

Eine MHz-Lichtquelle für die Femtosekunden-Stimulierte Raman-Mikroskopie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Philipp Benjamin Marx
aus München

Düsseldorf, Mai 2013

aus dem Institut für Physikalische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Gilch
Korreferent: Prof. Dr. Rainer Weinkauf

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xv
1 Ramanspektroskopie und Mikroskopie	1
1.1 Ramanspektroskopie und Mikroskopie in der Anwendung	1
1.2 Der Laser als technische Voraussetzung für die Ramanmikroskopie und nichtlineare Spektroskopie	2
1.3 Methodische Neuentwicklungen im Feld der Ramanmikroskopie	3
1.3.1 Moderne, konventionelle Ramanmikroskopie	3
1.3.2 Kohärente anti-Stokes Ramanstreuung (CARS) als Kontrastmechanismus	5
1.4 Stimulierte Ramanstreuung (SRS) als Kontrastmechanismus	8
1.4.1 Einkanal-SRS	9
1.4.2 Hybrid-SRS	10
1.5 Femtosekunden-Stimulierte Ramanspektroskopie als Kontrastmechanismus	12
1.5.1 Benötigte Laserimpulscharakteristika für die FSRM	12
1.5.2 kHz-Lichtquelle für FSRM	13
1.5.2.1 Bildgebung mit der kHz-FSRM	13
1.5.2.2 Die Schwächen der kHz-Lichtquelle	15
1.6 MHz-Lichtquelle für FSRM	15
1.6.1 Das Konzept der MHz-Lichtquelle	15
1.6.2 Aufgabenstellung der Arbeit	16
1.7 Gliederung der Arbeit	16
2 Grundlagen der Lasertechnik und der Faseroptik	17
2.1 Ausgewählte Ergebnisse der Lasertechnik	17
2.1.1 Drei-Niveau-/Vier-Niveau-Schema eines Lasers	18
2.1.2 Kurze Lichtimpulse aus Lasern	20
2.1.3 Beschreibung kurzer Lichtimpulse, Gruppengeschwindigkeitsdispersion und "zirpende" Spiegel	21
2.1.4 Messung kurzer Lichtimpulse	24
2.1.5 Der Intensitätsautokorrelator und sein Aufbau nach Kozma	24
2.2 Single-mode Fasern und Faserverstärker	25
2.2.1 Eigenschaften von Singlemode Fasern	25

2.2.2	Dispersion in Einzelmodenfasern	27
2.2.3	Selbstphasenmodulation in Fasern	27
2.2.4	Grundlagen zu dem Faserverstärker	28
2.2.4.1	Ytterbiumionen als Verstärkermedium	29
2.2.4.2	Aufbau einer einzelnen Verstärkerstufe	30
2.2.4.3	Theoretische Beschreibung eines Verstärkers	31
3	Beschreibung und Charakterisierung der MHz-Lichtquelle für die FSRM	35
3.1	Impulscharakteristik und Aufbau des Oszillators	35
3.2	Aufbau des Faserverstärkers	37
3.2.1	Angestrebte Impulscharakteristik des Ramanpumpimpulses	37
3.2.2	Charakteristik des Eingangssignals des Verstärkers	38
3.2.3	Aufbau des Verstärkers in mehreren Stufen	39
3.2.4	Einzelpass-Vorverstärker	39
3.2.5	Doppelpass-Vorverstärker	41
3.2.6	Leistungsverstärker	42
3.3	Aktueller Aufbau des Faserverstärkers	45
3.3.1	Aufbau mit einem Reflexionsgitter zur spektralen Einengung	47
4	Grundlagen der Femtosekunden Stimulierten Ramanmikroskopie	49
4.1	Nichtlineare Optik	49
4.1.1	Stimulierte Raman Streuung	50
4.1.2	Femtosekunden Stimulierte Ramanstreuung oder stimulierte Ramanstreuung mit kurzen Pulsen	55
4.1.3	Spektrale Interferenz eines Vierwellenmischuntergrunds mit dem Ramanprobeimpuls	57
4.2	Mikroskopie mit Femtosekunden Stimulierter Ramanstreuung	61
4.2.1	Auflösungsgrenze und Fokaltvolumen.	61
4.2.2	Auswahl geeigneter Objektive für die Fokussierung und Kollimation	62
4.3	Abschätzung des Signals der FSRM	63
5	Die spektroskopischen und mikroskopischen Aufbauten des FSRM Experiments	67
5.1	Piezostellelement zur Modulationsunterdrückung	68
5.2	Mikroskop	68
5.2.1	Teleskope zum Ausleuchten der Objektive	69
5.2.2	Objektive	70
5.2.3	Rastertisch	71
5.2.4	Probenpräparation	71
5.3	Der Spektrograph	71
5.4	Detektion	74
5.4.1	Hamamatsu-Diodenzeilen	74
5.4.2	Rolling-Shutter-Readout der Hamamatsu-Photodiodenzeile	75

5.4.3	Der “ULTRA“-Detektor	76
5.5	Erzeugung der Modulation des Pumplichtes	76
5.6	Messmethoden in der FSRM	77
5.6.1	Theoretischer Signalverlauf bei der Messung des Ramansignals . . .	78
5.6.2	Die referenzierte Messung stimulierter Ramanspektren	79
5.6.3	Ramanspektren unter Variation der Zeit des Starttriggers der Messung	82
5.6.4	Die “Phasestepping“-Methode	83
5.6.5	Ramanspektren mit “Phasestepping“	86
6	Rauschbeiträge in der FSRM	89
6.1	Rauschquellen des FSRM Experiments	92
6.1.1	Stabilität bzw. Rauschen des Ti:Saphir-Oszillators	92
6.1.2	Stabilität bzw. Rauschen des Faserverstärkers	95
6.1.3	Detektions- und Detektorrauschen	96
6.2	Signal-zu-Rauschverhältnis eines Ramanspektrums	97
6.3	Das Rauschen des Experiments	98
7	Ramanspektroskopie und Ramanmikroskopie mit dem MHz-FSRM Aufbau	103
7.1	Ramanspektroskopie mit MHz	103
7.1.1	Spektrale Auflösung des Experimentes	104
7.1.2	Charakterisierung der Laserimpulse mittels des Ramansignals . . .	106
7.1.3	Linienform der Ramanbanden bei der FSRS	109
7.1.4	Ramanspektren mit der “Phasestepping“-Methode	110
7.1.5	Vergleich des spontanen Ramanspektrums mit dem stimulierten Ramanspektrum von Benzonitril	111
7.2	Ramanmikroskopie mit dem MHz-FSRM Aufbau	113
7.2.1	Ramanbildgebung von Polymermikroskopiestandards anhand einer Hauptwertanalyse	114
7.2.2	Ramanbildgebung einer Epithelzelle	118
8	Perspektive und Kritik der FSRM	123
8.1	Fähigkeiten und Grenzen des MHz-FSRM-Aufbaus	123
8.2	Ungeklärte Sachverhalte bei der Messung mit dem MHz-FSRM-Aufbau . .	124
8.3	Wieviel Licht benötigt das FSRM Experiment, um den “Fingerprint“-Bereich einer Zelle zu messen?	126
8.4	Vorschläge zur Weiterentwicklung	127
8.4.1	Verbesserung der Lichtquelle	127
8.4.2	Ein schnellerer Detektor mit höherer Photoelektronenspeicherkapazität	129
8.4.3	Stabilere Mechanik und Optomechanik	130
8.4.4	“Rauschminderung“ mit SVD und Baselinekorrektur	130
8.4.5	Anwendung der FSRM in der Zellbiologie	131

A Spontane Ramanspektren einiger erwähnter Substanzen	133
B Spektrale Artefakt bei der Bildgebung mit FSRS	137
C GVD einiger Objektive	139
D Filterkurven des Strahlteilers zur Abspaltung des Seedimpulses	141
Literaturverzeichnis	143
Danksagung	163

Abbildungsverzeichnis

1.1	CARS-Schema und CARS-Spektrum	6
1.2	SRS-Schema und SRS-Spektrum	9
1.3	Bildgebung mit dem kHz-FSRM Aufbau von Polymermikrokopiestandards aus Polystyrol mit dem kHz-FSRM Aufbau	14
2.1	Energieniveauschema für einen Drei-Niveaulaser und einen Vier-Niveaulaser	19
2.2	Schema des Aufbaus des verwendeten Autokorrelators	25
2.3	Spektroskopische Eigenschaften von Ytterbiumionen in Glasfasern	30
2.4	Schematischer Aufbau einer Verstärkerstufe	31
3.1	Charakterisierung des fs-Oszillators	36
3.2	Schematischer Aufbau des Oszillators	37
3.3	Vergleich des zeitlichen Verlaufes des Ausgangssignal der ersten Verstärker- stufe ohne und mit Isolator.	40
3.4	Ausgangsleistung der ersten Verstärkerstufe in Abhängigkeit der Pumpleistung	41
3.5	Vergleich der Ausgangsleistung der ersten Stufe als Doppelpass mit unter- schiedlichen Faserlängen	43
3.6	Leistungscharakteristik des Leistungsverstärkers	44
3.7	Spektrale Charakterisierung des Yb^{3+} -Verstärkers	45
3.8	Schema des aktuellen Aufbau des Faserverstärkers	46
3.9	Ausgangsspektrum und Kontrast des Ausgangssignals des gesamten Verstär- kers im aktuellen Zustand.	47
3.10	Schema und Ausgangsspektrum des Verstärkeraufbaus mit Reflexionsgitter zur spektralen Einengung.	48
4.1	Schematische Darstellung der Messung des Depolarisationsverhältnis	54
4.2	Schematische Darstellung der Femtosekunden stimulierte Ramanstreuung .	56
4.3	Spektrale Interferenz im FSRS-Spektrum von Benzonitril	58
4.4	Frequenzbereiche des Vierwellenmischens zwischen Pump und Probelicht .	59
5.1	Aufbau des FSRM-Experiments	67
5.2	Aufbau des Spektrographen	72
5.3	(a) Linearität der Hamamatsudiodenzeile S3901; (b) Quanteneffizienz der Diodenzeilen S3901 und S8380	75

5.4	Schaltung und Ausgangssignal der Hamamatsu-Diodenzeile	76
5.5	Modulation des Pumplichtes mit "Chopper"-Rad bzw. Strom der Pumpdiode der zweiten Verstärkungsstufe	78
5.6	Der Verlauf des spektralen Signals bei der "Phasestepping"-Methode	80
5.7	Phasenfehler bei der referenzierten Messmethode	82
5.8	Amplitudenfehler bei der "Phasestepping"-Methode	85
5.9	Phasenfehler des Ramanverlustsignals für N=3	87
6.1	Schema des Messprozesses	90
6.2	Standardabweichung in Abhängigkeit der gemittelten Pixel.	94
6.3	Rauschen und Rauschbeiträge zum Messsignal.	99
6.4	Das rauschequivalente Signal in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen	101
7.1	Stimulierte Ramanspektren der Substanzen Cyclohexan, Toluol und Benzo- nitril	104
7.2	CH-Streckbereich des stimulierten Ramanspektrums von Cyclohexan und Bandenanpassung	105
7.3	Konturdarstellung des Ramanspektrums von Benzonitril in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit zwischen Probe- und Pumpimpuls.	107
7.4	Normiertes Ramanbandensignal in Abhängigkeit der Verzögerungszeit zwi- schen Probe- und Pumpimpuls.	108
7.5	Linienform der 2228 cm^{-1} -Bande von Benzonitril bei unterschiedlichen Ver- zögerungszeiten.	109
7.6	Ramanspektrum von Benzonitril mit der "Phasestepping"-Methode.	110
7.7	Spontanes und stimuliertes Ramanspektrum von Benzonitril	112
7.8	Vergleich der Ramanbandenintensität von spontaner und stimulierter Ram- anstreuerung.	113
7.9	Stimulierte Ramanspektren aus einem bildgebenden Scan von Polymermikro- skopiestandards (PS,PMMA) in einer wässrigen Dispersion.	115
7.10	Repräsentative PCA-Komponenten (5,6,11) einer Aufnahme von Polymer- mikroskopiestandards in einer wässrigen Dispersion.	116
7.11	Transmissionsaufnahme und Ramanmikroskopische Analyse von Polymer- mikroskopiestandards (PS, PMMA) in einer wässrigen Dispersion.	117
7.12	Ramanmikroskopische Aufnahme einer Epithelzelle aus der menschlichen Mundschleimhaut.	120
7.13	Gemittelte Ramanspektren aus der Ramanmikroskopischen Aufnahme einer Epithelzelle.	121
A.1	Spontanes Ramanspektrum von Wasser	134
A.2	Spontanes Ramanspektrum von Polystyrol	135
A.3	Spontanes Ramanspektrum von Polymethylmethacrylate	136
B.1	Die ersten PCA-Komponenten (1,2,3) einer Aufnahme von Polymermikro- skopiestandards (PMS) in einer wässrigen Dispersion.	138

D.1 Filterkurven der beiden verwendeten Strahlteiler zur Abspaltung des Sees-	
dimpulses	142

Tabellenverzeichnis

5.1	Spektrale Breite eines Pixels des Hamamatsudiodenarrays	73
5.2	Systematischer Amplitudenfehler der “Phasestepping“-Methode für $N = 3, 5, 7$	86
C.1	GVD einiger Objektive	140

Zusammenfassung

Die Schwingungsspektroskopie ist eine wichtige Methode zur Analyse von Molekülen, da anhand des Schwingungsspektrums eines Moleküls wichtige Aussagen über dessen Struktur getroffen werden können. Die IR-Absorptionsspektroskopie und die Ramanspektroskopie sind die zwei bedeutsamsten Techniken, um Schwingungsspektren aufzunehmen. Beide Techniken eignen sich zur Gewinnung von Schwingungsspektren mikroskopischer Proben. Damit können diese nicht nur morphologisch charakterisiert werden wie in der konventionellen Lichtmikroskopie, sondern auch anhand ihrer molekularen Zusammensetzung. Die Ramanmikroskopie besitzt eine höhere räumliche Auflösung als die IR-Mikroskopie, aber eine geringere Signalstärke als diese. Deswegen wurden optisch nichtlineare Techniken wie die kohärente anti-Stokes Ramanstreuung (CARS) und die stimulierte Ramanstreuung (SRS) zur Signalverstärkung in der Ramanmikroskopie angewandt. Die Femtosekunden-stimulierte Ramanspektroskopie (FSRS) ermöglicht die spektral breitbandige Aufnahme von (stimulierten) Ramanspektren. Man benötigt für die FSRS zwei Lichtimpulse: Einen spektral breitbandigen Impuls als "Ramanprobeimpuls" und einen spektral schmalbandigen und intensiven Impuls als "Ramanpumpimpuls". Diese Technik wurde 2007 von Ploetz et al. erstmals in der Mikroskopie als Kontrastmechanismus eingesetzt und in Anlehnung an die FSRS Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie (FSRM) genannt. Die verwendeten Lichtimpulse wurden von einem Ti:Sa-Laser/Verstärkersystem mit einer Wiederholrate von 1 kHz abgezweigt und entsprechend den jeweiligen Erfordernissen für Ramanpump bzw. -probeimpuls angepasst. Der verwendete Ramanpumpimpuls aus diesem Lasersystem besaß eine Energie im Bereich von einigen 100 nJ. Wenn diese Energie mit Hilfe eines Mikroskopobjektives fokussiert wird, ergibt sich im Fokus eine Spitzenleistung, die unverträglich mit biologischen Proben ist.

Deswegen wurde eine neue Lichtquelle konzipiert, die auf einem Ti:Sa-Oszillator mit einer Wiederholrate von 75 MHz beruht und eine entsprechend niedrigere Impulsenergie aufweist. Die Kernidee dieses Konzeptes ist, dass der Ramanprobeimpuls ohne weitere Konversion direkt im Laseroszillator erzeugt wird und dann der Ramanpumpimpuls aus dem Flügel des Oszillatorspektrums verstärkt wird. Dieses Konzept wurde im Zuge dieser Arbeit realisiert: Es wurde ein Ti:Sa-Oszillator mit einem sehr breitem Spektrum beschafft und eine Faserverstärker aufgebaut, um den Ramanpumpimpuls zu erzeugen. Der Faserverstärker benutzt Yb^{3+} -dotierte Fasern als aktives Medium. Die erzeugten Impulse wurden zeitlich und spektral charakterisiert. Die spektrale Breite des Ramanprobeimpulses betrug ca. 1875 cm^{-1} . Der Ramanpumpimpuls besaß eine Energie von ca. 0.5 nJ, er war

1.2 ps lang und das Spektrum war 18 cm^{-1} breit. Mit Hilfe dieser Lichtimpulse gelang es stimulierte Ramanspektren von Reinsubstanzen aufzunehmen. Der abgebildete Spektralbereich des Schwingungsspektrums reichte von $900\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Die spektrale Auflösung betrug ca. 20 cm^{-1} . Dabei wurde eine neue Messmethodik, das sogenannte “Phasestepping“, auf die FSRM angewandt. Diese ermöglichte die Verwendung eines Detektors mit “Rolling-Shutter“ ohne systematischen Fehler. Die Ramanbandenhöhen des stimulierten Ramanspektrums von Benzonitril wurden mit den Bandenhöhen des spontanen Ramanspektrums von Benzonitril verglichen und eine systematische Abweichung festgestellt.

Um diese Lichtquelle für die FSRM nutzbar zu machen, wurde ein rasterndes Mikroskop aufgebaut. Zunächst wurden mit diesem Mikroskopiostandards aus unterschiedlichen Polymeren abgebildet. Mit Hilfe einer Hauptwertanalyse gelang es die verschiedenen Polymere zu unterscheiden. Daraufhin wurde auch eine menschliche Epithelzelle abgebildet. Die Ramanspektren dieser Abbildung wurden anhand des Ramansignals einer einzelnen Ramanbande ausgewertet und dargestellt.

Das Rauschen bei der Messung von Ramanspektren wurde ausführlich analysiert. Dieses setzte sich aus dem Schrotrauschen durch die Photonen des Ramanprobeimpulses und dem Laseramplitudenrauschen zusammen. Das Signal-zu-Rauschverhältnis eines mit dem Aufbau aufgenommen Ramanspektrums genügt im derzeitigen Zustand nicht, um anhand des “Fingerprint“-Bereichs des Spektrums Zellkompartimente zu differenzieren. Eine höhere Detektionsrate könnte sowohl den Beitrag des Schrotrauschens als auch den des Amplitudenrauschens zum Gesamtrauschen senken. Ein optimierter Pumpimpuls, ein Detektor mit höherer Ausleserate und bessere Datenaufbereitung werden den Weg zur Bildgebung an biologischen Proben mit der FSRM ebnen.

Abstract

Vibrational Spectroscopy is an important tool for the characterization of molecules, because the vibrational spectrum of a molecule contains detailed information on its structure. IR absorption spectroscopy and Raman spectroscopy are the most prominent techniques in use to record the vibrational spectrum of a molecule. Both techniques can be applied to microscopic samples. Raman and IR microscopy can characterize a sample not only morphologically as conventional light microscopy can, but also based on their molecular composition. The spatial resolution of Raman microscopy is better, the signal much weaker compared to IR microscopy. Nonlinear optical techniques like coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and stimulated Raman scattering (SRS) have been applied in Raman microscopy to improve the Raman signal. Femtosecond stimulated Raman scattering (FSRS) enables the measurement of broadband Raman spectra. Two light pulses are employed for FSRS: a spectrally broadband pulse known as “probe” pulse and an intense, spectrally narrow pulse known as “pump” pulse. FSRS was introduced into the field of microscopy by Ploetz et al. in 2007 and referred to as femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM). In this first implementation the light pulses have been branched off a Ti:Sapph Laser/Amplifier system with a 1 kHz repetition rate. The energy of the pump pulse amounted to some 100 nJ. When the pump pulses are focused by a microscope objective, the peak power of these pulses is not compatible to biological samples.

A new light source relying on a Ti:Sapph oscillator with a MHz repetition rate has therefore been devised. With this light source the pump pulses are order of magnitudes lower in energy. The probe pulse is generated directly from the laser oscillator and the pump pulse is generated by amplifying the spectral wing of the oscillator spectrum. This concept has been realized in this thesis: A commercial, broadband oscillator has been purchased, and a fiber amplifier relying on Yb³⁺-doped fibers has been assembled, to generate the pump pulse. The pulses have been characterised spectrally and temporally. The spectral width of the probe pulse amounted to 1875 cm⁻¹. The energy of the pump pulse amounted to 0.5 nJ, the duration to 1.2 ps and the spectral width to 18 cm⁻¹. Stimulated Raman spectra were recorded using these light pulses. A spectral coverage of 900-4000 cm⁻¹ was achieved, and the spectral resolution amounted to ca. 20 cm⁻¹. The “phase stepping” method was applied for the recording of the spectra. This method enabled measurements with a rolling shutter detector without systematic errors. The Raman band integrals of the stimulated Raman spectrum of Benzonitril was compared with the band integrals of spontaneous Raman spectrum of this substance, and a systematic difference between both of these was

observed.

A raster scanning microscope was designed and built specifically for the lightsource. The setup was employed for the mapping of different polymer microscopy standards. A subsequent principal component analysis (PCA) of the recorded data set could differentiate between the different components of the sample. This first demonstration of the imaging capability of the setup was followed by the imaging of an human epithelial cell. The hyperspectral data set of this measurement was univariately analysed based on a single Raman band integral.

The measured spectra have been analysed to determine the noise contributions. The main noise sources are the shot noise of the photons of the probe pulse and the laser amplitude noise. At present the measurement of the cell could not be interpreted based on the the fingerprint region of the raman spectrum because of the low signal-to-noise ratio. At a higher detection rate, the shot noise as well as the laser amplitude noise should decrease. An optimized pump pulse, a detector with a higher detection rate and improved data processing will pave the way for biological imaging with FSRM.

Kapitel 1

Ramanspektroskopie und Mikroskopie

1.1 Ramanspektroskopie und Mikroskopie in der Anwendung

Die Ramanspektroskopie ist eine schwingungsspektroskopische Technik. Sie beruht auf der inelastischen Streuung von Licht an einer Probe. Dieser Effekt wurde von C.V. Raman und K.S. Krishnan zum ersten Mal experimentell nachgewiesen und beschrieben [1]. Der Energieverlust (Stokesstreuung) oder -gewinn (Anti-Stokesstreuung) eines Lichtquants entspricht dabei der Energie einer Schwingungsmode eines Moleküls in der Probe. Die Messung des gestreuten Lichtes gibt also Auskunft über Schwingungen der Moleküle in der Probe und damit über ihre Struktur. Ähnliche, aber komplementäre Informationen über Molekülschwingungen liefert die IR-Absorptionsspektroskopie. Während die Ramanspektroskopie sensitiv auf Änderungen der Polarisierbarkeit durch die Schwingungsmoden des Moleküls ist, beruht die IR-Spektroskopie auf der Änderung des Dipolmoments des Moleküls durch die Molekülschwingungen [2]. Der Ramaneffekt (typische Streuquerschnitte: 10^{-29} cm^2 [3]) ist deutlich schwächer als die IR-Absorption (typische Absorptionsquerschnitte: 10^{-19} cm^2 [4]). Jedes Molekül weist ein charakteristisches Schwingungsspektrum (Raman und IR) auf anhand dessen es identifiziert werden kann. Gewisse funktionale Struktureinheiten in Molekülen können bestimmten Frequenzbereichen in Schwingungsspektren zugeordnet werden. Die Schwingungsspektroskopie kann demnach zur Strukturaufklärung von Molekülen dienen [5]. Dafür werden heutzutage unter anderem noch Magnetresonanzspektroskopie [6], Röntgenbeugung [7, 8, 9] und Massenspektrometrie [6] eingesetzt. Die Schwingungsspektroskopie besitzt einen weitgefächerten Anwendungsbereich: Sie wird zum Beispiel in der Analytik der organischen und anorganischen Chemie [6, 10, 11], der zeitaufgelösten Spektroskopie [12, 13], der Biomedizin [14], der molekularen Biophysik [15], der Pharmazie [16, 17] und der Zellbiologie [18, 19, 20] eingesetzt, aber auch in der Materialforschung ([21, 22]), der Archäologie [23] und der Kunstgeschichte [24]. Sie besitzt wie beschrieben eine hohe molekulare Spezifität und ist nicht invasiv. Jede Probe kann in ihrem "natürlichen" Zustand gemessen werden. Die Signalhöhe ist in der Regel linear proportional zur Konzentration der Probe, was die analytische Anwendung vereinfacht. Der Ramanef-

fekt wurde 1975 erstmals als Kontrastmechanismus in der Mikroskopie eingesetzt [25, 26]. Bei dieser Anwendung hat der Ramaneffekt gegenüber der IR-Absorption als Kontrastmechanismus den Vorteil, dass das theoretisch erreichbare, räumliche Auflösungsvermögen zehnmal besser ist [27]. Es dauerte aufgrund der Schwäche des Ramaneffektes und der Empfindlichkeit der Technik auf die Fluoreszenz der Probe (Autofluoreszenz) bis Ende der achziger Jahre bzw. Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts bis die Technik begünstigt durch technische Entwicklungen (CCD, optische Raleighlinienfilter) zu einer breiteren Anwendung fand [27].

Ein Anwendungsfeld der modernen Ramanmikroskopie ist die Zellbiologie [18, 28]. Das räumliche Auflösungsvermögen entspricht der konventionellen Lichtmikroskopie. Es können also Details (Zellkern [29], Mitochondrien [28], Lipidvesikel [30]) innerhalb einer Zelle aufgelöst werden. Die Proben müssen zur Kontrastgebung weder eingefärbt werden, wie in der konventionellen Lichtmikroskopie [31, 32], noch müssen Fluoreszenzmarkermoleküle in das zu untersuchende System eingebracht werden, wie in der Fluoreszenzmikroskopie [33, 34, 35, 36]. Das ermöglicht lebende Zellen [18, 20, 37] oder sogar Organismen [38, 39] in ihrer nativen Umgebung und Gestalt anhand ihrer chemischen Zusammensetzung quantitativ zu untersuchen [40]. So können molekulare Mechanismen in der Zelle direkt aufgedeckt und quantitativ ausgewertet werden [20, 37].

1.2 Der Laser als technische Voraussetzung für die Ramanmikroskopie und nichtlineare Spektroskopie

Bevor die Ramanmikroskopie für die Zellbiologie nutzbar werden konnte, haben von der Entdeckung des Ramaneffektes 1928 [1] bis zur ersten Aufnahme einer lebenden Zelle mit einem Ramanmikroskop [18] einige technische und methodische Arbeiten den Weg bereitet. Eine der Wichtigsten stellt ohne Zweifel der Laser dar, denn eine geeignete Lichtquelle ist Voraussetzung für die effiziente Anregung von Ramanspektren: Raman beschrieb früh, dass erst eine monochromatische Lichtquelle den Ramaneffekt zu einer genauen und praktischen Methode zur Erforschung von Schwingungsspektren macht [41], da bei einer polychromatischen Quelle eine Schwingungsbande durch die Anregung mit einem breiten Spektrum instrumentell verbreitert wird.

Niederdruckgasentladungslampen mit geeigneten Filtern zur Isolierung eines einzelnen Übergangs aus dem Linienspektrum des Gases (zum Beispiel der Linie bei 4358 Angstrom aus dem Hg-Spektrum [42]) waren bis zur Erfindung des Lasers 1960 [43, 44] eine verbreitete Methode zur Anregung von Ramanspektren. Wie in vielen Bereichen der Wissenschaft hat der Laser auch die Ramanspektroskopie stark verändert. Im Jahre 2012 beinahe 50 Jahre nach der ersten Verwendung eines Lasers als Lichtquelle für die Ramanspektroskopie [45] werden fast ausschließlich Laser zur Ramananregung verwendet. Der Vorteil des Lasers lag zunächst neben den hohen Durchschnitts- oder Spitzenleistungen die Laser erzielen können vor allem in der höheren räumlichen Kohärenz des Laserlichtes. Diese ermöglichte einen einfacheren optischen Aufbau und die Untersuchung geringerer Probenmengen [46, 47], bis

zur Mikroramanspektroskopie [25, 26].

Ein weiterer Vorteil der Lasertechnik als Anregungsquelle war und ist die Verfügbarkeit anderer Anregungswellenlängen. Durch die Wahl eines geeigneten Lasers können elektronische Resonanzen und damit Fluoreszenz bewusst vermieden werden (Anregung im Nahinfrarotbereich [48, 49] oder im langwelligen Bereich des Sichtbaren [50]), oder eine Resonanz kann bewusst benutzt werden, um das Ramansignal mit Hilfe des Resonanzramaneffektes zu überhöhen (Anregung im Ultraviolett oder im kurzwelligen Bereich des Sichtbaren [51]). Ein stabiler, monochromatischer Laser allein genügt jedoch nicht für den Aufbau eines funktionstüchtigen Ramanmikroskopes. Moderne CCDs mit einer hohen Quanteneffizienz bis in den nahinfraroten Bereich ermöglichen die Detektion kleinster Lichtintensitäten. Moderne Kanten- und Kerbfilter zur vollständigen Unterdrückung der Rayleighstreuung erlauben eine hohe Transmission des Ramansignals. Zudem macht eine moderne Datenerfassung und -verarbeitung schnelle Bildgebung möglich.

Die Erfindung des Lasers führte auch zum experimentellen Nachweis nichtlinearer optischer Prozesse [52]. Für die nichtlineare Spektroskopie benötigt man hohe Spitzenintensitäten. Diese werden von Kurzpulslasern zur Verfügung gestellt. Der stimulierte Raman-effekt wurde 1962 erstmals beobachtet [53, 54], die kohärente anti-Stokes Ramanstreuung im Jahr 1965 (CARS) [55]. Die erste Realisierung eines Mikroskops, dessen Kontrast auf einem nichtlinearen Ramanprozess (hier: CARS) beruht, gelang 1982 mit Farbstofflasern [56] (mit 80 MHz-Repetitionsrate und ps-Pulsdauern). Der Betrieb von Farbstofflaser war jedoch sehr aufwändig. Anfang der neunziger Jahre wurde der Titan:Saphir(Ti:Sa)-Femtosekundenlaser entwickelt [57]. Dieser Festkörperlaser vereinfachte die nichtlineare Spektroskopie und wurde für den nächsten Aufbau eines CARS-Mikroskopes verwendet [58]. Seitdem wurden viele maßgeschneiderte Lichtquellen für nichtlineare Ramanmikroskope realisiert [59, 60, 61, 62, 63]. In der letzten Zeit wurden vermehrt Faserlaser eingesetzt [61, 62, 63, 64, 65, 66]. Wegen der kompakten Bauweise, der hohen Effizienz und Stabilität und der niedrigen Kosten werden Faserlaser sich in Zukunft wohl als Lichtquelle für die nichtlineare Ramanmikroskopie durchsetzen.

1.3 Methodische Neuentwicklungen im Feld der Ramanmikroskopie

Folgender Abschnitt soll einen Überblick über den aktuellen Stand der Entwicklung in der Ramanmikroskopie geben. Der Anspruch ist hier weniger jedes technische Detail zu erklären, als die Vorteile und Nachteile der Techniken zu benennen und Entwicklungslinien aufzudecken. Das dient im folgenden dazu die Zielsetzung und den Inhalt der Arbeit einzuordnen.

1.3.1 Moderne, konventionelle Ramanmikroskopie

Obwohl die nichtlineare Ramanmikroskopie in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat und weiter ein großes Entwicklungspotential birgt [67], bleibt die konventionelle

Ramanmikroskopie in vielen Anwendungsfeldern maßgeblich [27]. Es gibt verschiedene Hersteller die komplette Ramanmikroskopsysteme verkaufen (z.B. Witec, Horiba, Jasco). Der Aufbau eines Ramanmikroskops, das auf dem spontanen Ramaneffekt beruht, ist einfacher (und billiger). Gleichzeitig misst man immer ein ganzes Ramanspektrum mit hoher spektraler Auflösung für jeden Bildpunkt. Seitdem CCD-Kameras zur Verfügung stehen, sind Aufbauten, welche die Wellenlänge mit Hilfe eines Monochromators scannen, rar geworden. Die spektrale Auflösung ist durch das Auflösungsvermögen des Spektrographen begrenzt. Die Linienbreite des Lasers ist meist geringer. Je nach Anregungswellenlänge und verwendetem Gitter erreicht man typischerweise eine spektrale Auflösung von 2 cm^{-1} [29, 68, 69] bis 6 cm^{-1} [18, 28, 70]. Gerade in stark überlagerten Bereichen des Ramanspektrums (z.B. "Fingerprint"-Bereich) ist diese hohe spektrale Auflösung vorteilhaft [71]. Ein weiterer Vorteil der spontanen Ramanspektroskopie ist die lineare Abhängigkeit des Signals von der Probenkonzentration. Bei Signalüberlagerung können die einzelnen Signalbeiträge identifiziert werden (z.B. [71]), da unabhängige, lineare Signalbeiträge additiv sind. Die laterale räumliche Auflösung ist durch die Beugungsgrenze der Anregungswellenlänge gegeben. Mit Anregungswellenlängen im Sichtbaren erreicht man so eine Auflösung von ca. 300 nm [28] und mit einem konfokalem Aufbau des Mikroskopes zudem eine axiale Auflösung von ungefähr einem Mikrometer [68, 70].

Wie beschrieben ist der spontane Ramaneffekt sehr schwach. Der naheliegende Ansatz, das Signal durch Steigerung der Laserintensität in die Höhe zu treiben, wird in der Regel durch die Gefahr der Photoschädigung der Probe begrenzt. Deswegen benötigt man in der Regel relativ lange Aufnahmezeiten für ein Ramanspektrum (von einigen hundert Millisekunden [28, 72] bis zu einigen Sekunden [29, 69, 73]). Jedoch können auch lange Aufnahmezeiten zu Schäden an lebenden Zellen führen, weil die Bestrahlungsdauer dementsprechend lang ist. Zudem ist die Anzahl und die Größe der untersuchbaren Proben durch die Messzeiten beschränkt [74]. So ist ein Entwicklungsziel der konventionellen Ramanmikroskopie eine kürzere Aufnahmezeit pro Spektrum. Dies geschieht beispielsweise, indem die einzelnen Komponenten eines Ramanmikroskopes stetig verbessert werden. Der ganze spektroskopische Aufbau muss einen hohen Lichtdurchsatz erlauben. Sowohl die Rayleighlinienfilter, die dichroischen Spiegel als auch die Gitter im Spektrographen werden durch neue Produktionstechniken in diesem Punkt perfektioniert. In den letzten Jahren ist mit dem EMCCD (electron multiplying CCD) -Chip [75] ein neuer hochempfindlicher und rauscharmer Kamerachiptyp entwickelt worden. Dieser wird in kommerziellen Ramanmikroskopen (z.B. WITec UHTS 300 spectroscopy system, Horiba SWIFT TM Ultra Fast Raman Imaging) benutzt. Die Hersteller geben mit dieser Kamera erstaunlich kurze Messzeiten von wenigen Millisekunden pro Spektrum an (Horiba $< 8\text{ ms}$ [76], Witec $< 3\text{ ms}$ [77]). Eine weitere Möglichkeit die Messzeit zu verkürzen sind alternative Scanverfahren. So kann man die Probe statt mit einem Punktfokus auch mit einem Linienfokus ausleuchten. Bildet man diesen auf die CCD-Kamera ab können simultan die Ramanspektren der ganzen Bildlinie ausgelesen werden. Pro Integrationsfenster werden so mehr Ramanspektren aufgenommen. Damit erreicht man Messzeiten von 10 s pro Linie (entspricht 25 ms pro Pixel) [78] und bis zu 11 ms pro Pixel [20].

Die spontane Ramanstreuung ist sehr sensitiv gegenüber der Fluoreszenz der Probe

oder Verunreinigungen in der Probe [79]. Wie oben erwähnt sind typische Absorptionsquerschnitte deutlich größer als typische Ramanstreuquerschnitte. Deswegen können schon kleine Mengen einer fluoreszierenden Substanz im Probenvolumen das Ramansignal stark überlagern. Am stärksten tritt dieses Problem bei Anregung im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums ein [79]. Es wurden experimentelle Verfahren und Methoden der Datenaufbereitung [80, 81] entwickelt, um mit dem Fluoreszenzuntergrund umzugehen. Eine Methode, die auch in der Mikroskopie angewendet wurde, ist die “shifted excitation Raman difference spectroscopy“ (SERDS) [82]. Dabei wird das Ramanspektrum im Wechsel mit zwei verschiedenen Frequenzen angeregt, wodurch wird das Ramanspektrum um die Frequenzdifferenz verschoben wird, während das Fluoreszenzspektrum nach Kasha [83] unverändert bleibt. Die Differenz der unterschiedlichen Spektren entspricht einer Ableitung des Ramanspektrums, während sich der Fluoreszenzuntergrund in der Differenz beider Messungen aufhebt [80, 84, 85].

Um den Ramaneffekt einzelner Moleküle gezielt zu verstärken, kann der Resonanzramaneffekt genutzt werden [20, 69]. In das zu untersuchende System können gezielt kleine Moleküle eingebracht werden [78, 86] oder Teile des Systems deuteriert werden [29]. So gewinnt man einen minimal invasiven molekül- oder bindungsspezifischen Kontrast. Bei Deuterierung oder der Verwendung von Dreifachbindungen liegt die Schwingungsmarkerbande in der spektral “ruhigen“ Region um 2000 cm^{-1} . Die Messung der Polarisation des Ramanstreulichts gibt zusätzliche Information über die Probe, z.B. die lokale Ausrichtung der sekundären Struktur der Moleküle [87, 88]. Wie zu Beginn des Abschnitts erwähnt, wurden im vergangenen Jahrzehnt nichtlineare Ramanmikroskope stark weiterentwickelt. Durch die nichtlineare Ramanstreuung erreicht man höhere Signale. Das führt zu kürzeren Messzeiten. Bei den prominentesten nichtlinearen Methoden (CARS, SRS-Verlust) spielt der Fluoreszenzuntergrund keine Rolle, weil das Signal auf der anti-Stokesseite des Anregelichtes detektiert wird. Jedoch muss das nicht bedeuten, dass die nichtlinearen Ramanmethoden immer besser geeignet sind [52]. So gibt es auch Hinweise, dass gerade für biologische Proben, die nur eine geringe, durchschnittliche Lichtleistung tolerieren, der spontane Ramaneffekt, der besser geeignete Kontrastmechanismus ist [89].

1.3.2 Kohärente anti-Stokes Ramanstreuung (CARS) als Kontrastmechanismus

Die kohärente anti-Stokes Ramanstreuung (CARS) wurde 1982 in dem ersten nichtlinearen Ramanmikroskop als Kontrastmechanismus eingesetzt [56]. Auch bei der Wiederbelebung der nichtlinearen Ramanmikroskopie im Jahre 1999 mit neuerer Laser- und Detektionstechnik wurde CARS benutzt [58]. Diese Arbeit hatte starke Forschungsaktivitäten zur Folge mit dem Ziel die CARS-Mikroskopie zu verbessern und anzuwenden. Daraufhin gelang mit Hilfe der CARS Bildgebung anhand einer Ramanbande mit einer Bildrate von 30 Bildern pro Sekunde [38, 90] und In-Vivo Bildgebung an verschiedenen lipidreichen Gewebestrukturen (Ischiasnerv im Rattenmodell, Rückenmark im Mausmodell) [39]. Inzwischen sind einige Übersichtsarbeiten [91, 92] über die CARS-Mikroskopie veröffentlicht.

Die CARS ist eine nichtlineare Wechselwirkung zwischen einem Lichtfeld und einer Schwingungsmode eines Moleküle in der Probe. Der Effekt skaliert mit der dritten Ordnung des elektrischen Feldes des Lichtes, d.h. das elektrische Feld des eingestrahnten Lichtes tritt bei der Erklärung des Effektes dreimal in Erscheinung (siehe Abbildung 1.1).

Zunächst erzeugt die Überlagerung einer elektro-magnetischen Welle mit der Frequenz¹

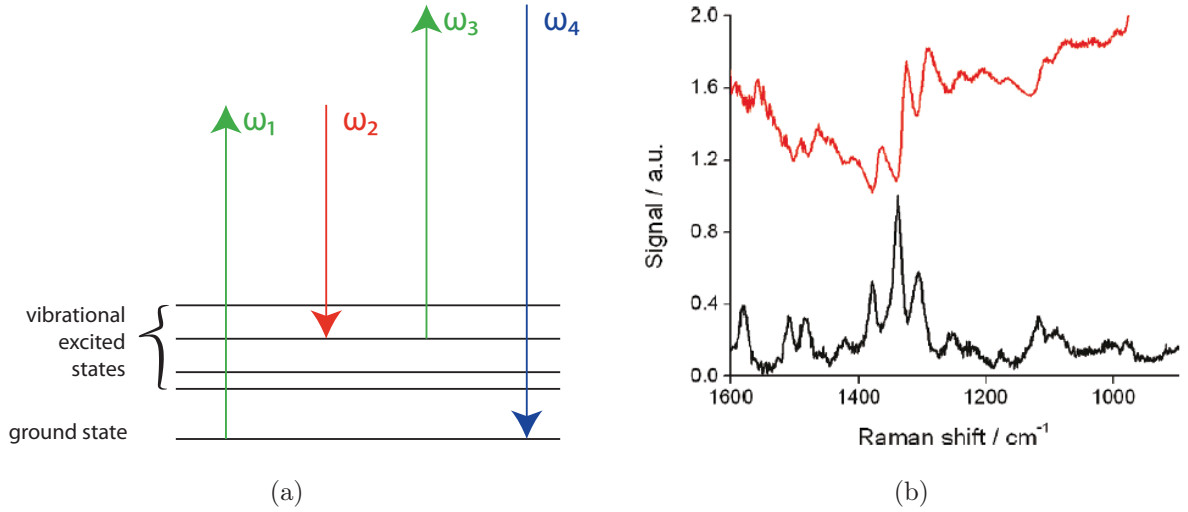


Abbildung 1.1: (a) CARS-Schema: Die Pfeile repräsentieren die am CARS-Prozess beteiligten elektromagnetischen Wellen: “Pump“: ω_1 ; “Stokes“: ω_2 ; “Probe“: ω_3 ; “Anti-Stokes“: ω_4

(b) Vergleich des spontanen Ramanspektrums (schwarz) und des CARS-Spektrums einer Mischung von AMP/ADP/ATP in Wasser (entnommen aus Ref. [40])

ω_1 mit einer zweiten elektro-magnetischen Welle mit der Frequenz ω_2 eine Schwebung mit der Frequenz $\Omega = \omega_1 - \omega_2$, die der Frequenz der Schwingungsmode entspricht. Das elektrische Feld dieser Schwebung führt zu einer kohärenten Anregung der Schwingungsmode. Die höherfrequente Welle wird in der Literatur oft “Pump“ genannt, die Niederfrequente in Analogie zur spontanen Ramanstreuung “Stokes“. Die angeregte Schwingungsmode moduliert die makroskopische Polarisierbarkeit des Mediums mit der Schwingungsfrequenz Ω . Die Einwirkung einer dritten elektro-magnetischen Welle mit der Frequenz ω_3 , in der Regel “Probe“ genannt, auf die Polarisierbarkeit führt zu einer nichtlinearen Polarisierung des Mediums mit Frequenz $\omega_4 = \Omega + \omega_3 = \omega_1 - \omega_2 + \omega_3$. Diese nichtlineare Polarisierung verursacht die Emission einer vierten Lichtwelle mit eben dieser Frequenz ω_4 . Diese vierte, im Vergleich zu allen eingestrahnten Lichtwellen blauverschobene Lichtwelle wird bei der CARS-Spektroskopie detektiert. Sie wird wieder in Analogie zur spontanen Ramanstreuung “Anti-Stokes“ genannt. Im Experiment werden meist nicht drei verschiedene

¹In dieser Arbeit werden zur Bezeichnung einer Frequenz einer Schwingung ω als Symbol für die Kreisfrequenz, äquivalent $\nu = \omega/2\pi$ als Symbol einer Frequenz und $\tilde{\nu} = \nu/c$ als Symbol für die Wellenzahl dieser Schwingung eingesetzt.

Laserquellen für die beteiligten Lichtwellen eingesetzt (anders [93]). In der Regel handelt es sich beim “Pump“ und beim “Probe“ um ein und denselben Laserimpuls (z.B. [91]). Es gibt jedoch auch Anwendungen bei denen “Pump“ und “Stokes“ zwei um die Frequenz der Schwingungsmode verschobenen Frequenzanteile aus dem Spektrum eines breitbandigen fs-Impulses sind [65, 94]. Damit der CARS-Prozess zu einer makroskopisch messbaren Verstärkung der “Anti-Stokes“-Welle führt, müssen die Wellenvektoren der eingestrahlten Lichtwellen eine sogenannte “phase-matching“ Bedingung erfüllen [95]. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass diese Bedingung in der Mikroskopie bei der Verwendung starker Fokussierung der Lichtstrahlen wegen der kurzen Interaktionslänge und den auftretenden großen Winkeln stark gelockert wird [58, 96]. Die CARS ist eine passive spektroskopische Technik, d.h. das Molekül ist nach der Wechselwirkung wieder im Grundzustand und wird folglich nicht angeregt. Eng damit verknüpft ist die dispersive Linienform der CARS-Spektren (siehe Abbildung 1.1). Das Signal der CARS skaliert quadratisch mit der Konzentration der Probensubstanz. Dieses Verhalten hat Nachteile bei niedrigen Konzentrationen und bei der Auswertung von überlagerten Signalen, kann aber bei einer hohen Konzentration zu hohen Signalen und sehr kurzen Messzeiten führen (z.B. bei Lipideinschlüssen (Lipiddroplets) in Zellen [97]). Die detektierten Photonen haben wie oben dargelegt eine höhere Frequenz als die anregenden Lichtfelder. Es kann demnach kein Fluoreszenzuntergrund von einer Ein-Photonenabsorption auftreten. Zudem hat das Ramanstreulicht bei NIR-Anregung eine Wellenlänge die mit Silizium basierten CCDs gut detektiert werden kann. Durch die anti-Stokes-Verschiebung der detektierten Photonen gibt es auch keinen Untergrund durch die anregenden Lichtfelder. Die räumliche Auflösung der CARS-Mikroskopie wird durch die Nichtlinearität des Effektes begünstigt. Das Signal wird sowohl lateral als auch axial hauptsächlich im Fokaltvolumen erzeugt. Die CARS-Mikroskopie ermöglicht damit dreidimensionale Bilder von mikroskopischen Proben.

Es gibt jedoch einige Komplikationen bei der CARS-Technik durch den sogenannten nichtlinearen Untergrund. Die nicht resonante, nichtlineare Antwort der Elektronen im Probevolumen auf die anregenden Lichtfelder erzeugt ein Lichtfeld, dass unabhängig von den Schwingungsresonanzen der Moleküle ist. Es überlagert sich kohärent mit der resonanten, nichtlinearen Antwort. Der Detektor misst das Betragsquadrat der superpositionierten Felder der resonanten und nichtresonanten Antwort des Mediums. Die resonante Antwort ist dadurch mit resonanten Antwort überlagert und die Linienform in einem CARS-Spektrum zeigt einen dispersiven Charakter (siehe Abbildung 1.1). Es wurden verschiedene CARS-Techniken entwickelt, um den nichtlinearen Untergrund zu unterdrücken oder zu umgehen [65, 98, 99, 100, 101].

In der spektral breitbandigen CARS-Mikroskopie, genannt “Multiplex-CARS“ macht man sich den nichtlinearen Untergrund zu nutze. Die Interferenz des schwachen, resonanten Signal mit dem starken, nichtresonanten Untergrund führt zu einer heterodynischen Verstärkung des resonanten Signals. Der nichtresonante Untergrund fungiert hier als so genannter “lokaler Oszillator“. Durch den nichtresonanten Untergrund wird aber nicht nur das Signal verstärkt, sondern aufgrund der höheren Photonenzahl im detektierten Signal auch das Schrotrauschen gemindert [92]. Das Signal zeigt jedoch weiterhin eine dispersive Linienform. Aus dieser kann jedoch mit verschiedenen Algorithmen [102, 103] die resonante,

dissipative Linienform ermittelt werden. So ist es möglich die sonst schwer interpretierbaren CARS-Spektren für quantitative Analysen zu nutzen [40]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit dieser Technik hyperspektrale Bildgebung an lebenden Zellen mit einer Aufnahmezeit von 50 ms pro Bildpunkt demonstriert [37, 104].

1.4 Stimulierte Ramanstreuung (SRS) als Kontrastmechanismus

Zunächst wurde die stimulierte Ramanstreuung 2005 als Kontrastmechanismus für die Mikroskopie präsentiert [105, 106]. Unabhängig von dieser Arbeit wurde die Femtosekunden stimulierte Raman Streuung (FSRS), eine Technik die auf der SRS beruht, 2007 in der Mikroskopie eingeführt [107]. 2008 wurde biomedizinische Bildgebung mit Hilfe der SRS demonstriert [108]. Anwendung der SRS-Mikroskopie wurden seitdem in der Biomedizin [109], Endoskopie [110], Entwicklungsbiologie [111], Pharmazie [17, 112], Lebensmittelforschung [113], der Biotechnologie [114] und in der Zellbiologie [63, 115, 116] demonstriert. Obwohl dieser Bereich der Ramanmikroskopie noch so jung ist, wurde er bereits in eine Übersichtsarbeit [67] aufgenommen.

Bei der stimulierten Ramanstreuung werden zwei Lichtwellen unterschiedlicher Frequenz, d. h. im Experiment zwei Laserimpulse, benutzt. Durch den stimulierten Ramanefekt in der Probe wird ein Photon in der höherfrequenten Lichtwelle vernichtet und gleichzeitig ein Photon in der niederfrequenten Lichtwelle erzeugt, wenn die Frequenzdifferenz der Lichtwellen der Frequenz einer molekularen (Raman erlaubten) Schwingungsmode entspricht. Diese Änderung der Lichtintensität der Laserimpulse durch die Wechselwirkung wird gemessen. Die Bezeichnung der Laserimpulse ist in der Literatur widersprüchlich. Eine Konvention ist den niederfrequenten Impuls Pumpimpuls zu nennen, der Höherfrequente heißt dann Stokesimpuls oder Signalimpuls. Einer zweite Konvention nach, welche in dieser Arbeit bei der Beschreibung der FSRS verwendet wird, wird der detektierte Lichtimpuls Probeimpuls genannt, während der andere als Anregimpulse oder englisch “Pump” bezeichnet wird.

Die spektrale Signatur des stimulierten Ramaneffektes entspricht der des spontanen Ramanspektrum (vgl. Abb. 1.2 (b)). Die Ramanspektren, die mit der SRS aufgenommen werden, sind also ohne weitere Bearbeitung der Daten interpretierbar. Wie der spontane Ramanefekt skaliert auch der stimulierte Ramanefekt linear mit der Konzentration. Die Merkmale der spontanen Ramanstreuung bezüglich ihrer chemischen Spezifität und analytischen Verwertbarkeit bleiben bei der stimulierten Ramanstreuung erhalten. Das stimulierte Ramansignal skaliert linear mit der Leistung des Probeimpulses und der Leistung des Pumpimpulses.

Es existieren verschiedene Konzepte für die Realisierung eines SRS-Mikroskopes: Einerseits sehr schnelle und sensitive einkanale Aufbauten, die lediglich das Ramansignal einer spezifischen Ramanbande als Kontrast benutzen (siehe Abschnitt 1.4.1)); Andererseits Aufbauten mit einer breitbandigen Detektion, welche ein “volles” Ramanspektrum

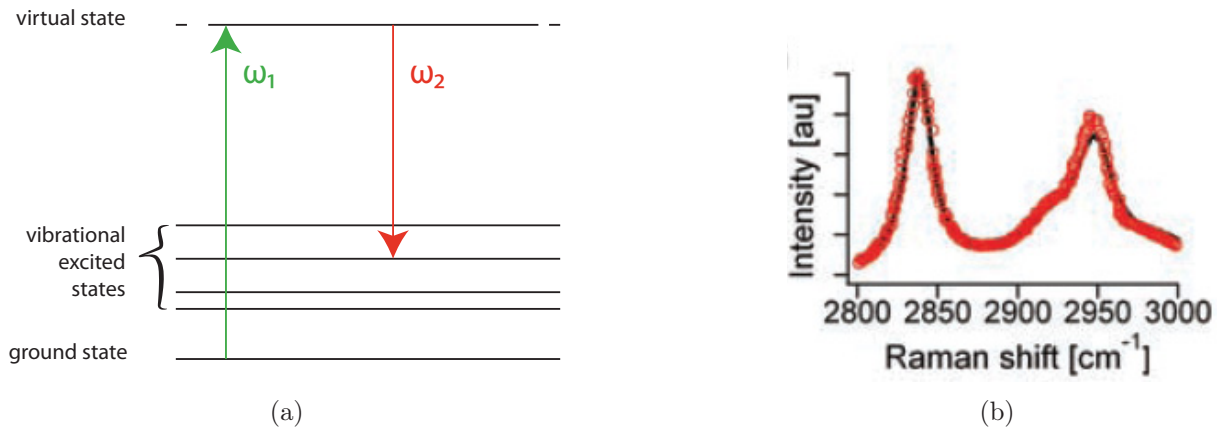


Abbildung 1.2: (a) SRS-Schema: Die Pfeile repräsentieren die am SRS-Prozess beteiligten Photonen: “Pump“: ω_1 ; “Stokes“: ω_2 ; Das “Pump“-Photon wird vernichtet, das “Stokes“-Photon erzeugt, dabei wird die Schwingungsmode angeregt.

(b) Vergleich des spontanen Ramanspektrums (schwarz) und des SRS-Spektrums (rote Kreise) von Methanol (entnommen aus Ref. [108])

für jeden Bildpunkt aufnehmen (siehe Abschnitt 1.5). Inzwischen gibt es auch Aufbauten, die versuchen die Geschwindigkeit bzw. Sensitivität der einkanaligen Detektion mit der chemischen Spezifität und Selektivität der breitbandigen Detektion zu vereinen (siehe Abschnitt 1.4.2). Erwähnenswert ist ausserdem noch die Bildgebung anhand der Raman induzierten Kerrstreuung (RIKES), weil sie ein “naher Verwandter“ der SRS ist und schon direkt mit dieser verglichen wurde [117, 118].

1.4.1 Einkanal-SRS

Von den meisten Forschungsgruppen, die sich mit SRS-Mikroskopie beschäftigen, wird die einkanalige Messung eines SRS-Signals als Kontrast in der Bildgebung angewandt [17, 64, 106, 108, 119, 120, 121]. Bei diesem Konzept wird der Impulszug des Pumplasers mit einem elektrooptischen Modulator, d.h. einer Pockelszelle, oder einem akustooptischen Modulator mit einer Radiofrequenz (1-40 MHz) moduliert. Diese Modulation wird über den stimulierten Ramaneffekt entweder als Verlust oder Gewinn auf den Impulszug des Probelasers übertragen. Der Probelaser wird nach der Interaktion mit der Probe und dem Pumplaser mit einer einzelnen Photodiode detektiert. Ein “Lock-in“-Verstärker (LiA) analysiert den variablen Anteil des Photostromes bei der Modulationsfrequenz. Das Ausgangssignal des LiA ist zu der Modulationstiefe des Probelasers durch die SRS direkt proportional. Durch die Detektion bei hohen Frequenzen ist der einkanalige Aufbau wenig sensitiv für Fluktuationen der Laseramplitude, welche bei niedrigen Frequenzen die Sensitivität begrenzen können. Das Schrotrauschen ist gering, da die gesamte Laserleistung (ca.

3 mW [63] - 210 mW [115]) des Probelasers, und damit viele Photonen pro Messintervall, mit einem einzigen Detektor registriert werden.

Der Frequenzabstand zwischen der Trägerfrequenz des Pumpimpulses und der des Probeimpulses bestimmt, welche Schwingungsmoden der Probe untersucht wird. Im Experiment werden die Lichtquellen so aufgebaut, dass zumindest die Frequenz eines der beiden Impulse variabel ist, um den Frequenzabstand an unterschiedliche Schwingungsmoden anzupassen. Dazu werden zum Beispiel spektral breitbandige Lasermedien mit einer anpassbaren Laserfrequenz (z.B. Ti:Sa [106] oder Ytterbium-dotierte Fasern [122]), optisch parametrische Oszillatoren [108, 123] oder die selektive Einengung eines breiten Spektrums durch die Erzeugung der zweiten Harmonischen [64, 124] verwendet. Die spektrale Auflösung der Messung ist durch die spektrale Breite der Impulse gegeben. In der Regel handelt es sich bei Pump- und Probeimpuls um ps-Impulse mit einer Dauer von 4-7 ps und einer entsprechenden spektralen Breite von ca. 3 cm^{-1} . Es wurden jedoch auch spektral breitere fs-Impulse eingesetzt [63, 120, 121]. Um trotz dieser größeren spektralen Breite gut aufgelöste Spektren zu erhalten, können beide Impulse gleichstark "gechirpt" werden. Zu einem Zeitpunkt interagiert dann nicht die ganze Frequenzbandbreite der Impulse mit der Probe, sondern nur die instantane. Auf diese Weise wurde mit fs-Impulsen eine Auflösung von 15 cm^{-1} erreicht [120].

Bei der einkanaligen Detektion werden nur kurze Integrationszeiten pro Bildpunkt benötigt (von einigen $100 \mu\text{s}$ pro Pixel [108, 116] bis zu erstaunlichen 100 ns pro Pixel [109]).² Es wurden messbare relative Signalhöhen $< 10^{-7}$ in einer Sekunde Messzeit [108] bzw. $< 2 \times 10^{-7}$ in 500 ms [64]) berichtet. Das entspricht einer Detektionsgrenze für Retinol von $50 \mu\text{M}$ bzw. einer Konzentration von 5 mM einer Methanollösung [108]. Bei niedrigen Laserleistungen ($< 5 \text{ mW}$) konnte eine Schrotrausch-begrenzte Messung erreicht werden [63]. Es wurden auch unterschiedliche Möglichkeiten einer balancierten Detektion verwendet, um das Amplitudenrauschen des Lasers vor der A/D-Wandlung durch Referenzieren herauszurechnen [64, 124]. Eine Unterscheidung der chemischen Zusammensetzung einer Probe ist bei diesem Ansatz ungenau, weil sie nur anhand einer einzelnen Ramanbande einer sogenannten "Markerbande" geschieht. In Anwendungen werden deswegen zur Unterscheidung zwischen unterschiedlichen chemischen Substanzen in der Probe entweder mehrere Probeimpulse zur Abdeckung mehrere Markerbanden [114] verwendet oder die Probe bei unterschiedlicher Einstellung des Frequenzabstandes zwischen Pump- und Probeimpuls mehrmals abgebildet (z.B. [108, 109]). Weil dieses Verfahren von Hand sehr aufwändig ist, wurden spezielle, automatisierte Methoden zur SRS-Mikroskopie entwickelt, welche ein schnelles Scannen des Frequenzabstandes von Pump- und Probeimpuls erlauben.

