynomfunktion in Abhängigkeit von diesen gemessenen Pixelpositionen angepasst.

Die resultierenden Kalibrierkoeffizienten werden im EEPROM des Spektrometers gespeichert und können ausgelesen und angewendet werden, sobald das Spektrometer an den Computer angeschlossen ist. Der Anwender kann die Genauigkeit der Wellenlängenkalibrierung mit geeigneten Emissionsquellen überprüfen. Die Wellenlängenkalibrierung selbst sollte jedoch nur im Werk beim Hersteller durchgeführt werden.

RELATIVE INTENSITÄTSKALIBRIERUNG

Eine Kalibrierung der Intensitätsachse ist für reproduzierbare Peakhöhenverhältnisse unerlässlich. Da jedes Spektrometer bei der Herstellung für sich justiert und optimiert wird, kommt es trotz des robusten Transmissionsdesigns von Wasatch Photonics zu kleinen Unterschieden in der Gesamtantwort verschiedener Spektrometer auf die gleiche Probe.

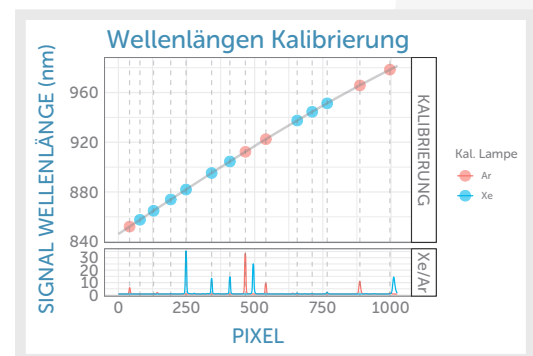


Abbildung 2: Die Wellenlängenkalibrierung erfolgt durch polynomielle Anpassung bekannter Wellenlängen von Atomemissionen als Funktion der gemessenen Peakpositionen im Pixelraum

Die Intensitätskalibrierung erfolgt gemäß den Vorgaben der ASTM E2911-13 (2013) mit einem Standard-Referenzmaterial (SRM), welches bei der Bestrahlung durch den Ramanlaser ein breitbandiges und bekanntes Emissionssignal erzeugt. Typischerweise werden hierzu Referenzmaterialien aus einem massiven Glasblock mit einer bekannten Zusammensetzung verwendet, die im Gegensatz zu den Referenzmaterialien, die in der UV-VIS-NIR Spektroskopie zum Einsatz kommen, deutlich einfacher zu handhaben sind.

Das gemessene Emissionsspektrum des SRM wird mit dem erwarteten Emissionsspektrum verglichen, und das Verhältnis zwischen den beiden Spektren definiert die spektrale Intensitätskorrektur an jedem Pixel. Diese Kalibrierung wird in der Produktion im Werk durchgeführt, bei der die glatte spektrale Ansprechkurve des Spektrometers an eine funktionale Form angepasst wird. Die Parameter des spektralen Antwortprofils werden im EEPROM des Spektrometers gespeichert, von wo aus sie von der Software gelesen werden können, um die Intensitätskorrektur anzuwenden.

Anwender können die Genauigkeit der Intensitätskorrektur mit dem Intensitätsverhältnis zweier Peaks einer Referenzsubstanz überprüfen, wie sie z. B. in der ASTM 1840-96 (2014) beschrieben ist.² Das Peakhöhenverhältnis für zwei Peaks in einem Raman-Spektrum kann jedoch von der optischen Auflösung (Linienbreite) des Geräts abhängen, zum Beispiel bei einem kompakten Raman-System mit begrenzter optischer Auflösung: Da die Fläche unter der Kurve für jede Spektrallinie konstant bleibt, wenn eine geringere Auflösung einen Peak verbreitert, verringert sich auch die Peakhöhe. Dies ist wichtig zu bedenken, wenn experimentelle Peakhöhenverhältnisse mit Literaturwerten verglichen werden, die mit hochauflösenden Geräten aufgenommen wurden.

KALIBRIERUNG DER LASERWELLENLÄNGE

Die abschließende Kalibrierung, die im Werk durchgeführt werden muss, ist die Bestimmung der exakten Anregungslaser-Wellenlänge. Laser mit einer bestimmten (nominalen) Raman-Wellenlänge sind so spezifiziert, dass sie in einen Wellenlängenbereich von typischerweise $\pm 0,5$ nm fallen, was bei einer Raman-Anregungswellenlänge von 830 nm einer Raman-Verschiebung von etwa 7 cm^{-1} entspricht. Für eine bessere Genauigkeit muss daher die exakte Laserwellenlänge anhand der Position bekannter Raman-Banden einer Referenzsubstanz bestimmt werden, idealerweise einer in der ASTM 1840-96 (2014) veröffentlichten,² für die die Positionen der Raman Banden mit einer Genauigkeit von besser als 1 cm^{-1} definiert sind.

