

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Dipl.-Ing. (FH) Alexander Wipfler
aus Schwetzingen

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2014

Nichtlineare optische Mikroskopie mit geformten Femtosekundenlaserimpulsen

Gutachter: Prof. Dr. Marcus Motzkus
Prof. Dr. Annemarie Pucci

Nichtlineare optische Mikroskopie mit geformten Femtosekundenlaserimpulsen

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einsatz gezielt geformter Femtosekundenlaserimpulse zur Erlangung chemischer Selektivität mit dem Ziel einer mikroskopischen Bildgebung. Die Methode der kohärenten anti-Stokes-Ramanstreuung in einer Einzelstrahlvariante mit breitbandigen Laserimpulsen (*Single-Beam-CARS*) steht dabei im Mittelpunkt. Die beiden Ansätze der *Kontrolle der Anregung* und des *Multiplexing* werden dabei in Theorie, Simulation und Experiment untersucht, jeweils im Hinblick auf die Erlangung spektroskopischer Information und die Möglichkeit einer Bildgebung.

Die *Kontrolle der Anregung* zielt darauf ab bestimmte Schwingungsübergänge in Molekülen zu bevorzugen. Nur diese bestimmte Spezies liefert dann einen Signalbeitrag und kann so identifiziert werden. Der Vorteil dabei ist, dass eine Einkanaldetektion verwendet werden kann, was schnelle Messwertaufnahmen ermöglicht.

Der Ansatz des *Multiplexing* liefert hingegen Schwingungsspektren oder Ausschnitte daraus. Dafür ist jedoch eine spektral aufgelöste Messung notwendig. Zur Erlangung spektraler Information ist Multiplexing daher sehr geeignet. Für schnelle Bildgebung hingegen weniger, es sei denn die Information ist über das Spektrum verteilt und kann nicht einzelnen Banden zugeordnet werden. Dann ist es möglich mit einer anschließenden Datenanalyse einzelne Komponenten zu identifizieren.

Bemerkenswert ist, dass alle Methoden mit demselben experimentellen Aufbau realisiert werden können. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass es möglich ist unerwünschte Signalbeiträge zu kontrollieren. In diesem Fall wurden Beiträge von Zweiphotonenfluoreszenz in Single-Beam-CARS-Messungen unterdrückt.

Nonlinear optical microscopy using shaped femtosecond laser pulses

This thesis describes the use of femtosecond laser pulse shaping in order to get chemical selectivity with the aim of performing microscopic imaging. The coherent anti-Stokes Raman scattering technique using a single broadband laser pulse (single-beam-CARS) is the most important one within this work. The two methods *control of the excitation* and *multiplexing* are regarded in theory, simulations and experiments. The goal of each technique is to gain spectroscopic information as well as imaging.

The *control of the excitation* approach is based on the enhancement of certain vibrational transitions in molecules. Only a certain species is then generating signal and can be identified this way. A single channel detection is possible, enabling fast measurement data acquisition.

Multiplexing on the other hand delivers vibrational spectra or parts thereof. To get this information, however, it is necessary to perform measurements with spectral resolution. Multiplexing is therefore very useful in terms of obtaining spectral information but less with regard to fast imaging. However, it can reveal information by sophisticated data analysis methods, that is spread over the entire vibrational spectrum and can not be assigned to single bands.

It has to be mentioned that all techniques can be realized with the same setup. Further it is possible to suppress unwanted signal contributions. In this work suppression was demonstrated for unwanted two-photon-excited fluorescence in single-beam-CARS measurements.

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

- *Multiplexing single-beam coherent anti-stokes Raman spectroscopy with heterodyne detection*, A. Wipfler, T. Buckup und M. Motzkus; Applied Physics Letters **100**, 071102 (2012).
- *Full characterization of the third-order nonlinear susceptibility using a single-beam coherent anti-Stokes Raman scattering setup*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; Optics Letters **37**, 4239 (2012).
- *Elimination of two-photon excited fluorescence using a single-beam coherent anti-Stokes Raman scattering setup*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; Journal of Raman Spectroscopy **44**, 1379 (2013).
- *Imaging of unknown samples using single-beam coherent anti-Stokes Raman scattering and k-means clustering*, A. Wipfler, L. Brückner, T. Buckup und M. Motzkus; in Vorbereitung.

Veröffentlichungen in Tagungsbänden

- *Broadband coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy with shaped femtosecond pulses*, C. Pohling, J. Rehbinder, A. Wipfler, T. Buckup und M. Motzkus; CLEO: Science and Innovations Baltimore, Maryland United States, 1. bis 6. Mai 2011.
- *Broadband CARS microspectroscopy*, C. Pohling, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; ICORS, Bangalore, Indien, 12. bis 17. August 2012.

Vorträge

- *The full characterization of the third-order nonlinear susceptibility using single-beam CARS*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; 12.03.2012, DPG-Frühjahrstagung, Stuttgart.
- *Single-beam-CARS: Disentanglement of CARS and strong two-photon excited fluorescence*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; 15.10.2012, Conference on coherent Raman Scattering Microscopy (microCARS2012), Naurod.

- *Elimination of strong two-photon-excited fluorescence using a single-beam-CARS-setup*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; 20.03.2013, DPG-Frühjahrstagung, Hannover.
- *Tailored broadband pulses for multimodal nonlinear imaging of biological samples*, J. Rehbinder, L. Brückner, A. Wipfler, T. Buckup und M. Motzkus; 26.03.2013, Focus on microscopy, Maastricht (NL).
- *Using a single-beam-CARS setup for the full characterization of the third-order susceptibility and elimination of strong two-photon excited fluorescence*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; 12.05.2013, CLEO Europe, München.

Posterpräsentationen

- *Empowering Femtosecond-CARS with 3000 cm⁻¹-Shaping*, J. Rehbinder, C. Pohling, A. Wipfler, C. Müller, T. Buckup und M. Motzkus; 30.05.-02.06.2010, 6th International Workshop on Optimal Control of Quantum Dynamics: Theory and Experiment, Schloss Ringberg, Tegernsee.
- *Single-beam-CARS: reaching the CH-stretching vibration*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup, und M. Motzkus; 19.-20.10.2010, Conference on coherent Raman Scattering Microscopy (microCARS2010), Bad Honnef.
- *Reaching the CH-stretching vibration in single-beam-CARS*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup, und M. Motzkus; 24.05.2011, ECONOS, Universiteit Twente (NL).
- *Nonlinear Raman microscopy*, C. Pohling, J. Rehbinder, A. Wipfler, T. Buckup und M. Motzkus; 13.-14.10.2011, Bunsen International Discussion meeting "Photocatalysis", Heidelberg.
- *Single-beam-CARS using broadband shaped laser pulses*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup, und M. Motzkus; 14.03.2012, DPG-Frühjahrstagung, Stuttgart.
- *Numerical optimization of excitation spectra for fast Singlebeam-CARS imaging*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; 20.03.2013 DPG-Frühjahrstagung, Hannover.

- *Elimination of strong two-photon-excited fluorescence using a single-beam-CARS-setup*, A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus; 26.03.2013, Focus on microscopy, Maastricht (NL).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie	9
2.1. Nichtlineare Optik	10
2.2. Ultrakurze Laserimpulse: Erzeugung, Formung und Charakterisierung . .	11
2.2.1. Kurzimpulslaser	11
2.2.2. Formung ultrakurzer Laserimpulse	14
2.2.3. Impulscharakterisierung	17
2.2.4. Impulsformerbasierte Charakterisierungs- und Kompressionsme- thoden	21
2.3. Nichtlineare optische Mikroskopie	24
2.4. Kohärente Ramanmikroskopie	26
2.4.1. Nichtlineare Suszeptibilität	26
2.4.2. Kohärente Anti-Sokes Ramanstreuung (CARS)	28
2.4.3. Single-Beam-CARS	33
2.4.4. Stimulierte Ramanstreuung (SRS)	43
3. Experimenteller Aufbau	45
3.1. Laserquelle	45
3.2. Impulsformer	47
3.3. Zeitliche und räumliche Impulskorrektur	49
3.4. Mikroskop und Detektion	55
4. Mikrospektroskopie	57
4.1. Kontrolle der Anregung: <i>b</i> -Scan	57
4.2. Multiplexing	62
4.2.1. Heterodyne Detektion	62
4.2.2. Phasengate	63

4.2.3.	Dual quadrature spectral interferometry (DQSI) für CARS	65
4.2.4.	Unterdrückung unerwünschter Zweiphotonenfluoreszenz	74
5.	Chemisch selektive Bildgebung	81
5.1.	Kontrolle der Anregung	81
5.1.1.	Partieller <i>b</i> -Scan	81
5.2.	Multiplexing	84
5.2.1.	Reduzierung der Intensität des Anregungsfeldes	84
5.2.2.	Festes Phasengate	85
5.2.3.	Klassifizierung	89
5.2.4.	Experimentelle Demonstration	90
6.	In silico Optimierung von Anregungsphasen	93
6.1.	Single-Beam-CARS-Signale als Ergebnis spektraler Interferenz	94
6.2.	Einkanaldetektion	95
6.3.	Zweikanaldetektion	99
7.	Zusammenfassung und Ausblick	105
7.1.	Diskussion der Ergebnisse	105
7.2.	Mögliche weitere Anwendungen der Lichtquelle	108
7.3.	Impulsformungskonzepte	110
7.3.1.	DQSI: Schnelle Messwertaufnahme	110
7.3.2.	Experimentelle Umsetzung einer schnellen spektralen Verschiebung des Phasengates	112
7.4.	Fokuskorrektur und Epi-Single-Beam-CARS	112
7.5.	In silico Optimierung	113
7.6.	Schlussbetrachtung	114
Anhang		119
A.	Kalibrierung der Flüssigkristallmaske	119
A.1.	Zuordnung Spannung-Phase	119
A.2.	Zuordnung Wellenlänge-Pixel	124

B. Mathematische Methoden der Simulation und Optimierung nichtlinearer optischer Signale	127
B.1. Mathematische Hilfsmittel	127
B.1.1. Faltung und Autokorrelation	127
B.1.2. Fouriertransformation	128
B.2. Simulation des CARS-Signals	129
B.3. Simulation von Zweiphotonenprozessen	130
B.4. Optimierungsalgorithmen	130
B.4.1. Evolutionäre Algorithmen	131
B.4.2. Downhill-Simplex Algorithmus	133
C. Extraktion von Ramanspektren aus zwei Phasengatemessungen	137
Literaturverzeichnis	149
Danksagung	151
Eidesstattliche Erklärung	153

1. Einleitung

Der Einfluss der optischen Mikroskopie auf die Naturwissenschaften und die Medizin kann kaum hoch genug geschätzt werden. So ist insbesondere die Entwicklung der Biologie untrennbar mit der Entwicklung mikroskopischer Methoden verbunden. Gegenstand einer jeden Mikroskopieart ist die Erzeugung von kontrastreichen Bildern kleiner Strukturen, üblicherweise bis in den Mikrometerbereich, mit anspruchsvolleren Methoden sogar bis hin zu wenigen Nanometern.[1–3] Der nächstliegende Kontrastmechanismus beruht auf verschieden starker Absorption der einzelnen Probenbestandteile, doch auch die *Phasenkontrastmikroskopie*, welche von Frits Zernike entwickelt wurde, ist mittlerweile ein weit verbreitetes Verfahren.[4]

Nichtlineare optische Mikroskopie als möglicher Kontrastmechanismus weist gegenüber ihrem konventionellen Pendant die Vorteile einer intrinsischen dreidimensionalen Ortsauflösung und chemisch selektiver Kontrastentstehung auf. Mit *Zweiphotonenfluoreszenz* und *Second Harmonic Generation* werden mittlerweile Aktivitäten in Neuronen nachverfolgt.[5]

Besondere Aufmerksamkeit verdienen Methoden, welche auf der *Ramanstreuung* basieren. Sie bilden direkt Schwingungsniveaus der untersuchten Moleküle ab. Damit haben sie gegenüber der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie einen entscheidenden Vorteil. Dort ist es sehr oft notwendig die Proben mit Farbstoffen zu markieren, um sie zu untersuchen. Diese Markierung verändert jedoch oft die chemischen Eigenschaften der Probe, die untersucht werden soll. Methoden der Ramanmikroskopie kommen hingegen komplett ohne Farbstoffe aus.

In Abbildung 1.1 sind mögliche Ramanstreuungsprozesse dargestellt. Im Fall der *spontanen Stokes-Ramanstreuung* in (a) wird ein Pumpphoton der Frequenz ω_p absorbiert und ein Stokesphoton der Frequenz $\omega_s = \omega_p - \Omega$ emittiert. Das Molekül befindet sich anschließend im angeregten Schwingungszustand mit der Frequenz Ω . Die *spontane anti-Stokes-Ramanstreuung* in (b) verhält sich analog für den Fall, dass das Molekül von einem angeregten in den Grundzustand übergeht und ein Photon der Frequenz $\omega_{aS} = \omega_p + \Omega$ emittiert wird. In (c) ist der Fall gezeigt, bei dem zwei Photonen der Frequenzen ω_p

1. Einleitung

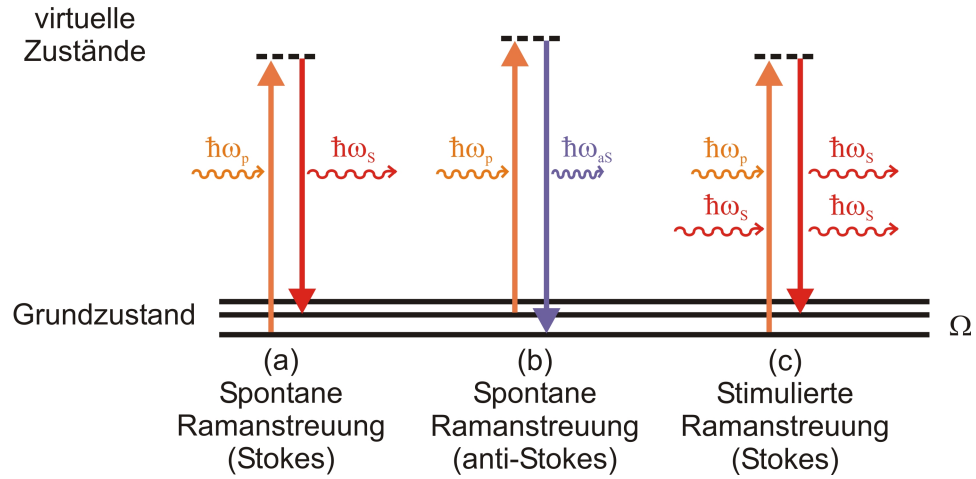


Abbildung 1.1.: Ramanstreuungsprozesse. (a) Spontane Ramanstreuung, bei der sich ein Molekül nach Wechselwirkung mit einem Photon der Frequenz ω_p in einem angeregten Schwingungszustand befindet. Die Frequenz des gestreuten Photons ist um die Molekülschwingungsfrequenz verringert $\omega_s = \omega_p - \Omega$ (Stokes-Ramanstreuung). (b) Bei der spontanen anti-Stokes-Ramanstreuung ist das Molekül zu Beginn im angeregten Zustand und ein Photon der Frequenz $\omega_{aS} = \omega_p + \Omega$ wird emittiert. (c) Wirken gleichzeitig zwei Photonen auf das Molekül, deren Frequenz um jene der Molekülschwingung verstimmt ist, findet stimulierte Ramanstreuung statt, bei der ein zusätzliches Photon der Frequenz ω_s emittiert wird (Stokes-Fall).

bzw. ω_S auf das Molekül einwirken. Entspricht die Frequenzdifferenz der Frequenz der Molekülschwingung $\omega_p - \omega_S = \Omega$ wird die Emission eines zweiten Photons der Frequenz ω_S induziert. Dies ist der Fall der *stimulierten Ramanstreuung*.

Eine Übersicht über Mikroskopiemethoden, welche auf der Ramanstreuung basieren, ist in Abbildung 1.2 gezeigt. Der direkteste Weg Ramanniveaus abzufragen ist die *spontane Ramanstreuung*. Hierzu wird ein schmalbandiger Laser (*Pump*) eingestrahlt und das inelastisch gestreute Spektrum bei niedrigeren Frequenzen (Stokes-Ramanstreuung) aufgenommen. Die Frequenzunterschiede der erhaltenen Linien von der Pumpfrequenz entsprechen dabei den Molekülschwingungsfrequenzen. Für die Aufnahme ist dann ein Langpassfilter notwendig, welches nur die Stokes-Streuung transmittiert und das Pumplicht blockiert.

Der Wirkungsquerschnitt der spontanen Ramanstreuung ist sehr gering, so dass Methoden, welche auf der *kohärenten Ramanstreuung* (Abbildung 1.1 c) basieren, zunehmend an Bedeutung gewinnen.[6] Die Signalstärken sind hier um Größenordnungen höher. Es handelt sich um einen nichtlinearen Prozess, da die Intensität der stimulierten Ramanstreuung sowohl von der Intensität der Pump-, als auch der Stokesstrahlung abhängt: $I_{SRS} \propto I_p \cdot I_S$. Aus diesem Grund sind *gepulste Laser* mit Impulsdauern im Piko- bis hinab in den Femtosekundenbereich das Mittel der Wahl für Methoden der stimulierten Ramanstreuung. Hier werden bei moderaten Durchschnittsleistungen hohe Spitzenintensitäten erzeugt, welche eine starke stimulierte Ramanstreuung erzeugen. Eine der wichtigsten nichtlinearen Ramanspektroskopiearten ist die *kohärente anti-Stokes-Ramanstreuung (CARS)*. Hier werden zwei verstimmte Laserimpulse eingestrahlt, um einen Vierwellenmischprozess zu erzeugen. Stimmt die Differenz der beiden Laserfrequenzen mit der Molekülschwingungsfrequenz überein, wird ein sehr starkes Signal erzeugt, was eine kontrastreiche Bildgebung ermöglicht. Die Verfahren zur räumlichen und vor allem zeitlichen Abstimmung der beiden Laserimpulse sind sehr aufwendig. Entweder werden zwei Laser elektronisch synchronisiert [7, 8] oder die zweite Frequenz (Stokes) wird mit Hilfe eines *optisch parametrischen Oszillators (OPO)* erzeugt.[9, 10] Beide Varianten sind experimentell sehr anspruchsvoll.

Die Bildgebung in CARS-Mikroskopen basiert auf der Anregung einer Schwingungsbande, das heißt die Molekülfrequenz, welche angeregt werden soll, muss vorher bekannt sein. Für die Bildgebung unbekannter Proben ist *Multiplex-CARS* eine gute Alternative. Hier wird ein breitbandiger Stokes-Impuls erzeugt, mit dem mehrere Ramanniveaus auf einmal abgefragt werden können.[13, 14] Häufig wird hierzu ein Teil des Pumpimpulses abgezweigt und in eine *photonische Kristallfaser (PCF)* fokussiert, um ein Weißlichtkon-

1. Einleitung

Anwendung	Experimentelle Umsetzung	Beispiel
Mikrospektroskopie	<p>Ramanmikroskop</p>	<p>Ramanspektrum von Toluol</p>
Schnelle chemisch selektive Bildgebung bekannter Proben	<p>CARS-Mikroskop</p>	<p>Fettzellen in einer Mäuseniere</p>
Chemisch selektive Bildgebung unbekannter Proben	<p>Multiplex-CARS-Mikroskop</p>	<p>Zellen einer Moospflanze</p>

Abbildung 1.2.: Konzepte der Raman-Mikroskopie im Hinblick auf ihre Anwendung. Spontane Ramanmessungen liefern hochinformativ Schwingungsspektren. Eine schnelle Bildgebung bekannter Proben liefert die CARS-Mikroskopie (Bild der Mäuseniere aus [11]). Unbekannte Proben können identifiziert werden, wenn größere spektrale Bereiche ausgewertet werden, wie dies in Multiplex-CARS-Messungen möglich ist (Bild der Mooszellen aus [12]).

tinuum zu erzeugen. Mit anspruchsvollen Auswertemethoden können dann unbekannte Proben mit chemischer Selektivität abgebildet werden.[12]

Der Ansatz dieser Arbeit hingegen ist die Realisierung der in Abbildung 1.2 gezeigten Methoden in einem einzigen Aufbau und die Entwicklung neuer Konzepte hierzu. Das Schema des Aufbaus ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Es wird der Ansatz des Einzelstrahl-CARS (engl.: single-beam-CARS, SB-CARS) verfolgt, bei dem alle am CARS-Prozess beteiligten Photonen aus einem einzigen breitbandigen Laserspektrum stammen. Wie in der folgenden Arbeit gezeigt wird, ist der Schlüssel zur erfolgreichen Umsetzung des Single-Beam-CARS die *Impulsformung*.

Das Ziel dieser Arbeit ist nun neue Single-Beam-CARS-Konzepte im Hinblick auf nichtlineare optische Mikroskopie zu entwickeln und in den Kontext existierender Methoden zu stellen. Eine Forderung ist, dass die neuen Konzepte mit dem in Abbildung 1.3 gezeigten Aufbau realisiert werden können. Die Frage ist hierbei inwieweit die entwickelten Methoden gegenüber spontanen Ramanmessungen [15], konventionellen CARS-Experimenten [16, 17] und Multiplex-CARS-Experimenten [13, 14] konkurrenzfähig sind.

Vom konzeptionellen Standpunkt betrachtet sind mit dem Single-Beam-CARS-Aufbau in Abbildung 1.3 zwei Ansätze möglich. Mit der *Kontrolle der Anregung* liefern nur bestimmte Moleküle Signalbeiträge, was direkt zur Bildgebung genutzt werden kann. Doch auch Spektroskopie ist damit möglich, indem die Anregung gezielt variiert wird. Der andere Ansatz ist *Multiplexing*, bei dem ein Spektrum aufgenommen wird, das dem herkömmlichen Multiplex-CARS entspricht. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Herangehensweisen zur Erreichung der multimodalen nichtlinearen Ramanmikroskopie sollen im weiteren Verlauf herausgearbeitet werden.

Im Folgenden werden in **Kapitel 2** die Grundlagen für die nichtlineare Mikroskopie ausgehend von den Grundgleichungen der nichtlinearen Optik behandelt und die wichtigsten experimentellen Konzepte vorgestellt. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf Methoden der nichtlinearen Ramanmikroskopie, vor allem auf CARS-Methoden.

Der experimentelle Aufbau ist in **Kapitel 3** beschrieben. Die Dispersion und die damit verbundene Änderung der spektralen Phase des Anregungsfeldes spielt bei ultrabreiten Spektren eine sehr große Rolle. Die größte experimentelle Herausforderung ist daher die Erzeugung eines zeitlich und räumlich korrigierten Impulses im Fokus eines Mikroskopobjektivs. Deshalb liegt ein besonderer Schwerpunkt des Kapitels auf Methoden zur räumlichen und zeitlichen Impulskorrektur. Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, als dass nur mit der vollständigen Bandbreite des verwendeten Lasers Single-Beam-CARS-Spektroskopie bis in den CH-Streckschwingungsbereich um 3000cm^{-1} möglich

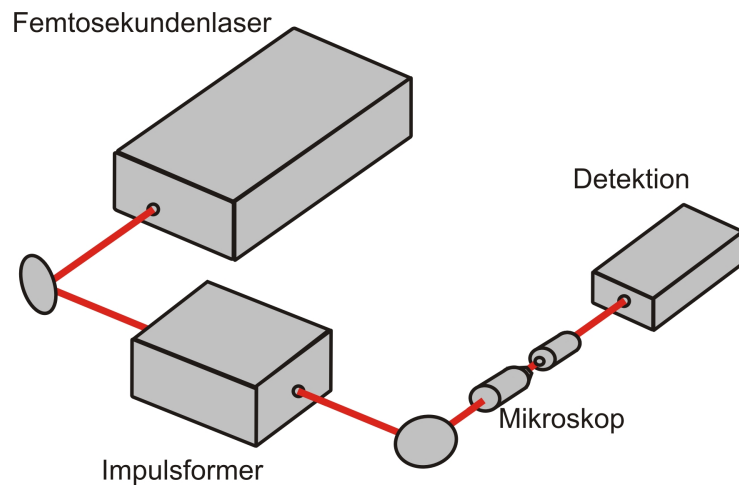


Abbildung 1.3.: Konzept der multimodalen nichtlinearen Mikroskopie, das in dieser Arbeit weiterentwickelt wird. Ein einziger breitbandiger Femtosekundenlaseroszillator liefert Impulse, welche in Amplitude und Phase geformt werden können. Ziel ist, bei Fokussierung in eine Probe eine möglichst hohe Selektivität oder spektrale Information zu erhalten. Die Detektion erfolgt je nach Aufgabenstellung und Methode mit oder ohne spektrale Auflösung.

ist.

Die Methoden zur Single-Beam-CARS-Spektroskopie werden in **Kapitel 4** vorgestellt. Die beiden Ansätze *Kontrolle der Anregung* und *Multiplexing* werden hier gründlich erläutert und experimentell demonstriert. Es werden die ersten Messungen bis in den CH-Bereich mit rein impulsformerbasierten Methoden gezeigt. Auch das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *Dual Quadrature Spectral Interferometry (DQSI)-CARS*-Konzept wird dort behandelt, mit welchem es möglich ist, nichtlineare Suszeptibilitäten in Amplitude und Phase zu bestimmen.

Das **Kapitel 5** behandelt die Möglichkeiten einer möglichst schnellen Bildgebung mit Single-Beam-CARS. Die beiden Ansätze *Kontrolle der Anregung* und *Multiplexing* werden auch hier demonstriert. Mit der Klassifizierungsmethode des *k*-means-clustering wird die Bildgebung der unbekanntenen Komponenten eines Polymerblends demonstriert.

Kapitel 6 zeigt dann Methoden zur rein rechnergestützten Optimierung von Anregungsspektren auf (*in silico Optimierung*). Hierbei wird vorgestellt, wie Anregungsphasen gezielt auf bekannte Suszeptibilitäten maßgeschneidert werden können.

In **Kapitel 7** wird eine kurze Zusammenfassung der Arbeit gegeben und die Ergebnisse in den Kontext existierender Methoden gestellt. Ferner werden mögliche Anknüpfungspunkte für zukünftige Arbeiten vorgestellt.

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

Das vorliegende Kapitel gibt einen Einblick in die physikalischen Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie. Ausgangspunkt ist hier die nichtlineare Polarisierung, welche bei entsprechend hohen Eingangsfeldstärken zum Tragen kommt. Anschließend werden die technologischen Grundlagen von Kurzpulslasern, sofern sie für diese Arbeit relevant sind, vorgestellt. Eine besondere Bedeutung kommt den Grundlagen der Impulsformung zu, da dies gewissermaßen das Herzstück des verwendeten Aufbaus ist.

Die große Herausforderung bei der nichtlinearen optischen Mikroskopie mit breitbandigen Lasern ist die Impulskompression im Mikroskopfokus. Aus diesem Grund werden zunächst die gängigsten herkömmlichen Impulscharakterisierungsmethoden *Frequency Resolved optical gating (FROG)* und *Spectral interferometry for direct electric field reconstruction (SPIDER)* vorgestellt, um dann die impulsformerbasierten Varianten zu behandeln.

Im Hinblick auf nichtlineare optische Mikroskopie werden *Second Harmonic Generation (SHG)* und *Zweiphotonenfluoreszenz* eingeführt, bevor dann die kohärente Ramanmikroskopie betrachtet wird. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der *kohärenten anti-Stokes-Ramanstreuung (CARS)*. Da die *Single-Beam-CARS*-Methode von sehr großer Bedeutung für diese Arbeit ist, gibt das vorliegende Kapitel einen Überblick über den Stand der Forschung auf diesem Gebiet.

Zum Abschluss wird aus Gründen der Vollständigkeit die *stimulierte Ramanstreuung (SRS)* als Kontrastmechanismus vorgestellt. Da diese Technik in dieser Arbeit aber nicht experimentell umgesetzt wurde, bleibt die Betrachtung auf einen kurzen Überblick beschränkt.

2.1. Nichtlineare Optik

Ausgangspunkt der nichtlinearen Optik stellt die Betrachtung einer *nichtlinearen Polarisation*¹ dar. Das bedeutet, dass Ladungsverschiebungen innerhalb der Probe unter Einwirkung eines elektromagnetischen Wechselfeldes diesem nicht linear folgen, sondern Terme höherer Ordnung auftreten. Solche Effekte spielten lange Zeit eine eher untergeordnete Rolle, da sie erst bei hohen Feldstärken auftreten. Diese wurden erst mit Erfindung des Lasers, insbesondere mit kurzen Impulsen zugänglich. In Lehrbüchern der nichtlinearen Optik, z. B. [18, 19] ist die Herleitung der Wellengleichung

$$\Delta \vec{E} - \mu_0 \varepsilon_0 \ddot{\vec{E}} = \mu_0 \ddot{\vec{P}} \quad (2.1)$$

zu finden. Diese ist zwar verhältnismäßig schwierig zu lösen, gibt aber dennoch einen intuitiven Einblick in die dahinter liegende Physik: Eine Polarisation \vec{P} erzeugt ein elektrisches Feld \vec{E} , gemäß Gleichung (2.1). Betrachtet man eine Polarisation der Form $\vec{P}(t) = \vec{P}_0 e^{i\omega t}$, so haben die Lösungen für $E(t)$ die gleiche Gestalt, sprich schwingen mit der gleichen Frequenz. Die Polarisation ihrerseits hängt von dem anregenden Feld auf folgende Weise ab (eindimensionale Darstellung):

$$P = \sum_n \varepsilon_0 \chi^{(n)} E^n = \sum_n P^{(n)} \quad (2.2)$$

Um den vektoriellen Charakter der Polarisation zu berücksichtigen, wird die nichtlineare Suszeptibilität als Tensor dargestellt, womit sich beispielhaft folgender Zusammenhang für Polarisation zweiter Ordnung $P_i^{(2)}$ ergibt, wenn die Variablen i, j und k über die Koordinaten x, y und z laufen:

$$P_i^{(2)} = \sum_{j,k} \varepsilon_0 \chi_{i,j,k}^{(2)} E_j E_k. \quad (2.3)$$

Die Ausdrücke für Terme höherer Ordnung werden analog erhalten, wobei die Tensorstufe von $\chi^{(n)}$ um eine Ordnung höher ist als die der nichtlinearen Polarisation.

Durch den Term $E_j E_k$ in Gleichung (2.3) erhält man Terme höherer Ordnung für die Polarisation, was deutlich wird, wenn man den Ansatz $E_j = E_k = E_0 \sin(\omega t)$ betrachtet²:

$$\begin{aligned} E_j E_k &= E_0^2 \sin^2(\omega t) \\ &= E_0^2 \left[\frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos(2\omega t) \right]. \end{aligned} \quad (2.4)$$

¹Hier als Dipoldichte zu verstehen, ehemals Polarisierung genannt, um sie von der Polarisation elektromagnetischer Wellen zu unterscheiden.

²Der in der linearen Optik übliche komplexe Ansatz $E(t) = E_0 e^{i\omega t}$ ist hier unzulässig, da es sich um ein Produkt handelt.

2.2. Ultrakurze Laserimpulse: Erzeugung, Formung und Charakterisierung

Bei Einstrahlung mit der Frequenz ω wird ein Signal mit der Frequenz 2ω erhalten. Ähnlich kann man für die Beiträge höherer Ordnung zeigen, dass

$$\sum \omega_{\text{ein}} = \sum \omega_{\text{aus}} \quad (2.5)$$

gelten muss (*Energieerhaltung*). Bisher wurde die räumliche Abhängigkeit der anregenden und erzeugten elektromagnetischen Wellen nicht betrachtet. Es lässt sich für die Wellenzahlvektoren \vec{k} analog folgende *Phasenanpassungsbedingung* formulieren:

$$\Delta\vec{k} = \sum \vec{k}_{\text{aus}} - \sum \vec{k}_{\text{ein}}. \quad (2.6)$$

Die effizienteste Anregung nichtlinearer Effekte entsteht, wenn $\Delta\vec{k} = 0$ gilt. Andernfalls wird die Intensität des erzeugten nichtlinearen Feldes gemäß

$$I_{\text{NL}} \propto \text{sinc}^2\left(\frac{|\Delta\vec{k}|L}{2}\right) \quad (2.7)$$

verringert.[18] L ist dabei die Wechselwirkungslänge, innerhalb derer das nichtlineare Signal erzeugt wird.

2.2. Ultrakurze Laserimpulse: Erzeugung, Formung und Charakterisierung

2.2.1. Kurzimpulslaser

Zur Erzeugung *ultrakurzer Laserimpulse* kommt die sogenannte *Modenkopplung* zum Einsatz. In einem Laserresonator der Länge L sind nur solche Wellenlängen λ ausbreitungsfähig, welche die Bedingung

$$L = n \frac{\lambda}{2}$$

erfüllen. Dieser Umstand rührt daher, dass die umlaufenden Lichtwellen nach einem vollständigen Resonatorumlauf wieder mit sich selbst in Phase sein müssen. Dadurch wirkt der Resonator als *Kammfilter* für Moden mit dem Frequenzabstand

$$\Delta f = \frac{c}{2L}. \quad (2.8)$$

Es können prinzipiell alle Moden angeregt werden, welche innerhalb des Verstärkungsprofils des Lasermediums liegen. Gemäß Gleichung (2.8) verhält sich der Frequenzabstand der Moden reziprok zur Resonatorlänge. Das bedeutet, dass bei gegebenem Verstärkungsprofil

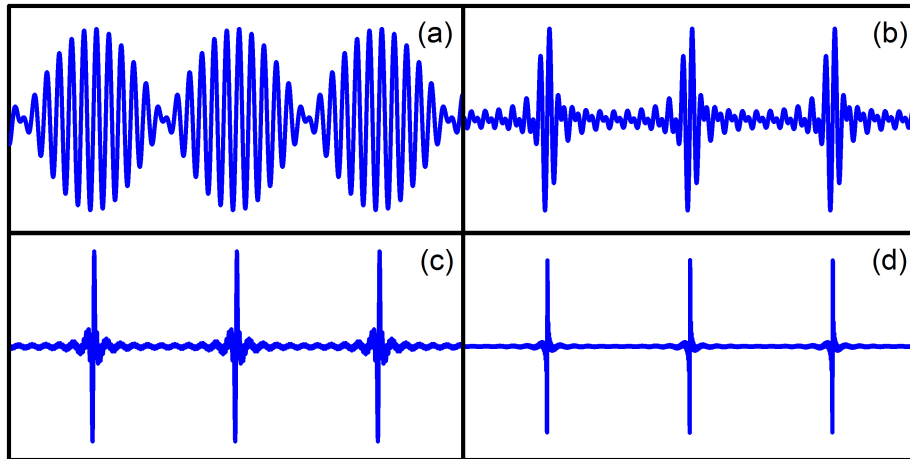


Abbildung 2.1.: Modenkopplung von (a) 2, (b) 10, (c) 50 bzw. (d) 200 Moden. Mit zunehmender Anzahl nimmt die Dauer der Impulse ab und die Auslöschung zwischen diesen wird effizienter.

umso mehr Moden angeregt werden, je länger der Resonator ist. Abbildung 2.1 illustriert den Effekt der Überlagerung mehrerer Moden. Bei zwei Moden (Abbildung 2.1 a) tritt eine Schwebung mit der Differenz der beiden Frequenzen auf. Je mehr Moden überlagert werden desto effizienter erfolgt die Auslöschung zwischen den Impulsen und deren Dauer nimmt ab. Wichtig ist hierbei, dass die verschiedenen Moden zu einem Zeitpunkt in Phase sind, da es ansonsten zu destruktiver Interferenz kommt.

Eine besonders weit verbreitete Möglichkeit zur Erreichung der Modenkopplung ist das *Kerrlinsen-Modenkoppeln*, dessen Grundlage die Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex (*Kerreffekt*) ist:

$$n = n_0 + n_2 I. \quad (2.9)$$

Eine räumliche Intensitätsverteilung erzeugt dementsprechend ein Brechungsindexprofil, welches als Linse betrachtet werden kann. Hohe Intensitäten erzeugen dabei Linsen mit größerer Brechkraft, so dass intensivere Impulse stärker fokussiert werden. In Abbildung 2.2 ist gezeigt wie dies zur Modenkopplung genutzt werden kann. Ein intensiver Laserstrahl erzeugt eine Kerrlinse in einem Medium, meist der Laserkristall selbst, und wird dadurch fokussiert. Eine Lochblende im Fokus blockiert schwächere Laserimpulse, die keine ausreichende Brechkraft im Medium erzeugen. Somit werden schwache Laserimpulse ausgefiltert. In modernen Laserdesigns wird auf die Lochblende verzichtet. Stattdessen wird der Pumplaserstrahl ebenfalls an die Stelle im Kristall fokussiert, an der

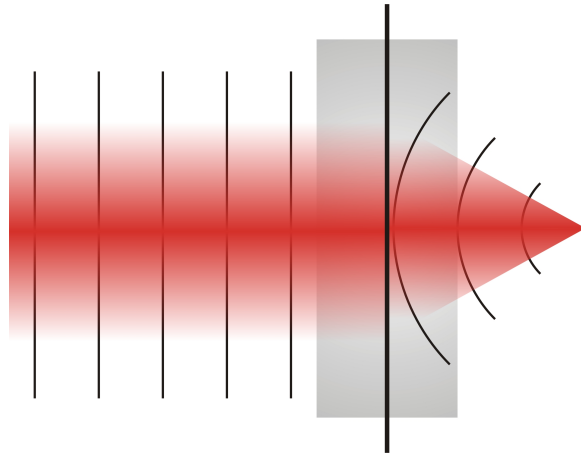


Abbildung 2.2.: Prinzip des Kerrlinsenmodenkoppels: Bereiche, die mit höherer Intensität bestrahlt werden, weisen einen höheren Brechungsindex auf, wodurch der Strahl fokussiert wird. Eine Lochblende kann so genutzt werden, um weniger intensive Strahlen auszufiltern.

sich der Fokus der Kerrlinse befindet. Dieses Verfahren wird als *Soft-aperture Kerr-lens modelocking* bezeichnet.[20]

Zur Erzeugung von *Femtosekundenlaserimpulsen* hat sich *Titan-Saphir (Ti:Sa)* als Lasermedium etabliert. Es weist sowohl ein sehr breites Verstärkungsprofil, als auch einen starken Kerreffekt auf. Ferner kann Ti:Sa mit Licht der Wellenlänge 532nm gepumpt werden, das mit kommerziell erhältlichen frequenzverdoppelten Nd:YAG-Lasern erzeugt werden kann. Eine interessante Alternative stellen zunehmend auch Faserlaser dar, welche sehr robust sind.[21] Die ultrabreiten Spektren, welche zur Anregung hochfrequenter Schwingungen notwendig sind, werden von diesen jedoch nicht erreicht. In [22] wurde ein Konzept vorgestellt, bei dem ultrabreite Spektren mittels einer photonischen Kristallfaser (PCF) erzeugt wurden. Diese haben jedoch den Nachteil, dass sie sehr strukturiert sind, sprich viele Peaks aufweisen, was ihren Einsatz in Multiplex-Single-Beam-CARS-Anwendungen ausschließt (vgl. Abschnitt 4.2). Ideal für Single-Beam-CARS sind also Spektren mit einer glatten, breitbandigen Erscheinung. Die beste Wahl hierfür sind Festkörper-Ti:Sa-Laser mit dispersionskorrigierenden geschirpten Spiegeln in der Kavität.[23, 24]

2.2.2. Formung ultrakurzer Laserimpulse

Ausgangspunkt der Überlegungen zum Formen ultrakurzer Laserimpulse ist die Darstellung derselben im Frequenzbereich. Das zeitlich veränderliche elektrische Feld eines kurzen Laserimpulses kann als *Wellenpaket*

$$\mathcal{E}(t) = \text{Re} \{E(t)\} = \text{Re} \{A(t)e^{i(\omega_0 t - \phi(t))}\} \quad (2.10)$$

mit der Einhüllenden $A(t)$ und der Phase $\omega_0 t - \phi(t)$ betrachtet werden. Der Term $\phi(t)$ hat großen Einfluss auf die Dauer und die instantane Frequenz

$$\omega_{\text{inst}}(t) = \omega_0 - \frac{d\phi(t)}{dt} \quad (2.11)$$

des Impulses.[25, 26] Ist $d\phi(t)/dt$ null oder konstant, so ändert sich die instantane Frequenz nicht während des Impulses und er hat die kürzest mögliche Dauer. Man spricht dann von einem *transformlimitierten Impuls*. Wenn hingegen $d\phi(t)/dt$ mit der Zeit ansteigt, nimmt die Frequenz mit der Zeit zu, der Impuls ist *positiv gechirpt*. Analog spricht man bei einer Abnahme der Frequenz mit der Zeit von einem *negativen Chirp*.

Diese Größen, gilt es bei der Impulsformung gezielt zu variieren. Eine zeitliche Modulation mit elektronischen Schaltern ist auf einer Femtosekundenzeitskala allerdings unmöglich, da man sich hier weit unterhalb der typischen Schaltzeiten bewegt. Zur Formung im Frequenzbereich wird die *Fouriertransformierte* (vgl. Anhang B) betrachtet:

$$\begin{aligned} E(\omega) &= \mathfrak{F} \{E(t)\} \\ &= \int A(t)e^{i(\omega_0 t - \phi(t))} e^{-i\omega t} dt \\ &= \int A(t)e^{-i\phi(t)} e^{-i(\omega - \omega_0)t} dt \\ &= \tilde{E}(\omega - \omega_0) \\ \text{mit } \tilde{E}(\omega) &= \mathfrak{F} \{A(t)e^{-i\phi(t)}\}. \end{aligned}$$

An vorstehender Rechnung ist zu erkennen, dass das erhaltene Spektrum im Frequenzbereich die um die Trägerfrequenz ω_0 verschobene Fouriertransformierte der Einhüllenden inklusive Phasenterm ist. Da die Fouriertransformation eindeutig ist, kann durch gezielte Modulation von $E(\omega)$ Einhüllende und Phase des Laserimpulses kontrolliert werden. Für die weiteren Betrachtungen im Rahmen dieser Arbeit ist es sogar geeigneter die Betrachtung im Frequenzbereich zu verwenden, da die angewandten nichtlinearen Effekte intuitiv als Wechselwirkung verschiedener Frequenzkomponenten verstanden werden können. Die Impulsformung kann im Frequenzbereich am zweckmäßigsten

2.2. Ultrakurze Laserimpulse: Erzeugung, Formung und Charakterisierung

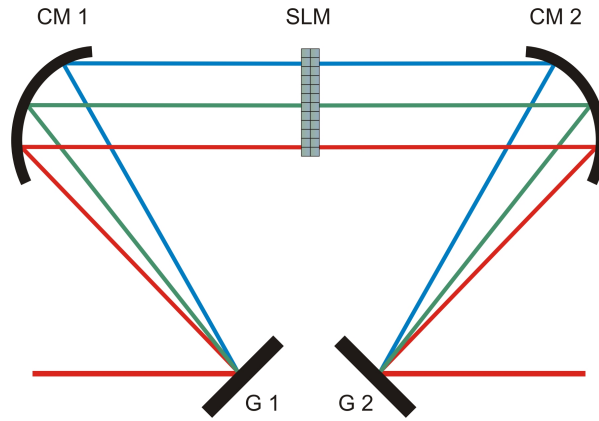


Abbildung 2.3.: Aufbau des Impulsformers. Das Beugungsgitter G1 spaltet den Impuls in seine spektralen Bestandteile auf, welche dann über den zylindrischen Spiegel CM1 kollimiert werden. Eine Flüssigkristallmaske (SLM) in der Fourierebene moduliert die spektralen Anteile in Amplitude und Phase. Der zylindrische Spiegel CM2 und das Beugungsgitter G2 überlagern die einzelnen spektralen Bestandteile wieder zu einem Impuls.

mit *Übertragungsfunktionen* beschrieben werden. Die komplexe Eingangsfunktion $E_{\text{in}}(\omega)$ wird dabei mit der komplexen Übertragungsfunktion $M(\omega)$ multipliziert, um die Ausgangsfunktion $E_{\text{out}}(\omega)$ zu erhalten:

$$E_{\text{out}}(\omega) = E_{\text{in}}(\omega) \cdot M(\omega). \quad (2.12)$$

Diese Beschreibung ist universell und erlaubt es für nahezu jedes optische Element eine Übertragungsfunktion zu formulieren. Ein *Michelson-Interferometer* etwa, das einen Impuls in zwei gleich intensive Hälften aufteilt, wobei eine um die Verzögerung τ verschoben ist, wird durch

$$M(\omega) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2}e^{i\omega\tau}$$

beschrieben. Eine besonders flexible Art der Impulsformung wird mit Aufbauten wie in Abbildung 2.3 erzielt.[27–29] Der einfallende Laserimpuls wird mittels eines Beugungsgitters in seine spektralen Anteile aufgespalten und durch einen zylindrischen Spiegel kollimiert. Ein räumlicher Lichtmodulator (engl.: *Spatial light modulator*, *SLM*) verändert dann das spektrale elektrische Feld gezielt in Amplitude und Phase. Als SLM kommen üblicherweise *Akustooptische Modulatoren (AOM)* oder *Flüssigkristallmasken (Liquid Crystal Displays, LCD)* zum Einsatz. In akustooptischen Modulatoren wird in einem Kristall eine Schallwelle erzeugt, welche eine lokale Brechungsindexänderung hervorruft,

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

an welcher die Lichtwelle gebeugt wird. Die Schallwelle kann verglichen mit der Lichtwelle als statisch betrachtet werden. Allerdings bewegt sie sich in den Intervallen der Laserimpulse, so dass sie mit diesen synchronisiert werden muss. Nach [28] liegt die Wiederholrate von AOMs bei maximal etwa 100 kHz, was bedeutet, dass mit einem Pulsepicker die Wiederholrate des Lasers angepasst werden müsste. Bei Ti:Sa-Festkörperlasern mit Impulswiederholraten von etwa 80 MHz bedeutet dies eine Reduktion der nutzbaren Impulse um drei Größenordnungen. In gleichem Maße würde die mittlere Signalintensität reduziert. Gleiches gilt auch für kompakte *akustooptische disperse Filter (AOPDF)*, die seit einiger Zeit unter dem kommerziellen Namen *Dazzler* erhältlich sind.[30, 31] Hinzu kommt hier, dass es sich um einen kollinearen Aufbau handelt, der besonders anfällig für *Raum-Zeit-Kopplungen* [32] ist, was bei Impulsdauern < 10 fs besonders problematisch werden kann.[28]

Aus diesem Grund sind Flüssigkristallmasken das Mittel der Wahl. Hier liegen die Phasenfunktionen quasi statisch an, so dass alle Impulse des Lasers auf die gleiche Weise geformt werden. Sie wurden auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet und sollen daher näher vorgestellt werden. In Abbildung 2.4 ist die Anordnung bei Verwendung einer Doppel-LCD-Maske gezeigt. Die optischen Achsen der beiden Flüssigkristallschichten sind um jeweils $\pm 45^\circ$ gegenüber der x -Achse geneigt, während der Polarisator in Richtung der x -Achse transmittiert. Es kann gezeigt werden, dass für Amplitude und Phase folgende Beziehungen gelten [29, 33]

$$A = \cos\left(\frac{\Delta\phi_1 - \Delta\phi_2}{2}\right), \quad (2.13)$$

$$\phi = \frac{\Delta\phi_1 + \Delta\phi_2}{2}. \quad (2.14)$$

Damit lässt sich die allgemeine Übertragungsfunktion des Impulsformers als

$$\boxed{M(\omega) = \cos\left(\frac{\Delta\phi_1(\omega) - \Delta\phi_2(\omega)}{2}\right) e^{\frac{\Delta\phi_1(\omega) + \Delta\phi_2(\omega)}{2}}} \quad (2.15)$$

ausdrücken. $\Delta\phi_{1,2}$ sind dabei die Phasenverschiebungen zwischen ordentlichem und außerordentlichem Strahl für Maske A bzw. Maske B (vgl. Abbildung 2.4). Diese Phasenverschiebungen sind abhängig von der an die Flüssigkristallzelle angelegten Spannung und können mit einer Kalibrationsmessung bestimmt werden (vgl. Anhang A). Da üblicherweise der Fall von Interesse ist, bei dem für eine gegebene Amplitude A und Phase ϕ die Phasenverschiebungen der Einzelmasken $\Delta\phi_{1,2}$ bestimmt werden sollen, sind

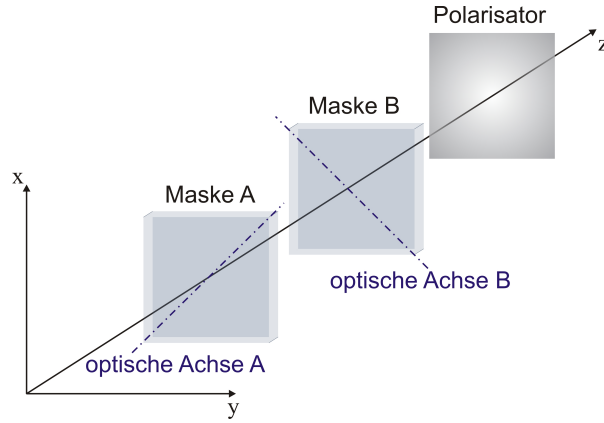


Abbildung 2.4.: Funktionsweise einer LCD-Maske: Ein in Richtung der x -Achse polarisiertes Wechselfeld erfährt an zwei aufeinander folgenden Flüssigkristallzellen Phasenverschiebungen, deren optische Achsen um 45° bzw. -45° zu ihm geneigt sind. Es entsteht eine Änderung von Phase und Polarisation. Ein Polarisator am Ausgang wandelt die Polarisations- in eine Amplitudenänderung um.

die folgenden beiden Gleichungen von besonderer Bedeutung:

$$\Delta\phi_1 = \phi + \arccos(A) \quad (2.16)$$

$$\Delta\phi_2 = \phi - \arccos(A). \quad (2.17)$$

Damit können mit dem Aufbau aus Abbildung 2.3 beliebige Übertragungsfunktionen realisiert werden.

2.2.3. Impulscharakterisierung

Die Charakterisierung ultrakurzer Laserimpulse im Femtosekundenbereich ist eine ausgesprochen anspruchsvolle Aufgabe. Während Impulse im Nanosekundenbereich mit schnellen Photodioden direkt in der Zeit vermessen werden können, ist für kürzere Impulse bis hinab zu einigen hundert Femtosekunden der Einsatz einer Streackamera notwendig.[25] Bei Impulsen im Bereich von 100 fs und darunter sind besondere Methoden einzusetzen. Am weitesten verbreitet sind *Frequency resolved optical gating (FROG)* [34, 35], *Spectral interferometry for direct electric field reconstruction (SPIDER)* [36, 37] und *Autokorrelation*. [25] Eine vollständige Impulscharakterisierung ist jedoch nur mit den beiden erstgenannten Verfahren möglich.