1.4.2 Hybrid-SRS

Es wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt trotz einer einkanaligen Detektion, Proben chemisch zu differenzieren: Zum einen wurden in direkter Erweiterung der Einkanal-SRS-

²Diese Zeit hängt jedoch auch von den jeweiligen experimentellen Bedingungen (z.B. Ramanbandenstärke, Laserleistung von Probe- und Pumpimpuls) ab.

Mikroskopie sehr schnell durchstimbare, spektral schmalbandige Lasersysteme verwendet [125, 126], zum anderen wurde ein spektral breitbandiger Laserimpuls mit Hilfe einer spektralen Maske für die chemisch selektive Detektion einer Spezies moduliert [127, 128]. Bei dem ersten Ansatz geschieht das Durchstimmen dieser Systeme so schnell, dass durch geschickte experimentelle Technik letztendlich kein Zeitverlust aus dem Frequenzwechsel resultiert. Die Zeit für die Aufnahme eines Spektrums lässt sich aus der reinen Aufnahmezeit eines Bildpunkts bei einer festen Frequenz berechnen. Mit einem schnell durchstimbaren OPO gelang so eine Bildgebung mit einer Aufnahmezeit von $8\ \mu\text{s}$ pro Bildpunkt und Abfragefrequenz mit einer Abstimmbarkeit der Abfragefrequenz über $115\ \text{cm}^{-1}$ und einer spektralen Auflösung von $5\ \text{cm}^{-1}$ [126]. Das entspricht einer Aufnahmezeit für ein Spektrum des gesamten durchstimbaren Bereichs von $184\ \mu\text{s}$. Eine noch kürzere Aufnahmezeit wurde mit einem schnell durchstimbaren Ytterbium-Faserverstärker erreicht: Die Gruppe um Ozeki hat Bildgebung bei wechselnder Abfragefrequenz mit einer Bildrate von 30,8 Bildern pro Sekunde (500×480 Bildpunkte) [125] demonstriert. Pro Bildpunkt und Abfragefrequenz entspricht das einer Aufnahmezeit von 128 ns. Die Abfragefrequenz war über $300\ \text{cm}^{-1}$ mit einer gleichzeitigen spektralen Auflösung von $3\ \text{cm}^{-1}$ frei durchstimmbare. Daraus lässt sich eine Aufnahmezeit für ein Spektrum des durchstimbaren Bereichs von $13\ \mu\text{s}$ pro Spektrum berechnen. Mit dieser Technik können also tatsächlich Ramanspektren aufgenommen werden und mit multivariaten Methoden (z.B. independent component analysis (ICA) [125]) ausgewertet werden. Der abgebildete Spektralbereich ist jedoch begrenzt: Es kann nur entweder der "CH-Streck"-Bereich oder ein Teil des "Fingerprint"-Bereiches aufgenommen werden. Die hohe Bildrate kann nur bei der vergleichsweise starken Ramanstreuung im "CH-Streck"-Bereich verwendet werden, im "Fingerprint"-Bereich ist das Signal trotz weiterer Mittelung stark rauschbehaftet [125]. Bei dem zweiten Ansatz wird das Ramanspektrum einer Substanz in der Probe selektiv mit einem amplitudenmodulierten Spektrum abgefragt [127, 128]. Dazu wurde eine Modulation einiger spezifischer spektraler Regionen entweder im Frequenzbereich von einigen kHz auf einen spektral breitbandigen Probeimpulszug geprägt und mit einer Fouriertechnik nach der Interaktion mit der Probe demoduliert [128] oder im zeitlichen Frequenzbereich weniger MHz auf einen spektral breitbandigen Pumpimpuls geprägt und direkt durch die Lockin-Detektion des Probeimpulses demoduliert [127]. Die zweite Technik wurde "spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering" (STE-SRS) genannt [127]. Mit beiden Techniken wurde eine Bildgebung anhand dreier spektraler Komponenten der Probe demonstriert (Aufnahmezeit pro Bildpunkt: $200\ \mu\text{s}$ [128] bzw. $114\ \mu\text{s}$). Mit der STE-SRS wurde auch eine chemisch quantitative Analyse der Konzentrationen in Mischungen von zwei oder drei Substanzen durchgeführt [127]. Beide Techniken nutzten jedoch wieder nur den signalstarken "CH-Streck"-Bereich des Spektrums zur Bildgebung und zur Differenzierung verschiedener Substanzen. Für die quantitative Analyse ist ein a priori Wissen der Ramanspektren der einzelnen Substanzen nötig. Die Fähigkeiten eines solchen Aufbaus können also die spontane Ramanstreuung nicht ersetzen. Zudem sind beide Techniken aufgrund der Verwendung der Modulationsmasken technisch sehr aufwändig.

1.5 Femtosekunden-Stimulierte Ramanspektroskopie als Kontrastmechanismus

Die Femtosekunden-Stimulierte Ramanspektroskopie (FSRS) wurde von Ploetz et al. 2007 als Kontrastmechanismus für die Mikroskopie eingeführt [107]. In Anlehnung an den Kontrastmechanismus wird diese Technik Femtosekunden-Stimulierte Raman-Mikroskopie (FSRM) genannt. Der in dieser Arbeit beschriebene Aufbau dient auch der Mikroskopie mit der FSRS [60]. Ausserdem wurde Bildgebung mit der FSRS von Bachler et al. anhand von Polystyrolmikroskopiestandards mit Hilfe eines MHz-Lasersystems gezeigt [118]. Die FSRS [12] detektiert im Gegensatz zu den anderen SRS-Techniken bei einer einzelnen Messung ein vollständiges Ramanspektrum. Dazu verwendet die FSRS einen spektral breitbandigen Femtosekundenimpuls als Probeimpuls und einen spektral schmalbandigen Pikosekundenimpuls als Pumpimpuls. Die spektrale Auflösung des stimulierten Ramanspektrums hängt meist von der spektralen Breite des verwendeten Pumpimpulses ab [60, 107, 118]. Die Sensitivität der FSRM beruht auf der Stabilität der verwendeten Laser, besonders kritisch ist die Stabilität des detektierten Probeimpulses. Das parallele Messen des Ramanspektrums zu einer Zeit beschränkt die FSRM im Gegensatz zu den anderen SRS-Techniken in zwei Punkten: Zum einen benötigt das Auslesen von mehreren hundert Messkanälen proportional mehr Zeit als das Auslesen eines Messkanales. Die Auslesezeit eines Spektrums ist der untere Grenzwert für die Messzeit pro Pixel. Das führt zu einer niedrigen Messrate bei einem FSRM-System, die gleichzeitig eine höhere Empfindlichkeit für Rauschen bei niedrigen Frequenzen bedingt. Zum anderen wird bei einer einkanaligen Technik proportional mehr Licht pro Kanal gemessen, deswegen ist die theoretisch erreichbare Schrotrauschgrenze pro Messzeit für einkanalige Techniken deutlich niedriger.

1.5.1 Benötigte Laserimpulscharakteristika für die FSRM

Für die FSRM werden zwei kurze Laserimpulse benötigt: Ein spektral schmalbandiger Pikosekundenimpuls als Pumpimpuls und ein spektral breitbandiger Femtosekundenimpuls als Probeimpuls. Der Pumpimpuls entspricht im Grunde dem Pumpimpuls in der einkanaligen SRS. Seine spektrale Breite bestimmt die spektrale Auflösung des stimulierten Ramanspektrums. Es ist also eine spektrale Breite anzustreben, mit der man in der Lage ist die spektrale Breite von Ramanbanden von Molekülen in Lösung aufzulösen. Diese liegen in der Regel zwischen $5 - 15 \text{ cm}^{-1}$ [129], also ähnlich der spektralen Breite der Impulse von 3 cm^{-1} bei der einkanaligen Messung mit SRS. Daraus ergibt sich eine Impulsdauer von 1 ps (entspricht 15 cm^{-1}) bis 5 ps (entspricht 3 cm^{-1}). Der stimulierte Ramaneffekt skaliert mit der Leistung des Pumplaser. Je höher die Leistung des Pumplasers, umso größer wird das Ramansignal. Bei zu hohen Leistungen erleidet die Probe jedoch eine Schädigung entweder direkt durch die Einwirkung des Lichtes oder indirekt über das Aufheizen der Probe. Aufgrund des zweiten Effektes sollte die Durchschnittsleistung des Pumplasers bei Bildgebung an biologischen Proben je nach Kriterium der Zellschädigung 10 mW [130] bzw. 80 mW [123] nicht übersteigen. In der Bildgebung von biologischen Proben mit kohärenter

Ramanstreuung sind auch höhere Durchschnittsleistungen von bis zu 100 mW durchaus üblich [115]. Aus experimenteller Sicht ist eine etwas höhere Leistung erstrebenswert, um etwaige Verluste durch optische Komponenten zu kompensieren.

Das Spektrum des Probeimpulses sollte so breit sein, dass möglichst alle Schwingungsbanden der Probe gleichzeitig abgefragt werden. Die höchstfrequente Bande in biologischen Proben ist die breite Wasserbande bei ca. $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, auf der niederfrequenten Seite können Ramanbanden schon ab ca. 500 cm^{-1} (z.B. Thymin, Guanin) Auskunft über charakteristische Strukturen von biologischen Proben geben [131]. Die spektrale Breite sollte also über 3000 cm^{-1} betragen. Das entspricht im NIR einer Impulslänge von ca. 5 fs. Dabei muss der spektrale Abstand der Zentralfrequenz des Probeimpulses zur Zentralfrequenz des Pumpimpulses so gewählt sein, dass diese Breite auch tatsächlich nutzbar ist. Die Form des Spektrums ist idealerweise rechteckförmig und unstrukturiert, um alle Kanäle des Detektors gleichmäßig auszuleuchten und spektrale Artefakte zu vermeiden. Besonders entscheidend ist die Stabilität der Leistung des Probelasers, da der stimulierte Ramaneffekt nur eine kleine Änderung auf dem großen Untergrund des Probespektrums bewirkt. Idealerweise ist der Probelaser so stabil, dass die Messung Schrottausch-begrenzt erfolgen kann.

1.5.2 kHz-Lichtquelle für FSRM

Bei dem ersten FSRM-Aufbau [107] wurde ein Ti:Sa-Laser/Verstärkersystem (Clark CPA 2001) mit einer Repetitionsrate von 1 kHz als Ausgangslichtquelle verwendet. Die Lichtimpulse aus diesem System sind 120 fs lang. Die spektrale Breite beträgt 8 nm (Das entspricht im Frequenzraum einer Breite von 130 cm^{-1}) und die zentrale Wellenlänge 780 nm, die Impulsenergie 1 μJ . Diese Impulse sind spektral zu schmal, um sie als Probeimpuls zu verwenden, und spektral zu breit, um als Pumpimpuls zu dienen. Um aus diesen Impulsen geeignete Probeimpulse zu gewinnen, müssen sie spektral verbreitert werden. Dazu wurde ein nichtlineare Prozess verwendet, die so genannte Weißlichterzeugung. Wenn man die Ausgangslichtimpulse mit ausreichender Energie auf eine Saphirscheibe fokussiert, erzeugt eine Kaskade unterschiedlicher nichtlinearer Prozesse (u. a. Selbstfokussierung, Selbstphasenmodulation) ein breites Frequenzspektrum. Das Abfragespektrum des Ramanprobeimpulses reicht danach von 600 nm - 760 nm. Die Impulsdauer entspricht ungefähr der Impulsdauer des erzeugenden Lichtimpulses. Um den Pumpimpuls zu erzeugen, werden die Ausgangslichtimpulse spektral eingengt. Dazu wird ein Bandpassfilter (Bandbreite: 25 cm^{-1} ; Oriel ,type 775FC012-50) verwendet. Der Ramanpumpimpuls hat also ein spektrale Breite von 25 cm^{-1} , die Impulsenergie ist $\approx 270\text{ nJ}$.

1.5.2.1 Bildgebung mit der kHz-FSRM

Mit Hilfe dieser Lichtquelle wurde mikroskopische Bildgebung durch FSRS demonstriert [107]. Dazu werden beide Pulse durch eine Verzögerungsstrecke zeitlich und über einen dichroischen Spiegel räumlich überlagert. Die Lichtimpulse werden mit einem reflektiven Mikroskopobjektiv (Cassegrain) auf die Probe fokussiert. Das transmittierte Licht wird mit

einem zweiten Objektiv kollimiert. Ein Kerbfilter unterdrückt das Pumplicht, während das Probelicht auf einen Spektrographen abgebildet wird. Der Spektrograph registriert in abwechselnder Folge ein Spektrum des Probeimpulses, welcher eine Wechselwirkung mit dem Pumpimpuls in der Probe hatte, sowie ein Spektrum des Probeimpulses, bei dem der Pumpimpuls mit einem Lichtzerhacker geblockt wurde. Aus diesen beiden Spektren lässt sich das Ramanspektrum der Probe im Fokaltvolumen rekonstruieren. Die Probe wird mit Verfahrtschienen bewegt, so dass ein Ramanspektrum für jeden Bildpunkt aufgenommen wird. Als Demonstration der chemisch sensitiven Bildgebung mit der FSRM wurden Polymer-

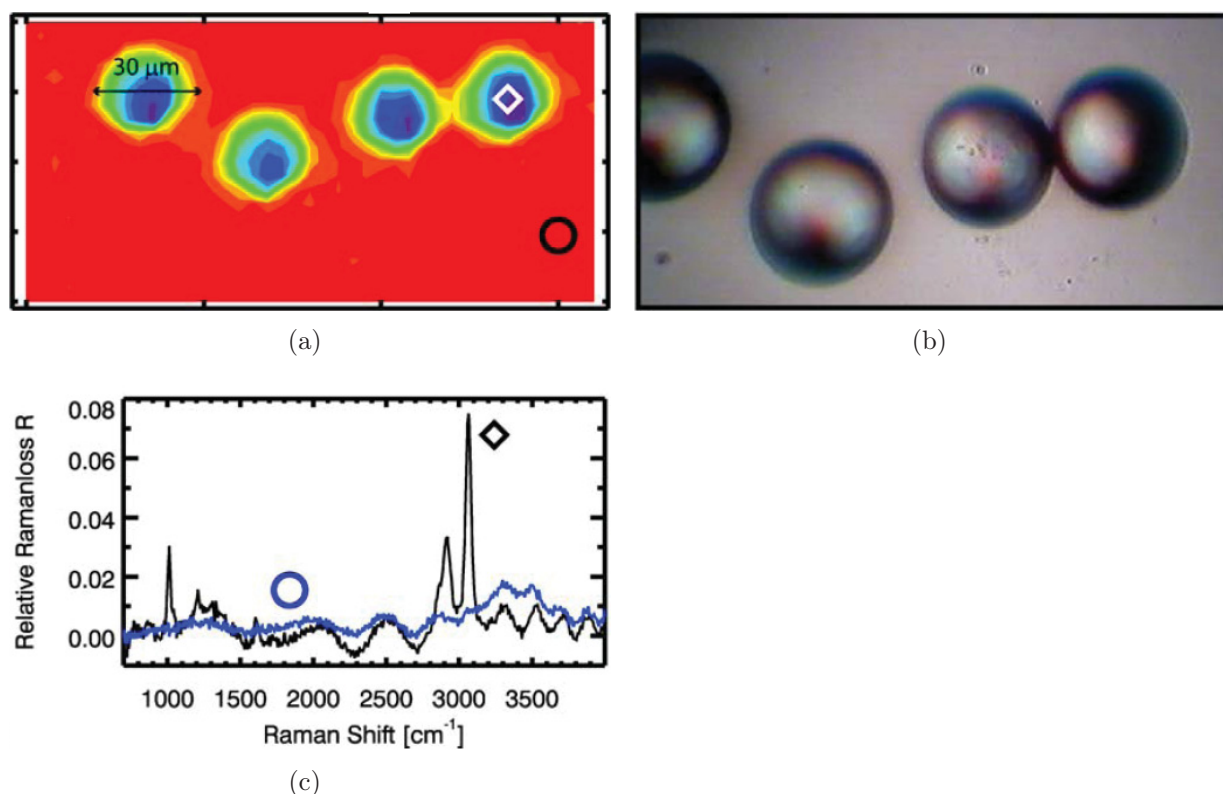


Abbildung 1.3: Bildgebung von Polymermikroskopiestandards mit dem kHz-FSRM Aufbau. (a) Bildgebung anhand des Bandenintegrals über den CH-Streckbereich. Kreis und Raute markieren die Position, an denen die in (c) gezeigten Ramanspektren aufgenommen wurden. (b) Transmissionsbild. (c) Stimulierte Ramanspektren von Polystyrol (schwarz) und Wasser (blau) die den markierten Bildpunkten in (a) entsprechen. (Abbildung abgeändert aus Ref. [107])

mikroskopiestandards untersucht. In Abbildung 1.3 sind Polymerstandards aus Polystyrol mit einem Durchmesser von 30 µm in Wasser abgebildet. Der Kontrast entspricht hier dem Bandenintegral über den CH-Streckbereichs des Ramanspektrums.

1.5.2.2 Die Schwächen der kHz-Lichtquelle

Die typischen Impulsenergien des Probeimpulses und des Pumpimpulses sind so hoch, dass sie biologisches Gewebe und Zellen zerstören können [132, 133]. Das Weißlicht weist Intensitätsschwankungen im Prozentbereich auf. Die Stabilisierung ist wegen des hoch nichtlinearen Erzeugungsprozesses schwierig. Da das Lasersystem eine Wiederholrate von 1 kHz vorgibt ist die kürzeste, realisierbare Messzeit 2 ms (Messung eines Spektrums mit Ramanwechselwirkung und Messung eines Spektrums ohne diese). Ein Laser/Verstärkersystem an sich ist zudem wartungsintensiv und teuer.

1.6 MHz-Lichtquelle für FSRM

Um die FSRM auch auf biologische Proben anwenden zu können, müssen die Spitzenintensitäten verringert werden. Dies geschieht, indem bei gleicher Durchschnittsleistung, die Repetitionsrate erhöht wird. Mit MHz-fs-Oszillatoren und optisch parametrische Oszillatoren wie sie in der CARS-Mikroskopie verwendet werden, sind die technologischen Voraussetzungen schon gegeben. Die Herausforderung ist die geeigneten spektralen und damit temporalen Impulsparameter für die FSRM zu erzeugen.

1.6.1 Das Konzept der MHz-Lichtquelle

Dabei ist die zentrale Idee, den Ramanprobeimpuls ohne zusätzlichen nichtlinearen Prozess zu erzeugen. Die kürzesten Impulse aus Ti:Sa-Lasern haben eine Dauer von 6-8 fs [134, 135, 136] (Femtolasers Rainbow sub-7fs, Menlosystems Octavius-1G: sub-6fs, ventenon|pulse:one ultrabroad: sub-6fs) und damit eine spektrale Bandbreite von über 300 nm (das entspricht ca. 4500 cm^{-1}), wenn man eine 10 dBc-Kriterium³ berücksichtigt. Die spektrale Bandbreite des Lasers allein genügt also, um ein vollständiges Ramanspektrum abzudecken. Gleichzeitig ist ein kommerzieller Ti:Sa-Laser sehr stabil (typische Schwankungen der Ausgangsleistung: 0.1 % - 0.2 %). Ein solcher sub-8fs Laser erfüllt also die wesentlichen Kriterien für einen Ramanprobeimpuls: Er ist spektral breit genug und er ist sehr stabil. Die Repetitionsrate der Ramanpumpimpulse muss sehr genau synchronisiert sein. Es gibt mehrere Möglichkeiten dies zu realisieren. Man kann zum einen einen zweiten Laser elektronisch synchronisieren, indem man die Länge dieses Laserresonators aktiv an die Länge des ersten Resonators anpasst. Eine andere Möglichkeit ist, den Ramanpumpimpuls durch einen optischen Prozess aus dem Ramanprobeimpuls zu erzeugen, also optisch zu synchronisieren. Hier soll der Ramanpumpimpuls erzeugt werden, indem ein geeigneter, schmaler spektraler Bereich des Ramanprobeimpulses optisch verstärkt wird. Die zentrale Wellenlänge des Ramanpumpimpulses muss so gewählt sein, dass eine Stokes- oder anti-Stokesverschiebung von 4000 cm^{-1} durch das Ramanprobespektrum abgedeckt wird. Der

³Diese Angabe berücksichtigt den Bereich des Spektrums, dessen spektrale Leistung >10 % der spektralen Leistung an dem Maximum des Spektrums ist.

Ramanpumpimpuls sollte eine Energie von 1 nJ besitzen und eine spektrale Breite von ca. 10 cm^{-1} .

1.6.2 Aufgabenstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war eine solche MHz-Lichtquelle für die FSRM aufzubauen und diese für die Bildgebung einzusetzen. Zudem sollten Schritte in Richtung eines in allen Teilen auf diese Lichtquelle und damit auf die Bildgebung von biologischen Proben ausgerichteten Ramanmikroskops gemacht werden.

1.7 Gliederung der Arbeit

Die Arbeit ist im Weiteren wie folgt aufgebaut: Im zweiten Kapitel sollen die notwendigen Grundlagen der Faseroptik und Lasertechnik zum Verständnis des realisierten Laserverstärkers wiederholt werden. Dieser soll im dritten Kapitel im Detail dargestellt werden. Im vierten Kapitel werden die Grundlagen der FSRM gegeben. Das Prinzip der FSRS soll hier erläutert werden und die Bereiche der Mikroskopie, die später benötigt werden, in Erinnerung gerufen werden. Das fünfte Kapitel befasst sich mit dem spektroskopischen und mikroskopischen Aufbau des MHz-FSRM Experiments. In einem kleinen Exkurs werden im sechsten Kapitel die Rauschbeiträge in der FSRM entschlüsselt. Die wesentlichen spektroskopischen und mikroskopischen Ergebnisse werden im siebten Kapitel dargestellt. Das achte Kapitel soll einen Ausblick in die Zukunft der FSRM ermöglichen.

Kapitel 2

Grundlagen der Lasertechnik und der Faseroptik

In diesem Kapitel sollen die Grundlagen dargelegt werden, die zum Verständnis der Lichtquelle für das FSRM Experiment dienlich sind. Die Lichtquelle besteht aus einem Ti:Sa-Laser und einem Ytterbium³⁺-Faserverstärker. Zunächst wird das Grundprinzip der Lasertätigkeit dargestellt und auf das Modell eines Vier-Niveauschemas und eines Drei-Niveauschemas angewandt. Der Ti:Sa-Laser entspricht einem Vierniveauschema. Das Drei-Niveauschema kann zur Erklärung des Faserverstärkers angewandt werden. Dann soll die Erzeugung kurzer Lichtimpulse mit einem Laser erklärt werden. Dazu wird das Prinzip des Modenkoppeln eingeführt. Die Charakterisierung kurzer Lichtimpulse wird anhand des Aufbaus eines Intensitätsautokorrelators dargestellt. Der Faserverstärker ist aus Einzelmodenfasern (SMF) aufgebaut. Die grundlegenden Eigenschaften von Einzelmodenfasern werden deswegen in dem nächsten Abschnitt erklärt. Die Propagation von kurzen Lichtimpulsen in Fasern wird durch zwei optische Effekte wesentlich beeinflusst: Dispersion und Selbstphasenmodulation. Diese werden in zwei kurzen Abschnitten beschrieben.

2.1 Ausgewählte Ergebnisse der Lasertheorie

Ein Laser¹ besteht im Allgemeinen aus einem Verstärkungsmedium und einem Resonator, das heißt in der Regel zwei Spiegeln, die das Verstärkungsmedium umschliessen². Die Verstärkung beruht auf stimulierter Emission elektromagnetischer Strahlung ausgehend von einem angeregten Zustand. Die Lasertätigkeit startet zunächst aus der spontanen Emission einiger Photonen aus angeregten Zuständen im Verstärkungsmedium. Die spontane Emission erfolgt isotrop in alle Raumrichtungen. Nur Licht, dessen Propagationsrichtung mit der Ausrichtung des Resonators zusammenfällt wird im Resonator festgehalten. Diese Photonen sorgen durch wiederholte Stimulation von Emissionen im Medium für einen hohen Photonenfluss im Resonator. Es stellt sich ein Fließgleichgewicht zwischen Verstärkung

¹Zum Laser- und seinem Funktionsprinzip gibt es weitreichende Literatur, z.B. Ref. [137]

²Exotische Fälle wie der Free-Electron Laser seien hier ausgenommen

des Lichtflusses im Medium und den Verlusten des Resonators ein. Das genutzte Laserlicht tritt durch einen der Endspiegel des Resonators aus. Es ist stark gerichtet und zeichnet sich durch hohe räumliche und zeitliche Kohärenz aus [138].

Das Spektrum des Laserlichts wird einerseits durch das Emissionsspektrum des Verstärkungsmedium andererseits durch die spektrale Charakteristik des Resonators bestimmt. Der Resonator unterstützt dabei nur gewisse longitudinale Moden³ des elektromagnetischen Feldes. Nur diese Moden interferieren konstruktiv zu einer stehenden Welle innerhalb des Resonators. Die Grundlage der Lasertätigkeit ist stimulierte Emission und bei optisch angeregten Lasern Absorption zur Anregung. Diese beiden Prozesse sind durch dieselbe Wechselwirkung zwischen Licht und Materie vermittelt. Bei der Absorption trifft ein Photon auf ein System (Es kann sich dabei um Atome oder Moleküle oder auch andere Systeme handeln) im Grundzustand. Das Lichtfeld vermittelt einen Übergang des Systems in den angeregten Zustand, dabei wird es absorbiert. Die stimulierte Emission ist der entgegengesetzte Prozess: Ein angeregtes System trifft auf ein Photon. Wieder vermittelt das Photon den Übergang des Systems, nur dieses Mal ist die Richtung entgegengesetzt, das System kehrt in den Grundzustand zurück und emittiert dabei ein Photon. Betrachtet man einen optischen Übergang im Verstärkungsmedium, so kann eine optische Verstärkung mit Hilfe dieses Übergangs nur dann passieren, wenn sich mehr Systeme im angeregten Zustand des Systems befinden als im Grundzustand. Man nennt diese Situation auch Besetzungsinversion oder Inversion. Ein System, das nur aus zwei Zuständen oder Energieniveaus besteht, kann deswegen nicht zur optischen Verstärkung eingesetzt werden. Es lässt sich im zeitlichen Mittel nur die Hälfte der Systeme in dem Medium anregen. Dadurch entsteht jedoch keine Verstärkung, sondern nur eine induzierte Transparenz. Deswegen benötigt man ein System mit drei oder mehr Energieniveaus, um Lasertätigkeit zu ermöglichen.

2.1.1 Drei-Niveau-/Vier-Niveau-Schema eines Lasers

Der erste Laser verwendete ein Drei-Niveausystem: Rubin, also Chromionen in Korund (Saphir) [43, 138]. Ein solches System besteht aus einem Grundzustand und zwei angeregten Zuständen (vgl. Abb. 2.1(a)). Das System wird in den energetisch höher liegenden, der angeregten Zustände angeregt. Dieser Vorgang wird auch Pumpen genannt oder optisches Pumpen, wenn die Anregung durch Absorption von Licht geschieht. Von dort relaxiert es nicht-strahlend und schnell in den zweiten angeregten Zustand, welcher eine lange Lebenszeit besitzt. Der optische Übergang von dem energetisch tiefer liegenden Zustand zum Grundzustand wird zur optischen Verstärkung genutzt. Um in einem Drei-Niveausystem eine Besetzungsinversion zu erreichen, müssen mehr als die Hälfte aller Systeme angeregt sein. Wenn ein Teil des Verstärkungsmediums nicht invertiert ist, dann reabsorbiert er die emittierte Strahlung. Das erfordert in der Regel hohe Pumpleistungen. Ein Problem, das durch die große Bevölkerung des angeregten, strahlenden Zustandes entsteht, ist die verstärkte spontane Emission (ASE). Hierbei wird spontane Emission aus dem angeregten

³Der Resonator kann annähernd als Fabry-Perot Interferometer betrachtet werden. Bei diesem ist der Frequenzabstand $\Delta\nu$ zwischen zwei longitudinalen Moden mit dem Abstand L der beiden Spiegel verknüpft: $\Delta\nu = \frac{c}{2L}$ [139]. c ist hier die Lichtgeschwindigkeit im Resonatormedium.

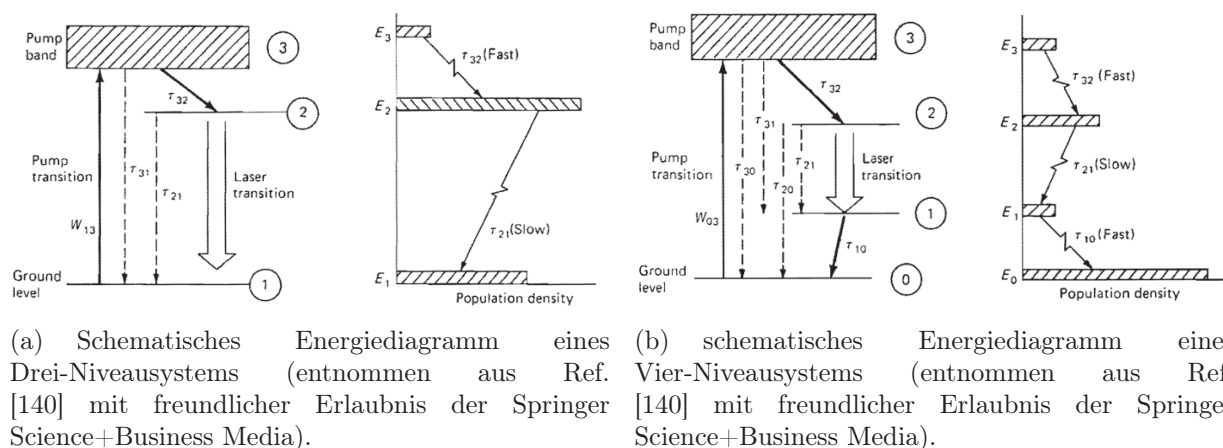


Abbildung 2.1: Energieniveauschema für einen Drei-Niveaulaser und einen Vier-Niveaulaser

Zustand durch stimulierte Emission verstärkt. Da die spontane Emission nicht zu dem kooperativen Laserprozess beiträgt, trägt die ASE zum Hintergrundrauschen bei. Zudem entvölkert sie den angeregten Zustand. Bei einem Laserverstärker der auf einem Drei-Niveausystem beruht kann die ASE die maximale Ausgangsleistung begrenzen [141]. Der Faserverstärker, der Teil der MHz-Lichtquelle für die FSRM ist, beruht auch auf einem Drei-Niveausystem: Ytterbiumionen eingebettet in einer Glasfaser. Die Ytterbiumionen werden mit Licht mit einer Wellenlänge von 915 nm gepumpt und verstärkten Licht bei 980 nm durch stimulierte Emission.

Ein Vier-Niveausystem umgeht einige Probleme die bei dem Drei-Niveausystem auftreten. Bei einem Vier-Niveausystem erfolgt der optische Übergang vom angeregten Zustand nicht in den Grundzustand des Systems, sondern in einen energetisch höher liegenden Zustand (vgl. Abb. 2.1(b)). Von diesem aus relaxiert das System nichtstrahlend in den Grundzustand. Inversion ist für dieses System erreicht, wenn der obere Zustand des Laser-Übergangs stärker bevölkert ist als der untere. Der untere Zustand ist in der Regel nach der Boltzmannstatistik thermisch besetzt. Je höher er energetisch über dem Grundzustand liegt umso weniger Systeme befinden sich somit in diesem Zustand. Auch wenn man das Verstärkungsmedium kühlt, entvölkert sich der untere Zustand des Laser-Übergangs. Eine Inversion ist also in einem Vier-Niveausystem auch zu erreichen, wenn sich die Mehrzahl aller Systeme im Grundzustand befindet. Ein Beispiel für ein Vier-Niveausystem ist der in dieser Arbeit beschriebene Titan-Saphir Oszillator (Femtolasers Fusion 300 BB).

Eine Zwischenstufe zwischen Drei- und Vier-Niveausystem ist das Quasi-Vier-Niveauschema, das ebenso manchmal Quasi-Drei-Niveauschema genannt wird: Es handelt sich dabei eigentlich um ein Drei-Niveauschema, jedoch ist der Grundzustand in mehrere Subniveaus unterteilt, deren Energien jedoch eng beieinander liegen und ein schneller thermischer Ausgleich möglich ist. Das untere Laserniveau ist damit thermisch besetzt, d.h. gemäß Boltzmannstatistik bevölkert ein Anteil der Population des Grundzustandes das untere Laserniveau. Die relative Besetzung des Laserniveaus im Vergleich zum untersten Niveau des

Grundzustandes ist dann proportional dem Quotienten ihrer Boltzmannfaktoren. In diesen Quotienten geht der Abstand der Energieniveaus und die absolute Temperatur ein. Je nach Energieabstand und Temperatur hat der Übergang dann stärkeren Vier-Niveaucharakter (niedrige Temperatur, hoher Energieabstand) oder stärkeren Drei-Niveaucharakter (höhere Temperatur, niedriger Energieabstand).

2.1.2 Kurze Lichtimpulse aus Lasern

Für die nichtlineare Optik benötigt man hohe Lichtintensitäten. Diese werden durch gepulste Laser erreicht. Die kürzesten Impulsdauern (<10 fs) aus Lasern werden mit Hilfe der Technik der passiven Modenkopplung erreicht. Diese Technik soll im folgenden kurz dargestellt werden. Zeitlich kurze Impulse benötigen ein breites Frequenzspektrum. Das ist ein fundamentales Ergebnis der Funktionalanalysis [142]. Um kurze Impulse mit einem Laser zu erzeugen, müssen also möglichst alle longitudinale Moden des Resonators, die vom Emissionsspektrum des Verstärkungsmediums unterstützt werden, kooperieren. Ein Laserresonator erlaubt eine Vielzahl von longitudinalen Moden. Im Prinzip kann bei jeder dieser Moden Lasertätigkeit einsetzen, wenn die Mode ausreichend Verstärkung durch das aktive Medium erfährt. Ohne weiteres Zutun setzen sich jedoch einige wenige Moden durch, welche am meisten Verstärkung erfahren. Die anderen Moden verlieren im Wettbewerb um die Verstärkung ("gain competition") [143]. Bei einem freilaufenden Laser tritt manchmal das Wechseln zwischen verschiedenen Moden ("mode hopping") als Rauschquelle auf [143]. Schwingen alle Moden statistisch unabhängig voneinander an, so überlagern sich die elektrischen Felder jedoch selten konstruktiv. Die Moden benötigen demnach eine feste Phasenbeziehung, die konstruktive Überlagerung ermöglicht. Tatsächlich zeigt sich, dass die Impulse am kürzesten sind, wenn die spektrale Phase⁴ der Lichtimpulse über das ganze Spektrum konstant gehalten ist [144]. Im Experiment wird diese Kopplung der Moden durch eine Nichtlinearität im Resonator realisiert. Diese begünstigt hohe Spitzenintensitäten, dadurch erfährt kooperatives Verhalten aller Moden weniger Verluste als die Lasertätigkeit einer einzelnen Mode. Das kann zum Beispiel durch einen sättigbaren Absorber (z.B. Semiconductor saturable absorber mirror (SESAM)) oder eine Kerrlinse in einem geeignet ausgelegten Resonator geschehen [145]. Die Überlagerung aller Moden im Resonator setzt eine genaue Kontrolle der Gruppengeschwindigkeitsdispersion, die der Impuls beim Durchlauf durch den Resonator erfährt, voraus. Diese erfolgt entweder durch ein Prismenpaar im Resonator oder durch sogenannte "chirped mirrors" [146, 135]. Das sind dielektrische Spiegel, die so aufgebaut sind, dass verschiedene Wellenlängen bei der Reflexion unterschiedliche Verzögerungen erfahren. Der am weitest verbreitete fs-Laser ist der Titan:Saphir-Laser, sowie er auch für diese Arbeit Verwendung fand. Titan:Saphir hat ein sehr breites Emissionsspektrum. Es reicht von 650 nm bis über 1000 nm [147]. Aufgrund dieser Bandbreite können Impulse mit einer Dauer von unter 6 Femtosekunden mit Titansaphirlasern erzeugt werden.

⁴Für genauere Definition siehe Abschnitt 2.1.3

2.1.3 Beschreibung kurzer Lichtimpulse, Gruppengeschwindigkeitsdispersion und “zirpende“ Spiegel

Das elektrische Feld $E(t)$ eines kurzen Lichtimpulses kann vollständig in der Zeitdomäne beschrieben werden:

$$E(t) = A_0(t)e^{i\phi(t)} + c.c. = A_0(t)e^{i(\omega_l t + \phi(t))} + c.c. \quad (2.1)$$

$A_0(t)$ beschreibt die Einhüllende des Impulses. ω_l ist die optische Trägerfrequenz des Impulses. Diese ist im Grunde nur gut definiert, wenn für die Impulsdauer $\Delta\tau$ gilt $\Delta\tau \gg 1/\omega_l$. $\phi(t)$ ist ein allgemeiner Phasenterm. Im Experiment wird in der Regel nicht das elektrische Feld, sondern die Intensität des Lichtfeldes bestimmt. In der Zeitdomäne gilt für die Intensität [95]:

$$I(t) = 2n\epsilon_0 c |E|^2 \quad (2.2)$$

n ist der Brechungsindex, ϵ_0 die dielektrische Suszeptibilität des Vakuums. Der Lichtimpuls kann ebenso vollständig in der Frequenzdomäne beschrieben werden:

$$\hat{E}(\omega) = \hat{A}_0(\omega - \omega_l)e^{i\Phi(\omega - \omega_l)} + c.c. \quad (2.3)$$

Der positive Anteil von $\hat{A}_0(\omega - \omega_l)$ beschreibt die Einhüllende des Spektrums. $\Phi(\omega)$ ist die spektrale Phase des Impulses. Die Messgrösse ist die spektrale Intensität $S(\omega)$:

$$S(\omega) = \frac{2n\epsilon_0 c}{2\pi} |\hat{E}|^2 \quad (2.4)$$

Durch die Fouriertransformation sind beide Beschreibungen miteinander verknüpft:

$$A_0(t)e^{i\phi(t)} + c.c. \Leftrightarrow \hat{A}_0(\omega)e^{i\Phi(\omega)} c.c. \quad (2.5)$$

Die charakteristische Frequenzbandbreite⁵ $\Delta\nu$ der spektralen Intensität und die Zeitbandbreite $\Delta\tau$ der zeitlichen Intensität eines Impulses sind auch über die Fouriertransformation verknüpft. Es existiert eine untere Grenze für das Produkt beider Bandbreiten. Nimmt man gaussförmige Impulse an, so gilt:

$$\Delta\nu \Delta\tau \geq 0.441 \quad (2.6)$$

Ein Impuls, dessen Frequenzbandbreite und Impulsdauer diese Grenze erreicht, wird “Bandbreiten-begrenzt“ genannt.

In der Zeitdomäne ist die Ableitung der Phase $\phi(t)$ nach der Zeit die instantane Frequenz $\omega(t)$:

$$\omega(t) = \omega_l + \frac{\partial\phi}{\partial t} \quad (2.7)$$

Ändert sich die instantane Frequenz mit der Zeit, so spricht man von einem “Chirp“. Ein Phasenterm mit einer quadratischen Abhängigkeit von der Zeit entspricht einem linearen

⁵ $\Delta\nu = \Delta\omega/2\pi$

“Chirp“. Ein positiver quadratischer Phasenterm im Zeitraum entspricht einem “upchirp“ (Die Frequenz wird mit der Zeit immer größer.), ein negativer einem “downchirp“ (Die Frequenz wird mit der Zeit immer kleiner.) [144]. Ein “gechirpter“ Impuls mit einer gewissen zeitlichen Dauer enthält mehr Frequenzen als ein ungechirpter Impuls mit der *gleichen* zeitlichen Dauer. Im Frequenzraum ist analog bei einer gegebenen spektralen Breite ein Impuls zeitlich am kürzesten, wenn die spektrale Phase $\Phi(\omega)$ konstant ist. Ein zusätzlicher Phasenterm im Frequenzraum verlängert den Impuls. Ein positiver Phasenterm mit quadratischer Frequenzabhängigkeit entspricht einem linearen “downchirp“, ein negativer einem linearen “upchirp“ [144]. Normale Dispersion bei der Propagation in einem dielektrischen Material führt zu einer zusätzlichen spektralen Phase:

$$\hat{E}(\omega) = \hat{A}_0(\omega - \omega_l) e^{i(\Phi(\omega - \omega_l) - k(\omega)z)} + c.c. \quad (2.8)$$

Der Wellenvektor k , welcher die Propagationseigenschaften des Materials beschreibt, kann um die Laserfrequenz ω_l entwickelt werden [148]:

$$k(\omega) = k(\omega_l) + \frac{\partial k}{\partial \omega}(\omega_l)(\omega - \omega_l) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2}(\omega_l)(\omega - \omega_l)^2 + \dots \quad (2.9)$$

Der erste Term der Summe geht in Phasengeschwindigkeit $v_\Phi = \omega_l/k(\omega_l)$ des Lichtimpulses ein. Der zweite Term ist reziprok zur Gruppengeschwindigkeit v_{group} des Lichtimpulses:

$$v_{group}^{-1} = \frac{\partial k}{\partial \omega}(\omega_l) \quad (2.10)$$

Der dritte Term besitzt eine quadratische Abhängigkeit von der Frequenz ω . Dieser Term führt demnach zu einem linearen “Chirp“. Normale Dispersion führt zu einem “upgechirpten“ Impuls, anomale Dispersion zu einem “downgechirpten“ Impuls. Der Beitrag einer optischen Komponente oder eines Materials wird mit der “group velocity dispersion“ (GVD) k_2 charakterisiert [148]:

$$k_2 = \frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2}(\omega_l) = \frac{\partial}{\partial \omega} \left(\frac{1}{v_{group}} \right) \quad (2.11)$$

Normale Dispersion im Material entspricht positiver GVD [144]. Im Bereich der Faseroptik wird die GVD manchmal auch mit Hilfe eines Dispersionsparameter D angegeben [144]:

$$D = -\frac{2\pi c}{\lambda^2} k_2 \approx -\frac{1}{v_{group}^2} \frac{\delta v_{group}}{\delta \lambda} \quad (2.12)$$

Der Dispersionsparameter beschreibt grob die zeitliche Verbreiterung eines Impulses pro Strecke und spektraler Bandbreite [144]. An einem konkreten Beispiel aus dem Experiment soll die Wirkung der Dispersion illustriert werden: Es soll angenommen werden, dass die zeitlichen Einhüllende des Impulses des Probelasers einer Gaussschen Glockenkurve folgt:

$$A_0(t) \propto e^{-\frac{t^2}{2\tau_0^2}} \quad (2.13)$$

Der Parameter τ_0 beschreibt die Impulsdauer des elektrischen Feldes. Im experimentellen Alltag ist es üblich statt dem Parameter τ_0 die volle Halbwertsbreite der Impulsdauer der Intensität τ_{FWHM} anzugeben:

$$\tau_{FWHM} = 2\sqrt{\ln 2}\tau_0 \quad (2.14)$$

Die Impulsdauer $\tau(z)$ wird bei der Propagation durch das Material wie folgt verlängert [144]:

$$\tau(z) = \tau_0 \sqrt{1 + \left(\frac{k_2 z}{\tau_0^2}\right)^2} \quad (2.15)$$

k_2 ist die GVD des Materials und z die Propagationslänge. Die vollständig komprimierte Impulsdauer beträgt am Ausgang des Lasers 8 fs. Das entspricht einem τ_0 von 4.8 fs. Das Experiment befindet sich ca. 2 m von dem Ausgang des Lasers entfernt. Die GVD in der Luft beträgt bei der zentralen Wellenlänge des Lasers (810 nm) ca. 27 fs²/m [149] (aus der dort angegebenen Sellmeierformel abgeleitet). Die Impulsdauer wird durch die Propagation von 8 fs auf ca. 21.8 fs verlängert. Den größten Beitrag zur Dispersion liefert jedoch das im Experiment verwendete fokussierende Objektiv. Die GVD eines Objektivs hängt stark von seiner Bauweise ab: Sie liegt für Standardobjektive der Achroplanserie von Zeiss zwischen 3500-4000 fs² [150], für Spezialobjektive mit aufwändigeren Korrekturen wie zum Beispiel die C-Apochromatserie oder die Plan-Neofluarserie zwischen 4500 und 5500 fs² [151]. Im Experiment wurde zumeist ein Fluorobjektiv (Zeiss, Fluor 20x, NA 0.75) eingesetzt. Dieses Objektiv zeigt eine niedrigere GVD [152]. Um den Effekt der Dispersion im Objektiv auf die Impulsdauer zu illustrieren soll der gemessene Wert der GVD von 1773 fs² angenommen werden (siehe Abschnitt 7.1.2). Nach Gleichung 2.15 verlängert sich der 8 fs Impuls des Oszillators bei der Propagation durch das Objektiv auf 512 fs. Der Probeimpuls hat dann eine Impulsdauer, die mit der Dauer des Pumpimpuls vergleichbar ist. Die Impulsverlängerung durch die Dispersion verringert die gemessenen Ramanbandenhöhen, da der zeitliche Überlapp nicht für alle Ramanbanden im gleichen Maße gewährleistet ist (siehe Abschnitt 7.1.2).

Die normale Materialdispersion führt immer zu einer positiven GVD des Impulses. Die richtige Anordnung dispersiver Elemente (Prismen, Gitter) kann zu negativer GVD führen. Mit einem solchen sogenannten "Kompressor" kann ein "upgechirpter" Impuls komprimiert oder auch überkomprimiert werden. Die Dispersion eines Mikroskopobjektivs kann so mit einem Kompressor vor dem Objektiv kompensiert werden [150, 151]. Sogenannte "chirped mirrors" sind eine weitere Möglichkeit die Dispersion eines kurzen Impulses zu kontrollieren. Diese dielektrischen Spiegel besitzen einen speziellen Aufbau der dielektrischen Beschichtung, so dass die unterschiedlichen Frequenzanteile eines Impulses in verschiedener Eindringtiefe reflektiert werden. So können Laufzeitunterschiede der Frequenzanteile des Impulses durch normale Dispersion durch die unterschiedliche Laufzeit in der Spiegelbeschichtung kompensiert werden [146]. Die Dispersion im verwendeten Oszillator wird ausschliesslich von "chirped mirrors" kontrolliert.

2.1.4 Messung kurzer Lichtimpulse

Man kann die Impulsdauern von ultrakurzen (<einigen Pikosekunden) Lichtimpulsen nicht direkt mit elektronischen Messmethoden auflösen. Deswegen bedient man sich der kurzen Impulse selbst als Maßstab für die Impulslänge. Die einfachste solcher Methoden ist die Autokorrelation eines Impulses. Dabei wird über einen Strahlteiler ein Replica des zu messenden Impulses erzeugt. Der Impuls und sein Replica werden relativ zueinander über eine einstellbare Lichtlaufstrecke verzögert. Die relative Verzögerungsstrecke entspricht über die Lichtgeschwindigkeit verknüpft einer Zeit. Der Impuls wird dann mit seinem Replica des Impulses in einem optisch, nichtlinearen Medium überlagert. Die nichtlineare Antwort des Mediums auf die überlagerten Lichtimpulse hängt von der instantanen Feldstärke ab. Die Messung der Antwort in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit gibt demnach Information über die Impulsdauer des Impulses. Allerdings muss man bei der Rekonstruktion der Pulslänge die erwartete Impulsform annehmen [144]. Es wurden jedoch auch Methoden entwickelt, um das elektrische Feld eines kurzen Laserimpulses vollständig zu charakterisieren. Dazu zählen unter Anderem “frequency-resolved optical gating” (FROG) [153] und “spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction” (SPIDER) [154].

2.1.5 Der Intensitätsautokorrelator und sein Aufbau nach Kozma

In dieser Arbeit wurde ein untergrundfreier Intensitätsautokorrelator [155] zur Vermessung der Probe- und Pumpimpulse der Lichtquelle verwendet. Das Replica des Impulses wird hier über einen geteilten Spiegel erzeugt, die Verzögerung, in dem eine Spiegelhälfte relativ zu der Anderen mit Hilfe eines Piezoelementes bewegt wird. Der Stellweg des Piezoelementes ist so lang (1 mm), dass nicht nur Femtosekundenimpulse sondern auch Pikosekundenimpulse vermessen werden können. Die beiden Hälften des Lichtstrahles werden mit Hilfe eines Parabolspiegels auf einen Punkt in einem BBO(Beta Barium Borat)-Kristall fokussiert, so dass sich beide im Kristall kreuzen. Es wird das durch Summenfrequenzbildung erzeugte Licht in Abhängigkeit von der Verzögerungsstrecke detektiert. Sowohl das Licht der Fundamentalen als auch die erzeugte zweite Harmonische beider Strahlhälften können mit einer Blende geblockt werden, während das detektierte Signal auf der Achse der sich kreuzenden Strahlhälften emittiert wird. Das Signal ist die Intensitätsautokorrelation des Lichtimpulses. Die Breite des Autokorrelationssignal entspricht über einen Entfaltungsfaktor, der von der angenommenen Pulsform abhängt, der Dauer des Impulses⁶. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Rekonstruktion nicht eindeutig ist, ganz unterschiedliche Pulsformen können sehr ähnliche Autokorrelationsspuren aufweisen. Man kann mit dieser Art der Autokorrelation nicht die spektrale Phase messen. Höhere Ordnung der Dispersion können somit nur indirekt gemessen werden.

⁶Für einen gaussförmigen Impuls ist die Autokorrelationsbreite um den Faktor 1.414 breiter als die tatsächliche Impulsdauer [144].

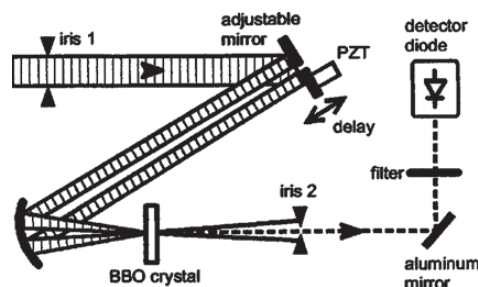


Abbildung 2.2: Schema des Aufbaus des verwendeten Autokorrelators (entnommen aus[155])

2.2 Single-mode Fasern und Faserverstärker

Lichtleitende Fasern und faserbasierte Komponenten sind in der modernen Telekommunikation allgegenwärtig. 2009 wurde der Nobelpreis für Physik zur Hälfte an Charles K. Kao für seine grundlegenden Arbeiten bezüglich der Transmission von Licht in Fasern für die optische Kommunikation vergeben. Der Faserlaser soll in Zukunft stabiler, kompakter und billiger sein, als Festkörperlaser das momentan sind. Der Faserlaser kann in allen, großen Anwendungsbereichen der Lasertechnik (Telekommunikation, Biologie/Medizin und Materialbearbeitung [57]) eingesetzt werden. Dieser Abschnitt soll den Hintergrund für alle Arbeiten an dem Faserverstärker der Lichtquelle geben. Es werden zunächst einige Begrifflichkeiten aus der Faseroptik dargelegt. Dann werden die grundlegenden Ratengleichungen für die Besetzung der Energieniveaus und die Verstärkung des Faserverstärkers gegeben.

2.2.1 Eigenschaften von Singlemode Fasern

Lichtleitende Fasern werden aus Glas hergestellt. Sie bestehen aus einem Kern mit höherem Brechungsindex und einem Mantel mit niedrigerem Brechungsindex. Der Brechungsindex eines Glases kann mit dem Zusatz ("Doping") geeigneter Elemente oder Verbindungen angehoben (z.B. TiO_2 , GeO_2 , Al_2O_3) oder gesenkt (B_2O_3 , F) werden [156].

Für hinsichtlich der Wellenlänge große Kerndurchmesser kann die Lichtleitung strahlenoptisch über das Phänomen der Totalreflexion des Lichtes an der Grenzfläche zwischen Kern und Mantel erklärt werden. Ist die Wellenlänge des geführten Lichtes in etwa so groß wie der Durchmesser des Kerns, muss man die Propagation des Lichtes in der lichtleitenden Struktur im Detail mit Hilfe der Maxwellgleichungen beschreiben. Die radiale Struktur der Faser führt zu Randbedingungen für das elektromagnetische Feld an dem Übergang zwischen Kern und Mantel. Diese Randbedingungen werden nur von diskreten Moden des transversalen, elektromagnetischen Feldes erfüllt. Die Moden haben jedoch keinen rein transversalen Charakter, deswegen nennt man diese Moden auch Hybridmoden. [157]. Der radiale Verlauf der Moden wird von Besselfunktionen beschrieben [157]. Der V-Parameter ist eine wichtige Größe, um die Anzahl der in der Faser geführten Moden zu beschreiben.

Er ist wie folgt definiert [157]:

$$V = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{n_1^2 - n_2^2} a = \frac{2\pi}{\lambda} NA a \quad (2.16)$$

λ ist die Wellenlänge des Lichtes, n_1 ist der Brechungsindex des Kerns, n_2 der Brechungsindex des Mantels, $NA = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$ ist die numerische Apertur der Faser, a ist der Radius des Kerns. Ist der V-Parameter kleiner als 2.405 wird nur eine einzelne Mode von der Faser geführt. Das ist für kleine Faserkerndurchmesser sowie geringe Unterschiede zwischen dem Brechungsindex des Kerns n_1 und dem Brechungsindex des Mantels n_2 der Fall. Man nennt eine solche Faser eine Einzelmodenfaser ("single mode fiber" (SMF)). Zur Charakterisierung von Einzelmodenfasern wird eine Cut-Off Wellenlänge angegeben. Für Licht mit einer kürzeren Wellenlänge ist für mehr als nur eine Mode die Propagation innerhalb der Faser möglich, die Faser verliert also ihren Einzelmodencharakter. Die unterschiedlichen, transversalen Moden besitzen unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten in der Faser. Ein aus mehreren transversalen Moden bestehender Lichtimpuls wird bei der Ausbreitung nicht nur durch die reine Materialdispersion, sondern eben auch durch diese sogenannte Modendispersion verlängert. Eine SMF vermeidet die Modendispersion und ist deswegen für das Leiten kurzer Lichtimpulse besonders geeignet.

Die fundamentale Mode wird in der Näherung für schwach führende Fasern [158] LP_{01} (LP für linear polarisiert) genannt. Diese Mode ist bezüglich der Polarisierung entartet, so dass es eigentlich zwei senkrecht zueinander linear polarisierte fundamentale Moden gibt. Das radiale Profil des elektrischen Feldes $E(r)$ folgt innerhalb des Kerns der niedrigsten, sphärischen Besselfunktion erster Art, und fällt außerhalb des Kerns mit einer modifizierten Hankelfunktion ab [158]. Dieser Verlauf kann durch eine Gaussfunktion genähert werden. Der Durchmesser $2w$ dieser Gaussfunktion, wie unten definiert, wird auch Modenfelddurchmesser (mode field diameter) genannt [157].

$$E(r) = E_0 \exp\left(-\left(\frac{r}{w}\right)^2\right) \quad (2.17)$$

E_0 ist hier der Wert des radialen Profils des elektrischen Feldes im Zentrum der Faser. Die Fläche A_{eff} heißt effektive Modenfläche:

$$A_{eff} = \pi w^2 \quad (2.18)$$

Diese Mode kann mit der TEM_{00} Mode eines auf das Faserende fokussierten Laserstrahlenbündels angeregt werden. Theoretische Berechnungen zeigen, dass bei geeignet angepassten Durchmesser des Laserstrahls⁷ beinahe keine Leistung verloren geht (Transmission $> 99.7\%$), wenn man von Reflektionsverlusten absieht [159]. Der Laserverstärker beruht auf Einzelmodenfasern. Die verwendete Einzelmodenfaser heißt HI 1060 und wird von der Firma Corning produziert. Der Durchmesser des Kerns beträgt $5.3 \mu\text{m}$ [160]. Die Cut-Off Wellenlänge ist bei dieser Faser $920 \pm 50 \text{ nm}$ [160]. Der Modenfelddurchmesser ist bei der verwendeten Wellenlänge von 980 nm $5.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ [160].

⁷Für Bedingungen, bei denen die Mode hauptsächlich im Kern propagiert, gilt: $w = \sqrt{2}d$. w ist hier der Radius der Gaussmode wie oben definiert, d ist der Radius des Faserkerns.

2.2.2 Dispersion in Einzelmodenfasern

Licht erfährt beim Durchgang durch eine Einzelmodenfaser Gruppengeschwindigkeitsdispersion (group velocity dispersion (GVD)). Das kann bei gepulsten Licht zu einer Verlängerung der Impulsdauer führen. Die GVD β_2 durch die Faser besteht aus zwei Beiträgen, erstens die Materialdispersion des Glases und zweitens die Dispersion durch die Wellenleitung in der Faser.

Der Beitrag β_2^M des Materials zur GVD folgt aus der Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex des Fasermaterials und wird definitionsgemäß, aus der Abhängigkeit des effektiven Brechungsindex der Faser n von der Kreisfrequenz ω bestimmt [144].

$$\beta_2^M = \frac{1}{c} \left(2 \frac{dn}{d\omega} + \omega \frac{d^2n}{d\omega^2} \right) \quad (2.19)$$

c ist die Lichtgeschwindigkeit.

Der zweite Beitrag zur GVD folgt aus der Wellenleitung des Lichtes. Er hängt von den charakteristischen Parametern der Faser ab. Dieser Beitrag ist klein und spielt nur bei dem Nulldurchgang der Materialdispersion eine nennenswerte Rolle. Er ist negativ und führt dazu, dass die so genannte Nulldispersionswellenlänge etwas zu höheren Wellenlängen verschoben wird [161].

Die übliche Einheit für β_2 ist ps²/km. Ist β_2 größer als Null spricht man von normaler Dispersion, ist β_2 kleiner als Null anomale Dispersion. Bei einer Standardtelekommunikationsfaser liegt die Nulldispersionswellenlänge in etwa bei 1310 μ m [161]. In der technischen Literatur wird oft der Dispersionsparameter D angegeben. Dieser ist nach folgender Relation linear proportional zur GVD, man beachte allerdings die Vorzeichenumkehr.

$$D = -\frac{2\pi c}{\lambda^2} \beta_2 \quad (2.20)$$

Die übliche Einheit für D ist ps/nm/km

Die sogenannte Dispersionslänge L_D ist eine Kenngröße für ein System aus Laserimpuls und Faser.

$$L_D = \frac{T_0^2}{|\beta_2|} \quad (2.21)$$

T_0 ist die Impulslänge des in der Faser propagierten Laserimpulses. L_D beschreibt die Länge, ab der der Impuls durch die Dispersion deutlich verändert wird. Für die Impulse des in dieser Arbeit beschriebenen Faserverstärker gilt $T_0 \approx 1$ ps und für die Einzelmodenfaser HI 1060 wird die Dispersion D bei der Wellenlänge 980 nm mit -53 ps/nm/km angegeben. Daraus folgt, dass die typische Dispersionslänge für den Faserverstärker ≈ 40 m beträgt. Die Dispersionslänge ist damit deutlich länger als die Länge des Verstärkers (≈ 6 m).