Die durchschnittliche Differenz zwischen den gemessenen Peakpositionen der Referenzsubstanz und den bekannten Peakpositionen ergibt die Abweichung der tatsächlichen Laserwellenlänge von der nominalen Laserwellenlänge. Bei Wasatch Photonics Spektrometern mit eingebauten Lasern wird die gemessene Laserwellenlänge in das EEPROM des Spektrometers geschrieben und von der Software zur Bestimmung der Raman-Verschiebung aus der Wellenlängenkalibrierung verwendet. Wenn der Laser und das Spektrometer unabhängig voneinander beschafft werden, zum Beispiel für OEM Anwendungen, muss diese Laserwellenlängenkalibrierung beim OEM Kunden durchgeführt werden.

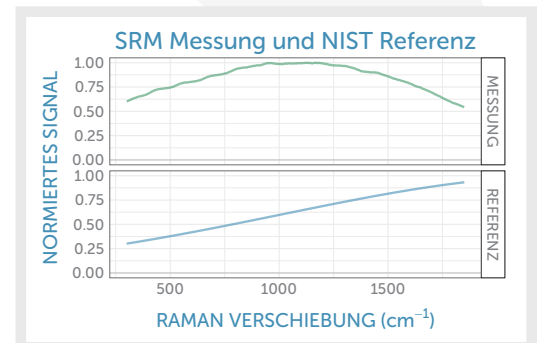


Abbildung 3: Beispiel für die gemessene und die veröffentlichte Spektralform der Emission eines SRM-Standards.

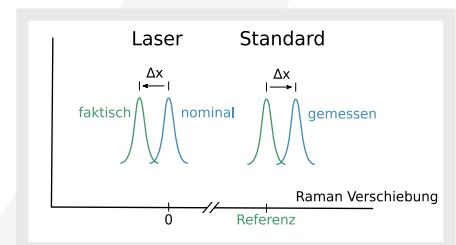


Abbildung 4: Kalibrierung der Laserwellenlänge anhand der Abweichung einer gemessenen Raman-Peakposition (unter Annahme der nominalen Laserwellenlänge) zur Referenz-Peakposition

Im Feld kann auch ein Anwender die Genauigkeit der Laserwellenlänge überprüfen, indem er die gemessenen Raman-Peakpositionen mit den Referenz-Peakpositionen vergleicht. Es wird empfohlen, diese Wellenzahlkorrektur täglich zu validieren und gegebenenfalls anzupassen, wie im nächsten Abschnitt beschrieben.

TÄGLICHE KORREKTUR DER WELLENZAHL

Für hochgenaue spektroskopische Messungen ist es notwendig, die kleinen, aber bemerkbaren, täglichen Schwankungen im gesamten System zu berücksichtigen. Diese Korrektur der Wellenzahlachse erfasst alle geringfügigen Änderungen der Laserwellenlänge, der Wellenlängenkalibrierung des Spektrometers oder andere geringfügige Verschiebungen des Spektrums, z. B. aufgrund von externen Temperaturänderungen. Es hat sich gezeigt, dass Raman-Instrumente jeder Leistungsstufe eine solche tägliche Wellenzahlkorrektur benötigen, um eine zuverlässige Standardisierung von Raman-Spektren für den Transfer von Spektralbibliotheken zwischen Instrumenten zu erreichen⁵.

Diese Korrektur wird mit einem einzigen, additiven Wellenzahl-Offset durchgeführt, der ganz analog zur oben beschriebenen Laserwellenlängen-Kalibrierung ermittelt wird. Die durchschnittliche Abweichung zwischen bekannten Raman-Peakpositionen zu den für diesen täglichen Referenzstandard gemessenen Peakpositionen wird als additive Korrektur auf das gesamte Raman-Spektrum angewendet. Diese Korrektur wird typischerweise mit einem Referenzstandard wie z. B. Polystyrol gemäß USP-Kapitel <1120>³ oder EP-Kapitel <2.2.48>⁴ durchgeführt. Die resultierende, korrigierte, Wellenzahlachse ergibt dann eine hohe Raman-Verschiebungsgenauigkeit und damit eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Peakpositionen von Gerät zu Gerät.