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

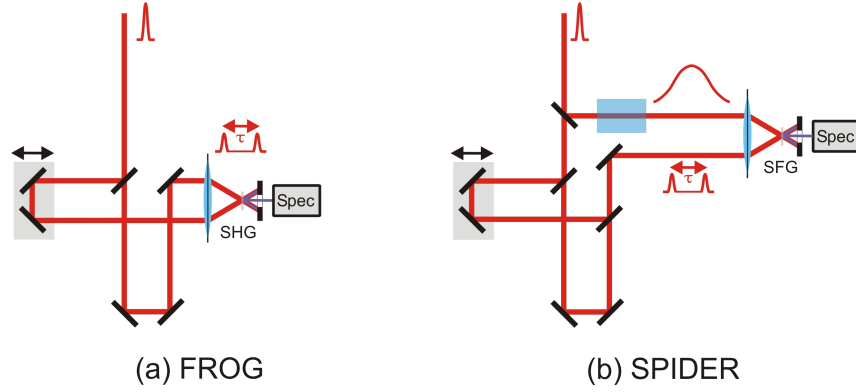


Abbildung 2.5.: Aufbau für (a) Frequency resolved optical gating (FROG) und (b) Spectral phase interferometry for direct electric field reconstruction (SPIDER).

Bei *FROG* (Abbildung 2.5 a) werden mit einem Michelson-Interferometer zwei Impulskopien erzeugt, welche in einem SHG-Kristall³ überlagert werden. Die Verzögerung τ zwischen beiden Impulskopien wird variiert, so dass das *FROG*-Signal mit Hilfe der Fouriertransformation (vgl. Anhang B) folgendermaßen ausgedrückt werden kann:

$$\begin{aligned}
 I_{FROG}(\omega, \tau) &= \left| \int E(t)E(t - \tau)e^{-i\omega t} dt \right|^2 \\
 &= \left| \int E_{Sig}(t, \tau)e^{-i\omega t} dt \right|^2
 \end{aligned} \tag{2.18}$$

Mit der Kenntnis des Laserspektrums $S(\omega)$ lässt sich das komplexe elektrische Feld in der Zeit als

$$E(t) = \frac{1}{2\pi} \int \sqrt{S(\omega)} e^{i\phi(\omega)} e^{i\omega t} d\omega \tag{2.19}$$

ausdrücken. Mit einer angenommenen Anfangsphase $\phi_0(\omega)$ lässt sich zunächst ein elektrisches Feld $E_0(t)$ und mit Gleichung (2.18) das Signal $E_{Sig,0}(t, \tau)$ in Amplitude und Phase berechnen. Durch *Fouriertransformation* (vgl. Anhang B) erhält man $E_{Sig,0}(\omega, \tau)$, dessen Amplitude nun durch die experimentellen Daten $\sqrt{I_{FROG}(\omega, \tau)}$ ersetzt wird. Eine *inverse Fouriertransformation* ergibt dann ein modifiziertes Signal $E'_{Sig,0}(t, \tau)$, aus welchem $E_1(t)$ rekonstruiert wird. Dieses ist dann Ausgangspunkt für eine weitere Iteration des Algorithmus. Die Rekonstruktion von $E_1(t)$ aus $E'_{Sig,0}(t, \tau)$ bzw. allgemeiner $E_{k+1}(t)$

³Es existieren weitere Varianten von *FROG*, etwa *Polarization-Gate*, welche hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht weiter behandelt werden.

2.2. Ultrakurze Laserimpulse: Erzeugung, Formung und Charakterisierung

aus $E'_{Sig,k}(t, \tau)$ beruht nach [35] auf Minimierung des Fehlers

$$Z = \sum_{i,j=1}^{N,M} |E'_{Sig,k}(t_i, \tau_j) - E_{k+1}(t_i)E_{k+1}(t_i - \tau_j)|^2. \quad (2.20)$$

Gleichung (2.20) geht dabei von einem endlichen Satz Messdaten mit N Werten für t und M Werten für τ aus.

Der Aufbau für *SPIDER* ist in Abbildung 2.5 (b) gegeben. Zwei Impulskopien werden mit einem gechirpten Referenzimpuls in einem SHG-Kristall überlagert, so dass jede Kopie mit einer anderen Frequenz des gechirpten Impulses wechselwirkt. Geht man von einem Impuls der Form

$$E(t) = \tilde{A}(t)e^{i\omega_0 t} \quad (2.21)$$

aus, so ergeben sich zwei Impulskopien, die sowohl zeitlich um τ als auch in ihrer Zentralfrequenz um Ω verschoben sind⁴:

$$E_1(t) = A(t)e^{i\tilde{\omega}_0 t} \quad (2.22)$$

$$E_2(t) = A(t - \tau)e^{i(\tilde{\omega}_0 + \Omega) \cdot (t - \tau)}. \quad (2.23)$$

Dabei wurde $\tilde{\omega}_0 = \omega_0 + \omega_c$ gesetzt, mit der Frequenzverschiebung ω_c durch die Mischung mit dem gechirpten Impuls. Für die Betrachtung im Frequenzraum werden die Fouriertransformationen (vgl. Anhang B) der Gleichungen (2.22) und (2.23) betrachtet:

$$E_1(\omega) = \int A(t)e^{i\tilde{\omega}_0 t} e^{-i\omega t} dt \quad (2.24)$$

$$\begin{aligned} E_2(\omega) &= \int A(t - \tau)e^{i(\tilde{\omega}_0 + \Omega) \cdot (t - \tau)} e^{-i\omega t} dt \\ &= E_1(\omega - \Omega)e^{-i\omega\tau} \end{aligned} \quad (2.25)$$

Es ergeben sich also zwei spektral verschobene Kopien des elektrischen Feldes. Das Signal, das mit einem Spektrometer detektiert wird, ist dann:

$$S(\omega) = |E_1(\omega) + E_2(\omega)|^2 \quad (2.26)$$

$$= |E_1(\omega)|^2 + |E_2(\omega)|^2 \quad (2.27)$$

$$+ E_1(\omega)E_1^*(\omega - \Omega)e^{i\omega\tau} + E_1^*(\omega)E_1(\omega - \Omega)e^{-i\omega\tau} \quad (2.28)$$

⁴Genau genommen unterscheiden sich die beiden Amplituden für $E_1(t)$ und $E_2(t)$ um einen konstanten Faktor. Dieser spielt für die weiteren Betrachtungen jedoch keine Rolle und wird daher vernachlässigt.

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

Durch inverse Fouriertransformation in den Zeitbereich, Filtern des Seitenbands um τ und anschließende Rücktransformation lässt sich der Term

$$S_{SPIDER}(\omega) = E_1^*(\omega)E_1(\omega - \Omega)e^{-i\omega\tau} \quad (2.29)$$

isolieren.[38] Die Phase lässt sich angeben als:

$$\phi(S_{SPIDER}(\omega)) = \phi(\omega - \Omega) - \phi(\omega) - \omega\tau. \quad (2.30)$$

Bei Kenntnis der Verzögerung τ bzw. durch entsprechende Kalibrierung lässt sich der Term $-\omega\tau$ eliminieren, so dass bei bekannter Frequenzverschiebung Ω die Phase des Laserfeldes als

$$\phi(\omega_0 - n\Omega) = \sum_{k=0}^{n-1} \tilde{\phi}(\omega_0 - k\Omega) \quad (2.31)$$

$$\text{mit } \tilde{\phi}(\omega) = \phi(S_{SPIDER}(\omega)) + \omega\tau \quad (2.32)$$

bestimmt werden kann.

FROG und *SPIDER* sind *vollständige* Charakterisierungsmethoden, das bedeutet sie liefern Amplitude und Phase des untersuchten Laserimpulses. Sie sind jedoch experimentell anspruchsvoll und beinhalten eine aufwendige Auswertung. Einen schnellen Anhaltspunkt über die Impulsdauer liefert die *Autokorrelation*. Hierbei werden zwei Arten unterschieden. Bei der *Intensitätsautokorrelation* wird ein Aufbau verwendet, welcher jenem für *FROG* in Abbildung 2.5 (a) entspricht, jedoch ohne spektral aufgelöste Detektion. Bei der *interferometrischen Autokorrelation* (*FRAC*⁵), welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, sind die beiden Teilstrahlen kollinear überlagert. Das gesamte Signal ergibt sich zu:

$$I_{\text{FRAC}}(\tau) = \int |(E(t) + E(t - \tau))^2|^2 dt. \quad (2.33)$$

Betrachtet man nun die Fälle $\tau = 0$ und $\tau \gg \tau_p$ (mit der Impulsdauer τ_p), so ergibt sich:

$$I_{\text{FRAC}}(\tau)|_{\tau=0} = \int |4E^2(t)|^2 dt = 16 \int |E^2(t)|^2 dt \quad (2.34)$$

$$I_{\text{FRAC}}(\tau)|_{\tau \gg \tau_p} = \int |E^2(t)|^2 dt + \int |E^2(t - \tau)|^2 dt = 2 \int |E^2(t)|^2 dt. \quad (2.35)$$

Aus vorstehenden Gleichungen folgt unmittelbar, dass das Verhältnis

$$\frac{I_{\text{FRAC}}(\tau)|_{\tau=0}}{I_{\text{FRAC}}(\tau)|_{\tau \gg \tau_p}} = 8$$

⁵Fringe resolved autocorrelation.

für *interferometrische Autokorrelationen* gilt. Ein Beispiel für eine gemessene *interferometrische Autokorrelation* ist in Abbildung 3.2 im Abschnitt 3.1 über den in dieser Arbeit verwendeten Laser zu sehen, zusammen mit dem Laserspektrum. Aus letzterem lässt sich die Zentralwellenlänge λ_0 bestimmen. Die Impulsdauer t_p lässt sich aus der Anzahl der Interferenzringe n , der Lichtgeschwindigkeit c und eines Entfaltungsfaktors B bestimmen:

$$t_p = \frac{n\lambda}{cB}. \quad (2.36)$$

Die Wahl des Entfaltungsfaktors B hängt von der angenommenen Impulsform ab. Häufig werden *gauß-* ($B = 1,414$) oder *sech-*förmige ($B = 1,543$) Impulse angenommen.[26] Hierbei wird ein Schwachpunkt von Autokorrelationsmethoden deutlich: mit der Wahl des Faktors B ist eine Einflussnahme auf die bestimmte Impulsdauer verbunden. Es wird also keine vollständige Charakterisierung erzielt. Für eine tägliche Überprüfung der Laserparameter ist dieses Verfahren aufgrund seiner Einfachheit aber sehr wertvoll, insbesondere da es sich um vergleichende Messungen am selben Laser an verschiedenen Tagen handelt.

2.2.4. Impulsformerbasierte Charakterisierungs- und Kompressionsmethoden

Im Hinblick auf nichtlineare optische Mikroskopie mit geformten Impulsen sind zwei Punkte zu beachten: erstens ist die Charakterisierung des Impulses *im Fokus* eines Objektivs von Interesse und zweitens steht mit dem Impulsformer ein Werkzeug zur Verfügung, mit welchem eine gezielte Einflussnahme auf die spektrale Phase möglich ist. Die Kompression kann dann erreicht werden, indem die spektrale Phase, die gemessen wurde, invertiert und am Impulsformer angelegt wird.

Die Erzeugung des kurzen Impulses im Fokus ist eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung und Anwendung nichtlinearer optischer Mikroskopie. Die Dispersion ist vor der Einkopplung in das Objektiv zu kompensieren. Hierbei ist die Impulsformung unverzichtbar und erfordert zum Teil anspruchsvolle Methoden. In [39] wurde ein spezieller deformierbarer Spiegel vorgestellt, mit dem eine Impulsdauer von 7,1fs im Fokus eines Objektivs (50x, NA 0,55) gemessen wurde. In dieser Arbeit sollen jedoch nur Verfahren vorgestellt werden, welche mit dem hier verwendeten Aufbau möglich sind.

Die Messung des Impulses im Fokus beschränkt die Messmethoden auf solche mit kollinearen Aufbauten. Hierbei gibt es verschiedene Abwandlungen etablierter Methoden. So wurde etwa von Stibenz et al. vor einigen Jahren eine Methode vorgestellt, bei

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

welcher das *FROG*-Signal mittels eines kollinearen Aufbaus erhalten wurde (*Interferometric frequency resolved optical gating, IFROG*), was für Mikroskopieanwendungen, insbesondere im Einzelstrahl Aufbau von besonderem Interesse ist.[40–42] 2008 wurde eine impulsformerbasierte Variante von *IFROG* vorgestellt. [43]

Eine kollineare Variante von *SPIDER* wurde in [44, 45] vorgestellt, bei der die notwendigen beiden Impulskopien durch den Impulsformer erzeugt wurden. In der Gruppe von Lim wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem ein zu *SPIDER* vergleichbares Signal erzeugt wird, ohne dass ein gechirpter Impuls überlagert werden muss.[46–48]

Eine speziell entwickelte Methode für Mikroskopie mit geformten Laserimpulsen ist *Multiphoton intrapulse interference phase scan (MIIPS)*. [49, 50] Es basiert auf der Aufnahme des Spektrums der zweiten Harmonischen des Laserimpulses, das gegeben ist als:

$$S(2\omega) = \left| \int |E(\omega + \Omega)E(\omega - \Omega)| \exp \{i [\phi(\omega + \Omega) + \phi(\omega - \Omega)]\} d\Omega \right|^2. \quad (2.37)$$

Die spektrale Phase $\phi(\omega)$ kann um eine beliebige Frequenz ω_0 in eine Taylorreihe entwickelt werden:

$$\phi(\omega) \approx \phi(\omega_0) + \left. \frac{\partial \phi}{\partial \omega} \right|_{\omega=\omega_0} \cdot (\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \left. \frac{\partial^2 \phi}{\partial \omega^2} \right|_{\omega=\omega_0} \cdot (\omega - \omega_0)^2 + \dots \quad (2.38)$$

$$= \phi^{(0)} + \phi^{(1)}(\omega) + \phi^{(2)}(\omega) + \dots \quad (2.39)$$

Der konstante Offset der Phase $\phi^{(0)}$ hat keinen Einfluss auf das Ergebnis von Gleichung (2.37). Für das Signal bei $2\omega_0$ spielen ferner aller Terme ungerader Ordnung $\phi^{(1)}(\omega), \phi^{(3)}(\omega), \dots$ keine Rolle, da

$$\phi^{(n)}(\omega_0 + \omega) = -\phi^{(n)}(\omega_0 - \omega) \quad (2.40)$$

gilt. Dadurch addieren sich die beiden Terme im Exponenten von Gleichung (2.37) stets zu null auf, so dass alle Beiträge zum Integral in Phase sind. Der entscheidende Term ist also derjenige zweiter Ordnung, welcher der zweiten Ableitung der Korrekturphase entspricht. Die Messprozedur von *MIIPS* sieht nun so aus, dass Phasenfunktionen der Form

$$\phi(\omega) = \frac{1}{2} a (\omega - \omega_0)^2 \quad (2.41)$$

angelegt werden. Der Parameter a wird nun variiert und das zugehörige SHG-Spektrum aufgenommen. Anschließend wird für jede Frequenz der Parameter $a_{\max}(\omega)$ bestimmt, bei dem das SHG-Signal maximal ist. Damit wird lokal die zweite Ableitung der Phase

Tabelle 2.1.: Vergleich verschiedener impulsformerbasierter Charakterisierungsmethoden.

Methode	getestet	Bemerkung
IFROG	ja	Keine zufriedenstellende Rekonstruktion möglich, vermutlich aufgrund unzureichender Frequenzkonversion für das gesamte Spektrum.
SB-SPIDER	nein	Die Implementation der aufwendigen Auswertung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.
MIIPS	ja	Liefert intuitive Bilder zur Beurteilung der gegebenen Impulskompression, z.B. im Hinblick auf die Anzahl der Reflexionen auf geschirpten Spiegeln (vgl. Abschnitt 3.3).
Evolutionärer Algorithmus	ja	Kein deterministisches Verfahren, für die Praxis aber sehr bedeutend. Dieses Verfahren kam im Vorfeld aller in dieser Arbeit gezeigten Messungen zum Einsatz.

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

bestimmt, die zur Korrektur notwendig ist. Zweimaliges Integrieren liefert letztendlich die Korrekturphase.

Eine Methode von großer praktischer Relevanz ist die Anwendung *evolutionärer Algorithmen*. Hierbei wird ein nichtlineares optisches Signal, entweder SHG oder das CARS-Signal selbst, gemessen und die Phase gezielt variiert (vgl. Anhang B.4.1). Der große Vorteil dabei ist, dass exakt dieselbe Probengeometrie wie bei der anschließenden Messung vorhanden ist. Hier ist das Vorgehen umgekehrt, als bei den anderen Methoden. Es wird nicht die Phase bestimmt um sie anschließend zu korrigieren. Statt dessen wird der Impuls experimentell zeitlich komprimiert und dabei die spektrale Phase erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *IFROG*, *MIIPS* und die Verwendung *evolutionärer Algorithmen* betrachtet. IFROG zeigte keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da vermutlich die unterschiedliche Phasenfehlانpassung für verschiedene Frequenzen eine Rolle bei der Erzeugung des Traces spielte. MIIPS wurde erfolgreich implementiert und eine Messung ist in Abschnitt 3.2 gezeigt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der anschaulichen Bedeutung der MIIPS-Traces: Phasenverzerrungen zweiter Ordnung sind als Verschiebungen von der Nulllinie, solche dritter Ordnung als Steigungen erkennbar. Die bei weitem wichtigste Kompressionsmethode für die Praxis war allerdings die Optimierung mit evolutionären Algorithmen. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.1.

2.3. Nichtlineare optische Mikroskopie

Nichtlineare optische Methoden gewinnen für Biologie, Medizin und Materialwissenschaften zunehmend an Einfluss.[51–53] Gerade mikroskopische Anwendungen sind von

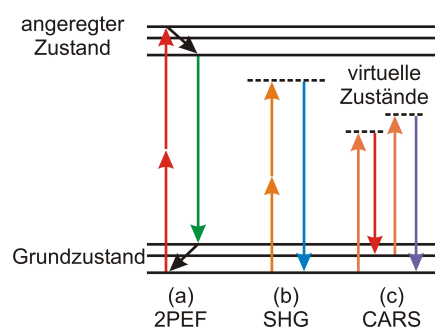


Abbildung 2.6.: Nichtlineare Effekte für die Mikroskopie. (a) Zweiphotonenfluoreszenz (2PEF). (b) Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG). (c) Kohärente anti-Stokes-Ramanstreuung (CARS).

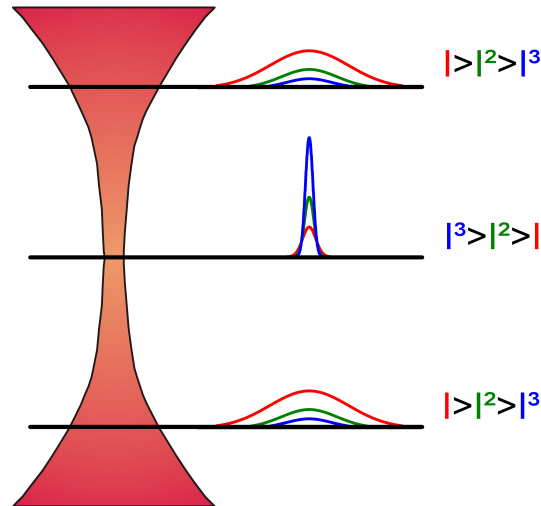


Abbildung 2.7.: Intensitätsabhängigkeiten inner- und außerhalb der Fokalebene. Nichtlineare Effekte treten mit nennenswerter Stärke nur im Bereich hoher Intensitäten nahe der Fokalebene auf.

besonderer Bedeutung.[54–56] Im Abschnitt 2.1 wurde die Rolle der Phasenanpassung behandelt und in Gleichung (2.7) quantifiziert. In der nichtlinearen optischen Mikroskopie stellt diese Bedingung kein Problem dar, da die anregenden Felder hier *stark fokussiert* vorliegen. Dies hat zur Folge, dass zum einen die Wechselwirkungslänge L sehr gering ist und zum anderen ein großer Bereich an Wellenzahlvektoren \vec{k} zur Verfügung steht.

Die wichtigsten nichtlinearen Effekte sind *Zweiphotonenfluoreszenz (2PEF)*, *Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG)* und *Kohärente anti-Stokes Ramanstreuung (CARS)*, die in Abbildung 2.6 gezeigt sind. Bei *2PEF* [57] werden zunächst zwei Photonen absorbiert, bevor nach einem strahlungslosen Übergang ein Photon höherer Frequenz emittiert wird. Mit dieser Methode wurden bereits dreidimensionale Bilder von Gehirnen lebender Mäuse bis zu einer Tiefe von $1000 \mu\text{m}$ aufgenommen.[58]

SHG kann als Absorption zweier Photonen und Emission eines Photons doppelter Frequenz betrachtet werden.[59] Da sie einem Dreiwellenmischprozess entspricht, der mit der Suszeptibilität zweiter Ordnung $\chi^{(2)}$ verbunden ist, tritt sie nicht in isotropen Medien auf. Dies ist zu sehen, wenn man den Zusammenhang zwischen nichtlinearer Polarisations zweiter Ordnung P^2 und elektrischem Feld E betrachtet. Innerhalb eines isotropen Mediums kann der Ursprung an jeden beliebigen Punkt gelegt werden. Die Richtung

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

der x -Achse ist ebenfalls frei wählbar. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit kann das Koordinatensystem also so gelegt werden, dass für die x -Koordinate des elektrischen Feldes im Ursprung $E_x(0) > 0$ gilt. Damit ergibt sich⁶

$$P_x^{(2)}(0) = \chi^{(2)} E_x^2(0) \geq 0.$$

Nun wird unter Ausnutzung der Isotropie das Koordinatensystem soweit rotiert, dass die x -Achse in die entgegengesetzte Richtung zeigt, was bedeutet, dass $E_x(0) > 0$ in $E_x(0) < 0$ übergeht. Damit muss auch gelten $P_x^{(2)}(0) \leq 0$. Andererseits gilt auch

$$-P_x^{(2)}(0) = \chi^{(2)} (-E_x(0))^2 \geq 0.$$

Dies ist nur möglich wenn $P_x^{(2)}(0) = 0$ und damit auch $\chi^{(2)} = 0$ gilt. Damit ermöglicht SHG die Abbildung anisotroper Strukturen in biologischem Gewebe.[59]

Der große Vorteil, der allen nichtlinearen optischen Kontrastmechanismen gemein ist, liegt in deren intrinsischem räumlichem Auflösungsvermögen. Abbildung 2.7 verdeutlicht dies. Außerhalb der Fokalebene sind die Effekte zweiter und dritter Ordnung verhältnismäßig gering, da kleine Intensitäten vorliegen. Im Fokus hingegen, wo die Intensität hoch ist, entstehen nichtlineare Signale besonders effektiv. Die Eindringtiefe des Anregungslichtes ist zudem für nichtlineare Effekte höher, da das Licht bis zum Fokus praktisch nicht abgeschwächt wird.

2.4. Kohärente Ramanmikroskopie

Eine Sonderstellung im Rahmen dieser Arbeit nimmt die kohärente Ramanmikroskopie, insbesondere *CARS*, ein. Es handelt sich hierbei um Spektroskopiemethoden, welche auf dem Effekt der stimulierten Ramanstreuung beruhen. Eine Übersicht ist in Abbildung 2.8 gegeben. Die verschiedenen Methoden werden im Folgenden beschrieben.

2.4.1. Nichtlineare Suszeptibilität

Bei Ramanschwingungen handelt es sich um solche, die nicht direkt über die Absorption eines Photons angeregt werden können. Statt dessen werden sie durch Strahlung höherer Frequenzen angeregt, wobei die Frequenz der am Molekül gestreuten Strahlung

⁶ $\chi^{(2)}$ wurde hier als positiv angenommen, die Argumentation für negative Werte verläuft aber vollkommen analog.

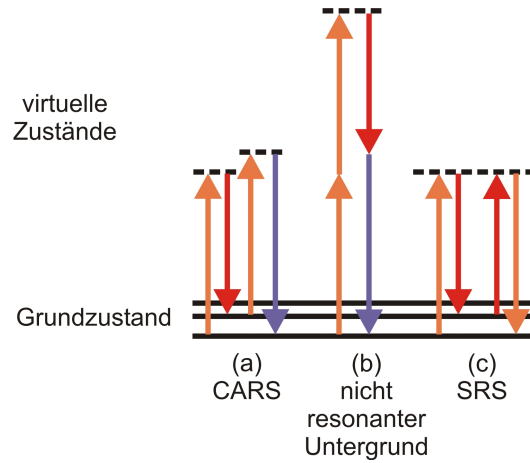


Abbildung 2.8.: Termschemata der wichtigsten Prozesse der nichtlinearen Ramanmikroskopie. (a) Kohärente anti-Stokes-Ramanstreuung (CARS), bei der drei einfallende Felder ein Signalfeld erzeugen, welches zu höheren Frequenzen verschoben ist. (b) Nichtresonanter Vierwellenmischprozess, der sich dem CARS-Signal überlagert. (c) Signalentstehung bei der Stimulated Raman Scattering-Methode (SRS).

um die Molekülschwingungsfrequenz erniedrigt (Stokes-Strahlung) oder erhöht (anti-Stokes-Strahlung) ist.[15] Im ersten Fall ist das Molekül danach in einem höher angeregten Schwingungszustand, im zweiten in einem niedriger angeregten. Die nächstliegende Möglichkeit, Information über die Ramaniveaus zu erhalten, ist die *spontane Ramanstreuung*, bei welcher Licht einer Wellenlänge eingestrahlt wird und die inelastisch gestreute Strahlung detektiert wird. Der Wirkungsquerschnitt für diese Messung ist allerdings sehr gering. Eine Möglichkeit diesen zu erhöhen, ist die *stimulierte Ramanstreuung* auszunutzen. Dabei werden zwei Felder eingestrahlt, deren Frequenzen eine Differenz aufweisen, welche der Molekülschwingungsfrequenz Ω entspricht. Anschaulich lässt es sich so beschreiben, dass die Schwingung durch die Schwebung der beiden Felder angetrieben wird. Damit ergibt sich eine Differentialgleichung der Form

$$m\ddot{x} + b\dot{x} + Dx = \tilde{A}e^{i\Omega t}, \quad (2.42)$$

welche durch den Ansatz

$$x(t) = \chi_r e^{i\Omega t} \quad (2.43)$$

gelöst wird. Einsetzen von (2.43) in (2.42) liefert

$$\chi_r = \frac{\tilde{A}}{m \Omega_0^2 - \Omega^2 + i\Omega\Gamma}, \quad (2.44)$$

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

wobei $\frac{D}{m} = \Omega_0^2$ und $\frac{b}{m} = \Gamma$ gesetzt wurde. Wegen des Ausdrucks $\Omega_0^2 - \Omega^2 = (\Omega_0 - \Omega)(\Omega_0 + \Omega)$ ist x_0 in (2.44) nur für $\Omega \approx \Omega_0$ deutlich von null verschieden. Damit ergibt sich folgende Näherung, welche häufig verwendet wird:

$$\chi_r = \frac{\tilde{A}}{\underbrace{2\Omega_0 m}_{=A}} \frac{1}{\Omega_0 - \Omega + i\frac{\Gamma}{2}}. \quad (2.45)$$

Neben den hier beschriebenen Molekülschwingungen tritt auch noch ein nichtresonanter Untergrund χ_{nr} auf, der durch elektronische Zustände entsteht, wie in Abbildung 2.8 (b) gezeigt. Es kommen im ganzen Vierwellenmischprozess dann nur virtuelle Zustände vor, so dass dieses Signal vollkommen unabhängig von den Schwingungsübergängen im vorliegenden Molekül ist. Die vollständige nichtlineare Suszeptibilität ergibt sich zu:

$$\chi^{(3)}(\Omega) = \chi_{nr} + \sum_k \frac{A_k}{\Omega_k - \Omega + i\frac{\Gamma_k}{2}}. \quad (2.46)$$

Hierbei wurde berücksichtigt, dass mehrere Schwingungsresonanzen auftreten, was durch das Summenzeichen zum Ausdruck gebracht wird.

Besonders erwähnenswert ist die Verbindung zu spontanen Ramanspektren. Diese entsprechen dem Imaginärteil der Suszeptibilität:

$$I_{\text{Raman}}(\omega) = \text{Im} \{ \chi^{(3)}(\omega_p - \omega) \}. \quad (2.47)$$

Dabei ist ω_p die Frequenz des Pumpasers. Da der nichtresonante Untergrund rein real ist, tritt er in spontanen Ramanmessungen nicht auf. Aus diesem Grund sind die Resonanzen hier direkt und unverzerrt sichtbar. Was den Informationsgehalt angeht, sind spontane Ramanmessungen daher die Referenz für alle neuen Methoden.

2.4.2. Kohärente Anti-Stokes Ramanstreuung (CARS)

Abbildung 2.8 (a) zeigt das Termschema für die kohärente anti-Stokes-Ramanstreuung. Bei diesem Vierwellenmischprozess werden direkt die Schwingungsniveaus des Grundzustandes abgefragt. Wie im Termschema in Abbildung 2.8 (a) zu sehen ist, muss das Anregungsfeld mindestens zwei Frequenzen bereitstellen, um den Ramanübergang anzuregen. Allgemein lässt sich die Effizienz, mit der ein Schwingungsniveau der Frequenz Ω mit einem Feld $E(\omega)$ angeregt werden kann, durch die *Ramananregungswahrscheinlichkeit*

$$A(\Omega) = \int_0^\infty E(\omega') E^*(\omega' - \Omega) d\omega' \quad (2.48)$$

ausdrücken. Mit dieser Größe wird die Suszeptibilität $\chi^{(3)}(\Omega)$ gewichtet, was die Molekülantwortfunktion

$$R(\Omega) = A(\Omega)\chi^{(3)}(\Omega) \quad (2.49)$$

ergibt. Diese Gleichung gibt an, wie stark die einzelnen Niveaus besetzt sind. Das CARS-Feld entsteht dann durch Abfrage mit dem Anregungsfeld $E(\omega)$:

$$E_{\text{CARS}}(\omega) = \int_0^\infty E(\omega - \Omega)R(\Omega)d\Omega. \quad (2.50)$$

Narrowband-CARS

Narrowband-CARS war die erste Umsetzung von CARS überhaupt [60] und auch für die Mikroskopie.[16, 17] Hierbei werden zwei um die Frequenz der Molekülschwingung verstimmt Laserimpulse verwendet, um diese anzuregen. Das Abfragen mit dem höherfrequenten Impuls erzeugt dann ein Signal, welches bei einer höheren Frequenz als die der eingestrahlten Laser liegt. In der zuvor eingeführten Nomenklatur lässt sich das Anregungsfeld als Überlagerung zweier δ -Funktionen

$$E(\omega) = E_p\delta(\omega - \omega_p) + E_S\delta(\omega - \omega_S) \quad (2.51)$$

beschreiben, wie in Abbildung 2.9 gezeigt ist, wobei $\omega_p > \omega_S$ gilt. Setzt man dies in Gleichung (2.48) ein, ergibt sich:

$$A(\Omega) = |E_p|^2\delta(-\Omega) + E_pE_S^*\delta(\omega_p - \omega_S - \Omega) + E_p^*E_S\delta(\omega_S - \omega_p - \Omega) + |E_S|^2\delta(-\Omega). \quad (2.52)$$

Es ergeben sich also zwei Peaks bei $\Omega = 0$, ein physikalisch nicht sinnvoller bei $\Omega = \omega_S - \omega_p < 0$ und der eigentlich interessante bei $\Omega = \omega_p - \omega_S < 0$. Es wird also genau die Differenz der beiden Peaks des Feldes $E(\omega)$ angeregt. Unter Verwendung von Gleichung (2.50) ergibt sich die Signalkomponente

$$E_{\text{CARS},p}(\omega) = E_p^2E_S^*\chi^{(3)}(\omega_p - \omega_S)\delta(\omega + \omega_S - 2\omega_p), \quad (2.53)$$

welche einen Peak bei $\omega_{aS} = 2\omega_p - \omega_S > \omega_p$ aufweist. Damit ist es möglich ohne überlagerte Fluoreszenz direkt Moleküle mit der Resonanz $\Omega = \omega_p - \omega_S$ bei der Frequenz ω_{aS} zu detektieren. Das erhaltene CARS-Signal entspricht dem Betragsquadrat der nichtlinearen Suszeptibilität $|\chi^{(3)}(\omega_p - \omega_S)|^2$.

Die technische Umsetzung erfolgt entweder mit zwei elektronisch synchronisierten Lasern oder einem optisch-parametrischen Oszillator. Im letzten Fall wird automatisch eine stabile Phasenbeziehung und ein *lokaler Oszillator* (vgl. Abschnitt 4.2.1) erhalten.[61]

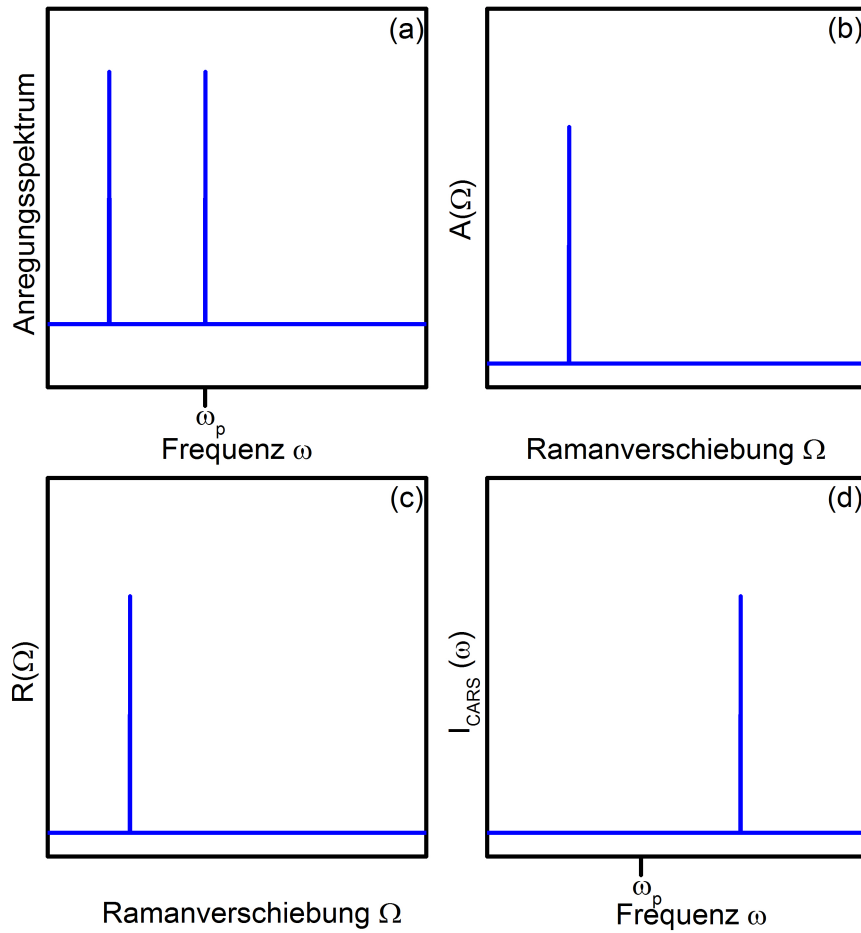


Abbildung 2.9.: Narrowband-CARS. (a) Spektrales Anregungsfeld bestehend aus zwei schmalbandigen Peaks, welche um $\Delta\omega = \omega_p - \omega_s$ verstimmt sind. (b) Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ mit einem Peak bei $\Delta\omega$. (c) Molekülantwort. (d) Spektrales CARS-Feld mit einem Peak bei $2\omega_p - \omega_s$.

Multiplex-CARS

Bei *Multiplex-CARS* [13, 14, 62, 63] setzt sich das Anregungsfeld ebenfalls aus zwei Anteilen zusammen, von denen einer breitbandig ist und einer schmalbandig, wie in Abbildung 2.10 (a) gezeigt. Erzeugt werden diese meist durch Einkoppeln eines Teils des Pumpstrahls in photonische Kristallfasern.[14, 64, 65] Das Anregungsfeld kann ausgedrückt werden als:

$$E(\omega) = E_p \delta(\omega - \omega_p) + E_S(\omega). \quad (2.54)$$

Dabei weisen Pump- und Stokesfeld keine spektrale Überlappung auf, es gilt also $E_S(\omega) = 0$ für $\omega \geq \omega_p$. Außerdem hat das Pumpfeld eine viel größere Intensität als das Stokesfeld: $|E_p| \gg \int E_S(\omega) d\omega$. Für die Ramananregungswahrscheinlichkeit ergibt sich dann durch Einsetzen von Gleichung (2.54) in Gleichung (2.48):

$$\begin{aligned} A(\Omega) = & |E_p|^2 \delta(\Omega) + \underbrace{E_p E_S^*(\omega_p - \Omega)}_{A_{eff}(\Omega)} \\ & + \underbrace{E_S(\omega_p + \Omega) E_p^*}_{=0} + \underbrace{\int E_S(\omega) E_S^*(\omega - \Omega) d\omega}_{\ll A_{eff}(\Omega)} \end{aligned} \quad (2.55)$$

Es entsteht eine breitbandige effektive Anregung $A_{eff}(\Omega)$ für alle Schwingungsniveaus innerhalb der Bandbreite des Feldes $E_S(\omega)$. Einsetzen von $A_{eff}(\Omega)$ in Gleichung (2.50) ergibt das CARS-Feld

$$E_{CARS,m}(\omega) = E_p^2 E_S^*(2\omega_p - \omega) \chi^{(3)}(\omega - \omega_p). \quad (2.56)$$

Damit lässt sich also ein ganzer Bereich aus dem CARS-Spektrum auf einmal aufnehmen. Das erhaltene Signal ist proportional zum Betragsquadrat $|\chi^{(3)}(\Omega)|^2$, was nicht ohne Konsequenzen für die Interpretation der Messungen bleibt, wie Abbildung 2.11 zeigt. In (a) sind Imaginär- und Realteil der Suszeptibilität zu sehen und in (b) das Betragsquadrat, welches dem CARS-Signal entspricht. Es wurde ein Lorentzoszillator bei $\Omega_R = 2000 \text{cm}^{-1}$ simuliert mit einer Stärke von $A = 5 \cdot 10^4 \text{cm}^{-1}$ und einer Linienbreite von $\Gamma = 5 \text{cm}^{-1}$. Der nichtresonante Untergrund χ_{nr} wurde mit Werten von 0; 0,5 und 2 simuliert. Das Betragsquadrat $|\chi^{(3)}(\Omega)|^2$ ändert mit zunehmendem nichtresonanten Untergrund seine Form von einem deutlichen Peak bei der Resonanzfrequenz zu einer verschobenen Linienform. Dies wird ersichtlich, wenn man das erhaltene Signal betrachtet:

$$|\chi_{nr} + \chi_r^{(3)}(\Omega)|^2 = |\chi_{nr}|^2 + |\chi_r^{(3)}(\Omega)|^2 + 2\chi_{nr} \text{Re} \{ \chi_r^{(3)}(\Omega) \}. \quad (2.57)$$

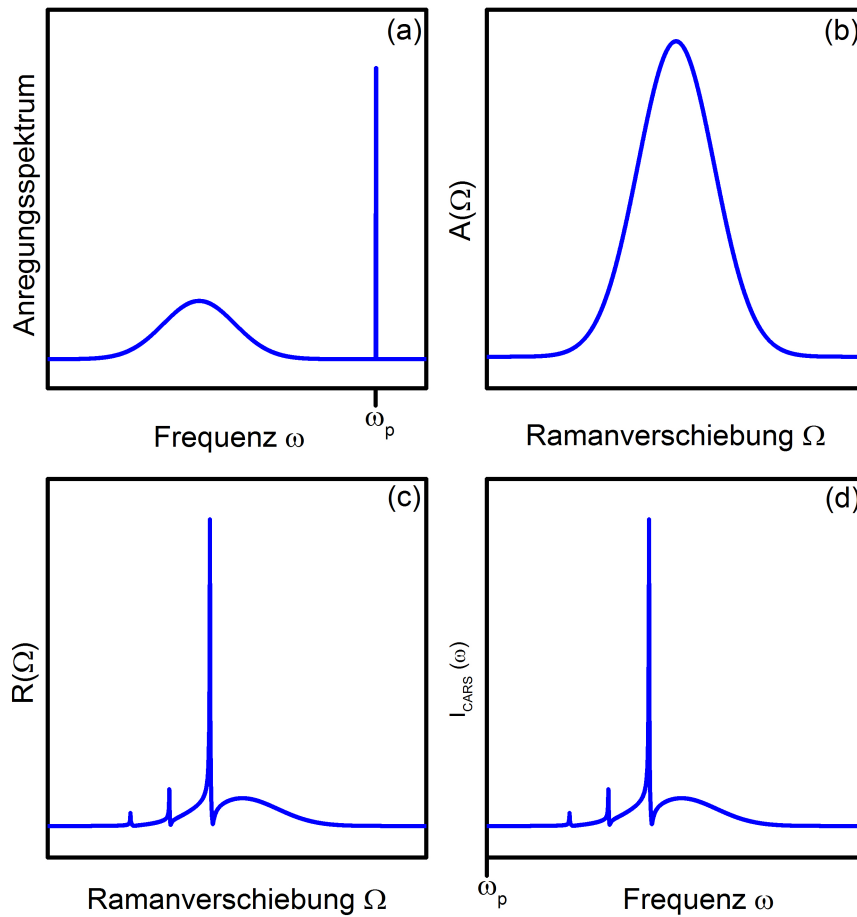


Abbildung 2.10.: Multiplex-CARS. (a) Anregungsspektrum mit einem Peak bei ω_p und einem breitbandigen Stokesanteil bei kleineren Frequenzen. (b) Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ mit einem Verlauf, welcher dem Stokesanteil entspricht. (c) Molekülantwort. (d) CARS-Feld mit einem spektralen Verlauf, welcher der um ω_p verschobenen Molekülantwort entspricht.

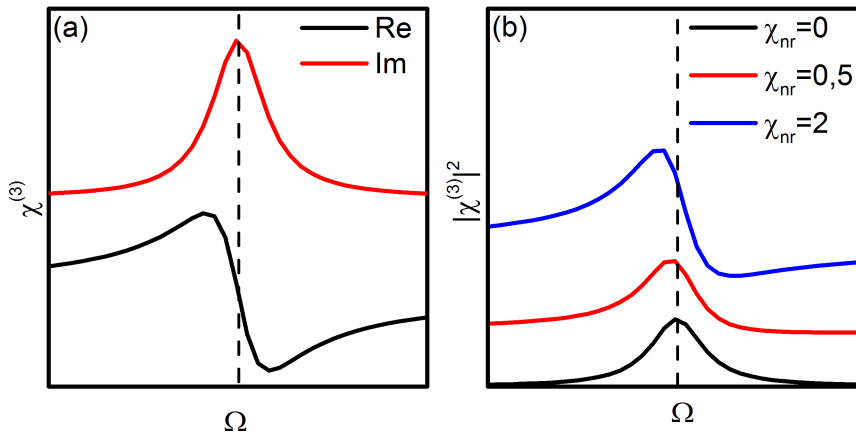


Abbildung 2.11.: Simulation der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi^{(3)}$. (a) Spektraler Verlauf von Real- (schwarz, unten) und Imaginärteil (rot, oben). (b) Betragsquadrat $|\chi^{(3)}(\Omega)|^2$ für verschiedene Werte des nichtresonanten Untergrundes χ_{nr} . Die Linienform ändert sich zunehmend und das Maximum wird zu niedrigeren Frequenzen hin verschoben.

Mit zunehmendem nichtresonanten Untergrund wird dem Signal also ein Anteil überlagert, welcher die Form des Realteils eines Lorentzoszillators hat (vgl. Abbildung 2.11 a). In realen Proben ist oft die Bedingung $\chi_{nr} \gg \chi_r^{(3)}(\Omega)$ erfüllt, so dass der Signalverlauf nach Gleichung (2.57) im Wesentlichen dem Realteil einer Lorentzfunktion entspricht. Das gleiche Ergebnis wird erhalten, wenn im Narrowband-CARS-Experiment der Abstand zwischen ω_p und ω_S variiert und das Signal über die Verstimmung aufgetragen wird.

Multiplex-CARS-Messungen nehmen mehr Zeit in Anspruch als Narrowband-CARS, da mit spektraler Auflösung detektiert werden muss. Der Vorteil ist aber, dass Information, welche über das Spektrum verteilt ist, ausgewertet kann. Es wurden etliche Methoden entwickelt, um aus Multiplex-CARS-Spektren ein hohes Maß an Information zu gewinnen.[12, 65–68]

2.4.3. Single-Beam-CARS

Die Single-Beam-CARS-Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und weiterentwickelt. Dabei wird das CARS-Signal mit einem einzigen breitbandigen Laser erzeugt, wie in Abbildung 2.12 (a) gezeigt.[69–78] Dabei stammen alle beteiligten Photonen aus dem selben Spektrum. Zur Anregung einer Schwingung der Frequenz Ω tragen alle

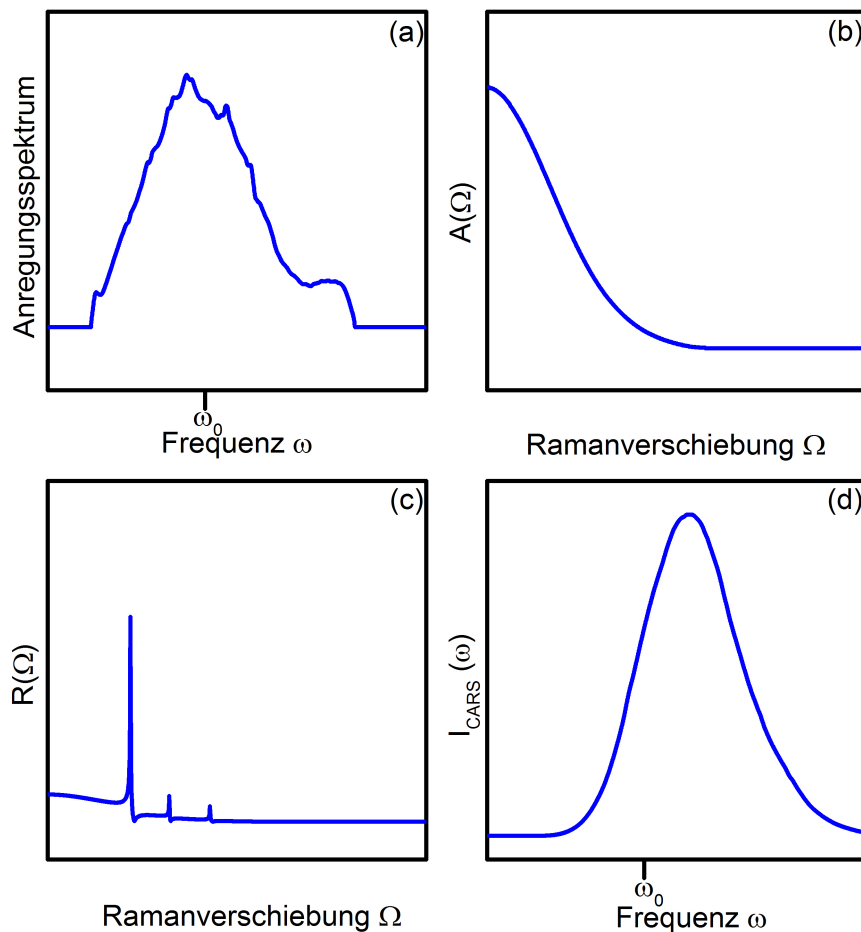


Abbildung 2.12.: Single-Beam-CARS. (a) Breitbandiges Anregungsspektrum. (b) Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ mit einem Maximum bei null, von wo aus eine kontinuierliche Abnahme zu höheren Wellenzahlen hin stattfindet. (c) Die Molekülantwort entspricht der gewichteten Suszeptibilität. (d) Durch die breitbandige Abfrage werden die Resonanzen verwaschen und sind im detektierten Spektrum nicht mehr zu erkennen.

Frequenzpaare bei, die diesen Abstand besitzen. Die Gesamtanregungswahrscheinlichkeit ergibt sich dann direkt aus Gleichung (2.48) und weist einen Verlauf wie in Abbildung 2.12 (b) gezeigt auf.

Bei Single-Beam-CARS verhält sich die Gewinnung von Information über Schwingungsresonanzen der Probe vollkommen anders, als bei den zuvor vorgestellten Methoden. Wie an Gleichung (2.50) deutlich wird, ist das erhaltene Signal eine Faltung der Molekülantwort $R(\Omega)$ mit dem breitbandigen Anregungsfeld $E(\omega)$. Geht man von einem Anregungsfeld aus, welches durch eine glatte Funktion beschrieben wird, also keine ausgeprägten Merkmale bei bestimmten Frequenzen verfügt, werden die Linien von $R(\Omega)$ verwaschen, wie Abbildung 2.12 (d) zeigt.

Single-Beam-CARS erfordert daher zusätzliche Maßnahmen, welche durch Einsatz der *Impulsformung* des Anregungsfeldes erfolgen. Es gibt zwei gängige Möglichkeiten zur Erlangung schwingungsspektroskopischer Information aus Single-Beam-CARS-Messungen: Bei der *Kontrolle der Anregung* [79, 80] erzeugen nur Moleküle, deren Schwingungsniveau bei den passenden Frequenzen liegen, CARS-Signal. Durch Einführung eines schmalbandigen spektralen Merkmals ist auch im Single-Beam-CARS *Multiplexing* möglich. Die entsprechenden Methoden werden im Folgenden beschrieben.

Kontrolle der Anregung: Zeitaufgelöste Methoden

Der Begriff der zeitaufgelösten Methoden hat seinen Ursprung in der Tatsache, dass die geformten Impulse die Molekülschwingung in der Zeitdomäne abbilden. Hierzu wird ein Impuls in zwei oder mehr Subimpulse aufgeteilt, deren zeitlicher Abstand variiert wird.