2.2.3 Selbstphasenmodulation in Fasern

Die Selbstphasenmodulation kann bei der Propagation kurzer Lichtimpulse durch eine Faser auftreten. Die Ursache der Selbstphasenmodulation ist die Nichtlinearität der Faser

bei hohen Spitzenintensitäten. Der Brechungsindex n der Faser wird dann abhängig von dem zeitlichen Verlauf der Intensität $I(t)$ des Lichtimpulses. Diese Abhängigkeit ist dem nichtlinearen Brechungsindex n_2 proportional [162]:

$$n = n_0 + \frac{1}{2}n_2I(t) \quad (2.22)$$

n_0 ist der materialbedingte Brechungsindex der Faser.

Auf eine ebene Welle angewandt, folgt das die instantane Frequenz $\omega(t)$ des Lichtimpulses, von der Ableitung der Impulsform abhängt:

$$\omega(t) = \omega_0 - \frac{\omega_0}{c} \frac{\partial n(t)}{\partial t} x \quad (2.23)$$

ω_0 ist die Zentralfrequenz des Lichtimpulses.

Die Selbstphasenmodulation erzeugt während der Propagation durch die Faser an den zeitlichen Flanken des Impulses neue Frequenzen. An der führenden Flanke des Impulses sind die erzeugten Frequenzen zur Zentralfrequenz rot verschoben, an der folgenden Flanke blau verschoben [162]. Die zeitliche Impulsform bleibt durch die SPM zunächst unberührt, die Frequenzen werden innerhalb des Pulses erzeugt. Ist aber ein Impuls zunächst transform limitiert, wird er durch die neuen Frequenzen gecirpt. Die Längenskala, auf der die Selbstphasenmodulation aber auch andere nichtlineare Effekte wie stimulierte Ramanstreuung und stimulierte Rayleighstreuung Bedeutung haben [161], ist die sogenannte nichtlineare Länge L_{NL} :

$$L_{NL} = \frac{cA_{eff}}{n_2\omega_0P_0} \quad (2.24)$$

P_0 ist Spitzenleistung des Lichtimpulses.

Nimmt man die Werte der verstärkten Impulse des in Kapitel 3 beschriebenen Faserverstärkers an ($A_{eff} = 30 \mu\text{m}^2$, $P_0 = 1 \text{ kW}$, $n_2 = 3,2 \times 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{W}$, $\omega_0 = 2 \times 10^{15} \text{ Hz}$), ergibt sich eine nichtlineare Länge von ca. 14 cm. Wie auch später in Abschnitt 3.2.5 gezeigt wird, muss die Selbstphasenmodulation bei dem Aufbau des Experiments berücksichtigt werden.

2.2.4 Grundlagen zu dem Faserverstärker

Faserverstärker finden breite Anwendung in der Telekommunikation [157]. Glasfasernetzwerke benötigen wegen optischer Verluste in der Faser in Intervallen von ca. 50 km [157] Signalverstärker. So benötigt eine 9000 Kilometer lange transpazifische Verbindung 274 Faserverstärker zur fehlerfreien Übertragung eines Signals [163]. Neben Verstärkern die auf dem stimulierten Ramaneffekt beruhen und optischen Halbleiterverstärkern, sind auf mit seltenen Erden dotierten Glasfasern beruhende Verstärker eine weit verbreitete Alternative zur Verstärkung des Signals [157]. Erbiumdotierte Faserverstärker (EDFA) können beispielsweise zur Verstärkung des C-Bandes (1530-1565 nm) verwendet werden [157]. EDFA besitzen eine hohe Verstärkung bei geringem Rauschen und eine hohe Ausgangsleistung über eine große spektrale Bandbreite [157]. Für den Aufbau des Faserverstärkers für die

Erzeugung des Ramanpumpimpulses des FSRM-Experiments wurde jedoch eine Glasfaser verwendet, die mit Ionen einer anderen seltenen Erde, nämlich Ytterbiumionen, dotiert ist. In weiteren Verlauf dieses Abschnitt sollen die Grundlagen für diesen Faserverstärker der Lichtquelle dargelegt werden. Zunächst werden Ytterbiumionen als Verstärkermedium vorgestellt, daraufhin wird schematisch der Aufbau einer Verstärkerstufe dargestellt. Zuletzt folgt eine Zusammenfassung allgemeiner, theoretischer Aussagen zu Faserverstärkern, die auf dotierten Glasfasern beruhen.

2.2.4.1 Ytterbiumionen als Verstärkermedium

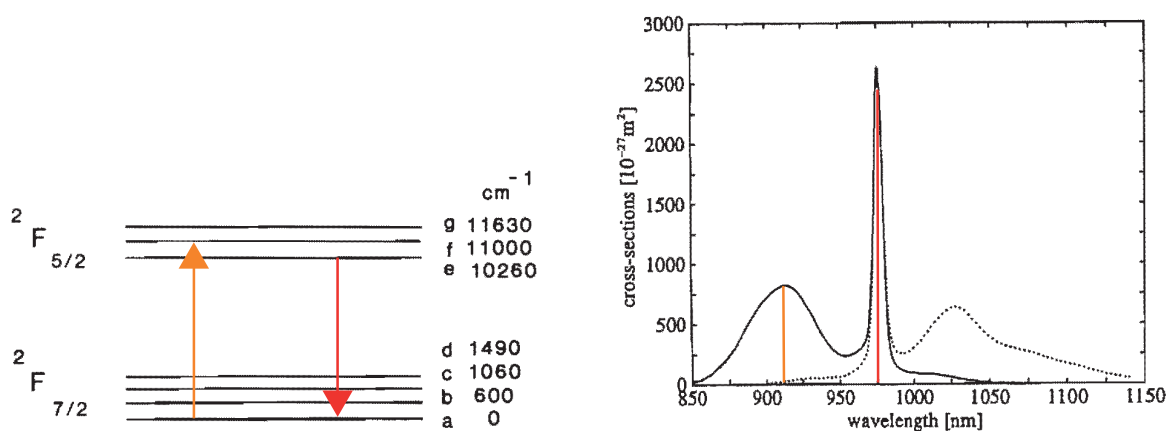
Ytterbium gehört wie Erbium und Neodym zu den seltenen Erden. Damit man Ionen der seltenen Erden als Lasermedium verwenden kann, müssen sie in ein optische transparentes Wirtsmaterial eingebettet sein (z.B. Yttrium-Aluminium-Garnet (YAG) oder Glas). Das Wirtsmaterial dient nicht allein der räumlichen Einbettung einer gewissen Konzentration der Laser-aktiven Ionen, es beeinflusst auch das Termschema der eingebetteten Ionen durch das sogenannte Ligandenfeld und macht damit die Verwendung als Lasermedium erst möglich. Als Lasermedium sind im Bereich der Faserlaser Erbiumionen weiter verbreitet als Ytterbiumionen, bei den Festkörperlasern Neodymionen viel gängiger. Ytterbiumionen wurde schon 1962 als Lasermedium eingesetzt, aufgrund ihres Termschemas mit Quasi-Drei-Niveau-Gestalt allerdings nur bei tiefen Temperaturen unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff [164].

Der für die Verstärkung eingesetzte, elektronische Übergang bei Ytterbium erfolgt wie bei allen seltenen Erden innerhalb der 4f Schale [165]. Genauer findet der Übergang zwischen der $^2F_{7/2}$ Mannigfaltigkeit des Grundzustands und der $^2F_{5/2}$ Mannigfaltigkeit eines angeregten Zustandes statt [166]. Die Energieniveaus sind sowohl im angeregten Zustand als auch im Grundzustand durch den Starkeffekt nochmals aufgespalten (siehe Abbildung 2.3(a)) [166]. Das relativ einfache Termschema hat mehrere Implikationen für Ytterbium als Lasermedium, negative wie positive: Zunächst besitzt es damit nur Dreineveu- oder Quasi-Dreineveuübergänge [166, 167] und erfordert damit höhere Pumpleistungen als z.B. Neodym, um die Laserschwelle zu erreichen [167]. Auch besitzt es keine höheren Energieniveaus, so dass optisches Pumpen mit Entladungslampen sehr ineffizient ist [167]. Jedoch ist die Stokesverschiebung zwischen Pumpwellenlänge und Laserwellenlänge sehr klein, so dass ein hoher Wirkungsgrad möglich ist und auch die Wärmeabgabe an die umgebende Wirtsstruktur gering ist [168]. Das Fehlen höherer Energieniveaus⁸ verhindert auch das Auftreten einer Absorption aus dem angeregten Zustand sowohl des Pump- als auch des Laserlichtes [166]. Der Energieabstand zwischen dem Grund- und dem angeregten Zustand verhindert auch in Wirtsmaterialien mit hoher Phononenenergie wie z.B. Silica nichtstrahlende Vielphononenprozesse [166].

Die genauen spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden sich in verschiedenen Wirtsmaterialien. Deswegen werden hier nur die Eigenschaften von Ytterbium in Glasfasern dargestellt. Die einzelnen Übergänge zwischen dem angeregten und dem Grundzustand sind

⁸Das nächst höhere Energieniveau liegt etwa bei 10^6 cm^{-1} [167].

in Glas so stark verbreitert, dass nicht mehr alle im Emissions- und Absorptionsspektrum aufgelöst werden können [141] (siehe Abb. 2.3(b)). Die Verbreiterung der Banden ist hauptsächlich homogen, besitzt jedoch auch einen inhomogenen Anteil [141]. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes τ variiert je nach Zusammensetzung des Glases von typischen 0.8 ms für eine germaniumdotierte Glasmischung bis zu 1.5 ms für eine reine Siliziumglasfaser [141]. Für den Laserverstärker des FSRM-Experimentes wird zum Pumpen der Übergang vom untersten Subniveau des Grundzustands in das zweite Subniveau des angeregten Zustandes verwendet. Die Emission erfolgt dann vom niedrigsten Subniveau des angeregten Zustandes wieder in das niedrigste Niveau des Grundzustandes (siehe Abb. 2.3(a)). Es handelt sich also um ein echtes Drei-Niveauschema. Während die zum Pum-



(a) Termschema von Ytterbiumionen (entnommen aus [166]). Der Pumpübergang (oranger Pfeil) erfolgt bei ca. 11000 cm^{-1} , die stimulierte Emission (roter Pfeil) bei ca. 10260 cm^{-1} . ©1995 IEEE

(b) Absorptions- (durchgezogene Linie) und Emissionsstreuquerschnitte (gestrichelte Linie) einer Yb^{3+} -dotierten Faser (entnommen aus [141]). Die Wellenlänge von dem verwendeten Pumpübergang (orange)- bzw. Laserübergang (rot) sind markiert. ©1997 IEEE

Abbildung 2.3: Spektroskopische Eigenschaften von Ytterbiumionen in Glasfasern

pen verwendete Bande sehr breit ist, besitzt die verwendete Emissionsbande eine spektrale Verstärkungsbandbreite von nur 2.25 nm (FWHM). Das ist aber immer noch ausreichend, um eine Impulsdauer von ca. 0.6 ps zu unterstützen. Der Absorptionsquerschnitt bei der Pumpwellenlänge von 915 nm beträgt ca. $750 \times 10^{-23} \text{cm}^2$, der Emissionsquerschnitt in der Spitze der verwendeten Emissionsbande liegt bei über $2500 \times 10^{-23} \text{cm}^2$ [141] (siehe Abb. 2.3(b)). Aufgrund des hohen Emissionsquerschnittes kann bei sehr kurzen Faserlängen eine sehr hohe Signalverstärkung erzielt werden.

2.2.4.2 Aufbau einer einzelnen Verstärkerstufe

Der Laserverstärker ist aus mehreren Verstärkungsstufen aufgebaut. Alle Verstärkungsstufen haben jedoch im Kern den gleichen Aufbau (siehe Abb. 2.4). Sie bestehen aus einem

sogenannten “Wavelength Division Multiplexer“, kurz WDM, mit dessen Hilfe das Pumplicht und das Signallight aus zwei unterschiedlichen Fasern in einer gemeinsamen Faser (Diese wird deswegen auch “common“ genannt.) vereint werden. Es handelt sich dabei prinzipiell nur um einen dichroitischen Spiegel, der jedoch so eingebaut wird, dass er direkt mit den Faserenden kombinierbar ist. An das Ende der “common“-Faser schliesst die aktive Ytterbiumfaser an. Nach der Verstärkung muss das Signal wieder vom Pumplicht getrennt werden, dazu wird ein weiterer WDM oder wie im Falle der letzten Verstärkungsstufe erst außerhalb der Faser ein dichroitischer Spiegel verwendet. Das Pumplicht kann sowohl mit dem Signallight kopropagieren, wie beschrieben, als auch dem Signallight entgegenpropagieren, indem man den WDM nach der aktiven Faser zum Einkoppeln des Pumplichtes in die “common“-Faser verwendet. In der Tat sieht man auch unterschiedliche Verstärkungsergebnisse für beide Aufbauten (siehe z.B. [157]). In der Regel wird das

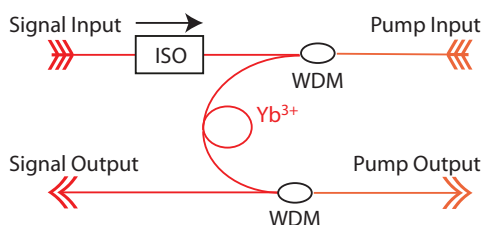


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau einer Verstärkerstufe. ISO: Isolator; WDM: “Wavelength Division Multiplexer“; Yb³⁺: aktive Yb³⁺-dotierte Faser

Signallight vor dem Verstärker durch einen optischen Isolator gesandt. Dieser lässt Licht nur in einer Richtung, der Propagationsrichtung des Signallichtes, passieren. Damit wird einerseits verhindert, dass rückwärts gerichtetes Licht durch ASE oder Reflektionen aus der Verstärkerstufe andere vorgeschaltete optische Prozesse beeinflusst, andererseits verhindert ein solcher Isolator auch, dass die rückwärts gerichtete ASE durch optische Elemente vor der Verstärkerstufe wieder in die Verstärkerstufe zurückreflektiert wird. Unterschiedliche Verstärkungsstufen unterscheiden sich hauptsächlich in den unterschiedlichen Leistungen und spektralen Signaturen des Signallichtes und den unterschiedlichen Leistungen des Pumplichtes und geringfügig auch in der Länge der aktiven Faser und den Details des realisierten Aufbaus.

2.2.4.3 Theoretische Beschreibung eines Verstärkers

Wegen seiner immensen Bedeutung in der Telekommunikation sind zahlreiche theoretische und numerische Arbeiten zum Erbiumionen dotierten Faserverstärker (EDFA) erschienen [157, 169, 170, 171]. Diese lassen sich im Allgemeinen direkt auf Ytterbium³⁺ dotierte Faserverstärker übertragen [141]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine numerischen Berechnungen angestellt. Deswegen sollen nur allgemeine, qualitative Betrachtungen zu dem Faserverstärker die Beschreibung des Aufbaus in Abschnitt 3.2 ergänzen.

Zur Beschreibung eines Laserverstärkers werden in der Regel Ratengleichungen verwendet.

Diese beschreiben die Veränderung der Lichtleistung von Pump und Signal und der verstärkten spontanen Emission sowie der Besetzung des Grund- und des angeregten Zustandes in Abhängigkeit vom Ort in der Faser und der Zeit. Zur Vereinfachung der Behandlung kann man zunächst annehmen, dass sich eine zeitlich stationäre Lösung einstellt. Das ist berechtigt, obwohl das zu verstärkende Signallicht mit der Wiederholrate des Oszillators gepulst ist, weil bei Erbium dotierten Fasern beobachtet wurde, dass die Inversion und damit die Verstärkung schon einer Modulation des Eingangssignals von 10 kHz nicht mehr folgen kann [172]⁹.

Die stationäre Lösung führt dazu, dass die Population des Laserniveaus $n_2(z)$ an jedem Ort direkt mit den durchschnittlichen Lichtleistungen $P_k(z)$ an diesem Ort in der Faser zusammenhängt [157]:

$$\frac{n_2(z)}{n_t} = \frac{\sum_k \frac{\alpha_k}{\alpha_k + g_k} \frac{P_k(z)}{P_k^{sat}}}{1 + \sum_k \frac{P_k(z)}{P_k^{sat}}} \quad (2.25)$$

Das Emissions- und Absorptionsspektrum wird hierbei in spektrale Abschnitte unterteilt die durch den Index k gekennzeichnet sind. n_t ist Ionenkonzentration im Kern der Faser. Die Parameter $\alpha_k = n_t \sigma_{ak}$ und $g_k = n_t \sigma_{ek}$ beschreiben das spektrale Emissions- und Absorptionsverhalten der Ytterbiumionen über die Streuquerschnitte σ_{ek} bzw. σ_{ak} . Die Leistung wird hier mit der intrinsischen Sättigungsleistung P_k^{sat} normiert [157]:

$$P_k^{sat} = \frac{h\nu_k A_{eff} n_t}{(\alpha_k + g_k) \tau} \quad (2.26)$$

τ ist die Lebenszeit des oberen Laserniveaus, ν_k die Frequenz des Lichtes, A_{eff} die effektive Modenfläche des Lichtes. Bei der Lichtleistung $P_k(z)$ in einem spektralen Intervall müssen sowohl die Beiträge des Pump- als auch die des Signallichtes in Betracht gezogen werden.

Bei dieser Betrachtung wurde ein vollständiger Überlapp zwischen der Mode des Lichtes und der Ionenkonzentration im Faserkern angenommen. Die intrinsische Sättigungsleistung bei der Pumpwellenlänge kann physikalisch interpretiert werden. Die Pumpabsorption unterscheidet sich qualitativ für Leistungen deutlich unterhalb der Sättigungsleistung und Leistungen weit über der Sättigungsleistung. Für geringe Pumpleistungen nimmt die Intensität innerhalb der Faser gemäß Lambert-Beerschem Gesetz exponentiell ab. Bei hohen Leistungen zeigt die Intensität eine lineare Abnahme [163]. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die angeregte Population n_2 innerhalb der Faser konstant ist. Die normierte Besetzung des angeregten Zustandes ergibt sich aus dem Verhältnis des Streuquerschnitts der Absorption bei der Pumpwellenlänge σ_{pa} zu der Summe der Streuquerschnitte von Absorption und Emission $\sigma_{pa} + \sigma_{pe}$ bei eben dieser Wellenlänge [141]:

$$n_2/n_t = \frac{\sigma_{pa}}{\sigma_{pa} + \sigma_{pe}} \quad (2.27)$$

⁹Außerdem besitzt jeder einzelne Impuls selbst im verstärkten Ausgangszustand deutlich weniger Energie (ca. 0.5 nJ), als zu jedem Zeitpunkt in jeder Verstärkungsstufe (ca. 20 nJ) gespeichert ist. Die Verstärkungsdynamik wird also während des Durchlaufs eines einzelnen Impulse nur geringfügig verändert.

Allerdings vernachlässigt diese Näherung das Auftreten von verstärkter spontaner Emission (ASE) und berücksichtigt auch die Signalintensität nicht. Die Intensitäten der vorwärts und rückwärts gerichteten ASE nimmt jeweils zu dem Ende der Faser zu und führt über Gleichung 2.25 direkt zu einer Abnahme der Population des angeregten Zustandes [157]. Für die im Experiment verwendeten Ytterbium³⁺-dotierten Fasern beträgt die intrinsische Sättigungsleistung bei der Pumpwellenlänge ca. 5.5 mW. Die im Experiment verwendete Pumpleistung von maximal 160 mW übersteigt diese damit deutlich. Man kann also von einer durch die ASE und das Signal begrenzten vollständigen Inversion entlang der Faser ausgehen. Diese beträgt nach Gleichung 2.27 aufgrund des geringen Emissionsquerschnittes von Ytterbium³⁺ bei 915 nm (vgl. Abbildung 2.3(b)) ca. 97 % [141].

Die Länge der aktiven Faser muss an die vorliegenden Lichtleistungen angepasst werden. Aufgrund des Dreiniveau-Charakters der Ytterbiumionen muss die Faserlänge so gewählt werden, dass an jedem Ort der Faser Besetzungsinversion vorliegt, da sonst das Signallicht reabsorbiert wird. Es ergibt sich eine optimale Länge, die die maximale Verstärkung für eine gegebene Pumpleistung bietet. Allerdings führt diese Länge nicht zwangsläufig zu dem niedrigsten Rauschen, welches durch die Verstärkung auftritt [157]. Im Experiment kann die optimale Faserlänge zur Verstärkung des Lichtes bei 975 nm mit Hilfe der ASE bestimmt werden: Bei einer festgelegten Pumpleistung wird das Emissionsspektrum der Faser gemessen. Zeigt die Faser starke Emission bei einer Wellenlänge größer als 975 nm, ist das ein Zeichen von Reabsorption des Signallichtes. Denn wird das Licht bei 975 nm absorbiert, erfolgt die Emission bei einer längeren Wellenlänge. Die Faser wird kontinuierlich gekürzt bis die Emission ausschließlich bei 975 nm auftritt.

Idealerweise erreicht das Signal eine Sättigung der Verstärkungsstufe, denn Schwankungen in der Eingangsleistung werden durch den nichtlinearen Sättigungseffekt abgemildert. Bei niedriger Seedleistung ist das Ausgangssignal linear proportional zur Eingangsleistung die Verstärkung also konstant. Ist die Seedleistung jedoch ausreichend hoch, wird eine Sättigung erreicht. Der Verstärker sollte an die vorhandene Seedleistung so angepasst werden, dass diese ausreicht den Verstärker zu sättigen. Die ASE wird durch die starke Konkurrenz der Signalverstärkung in diesem Fall verringert [157]. Dennoch verschlechtert jeder Verstärker das Signal-zu-Rauschverhältnis des zu verstärkenden Lichtes. Selbst eine gesättigte Verstärkerstufe führt zu einer Verschlechterung des Signal-zu-Rauschverhältnisses um einen Faktor 2 [157]. Die Verstärkung des Signals bei 975 nm wird theoretisch durch die ASE nach oben bei einem Wert von ungefähr 45 dB beschränkt, wenn der Verstärker bei 915 nm gepumpt wird [141]. Für eine Verstärkerstufe die hohe Ausgangsleistung liefern soll, ist das Pumpen entgegen der Signalausbreitungsrichtung optimal. Auf diese Weise wird die höchste Leistungskonversion vom Pumplicht zum Signallicht erreicht [157], weil dort am meisten Pumplicht zu Verfügung steht, wo das Signallicht auch am stärksten ist.

Kapitel 3

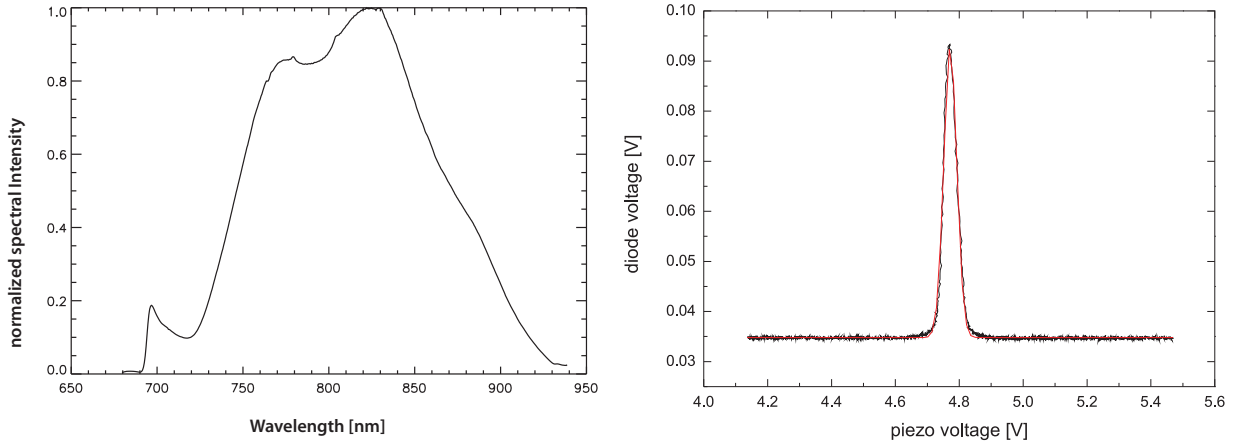
Beschreibung und Charakterisierung der MHz-Lichtquelle für die FSRM

Der hier beschriebene Aufbau der Lichtquelle für die FSRM wurde in weiten Teilen bereits veröffentlicht [60]. Die folgende Beschreibung ist jedoch umfassender und manche Entwicklungen gehen über den bis dato veröffentlichten Stand hinaus. Die Lichtquelle erzeugt einen spektral breitbandigen Lichtimpuls, und einen intensiven spektral schmalbandigen Lichtimpuls. Diese Impulse sind sowohl für die Femtosekunden-stimulierte Ramanspektroskopie maßgeschneidert als auch für die Mikroskopie von biologischen Proben geeignet. Die Lichtquelle besteht aus einem kommerziellen fs-Laser und einem selbstgebauten Yb^{3+} -Faserverstärker. Der fs-Impuls dient als Ramanprobeimpuls. Seine komprimierte Impulsdauer beträgt 8 fs und er reicht spektral von 650 nm bis 950 nm. Der Ramanpumpimpuls wird mit dem Faserverstärker erzeugt. Es wird dabei ein ps-Impuls erzeugt, der spektral ca. 2 nm schmal und bei ca. 978 nm positioniert ist. Zunächst wird der verwendete Titan:Saphir-Laser beschrieben und die Lichtimpulse charakterisiert. Dann wird der Aufbau der Faserverstärker im Detail beschrieben.

3.1 Impulscharakteristik und Aufbau des Oszillators

Bei dem Oszillator handelt es sich um einen Ti:Saphir-Laser der Firma Femtolasers (Fusion 300 BB) (Aufbau siehe Abb. 3.2). Die modengekoppelte Durchschnittsleistung liegt zwischen 400-450 mW. Die Impulsdauer ist laut Datenblatt <8 fs und wurde nach einer Luftstrecke von 1-2 m mit 15 fs gemessen (siehe Abb. 3.1(b)). Das Spektrum des fs-Lasers ist in 3.1(a) dargestellt. Die spektrale Breite des Spektrums beträgt ca. 120 nm (FWHM). Der Pumplaser, der in dem Oszillator Verwendung findet, ist ein diodengepumpter Festkörperlaser der Firma LaserQuantum (Finesse 4W). Es handelt sich um einen innerhalb des Resonators frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Laser. Die Wellenlänge liegt bei 532 nm. Die Ausgangsleistung des Pumplasers ist 4 W. Die Stabilität des Pumplasers ist im Datenblatt mit 0.1 % r.m.s angegeben [173].

Der Resonator enthält außer des Kristalles keine Materialien. Alle Spiegel innerhalb



(a) Normiertes Spektrum des Oszillators

(b) Autokorrelation des Oszillators. Die Messpunkte sind schwarz dargestellt in rot ist eine Anpassung einer Gaußskurve gezeigt. Die volle Halbwertsbreite der Gaußskurve beträgt 0.04791 V. Die Spannung entspricht über die Eichung des Piezotisches des Autokorrelators (431.4 fs/V) und dem Entfaltungsfaktor der Autokorrelation $\sqrt{2}$ einer Impulsdauer von 14.6 fs.

Abbildung 3.1: Charakterisierung des fs-Oszillators

des Resonators außer den beiden gekrümmten Spiegel vor und nach dem Kristall sind ge“chirped“. Mit Hilfe dieser Spiegel wird die Dispersion im Resonator genau eingestellt. Außerhalb des Resonators befindet sich eine Kompensationplatte mit der der räumliche Chirp, der durch den gekeilten Auskoppelspiegel eingeführt wird, kompensiert wird. Außerdem befinden sich dort noch zwei weitere “gechirpte“ Spiegel die den Impuls komprimieren, so dass er am Ausgang des Lasers seine kürzeste Dauer erreicht.

Das Modenkoppeln wird durch eine Kerrlinse im Titansaphirkristall bewerkstelligt. Dazu muss allerdings auch ein Spiegel (M1 in Abbildung 3.2) so verschoben werden, dass der Resonator den modengekoppelten Betrieb begünstigt. Genauer wird der Spiegel mit Hilfe einer Mikrometerschraube im Vergleich zu der Position mit der höchsten Dauerstrich-Durchschnittsleistung näher an den Kristall gebracht. Der Endspiegel (M3 in Abbildung 3.2) kann bewegt werden, um eine kurze Instabilität des Dauerstrichbetriebs einzuführen, in dem man den Spiegel leicht verschiebt. Das führt zum Modenkoppeln, wenn sich der Spiegel M1 (vgl. Abbildung 3.2) im geeigneten Abstand vom Kristall befindet. Man spricht auch von dem Stabilitätsbereich für das Modenkoppeln. Das Spektrum des Oszillators verbreitert sich zunehmend, wenn man den Spiegel M1 immer weiter zu dem Kristall bewegt. Dies kann benutzt werden, um die Seedleistung für den Verstärker zu erhöhen. Allerdings verlässt man bei zu weiter Verschiebung den Stabilitätsbereich, so dass die Laserleistung stark abnimmt (<300 mW) und auch kein modengekoppelter Betrieb mehr möglich ist.

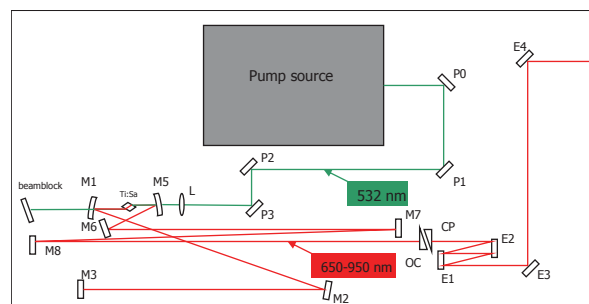


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des Femtolasers Fusion. M1- M7 Resonatorspiegel, OC Auskoppelspiegel, CP Kompensationsplatte für räumlichen Chirp, E1 und E2 gechirpte Spiegel außerhalb des Resonators, E3 und E4 Spiegel außerhalb des Resonators, L Linse, P0-P3 Spiegel für Pumplicht; (entnommen aus dem Benutzerhandbuch des SynergyTM-Oszillators der Femtolasers Produktions GmbH) ©2009 Femtolasers Produktions GmbH

3.2 Aufbau des Faserverstärkers

Der Faserverstärker im aktuellen Zustand ist Schritt für Schritt gewachsen. Die Idee einen faserbasierten Verstärker aufzubauen, geht auf Robert Huber und Thomas Klein von der LMU München zurück, die bereits Pläne für Yb^{3+} -basierte Faserverstärker in Zusammenhang mit ihrer Forschung an Fourier Domain mode-locked (FDML) Lasern gemacht hatten [174]. Allerdings verwendet der Verstärker hier den optischen Übergang bei 980 nm. Dieser Übergang hat im Gegensatz zu dem Übergang bei 1030 nm einen deutlicheren Drei-Niveaucharakter [141]. Auch handelt es sich um einen Verstärker für kurze Impulse, so dass nichtlineare Effekte in der Faser auftreten. Zunächst wurde der Verstärker mit einer einzelnen Stufe aufgebaut. Als sich herausstellte, dass die Ausgangsleistung einer einzelnen Stufe nicht ausreicht, um ein hinreichendes Ramansignal zu erzeugen, wurde der Aufbau zunächst um eine weitere Stufe erweitert [60]. Später wurden mehrere Methoden gefunden, um das Spektrum einzuengen. Im aktuellen Zustand resultiert daraus ein Doppelpass durch die erste Verstärkungsstufe. Der Aufbau soll im folgenden jedoch nicht historisch, sondern funktional beschrieben werden. Zunächst werden die Charakteristika des Seedlichtes aus dem Oszillator dargestellt. Dann die Untereinheiten des Vorverstärkers und des Leistungsverstärkers. Daraufhin wird das aktuelle Design des Verstärkers (Stand Sept. 12) dargestellt werden. Abschließend sollen noch ein paar Exkurse zu Effekten, die auf dem Weg auftraten (SPM und Gainnarrowing), und anderen Aufbaumöglichkeiten gegeben werden.

3.2.1 Angestrebte Impulscharakteristik des Ramanpumpimpulses

Der Faserverstärker erzeugt den Ramanpumpimpuls. Die Eigenschaften des Ramanpumpimpulses haben Einfluss auf Signalhöhe und spektrale Form des Ramansignals. Die Intensität ist direkt proportional zum Bandenintegral oder bei fester spektraler Breite zur Bandenhöhe des Ramansignals. Die Impulsenergie sollte also so hoch wie möglich sein. Die obere Schranke setzt hier die Photostabilität der Probe. Diese variiert nicht nur von Probe

zu Probe, sondern kann auch vom Kriterium, an der die Photoschädigung bemessen wird, abhängen. Deswegen kann die cw-Leistung $\approx 10 - 100$ mW betragen (vgl. hierzu Abschnitt 1.5.1). Da aus experimenteller Sicht das Abschwächen einfach ist, sollte eine Durchschnittsleistung von ca. 100 mW angestrebt werden.

Die spektrale Breite des Pumpimpulses geht in die spektrale Auflösung des Aufbaus ein, da die spektrale Breite des Ramansignals sich aus der Faltung der natürlichen Breite der Ramanbande und der Breite des Pumpimpulses ergibt. In diesem Fall begrenzt die spektrale Breite des Impulses sogar das Auflösungsvermögen des Experiments. Idealerweise ist der Ramanpumpimpuls spektral so breit wie die Ramanbande. Typische Ramanbanden in Lösung oder biologischen Proben betragen $1 - 10 \text{ cm}^{-1}$ [129]. Die angestrebte Breite beträgt jedoch $\approx 10 \text{ cm}^{-1}$. Diese spektrale Breite passt zum Auflösungsvermögen des Spektrographen.

3.2.2 Charakteristik des Eingangssignals des Verstärkers

Der Ramanpumpimpuls wird durch Verstärkung des nahinfraroten Flügels des Oszillatorpektrums um 980 nm gewonnen. Dieser Flügel wird durch einen Strahlteiler oder durch eine als Strahlteiler fungierende Optik von dem fs-Impuls des Oszillators abgeteilt. Der zu verstärkende Impuls wird auch "Seedimpuls" genannt. Das Spektrum und die Leistung des Seedimpulses hängen sowohl von dem Strahlteiler als auch von dem Spektrum und der Leistung des Oszillators ab. Es wurden zwei unterschiedliche Strahlteiler eingesetzt: Ein Langpassfilter mit der Kante bei ca. 925 nm (943DRLP von Omega Optical) und ein breitbandiger, dielektrischer Spiegel (Layertec, # 107581). Der Layertec-Spiegel hat sich bewährt, da er den größten Teil des Oszillatorspektrums bis weit ins Nahinfrarote zu einem hohen Prozentsatz (>90 % bis über 950 nm). reflektiert und trotzdem bei ca. 980 nm eine hohe Transmission aufweist (siehe Anhang D). Die Flanke ist dabei steiler als es bei kommerziell erhältlichen Kantenfilter z.B. dem Omega Optical-Strahlteiler der Fall ist. Wie bei jedem dielektrischen Spiegel lässt sich das reflektierte resp. transmittierte Spektrum durch Verkippen um wenige Nanometer verschieben. Das kann benutzt werden um das Seed-Spektrum zu optimieren. Das vom Layertec-Spiegel transmittierte Licht hat eine Leistung von ca. 2 mW, aber nur ein kleiner Teil davon liegt im spektralen Bereich zwischen 970 und 990 nm.

Um die Yb-dotierte Faser als Verstärkungsmedium zu benutzen, muss das Seed-Licht in eine Einzelmodenfaser eingekoppelt werden. Theoretisch sollte das Licht beinahe vollständig in die Faser eingebracht werden können [159], praktisch gilt ein Wert um die 80 % als erreichbar. Das Licht wird mit Hilfe einer Asphäre (Thorlabs, CFC-11-B-APC) auf das Faserende fokussiert. Jedoch ist die Asphäre nicht chromatisch korrigiert, deswegen kann immer nur ein Bereich des Spektrums des Seed-Lichtes in die Faser eingekoppelt werden. Es erweist sich also als schwierig die genaue Prozentzahl des eingekoppelten Lichtes zu bestimmen. Es hat sich als nützlich erwiesen, die Einkopplung anhand der Leistung nach dem WDM (Wavelength Division Multiplexer, siehe Abbildung 3.8) zu optimieren. Der WDM schneidet aus dem Seed-Licht den relevanten spektralen Bereich aus. Das Spektrum

nach dem WDM ist je nach Konfiguration der vorhergehenden Komponenten 12 bis 18 Nanometer breit und bei ca. 980 nm zentriert. Die Leistung an dieser Stelle beträgt zwischen 100 und 200 μW . Die große Variation des Wertes liegt an den vielen Faktoren, die diesen beeinflussen. Besonders wichtig ist hier die Justage des Oszillators. Mit Hilfe des sogenannten Stabilitätsbereich (siehe Abschnitt 3.1) lässt sich die Leistung im Verstärkungsbereich maximieren. Allerdings kann die Leistung bei schlechter Oszillatoreinstellung ebenso stark sinken. Desweiteren spielt der Einfallswinkel auf den Layertecspiegel und die empfindliche Justage der Einkopplung selbst eine Rolle. In der veröffentlichten Arbeit [60] wurde eine Leistung von 42 μW in dem Bereich zwischen 975 und 990 Nanometer angegeben. Die Abhängigkeit der Impulsstärke von der Seedleistung an dieser Stelle wird später dargestellt (siehe Abb. 3.9(b)). Es zeigt sich, dass eine Seedleistung von über 100 μW ausreicht, um den Verstärker nahe der Sättigung zu betreiben.

3.2.3 Aufbau des Verstärkers in mehreren Stufen

Der Verstärker ist in seiner momentanen Erscheinung (Stand: 12.03.13) in mehrerem Verstärkungsstufen aufgebaut (siehe Abschnitt 3.3). Die Stufen haben Gemeinsamkeiten in ihrem Aufbau (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Die unterschiedliche Funktionalität aufgrund der unterschiedlichen Impulsparameter in den Stufen soll in den folgenden Abschnitten gezeigt werden.

3.2.4 Einzelpass-Vorverstärker

Für den Einzelpass-Vorverstärker wird, wenn nicht anders angemerkt, wie im restlichen Aufbau die passive Einzelmodenfaser des Typs Hi1060 der Firma Corning verwendet. Die erste Komponente des Aufbaus ist ein Isolator (OFR, type IO-F-980APC). Der Vorverstärker muss mit dem optischen Isolator vom Oszillator getrennt sein. Sonst wird die rückwärts gerichtete ASE vom Auskoppelspiegel des Lasers in die Vorwärtsrichtung reflektiert. Im zweiten Durchlauf wird diese wieder verstärkt. Sie trägt damit erheblich zum ASE-Untergrund bei (siehe Abbildung 3.3(a)).

Darauf folgt ein WDM, (Optolink, WDM-T-12-917-90-FA) welcher das Licht der Pumpdiode (Axcel Photonics, type BF-915-0200-P5A) und das Signallicht aus dem Oszillator in einer gemeinsamen Faser ("common") überlagert. Die aktive Ytterbiumfaser (Liekki, type Yb1200-4/125) schließt direkt an die Commonfaser an. Die aktive Faser selbst ist ca. 5 cm lang. Durch einen weiteren WDM wird das Pumplicht wieder vom Signallicht separiert. Die Pumpdioden erreichen je nach Seriennummer eine maximale Leistung von 200-220 mW, wenn der Diodenstrom 340 mA beträgt. Die zentrale Wellenlänge des Pumplichtes ist ca. 917 nm, bei einer spektralen Breite von ungefähr 0.04 nm (siehe Testreport [175]). Bei den typischen Eingangsleistungen (siehe Abschnitt 3.2.2) beträgt die gesamte Ausgangsleistung der ersten Stufe 20-30 mW (inklusive ASE). Wobei die Stufe über die Zeit kontinuierlich schwächer wurde (32 mW am 9.7.09 bei 220 mW Pumpleistung, 22.2 mW am 2.3.10 bei 189 mW Pumpleistung). Womöglich altern die Komponenten wie Pumpdiode oder aktive Faser. Durch abschnittsweise Integration des Zeitverlaufs (siehe Abbildung

3.3(b)) des Ausgangssignals des Verstärkers kann man den Anteil des gepulsten Lichtes an der Ausgangsleistung abschätzen. Das Verhältnis der Fläche unter dem Peak zu dem ungepulsten Teils einer Periodendauer des Oszillators beträgt 1.7 zu 1. Bei einer Gesamtleistung von 30.1 mW sind 63 %, also 19 mW gepulst.

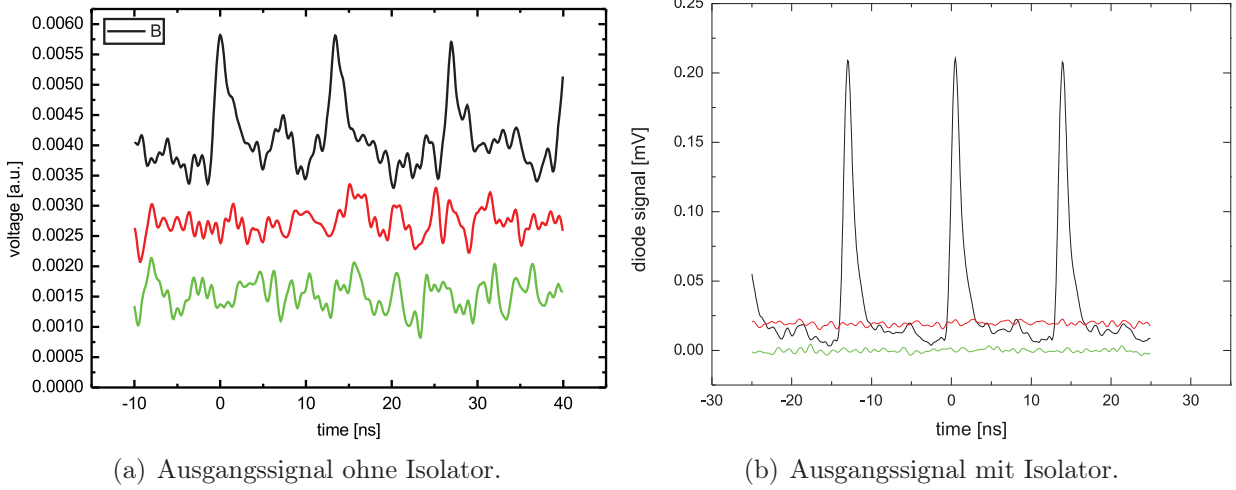


Abbildung 3.3: Vergleich des zeitlichen Verlaufes des Ausgangssignals der ersten Verstärkerstufe ohne und mit Isolator. Wenn ein gepulstes Eingangssignal in den Verstärker gesandt wird, ist auch das Ausgangssignal gepulst (schwarze Linie). Allerdings steigt in diesem Fall ohne Isolator auch der ASE-Untergrund im Vergleich zu einer Verstärkerstufe, bei der der Eingang geblockt wurde (rote Linie). Die grüne Linie stellt den Dunkelstrom der Photodiode dar. Die gemessene Impulsdauer wird durch die Anstiegszeit der Diode verursacht.

Mit Hilfe eines Wire-Grid-Polarisators wurde der Polarisationszustand analysiert. Das Verhältnis von p- zu s-Polarisation¹ betrug 5,9, wobei in der p-Polarisation 23.2 mW gemessen wurden, in der s-Polarisation 3,9 mW. Vor dem Polarisator wurden 31.6 mW gemessen. Die Differenz zwischen der Gesamtleistung nach dem Polarisator und der Leistung vor dem Polarisator entspricht einem generellen Reflexionsverlust an dem Polarisator. Die ASE zeigte ein Verhältnis von p- zu s- Polarisation von 0.9, ist also weitestgehend unpolarisiert. Nimmt man an, dass nur die ASE in die s-Polarisation emittiert wird, folgt eine ASE-Leistung von 9.1 mW, das entspricht einem Wert von 29 % und ist damit stimmig mit dem aus der Diodenspur ermittelten Anteil von gepulsten zu ungepulsten Licht. Das bedeutet auch, dass die Polarisation des gepulsten Lichts im wesentlichen linear ist.

Eine Autokorrelation des Pulses ergab eine Pulslänge von 1 ps. Die spektrale Breite betrug 5.6 nm, das entspricht 58 cm^{-1} . Die höchste Intensität wurde bei 983 nm registriert². Das Zeit- und Frequenzbandbreitenprodukt beträgt mit diesen Werten $1.8 = 4 \times 0.441$ (vgl.

¹p-Polarisation bedeutet, dass die Polarisation parallel zur optischen Ebene, das ist in dem Aufbau die Ebene des optischen Tisches, ausgerichtet ist, s-Polarisation bedeutet, dass diese senkrecht zu dieser Ebene ausgerichtet ist.

²Im Vergleich zu späteren Messungen scheint hier die Wellenlänge zu hoch.

Abschnitt 2.1.3). Der Impuls ist also nicht durch die spektrale Bandbreite begrenzt, sondern durch Dispersion zeitlich verbreitert.

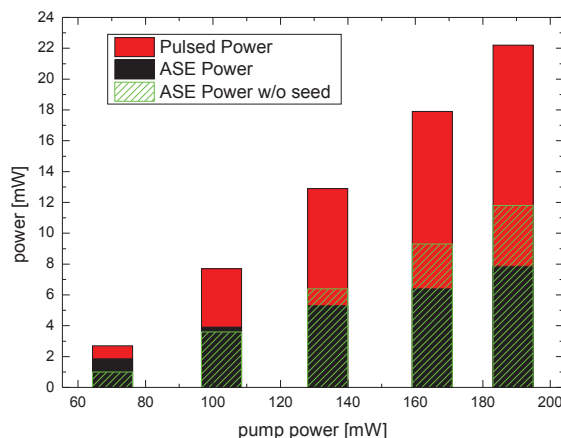


Abbildung 3.4: Ausgangsleistung der ersten Verstärkerstufe in Abhängigkeit der Pumpleistung. Die gesamte Ausgangsleistung setzt sich aus der Leistung des gepulsten Lichtes (rot) und der Leistung des ungepulsten ASE-Untergrunds (schwarz) zusammen. Zum Vergleich ist auch die ASE Leistung ohne Signallicht dargestellt (grün straffiert).

Die Ausgangsleistungen der Verstärkerstufe wurde in Abhängigkeit der Pumpleistung gemessen (siehe Abb.3.4). Die Gesamtausgangsleistung steigt linear mit der Pumpleistung. Der Schwellwert der Pumpleistung für die Transparenz der Faser ist ≈ 55 mW. Wird das Eingangssignal geblockt, wird ausschließlich ASE emittiert. Auch das Signal der ASE steigt linear mit der Pumpleistung die Steigung ist jedoch flacher und der Schwellwert der Pumpleistung für das Auftreten der ASE liegt etwas höher bei 61.1 mW.

Gleichzeitig wurde mit Hilfe einer Photodiode der Impulszug des Verstärkers gemessen, um den Anteil des gepulsten Lichtes am Ausgangssignal zu bestimmen. Der Anteil steigt von anfänglichen 31 Prozent für die niedrigste Pumpleistung bis zu ca. 65 Prozent für die höchste Pumpleistung an. Man erwartet das die ASE Leistung durch die Anwesenheit des Signallichtes herabgesetzt wird, da die Signalverstärkung in Konkurrenz zu der Verstärkung der spontanen Emission steht. Für hohe Pumpleistung bestätigt sich die Erwartung. Für niedrige Pumpleistung ist die ASE trotz Signal höher als ohne eingestrahktes Seedlicht. Die Faserlänge ist für diese Pumpleistungen nicht ideal, deswegen findet eine Reabsorption des gepulsten Lichtes am Ende der Faser statt. Zudem begünstigt dies dann wieder das Auftreten von ASE mit einer Wellenlänge, die über der Wellenlänge des Signals liegt.

3.2.5 Doppelpass-Vorverstärker

Die freie Bandbreite des Yb^{3+} -Übergangs und des Seeds sind spektral breiter als die für die stimulierte Ramanstreuung gewünschten 10 cm^{-1} . Faser-Braggitter ermöglichen eine

faserbasierte spektrale Einengung des Verstärkers. Sie benötigen jedoch einen so genannten “Zirkulator”³, um das reflektierte spektral schmalbandige Licht zu nutzen. Ein besonders kompakter und effizienter Aufbau gelingt, wenn man den Zirkulator gleich nach der Einkopplung positioniert und durch ihn den Isolator ersetzt. Die aktive Faser der ersten Stufe wird dann zweimal durchlaufen (siehe Abb. 3.8). Die Ausgangsleistung des Doppelpassvorverstärkers beträgt maximal 40.6 mW bei einer Pumpleistung von 189 mW. Allerdings eignet sich diese hohe Leistung nicht als Seed für den Leistungsverstärker. Die weitere Verstärkung führt zu Selbstphasenmodulation (SPM) des Impulses. Dadurch wird sowohl das Spektrum als auch die zeitliche Struktur des Impulses unbrauchbar (siehe auch Abb. 3.9(a)). Auch kann eine zu hohe Eingangsleistung den Verstärker in ein ungünstiges Verstärkungsregime, das sogenannte “deep saturation regime“ führen. Der Verstärker wird in diesem Regime sehr instabil [157]. Deswegen wurde zunächst der Diodenstrom der ersten Stufe auf einen Wert reduziert, der bei maximalen Diodenleistung der zweiten Stufe noch keine SPM zeigt. Dieser Wert lag bei 178 mA oder einer Lichtleistung der Pumpdiode von 54 mW. Dieser Wert ist sehr nahe an dem Schwellwert an dem die Transparenz der Faser für das Signal einsetzt. Die Verstärkung ist in diesem Bereich deutlich nichtlinear in Abhängigkeit von der Pumpleistung (vgl. Abb. 3.5). Der gesamte Verstärker einschließlich der Leistungsverstärkungsstufe erreicht bei dieser Konfiguration eine Ausgangsleistung von 64 mW (Für genauere Analyse des gesamten Verstärkers mit Doppelpass-Vorverstärker siehe Abschnitt 3.3). Das eingesetzte FBG ist bei 977.9 nm zentriert und besitzt eine nominelle Breite von 1,8 nm. Das Spektrum des Impulses wurde jedoch mit einer Breite von 2.1 nm gemessen. Die Impulslänge wurde mit einem Wert von 940 fs gemessen.

Für die reduzierte Pumpleistung ist die Faserlänge nicht mehr ideal. Die Faserlänge wurde ja an die volle Pumpleistung von ca. 190 mW angepasst. Es folgt zwangsläufig, dass ein Teil des Signals reabsorbiert wird. Deswegen wurde eine zweite kürzere Faser (ca. 3 cm) gefertigt (siehe Abb. 3.5). Die kürzere Stufe wird bei niedrigerer Pumpleistung (ca. 40 mW) transparent für das Signal und die Ausgangsleistung der kurzen Stufe liegt bis zu einer Pumpleistung von ca. 80 mW über der Ausgangsleistung der langen Stufe (siehe Abb. 3.5). Gleichzeitig ist die ASE ohne Eingangssignal in der kurzen Stufe stark reduziert (siehe Abb. 3.5). Die ASE ist eine Rauschquelle des Verstärkers. Die kurze Verstärkerstufe sollte also deutlich rauschärmer sein. Bei einer Pumpleistung von 70 mW für die erste Stufe in der kurzen Ausführung (3 cm) wurde eine Gesamtausgangsleistung des Verstärkers (einschließlich Leistungsverstärker) von 56 mW erzielt.

3.2.6 Leistungsverstärker

Die letzte Verstärkerstufe fungiert als “Leistungsverstärker“. Diese Verstärkerstufe ist genauso wie die Vorverstärkerstufe 5 cm lang und verwendet auch sonst die gleichen Komponenten wie diese (siehe Abschnitt 3.2.4). Das Pumplicht wird über einen WDM in Si-

³Ein Zirkulator ist eine faseroptische Komponente, mit drei Faserzugängen sogenannten “ports“. Das Licht kann diese Komponente nur in einer festen Richtung durchlaufen. Nämlich von dem ersten “port“ zu dem zweiten “port“ und von dem zweiten “port“ zu dem dritten “port“. In alle anderen Richtungen wirkt der Zirkulator wie ein Isolator. Im Experiment wurde ein Zirkulator der Firma AC Photonics eingesetzt.

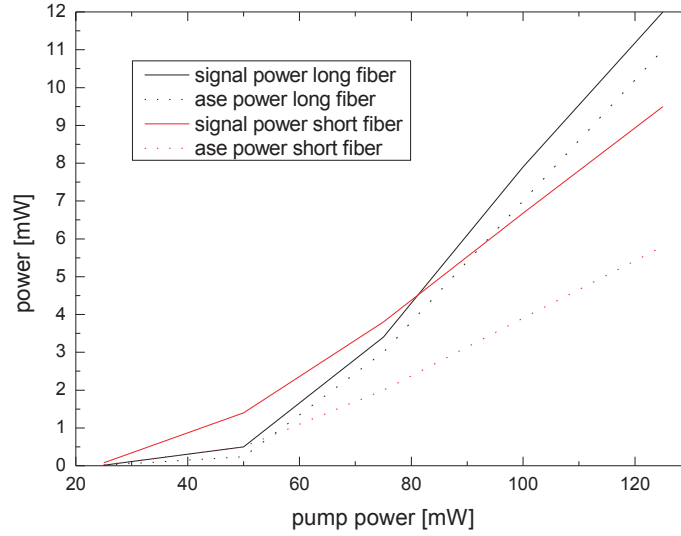


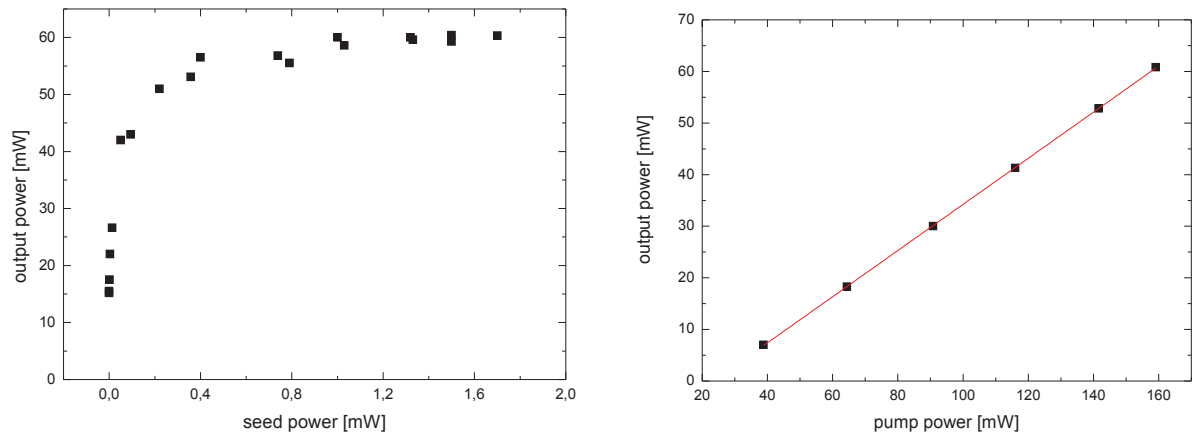
Abbildung 3.5: Vergleich der Ausgangsleistung der ersten Stufe als Doppelpass mit unterschiedlichen Faserlängen. Die lange Faser (5 cm, schwarz) zeigt bei niedrigen Pumpleistungen ein geringeres Ausgangssignal als die kurze Faser (3 cm, rot). Die dargestellte ASE-Leistung ist die Ausgangsleistung der Verstärkerstufe bei geblocktem Signallicht.

gnalausbreitungsrichtung eingekoppelt. Wegen der hohen Spitzenleistung am Ausgang des Verstärkers besteht die Gefahr den Laserimpuls durch SPM zu verbreitern. Um diesen Effekt zu minimieren, wird das Licht direkt aus der aktiven Faser ausgekoppelt und mit einem Mikroskopobjektiv kollimiert. Die charakteristische nichtlineare Länge, wie in Abschnitt 2.2.3 definiert, ist direkt proportional zur Modenfläche des Lichtes in der Faser. Deswegen ist bei Verlassen der Faser das Auftreten von SPM quasi ausgeschlossen. Dieser Aufbau verhindert allerdings das Pumpen entgegen der Ausbreitungsrichtung mit den fasergekoppelten Pumpdioden. Experimente zeigen das, dass rückwärtig gerichtete Pumpen effizienter ist [157].

Im Gegensatz zu dem Vorverstärker wird in der Endstufe eine Sättigung durch das Eingangssignal erreicht (siehe Abbildung 3.6(a)). Schon bei einer Eingangsleistung von 0.8 mW wird mit einer Pumpleistung von 160 mW eine Ausgangsleistung von über 55 mW erreicht. Diese Leistung wird sowohl von dem Einzelpass-Vorverstärker als auch von dem Doppelpass-Vorverstärker leicht erreicht (siehe Abb. 3.4 und 3.5). Für sehr hohe Eingangsleistung steigt die Ausgangsleistung der letzten Stufe wieder (Messdaten nicht gezeigt). Hier kommt der Verstärker in das ungünstige, tief gesättigte Regime [157]. Die maximale Ausgangsleistung im gesättigten Regime beträgt dabei 60 mW bei einer Pumpleistung von 160 mW. Die Verstärkerstufe wird bei einer Pumpleistung von 28 mW transparent für das Signal (siehe Abbildung 3.6(b)).

Das ASE-Spektrum ist spektral schmaler als das Eingangsspektrum und bei 977.15 (977.3) nm⁴ zentriert. Für die Kombination der spezifischen Pumpleistung mit der spe-

⁴Der in Klammern angegebene Wert wurde nicht mit dem Spektrometer des Experimentes,



(a) Ausgangsleistung des Leistungsverstärkers in Abhängigkeit des Eingangssignals (b) Ausgangsleistung des Leistungsverstärkers in Abhängigkeit der Pumpleistung (schwarze Quadrate). In rot ist eine lineare Anpassung an die Messpunkte dargestellt.