BEISPIEL KALIBRIERUNG UND KORREKTUR

Mit dieser grundlegenden Methode können wir nun die Intensitätskalibrierung und Wellenzahlkorrektur für einen Satz von sieben verschiedenen, aber identisch aufgebauten und konfigurierten, 830-nm-Raman-Systemen mit integrierter Laser- und Sondenoptik (WP 830-L) demonstrieren. Eine Probenlösung von Glukose in Wasser in einer Polystyrol-Küvette wird in den Probenhalter eingesetzt, der wiederum direkt an der Frontlinse des Spektrometers befestigt ist. Als Demonstrationsprobe wurde hier Glukose in Wasser gewählt, da das Raman-Spektrum sehr komplex ist und viele Peaks über einen weiten Wellenzahlbereich verteilt aufweist.

WELLENLÄNGENKALIBRIERUNG

Die Wellenlängenkalibrierung wurde während der Produktion durchgeführt und wird so verwendet wie sie ist. Die Kalibrierung für eines der Spektrometer ist als Beispiel in Abb. 2 zu sehen.

KORREKTUR DER WELLENZAHL

Die in diesem Beispiel verwendete Probenlösung befindet sich in einer Polystyrol-Küvette, einem Material, das in der ASTM-Publikation² als eine Referenzverbindung aufgeführt ist. Zwei

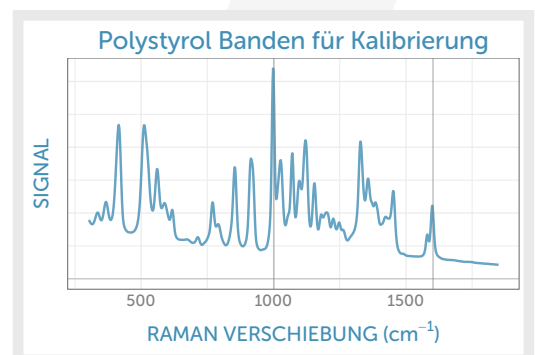


Abbildung 6: Beispielspektrum einer Glukoselösung in einer Polystyrol Küvette mit Markierung der verwendeten Polystyrol-Referenzpeaks.

Polystyrol-Peaks bei $1001,4 \text{ cm}^{-1}$ und $1602,3 \text{ cm}^{-1}$ (ASTM) werden als Wellenzahl-Referenz verwendet, da diese Peaks ausreichend von etwaigen Probenpeaks der Glukose Lösung getrennt sind.

Die resultierenden durchschnittlichen Werte der Wellenzahlkorrekturverschiebung variieren je nach Einheit von -4 cm^{-1} bis $+2 \text{ cm}^{-1}$. Der größte Teil dieser Korrektur ist auf die Verwendung der nominalen Laserwellenlänge ($830,0 \text{ nm}$) bei der ursprünglichen Erfassung zurückzuführen. Nach dieser Wellenzahlkorrektur weicht die Position aller Glukose-Peaks von jedem der sieben Testspektrometer um weniger als $0,5 \text{ cm}^{-1}$ von der mittleren Position ab, was weniger als ein Viertel eines Pixels auf dem Detektorarray entspricht und auf die hohe Genauigkeit der Wellenlängenkalibrierung hindeutet.

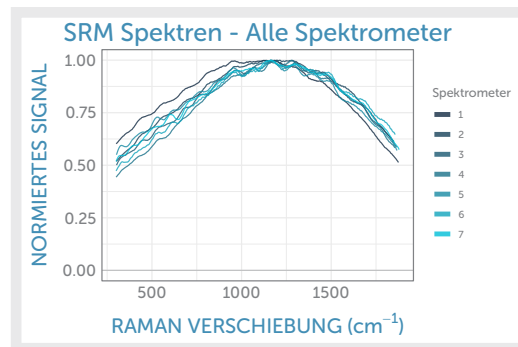
Die Wellenzahlkorrektur führt zu einer deutlichen Verbesserung der Übereinstimmung der Peakpositionen zwischen den mit verschiedenen Spektrometern aufgenommenen Probenspektren.