Eine erste Demonstration für ein solches Verfahren wurde in [69] gegeben. Es wird eine Phasenfunktion der Form

$$\phi(\omega) = a \sin(b\omega + c) \quad (2.58)$$

angelegt. Der Parameter b wird variiert um spektrale Information zu erlangen, weshalb diese Methode als *b-Scan* bezeichnet wird. Die Auswirkung einer solchen Phase ist in Abschnitt 4.1 ausführlich in der Frequenzdomäne beschrieben. Der entscheidende Punkt ist, dass eine maximale Anregung erreicht wird, wenn für die Molekülschwingung die Bedingung

$$\Omega = n \frac{2\pi}{b} \quad \text{mit } n \in \mathbb{N} \quad (2.59)$$

erfüllt ist. Hier soll kurz das intuitive Bild in der Zeitdomäne gegeben werden, ohne jedoch den Fokus auf mathematische Details zu richten. In der Zeitdomäne hat der

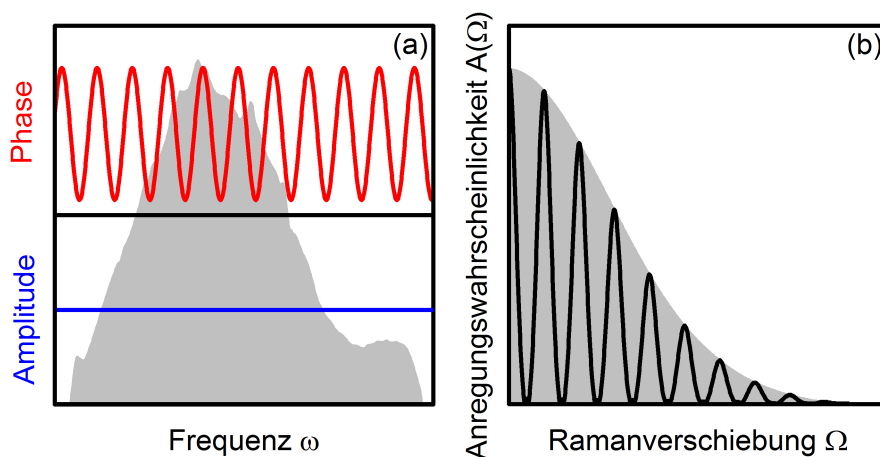


Abbildung 2.13.: Multiimpuls-Schema. (a) Eine sinusförmige spektrale Phase bewirkt eine Anregung der Moden, deren Frequenz einem ganzzahligen Vielfachen derjenigen des Sinus entspricht. (b) Bei den Frequenzen, welche die Bedingung $\Omega = \frac{2\pi n}{b}$ erfüllen, wird die Ramananregungswahrscheinlichkeit des transformlimitierten Impulses (grau hinterlegt) erreicht.

geformte Impuls folgende Form [81]:

$$E_a(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n(a) E_{in}(t - nb) e^{-inc}. \quad (2.60)$$

Dabei ist $J_n(a)$ die Besselfunktion erster Art der Ordnung n . Es werden also mit $J_n(a)$ gewichtete Impulskopien erzeugt, welche jeweils den zeitlichen Abstand b zueinander haben. Die Anregung kann so betrachtet werden, dass jeweils nach einer Schwingungsperiode ein weiterer Impuls auf das Molekül einwirkt und so eine Anregung in Phase stattfindet. Wie in der Simulation (vgl. Anhang B) in Abbildung 2.13 gezeigt ist, wird die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ durch die sinusförmige Phase moduliert. Die Auswertung dieser Methode ist in Abschnitt 4.1 dargestellt.

In [82] bzw. [83] wurden weitere Verfahren entwickelt, bei welchen Impulskopien mit variablem zeitlichen Abstand erzeugt wurden. Ein wichtiges Beispiel sind etwa Doppelimpulse. Auch hier erfolgt eine effiziente Anregung, wenn die beiden Impulskopien den zeitlichen Abstand einer Molekülschwingungsperiode haben. Die Verwendung der Impulsformung ermöglicht die Erzeugung von Doppelimpulsen durch Anlegen einer Mas-

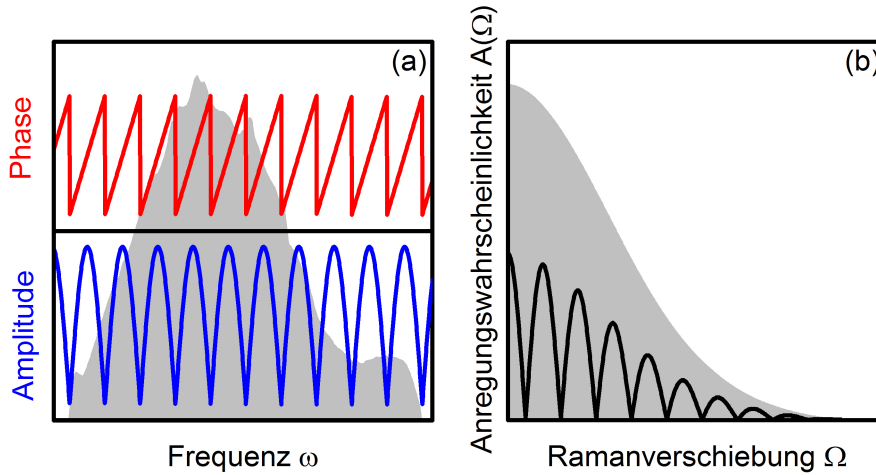


Abbildung 2.14.: Doppelimpulsanregung. (a) Eine kosinusförmige spektrale Amplitude der Maskenfunktion erzeugt zwei gleiche Doppelimpulse. (b) Es werden auch hier alle Frequenzen, welche die Bedingung $\Omega = 2\pi/b$ erfüllen, angeregt. Allerdings ist die Effizienz der Anregung und Selektivität der Moden nicht so ausgeprägt wie beim Multiimpulsschema.

kenfunktion der Form

$$M(\omega) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2}e^{i\omega b}. \quad (2.61)$$

Amplitude und Phase entsprechen dann

$$|M(\omega)| = \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(\omega b)},$$

$$\phi(\omega) = \arctan\left(\frac{\sin(\omega b)}{1 + \cos(\omega b)}\right).$$

Die effizienteste Anregung wird also erhalten, wenn wie zuvor die Bedingung $\Omega = n \cdot 2\pi/b$ erfüllt ist. Der Effekt auf die Ramananregungswahrscheinlichkeit ist in einer Simulation in Abbildung 2.14 gezeigt. Eine Möglichkeit zur schnellen Aufnahme solcher Doppelimpulsmessungen wurde in [84, 85] vorgestellt und in [86, 87] für Messungen bis in den CH-Bereich weiterentwickelt. Hier wurden die Impulskopien nicht mit einem Impulsformer, sondern einem Michelson-Interferometer erzeugt. Eine weitere interessante Realisierung des Doppelimpuls-CARS-Experiments wurde in [88] demonstriert. Dort wurden zwei leicht verstimmt Frequenzkämmen [89] überlagert, so dass sich die zeitliche Differenz zwischen zwei Einzelimpulsen leicht ändert. Durch eine Detektion in der Größenordnung

mehrerer MSamples/s wird das Interferogramm erhalten. Der Informationsgehalt ist in den genannten Verfahren identisch und die Auswertung erfolgt analog. Sie besteht dann im Wesentlichen aus einer Fouriertransformation, um die Schwingungsmoden zu identifizieren [69] (vgl. Abschnitt 4.1).

Weiterhin wurde in [82] bzw. [83] ein Verfahren vorgestellt, welches als *Two colour double pulse* bezeichnet wird. Diese Impulsform wird einfach erreicht, indem eine Hälfte des spektralen Anregungsfeldes eine konstante Phase erhält und die andere eine der Form

$$\phi(\omega) = b\omega.$$

Dies entspricht einer zeitlichen Verzögerung dieses Teilimpulses um b gegenüber dem anderen, welcher eine konstante spektrale Phase aufweist. Die beiden Beiträge können als transformlimitierte Impulse mit der halben Bandbreite betrachtet werden, deren Ramananregungswahrscheinlichkeiten interferieren. Während die Anregungswahrscheinlichkeit des nicht verschobenen Anteils eine konstante Phase besitzt, nimmt die des verschobenen linear mit der Frequenz zu. Dadurch wird die resultierende Anregungswahrscheinlichkeit moduliert. Dieser Effekt kann in der Simulation in Abbildung 2.15 beobachtet werden.

Kontrolle der Anregung: Spectral Focusing und Binary Phase Shaping

Zwei weitere Verfahren, welche auf der Kontrolle der Anregung basieren und eine Verbindung zu herkömmlichen CARS-Experimenten darstellen, sind Spectral Focusing und Binary Phase Shaping. Bei der zuvor vorgestellten b-Scan-Technik wurden immer alle Vielfache der Frequenz $2\pi/b$ innerhalb der Laserbandbreite angeregt und durch einen Scan mit anschließender Auswertung alle Linien erhalten. Eine Alternative hierzu ist nur eine Bande anzuregen. Erreicht wird dies durch zwei Kopien einer Phasenfunktion, welche um die anzuregende Frequenz Ω verschoben sind.

Eine Möglichkeit ist es, zwei Hälften des Spektrums den gleichen Chirp aufzuprägen, wie in Abbildung 2.16 gezeigt. Die Simulation der Ramananregungswahrscheinlichkeit demonstriert die Möglichkeit zur effizienten Unterdrückung unerwünschter Frequenzen. Erste Realisierungen hiervon wurden demonstriert, indem zwei spektrale Hälften eines Laserimpulses durch verschiedene Glaselemente geschirpt wurden.[90–92] Der Ansatz in [93] verwendet das gleiche Verfahren, legt die entsprechende Phasenfunktion jedoch mit einem Impulsformer an. Für sich genommen ist dies eine aufwendigere und kostspieligere Lösung als die zuvor genannte mit den Glaselementen, allerdings ist es als Erweiterung eines ohnehin bestehenden Aufbaus zur Impulsformung eine wirkungsvolle Methode zur

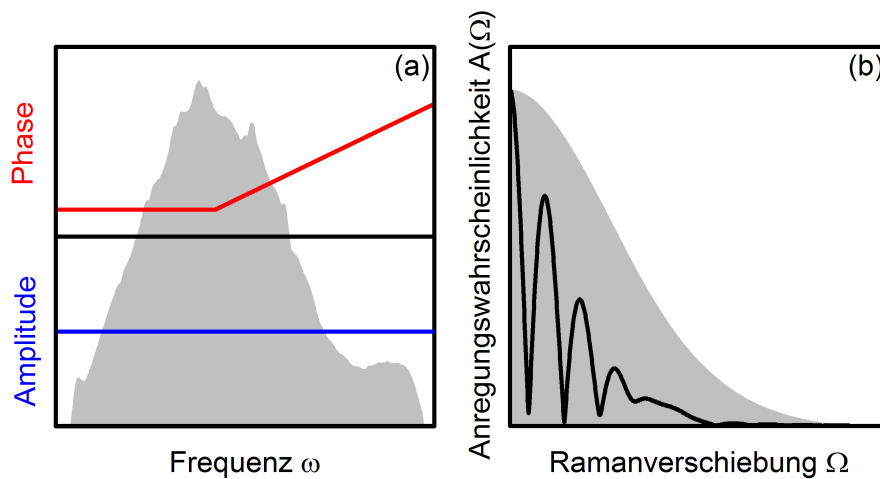


Abbildung 2.15.: Zweifarben-Doppelimpuls. (a) Eine Hälfte des Spektrums wird in der Zeit durch Anlegen einer linearen Phase verschoben. Es handelt sich um eine reine Phasenformung. (b) Die Ramananregungswahrscheinlichkeit für niedrige Wellenzahlen ist erhöht, da hier die Beiträge der beiden Teilimpulse interferieren. Dadurch wirkt $A(\Omega)$ eingengt.

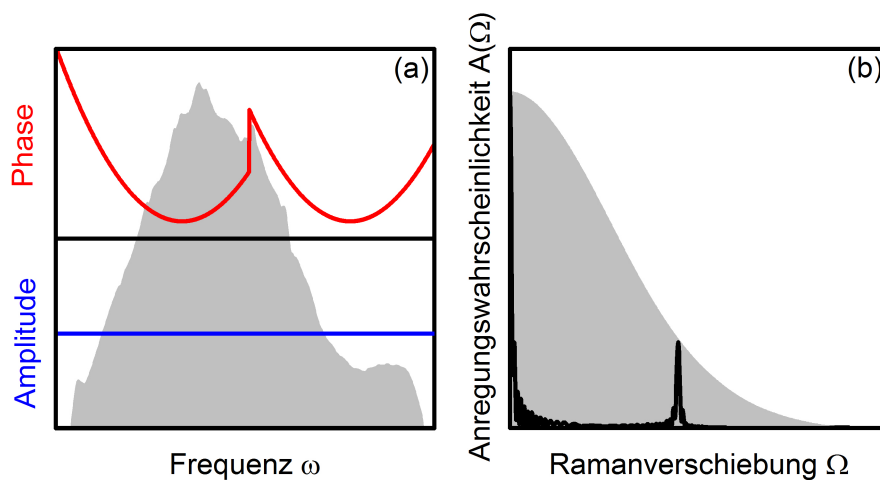


Abbildung 2.16.: Spectral Focusing. (a) Zwei um Ω verschobene Parabeln tragen zu einer Anregung bei dieser Frequenz bei. (b) Die Ramananregungswahrscheinlichkeit für andere Frequenzen wird nahezu vollständig unterdrückt.

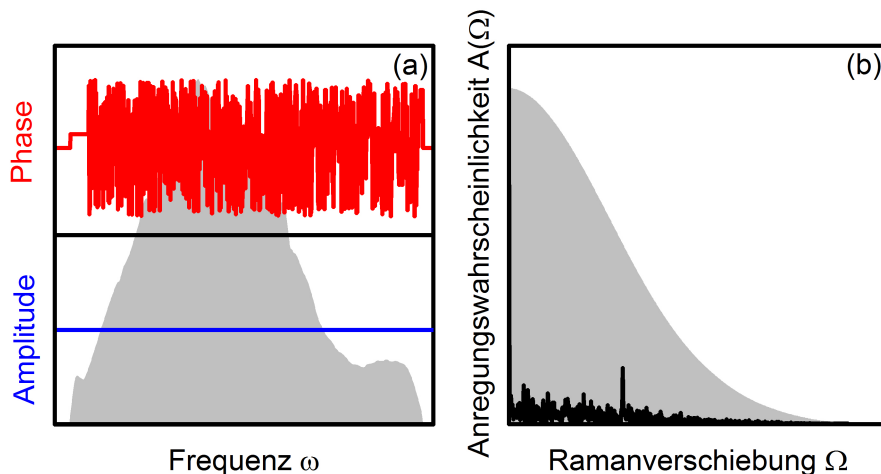


Abbildung 2.17.: Binary Phase Shaping. (a) Die einzelnen Pixel einer Maske werden entweder auf den Wert null oder π gesetzt. (b) Durch identische Kopien von Phasenabfolgen kann eine bestimmte Frequenz angeregt werden.

schnellen Bildgebung, welche ohne großen Aufwand realisiert werden kann.

Eine andere Variante der gezielten Anregung einer Schwingungsresonanz wurde in [94, 95] vorgestellt. Wie in Abbildung 2.17 gezeigt ist, wird dabei jedes einzelne Pixel einer Phasenmaske entweder auf 0 oder π gesetzt. Dabei entsteht ein binäres Muster, welches um die Frequenz Ω versetzt wird, womit die Bedingung für eine konstruktive Überlagerung aller Frequenzanteile zur Anregung dieser Bande gegeben ist. In [94] wurde eine Methode demonstriert, mit welcher analytisch eine Abfolge von Phasenwerten null und π für den Bereich zwischen den beiden um Ω verschobenen Phasenkopien bestimmt wird. Im Beispiel hier wurde die Abfolge für das gesamte Spektrum mit Hilfe eines genetischen Algorithmus gefunden (vgl. Anhang B). Die Kombination aus genetischen Algorithmen und Binary Phase Shaping ist besonders geeignet, da der Parameterraum hier aus binären Zahlen besteht.

Es ist möglich durch eine längere Optimierung oder andere Suchstrategien vermutlich eine selektivere Anregung zu erhalten, allerdings ist kein Vorteil gegenüber des Ansatzes des Spectral Focusing erkennbar, bei dem die benötigte Phase direkt ersichtlich ist.

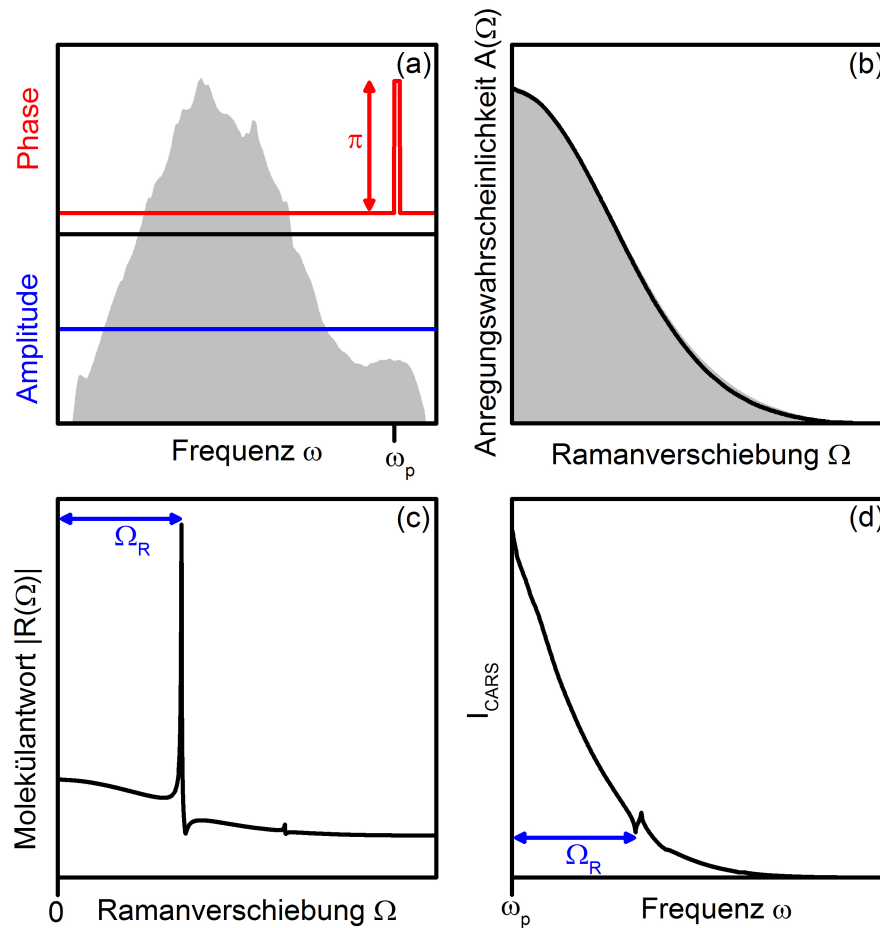


Abbildung 2.18.: Spektral aufgelöster Single-Beam-Ansatz. (a) Im spektralen Anregungsfeld wird ein π -Phasengate erzeugt. (b) Die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ bleibt hiervon praktisch unbeeinflusst. (c) Die Molekülantwort $R(\Omega)$ enthält Beiträge von allen Resonanzen innerhalb der Laserbandbreite. (d) Im CARS-Spektrum erscheinen die Resonanzen als Dip-Peak-Muster.

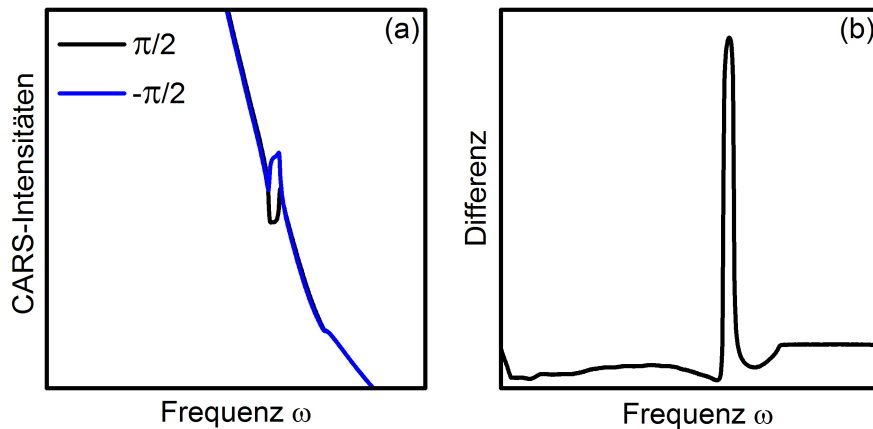


Abbildung 2.19.: Erzeugung von Spektren, welche annähernd spontanen Ramanspektren entsprechen. (a) Die CARS-Spektren für Gatephasen von $\pi/2$ und $-\pi/2$ unterscheiden sich nur an den Stellen, an denen Resonanzen auftreten. (b) Die Differenz ergibt ein Spektrum, welches demjenigen aus einer spontanen Ramanmessung ähnelt.

Multiplexing: Spektral aufgelöste Methoden

Eine grundlegend andere Methode als die Kontrolle der Anregung sind spektral aufgelöste Methoden, welche auf einem *Multiplexing*-Ansatz beruhen. Hierbei wird ein schmalbandiger Bereich eingeführt, welcher gegenüber dem Rest des Spektrums in Phase und/oder Amplitude verändert ist. Im Folgenden wird dieser als Phasen- bzw. Amplitudengate bezeichnet. Wie in Abbildung 2.18 (b) zu sehen ist, bleibt die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ davon praktisch unberührt und alle Schwingungsniveaus innerhalb der Laserbandbreite werden angeregt (Abbildung 2.18, c). Der schmalbandige Probe-Impuls bewirkt ein Multiplex-CARS-Feld, welches durch Interferenz ein Dip-Peak-Muster im Spektrum erzeugt. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt bei einer Gatephase $\phi_g = \pi$. [70] Die genaue Behandlung der Theorie erfolgt in den Abschnitten 4.2 und 5.2.

Ein weiterer interessanter Effekt ist in Abbildung 2.19 demonstriert. Wie in Abschnitt 4.2 näher beschrieben wird, liefert die Differenz zweier CARS-Spektren mit einer Phase des Gates von $\pi/2$ bzw. $-\pi/2$ annähernd ein Ramanspektrum (vgl. Abbildung 2.19 b). [96] Die genaue Behandlung dieses Effekts ist in Anhang C dargestellt.

In [72, 74] wurde ein Verfahren vorgestellt, mit dem die beiden hierfür benötigten

Spektren auf einmal aufgenommen werden können, indem sie in verschiedenen Polarisationsrichtungen erzeugt werden.

Wie Abbildung 2.19 (b) zeigt, wird nur näherungsweise ein Ramanspektrum erhalten, was im folgenden Abschnitt 4.2 näher erläutert wird. Dort wird auch ein Verfahren vorgestellt, mit dem zuverlässig korrekte Ramanspektren erhalten werden können.

Eine andere Methode Ramanspektren zu erhalten, welche in [97, 98] demonstriert wurde, ist die Beziehung

$$\Theta(t)\mathfrak{F}^{-1}\{E_{Sig}(\omega) + E_{Sig}^*(\omega)\} = \mathfrak{F}^{-1}\{E_{Sig}(\omega)\}$$

auszunutzen. Der erste Term $E_{CARS,n} + E_{CARS,n}^*$ entspricht dem Realteil, der näherungsweise als $S_\pi(\omega)/S_0(\omega)$ bestimmt werden kann. Durch zwei Fouriertransformationen kann auf diese Weise die Phase von $E_{Sig}(\omega)$ näherungsweise bestimmt werden.

2.4.4. Stimulierte Ramanstreuung (SRS)

Eine Methode, die in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen hat, ist die stimulierte Ramanstreuung (SRS), die in Abbildung 2.8 (c) dargestellt ist.[99–105] Bei der stimulierten Ramanstreuung wird ein Photon emittiert, welches die gleiche Frequenz hat wie das eingestrahlte Stokesphoton. In einer klassischen Betrachtungsweise, lässt sich sagen, dass ein Feld bei der Stokesfrequenz emittiert wird, welches mit dem eingestrahnten in Phase ist (siehe Abbildung 2.8). Bei der Pumpfrequenz hingegen wird ein Feld emittiert, das gegenüber dem eingestrahnten eine Phase von π aufweist und daher mit diesem destruktiv interferiert.

Für das Pumpfeld kommt es damit zu einer Abschwächung, welche als *Stimulated Raman Loss (SRL)* bezeichnet wird, während das Stokesfeld eine Verstärkung, den sogenannten *Stimulated Raman Gain (SRG)*, erfährt. Lange Zeit konnte dieser Effekt nicht ausgenutzt werden, da hierzu sehr kleine Änderungen eines verhältnismäßig großen Signals gemessen werden müssen ($\Delta I/I \sim 10^{-4}$). Die Lösung für dieses Problem ist eine Lock-In-Technik bei sehr hohen Frequenzen (RF-Lock-In), welche es ermöglicht einige wenige Stokesimpulse ein- und auszublenden.⁷ Das Prinzip ist in Abbildung 2.20 gezeigt. Wann immer Stokesimpulse vorhanden sind, kommt es zu einer Abschwächung des Pumpsignals, vorausgesetzt die Verstimmung der beiden Impulse stimmt mit der Resonanzfrequenz des Moleküls überein. Diese Abschwächung ist mit der gleichen Frequenz moduliert wie das Ein- und Ausschalten der Stokesimpulse. Typische Frequenzen

⁷Alternativ wäre auch ein Ein- und Ausblenden des Pumpimpulses möglich.

2. Grundlagen der nichtlinearen optischen Mikroskopie

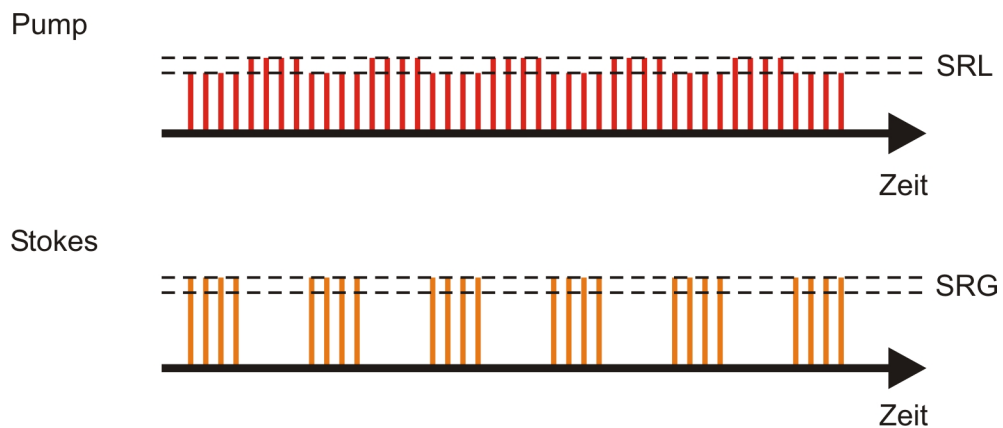


Abbildung 2.20.: Experimentelle Umsetzung der Stimulated Raman Scattering Methode (SRS). Einem Pumpimpuls wird ein zeitlich modulierter Stokesimpuls überlagert, was zu einer modulierten Abschwächung (Stimulated Raman Loss, SRL) führt, welche mit Lock-In-Technik detektiert werden kann.

liegen hier im Megahertzbereich. Wird der Lock-In-Verstärker auf diese eingestellt, so wird diese Änderung gemessen.

Der große Vorteil von SRS-Messungen ist, dass der Imaginärteil der Suszeptibilität abgefragt wird, was zu untergrundfreien Aufnahmen führt. In [106] wurde eine Single-Beam-SRS Variante vorgestellt. Die Modulation erfolgte dort mit dem Impulsformer, was den Einsatz eines Lock-In-Verstärkers ausschließt. Aus diesem Grund wurde ein verstärktes Lasersystem mit einer Wiederholrate von 1kHz und Impulsenergien von bis zu $1\mu\text{J}$ verwendet, um die kleinen SRS-Signaländerungen detektieren zu können. Diese hohen Intensitäten verhindern bislang den Einsatz von Single-Beam-SRS in der Bildgebung empfindlicher Proben.

3. Experimenteller Aufbau

Nach der Vorstellung der Grundlagen soll in diesem Kapitel das verwendete Mikroskopiesystem näher beschrieben werden. Der grundlegende Aufbau ist bereits in Abbildung 1.3 in Kapitel 1 kurz eingeführt worden. Hier werden nun die experimentellen Details erörtert. Dazu ist zunächst der Aufbau in Abbildung 3.1 zusammen mit einigen experimentellen Daten gezeigt.

Nach einer kurzen Beschreibung des Lasersystems, wird der Impulsformer in seinen Einzelheiten beschrieben. Seine Kalibrierung wird in Anhang A behandelt.

Ein großer Teil dieses Kapitels behandelt die Korrektur des Impulses, sowohl was seinen Chirp betrifft (zeitliche Korrektur), als auch in Bezug auf Abbildungsfehler (räumliche Korrektur). Zur zeitlichen Korrektur kommen neben dem Impulsformer sogenannte *gechirpte Spiegel* zum Einsatz. Die räumliche Korrektur basiert vor allem auf dem Einsatz eines adaptiven Spiegels.

Abschließend werden die Komponenten des Mikroskops und der Detektionseinheit vorgestellt, die im Wesentlichen jedoch dem üblichen Stand der Technik entsprechen.

3.1. Laserquelle

Als Lichtquelle kam ein kommerzieller Ti:Sa-Laserszillator (Femtolasers Fusion Pro 800) zum Einsatz, welcher am Ausgang Laserimpulse von etwa 9fs Dauer liefert. In Abbildung 3.2 (a) ist die zugehörige Autokorrelation zu sehen. Die Impulswiederholffrequenz liegt bei 76MHz und die mittlere Leistung bei $P_{avg} = 800\text{mW}$. Damit ergibt sich eine Impulsenergie von etwa $E_P = 10,5\text{nJ}$ und eine Impulsspitzenleistung von $P_P = 1,17\text{MW}$. Das zugehörige Spektrum ist in Abbildung 3.2 (b) gezeigt. Der eingezeichnete Pfeil verdeutlicht, dass ein Frequenzbereich von mehr als 3000cm^{-1} überspannt wird. Diese Frequenz entspricht etwa derjenigen von CH-Streckschwingungen, so dass diese mit diesem System angeregt werden können. Möglich werden solche Laserparameter bei kompaktem Aufbau durch die Verwendung von *gechirpten Spiegeln* zur Impulskompression.[23]

3. Experimenteller Aufbau

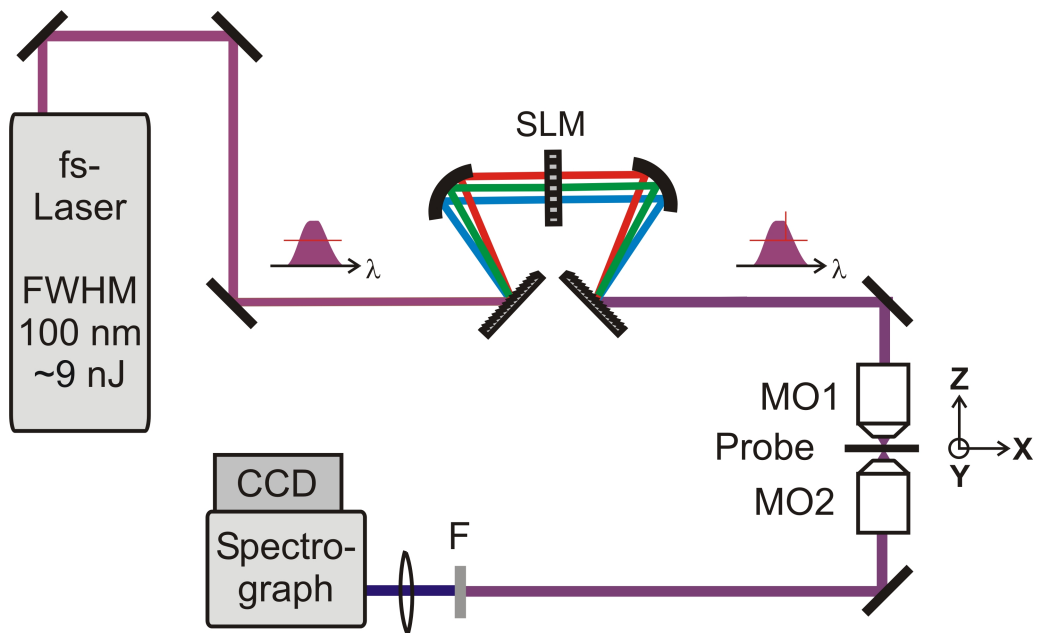


Abbildung 3.1.: Aufbau zur nichtlinearen Mikroskopie, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Ein kommerzieller Ti:Sa-Laser (Femtolasers Fusion Pro 800) liefert Impulse mit einer Dauer von etwa 9 fs. Diese werden mit einer 4f-Linie und einem räumlichen Lichtmodulator (SLM) in Amplitude und Phase geformt und zum Mikroskop geführt, wo die nichtlineare Wechselwirkung mit der Probe stattfindet. Das kollimierte Signal wird dann zur Detektionseinheit geführt.

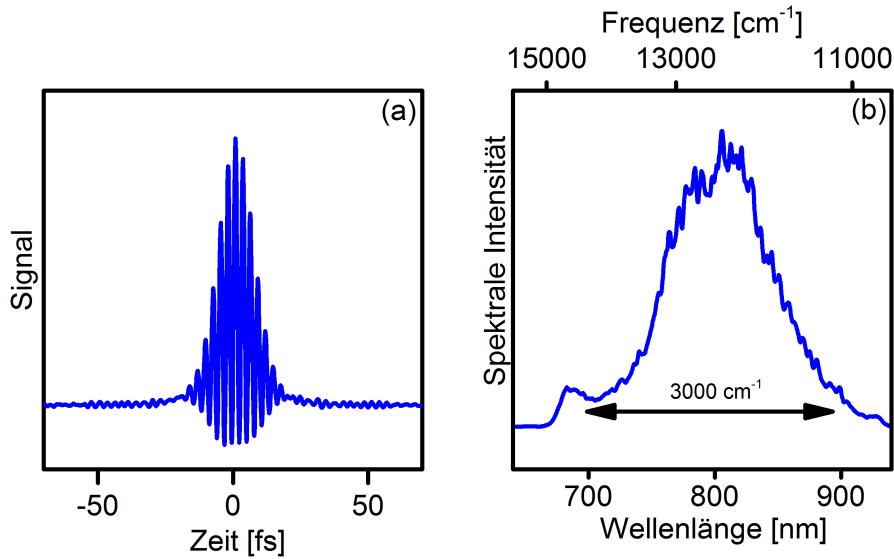


Abbildung 3.2.: (a) Autokorrelation (b) und Spektrum für den Femtosekundenlaseroszillator Fusion Pro 800 von Femtolasers.

Die Leistungsfähigkeit des vorgestellten Experiments hängt maßgeblich von der Justierung des Lasers ab. So ist die Einkopplung des Pumplasers täglich zu überprüfen und die Ausgangsleistung zu messen. Gegebenenfalls ist auch der Kristall und die restlichen Optiken zu reinigen und die Kavitätsendspiegel zu justieren. Auch die Position des Kristalls ist etwa einmal im Monat zu ändern, da mit der Zeit der Pumplaserstrahl ($P_{avg} = 7\text{W}$) den Kristall zerstört.

3.2. Impulsformer

Der Impulsformer, gewissermaßen das Herzstück des Aufbaus, ist in Abbildung 3.3 gezeigt und wurde im Prinzip bereits im Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Im Experiment kam eine 4f-Linie zum Einsatz, die im Laufe der Arbeit mehrfach überarbeitet und umgebaut wurde. Fester Bestandteil aller Aufbauten war jedoch eine Doppelflüssigkristallmaske (SLM 640d von Jenoptik) mit 640 Pixeln, die über die Software LabVIEW von National Instruments angesteuert wurde. Der erreichbare Phasenhub hängt von der Wellenlänge ab und beträgt laut Hersteller der Maske 7π bei 430 nm und 2π bei 1500 nm. Die Spannung, die an jedes Pixel angelegt werden kann ist mit einer Auflösung von 12 Bit steuerbar, so dass 4096 Abstufungen erreicht werden. Der maximale Spannungsbereich kann

3. Experimenteller Aufbau

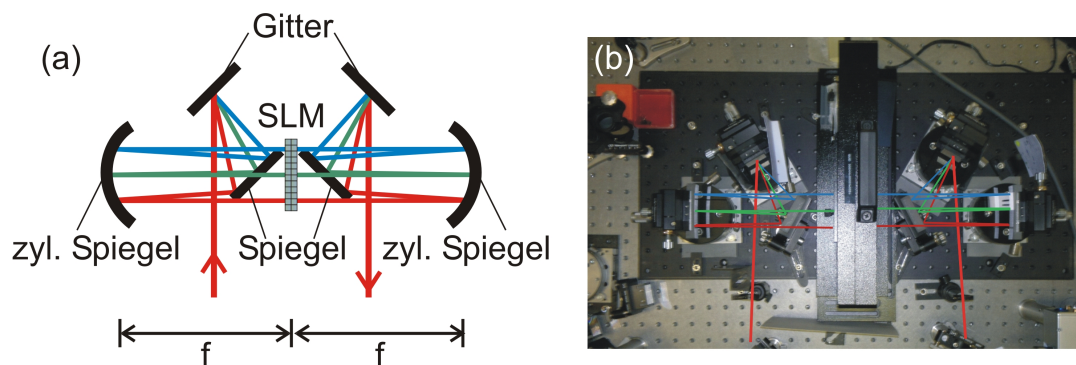


Abbildung 3.3.: Aufbau des Impulsformers. (a) Schematische Skizze. Aus Platzgründen wurde der Strahlengang einmal mit Hilfe von Planspiegeln gefaltet. (b) Aufbau im Labor. Zu sehen ist die erste Version mit einer Brennweite der zylindrischen Spiegel von $f = 200\text{mm}$ und Gittern mit 600 l/mm .

dabei per Software ausgewählt werden: entweder von 0V bis 5V oder von 0V bis 8V . Bei der ersten Variante ist die Auflösung größer, da kleinere Spannungsschritte auch kleinere Phasenänderungen bedeuten. Die hohe Spannung ist nützlich, wenn eine Teilmaske inaktiv, sprich auf die *höchste* Spannung gesetzt werden soll. Die Phasenänderung bei einem gegebenen Spannungswert hängt empfindlich von der Temperatur ab, weshalb die Flüssigkristallmaske eine Aufwärmzeit von typischerweise 30 Minuten benötigt. Ferner ist eine Kalibrierung am endgültigen Aufstellungsort notwendig. Eine ausführliche Beschreibung des Vorgehens hierzu ist in Anhang A gegeben.

Der Aufbau eines Impulsformers erfordert besondere Sorgfalt bei der Justage. So ist etwa darauf zu achten das erste Gitter mit einem Strahl der parallel zur Tischebene verläuft zu treffen und auch die spektral aufgespaltene Strahlen müssen in dieser Ebene liegen. So ist sichergestellt, dass Gitter nicht verdreht ist. Der Abstand zwischen dem ersten Gitter und dem ersten zylindrischen Spiegel ist ungefähr auf die Brennweite desselben einzustellen und in einiger Entfernung ($2\text{--}3\text{ m}$) ist zu überprüfen, dass sich die Breite des spektral aufgespaltene Strahls nicht ändert und dieser nicht verdreht ist. Der zweite zylindrische Spiegel im Abstand $2f$ zum ersten und das zweite Gitter sind so zu positionieren, dass der Ausgangsstrahl parallel zur Tischebene und auf gleicher Höhe wie der Eingangsstrahl den Impulsformer verlässt. Mit einer Infrarotkarte ist dann die räumliche Verzerrung in möglichst großer Entfernung zu kontrollieren und mit dem Gitterwinkel zu kompensieren. Der letzte Schritt zum Aufbau der $4f$ -Linie ist die Einstellung des Abstandes des zweiten Gitters zum Spiegel. Hierzu wird das Autokorrelationssignal des Ausgangsstrahls aufgenommen und die Impulsdauer minimiert.

Anschließend ist die Flüssigkristallmaske einzusetzen, wobei darauf zu achten ist, dass sie möglichst senkrecht zum Laserstrahl steht. Dies wird erreicht, indem die Reflexion, welche an Eintrittsfenster entsteht, mit dem Eingangsstrahl zur Deckung gebracht wird. Die Maske erzeugt wieder einen sehr großen Chirp im Ausgangsstrahl. Dies kann zwar durch die Position des zweiten Gitters teilweise kompensiert werden, allerdings zu Lasten der Strahlqualität. In dieser Arbeit wurde die Erfahrung gemacht, dass das beste Ergebnis erzielt wird, wenn die Kompression mittels *gechirpter Spiegel* vorgenommen wird, wie im folgenden Abschnitt 3.3 beschrieben wird.

Es gab im Laufe der Arbeit drei Konfigurationen von Gittern und zylindrischen Spiegeln:

1. Gitter mit 600 1/mm und zylindrische Spiegel mit 200 mm Brennweite.
2. Gitter mit 1200 1/mm und zylindrische Spiegel mit 200 mm Brennweite.
3. Gitter mit 600 1/mm und zylindrische Spiegel mit 300 mm Brennweite.

Bei der ersten Konfiguration war ein kompakter Aufbau möglich, allerdings bei niedriger Auflösung. Die zweite ermöglichte eine höhere Auflösung, allerdings war die Effizienz der Gitter in der Polarisationsrichtung des Laserstrahls sehr gering. Die dritte Variante, ermöglichte schließlich eine gute Auflösung bei hoher Transmission, wenn auch mit einem etwas größeren Aufbau.

Der wesentliche Schritt nach einem solchen Umbau ist immer die Pixel-Wellenlängen-Kalibrierung (siehe Anhang A). Dazu werden für etwa zehn einzelne Pixel nacheinander die Amplituden moduliert und mit einem Spektrometer die zugehörigen Wellenlängen ermittelt. Aus der Annahme der *Fraunhofer-Beugung* folgt die Funktion, vgl. [28]:

$$x(\lambda) = x_0 + f \tan \left[\arcsin \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \theta_i \right) - \arcsin \left(\frac{\lambda_0}{d} - \sin \theta_i \right) \right]. \quad (3.1)$$

Dabei sind $x(\lambda)$ die Pixelposition in Abhängigkeit von der Wellenlänge, x_0 die Referenzposition, f die Brennweite des Zylinderspiegels, d der Strichabstand des Beugungsgitters, θ_i der Einfallswinkel und λ_0 die Wellenlänge bei x_0 . Mittels eines für diese Aufgabe erstellten LabVIEW-Programms wird dann eine Anpassung nach *Levenberg-Marquadt* [107] vorgenommen und die Wellenlänge für jedes Pixel ermittelt.

3.3. Zeitliche und räumliche Impulskorrektur

Voraussetzung für eine erfolgreiche nichtlineare Mikroskopie ist ein Impuls, der sowohl zeitlich als auch räumlich gut korrigiert ist. Die zeitliche Korrektur ist notwendig, da sich

3. Experimenteller Aufbau

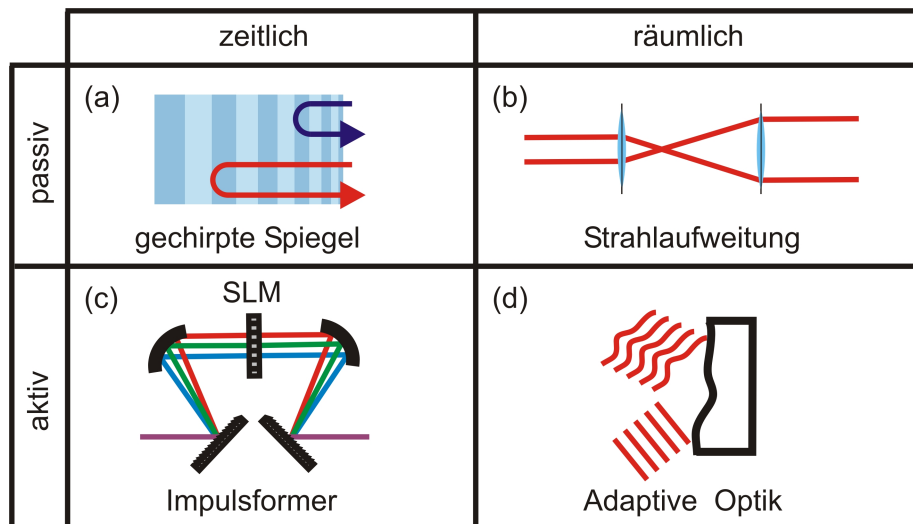


Abbildung 3.4.: Passive und aktive Korrekturmethode.

dispersive Elemente im Strahlengang befinden. In erster Linie ist hier das Mikroskopobjektiv zu nennen, doch auch die Flüssigkristallmaske selbst und sogar die Dispersion der Luft spielen bei solch kurzen Laserimpulsen eine Rolle. Die 4f-Linie des Impulsformers erzeugt hingegen Wellenfrontverzerrungen, welche letztlich die Qualität des Fokus verringern.

Zur Korrektur kommen für räumliche und zeitliche Korrekturen sowohl aktive als auch passive Elemente zum Einsatz. Eine Übersicht gibt Abbildung 3.4.

Möglichkeiten zur zeitlichen Impulskompensation mit passiven Elementen sind seit längerer Zeit in Form von *Prismen-* oder *Gitterkompressoren* gegeben, die jedoch eine aufwendige Justierung erfordern und großen Raum beanspruchen. Eine interessante Alternative, welche in dieser Arbeit zum Einsatz kam, sind *gechirpte Spiegel*, die in Abbildung 3.4 (a) dargestellt sind.[24, 108] Hierbei handelt es sich um dielektrische Spiegel, wie sie etwa auch in Laserkavitäten verwendet werden, mit dem Unterschied jedoch, dass die Schichtdicken mit zunehmender Eindringtiefe größer werden. Dadurch ist die Bedingung für konstruktive Interferenz zweier Teilwellen, die von benachbarten Schichtgrenzen reflektiert werden, bei kleineren Eindringtiefen zunächst für kurzwelliges Licht gegeben. Mit zunehmender Eindringtiefe wird dann nach und nach immer langwelligeres Licht reflektiert. Das bedeutet, dass die einzelnen spektralen Komponenten mit abnehmender Frequenz eine größere Verzögerung erfahren. Dadurch nimmt die instantane Frequenz des reflektierten Feldes mit der Zeit ab, der Impuls ist *negativ gechirpt*. Damit lässt sich mit einem solchen Spiegel der *positive Chirp* (die instantane Frequenz des Impulses

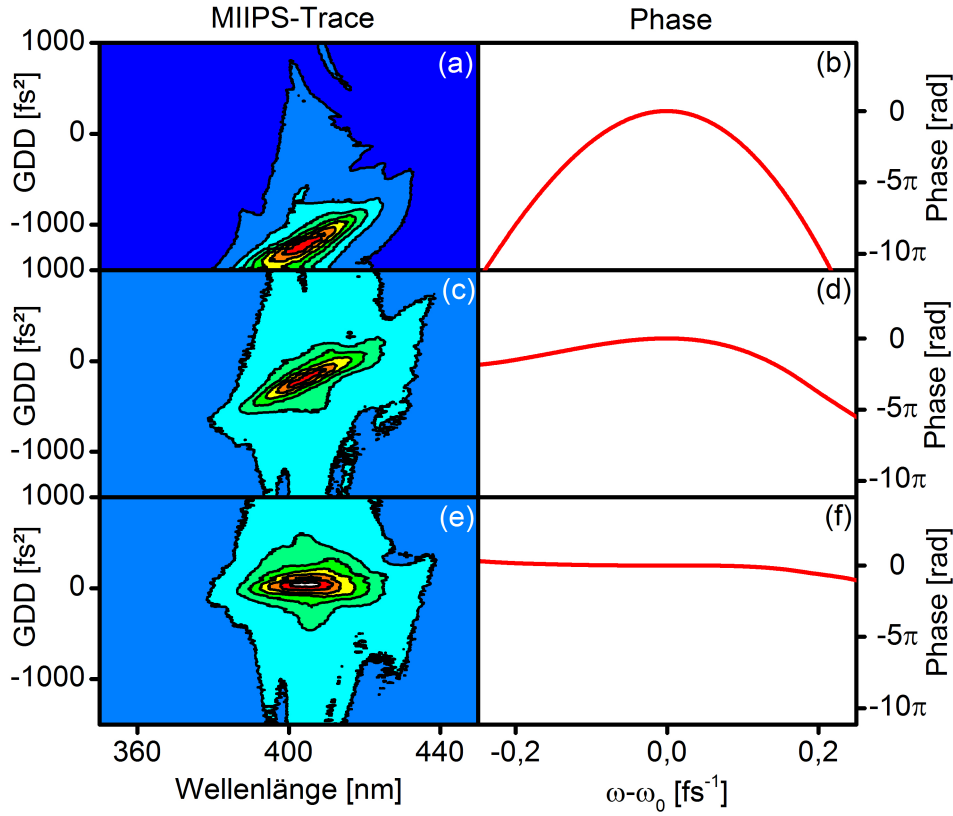


Abbildung 3.5.: Einfluss der Impulskompressionsmethoden: (a) MIIPS-Trace und (b) Phase des nicht korrigierten Impulses. Die gechirpten Spiegel korrigieren Phasenfehler zweiter Ordnung, weshalb der MIIPS-Trace in (c) zur Nulllinie hin verschoben ist, ebenso ist die Phase in (d) deutlich weniger verzerrt. Chirp dritter Ordnung kann dann mit dem Impulsformer korrigiert, was sich in einem horizontalen MIIPS-Trace (e) und einer flachen Phase (f) widerspiegelt.

3. Experimenteller Aufbau

nimmt mit der Zeit zu), welcher in allen anderen Medien im Strahlengang (Glas, Luft, etc.) entsteht, kompensieren. Kommerzielle gechirpte Spiegel sind so gestaltet, dass sie mit jeder Reflexion eine bestimmte quadratische Phasenverzerrung erzeugen. Dabei werden immer zwei zusammengehörende Spiegel verwendet, welche die Phasenverzerrungen höherer Ordnung, die sie selbst auch erzeugen, kompensieren und mehrfache Reflexionen ermöglichen. Damit kann ein Großteil der Phasenkorrektur durch Einstellen der Anzahl an Reflexionen erzielt werden. Die verbleibende Phasenverzerrung kann dann mit dem Impulsformer (Abbildung 3.4 c) kompensiert werden.

Der Einfluss der zeitlichen Korrekturen ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Gezeigt ist eine MIIPS-Messung, welche in Abschnitt 2.2.4 beschrieben wurde. Abbildung 3.5 (a) zeigt den MIIPS-Trace für einen nicht korrigierten Impuls. Das Maximum ist deutlich von der Nulllinie verschoben (Phase zweiter Ordnung) und geneigt (Phase dritter Ordnung). Abbildung 3.5 (b) zeigt die zugehörige Phase. Bei dem Trace in Abbildung 3.5 (c) wurde ein Paar gechirpter Spiegel (Layertec) mit 18 Reflexionen verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Maximum die Nulllinie kreuzt, aber noch geneigt ist. Das bedeutet, dass die Phase zweiter Ordnung weitgehend korrigiert ist, die Phase dritter Ordnung jedoch noch nicht. Die gezeigte Phase in Abbildung 3.5 (d) ist auch deutlich flacher als zuvor. Die Abbildungen 3.5 (e) und (f) zeigen schließlich die Korrektur mit Spiegelkompressor *und* Impulsformer. Das Maximum des Traces liegt horizontal auf der Nulllinie und die entsprechende Phase ist ebenfalls flach.