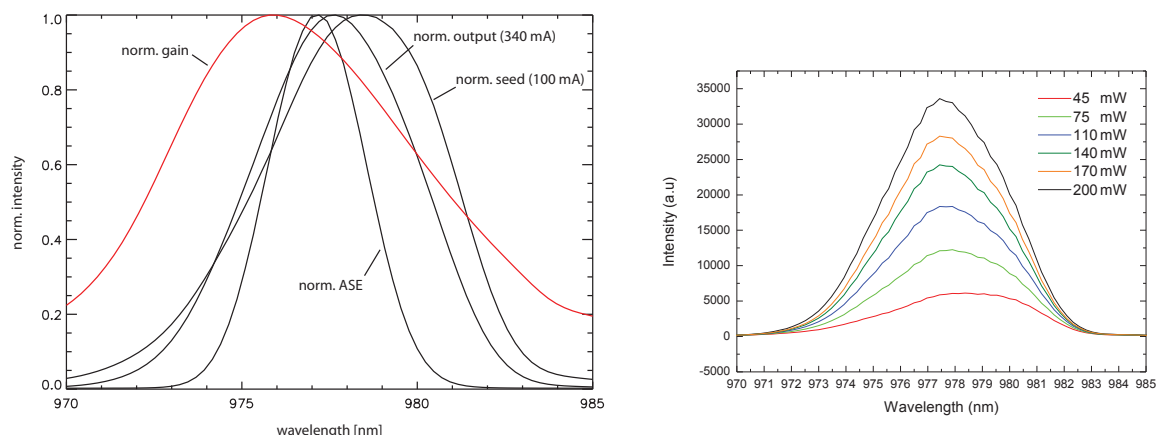
Abbildung 3.6: Leistungscharakteristik des Leistungsverstärkers

zifischen Faserlänge erfährt diese Wellenlänge effektiv die höchste Verstärkung aus der spontanen Emission. Wird jedoch Seedlicht zu Verfügung gestellt, kann sich die für die Verstärkung optimale Wellenlänge verschieben.

Das Ausgangsspektrum des Leistungsverstärkers hängt vom Eingangsspektrum und dem Verstärkungsspektrum der Faser ab. Das Eingangsspektrum wurde ermittelt, in dem der Diodenstrom der Pumpdiode der zweiten Stufe auf 100 mA reduziert wurde. Das entspricht laut Datenblatt einer Leistung von ca. 55 mW. Der Wert entspricht in etwa dem Schwellwert für die Transparenz der Stufe (siehe Abschnitt 3.2.4). Das gemessene Eingangsspektrum ist demnach schon leicht verstärkt und kann durch die Emissions und Absorptionscharakteristik der zweiten Stufe schon verändert sein. Die Zentralwellenlänge dieses Eingangsspektrum liegt bei 978.4 (978.55) nm. Das Ausgangsspektrum wird durch die Verstärkung blau verschoben und spektral schmaler. Das spektrale Einengen des Spektrums durch die Verstärkung wird auch “Gain Narrowing” genannt. Aus den Spektren kann man ein Verstärkungsspektrum ermitteln.

Dieses zeigt, dass die Verstärkung bei 975.8 (975.95) nm maximal ist (Die veröffentlichten Emissionsquerschnitte zeigen ein Maximum bei 975 nm [141]). Ein Eingangssignal mit einer kürzeren Wellenlänge als die momentane würde also eine größere Verstärkung als das aktuelle Eingangssignal erfahren. Das Spektrum des Oszillators sowie eine Reihe optischer Komponenten wie der Strahlteiler, die einkoppelnde Linse und die WDMs selektieren das aktuelle Eingangsspektrum (siehe Abschnitt 3.2.2). Die maximale Ausgangsleistung ist durch die Seed- und die Pumpleistung der zweiten Stufe begrenzt. Der Sättigungswert der Stufe steigt mit beiden Werten an. Im Experiment wird die Seedleistung jedoch ab-

sondern mit einem zusätzlichen “optical spectrum analyzer” (OSA) gemessen



(a) Verstärkungsspektrum der Yb^{3+} -Faser (rot). Es entspricht dem Verhältnis des Ausgangsspektrums bei vollem Pumpstrom (340 mA entspricht einer Pumpleistung von ca. 200 mW) zu dem Ausgangsspektrum bei niedrigem Pumpstrom (100 mA entspricht einer Pumpleistung von ca. 55 mW)). Zum Vergleich ist auch das normierte ASE-Spektrum der Faser dargestellt.

(b) Ausgangsspektrum des Leistungsverstärkers in Abhängigkeit der Pumpleistung

Abbildung 3.7: Spektrale Charakterisierung des Yb^{3+} -Verstärkers

sichtlich begrenzt, da das Eintreten von Selbstphasenmodulation als obere Schranke für die Ausgangsleistung auftritt (siehe Abbildung 3.9(a)).

3.3 Aktueller Aufbau des Faserverstärkers

Der aktuelle Aufbau verwendet den Doppelpass-Vorverstärker wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben und den darauf folgenden Leistungsverstärker wie in Abschnitt 3.2.6 dargestellt (siehe Abb. 3.8). Nach der letzten Stufe verlässt das Licht die Faser und wird mit einem Mikroskopobjektiv (Zeiss 10 $\times$; NA 0,22; AR 1,06) kollimiert. Darauf folgt ein Langpassfilter, der das restliche Pumplicht blockt, und eine Halbwellenverzögerungsplatte, um die Polarisationsrichtung des Pumpimpulses an die des Probeimpulses anzupassen.

Wie in Abschnitt 3.2.5 erläutert, erreicht der Vorverstärker als Doppelpassaufbau bei hoher Pumpleistung so hohe Ausgangsleistungen, dass die zweite Stufe durch diese schon tief gesättigt wird und das Spektrum durch SPM stark verändert wird (vgl. Abb. 3.9(a)). Deswegen wird momentan der Pumpstrom der ersten Stufe stark reduziert, so dass die Ausgangsleistung der ersten Stufe nur wenige mW beträgt. Dabei ist entscheidend, dass das Ausgangsspektrum des gesamten Verstärkers keine Veränderung durch SPM aufweist. Die Pumpleistung der ersten Stufe beträgt dann ungefähr 50-60 mW. Die Ausgangsleistung der ersten Stufe genügt dann, um den Leistungsverstärker zu sättigen (vgl. Abb. 3.6(a)). Die Pumpleistung der zweiten Stufe beträgt aktuell ca. 160 mW. Die Gesamtausgangsleistung

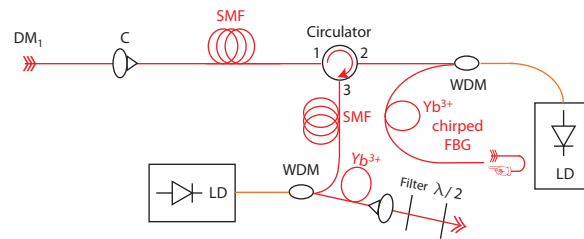
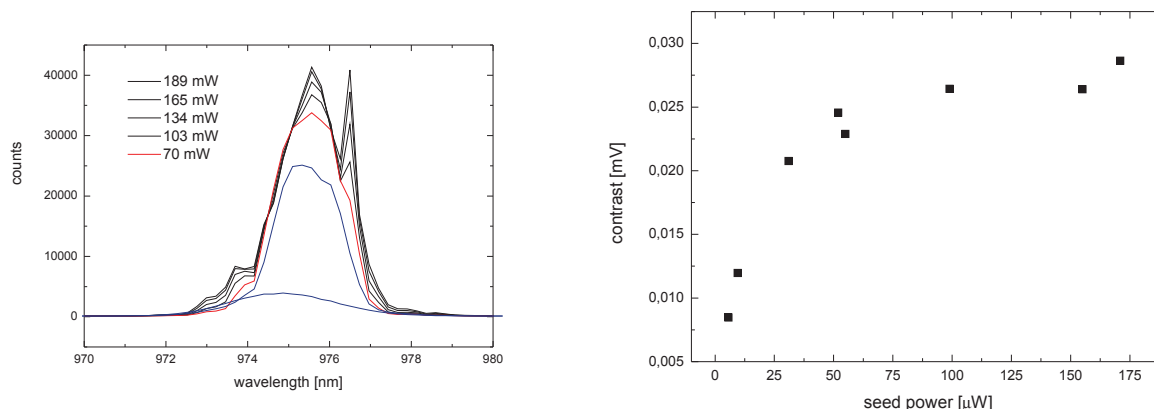


Abbildung 3.8: Schema des aktuellen Aufbau des Faserverstärkers. DM: dichroischer Spiegel; C: fokussierende Linse; SMF: Einzelmodesfaser; WDM: wavelength division multiplexer; Yb^{3+} : Ytterbium³⁺ dotierte Faser; FBG: Faser-Bragggritter; LD: Laserdiode; $\lambda/2$: Halbwellenverzögerungsplatte

stung des Verstärkers liegt zwischen 50-60 mW. Wenn man annimmt, dass das Verhältnis von gepulstem zu ungepulstem Licht in der Ausgangsleistung des gesamten Verstärkers dem Verhältnis beider nach der ersten Verstärkerstufe (siehe Abschnitt 3.2.4) entspricht, dann folgt eine gepulste Lichtleistung von 35-42 mW. Die Breite des gemessenen Ausgangsspektrums beträgt 2,1 nm. Ist also etwas breiter als die nominelle Breite des FBGs von 1,8 nm. Die Autokorrelation ergab eine Impulsdauer von 940 fs. Das Frequenz-Zeit-Bandbreitenprodukt ist mit diesen Werten $0,62 = 1,4 \times 0,441$. Die Impulse sind also annähernd bandbreitenbegrenzt. Die Auswertung der Kreuzkorrelation zwischen dem im Faserverstärker erzeugten Ramanpumpimpuls und dem Ramanprobeimpuls zeigte jedoch einen längeren zeitlichen Flügel (siehe Abb. 7.4 und Diskussion in Abschnitt 8.4.1).

Die reine ASE-Leistung des Verstärkers entspricht der Ausgangsleistung des Verstärkers mit Eingangssignal. Den Einfluss der Leistung des Eingangssignals auf das Ausgangssignal kann anhand dem Zeitverlauf des Signals abgelesen werden. Wenn das Eingangssignal vollständig geblockt ist, erscheint das Ausgangssignal ungepulst. Je mehr gepulstes Licht als Eingangssignal zur Verfügung gestellt wird, umso stärker erscheint der gepulste Charakter des Ausgangssignals. Um den Impulscharakter des Lichtes nachzuweisen, wurde das Ausgangssignal des Verstärkers mit einer schnellen Photodiode (Thorlabs Det10A/M) gemessen. Die Differenz des Maximums zu dem Minimum im Photostrom ist ein Maß für den Anteil des gepulsten Lichtes an dem Ausgangssignal. Das stimulierte Ramansignal ist direkt proportional zu diesem Kontrast. Ab einer Eingangsleistung⁵ von ca. $100 \mu\text{W}$ erreicht der Verstärker bei den oben genannten Einstellungen eine Sättigung (vgl. Abb. 3.9(b)). Die Eingangsleistung des Faserverstärkers hängt stark von der "Tagesform" des Oszillators ab. Deswegen ist dieser Schwellwert als Kriterium für eine geeignete Eingangsleistung im Experiment wichtig.

⁵Gemessen nach dem WDM, vor der Yb^{3+} -Faser



(a) Ausgangsspektrum des gesamten Verstärkers in Abhängigkeit der Pumpleistung der ersten Verstärkerstufe. In der Regel wird die Pumpleistung auf ca. 70 mW (rote Linie) eingestellt.

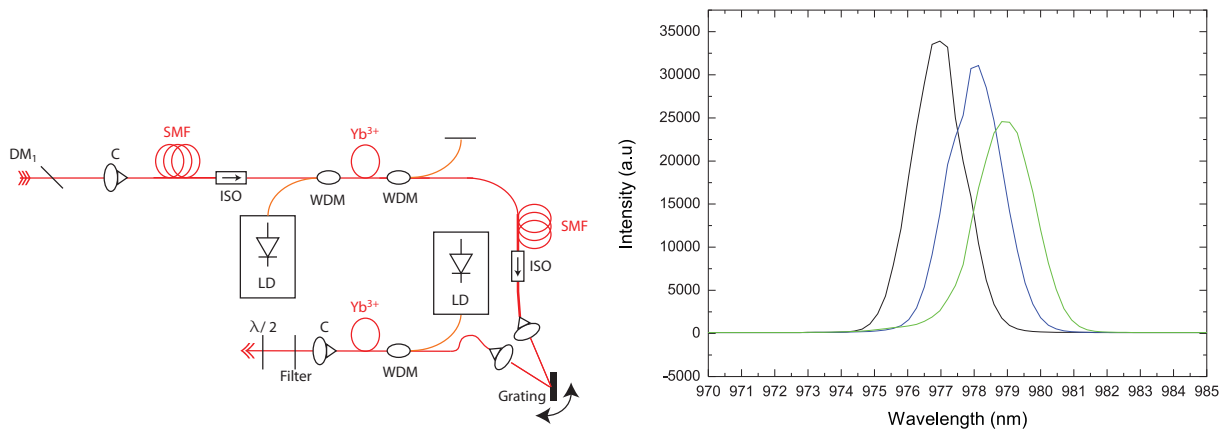
(b) Differenz zwischen Minimum und Maximum des Ausgangssignals des gesamten Verstärkers in Abhängigkeit des Eingangssignals des gesamten Verstärkers.

Abbildung 3.9: Ausgangsspektrum und Kontrast des Ausgangssignals des gesamten Verstärkers im aktuellen Zustand.

3.3.1 Aufbau mit einem Reflexionsgitter zur spektralen Einengung

An Stelle des Faser-Bragggitters kann auch ein Reflexionsgitter zur spektralen Einengung des Pumpimpulses eingesetzt werden. Im Experiment wurde dies realisiert, in dem das Licht nach der ersten Verstärkerstufe mit einer GRIN-Linse aus der Faser ausgekoppelt wurde. Das kollimierte Licht wurde direkt auf ein Reflexionsgitter⁶ (1200 Linien/mm; “blaze“ bei 1 μm) gesandt. Das in erster Ordnung gebeugte Licht wurde mit einer zweiten GRIN-Linse wieder in eine Faser eingebracht und in der folgenden Stufe weiterverstärkt (vgl. Abb. 3.10(a)). Durch die Beugung am Gitter wird das Licht spektral aufgespalten. Deswegen fällt nur ein Anteil des Spektrums auf die zweite GRIN-Linse und wird wieder in die Faser fokussiert. Durch die Neigung des Gitters in der Einfallsebene des Lichtes kann der Wellenlängenbereich, der auf die einsammelnde Linse gelenkt wird, ausgewählt werden. Damit kann der zur Verstärkung optimale Spektralbereich ausgewählt werden. Die Breite des Ausgangsspektrums betrug daraufhin 1,8 nm. Die Autokorrelation ergab eine Impulsdauer von ca. 800 fs. Damit liegt das Frequenz-Bandbreiteprodukt bei ca. 0,43. Es ist also bandbreitenbegrenzt, wenn man Gaussimpulse annimmt. Die Durchschnittsleistung betrug 42-53 mW mit einem gepulsten Anteil von 64% (oder absolut 27-34 mW). Mit diesen Parametern wurden die höchsten Signalthöhen bei Ramanspektren reiner Substanzen gemessen (siehe Abb. 7.1).

⁶Zur allgemeinen Information zu Beugungsgittern siehe z.B. Ref. [176]



(a) Schema des Aufbaus mit einem Reflexionsgitter zur spektralen Einengung. iso: optischer Isolator; grating: Reflexionsgitter; sonst Bezeichnungen wie in Abbildung 3.8.

(b) Ausgangsspektrum des Faserverstärkers mit Reflexionsgitter für drei verschiedene Gittereinstellungen. Durch Änderung des Einfallswinkel auf das Gitter kann die ausgewählte Wellenlänge variiert werden.

Abbildung 3.10: Schema und Ausgangsspektrum des Verstärkeraufbaus mit Reflexionsgitter zur spektralen Einengung.

Kapitel 4

Grundlagen der Femtosekunden Stimulierten Ramanmikroskopie

4.1 Nichtlineare Optik

Der stimulierte Ramaneffekt ist ein nichtlinearer optischer Effekt. Das bedeutet, dass die Antwort des Mediums nichtlinear mit dem einfallenden elektrischen Feld $\vec{E}$ skaliert. In der *linearen* Optik gilt für die makroskopische Polarisation $\vec{P}$ des Mediums [95]:

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi_{lin} \vec{E} \quad (4.1)$$

χ_{lin} ist die lineare Suszeptibilität des Mediums. Dieser Ausdruck gilt nur bei niedrigen Feldstärken des elektrischen Feldes. Bei höheren Feldstärken¹, im Bereich der nichtlinearen Optik, müssen auch die höheren Terme berücksichtigt werden. Für die makroskopische Polarisation folgt [95]:

$$\vec{P} = \epsilon_0 (\chi_{lin} \vec{E} + \chi_2 \vec{E} \vec{E} + \chi_3 \vec{E} \vec{E} \vec{E} + \dots) \quad (4.2)$$

Der dritte Term in Gleichung 4.2 umfasst 81 Terme, da die drei Vektoren des elektrischen Feldes $\vec{E}$ über den Tensor der nichtlinearen Suszeptibilität dritter Ordnung χ_3 mit dem Vektor der Polarisation des Mediums² verknüpft werden. Viele der Terme sind bei einem isotropen Medium aus Symmetriegründen redundant. So lässt sich der Tensorcharakter von χ_3 in diesem Fall mit nur drei unabhängigen Einträgen beschreiben [95]. Betrachtet man nur parallel linear polarisiertes Licht in einer Ebene genügt ein Tensorelement. Dieses beschreibt über die Frequenzabhängigkeit der Polarisation einige nichtlineare optische Effekte.

¹Man kann abschätzen, dass die nichtlinearen Terme eine Rolle spielen, wenn die optischen Feldstärken mit der elektrostatischen Feldstärke im Atom vergleichbar sind. Diese Feldstärke beträgt ungefähr $5,7 \cdot 10^{11} \text{ Vm}^{-1}$ [177].

²Der Vektor des elektrischen Feldes gibt Auskunft über die Polarisationsrichtung der elektromagnetischen Welle, diese ist nicht mit der Polarisation des Mediums zu verwechseln, welche auch einen vektoriellen Charakter hat.

Aufgrund des dreifachen Produktes des elektrischen Feldes im Term dritter Ordnung können im Gegensatz zur linearen Optik neue Frequenzen in der Polarisation erzeugt werden. Dies lässt sich am einfachsten illustrieren, wenn man ein elektrisches Feld $E(t)$ mit drei Frequenzkomponenten E_j , $j \in \{1, 2, 3\}$ annimmt (siehe auch Ref. [95]).

$$E(t) = E_1 \exp(-i\omega_1 t) + E_2 \exp(-i\omega_2 t) + E_3 \exp(-i\omega_3 t) + c.c. \quad (4.3)$$

Beim Ausmultiplizieren des dreifachen Produktes in Gleichung 4.2 ergeben sich nun immer Terme aus drei Beiträgen aus den einzelnen Frequenzkomponenten. Dabei tritt jede mögliche Kombination aus Summe und Differenz von drei Frequenzen der drei Frequenzen $\omega_1, \omega_2, \omega_3$ auf. Die nichtlineare Polarisation besitzt damit 22 verschiedene positive Frequenzkomponenten [95]. Diese repräsentieren verschiedene, nichtlineare Prozesse dritter Ordnung. Einer dieser Prozesse ist die Vierwellenmischung. Bei diesem parametrischen Prozess erzeugen drei Lichtwellen unterschiedlicher Frequenz durch die nichtlineare Wechselwirkung in dem Medium eine Lichtwelle mit einer neuen Frequenz. Die Vierwellenmischung wird durch folgende Terme repräsentiert [95]:

$$\begin{aligned} P^{NL}(\omega_1 + \omega_2 + \omega_3) &= 6\epsilon_0\chi_3 E_1 E_2 E_3 \\ P^{NL}(\omega_1 + \omega_2 - \omega_3) &= 6\epsilon_0\chi_3 E_1 E_2 E_3^* \\ P^{NL}(\omega_1 + \omega_3 - \omega_2) &= 6\epsilon_0\chi_3 E_1 E_3 E_2^* \\ P^{NL}(\omega_2 + \omega_3 - \omega_1) &= 6\epsilon_0\chi_3 E_2 E_3 E_1^* \end{aligned} \quad (4.4)$$

Andere Prozesse wie der optische Kerreffekt, der das Modenkoppeln in einem fs-Oszillator ermöglicht (siehe 2.1.2), und die Selbstphasenmodulation (siehe 2.2.3) können durch folgenden Term dargestellt werden:

$$P^{NL}(\omega_1 + \omega_1 - \omega_1) = 3\epsilon_0\chi_3 E_1 E_1 E_1^* \quad (4.5)$$

Der Term der nichtlinearen Polarisation, der die stimulierte Ramanstreuung beschreibt, trägt die Frequenz ω_2 , die im einfallenden Licht schon auftrat. Sie ist allerdings auch durch das Betragsquadrat des elektrischen Feldes der zweiten Frequenz ω_1 beeinflusst.

$$P^{NL}(\omega_1 - \omega_1 + \omega_2) = 6\epsilon_0\chi_3 E_1 E_1^* E_2 \quad (4.6)$$

Im folgenden Abschnitt soll diese Gleichung genauer betrachtet werden. Die Form der hier nicht genauer beschriebenen Suszeptibilität χ_3 wird gegeben und die Abhängigkeiten der stimulierten Ramanstreuung von den elektrischen Feldern und der molekularen Beschaffenheit der Probe dargestellt.

4.1.1 Stimulierte Raman Streuung

Die Ramanstreuung ist eine inelastische Streuung von Licht an Molekülen. Dabei wird im Falle der Stokesstreuung eine Schwingungsmode durch die Wechselwirkung mit dem Licht angeregt. Im vollen quantenmechanischen Bild wird ein Photon mit der Frequenz

ω_1 vernichtet und ein Photon mit einer niedrigeren Energie mit der Frequenz ω_2 erzeugt, während die Schwingungsmode mit der Frequenz $\Delta\omega = \omega_1 - \omega_2$ in den nächst höheren Schwingungszustand angeregt wird. Im Falle der Anti-Stokesstreuung wird ein Photon mit einer höheren Energie erzeugt, während die beteiligte Schwingungsmode in einen niedrigeren Schwingungszustand übergeht. Die Stärke dieses Übergangs von dem einen in den anderen Schwingungszustand wird in der Quantenmechanik durch ein entsprechendes Übergangsmatrixelement angegeben, welches mit Hilfe einer störungstheoretischen Behandlung zweiter Ordnung berechnet werden kann [178].

Die Bedingung für die Wechselwirkung des Lichtes mit einer Schwingungsmode ist, dass sich die molekulare Polarisierbarkeit α mit der Koordinate der Schwingungsmode q ändert. Wenn diese Schwingungsmode angeregt ist, ist dem durch das Lichtfeld induzierten Dipolmoment des Moleküls dann die Frequenz der Schwingungsmode aufgeprägt. Dem eingestrahlten Lichtfeld werden durch die schwingungsmodulierte Molekülantwort Seitenbänder bei der Stokes- und der Anti-Stokesfrequenz erzeugt. Diese Betrachtung setzt voraus, dass die Schwingungsmode bereits angeregt ist. Das ist im Falle der Stokesstreuung aber nicht der Fall. Dieser Widerspruch wird mit einer quantenmechanischen Betrachtung des Moleküls durch die Nullpunktsenergie des Schwingungsgrundzustandes gelöst. Mit der quantenmechanischen Beschreibung des Lichtes ist auch möglich den stimulierten und den spontanen Ramaneffekt in einem einheitlichen Bild zu beschreiben³ [179]. Während bei der stimulierten Ramanstreuung das Lichtfeld bei der Stokesfrequenz mit Hilfe eines zweiten Lasers eingestrahlt wird, betrachtet man die spontanen Ramanstreuung als Verstärkung der Vakuumfluktuationen des Lichtfeldes bei der Stokesfrequenz.

Um wesentliche Eigenschaften des stimulierten Ramaneffektes zu beschreiben, genügt jedoch eine klassische Beschreibung von Licht und Molekülen [95]. Die Schwingungsmode wird dabei als gedämpfter, harmonischer Oszillator mit der Resonanzfrequenz ω_R und der Dämpfungskonstante γ dargestellt. Die Lichtfelder von Pump- bzw. Stokesmode werden als monochromatische, elektromagnetische Wellen mit paralleler Polarisation mit der Frequenz ω_1 bzw. ω_2 beschrieben. Die makroskopische Antwort der Schwingungsmode auf die eintreffenden Lichtfelder entspricht im Rahmen der nichtlinearen Optik der nichtlinearen Suszeptibilität χ_3 (siehe Gleichung 4.2). Da die Moleküle in der Probe zufällig zur Polarisationsrichtung des Lichtes verteilt sind, beinhaltet die Suszeptibilität eine Mittelung über alle möglichen Orientierungen der Moleküle zu den Lichtfeldern. Zunächst wird hier vereinfachend ein isotroper Tensor für die Suszeptibilität angenommen, so dass diese Mittelung keinen Einfluss hat. Die nichtlineare Suszeptibilität trägt sowohl die nichtresonante, elektronische Antwort des Mediums χ_{NR} als auch die resonante Antwort durch die Molekülschwingung χ_R . Fern jeder elektronischen Resonanz des Moleküls ist die elektronische Antwort rein dispersiv und der Tensor χ_{NR} rein reel [117]. Der Realteil der resonanten Antwortfunktion χ_R zeigt eine disperse Linienform. Der Imaginärteil folgt einer Lorentzfunktion [95]. Im Falle der Resonanz ($\omega_R = \omega_1 - \omega_2$) ist bei der stimulierten Ramanstreuung

³In enger Analogie zur Beschreibung von spontaner und stimulierter Emission.

der Imaginärteil negativ [95]. Die Breite der Lorentzfunktion ist 2γ .

$$\chi_3 = \chi_{NR} + \chi_R = \chi_{NR} + \frac{\epsilon_0(N/6m)(\partial\alpha/\partial q)_0^2}{\omega_R^2 - (\omega_1 - \omega_2)^2 + 2i(\omega_1 - \omega_2)\gamma} \quad (4.7)$$

m ist hier die reduzierte Masse der Schwingungsmode, N die Teilchendichte der Moleküle. Der Betrag der Suszeptibilität hängt wie oben beschrieben von der Ableitung $\partial\alpha/\partial q$ der Polarisierbarkeit α des Mediums nach seiner Koordinate q der Schwingungsmode ab. Die nichtlineare Polarisierung des Mediums P_{NL} hängt nach Gleichung 4.6 außer von der Suszeptibilität auch von dem Betragsquadrat der Feldstärke des Pumplichtes $|E_{pump}|^2$ mit der Frequenz ω_1 und dem elektrischen Feld E_{probe} bei der Probefrequenz ω_2 ab.

$$P_{NL}(\omega_2) = 6\epsilon_0\chi_3(\omega_2) \cdot |E_{pump}|^2 E_{probe} \quad (4.8)$$

Die nichtlineare Polarisierung des Mediums führt zur Erzeugung eines Feldes ΔE_{Raman} mit der Frequenz ω_2 . Nimmt man an, dass Wechselwirkungslänge l sehr kurz ist, so skaliert das erzeugte Lichtfeldes ΔE_{Raman} in erster Näherung linear mit der Wechselwirkungslänge. Diese Annahme ist im Falle der Ramanmikroskopie berechtigt, da die Rayleighlänge des Fokus sehr kurz ist. Das elektrische Feld ΔE_{Raman} ist dabei um 90 Grad phasenverschoben zu dem eingehenden elektrischen Feld E_{probe} [117].

$$\Delta E_{Raman}(\omega_2) = -3i\frac{\omega_2 l}{nc}\chi_3(\omega_2)|E_{pump}|^2 E_{probe} \quad (4.9)$$

Am Detektor wird die Intensität des elektrischen Feldes des Probeimpulses I_{probe}^{srs} gemessen. Das gemessene Feld ist die Superposition des eingehenden Feldes E_{probe} und des kleinen Beitrags ΔE_{Raman} durch die stimulierte Ramanstreuung. Das eingehende Feld E_{probe} ist definitionsgemäß rein reel. Deswegen vereinfachen sich die Kreuzterme des Betragsquadrates in Gleichung 4.10 und allein der Imaginärteil der Suszeptibilität trägt zum Signal bei. Da der nichtresonante Anteil der Suszeptibilität rein reel ist, tritt er in der Gleichung nicht in Erscheinung.

$$\begin{aligned} I_{probe}^{srs} &= 2\epsilon nc|E_{probe} + \Delta E_{Raman}|^2 = 2\epsilon nc|E_{probe}|^2 + 2\epsilon nc E_{probe} \text{Re}(\Delta E_{Raman}) = \\ &= 2\epsilon nc|E_{probe}|^2 - 6\epsilon nc \frac{\omega_2 l}{nc} \text{Im}(\chi_R)(\omega_2)|E_{pump}|^2|E_{probe}|^2 \end{aligned} \quad (4.10)$$

Die Intensität des Ramanfeldes ΔE_{Raman} alleine wurde hier vernachlässigt. Als Raman-signal oder "Raman Gain" $R(\omega)$ wird das auf das ohne Wechselwirkung mit dem Pumpimpuls gemessene Spektrum des Probeimpuls I_{probe} referenzierte Spektrum I_{probe}^{srs} bezeichnet [107].

$$R(\omega) = \frac{I_{probe}^{srs}}{I_{probe}} - 1 = -3\frac{\omega_2 l}{nc} \text{Im}(\chi_R)(\omega_2)|E_{pump}|^2 \quad (4.11)$$

Wird an Stelle des niederfrequenten Probeimpuls, das referenzierte Spektrum des Pumpimpuls gemessen, ist das Ramansignal ein Ramanverlustsignal oder "Raman Loss". Die

Änderung der Intensität des Probeimpulses durch die stimulierte Ramanstreuung ist proportional der Leistung des Pumpimpulses (“Probeimpulses“ im Falle der Ramanverlustmessung). Besonders entscheidend ist aber, dass das Signal direkt proportional zum Imaginärteil der Suszeptibilität ist und keine Abhängigkeit vom dispersiven Realteil besteht. Daraus folgt zum einen, dass die spektrale Linienform der stimulierten Ramanstreuung wie die der spontanen Ramanstreuung lorentzförmig ist, zum anderen, dass das Signal direkt proportional der Anzahl der Streuzentren und damit der Probenmenge ist. Beide Eigenschaften ermöglichen eine einfache Analyse eines stimulierten Ramanspektrums und unterscheiden die stimulierte Ramanstreuung von der kohärenten anti-Stokes Ramanstreuung.

Das stimulierte Ramansignal unterscheidet sich vom spontanen Ramansignal in der Abhängigkeit von den Frequenzen der beteiligten Lichtfelder. Für das stimulierte Ramansignal $R(\omega_1, \omega_2)$ gilt nach Gleichung 4.11:

$$R(\omega_1, \omega_2) \propto \omega_2 |E_{\text{pump}}(\omega_1)|^2 \propto \omega_2 \omega_1 \quad (4.12)$$

Die Frequenz beider Lichtfelder geht in die Gleichung gleichwertig ein. Die Stärke des spontanen Ramaneffektes kann an seinem differentiellen Wirkungsquerschnitt $d^2\sigma_{sp}/d\Omega d\omega_2$ bemessen werden⁴. Für dessen Frequenzabhängigkeit gilt nach [179]:

$$d^2\sigma_{sp}/d\Omega d\omega_2(\omega_1, \omega_2) \propto \omega_1 \omega_2^3 \quad (4.13)$$

Die Abhängigkeit von der anregenden Frequenz ω_1 entspricht der des stimulierten Ramaneffekts. Die Abhängigkeit von der detektierten Frequenz ω_2 entspricht der Frequenzabhängigkeit des quantenmechanischen Modendichte im Grundzustands des Vakuumlichtfeldes [179]. In der klassischen Betrachtung wird die generelle ω^4 Abhängigkeit des Ramaneffektes durch die Frequenzabhängigkeit der Abstrahlung eines induzierten Dipols erklärt [180].

In der bisherigen Ableitung der stimulierten Ramanstreuung wurde angenommen, dass der Tensor der Suszeptibilität isotrop sei und die beiden Lichtfelder parallel polarisiert. Im Allgemeinen ist der Tensor jedoch nicht isotrop und auch die Lichtfelder nicht zwangsläufig parallel polarisiert. Die Anisotropie einer Ramanbande macht sich bei der Ramanstreuung durch gestreutes Licht mit einer geänderten Polarisationsrichtung bemerkbar. Um die Anisotropie einer Ramanbande zu charakterisieren, wird für die spontane Ramanstreuung das Depolarisationsverhältnis ρ in der Regel als das Verhältnis der gestreuten Leistung pro Raumwinkel, welche senkrecht zur anregenden Polarisation polarisiert ist, zu der Leistung pro Raumwinkel, welche parallel zur anregenden Polarisation polarisiert ist, bei einer Detektion im 90 Grad Winkel zur Richtung der Anregung definiert [180]:

$$\rho = \frac{dP^\perp/d\Omega}{dP^\parallel/d\Omega} \quad (4.14)$$

Dieses Verhältnis liegt bei 0 für eine stark polarisierte, d.h. isotrope, Bande und bei 3/4 für eine maximal anisotrope, also unpolarisierte Bande. Wenn bei gleicher Detektionsgeometrie kein analysierender Polarisator eingesetzt wird, sondern die Polarisation des

⁴ $d^2\sigma_{sp}/d\Omega d\omega_2$ ist proportional zu dem Imaginärteil der Suszeptibilität dritter Ordnung χ_3 [179].

anregenden Lichtes einmal senkrecht zur Streuebene gedreht ist und das andere Mal parallel zur Streuebene, ergibt sich ein anderes Depolarisationsverhältnis⁵. Für eine unpolarisierte Bande ist bei dieser Definition ein maximales Depolarisationsverhältnis von 6/7, eine stark polarisierte Bande besitzt weiter den Wert 0. Beide Definitionen sind aber äquivalent und können ineinander übergeführt werden:

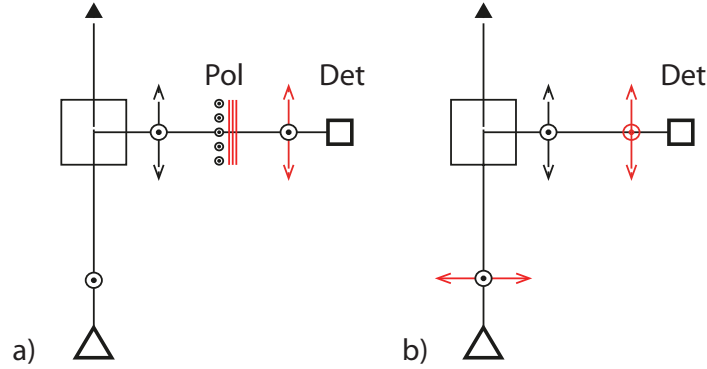


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Messung des Depolarisationsverhältnisses. a) Das Depolarisationsverhältnis entspricht dem Verhältnis der am Detektor (Det) gemessenen Leistung, wenn der Polarisator (Pol) senkrecht zur Polarisationsrichtung der Anregung steht (rote Linien), zur Leistung, wenn dieser parallel zur Polarisationsrichtung der Anregung steht (schwarz).

b) Das Depolarisationsverhältnis entspricht dem Verhältnis der am Detektor (Det) gemessenen Leistung, wenn die Polarisation der Anregung parallel zur Streuebene gerichtet ist (rote Linien), zur Leistung, wenn diese senkrecht zur Streuebene steht (schwarz).

Bei der Messung des Depolarisationsverhältnisses mit analysierenden Polarisator werden zwei Leistungen bestimmt (vgl. Abb. 4.1). Die Leistung P_{iso}^a bei paralleler Anordnung von Polarisation und Polarisator repräsentiert hauptsächlich den isotropen Anteil der Ramanstreuung. Die andere Leistung P_{aniso}^a bei senkrechter Anordnung von Polarisation und Polarisator misst die Anisotropie der Streuung. Bei der Messung ohne analysierenden Polarisator werden auch zwei Leistungen bestimmt. Die gemessene Leistung P_{iso}^{wa} , bei der die Polarisation der Anregung senkrecht zur Streuebene ausgerichtet ist, entspricht der Summe der Leistungen P_{iso}^a und P_{aniso}^a aus der Messung mit Analysator, wie aus der schematischen Zeichnung 4.1 abzulesen ist. Wenn die Polarisation der Anregung parallel zur Streuebene gerichtet ist, kann das detektierte Streulicht aufgrund der Detektionsgeometrie nicht die gleiche Polarisation besitzen wie das anregende Licht. Das detektierte Licht wird also ausschließlich anisotrop gestreut. Weil kein Analysator eingesetzt wird, ist die gemessene Leistung P_{aniso}^{wa} in diesem Fall das Doppelte der Leistung mit Analysator P_{aniso}^a . Für das ohne Analysator gemessene Depolarisationsverhältnis ρ^{wa} folgt:

⁵In Ref. [178] werden verschiedene Detektionsgeometrien aufgeführt.

$$\rho^{wa} = \frac{P_{iso}^{wa}}{P_{iso}^{wa}} = \frac{2P_{aniso}^a}{P_{aniso}^a + P_{iso}^a} \quad (4.15)$$

$$= \frac{2\rho}{1 + \rho} \quad (4.16)$$

Die ohne Analysator gemessene Leistung P_{iso}^{wa} kann aus der mit Analysator gemessenen Leistung P_{iso}^a unter Verwendung des Depolarisationsverhältnis ρ^{wa} bestimmt werden.

$$P_{iso}^{wa} = P_{iso}^a + P_{aniso}^a = P_{iso}^a(1 + \rho) = P_{iso}^a \left(\frac{1}{1 - \rho^{wa}/2} \right) \quad (4.17)$$

Bei der stimulierten Ramanstreuung fungiert das Licht des Stokesimpulses als Analysator. In diesem Falle ist das Depolarisationsverhältnis des Falles mit Analysator zu verwenden [181]. Die Detektionsrichtung beim stimulierten Ramaneffekt ist nicht 90 Grad, sondern 0 Grad. Der differentielle Streuquerschnitt der Ramanstreuung ist aber für 90 und 0 bzw. 180 Grad gleich [178].

4.1.2 Femtosekunden Stimulierte Ramanstreuung oder stimulierte Ramanstreuung mit kurzen Pulsen

Die Femtosekunden-stimulierte Ramanstreuung (FSRS) wurde entwickelt, um transiente Schwingungsspektren von schnellen photochemischen Prozessen mit Hilfe der stimulierten Ramanstreuung aufzunehmen [12, 182]. Die photochemische Reaktion wird durch einen sehr kurzen Lichtimpuls, dem sogenannten “actinic pulse“, ausgelöst. Zu einem späteren Zeitpunkt wird mit Hilfe der FSRS der momentane Zustand der Reaktion anhand der Schwingungsspektren der beteiligten Moleküle abgefragt. Wenn man den Zeitpunkt der Abfrage variiert, kann der gesamte Reaktionsverlauf abgebildet werden. Diese Technik erreicht dabei eine Zeitauflösung für die Abfrage des Reaktionsverlaufs von bis zu 50 fs und eine Auflösung des Schwingungsspektrums von 10 cm^{-1} [12]. Die Abfrage des Schwingungsspektrums benötigt wie für die SRS beschrieben (vgl. Abschnitt 4.1.1) zwei Lichtfelder, eines für das Probelicht und das andere für das Pumplicht⁶. Bei der FSRS werden dafür zwei geeignete ultrakurze Lichtimpulse eingesetzt: Der Pumplichtimpuls besitzt in der Regel eine Impulsdauer von einigen wenigen Pikosekunden und eine entsprechende fouriertransform limitierte spektrale Bandbreite von $10 - 20 \text{ cm}^{-1}$ [12]. Der Probelichtimpuls besitzt eine deutlich kürzere Impulsdauer von einigen 10 fs [12] und ist dementsprechend spektral sehr breit ($> 1500 \text{ cm}^{-1}$). Beide Impulse werden in der Probe sowohl zeitlich als auch örtlich überlagert. Die Wechselwirkung der überlagerten elektrischen Felder der beiden Lichtimpulse mit den Molekülen der Probe führt zur stimulierten Ramanstreuung. Das Spektrum des Probeimpuls kann sowohl auf der Stokes als auch auf der Anti-Stokesseite des Spektrums des Pumpimpulses liegen. Je nachdem beobachtet man in dem Spektrum

⁶In dieser Arbeit wird bei der Beschreibung der FSRS immer das detektierte Lichtfeld “Probe“-Feld oder -Impuls genannt, das andere dementsprechend “Pump“-Feld oder -Impuls.

des Probeimpuls eine spektral schmale Verstärkung durch den stimulierten Ramaneffekt oder eine Abschwächung durch eben diesen Effekt. Dies geschieht immer dann, wenn die Frequenzdifferenz zwischen der Zentralfrequenz des Ramanpumpimpulses und der jeweiligen Frequenz im Spektrum des Ramanprobeimpulses der Frequenz einer Raman-aktiven Schwingungsmode der Moleküle in der Probe entspricht (siehe Abbildung 4.1.2). Die spektrale Breite der Ramansignatur im Spektrum des Probeimpuls ist durch die Faltung der natürlichen Breite des Ramanübergangs mit der spektralen Breite des Pumpimpulses gegeben [183].

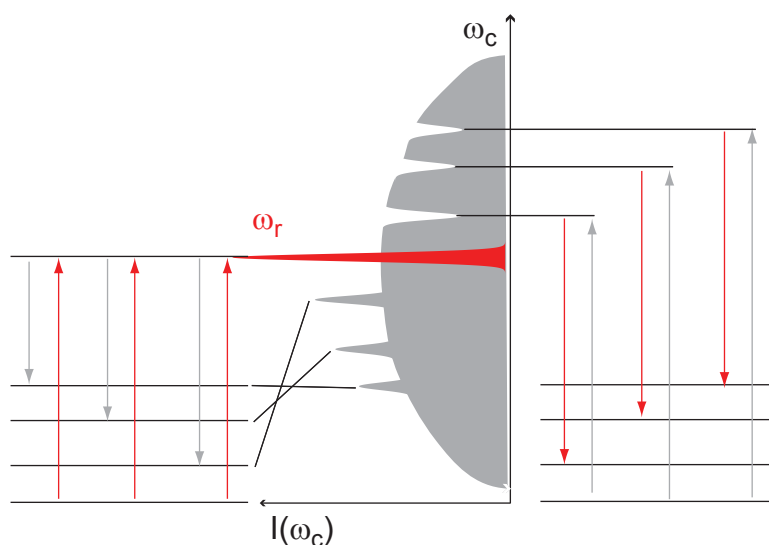


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Femtosekunden stimulierte Ramanstreuung: Spektren von Ramanpumpimpuls (rot) und Ramanprobeimpuls (grau) sind vertikal gegen die Frequenz aufgetragen. An beiden Seiten der Spektren sind der Schwingungsgrundzustand (durchgezogene Linie) und einige Vibrationsmoden eines Moleküls gegen die selbe Frequenzachse schematisch angezeigt. Die Pfeile symbolisieren Photonen des Ramanpumpimpulses (rot) und des Ramanprobeimpulses (grau). Wenn die Frequenzdifferenz zwischen Ramanpumpimpuls ω_r und Ramanprobeimpuls ω_c der Frequenz einer Schwingungsmode des Moleküls in der Probe entspricht, führt die stimulierte Ramanstreuung zu einer spektral schmalbandigen Verstärkung des Spektrums des Ramanprobeimpuls auf der Stokesseite der Frequenz des Ramanpumpimpulses, und entsprechend zu einer Abschwächung auf der Anti-Stokesseite (Abbildung aus Ref. [107])

Da der Pumpimpuls jedoch nicht unendlich lang ausgedehnt ist, sondern eine gewisse Impulsdauer besitzt, hängt die Linienform und Linienbreite des FSRS-Spektrums von der relativen zeitlichen Verzögerung der Ankunft des Pumpimpulses zu der des Probeimpuls ab [183]. Erreicht der Pumpimpuls die Probe zuerst, hat er weniger Zeitüberlapp mit der kohärenten Schwingung der Moleküle, die erst angestoßen wird, wenn auch der Probeimpuls die Probe erreicht. Die Ramanbande im FSRS-Spektrum wird deswegen verbreitert.

Kommt der Probeimpuls vor dem Pumpimpuls an der Probe an, wird die Ramanbande dementsprechend schmaler. Sie entwickelt bei einer zunehmend verspäteten Ankunft des Pumpimpuls auch negative Flügel auf beiden Seiten der Ramanbande. Den maximalen Spitzenwert erreicht die Ramanbande nicht beim absoluten Zeitüberlapp zwischen Ramanpumpimpuls und Ramanprobeimpuls, sondern bei einer leichten Verzögerungen des Ramanpumpimpulses gegenüber der dem Ramanprobeimpuls (ca. 0.7 bis 1 ps bei einer Dauer des Ramanpumpimpulses von 2.7 ps [183]). Es wurde gezeigt, dass auf der hochfrequenten Seite der Ramanbande ein negativer Flügel entsteht, wenn sich die Frequenz der molekularen Schwingung während der Wechselwirkung von einer niedrigen zu einer hohen Frequenz ändert [184]. Eine ähnliche spektrale Linienform entsteht, wenn nicht die molekulare Schwingung einen Frequenzgang von niedrigen zu hohen Frequenzen aufweist, sondern der Ramanpumpimpuls (siehe Abschnitt 7.1.3). Durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion in Material mit normaler Dispersion entsteht ein solcher positiver Chirp in einem kurzen Impuls (siehe Abschnitt 2.1.3).

4.1.3 Spektrale Interferenz eines Vierwellenmischuntergrunds mit dem Ramanprobeimpuls

Sowohl bei dem ersten FSRM-Aufbau [107] als auch bei dem in dieser Arbeit genauer beschriebenen MHz-Aufbau [60] zeigte sich eine Störung der Basislinie der gemessenen Ramanpektren in der Größenordnung der Ramanbanden (siehe Abbildung 4.1.3). Die Eigenschaften dieser spektralen Interferenz wurden zunächst detailliert beschrieben [185, 186] und dann einer Interferenz des Ramanprobeimpuls mit einem schwachen Lichtfeld, das durch Vierwellenmischung zwischen Probeimpuls und Pumpimpuls erzeugt wird, zugeschrieben [187, 186].

Diese Ergebnisse sollen hier kurz dargestellt werden: Neben dem stimulierten Ramanneffekt treten durch die Überlagerung von Ramanpumpimpuls und Ramanprobeimpuls in der Probe auch andere optisch nichtlineare Effekte (siehe Abschnitt 4.1) in ähnlicher Stärke auf. Neben den Effekten, die auf die Impulse selbst zurückwirken, wie z.B. die Selbstphasenmodulation und der Kerreffekt und Effekten, die von dem einen Impuls auf den anderen Impuls wirken, wie z.B. die Kreuzphasenmodulation oder eben SRS, kann die Wechselwirkung des Lichtfeldes beider Impulse mit dem Medium durch das Vierwellenmischen (FWM) auch neue Lichtfelder erzeugen. Damit diese im FSRM-Experiment beobachtet werden können, muss die Frequenz des erzeugten Lichtfeldes im Spektrum des Probeimpulses liegen. Da der Pumpimpuls die höchste spektrale Intensität besitzt, muss er bei der Wechselwirkung beteiligt sein, damit das Signal des FWM detektierbar ist. Der Probeimpuls ist spektral so breit, dass mehr als eine Frequenzkomponente bei dem FWM als Ausgangsfeld in Frage kommt. Von den möglichen Frequenzkombinationen des FWM (siehe Gleichung 4.4) erfüllen nur die beiden folgenden diese Bedingungen [187]:

$$\begin{aligned}\omega_{fwm}^{diff} &= \omega_p - \omega_{pr,1} + \omega_{pr,2} \\ \omega_{fwm}^{sum} &= -\omega_p + \omega_{pr,1} + \omega_{pr,2} \\ \text{mit } \omega_{pr,1/pr,2} &> \omega_p\end{aligned}\tag{4.18}$$

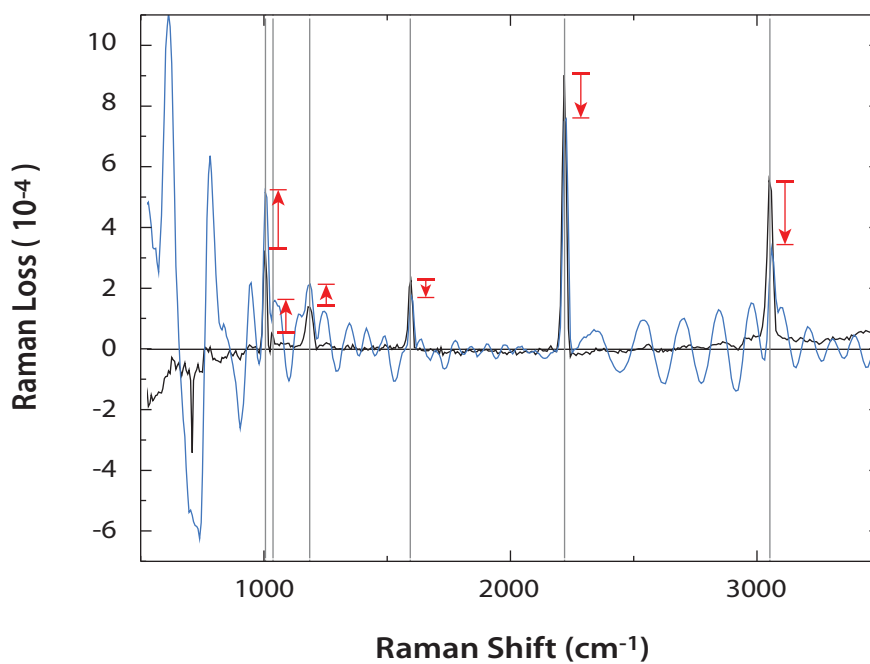


Abbildung 4.3: Spektrale Interferenz im FSRS-Spektrum von Benzonitril (Abbildung entnommen aus Ref. [186]). Das Spektrum mit der spektralen Interferenz (blau) zeigt im Vergleich zum Spektrum ohne spektraler Interferenz (schwarz) veränderte Bandenhöhen (siehe rote Pfeile). Die Bandenlagen des Spektrums von Benzonitril sind markiert (graue gestrichelte Linien).

Der erste Term wurde Differenzterm genannt [187] (Dementsprechend ist ω_{fwm}^{diff} die Frequenz dieses Lichtfeldes), da die Differenz der beiden Frequenzbeiträge $\omega_{pr,1}, \omega_{pr,2}$ aus dem Spektrum des Probeimpulses gebildet wird. Das Spektrum dieses Lichtfeldes ist um die Zentralfrequenz des Pumpimpulses ω_p zentriert. Die spektrale Breite dieses Feldes hängt vom Chirp des Probeimpulses ab (vgl. Abb. 4 in Ref. [93]). Für ein Lichtimpuls mit konstanter Phase entspricht die spektrale Breite des Differenzterms der doppelten Breite des Probeimpuls (siehe Abbildung 4.1.3). Bei dem zweiten Term werden die beiden Frequenzbeiträge $\omega_{pr,1}, \omega_{pr,2}$ summiert. Das Spektrum des Summenterms ist um die höchste Frequenz des Probeimpulses zentriert, reicht aber bis zu der Zentralfrequenz des Pumpimpulses (siehe Abbildung 4.1.3). Für diesen Term besteht keine Abhängigkeit der spektralen Breite von dem Chirp des Probelichtes. Die möglichen Frequenzen beider durch FWM erzeug-

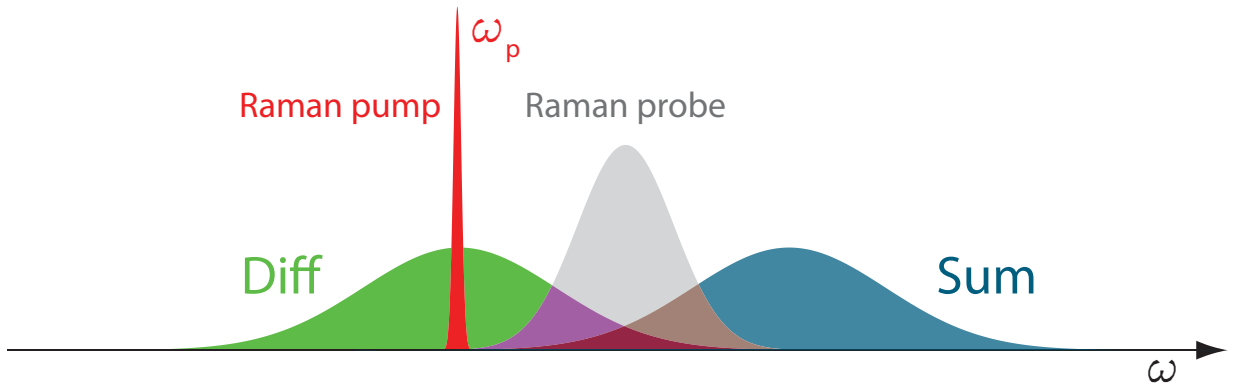


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Frequenzbereiche des Vierwellenmischens zwischen Pump- und Probelicht. Der Differenzterm (grün) ist um die Zentralfrequenz ω_p des Pumpimpulses (rot) zentriert. Der Summenterm (blau) ist am hochfrequenten Flügel des Probespektrums (grau) zentriert. Beide Beiträge überlappen mit dem Probespektrum (grau).

ten Lichtfelder decken den gesamten Spektralbereich des Probeimpulses ab. Die erzeugten Lichtfelder sind eigentlich schwach. Die beobachtete Signalstärke der spektralen Interferenz erklärt sich durch die Heterodyne-Detektion des FWM-Feldes durch das elektrische Feld des Probeimpulses: Die elektrischen Felder von Probeimpuls $E_{pr}(\omega)$ und FWM-Feld $E_{FWM}(\omega)$ addieren sich kohärent. Die gemessene Intensität des gesamten elektrischen Feldes ist die Summe aus den jeweiligen Intensitäten von Probeimpuls und FWM-Feld und dem Kreuzterm beider Beiträge [187]:

$$|E_{pr}(\omega) + E_{FWM}(\omega)|^2 \propto I_{pr}(\omega) + I_{FWM}(\omega) + 2\sqrt{I_{pr}(\omega)I_{FWM}(\omega)} \cos(\Phi(\omega)) \quad (4.19)$$

$\Phi(\omega)$ ist die relative Phase der beiden elektrischen Felder $E_{pr}(\omega)$ und $E_{FWM}(\omega)$. Während der Beitrag der Intensität des FWM-Feldes in Gleichung 4.19 vernachlässigt werden kann, ist der Kreuzterm durch die Abhängigkeit von der Intensität des Probeimpulses zu berücksichtigen. Ähnlich wie das SRS-Signal (siehe 4.1.1) wird also auch der störende Beitrag des

FWM durch die Interferenz mit dem Probelicht messbar. Da das stimulierte Ramanspektrum immer referenziert gemessen wird, muss zur Beschreibung der spektralen Interferenz auch das heterodyn detektierte FWM-Signal referenziert werden. Das gemessene Signal $R(\omega)$ besitzt dann nach den Gleichungen 4.11, 4.19 und 4.4 folgende Abhängigkeit von den eingehenden Lichtfeldern $E_{pr}(\omega)$, $E_{FWM}(\omega)$ und der nichtlinearen Suszeptibilität χ_3 :

$$R(\omega) \propto \frac{|E_{FWM}(\omega)| \cdot |E_{pr}(\omega)|}{|E_{pr}(\omega)|^2} \cdot \cos(\Phi(\omega)) \propto \chi_3 \cdot |E_{FWM}(\omega)| \cdot |E_{pr}(\omega)| \cdot \cos(\Phi(\omega)) \quad (4.20)$$

Diese Abhängigkeit des gemessenen FWM-Signals von der Intensität des Pump- und des Probeimpulses wurden experimentell bestätigt [187]. Ebenso wurde mit Hilfe von verschiedenen Gläsern die lineare Abhängigkeit von dem nichtlinearen Brechungsindex n_2 nachgewiesen [187]. Der nichtlineare Brechungsindex n_2 wiederum ist der nichtlinearen Suszeptibilität χ_3 direkt proportional [95]. Zudem wurde die spektrale Linienform durch Simulationen sehr genau reproduziert [187]. Als Eingabeparameter dienten dabei das gemessene Spektrum und die gemessene spektrale Phase des Probeimpulses [187].

Da der beschriebene Effekt von keiner Resonanz im Material abhängt, wird er in jeder Probe auftreten. Er verändert die gemessenen Bandenhöhen und verzerrt das Ramanspektrum. Deswegen benötigt man Methoden, den Effekt zu umgehen oder zu unterdrücken. Schon in der ersten Arbeit über diese spektrale Interferenz wurden dafür mehrere Möglichkeiten aufgezeigt [185]: Sind der Pump- und der Probeimpuls senkrecht zueinander polarisiert, wird sowohl das stimulierte Ramansignal als auch das FWM-Signal geringer. Das Depolarisationsverhältnis [188] der meisten Ramanbanden erlaubt jedoch auch bei dieser Konfiguration die Aufnahme eines Ramanspektrums. Das FWM-Feld wird dabei jedoch effektiv unterdrückt [185]. Die zweite Möglichkeit ist, die Impulse in entgegengesetzter Richtung durch die Probe zu senden [187]. Die Phasenanpassung für den stimulierten Ramaneffekt ist weiterhin erfüllt, jedoch nicht die Phasenanpassung für den FWM-Prozess⁷. Da die Wechselwirkungslänge von Pumpimpuls und Probeimpuls jedoch verkürzt wird, wird auch hier das Ramansignal verringert. Eine dritte Möglichkeit macht sich die heterodyne Detektion durch den Probeimpuls zunutze [185]. In dem die relative Wegstrecke zwischen Probe- und Pumpimpuls während einem Integrationsintervall des Detektors in der Größenordnung der Wellenlänge geändert wird, kann die spektrale Interferenz gemittelt werden. Durch die Änderung der relativen Wegstrecke der beiden Impulse ändert sich die relative Phase $\Phi(\omega)$ der Impulse während der Messung um einen Betrag grösser 2π . Die Messung führt zu einer Integration des Kosinusterm in Gleichung 4.20 entlang der veränderlichen Phase. Das führt bei geeigneter Veränderung der Wegstrecke zur Auslöschung des FWM-Signals. Bleibt die Änderung der Wegstrecke klein gegenüber der “ Länge “ des Pumpimpulses, d.h. der Zeitdauer des Impulses mal der Lichtgeschwindigkeit, bleibt das Ramansignal durch diese Methode unberührt. Diese Methode wurde sowohl beim kHz- als auch beim MHz-Aufbau mit Hilfe einer Piezokeramik als Stellelement realisiert. Man könnte diesen Effekt aber auch benutzen, um die Grösse des nichtresonanten Anteil der Suszeptibilität dritter Ordnung zu messen.