RELATIVE INTENSITÄTSKALIBRIERUNG

Zur Demonstration der Durchführung der Intensitätskalibrierung messen wir die Emission einer Standard-Referenzmaterialprobe, die spezifisch für die Laserwellenlänge 830 nm ist (SRM 2246). Eine vollständige Liste der verfügbaren relativen Intensitätskorrekturstandards für die Raman-Spektroskopie finden Sie auf der NIST-Website SRM Home und in ASTM E2911-13 (2013)⁶. Das Emissionsspektrum für SRM 2246 wurde für jedes einzelne der sieben WP 830-L-Spektrometer gemessen, normiert und mit dem erwarteten (normierten) Emissionsspektrum, wie von NIST angegeben, verglichen.

Auch ohne Intensitätskalibrierung stimmen die spektralen Empfindlichkeitskurven der einzelnen Spektrometer sehr gut überein, was auf die hohe Reproduzierbarkeit der verwendeten

Transmissionsoptik des Spektrometers hindeutet. Das Verhältnis zwischen



Normierte 9: Normalisierte Emissionsspektren von SRM 2246, aufgenommen mit allen Spektrometern im Test.

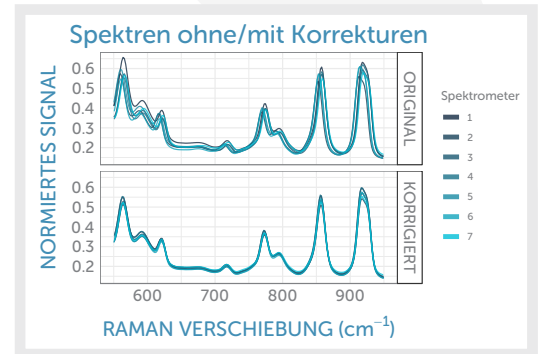


Abbildung 8: Vergleich eines Ausschnitts des (normierten) Probenspektrums (Glukose in Wasser) für sieben Spektrometer mit Wellenzahlkorrektur (unten) und ohne Wellenzahlkorrektur unter Annahme der nominalen Laserwellenlänge (oben). Die Wellenzahlkorrektur führt zu einer deutlichen Verbesserung der Übereinstimmung aller Peakpositionen

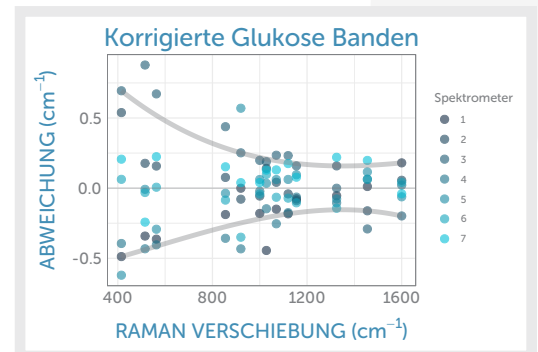


Abbildung 7: Die Abweichung der Glukose-Peak-Positionen für einzelne Spektrometer von der mittleren Position über alle Spektrometer zeigt eine sehr geringe Streuung von weniger als $0,5 \text{ cm}^{-1}$ oder weniger als $1/4$ Pixel

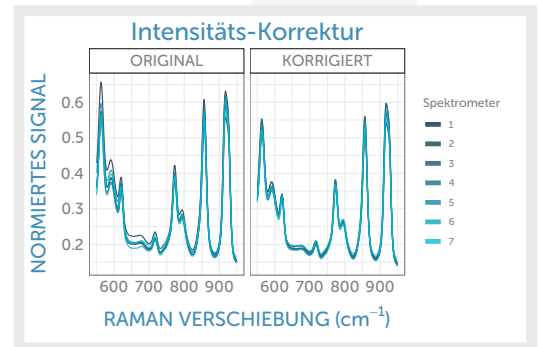


Abbildung 10: Vergleich eines Ausschnitts aus dem (normierten) Probenspektrum (Glukose in Wasser) für sieben Spektrometer mit Wellenzahl- und Intensitätskorrektur (rechts) und ohne Intensitätskorrektur (links). Die Intensitätskorrektur führt zu einer hervorragenden Übereinstimmung aller Peakhöhen

erwarteter Emission und gemessener Emission bildet die Intensitätskalibrierung (an jedem Pixel). Die Anwendung dieser Intensitätskalibrierung auf alle experimentellen Spektren eliminiert die spektrometerspezifische spektrale Empfindlichkeit, was zu einer hervorragenden Übereinstimmung der relativen Peakhöhen über mehrere Spektrometer hinweg führt. Für den besten Vergleich der relativen Peakhöhen haben wir alle Spektren auf ein einziges Peakmaximum normiert.