Ergänzend sei angemerkt, dass in der Praxis üblicherweise eine Optimierung mit einem evolutionären Algorithmus [109] verwendet wurde. Dabei wurde das Single-Beam-CARS-Signal detektiert und auf ein Maximum hin optimiert. Mit einer solchen Optimierung wurde eine Impulsdauer von $\tau_p = 9,9\text{fs}$ im Fokus des Mikroskops gemessen. Diese Messung wurde durchgeführt, indem mit dem kommerziellen Autokorrelator *Femtometer* zwei Teilstrahlen erzeugt und diese im Mikroskopfokus in einen SHG-Kristall fokussiert wurden.

Eine solche Korrektur wäre auch mit dem Impulsformer alleine möglich, allerdings wäre dann der Einsatzbereich der Maske eingeschränkt. Die Phase jedes Pixels kann prinzipiell beliebig um 2π verschoben werden. Dadurch kann, wie in Abbildung 3.6 dargestellt, jede lineare Funktion durch eine periodische ersetzt werden. Das Anlegen einer solchen Funktion an eine Flüssigkristallmaske entspricht dann dem Abtasten eines Signals. Wie aus der Messtechnik bekannt ist, muss eine periodische Funktion mit einer Abtastfrequenz aufgenommen werden, die *mehr* als doppelt so groß ist wie ihre eigene, um *Aliasing*-Effekte zu vermeiden.[110] Dies bedeutet, dass bei gegebener Auflösung

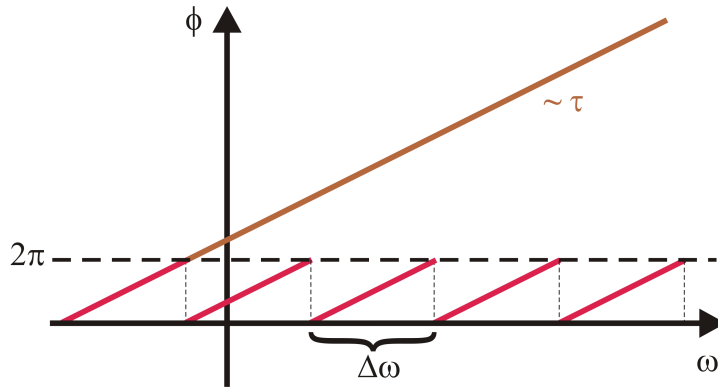


Abbildung 3.6.: Lineare Phasenfunktion mit der Steigung τ und gleichwertige Funktion im Bereich zwischen null und 2π . Der Bereich $\Delta\omega = 2\pi/\tau$ kann als Periode einer Funktion gesehen werden, welche durch die Pixel abgetastet wird. Gemäß dem *Nyquist-Theorem* muss die Abtastfrequenz mehr als doppelt so groß sein wie die höchste Signalfrequenz, was bedeutet, dass innerhalb von $\Delta\omega$ mindestens drei Pixel liegen müssen.

der Flüssigkristallmaske nur Funktionen bis zu einer gewissen Steigung realisiert werden können. Korrekturphasen mit zu großen lokalen Steigungen können daher entweder gar nicht angelegt werden oder schränken den Einsatzbereich der Maske stark ein.

Bei der räumlichen Korrektur kommen ebenfalls passive und aktive Elemente zum Einsatz. Ziel der räumlichen Korrektur ist einen möglichst kleinen Fokus zu erhalten. Als passives Element wird hierzu die *Strahlaufweitung* verwendet. Wie in einschlägigen Lehrbüchern der Optik, etwa [111], gezeigt wird, ist der Durchmesser eines Fokalspots gegeben als:

$$d_{\min} \approx 1,22\lambda \frac{f}{D}. \quad (3.2)$$

Dabei sind f die Brennweite und D der Durchmesser des Objektivs, bzw. Strahls. Gleichung (3.2) macht direkt deutlich, dass mit besserer Ausleuchtung (D steigt) das Fokusbild abnimmt (d_{\min} sinkt). Technisch wird eine Strahlaufweitung erreicht, indem zwei Linsen bzw. fokussierende Spiegel so angeordnet werden, dass ihre Brennpunkte übereinander liegen. Das Verhältnis der Aufweitung entspricht dann genau demjenigen der Brennweiten (vgl. Abbildung 3.4 c).

Die aktive Korrektur räumlicher Verzerrungen mit *adaptiven Spiegeln* geht vom Konzept der *Wellenfronten* aus. Dies sind die Orte gleicher Phase. Für eine ebene Welle

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (3.3)$$

3. Experimenteller Aufbau

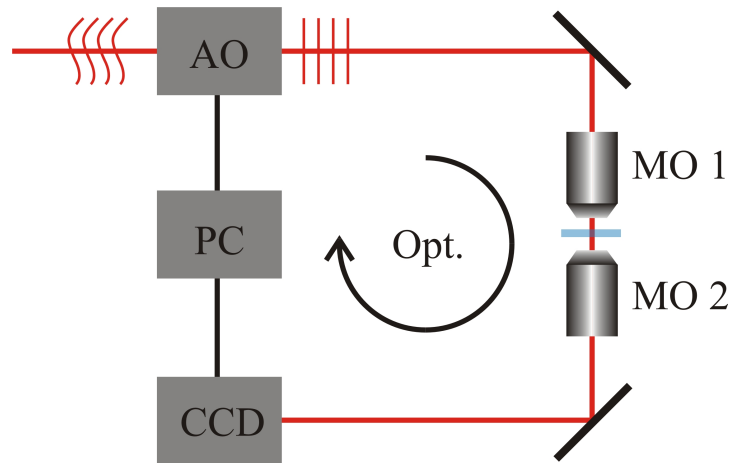


Abbildung 3.7.: Aufbau zur Optimierung des Fokusspots. Über einen adaptiven Spiegel (AO) wird der Strahl zum Mikroskop geführt und von einem Objektiv (MO 1) in die Probe fokussiert. Ein zweites Objektiv (MO 2) bildet den Spot auf den Chip einer Kamera (CCD) ab, welche von einem Computer (PC) mit der Software *BeamTuner* ausgelesen wird. Mittels des Algorithmus nach *Nelder und Mead* wird die optimale Korrekturphase gesucht.

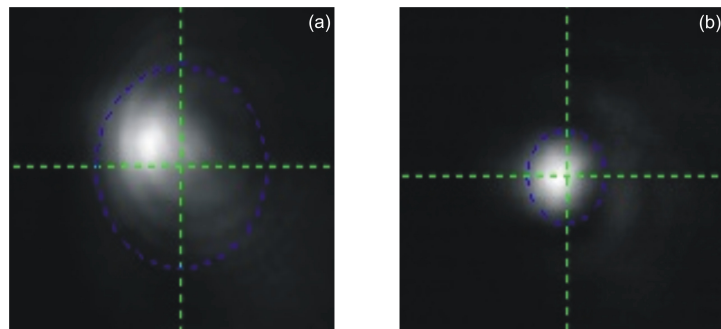


Abbildung 3.8.: Abbildung des Fokusspots zu Beginn (a) und Ende (b) der Optimierung mit dem adaptiven Optiksistem.

entspricht dies zu festen Zeiten geraden Linien, die senkrecht auf dem Wellenzahlvektor \vec{k} stehen. In realen abbildenden Systemen treten jedoch immer Abbildungsfehler, sogenannte *Aberrationen*, auf. Diese bewirken in dieser Betrachtungsweise Abweichungen von der idealen Form ebener Wellenfronten (vgl. Abbildung 3.4 d). Ein *adaptiver Spiegel* besteht nun aus einer dünnen, reflektiv beschichteten Membran, welche durch Aktuatoren verformt werden kann. Damit lassen sich Wellenfrontverformungen ausgleichen.[112, 113] Das klassische Anwendungsgebiet adaptiver Optiken ist die Astronomie, wo die Abbildungsqualität in Teleskopen erhöht wird, indem atmosphärische Wellenfrontverformungen ausgeglichen werden.[114] Hierzu wird mit einem Strahlteiler ein Teil des Abbildungsstrahls auf einen *Shack-Hartmann*-Wellenfrontsensor gelenkt und damit die notwendige Korrektur bestimmt. Für die Mikroskopie gibt es eine Möglichkeit, welche ohne einen Wellenfrontsensor auskommt, wie in Abbildung 3.7 gezeigt ist. Der Fokusspot im Mikroskop wird hierzu auf eine CCD-Kamera abgebildet. Eine kommerzielle Software (*Beamtuner* von *OKOTech*) bestimmt iterativ mittels eines *Downhill-Simplex-Verfahrens* [115] die optimale Form des adaptiven Spiegels, um einen möglichst kleinen Spot zu erhalten. Hierzu wird bei jeder Aufnahme der Kamera oberhalb einer gewissen Schwelle der Intensitätsschwerpunkt

$$\begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum_i I_i x_i / \sum_i I_i \\ \sum_i I_i y_i / \sum_i I_i \end{pmatrix}$$

berechnet und daraus der Spotradius wie folgt bestimmt:

$$r = \sqrt{\frac{\sum_i I_i ((x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2)}{\sum_i I_i}}. \quad (3.4)$$

Dieser Radius r wird dann gezielt minimiert. Das Ergebnis einer solchen Optimierung ist in Abbildung 3.8 gezeigt. In (a) ist der Spot zu Beginn der Optimierung zu sehen mit einer stark asymmetrischen Intensitätsverteilung, die in (b) korrigiert wurde. Das Single-Beam-CARS-Signal unterscheidet sich zwischen den beiden Einstellungen um einen Faktor von etwa zwei.

3.4. Mikroskop und Detektion

Der Aufbau für Mikroskop und Detektion entspricht der gängigen Technik der nichtlinearen optischen Mikroskopie. In einem modifizierten kommerziellen Mikroskop (Olympus BX-51) wird der Laserstrahl mit einem Objektiv mit 60-facher Vergrößerung und einer

3. Experimenteller Aufbau

numerischen Apertur $NA = 0,7$ in die Probe fokussiert und anschließend zusammen mit dem Signal mit einem weiteren Objektiv (40-fache Vergrößerung, $NA = 0,6$) kollimiert.

Die Probe kann mit einem Piezo-Tisch (NanoCube, PhysikInstrumente) in einem Bereich von $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ verschoben werden, was ein Abrastern der Probe ermöglicht.

Vor dem Detektor befindet sich ein Kurzpass-Interferenzfilter mit einer Cut-off-Wellenlänge von 680 nm bzw. 750 nm je nach Experiment. Die Detektion selbst wird mit einem Monochromator (Acton Research Company) und einer CCD-Kamera mit Verstärkung (Andor ICCD) erreicht.

4. Mikrospektroskopie

Nach der Behandlung der Grundlagen und des experimentellen Aufbaus für Single-Beam-CARS-Messungen werden in diesem Kapitel erstmals Messungen und neue Konzepte, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, behandelt. Zunächst wird als Beispiel für ein bekanntes Schema der Kontrolle der Anregung, eine b-Scan-Messung in Simulation und Experiment gezeigt.[69] Hierbei wurde mit dem Aufbau erstmals erfolgreich die CH-Streckschwingung von Acetonitril mit dieser Methode detektiert. Damit wurde der gesamte Fingerprintbereich für Single-Beam-CARS zugänglich gemacht.

Der Hauptteil des vorliegenden Kapitels behandelt die erstmalige Verwendung der *dual quadrature spectral interferometry*-Methode [116] für Single-Beam-CARS im Rahmen dieser Arbeit. Mit dieser ist eine Charakterisierung der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi^{(3)}(\Omega)$ in Betrag und Phase möglich, bei Verwendung einer reinen Phasenformung. Ein weiterer Vorteil ist die lineare Konzentrationsabhängigkeit, welche die Detektion kleiner Konzentrationen erlaubt.

Zum Abschluss des Kapitels wird untersucht, inwieweit unerwünschte Beiträge von Zweiphotonenfluoreszenz (2PEF) durch gezielte Phasenmanipulation unterdrückt, bzw. nachträglich eliminiert werden können. Diese Untersuchung ist gerade für biologische Proben wichtig, da die 2PEF hier oft das CARS-Signal überlagert.

4.1. Kontrolle der Anregung: b-Scan

Die erste Realisierung von Single-Beam-CARS-Spektroskopie basierte auf einer Anregung mit einem spektralen Feld mit sinusförmiger Phase, wie in Abschnitt 2.4.3 bereits dargestellt wurde [69, 71, 82, 83]:

$$\phi(\omega) = a \sin(b\omega + c). \quad (4.1)$$

Diese Phasenfunktion hat zur Folge, dass spektrale Komponenten mit dem Frequenzabstand

$$\Delta\omega = n \frac{2\pi}{b} \quad (4.2)$$

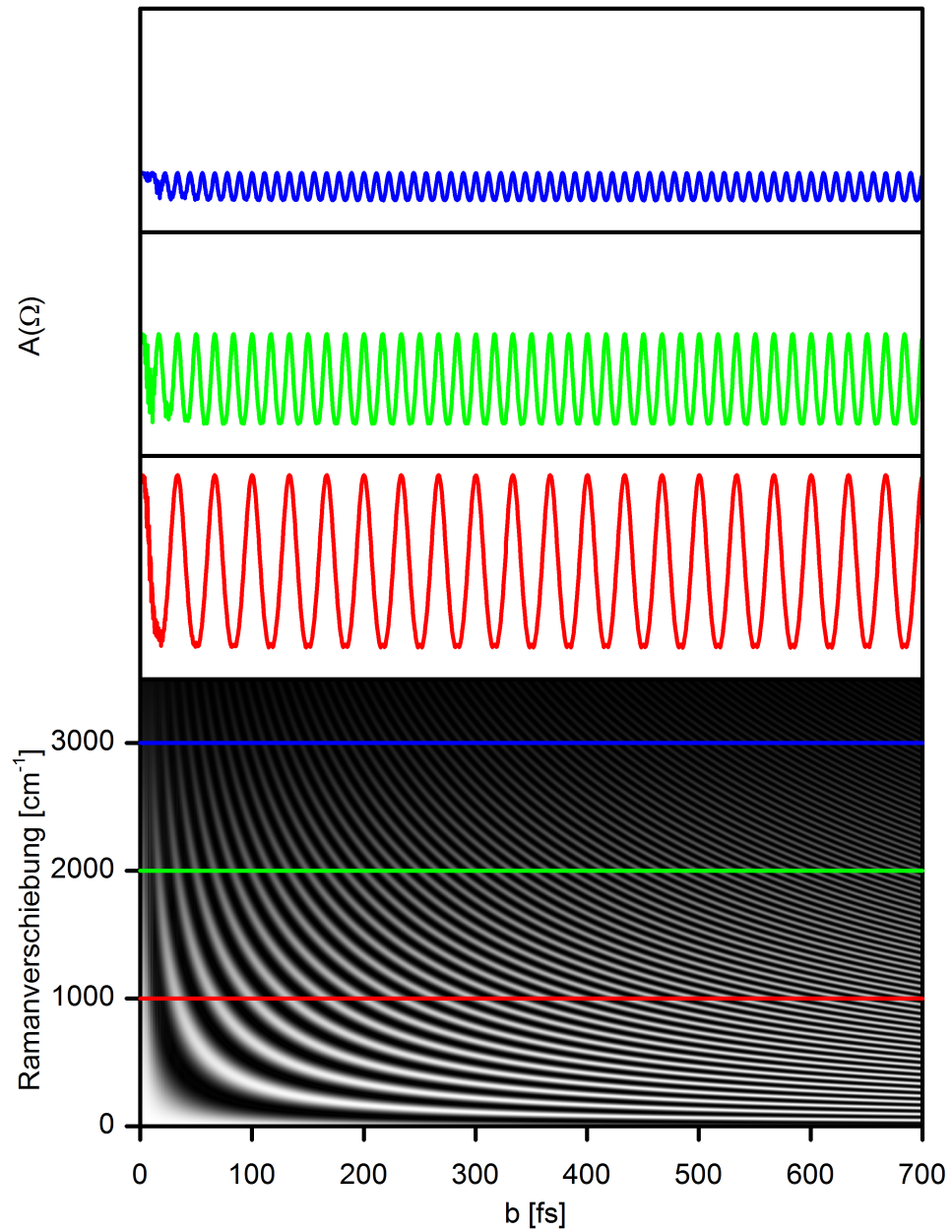


Abbildung 4.1.: Die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ in Abhängigkeit der Schwingungsfrequenz und des Parameters b . Die Maxima beschreiben gemäß der Bedingung $\Omega = n2\pi/b$ Hyperbeln. Die Längsschnitte zeigen, dass die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ mit der Frequenz Ω moduliert wird.

in Phase sind und der Ausdruck $E^*(\omega)E(\omega+\Delta\omega)$ stets die Phase null erhält. Die Beiträge zur Ramananregungswahrscheinlichkeit

$$A(\Omega) = \int E^*(\omega)E(\omega + \Omega)d\omega,$$

für die Gleichung (4.2) erfüllt ist, addieren sich also konstruktiv auf, womit die Anregung für die entsprechenden Frequenzen maximiert wird. Eine Simulation der Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ bei Anregung mit Phasenfunktionen nach Gleichung (4.1) für variierende Parameter b ist in Abbildung 4.1 gegeben. Die Maxima beschreiben entsprechend Gleichung (4.2) Hyperbeln. Exemplarisch sind die drei Frequenzen 1000cm^{-1} , 2000cm^{-1} und 3000cm^{-1} als Querschnitt dargestellt, welche einen periodischen Verlauf aufweisen. Die Periodendauer entspricht dabei genau derjenigen der zugehörigen Molekülschwingung.

Dieser Sachverhalt lässt sich für spektroskopische Zwecke nutzen. Wird der Parameter b in Gleichung (4.1) variiert, so ändert sich für jede Frequenz gemäß Abbildung 4.1 $A(\Omega)$ und damit auch die Molekülantwort $R(\Omega) = A(\Omega)\chi^{(3)}(\Omega)$ periodisch. Das resultierende CARS-Feld ist dann:

$$\begin{aligned} E_{\text{CARS}}(\omega, b) &= \int E(\omega - \Omega)A(\Omega, b)\chi^{(3)}(\Omega)d\Omega \\ &= \int E(\omega - \Omega)A(\Omega, b) \left(\chi_{NR} + \sum_k \frac{B_k}{\Omega - \Omega_{r,k} + i\Gamma_k} \right) d\Omega \\ &= \int E(\omega - \Omega)A(\Omega, b)\chi_{nr}d\Omega + \sum_k \int \frac{E(\omega - \Omega)A(\Omega, b)B_k}{\Omega - \Omega_{r,k} + i\Gamma_k} d\Omega. \end{aligned} \quad (4.3)$$

Es wird entsprechend der spektralen Anteile von $\chi^{(3)}$ moduliert, wobei zu beachten ist, dass resonante Beiträge zum Signal lediglich nahe der Frequenzen $\Omega_{r,k}$ vorhanden sind. Diese Beiträge weisen entsprechend Abbildung 4.1 einen periodischen Verlauf auf und überlagern sich zum Gesamtsignal. Durch eine Fourieranalyse lassen sich die Schwingungsfrequenzen dann extrahieren.[69]

Zur Illustration ist in Abbildung 4.2 eine Simulation gezeigt, bei der eine Suszeptibilität $\chi(3)$ angenommen wurde, die in (a) zu sehen ist. Als Anregungsspektrum wurde das gemessene Laserspektrum verwendet, das in (b) zusammen mit einer beispielhaften sinusförmigen Phasenfunktion gezeigt ist. In der Simulation wurde jetzt der Parameter b aus Gleichung (4.1) variiert und das CARS-Feld nach Gleichung (2.50) berechnet¹. Es wurde das Betragsquadrat gebildet, um die messbare Intensität zu erhalten. Der Bereich

¹Siehe hierzu Anhang B.

4. Mikrospektroskopie

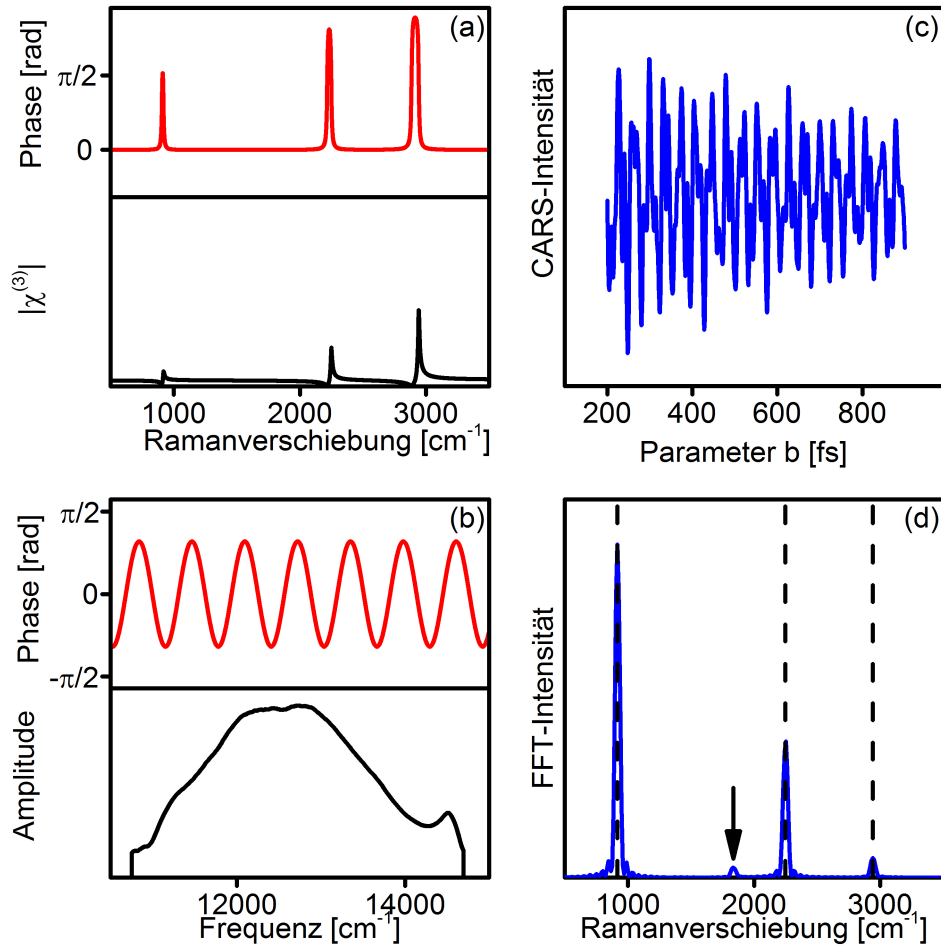


Abbildung 4.2.: Simulation der Mikrospektroskopie mit dem b-Scan-Schema. In (a) ist die angenommene Suszeptibilität $\chi^{(3)}$ zu sehen und in (b) das Anregungsspektrum mit einer exemplarischen Sinusphase. Der simulierte b-Scan ist in Abbildung (c) gezeigt und die Fouriertransformation davon in (d). Die gestrichelten Linien zeigen die Positionen der gewählten Resonanzfrequenzen aus (a), während der Pfeil bei 1836cm^{-1} eine Oberschwingung der niederfrequenten Linie bei 918cm^{-1} zeigt.

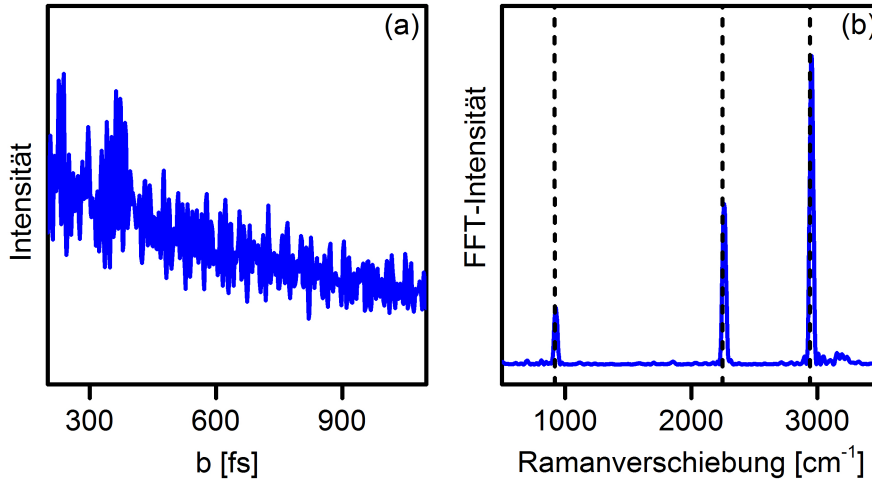


Abbildung 4.3.: Experimentelle Demonstration der Mikrospektroskopie an Acetonitril.

(a) *b*-Scan. (b) Fouriertransformierte. Die gestrichelten vertikalen Linien zeigen die Ramanbanden von Acetonitril laut NIST.

von 15000cm^{-1} bis 18000cm^{-1} wurde integriert und für jeden Wert von b aufgetragen (c). Von dem Signal in (c) wurde dann eine Polynomannpassung dritter Ordnung subtrahiert und eine Fouriertransformation durchgeführt. Das Ergebnis hiervon ist in (d) zu sehen: es werden die Linien reproduziert, welche für die Suszeptibilität angenommen wurden. Allerdings zeigt sich, dass die Verhältnisse nicht übereinstimmen. Dies ist auf die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ zurückzuführen, welche zu höheren Frequenzen abnimmt. Ferner fällt eine kleine Linie bei 1836cm^{-1} auf, die sich als Oberschwingung zu der Linie bei 918cm^{-1} erklären lässt, da es sich bei den periodischen Modulationen im *b*-Scan (Abbildung 4.2 c) nicht um reine Sinusschwingungen handelt.

Zuletzt ist in Abbildung 4.3 eine experimentelle Demonstration für Acetonitril gezeigt. Die Ergebnisse der Simulation werden klar reproduziert. Die Linien, die durch die Fouriertransformation erhalten werden, stimmen exakt mit den Werten aus der Datenbank des *National Institute for Standards and technology (NIST)*² überein. Die Linie bei 2942cm^{-1} ist deutlich zu sehen, was den großen Bereich zur Anregung im experimentellen Aufbau belegt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass der *b*-Scan eine aussagekräftige Spektroskopiemethode darstellt, bei der die Auflösung der erhaltenen Spektren die Bandbreite des anregenden Laserfeldes um einen Faktor von über 100 übersteigt (Linienbreite ca.

²<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C75058&Mask=800#Electronic-Spec>

4. Mikrospektroskopie

20cm⁻¹ im Vergleich zu über 3000cm⁻¹ Bandbreite des Laserfeldes). Der große Spektralbereich, der mit einem einzigen Laserimpuls hier erreicht wurde ist ein großer Fortschritt gegenüber früheren Arbeiten.[69–71, 82] In [86] und [87] wurde ebenfalls von einem Single-Beam-CARS-Experiment berichtet, mit welchem CH-Schwingungen detektiert werden können. Dort wird zwar auch ein Impulsformer verwendet, allerdings nur zur Phasenkorrektur des Anregungsimpulses. Die Erzeugung der, für die Single-Beam-CARS-Spektroskopie notwendigen, Doppelimpulse erfolgt dann mit einem Michelson-Interferometer.

Das in dieser Arbeit beschriebene Experiment hingegen kommt mit passiven Elementen, wie den geschliffenen Spiegeln, und dem Impulsformer aus.

4.2. Multiplexing

Die zweite Methode, um aus Single-Beam-CARS-Spektren Information zu gewinnen ist das *Multiplexing*. Generell bedeutet dies, dass Molekülschwingungen über einen bestimmten spektralen Bereich mit einer einzigen Messung aufgenommen werden. Im Single-Beam-CARS wird dies erreicht, indem alle Resonanzen innerhalb der Laserbandbreite angeregt werden und die Phase des Anregungsfeldes derart modifiziert wird, dass diese im CARS-Spektrum sichtbar werden. Typischerweise wird dazu ein kleiner Bereich, im Folgenden *Gate* genannt, im Anregungsspektrum eingeführt, der sich in Phase und/oder Amplitude vom Rest unterscheidet. Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die Funktionsweise und Anwendung dieser Methode.

4.2.1. Heterodyne Detektion

Grundlage aller Multiplex-Konzepte im Single-Beam-CARS ist die sogenannte *heterodyne Detektion*³, was bedeutet, dass das eigentliche Signal mit einem externen zu ihm kohärenten Feld überlagert wird.[77, 78, 117–119] Dieses Feld wird *lokaler Oszillator* genannt und hat dieselbe Frequenz wie das Signal. Im Gegensatz dazu wird eine untergrundfreie Detektion, also in einem Frequenzbereich, in dem es kein Anregungs- oder sonstiges kohärentes Feld gibt, als *homodyne Detektion* bezeichnet. So ist das herkömmliche CARS-Experiment ein Beispiel für eine Messung mit homodyner Detektion, während SRS etwa eine heterodyne Methode darstellt.

³Je nach Fachgebiet sind die Begriffe *heterodyn* und *homodyn* unterschiedlich belegt, in dieser Arbeit wird die für die nichtlineare Mikroskopie übliche Nomenklatur verwendet.

Die Detektion der Überlagerung von lokalem Oszillatorfeld $E_{LO}(\omega)$ und CARS-Signalfeld $E_{Sig}(\omega)$ wird mit folgender Gleichung ausgedrückt:

$$\begin{aligned} S(\omega) &= |E_{LO}(\omega) + E_{Sig}(\omega)|^2 \\ &= |E_{LO}(\omega)|^2 + |E_{Sig}(\omega)|^2 + 2\text{Re}\{E_{LO}^*(\omega)E_{Sig}(\omega)\} \end{aligned} \quad (4.4)$$

$$\begin{aligned} &= |E_{LO}(\omega)|^2 + |E_{Sig}(\omega)|^2 \\ &\quad + 2|E_{LO}(\omega)E_{Sig}(\omega)| \cos(\phi_{Sig}(\omega) - \phi_{LO}(\omega)). \end{aligned} \quad (4.5)$$

Der lokale Oszillator ist üblicherweise um Größenordnungen stärker als das CARS-Signalfeld, wodurch der letzte Term eine große Verstärkung um den Faktor $2|E_{LO}(\omega)|$ des zu messenden Signals $|E_{Sig}(\omega)|$ bewirkt. Daher kann der Term $|E_{Sig}(\omega)|^2$ normalerweise vernachlässigt werden. Der lokale Oszillator bildet also einen konstanten Untergrund, auf welchem das CARS-Signalfeld moduliert wird. Üblicherweise ist dies hinsichtlich des Dynamikbereiches des Detektors von Belang, da unter Umständen kleine Signaländerungen auf einem großen Untergrund detektiert werden müssen. In den Messungen zeigte sich jedoch, dass die Änderungen der Intensität bei ca. 5% liegen, was mit einer CCD-Kamera problemlos detektiert werden kann.

Der interessanteste Term in Gleichung (4.5) ist der letzte, an dem zum einen die zuvor erwähnte Verstärkung deutlich wird und zum anderen die Phasenbeziehung

$$\cos(\phi_{Sig}(\omega) - \phi_{LO}(\omega)).$$

Diese kann ausgenutzt werden, um das Signalfeld in Amplitude und Phase zu bestimmen, was bereits in erweiterten Narrowband-CARS-Experimenten demonstriert wurde.[120–123] Im Folgenden wird gezeigt, wie ein lokales Oszillatorfeld ohne großen Aufwand in einem Single-Beam-CARS-Experiment erhalten wird.

4.2.2. Phasengate

In diesem Abschnitt soll nun behandelt werden, wie eine heterodyne Detektion erreicht wird. Der lokale Oszillator, wie er in dieser Methode erzeugt wird, wird in der Literatur häufig etwas unpräzise als *nichtresonanter Untergrund* bezeichnet.[72, 74, 96] Tatsächlich erhält man durch die Abfrage mit einem breitbandigen Feld jedoch an jedem Punkt des CARS-Spektrums ein Integral über die Suszeptibilität über einen großen spektralen Bereich. Darin sind jedoch auch resonante Anteile enthalten, so dass der Begriff nicht-resonanter Untergrund irreführend ist.

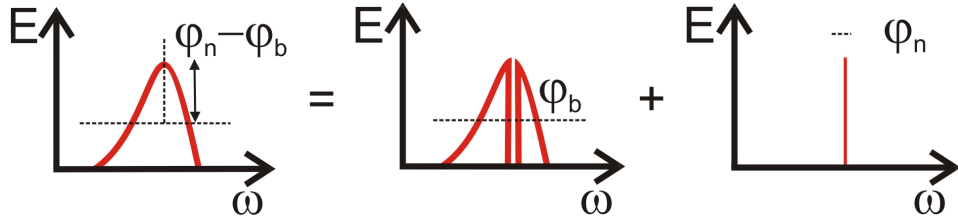


Abbildung 4.4.: Anregungsfeld beim Multiplexing. In einem schmalen Bereich (Gate) wird eine andere Phase als im Rest des Spektrums angelegt. Das Anregungsfeld kann dann als Überlagerung eines breit- und eines schmalbandigen Impulses angesehen werden.

Der lokale Oszillator kann als unspezifisches CARS-Signal aufgefasst werden. Der Begriff *unspezifisch* ist hierbei auf Information bezüglich der Suszeptibilität des untersuchten Moleküls bezogen. Das entstehende Signal ist nach Gleichung (2.50) wohldefiniert und kohärent zum Anregungsfeld. Dies lässt sich dann zum Vorteil ausnutzen, wenn ein schmalbandiges Phasengate eingeführt wird. Gemeint ist damit ein Bereich von wenigen Pixeln der Maske des Impulsformers, in dem die Phase auf einen konstanten Wert gesetzt wird, der sich von demjenigen im Rest des Spektrums unterscheidet. In Abbildung 4.4 ist illustriert, dass dies als Überlagerung zweier Anregungsfelder betrachtet werden kann: einem breitbandigen mit einer Lücke und einem schmalbandigen mit verschobener Phase, welches diese Lücke füllt. Im idealisierten Fall wird der schmalbandige Anteil als δ -Funktion beschrieben und das Anregungsfeld wie folgt ausgedrückt:

$$E(\omega) = E_b(\omega) + E_n e^{i\phi_n} \delta(\omega - \omega_n).$$

Setzt man dies in Gleichung (2.50) ein, so erhält man:

$$\begin{aligned} E_{\text{CARS}}(\omega) &= \int_0^\infty E(\omega - \Omega) A(\Omega) \chi^{(3)}(\Omega) d\Omega \\ &= \int_0^\infty E_b(\omega - \Omega) A(\Omega) \chi^{(3)}(\Omega) d\Omega \\ &\quad + \int_0^\infty E_n e^{i\phi_n} \delta(\omega - \omega_n - \Omega) A(\Omega) \chi^{(3)}(\Omega) d\Omega \\ &= \underbrace{\int_0^\infty E_b(\omega - \Omega) A(\Omega) \chi^{(3)}(\Omega) d\Omega}_{E_{\text{LO}}(\omega)} \\ &\quad + \underbrace{E_n e^{i\phi_n} A(\omega - \omega_n) \chi^{(3)}(\omega - \omega_n)}_{E_{\text{Sig}}(\omega)}. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Es ergibt sich also die Überlagerung eines Signalfeldes $E_{Sig}(\omega)$, welches die Information $\chi^{(3)}(\omega - \omega_n)$ trägt, mit einem starken lokalen Oszillator $E_{LO}(\omega)$, womit Gleichung (4.5) angewandt werden kann. Die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ kann dabei als unverändert im Vergleich zu einem transformlimitierten Impuls angesehen werden (vgl. Abschnitt 2.4.3).

Die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet haben den lokalen Oszillator bislang stark vereinfachend als rein reellen Größe betrachtet.[72, 74, 96] Dass diese Annahme nicht immer zutreffend ist, wird an Abbildung 4.5 deutlich. Es wurde die Phase des lokalen Oszillators in Abhängigkeit der Stärke des nichtresonanten Anteils χ_{nr} simuliert. Dabei wurde das experimentelle Laserspektrum verwendet, bei dem ein Bereich von 14000cm^{-1} bis 14010cm^{-1} auf null gesetzt wurde, um die Lücke zu simulieren, die durch das Phasengate hervorgerufen wird. Da die Molekülantwort $R(\Omega)$ in die Phase des lokalen Oszillatorfeldes

$$E_{LO}(\omega) = \int_0^\infty E_b(\omega - \Omega)R(\Omega)d\Omega$$

eingeht, ändert sich letztere mit der Frequenz ω . Besonders an den Stellen, an denen die Resonanzen vom höherfrequenten Rand des Anregungsspektrums aus betrachtet auftreten, sind deutliche Phasenänderungen zu verzeichnen. Ferner treten von der Lücke aus betrachtet um die Schwingungsfrequenzen verschobene Phasenänderungen auf. Dieser Effekt wird in Abschnitt 5.2.2 nochmals näher behandelt. Mit zunehmendem nichtresonantem Untergrund der Suszeptibilität $\chi^{(3)}(\Omega)$ fällt dieser Effekt zwar weniger ins Gewicht, bleibt aber dennoch soweit erhalten, dass die Annahme des lokalen Oszillators als rein reelle Größe nicht gerechtfertigt ist. Im folgenden Abschnitt wird ein Verfahren vorgestellt, welches ohne Annahmen über die Phase des lokalen Oszillators auskommt.

4.2.3. Dual quadrature spectral interferometry (DQSI) für CARS

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Einführung eines Phasengates die Überlagerung eines Signalfeldes mit einem lokalen Oszillator bewirkt. Nach Gleichung (4.5) wird die Signalamplitude mit $\cos(\phi_{Sig}(\omega) - \phi_{LO}(\omega))$ multipliziert. Zur Bestimmung der Signalfeldamplitude fehlt demnach die Information über die Phasen $\phi_{Sig}(\omega)$ und $\phi_{LO}(\omega)$ von Signalfeld bzw. lokalem Oszillator. Gleichung (4.6) zeigt aber, dass das Signalfeld $E_{Sig}(\omega)$ mit dem Term $e^{i\phi_n}$ multipliziert wird, wobei ϕ_n die Phase ist, welche am Gate angelegt wird. Das bedeutet, dass unabhängig von der ursprünglichen Phase $\phi_{Sig,0}(\omega)$ eine Phasenverschiebung um ϕ_n erfolgt:

$$\phi_{Sig}(\omega) = \phi_{Sig,0}(\omega) + \phi_n.$$

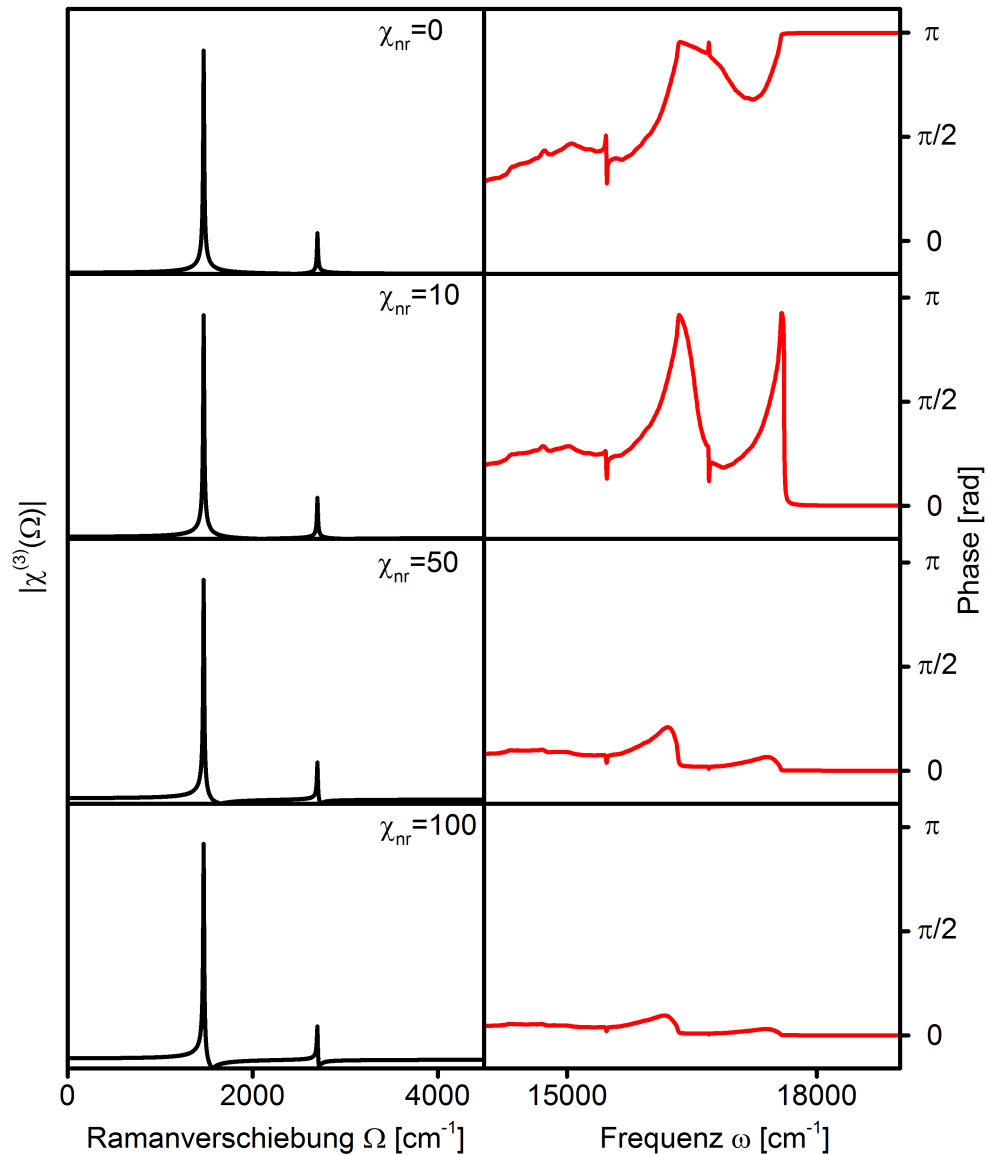


Abbildung 4.5.: Abhängigkeit der Phase des lokalen Oszillators (rechts) von der Stärke des nichtresonanten Untergrunds der Suszeptibilität (links). Die Annahme des lokalen Oszillators als reale Größe ist nur bei großen nichtresonanten Beiträgen gerechtfertigt, hier etwa bei $\chi_{nr} = 100$.

Damit lässt sich die Phase des Signalfeldes beliebig verschieben, lediglich die Anfangsphasen $\phi_{Sig,0}(\omega)$ und $\phi_{LO}(\omega)$ sind unbekannt.[124]

Die Problemstellung, Amplitude und Anfangsphase einer sinusförmigen Funktion zu ermitteln, wurde bereits für das Konzept *Dual Quadrature Spectral Interferometry (DQSI)* gelöst.[116] Die Grundidee ist, vier Phasen anzulegen, die einen Abstand von jeweils $\pi/2$ zueinander aufweisen. Damit wird der Verlauf der Phasenabhängigkeit des Signals teilweise abgetastet. Durch Einsetzen lässt sich leicht überprüfen, dass folgende Beziehungen gelten:

$$|E_{Sig}(\omega)| \propto \frac{1}{4 |E_{LO}(\omega)|} \left((S(\omega)_{\phi_n=0} - S(\omega)_{\phi_n=\pi})^2 + (S(\omega)_{\phi_n=\pi/2} - S(\omega)_{\phi_n=-\pi/2})^2 \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (4.7)$$

$$\phi_{Sig,0}(\omega) - \phi_{LO}(\omega) = \arctan \left(\frac{S(\omega)_{\phi_n=\pi/2} - S(\omega)_{\phi_n=-\pi/2}}{S(\omega)_{\phi_n=0} - S(\omega)_{\phi_n=\pi}} \right). \quad (4.8)$$

Da $E_{Sig}(\omega) \ll E_{LO}(\omega)$ gilt, wird für die Berechnung von $E_{Sig}(\omega)$ in Gleichung (4.7) statt $|E_{LO}(\omega)|$ näherungsweise $\sqrt{S(\omega)_{\phi_n=0}}$ verwendet. Die Wirkungsweise dieser Berechnung ist in Abbildung 4.6 illustriert. In (a) ist das Anregungsspektrum gezeigt, aufgeteilt in schmal- und breitbandigen Anteil. Teilabbildung (b) zeigt den entstehenden lokalen Oszillator und das Signalfeld, während in (c) die vier Single-Beam-CARS-Signale gezeigt sind, welche in den Gleichungen (4.7) und (4.8) zur Berechnung verwendet werden. Teilabbildung (d) zeigt das erhaltene Signalfeld in Amplitude und Phase.

Das erhaltene Signal $E_{Sig}(\omega)$ entspricht genau demjenigen aus herkömmlichen Multiplex-CARS-Messungen. Eine beispielhafte Messung an Toluol ist in Abbildung 4.7 gezeigt. Das erhaltene CARS-Spektrum gleicht, abgesehen von Unterschieden in der Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$, demjenigen, das mit einem herkömmlichen Multiplex-CARS-Aufbau [12] gemessen wurde. Eine Imaginärteilextraktion mit der *Maximum-Entropy-Methode (MEM)*[68] liefert ein Spektrum, wie es bei der spontanen Ramanmikroskopie erhalten wird.

Die Methode der *DQSI* in Kombination mit Single-Beam-CARS-Messungen ist allerdings noch wirkungsvoller, wenn auch die Phasenextraktion nach Gleichung (4.8) verwendet wird. Eine Imaginärteilextraktion mit MEM wird damit überflüssig. In Abbildung 4.8 (a) ist das Ergebnis einer Messung mit anschließender Berechnung von Amplitude und Phase nach den Gleichungen (4.7) bzw. (4.8) gezeigt.

Das Ergebnis offenbart bereits ein hohes Maß an Information, allerdings fällt auf, dass die Amplitude für niedrigere Frequenzen eine deutlich stärkere Gewichtung als für höhere

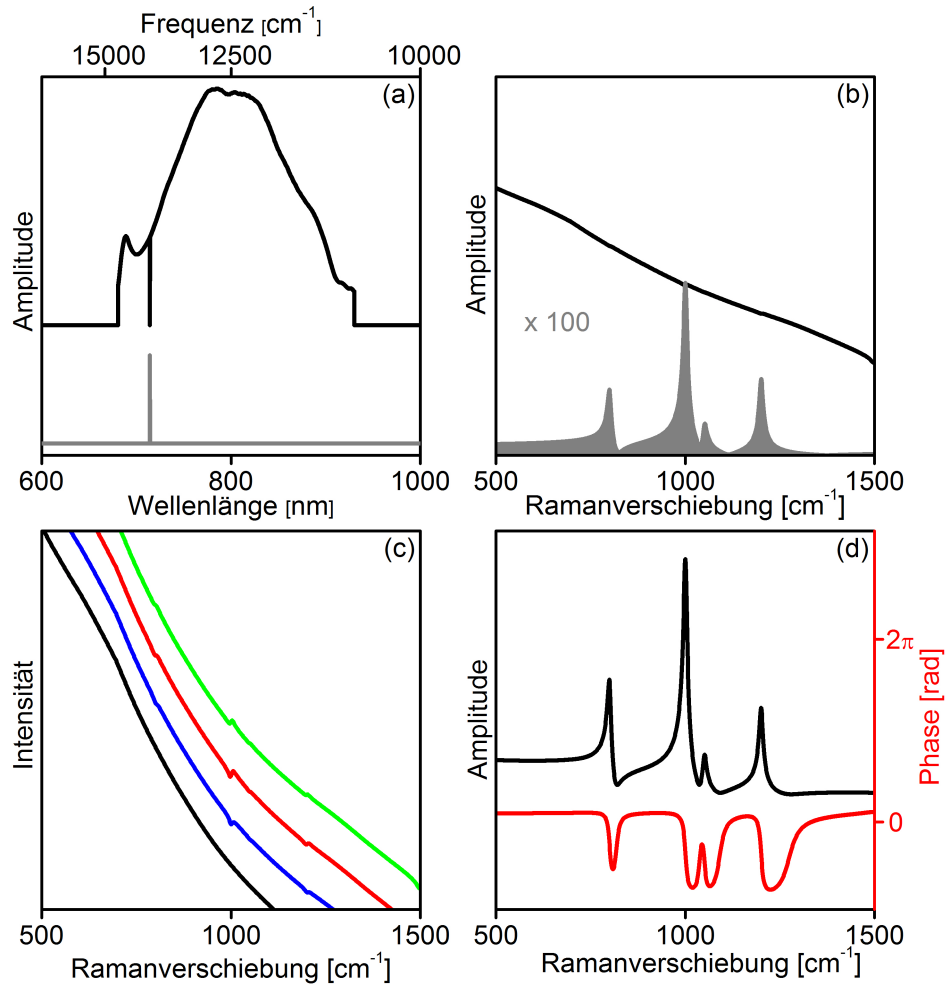


Abbildung 4.6.: Simulation des DQSI-Schemas. (a) Anregungsfeld mit breitbandigem Anteil (schwarz, oben) und Gate (hellgrau, unten). (b) Die erzeugten CARS-Spektren wirken als lokaler Oszillator (schwarz, oben) und Signalfeld (hellgrau, unten). Das simulierte Signalfeld ist um einen Faktor 100 vergrößert. (c) Die vier messbaren CARS-Spektren (vertikal verschoben) für $\phi_g = 0$ (schwarz, unten), $\phi_g = \pi/2$ (blau, zweite von unten), $\phi_g = \pi$ (rot, zweite von oben) und $\phi_g = -\pi/2$ (grün, oben) weisen Peaks und Dips auf, die um die jeweilige Resonanzfrequenz vom Gate aus verschoben sind. (d) Die DQSI-Operation liefert Betrag (schwarz, oben) und Phasendifferenz (rot, unten) des Signalfeldes zum lokalen Oszillatorfeld.