⁷Zur Phasenanpassung siehe [95]

4.2 Mikroskopie mit Femtosekunden Stimulierter Ramanstreuung

Das Mikroskop ist eines der ältesten⁸ wissenschaftlichen Instrumente. Es dient dazu auf optischem Wege kleine ($> 0.3 \mu\text{m}$) Gegenstände zu beobachten. In diesem Abschnitt soll aber nicht die Mikroskopie im Allgemeinen diskutiert werden, sondern nur in wie weit die speziellen Fokussierungsbedingungen der Mikroskopie die stimulierte Ramanstreuung beeinflussen und welche Bedingungen ein ideales Objektiv für die FSRM erfüllen sollte. Das aufgebaute Ramanmikroskop misst für jeden Bildpunkt einer mikroskopischen Aufnahme ein Ramanspektrum. Aus diesen Spektren kann durch geeignete Datenverarbeitung Kontrast für die Bildgebung erzeugt werden. Zur Bilderzeugung muss entweder die Fokusposition von Probe- und Pumpstrahl die ruhende Probe abrastern oder der Strahlverlauf bleibt unverändert koaxial und die Probe wird in kleinen Schritten verfahren. Für empfindliche biologische Proben z.B. lebende Zellen ist eine Anordnung mit einer ruhenden Probe besser geeignet. Die mit der Bewegung verbundenen Vibrationen und damit unnatürlicher Stress werden vermieden [190]. Deswegen besitzen die meisten kommerziellen (und damit für die Anwendung bestimmten) konfokalen Mikroskope einen Scanaufbau aus einem zweiachsigen oder zwei einachsigen Galvanospiegeln, um den Laserstrahl über die Probe zu scannen. Der Scanbereich ist allerdings auf das Bildfeld des Objektivs beschränkt. Für einen größeren Bildbereich muss die Probe dann doch verfahren werden. Das zweite Verfahren ist durch die koaxiale Anordnung des Strahles und der Optiken optisch vorteilhaft, da man nicht auf die Bildfeldkorrektur im Randbereich des Objektivs angewiesen ist, wie das bei dem scannenden Strahl der Fall ist. Zudem ist der Aufbau mit einem kommerziellen Piezoscantisch einfach umzusetzen. Der realisierte Mikroskopie-Aufbau verwendet einen Verfahrtschisch, um die Probe abzurastern. Die Laserstrahlen werden koaxial mit einem Objektiv fokussiert und in Transmission mit einem zweiten Objektiv eingesammelt.

4.2.1 Auflösungsgrenze und Fokolvolumen.

Die theoretische Auflösungsgrenze in der Mikroskopie der linearen Optik ist durch die Beugung des Lichtes an der kleinsten Apertur bestimmt. Die numerische Apertur NA ist eine charakteristische Größe für eben diese Auflösungsgrenze. Sie ist als das Produkt des Sinus des halben Öffnungswinkel θ des durch das Mikroskop eingesammelten Lichtkegels und des Brechungsindex n des Mediums zwischen der einsammelnden Optik und der Probe definiert [176]:

$$NA = n \sin(\theta) \quad (4.21)$$

Moderne Methoden, die diese Auflösungsgrenze unterlaufen, benutzen nichtlineare Sättigungseffekte (z.B. STED [191]) oder die Abbildung einzelner Fluorophore (z.B. STORM, PALM [192]). Nach Helmholtz gilt für die kleinste aufgelöste Struktur d eines Mikroskops

⁸Erste Berichte über Mikroskope sind vom Anfang des 17. Jahrhunderts überliefert [189].

mit der numerischen Apertur NA , welches mit Licht der Wellenlänge λ ausgeleuchtet wird [176]:

$$d \geq 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (4.22)$$

Diese Formel entspricht gleichzeitig der Ausdehnung der Airyscheibe der Intensität im Fokus [190, 193]. Mit einer typischen Wellenlänge des Experiments von ca. $1 \mu\text{m}$ und der NA von 0,75 des verwendeten FLUAR Objektivs der Firma Zeiss ergibt sich eine laterale Ausdehnung des Fokus von ca. 810 nm. Die axiale Ausdehnung des Fokus ergibt sich aus einer beugungstheoretischen Betrachtung zu [190, 193]:

$$z_0 = 2 \cdot \frac{n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (4.23)$$

n ist der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe. Mit den oben genannten experimentellen Parametern folgt, dass die Ausdehnung des Fokus in axialer Richtung ca. $3.6 \mu\text{m}$ beträgt. Das Fokalkvolumen V_{Fokus} kann als Zylinder mit dem Radius des Fokus und Länge der axialen Ausdehnung genähert werden:

$$V_{Fokus} = \pi \left(0.61 \frac{\lambda}{2NA} \right)^2 \cdot 2 \frac{n \cdot \lambda}{NA^2} = 0.186 \cdot \pi \frac{n\lambda^3}{NA^4} \quad (4.24)$$

Es ergibt sich ein Fokalkvolumen von ungefähr 2 Femtoliter mit den oben genannten Parametern. Die theoretische beugungslimitierte Auflösungsgrenze wird jedoch nur erreicht wenn das Objektiv voll ausgeleuchtet wird und der Laserstrahl coaxial zum Objektiv ausgerichtet ist.

4.2.2 Auswahl geeigneter Objektive für die Fokussierung und Kollimation

Bei der Auswahl geeigneter Objektive muss auf die Eigenschaften der Lichtfelder von Pump- und Probeimpuls Rücksicht genommen werden. Zunächst soll das fokussierende Objektiv betrachtet werden: Das Spektrum der verwendeten Lichtimpulse decken den gesamten Spektralbereich von 650 nm bis 980 nm ab. Das fokussierende Objektiv muss den Spektralbereich ohne laterale oder axiale chromatische Verzeichnung fokussieren können. Eine axiale chromatische Korrektur ist in der Regel nur bei der Klasse der Apochromaten vorzufinden [190]. Die Impulsdauer beider Lichtimpulse ist zudem sehr kurz, die Impulsdauer des Probeimpuls ist vor dem Objektiv nur wenige 10 fs lang. Die Dispersion der Gruppengeschwindigkeit im Objektiv kann die Impulsdauer des Probeimpuls so stark verlängern, dass nicht alle Frequenzen gleichzeitig mit dem Pumpimpuls in der Probe überlagert sind. Das Objektiv sollte demnach möglichst wenig Gruppengeschwindigkeitsdispersion aufweisen oder der Probeimpuls muss vor dem Objektiv überkomprimiert werden [194]. Der stimulierte Ramaneffekt hängt von der Polarisation des Probe- und Pumpimpulses ab. Die maximale Ramanstreuung wird erreicht, wenn die Polarisation beider linear polarisierter Impulse parallel ist. Das Objektiv verändert durch die starke Fokussierung zwangsläufig die

Polarisation beider Impulse [195]. Das Objektiv sollte demnach möglichst polarisationserhaltend sein. Das einsammelnde Objektiv muss etwas gelockerte Bedingungen erfüllen, da der Pumpimpuls nicht detektiert wird: Die chromatische Korrektur sollte weiterhin für den Bereich von 650-910 nm gewährleistet sein. Die Gruppengeschwindigkeitsdispersion und die Polarisation spielen nach der Wechselwirkung mit der Probe keine Rolle mehr (Die Effizienz des Gitters im Spektrometer hängt allerdings von der Polarisation des Probeimpulses ab.).

Für die beste räumliche Auflösung sollte das fokussierende Objektiv eine möglichst hohe numerische Apertur aufweisen. Der Einfluss der numerischen Apertur auf das Signal wird im nächsten Abschnitt dargestellt. Das einsammelnde Objektiv sollte mindestens die gleiche numerische Apertur besitzen wie das fokussierende Objektiv, um sicherzustellen, dass kein Licht durch die Apertur des Objektivs verloren geht. Zudem verändert Kreuzphasenmodulation die Divergenz des Probelichtes [108, 117]. Um den Einfluss dieses Effektes zu minimieren, sollte die numerische Apertur des zweiten Objektivs größer sein als die NA des ersten Objektivs [108, 117]. Die Vergrößerung der Objektive hat keinen direkten Einfluss auf das Signal. Eine geringe Vergrößerung ist mit einem größeren Arbeitsabstand verbunden [190]. Das Verhältnis der Vergrößerungen der Objektive entspricht dem Verhältnis der Strahldurchmesser. Die Vergrößerungen der beiden Objektive sollte in etwa gleich sein, da bei einem ungünstigen Verhältnis (z.B. Fokussierung 20x, Kollimierung 100x) der Strahldurchmesser erheblich verringert wird. Das erschwert die Fokussierung des Lichtes auf den Eintrittsspalt des Spektrometers. Zudem ermöglicht eine geringe Vergrößerung eine bessere Orientierung im beobachtenden Weißlichtbild der Probe.

4.3 Abschätzung des Signals der FSRM

In diesem Abschnitt soll die Signalstärke des stimulierten Ramaneffektes im Experiment mit der MHz-Lichtquelle abgeschätzt werden und der Einfluss der experimentell veränderlichen Parameter aufgezeigt werden. Das ermöglicht auch eine Abschätzung der Sensitivität des Experiments, wenn man das Rauschen (siehe Kapitel 6) berücksichtigt. In der Ramanliteratur ist die Wechselwirkungsstärke oft über den differentiellen Streuquerschnitt ($d\sigma/d\Omega$) angegeben. Dieser Streuquerschnitt gibt für den spontanen Ramanprozess die Übergangsstärke an. Man kann mit Hilfe des differentiellen Streuquerschnitts den sogenannten Verstärkungsfaktor oder “Gainfaktor“ G [95] für die stimulierte Ramanstreuung berechnen. Dieser gibt an wie stark der Probeimpuls durch die Ramangewinnverstärkung pro Wegstrecke verstärkt wird. Zur Berechnung des Gainfaktors muss der differentielle Streuquerschnitt entsprechend der geänderten Anregebedingungen bei der stimulierten Ramanstreuung skaliert werden. Anstatt der Intensität des Vakuumfeldes zur Anregung tritt hier die Intensität des Probeimpulses. Für diese I_{probe}^{srs} gilt damit [95]:

$$\frac{dI_{probe}^{srs}}{dz} = -GI_{probe}^{srs} \quad (4.25)$$

mit

$$G = \frac{4\pi^3 c^2}{\omega_1^2 \hbar 2\gamma \omega_2 n_1^2} N \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) I_{pump} \quad (4.26)$$

Für den spontanen Prozess geht in den Faktor die spektrale Breite des Übergangs 2γ ein. Da die Breite des Übergangs bei der FSRS auch von der Breite des Pumpimpulses $\Delta\omega_{probe}$ abhängt wird hier in Folge die effektive Breite des Übergangs $(\Delta\omega_{eff})^2 = (2\gamma)^2 + (\Delta\omega_{probe})^2$ verwendet. Der Gainfaktor ist der Intensität des Pumpimpulses, der Teilchendichte der Moleküle N und dem differentiellen Streuquerschnitt direkt proportional. Nur die Intensität des Pumpimpulses ist experimentell direkt beeinflussbar. Für das Ramansignal in der Resonanz R folgt aus Gleichung 4.25 und Gleichung 4.11 mit einer linearen Näherung für die kurze Wechselwirkungslänge l

$$R = G \cdot l = \Gamma(\omega_1, \omega_2) \cdot \frac{1}{\Delta\omega_{eff}} N \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) I_{pump} \cdot l \quad (4.27)$$

Der Faktor $\Gamma(\omega_1, \omega_2) = 4\pi^3 c^2 / \omega_1^2 \hbar \omega_2 n_1^2$ fasst die Frequenzabhängigkeit des Signals zusammen. Das Ramansignal R hängt über die Wechselwirkungslänge l und die Intensität des Pumpimpulses I_{pump} von der NA ab. Dabei gilt mit Gleichung 4.23: $l \propto NA^2$ und mit Gleichung 4.22: $I \propto 1/NA^2$. Für das Ramansignal folgt:

$$R \propto l \cdot I_{pump} \propto NA^2 \cdot 1/NA^2 \quad (4.28)$$

Das Ramansignal ist also unabhängig von der NA des fokussierenden Objektivs oder allgemeiner von der Größe des Fokus. Über die Intensität und die effektive spektrale Breite besteht eine Abhängigkeit des Ramansignals von der Impulsdauer des idealerweise bandbreiten-limitierten Pumpimpulses. Wenn die effektive Bandbreite von der spektralen Breite des Pumpimpulses bestimmt ist, ist das Ramansignal in der Spitze unabhängig von der Impulsdauer des Impulses. Das Bandenintegral allerdings ist der inversen Impulsdauer proportional. Bestimmt die natürliche Bandbreite der Ramanbande die effektive Bandbreite, gilt zudem, dass auch das Ramansignal der inversen Impulsdauer proportional ist. Den höchsten Spitzenwert in Abhängigkeit von der Breite wird erreicht, wenn die Bandbreite des Pumpimpulses der Bandbreite des Ramanübergangs entspricht⁹. Mit Gleichung 4.27 und den im Kasten dargestellten experimentellen Parametern folgt für den Spitzenwert des Ramansignals von Toluol der Bande bei 1003 cm^{-1} ein Signalthöhe von 0.0014 oder absolut mit einer Impulsenergie des Probeimpulses von 0.06 pJ 387 Photonen pro Laserimpuls oder 29×10^6 Photonen pro Millisekunde. In Abschnitt 7.1 wird ein Spektrum von Toluol gezeigt die Signalthöhe dieser Bande beträgt hier in etwa 0.00125 (siehe Abbildung 7.1 in Abschnitt 7.1). Für dieses Experiment waren die Leistungen in etwa vergleichbar es wurden jedoch

⁹vgl. hierzu die gleiche Aussage bezüglich CARS in [196]

andere Objektive verwendet. Deren Einfluss sollte wie oben gezeigt jedoch gering sein.

Abschätzung des relativen Ramansignals
der Ramanbande bei 1003 cm^{-1} des Moleküls Toluol:
Alle Parameter sind, wenn nicht anders vermerkt,
Messgrößen des Experiments.

$$\omega_1 = 2.1 \times 10^{15} \frac{1}{\text{s}}$$

$$\omega_2 = 1.9 \times 10^{15} \frac{1}{\text{s}}$$

$$\Delta\omega_{eff} = \sqrt{(2\gamma)^2 + (\Delta\omega_{probe})^2} = 3.4 \times 10^{13} \frac{1}{\text{s}} \quad 2\gamma \text{ aus [3]}$$

$$E_{pump} = 0.5 \text{ nJ}$$

$$A_{eff} = 0.515 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \quad \text{siehe Abschnitt 4.2.1}$$

$$T_{pump} = 1 \text{ ps}$$

$$I_{pump} = 9.7 \times 10^{14} \frac{\text{W}}{\text{m}^2}$$

$$l = 3.6 \text{ }\mu\text{m} \quad \text{siehe Abschnitt 4.2.1}$$

$$N \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) = 1.1 \times 10^{-6} \frac{1}{\text{m}} \quad \text{aus [3]}$$

Mit Gleichung 4.27 lässt sich das relative Ramansignal R berechnen:

$$\begin{aligned} R &= 12.6 \times 10^6 \frac{\text{m}^2}{\text{J}} \cdot \frac{1}{3.4 \times 10^{13}} \text{ s} \cdot 1.1 \times 10^{-6} \frac{1}{\text{m}} \cdot 9.7 \times 10^{14} \frac{\text{W}}{\text{m}^2} \cdot 3.6 \text{ }\mu\text{m} \\ &= 1.4 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Die untere Schranke für die theoretisch mögliche Sensitivität setzt das Schrotrauschen durch die Körnigkeit des Lichtes im Probeimpuls (siehe Kapitel 6). Vereinfacht kann man sagen, dass das relative Rauschniveau durch das Schrotrauschen bei der Detektion des Lichts invers zur Wurzel der Anzahl der Photonen im Probeimpuls skaliert. In einem einzelnen Probeimpuls sind im Zentrum des Spektrums 0.1×10^6 Photonen pro Pixel verteilt. Das entspricht einem relativen Rauschen von 3.2×10^{-3} pro Laserschuss oder 1.2×10^{-5} pro Millisekunde. Das entspricht einer unteren Grenze der Sensitivität von 80mM für Toluol geschätzt anhand der Bande bei 1003 cm^{-1} für eine Messzeit von 1 ms eine genauere Diskussion erfolgt in dem Kapitel über die Rauschbeiträge 6 und dem Kapitel über die durchgeführten Messungen mit dem MHz-FSRM Aufbau 7. In dem abschliessenden Kapitel 8 wird außerdem anhand weiterer Überlegungen über die Entwicklungsmöglichkeiten und Anwendbarkeit des Aufbaus Bezug auf diese Berechnungen genommen.

Kapitel 5

Die spektroskopischen und mikroskopischen Aufbauten des FSRM Experiments

In diesem Kapitel sollen alle experimentellen Aufbauten (Siehe Abbildung 5.1) außer der Lichtquelle (siehe Kapitel 3) beschrieben werden. Dazu gehören der bewegliche Spiegel mit dem Piezostellelement zur Modulationsunterdrückung (Abschnitt 5.1), der Mikroskopaufbau mit Rastertisch und Optiken (Abschnitt 5.2), der Spektrograph (Abschnitt 5.3) und die verschiedenen Detektoren, die eingesetzt wurden (Abschnitt 5.4). Zudem werden zwei unterschiedliche Methoden zur Modulation des Pumplichtes für die referenzierte Detektion des Signals beschrieben (Abschnitt 5.5). Daraufhin wird ein systematischer Messfehler dargestellt, der in Verbindung von der Referenzierung mit dem “Rolling-Shutter“ der Diodenzeilen der Firma Hamamatsu (Abschnitt 5.4.1) auftritt. Abschließend wird mit der “Phasestepping“-Methode [197] ein geeignetes Messverfahren für die Hamamatsu-Diodenzeile (Abschnitt 5.6) beschrieben.

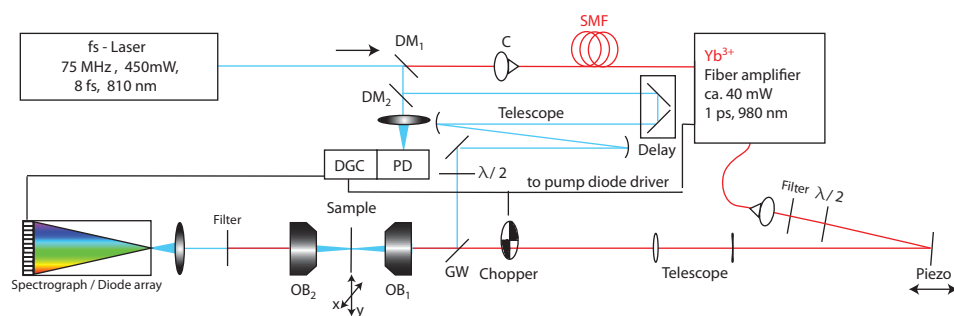


Abbildung 5.1: Aufbau des FSRM-Experiment. GW Glaskeil, OB Objektive, DM Dielektrische Spiegel, Delay Verzögerungsstrecke, $\lambda/2$ Halbwellenverzögerungsplatten, Piezo Beweglicher Spiegel auf Piezostellelement, PD Photodiode, DGC elektronische Verzögerungserzeugungskarte, Chopper Lichtmodulationsapparatur

5.1 Piezostellelement zur Modulationsunterdrückung

Eine Möglichkeit den FWM-Untergrund, der in Abschnitt 4.1.3 beschrieben wurde, zu unterdrücken, ist die relative Verzögerungsstrecke zwischen Pumpimpuls und Probeimpuls während der Integrationszeit einer Messung in der Größenordnung einer Wellenlänge zu variieren. Im aktuellen Aufbau geschieht diese variable Verzögerung an einem dünnen Silberspiegel im Arm des Pumplichtes (siehe Abbildung 5.1). Zunächst wurde die Längenvariation im Arm des Probelichtes eingesetzt, das ist jedoch unvorteilhaft, da das Probelicht gemessen wird und die Längenvariation durch das Piezoelement zu einer artifiziellen Rauschquelle wird. Das Licht wird unter einem Winkel von ca. 1 Grad von dem Spiegel reflektiert. Der Spiegel ist auf einen vorgespanntes Piezostellelement (piezosystems jena, P-150-00, mit erhöhter mechanischer Vorspannung von 300 N, Verstellweg $4\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ für eine Spannung von -20 V bis 130 V , Arbeitsfrequenz $3\text{--}5\text{ kHz}$) montiert. Dieses Piezoelement wird über einen selbstgebauten Verstärker mit einer sinusförmigen Spannung versorgt ($0\text{--}60\text{ V}$, $3\text{--}20\text{ kHz}$). Damit erreicht der Piezo einen Hub von $1.8\text{ }\mu\text{m}$, also ungefähr das Doppelte der verwendeten Wellenlänge. Der volle Hub des Piezoelements führt über den Einfallswinkel zu einem seitlichen Versatz des Pumpstrahls von ca. 30 nm . Dieser Versatz ist mit einer einfachen Photodiode im Strahlverlauf des Pumpimpulses messbar. Deswegen sollte angedacht werden, den Spiegel durch einen Retroreflektor zu ersetzen.

5.2 Mikroskop

Zu den Aufbauten, die das eigentliche Mikroskop darstellen, gehören sowohl optische Elemente als auch mechanische Komponenten. Zuerst soll die gesamte Optik beschrieben werden: Diese kann man sich als eine koaxiale Anordnung von optischen Elementen vorstellen. Die Komponenten sind für Probe- und Pumplicht funktionell ähnlich, wenn auch nicht identisch. Nach der Lichtquelle, der Verzögerungsstrecke und im Pumparm dem variablen Stellelement zur Modulationsunterdrückung (siehe 5.1) folgt in beiden Armen ein Teleskop zur Strahlaufweitung (siehe 5.2.1). Mit einem Glaskeil werden die beiden Strahlen koaxial überlagert. Der Probestrahl wird hierbei reflektiert, der Pumpstrahl durch den Glaskeil transmittiert. Der spektral breitere Probeimpuls erfährt dabei keine Dispersion. Da beide Strahlen parallel zur Reflektionsebene polarisiert sind (p-polarisiert), tritt der Brewstereffekt auf. Weil der Einfallswinkel für beide Strahlen nahe dem Brewsterwinkel ist, wird der Pumpstrahl zum größten Teil transmittiert, während nur ein kleiner Teil des Probestrahls reflektiert wird (ca. $0.5\text{ }\%$) [60]. Gleichzeitig kann, indem man die Polarisationssebene des Probeimpuls mit einer Halbwellenplatte verändert, die Leistung des Probelichtes erhöht werden. Dabei ist zu beachten, dass auch die Polarisationssebene des Pumplichtes verändert werden muss, und die Leistung des Pumplichtes dementsprechend abnimmt. Nach dem Glaskeil folgen drei silberne Umlenkspiegel, die den Strahl zunächst aus der horizontalen Tischebene lenken, um ihn dann vertikal von oben in Richtung des fokussierenden Objektivs auf den Probenstisch zu lenken. Das erste Objektiv (FLUAR (20x, 0.75, M27) Zeiss, siehe auch 5.2.2) fokussiert das überlagerte Licht von Probe- und Pumparm auf die Probe. Die

Probe wird wegen der Deckglaskorrektur der Objektive zwischen zwei Deckgläser präpariert (zur Probenpräparation siehe Abschnitt 5.2.4). Nachdem das Licht durch die Probe gewandert ist, wird es von einem zweiten Objektiv (Achroplan 100x, 1.25 Zeiss, siehe auch 5.2.2) kollimiert. Drei weitere silberne Umlenkspiegel führen den kollimierten Strahl zurück in die horizontale Strahlebene (Abstand vom Tisch: 14.5 cm). Darauf folgt ein Filter zur Auslöschung des Pumplichtes und der Spektrograph (siehe Abschnitt 5.3).

Der horizontale Strahlverlauf bedient sich standardisierter Säulen und Spiegelhalter. Für den vertikalen Strahlverlauf wurde eine Gewindelochrasterplatte (450 mm x 300 mm x 12.7 mm) mit Hilfe eines massiven Winkels vertikal auf den optischen Tisch montiert. An dieser Platte wurden sowohl die ersten drei vertikal ausgerichteten Umlenkspiegel als auch die Objektivhalterungen befestigt. Beide Objektivhalterungen sind baugleich. Diese bestehen aus drei zueinander orthogonal montierten Linearverschiebern, um die Objektive lateral und axial justieren zu können (Lateral parallel zu der Rasterlochplatte: Linos LT65-25, lateral senkrecht zur Lochrasterplatte: Newport M-UMR8.25A oder Vorgängermodel von micro-controlle, axial: Newport M-SDS65). Alle Linearverschieber erlauben eine Verschiebung von 25 mm. Obwohl der aus Edelstahl gefertigte axiale Verschiebetisch sehr stabil ist, wurde ein Langzeitdrift des Signals dieser Komponente zugeordnet. Das Gesamtgewicht der anderen Tische und der Objektive schieben durch die Schwerkraft gegen die Mikrometerschraube des Verstelltisches. Es wird vermutet, dass sich dadurch die axiale Position merklich ändert. Zudem erfordert die Justage der axialen Position im jetzigen Aufbau viel Fingerspitzengefühl. Die Achsen sind nicht vollständig entkoppelt, eine leichte Berührung des axialen Verschiebers, führt schon zu einer lateralen Bewegung des Objektivs. Der Piezorasterscantisch und die darauf befestigte Probe sind getrennt von dem vertikalen Optikaufbau auf vier Alufüßen gestellt. Hier ist zu überlegen, ob man den relativ hohen Aufbau noch mit dem optischen Aufbau verschraubt, um ihn zu versteifen. Das Proben-deckglas wird mit einer Feder auf eine Probenplatte (Thorlabs MAX200P6) geklemmt. Diese Probenplatte ist direkt auf den Piezorastertisch (PI-542.2CD mit Ansteuerung E-725.3CD) geschraubt, der wiederum auf einem manuell verschiebbaren Kreuztisch (OWIS Kreuztisch KT 150-D80, Verstellweg 20 mm x 20 mm) zur groben Justage befestigt ist (siehe auch Abschnitt 5.2.3).

5.2.1 Teleskope zum Ausleuchten der Objektive

Damit die Fokusgröße das Beugungslimit erreicht, muss das Strahlprofil des Lasers die Apertur des Objektivs überfüllen (siehe dazu Abschnitt 4.2.1). Der Strahldurchmesser des Probelichtes ist am Ausgang des Lasers 2 mm und der Strahl divergiert mit einem Winkel < 2 mrad. Bei der Propagation bis zur Probe weitet sich der Strahl auf einen Durchmesser von ca. 4 mm (Das Strahlprofil war elliptisch, deswegen handelt es sich hierbei um den Mittelwert beider Hauptachsen der Ellipse.) Der Strahldurchmesser des Pumplasers beträgt an derselben Stelle 5 mm. Der Durchmesser der hinteren Apertur des fokussierenden Objektivs ist 23 mm groß. Deswegen müssen für eine optimale Ausnutzung der numerischen Apertur des Objektivs beide Strahlen aufgeweitet werden. Dies geschieht jeweils mit einem Teleskop. Das Teleskop für den Probestrahl verwendet Spiegel, um Dispersion der

Gruppengeschwindigkeit durch das Material zu vermeiden. Der Aufbau des Teleskops folgt dem Bauprinzip eines astronomischen Fernrohrs [176] in einer z-Geometrie. Das Verhältnis der Radien der beiden gekrümmten Silberspiegel entspricht der Aufweitung des Strahls ($600/300 \text{ mm/mm} = 2$). Bei dem Pumpstrahl ist die Materialdispersion weniger kritisch. Das in diesem Fall terrestrische Telekop [176] verwendet deshalb zwei Linsen (Brennweiten: -100 mm und 200 mm). Bei beiden Teleskopen wird der Strahl um einen Faktor 2 aufgeweitet. Das Objektiv wird also auch mit den Teleskopen noch nicht überfüllt. Bei einer stärkeren Aufweitung gilt es Folgendes zu bedenken: Erstens, überfüllt der Pumpstrahl das Objektiv, verliert man proportional Anregungsleistung und damit Signal. Zweitens, da 1 Zoll-Spiegel verwendet werden, wird ein Strahldurchmesser größer 18 mm beim Strahltransport durch die Spiegel beschnitten. Dieser Fall ist auch im Sinne der Lasersicherheit zu vermeiden.

5.2.2 Objektive

Die beiden Objektive sind die zentralen optischen Elemente des Mikroskops. Das fokussierende und das kollimierende Objektiv unterscheiden sich jedoch in ihrem Anforderungsprofil. Die Aufgabe des fokussierenden Objektives ist es, den Pump- und den Probestrahl lateral und axial auf einen gemeinsamen, kleinstmöglichen Punkt zu fokussieren. Dabei sollte die Transmission für beide Impulse möglichst hoch und die Polarisierung erhalten sein. Im aktuellen Aufbau wird zum Fokussieren ein Objektiv der Fluor-Reihe von Zeiss (NA 0.75, 20X, M27) verwendet. Die Transmission für den Pumpimpuls ist ungefähr 76 %, für den Probeimpuls liegt die Transmission je nach Wellenlänge zwischen 85 und 97 %. Aus der numerischen Apertur von 0.75 folgt ein beugungsbegrenzter Fokussdurchmesser von ca. $0.8 \mu\text{m}$ und eine axiale Fokallänge von $3.6 \mu\text{m}$ (siehe Abschnitt 4.2.1). Dieses Optimum wird wahrscheinlich nicht erreicht, da die Objektive nicht vollständig ausgeleuchtet werden (siehe Abschnitt 5.2.1). Die ursprüngliche Zielanwendung des Objektivs ist die Fluoreszenzmikroskopie. Deswegen ist die Farbkorrektur des Objektives im NIR nicht als optimal ausgewiesen. Im Vergleich mit anderen Objektiven, unter diesen auch farblich besser korrigierte, weist dieses Objektiv dennoch das höchste Ramansignal auf (gemessen an Benzonitril, Kollimation mit Zeiss Achroplan 100x, 1.25) [152]. Vermutlich ist die Polarisierungserhaltung des Objektivs besser. Das Objektiv zeigt in dem Vergleich mit anderen Objektiven auch die geringste Gruppengeschwindigkeitsdispersion [152]. Dies ist ein weiterer Vorteil dieses Objektivs gegenüber farblich besser korrigierten Objektiven, die mehr Linsen benötigen.

Das einsammelnde Objektiv soll allein den Probeimpuls kollimieren. Das aktuell eingesetzte Objektiv ist aus der Achroplan-Reihe von Zeiss (NA 1.25, 100x, Oil, M27). Die Transmission für den Probeimpuls beträgt im Mittel 85 %. Das Objektiv ist wiederum nicht für die konfokale Lasermikroskopie entwickelt worden, sondern für die Weitfeldmikroskopie. Das Verhältnis der Vergrößerungen der beiden Objektive führt zu einer Einengung des Strahldurchmessers des Probeimpulses ($20x/100x = 1/5$). Die Einengung ist unerwünscht und erschwert die Fokussierung des Lichtes auf den Eintrittsspalt des Spektrographen (siehe 5.3). Es sei angemerkt, dass vor diesem Objektivpaar zwei baugleiche Objektive (NA

0.4/20x) der Firma Leitz eingesetzt wurden. Diese einfach gebauten Objektiv führten dennoch zu hohen Ramansignalen (siehe Abschnitt 7.1).

5.2.3 Rastertisch

Für die Bildgebung ist bei dem coaxialen optischen Aufbau eine rasternder Verfahrtschisch unerlässlich. Die Positioniergenauigkeit des Tisches sollte unter dem Nyquistkriterium [198] der beugungsbegrenzten Auflösung liegen (< 400 nm). Die Zeit, die der Verfahrtschisch benötigt, um von einem Bildpunkt zum nächsten zu fahren, geht entscheidend in die Gesamtaufnahmezeit eines Bildes ein. Der Verfahrtschisch sollte also möglichst schnell und präzise von Bildpunkt zu Bildpunkt rastern können. Der im Experiment verwendete Tisch ist ein Piezo-Kreuztisch der Firma PhysikInstrumente (PI-542.2CD). Der Piezotisch besitzt einen Stellbereich von $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ bei einer Auflösung von 0.7 nm. Die Geschwindigkeit des Tisches hängt vom Gewicht des Probenstisches samt Probe (< 100 g) ab. Im aktuellen Messprogramm wird jeder Bildpunkt einzeln angesteuert. Der Piezotisch ermittelt über kapazitive Messsensoren seine Position. Wenn sich die tatsächlich gemessene Position um den eingestellten Wert bis auf einen gesetzten Schwellwert eingeschwungen hat, meldet der Kontroller dem Messprogramm, das Erreichen der Position. Diese Art der Punkt zu Punkt-Rasterung ist wegen des nötigen Einschwingens auf eine gesetzte Position zeitaufwändig. Eine andere Art der Rasterung könnte die Messzeit verkürzen: Anstatt die Position möglichst genau zu bestimmen, kann man eine möglichst konstante Geschwindigkeit vorgeben und während der Tisch sich bewegt in gleichen Zeitabständen messen. Diese Rasterung macht das Einschwingen auf eine Position obsolet.

5.2.4 Probenpräparation

Da beide Objektive für ein Deckglas korrigiert sind, muss sich die Probe zwischen zwei Deckgläsern befinden. Die Deckglaskorrektur sieht eine Dicke der Deckgläser von $170 \mu\text{m}$ vor. Diese Dicke entspricht der Deckglasnummer 1,5. Die Dicke der Deckgläser ist kritisch für das Erreichen der Beugungsgrenze [190]. Deswegen wird für die Signal-kritische Fokussierung ein hochpräzises Deckglas ($17 \times 17 \text{ mm}^2$) der Firma Zeiss eingesetzt. Das untere Deckglas ist ein Standarddeckglas der Firma Menzelgläser ($60 \times 20 \text{ mm}^2$). Es ist länger und breiter als das obere Deckglas, um es besser auf der Probenplatte (Thorlabs MAX200P6) befestigen zu können. Das obere Deckglas wird, nachdem es vorsichtig auf die Probe aufgebracht wurde, mit Nagellack versiegelt. Das soll ein Verdampfen der Flüssigkeit verhindern. Der Nagellack wird von manchen Proben angegriffen und zum Teil gelöst (z.B. Benzonitril).

5.3 Der Spektrograph

Nach der Wechselwirkung von Probe- und Pumpimpuls mit der Probe und der Rekollimation des Lichtes durch das zweite Mikroskopobjektiv, wird das Licht mit einigen Umlenkspiegeln in Richtung des Spektrographs gelenkt. Die spektrale Leistungsdichte des Pumpim-

pulses ($\approx 2.2 \text{ mW/cm}^{-1}$) ist deutlich höher als die spektrale Leistungsdichte des Probeimpulses ($\approx 1 \times 10^{-3} \text{ mW/cm}^{-1}$). Damit der Detektor vor zusätzlichem Streulicht durch das Pumplicht geschützt wird, muss das koaxial propagierende Pumplicht abgeschwächt oder ausgelöscht werden. Dies geschieht im aktuellen Aufbau mit einem Kurzpassfilter (Thorlabs FES0950). Die Unterdrückung dieses Filters ist in der Unterdrückungsregion (ca. 979 nm - 1235 nm) laut Datenblatt mindestens 10^{-4} . Durch Verkippen des Filters kann die Unterdrückungsregion zu niedrigeren Wellenlängen verschoben werden. Mit einem Kerbfilter könnte eine noch bessere Unterdrückung erreicht werden.

Das Probelicht wird mit einer achromatischen Linse (EdmundOptics $25 \times 40 \text{ VIS-NIR}$ außerdem fanden Verwendung: EdmundOptics $25 \times 30 \text{ VIS-NIR}$ und EdmundOptics $25 \times 35 \text{ NIR}$) auf den Eintrittsspalt fokussiert. Der Spektrograph (Acton Scientific ARC SpectroPro SP2358) benutzt eine Czerny-Turner Anordnung [199] (siehe Abbildung 5.2).

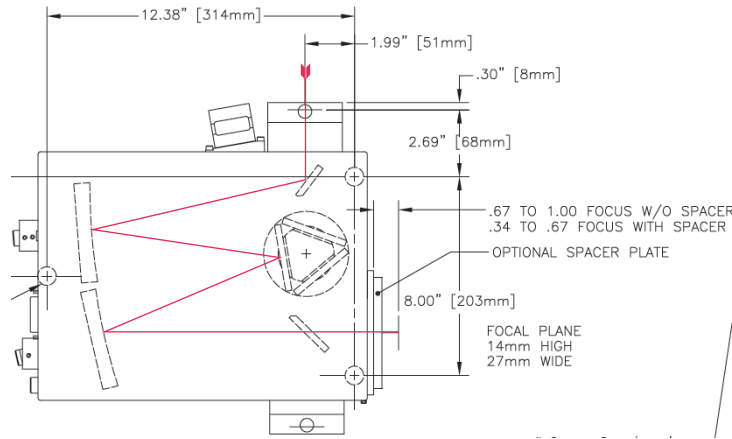


Abbildung 5.2: Aufbau des Acton Scientific ARC SpectroPro SP2358 Spektrographen. Die rote Linie zeigt den Strahlengang durch den Spektrographen an (Abbildung entnommen aus Ref. [200]).

Das Öffnungsverhältnis oder die F-Zahl f/Zahl eines Spektrographs ist als der halbe Kehrwert der NA des Spektrographs definiert [199]:

$$f/\text{Zahl} = \frac{1}{2NA} \quad (5.1)$$

Die f-Zahl des Spektrographen beträgt $f/3.9$ das entspricht einem halben Öffnungswinkel von 7.4 Grad. Um den Spektrograph voll auszuleuchten muss für die achromatische Linse mit der Brennweite von 40 mm der Durchmesser des Probestrahls 10 mm betragen, bei einer Brennweite von 35 mm dementsprechend ca. 8.75 mm, und bei der Brennweite von 30 mm ca. 7.5 mm. Der Spektrograph besitzt einen motorisierten Eintrittsspalt, der von $10 \mu\text{m}$ bis 3 mm variiert werden kann. Es ist mit einem drehbaren Gitterhalter zum Wechseln des Beugungsgitters ausgestattet. Es sind zwei Gitter in den Gitterhalter eingebaut: Das Erste besitzt 300 Linien/mm und ist für 750 nm „geblazet“, das Zweite

Gitterlinien pro mm	Spektrale Breite pro Pixel bei einer Ramanverschiebung von		
	1000 cm ⁻¹	2000 cm ⁻¹	3000 cm ⁻¹
300	6.6 cm ⁻¹	7.8 cm ⁻¹	9.2 cm ⁻¹
600	3.3 cm ⁻¹	6.6 cm ⁻¹	7.8 cm ⁻¹

Tabelle 5.1: Spektrale Breite eines Pixels der Hamamatsu-Diodenzeile in Verbindung mit dem Spektrographen (Acton Scientific ARC SpectroPro SP2358)

besitzt 600 Linien/mm und ist ebenfalls für 750 nm “geblazet”¹. Die Gitter haben bei der verwendeten Wellenlänge eine Effizienz von über 80 %. Die beiden gekrümmten Spiegel im Spektrographen (siehe Abbildung 5.2) sind mit Silber beschichtet. Nimmt man eine Reflektivität von 98 % an ergibt sich ein Durchsatz von ca 77 % für Licht bei der “geblazeten” Wellenlänge. Die theoretisch mögliche spektrale Auflösung eines Gitterspektrographen $A_{Gitter} = \lambda/\Delta\lambda$ entspricht der Zahl der ausgeleuchteten Gitterstriche [176]. Die spektrale Breite des Pumpimpulses begrenzt die Linienbreite der Ramanlinien auf 18 cm⁻¹. Das entspricht in Nanometern bei einer Ramanverschiebung von 3000 cm⁻¹ relativ zur zentralen Wellenzahl des Pumpimpulses einer Breite von 1.0 nm, bei einer Ramanverschiebung von 1000 cm⁻¹ einer Breite von 1.4 nm. Um eine etwaige Ramanbande aufzulösen müssen für eine solche Ramanbande bei 3000 cm⁻¹ ca. 760 Linien des Gitters beleuchtet werden, bei der niederfrequenten Schwingung bei 1000 cm⁻¹ sind es sogar nur 640 Linien. Diese Bedingung ist mit beiden Gittern (300 Linien/mm bzw. 600 Linien/mm) des Spektrographs leicht zu erfüllen. Die Gitter müssen hierfür bei Weitem nicht voll ausgeleuchtet werden. Die instrumentelle Auflösung des Spektrographen ist also nicht durch das Gitter beschränkt. Sie ist, sieht man von möglichen Abbildungsfehlern des Spektrographen ab, durch Eintrittspalt und Austrittspalt (i.e. ein Pixel des Detektors) begrenzt. Ein Pixel der verwendeten Hamamatsu-Diodenzeile (S3901-512Q, S8380-512Q, siehe Abschnitt 5.4.1) ist 50 μm breit. Der Eintrittspalt ist durch den Fokusbereich des Probelichtes am Eintrittspalt gegeben. Dieser ist ca. 30 bis 40 μm groß. Idealerweise ist der Fokusbereich kleiner. Der Durchmesser hängt aber unter Anderem auch von der Probe, den Objektiven und der Linse vor dem Spektrograph ab). Die gefaltete Breite von Eintritts- und Austrittspalt liegt damit zwischen 58 und 64 μm. Das entspricht mit der linearen Dispersion des 300 Linien/mm Gitters von 10.5 nm/mm einer spektralen Breite von maximal 0.67 nm und einer spektralen Breite von ca. 12 cm⁻¹ bei einer Ramanverschiebung von 3000 cm⁻¹ und ca. 8.4 cm⁻¹ bei einer Ramanverschiebung von 1000 cm⁻¹. Damit liegt man noch unter spektralen Bandbreite des Pumpimpulses von 18 cm⁻¹. Die Bande erfährt aber durch das Instrument eine leichte Verbreiterung. Es gilt auch zu berücksichtigen, dass man für eine gute Darstellung einer Bande mehr als einen Pixel benötigt. Während mit dem 300-Linien-Gitter die lineare Dispersion zu gering ist, um Ramanbanden bei 3000 cm⁻¹ aufzulösen, gelingt dies mit dem 600-Linien-Gitter (siehe Tabelle 5.1). Allerdings gelingt es mit dem 600-Linien-Gitter nicht den gesamten relevanten Spektralbereich eines Ramanspektrums (1000-3000 cm⁻¹)

¹Zum “Blaze” eines Gitters siehe Ref. [176]

auf den Detektor abzubilden, während dies mit dem 300-Linien-Gitter gelingt. Um eine hohe spektrale Auflösung bei gleichzeitiger vollständiger Abdeckung des Ramanspektrums zu erreichen, benötigt man eine Kamera die mehr Pixel und damit schmalere Pixel besitzt. Eine Diodenzeile mit 1024 Pixeln auf einer Länge von 25 Millimetern (z.B. Hamamatsu S8381-1024Q oder S3904-1024Q) reicht aus, um dies zu gewährleisten.

5.4 Detektion

Der Detektor des Experiments soll das Spektrum des Probeimpulses messen. Es handelt sich entweder um eine Photodiodenzeile oder eine Zeilen-CCD-Kamera. Er wird am Ausgang des Spektrographen in der Fokalebene des zweiten gekrümmten Spiegel des Spektrographen positioniert (vgl. Abb. 5.2). Das Licht des Probeimpuls ist entlang der Diodenzeile gemäß seiner Wellenlänge aufgespalten. Die Aufspaltung ist linear in der Wellenlänge und reziprok zur Frequenz. Jeder Pixel des Detektors detektiert einen spezifischen spektralen Bereich des Probeimpulses. Als Detektor wurden verschiedene NMOS-Diodenzeilen der Firma Hamamatsu (Typenbez.: S3901-512Q, S3904-1024Q, S8380-512Q, siehe Abschnitt 5.4.1) und zudem noch eine CCD-Zeilenkamera der Firma Quantum Detectors (Typenbez.: ULTRA, siehe Abschnitt 5.4.3) eingesetzt. Diese sollen in den nächsten Abschnitten beschrieben werden.

5.4.1 Hamamatsu-Diodenzeilen

Es wurden drei verschiedene Typen an NMOS-Diodenzeilen von Hamamatsu eingesetzt. Die Diodenzeilen unterscheiden sich nur in einigen wenigen Parametern und sind elektronisch identisch geschaltet: Der Typ S3901-512Q und der Typ S8380-512Q besitzen beide 512 Pixel, der Typ S3904-1024Q 1024 Pixel. Alle Diodenzeilen haben eine photoaktive Fläche von $25.6 \times 2.5 \text{ mm}^2$. Dementsprechend ist die Pixelbreite bei den Zeilen mit 512 Pixeln $50 \mu\text{m}$, bei der Zeile mit 1024 Pixeln $25 \mu\text{m}$, innerhalb dieser Breite ist zwischen zwei Pixeln eine $5 \mu\text{m}$ breite, nicht photoaktive Zone. Auch besitzen alle verwendeten Zeilen in der Summe aller Pixel die gleiche, gesamte Sättigungsladung von 25.6 nC . Die Diodenzeilen mit 512 Pixeln besitzen also eine Sättigungsladung von 50 pC pro Pixel, während die Diodenzeile mit 1024 Pixeln 25 pC pro Pixel aufnehmen kann. Die Diodenzeilen vom Typ S3901-512Q und S3904-1024Q besitzen die gleiche Sensitivität, der Typ S8380-512Q besitzt eine höhere Sensitivität im NIR als diese (siehe Abbildung 5.3). Im aktuellen Aufbau findet der Typ S8380-512Q Verwendung. Alle eingesetzten Diodenzeilen wurden mit Elektronik der Firma Tec5 angesteuert und ausgelesen. Die Elektronik besteht aus drei Bauteilen: Einer Vorverstärkerelektronik (TEC5 DZA-S3901-4 1M/STD), einer Highspeed Frontend Elektronik (TEC5 FEE-1M /NMOS-1 STD) und einer PCI-Karte (PD-PCIO1V1 /52-64k).

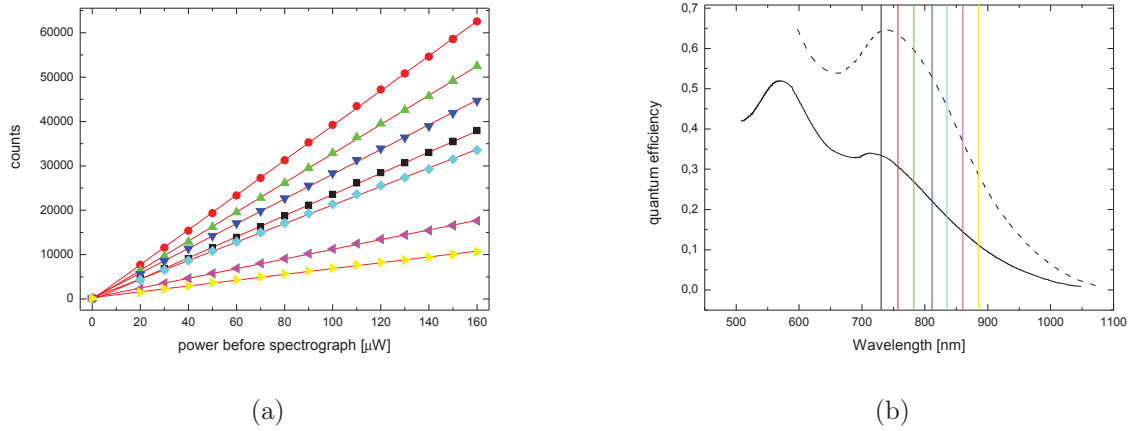


Abbildung 5.3: (a) Linearität der Hamamatsudiodenzeile S3901; (b) Quanteneffizienz der Diodenzeilen S3901 (durchgezogen) und S8380 (gestrichelt). Die durchgezogenen roten Linien in (a) sind lineare Anpassungen an die Messdaten. Die vertikalen Linien in (b) entsprechen den Wellenlängen in (a): schwarz: 730 nm; rot: 755.9 nm; grün: 781.7 nm; blau: 810 nm; cyan: 833.1 nm; lila: 858.6 nm; gelb: 884.1 nm. Die Daten für die Quanteneffizienz sind aus den Datenblättern der Diodenzeilen [201, 202] entnommen

5.4.2 Rolling-Shutter-Readout der Hamamatsu-Photodiodenzeile

Die Photodiodenzeile ist in eine Auslesestruktur integriert. Diese Struktur besteht aus einem Shiftregister und einzelnen Schaltern für jede Photodiode [203]. Trifft Licht auf die Photodioden, werden Ladungen getrennt. Die Ladungen werden lokal in der Sperrschichtkapazität der Photodiode gespeichert [203]. Die Photodioden der Photodiodenzeile werden in Serie ausgelesen. Dies geschieht, wenn der Schalter (ein Transistor) einer Photodiode von dem Shiftregister angesprochen wird (vgl. Abbildung 5.4). Die Ladungen werden über eine gemeinsame Leitung („Video line“), die mit allen Schaltern der Photodioden verbunden ist, ausgelesen. Nach jedem Ausleseereignis ist der Pixel wieder aufnahmebereit. Jeder Pixel integriert von Ausleseereignis zu Ausleseereignis alle Photoelektronen, die in diesem Zeitfenster erzeugt werden. Eine Messung mit der Photodiodenzeile wird durch einen elektronischen Starttrigger an das Shiftregister ausgelöst. Das Shiftregister adressiert dann der Reihe nach die einzelnen Schalter, die in Folge über die „Video line“ ausgelesen werden. Das Auslesedauer eines Pixel beträgt durch die interne Frequenz der Elektronik von 1 MHz $1 \mu\text{s}$. Die Auslesedauer für die ganze Diodenzeile ist demnach $1 \mu\text{s} \times \text{Pixelanzahl}$, entweder $512 \mu\text{s}$ oder $1024 \mu\text{s}$. Der Starttrigger wird extern von der Verzögerungserzeugungskarte bereitgestellt. Die Wiederholrate des Starttriggers und damit des Messzyklus ist im Experiment auf 1 kHz gesetzt. Die maximale Wiederholrate ist durch die Auslesezeit auf ca. 2 kHz begrenzt. Das serielle Auslesen der Pixel der Photodiodenzeilen führt in Verbindung mit der referenzierten Messung von FSR-Spektren zu einem systematischen Messfehler. Dieser Effekt ist in Abschnitt 5.6 genauer beschrieben.

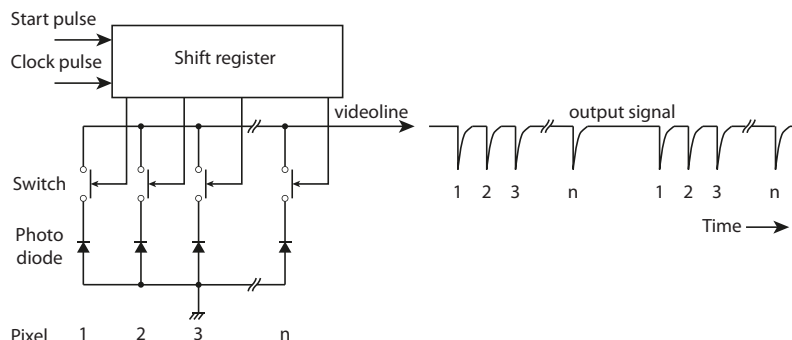


Abbildung 5.4: Schaltung (links) und Ausgangssignal (rechts) der Hamamatsu-Diodenzeile. Der Startimpuls (Start pulse) löst das Auslesen der Zeile aus. Das Schieberegister (Shift register) sendet daraufhin einen Schaltimpuls an den Schalter (Switch) der ersten Photo-diode. Daraufhin wird das Signal der ersten Diode über die Ausgangsleitung (video line) ausgelesen. Bei dem nächsten Impuls der Uhr (clock pulse) wird dann der Schalter des zweiten Pixels verbunden, und so fort. So werden alle Pixel der Reihe nach über die gleiche Ausgangsleitung ausgelesen (Die Abbildung ist abgeändert nach Ref. [203])

5.4.3 Der “ULTRA“-Detektor

Der “ULTRA“-Detektor wurde für die zeitaufgelöste Spektroskopie mit einem 10 KHz-Lasersystem entwickelt [204]. Es ist ein vollständig integrierter, Silizium-basierter Detektor, der mit einer maximalen Rate von 20 kHz alle 512 Pixel auslesen kann. Der Detektor besitzt eine $25.6 \times 1 \text{ mm}^2$ große photoaktive Fläche. Ein Pixel hat demnach eine Breite von $50 \text{ }\mu\text{m}$. Die Sättigungsladung eines Pixels beträgt 10 pC. Der Detektor kann mit einem Peltiersystem bis zu einer Temperatur von -20 Grad Celsius gekühlt werden [204]. Das Auslesen geschieht mit einem “global shutter“, d.h. alle Pixel werden in einem Zug während einer Totzeit des Detektors ausgelesen. Die Totzeit des Detektors beträgt ca. $2 \text{ }\mu\text{s}$. Das Rauschen eines Pixels des Detektors ist durch Schrotrauschen begrenzt, wenn mehr als 1.6×10^6 Photonen pro Ausleseereignis auf den Pixel treffen [204].

5.5 Erzeugung der Modulation des Pumplichtes

Das stimulierte Ramanspektrum wird referenziert gemessen. Das bedeutet, der stimulierte Ramanverlust im Spektrum des Probeimpulses wird auf das unveränderte Spektrum des Probeimpulses bezogen. Im Experiment geschieht die Referenzierung immer zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen. Dadurch registriert die Messung Schwankungen in dem Probespektrum, die auf einer längeren oder kürzeren Zeitskala als das Messintervall auftreten, nicht. Um in zwei aufeinander folgenden Messungen, einmal das Spektrum mit Ramanverlust und einmal das unveränderte Spektrum zu messen, wird das Pumplicht mit der halben Messfrequenz kastenförmig moduliert, das heißt abwechselnd ein- und aus-

geschaltet. Ein Messzyklus eines stimulierten Ramanspektrums besteht immer aus einer Dauer in der das Pumplicht anwesend ist und einer Dauer in der das Pumplicht geblockt oder unterdrückt ist.

Dies wurde auf zwei unterschiedliche Arten realisiert: Einmal mechanisch, mit einer segmentierten, rotierenden Scheibe, einem sogenannten “Chopper“-Rad, die das Licht abwechselnd blockt und durchlässt, das andere Mal elektronisch, über den Pumpdiodenstrom der zweiten Verstärkerstufe des Faserverstärkers (siehe Abschnitt 3.2.6). Der “Chopper“ (New Focus, Model 3501) ist einfach zu implementieren. Man kann mit ihm sowohl den verstärkten Pumpimpuls als auch den unverstärkten “Seed“-Impuls (siehe Abbildung 5.5) modulieren. Da er am optischen Tisch festgeschraubt werden muss, übertragen sich mechanische Vibrationen vom “Chopper“ auf den optischen Tisch. Diese Vibrationen tragen zum Rauschen der gesamten Messung bei. Dies wird vermieden, wenn man zur Modulation des Lichtes den Pumpdiodentreiber (Thorlabs ITC 510) der zweiten Stufe des Faserverstärkers verwendet. Mit dem Pumpdiodentreiber kann der Strom der Pumpdiode über ein analoges Steuersignal mit einer maximalen Frequenz von 200 kHz moduliert werden. Das Steuersignal ist eine Rechteckfunktion mit variabler Frequenz und Amplitude, die aus einem TTL-Signal der Verzögerungserzeugungskarte mit einem CMOS-Logikbaustein gewonnen wird. Die Rechteckfunktion des Steuersignals setzt den Strom der Pumpdiode abwechselnd auf den maximalen Wert (350 mA) und wenige mA (Ein Wert unter Null sollte zum Schutz der Diode vermieden werden.). Die ungepumpte zweite Verstärkerstufe (Diodenstrom gleich Null) absorbiert den Großteil des Ausgangssignals der ersten Stufe. Das Pumplicht wird unterdrückt. Wird die zweite Stufe gepumpt (voller Diodenstrom), emittiert der Faserverstärker das vollständig verstärkte Signal. Der stationäre Zustand für die Verstärkungstätigkeit der zweiten Stufe, stellt sich nach einem kurzen Zeit ein. Die Zeit bis zum Erreichen der halben stationären Amplitude des Ausgangssignals beträgt ca. 65 μ s (siehe Abbildung 5.5).

Die höchste Modulationsfrequenz, die mit dem “Chopper“-Rad erreicht werden kann, beträgt laut Handbuch 6.4 kHz. Bei dem Diodentreiber ist die maximale Modulationsfrequenz mit 200 kHz angegeben. Die Verstärkungsdynamik der Ytterbiumionen-dotierten Faser begrenzt den Wert vermutlich schon früher. In der Abbildung 5.5 sieht man eine Verzögerung des Aufbaus der Verstärkungstätigkeit von ca. 65 μ s. Das entspricht einer Frequenz von ca. 15 kHz. Wenn man eine schnellere Modulation erreichen will, muss man auf akusto-optische [119] oder elektro-optische [108] Modulatoren zurückgreifen.

5.6 Messmethoden in der FSRM

In diesem Abschnitt soll die “Phasestepping“-Methode [197] als alternative Messmethode zu der direkten Referenzierung für die Messung von stimulierten Ramanspektren vorgestellt werden. Die direkte Referenzierung führt in Verbindung mit dem “Rolling-Shutter“ der Diodenzeilen von Hamamatsu (siehe Abschnitt 5.4.2) zu einem systematischen Messfehler. Dieser Messfehler verringert die gemessenen absoluten Ramanbandenhöhen und ebenso das Verhältnis der Bandenhöhen zueinander. Er kann im ungünstigsten Fall das Signal

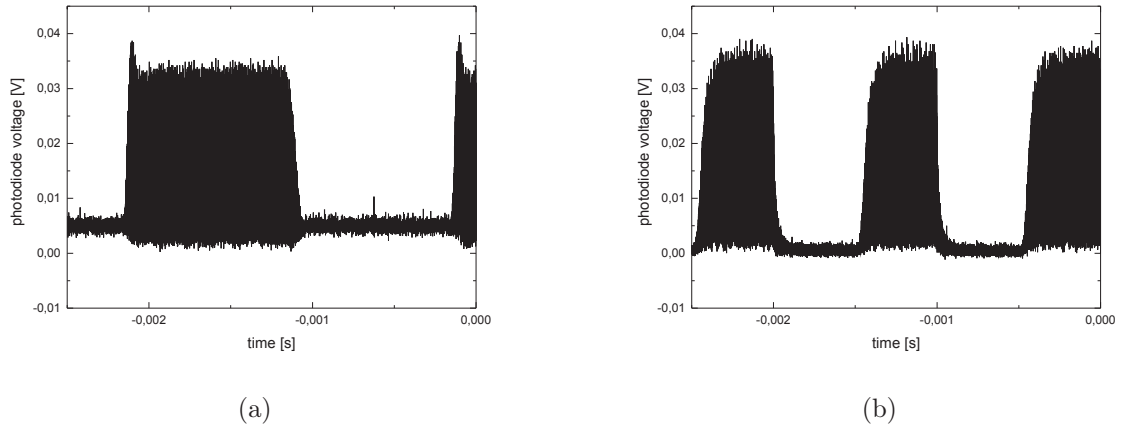


Abbildung 5.5: Modulation des Pumplichtes mit ‘Chopper’-Rad (a) bzw. Strom der Pumpdiode der zweiten Verstärkungsstufe (b). Das ‘Chopper’-Rad moduliert den ‘Seed’-Impuls des Verstärkers mit 500 Hz. Das Signal zeigt am Anfang des Zyklus eine Überhöhung, da die Inversion der Verstärkerstufe noch von der ASE bestimmt wird und sich erst dem stationären Wert anpassen muss. Die Modulation des Diodenstroms erfolgt mit 1 kHz. Am Anfang des Zyklus muss sich erst das Gleichgewicht der Verstärkungstätigkeit aufbauen.

vollständig auslöschen. Eine quantitative Auswertung ist demnach mit der referenzierten Messmethode nicht möglich. Die ‘Phasestepping’-Methode [197] kann diesen systematischen Messfehler deutlich abmildern. Der relative Fehler der absoluten Bandenhöhen beträgt dann maximal noch einige Prozent. Beide Messverfahren zeigen das gleiche relative Rauschen (siehe Kapitel 6). Insgesamt ist das ‘Phasestepping’ die adäquate Messmethode zur Messung von stimulierten Ramanspektren mit einem Vielkanaldetektor mit ‘Rolling-shutter’.