ERGEBNIS: HOHE KORRELATION ZWISCHEN DEN SPEKTREN

Um die Übereinstimmung zwischen den korrigierten Spektrometern zu quantifizieren, bestimmen wir den Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren jeder möglichen Paarung von Spektrometern innerhalb der Gruppe, nach Interpolation auf eine gemeinsame Wellenzahlachse mit 1 cm^{-1} Abstand. Dieser Korrelationskoeffizient wird üblicherweise als "Trefferqualitätsindex" bei einem Bibliotheks-Vergleich verwendet und misst die allgemeine Übereinstimmung zwischen verschiedenen Spektren. Für die sieben Spektrometer in dieser Gruppe finden wir 21 paarweise Korrelationskoeffizienten mit der folgenden Verteilung: Wir erhalten eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen zwei beliebigen (korrigierten) Spektren mit einer typischen paarweisen Korrelation von 99,8 % und einer Mindestkorrelation von 99,5 %. Dies zeigt die hervorragende Übereinstimmung zwischen Spektrometern, die erreicht werden kann, wenn man mit einem guten optischen Design beginnt und die entsprechenden Korrekturen anwendet.

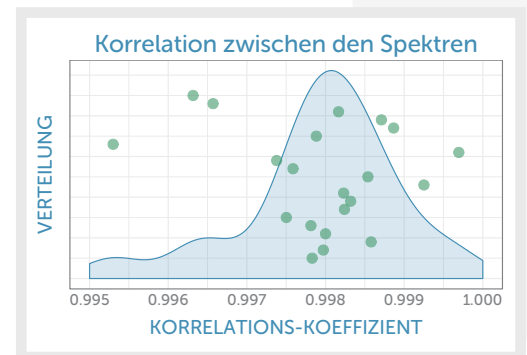


Abbildung 11: Verteilung der spektralen Übereinstimmung für alle paarweisen Vergleiche des korrigierten Probenspektrums, aufgenommen jeweils mit verschiedenen Spektrometern.

SCHLUSSFOLGERUNG

OEM-Anwendungen erfordern ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den einzelnen Spektrometern einer Serie, um konsistente, zuverlässige Ergebnisse im Feld zu liefern. Aufgrund ihrer komplexen Optik weisen jedoch selbst identisch konstruierte, konfigurierte und kalibrierte Spektrometer eine gewisse Abweichung in ihren Spektren auf. Diese Variationen können einfach und effektiv durch Intensitäts- und Wellenzahlkorrekturen aufgefangen werden, wodurch die Antwort aller Geräte vor der anwendungsspezifischen Analyse der Spektren standardisiert wird.

Indem wir mit einem empfindlichen, robusten Raman-Spektrometer-Design beginnen und diese einfachen Korrekturen anwenden, zeigen wir, dass zwei beliebige Spektrometer der gleichen Konfiguration dazu gebracht werden können, das gleiche komplexe Spektrum mit außergewöhnlicher Gesamtübereinstimmung zu messen. Dieser unkomplizierte Korrekturprozess macht es möglich, gängige Spektren Bibliotheken oder universelle chemometrische Modelle für ganze Serien von Spektrometern mit hoher Genauigkeit zu verwenden.

Bei Wasatch Photonics arbeiten wir in jeder Phase des Entwicklungsprozesses mit unseren OEM-Kunden zusammen, um unsere "OEM by Design"-Lösungen und die besten Fertigungsverfahren für Raman-Anwendungen mit dem einzigartigen Anwendungs-Know-how des Kunden, deren Expertise im Gerätedesign und der Markt Kenntnis und Reichweite des Kunden zu integrieren, um Geräte zu entwickeln, die empfindlich, robust und reproduzierbar sind. Kontaktieren Sie uns noch heute, um Ihre individuellen Raman-Anwendungen zu besprechen.

REFERENZEN

1. [European Pharmacopeia 8.7 Edition 2016](#), Chapter 2.2.48, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2016.
2. [ASTM E2911-13, Standard Guide for Relative Intensity Correction of Raman Spectrometers](#), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.
3. [ASTM E1840-96\(2014\), Standard Guide for Raman Shift Standards for Spectrometer Calibration](#), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
4. Rodriguez JD, Westenberger BJ, Buhse LF, Kauffman JF. "[Standardization of Raman spectra for transfer of spectral libraries across different instruments.](#)" *Analyst*. 2011;136(20):4232-40.
5. [USP 43-NF 38 General Chapter <1120>, The United States Pharmacopeial Convention](#), 2020.
6. [European Pharmacopeia 8.7 Edition 2016](#), Chapter 2.2.48, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2016