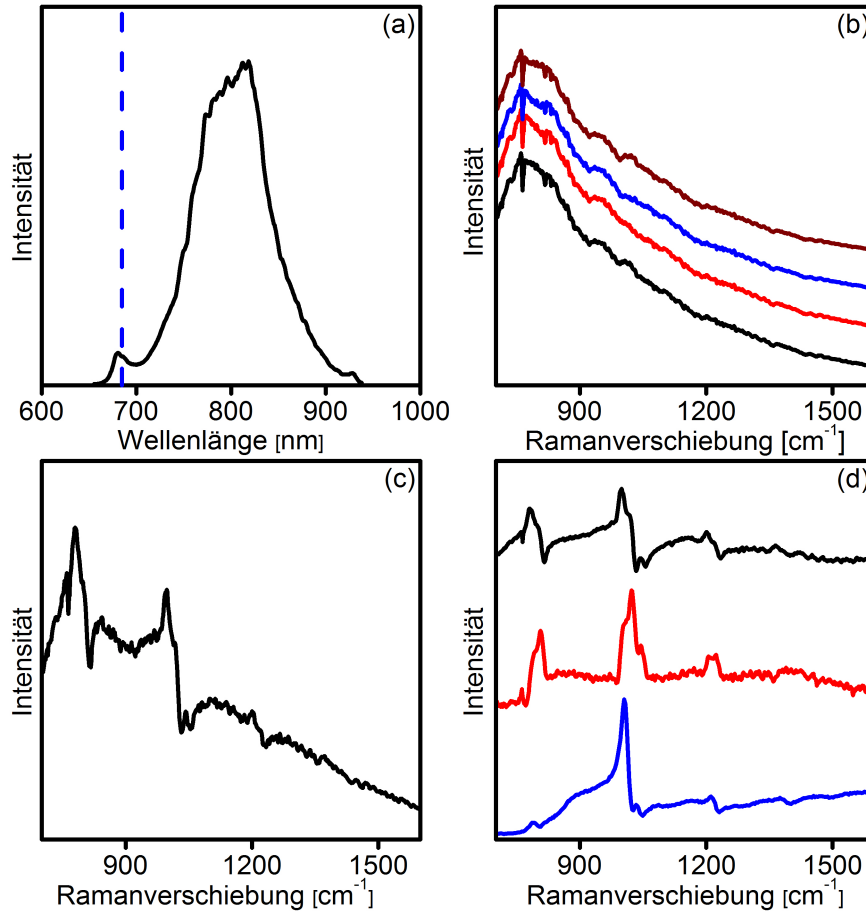


Abbildung 4.7.: DQSI-Messung an Toluol. (a) Anregungsspektrum mit einem Gate von zwei Pixeln bei 760nm (gestrichelte vertikale Linie). (b) Vier gemessene Single-Beam-CARS-Spektren (vertikal verschoben) für die DQSI-Operation für $\phi_g = 0$ (schwarz, unten), $\phi_g = \pi/2$ (rot, zweite von unten), $\phi_g = \pi$ (blau, zweite von oben) und $\phi_g = -\pi/2$ (braun, oben). (c) Extrahiertes Signalfeld $|E_{Sig}(\omega)E_{LO}(\omega)|$, welches noch mit dem lokalen Oszillator gewichtet ist. (d) Korrigierte Signalfeldintensität nach Gleichung (4.7) (schwarz, oben), mit MEM extrahierter Imaginärteil (rot, mitte), Vergleichsmessung mit einem konventionellen Multiplex-CARS-Aufbau (blau, unten).

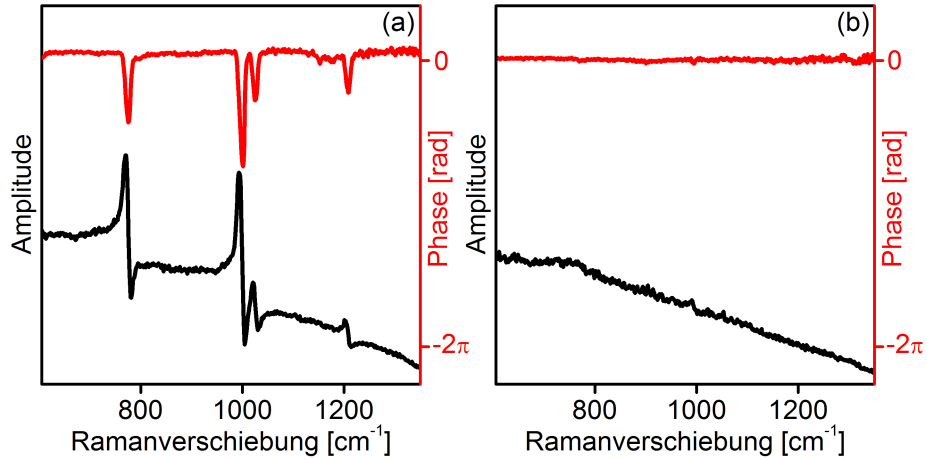


Abbildung 4.8.: Amplituden- und Phasenberechnung nach den Gleichungen (4.7) bzw. (4.8) für DQSI-Messungen an Toluol (a) und Deckglas (b).

aufweist. Die stärkere Gewichtung der niedrigen Frequenzen liegt an der höheren Ramananregungswahrscheinlichkeit in diesem Bereich. Eine Möglichkeit zur Kompensation dieses Effektes, ist eine Referenzmessung in einer nichtresonanten Probe durchzuführen. Dabei kann von einer konstanten, rein reellen Suszeptibilität $\chi_{nr}^{(3)}$ ausgegangen werden. Es ist hierzu ein Material notwendig, das im betrachteten Bereich keine Schwingungsresonanzen und ferner eine möglichst geringe Absorption aufweist. Ein geeignetes Material hierfür ist Glas. Die Referenzmessung kann im gleichen experimentellen Aufbau ohne großen Aufwand realisiert werden, indem der Anregungsstrahl in das Deckglas einer Küvette fokussiert wird. In Abbildung 4.8 ist die Auswertung der Gleichungen (4.7) und (4.8) einmal für Toluol (a) und das Deckglas (b) gegeben. Geht man von einer rein nichtresonanten, konstanten und reellen Suszeptibilität $\chi_{nr}^{(3)}$ im Deckglas aus, so gilt für das Signalfeld $E_{Sig,G}(\omega)$ nach Gleichung (4.6):

$$E_{Sig,G}(\omega) = E_n A(\omega - \omega_n) \chi_{nr}^{(3)}. \quad (4.9)$$

Das bedeutet der Amplituden- und Phasenverlauf von $E_{Sig,G}(\omega)$ spiegelt denjenigen der Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\omega - \omega_n)$ wider.

Mit der Annahme $\chi_{nr} = \text{konst.}$ ist eine Korrektur des Signalfeldes für Toluol möglich, indem die nach der DQSI-Operation erhaltenen komplexen Signalfelder für Toluol und Glas dividiert werden:

$$\frac{E_{Sig,Tol}}{E_{Sig,G}} = \frac{E_n A(\omega - \omega_n) \chi_{Tol}^{(3)}(\omega - \omega_n)}{E_n A(\omega - \omega_n) \chi_{nr}^{(3)}} \propto \chi_{Tol}^{(3)}(\omega - \omega_n). \quad (4.10)$$

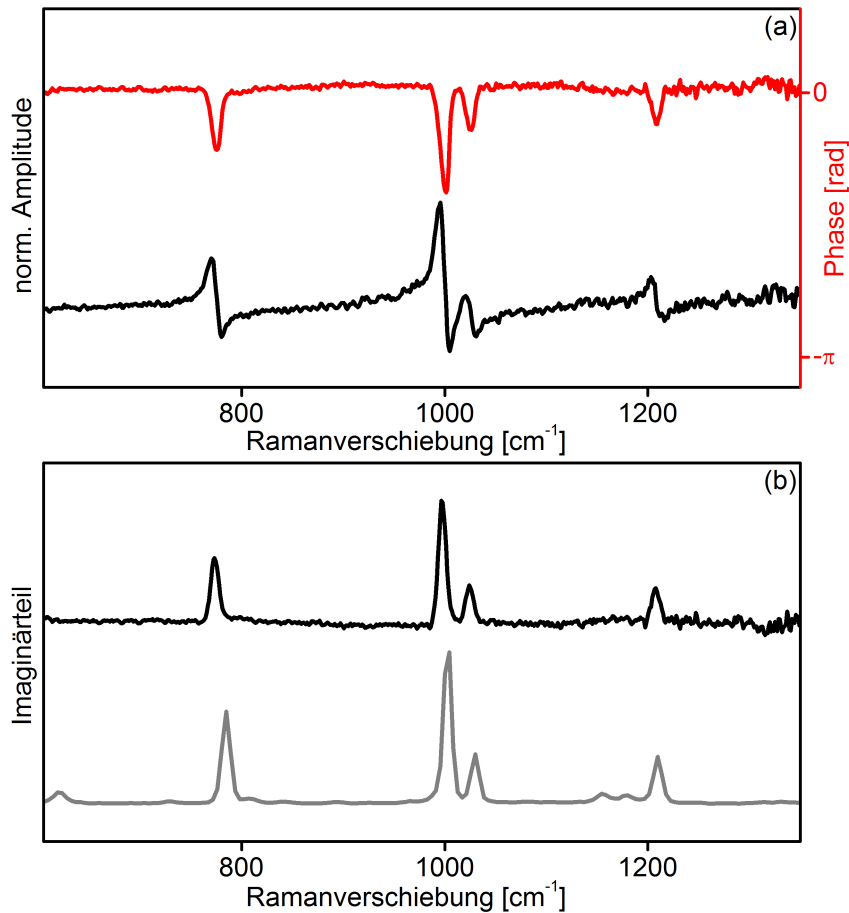


Abbildung 4.9.: Extraktion von Ramanspektren aus Single-Beam-CARS-Messungen. (a) Korrigierte DQSI-Messung an Toluol nach Gleichung (4.10) in Betrag (unten, schwarz) und Phase (oben, rot). In (b) ist der aus den Daten in (a) berechnete Imaginärteil (schwarz, oben) und ein gemessenes spontanes Ramanspektrum von Toluol (hellgrau, unten) gezeigt.

4. Mikrospektroskopie

Die vorstehende Gleichung (4.10) stellt eine Näherung dar, weil sie davon ausgeht, dass der lokale Oszillator für Toluol identisch zu dem für Glas ist, was genau genommen nicht zutrifft, da die Phase der Suszeptibilität von Toluol in die Phase des lokalen Oszillators eingeht. Dieser Effekt wurde im vorhergehenden Abschnitt 4.2.2 diskutiert. Das bedeutet, dass die Phasenkorrektur nach Gleichung (4.10) nur gültig ist, wenn von einem rein realen lokalen Oszillator ausgegangen werden kann. Dies ist nur der Fall, wenn das betrachtete Molekül einen ausreichend großen nichtresonanten Untergrund aufweist (vgl. Abbildung 4.5). Dabei ist anzumerken, dass ansonsten nur Phasenfehler korrigiert werden, welche in einem unzureichend korrigierten Anregungsimpuls begründet sind. In Abbildung 4.8 (a) ist jedoch zu erkennen, dass die Phase für Toluol außer bei den Resonanzen praktisch bei null liegt.

Die Korrektur für Toluol funktioniert sehr gut, wie Abbildung 4.9 zeigt. In (a) ist das nach Gleichung (4.10) normierte Signal dargestellt. Im Amplitudenverlauf fällt auf, dass die Verhältnisse der Linien zueinander verändert sind. So ist etwa die Linie unterhalb von 800cm^{-1} nun schwächer als diejenige bei etwa 1000cm^{-1} , was in Abbildung 4.8 noch umgekehrt war. Außerdem ist der Verlauf insgesamt flacher.

In Teilabbildung 4.9 (b) ist der berechnete Imaginärteil aus den Daten in (a) gezeigt. Zum Vergleich ist ein gemessenes spontanes Ramanspektrum aufgetragen, welches mittels eines kommerziellen Ramanmikroskops (Witec Alpha) gemessen wurde. Die Positionen und insbesondere die relativen Intensitäten der Linien stimmen hervorragend überein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Gleichung (4.7) ist, dass das erhaltene Signal proportional zum Betrag des Feldes $|E_{Sig}(\omega)|$ selbst und nicht zu dessen Intensität ist. Der Betrag des Feldes wiederum ist zur Anzahl N der Ramanstreuer proportional. Aus diesem Grund ist das erhaltene Signal dann ebenfalls von N abhängig und nicht von N^2 wie herkömmliche CARS-Signale, was für die Detektion bei niedrigen Konzentrationen von Vorteil ist. Um diesen Sachverhalt experimentell zu verifizieren, wurde eine Verdünnungsreihe von Acetonitril in Wasser hergestellt und Betrag und Phase des Signalfeldes $E_{Sig}(\omega)$ wie zuvor beschrieben bestimmt (siehe Abbildung 4.10). Da Acetonitril einen schwachen nichtresonanten Untergrund besitzt, ist die Korrektur der Phase nicht so einfach möglich wie zuvor bei Toluol. Als Maß für die Signalstärke wird die Differenz von Peak zu Dip bei der Linie um 2942 cm^{-1} verwendet, wie in Abbildung 4.10 (g) exemplarisch eingezeichnet ist. Die Differenz wurde dann in Abbildung 4.11 doppelt logarithmisch aufgetragen und linear interpoliert. Die erhaltene Steigung von $m = 1, 13 \pm 0, 12$ entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit der erwarteten linearen Abhängigkeit. Eine

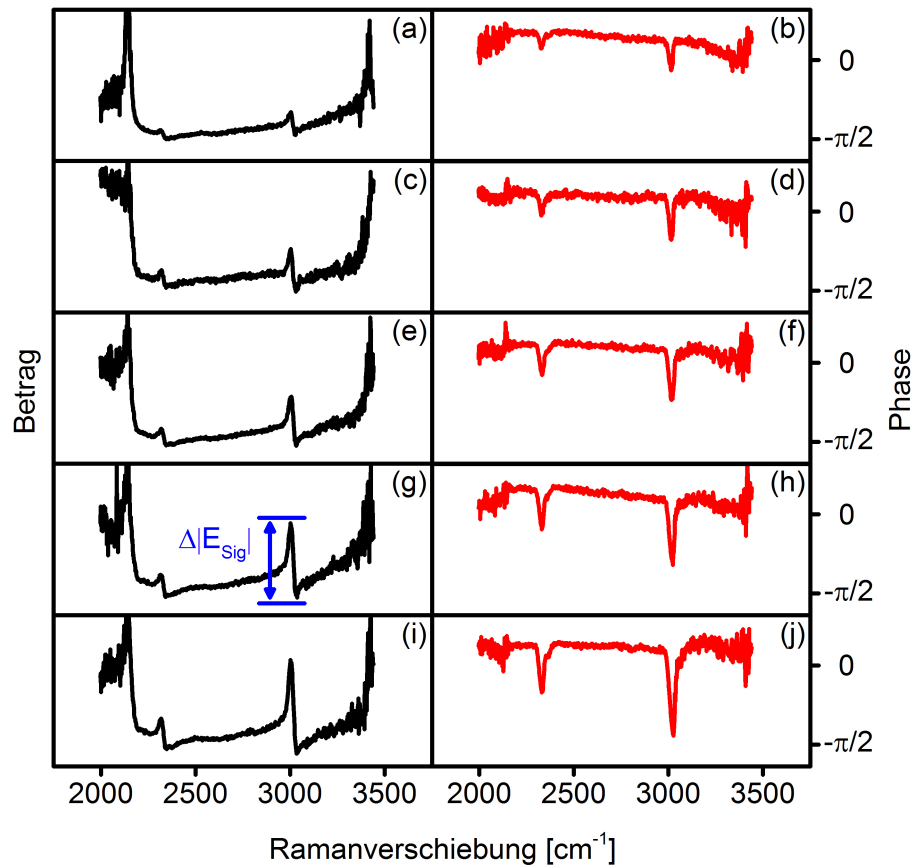


Abbildung 4.10.: Verdünnungsreihe Acetonitril. (a), (c), (e), (g), (i) DQSI-Amplituden für Acetonitril nach Gleichung (4.7) für 20, 30, 40, 50 bzw. 70 % Vol. (b), (d), (f), (h), (j): DQSI-Phasen nach Gleichung (4.8) zu den entsprechenden Verdünnungen. In (g) ist exemplarisch eingezeichnet wie die Signalstärke ermittelt wurde.

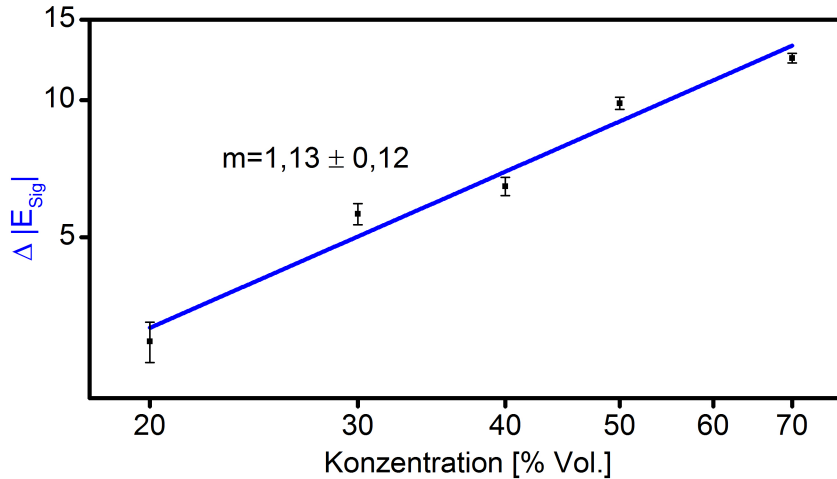


Abbildung 4.11.: Konzentrationsabhängigkeit der CARS-Signalfeldstärke. Die Daten aus Abbildung 4.10 sind doppelt logarithmisch aufgetragen. Die ermittelte Steigung bestätigt den erwarteten linearen Zusammenhang.

Beschränkung der Genauigkeit dieser Methode zur Bestimmung Signalintensität könnte in der Bestimmung der Differenz $\Delta |E_{Sig}|$ in Abbildung 4.10 liegen. Sie basiert auf der Annahme, dass die Linienform gleich bleibt. Wie in Abbildung 2.11 in Abschnitt 2.4.2 jedoch diskutiert wurde, ändert sich diese mit zunehmendem nichtresonanten Untergrund der Suszeptibilität. Mit abnehmender Konzentration von Acetonitril, steigt der nichtresonante Untergrund, welcher vor allem in Wasser entsteht. Dadurch kann sich die Linienform mit der Konzentration leicht ändern, was unter Umständen die geringe Genauigkeit erklärt.

4.2.4. Unterdrückung unerwünschter Zweiphotonenfluoreszenz

Als einer der Hauptvorteile von CARS wird gemeinhin angeführt, dass das Signal zu höheren Frequenzen verschoben ist und nicht von Fluoreszenz überlagert wird. Allerdings tritt bedingt durch die kurzen Impulse und die damit verbundenen hohen Spitzenintensitäten eine beachtliche Zweiphotonenabsorption auf, welche eine anschließende Fluoreszenz nach sich ziehen kann. Diese *Zweiphotonenfluoreszenz (2PEF)* überlagert sich inkohärent zum CARS-Signal, so dass sich die Intensitäten addieren:

$$S(\omega) = S_{CARS}(\omega) + S_{2PEF}(\omega). \quad (4.11)$$

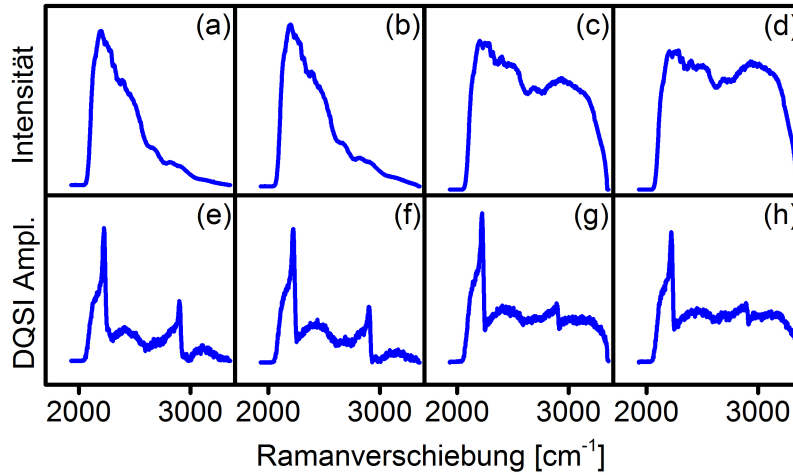


Abbildung 4.12.: Bestimmung des Single-Beam-CARS-Signalfeldes für verschiedene Konzentrationen von DCM in Acetonitril. (a-d) Single-Beam-CARS-Spektren (Gatephase $\phi_n = 0$) für die Konzentrationen 0 %; 0,1%; 1% bzw. 10 % Vol. der Ausgangslösung. (e-h) Die entsprechenden Signalfeldamplituden $|E_{Sig}(\omega)|$ nach Gleichung (4.7).

Bei der DQSI-Operation nach den Gleichungen (4.7) und (4.8) sollte demnach der Anteil der 2PEF wegfallen, da jeweils Differenzen von Signalen mit verschiedenen Gatephasen gebildet werden. Um dies zu untersuchen, wurde eine Lösung des Laserfarbstoffs DCM in Acetonitril hergestellt, bei der eine starke 2PEF im selben Spektralbereich wie das CARS-Signal beobachtet wurde. Die Lösung wurde anschließend drei mal um den Faktor zehn verdünnt. Mit diesen Lösungen wurde dann jeweils eine DQSI-Single-Beam-CARS-Messung mit entsprechender Berechnung nach den Gleichungen (4.7) und (4.8) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12 gegeben. Es fällt zunächst auf, dass mit zunehmender Konzentration zu höheren Frequenzen hin ein starker 2PEF-Anteil im Single-Beam-CARS-Spektrum entsteht, was zu erwarten ist. Allerdings ist auch in den berechneten Signalfeldamplituden ein Anteil von 2PEF vorhanden, der sich ebenfalls bei höheren Frequenzen zeigt und vor allem die Linie bei 2942cm^{-1} mit ansteigender DCM-Konzentration zunehmend überdeckt.

Nach Gleichung (4.11) ist diese Beobachtung nicht zu erwarten. Die Erklärung für diesen Effekt ist in der Effizienz der Zweiphotonenabsorption zu finden, welche von der Gatephase ϕ_g abhängt. Ein Maß für diese Effizienz ist das Leistungsspektrum der zweiten Harmonischen, welches in Gleichung (B.10) in Anhang B behandelt wird. Es wird über

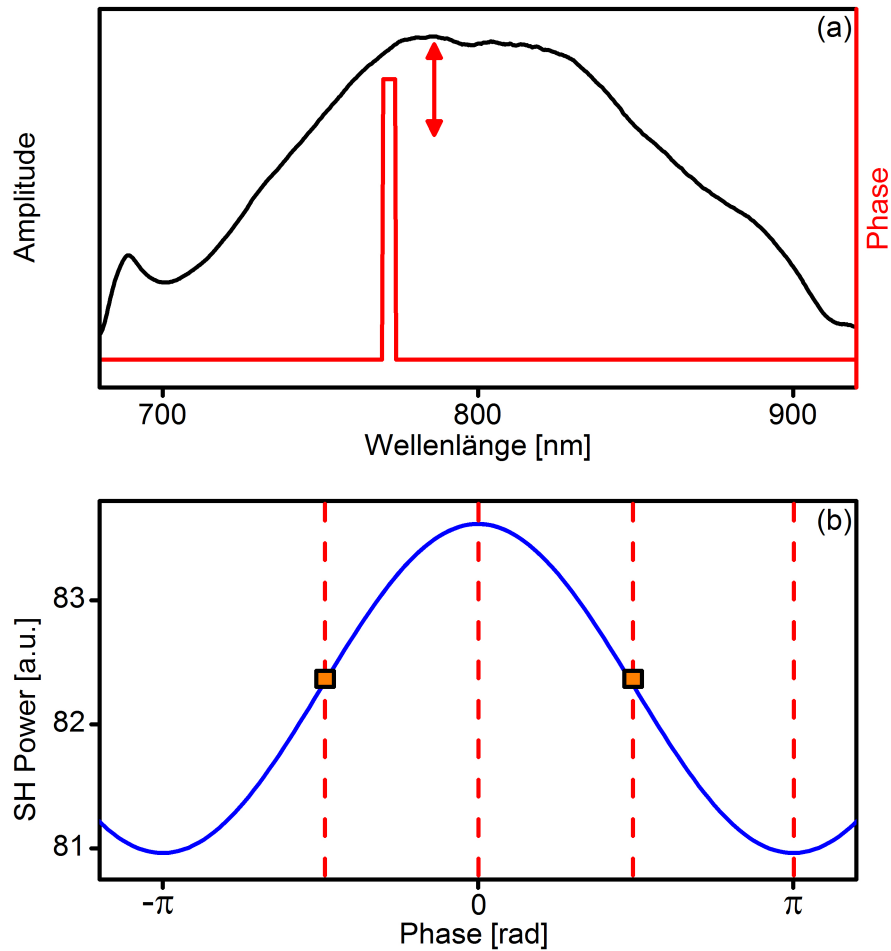


Abbildung 4.13.: Abhängigkeit des Leistungsspektrums der zweiten Harmonischen von der Anregungsphase in DQSI-Messungen. (a) Laserfeldamplitude und Phase mit variablem Phasengate. (b) Darauf basierende Simulation des integrierten Leistungsspektrums der zweiten Harmonischen in Abhängigkeit der angelegten Phase des Gates.

alle Frequenzen integriert:

$$\tilde{S}(\phi_g) = \int \left| \int E(\omega)E(\Omega - \omega)d\omega \right|^2 d\Omega. \quad (4.12)$$

Anschließend wird die Phase des Gates ϕ_g variiert. In Abbildung 4.13 ist das Ergebnis einer numerischen Auswertung von Gleichung (4.12) gezeigt, wobei das experimentell ermittelte Laserspektrum verwendet wurde und ein Phasengate von 10cm^{-1} Breite bei der Position 13.000cm^{-1} simuliert wurde. Es ergibt sich eine sinusförmige Abhängigkeit, was bedeutet, dass die Zweiphotonenfluoreszenz ebenfalls sinusförmig moduliert wird. Dies ist die Erklärung für den 2PEF-Anteil in den Spektren in Abbildung 4.12. Die DQSI-Operation zur Berechnung der Amplitude in Gleichung (4.7) gibt die Amplitude einer Sinusfunktion. Da das 2PEF-Signal ebenfalls sinusförmig moduliert wird, bleibt die Amplitude dieser Änderung im Signal erhalten.

In Abbildung 4.13 (b) sind die vier Phasen eingezeichnet, welche für die DQSI-Operation notwendig sind. Bei zwei von ihnen, nämlich bei $-\pi/2$ und $\pi/2$, ist Zweiphotonenabsorption und damit auch die 2PEF gleich stark. Geht man von einem lokalen Oszillator mit flacher Phase aus, so entspricht die Differenz dieser beiden Werte annähernd einem spontanen Ramanspektrum (vgl. Anhang C). Ferner wird durch die Differenzbildung auch der 2PEF-Anteil kompensiert, wie in Abbildung 4.14 gezeigt wird.

Eine grundsätzlich andere Möglichkeit 2PEF zu unterdrücken, ist nicht die Phase des Gates, sondern dessen spektrale Position zu verändern.[125] Das Leistungsspektrum der zweiten Harmonischen wird dadurch kaum verändert, das Peak-Dip-Merkmal im Single-Beam-CARS-Spektrum jedoch verschoben. Dies entspricht einer Einzelstrahlvariante des *Frequency modulation CARS*, welches in [126] vorgestellt und in [127] mit breitbandigen Laserimpulsen umgesetzt wurde. Eine experimentelle Demonstration der Unterdrückung der Zweiphotonenfluoreszenz ist in Abbildung 4.15 gezeigt. In (a) sind Single-Beam-CARS-Messungen für zwei Anregungsspektren dargestellt, bei denen die Position eines $\pi/2$ -Gates um ein Pixel verschoben wurde. Sie stimmen exakt überein, außer an den Positionen, an denen die Resonanzen abgebildet werden. Dadurch ist die Differenz der beiden Signale eine Nulllinie, bei der Peaks und Dips bei den Positionen der Resonanzen auftreten. Die Integration des Signals in (c) zeigt Linien bei den Resonanzen. Der Anteil der 2PEF im gemessenen Spektrum war dabei um einen Faktor 160 stärker als das detektierte CARS-Signal.

Wie in Abschnitt 5.2.2 gezeigt wird, wäre eine π -Phase geeigneter gewesen. Bei der Durchführung des Experiments war der Einfluss des dort eingeführten Interferenzfeldes jedoch noch nicht verstanden. Das Ziel war mit vier Messungen, Differenzbildung und

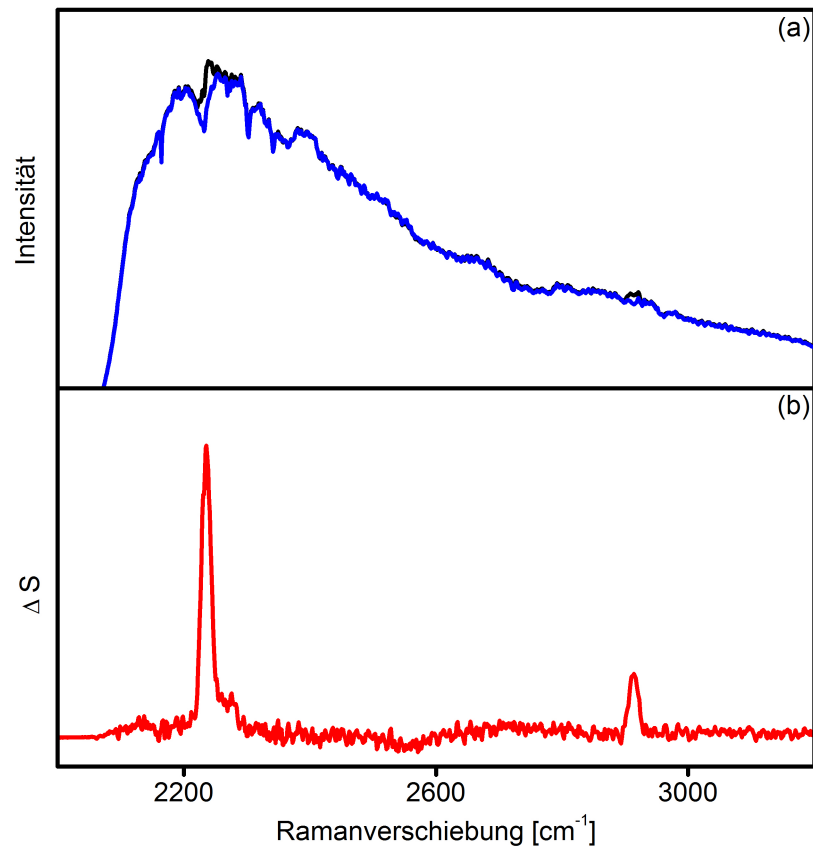


Abbildung 4.14.: Extraktion von Ramanspektren durch Phasenänderung des Gates. (a) CARS-Spektren von Acetonitril und DCM mit Gatephasen $\phi_g = \pm\pi/2$. (b) Die Differenz entspricht annähernd einem spontanen Ramanspektrum.

Integration eine *DQSI*-Messung durchzuführen und eine vollständige Charakterisierung von $\chi^{(3)}(\Omega)$ zu erhalten. Mit dem inzwischen erlangten Verständnis, welches in Abschnitt 5.2.2 beschrieben wird, ist jedoch klar, dass dies unmöglich ist. Bei Verschieben des Gates ändert sich auch der lokale Oszillator in der für *DQSI* üblichen Betrachtungsweise. Die Betrachtungsweise aus Abschnitt 5.2.2 erlaubt das lokale Oszillatorfeld als identisch für beide Messungen zu betrachten. Der verfügbare Phasenraum ist dann aber auf $\pi/2 < \phi < 3\pi/2$ beschränkt, so dass eine *DQSI*-Operation nicht möglich ist (vgl. Abbildung 5.4).

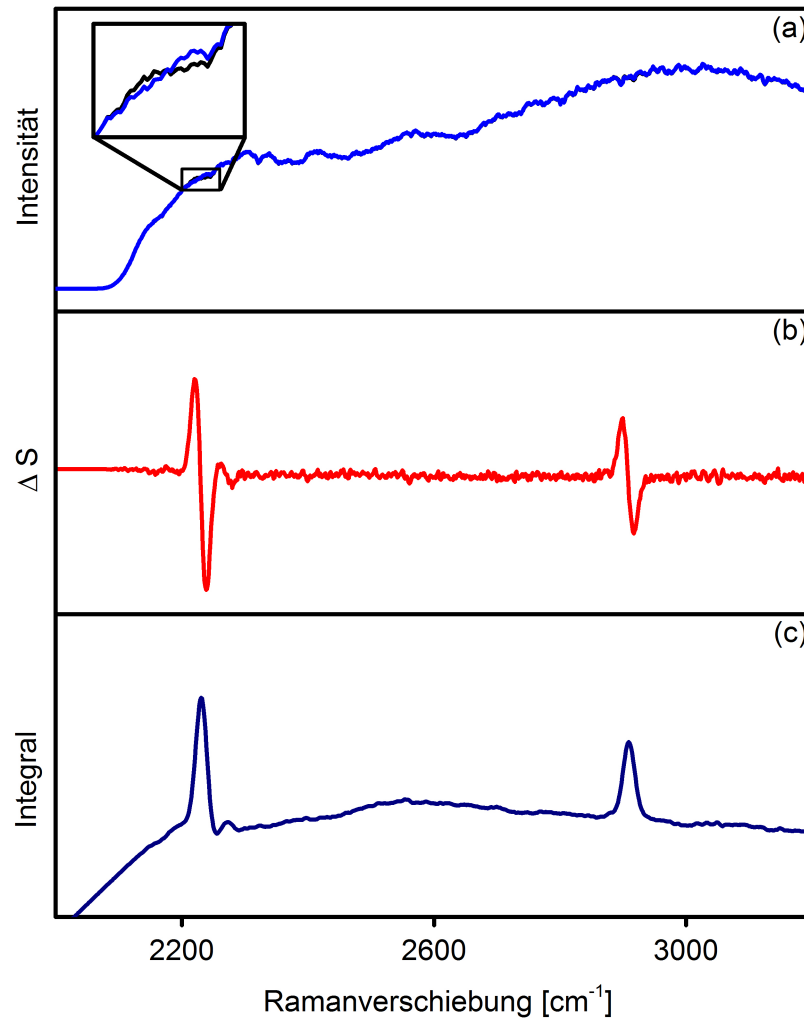


Abbildung 4.15.: Extraktion von Ramanspektren durch Verschieben der spektralen Position des Gates. (a) Selbst bei starker 2PEF bleibt die Signalintensität bei Verschiebung des Phasengates konstant. (b) An den Stellen, die vom Gate aus um die Resonanzfrequenz verschoben sind, treten Änderungen auf, welche Verschiebungen des Gates nachbilden und in der Differenz der Signale sichtbar sind. (c) Eine Integration liefert dann näherungsweise den Betrag des Signalfeldes.

5. Chemisch selektive Bildgebung

Der eigentliche Reiz nichtlinearer optischer Raman-Mikroskopie ist die chemisch selektive Bildgebung. Das bedeutet, dass chemische Eigenschaften, in diesem Fall Molekülschwingungsfrequenzen, als Kontrastmechanismus herangezogen werden.

Die beiden Single-Beam-CARS-Ansätze *Kontrolle der Anregung* und *Multiplexing* sind auch hier Ausgangspunkt der Betrachtungen. In [93] wurde bereits der impulsformerbasierte Ansatz des *Spectral Focusing* vorgestellt. In dieser Arbeit wird das Repertoire dieser Methoden um den *partiellen b-Scan* erweitert. Dies ist ein recht instruktives Beispiel, das hier angegeben werden soll, obwohl seine praktische Relevanz geringer als die des Spectral Focusing ist.

Der Multiplex-Ansatz, der in diesem Kapitel vorgestellt wird, entspricht in seinem Anspruch konventionellen Multiplex-CARS-Messungen unbekannter Proben.[12] Es wird eine Methode vorgestellt, mit welcher ohne Vorwissen die räumliche Anordnung eines Polymerblends identifiziert wird.

5.1. Kontrolle der Anregung

Die Kontrolle der Anregung ist der nächstliegende Ansatz für eine schnelle Bildgebung. Die Idee eine bestimmte Bande anzuregen und das CARS-Signal als Kontrastmechanismus zu verwenden entspricht herkömmlichen Narrowband-CARS-Experimenten.[16] Das hier vorgestellte Verfahren unterscheidet sich von diesem Ansatz insofern, dass ein Ausschnitt aus einem *b-Scan* betrachtet und mit einer vorhergehenden Messung verglichen wird. Im übertragenen Sinne kann man von einem zeitlichen *Fingerabdruck* der Molekülschwingung sprechen.

5.1.1. Partieller *b-Scan*

Spektroskopie mittels *b-Scan* wurde bereits in Abschnitt 4.1 vorgestellt. Nun soll anhand eines experimentellen Beispiels die Möglichkeit einer Bildgebung mit diesem Ver-

5. Chemisch selektive Bildgebung

fahren erfolgen. Der b -Scan enthält charakteristische Molekülschwingungen der Probe als Überlagerung verschiedener sinusförmiger Funktionen. In Abbildung 5.1 (a) ist ein solcher b -Scan für Acetonitril zu sehen, dem eine Funktion der Form:

$$F(b) = A_0 + A_1 b + A_2 \sum_{i=1}^3 a_i \sin(\omega_i b + \phi_i) \quad (5.1)$$

angepasst wurde, um die drei stärksten Resonanzen zu erfassen. Die Werte der Anpassungsparameter sind in Tabelle 5.1 angegeben. A_0 und A_1 bewirken eine lineare Anpassung, während die relativen Amplituden a_i , zusammen mit den Frequenzen ω_i und den Phasen ϕ_i , die Oszillationen abbilden. A_2 wurde während der Anpassung konstant auf eins gesetzt.

In einem nächsten Schritt wurde ein Bild aufgenommen, indem der Fokus in z -Richtung durch eine Küvette gescannt wurde, um den Übergang vom Deckglas in Acetonitril abzubilden. An jedem Bildpunkt wurde ein kurzer Scan zwischen $b = 275$ fs und $b = 435$ fs in Schritten von 10 fs ausgeführt. Für jeden Scan wurde dann die Funktion aus Gleichung (5.1) angepasst, wobei jedoch nur die Parameter A_0 , A_1 und A_2 zur Optimierung freigegeben wurden. A_2 gibt an, wie stark die zuvor angepassten Oszillationen in Acetonitril mit jenen am aktuellen Bildpunkt übereinstimmen. Eine Falschfarbendarstellung ist in Abbildung 5.1 (b) gezeigt. Es zeigt sich, dass A_2 im Bereich des Deckglases erwartungsgemäß kleinere Werte annimmt als in Acetonitril. Das Histogramm zu dem Bild in Abbildung 5.1 (b), in welchem die relative Häufigkeiten der Werte für A_2 aufgetragen sind, ist in Abbildung 5.1 (c) gezeigt. Es zeigen sich zwei Maxima, je eines bei niedrigen und eines bei hohen Werten. Das erste wird dabei dem Glas, das zweite Acetonitril zugeordnet. Der Grenzwert zur Unterscheidung wird im Minimum bei $A_{2,d} = 0,5$ festgelegt. Werte darüber werden Acetonitril, Werte darunter Glas zugeordnet. Daraus ergibt sich dann ein *Binärbild*, welches in Abbildung 5.1 (d) gegeben ist. Die beiden Komponenten Acetonitril und Glas werden deutlich unterschieden. Lediglich im Bereich der Grenzschicht kommt es zu vereinzelt Fehlzugeordnungen, was möglicherweise auf einen unzureichend korrigierten Fokus zurückzuführen ist.

Abschließend sei bemerkt, dass dieses Verfahren, trotz seiner erfolgreichen Umsetzung, von geringer praktischer Relevanz ist. Es muss verhältnismäßig viel Vorwissen eingebracht werden und die Messung dauert dennoch sehr lange. Ein geeigneterer Ansatz wurde in [93] vorgestellt, wo Spectral Focusing in einer impulsformerbasierten Variante verwendet wurde. Auch der Ansatz des Binary Phase Shaping [94] erscheint geeigneter (vgl. Abschnitt 2.4.3).

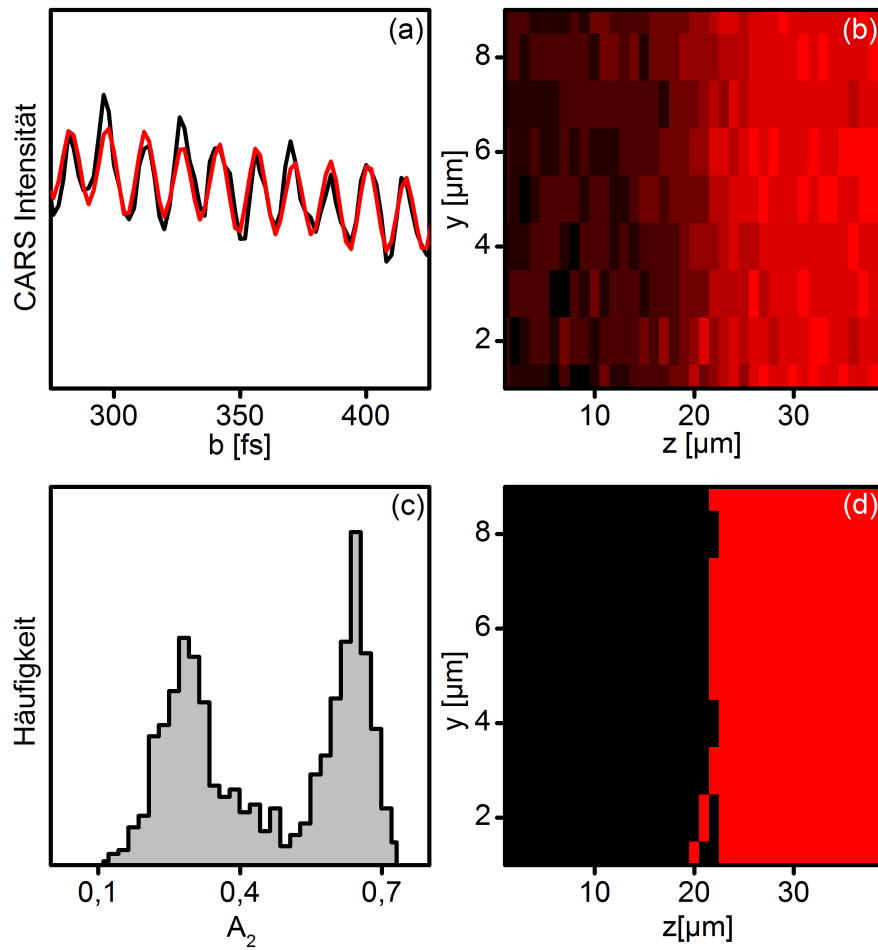


Abbildung 5.1.: Partieller b-Scan. (a) b -Scan (schwarz) und Anpassungsfunktion (rot) für Acetonitril. (b) Bild des Übergangs von Glas (links) in Acetonitril (rechts) anhand der Werte des Fitparameters A_2 . (c) Histogramm zu (b). (d) Binärbild aus (b) mit dem Grenzwert $A_{2,d} = 0,5$.

Tabelle 5.1.: Anpassungsparameter entsprechend Gleichung (5.1).

Parameter	Wert
A_0	$1,26 \cdot 10^6$
A_1	$-519,743\text{fs}^{-1}$
A_2	1 (per Definition)
a_1	$-7349,75$
a_2	$-54284,9$
a_3	$2174,69$
ω_1	$0,2882\text{fs}^{-1}$
ω_2	$0,4265\text{fs}^{-1}$
ω_3	$1,8718\text{fs}^{-1}$
ϕ_1	$1,7603$
ϕ_2	$3,4349$
ϕ_3	$-4,3596$

5.2. Multiplexing

Im Folgenden soll untersucht werden, inwieweit mit dem Multiplexingansatz eine Single-Beam-CARS-Bildgebung erzielt werden kann. Das *DQSI*-Schema, welches in Abschnitt 4.2.3 vorgestellt wurde, benötigt allerdings vier Messungen, die entsprechend lange gemittelt werden müssen, um verhältnismäßig kleine Änderungen deutlich werden zu lassen. Für eine Bildgebung an realen Proben ist dies inakzeptabel, da erstens zu lange Bestrahlungsdauern im Interesse einer geringen Probenbelastung zu vermeiden sind und zweitens typischerweise etwa 10.000 Bildpunkte aufzunehmen sind. Daher ist es anzustreben an jedem Bildpunkt jeweils möglichst nur ein Spektrum aufzunehmen und die Anregungsphase nicht zu ändern. Im Folgenden werden die Voraussetzungen dafür dargestellt.

5.2.1. Reduzierung der Intensität des Anregungsfeldes

Ein entscheidender Punkt für die erfolgreiche Aufnahme von Single-Beam-CARS-Spektren in empfindlichen Proben, wie biologischem Gewebe oder in diesem Fall Polymeren, ist die Reduzierung der Strahlungsbelastung. Hierzu ist zu beachten, dass zur Anregung hoher Schwingungsfrequenzen der mittlere Teil des Spektrums nicht beiträgt. Dies liegt daran, dass für die Frequenzkomponenten in der Mitte des Spektrums sowohl zu

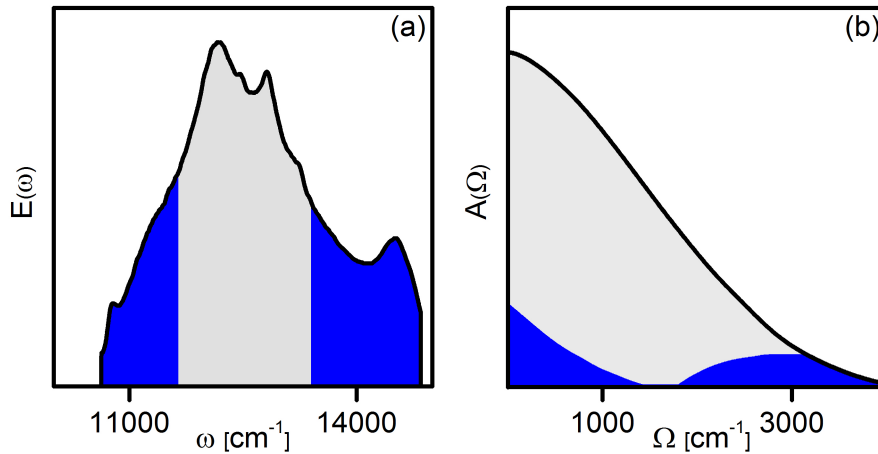


Abbildung 5.2.: Einfluss des (a) Anregungsspektrums auf die (b) Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$. Oberhalb von 3000cm^{-1} tragen nur die Ränder des Spektrums bei, so dass sich $A(\Omega)$ für hohe Wellenzahlen, bei Ausschneiden eines Bereiches aus der Mitte des Spektrums, nicht ändert.

höheren als auch zu niedrigeren Frequenzen lediglich eine reduzierte Bandbreite des Spektrums vorhanden ist. Abbildung 5.2 zeigt die Berechnung der Ramananregungswahrscheinlichkeit für zwei verschiedene Anregungsspektren. Im ersten wird das gesamte Laserspektrum verwendet. Die entsprechende Anregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ zeigt den typischen Verlauf mit einem Maximum bei null und einer kontinuierlichen Abnahme zu höheren Frequenzen hin. Im zweiten Fall werden nur die Ränder des Spektrums verwendet und der Mittelteil ausgeschnitten. Die Anregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ ist zunächst deutlich reduziert und nimmt in diesem Fall deutlich schneller ab, entsprechend der Bandbreite der verbleibenden Flügel. Ab einem gewissen Punkt findet dann wieder ein Anstieg statt und bei genügend hohen Frequenzen, hier bei etwa 3000cm^{-1} , wird sogar die Anregungswahrscheinlichkeit des vollständigen Spektrums erreicht. Das bedeutet, dass die Anregung hoher Frequenzen bei deutlich reduzierter Gesamtintensität nicht eingeschränkt wird.

5.2.2. Festes Phasengate

Für eine Bildgebung ist es anzustreben eine konstante Phase anzulegen und dann die Probe zu scannen. Eine Möglichkeit hierzu ist das Anlegen eines konstanten Phasen-

5. Chemisch selektive Bildgebung

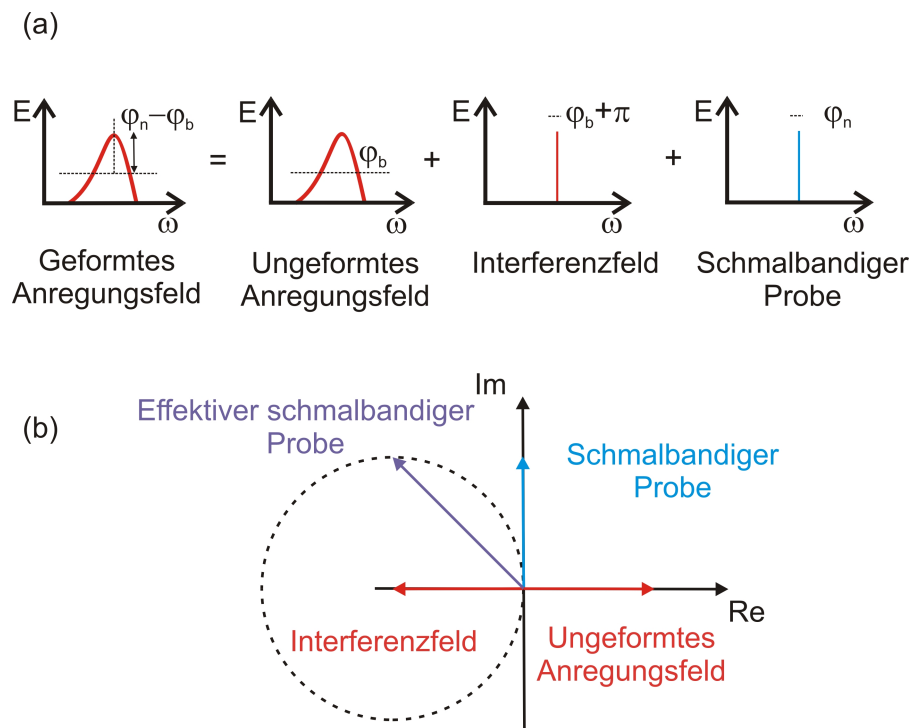


Abbildung 5.3.: Betrachtung des Anregungsschemas. (a) Ein festes Phasengate kann aus einer Überlagerung dreier Komponenten betrachtet werden. (b) Für das effektive Probefeld kann dabei nur ein eingeschränkter Bereich an Phasen erreicht werden.

gates. Um einen optimalen Wert für die angelegte Phase zu finden, ist es hilfreich das Anregungsfeld als Überlagerung dreier Komponenten zu betrachten, wie in Abbildung 5.3 (a) gezeigt ist. Ein Teil ist das ungeformte Anregungsfeld mit einer flachen Phase, welches einen lokalen Oszillator mit glattem Amplituden- und Phasenverlauf erzeugt. Diesem überlagert ist ein schmalbandiges spektrales Feld bei der Frequenz ω_g mit einer um π verschobener Phase, das im Folgenden Interferenzfeld genannt wird.[128, 129] Dieser Anteil erzeugt die Kerbe im Spektrum, welche durch die dritte Komponente, einem schmalbandigen Feld mit der angelegten Gatephase, wieder aufgefüllt wird.