Der Abschnitt ist wie folgt aufgebaut: Zunächst wird der theoretische Signalverlauf für beide Messmethoden beschrieben. Dann wird die referenzierte Messmethode dargestellt und die Ursache des systematischen Fehlers aufgezeigt. Dieser wird anhand des Ramansignals der Substanz Benzonitril illustriert. Es folgt die Darstellung der ‘Phasestepping’-Methode und entsprechender Spektren, die mit Hilfe dieser Methode gemessen wurden. Abschließend wird der Einfluss der Anzahl der Messungen innerhalb eines Messintervalls bei der ‘Phasestepping’-Methode auf das Signal erläutert.

5.6.1 Theoretischer Signalverlauf bei der Messung des Ramansignals

Die einzelnen Messwerte, aus denen mit Hilfe der beiden Messmethoden das stimulierte Ramanverlustsignal berechnet wird, können mit einem theoretischen Kurvenverlauf beschrieben werden. Die Messfrequenz F_{mess} ist ein ganzes Vielfaches der Lichtmodulationsfrequenz F_{mod} , also $F_{mess} = N \cdot F_{mod}$ mit $N \geq 2$. Im Experiment ist die Messfrequenz des Detek-

tors unveränderlich 1 kHz, demnach die Lichtmodulationsfrequenz auf eine subharmonische Frequenz von 1 kHz angepasst. Die N Messungen eines Messzyklus tasten den zeitlichen Verlauf der spektralen Intensität des Probeimpulses im zeitlichen Abstand von einer Millisekunde ab. Bei einer Ramanbande ist die spektrale Intensität des Probeimpulses durch die Wechselwirkung mit dem Pumpimpuls rechteckförmigmoduliert. Die Integrationszeit jedes Pixels beträgt eine Millisekunde. Der theoretische Verlauf der Messwerte folgt deswegen nicht einer Rechteckfunktion, sondern entspricht der Faltung zwischen dem 1 Millisekunde andauernden Integrationsfenster und der N Millisekunden andauernden Lichtmodulation. Das ist im allgemeinen eine Trapezform (siehe Abbildung 5.6). Die Form des Trapezes ändert sich jedoch mit der Ordnung N der subharmonischen Frequenz der Lichtmodulation: Bei der referenzierten Messung mit $N = 2$ ist die Integrationsdauer eines Pixel so lang wie der “AN“-Zustand oder der “AUS“-Zustand der Lichtmodulation. Der theoretische Verlauf der Messwerte besitzt dann eine reine Dreiecksform (siehe Abbildung 5.7). Es existiert nur ein “korrekter“ Messzeitpunkt an der Spitze des Dreiecks.

Ist $N > 2$, dauern die Zustände der Lichtmodulation länger an als das Integrationsfenster. Der theoretische Signalverlauf ist trapezförmig (siehe Abbildung 5.6). Der Übergang zwischen dem “AN“- und dem “AUS“-Signal erfolgt in einer Millisekunde. Sowohl das volle “AN“- als auch das volle “AUS“-Signal der Modulation sind $N/2 - 1$ Millisekunden messbar. Je größer N ist, umso mehr nähert sich der theoretische Signalverlauf wieder einer Rechteckfunktion an. Der Signalverlauf $f(\Phi)$ lässt sich in Abhängigkeit von der Phase $(\Phi + \Phi_0 \in \{-\pi/N, \pi/N\})$ innerhalb des Messzyklus wie folgt definieren:

$$B + \frac{A \times N}{2\pi} \times \Phi \quad \text{für } \Phi + \Phi_0 \in \{-\pi/N, \pi/N\} \quad (5.2)$$

$$B + A/2 \quad \text{für } \Phi + \Phi_0 \in \{\pi/N, \pi - \pi/N\} \quad (5.3)$$

$$B + \frac{A \times N}{2\pi}(\pi - \Phi) \quad \text{für } \Phi + \Phi_0 \in \{\pi - \pi/N, \pi + \pi/N\} \quad (5.4)$$

$$B - A/2 \quad \text{für } \Phi + \Phi_0 \in \{\pi + \pi/N, 2\pi - \pi/N\} \quad (5.5)$$

$$(5.6)$$

A ist die Amplitude der Modulation des Messsignals, B der mittlere Abstand zur Nulllinie. $2\pi/N$ entspricht immer einer Millisekunde. Die Phasenverschiebung Φ_0 beschreibt z.B. eine zeitlich verschobene Detektion des Signals. Die von Diode zu Diode verschobenen Integrationsfenster aufgrund des “Rolling-Shutter“ (siehe Abschnitt 5.4.2) führen zu einer Phasenverschiebung von $2\pi/(N \cdot 1000)$ zwischen zwei benachbarten Pixeln. In Abbildung 5.6 ist diese Phasenverschiebung zwischen den einzelnen Dioden der Zeile deutlich gemacht. Dieses Signal wiederholt sich mit der Frequenz der Lichtmodulation.

5.6.2 Die referenzierte Messung stimulierter Ramanspektren

Bei der referenzierten Messung eines stimulierten Ramanspektrums besteht ein Messzyklus aus zwei Messungen. Die erste Messung misst ein Probespektrum, welches durch die Wechselwirkung mit Pumplicht und Probe eine stimulierte Ramanverlustsignatur aufweist. Bei

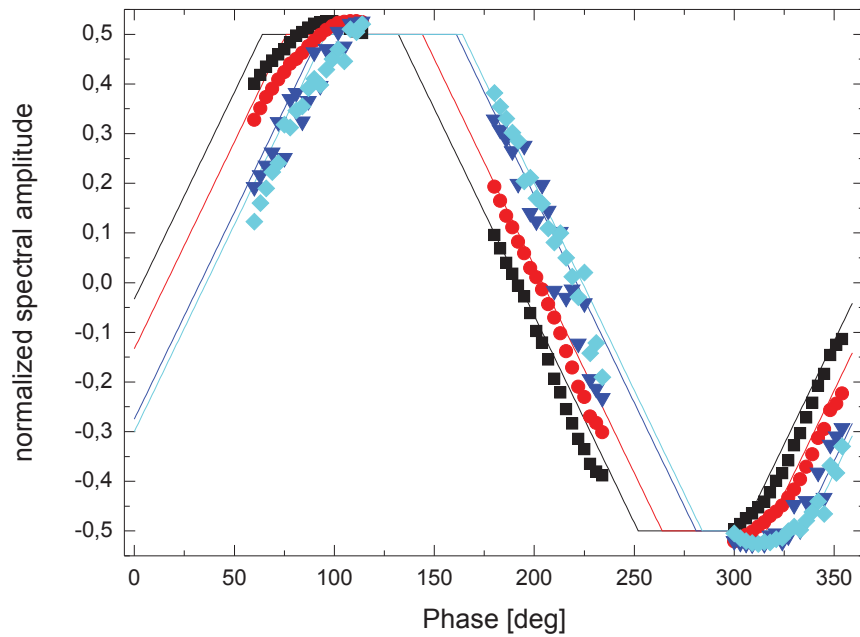


Abbildung 5.6: Der Verlauf der spektralen Intensität mit der Lichtmodulation bei der subharmonischen Frequenz $333 \text{ Hz} = 1 \text{ kHz}/3$ in Abhängigkeit der Phase im Messzyklus. Es ist die normierte, spektrale Intensität des Probespektrums bei einigen Ramanbanden von Benzonitril (schwarz entspricht der Bande bei 3068 cm^{-1} oder Pixel 152 der Diodenzeile; rot $=2228 \text{ cm}^{-1}$, Pixel 251; blau $=1192 \text{ cm}^{-1}$, Pixel 394; cyan $=999 \text{ cm}^{-1}$, Pixel 422) in Abhängigkeit der Phase für alle drei Messungen des Messzyklus angezeigt. Durchgezogen ist der theoretische Verlauf nach Gleichung 5.7 und der jeweiligen Pixelposition der Bande dargestellt. Messwerte sind als Symbole aufgetragen.

der zweiten Messung wird das Pumplicht geblockt und das Spektrum des Probelichtes ist “unverändert“. Natürlich durchläuft das Probelicht auch bei der zweiten Messung die Probe. Dabei kann es gestreut oder absorbiert, also auch verändert werden. Diese Änderung tritt bei beiden Messungen in gleichem Maße auf. Um das stimulierte Ramanspektrum zu ermitteln wird nach Gleichung 4.11 das erste Spektrum (Mit Ramanverlust) durch das Zweite (Ohne Ramanverlust) geteilt. Dabei heben sich alle Veränderung des Probespektrums, die nicht vom Pumpimpuls induziert sind, auf. Die referenzierte Messmethode setzt voraus, dass die Modulation des Pumplichtes (siehe Abschnitt 5.5) mit dem Auslesen der Kamera richtig synchronisiert ist. Während der Integrationszeit der Messung des Probespektrums mit dem Ramanverlust, muss das Pumplicht auch in der Probe anwesend sein. Der Anfangspunkt der Integrationszeit muss mit dem Einsetzen des “An“-Zustandes des Pumplichtes übereinstimmen. Ebenso muss beim Messen des Referenzspektrums während der Integrationszeit das Pumplicht immer geblockt sein. Der relative, zeitliche Abstand Δt_{mess} zwischen Initialisierung eines Pixels am Anfang des Integrationsfensters und Einsetzen des “An“-Zustandes in der Lichtmodulation kann als Phase Φ_{mess} innerhalb des Messzyklus interpretiert werden. Der Messzyklus eines Pixels dauert bei der referenzierten Messung 2 ms, der Modulationsfrequenz f_{mod} von 500 Hz entsprechend. Für Φ_{mess} folgt $\Phi_{mess} = t_{mess} \times f_{mod} \cdot 360^\circ$.

In der ersten Millisekunde trifft das Pumplicht auf die Probe in der zweiten Millisekunde ist das Pumplicht geblockt. Wenn die Initialisierung des Pixels zeitgleich mit dem “An“-Zustand eintritt, also $\Delta t_{mess} = \Phi_{mess} = 0$, wird das maximale Signal gemessen. Diese Bedingung kann mit den im Experiment verwendeten Photodiodenzeilen von Hamamatsu nicht für alle Pixel gleichzeitig erfüllt werden, da nicht alle Pixel zum gleichen Zeitpunkt ausgelesen und initialisiert werden (siehe Abschnitt 5.4.2). Vielmehr besitzt jeder Pixel einen eigenen Start- und Endpunkt für die Integration, da die Pixel in Reihe ausgelesen werden. Das Messfenster verschiebt sich systematisch von Pixel zu Pixel um $1 \mu s$. Vom ersten zum letzten Pixel also um $512 \mu s$. Das führt zu einem systematischen Messfehler im referenziert gemessenen Ramanspektrum. Ist R_{abs} die absolute Höhe des Ramansignals eines Pixels und S das unveränderte spektrale Signal des Probelichtes, so folgt für das gemessene relative Ramansignal $R(\Phi_{mess})$:

$$R(\Phi_{mess}) = \frac{R_{abs} - 2|\Phi_{mess}|R_{abs}}{S - |\Phi_{mess}|R_{abs}} \approx \frac{R_{abs} - 2|\Phi_{mess}|R_{abs}}{S} \quad (5.7)$$

Stimmen die Startpunkte von Lichtmodulation und Integrationsfenster eines Pixels nicht überein, also $\Phi_{mess} \neq 0$, überspannt das Messfenster der beiden Messungen sowohl den “An“-Zustand als auch den “Aus“-Zustand des Pumplichtes. Die Referenzierung liefert nicht mehr die volle Amplitude. Wenn die Messpunkte eines Messzyklus gegenphasig zur Lichtmodulation sind, d.h. $\Phi_{mess} = 1/2$, hebt sich die Ramanverluststreuung beider Messungen sogar vollständig auf. Der erste Pixel ist relativ zum 500. Pixel durch das serielle Auslesen automatisch gegenphasig.

5.6.3 Ramanspektren unter Variation der Zeit des Starttriggers der Messung

Der systematische Messfehler der referenzierten Messung führt im Experiment zu verringerten Ramanbandenhöhen, jedoch nicht zwangsläufig aller Banden. Vielmehr entscheidet die Phase Φ_{mess} zwischen Lichtmodulation und Trigger welcher Pixel das maximale und korrekte Ramansignal misst. Das Signal aller anderen Pixel fällt nach Gleichung 5.7 linear mit dem Abstand zu dem Pixel mit dem maximalen Ramansignal ab, wobei der Abstand der Pixel proportional zur Phase Φ_{mess} ist. Mit Hilfe der Verzögerungserzeugungskarte kann man die Phase zwischen Lichtmodulation und Messung verändern. In Abbildung ist die Veränderung der Ramanbandenhöhen in Abhängigkeit von dieser Phase dargestellt. Bei

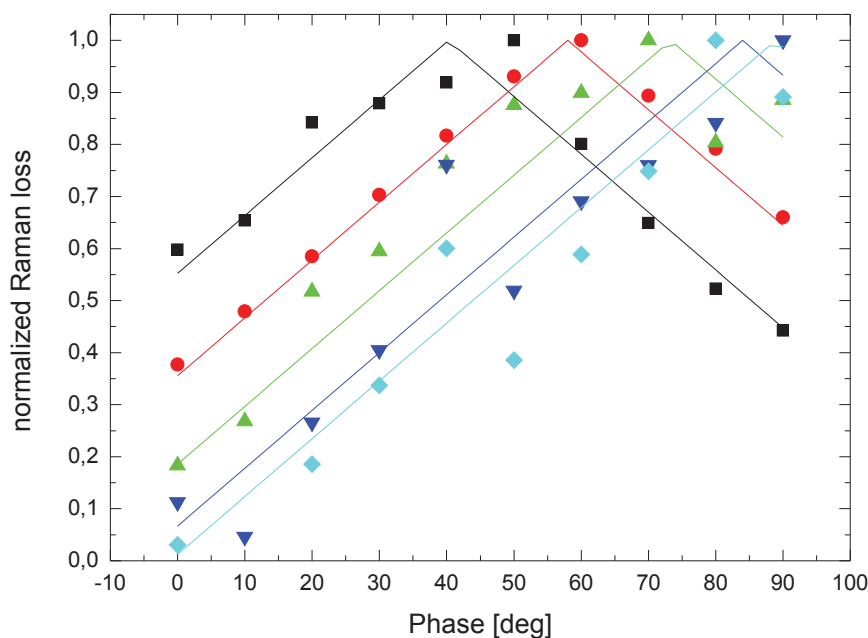


Abbildung 5.7: Phasenfehler des Ramanverlustsignals bei der referenzierten Messmethode. Es ist das normierte Ramanverlustsignal einiger Ramanbanden von Benzonitril (schwarz entspricht der Bande bei 3068 cm^{-1} oder Pixel 146 der Diodenzeile; rot $=2228\text{ cm}^{-1}$, Pixel 244; grün $=1597\text{ cm}^{-1}$, Pixel 327; blau $=1192\text{ cm}^{-1}$, Pixel 388; cyan $=999\text{ cm}^{-1}$, Pixel 415) gegen die Phase im Messzyklus zwischen Lichtmodulation und Messereignis aufgetragen. Durchgezogen ist der theoretische Verlauf nach Gleichung 5.7 und der jeweiligen Pixelposition der Bande dargestellt, Messwerte sind als Symbole aufgetragen.

einer “normalen“ Messung mit der referenzierten Methode wird die Phase so eingestellt, dass der Pixel mit dem korrekten Ramansignal in etwa in der Mitte der Diodenzeile liegt. Die Pixel am Rand zeigen dann theoretisch eine Abnahme des Ramansignals um ca. 50 %.

5.6.4 Die “Phasestepping“-Methode

Die “Phasestepping“-Methode [197] erlaubt für jeden Pixel eine Rekonstruktion der Signalmodulation durch die Ramanstreuung. Um dies zu ermöglichen, müssen in einem Messzyklus mehr als zwei Messungen getätigt werden. Ein Messzyklus deckt auch hier (vgl. Abschnitt 5.6.2) eine Periode der Lichtmodulation ab. Der Algorithmus beruht auf der Fourierreihenentwicklung [205] des periodischen Messsignals (zur Form des Messsignals siehe Abschnitt 5.6.1). Jede periodische Funktion $f(\Phi)$ kann durch eine Summe aus trigonometrischen Funktionen genähert werden [205]:

$$S(\Phi) = \frac{a_0}{2} + a_1 \cos \Phi + a_2 \cos 2\Phi + \dots \\ + a_1 \sin \Phi + a_2 \sin 2\Phi + \dots \quad (5.8)$$

Hierbei erreicht man die beste Annäherung der Funktion $S(\Phi)$ an die Funktion $f(\Phi)$, wenn für die Koeffizienten a_k und b_k gilt [205]:

$$a_k = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} f(\Phi) \cos(k\Phi) d\Phi \quad (5.9)$$

$$b_k = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} f(\Phi) \sin(k\Phi) d\Phi \quad (5.10)$$

Die Kosinuskoeffizienten a_k und Sinuskoeffizienten b_k können also aus dem Funktionsverlauf von $f(\phi)$ bestimmt werden. Bei der “Phasestepping“-Methode ist der Funktionsverlauf nur punktwise bekannt. Trotzdem können die Integrale in den Gleichungen 5.9 mit Hilfe einer numerischen Integration angenähert werden. Es gilt mit Hilfe der Trapezformel zur Integration [205]:

$$a_k \approx \tilde{a}_k = \frac{2}{N} \sum_{\nu=0}^{N-1} f(\Phi_\nu) \cos k\Phi_\nu, \quad b_k \approx \tilde{b}_k = \frac{2}{N} \sum_{\nu=0}^{N-1} f(\Phi_\nu) \sin k\Phi_\nu \quad (5.11)$$

Mit den Stützstellen $\Phi_\nu = \frac{2\pi}{N}\nu$ und $\nu = 0, 1, \dots, N-1$. Die Stützstellen sind äquidistant in der Phase. Bei der “Phasestepping“-Methode wird das sichergestellt, in dem die Messfrequenz immer ein ganzes Vielfaches der Lichtmodulationsfrequenz ist. Der Fehler der numerischen Integration hängt von der Anzahl der Stützstellen ab: Je mehr Stützstellen, umso korrekter wird die Integration. Ein stetiger Funktionsverlauf von $f(\Phi)$ würde die Genauigkeit noch mehr erhöhen [205].

Bei der “Phasestepping“-Methode wird die Reihenentwicklung auf die ersten beiden Glieder mit den Koeffizienten $\tilde{a}_0, \tilde{a}_1, \tilde{b}_1$ beschränkt. Das nullte Glied $\tilde{a}_0/2$ der Fourierreihenentwicklung entspricht nach Gleichung 5.11 dem Mittelwert der Messwerte eines Zyklus. Nach der analytischen Gleichung 5.2 des Funktionsverlaufs entspricht das nullte Glied dem Abstand zur Nulllinie $B = a_0/2$. Durch Vergleich der analytischen Lösung mit der numerischen Lösung folgt $\tilde{a}_0/2 = B$. Mit Hilfe der beiden Koeffizienten $\tilde{a}_1, \tilde{b}_1$ soll die Amplitude A und die Phasenverschiebung Φ_0 des Funktionsverlaufs $f(\Phi + \Phi_0)$ einer Messung bestimmt

werden. Die analytische Integration nach Gleichung 5.9 des theoretischen Funktionsverlaufs $f(\Phi + \Phi_0)$ führt zu folgenden Ausdrücken für die Koeffizienten a_1, b_1 [205]:

$$a_1 = \frac{2AN}{\pi^2} \sin \frac{\pi}{N} \sin \Phi_0 \quad (5.12)$$

$$b_1 = \frac{2AN}{\pi^2} \sin \frac{\pi}{N} \cos \Phi_0 \quad (5.13)$$

Aus den Koeffizienten a_1, b_1 läßt sich die Amplitude A und die Phase Φ_0 der Modulation berechnen:

$$A = \frac{\pi^2}{2N} \sqrt{a_1^2 + b_1^2} \left(\sin \frac{\pi}{N} \right)^{-1} \quad (5.14)$$

$$\Phi_0 = \arctan \frac{a_1}{b_1} \quad (5.15)$$

Für große N vereinfacht sich die Gleichung für die Amplitude zu:

$$A = \frac{\pi}{2} \sqrt{a_1^2 + b_1^2} \quad (5.16)$$

Aus der Amplitude A und dem Untergrund B läßt sich das relative Ramanverlustsignal R (siehe Abschnitt 4.11) bestimmen:

$$R = \frac{A}{B + A/2} \approx \frac{A}{B} \approx \frac{\pi \sqrt{a_1^2 + b_1^2}}{a_0} \quad (5.17)$$

Das rekonstruierte Ramanverlustsignal R ist nach Gleichung 5.14 und Gleichung 5.9 von der Phase Φ_0 unabhängig. Das bedeutet, dass das Signal der einzelnen Dioden theoretisch nicht mehr von der Position in der Diodenzeile abhängt.

Die numerisch bestimmten Koeffizienten $\tilde{a}_1, \tilde{b}_1$ weichen jedoch von den analytischen bestimmten Koeffizienten a_1, b_1 (siehe Gleichungen 5.12, 5.13) ab. Das Verhalten der numerisch bestimmten Koeffizienten unterscheidet sich qualitativ bei einer geraden Anzahl von Messungen von dem Verhalten bei einer ungeraden Anzahl von Messungen. Bei einer geraden Anzahl von Messwerten ist die numerische Integration nach Gleichung 5.11 dabei deutlich stärker mit Fehlern behaftet [197]. Deswegen werden hier nur die Formeln für eine ungerade Anzahl von Messungen angegeben:

$$\tilde{a}_1 = \frac{A}{\pi} \cos^2 \left(\frac{\pi}{2N} \right) \Phi_0 \quad (5.18)$$

$$\tilde{b}_1 = \frac{A}{\pi} \sin \left(\frac{\pi}{N} \right) \left(\frac{\pi}{N (1 - \cos(\frac{\pi}{N}))} - \Phi_0 \right) \quad (5.19)$$

$$\text{mit } \Phi_0 \in \left(0, \frac{\pi}{N} \right)$$

Aus den Koeffizienten $\tilde{a}_1, \tilde{b}_1$ kann man eine numerisch berechnete Amplitude $\tilde{A}$ nach Gleichung 5.14 berechnen:

$$\begin{aligned}\tilde{A} &= \frac{\pi^2}{2N} \sqrt{\tilde{a}_1^2 + \tilde{b}_1^2} \left(\sin \frac{\pi}{N} \right)^{-1} \\ &= \Delta \sqrt{\left(\frac{\cot \left(\frac{\pi}{2N} \right)}{4} \right)^2 + \left(\frac{\Phi_0 N}{2\pi} - \frac{1}{4} \right)^2} \\ \text{mit } \Delta &= A \frac{\pi^2}{N^2} \sqrt{2 \left(1 + \cos \left(\frac{\pi}{N} \right) \right)} \left(\sin \frac{\pi}{N} \right)^{-1} \\ \text{für } \Phi_0 &\in \left(0, \frac{\pi}{N} \right)\end{aligned}\tag{5.20}$$

Die numerisch berechnete Amplitude $\tilde{A}$ ist für ungerade N periodisch in der Phase Φ_0 mit einer Periodendauer von π/N . Sie ist für $N = 3, 5, 7$ in Abbildung 5.8 in Abhängigkeit von der Phase $\Phi_0 \in (0, \frac{\pi}{N})$ dargestellt.

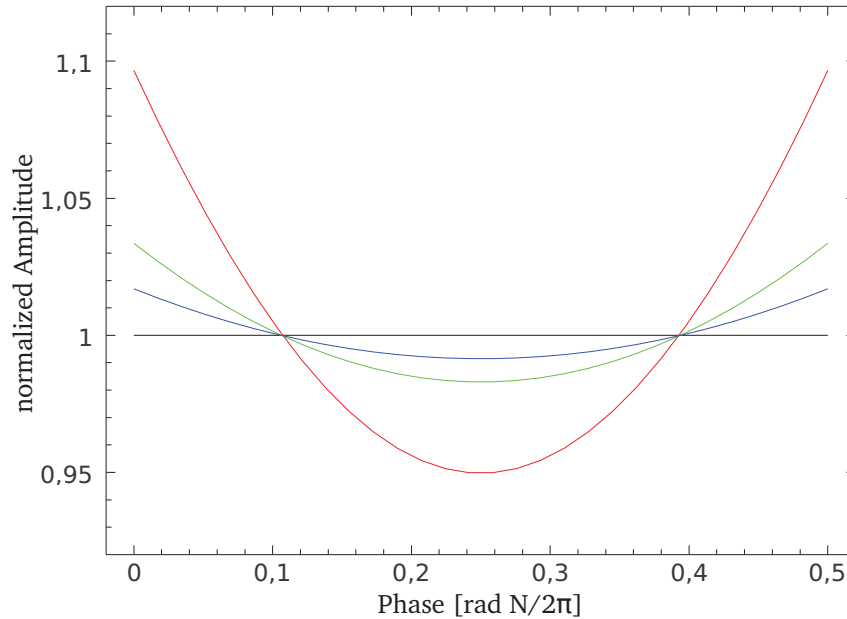


Abbildung 5.8: Amplitudenfehler bei der “Phasestepping“-Methode. Es ist die theoretische, normalisierte Amplitude $\tilde{A}$ nach Gleichung 5.20 für $N=3$ (rot), 5 (grün), 7 (blau) gegen die Phase Φ_0 aufgetragen.

Die Abweichung von der tatsächlichen Modulationsamplitude A sinkt mit der Ordnung N . In Tabelle 5.2 sind die maximalen, prozentuellen Abweichungen für $N = 3, 5, 7$ aufgelistet. Selbst bei der am stärksten mit Fehlern behafteten Ordnung $N = 3$ ist die prozentuelle Abweichung zwischen Minimum und Maximum nur ca. 15 %. Die Ursache der Abwei-

	Maximum	Minimum	Differenz
N=3	1.0966	0.9497	0.1469
N=5	1.0336	0.9830	0.0506
N=7	1.0170	0.9915	0.0255

Tabelle 5.2: Systematischer Amplitudenfehler der “Phasestepping“-Methode für $N = 3, 5, 7$

chung ist die unstetige Modulation des Signals. Trotzdem ermöglicht der “Phasestepping“-Algorithmus eine drastische Verbesserung der gemessenen relativen und absoluten Signalhöhen. Bei der Messung ist zu beachten, dass mit der Ordnung N nicht nur der Messfehler sinkt, sondern auch die Messzeit pro Messzyklus steigt. Bei einer niedrigeren Messfrequenz kann das gemessene Rauschen steigen (siehe Kapitel 6), da man sensitiver für Umwelteinflüssen auf der längeren Zeitskala wird.

5.6.5 Ramanspektren mit “Phasestepping“

Bei der Messung von Ramanspektren mit der “Phasestepping“-Methode sind alle Ramanbanden bis auf eine kleine systematische Abweichung unabhängig von der Phase Φ_0 . Dies wurde im Experiment mit Messungen an dem Molekül Benzonitril nachgewiesen (siehe Abbildung 5.9). Die genaue Abhängigkeit von der Phase ist nur bei den starken Banden bei 3068 cm^{-1} (schwarz) und 2228 cm^{-1} (rot) zu erkennen, bei den anderen Banden ist die Streuung der Messwerte größer als der systematische Messfehler. Die systematische Abweichung ist aber deutlich geringer als bei der referenzierten Messmethode (siehe Abbildung 5.7). Die “Phasestepping“-Methode zeigt auch im Experiment eine geringere systematische Abweichung der Ramanbandenhöhen wie es die theoretische Beschreibung erwarten lässt (siehe Abschnitt 5.6.4). Es ist die adäquate Messmethode für einen Vielkanal-Detektor mit einem “Rolling Shutter“. In Abschnitt 7.1.4 werden mit dieser Methode gemessenen Spektren im Vergleich zu Spektren, welche mit der referenzierten Methode gemessen wurden, gezeigt.

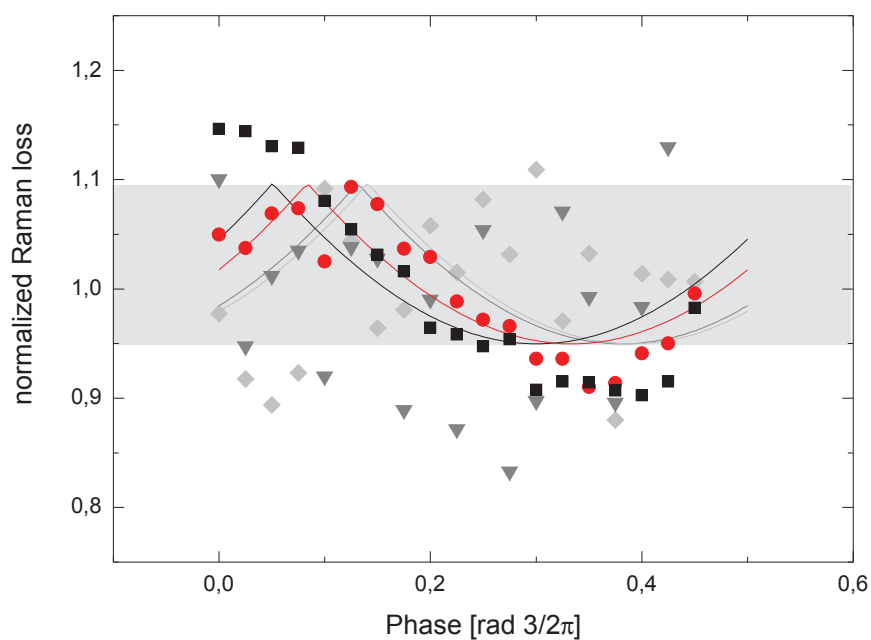


Abbildung 5.9: Phasenfehler des Ramanverlustsignals für $N=3$. Es ist das normierte Ramanverlustsignal einiger Ramanbanden von Benzonitril (schwarz entspricht der Bande bei 3068 cm^{-1} oder Pixel 152 der Diodenzeile; rot $=2228\text{ cm}^{-1}$, Pixel 251; grau $=1192\text{ cm}^{-1}$, Pixel 394; hellgrau $=999\text{ cm}^{-1}$, Pixel 422) in Abhängigkeit der Phase angezeigt. Durchgezogen ist der theoretische Verlauf nach Gleichung 5.20 und der jeweiligen Pixelposition der Bande dargestellt, Messwerte sind als Symbole aufgetragen. Der prozentuale Bereich des systematischen Fehlers ist hellgrau unterlegt.

Kapitel 6

Rauschbeiträge in der FSRM

In diesem Kapitel sollen die wesentlichen Beiträge zum Rauschen bei einer Messung eines Ramanspektrums und damit der Bildgebung anhand dieser Spektren dargestellt werden. Das Rauschen begrenzt die kürzeste Messzeit eines Spektrums und damit auch die kürzeste Aufnahmezeit eines Bildes. Anders formuliert, begrenzt das Rauschen die Sensitivität des Experimentes für eine festgesetzte Messzeit (siehe Abschnitt 6.3). Letztlich sollte eine beliebig lange Messzeit, eine beliebig hohe Sensitivität ermöglichen. Im realen Experiment hängt dies vom statistischen Charakter des Rauschens ab. Zunächst soll der Messprozess in seinem Ablauf geschildert werden (siehe Abbildung 6.1), um aufzuzeigen wie sich die einzelnen Rauschquellen im Messergebnis niederschlagen. Die Messgröße des Experimentes ist das Spektrum des Probeimpulses. Das Rauschen ist eine zeitliche Fluktuation des Messsignals um seinen Mittelwert. Zur Vereinfachung betrachten wir nur das Messsignal einer einzelnen Diode aus der Diodenzeile, also des Signals eines gewissen optisch spektralen Bereiches der Probeimpulse.

Der Detektionsprozess soll zur Beschreibung in Gedanken in mehrere Schritte zerlegt werden: Zunächst wird der Lichtfluss durch den Photoeffekt in der Diode in einen Elektronenfluss umgewandelt. Der zeitliche Verlauf dieses Elektronenflusses besteht wie der Lichtfluss aus einzelnen Impulsen mit einem zeitlichen Abstand von $T_{rep} \approx 13$ ns und ist durch den stimulierten Ramaneffekt mit der Modulationsfrequenz $\omega_{mod} = 2\pi/T_{mod}$ moduliert. Betrachtet man diesen Verlauf im Frequenzraum, so zeigt sich bei niedrigen Frequenzen das sogenannte “baseband“. Es enthält neben der Modulationsamplitude bei der Modulationsfrequenz auch alle niederfrequenten Rauschamplituden. Bei der Repetitionsfrequenz $\omega_{rep} = 2\pi/T_{rep}$ und allen harmonischen Frequenzen wiederholt sich das “baseband“ auf beiden Seiten der Trägerfrequenz.

Die Kapazität der Diode führt zu einer Integration des Elektronenflusses. Die Integrationszeit T_{int} ist die Zeit zwischen zwei Ausleseereignissen, also bei der Hamamatsu-Diodenzeile 1 ms. Sie ist damit auch gleich der Auslesezeit oder Abtastperiodendauer T_{sample} . Im Zeitraum entspricht die Integration einer Faltung mit einem rechteckigen Integrationsfenster mit der Dauer von 1 ms. Im Frequenzraum ist die Integration ein Tiefpassfilter mit der Fouriertransformierten des Integrationsfensters als Filterfunktion. Der theoretische Zeitverlauf zeigt nun kein gepulstes Signal mehr. Im Frequenzraum werden al-

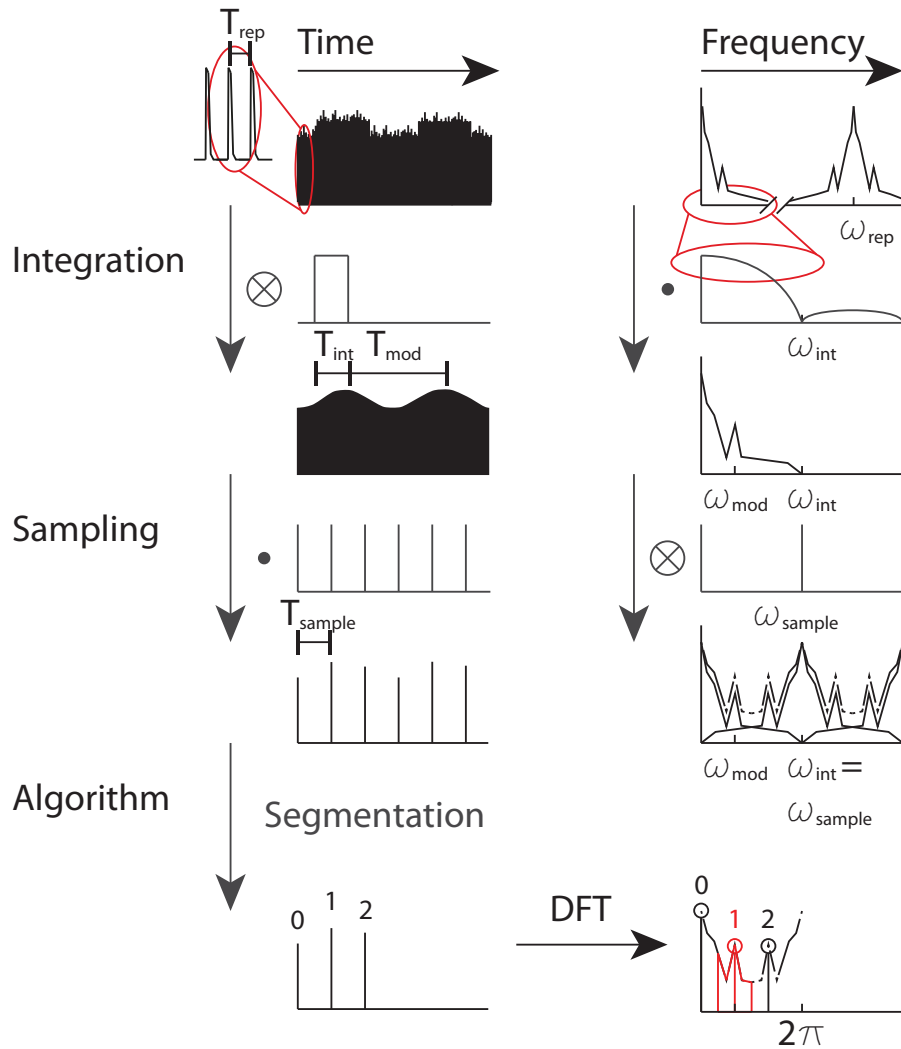


Abbildung 6.1: Schema des Messprozesses. Das Messsignal (schwarz) wird jeweils in der Zeitdomäne (linke Spalte) und in der Frequenzdomäne (rechte Spalte) dargestellt. Als Beispiel wird hier ein Messzyklus mit drei Messungen in einer Modulationsperiode herangezogen. Es wird in drei Schritten (grau dargestellt; Integration, Abtasten und digitaler Algorithmus) zu dem endgültigen Messergebnis (rot markiert) verarbeitet. Eine Faltung ($\otimes$) in der Zeitdomäne entspricht einer Multiplikation ($\cdot$) in der Frequenzdomäne und andersherum. Der Algorithmus beruht auf der diskreten Fouriertransformation (DFT).

le Frequenzen, die höher als die Integrationsfrequenz $\omega_{int} = 2\pi \times 1 \text{ kHz}$ sind, unterdrückt.

Der nächste Schritt im Messprozess ist das Auslesen der Diodenkapazität. Das Auslesen entspricht einem Abtasten des integrierten, kontinuierlichen Zeitverlaufs mit einer Abtastrate $\omega_{sample} = 2\pi/T_{sample}$. Dies kann im Zeitraum durch die Multiplikation mit einem “Kamm“ von δ -Funktionen beschrieben werden. Die Dauer zwischen zwei “Zinken“ des “Kammes“ ist die Abtastperiodendauer $T_{sample} = 1\text{ms}$. Im Frequenzraum ist die Multiplikation eine Faltung mit der Fouriertransformierten des “Kammes“. Die Fouriertransformierte ist jedoch wieder ein “Kamm“ von δ -Funktionen. Der Abstand zwischen zwei δ -Funktionen der Fouriertransformierten ist $\omega_{sample} = 2\pi \times 1 \text{ kHz}$. Das Signal besteht im Zeitraum nach dem Abtasten aus einzelnen Paketen von Ladungen. Im Frequenzraum führt das Abtasten zu einem “Aliasing“-Effekt [206]: In dem abgetasteten Signal werden alle niedrigen Frequenzen mit der Trägerfrequenz und ihren Harmonischen ω_{sample} wiederholt. Insbesondere kann in dem abgetasteten Signal nicht zwischen zwei Frequenzen ω_1, ω_2 unterschieden werden, für die gilt:

$$\omega_1 = \omega_{sample} - \omega_2$$

Auf diese Weise ist eine Messung nicht nur für Rauschen bei der Modulationsfrequenz ω_{mod} , sondern auch für Rauschen bei der Frequenz $\omega_{sample} - \omega_{mod}$ empfindlich.

Die Ladungspakete werden in dem nächsten Schritt mit einem A/D-Wandler digitalisiert. Dadurch wird aus den Ladungspaketen eine Folge von Messwerten. Der Algorithmus zur Bestimmung der Ramansignale zerlegt die Folge in Abschnitte aus N Messwerten, die einer Modulationsperiode entsprechen. Die Modulationsperiodenzeit T_{mod} ist immer ein ganzes Vielfaches N der Abtastperiode T_{sample} . Diese Abschnitte werden mit einer diskreten Fouriertransformation in N Fourierkomponenten überführt. Das Ramansignal entspricht der ersten Fourierkomponente¹. Diese deckt einen Phasenbereich von $2\pi/N$ oder einen Frequenzbereich von $2\pi/N \times 1 \text{ kHz}$ ab und ist bei der Modulationsfrequenz zentriert. Wie oben schon gezeigt, sieht diese Komponente aufgrund des “Aliasing“ auch den ebenso breiten Frequenzbereich um die Frequenz $\omega_{sample} - \omega_{mod}$. Bei der Messung mit direkter Referenzierung sind beide Bereiche identisch zwischen 250 Hz und 750 Hz. Für die “Phasestepping“-Methode liegt der relevante Frequenzbereich, je nach Anzahl der Messungen pro Messzyklus, bei 167 Hz-833 Hz für drei Messungen, bei 100-300 Hz und 700-900 Hz für fünf Messungen und bei 71-214 Hz und 786-929 Hz für sieben Messungen. Zum Gesamtrauschen des Experiments trägt also die spektrale Leistungsdichte des Rauschens einer Quelle in diesem Frequenzbereich bei. Desweiteren soll angenommen werden, dass die unterschiedlichen Rauschquellen statistisch unabhängig sind. Das bedeutet, dass die Standardabweichung des Gesamtmessprozesses σ_{gesamt} sich aus der geometrischen Summe der einzelnen Beiträge $\sigma_1, \sigma_2, \dots$ zusammensetzt:

$$\sigma_{gesamt}^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots \quad (6.1)$$

im weiteren Verlauf des Kapitels werden zunächst die potentiellen Rauschquellen genannt. Dann soll das Rauschen anhand von Messungen quantifiziert und mit dem Signalniveau verglichen werden.

¹Diese Aussage trifft auch für die referenzierte Messung zu.

6.1 Rauschquellen des FSRM Experiments

Das Gesamtrauschen der Messung setzt sich aus dem Rauschen des Lichtes und dem Rauschen durch den Detektor und den Detektionsprozess zusammen (siehe Abschnitt 6.1.3). Die Ursachen für das Rauschen des Lichtes sind unterschiedlich: Die Lichtquelle selber zeigt ein Amplitudenrauschen und eine statistische Strahlrichtungsabweichung (siehe Abschnitt 6.1.1), welche sich durch die Detektionsgeometrie auf das Messsignal niederschlagen kann. Genauso wirken äußere Umwelteinflüsse wie Luftverwirbelungen oder mechanische Schwingungen auf den Strahltransport bis zum Detektor. Auch das Rauschen des Pumplasers kann das Gesamtrauschen beeinflussen. Durch den stimulierten Ramaneffekt und durch Kreuzphasenmodulation [117] überträgt sich dieses auf das Rauschen des Probespektrums. Zum Rauschen durch Detektor und Detektion trägt das Schrotrauschen des Detektionsprozess, das Auslese- und Dunkelstromrauschen der Photodioden und das Digitalisierungsrauschen durch den A/D- Wandler bei.

6.1.1 Stabilität bzw. Rauschen des Ti:Saphir-Oszillators

Das Rauschen des “Fusion BB“ Laser von der Firma Femtolasers ist im Datenblatt mit einer relativen Standardabweichung von $< 0.05\%$ r.m.s. angegeben. Dieser Wert ist der integrierte Wert für alle Frequenzen von 10 Hz-100 kHz. Es kann also nur als obere Grenze des Rauschbeitrags des Amplitudenrauschens des Lasers zum Gesamtrauschen des Experiments angenommen werden. Die spektrale Leistungsdichte des Rauschens von Ti:Sa Laseroszillatoren wurde bei unterschiedlichen Systemen gemessen [207, 208, 209, 210]. Das genaue Verhalten hängt stark vom Rauschen des grünen Pumplasers ab, welches sich für Frequenzen kleiner 700 kHz [211] direkt auf das Gesamtsystem überträgt [207, 209, 211]. Der “Fusion“ Laser wird von einem 4 Watt “Finesse“ Laser der Firma LaserQuantum gepumpt. Die normierte Standardabweichung ist laut Datenblatt mit $< 0.1\%$ r.m.s. für den Frequenzbereich von 1 Hz bis zu 100 MHz. Dieser Wert ist vergleichsweise hoch (Lighthouse Photonics Sprout G-10W NET: $< 0.03\%$ r.m.s von 10 Hz bis zu 10 MHz, Coherent Verdi G5: $< 0.02\%$ r.m.s. 10 Hz bis zu 100 MHz [207]). Ein anderer Pumplaser könnte demnach das Rauschen des Gesamtsystems senken.

Im entscheidenden Frequenzbereich zwischen 100 Hz und 1 kHz liegt die spektrale Leistungsdichte des Rauschens für ähnliche Ti:Sa Laser zwischen 100-120 dBc/Hz² [210, 209] und 90 -110 dBc/Hz [208, 209]. Das entspricht einer in dem Frequenzbereich von 100 Hz–1 kHz integrierten, normierten Standardabweichung von ca. 3×10^{-4} (entspricht konstant 100 dBc/Hz) bis 9×10^{-4} (entspricht konstant 90 dBc/Hz). Die spektrale Leistungsdichte weist gerade in dem relevanten Frequenzbereich (100 Hz–1 kHz) starke Spitzen und Abweichungen auf [208, 209], die auf äußere Einflüsse wie Luftströme und akustische Vibrationen des Systems zurückgeführt wurden [209]. Generell zeigt sich das, dass das Rauschen eines solchen Lasersystem mit höheren Frequenzen abnimmt. Es wurde ein Abfall der spektralen

²dBc/Hz: Beschreibt das relative Signal pro Frequenzintervall bezogen auf das Trägersignal bei der Wiederholrate des Oszillators.

Leistungsdichte mit 10 dB pro Dekade berichtet [208]. Jedoch hängt auch dieses Verhalten von der Charakteristik des Pumplasers ab. So wurde für einen multi-longitudinalen Pumplaser ein Plateau im Bereich von 1-20 kHz gemessen [209].

Es wurde keine dezidierte Messung zur Bestimmung des Amplitudenrauschens des Fusion Lasersystems ausgeführt. Dennoch kann man den Beitrag des Lasers zum Gesamtrauschen mit wenigen Annahmen aus einer Messung mit dem Detektor des Experiments bestimmen. Bei einer solchen Messung kann man nicht mehr zwischen dem genuinen Laser-rauschen und einem zusätzlichen Rauschen durch Umwelteinflüsse wie Temperaturschwankungen, Luftverwirbelungen oder mechanische Vibrationen der optomechanischen Bauteile unterscheiden. Die grundlegende Annahme zur quantitativen Bestimmung des Laserrauschens der Messung ist, dass das Rauschen des Lasers spektral korreliert ist. Das bedeutet, dass die Amplitude des Lasers bei allen Lichtfrequenzen gleichzeitig und gleichartig schwankt. Diese Annahme ist insofern begründet, als dass ein grosser Teil des Rauschens direkt vom grünen Pumplaser induziert wird. Dieser Beitrag zum Gesamtrauschen des Ti:Sa Lasers sollte sich auf alle Lichtfrequenzen des Spektrums des Ti:Sa Lasers gleich auswirken. Die zweite Annahme ist, dass alle anderen Rauschquellen spektral unkorreliert sind. Unter diesen Annahmen wurde das Amplitudenrauschen des Lasers wie folgt bestimmt:

Das gesamte Rauschen eines Pixels kann bei wiederholter Messung des Spektrums des Probeimpulses mit der kürzesten Integrationszeit von 1 ms durch seine Standardabweichung charakterisiert σ_{gesamt} werden. Die gesamte Standardabweichung ist nach Gleichung 6.1 die geometrische Summe aus den statistisch unabhängigen Einzelbeiträgen. In diesem Fall seien das die relative Standardabweichung der Laseramplitudenschwankungen σ_{LA}^{rel} und die relative Standardabweichung aller anderen Rauschquellen σ_{Rest}^{rel} . Es gilt also:

$$(\sigma_{gesamt}^{rel})^2 = (\sigma_{LA}^{rel})^2 + (\sigma_{Rest}^{rel})^2 \quad (6.2)$$

Bei Mittelung über N Pixel gilt für die Standardabweichung der gemittelten Größen $\langle \sigma_{LA}^{rel} \rangle_N$ und $\langle \sigma_{Rest}^{rel} \rangle_N$

$$\langle \sigma_{LA}^{rel} \rangle_N = (\sigma_{LA}^{rel}) \quad (6.3)$$

$$\langle \sigma_{Rest}^{rel} \rangle_N = \frac{\sigma_{Rest}^{rel}}{\sqrt{N}} \quad (6.4)$$

Die Standardabweichung der statistisch unabhängigen Größen σ_{Rest} sinkt mit der Wurzel der gemittelten Pixel N . Nach Annahme ist das Amplitudenrauschen des Lasers spektral vollständig korreliert und bleibt damit konstant. Für die gesamte, über N Pixel gemittelte Standardabweichung $\langle \sigma_{gesamt} \rangle_N$ folgt:

$$\begin{aligned} \langle \sigma_{gesamt}^{rel} \rangle_N^2 &= \langle \sigma_{LA}^{rel} \rangle_N^2 + \langle \sigma_{Rest}^{rel} \rangle_N^2 \\ &= (\sigma_{LA}^{rel})^2 + \frac{(\sigma_{Rest}^{rel})^2}{N} \end{aligned} \quad (6.5)$$

Für große N nähert sich also der gemittelte Gesamtwert der relativen Standardabweichung $\langle \sigma_{gesamt}^{rel} \rangle_N$ der relativen Standardabweichung des Laseramplitudenrauschens an. Die

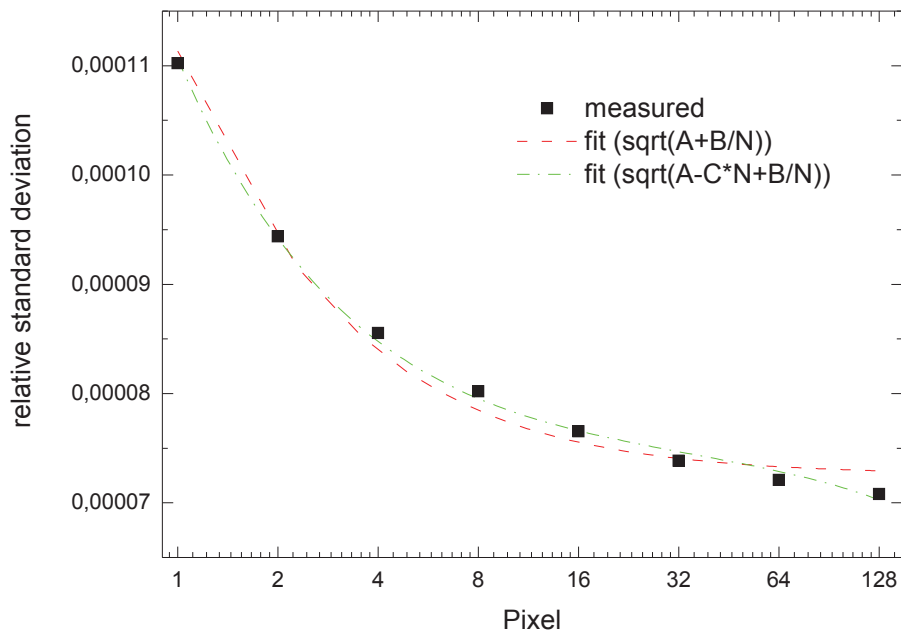


Abbildung 6.2: Relative Standardabweichung des Messsignals in Abhängigkeit der gemittelten Pixel. Die Mittelung des Messsignals (Schwarze Quadrate) erfolgte im zentralen Bereich des Spektrums (745 nm - 811 nm). An die Messdaten wurden unterschiedliche Funktionen angepasst. Die rote Kurve folgt Gleichung 6.5. Da die Anpassung nur für Abschnitte der Messdaten eine gute Annäherung ist, wurde eine Korrektur in erster Ordnung der Pixel für die Konstante A eingeführt (grüne Linie).

Abhängigkeit der gesamten, relativen Standardabweichung $\langle \sigma_{gesamt}^{rel} \rangle_N$ von N wurde im Experiment überprüft. Eine Anpassung von Gleichung 6.5 an die Messdaten (siehe Abbildung 6.2) ergab eine relative Standardabweichung der Laseramplitude (σ_{LA}^{rel}) von 7.25×10^{-5} . Diese Anpassung ist aber deutlich mit Fehlern behaftet. So scheint die Annahme, dass das Laseramplitudenrauschen vollständig korreliert ist nicht erfüllt zu sein. Eine bessere Anpassung wird folglich erreicht, wenn man eine Korrektur in erster Ordnung der Pixel für die relative Standardabweichung (σ_{LA}^{rel}) erlaubt (siehe grüne Linie in Abbildung 6.2). Das bedeutet, dass spektrale benachbarte Bereiche stärker korreliert sind als spektral weiter auseinanderliegende. Die Korrektur beträgt maximal ca. 6 %. Für die weitere Analyse soll jedoch der Einfachheit halber der mittlere Wert der ersten Anpassung von 7.25×10^{-5} verwendet werden. Für die absolute Standardabweichung der Laseramplitude in “Counts“ (σ_{LA}^{abs}) folgt:

$$(\sigma_{LA}^{abs}) = (\sigma_{LA}^{rel}) \overline{K}_{counts} = 7.25 \times 10^{-5} \overline{K}_{counts} \quad (6.6)$$

$\overline{K}_{counts}$ ist die Zählrate nach der Digitalisierung.

6.1.2 Stabilität bzw. Rauschen des Faserverstärkers

Das Rauschen des Faserverstärkers wird mit dem Ramanbandensignal auf das Spektrum des Probeimpuls übertragen. Jeder Verstärker führt aufgrund der spontanen Emission zur Erhöhung des Rauschens. Dies wird durch die sogenannte “Noisefigure“ NF charakterisiert [157]:

$$NF = \frac{SNR_{in}}{SNR_{out}} \quad (6.7)$$

SNR_{out} bzw. SNR_{in} sind Signal-zu-Rauschverhältnisse von Ausgangs- bzw. Eingangssignal des Verstärkers. Das Signal-zu-Rauschverhältnis ist in diesem Fall als das Quadrat des Verhältnisses vom Mittelwert der Photonenzahl zu seiner Standardabweichung definiert³. Nimmt man eine vollständig invertierte Verstärkerstufe an, so gilt für die NF bestenfalls [157]:

$$NF \geq \frac{2}{1 - \frac{\sigma_{pe}\sigma_{se}}{\sigma_{pa}\sigma_{se}}} \approx 2.1 \quad (6.8)$$

Mit $\sigma_{sa} = \sigma_{se}$ und $\frac{\sigma_{pa}}{\sigma_{pa} + \sigma_{pe}} = 0.97$ (siehe Abschnitt 2.2.4.3 und Gleichung 2.27). Der Faserverstärker besteht aus zwei Verstärkerstufen. Für das Verhältnis von Signal zu Rauschen vom Eingangssignal der ersten Stufe SNR_{in}^{pre} zum Ausgangssignal der zweiten Stufe SNR_{out}^{power} gilt dann:

$$NF^2 = SNR_{in}^{pre} / SNR_{out}^{power} \quad (6.9)$$

Die Eingangsphotonenanzahl beträgt ca. 2.1×10^{14} Photonen pro Sekunde (mit 42 μ W Seedleistung, siehe Abschnitt 3.2.2). Das Rauschen ist bei dieser hohen Anzahl von Photonen durch das Amplitudenrauschen des Ti:Sa-Lasers begrenzt und nicht durch das Schrot-

³Diese Definition wird nur in diesem Abschnitt verwendet. In Abschnitt 6.2 folgt eine unterschiedliche Definition.

rauschen. Das Rauschen der Seedphotonenzahl wurde nicht gemessen. Nimmt man an, dass das Rauschen des Seeds direkt mit dem Amplitudenrauschen des gesamten Ti:Sa-Lasers korreliert ist, dann überträgt sich das Rauschen direkt. Die Standardabweichung der Eingangsphotonenzahl ist ca. 7.25×10^{-5} gleich der Standardabweichung des Ti:Sa-Lasers bei einer Messzeit von 1 ms. Das Signal-zu-Rauschverhältnis der Eingangsstufe soll also nach der obigen Definition mit 5.3×10^{-7} angegeben werden. Aus Gleichung 6.9 folgt, dass das quadrierte Signal-zu-Rauschverhältnis der Ausgangsleistung $SNR_{out}^{power} 1.1 \times 10^{-6}$ beträgt und die Standardabweichung 1.1×10^{-3} . Diese Abweichung ist eine zusätzliche, theoretische, relative Abweichung der Ramanbandenhöhen von ihrem Wert. Bei einer Ramanbandenhöhen von 1×10^{-3} ist die Abweichung ungefähr 10^{-6} . Diese ist so gering, dass man sie im Vergleich zum Rauschen des Probespektrums vernachlässigen kann.

6.1.3 Detektions- und Detektorrauschen

Die Rauschquellen durch Detektion und Detektor, die im Folgenden betrachtet werden sollen, sind: Das Schrotrauschen der Photoelektronen, das Rauschen des Dunkelstroms der Photodioden, das Ausleserauschen der Photodioden und das Rauschen durch die A/D-Wandlung. Das Schrotrauschen beruht auf der ‘‘Körnigkeit‘‘ des Lichtes. Die Photonenzahl folgt einer Poissonverteilung. Die Photonenzahl streut um den Mittelwert der Photonenzahl $\bar{K}_{photon}$ mit der Varianz $\sigma_{photonSN}^2 = \bar{K}_{photon}$ [212]. Diese überträgt sich durch die Detektion auf die Photoelektronen [212]. Dabei ist jedoch die Quanteneffizienz des Detektors η (siehe Abbildung 5.3) zu berücksichtigen. Der Mittelwert der Photoelektronen ist demnach $\bar{K}_{elektron} = \eta \bar{K}_{photon}$ und die Standardabweichung $\sigma_{ElektronSN} = \sqrt{\bar{K}_{elektron}}$. Eine höhere Quanteneffizienz führt zu einem niedrigeren relativen Rauschen der Photoelektronen. Über die A/D-Wandlung entsprechen $\bar{K}_{elektron}$ Elektronen $\bar{K}_{counts} = \bar{K}_{elektron}/4762$ ‘‘Counts‘‘, den Digitalisierungsschritten der A/D-Wandlung. Die Standardabweichung der Photoelektronen $\sigma_{elektron}$ entspricht dann der Standardabweichung in Digitalisierungsschritten:

$$(\sigma_{SN}^{abs}) = \sqrt{\bar{K}_{elektron}/4762} = \sqrt{\bar{K}_{counts}/4762}. \quad (6.10)$$

Das Schrotrauschen ist eine fundamental physikalische untere Grenze für das Rauschen der gesamten Messung. Im Idealfall versucht man eine ‘‘Schrotrausch-begrenzte‘‘ Messung zu realisieren. Das bedeutet, dass das Schrotrauschen die anderen Rauschbeiträge dominiert.