Die Konsequenzen für das Experiment sind in Abbildung 5.3 (b) gezeigt. Das schmalbandige Interferenzfeld überlagert das angelegte Probefeld kohärent, so dass ein effektives Probefeld entsteht, welches nur einen eingeschränkten Phasenbereich einnehmen kann. Der mögliche Bereich ist durch einen gestrichelten Kreis in der linken Hälfte der komplexen Ebene dargestellt. Einige Beispiele sind in Abbildung 5.4 gezeigt. Wird eine Phase von null am Gate angelegt, so löschen sich Interferenzfeld und Probefeld gegenseitig aus, so dass ein ungeformtes Anregungsfeld übrig bleibt, was dem experimentellen Ergebnis mit einem transformlimitierten Impuls entspricht (Abbildung 5.4). Mit zunehmender Phase des Probegates steigt auch die Amplitude des effektiven Probefeldes an, solange bis bei der Phase π eine konstruktive Überlagerung von Probe- und Interferenzfeld vorliegt (Abbildung 5.4 c). Die Amplitude des effektiven Probefeldes variiert also zwischen null und der doppelten Amplitude des Anregungsfeldes bei der Frequenz ω_g , während die mögliche Phase im Bereich von $\pi/2 < \phi < -\pi/2$ liegt. Die Teilabbildungen 5.4 (b) und (d) zeigen den Sachverhalt für Gatephasen von $\phi_g = \pm\pi/2$.

Diese zunächst etwas kompliziert anmutende Betrachtungsweise hat den Vorteil, dass der lokale Oszillator tatsächlich als Funktionen mit glattem Amplituden- und Phasenverlauf betrachtet werden kann. Geht man davon aus, dass das schmalbandige Probefeld keinen Einfluss auf die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\Omega)$ hat, so lässt sich das resultierende Single-Beam-CARS-Feld wie folgt ausdrücken:

$$\begin{aligned}
E_{\text{CARS}}(\omega) &= \int E(\omega - \Omega)R(\Omega)d\Omega \\
&= \int (E(\omega - \Omega) + E(\omega_g)\delta(\omega - \omega_g - \Omega)e^{i\phi_{g,eff}}) R(\Omega)d\Omega \\
&= \int E(\omega - \Omega)R(\Omega)d\Omega + E(\omega_g)e^{i\phi_{g,eff}} R(\omega - \omega_g) \\
E_{\text{CARS}}(\omega) &= E_{\text{CARS,b}}(\omega) + E_{\text{Sig,eff}}(\omega).
\end{aligned} \tag{5.2}$$

Geht man von einer Phase des Probegates von $\phi_{g,eff} = \pi$ aus, so lässt sich Gleichung

5. Chemisch selektive Bildgebung

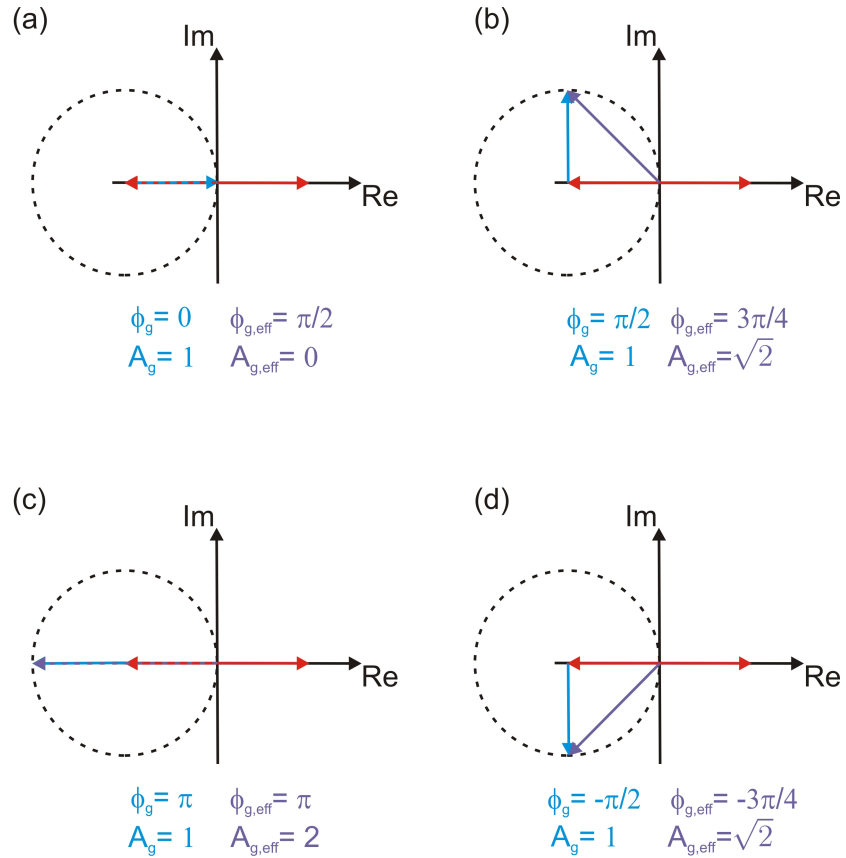


Abbildung 5.4.: Betrachtung der DQSI-Phasen. (a-d) Veranschaulichung des Einflusses des Interferenzfeldes auf Amplitude und Phase des effektiven Probes bei den Gatephasen, die für DQSI verwendet werden.

(5.2) wie folgt umformen:

$$E_{\text{CARS}}(\omega) = E_{\text{CARS,b}}(\omega) - E(\omega_g)A(\omega - \omega_g)\chi^{(3)}(\omega - \omega_g). \quad (5.3)$$

Die Phasen von $E_{\text{CARS,b}}(\omega)$ sowie $A(\omega - \omega_g)$ werden hier näherungsweise als null angenommen, so dass sich für das gemessene CARS-Signal

$$\begin{aligned} S_{\text{CARS}}(\omega) &= |E_{\text{CARS,b}}(\omega) - E(\omega_g)A(\omega - \omega_g)\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)|^2 \\ &= |E_{\text{CARS,b}}(\omega)|^2 + \underbrace{E(\omega_g)A(\omega - \omega_g)|\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)|^2}_{\ll |E_{\text{CARS,b}}(\omega)|} \\ &\quad - 2E(\omega_g)E_{\text{CARS,b}}(\omega)A(\omega - \omega_g)\text{Re}\{\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)\} \end{aligned} \quad (5.4)$$

ergibt. Das resultierende CARS-Signal kann also als glatte Funktion betrachtet werden, von welcher ein Term proportional zu $\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)$ abgezogen wird, so dass gewissermaßen ein umgedrehtes CARS-Signal aufgenommen wird. Aus diesem Grund wird aus dem typischen Peak-Dip-Verlauf mit steigender Schwingungsfrequenz ein Dip-Peak-förmiger. Die Unterschiede für verschiedene Moleküle sind jedoch in etwa so signifikant wie bei herkömmlichen CARS-Messungen.

5.2.3. Klassifizierung

Diese Unterschiede im Spektrum lassen sich für eine Klassifizierung nutzen. Damit ist gemeint, dass die aufgenommenen Spektren entsprechend ihrer Form verschiedenen *Klassen (Cluster)* zugeordnet werden.[130, 131] Wird als Kriterium für die Zugehörigkeit zu einer Klasse die Fehlerquadratsumme zum Mittelwert S_c aller Spektren der Klasse

$$F = \sum_i (S_{\text{CARS}}(\omega_i) - S_c(\omega_i))^2 \quad (5.5)$$

herangezogen, ist es unerheblich worauf die einzelnen Spektren bezogen sind. Es kann die Nulllinie wie bei spontanen Ramanmessungen, ein konstanter Wert oder ein beliebiger Verlauf sein. Bei Single-Beam-CARS-Messungen, wie sie hier gezeigt werden, ist letzteres der Fall. In Gleichung (5.5) wurde berücksichtigt, dass die Spektren mit einer begrenzten Auflösung detektiert werden. Daher wurde ein Summenzeichen verwendet, wobei der Index i für Nummerierung der einzelnen Pixel der CCD-Kamera steht.

Eine gängige Art der Klassifizierung ist das *k-means-Clustering*. [132] Hierbei wird die Anzahl k der Klassen bzw. Cluster bereits zu Beginn festgelegt. Zunächst werden zufällig k Spektren ausgewählt, die als anfängliche *Means* S_c , also Mittelwertspektren, dienen.

5. Chemisch selektive Bildgebung

Anschließend wird jedes Spektrum demjenigen Mean zugeordnet, mit welchem es die geringste Fehlerquadratsumme F nach Gleichung (5.5) bildet. Die Spektren, welche dem selben Mean zugeordnet sind, bilden dann einen Cluster. Der nächste Schritt ist dann die Mittelwertbildung aller Spektren eines Clusters. Diese Mittelwerte sind dann die Means für die nächste Iteration. Der Algorithmus wird solange fortgesetzt bis sich die Zuordnung der Spektren zu ihren Clustern nicht mehr ändert.

Dadurch wird erreicht, dass Spektren, welche eine ähnliche Gestalt haben, derselben Klasse zugeordnet werden. Da die Resonanzen der Suszeptibilitäten die Form der CARS-Spektren auf charakteristische Weise ändern, findet eine chemisch selektive Zuordnung statt.

Es ist anzumerken, dass noch etliche weitere Klassifizierungsmethoden [133] existieren, etwa die *Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)* [12, 134] oder *Support Vector Machines (SVM)*. [135] Das k -means-Clustering wurde für eine erste Demonstration verwendet, da es verhältnismäßig einfach zu implementieren ist. Eine systematische Untersuchung kann ergeben, dass ein anderes Verfahren geeigneter ist.

5.2.4. Experimentelle Demonstration

Das zuvor vorgestellte Schema wurde an einem Polymerblend bestehend aus Polyethylen (PE), Polystyrol (PS) und Polypropylen (PP) experimentell demonstriert. Die Formung des Anregungsfeldes ist in Abbildung 5.5 gezeigt. Es wurde ein Probe-Gate von vier Pixeln bei 775 nm eingeführt, das eine Amplitude von eins und eine Phase von π aufweist. Ferner wurde der Bereich zwischen 810nm und 860nm mit dem Impulsformer ausgeschnitten und die Intensität im verbleibenden Spektrum auf 0,8 gesetzt, um Photozerstörung zu vermeiden.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.6 gezeigt. In (a) ist die Intensität der CARS-Spektren bei 640nm aufgetragen. Es sind lediglich grobe Strukturen erkennbar und der Informationsgehalt ist in etwa mit einer Lichtbildaufnahme zu vergleichen. Die Verteilung der Komponenten ist jedoch nicht ersichtlich.

Betrachtet man jedoch die CARS-Spektren selbst an verschiedenen Punkten in der Probe, so werden durchaus Unterschiede deutlich, wie in (b) zu sehen ist. Das Spektrum am rot markierten Punkt weist eine zusätzliche Linie bei etwa 620nm auf und das am grün markierten Punkt zeigt einen schnelleren Abfall zu größeren Wellenlängen hin. Die k -means-Clusteranalyse in (c) offenbart die Chemische Struktur der Probe. Die einzelnen Bereiche der verschiedenen Polymere sind klar zu erkennen.

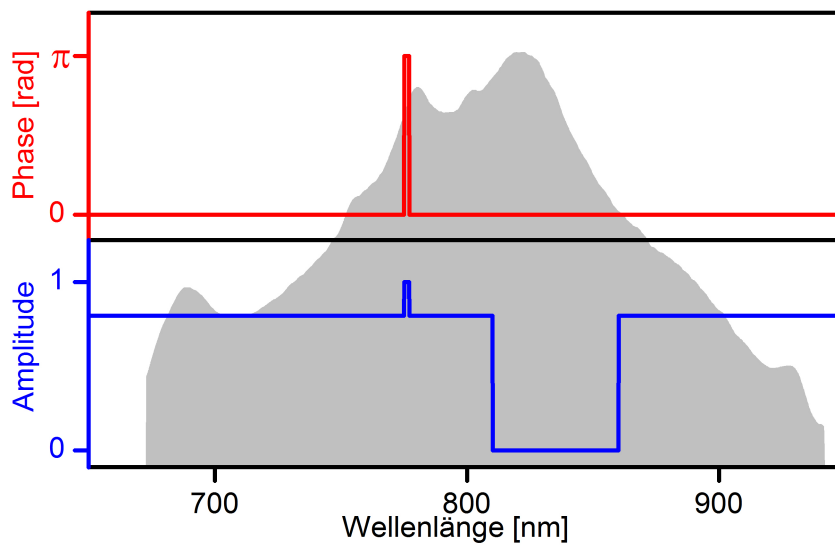


Abbildung 5.5.: Formung des Anregungsfeldes zur Bildgebung. Die Amplitude des Gates erhält den Wert eins, während jene der Flügel 0,8 beträgt und der mittlere Bereich ganz ausgeschnitten wird.

In Teilabbildung (d) sind die Means am Ende der Klassifizierung zu sehen, welche mit den Einzelspektren in (b) übereinstimmen. Die einzelnen Charakteristika sind gleich, der einzige Unterschied ist, dass das Rauschen, welches bei den Einzelspektren in (b) zu sehen ist, heraus gemittelt wurde.

Die Klassifizierung erfolgte vollkommen ohne Vorwissen über die Probe, abgesehen davon, dass der CH-Schwingungsbereich zur Anregung ausgewählt wurde. Die Anordnung der Probenbestandteile wurde identifiziert, ohne dass allerdings angegeben werden kann, welcher Bereich im Bild in Abbildung 5.6 (c) zu welchem Probenbestandteil gehört. Dies ist jedoch nicht unbedingt ein großer Nachteil. Bei mikroskopischen Aufnahmen in der Medizin oder auch den Materialwissenschaften erfordert die richtige Interpretation der Bilder sehr häufig großes Expertenwissen. So liefert bei lichtmikroskopischen Aufnahmen die Angabe der Transmission an verschiedenen Bildpunkten keine besondere Information. Entscheidend ist vielmehr verborgene Strukturen sichtbar zu machen, was mit der hier vorgestellten Methode eindeutig möglich ist.

5. Chemisch selektive Bildgebung

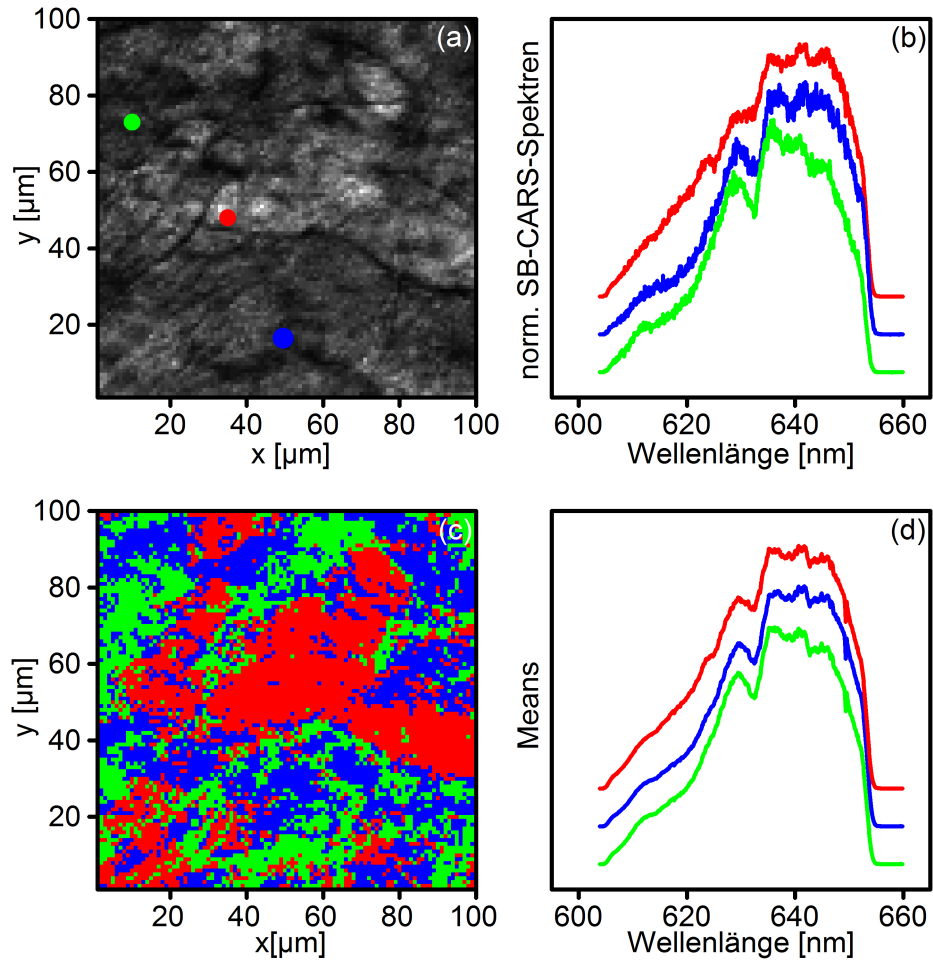


Abbildung 5.6.: Chemisch selektive Bildgebung eines Polymerblends. (a) Die Auftragung der Signalintensität der Single-Beam-CARS-Spektren bei 640nm. (b) Spektren von verschiedenen Probenpositionen. (c) Clusteranalyse. (d) Die Mittelwertspektren der entsprechenden Bereiche in (c).

6. In silico Optimierung von Anregungsphasen

Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits die Problematik der Probenzerstörung durch zu lange Bestrahlung mit Laserlicht angesprochen. Dort wurde ein Großteil des Anregungsspektrums ausgeschnitten und die Intensität reduziert, um ein Bild aufnehmen zu können. Auch in biologischen Proben, welche für die nichtlineare Mikroskopie von hoher Relevanz sind, tritt dieser Effekt auf. Zur Illustration ist in Abbildung 6.1 die lichtmikroskopische Aufnahme von Mooszellen vor und nach einer Single-Beam-CARS-Messung gezeigt. Die Probe ist offensichtlich zerstört worden und die gemessenen Daten waren ebenfalls nicht verwendbar.

Dieses Kapitel soll nun einen Weg aufzeigen, wie das Problem der Photozerstörung weiter reduziert werden kann. Es werden Anregungsphasen gesucht, welche gezielt für die Moleküle einer Komponente Signal liefern, während in anderen Komponenten ein möglichst geringes Signal entstehen soll. Dadurch kann die Bildaufnahme deutlich beschleunigt werden und die Zellen sind der Bestrahlung kürzer ausgesetzt. Die Aufgabe besteht nun darin, diese Anregungsphasen zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist die Optimierung im Experiment durchzuführen, indem verschiedene Probenbestandteile gemes-

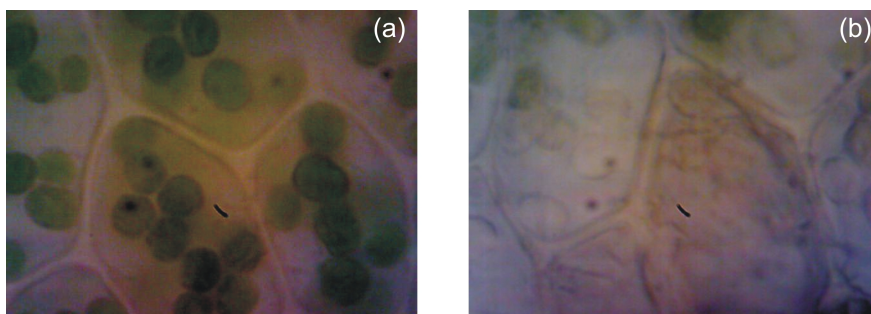


Abbildung 6.1.: Mooszellen (a) vor und (b) nach der Aufnahme eines Single-Beam-CARS-Bildes.

6. *In silico* Optimierung von Anregungsphasen

sen und deren Signale mittels eines evolutionären Algorithmus (siehe Anhang B) optimiert werden. Dies ist jedoch sehr schwierig oder unter Umständen sogar unmöglich, da diese Optimierung im Experiment ebenfalls eine lange Bestrahlung der Probe impliziert, was wiederum Photozerstörung verursacht.

Der alternative Ansatz ist nun die Signale nicht im Experiment zu messen, sondern mittels eines Computers zu simulieren (*in silico*-Optimierung). Die Voraussetzung hierfür ist eine schnelle Simulation, weswegen im Rahmen dieser Arbeit ein Simulationspaket in LabVIEW erstellt wurde. Die Grundlagen hierzu sind in Anhang B beschrieben.

In [136–138] wurde eine ähnliche Optimierung beschrieben, allerdings mit dem Unterschied, dass dort ein zusätzlicher schmalbandiger Stokes-Impuls überlagert wurde und jeweils zwei Messungen aufgenommen werden mussten, um den nichtresonanten Untergrund zu eliminieren. Hier ist der Anspruch ein Verfahren konzeptionell zu entwickeln, das mit einem einzigen Impuls auskommt und keinen Wechsel der Phasenfunktion benötigt.

Die Optimierungsalgorithmen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind ebenfalls in Anhang B beschrieben. Es handelt sich zum einen um *evolutionäre Algorithmen*[139–141] und zum anderen um den *Downhill-Simplex-Algorithmus*. [115] Evolutionäre Algorithmen stellten sich als besonders geeignet in Kombination mit binär kodierten Daten heraus. So wurden sie im Rahmen der numerischen Optimierung des, in Abschnitt 2.4.3 gezeigten, Binary Phase Shaping verwendet. Ferner eignen sich evolutionäre Algorithmen in besonderem Maße für Optimierungen am Experiment, da sie, verglichen mit dem Downhill-Simplex-Verfahren, weniger empfindlich auf verrauschte Optimierungsgrößen reagieren.[139]

Der Vorteil des Downhill-Simplex-Algorithmus hingegen ist, dass bei einer Iteration nur ein bis zwei Fitnesswerte errechnet werden müssen. Damit ist er für numerische Simulationen sehr gut geeignet, da die Berechnung deutlich beschleunigt wird. Aus diesem Grund wurde er für die Optimierungen in diesem Kapitel verwendet.

6.1. Single-Beam-CARS-Signale als Ergebnis spektraler Interferenz

Ein Weg zur Optimierung von Anregungsphasen auf Basis einer Simulation soll im Folgenden demonstriert werden. Der Ansatz hierzu ist in Abbildung 6.2 gezeigt. Das Anregungsspektrum kann als Überlagerung vieler infinitesimal kleiner Bereiche angese-

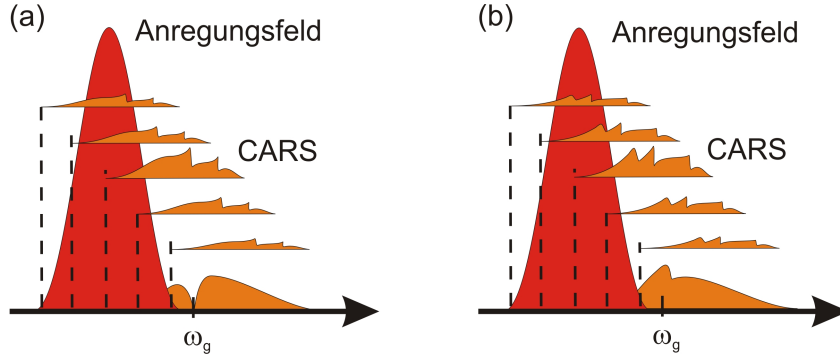


Abbildung 6.2.: Optimierung von Anregungsphasen. Das Single-Beam-CARS-Feld kann als Überlagerung vieler Multiplex-CARS-Felder betrachtet werden, welche interferieren. Es gilt eine Anregungsphase zu finden, welche für ein Molekül an einer bestimmten Stelle im Spektrum ω_g destruktive Interferenz erzeugt (a) und für ein anderes konstruktive (b).

hen werden, welche als Probespektrum wirken. Diese erzeugen dann infinitesimal kleine CARS-Felder $|E(\omega - \Omega)| e^{i\phi(\omega - \Omega)} R(\Omega)$, welche sich zum Gesamt-CARS-Feld aufintegrieren:

$$E_{CARS}(\omega) = \int |E(\omega - \Omega)| e^{i\phi(\omega - \Omega)} R(\Omega) d\Omega. \quad (6.1)$$

Die frequenzabhängige Phase des Anregungsfeldes $\phi(\omega - \Omega)$ hat dann Einfluss darauf, ob konstruktive oder destruktive Interferenz bei einer bestimmten Detektionsfrequenz ω_g auftritt. In Abbildung 6.2 sind exemplarisch fünf Probefrequenzen eingezeichnet, zusammen mit den von ihnen abgefragten CARS-Feldern. Tatsächlich handelt es sich aber natürlich um eine kontinuierliche Verteilung der Probefrequenzen, nämlich das Anregungsfeld $E(\omega)$. In Abbildung 6.2 (a) ist der Fall einer destruktiven und in (b) der einer konstruktiven Interferenz gezeigt.

Ziel einer Optimierung im Hinblick auf Kontrasterzeugung ist es, eine Phasenfunktion $\phi(\omega)$ für das Anregungsfeld zu finden, die für ein Molekül bei einer bestimmten Detektionsfrequenz konstruktive und für ein anderes destruktive Interferenz erzeugt. Auf diese Weise könnte eine Komponente mit großer Selektivität abgebildet werden.

6.2. Einkanal detektion

Mit dem in Anhang B vorgestellten Downhill-Simplex-Verfahren in Verbindung mit der schnellen Simulation von Single-Beam-CARS-Spektren kann nun eine entsprechende

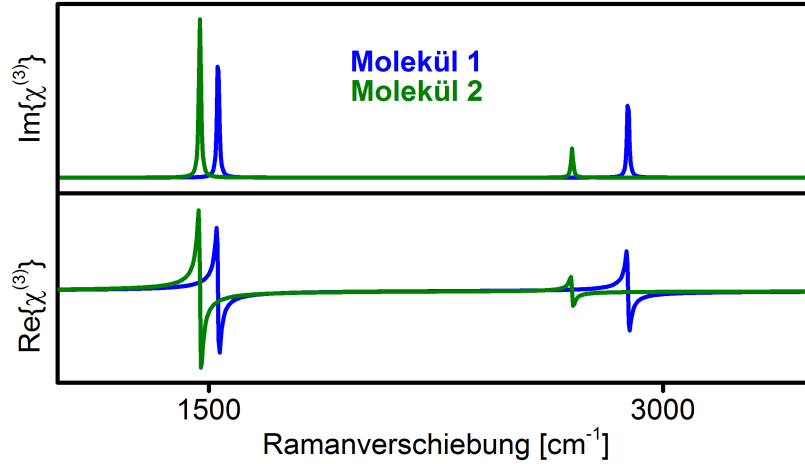


Abbildung 6.3.: Simulierte Suszeptibilitäten für die in silico-Optimierung. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 6.1 angegeben.

Phase gesucht werden. Hierzu wurden simulierte Suszeptibilitäten verwendet, welche in Abbildung 6.3 gezeigt sind und mit den Parametern aus Tabelle 6.1 modelliert wurden. Als Anregungsspektrum wurde das Spektrum des Lasers aus dem Experiment verwendet (siehe Kapitel 3). Der nächstliegende Ansatz für eine Zielfunktion $F_1(\vec{\phi})$ ist dabei die Differenz der CARS-Intensitäten in einem begrenzten spektralen Bereich für zwei verschiedene Moleküle:

$$F_1(\vec{\phi}) = \int_{\omega_g}^{\omega_g + \Delta\omega} I_{CARS}(\omega, \chi_1^{(3)}) d\omega - \int_{\omega_g}^{\omega_g + \Delta\omega} I_{CARS}(\omega, \chi_2^{(3)}) d\omega. \quad (6.2)$$

Der Parametervektor $\vec{\phi}$ besteht dabei aus den Werten für die Phasenfunktion, die über das Anregungsspektrum verteilt sind. In dieser Simulation wurde dabei die spektrale Zuordnung der Pixel der Maske im Experiment verwendet. Entsprechend waren es 640 diskrete Werte für die Phase des Anregungsfeldes. In Tabelle 6.1 sind als Parameter für die in silico-Optimierung die Werte für die beiden Suszeptibilitäten nach Gleichung (2.46), sowie die Positionen der Integrationsbereiche gegeben. Für die Optimierung der Zielfunktion nach Gleichung (6.2) wurde der Bereich ω_g in Tabelle 6.1 verwendet.

Die Ergebnisse der Optimierung sind in Abbildung 6.4 gezeigt. Teilabbildung (a) zeigt das Anregungsfeld. Die hier gezeigte Phase ist bereits das Ergebnis der Optimierung. In (b) sind die CARS-Intensitäten für die beiden simulierten Suszeptibilitäten für die Anregung mit der optimierten Phase aus (a) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Intensität des CARS-Signals für die Suszeptibilität $\chi_2^{(3)}$ bei der Position ω_g des Integrationsberei-

Tabelle 6.1.: Simulationsparameter zur In silico Optimierung.

Parameter	Wert
$\chi_1^{(3)}(\Omega) = \chi_{nr,1} + \sum_{k=1,2} \frac{A_{1,k}}{\Omega_{1,k} - \Omega + i\Gamma_{1,k}}$	
$A_{1,1}$	$3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}$
$A_{1,2}$	$2,5 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}$
$\Omega_{1,1}$	2885 cm^{-1}
$\Omega_{1,2}$	1530 cm^{-1}
$\Gamma_{1,1}$	4 cm^{-1}
$\Gamma_{1,2}$	4 cm^{-1}
$\chi_{nr,1}$	200
$\chi_2^{(3)} = \chi_{nr,2} + \sum_{k=1,2} \frac{A_{2,k}}{\Omega_{2,k} - \Omega + i\Gamma_{2,k}}$	
$A_{2,1}$	$1 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}$
$A_{2,2}$	$3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}$
$\Omega_{2,1}$	2700 cm^{-1}
$\Omega_{2,2}$	1470 cm^{-1}
$\Gamma_{2,1}$	4 cm^{-1}
$\Gamma_{2,2}$	4 cm^{-1}
$\chi_{nr,2}$	200
Integrationsbereiche	
$\omega_{g,1}$	15330 cm^{-1}
$\omega_{g,2}$	15380 cm^{-1}
ω_g	15380 cm^{-1}
$\Delta\omega$	$17,3 \text{ cm}^{-1}$
Optimierungsparameter	
Reflexionsparameter ρ	1
Expansionsparameter χ	2
Kontraktionsparameter γ	0,5
Komprimierungsparameter σ	0,5

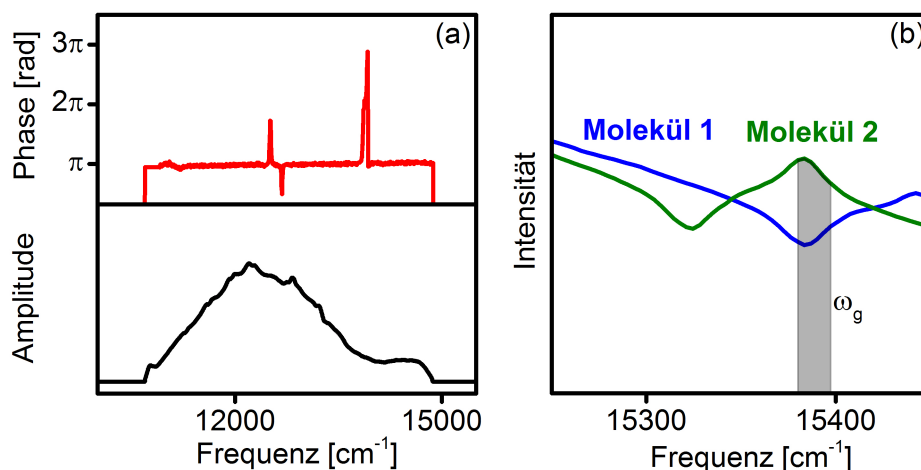


Abbildung 6.4.: In silico Optimierung. (a) Anregungsamplitude mit optimierter Phase. (b) CARS-Intensitäten bei Anregung mit der optimierten Phase.

ches um 15380cm^{-1} deutlich gegenüber derjenigen für die Suszeptibilität $\chi_1^{(3)}$ erhöht ist. Bemerkenswert ist dabei, dass eine glatte, weitestgehend konstante, Phasenfunktion erhalten wird, obwohl die Werte für jedes Pixel der (simulierten) Maske für einen Bereich zwischen null und 2π freigegeben wurden. Die Werte an der Stelle des Integrationsbereiches sind 248 bzw. 157 für die CARS-Intensitäten, was einem Kontrast von

$$K = \frac{I_{CARS,2} - I_{CARS,1}}{I_{CARS,2} + I_{CARS,1}} \approx 0,22$$

entspricht. In Abschnitt 4.2.1 wurde erwähnt, dass die Änderungen durch eine einzelne Resonanz bei Anregung mit einem Phasengate typischerweise bei etwa 5% liegen. Damit ist der hier erreichte Kontrast schon eine Verbesserung. Allerdings ist er nur auf diese beiden Komponenten abgestimmt, was zu Problemen führen kann, wenn nichtresonante Komponenten vorhanden sind. Ebenso kann eine unterschiedliche Streuung in der Probe das Ergebnis verfälschen.

Das legt nahe, dass die Differenz alleine unter Umständen keine sehr wirkungsvolle Grundlage für eine erwünschte Selektivität ist. Vielmehr ist das Ziel, Anregungsphasen wirklich auf die einzelnen Komponenten maß zu schneiden und eine eindeutige Zuordnung zu erhalten.

6.3. Zweikanaldetektion

Eine eindeutige Zuordnung kann erhalten werden, wenn verschiedene spektrale Bereiche des CARS-Spektrums betrachtet werden. Eine alternative Zielfunktion, welche die Linienform im CARS-Spektrum ausnutzt ist:

$$F_2(\vec{\phi}) = \left(\int_{\omega_{g,1}}^{\omega_{g,1}+\Delta\omega} I_{CARS}(\omega)_{\chi_1^{(3)}} d\omega - \int_{\omega_{g,2}}^{\omega_{g,2}+\Delta\omega} I_{CARS}(\omega)_{\chi_1^{(3)}} d\omega \right) \cdot \left(\int_{\omega_{g,1}}^{\omega_{g,1}+\Delta\omega} I_{CARS}(\omega)_{\chi_2^{(3)}} d\omega - \int_{\omega_{g,2}}^{\omega_{g,2}+\Delta\omega} I_{CARS}(\omega)_{\chi_2^{(3)}} d\omega \right). \quad (6.3)$$

Hierbei wird die Differenz nicht zwischen CARS-Spektren für verschiedene Moleküle gebildet, sondern jeweils für dasselbe Molekül bei anderen Positionen im Spektrum. Das Ziel ist hierbei für ein Molekül eine positive, für das andere eine negative Differenz zu erhalten. Das Produkt in Gleichung (6.3) wird dabei negativ und somit immer kleiner, je größer die Beträge der beiden Differenzen werden. Somit ist sie für Optimierungsalgorithmen, welche ein Minimum anstreben, geeignet.

In Abbildung 6.5 ist das Ergebnis der Optimierung, wieder mit den modellierten Suszeptibilitäten $\chi_{1,2}^{(3)}(\Omega)$ aus Tabelle 6.1, gezeigt. Es ist zu erkennen, dass für die simulierte Suszeptibilität $\chi_1^{(3)}$ im Integrationsbereich bei $\omega_{g,1}$ ein Minimum und in dem bei $\omega_{g,2}$ ein Maximum entsteht. Dies entspricht einem negativen ersten Faktor in der Zielfunktion in Gleichung (6.3). Für die Suszeptibilität $\chi_2^{(3)}$ verhält es sich genau umgekehrt: Das Maximum befindet sich bei $\omega_{g,1}$ und das Minimum bei $\omega_{g,2}$. Damit ist maximaler Kontrast zu erreichen, wenn die Differenzen der CARS-Signale bei $\omega_{g,1}$ und $\omega_{g,2}$ aufgetragen werden.

Die Optimierung der Zielfunktion in Gleichung (6.3) mit dem Downhill-Simplex-Algorithmus erfolgte ohne Kenntnis des zugrundeliegenden physikalischen Mechanismus. Es ist allerdings sehr aufschlussreich und interessant die erhaltene Anregungsphase dahingehend zu untersuchen. Zunächst fällt auf, dass die Korrekturphase in Abbildung 6.5 einen weitgehend konstanten Verlauf und nur an einigen Stellen deutliche Peaks und Dips aufweist.

Der Effekt ist in den Abbildungen 6.6 und 6.7 erklärt. Die spektrale Position jedes Peaks und Dips in der Anregungsphase lässt sich einer Differenz zwischen einem der Integrationsbereiche $\omega_{g,1}$ bzw. $\omega_{g,2}$ und den Resonanzen der Suszeptibilitäten $\chi_1^{(3)}(\Omega)$ bzw. $\chi_2^{(3)}(\Omega)$ zuordnen. Abbildung 6.6 illustriert den Fall für Molekül 1. Der Peak bei 12445cm^{-1} bildet die Resonanz $\Omega_{1,1} = 2885\text{cm}^{-1}$ (vgl. Tabelle 6.1) in den Integrationsbereich $\omega_{g,1} = 15330\text{cm}^{-1} = 12445\text{cm}^{-1} + 2885\text{cm}^{-1}$ ab. Ebenso bildet der Peak bei 13800cm^{-1} die Resonanz $\Omega_{1,2} = 1530\text{cm}^{-1}$ in den Integrationsbereich $\omega_{g,1}$ ab.

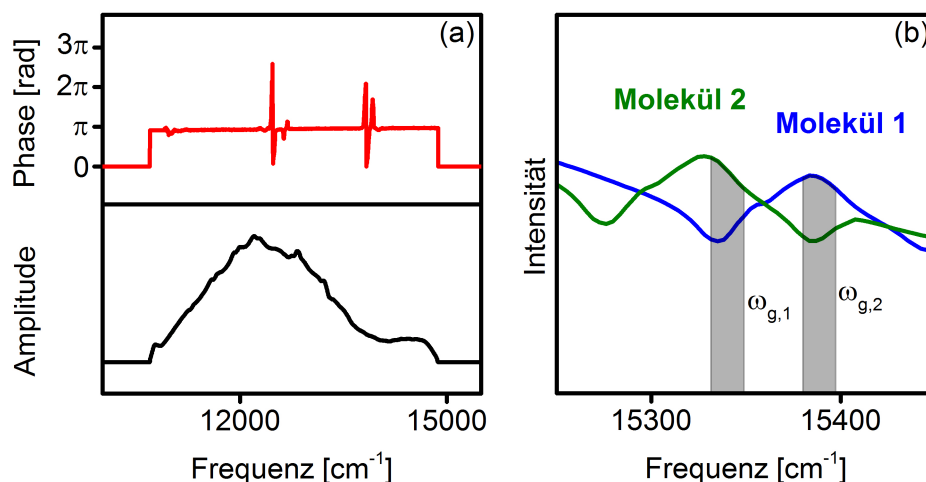


Abbildung 6.5.: Ergebnis der Optimierung für die Zielfunktion mit zwei Integrationsbereichen. (a) Anregungsamplitude mit optimierter Phase. (b) CARS-Intensitäten. Die restlichen Parameter entsprechen der Simulation aus Abbildung 6.4.

Die Dips in der Anregungsphase bei 12495cm^{-1} und 13850cm^{-1} hingegen bilden die beiden Resonanzen $\Omega_{1,1}$ bzw. $\Omega_{1,2}$ in den Integrationsbereich $\omega_{g,2} = 15380\text{cm}^{-1} = 12495\text{cm}^{-1} + 2885\text{cm}^{-1} = 13850\text{cm}^{-1} + 1530\text{cm}^{-1}$ ab und erzeugen destruktive Interferenz. Dadurch entsteht ein Dip im CARS-Spektrum. Dies erfüllt genau die Forderung der Zielfunktion in Gleichung (6.3).

In Abbildung 6.7 ist der Fall für Molekül 2 gezeigt. Die Diskussion verläuft hier vollkommen analog. Der Unterschied ist jedoch, dass im Integrationsbereich $\omega_{g,1}$ destruktive, und im Integrationsbereich $\omega_{g,2}$ konstruktive Interferenz erzeugt wird. Die Differenz der CARS-Intensitäten in den beiden Integrationsbereichen

$$\Delta I_{CARS} = I_{CARS}(\omega_{g,1}) - I_{CARS}(\omega_{g,2})$$

hat für Molekül 1 also ein positives und für Molekül 2 ein negatives Vorzeichen. Dies entspricht einer binären Zuordnung und damit dem maximal erreichbaren Kontrast.

Diese Phasenfunktion wurde ohne jegliche Einschränkungen vom Optimierungsalgorithmus gefunden, entspricht aber im Wesentlichen dem Verfahren des *All optical processing*, welches von der Silberberggruppe in [142] vorgestellt wurde. Bei der Optimierung, wie sie in dieser Arbeit gezeigt ist, wird darüber hinaus aber der optimale Phasenverlauf

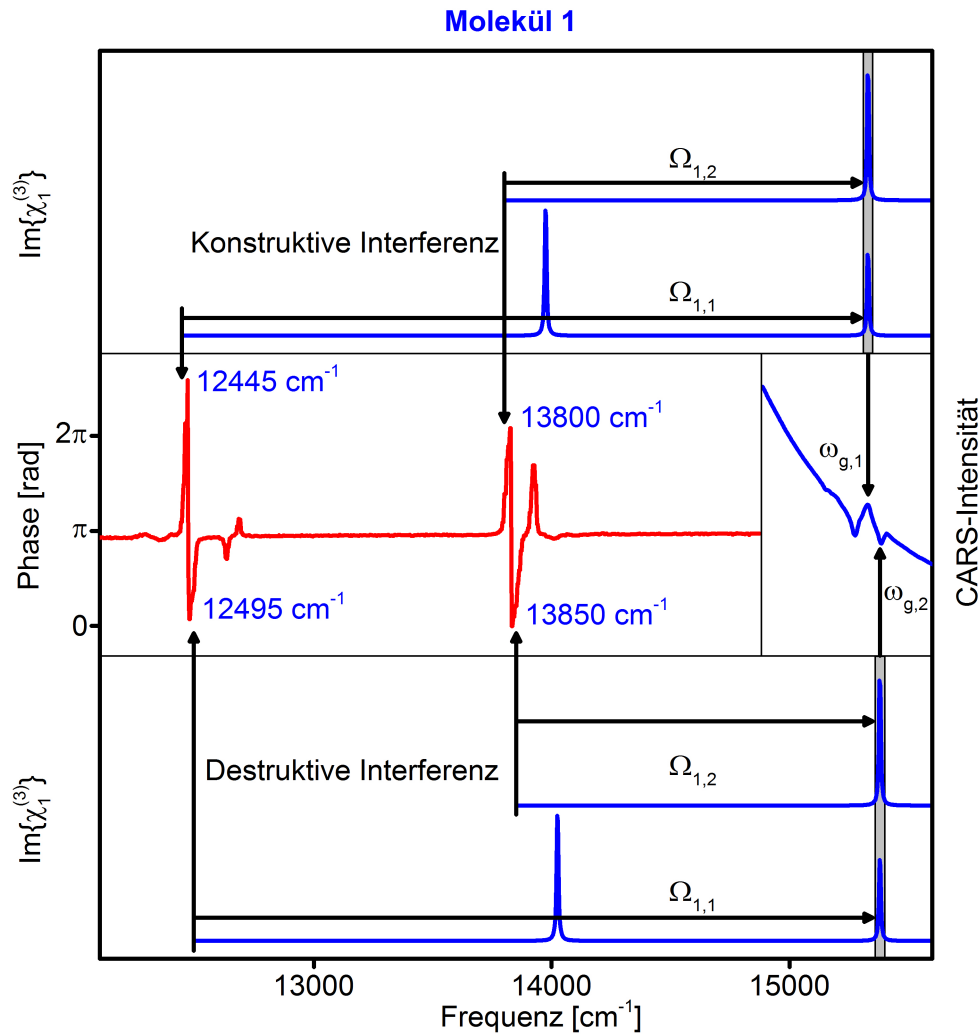


Abbildung 6.6.: Wirkungsweise der optimierten Anregungsphase aus Abbildung 6.5 im Falle von Molekül 1. Die Peaks bei 12445 cm^{-1} und 13800 cm^{-1} bilden die Resonanzen $\Omega_{1,1} = 2885 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $\Omega_{1,2} = 1530 \text{ cm}^{-1}$ in den Integrationsbereich $\omega_{g,1} = 15330 \text{ cm}^{-1}$ ab. Es entsteht konstruktive Interferenz, was sich in einem Peak im CARS-Spektrum zeigt. Die Dips bei 12495 cm^{-1} und 13850 cm^{-1} bilden die Resonanzen des Moleküls 1 in den Integrationsbereich $\omega_{g,2} = 15380 \text{ cm}^{-1}$ ab, wobei destruktive Interferenz entsteht. Die Frequenzachse gilt für die gesamte Abbildung.

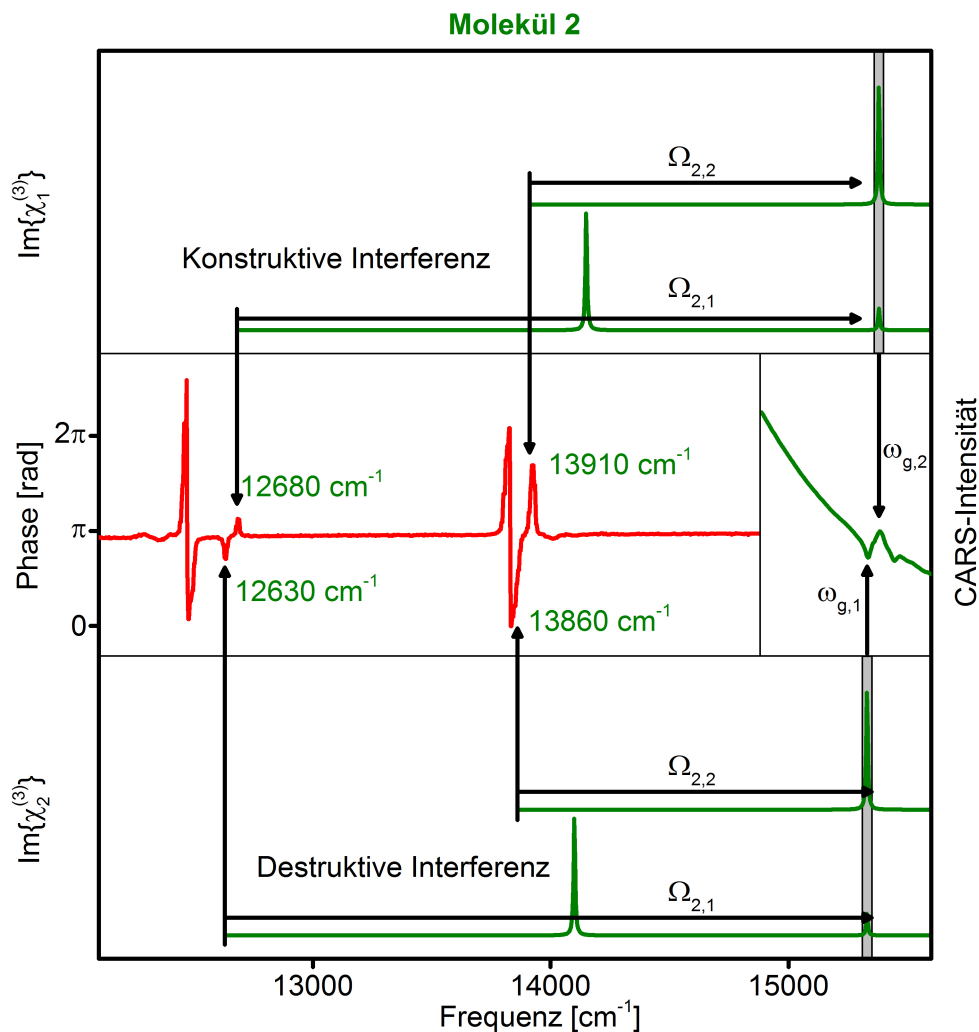


Abbildung 6.7.: Wirkungsweise der optimierten Anregungsphase aus Abbildung 6.5 im Falle von Molekül 2. Die Peaks bei 12680cm^{-1} und 13910cm^{-1} bilden die Resonanzen $\Omega_{2,1} = 2700\text{cm}^{-1}$ bzw. $\Omega_{2,2} = 1470\text{cm}^{-1}$ in den Integrationsbereich $\omega_{g,2} = 15380\text{cm}^{-1}$ ab. Es entsteht konstruktive Interferenz, was sich in einem Peak im CARS-Spektrum zeigt. Die Dips bei 12630cm^{-1} und 13860cm^{-1} bilden die Resonanzen des Moleküls 2 in den Integrationsbereich $\omega_{g,1} = 15330\text{cm}^{-1}$ ab, wobei destruktive Interferenz entsteht. Die Frequenzachse gilt für die gesamte Abbildung.

der Peaks und Dips und nicht nur deren Position bestimmt. Die Anregungsphase wird also tatsächlich maßgeschneidert.

Die Betrachtung hier erfolgte für zwei Moleküle mit zwei Integrationsbereichen. Es wurden die Differenzen $D_{1,2} = S(\omega_{g,1}) - S(\omega_{g,2})$ und $D_{2,1} = S(\omega_{g,2}) - S(\omega_{g,1})$ gebildet. Interessant ist weiterhin die Frage, wie sich die Anzahl unterscheidbarer Moleküle in Abhängigkeit der Integrationsbereiche ändert. Durch Einführung eines dritten Integrationsbereiches $\omega_{g,3}$ lassen sich bereits sechs Differenzen bilden ($D_{1,2}$, $D_{1,3}$, $D_{2,1}$, $D_{2,3}$, $D_{3,1}$ und $D_{3,2}$). Allgemein formuliert lassen sich für n Integrationsbereiche $n \cdot (n - 1)$ Differenzen bilden, was die Unterscheidung sehr vieler Komponenten ermöglicht. Eine Grenze dürfte jedoch der minimale Abstand sein, welchen die Integrationsbereiche haben dürfen. In dieser Simulation waren es 50cm^{-1} . Allgemein dürfte die Ramanlinienbreite ein guter Anhaltspunkt sein, jedoch wären systematische Untersuchungen hierzu notwendig.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Zum Ende soll in diesem Kapitel eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit erfolgen. Dabei liegt das Augenmerk auf einem Vergleich der verschiedenen entwickelten Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden. Die Frage inwieweit konventionelle Konzepte nachgebildet werden können, ist dabei zentral. Anschließend werden mögliche weitere Anwendungen der Lichtquelle, bestehend aus Laseroszillator und Impulsformer, betrachtet und konkrete Anregungen für Weiterentwicklungen des Experiments gegeben, um die Messwertaufnahme zu beschleunigen.

Nach einer kurzen Behandlung wie der Ansatz der *in silico*-Optimierung in die Praxis überführbar wäre, endet die Arbeit mit einer Schlussbetrachtung.

7.1. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über nichtlineare optische Mikroskopie mit geformten Femtosekundenlaserimpulsen mit dem Ziel der Spektroskopie und Bildgebung.

Insbesondere wurden neue Konzepte zur Single-Beam-CARS Mikrospektroskopie und -Mikroskopie entwickelt und im Detail untersucht. Die beiden Ansätze der *Kontrolle der Anregung* und des *Multiplexing* wurden gegenüber gestellt.

Als Vertreter der Kontrolle der Anregung wurde in Abschnitt 4.1 der *b-Scan* in Simulation und Experiment vorgestellt. Mit ihm ist die Aufnahme vollständiger Ramanspektren möglich, indem die Anregung der Schwingungsfrequenzen des Moleküls moduliert wird. Jede Resonanz liefert dabei einen charakteristischen Beitrag zum Signal, welcher durch eine Fouriertransformation identifiziert werden kann. Bemerkenswert ist hierbei, dass spektrale Information erhalten wird, obwohl die Messung des Signals einkanalig erfolgt. Im Aufbau, der im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist, wurde erstmals das Ziel erreicht, CH-Schwingungen im Bereich von 3000cm^{-1} mit dieser Methode zu detektieren. Dies ist enorm wichtiger Spektralbereich, der bei den allermeisten kohärenten Ramanmikroskopiemethoden im Mittelpunkt des Interesses steht. Ferner wurde durch die erfolgreiche Messung der CH-Schwingung gezeigt, dass eine hochflexible, breitbandige, kohärente

7. Zusammenfassung und Ausblick

Lichtquelle zur Verfügung steht, die eine Vielzahl von Experimenten erlaubt. Neben den gezeigten Spektroskopiemethoden ist sogar denkbar, weitere Funktionen zu integrieren (vgl. Abschnitt 7.2).

Einen sehr wichtigen Teil dieser Arbeit stellte die Weiterentwicklung der Multiplex-Methode für Single-Beam-CARS dar. In Abschnitt 4.2 wurde die zugrundeliegende Theorie vorgestellt und das Konzept des *Dual Quadrature Spectral Interferometry (DQSI)-CARS* erarbeitet und experimentell demonstriert.[143] Durch Aufnahme von vier Spektren und Normierung mit einer Messung in einer nichtresonanten Probe kann mit dieser Methode in kurzer Zeit die Suszeptibilität $\chi^{(3)}$ in Amplitude und Phase bestimmt werden.[144] Der Informationsgehalt entspricht damit demjenigen spontaner Ramanmessungen.

In Abschnitt 4.2.4 wurde untersucht, inwiefern die DQSI-Methode geeignet ist unerwünschte Zweiphotonenfluoreszenz (2PEF) zu unterdrücken. Es zeigte sich, dass bei starker 2PEF ein Anteil derselben im verarbeiteten Signal erhalten bleibt. Der Grund hierfür ist, dass die Zweiphotonenabsorption durch die DQSI auf dieselbe Art moduliert wird wie das Signalfeld, das gemessen werden soll. Es wurden zwei Methoden (*Verschieben der Phase* und *Verschieben der Position des Gates*) vorgestellt, mit denen eine Kompensation eines 2PEF-Signals, das um einen Faktor 160 stärker ist als das CARS-Signal selbst, ermöglicht wird.[145]

In Kapitel 5 wurden die Möglichkeiten, Single-Beam-CARS für die Bildgebung zu verwenden, behandelt. Neben dem in Abschnitt 5.1.1 vorgestellten partiellen b-Scan stellen *Spectral Focusing* und *Binary Phase Shaping* interessante Ergänzungen dar. Sie waren zwar nicht Gegenstand dieser Arbeit, sind aber die geeignetsten Ansätze zur Bildgebung mit Kontrolle der Anregung. Sie stellen eine Entsprechung herkömmlicher Narrowband-CARS-Experimente dar und werden daher hier diskutiert.

Die Verwendung eines festen Phasengates zur Erzeugung von Multiplex-Single-Beam-CARS-Spektren in Verbindung mit einer *k-means-Cluster*-Klassifizierung wurde in Abschnitt 5.2 demonstriert. Die räumliche Struktur eines Polymerblends wurde ohne jegliches Vorwissen auf Basis chemischer Informationen erhalten. Die zugrundeliegende Theorie wurde ausführlich behandelt und ein Wert von $\phi = \pi$ als ideal für das Phasengate identifiziert.

Die beiden Ansätze *Multiplexing* und *Kontrolle der Anregung* weisen im Hinblick auf ihre Anwendungen in Spektroskopie und Bildgebung jeweils bestimmte Vor- und Nachteile auf. Die DQSI-Multiplex-Methode (Abschnitt 4.2.3) erlaubt eine vollständige Charakterisierung der Suszeptibilität mit nur vier Messungen. Auch wenn eine spektral auf-

gelöste Detektion notwendig ist, stellt sie damit ein schnelles Spektroskopieverfahren dar. Insgesamt ist es die geeignetste Methode zur Single-Beam-CARS-Mikrospektroskopie.

Die Bildgebung mittels eines festen Phasengates und anschließender Klassifizierung (Abschnitt 5.2.2) hat den Vorteil, dass unbekannte Proben untersucht werden können. Die spektrale Auflösung des Signals erfordert jedoch lange Aufnahmezeiten. Hinzu kommt, dass die nachträgliche Klassifizierung verhältnismäßig lange dauert, so dass diese Methode vor allem für vollkommen unbekannte Proben geeignet ist. Eine interessante Fragestellung für zukünftige Arbeiten ist, inwieweit Datenbanken mit Single-Beam-CARS-Spektren angelegt werden können, so dass die Mittelwertspektren einer Klasse nicht für jedes Bild neu bestimmt werden müssen, sondern ein Vergleich mit vorhandenen Daten möglich ist. Hierzu ist jedoch zu klären, inwiefern leichte Variationen des Laserspektrums das Single-Beam-CARS-Spektrum beeinflussen.

Die zuvor behandelten *b*-Scans (Abschnitt 4.1) ermöglichen Spektroskopie mit der Kontrolle der Anregung. Durch die lange Aufnahmedauer, sind sie jedoch für die Bildgebung ungeeignet. Bemerkenswert ist hingegen, dass Schwingungsspektren erhalten werden, deren spektrale Auflösung einzig und allein durch jene des Impulsformers bestimmt ist.

Für die Bildgebung ist die Kontrolle der Anregung, in Form des, in [93] gezeigten Spectral Focusing, sehr interessant. Abgesehen davon, dass bekannt sein muss welche Bande angeregt werden soll, werden hier auf einfache und schnelle Weise Bilder in Einkanal-detektion erhalten, welche keiner weiteren Auswertung bedürfen.

Die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden vor dem Hintergrund ihrer jeweiligen Anwendungen sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Das Kapitel 6 in dieser Arbeit stellt ein neues Konzept für die gezielte Detektion bestimmter Moleküle vor. Die nächstliegende Annahme war hier zunächst die *Kontrolle der Anregung*. Das Ergebnis der numerischen Optimierung hat allerdings eine ganz andere Möglichkeit aufgezeigt. Es hat sich herausgestellt, dass ein *Multiplex*-Ansatz geeigneter ist. Es werden dabei Beiträge aller Resonanzen in einen spektralen Bereich abgebildet, was dem Ansatz des *all-optical processing* entspricht.[142] Daher wurde ein Konzept entwickelt, mit dem durch Zweikanal-detektion eine sichere Zuordnung möglich ist. Dies würde eine Implementation des *Shaper-assisted Multiplex (SAM)-CARS* in einer Single-Beam-Variante darstellen.[146] Damit wäre eine weitere anspruchsvolle Methode in das Single-Beam-CARS-Experiment integriert. Die auf diese Weise maßgeschneiderte Anregung hätte gegenüber dem Spectral Focusing-Ansatz zum einen den Vorteil, dass zugleich mehrere Banden auf einmal abgefragt werden können. Zum anderen sind die

7. Zusammenfassung und Ausblick

Signalstärken deutlich höher, da hier nach wie vor ein *lokaler Oszillator* erzeugt wird. Bei Verfahren, welche auf der Kontrolle der Anregung basieren, ist dieser sehr stark abgeschwächt, womit die Signalstärken deutlich reduziert sind. Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Ansatz wäre hier sicher eine wertvolle Alternative.

Für die effiziente numerische Optimierung ist im Rahmen dieser Arbeit ein Simulationspaket in LabVIEW entstanden, welches durch geschickte Umformulierung der beschreibenden Gleichungen und der Verwendung schneller Fouriertransformationen (FFTs) eine Steigerung der Berechnungsgeschwindigkeit um etwa zwei Größenordnungen gegenüber dem zuvor vorhandenen Programm aus [83] erreicht. Die Funktionsweise ist in Anhang B beschrieben. Dieses Simulationspaket ist ein wichtiger Bestandteil zum schnellen Auffinden optimaler Anregungsphasen mit Suchalgorithmen.

7.2. Mögliche weitere Anwendungen der Lichtquelle

Durch die erfolgreiche Messung der CH-Schwingung wurde gezeigt, dass mit der Kombination aus Ti:Sa-Oszillator und Impulsformer eine hochflexible, breitbandige, kohärente Lichtquelle zur Verfügung steht, die eine Vielzahl von Experimenten erlaubt. Neben den hier gezeigten Spektroskopiemethoden ist denkbar, viele weitere Funktionen zu integrieren. Als Beispiele seien hier genannt:

Mikrochirurgische Funktionen: Ziel der vorgestellten Spektroskopiemethoden ist unter anderem Gewebe als krank, z.B. tumorös, zu identifizieren. Es ist denkbar durch entsprechende Formung der Laserimpulse dieses Gewebe dann gezielt und punktgenau zu entfernen oder zu zerstören.

Therapeutische Funktionen: In [147] wurde untersucht, wie die Freisetzung von medizinischen Wirkstoffen durch Zweiphotonenabsorption erfolgen kann. Geformte Impulse sind hierzu ein sehr gut geeignetes Werkzeug. Denkbar ist etwa bei Operationen bereits einen Wirkstoff in den Körper einzubringen, welcher erst durch einen entsprechend geformten Laserimpuls aktiviert wird. Auch hier ist die Kombination mit mikrospektroskopischen Methoden besonders reizvoll.

Weitere Spektroskopie- und Mikroskopiearten: In [148] ist beschrieben, wie die *Laseremissionsspektroskopie (Laser induced Breakdown Spectroscopy (LIBS))*[149] mit geformten Laserimpulsen verbessert werden kann. Dabei wird mit einem ersten Impuls ein Plasma gezündet, welches, dann durch weitere Impulse angeregt werden kann. Auch das Konzept des *Spectral Hole Refilling*[128, 129] kann problemlos

Tabelle 7.1.: Vor- und Nachteile der beiden Ansätze Phasengate und Kontrolle der Anregung für Spektroskopie und Bildgebung.

Spektroskopie	Bildgebung
Multiplexing: DQSI	Multiplexing: k-means-Clustering
<ul style="list-style-type: none"> • hoher Informationsgehalt (+) • schnell (+) • spektrale Detektion (-) 	<ul style="list-style-type: none"> • kein Vorwissen erforderlich (+) • spektrale Detektion (-) • lange Auswertung (-)
Kontrolle der Anregung: b-Scan	Kontrolle der Anregung: spektrale Fokussierung
<ul style="list-style-type: none"> • Einzelkanaldetektion (+) • lange Messdauer (-) 	<ul style="list-style-type: none"> • Einzelkanaldetektion (+) • schnelle Messung (+) • keine weitere Auswertung erforderlich (+) • Vorwissen notwendig (-)

7. Zusammenfassung und Ausblick

mit diesem Aufbau umgesetzt werden. Ferner ist Zweiphotonenfluoreszenz- und SHG-Mikroskopie mit dem bestehenden Aufbau direkt möglich.[93]

Standoff-Anwendungen: Die gezeigten Methoden sind nicht auf die Mikroskopie beschränkt, sondern können prinzipiell auch in Standoff-Varianten[150–153] verwendet werden, etwa in der Sicherheitstechnik [154] oder der Untersuchung von Verbrennungsprozessen.[155, 156]

Die vorstehende Liste ist kann keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben. Es sind zahlreiche weitere Anwendungsgebiete, von der Plasmonik [157, 158] bis hin zur ultraschnellen Datenübertragung [159, 160] denkbar.

7.3. Impulsformungskonzepte

Die Spektroskopiemethoden, welche auf der Einführung eines Phasengates basieren und in den Abschnitt 4.2.3 und 4.2.4 beschrieben sind, liefern ein hohes Maß an Information. Allerdings wird jeweils noch eine Änderung der Anregungsphase zwischen verschiedenen Messungen benötigt, was den Messvorgang verlangsamt. Um mit gängigen Schwingungsspektroskopiemethoden wie spontanen Ramanmessungen konkurrieren zu können, ist es erforderlich das Umschalten der Phasenfunktionen an der Flüssigkristallmaske zu beschleunigen.

7.3.1. DQSI: Schnelle Messwertaufnahme

Eine Idee zur Beschleunigung der Messwertaufnahme, für die in Abschnitt 4.2.3 vorgestellte DQSI-Technik, ist das relativ langsame Umschalten der Flüssigkristallpixel zum Vorteil auszunutzen. Nimmt man, wie bisher, mehrere Spektren auf, indem man verschiedenen Phasen anlegt, wartet bis der Umschaltvorgang abgeschlossen ist und erst dann die Kamera ausliest, ergibt sich eine recht lange Messdauer. Ein Ansatz dies zu ändern, ist einmal über einen großen Phasenbereich (ca. 2π) zu wechseln und den Umschaltvorgang gewissermaßen mit zu verfolgen. Dieser liegt in der zeitlichen Größenordnung von etwa 30-50 Millisekunden und kann mit modernen CCD-Kameras ohne weiteres verfolgt werden. In [161] wird für die Phasenänderung während des Umschaltvorgangs näherungsweise folgende Gleichung angegeben:

$$\phi(t) = \phi_0 + (\phi_1 - \phi_0) \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}\right). \quad (7.1)$$

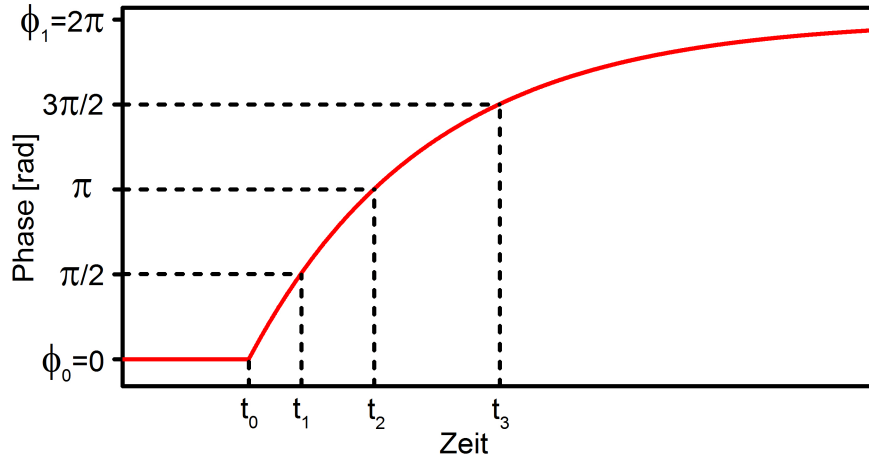


Abbildung 7.1.: Umschaltvorgang der Flüssigkristallmaske. Nach der Änderung der Spannung zur Zeit t_0 orientieren sich die Flüssigkristalle innerhalb einiger Millisekunden um. Während dieser ändert sich die Phase kontinuierlich.

Der zeitliche Verlauf der Phase beim Umschalten ist in Abbildung 7.1 gezeigt, wobei angenommen wurde, dass bei der Zeit t_0 von $\phi_0 = 0$ auf $\phi_1 = 2\pi$ gewechselt wurde. Die für DQSI notwendigen Phasen werden also im Bereich einiger Millisekunden durchlaufen. Die Zeit nach dem Umschalten Δt , bei der die Phase ϕ erreicht wird, errechnet sich zu

$$\Delta t = -\tau \ln \left(\frac{\phi_1 - \phi}{\phi_1 - \phi_0} \right). \quad (7.2)$$

Bis auf den experimentellen Parameter τ sind alle Größen bekannt, um die notwendigen Phasen $\pi/2$, π und $3\pi/2$ zu bestimmen. Der Parameter τ kann, ähnlich dem Vorgehen bei der Maskenkalibrierung (vgl. Anhang A), durch eine Transmissionsmessung mit gekreuzten Polarisatoren bestimmt werden.

Dieses Wissen lässt sich dann ausnutzen, um mit einer schnellen CCD-Kamera den Umschaltvorgang nachzuverfolgen. Eine vorhandene Kamera (Andor Newton) bietet die Möglichkeit im sogenannten *Fast kinetics mode* zu messen. Dabei wird nur ein Teil der Pixel beleuchtet und der Rest als Speicher verwendet. Aufnahmedauern bis hinab in den Mikrosekundenbereich sind so möglich.

7.3.2. Experimentelle Umsetzung einer schnellen spektralen Verschiebung des Phasengates

In Abschnitt 4.2.4 wurde als Methode zur Elimination von Zweiphotonenfluoreszenz das Verschieben eines Phasengates im Spektrum vorgestellt. Eine andere Möglichkeit zur Durchführung einer solchen Messung, ist nicht die Gateposition auf der Maske zu verschieben, sondern das Spektrum selbst und die Phasenfunktion an der Maske konstant zu lassen. In gewisser Hinsicht entspricht dieses Vorgehen demjenigen in [162]. Dort wurden auf einer zweidimensionalen Phasenmaske zwei verschiedene Muster räumlich übereinander geschrieben und der Strahl über einen galvanischen Scanner hin- und herbewegt. Das hier vorgeschlagene Verfahren ist in Abbildung 7.2 gezeigt und käme mit einer eindimensionalen Maske aus, an der ein Phasengate wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, angelegt wird. Der galvanische Scanner bewegt den Strahl dann nicht in vertikaler sondern in horizontaler Richtung. Dadurch verschiebt sich die relative spektrale Position des Gitters und eine schnelle Version des *Frequency modulation CARS* ist erreicht.[126, 127]

Die Anregung der Zweiphotonenfluoreszenz bleibt dabei unverändert und kann durch Subtraktion zweier Spektren mit verschiedenen Gatepositionen eliminiert werden. Dies entspricht dem Vorgehen, das in Abschnitt 4.2.4 beschrieben wurde.

7.4. Fokuskorrektur und Epi-Single-Beam-CARS

In Abschnitt 3.3 wurde, im Zusammenhang mit der zeitlichen und räumlichen Impulskorrektur, der Einsatz eines adaptiven Spiegels vorgestellt. Bislang wurde die Form des Fokusspots optimiert. Interessant ist hier der Ansatz das CARS-Signal selbst als Optimierungsgröße zu verwenden. Damit ist eine Korrektur direkt im Experiment möglich und außerdem in Kombination mit der zeitlichen Korrektur durch den Impulsformer. Damit können auftretende Raum-Zeit-Kopplungen [28] kompensiert werden. Es ist dadurch eine deutliche Verbesserung hinsichtlich Auflösung und Signalintensität zu erwarten.

Ein nächster Schritt könnte dann sein mit dem verbesserten Fokalspot zu untersuchen inwieweit Single-Beam-CARS mit einer Detektion in Rückwärtsrichtung (*Epi-CARS*) möglich ist.[163] Dies würde den Einsatzbereich dieser Methode deutlich erweitern und wäre insbesondere für medizinische Anwendungen sehr interessant. Ein großes Ziel ist hier Bilder *in vivo* aufzunehmen, was Epi-Detektion erst möglich würde.

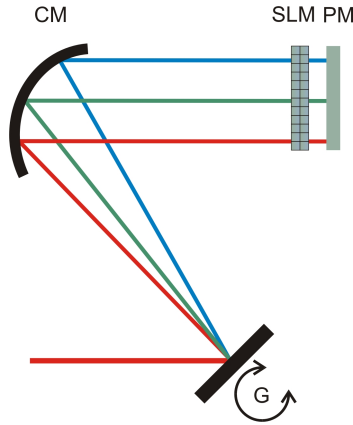


Abbildung 7.2.: Aufbau zur schnellen Phasengateverschiebung. Das Beugungsgitter (G) im Fokus des zylindrischen Spiegels (CM) wird schnell um einen kleinen Winkel gedreht. Das Spektrum wird dadurch über die Flüssigkristallmaske (SLM) verschoben und über einen Planspiegel (PM) zurück reflektiert.

7.5. *In silico* Optimierung

Die in Kapitel 6 vorgestellte *in silico* Optimierung ist noch an einer realen Probe zu demonstrieren. Dies ist vielleicht eine der bedeutendsten Fragen, welche diese Arbeit hinterlässt, weil damit eine schnelle Bildgebung möglich wäre, die gleichzeitig maximalen Kontrast liefert. In [83] wurde das Konzept vorgestellt, Anregungsphasen für einzelne Probenbestandteile zu optimieren. Die Simulationen in Kapitel 6 sind ein Schritt zur Beantwortung der offenen Frage, wie eine solche Optimierung erfolgen kann. Durch das Konzept die Resonanzen der untersuchten Moleküle gezielt in bestimmte Spektralbereiche zu kodieren, wird erstmals eine konkrete Herangehensweise für eine schnelle, kontrastreiche, chemisch selektive Bildgebung für Single-Beam-CARS aufgezeigt.

Zur Umsetzung dieser Methode im Experiment ist im Wesentlichen eine Herausforderung zu meistern: Es ist ein Weg zu finden, die Suszeptibilitäten der betrachteten Proben zu erhalten. Dazu ist entweder die DQSI-Methode aus Abschnitt 4.2.3 dahingehend weiter zu entwickeln, dass die Photozerstörung weitgehend vermieden wird. Alternativ ist eine Extraktion basierend auf spontanen Ramandaten durchzuführen. Eine Möglichkeit hierzu ist eine Anpassung gemäß der Beziehung

$$I_{Raman}(\omega) = \text{Im} \{ \chi^{(3)}(\omega - \omega_p) \} \quad (7.3)$$

und der Annahme von Lorentz-Oszillatoren nach Gleichung (2.46). [136, 137]

7.6. Schlussbetrachtung

Abschließend lässt sich festhalten, dass Single-Beam-CARS, durch die intrinsische Erzeugung eines *lokalen Oszillators* und die Möglichkeit einer gezielten *Anregung* bestimmter Banden, ein breites Spektrum an Experimenten erlaubt, welche ansonsten in verschiedenen komplizierten Aufbauten realisiert werden müssten. So sind in Abbildung 7.3 dieselben Konzepte mit dem Single-Beam-Ansatz realisiert worden wie in Abbildung 1.2 in der Einleitung. Der bemerkenswerte Unterschied ist jedoch, dass alle Experimente dieser Arbeit (und noch weitere) mit demselben Aufbau entstanden sind, der in Abbildung 1.3 in der Einleitung gezeigt ist. Der Wechsel zwischen verschiedenen Experimenten erfolgt also rein softwarebasiert. Der Unterschied aus Sicht des Anwenders besteht lediglich in einem Wechsel der Phasenfunktion. Mit einer erfolgreichen Umsetzung des Konzeptes der numerisch optimierten Anregung aus Kapitel 6 könnte das Schema in Abbildung 7.3 um die Entsprechung von *SAM-CARS* [146], eines weiteren experimentell höchst anspruchsvollen Aufbaus, erweitert werden. Zusätzlicher würde sogar noch ein *lokaler Oszillator* erzeugt. Damit wäre der Reiz des Single-Beam-Ansatzes nicht nur viele Experimente in einem Aufbau umzusetzen. Es würde eine Art der Bildgebung mit maßgeschneiderten Anregungsphasen möglich, die bislang nicht existiert.

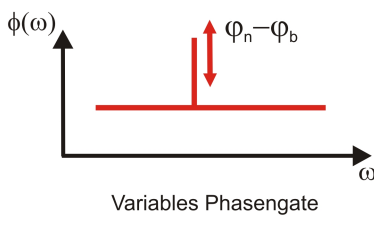
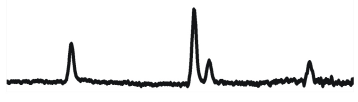
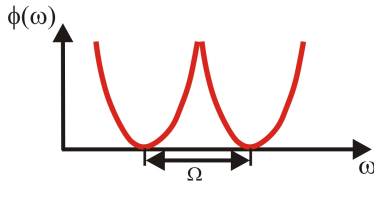
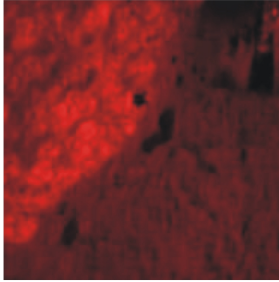
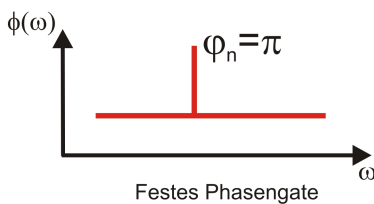
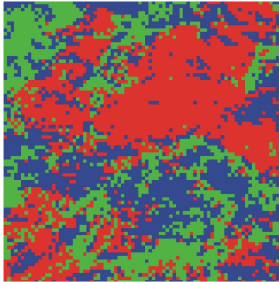
Anwendung	Phase des spektralen Anregungsfeldes	Beispiel
Mikrospektroskopie	 <p>Variables Phasengate</p>	 <p>Raman äquivalentes Spektrum von Toluol</p>
Schnelle chemisch selektive Bildgebung bekannter Proben	 <p>Spectral focusing</p>	 <p>Tumorgewebe in einem Mäusehirn</p>
Chemisch selektive Bildgebung unbekannter Proben	 <p>Festes Phasengate</p>	 <p>Polymerblend</p>

Abbildung 7.3.: Konzepte der multimodalen nichtlinearen Mikroskopie im Hinblick auf ihre Anwendung. Durch die in dieser Arbeit entwickelte DQSI-CARS-Methode können Ramanäquivalente Spektren aufgenommen werden. Bereits in [93] wurde eine impulsformerbasierte Methode des Spectral Focusing entwickelt, die konventionelle CARS-Messungen nachbildet und schnelle Bildgebung erlaubt. Das Bild des Mäusehirns ist aus der genannten Quelle übernommen. In dieser Arbeit wird die Palette der Verfahren um eines erweitert, welches die chemisch selektive Bildgebung unbekannter Proben erlaubt.

Anhang

A. Kalibrierung der Flüssigkristallmaske

Die Kalibrierung der Flüssigkristallmaske ist der entscheidende Punkt zur erfolgreichen Umsetzung der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente. Sowohl die Zuordnung der an den Pixeln angelegten Spannung zur resultierenden Phase, als auch die Kalibrierung hinsichtlich der Wellenlänge, welche durch die jeweiligen Pixel transmittiert wird, ist von großer Bedeutung.

Der Aufbau ist für beide Kalibrierungen identisch und in Abbildung A.1 gezeigt. Der Impulsformer befindet sich dabei zwischen zwei gekreuzten Polarisatoren. Die Detektion des Signals erfolgt mittels eines Spektrometers. Die notwendigen Messungen und Auswertungen sind nachfolgend dargestellt. Der vorliegende Anhang soll dabei als Anleitung für zukünftige Arbeiten an diesem Experiment dienen. Für eine theoretische Behandlung des Themas sei an die entsprechende Literatur verwiesen.[27–29, 164]

A.1. Zuordnung Spannung-Phase

Die Pixel des räumlichen Lichtmodulators SLM 640d von Jenoptik, der in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzen transparente Elektroden, welche es erlauben Spannun-

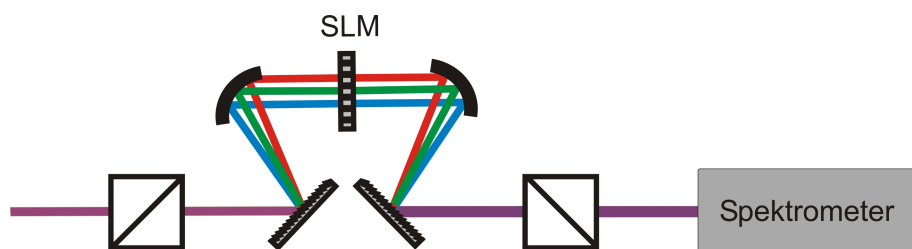


Abbildung A.1.: Aufbau zur Kalibrierung der Flüssigkristallmaske. Der Eingangspolarisator ist üblicherweise nicht notwendig, da der Laserstrahl bereits in dieser Richtung polarisiert ist.

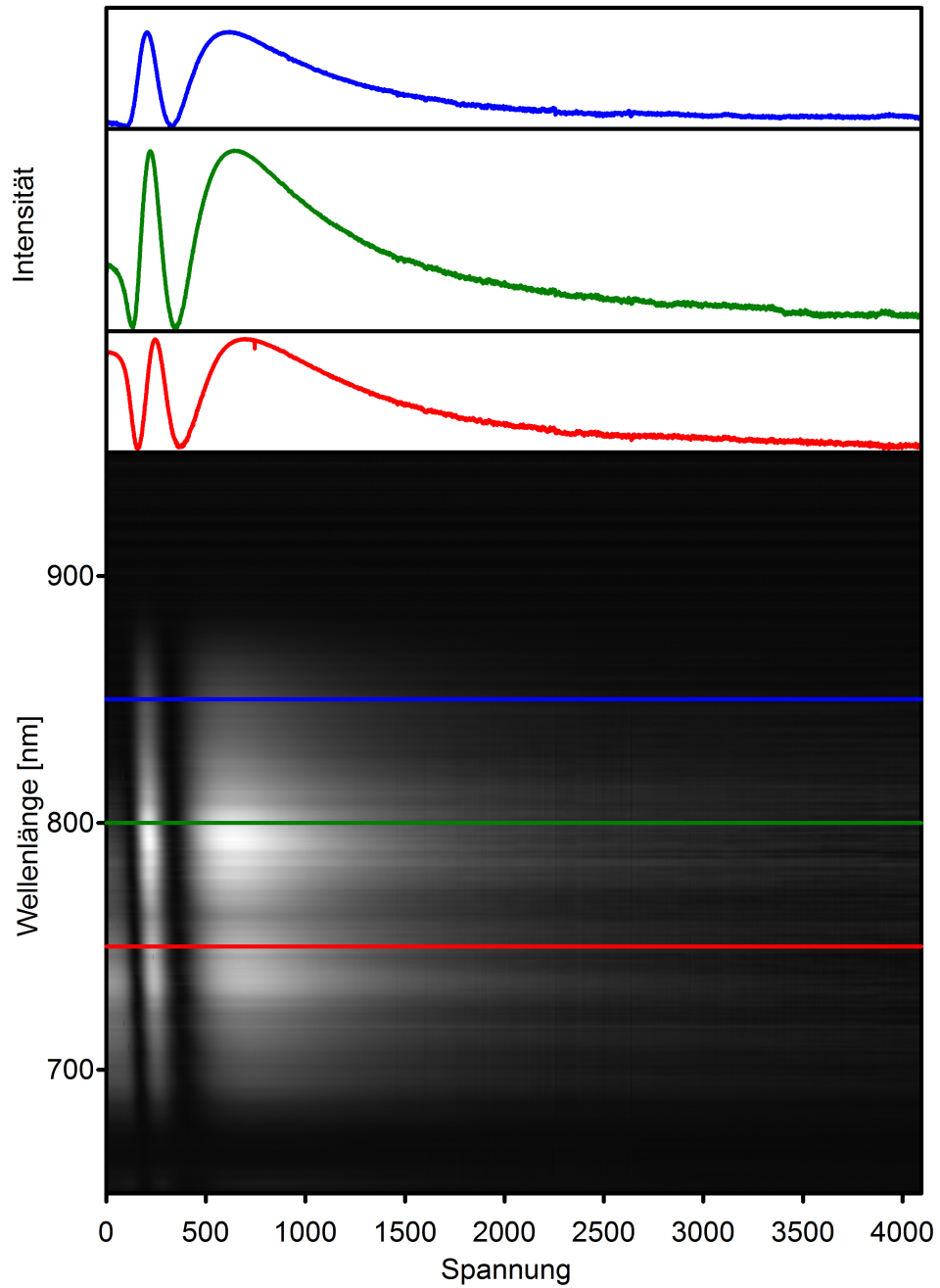


Abbildung A.2.: Kalibrierung der Spannungsabhängigkeit der Phase. Die Messung kann jeweils nur für eine Teilmaske gleichzeitig ausgeführt werden. Die andere ist währenddessen auf maximaler Spannung zu halten. Die Transmission variiert in Abhängigkeit von Wellenlänge und angelegter Spannung. Die Längsschnitte zeigen die Intensitätsabhängigkeit der Transmission bei 750 nm (rot), 800 nm (grün) und 850 nm (blau).

gen anzulegen, um die Flüssigkristalle zu neigen und damit die Phasenverschiebung zwischen ordentlichem und außerordentlichem Teilstrahl zu variieren. Wie stark diese Phasenänderung ist, kann nicht von vornherein analytisch vorgesagt werden, insbesondere, da das Verhalten der Flüssigkristalle stark temperaturabhängig ist. Aus diesem Grund ist eine Kalibrierung im bestehenden Experiment notwendig. Hierzu wird die Flüssigkristallmaske zwischen zwei gekreuzten Polarisatoren angebracht bzw. am Eingang Laserlicht verwendet, dessen elektrisches Feld senkrecht zum Ausgangspolarisator schwingt. Die optische Achse der Flüssigkristalle nimmt dabei sowohl zum Eingangs- als auch zum Ausgangspolarisator einen Winkel von 45° ein. Die Eingangsfeldamplitude

$$E_{in}(t) = E_{in,0} \sin \omega t$$

wird also zu gleichen Teilen in ordentlichen und außerordentlichen Teilstrahl aufgespalten

$$E_{1,in}(t) = E_{2,in}(t) = \frac{E_{in}}{\sqrt{2}}.$$

Beim Durchlaufen der Maske erfährt $E_2(t)$ eine Phasenverschiebung um ϕ gegenüber $E_1(t)$. Am Ausgang überlagern sich beide Teilstrahlen wieder und sind linear, zirkular oder elliptisch polarisiert. Für die Komponente des elektrischen Feldes in Richtung des Ausgangspolarisators gilt dann:

$$\begin{aligned} E_{out}(\phi, t) &= \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{E_{in,0}}{\sqrt{2}} \sin \omega t - \frac{E_{in,0}}{\sqrt{2}} \sin(\omega t + \phi) \right) \\ &= \frac{E_{in,0}}{2} (\sin \omega t - \sin(\omega t + \phi)). \end{aligned} \quad (\text{A.1})$$

Das Minuszeichen rührt daher, dass der Ausgangspolarisator um 90° gegenüber dem Eingangspolarisator geneigt ist. Durch Anwendung elementarer trigonometrischer Beziehungen lässt sich Gleichung (A.1) umformen zu

$$E_{out}(\phi, t) = -E_{in,0} \sin \frac{\phi}{2} \cos \left(\omega t + \frac{\phi}{2} \right). \quad (\text{A.2})$$

Da nur die Intensität gemessen werden kann, welche proportional zum Quadrat der Amplitude des Feldes ist, gilt

$$I(\phi) \propto I_0 \sin^2 \frac{\phi}{2}.$$

Betrachtet man die Periodizität von 2π und ferner, dass die Phasenänderung ϕ spannungsabhängig ist, ergibt sich der folgende Ausdruck

$$I(U) = I_0 \sin^2 \left(\frac{\phi(U)}{2} \pm k\pi \right). \quad (\text{A.3})$$

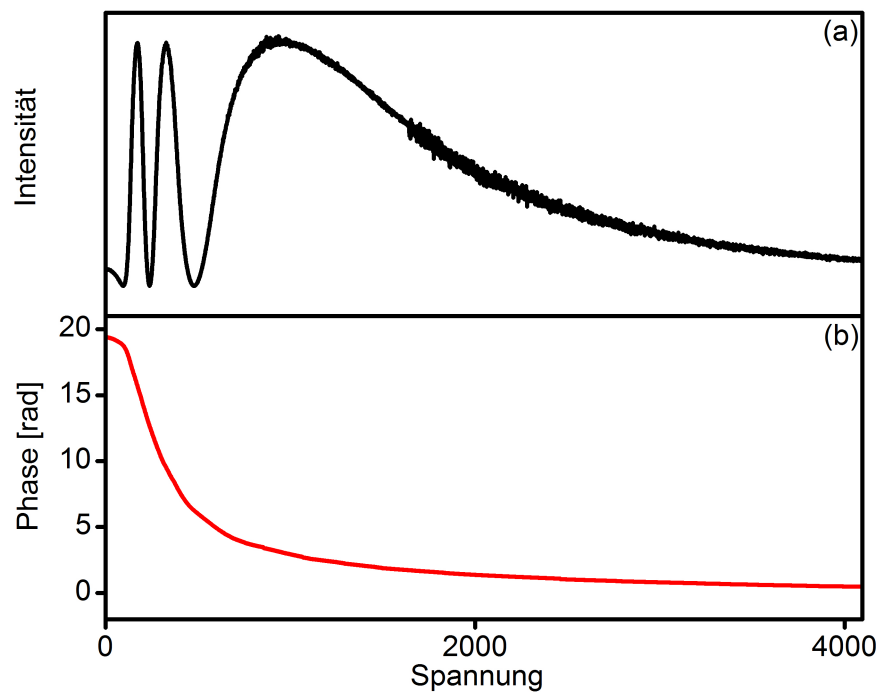


Abbildung A.3.: Extraktion der Phasen-Spannungs-Abhängigkeit. (a) Transmissionsmessung bei 633 nm. (b) Extrahierte Phasenabhängigkeit nach Gleichung (A.4).

Entsprechend lässt sich für Phase in Abhängigkeit von der Spannung der Ausdruck

$$\phi(U) = 2k\pi \pm 2 \arcsin \sqrt{\frac{I}{I_0}} \quad (\text{A.4})$$

formulieren. Mit der Flüssigkristallmaske wurde ein Programm geliefert,[33] welches automatisch die Phasenabhängigkeit berechnet und auch die verschiedenen Vorzeichen und mögliche Vielfache von π berücksichtigt.

In Abbildung A.2 ist die spektral aufgelöste Messung der Intensität in Abhängigkeit von der angelegten Spannung gezeigt. Die verwendete Maske erlaubt eine Variation der Spannung zwischen 0V und 5V, bzw. 0V und 8V, je nach Betriebsmodus. Der Digital-Analog-Wandler hat dabei eine Auflösung von 12 Bit, so dass 4096 verschiedene Spannungswerte angelegt werden können. Diese sind in Abbildung A.2 als Abszisse aufgetragen. Da es sich um eine Doppelmaske handelt, ist zu beachten, dass an der Maske, die gerade nicht kalibriert wird, die *maximale Spannung* anliegt. Dann sind die Flüssigkristalle so ausgerichtet, dass kein Phasenunterschied zwischen ordentlichem und außerordentlichem Teilstrahl auftritt. Die drei Längsschnitte in Abbildung A.2 zeigen die Wellenlängenabhängigkeit der transmittierten Intensität. Im Prinzip könnte für jede Wellenlänge Gleichung (A.4) ausgewertet und eine eigene Kalibrierungskurve erhalten werden. Allerdings benötigt dieser Ansatz in der späteren Verwendung zu viel Zeit, da in einer Look-up-Tabelle für jede Wellenlänge und jede Phase der Wert für die anzulegende Spannung gesucht werden müsste.

Als praktikabler hat sich herausgestellt die Wellenlängenabhängigkeit der Phasenänderung auf die Wellenlängenabhängigkeit der Brechzahldifferenz

$$\Delta n = \frac{\Delta n_\infty \lambda}{\sqrt{\lambda^2 - \lambda_0^2}} \quad \text{mit} \quad \Delta n_\infty = 0,2002 \quad \text{und} \quad \lambda_0 = 327,44\text{nm}$$

zurückzuführen.[33] Wenn eine Kalibrierungskurve für eine Wellenlänge λ_m aufgenommen wurde, lässt sich die Phasenänderung bei einer beliebigen anderen Wellenlänge in Abhängigkeit der Spannung wie folgt berechnen:

$$\phi(U, \lambda) = \phi_m(U) \frac{\lambda_m}{\lambda} \frac{\Delta n(\lambda)}{\Delta n(\lambda_m)}. \quad (\text{A.5})$$

In der Praxis ist üblicherweise der Fall von Interesse, dass eine Phasenänderung vorgegeben wird und die entsprechende Spannung gesucht wird. Die Auflösung von Gleichung (A.5) nach ϕ_m erlaubt eine wellenlängenkorrigierte Phase $\phi_m(U)$ zu berechnen, welche dann aus einer einzigen Kalibrierung ermittelt werden kann.

A.2. Zuordnung Wellenlänge-Pixel

Nach der Kalibrierung der Phasen-Spannungs-Zuordnung, ist die Zuordnung der Pixel zu den Wellenlängen, die sie jeweils transmittieren, sehr wichtig. Zum einen ist dies für spektral aufgelöste Messungen wie das DQSI-Single-Beam-CARS von großer Bedeutung. Zum anderen können die notwendigen Spannungswerte nach Gleichung (A.5) nur berechnet werden, wenn die korrekte Wellenlänge bekannt ist. Hierzu wird nacheinander die Amplitude von etwa 10 Pixeln, die über das Spektrum verteilt sind, auf null gesetzt, während der Rest vollständig transmittiert wird. Im Spektrum ist dann eine Kerbe zu sehen. Die Werte der Pixelnummern werden zusammen mit den jeweiligen Wellenlängen notiert.[28]

Die Dispersion der Wellenlängen durch das Gitter wird mithilfe der Gleichung

$$d \sin \theta_i + d \sin \theta_a = n\lambda$$

beschrieben. Dabei ist d der Abstand der Linien des Gitters, θ_i der Einfallswinkel und θ_a der (wellenlängenabhängige) Ausfallswinkel, wie in Abbildung A.4 zu sehen ist. Da im Impulsformer die erste Beugungsordnung verwendet ($n = 1$) wird, lässt sich der Ausfallswinkel als

$$\theta_a(\lambda) = \arcsin \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \theta_i \right)$$

beschreiben. Durch den ersten zylindrischen Spiegel im Impulsformer mit der Brennweite f wird der Ausfallswinkel θ_a einem Ort

$$x(\theta_a) = f \tan \theta_a$$

zugeordnet. Damit ergibt sich eine Ortszuordnung in Abhängigkeit von der Wellenlänge zu

$$x(\lambda) = f \tan \left[\arcsin \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \theta_i \right) \right].$$

Diese Betrachtung geht davon aus, dass der Mitte der Maske der Ort $x = 0$ zugeordnet wird. Um diese Annahme an die tatsächlichen Gegebenheiten der Maske anzupassen, wird ein Parameter x_0 eingeführt, der den Ort (Pixelnummer) auf der Maske angibt, der von einem mittleren Teilstrahl mit der Wellenlänge λ_0 getroffen wird. Dies führt zur nachfolgenden Gleichung

$$\boxed{x(\lambda) = x_0 + f \tan \left[\arcsin \left(\frac{\lambda}{d} - \sin \theta_i \right) - \arcsin \left(\frac{\lambda_0}{d} - \sin \theta_i \right) \right]}. \quad (\text{A.6})$$

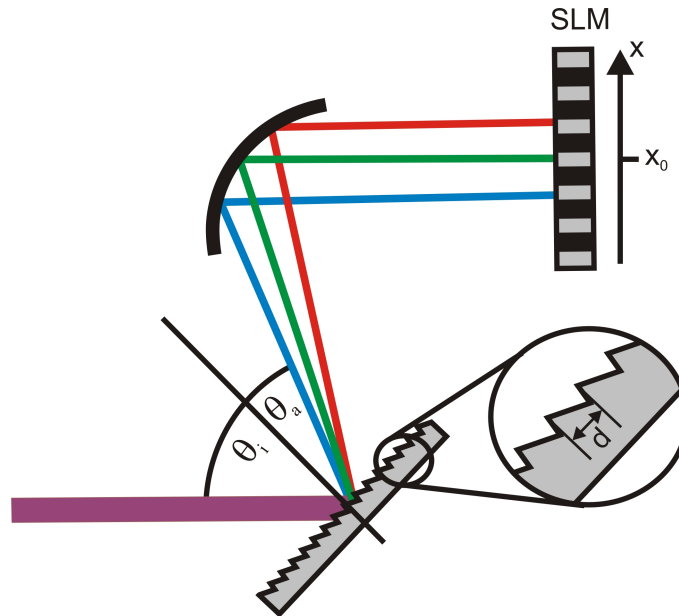


Abbildung A.4.: Anordnung bei der Wellenlängenkalibrierung. Das Beugungsgitter befindet sich im Abstand der Brennweite f des zylindrischen Spiegels.

Gleichung (A.6) wurde bereits unter der Nummer (3.1) in Kapitel 3 angegeben. Sie wurde in einem eigens dafür erstellten LabVIEW-Fitprogramm an die Messdaten angepasst. Das Ergebnis einer solchen Anpassung ist in Abbildung A.5 gezeigt.

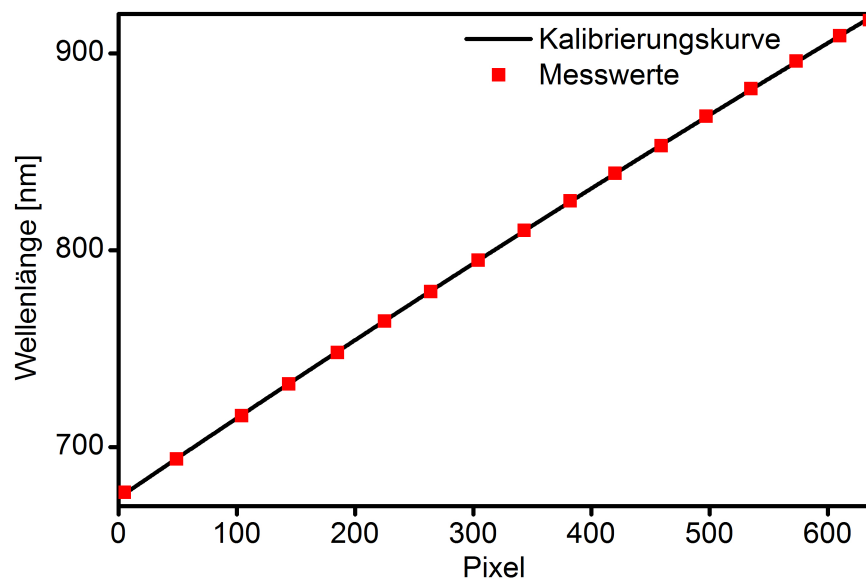


Abbildung A.5.: Kalibrierung der Wellenlängenzuordnung. Zu sehen sind die Messdaten (rote Punkte) mit der angepassten Kalibrierungskurve (schwarz).

B. Mathematische Methoden der Simulation und Optimierung nichtlinearer optischer Signale

In Kapitel 6 wurde die *in silico*-Optimierung von Anregungsphasen vorgestellt. Der Schlüssel zur Umsetzung dieses Ansatzes ist eine effiziente Simulationsmethode. Der nachfolgende Anhang behandelt die mathematischen Grundlagen zur schnellen numerischen Berechnung von CARS- und Zweiphotonenspektren. Diese Simulationsmethoden wurden auch bei der numerischen Evaluation der verschiedenen Single-Beam-CARS-Methoden in den Kapiteln 2, 4 und 5 verwendet.

B.1. Mathematische Hilfsmittel

Dieser Abschnitt zeigt wie die Fouriertransformation als Hilfsmittel zur effizienten Simulation eingesetzt werden kann. Ausgehend von der Definition und ihren wichtigen Eigenschaften wird die Beschreibung nichtlinearer optischer Signale in einer für die numerische Berechnung geeigneten Form gezeigt.

B.1.1. Faltung und Autokorrelation

Bei der Beschreibung nichtlinearer optischer Signale treten häufig Ausdrücke der Form

$$G(\omega) = \int F_1(\omega - \Omega)F_2(\Omega)d\Omega = F_1(\omega) * F_2(\omega) \quad (\text{B.1})$$

auf. Diese Operation wird als *Faltung* der Funktionen F_1 und F_2 bezeichnet und mit einem Stern (*) dargestellt. Ein Beispiel hierfür ist Gleichung (2.50) in Abschnitt 2.4.3. Dort wird das elektrische CARS-Feld $E_{\text{CARS}}(\omega)$ als Faltung des Anregungsfeldes $E(\omega)$ mit der Molekülantwort $R(\omega)$ ausgedrückt.

Einen Sonderfall der Faltung stellt die *Autokorrelation* dar. Hierbei wird eine Funktion mit dem komplex konjugierten ihrer selbst gefaltet:

$$G(\omega) = \int F^*(\omega - \Omega)F(\Omega)d\Omega. \quad (\text{B.2})$$

Ein Vergleich mit Gleichung (2.48) zeigt, dass die Ramananregungswahrscheinlichkeit $A(\omega)$ als *Autokorrelation* des Anregungsfeldes $E(\omega)$ betrachtet werden kann.

B.1.2. Fouriertransformation

Wie im Folgenden gezeigt werden soll, ist die *Fouriertransformation* ein wertvolles Hilfsmittel bei der Bestimmung von *Faltungen* und *Autokorrelationen*. Sie ist definiert als:

$F(\omega) = \int f(t)e^{-i\omega t} dt$	$= \mathfrak{F}\{f(t)\}$	Hintransformation,	(B.3)
$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int F(\omega)e^{i\omega t} d\omega$	$= \mathfrak{F}^{-1}\{F(\omega)\}$	Rücktransformation.	(B.4)

Hierbei wird die *Fouriertransformation* als mathematisches Hilfsmittel betrachtet. Für die physikalische Bedeutung sei an dieser Stelle an einschlägige Literatur verwiesen, etwa [165, 166]. Im Folgenden soll dargestellt werden, wie die Berechnung von Faltungen mit der Fouriertransformation erleichtert werden kann. Seien $F_1(\omega)$ und $F_2(\omega)$ Funktionen im Frequenzbereich und $G(\omega)$ deren Faltung, wie in Gleichung (B.1), so ergibt sich für deren Fouriertransformierte $g(t) = \mathfrak{F}^{-1}\{G(\omega)\}$:

$$g(t) = \frac{1}{2\pi} \iint F_1(\omega - \Omega)F_2(\Omega)d\Omega e^{i\omega t} d\omega$$

$$\stackrel{\text{Subst.}}{=} \frac{1}{2\pi} \underbrace{\int F_1(\tilde{\omega})e^{i\tilde{\omega}t} d\tilde{\omega}}_{2\pi f_1(t)} \underbrace{\int F_2(\Omega)e^{i\Omega t} d\Omega}_{2\pi f_2(t)}.$$

Es wurde die Substitution $\tilde{\omega} = \omega - \Omega$ verwendet. Damit ergibt sich das wichtige *Faltungstheorem* zu:

$G(\omega) = \int F_1(\omega - \Omega)F_2(\Omega)d\Omega$	Faltung im Frequenzbereich,	(B.5)
---	-----------------------------	-------

$g(t) = 2\pi \cdot f_1(t) \cdot f_2(t)$	Produkt im Zeitbereich.	(B.6)
---	-------------------------	-------

Die aufwendige Faltungsoperation geht nach einer Fouriertransformation also in ein einfaches Produkt über. Numerische Methoden zur Fouriertransformation sind inzwischen weit entwickelt und in viele Programmierumgebungen integriert, so auch in LabVIEW,

welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Die Verwendung der *diskreten Fouriertransformation* beschleunigt die Auswertung von Faltungs- und Autokorrelationsintegralen um ein Vielfaches.