Unabhängig vom Licht werden in der photosensitiven Verarmungszone der Photodioden Elektron-Loch-Paare erzeugt, die als Dunkelstrom registriert werden. Dieser Dunkelstrom ist eine Rauschquelle. Eine weitere Rauschquelle ist das Ausleseereignis, bei dem die in der Kapazität der Photodiode angesammelten Elektronen zum A/D-Wandler geführt werden. Der Hersteller der Photodiodenzeilen (Hamamatsu) schätzt alle Rauschquellen die mit Dunkelstrom und Ausleseereignis verbunden sind für die Photodiodenzeile S3901 mit ca. 3391.3 Elektronen ab [203]. Eine Messung der Standardabweichung des Dunkelstroms ($\sigma_{readout}^{abs}$) ergibt jedoch 2.7 ‘‘Counts‘‘, das entspricht ca. 12857 Elektronen.

Dieses Messergebnis umfasst auch schon das Rauschen durch die A/D-Wandlung. Der A/D-Wandler der TEC 5 Ausleseelektronik hat eine Dynamik von 16 Bit. Die Ladung, die

in der Kapazität der Photodiode gespeichert war, wird über den A/D-Wandler in 2^{16} Stufen digitalisiert. Eine Stufe entspricht bei einer maximalen Ladung von 50 pC pro Photodiode $50 \text{ pC}/65536 = 7.63 \times 10^{-16} \text{ C} = 4762 \text{ e}^-$. Nimmt man an, dass das Digitalisierungsrauschen einer Stufe gleichverteilt ist, d.h. jeder Digitalisierungsfehler innerhalb der Stufe gleich wahrscheinlich, ergibt sich für die Standardabweichung des Digitalisierungsrauschen $\sigma_{A/D}$ [206]⁴:

$$\sigma_{A/D}^2 = \frac{\Delta^2}{12} \quad (6.11)$$

$\Delta = 4762 \text{ e}^-$ entspricht einer Digitalisierungsstufe. Die Standardabweichung des Signals durch das A/D-Wanderrauschen entspricht demnach ca 1375 e^- oder ca. 0,3 “Counts“, ist also vergleichsweise niedrig.

6.2 Signal-zu-Rauschverhältnis eines Ramanspektrums

Das Signal-zu-Rauschverhältnis SNR ist eine wichtige Größe, um ein Messsystem zu charakterisieren. Es existieren jedoch unterschiedliche Definitionen dieser Größe auf⁵. Innerhalb dieser Arbeit soll, wenn vom Signal-zu-Rauschverhältnis eines Ramanspektrums gesprochen wird, folgende Definition gelten:

$$SNR = \frac{R_{peak}^{band}}{\sigma_{base}} \quad (6.12)$$

Das Signal-zu-Rauschverhältnis SNR ist also hier das Verhältnis des Spitzenwerts der relativen Amplitude einer Ramanbande R_{peak}^{band} zu der Standardabweichung der Grundlinie des Ramanspektrums σ_{base} sein. Damit eine Ramanbande also solche richtig erkannt wird, genügt jedoch nicht, dass das Signal-zu-Rauschverhältnis größer als 1 ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine statistische Abweichung eines Pixel des Spektrums über die einfache Standardabweichung hinausreicht, ist beträchtlich. Die Wahrscheinlichkeitsrechnung gibt dafür eine Irrtumswahrscheinlichkeit an. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für das Überschreiten der einfachen Standardabweichung ist 15 Prozent [205, 213]. A. Rose hat ein Kriterium für das SNR [213] gefunden, welches bei bildgebenden Verfahren häufig Anwendung findet. Dieses besagt, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als das Inverse der Pixelanzahl sein sollte. Dadurch sollte im statistischen Mittel das Spektrum weniger als einen Pixel enthalten, welcher fälschlicherweise eine Ramanbande anzeigt. Die verwendete Diodenzeile besitzt 512 Pixel. Die Irrtumswahrscheinlichkeit sollte also kleiner als $1/512 = 1.95 \times 10^{-3}$ sein. Dies ist bei einem Signal-zu-Rauschverhältnis von 3 der Fall. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt dann 1.3×10^{-3} [214]. Jedoch ist auch das Signal selbst dem gleichen Rauschen unterworfen, so dass es fälschlicherweise unter der SNR -Schwelle liegen kann. Rose empfiehlt deswegen das Kriterium höher um ein Sigma höher zusetzen [213]. In 85

⁴Der Faktor 12 ist bezeichnend für das Verhältnis der Varianz zur Breite einer gleichverteilten Wahrscheinlichkeitsgröße.

⁵vgl. Abschnitt 6.1.2

Prozent aller Fälle liegt dann die Ramanbande über dem Schwellwert. Da sich eine Ramanbande in der Regel über mehr als drei Pixel erstreckt, kann man das Kriterium für das SNR über die statistische Mittelung, um die Wurzel von drei abmildern. Das Kriterium für eine erkennbare Ramanbande und damit für die Sensitivität des Experiments lautet dann:

$$SNR > \frac{4}{\sqrt{3}} = 2.3 \quad (6.13)$$

Dieses Kriterium findet im nächsten Abschnitt 6.3 Verwendung, um die benötigte Integrationszeit für eine Messung eines Ramansignals abzuschätzen.

6.3 Das Rauschen des Experiments

Die absolute Standardabweichung des Messsignals (σ_{all}^{abs}) in Abhängigkeit der Zählrate $\bar{K}_{counts}$ ist die geometrische Summe der absoluten Standardabweichung der Laseramplitude (σ_{LA}^{abs}) nach Gleichung 6.6, der absoluten Standardabweichung des Schrotrauschens (σ_{SN}^{abs}) nach Gleichung 6.10 und des durch Dunkelstrom und Ausleseelektronik bedingten Ausleserauschen ($\sigma_{readout}^{abs}$) (siehe Abschnitt 6.1.3):

$$\begin{aligned} (\sigma_{all}^{abs}) (\bar{K}_{counts}) &= \sqrt{(\sigma_{LA}^{abs})^2 + (\sigma_{SN}^{abs})^2 + (\sigma_{readout}^{abs})^2} \\ &= \sqrt{(7.25 \times 10^{-5} \bar{K}_{counts})^2 + \frac{\bar{K}_{counts}}{4762} + (2.7)^2} \end{aligned} \quad (6.14)$$

Die relative Standardabweichung einer Messung (σ_{all}^{rel}) folgt aus dieser Gleichung durch Teilen durch die Zählrate $\bar{K}_{photon}$ der Messung:

$$\begin{aligned} (\sigma_{all}^{rel}) (\bar{K}_{counts}) &= \frac{(\sigma_{all}^{abs}) (\bar{K}_{photon})}{\bar{K}_{photon}} \\ &= \sqrt{(\sigma_{LA}^{rel})^2 + (\sigma_{SN}^{rel})^2 + (\sigma_{readout}^{rel})^2} \\ &= \sqrt{(7.25 \times 10^{-5})^2 + \frac{1}{4762 \bar{K}_{counts}} + \left(\frac{2.7}{\bar{K}_{counts}}\right)^2} \end{aligned} \quad (6.15)$$

Nach diesen Gleichungen ist für Zählraten kleiner als 34973 das Ausleserauschen der größte Beitrag zum gesamten Rauschen eines Pixels. Im Bereich von 34973 bis 39952 "Counts" ist das Schrotrauschen der Messung der höchste Term in den Gleichungen 6.14 und 6.15. Erst ab 39952 Zählsschritten ist das Laseramplitudenrauschen größer als die anderen Beiträge. Es gilt jedoch zu beachten, dass schon ab ca. 30000 "Counts" alle Beiträge ähnliche Werte aufweisen (vgl. Abbildung 6.3 (b)) und damit auch gleichwertig zum Gesamtrauschen beitragen. Das Ausleserauschen wird ab 35000 "Counts" von den anderen Rauschquellen dominiert.

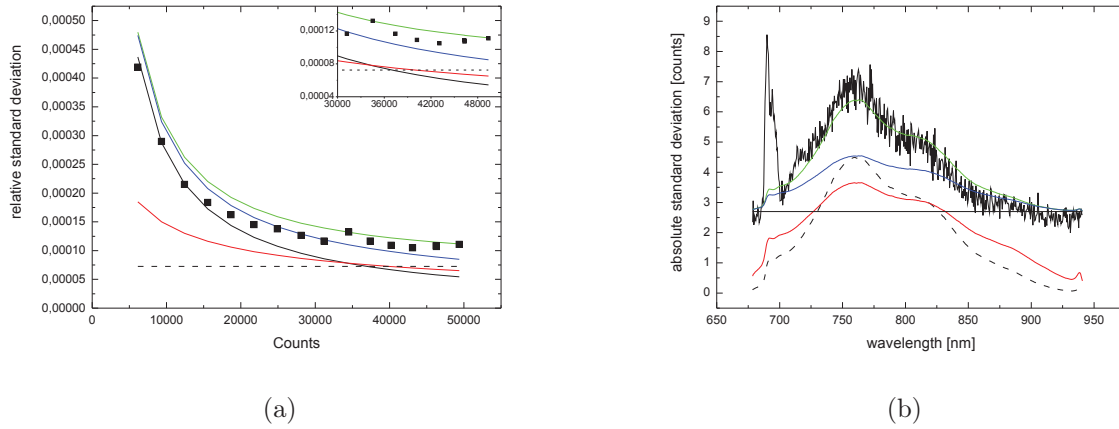


Abbildung 6.3: Rauschen und Rauschbeiträge zum Messsignal.

(a) Die über den zentralen Wellenlängenbereich (756-833 nm) gemittelte relative Standardabweichung des Probespektrums (schwarze Quadrate) gegen die gemittelte Zählrate der Pixel in diesem Bereich. Außerdem sind die einzelnen theoretischen Beiträge zum Rauschen, das Ausleserauschen (durchgezogene, schwarze Linie, nach Abschnitt 6.1.3), das Schrotrauschen (rote Linie, vgl. Gleichung 6.10) und das Laseramplitudenrauschen (gestrichelte, schwarze Linie 6.1.1) dargestellt. Zum Vergleich mit der Messung ist die geometrische Summe aller Beiträge nach Gleichung 6.15 (grüne Linie) und die geometrische Summe aus Schrotrauschen und Ausleserauschen (blaue Linie) dargestellt.

(b) Die *absolute* Standardabweichung des Probespektrums (obere schwarze Linie) gegen die Wellenlänge. Außerdem sind jeweils die absoluten Größen wie in (a) dargestellt. Der Spitzenwert des Spektrums der Messung waren ca. 60000 "Counts". Der starke Anstieg der Standardabweichung im Flügel des Spektrums bei ca. 680 nm liegt vermutlich an einem höheren Laseramplitudenrauschen bei der dort liegenden spektralen Kante im Probespektrum.

Wenn man das ungefilterte Probespektrum zur Abfrage des Ramaneffektes benutzt, führt die Form des Spektrums zu unterschiedlichen Rauschbeiträgen in Abhängigkeit der Wellenlänge (siehe Abbildung 6.3 (b)). Wenn die Lichtleistung so eingestellt wird, dass der spektrale Spitzenwert nahe der Sättigung der Diodenzeile (ca. 60000 "Counts") liegt, so dominiert in den Randbereichen des Spektrums das Ausleserauschen. Der spektrale Bereich, in dem Schrotrauschen und Laseramplitudenrauschen das Rauschen dominieren, reicht von 725 nm - 825 nm, das entspricht den Ramanverschiebungen von 3600 cm^{-1} bis 1917 cm^{-1} . Wenn man den Bereich berücksichtigt bei dem das Rauschen schon durch die Lichteinstrahlung beeinflusst reicht der spektrale Bereich von 700 nm - 850 nm oder entsprechend von 4081 cm^{-1} bis 1560 cm^{-1} . Damit ist der Rauschbeitrag gerade in dem wichtigen "Fingerprint"-Bereich (1000 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1}) des Spektrums durch das Ausleserauschen begrenzt. Bei dieser Messung wurde die Hamamatsu-Diodenzeile S3901 verwendet. Da die Quanteneffizienz der Hamamatsu-Diodenzeile S8380 im nahinfraroten Spektralbe-

reich deutlich höher ist (siehe Abbildung 5.3), weitet sich für diese Zeile der lichtdominierte Rauschbereich mehr ins Nahinfrarote. Über Mittelung kann das Rauschen des gemittelten Messsignals im Vergleich zur Einzelmessung verringert werden (siehe Abbildung 6.4). Die Standardabweichung sollte für eine normalverteilte Zufallsgröße mit der Wurzel der Anzahl der Messungen N abnehmen. Da eine Messung eine Millisekunde dauert, entspricht die Integrationszeit in Millisekunden der Anzahl der Messungen. Die Messung der Standardabweichung der Grundlinie des Ramanspektrums im lichtdominierten Rauschbereich in Abhängigkeit von der Anzahl der Mittelungen zeigt annähernd dieses Verhalten: Die logarithmische Auftragung der Messwerte ergibt eine Steigung von ca. -0.45.

Auch die Sensitivität nach dem Kriterium von Rose (siehe Abschnitt 6.2) des Experiments steigt mit der Integrationszeit einer Messung. Die minimal messbare Ramanbandenhöhe R_{min}^{band} in Abhängigkeit der Integrationszeit in Millisekunden N folgt der Gleichung:

$$\log R_{min}^{band} = -3.43 - 0.45 \log N \quad (6.16)$$

Für die geringste Messzeit von 2 ms können mit der Hamamatsudiodenzeile S 3901 nur Ramanbanden mit einer Peakhöhe von mindestens 2.7×10^{-4} erkannt werden. Bei einer Messzeit von 100 ms liegt die Grenze bei 4.7×10^{-5} , bei einer Messzeit von 1 Sekunde bei 1.7×10^{-5} . Für Einzelkanal-SRS Messungen wurden Ramanbandenhöhen von 1×10^{-7} in einer Messzeit von 1 Sekunde berichtet [108]. Der Vergleich mit Multiplex-CARS Aufbauten und konventionellen Ramanmethoden ist komplizierter, da dort absolute Signale gemessen werden. Um die Sensitivitäten zu vergleichen muss das SNR konkreter Ramanbanden verglichen werden.

Eine Anmerkung zum Algorithmus:

Momentan werden schon im Messprogramm die einzelnen Segmente mit jeweils den N Messwerten für jede Modulationsperiode gemittelt, damit die Messdaten am Ende möglichst wenig Speicherplatz in Anspruch nehmen. Man kann aber eine geringere Varianz des Messwertes bei gleicher Messzeit erreichen, wenn man jede einzelne Messung abspeichert [198]: Hat man zum Beispiel K Modulationsperioden mit dem bisherigen Messprogramm aufgenommen, so sinkt die Standardabweichung des Messwertes mit der Wurzel von K . Für eine geringere Abweichung ist es angezeigt, die Messwerte nicht disjunkt in Intervalle zu zerlegen, sondern Segmente zu bilden, die sich teilweise überlappen [198]. Nahezu optimal ist jedes Segment zur Hälfte mit dem vorherigen zu überlappen [198]. Die Standardabweichung ist in diesem Fall proportional der Wurzel von ca. $18K/11$ [198]. Bei gleicher Messzeit gewinnt man so einen Faktor von ungefähr $\sqrt{2}$ im SNR .

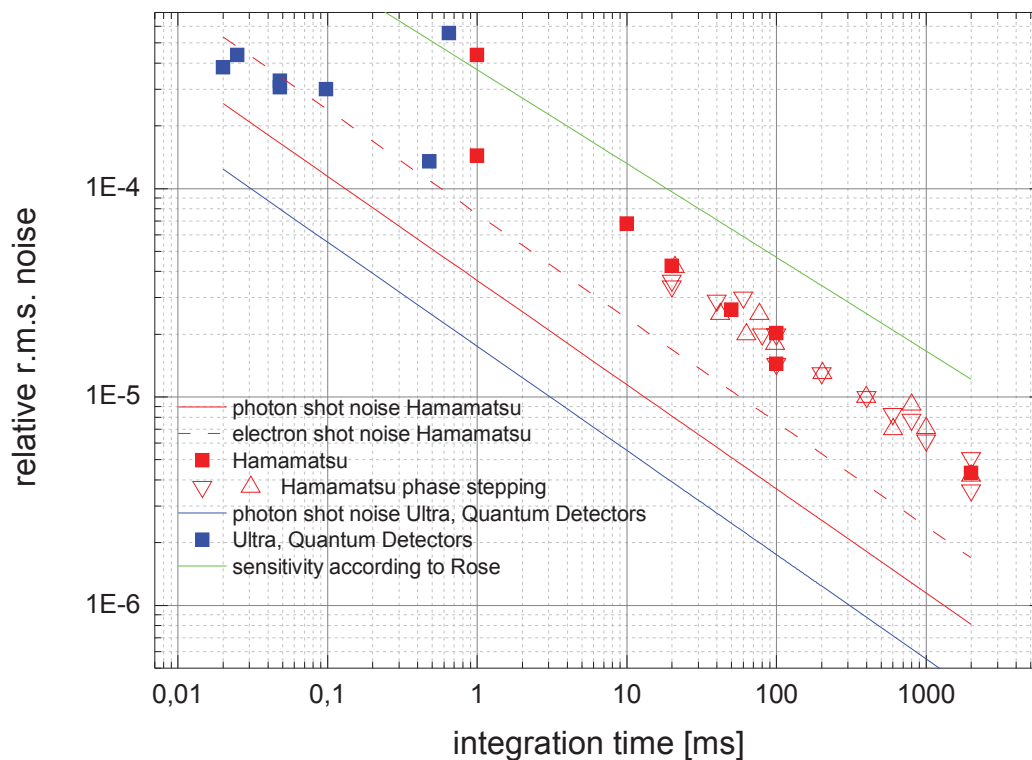


Abbildung 6.4: Das rauschequivalente Signal in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen für die Hamamatsu Diodenzeile S3901 (siehe Abschnitt 5.4.1) und den Ultradetektor (siehe Abschnitt 5.4.3). Da eine Messung bei der Hamamatsudiodenzeile eine Millisekunde dauert, entspricht die Integrationszeit in Millisekunden bei diesem Detektor der Anzahl der Messungen. Als rauschequivalentes Signal wurde die relative Standardabweichung der Grundlinie des Ramanspektrums im zentralen Bereich des Ramanspektrums bestimmt. Die roten Symbole entsprechen Messungen mit der Hamamatsu Diodenzeile: Quadrate-referenzierte Messmethode; Dreieck, Spitze nach oben-“Phasestepping“ 5er Zyklus; Dreieck, Spitze nach unten-“Phasestepping“ 7er Zyklus. Die blauen Vierecke stellen Messwerte mit dem “Ultra“-Detektor der Firma Quantum Detectors da. Zum Vergleich ist als theoretische Untergrenze das Photonenschrotrauschen für beide Detektoren (Hamamatsu: rote, durchgezogene Linie; Quantum Detectors: blaue Linie) angegeben. Diese Grenze könnte nur bei einer Quanteneffizienz von 1 erreicht werden. Deswegen ist auch das Schrotrauschen der Photoelektronen für den Hamamatsudetektor (rote gestrichelte Linie) angegeben. Die angenommene Lichtleistung entspricht bei dem Hamamatsudetektor ca. 37000 “Counts“ oder 7.62×10^8 Photonen, bei dem “Ultra“-Detektor 3.26×10^9 Photonen. Die Sensitivitätsgrenze des Experimentes nach Rose (siehe Abschnitt 6.2) in Abhängigkeit der Messzeit ist für den Hamamatsudetektor dargestellt (grüne Linie).

Kapitel 7

Ramanspektroskopie und Ramanmikroskopie mit dem MHz-FSRM Aufbau

Der bis hierhin beschriebene Aufbau soll der Ramanmikroskopie dienen (siehe Kapitel 1). Dabei wird der stimulierte Ramaneffekt zur Kontrastgebung verwendet. Dieser soll eine im Vergleich zur konventionellen Ramanmikroskopie schnellere Bildgebung ermöglichen (siehe Abschnitt 1.4). Im Gegensatz zu vielen einkanaligen Ansätzen zur stimulierten Ramanmikroskopie (siehe Abschnitt 1.4.1) wird hier aber nicht auf die spektrale Bandbreite der konventionellen Ramanmikroskopie verzichtet, wodurch die chemische Spezifität der Ramanmikroskopie erhalten bleibt und gleichzeitig die Sensitivität der stimulierten Ramanmikroskopie angestrebt wird. Im folgenden Kapitel wird zunächst auf die spektroskopischen Charakteristika des Aufbaus eingegangen, wobei insbesondere einige Eigenheiten der Femtosekunden stimulierten Ramanspektroskopie (FSRS) erarbeitet werden. Abschließend sollen zwei Beispiele die Bildgebung mit diesem Aufbau demonstrieren: Mikroskopiestandards aus unterschiedlichen Polymeren und Epithelzellen aus dem Mundraum einer Versuchsperson.

7.1 Ramanspektroskopie mit MHz

Die Untersuchungen der spektroskopischen Eigenschaften des Aufbaus wurden mit Hilfe reiner Lösungsmittel als Testsubstanz ausgeführt. Benzonitril ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}$; ACROS Organics; 99+%, for spectroscopy) und Cyclohexan (C_6H_{12} ; ACROS Organics; 99+%, for spectroscopy) wurden dafür am häufigsten eingesetzt. Die Flüssigkeiten wurden als dünne Filme zwischen zwei Deckgläsern untersucht (siehe Abschnitt 5.2.4). Bei Benzonitril handelt es sich dabei um eine besonders geeignete Testsubstanz (siehe Abbildung 7.1): Erstens besitzt es einige sehr starke Ramanbanden (bei 999 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , 2228 cm^{-1} [215, 188]). Anhand dieser Banden kann die maximale Signalintensität justiert und optimiert werden. Dazu müssen der örtliche Überlapp und die Polarisation der beiden Laserimpulse angepasst

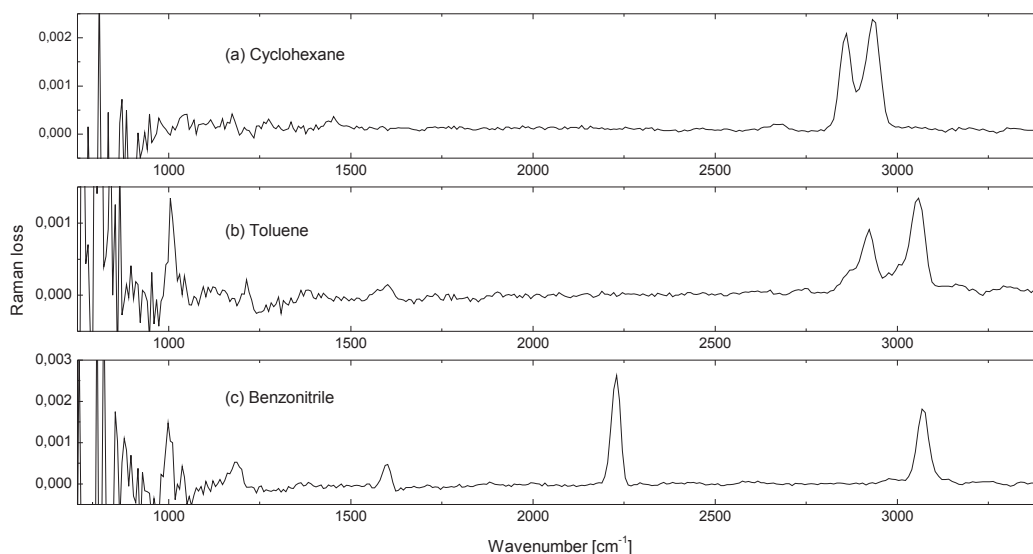


Abbildung 7.1: Stimulierte Ramanspektren der Substanzen Cyclohexan (a), Toluol (b) und Benzonitril (c). Die gesamte Integrationszeit betrug jeweils 100 ms. Die Leistung des Pumplasers (mit ASE Untergrund) waren 53 mW, die spektrale Breite des Pumplasers 18 cm^{-1} . Der Pumplaser wurde mit einem geritzten Gitter zwischen den Verstärkerstufen spektral eingengt (siehe Abschnitt 3.3.1).

werden.

Zweitens sind die Ramanbanden von Benzonitril im ganzen erfassten Spektralbereich des Experimentes (800 cm^{-1} – 3500 cm^{-1}) spektral breit verteilt (999 cm^{-1} , 1192 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , 2228 cm^{-1} , 3068 cm^{-1} [215, 188]). Dies erlaubt die Ramanbanden für alle erfassten Wellenzahlen des Experimentes gleichzeitig zu charakterisieren. Die Verzögerungszeit zwischen Pump- und Probeimpuls verändert zum Beispiel die relativen Bandenhöhen eines Ramanspektrums. Genauso kann sich die Phase zwischen Lichtmodulation und Detektion auf diese auswirken (siehe Abschnitt 5.6.2). Cyclohexan wurde verwendet, um die spektrale Auflösung des Aufbaus zu testen (siehe Abbildung 7.1). Dazu wurde die spektrale Bande bei 2853.5 cm^{-1} benutzt, für die genaue Literaturwerte für Bandbreite und Bandenintegral bekannt waren [216].

7.1.1 Spektrale Auflösung des Experimentes

Die spektrale Auflösung des Experimentes ist durch die spektrale Bandbreite des Pumplasers begrenzt. Dies wurde anhand der Ramanbande bei 2853.5 cm^{-1} von Cyclohexan überprüft. Eine symmetrische CH-Streckschwingung verursacht diese Ramanbande [216]. Die mit spontaner Ramanstreuung gemessene Bandbreite der Schwingung beträgt 10.2 cm^{-1} [216]. Zum Vergleich wurde das stimulierte Ramanspektrum von Cyclohexan mit dem MHz-FSRM-Aufbau gemessen. Dabei wurde ein Gitter mit 600 Linien/mm und eine Diodenzeile

mit 1024 Pixeln (Hamamatsu S3904-1024Q) eingesetzt. Der Spektrograph besitzt mit dieser Kombination eine Auflösung, die kleiner als 4 cm^{-1} ist. Der Pumplaser wurde mit einer Einzelpassvorverstärkerstufe und einem Einzelpassleistungsverstärker betrieben. Das Spektrum wurde zwischen beiden Stufen mit einem Circulator und einem “gechirpten“ Faser-Bragggitter (O/E Land; custom made filter; @ 977.9 nm ; FWHM $< 1.8\text{ nm}$; dispersion 6.35 ps/nm) eingeeengt. Die erwartete Linienbreite des stimulierten Ramansignals entspricht

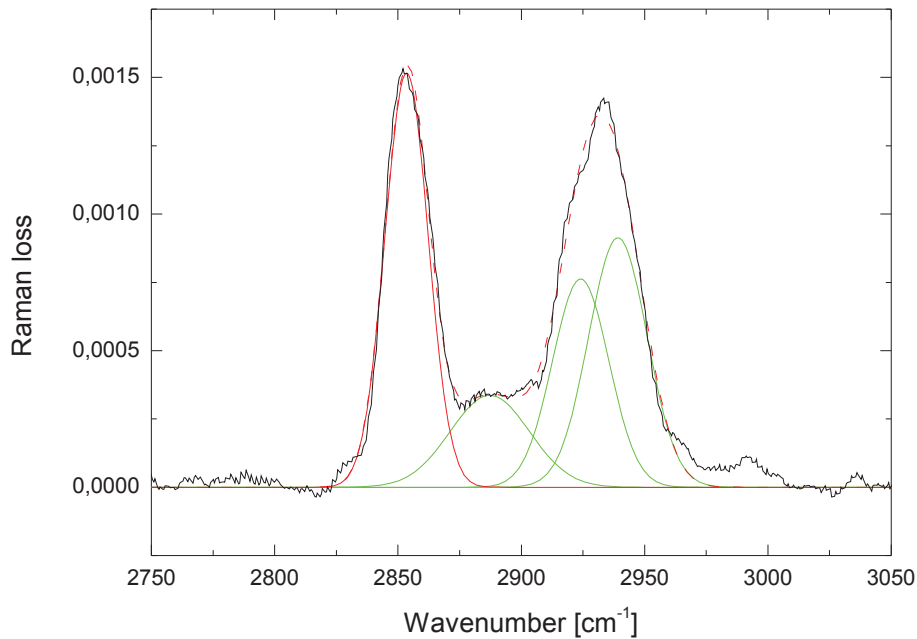


Abbildung 7.2: CH-Streckbereich des stimulierten Ramanspektrums von Cyclohexan (schwarz) und Bandenanpassung. Mit einem Glättungsfilter und mit einem Savitzky-Golayfilter wurden Pixel- zu Pixelschwankungen des Ramanspektrums gemildert. An den CH-Streckbereich wurden mehrere Banden angepasst (Summe: rot, gestrichelt). Abgesehen von der “Test“-Bande bei 2853 cm^{-1} (rot) wurden drei weitere Banden (grün) benötigt. Die ermittelte Bandbreite der “Test“-Bande beträgt 20.7 cm^{-1} .

nach Abschnitt 4.1.2 der Faltung der spektralen Breite des Pumpimpulses mit der natürlichen Linienbreite der Ramanresonanz. Diese Breite beträgt $\sqrt{(10.2\text{ cm}^{-1})^2 + (18.8\text{ cm}^{-1})^2} = 21.4\text{ cm}^{-1}$. Das gemessene Spektrum des CH-Streckbereichs von Cyclohexan ist in Abbildung 7.2 dargestellt. An die Messung wurden mehrere Banden angepasst, um den gesamten Bereich korrekt wiederzugeben (Summe: rot, gestrichelt). Die Bandenpositionen der angepassten Banden sind 2853.5 cm^{-1} , 2887.2 cm^{-1} , 2924.1 cm^{-1} und 2939.2 cm^{-1} .

¹Diese Abschätzung nimmt einen gaussförmigen spektralen Verlauf der Ramanbande und des Ramanpumpimpulses an

Nach [217] sind die Positionen bei 2853 cm^{-1} , 2895 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} und 2939 cm^{-1} . Die beiden ersten Banden sind symmetrischen Streckschwingungen zugeordnet. Dabei ist die Bande bei 2853 cm^{-1} der irreduziblen Darstellung a_{1g} zugeordnet, die Bande bei 2895 cm^{-1} der irreduziblen Darstellung e_g . Die letzten beiden Banden sind asymmetrischen CH-Streckschwingungen zugeordnet worden [216]. Wieder besitzen beide Schwingungen eine unterschiedliche irreduzible Darstellungen: Die Bande bei 2924.1 cm^{-1} folgt der irreduziblen Darstellung e_g und die Bande bei 2939.2 cm^{-1} der irreduziblen Darstellung a_{1g} [217]. Die ermittelte Bandbreite der symmetrischen CH-Streckschwingung bei 2853 cm^{-1} beträgt 20.7 cm^{-1} . Das entspricht in etwa der erwarteten Breite. Die spektrale Auflösung des Experimentes kann verbessert werden, wenn die Bandbreite des Pumpimpulses weiter eingeengt wird. Jedoch sollte sie dabei nicht unter 10 cm^{-1} sinken, da dann die Kombination aus 300 Linien/mm Gitter und 512 Pixel Diodenzeile die Auflösung begrenzt (siehe Tabelle 5.1).

7.1.2 Charakterisierung der Laserimpulse mittels des Ramansignals

Der stimulierte Ramaneffekt kann zur quantitativen Charakterisierung der Impulslänge des Pumpimpulses und des "Chirps" des Probeimpulses im Fokus verwendet werden. Dies geschieht mit Hilfe einer spektral aufgelösten, zeitlichen Kreuzkorrelation zwischen Pump- und Probeimpuls. Diese Art der Charakterisierung entspricht einer XFROG-Technik [218] und wurde auch schon mit Hilfe nichtresonanter CARS (siehe Abschnitt 1.3.2) demonstriert [219]. Die Ankunft des Pumpimpulses am Probenort wird mit Hilfe einer Verzögerungsstrecke gegenüber der Ankunft des Probeimpulses um eine Zeitspanne τ variiert und jeweils ein stimulierte Ramanspektrum der Probensubstanz aufgenommen. Das so aufgenommene "Kreuzkorrelationssignal" $I(\tau, \omega)$ ist sowohl von der Verzögerungszeit τ als auch der Frequenz ω abhängig.

In Abbildung 7.3 ist die Kreuzkorrelation mit Benzonitril als Probensubstanz dargestellt. Die einzelnen Ramanbanden des Spektrums erscheinen in der Kreuzkorrelation zeitlich versetzt. Dies ist auf die Gruppengeschwindigkeitsverzögerung des Probeimpulses aufgrund der Dispersion des Lichtes im Glas des Objektivs und in der Luft zurückzuführen. Die niedrigen Frequenzen des Probespektrums befinden sich zeitlich in der vorderen Flanke des Probeimpulses, die Höheren in der hinteren Flanke. Für niedrigere Verzögerungszeiten erreicht der Probeimpuls die Probensubstanz vor dem Pumpimpuls. Die abfallende Flanke des Probeimpulses überlagert sich dann vor der steigenden Flanke mit dem Pumpimpuls. Damit erscheinen die hochfrequenten Ramanbanden zuerst bei den kürzeren Verzögerungszeiten. Ist die Bande bei 3068 cm^{-1} maximal, erreicht die Bande bei 999 cm^{-1} nur noch 88 Prozent ihres maximalen Spitzenwertes. Ist jedoch die Bande bei 999 cm^{-1} maximal, sinkt der Spitzenwert der Bande bei 3068 cm^{-1} sogar auf 41 Prozent des maximalen Spitzenwertes.

Die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD, siehe 2.1.3) kann anhand der Position der Maxima der Ramanbanden abgeschätzt werden. Diese folgen dem Verlauf der momen-

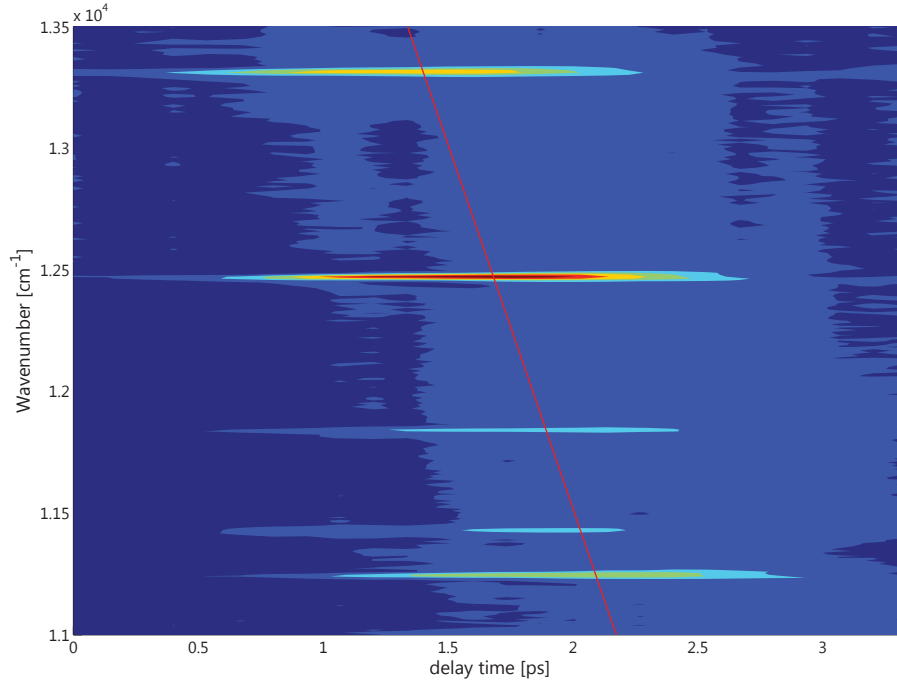


Abbildung 7.3: Konturdarstellung des Ramanspektrums von Benzonitril in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit zwischen Probe- und Pumpimpuls. Bei der Zeit $\tau = 0$ erreicht der Probeimpuls die Probe vor dem Pumpimpuls, bei hohen Verzögerungszeiten erreicht der Pumpimpuls die Probe zuerst. Das maximale Signal der einzelnen Ramanbanden in Abhängigkeit von der Zeit hängt vom Frequenzgang des Probeimpulses ab. Die rote Linie stellt eine lineare Anpassung an die Spitzenwerte der Ramanbanden dar.

tanen Frequenz des Probeimpulses $\omega(\tau)$ (vgl. Gleichung 2.7). Nähert man die temporale Phase des Probeimpulses mit einem rein quadratischen Term, so folgt ein linearer Verlauf der momentanen Frequenz. Die Steigung der momentanen Frequenz entspricht dann der zweiten Ableitung der Phase nach der Zeit $\phi''(t)$. Für den Wert der spektralen Phase zweiter Ordnung $\phi_2(\omega_0)$ im Verhältnis zu der Impulsdauer τ_0 gilt nach Gleichung 2.13:

$$1 \ll \frac{\phi_2}{\tau_0^2}$$

So kann die spektrale Phase ϕ_2 direkt aus der temporalen Phase ϕ'' abgeleitet werden:

$$\phi_2 \approx \frac{1}{\phi''} \quad (7.1)$$

Die reziproke Steigung der instantanen Frequenz als Funktion der Verzögerungszeit entspricht somit der GVD des Impulses. In Abbildung 7.3 ist als rote Linie eine lineare Anpassung an die Maxima der Ramanbanden bei den Schwingungsfrequenzen von Benzonitril

bei 999 cm^{-1} , 1192 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , 2228 cm^{-1} und 3068 cm^{-1} . Die Steigung beträgt $-2993.5\text{ cm}^{-1}/\text{ps}$. Das entspricht einer Gruppengeschwindigkeitsdispersion von 1773 fs^2 . Den größten Beitrag zu diesem Wert leistet das Objektiv (Fluar, Zeiss, $20\times/0.75$). Der Hersteller gibt für dieses Objektiv einen Wert von 1675 fs^2 an [220]. Die kleine Differenz der Werte kann zum Teil auf die GVD in der Luft (ca. 54 fs^2) zurückgeführt werden. Im Vergleich zu der Dispersion anderer in der Laser- und Fluoreszenzmikroskopie gebräuchlicher Objektive ist dieser Wert gering (vgl. Tabelle im Anhang C.1).

Die Pumpimpulsdauer am Probenort kann direkt aus dem Zeitverlauf einer einzelnen Ramanbande abgelesen werden (siehe Abb. 7.4). Die volle Halbwertsbreite betrug ca. 1.5 ps .

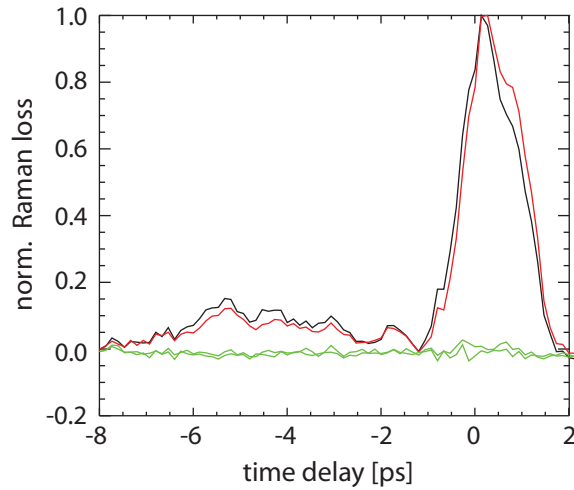


Abbildung 7.4: Normiertes Ramanbandensignal in Abhängigkeit der Verzögerungszeit zwischen Probe- und Pumpimpuls. Die rote Linie stellt das maximale Ramanverlustsignal der CH-Streckbande einer durchsichtigen Haushaltsfolie dar. Die schwarze Linie zeigt den normierten zeitlichen Verlauf des Integrals über jene Bande, die grünen Linien zeigen das Signal fern der Ramanresonanz. Beim Zeitnullpunkt erreicht der Pumpimpuls die Probe vor dem Probeimpuls, bei hohen Verzögerungszeiten ($> 8.25\text{ ps}$) erreicht der Probeimpuls die Probe zuerst. Der Nullpunkt der Zeit ist willkürlich gesetzt.

Der Impuls erscheint bei dieser Messung länger als bei der Autokorrelation (bestimmte Impulsdauer: 0.9 ps , siehe Abschnitt 3.2.5). Der Einfluss der Dispersion des Objektives und der strahlaufweitenden Linsen auf die Impulsdauer eines derart schmalbandigen Impulses ist jedoch vernachlässigbar gering. In der Kreuzkorrelation sieht man zudem einen langen zeitlichen Flügel des Pumpimpulses. Die Autokorrelation ist prinzipiell nicht in der Lage, eine asymmetrische Impulsform zu ermitteln. Die Diskrepanz der Halbwertsbreiten mag auf die angenommene Impulsform bei der Autokorrelation zurückgeführt werden.

7.1.3 Linienform der Ramanbanden bei der FSRS

Ein genauerer Blick auf die Bandenform einer einzelnen Ramanbande in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit zwischen Pump- und Probeimpuls ermöglicht eine qualitative Aussage über die Gruppengeschwindigkeitsdispersion des Ramanpumpimpulses. In Abbildung 7.5 ist diese Anhängigkeit exemplarisch anhand der Ramanbande von Benzonitril bei 2228cm^{-1} für zwei unterschiedliche spektrale Breiten des Pumpimpulses gezeigt. Wie

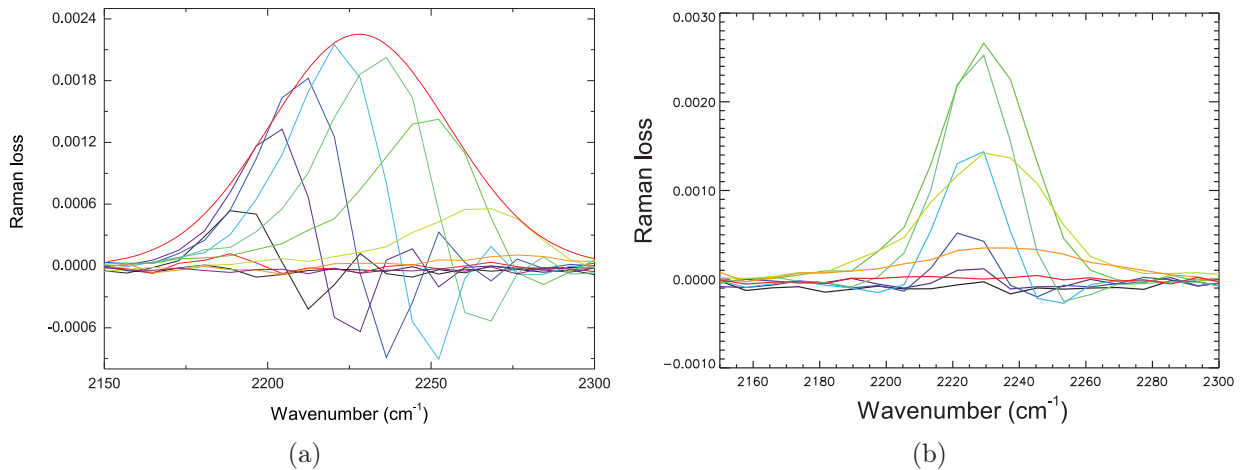


Abbildung 7.5: Linienform der 2228 cm^{-1} Bande von Benzonitril bei unterschiedlichen Verzögerungszeiten. Der Farbverlauf spiegelt die zeitliche Ordnung der Spektren wieder (schwarz: Probe vor Pump; hellblau und türkis: Pump und Probe zugleich; grün bis orange: Pump vor Probe) (a) Der Unterschied der Verzögerungszeit zweier aufeinanderfolgenden Spektren beträgt 334 fs . Die spektrale Breite des Pumpspektrums beträgt 58 cm^{-1} . Die Einhüllende aller Ramanspektren (rot) besitzt eine spektrale Breite von 64 cm^{-1} (b) Der Unterschied der Verzögerungszeit zweier aufeinanderfolgenden Spektren beträgt 267 fs . Die spektrale Breite des Pumpspektrums beträgt 18 cm^{-1} .

Abschnitt 4.1.2 dargelegt ist die Ramanbande schmaler, wenn der Probeimpuls die Probe vor dem Pumpimpuls erreicht. Gleichzeitig sieht man anhand der Veränderung der Wellenzahl des Spitzenwertes der Ramanbande den “Chirp“ des Pumpimpulses. Wie man bei normaler Dispersion erwartet, sind die niedrigen Frequenzen vor den hohen Frequenzen am Probenort. Die spektrale Breite der Einhüllenden der Ramanspektren des gesamten Zeitverlaufs entspricht in etwa der spektralen Breite des Pumpimpulses (vgl. Abb. 7.5 (a)). Der negative Flügel an der hochfrequenten Seite der Ramanbande ist ebenfalls ein Indiz für den “Chirp“ des Pumpimpulses (vgl. Abschnitt 4.1.2). Die beschriebenen Effekte des “Chirp“ sind bei einer spektralen Breite des Pumpimpulses von 18 cm^{-1} nur noch schwach zu erkennen (vgl. Abb. 7.5 (b)).

7.1.4 Ramanspektren mit der “Phasestepping“-Methode

In Abschnitt 5.6 wurde dargelegt, dass die “Phasestepping“-Methode die adäquate Messmethode für die Detektion mit der S3901 bzw. S3830 Diodenzeile von Hamamatsu darstellt. Dies soll hier im Vergleich zur Messung mit der referenzierten Messmethode (siehe Abschnitt 5.6.2) anhand von Ramanspektren der Testsubstanz Benzonitril dargestellt werden. Um den systematischen Messfehler der referenzierten Methode zu illustrieren, wurden Spektren unter Variation der Zeit zwischen Lichtmodulation und Ausleseereignis aufgenommen (siehe Abbildung 7.6 (a)). Für niedrige Zeiten sind ausschließlich die CH-Streck-Bande und die Nitrilbande erkennbar. Diese Banden nehmen für höhere elektronische Verzögerungszeiten ab, während die Banden des Benzolrings erscheinen. Bevor die “Rollings-Shutter“-Problematik erkannt wurde, wurden die meisten Spektren mit einer Verzögerungszeit von $340\text{ }\mu\text{s}$ aufgenommen. Bei dieser Verzögerungszeit sind die notorisch niedrigen “Finger-print“-Banden gerade maximal.

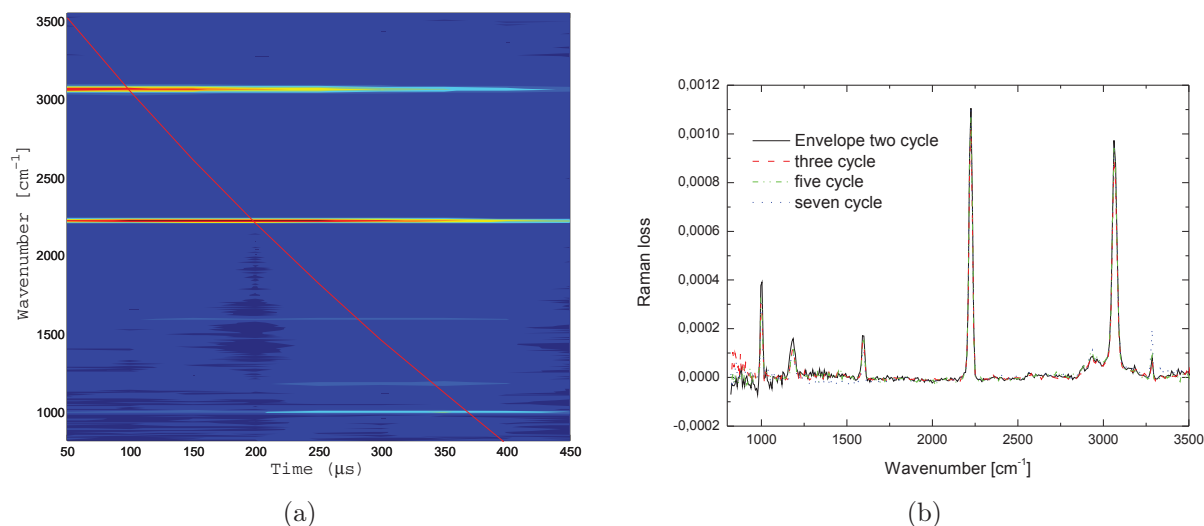


Abbildung 7.6: Ramanspektrum von Benzonitril mit der “Phasestepping“-Methode. (a) Darstellung des Phasenfehlers der referenzierten Messmethode (siehe auch Abschnitt 5.6.3) anhand des Spektrums von Benzonitril. Die rote Linie markiert den theoretischen Verlauf des maximalen Ramansignals in Abhängigkeit von der Verzögerung zwischen Lichtmodulation und Ausleseereignis. (b) Die Einhüllende der Ramanspektren des Zeitverlaufs von Abb. (a) (schwarz) im Vergleich mit der Messung des Ramanspektrums mit der “Phasestepping“-Methode (rot: Dreier-Zyklus, grün: Fünfer-Zyklus, blau: Siebener Zyklus).

Bei der “Phasestepping“-Methode ist der Phasenfehler deutlich minimiert. In Abbildung 7.6(b) ist die Einhüllende aller Zeitverzögerungen aus Abbildung 7.6(a) dargestellt (schwarz, durchgezogen)². Diese deckt sich mit den Messungen des Ramanspektrums von Benzonitril, welche mit der “Phasestepping“-Methode gemessen wurden (rot: 3er-, grün:

²Die Einhüllende ist hier als der Maximalwert aller Zeitverzögerungen bestimmt worden.

5er-, blau: 7er-Zyklus). Für die Messung des Ramanspektrums mit der “Phasestepping“-Methode ist jedoch keine Veränderung der Verzögerungszeit von Nöten. Die Aufnahmezeit und der experimentelle Aufwand sind dadurch deutlich verringert.

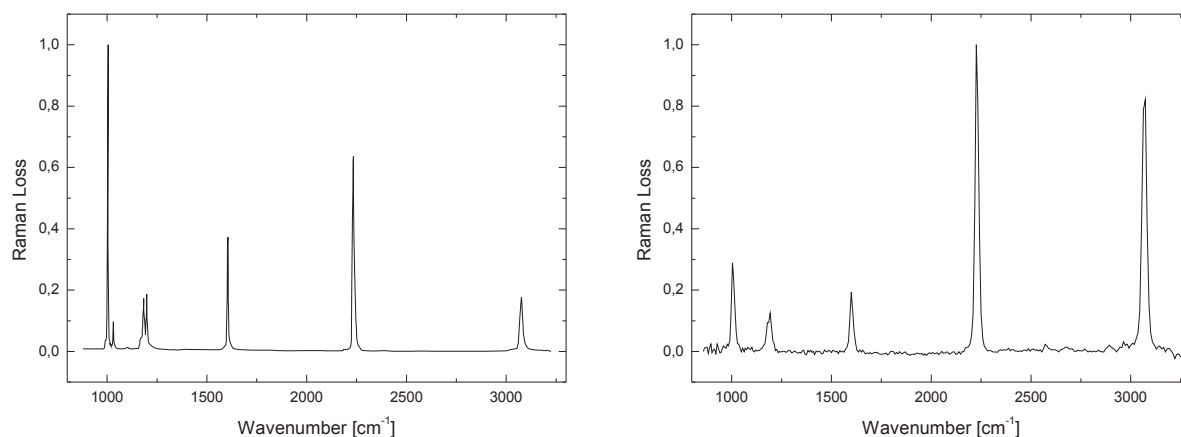
7.1.5 Vergleich des spontanen Ramanspektrums mit dem stimulierten Ramanspektrum von Benzonitril

In der Literatur zur Anwendung des stimulierten Ramaneffektes als Kontrastmechanismus in der Mikroskopie wird häufig das stimulierte Ramanspektrum eines Testmoleküles mit dessen spontanen Ramanspektrum verglichen [17, 106, 108, 120]. Beide Spektren werden in einem auf 50 cm^{-1} [17] bis 200 cm^{-1} [106, 108] eingeschränkten spektralen Bereich so übereinandergelegt, dass sich ihr Verlauf deckt. Daraus wurde der Schluß gezogen, dass die beiden Spektren identisch wären [67]. Dies kann nur unter Berücksichtigung der jeweiligen experimentellen Umstände gelten. Sowohl der spontane als auch der stimulierte Ramanefekt besitzt eine grundsätzliche und unterschiedliche Abhängigkeit von den Frequenzen der beteiligten Lichtfelder (siehe Abschnitt 4.1.1). Je nach Detektionsgeometrie des spontanen Ramanspektrums ist auch der Einfluss der Depolarisation der Ramanbande auf die Bandenhöhe anders als bei der stimulierten Ramanstreuung (siehe Abschnitt 4.1.1). Zudem können sich die Spektren auch nur bei vergleichbarer, instrumenteller spektraler Auflösung gleichen. Ist diese nicht gewährleistet, ist es sinnvoller das jeweilige Bandenintegral zu vergleichen.

Der MHz-FSRM Aufbau bietet die Möglichkeit, das stimulierte Ramanspektrum einer Testsubstanz von ca. 900 cm^{-1} bis 3500 cm^{-1} mit dem spontanen Spektrum zu vergleichen, was anhand des Ramanspektrums von Benzonitril angestellt wurde. Die Vorteile von Benzonitril als Testsubstanz wurden oben genannt (siehe Abschnitt 7.1). Zum Vergleich wird ein spontanes Ramanspektrum von Benzonitril aus der Literatur verwendet (Siehe Abbildung 7.7(a), Daten entnommen aus Ref. [188]). Dieses Spektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge von 514.5 nm mit einem Coderg PHO Ramanspektrometer aufgenommen [188]. Die spektrale Auflösung betrug 2 cm^{-1} . Der Detektor stand senkrecht zur Polarisationsrichtung des anregenden Laserlichtes [188]. Das Streulicht wurde ohne analysierenden Polarisator gemessen [188]. Das stimulierte Ramanspektrum wurde mit der “Phasestepping“-Methode gemessen und über einen Verzögerungsbereich zwischen Pump- und Probeimpuls von 3.3 ps gemittelt (siehe Abbildung 7.7(b)).

Die spektrale Auflösung des stimulierten Ramanspektrums beträgt ca. 20 cm^{-1} . Deswegen sind jeweils die Doppelbanden (siehe spontanes Ramanspektrum, Abbildung 7.7) bei 1000 cm^{-1} und bei 1190 cm^{-1} nicht aufgelöst. Die unterschiedliche spektrale Auflösung der Spektren führte auch zu unterschiedlichen Ramanbandenhöhen. Die höchste Bande des spontanen Spektrums ist die spektral sehr schmale Bande bei 1005 cm^{-1} , während im stimulierten Spektrum die Bande bei 2228 cm^{-1} deutlich höher ist.

Deswegen eignen sich die Bandenintegrale besser, um die Ramanbandenintensität des spontanen Ramanspektrums mit der des stimulierten Spektrums zu vergleichen. Die Ramanbanden beider experimenteller Spektren wurden integriert. Für den Vergleich mit dem



(a) Spontanes Ramanspektrum von Benzonitril

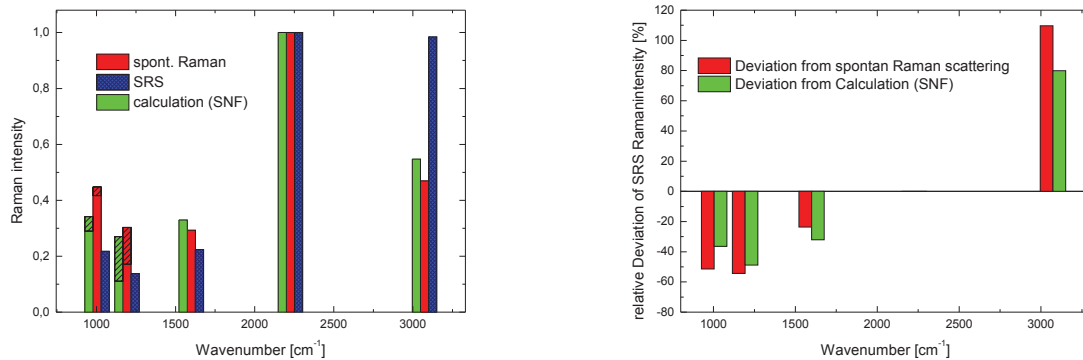
(b) Stimuliertes Ramanspektrum von Benzonitril

Abbildung 7.7: Normiertes spontanes und stimulierte Ramanspektrum von Benzonitril. Das spontane Ramanspektrum in (a) wurde aus Ref. [188] entnommen und auf die höchste Bande normiert. Das dargestellte, stimulierte Ramanspektrum wurde zum einen über unterschiedliche Verzögerungszeiten zwischen Pump- und Probeimpuls integriert zum anderen mit der “Phasestepping“-Methode gemessen. Damit werden die systematischen Fehler, die in den Abschnitten 7.1.2 und 7.1.4 dargestellt wurden, vermieden. Das stimulierte Ramanspektrum wurde auch auf die höchste Bande normiert.

stimulierten Spektrum wurden die Bandenintegrale der Doppelbanden im spontanen Spektrum aufsummiert. Diese Bandenintensitäten wurden für beide Spektren entsprechend ihrer intrinsischen Frequenzabhängigkeit korrigiert (siehe Gleichungen 4.12 und 4.13). Beim stimulierten Ramanereffekt wirkt die Polarisation des Probelichts als Polarisationsanalysator für das Streulicht. Ein solcher war bei der Messung des spontanen Ramanspektrums nicht vorhanden. Der Depolarisationsgrad ρ einer Bande ermöglicht eine Korrektur dieses Unterschiedes nach Gleichung 4.17. Das stimulierte Ramanspektrum wurde entsprechend dieser Gleichung und den in Ref. [188] für die einzelnen Banden angegebenen Depolarisationsgrade korrigiert.

Die korrigierten und normierten Ramanbandenintensitäten des spontanen Spektrums und des stimulierten Spektrums sind in Abbildung 7.8 dargestellt. Die Ramanbandenintensität des stimulierten Spektrums ist bei der CH-Streckbande höher als die des spontanen Spektrums, die aromatische Atemmode des stimulierten Spektrums ist niedriger als die des spontanen Spektrums. Die Diskrepanz zwischen den äußeren Banden des Spektrums beläuft sich auf einen Faktor von 4. Die Ursache dieser Abweichung ist derzeit nicht bekannt. Zum Vergleich wurden mit quantenmechanischen Methoden³ die differentiellen Ramanquerschnitte von Benzonitril berechnet. Die berechneten Ramanintensitäten decken sich in

³Die optimierte Geometrie und die Orbitale wurden mit dem Turbomole Programm Packet [221] berechnet. Die Rechnung beruht auf dem DFT (density functional theory) Verfahren. Es wurde dabei das Funktional B3LYP und der Basissatz 6-311+G** verwendet. Die Normalmoden und Streuquerschnitte wurden daraufhin mit dem Programm SNF bestimmt [222].



(a) Normierte und korrigierte Ramanintensitäten von Benzonitril für spontane Ramanstreuung (rot) stimulierte Ramanstreuung (blau) und numerische Simulation (grün).

(b) Relative Abweichung der Ramanintensität der SRS von der Ramanintensität der spontanen Ramanstreuung und einer numerischen Simulation dieser.