B.2. Simulation des CARS-Signals

Die Formulierung des CARS-Signals im Interesse einer schnellen Simulation ergibt sich dann wie folgt (vgl. Gleichung (2.50)):

$$\begin{aligned} E_{\text{CARS}}(\omega) &= \int_0^\infty E(\omega - \Omega)R(\Omega)d\Omega \\ &= \mathfrak{F} \left\{ 2\pi \mathfrak{F}^{-1} \{R(\omega)\} \mathfrak{F}^{-1} \{E(\omega)\} \right\} \end{aligned} \quad (\text{B.7})$$

Die Molekülantwortfunktion R wurde hier im Interesse einer konsistenten Darstellung in Abhängigkeit der Variablen ω angegeben. Der Ausdruck für $A(\omega)$ aus Gleichung (2.48) ergibt sich weitestgehend analog zum Faltungstheorem wie folgt:

$$\begin{aligned} \mathfrak{F}^{-1} \{A(\omega)\} &= \frac{1}{2\pi} \iint E^*(\omega)E(\omega + \Omega)e^{i\Omega t}d\Omega d\omega \\ &\stackrel{\text{Subst.}}{=} \frac{1}{2\pi} \int E^*(\omega)d\omega \int E(\tilde{\Omega})e^{i(\tilde{\Omega}-\omega)t}d\tilde{\Omega} \\ &= \frac{1}{2\pi} \int E^*(\omega)e^{-i\omega t}d\omega \int E(\tilde{\Omega})e^{i\tilde{\Omega}t}d\omega \\ &= 2\pi [\mathfrak{F}^{-1} \{E(\omega)\}]^* \mathfrak{F}^{-1} \{E(\omega)\} \\ \Rightarrow A(\omega) &= \mathfrak{F} \left\{ 2\pi |\mathfrak{F}^{-1} \{E(\omega)\}|^2 \right\} \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

Mit den Gleichungen (B.7) und (B.8) lässt sich das CARS-Feld $E_{\text{CARS}}(\omega)$ alleine durch Berechnung von Fouriertransformation, Produkten und Beträgen errechnen. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Integration in Gleichung (2.50) im Bereich von 0 bis ∞ ausgeführt wird, während bei der Bildung von Fouriertransformationen keine untere Grenze existiert, 0 also durch $-\infty$ zu ersetzen ist. Dies kann jedoch einfach berücksichtigt werden, indem für die Molekülantwort

$$R(\omega) = \Theta(\omega)\chi^{(3)}(\omega)A(\omega) \quad (\text{B.9})$$

angesetzt wird. $\Theta(\omega)$ ist hierbei die *Heaviside*-Stufenfunktion.[165]

B.3. Simulation von Zweiphotonenprozessen

Neben CARS spielen Zweiphotonenprozesse eine wichtige Rolle in der nichtlinearen Mikroskopie. Die Beschreibung derselben kann ebenfalls im Frequenzbereich erfolgen. Als erster Schritt in Zweiphotonenprozessen kann üblicherweise die *Zweiphotonenabsorption* (2PA) betrachtet werden. Bei breitbandigen Laserimpulsen ist zu beachten, dass alle Frequenzpaare, welche sich zu einem bestimmten Wert aufaddieren, zur 2PA bei dieser Frequenz beitragen (siehe Abbildung B.1). Mathematisch ausgedrückt wird dies durch das Leistungsspektrum der zweiten Harmonischen[167]:

$$S^{(2)}(\Omega) = \left| \int E(\omega)E(\Omega - \omega)d\omega \right|^2. \quad (\text{B.10})$$

In Abbildung B.1 entspricht dabei $\Delta E = \hbar\Omega$ der Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand $|g\rangle$ bzw. $|e\rangle$. $S(\Omega)$ gibt an, wie effektiv ein gegebenes elektrisches Wechselfeld $E(\omega)$ Zweiphotonenprozesse bei der Frequenz Ω anregen kann. Die Licht-Materie-Wechselwirkung wird dann über bestimmte Parameter beschrieben. Im Falle der Erzeugung der zweiten Harmonischen wird $S(\Omega)$ einfach mit einem frequenzabhängigen Faktor $\chi^{(2)}(\Omega)$ gewichtet. Im Falle der Zweiphotonenabsorption wird die Ausbeute Y durch das Integral über das mit dem Faktor $g_{TPA}^{(2)}(\Omega)$ gewichtete $S^{(2)}(\Omega)$ bestimmt:

$$Y = \int g_{TPA}^{(2)}(\Omega)S^{(2)}(\Omega)d\Omega. \quad (\text{B.11})$$

Auch für die Modellierung von Zweiphotonenprozessen bewirkt die Verwendung von Fouriertransformationen eine Steigerung der Effizienz, da es sich bei dem Ausdruck zwischen den Betragstrichen in Gleichung (B.10) um eine Faltung wie in Gleichung (B.1) handelt. Die für die Simulation günstige Formulierung von $S^{(2)}(\Omega)$ nimmt dann folgende Form an:

$$S_{(2)}(\Omega) = \left| \mathfrak{F} \left\{ 2\pi (\mathfrak{F}^{-1} \{E(\Omega)\})^2 \right\} \right|^2. \quad (\text{B.12})$$

Damit ist eine geeignete Beschreibung der wichtigsten nichtlinearen optischen Effekte für Mikroskopieanwendungen vorhanden, die im Rahmen dieser Arbeit in einem *LabVIEW*-Paket implementiert wurde.

B.4. Optimierungsalgorithmen

Besonders wertvoll ist ein solches Simulationspaket in Verbindung mit geeigneten Optimierungsalgorithmen. Die schnelle Berechnung erlaubt dabei die Optimierung in hochdimensionalen Suchräumen. Bei analytisch schwer oder nicht zu behandelnden Problemen

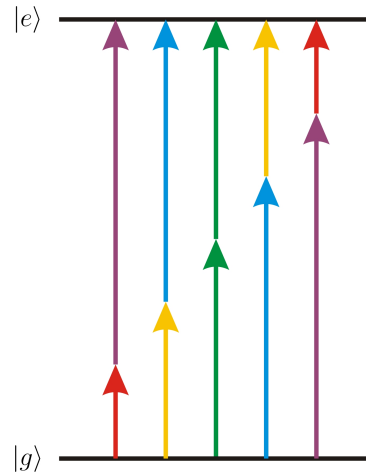


Abbildung B.1.: Zur Zweiphotonenabsorption tragen alle Frequenzpaare bei, die sich kohärent zu einem Wert aufaddieren.

empfiehlt sich eine *lokale Suchstrategie*.^[115] Das bedeutet, dass für mehrere Parametersätze der Form

$$\vec{x} = \begin{pmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix}$$

in einem n -dimensionalen Suchraum die Werte für eine Qualitätsfunktion $f(\vec{x})$ bestimmt wird. Diese Funktion wird als *Fitnessfunktion* bezeichnet und muss nicht einmal bekannt sein, sondern kann auch experimentell bestimmt werden. Es wurden sogar Optimierungen mit subjektiver Bewertung demonstriert.^[168] Ausgehend von diesen Parametersätzen werden dann neue Punkte im Suchraum erzeugt, basierend auf ihren Werten der Fitnessfunktion. Diese Erzeugung kann dabei entweder *stochastisch* erfolgen, das bedeutet, dass die besten Parametersätze zufällig variiert und gemischt, oder nach einem festgelegten Algorithmus berechnet werden. Im letzten Fall spricht man von einer *deterministischen* lokalen Optimierung.

B.4.1. Evolutionäre Algorithmen

Eine klassische stochastische lokale Suchstrategie stellen die *evolutionären Algorithmen* dar. Diese sind der biologischen Evolution nachempfunden und jeder Parametersatz wird als Individuum betrachtet, das Nachkommen erzeugen kann. Die evolutionären Algorithmen unterteilen sich dabei in *Evolutionsstrategien (ES)* ^[139], mit reellen Zahlen als Parameter, und *genetische Algorithmen* ^[140], bei denen die Parameter in binäre

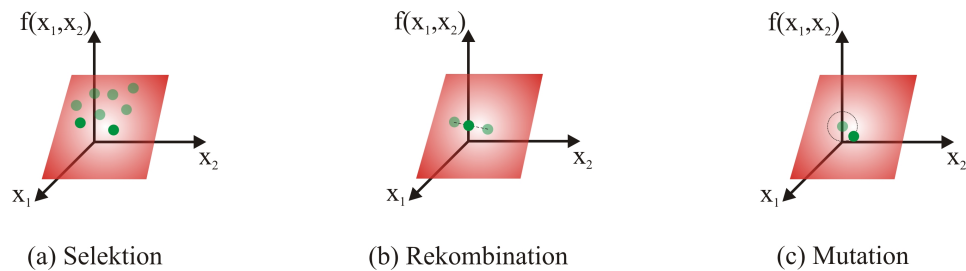


Abbildung B.2.: Operationen beim Einsatz evolutionärer Algorithmen. (a) Selektion: aus einer Menge (Generation) von Parametersätzen (Individuen) werden diejenigen mit den besten Werten der Fitnessfunktion ausgewählt. Aus ihnen wird die nächste Generation erzeugt. (b) Rekombination: die ausgewählten Parametersätze werden gemischt, um neue Individuen zu erzeugen. (c) Mutation: einzelne Individuen der neuen Generation werden zufällig leicht variiert.

Zahlen umgewandelt werden, welche dann gewissermaßen als Gene betrachtet werden. Abgesehen von der Parametrisierung sind beide ähnlich und haben folgendes Schema:

1. Zufällige Erzeugung einer ersten Menge (Generation) von Parametersätzen.
2. *Selektion* einer Teilmenge bestehend aus den Parametersätzen (Individuen) mit den besten *Fitnesswerten* (vgl. Abbildung B.2, a).
3. *Rekombination* innerhalb der ausgewählten Teilmenge. Dies entspricht einem Mischen der Parameter (vgl. Abbildung B.2, b).
4. Zufällige *Mutation* der neuen Generation. Dabei werden einige wenige Individuen leicht variiert (vgl. Abbildung B.2, c).
5. Weiter mit Punkt 2 bis das Abbruchkriterium (z.B. Anzahl Generationen, Zielfitness, Variation der Fitnesswerte) erreicht ist.

Bei der Rekombination können je nach Parametrisierung verschiedene Methoden angewandt werden. Bei reellen Zahlen ist eine Mittelwertbildung oder zufälliges Mischen der Werte für jeden Parameter von beiden Individuen, die an der Rekombination teilnehmen, möglich. Bei binär kodierten Parametern sind alle logischen Operationen (AND, OR, XOR, etc.) denkbar.

Bei der Mutation werden die Parameter zufällig variiert. Bei binärer Kodierung werden zufällig ausgewählte einzelne Bits invertiert, bei Kodierung mit reellen Zahlen können die einzelnen Parameter um eine normalverteilte Zufallszahl variiert werden.[109]

B.4.2. Downhill-Simplex Algorithmus

Der Downhill-Simplex-Algorithmus, auch Verfahren nach Nelder und Mead [115] genannt, ist etwas aufwendiger und wird daher in einem eigenen Ablaufdiagramm in Abbildung B.3 dargestellt. Die Idee besteht darin in einem n -dimensionalen Parameterraum einen *Simplex* S aufzuspannen. Dies ist ein Gebilde in einem n -dimensionalen Suchraum, das aus $n+1$ Punkten besteht. In einer Dimension, also eine Gerade, in zwei Dimensionen ein Dreieck, in drei Dimensionen ein Tetraeder etc.

In Abbildung B.4 ist beispielhaft ein zweidimensionaler Parameterraum gezeigt, in dem ein Simplex aus drei Punkten aufgebaut ist. Der erste Simplex wird zufällig aufgebaut, danach ist die Suchstrategie deterministisch. Zunächst werden die Werte einer zu minimierenden Suchfunktion f für alle Punkte des Simplex bestimmt und geordnet, so dass $f(\vec{x}_1)$ den kleinsten Wert annimmt, $f(\vec{x}_{n+1})$ den größten und die übrigen Werte entsprechend dazwischen.

Dann wird der Punkt \vec{x}_{n+1} mit dem höchsten Wert einer zu minimierenden Zielfunktion $f(\vec{x}_{n+1})$ am Mittelpunkt \vec{x}_s der n besten Werte des Simplex *reflektiert* (vgl. Abbildung B.4, a):

$$\vec{x}_r = \vec{x}_s + \varrho(\vec{x}_s - \vec{x}_{n+1}).$$

Der Koeffizient ϱ gibt dabei an, wie weit der neue Punkt \vec{x}_r vom Mittelpunkt \vec{x}_s entfernt ist und liegt üblicherweise bei 1. Für den Fall, dass die Zielfunktion f für \vec{x}_r den geringsten Wert aufweist, also $f(\vec{x}_r) < f(\vec{x}_1)$ gilt, wird eine *Expansion* durchgeführt (vgl. Abbildung B.4, b):

$$\vec{x}_e = \vec{x}_s + \chi(\vec{x}_r - \vec{x}_s).$$

Der Expansionskoeffizient $\chi > 1$ gibt an, um welchen Faktor der Abstand zum Mittelpunkt vergrößert wird. Ein typischer Wert ist $\chi = 2$.

Falls $f(\vec{x}_r) \geq f(\vec{x}_n)$ gilt, der reflektierte Punkt also der schlechteste des neuen Simplex ist, wird eine *Kontraktion* durchgeführt (vgl. Abbildung B.4, c):

$$\begin{aligned} \vec{x}_{oc} &= \vec{x}_s + \gamma(\vec{x}_r - \vec{x}_s) && \text{falls } f(\vec{x}_n) \leq f(\vec{x}_r) < f(\vec{x}_{n+1}) \\ \vec{x}_{ic} &= \vec{x}_s + \gamma(\vec{x}_{n+1} - \vec{x}_s) && \text{falls } f(\vec{x}_r) \geq f(\vec{x}_{n+1}). \end{aligned}$$

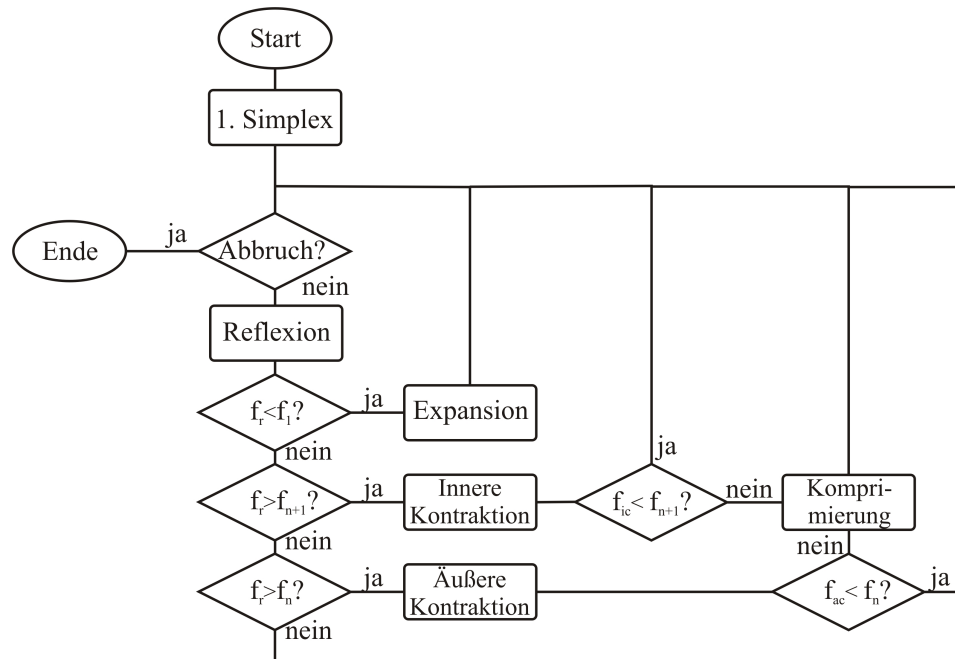


Abbildung B.3.: Ablaufdiagramm des Downhill-Simplex-Algorithmus.

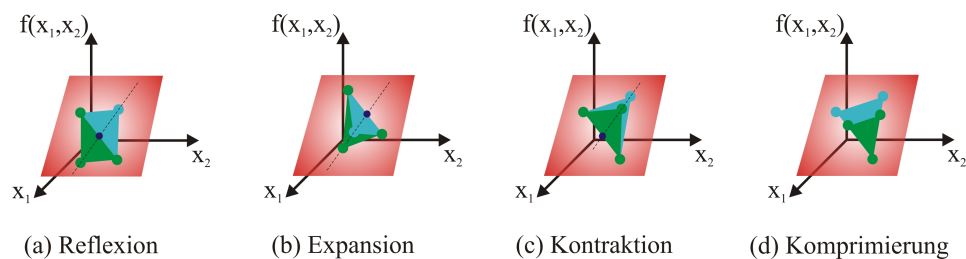


Abbildung B.4.: Operationen beim Einsatz des Downhill-Simplex-Algorithmus. (a) *Reflexion* des schlechtesten Punktes des alten Simplex (türkis) am Schwerpunkt der restlichen Punkte zur Erzeugung eines neuen Simplex (grün). (b) Falls der reflektierte Punkt der beste des neuen Simplex ist, wird eine *Expansion* durchgeführt und dieser in die gleiche Richtung weiter verschoben. (c) Eine *Kontraktion* des Simplex wird durchgeführt, falls der reflektierte Punkt schlechter als alle anderen ist. Hierzu wird der schlechteste Punkt in Richtung des Schwerpunkts verschoben. (d) Für den Fall, dass die Kontraktion keine Verbesserung bewirkt, wird eine *Komprimierung* durchgeführt, indem alle anderen Punkte des Simplex an den besten herangezogen werden.

Ein typischer Wert für den Kontraktionskoeffizienten ist $\gamma = 1/2$. Der erste Fall wird als *äußere*, der zweite als *innere* Kontraktion bezeichnet. Sollte keine der zuvor genannten Operationen eine Verbesserung bringen, das heißt es gelten $f(\vec{x}_{oc}) > f(\vec{x}_n)$ bzw. $f(\vec{x}_{ic}) > f(\vec{x}_n)$, so wird eine *Komprimierung* durchgeführt. Dabei wird der Abstand aller Punkte \vec{x}_2 bis \vec{x}_{n+1} zum besten Punkt \vec{x}_1 einen Faktor $\sigma < 1$ (typisch $\sigma = 0,5$) verringert:

$$\vec{v}_i = \vec{x}_1 + \sigma(\vec{x}_i - \vec{x}_1) \quad \text{mit } i = 2, \dots, n+1.$$

Der Simplex S besteht dann zu Beginn der nächsten Iteration aus

$$S = \{\vec{x}_1, \vec{v}_2, \dots, \vec{v}_{n+1}\}.$$

Diese Operation ist beispielhaft in Abbildung B.4 (d) dargestellt.

C. Extraktion von Ramanspektren aus zwei Phasengatemessungen

In Abschnitt 4.2.4 wurde behauptet, dass die Differenz zweier Signale mit einem Phasengate von $\phi_g = \pi/2$ bzw. $\phi_g = -\pi/2$ ein Schwingungsspektrum ergibt, wie es in spontanen Ramanmessungen erhalten wird. Die übliche Begründung in der Literatur [72, 74, 96] basiert auf einer Betrachtung des gemessenen Signals

$$S(\omega) = |E_{LO}(\omega)|^2 + |E_{Sig}(\omega)|^2 + 2E_{LO}(\omega)\text{Re}\{E_{Sig}(\omega)\}. \quad (\text{C.1})$$

Dabei wurde bereits angenommen, dass der lokale Oszillator rein real ist, was bei hinreichend großem nichtresonanten Anteil der Suszeptibilität gerechtfertigt ist. Allerdings ist die weitere Annahme in der Literatur, dass für den Fall $\phi_g = \pm\pi/2$ die Gleichung

$$E_{Sig}(\omega) = E_n\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)A(\omega - \omega_g)e^{\pm i\frac{\pi}{2}} \quad (\text{C.2})$$

gilt, nicht korrekt. Wie in Abschnitt 5.2.2 aufgezeigt wird, muss ein schmalbandiges Interferenzfeld mit der Phase π überlagert werden, um einen rein realen lokalen Oszillator betrachten zu können. Andernfalls treten Phasenänderungen genau an den Stellen der Resonanzen im gemessenen Spektrum auf.

Durch dieses Interferenzfeld aber ändert sich die Phase des Gates von $\phi_g = \pm\frac{\pi}{2}$ zu $\phi_{g,eff} = \pm\frac{3\pi}{4}$ (siehe Abbildung 5.4 b und d). Der Ausdruck $e^{\pm i\frac{\pi}{2}}$ ist also durch

$$e^{\pm i\frac{3\pi}{4}} = \frac{1}{\sqrt{2}}(-1 \pm i) \quad (\text{C.3})$$

zu ersetzen. Setzt man dies in Gleichung (C.1) ein, so ergibt sich

$$S(\omega) = |E_{LO}(\omega)|^2 + |E_{Sig}(\omega)|^2 + \sqrt{2}E_{LO}(\omega)E_nA(\omega - \omega_g)\text{Re}\{\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)(-1 \pm i)\}. \quad (\text{C.4})$$

Daraus ergibt sich für die Differenz der Signale $S_+(\omega)$ für $\phi_{g,eff} = \frac{3\pi}{4}$ und $S_-(\omega)$ für $\phi_{g,eff} = -\frac{3\pi}{4}$ der folgende Ausdruck:

$$S_-(\omega) - S_+(\omega) = -2\sqrt{2}E_{LO}(\omega)E_nA(\omega - \omega_g)\text{Re}\{i\chi^{(3)}(\omega - \omega_g)\}. \quad (\text{C.5})$$

C. Extraktion von Ramanspektren aus zwei Phasengatemessungen

Betrachtet man nun $\chi^{(3)}(\omega) = \text{Re} \{ \chi^{(3)}(\omega) \} + i \text{Im} \{ \chi^{(3)}(\omega) \}$, so ergibt sich als Endergebnis

$$\boxed{S_-(\omega) - S_+(\omega) = 2\sqrt{2}E_{LO}(\omega)E_n A(\omega - \omega_g) \text{Im} \{ \chi^{(3)}(\omega - \omega_g) \}.} \quad (\text{C.6})$$

Dies bestätigt die Aussage aus den Abschnitten 2.4.3 und 4.2.4, dass die Differenz zweier Single-Beam-CARS-Spektren für die Anregung mit einem Phasengate $\phi_g = \pm\pi/2$ einem spontanen Ramanspektrum entspricht. Es ist anzumerken, dass die Schlussfolgerungen in der Literatur ihre Gültigkeit behalten, da tatsächlich der Imaginärteil von $\chi^{(3)}(\Omega)$ erhalten wird, lediglich die zugrundeliegende Herleitung ist unvollständig.

Literaturverzeichnis

- [1] S. W. Hell und J. Wichmann, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994).
- [2] E. Betzig und J. K. Trautman, *Science* **257**, 189 (1992).
- [3] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz und H. F. Hess, *Science* **313**, 1642 (2006).
- [4] F. Zernike, *Physica* **9**, 686 (1942).
- [5] D. Cottet, J. Douady, J.-C. Vial und H. A. Wege, *Opt. Mat.* **33**, 1434 (2011).
- [6] J. Cheng und X. Xie, *Coherent Raman Scattering Microscopy, Series in Cellular and Clinical Imaging* (Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2012).
- [7] D. J. Jones, E. O. Potma, J.-X. Cheng, B. Burfeindt, Y. Pang, J. Ye und X. S. Xie, *Rev. of scientific instr.* **73**, 2843 (2002).
- [8] E. O. Potma, D. J. Jones, J.-X. Cheng, X. S. Xie und J. Ye, *Opt. Lett.* **27**, 1168 (2002).
- [9] D. Brüggemann, J. Hertzberg, B. Wies, Y. Waschke, R. Noll, K.-F. Knoche und G. Herziger, *App. Phys. B* **55**, 378 (1992).
- [10] G. W. Baxter, M. J. Johnson, J. G. Haub und B. J. Orr, *Chem. Phys. Lett.* **251**, 211 (1996).
- [11] C. L. Evans und X. S. Xie, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 883 (2008).
- [12] C. Pohling, T. Buckup und M. Motzkus, *J. of Biomed. Opt.* **16**, 021105 (2011).
- [13] T. W. Kee, H. Zhao und M. T. Cicerone, *Opt. Express* **14**, 3631 (2006).
- [14] B. von Vacano, L. Meyer und M. Motzkus, *J. of Raman Spec.* **38**, 916 (2007).

- [15] D. Long, *Raman spectroscopy* (McGraw-Hill International Book Company, Berkshire, UK, 1977).
- [16] A. Zumbusch, G. R. Holtom und X. S. Xie, *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142 (1999).
- [17] M. Müller und A. Zumbusch, *Chem. Phys. Chem.* **8**, 2156 (2007).
- [18] R. W. Boyd, *Nonlinear optics*, 3. Aufl. (Academic Press, Waltham, MA, 2008).
- [19] B. Saleh und M. Teich, *Grundlagen der Photonik, Lehrbuch Physik* (Wiley-VCH, Weinheim, 2008).
- [20] J.-H. Lin, M.-D. Wei, W.-F. Hsieh und H.-H. Wu, *J. Opt. Soc. Am. B* **18**, 1069 (2001).
- [21] M. Marangoni, A. Gambetta, C. Manzoni, V. Kumar, R. Ramponi und G. Cerullo, *Opt. Lett.* **34**, 3262 (2009).
- [22] B. von Vacano, W. Wohlleben und M. Motzkus, *Opt. Lett.* **31**, 413 (2006).
- [23] A. Stingl, R. Szipöcs, M. Lenzner, C. Spielmann und F. Krausz, *Opt. Lett.* **20**, 602 (1995).
- [24] F. Kärtner, U. Morgner, R. Ell, T. Schibli, J. Fujimoto, E. Ippen, V. Scheuer, G. Angelow und T. Tschudi, *J. Opt. Soc. Am. B* **18**, 882 (2001).
- [25] *Femtosecond laser pulses*, 2. Aufl., herausgegeben durch C. Rulliere (Springer, New York, 2005).
- [26] J.-C. Diels und W. Rudolph, *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*, 2. Aufl. (Academic Press, Waltham, MA, 2006).
- [27] A. Weiner, *Rev. of Scientific Instr.* **71**, 1929 (2000).
- [28] A. Monmayrant, S. Weber und B. Chatel, *J. of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* **43**, 103001 (2010).
- [29] M. M. Wefers und K. A. Nelson, *J. Opt. Soc. Am. B* **12**, 1343 (1995).
- [30] F. Verluise, V. Laude, Z. Cheng, C. Spielmann und P. Tournois, *Opt. Lett.* **25**, 575 (2000).

- [31] F. Verluise, V. Laude, J.-P. Huignard, P. Tournois und A. Migus, *J. Opt. Soc. Am. B* **17**, 138 (2000).
- [32] F. Frei, A. Galler und T. Feurer, *J. of chem. phys.* **130**, 034302 (2009).
- [33] *SLM-S, 640d, Technische Dokumentation*, Jenoptik Laser, Optik, Systeme GmbH, Jena.
- [34] D. Kane und R. Trebino, *J. of Quant. Elec., IEEE* **29**, 571 (1993).
- [35] R. Trebino, *Frequency-Resolved Optical Gating: The Measurement of Ultrashort Laser Pulses* (Springer, New York, 2000), S. 101–115.
- [36] C. Iaconis und I. Walmsley, *Opt. Lett.* **23**, 792 (1998).
- [37] I. A. Walmsley und C. Dorrer, *Adv. Opt. Photon.* **1**, 308 (2009).
- [38] M. Takeda, H. Ina und S. Kobayashi, *J. Opt. Soc. Am. A* **72**, 156 (1982).
- [39] Y. Ozeki, G. Omura und K. Itoh, *Opt. Express* **16**, 2778 (2008).
- [40] G. Stibenz und G. Steinmeyer, *Opt. Express* **13**, 2617 (2005).
- [41] D. E. Wilcox, F. D. Fuller und J. P. Ogilvie, *Opt. Lett.* **38**, 2980 (2013).
- [42] I. Amat-Roldán, I. Cormack, P. Loza-Alvarez, E. Gualda und D. Artigas, *Opt. Express* **12**, 1169 (2004).
- [43] A. Galler und T. Feurer, *App. Phys. B* **90**, 427 (2008).
- [44] B. von Vacano, T. Buckup und M. Motzkus, *Opt. Lett.* **31**, 1154 (2006).
- [45] B. von Vacano, T. Buckup und M. Motzkus, *J. Opt. Soc. Am. B* **24**, 1091 (2007).
- [46] B.-C. Chen und S.-H. Lim, *Opt. Lett.* **32**, 2411 (2007).
- [47] J. Sung, B.-C. Chen und S.-H. Lim, *Opt. Lett.* **33**, 1404 (2008).
- [48] P. Schön und S. Brasselet, *Opt. Lett.* **36**, 805 (2011).
- [49] V. V. Lozovoy, I. Pastirk und M. Dantus, *Opt. Lett.* **29**, 775 (2004).
- [50] V. V. Lozovoy, B. Xu, Y. Coello und M. Dantus, *Opt. Express* **16**, 592 (2008).

- [51] K. König, *J. of Biophot.* **1**, 13 (2008).
- [52] K. König, A. Ehlers, I. Riemann, S. Schenkl, R. Bückle und M. Kaatz, *Microscopy Res. and Tech.* **70**, 398 (2007).
- [53] K. Schenke-Layland, I. Riemann, O. Damour, U. A. Stock und K. König, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 878 (2006).
- [54] W. R. Zipfel, R. M. Williams und W. W. Webb, *Nat. Biotech.* **21**, 1369 (2003).
- [55] R. M. Williams, W. R. Zipfel und W. W. Webb, *Current Opinion in Chem. Biol.* **5**, 603 (2001).
- [56] B. Chung, J. Chao-Yu und E. O. Potma, *Ann. Rev. of Phys. Chem.* **64**, 77 (2013).
- [57] W. Denk, J. Strickler und W. Webb, *Science* **248**, 73 (1990).
- [58] P. Theer, M. T. Hasan und W. Denk, *Opt. Lett.* **28**, 1022 (2003).
- [59] P. J. Campagnola und L. M. Loew, *Nat. Biotech.* **21**, 1356 (2003).
- [60] P. D. Maker und R. W. Terhune, *Phys. Rev.* **137**, A801 (1965).
- [61] M. Jurna, J. P. Korterik, C. Otto, J. L. Herek und H. L. Offerhaus, *Phys. Rev. Lett.* **103**, 043905 (2009).
- [62] J.-X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book und X. S. Xie, *J. of Phys. Chem. B* **106**, 8493 (2002).
- [63] S. H. Parekh, Y. J. Lee, K. A. Aamer und M. T. Cicerone, *Biophysical Journal* **99**, 2695 (2010).
- [64] T. Gottschall, M. Baumgartl, A. Sagnier, J. Rothhardt, C. Jauregui, J. Limpert und A. Tünnermann, *Opt. Express* **20**, 12004 (2012).
- [65] Y. Liu, Y. J. Lee und M. T. Cicerone, *Opt. Lett.* **34**, 1363 (2009).
- [66] Y. J. Lee, D. Moon, K. B. Migler und M. T. Cicerone, *Analyt. Chem.* **83**, 2733 (2011).
- [67] M. T. Cicerone, K. A. Aamer, Y. J. Lee und E. Vartiainen, *J. of Raman Spec.* **43**, 637 (2012).

- [68] E. M. Vartiainen, H. A. Rinia, M. Müller und M. Bonn, *Opt. Express* **14**, 3622 (2006).
- [69] N. Dudovich, D. Oron und Y. Silberberg, *Nature* **418**, 512 (2002).
- [70] D. Oron, N. Dudovich und Y. Silberberg, *Phys. Rev. Lett.* **89**, 273001 (2002).
- [71] N. Dudovich, D. Oron und Y. Silberberg, *J. of Chem. Phys.* **118**, (2003).
- [72] S.-H. Lim, A. G. Caster und S. R. Leone, *Phys. Rev. A* **72**, 041803 (2005).
- [73] D. Oron, N. Dudovich und Y. Silberberg, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 213902 (2003).
- [74] S.-H. Lim, A. G. Caster, O. Nicolet und S. R. Leone, *J. of Phys. Chem. B* **110**, 5196 (2006).
- [75] B. von Vacano und M. Motzkus, *Opt. Comm.* **264**, 488 (2006).
- [76] B. von Vacano, W. Wohlleben und M. Motzkus, *J. of Raman Spec.* **37**, 404 (2006).
- [77] B. von Vacano, T. Buckup und M. Motzkus, *Opt. Lett.* **31**, 2495 (2006).
- [78] C. Müller, T. Buckup, B. von Vacano und M. Motzkus, *J. of Raman Spec.* **40**, 809 (2009).
- [79] D. Meshulach und Y. Silberberg, *Nature* **396**, 239 (1998).
- [80] D. Meshulach und Y. Silberberg, *Phys. Rev. A* **60**, 1287 (1999).
- [81] M. Wollenhaupt, A. Assion und T. Baumert, in *Springer Handbook of Lasers and Optics*, herausgegeben durch F. Träger (Springer, New York, 2007), S. 937–983.
- [82] B. von Vacano und M. Motzkus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 681 (2008).
- [83] B. von Vacano, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2008.
- [84] J. P. Ogilvie, E. Beaurepaire, A. Alexandrou und M. Joffre, *Opt. Lett.* **31**, 480 (2006).
- [85] M. Cui, J. Skodack und J. P. Ogilvie, *Appl. Opt.* **47**, 5790 (2008).
- [86] K. Isobe, A. Suda, M. Tanaka, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki und K. Midorikawa, *Phys. Rev. A* **77**, 063832 (2008).

- [87] K. Isobe, A. Suda, M. Tanaka, H. Hashimoto, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki und K. Midorikawa, *J. of Selected Topics in Quantum Electr.*, IEEE **16**, 767 (2010).
- [88] T. Ideguchi, S. Holzner, B. Bernhardt, G. Guelachvili, N. Picque und T. W. Hansch, *Nature* **502**, 355 (2013).
- [89] T. Udem, R. Holzwarth und T. W. Hansch, *Nature* **416**, 233 (2002).
- [90] T. Hellerer, A. M. K. Enejder und A. Zumbusch, *App. Phys. Lett.* **85**, 25 (2004).
- [91] I. Rocha-Mendoza, W. Langbein und P. Borri, *App. Phys. Lett.* **93**, 201103 (2008).
- [92] I. Rocha-Mendoza, W. Langbein, P. Watson und P. Borri, *Opt. Lett.* **34**, 2258 (2009).
- [93] J. Rehbinder, Dissertation, Universität Heidelberg, 2013.
- [94] P. J. Wrzesinski, D. Pestov, V. V. Lozovoy, B. Xu, S. Roy, J. R. Gord und M. Dantus, *J. of Raman Spec.* **42**, 393 (2011).
- [95] V. V. Lozovoy und M. Dantus, *Chem. Phys. Chem.* **6**, 1970 (2005).
- [96] Y. Liu, M. D. King, H. Tu, Y. Zhao und S. A. Boppart, *Opt. Express* **21**, 8269 (2013).
- [97] S.-H. Lim, A. G. Caster und S. R. Leone, *Opt. Lett.* **32**, 1332 (2007).
- [98] J. Sung, B.-C. Chen und S.-H. Lim, *J. of Raman Spec.* **42**, 130 (2011).
- [99] P. Nandakumar, A. Kovalev und A. Volkmer, *New J. of Phys.* **11**, 033026 (2009).
- [100] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang und X. S. Xie, *Science* **322**, 1857 (2008).
- [101] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui und K. Itoh, *Opt. Express* **17**, 3651 (2009).
- [102] C. W. Freudiger, W. Min, G. R. Holtom, B. Xu, M. Dantus und X. S. Xie, *Nature phot.* **5**, 103 (2011).
- [103] B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom und X. S. Xie, *Science* **330**, 1368 (2010).

- [104] E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth und P. Gilch, *App. Phys. B* **87**, 389 (2007).
- [105] W. Min, C. W. Freudiger, S. Lu und X. S. Xie, *Ann. Rev. of Phys. Chem.* **62**, 507 (2011).
- [106] H. Frostig, O. Katz, A. Natan und Y. Silberberg, *Opt. Lett.* **36**, 1248 (2011).
- [107] D. W. Marquardt, *J. of the Soc. for Ind. & App. Math.* **11**, 431 (1963).
- [108] F. Kärtner, N. Matuschek, T. Schibli, U. Keller, H. Haus, C. Heine, R. Morf, V. Scheuer, M. Tilsch und T. Tschudi, *Opt. Lett.* **22**, 831 (1997).
- [109] D. Zeidler, S. Frey, K.-L. Kompa und M. Motzkus, *Phys. Rev. A* **64**, 023420 (2001).
- [110] C. E. Shannon, *SIGMOBILE Mob. Comput. Commun. Rev.* **5**, 3 (2001).
- [111] F. Pedrotti *et al.*, *Optik für Ingenieure*, 3. Aufl. (Springer, Berlin, 2005).
- [112] M. Neil, R. Juškaitis, M. Booth, T. Wilson, T. Tanaka und S. Kawata, *J. of Microscopy* **200**, 105 (2000).
- [113] M. J. Booth, M. A. Neil, R. Juškaitis und T. Wilson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 5788 (2002).
- [114] F. Rigaut, B. L. Ellerbroek und M. J. Northcott, *App. Opt.* **36**, 2856 (1997).
- [115] W. Alt, *Nichtlineare Optimierung: Eine Einführung in Theorie, Verfahren und Anwendungen*, *Vieweg Studium: Aufbaukurs Mathematik* (Vieweg, Wiesbaden, 2002).
- [116] L. Lepetit, G. Chériaux und M. Joffre, *J. Opt. Soc. Am. B* **12**, 2467 (1995).
- [117] T. Suzuki und K. Misawa, *Opt. Express* **19**, 11463 (2011).
- [118] X. Wang, A. Zhang, M. Zhi, A. V. Sokolov, G. R. Welch und M. O. Scully, *Opt. Lett.* **35**, 721 (2010).
- [119] X. Wang, K. Wang, G. R. Welch und A. V. Sokolov, *Phys. Rev. A* **84**, 021801 (2011).
- [120] C. L. Evans, E. O. Potma und X. S. Xie, *Opt. Lett.* **29**, 2923 (2004).
- [121] E. O. Potma, C. L. Evans und X. S. Xie, *Opt. Lett.* **31**, 241 (2006).

- [122] K. Orsel, E. T. Garbacik, M. Jurna, J. P. Kortarik, C. Otto, J. L. Herek und H. L. Offerhaus, *J. of Raman Spec.* **41**, 1678 (2010).
- [123] M. Jurna, J. Kortarik, C. Otto, J. Herek und H. Offerhaus, *Phys. Rev. Lett.* **103**, 043905 (2009).
- [124] B. Li, W. S. Warren und M. C. Fischer, *Optics Express* **18**, 25825 (2010).
- [125] Y. Nagashima, T. Suzuki, S. Terada, S. Tsuji und K. Misawa, *J. of Chem. Phys.* **134**, 024525 (2011).
- [126] F. Ganikhanov, C. L. Evans, B. G. Saar und X. S. Xie, *Opt. Lett.* **31**, 1872 (2006).
- [127] B.-C. Chen, J. Sung und S.-H. Lim, *J. of Phys. Chem. B* **114**, 16871 (2010).
- [128] A. Prakelt, M. Wollenhaupt, C. Sarpe-Tudoran, A. Assion und T. Baumert, *App. Phys. Lett.* **87**, 121113 (2005).
- [129] M. C. Fischer, T. Ye, G. Yurtsever, A. Miller, M. Ciocca, W. Wagner und W. S. Warren, *Opt. Lett.* **30**, 1551 (2005).
- [130] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites und R. Salzer, *J. of biophot.* **2**, 13 (2009).
- [131] M. Hedegaard, C. Krafft, H. J. Ditzel, L. E. Johansen, S. Hassing und J. Popp, *Analyt. Chem.* **82**, 2797 (2010).
- [132] T. Kanungo, D. Mount, N. Netanyahu, C. Piatko, R. Silverman und A. Wu, *Trans. on Pattern Analysis and Machine Intell.*, *IEEE* **24**, 881 (2002).
- [133] T. Bocklitz, M. Putsche, C. Stüber, J. Käs, A. Niendorf, P. Rösch und J. Popp, *J. of Raman Spec.* **40**, 1759 (2009).
- [134] G. Dunteman, *Principal Components Analysis*, No. Nr. 69 in *A Sage Publications* (SAGE Publications, Thousand Oaks, CA, 1989).
- [135] I. Steinwart und A. Christmann, *Support Vector Machines, Information science and statistics* (Springer, Berlin, 2008).
- [136] A. C. W. van Rhijn, M. Jurna, A. Jafarpour, J. L. Herek und H. L. Offerhaus, *J. of Raman Spec.* **42**, 1859 (2011).

- [137] A. C. van Rhijn, H. L. Offerhaus, P. van der Walle, J. L. Herek und A. Jafarpour, *Opt. Express* **18**, 2695 (2010).
- [138] A. C. W. van Rhijn, S. Postma, J. P. Korterik, J. L. Herek und H. L. Offerhaus, *J. Opt. Soc. Am. B* **26**, 559 (2009).
- [139] I. Rechenberg, *Evolutionstrategie '94, Werkstatt Bionik und Evolutionstechnik* (Frommann-Holzboog, Stuttgart, 1994).
- [140] D. E. Goldberg, *Genetic Algorithms* (Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, 2013).
- [141] I. Gerdes, F. Klawonn und R. Kruse, *Evolutionäre Algorithmen* (Springer, Berlin, 2004).
- [142] D. Oron, N. Dudovich und Y. Silberberg, *Phys. Rev. A* **70**, 023415 (2004).
- [143] A. Wipfler, T. Buckup und M. Motzkus, *App. Phys. Lett.* **100**, 071102 (2012).
- [144] A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus, *Opt. Lett.* **37**, 4239 (2012).
- [145] A. Wipfler, J. Rehbinder, T. Buckup und M. Motzkus, *J. of Raman Spec.* **44**, 1379 (2013).
- [146] J. Rehbinder, C. Pohling, T. Buckup und M. Motzkus, *Opt. Lett.* **35**, 3721 (2010).
- [147] T. Buckup, J. Dorn, J. Hauer, S. Härtner, N. Hampp und M. Motzkus, *Chem. Phys. Lett.* **439**, 308 (2007).
- [148] R. Stoian, M. Wollenhaupt, T. Baumert und I. V. Hertel, *Laser Precision Micro-fabrication* (Springer, 2010), S. 121–144.
- [149] R. Noll, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* (Springer, Berlin, 2012).
- [150] A. Natan, J. M. Levitt, L. Graham, O. Katz und Y. Silberberg, *App. Phys. Lett.* **100**, 051111 (2012).
- [151] A. Natan, O. Katz, S. Rosenwaks und Y. Silberberg, in *Ultrafast Phenomena XVI*, Vol. 92 of *Springer Series in Chemical Physics*, herausgegeben durch P. Corkum, S. Silvestri, K. A. Nelson, E. Riedle und R. W. Schoenlein (Springer Berlin Heidelberg, 2009), S. 985–987.

- [152] H. Li, D. A. Harris, B. Xu, P. J. Wrzesinski, V. V. Lozovoy und M. Dantus, in *Laser Applications to Chemical, Security and Environmental Analysis*, Optical Society of America (PUBLISHER, 2008).
- [153] M. T. Bremer, P. J. Wrzesinski, N. Butcher, V. V. Lozovoy und M. Dantus, *App. Phys. Lett.* **99**, 101109 (2011).
- [154] C. Bauer, A. Sharma, U. Willer, J. Burgmeier, B. Braunschweig, W. Schade, S. Blaser, L. Hvozدارa, A. Müller und G. Holl, *Applied Physics B* **92**, 327 (2008).
- [155] P. Beaud, H.-M. Frey, T. Lang und M. Motzkus, *Chemical physics letters* **344**, 407 (2001).
- [156] T. Lang und M. Motzkus, *J. opt. Soc. Am. B* **19**, 340 (2002).
- [157] T. Hanke, J. Cesar, V. Knittel, A. Trügler, U. Hohenester, A. Leitenstorfer und R. Bratschitsch, *Nano Lett.* **12**, 992 (2012).
- [158] V. V. Temnov, K. A. Nelson, G. Armelles, A. Cebollada, T. Thomay, A. Leitenstorfer und R. Bratschitsch, *Opt. Express* **17**, 8423 (2009).
- [159] D. E. Leaird und A. M. Weiner, *Opt. Lett.* **24**, 853 (1999).
- [160] Z. Jiang, C.-B. Huang, D. E. Leaird und A. M. Weiner, *Nat Photon* **1**, 463 (2007).
- [161] G. Thalhammer, R. W. Bowman, G. D. Love, M. J. Padgett und M. Ritsch-Marte, *Opt. Express* **21**, 1779 (2013).
- [162] E. Frumker, D. Oron, D. Mandelik und Y. Silberberg, *Opt. Lett.* **29**, 890 (2004).
- [163] J.-x. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book und X. S. Xie, *J. of Phys. Chem. B* **105**, 1277 (2001).
- [164] D. Zeidler, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001.
- [165] G. Arfken, H. J. Weber und F. E. Harris, *Mathematical methods for physicists*, 7. Aufl. (Elsevier Ltd, Oxford, 2012).
- [166] M. L. Boas, *Mathematical methods in the physical sciences*, 3. Aufl. (John Wiley and sons, Hoboken, NJ, 2005).
- [167] M. A. Montgomery und N. H. Damrauer, *New J. of Phys.* **11**, 105053 (2009).

- [168] M. Herdy, *Parallel Problem Solving from Nature—PPSN IV* (Springer, Berlin, 1996), S. 22–31.

Danksagung

Nun da ich in jeder Hinsicht am Ende meiner Doktorarbeit angelangt bin, möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir dies ermöglicht haben.

Zunächst ist hier Herr Prof. Dr. Marcus Motzkus zu nennen, der diese Arbeit betreut hat. Er machte all die Jahre in vielen Situationen deutlich, dass er - vermutlich mehr als ich selbst - in meine Fähigkeiten vertraut, was die beste Motivation war, die er mir als Betreuer geben konnte.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit an ihrem Seminar teilzunehmen danke ich Frau Prof. Dr. Annemarie Pucci. An dieser Stelle danke ich auch Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Brenner und Herrn Prof. Dr. Thomas Gasenzer für ihre Bereitschaft in meiner Prüfungskommission mitzuwirken.

Herrn Dr. Tiago Buckup danke ich für den fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch, insbesondere beim Erstellen der gemeinsamen Veröffentlichungen, ich habe das Gefühl durch unsere Zusammenarbeit gewachsen zu sein.

Für im besten Sinne gute Unterhaltung(en) danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Robert Volpp.

Von meinen ehemaligen Kollegen möchte ich besonders Jens Möhring, Marie Krause, Christoph Pohling und Dzmitry Starukhin danken, denen ich mich freundschaftlich verbunden fühle, nach allem was wir gemeinsam erlebt haben.

Den aktuellen Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe Jiang Man, Steffy Becht, Takeshi Miki, sowie Frau Boganski aus dem Sekretariat danke ich für die gute Zusammenarbeit. Meiner Forschungspraktikantin Andrea Uptmoor danke ich für ihre engagierte Arbeit und ihr großes Interesse.

Mein Mentor Jean Reh binder hat eine besondere Rolle während der Arbeit gespielt. So war er nicht nur mein Kollege, mit dem ich ein Experiment teilte, sondern später auch Mitbewohner und nicht zuletzt ein guter Freund und Vertrauter, ohne dessen besonderen Humor diese Arbeit nicht hätte fertiggestellt werden können.

In Lukas Brückner hat er einen würdigen Nachfolger gefunden, der nicht nur viel Enthusiasmus in die CARS-Gruppe brachte, sondern auch großen Unterhaltungswert. Obwohl...

Einen besonderen Dank möchte ich an meine "Büromitbewohnerin" Julia Herz richten. Zum einen für die großzügige Büroversorgung mit Obst vom Markt und die damit verbundene gesunde Ernährung, die mich vermutlich vor vielen Krankheiten bewahrt hat. Viel mehr aber noch für die vielen netten, aufmunternden, lehrreichen und oft auch witzigen Gespräche, die ich sehr vermissen werde.

Wo ich ohne die schönen Erlebnisse der vergangenen Jahre mit meinen Bands wäre, kann ich kaum abschätzen. Durch sie wurde mir immer wieder bewusst, dass es ein Leben jenseits des Laboralltags gibt, für das es sich lohnt manche Anstrengung auf sich zu nehmen.

Es ist immer ein heikles Unterfangen Freunden zu danken, da man zwangsläufig welche vergisst. Ich versuche es trotzdem, beschränke mich aber auf wenige und vergesse bewusst: Iris König und Stephan Piedl waren mir in den letzten Jahren unverzichtbare Freunde. Sie haben mir durch einige Krisen geholfen und haben damit mehr Anteil an dieser Arbeit, als ihnen vielleicht bewusst ist. Martin Pfeifer ist als Freund ebenso zuverlässig wie als Bassist. Ihm danke ich vor allem für seine positive, aber nicht blauäugige, Weltsicht und seine Gutmütigkeit.

Den Titel des "besten Kumpels" kann man nur einmal vergeben. Unter meinen vielen guten Freunden ist dies seit über 25 Jahren Sebastian Gerner, mit dem mich das Interesse für Rock'n'Roll, viele gemeinsame Erlebnisse und nicht zuletzt tiefes gegenseitiges Verständnis verbinden.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich in all den Jahren unterstützt hat und mit dem unvermittelten Tod meines Vaters Manfred Wipfler (1943-2012) einen schweren Schlag hinnehmen musste. Dass er die Fertigstellung der Arbeit nicht mehr miterleben darf, erfüllt mich mit großer Traurigkeit. Besonders danken möchte ich meiner Mutter Hannelore Wipfler, der ich in den vergangenen Jahren leider viel zu selten Dankbarkeit und viel zu oft meine schlechten Launen zuteil werden ließ.

Als kleine Belohnung für alle, die bis zum Ende ausgehalten haben, möchte ich mit einem Zitat des Kopfballungeheuers Horst Hrubesch schließen: „Ich sage nur ein Wort: Vielen Dank!“

Eidesstattliche Erklärung

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

Heidelberg, 9. Dezember 2013

Alexander Wipfler