Abbildung 7.8: Vergleich der Ramanbandenintensität von spontaner und stimulierter Ramanstreuung. Die Ramanbandenintensität der SRS und der spontanen Ramanstreuung wurde aus dem Bandenintegral der experimentell bestimmten Spektren (siehe Abbildung 7.7) gewonnen. Die Frequenzabhängigkeit der SRS und der spontanen Ramanstreuung wurden nach den Formeln 4.12 und 4.13 korrigiert. Die Ramanintensität der SRS wurde entsprechend seiner Abhängigkeit vom Depolarisationsverhältnis so skaliert, dass sie mit der spontanen Ramanintensität vergleichbar ist. Die gerechneten Ramanintensitäten (grün in (a)) ergeben sich aus den frequenzkorrigierten, errechneten Ramanstreuquerschnitten der einzelnen Ramanbanden.

etwa mit den Ramanintensitäten der spontanen Ramanstreuung.

7.2 Ramanmikroskopie mit dem MHz-FSRM Aufbau

Die in diesem Kapitel dargestellten Ramanmikroskopischen Abbildungen stellen erste Versuche der Bildgebung mit dem MHz-Aufbau dar. Sie dienen der Demonstration der Leistungsfähigkeit des Aufbaus. Die wissenschaftliche Fragestellung bezieht sich also weniger auf die dargestellten Proben, als auf die realisierten Kennwerte der Ramanmikroskopie. Die Datensätze zur Ramanmikroskopischen Bildgebung wurden wie folgt aufgenommen: Zunächst wurde der Aufbau mit einer Benzonitril-Probe justiert. Besonderer Wert wurde auf die Darstellung der niederfrequenten Banden gelegt. Daraufhin wurde die abzubildende Probe an den Probenort gelegt. Mit Hilfe einer CCD Kamera und einer gewöhnlichen Lampe wurde mit einer Transmissionsweitfeldaufnahme der Probe der abzubildende Bereich festgelegt. Dieser Bereich wurde in äquidistanten Schritten abgerastert. Dabei wurde der Rastertisch unidirektional verfahren, d.h. die Richtung, mit der eine Spalte des Bildes abgerastert wurde, wurde immer beibehalten. Bei jedem Bildpunkt wurde ein referenzier-

tes Ramanspektrum (siehe Abschnitt 5.6.2) aufgenommen. Der so erhaltene Datensatz hat zwei Raumdimensionen und eine spektrale Dimension. Um ein Bild zu erzeugen, muss die spektrale Dimension mit einer geeigneten Methode auf die Raumdimensionen projiziert werden. Es wurden zwei Methoden angewandt:

- Für die Auswertung des Datensatzes einer Epithelzelle eine univariate Methode, nämlich die Integration der CH-Streckbande (siehe Abschnitt 7.2.2)
- für die Auswertung von Mikroskopiestandards aus unterschiedlichen Polymeren eine multivariate Methode, die auf einer Hauptwertanalyse des Datensatzes beruht (siehe Abschnitt 7.2.1)

Bei beiden Methoden entsteht ein sogenannter “chemischer Kontrast“, der auf der chemischen Selektivität des Ramaneffektes beruht.

7.2.1 Ramanbildgebung von Polymermikroskopiestandards anhand einer Hauptwertanalyse

Schon am Anfang der Renaissance der kohärenten Ramanmikroskopie wurden Polymermikroskopiestandards als Testprobe verwendet [58]. Diese eignen sich als Testobjekt, weil sowohl ihre chemischen als auch ihre physikalischen Eigenschaften genau bekannt sind: Üblich sind Standards aus Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA). Der hohe Anteil an CH-Gruppen und die dichte Packung führen zu einem hohen Signal bei der CH-Streckbande. Die Polymerkugeln sind zudem transparent für VIS-NIR Wellenlängen und ihre Größe genau bekannt. Der große Brechungsindexunterschied zwischen den Polymeren (PS: $n=1.577$ bei 833 nm, PMMA $n=1.484$ bei 833 nm [223]) und Wasser ($n = 1.329$ bei 825 nm [224]) kann bei der Abbildung zu Messartefakten führen (siehe Anhang B).

Für die Messung wurden ein PS-Standard (FLUKA, 81494, microparticle size standards based on polystyrene monodisperse, 4 μm) und PMMA-Mikropartikel (FLUKA, 73371, micro particles on polymethacrylat, 4 μm) verwendet. Die beiden Suspensionen wurden zu gleichen Teilen gemischt und mit entionisiertem Wasser verdünnt. Diese verdünnte Suspension wurde zwischen zwei Deckgläser gebracht und mit Nagellack eingeschlossen (Zur Probenpräparation siehe auch Abschnitt 5.2.4). Die vier Mikrometer großen Partikel haben sich für die Abbildung mit dem FSRM-MHz-System als geeignet erwiesen. Kleinere Partikel (1 – 2 μm) sind durch die Brownsche Bewegung zu mobil, größere Partikel (10 μm) zeigten gelegentlich eine Art Fabry-Perot-Interferenz im Spektrum des Probeimpulses. Auch die vier Mikrometer großen Partikel waren zum Teil mobil, es ließen sich aber genügend immobile Partikel für Abbildungen finden.

Exemplarisch soll hier ein Datensatz eines Scans einer wässrigen Suspension von 4 μm Partikeln aus PS und 4 μm Partikeln aus PMMA dargestellt werden (siehe Abbildung 7.11(a)). Der Scan besteht aus 75×74 Bildpunkten mit einem Rasterabstand von 250 nm. Die Messzeit für das Ramanspektrum eines Bildpunktes betrug 100 ms. Die gesamte, reine

Messzeit betrug damit 555 Sekunden oder 9 Minuten und 15 Sekunden. Der gesamte Scan dauerte aufgrund der Verfahrzeit zwischen den Messintervallen ca. 1.5 Mal länger⁴.

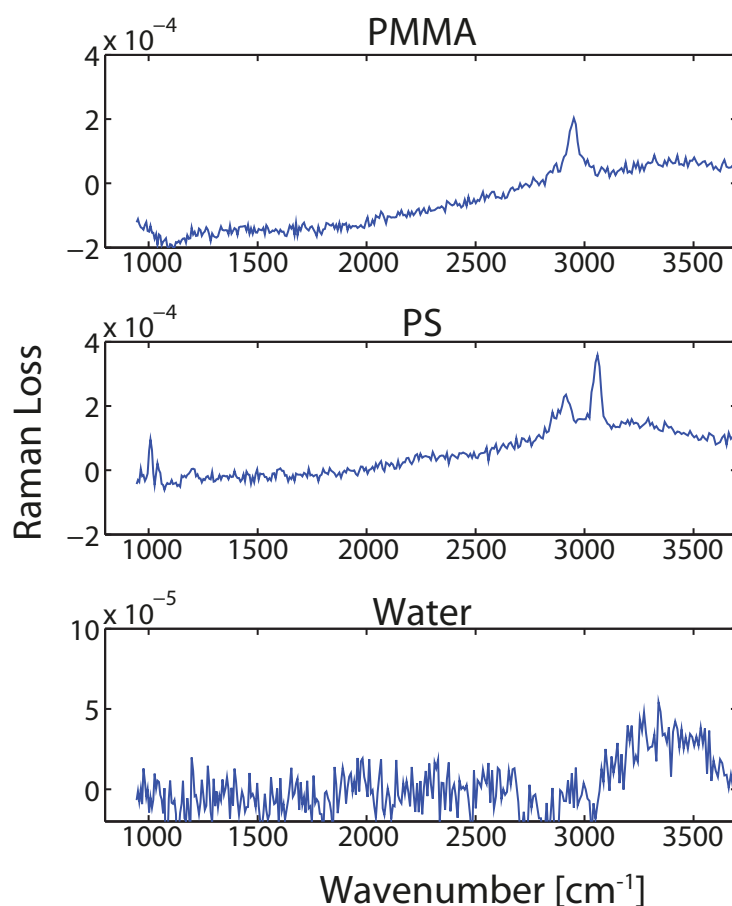


Abbildung 7.9: Stimulierte Ramanspektren aus einem bildgebenden Scan von Polymermikroskopiestandards (PS, PMMA) in einer wässrigen Dispersion. Jedes Spektrum repräsentiert einen Bildpunkt, in dem jeweils die Reinsubstanz (PMMA, PS, Wasser) vorlag. Die Aufnahmezeit eines Spektrums betrug 100 ms.

In Abbildung 7.9 sind repräsentativ Ramanspektren einzelner Bildpunkte dargestellt. Anhand der Spektren lassen sich die Hauptbestandteile der Probe klar unterscheiden. In dem Ramanspektrum von PMMA ist eine einzelne aliphatische CH-Streckbande erkennbar. Das Polystyrolspektrum zeigt eine aliphatische und eine aromatische CH-Streckbande außerdem wird bei ca. 1000 cm^{-1} die Atemmode des Benzolrings sichtbar. Die Basislinie beider Spektren ist leicht geneigt. Diese Variation ist ein systematischer Messfehler, der immer bei Messungen der Polymerstandards auftauchte (siehe auch im Anhang B). Das

⁴Die Verfahrzeit wurde nie exakt bestimmt.

Spektrum von Wasser zeigt allein die breite OH- Streckbande über 3000 cm^{-1} , die Basislinie ist konstant.

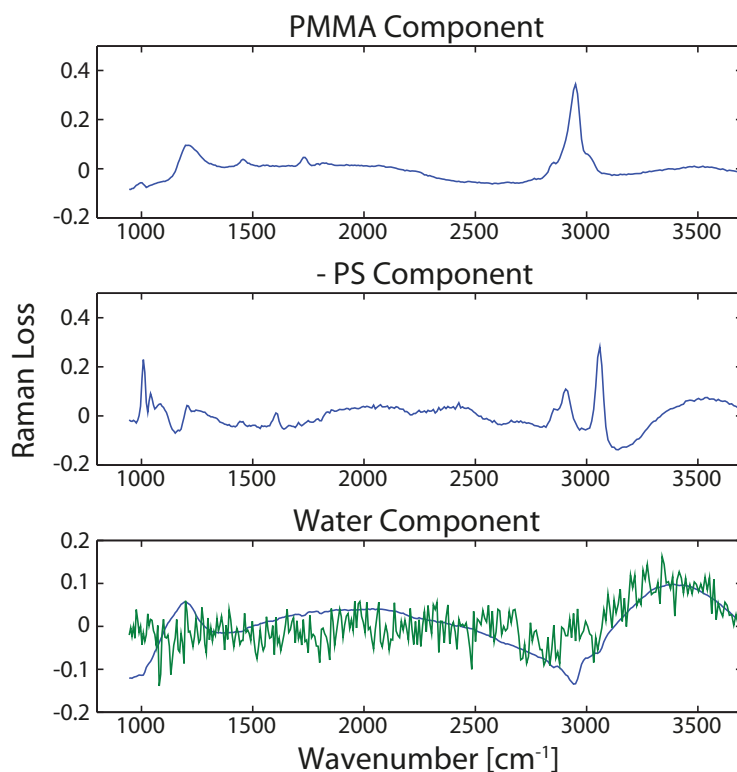


Abbildung 7.10: Repräsentative PCA-Komponenten (5=Wasser, 6=PMMA, 11=-PS) einer Aufnahme von Polymermikroskopiestandards in einer wässrigen Dispersion. Die Komponenten wurden anhand ihrer spektralen Charakteristika den Reinsubstanzen in der Probe zugeordnet. Im Spektrum der Wasserkomponente ist zum Vergleich auch das Einzelpunktspektrum von Wasser (grün) dargestellt.

Die Probe bestand allein aus diesen drei Komponenten. Für eine vollständige Charakterisierung der Probe, benötigt man also für jeden Bildpunkt nur die drei Konzentrationen der Komponenten. Der Datensatz enthält für jeden Bildpunkt 512 spektrale Kanäle, in welchen die benötigte Information enthalten ist. Jedoch sind die Kanäle zum größten Teil redundant. Die Hauptkomponentenanalyse oder “Principal Component Analysis“ (PCA) ist eine statistische Methode, mit der man die Dimensionalität eines Datensatzes reduzieren kann [225, 226]. Die PCA wurde schon zur Kontrasterzeugung in der kohärenten Ramanbildgebung angewandt [227]. Bei einer PCA wird der $m \times n$ große Datensatz in zwei Matrizen zerlegt. Der erste Index m repräsentiert hier die Anzahl der Bildpunkte, der zweite Index n die Anzahl der spektralen Kanäle. Die erste $(n \times n)$ -Matrix enthält als Spalten eine neue orthogonale, spektrale Basis des Datensatzes [226]. Diese PCA-Komponenten sind in

der Reihenfolge ihres Beitrags zur gesamten Varianz des Datensatzes sortiert. Die zweite ($m \times n$)-Matrix enthält für jeden Bildpunkt den Beitrag jeder Komponente zum Spektrum des Bildpunktes. Das Spektrum eines Bildpunktes wird also in eine Linearkombination mit den Komponenten als Basisvektoren zerlegt. Diese sind orthogonal und können daher sowohl negative als auch positive Einträge besitzen.

Eine Analyse der ersten Komponenten eines Datensatzes gibt Auskunft über die größten spektralen Variationen des Datensatzes. Die ersten Hauptkomponenten des vorliegenden

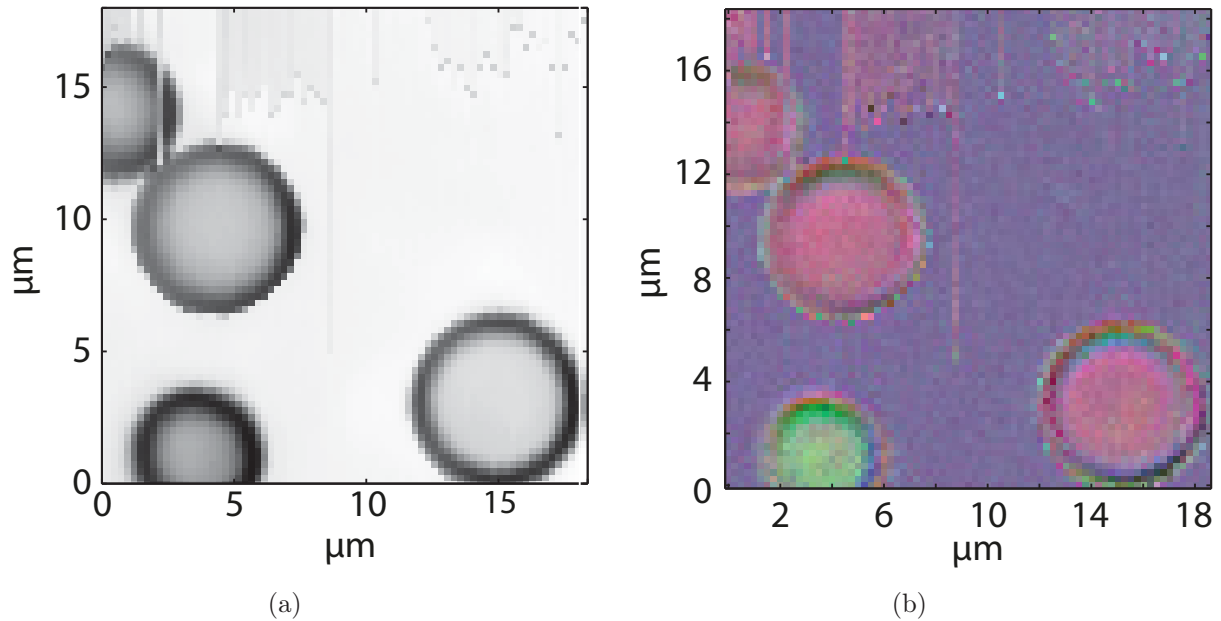


Abbildung 7.11: Transmissionsaufnahme und Ramanmikroskopische Analyse von Polymermikroskopiestandards (PS, PMMA) in einer wässrigen Dispersion. Die Transmissionsaufnahme wurde anhand der Transmission des Probeimpulses an jedem Bildpunkt ermittelt. Die Ramanmikroskopische Analyse beruht auf den Gewichten der in Abbildung 7.10 gezeigten PCA-Komponenten. Diese Gewichtung wurde in den RGB-Farbraum übertragen (rot: PMMA; grün: PS; blau: Wasser)

Datensatzes sind auf systematische Schwankungen des Probespektrums zurückzuführen (siehe Anhang B). Die Variation des Datensatzes aufgrund des Ramansignals macht sich erst ab der fünften Hauptkomponente bemerkbar. So zeigt die fünfte Komponente die Wasserbande (vgl. Abbildung 7.10), zudem ist als negativer Beitrag die CH-Streckbande von PMMA in der fünften Hauptkomponente zu erkennen. Bei der positiven "Bande" bei ca. 1200 cm^{-1} handelt es sich um ein Artefakt. Auch ohne Probe und ohne Pumpimpuls taucht diese Variation im referenzierten Probespektrum auf. Die fünfte Hauptkomponente soll in dieser Behandlung Wasserkomponente genannt werden. Die sechste Hauptkomponente weist große Ähnlichkeit mit dem Spektrum von PMMA auf. Deswegen soll diese Komponente als PMMA-Komponente bezeichnet werden. In der Komponente ist nicht nur die CH-Streckbande zu erkennen, sondern auch Banden bei ca. 990 cm^{-1} (symme-

trische COC-Streckschwingung), 1440 cm^{-1} (Methyl-Deformationsschwingung) und bei 1750 cm^{-1} (CO-Streckschwingung der Doppelbindung.), welche auch den stärksten Banden im spontanen Ramanspektrum von PMMA entsprechen (vgl. Abbildung A.3). Außerdem tritt wie in der Wasserkomponente ein spektrales Artefakt bei ca. 1200 cm^{-1} auf. Das Signal- zu Rauschverhältnis der PMMA-Komponente ist im Vergleich zum Einzelspektrum deutlich verbessert. Die elfte Hauptkomponente weist die Charakteristika des Polystyrolspektrums auf. Allerdings sind die Ramanbanden ins Negative verkehrt. Für die bessere Kenntlichkeit ist deswegen in Abbildung 7.10 das Negative der elften Hauptkomponente dargestellt. Deutlich ist sind die aromatische und aliphatische CH-Streckbande, die Ring-Atemmode bei 1000 cm^{-1} und zwei weitere Streckmoden des aromatischen Rings bei 1600 und 1450 cm^{-1} . Des Weiteren erkennt man eine Bande bei 1200 cm^{-1} und eine am Fuß der Ringatemmode, die beide auch im spontanen Ramanspektrum erkennbar sind (vgl. Abbildung A.2). Der negative Dip bei 1200 cm^{-1} kann wieder dem schon beschriebenen spektralen Artefakt zugeordnet werden. Diese Komponente wird im Folgenden als PS-Komponente bezeichnet.

Da die genannten Hauptkomponenten so gut mit den Spektren der Bestandteile korrelieren, kann man erwarten, dass die Gewichte der jeweiligen Hauptkomponenten mit der Konzentration des jeweiligen Reinstoffes im Bildpunkt zusammenhängen. Dies kann man visualisieren, indem man jeder der drei gewählten Hauptkomponenten einen Farbkanal im RGB-Farbraum zuweist. Das Gewicht der Hauptkomponente entspricht dann der Farbstärke des Kanals. Die Skala reicht dabei für eine 8 Bit Farbtiefe von 0-255. Eine ähnliche Herangehensweise wurde zur Erzeugung von Falschfarbenbildern aufgrund von CARS-Spektren von Mäusehirn verwendet [227]. Dort nutzte man jedoch direkt die Gewichte der ersten drei Hauptkomponenten als Grundlage für die drei Farbkanäle. In Abbildung 7.11 (b) ist der vorliegende Datensatz durch die RGB-Farbgebung der fünften (Wasser), sechsten (PMMA) und elften (PS) Hauptkomponente visualisiert. Man kann die drei Bestandteile deutlich über ihre Farbgebung unterscheiden (Wasser=blau, PS= grün, PMMA=rot). An den Randbereichen der Polymerpartikel mischen die Komponenten stärker. Auch kommt es dort vermehrt zu systematischen Abbildungsfehlern aufgrund des Brechungsindexsprungs (siehe Anhang B). Wie auch aus dem Spektrum ersichtlich entspricht die Wasserkomponente nicht vollständig dem Spektrum des Wassers, sondern einer Mischung aus PMMA und Wasserspektrum. Dementsprechend benötigt man zur Rekonstruktion eines Wasserspektrums sowohl die Wasserkomponente als auch die PMMA-Komponente, was für den Wasserbereich eine violette Farbgebung ergibt. Theoretisch ermöglicht die PCA auch eine quantitative Analyse der Bestandteile eines Bildpunktes. Die nötige Eichung des Systems wurde jedoch nicht vorgenommen.

7.2.2 Ramanbildgebung einer Epithelzelle

Ein wachsendes Anwendungsfeld der Ramanmikroskopie sind die Lebenswissenschaften [14]. Eine wesentlicher Designparameter der Lichtquelle für den MHz-FSRM Aufbau war die Verträglichkeit der Lichtimpulse für biologische Proben und die Fähigkeit biologische Proben abzubilden [60]. Um die Anwendbarkeit auf biologische Proben zu testen, wur-

de eine menschliche Epithelzelle aus der Mundschleimhaut mit dem MHz-FSRM Aufbau vermessen (siehe Abbildung 7.12). Die Zelle stammte aus einem Abstrich der Mundschleimhaut eines Menschen. Der Rasterscan deckte einen Bildbereich von $60 \times 60 \mu\text{m}^2$ ab, der in 150×150 Schritten mit einem Abstand von $0.4 \mu\text{m}$ abgerastert wurde. An jedem Bildpunkt wurde ein Ramanspektrum mit einer Aufnahmezeit von 160 ms mit der referenzierten Messmethode gemessen. Das Licht wurde dabei mit einem FLUAR-Objektiv ($20\times/\text{NA}=0.75$, Zeiss) fokussiert und mit einem C-Achromat-Objektiv eingesammelt ($32\times 0.85 \text{ NA}$).

Die Zelle ist im Transmissionsbild (siehe Abbildung 7.12) ungefähr $44 \mu\text{m} \times 36 \mu\text{m}$ groß. Der Nukleus der Zelle ist gut erkennbar. Er ist beinahe rund. Sein Durchmesser beträgt ca. $10 \mu\text{m}$. Der intrazelluläre Bereich ist fein strukturiert. Das Transmissionsbild offenbart auch unterschiedliche Scanartefakte im oberen Bereich der Bildmitte. Zur Kontrasterzeugung wurden die Ramanspektren mit einer univariaten Methode ausgewertet. Das Ramansignal von den Zellstrukturen war aufgrund der niedrigen Konzentration der Probe im Fokaltvolumen sehr schwach. Nur die CH-Streckbande und die Wasserbande sind in einem Einzelspektrum erkennbar (Spektren nicht gezeigt). Deswegen wurde für eine univariate Auswertung die CH-Streckbande zur Visualisierung der Zelle gewählt. Der Kontrast der roten Bereiche in Abbildung 7.12 entspricht dem Mittelwert der CH-Streckbande von $2826 - 3050 \text{ cm}^{-1}$. Der Integrationsbereich umfasst alle CH-Streckmoden (CH_3 , CH_2 , CH) einer Zelle [28]. Vor der Bildung des Mittelwertes wurde von jedem Spektrum der Mittelwert des Medians der nächsten 10 benachbarten Pixel an beiden Seiten des Integrationsbereichs als Untergrundkorrektur abgezogen. Der CH-Kontrast wurde daraufhin mit einem 3×3 -Bildpunkte-Filter gemittelt. Der Schwellwert der Skala von 6.2×10^{-6} orientiert sich am Rose-Kriterium (siehe Abschnitt: 6.2): Die Standardabweichung des CH-Strecksignals im Bereich neben der Zelle beträgt 3.8×10^{-6} . Das Bild besteht aus 150×150 Pixel. Deswegen sollte die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 4.4×10^{-5} sein. Laut Rose müsste das SNR dann größer als fünf sein. Da über neun benachbarte Bildpunkte gemittelt wurde, genügt ein SNR von $5/\sqrt{9}$. Daraus folgt nun ein Signalschwellwert von $3.8 \times 10^{-6} \times 5/\sqrt{9} = 6.3 \times 10^{-6}$. Das CH-Strecksignal übersteigt den signifikanten Schwellwert nur in wenigen Bereichen der Zelle: im Zellkern, an einem kleinen Teil der Plasmamembran und an einzelnen Stellen innerhalb des Cytoplasmas. Diese Bereiche sind auch im Transmissionsbild als Strukturen erkennbar.

Da über den gesamten CH-Bereich integriert wurde, ist es nicht möglich, über die chemische Zusammensetzung der einzelnen Zellbereiche eine spezifische Aussage zu machen. Man kann das Signal als Maß der Konzentration organischer Strukturen verstehen. Diese ist im enggepackten Zellkern sehr hoch [228]. Der Zellkern zeigt auch das stärkste CH-Strecksignal. Die Plasmamembran besteht aus Phospholipiden [228]. Auch hier erwartet man eine hohe Konzentration und somit ein signifikantes Signal. Die Membran ist jedoch sehr dünn (4-5 nm) [228]. Nur an einer einzelnen Stelle scheint die Orientierung der Membran geeignet, um ein ausreichend hohes Signal zu generieren. Die anderen Bereiche mit einem signifikanten CH-Strecksignal sind schwer zuzuordnen. Die meisten Organellen einer eukaryotischen Zelle sind kleiner als diese [228]. Lipideinschlüsse könnten diese Bereiche erklären [108].

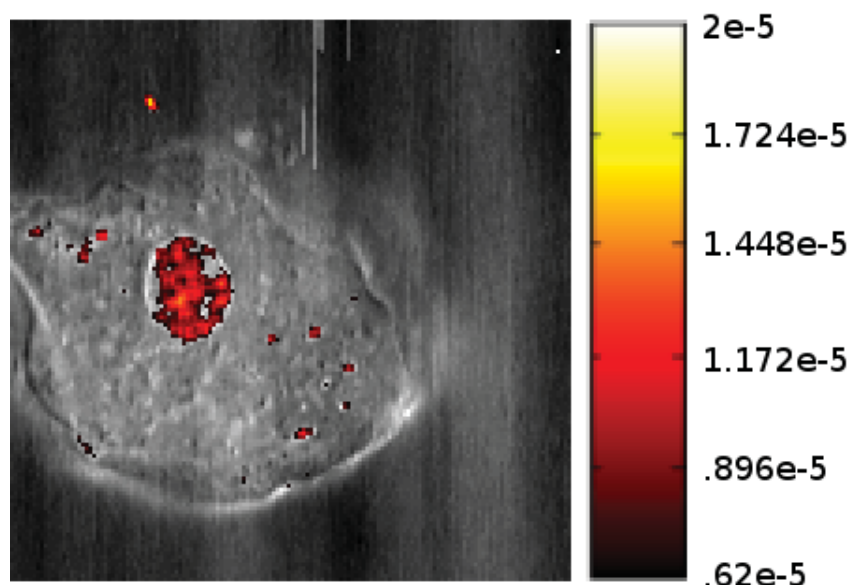


Abbildung 7.12: Ramanmikroskopische Aufnahme einer Epithelzelle aus der menschlichen Mundschleimhaut. Das Bild bildet einen $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ Bereich ab. Die Grauwerte beruhen auf der Transmission durch die Probe. Die Transmission variiert nur um ca. 3 Prozent (Schwarz bedeutet höchste Transmission, weiß niedrigste Transmission). Der Transmissionsaufnahme ist das Bandenintegral über den CH-Streckbereich des Ramanspektrums (siehe Abbildung 7.13) entsprechend der Farbskala überlagert. Signifikante Beiträge zeigen sich im runden Zellkern und in einzelnen Bereichen im Zellplasma.

In Abbildung 7.13 ist das Durchschnittsspektrum aller rot gekennzeichneten Bereiche in Abbildung 7.12 dargestellt (grün). Da die Grundlinie des Spektrums deutlich variiert, wurde das Spektrum eines Bereichs ausserhalb der Zelle (schwarz) abgezogen. Das Differenzspektrum (rot) zeigt deutlich die CH-Streck-Bande. Andere Ramanbanden sind nur zu erahnen. Das spontane Ramanspektrum des Zellkerns einer Zelle aus der Mundschleimhaut eines Menschen zeigt im sogenannten "Fingerprint"-Bereich (von $800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) und im anschließenden Frequenzbereich (z.B. bei ca. 1660 cm^{-1}) einige Banden. Das Signal beider Messmethoden wurde auf das CH-Strecksignal normiert. Im Vergleich zu dem spontanen Ramanspektrum (blau) aus dem Zellkern ist die Signalthöhe des stimulierten Signals hier deutlich geringer.

Dieser Bereich wird in der Ramanmikroskopie für eine chemische Differenzierung zwischen unterschiedlichen Bestandteilen der Zelle verwendet [28, 37]. Es hat sich auch in Messungen an Reinsubstanzen mit diesem Aufbau gezeigt, dass das Signal bei niedrigen Schwingungsfrequenzen unerwartet niedrig im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Signalthöhen der spontanen Ramanstreuung erscheint (vgl. Abschnitt 7.1.5). Das gilt auch, wenn die beschriebenen systematischen Fehler von "Rolling-Shutter" (siehe Abschnitt 5.6.2), "Chirp" des Probeimpulses (siehe Abschnitt 7.1.2) und die intrinsische Frequenzabhängigkeit beider Wechselwirkungen (spontan und stimuliert) berücksichtigt werden. Eine

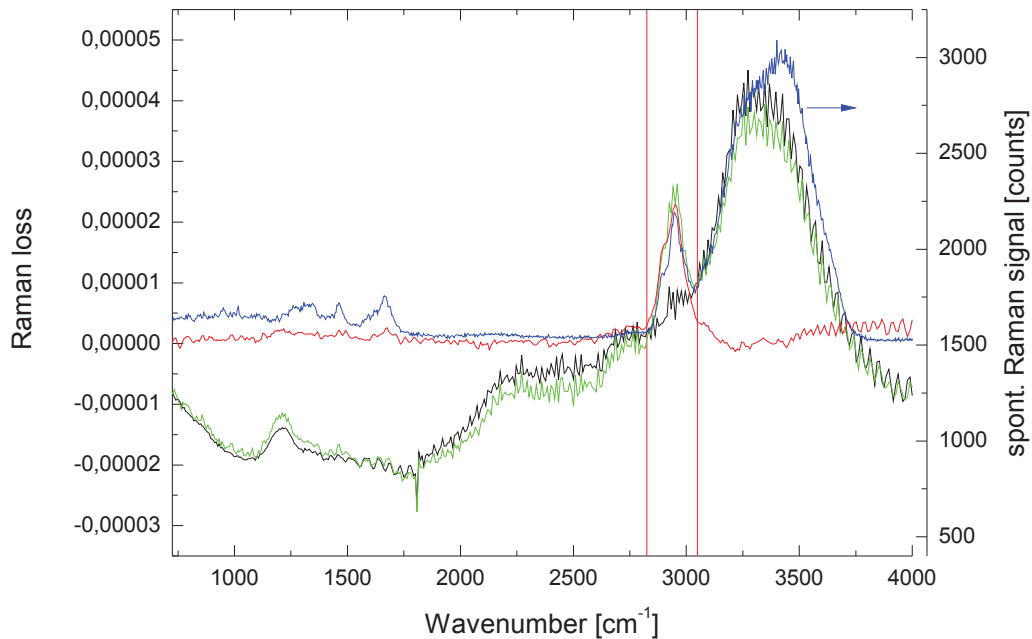


Abbildung 7.13: Gemittelte Ramanspektren aus der Ramanmikroskopischen Aufnahme einer Epithelzelle: Durchschnittsspektrum der CH-streckreichen Regionen der Zellen (grün, Mittelungszeit 81.12 s), Durchschnittsspektrum von Wasser außerhalb der Zelle (schwarz), geglättetes Differenzspektrum der Regionen mit CH-Strecksignal und Wasser (rot), gemitteltes spontanes Ramanspektrum des Zellkerns einer anderen Epithelzelle aus der Mundschleimhaut (blau, Mittelungszeit 3 s). Die vertikalen, roten Linien markieren den Integrationsbereich der univariaten Auswertung für die Bildgebung ($2826 - 3050 \text{ cm}^{-1}$). Das spontane Ramanspektrum wurde von Dr. Tatyana Chernenko aus der Gruppe von Max Diem (North Eastern University, Boston) zu Verfügung gestellt.

Klärung dieses Sachverhaltes ist empfehlenswert und in Anbetracht des hohen Informationsgehaltes dieses Spektralbereiches unerlässlich.

Abgesehen von der geringen Sensitivität im “Fingerprint“-Bereich eignet sich der MHz-FSRM Aufbau um Zellen abzubilden. Die geringen Brechungsindexunterschiede zwischen intra- und extrazellulärem Bereich kommen einer Messung des Spektrums in Transmission entgegen (siehe im Gegensatz dazu in Anhang B). Die hohe Transmission der Zelle führt zu einem minimalen Schrotrauschen. Der nächste Schritt wäre die Abbildung lebender Zellen, um die Verträglichkeit der verwendeten Lichtleistungen für diese zu überprüfen.

Kapitel 8

Perspektive und Kritik der FSRM

Diese Arbeit beschreibt im Detail den MHz-FSRM Aufbau, der in der AG Gilch über vier Jahre entwickelt wurde und dessen erste Anwendung. Das letzte Kapitel soll zunächst die Eckdaten des Aufbaus nochmals zusammenfassen. Anhand dieser sollen einerseits die Möglichkeiten des Aufbaus zur Bildgebung diskutiert werden, andererseits auch die Grenzen dieser Technik genannt werden. Von dieser Bestandsaufnahme ausgehend sollen mögliche Entwicklungsrichtungen aufgezeigt werden.

8.1 Fähigkeiten und Grenzen des MHz-FSRM-Aufbaus

Der MHz-FSRM Aufbau dient der chemisch selektiven Bildgebung mikroskopischer Proben mittels des stimulierten Ramaneffektes. Wie jede andere schwingungsspektroskopische Methode (IR, Raman, CARS) zur Kontrasterzeugung ist die SRS nicht invasiv. Die chemische Charakterisierung eines Probenortes erfolgt aufgrund des dort gemessenen stimulierten Ramanspektrums. Der gemessene Spektralbereich reicht von 900 bis 4000 cm^{-1} . Die spektrale Auflösung des Instruments beträgt ca. 20 cm^{-1} . Die spektrale Auflösung ist durch die Charakteristik des verwendeten FBG ("Fiber Bragg Gratings") vorgegeben (siehe Abschnitt 3.2.5). Für die Bildgebung wurden Messzeiten im Bereich zwischen 100 ms und 160 ms pro Ramanspektrum realisiert (siehe Abschnitt 7.2). Die laterale, räumliche Auflösung beträgt (als durch Beugung begrenzt angenommen, siehe Abschnitt 5.2.2) 0.8 μm . Der aufgenommene, räumlich zugeordnete spektrale Datensatz kann mit Methoden der linearen Algebra (z.B. PCA, SVD) ausgewertet werden. So wurde eine Klassifizierung verschiedener Substanzen einer Probe anhand einiger Hauptkomponenten einer Hauptkomponentenanalyse gezeigt (siehe Abschnitt 7.2.1). Aufnahmen biologischer Proben erbrachten im analytisch so wichtigen "Fingerprint" Bereich des Spektrums [37, 115] ein so kleines Signal- zu Rauschverhältnis, dass eine sinnvolle Auswertung anhand dieses Spektralbereiches nicht mehr möglich war (siehe Abschnitt 7.2.2). Andere Techniken wie z.B. Muiltplex-CARS oder spontane Ramanstreuung nutzen bei vergleichbaren Aufnahmezeiten diesen Bereich für die Analyse [28, 40].

Das Signal- zu Rauschverhältnis des Aufbaus hängt von der Höhe des Ramansignals und

dem Rauschuntergrund für die jeweilige Messzeit ab. Die Signalhöhe wiederum hängt neben der Ramanaktivität und der Konzentration der jeweiligen Probensubstanz im Fokalvolumen von der Intensität der Pumpimpulse ab. Für ein gegebenes Objektiv und gegebener Impulsdauer und -form ist diese allein von der Spitzenleistung des Verstärkers bedingt. Diese ist momentan durch das Auftreten von Selbstphasenmodulation in der Faser bei höheren Leistungen begrenzt. Eine weitere obere Grenze für die Durchschnittsleistung des Pumpimpulses stellt die Zerstörschwelle biologischer Proben dar. Sie liegt je nach Kriterium für die Zellschädigung zwischen wenigen mW [130] und mehreren 10 mW (ca. 50-80 mW für Wellenlängen zwischen 880 und 1000 nm) [123]. In jedem Fall ist die derzeit verfügbare Durchschnittsleistung der Pumpimpulse eher am oberen Rand des gerade noch Verträglichen anzusiedeln. Die Signalhöhe ist also einerseits durch die schlechte Verträglichkeit der Proben mit höheren Lichtleistungen der Pumpimpulse andererseits auch durch die mangelnde Verfügbarkeit höherer Lichtleistungen eben dieser Impulse begrenzt.

Der Rauschuntergrund ist wesentlich durch drei Einflüsse bestimmt (siehe Abschnitt 6): das Laseramplitudenrauschen des Probelasers, das Schrotrauschen der Photoelektronen und das Ausleserauschen der Detektion. Ersteres ist wesentlich von dem Rauschen des Pumplasers und äußeren Einflüssen wie Luftströme und akustische Vibrationen des Systems bedingt (siehe Abschnitt 6.1.1). Die physikalisch fundamentalere Grenze stellt allerdings das Schrotrauschen dar. Je mehr Probelicht zur Verfügung steht, umso geringer wird das gemessene Schrotrauschen. Jedoch ist auch die Lichtleistung des Probelichts durch eine mögliche Probenschädigung begrenzt. Da die Wellenlängen des Probelichtes kürzer sind, sinkt der Schwellwert für eine Zellschädigung leicht (wenige mW [130] bis zu ca. 45 mW [123]). Momentan wird das Probelicht mit einer Leistung von ca. 1 mW (gemessen vor dem fokussierenden Objektiv) auf die Probe gelenkt, die Lichtleistung muss jedoch vor dem Spektrographen auf ca. 160 μ W abgeschwächt werden, um den Detektor nicht zu sättigen. Das minimale Schrotrauschen ist also zur Zeit durch die Lichtaufnahmefähigkeit des Detektors begrenzt. Eine Langzeitanalyse des Signals (Messzeit >1 h) zeigte sowohl Schwankungen des Signals im Bereich von ca. 10 % als auch einen beinahe genauso großen Signaldrift [229]. Die Messzeit entspricht in etwa der Aufnahmezeit eines typischen Rasterscan. Die Signalthöhen eines Bildscans sind neben den oben beschriebenen kurzzeitigen Schwankungen bei der Messung eines Spektrums (siehe auch Abschnitt 6), folglich auch langzeitigen Schwankungen unterworfen. Eine Analyse eines aufgenommen Bildes ist mit eben diesem Fehler behaftet. Zudem kann der MHz-FSRM-Aufbau Proben nur in Transmission messen. Von stark streuenden Proben oder von Proben mit größerer Schichtdicke als die Summe der Arbeitsabstände beider Objektive können keine Aufnahmen gemacht werden.

8.2 Ungeklärte Sachverhalte bei der Messung mit dem MHz-FSRM-Aufbau

Bei der Messung von Ramanspektren und Ramanbildern mit dem Aufbau konnten die Ursachen einiger Sachverhalte bis jetzt nicht geklärt werden. Ein Problem stellt die Abwei-

chung der gemessenen Ramanbandenhöhen von den aus der spontanen Ramanspektroskopie oder der Theorie erwarteten Ramanbandenhöhen dar. Die Klärung dieses Sachverhaltes erscheint insbesondere sinnvoll, da, falls es sich hierbei um einen systematischen und instrumentell verursachten Fehler handelt, die Signalhöhen im “Fingerprint“ zunehmen sollten. Allein eine Klärung dürfte jedoch schon neue Einblicke in die Grundlagen der FSRM gewähren. Ein möglicher experimenteller Ansatz könnte die Variation der Fokussierungsbedingungen zu einer niedrigeren NA sein. Damit würden etwaige nicht berücksichtigte Einflüsse durch die Fokussierung ausgeschlossen.

Desweiteren erscheint die Grundlinie des Spektrums bei Aufnahme von Ramanbildern je nach Bereich in der Probe stark verändert (siehe Anhang B). Die Grundlinienartefakte scheinen mit Brechungsindexsprüngen oder Schichtdickenvariationen in der Probe in Verbindung zu stehen. Das Signal wird auf dem Untergrund des transmittierten Probelichtes gemessen. Die an sich geringen Änderungen im detektierten Spektrum des Probeimpulses erreichen trotzdem die Signalhöhen der Ramanbanden, wobei immer referenziert gemessen wird. Das bedeutet, dass das Spektrum des Probeimpulses zweimal an der gleichen Position gemessen und miteinander verglichen wird. Trotzdem weichen diese beiden Spektren systematisch voneinander ab. Mögliche Ursache könnte ein Einfluss des Piezorastertisches beim Abrastern der Probe sein. Es wurde ein Einfluss des Pumpimpulses auf die Divergenz des Probeimpulses durch die Kreuzphasenmodulation beschrieben, der durch die Abbildung auf den Spektrographen auch zu einer systematischen Grundlinienvariation führen könnte [117]. Die Artefakte erschweren eine direkte Interpretation der gemessenen Ramanspektren.

Als letztes sei noch genannt, dass die Ramansignalhöhen heute niedriger sind als die anfänglich gemessenen. Als Beispiel sei die Ramanbande bei 2228 cm^{-1} von Benzonitril genannt. Diese zeigte zunächst eine Bandenhöhe von 2.5×10^{-3} (siehe Abbildung 7.1). Momentan liegt die regelmäßig erreichte Ramanbandenhöhe dieser Bande bei ca. 8×10^{-4} . Sie ist also drei Mal niedriger. Die Messungen wurden mit unterschiedlichen Objektiven ausgeführt, diese sollten jedoch keinen Einfluß auf die Ramanbandenhöhe haben (siehe Abschnitt 4.3). Die Laserleistungen und die spektrale Breite des Pumpimpulses waren in etwa vergleichbar. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Impulsform. Während das Pumpspektrum bei der älteren Messung mit einem geritzten Gitter in Littrow-Konfiguration spektral eingeschränkt wurde (siehe Abschnitt 3.3.1), geschieht dies zur Zeit mit einem FBG. Dieses FBG könnte ungewollt eine Dispersion höherer Ordnung verursachen. Ein Indiz dafür ist der zeitliche Flügel des Ramanpumpimpuls, der in der Kreuzkorrelation sichtbar wird (siehe Abbildung 7.1.2). Gelingt es die alten Ramanbandenhöhen zu erreichen, verbessert sich das SNR des Aufbaus um einen Faktor von drei. Die Ursache des im letzten Abschnitt diskutierten Langzeitdrifts des Ramansignals ist momentan nicht ergründet. Es wurde beobachtet, dass sich das Signal wiederherstellen läßt, wenn das fokussierende Objektiv nachjustiert wird. Möglicherweise ist die mechanische Halterung des Objekts nicht über den Zeitraum der Messung stabil.

8.3 Wieviel Licht benötigt das FSRM Experiment, um den “Fingerprint“-Bereich einer Zelle zu messen?

Um den “Fingerprint“-Bereich einer Zelle zu messen, muss eine höhere Sensitivität des Experiments erreicht werden. Das bedeutet, dass entweder das Signal verstärkt wird oder aber der Rauschuntergrund verringert. In diesem Abschnitt soll von den momentanen experimentellen Bedingungen ausgehend das theoretisch benötigte Rauschniveau abgeschätzt werden. Im Zellkern liegt der Spitzenwert der Amide-I-Bande¹ [28] bei ca. 2.5×10^{-6} (siehe Abbildung 7.13). Messungen an Gewebeschnitten aus dem Kleinhirn einer Maus zeigten in etwa die gleiche Signalthöhe der Amide-I-Bande (Messungen nicht gezeigt). Nach dem Rose-Kriterium [213] sollte das Signal- zu Rauschverhältnis für eine zweifelsfreie Messung einer Bande größer als 5 sein. Damit folgt sofort eine benötigte, relative Standardabweichung eines Pixels von 5×10^{-7} . Dieser Wert ist deutlich geringer als die mit dem derzeitigen Aufbau innerhalb einer Millisekunde erreichte Standardabweichung von ca. 1×10^{-4} . In der Multiplex-CARS Mikroskopie wurde Bildgebung anhand der Amide-I-Bande mit einer Belichtungszeit von 50 ms pro Spektrum gezeigt [37]. Um mit dem MHz-FSRM-Aufbau in 50 ms ein ausreichendes SNR zu erreichen, müsste nach der oben angegebenen Abschätzung die Standardabweichung des Signals bei einer Integrationszeit von einer Millisekunde kleiner als 3.5×10^{-6} sein. Das real gemessene *SNR* ist momentan um einen Faktor 30 geringer als das gerade abgeschätzte, benötigte *SNR*.

Nimmt man idealisiert das Schrotrauschen als einzige Rauschquelle an, so lässt sich aus der oben abgeschätzten, benötigten Standardabweichung von 3.5×10^{-6} die entsprechende Ladungs- und Lichtmenge berechnen: Bei einer Schrotrausch-begrenzten Messung entspricht sie 8.2×10^{10} Photoelektronen oder einer Ladung von 13 nC oder bei einer Quanteneffizienz des Detektors von 0.5 einer durchschnittlichen Lichtleistung von 41 μ W pro Pixel. Die verwendete Photodiodenzeile besitzt eine maximale Ladungsaufnahmefähigkeit von 50 pC. Die gemessene Sättigungslichtleistung beträgt 190 nW. Die verwendeten Diodenzeile müsste also mehr als 200 Mal mehr Photoelektronen speichern können. Nimmt man an, dass die volle Halbwertsbreite des Probespektrums von 120 nm 228 Pixel der Zeile ausleuchtet, müsste die durchschnittliche Probeleistung ca. 9 mW betragen, um Schrotrausch-begrenzt die Amide-I-Bande zu messen. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass das Laserrauschen bei einer Ausleserate von 1 kHz mit 7.25×10^{-5} abgeschätzt wurde. Auch wenn man also mehr Photoelektronen speichern könnte, wäre man durch das Laserrauschen begrenzt. Das Laserrauschen ist jedoch frequenzabhängig. Eine schnellere Ausleserate des Detektors könnte also das gemessene Laserrauschen senken. Um also das gesamte Rauschniveau zu senken, genügt es nicht allein mehr Licht einzusammeln, gleichzeitig muss die Ausleserate erhöht werden. Wenn die einzige Rauschquelle das Schrotrauschen wäre, wäre eine Verbesserung des Signal-zu Rauschverhältnisses des Aufbaus um einen Faktor von 16 nötig, damit der “Fingerprint“-Bereich einer Zelle mit Hilfe der FSRM bei einer Messzeit von 50 ms pro Pixel abgebildet werden kann.

¹Diese Bande dient nur zur Abschätzung des Ramansignales und ist selbst nicht Bestandteil des “Fingerprint“-Bereiches.

8.4 Vorschläge zur Weiterentwicklung

Abschließend sollen einige Vorschläge zu Weiterentwicklung des Aufbaus gemacht werden. Diese betreffen die Lichtquelle, welche im Zentrum dieser Arbeit stand, den Detektor, die Mechanik des Aufbaus und die Datenverarbeitung.

8.4.1 Verbesserung der Lichtquelle

Die Lichtquelle wurde in einem Entwicklungsprozess aufgebaut. Der jetzige Zustand ist also nicht allein einem übergeordneten, wissenschaftlichen Kalkül geschuldet, sondern auch dem jeweiligen Erkenntnisstand zum Zeitpunkt des Aufbaus. Deswegen lohnt es sich jede einzelne Komponente kritisch zu überprüfen, um etwaige Fehlentwicklungen zu korrigieren. Das trifft vor allem für das Verstärkersystem zur Erzeugung der Ramanpumpimpulse zu. Dieses wurde oft variiert und die letzte Analyse ergab, dass womöglich die zeitliche Impulsform nicht ideal ist. Außerdem wären eine geringere spektrale Breite und eine höhere Leistung der Pumpimpulse wünschenswert. Die geringere spektrale Breite würde die instrumentelle Auflösung verbessern. Eine höhere Leistung der Pumpimpulse ist aus rein experimenteller Sicht wünschenswert, denn so könnten zusätzliche Verluste durch den Einbau anderer Optiken (z.B. Polarisatoren, Strahlteiler) ausgeglichen werden und das Ramansignal würde nicht mehr so kritisch von der Justage einzelner Komponenten abhängen. Eine Analyse des Rauschens (siehe Kapitel 6) ergab außerdem, dass das Amplitudenrauschen des Probelasers nicht zu vernachlässigen ist. Gerade in Hinblick auf einen neuen Detektor, welcher eine niedrigeres Schrotrauschen ermöglichen würde, ist eine Absenkung des Amplitudenrauschens anzustreben. Sonst bleibt jede Messung durch diese Rauschquelle limitiert.

Das Amplitudenrauschen des Ramanprobe-Oszillator verringern

Von der Verringerung des Amplitudenrauschens von Ti:Sa-Lasern mit Hilfe eines sogenannten "Noise-Eater" wurde 1994 berichtet [230, 231]. Ein "Noise-Eater" besteht aus einem Akusto-optischen Modulator oder einem anderen optischen Element, mit dem die Laseramplitude verändert werden kann, einer Photodiode, welche das Amplitudensignal des Lasers misst, und einem Regelkreis. Das optische Regelement wird in den Strahlverlauf des Lasers eingebracht. Die Photodiode misst das Amplitudensignal hinter dem Regelement. Der Regelkreis benutzt das Photodiodensignal, um das Regelement zu steuern und so das Rauschen zu minimieren. Bei dieser Anwendung wurde der verwendete Ti:Sa-Laser allerdings mit Argon-Ionen-Lasern gepumpt. Es ist bekannt, dass diese Pumpquellen deutlich instabiler sind als die heutzutage verwendeten Dioden gepumpten Festkörperlaser [208]. Bei Oszillator/Verstärker-Aufbauten wurde eine ähnliche Regelung des Ausgangsleistung des Gesamtsystems anhand der Regelung der Oszillatorleistung mit einer nachgeschalteten Pockelszelle demonstriert [232, 233]. Dadurch wurde r.m.s-Rauschen nach Regelung von lediglich 0.28 % erreicht [232]. Es wurde allerdings nicht gezeigt, ob die Regelung auch zu einem minimierten Amplitudenrauschen des Oszillators selbst führt. Es besteht die Mög-

lichkeit, dass ein nachgeschalteter sogenannter Noise-Eater das Amplitudenrauschen des Oszillators in einem bestimmten Frequenzband minimieren kann. Da das Rauschniveau des hier beschriebenen Aufbaus aber schon sehr niedrig ist, wäre die Verbesserung wahrscheinlich nur minimal.

Eine zweite Möglichkeit das Amplitudenrauschen des Oszillators zu verringern, ist der Einsatz eines rauschärmeren Pumplasers. Das Rauschen des Pumplaser überträgt sich bis zu einer Frequenz von ca. 700 kHz auf das Amplitudenrauschen des Oszillators [211]. In diesem Bereich dominiert der Einfluss des Pumplasers das Amplitudenrauschen eines freilaufenden Oszillators [209]. Der verwendete Pumplaser (Laser Quantum Finesse 4W) weist laut Datenblatt im Vergleich zu anderen auf dem Markt verfügbaren Pumplasern ein 3 bis 5 mal höhere Standardabweichung der Amplitude auf (vgl. Abschnitt 6.1.1). Diese Option ist zwar vielversprechender als die erste, dafür aber auch sehr kostenintensiv.

Spektrale und zeitliche Charakteristik der Ramanpumpimpulse optimieren

Momentan besitzt der Pumpimpuls eine spektrale Breite von 18 cm^{-1} . Die spektrale Auflösung des Instruments ist durch die spektrale Breite des Pumpimpulses beschränkt (siehe Abschnitt 7.1.1). Viele Ramanbanden sind schmaler als die momentane Auflösung, so dass sie instrumentell verbreitert dargestellt werden. Das geht zu Lasten der Aussagekraft der Spektren, vor allem in Situationen in denen Ramanbanden sich beinahe überlagern. Eine spektrale Auflösung von 10 cm^{-1} deckt in etwa das Auflösungsvermögen des Spektrographen mit dem 300 Linien/mm-Gitter (vgl. Abschnitt 5.3). Der Pumpimpuls kann entweder mit Hilfe eines anderen FBG mit einer spektral eingegengten Reflektivitätscharakteristik oder durch einen anderen spektralen Bandpassfilter zwischen den Verstärkerstufen realisiert werden. Ein Gitter in Littrow-Konfiguration kann an Stelle des FBG als spektraler Filter eingesetzt werden (siehe Abschnitt 3.3.1 und [122]). Die zeitliche Struktur des Pumpimpulses zeigt einen langen Flügel neben der Signalspitze (siehe Abschnitt 7.1.2). Die Dispersion dritter Ordnung kann für eine asymmetrische Impulsform verantwortlich sein [234]. Diese zeitliche Struktur ist möglicherweise Ursache des ungeklärten Signalverlust (siehe Abschnitt 8.2). Neben der unvermeidlichen Materialdispersion in der Faser könnte auch das FBG für eine höhere Ordnung des Chirp verantwortlich sein. Deswegen wäre ein Aufbau mit einem Gitter in Littrow-Konfiguration zu empfehlen. Mit dieser Konfiguration wurden auch die höchsten Ramansignale gemessen.

Um die Leistung der Ramanpumpimpulse zu erhöhen, muss ein Weg gefunden werden die SPM in der Faser zu umgehen. Eine Möglichkeit wäre die letzte Verstärkerstufe nach dem Prinzip der "chirped pulse amplification" (CPA) aufzubauen [235]. Es ist jedoch auch möglich mit Hilfe der SPM die spektrale Breite einzuengen. Dafür werden die Impulse negativ "vorgechirpt". Die neuen Frequenzen, die durch die SPM erzeugt werden, verbreitern dann nicht das Spektrum, sondern führen zu einer Verstärkung der zentralen Frequenzen des Impulses [236, 237, 238]. So könnte man also gleichzeitig die Leistung erhöhen und das Spektrum einengen. Desweiteren kann der Verstärker verbessert werden indem die erste Verstärkerstufe gekürzt wird. Wie in Abschnitt 3.2.5 erklärt, könnte bei ähnlicher Ausgangsleistung eine geringe ASE erreicht werden. Um die Stabilität des Verstärkers zu

erhöhen wäre es sinnvoll, alle Fasern des Verstärkers zu “splicen“.

8.4.2 Ein schnellerer Detektor mit höherer Photoelektronenspeicherkapazität

Die momentan verwendeten Hamamatsu-Photodiodenzeilen eignen sich als Detektor für die FSRM wegen ihrer hohen Elektronenspeicherkapazität. Die Ausleserate ist jedoch auf 1 kHz beschränkt und die Ausleseelektronik nutzt einen “Rolling-Shutter“, was die effektive Aufnahmezeit für ein Spektrum verlängert. Es wird angenommen, dass sich in dem Bereich von 50-1000 Hz akustische Schwingungen und Luftströme ins Laserrauschen übertragen [209]. Das Rauschen eines Ti:Sa-Oszillators nimmt generell mit höheren Frequenzen ab [208]. Der Abfall beträgt dabei 10 dB pro Dekade in der Frequenz, deswegen spricht man auch von einem $1/f$ -Rauschen [208, 239]. Der Detektor misst also bei einer Frequenz, die sowohl für externe Störungen des Lasers als auch für interne Rauschquellen des Lasers empfindlich ist. Eine Analyse des Rauschens des FSRM-Aufbaus ergab, dass der Beitrag des Laserrauschens bei hohen Lichtleistungen die anderen Rauschbeiträge dominiert (siehe Abbildung 6.3). Es ist also sinnvoll schneller zu messen, um den hohen Beitrag des Laserrauschens im Frequenzbereich von 0.1-1 KHz zu umgehen. Desweiteren muss auch ein schneller messender Detektor eine hohe Photoelektronenspeicherkapazität aufweisen, um das Schrotrauschen klein zu halten. Entscheidend ist hier die durchschnittliche Anzahl von Photoelektronen in einem Zeitintervall. Je höher dieser Wert ist, umso niedriger das Schrotrauschen.

Der ULTRA-Detektor kann mehr Photonen pro Sekunde messen

Beide Kriterien werden vom ULTRA-Detektor der Firma QuantumDetectors erfüllt (siehe auch [204]). Die maximale Ausleserate ist 20 KHz, dabei kann ein Pixel eine maximale Ladung von 10 pC aufnehmen. Insgesamt erreicht man also eine Rate von ca. $1,25 \times 10^{12}$ Photoelektronen pro Sekunde, also viermal mehr Photoelektronen pro Sekunde als mit der Hamamatsu-Diodenzeile. Das relative Schrotrauschen sinkt folglich um einen Faktor von 2. Das Laseramplitudenrauschen bei 20 kHz (bzw. 10 kHz bei einer referenzierten Messung) des Oszillators ist nicht gemessen worden. Es besteht die Hoffnung, dass auch dieser Beitrag zum Rauschen mit dem Ultra Detektor geringer wäre. Eine technisch interessante Option für den Detektor sind CMOS-Kameras, die vom IBIOS-Institut an der Uni Nottingham entwickelt werden (vgl. [240]). Die Kapazität eines Pixels besteht hier neben der intrinsischen Kapazität der photosensitiven Schicht aus 11 weiteren parallel geschalteten Kondensatoren. Diese können einzeln zugeschaltet werden, so dass die Photoelektronenspeicherkapazität des Pixels verändert werden kann [240]. So kann die Kapazität jedes Pixel an die Lichtmenge bei der entsprechenden Wellenlänge angepasst und die Dynamik des A/D-Wandlers bei jedem Pixel optimal ausgenutzt werden. Die maximale Photoelektronenrate beträgt hier ca. $1 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$. Sie ist also vergleichbar mit der des ULTRA Detektor. Die maximale Ausleserate ist mit 1,7 kHz deutlich langsamer als die des ULTRA Detektor.

Potentiell sei aber eine Ausleserate von 40 kHz möglich [240]. Ein solcher Detektor wäre sehr geeignet für die Messung von stimulierten Ramanspektren.

8.4.3 Stabilere Mechanik und Optomechanik

Messungen an Proben zeigen, dass der gesamte Aufbau sensibel auf von außen eingeführte Schwingungen ist. Vibrationen durch Auftreten neben dem optischen Tisch machen sich als Grundlinienschwankungen in der Messung bemerkbar. Das früher eingesetzt mechanische “Chopper“-Rad zur Modulation des Pumplichtes führte auch zu einem messbar höheren Rauschen. Ein bessere Schwingungsisolierung des Tisches könnte zu einem niedrigeren Laseramplitudenrauschen führen, weil sowohl der Resonator des Lasers [209] als auch der Strahltransport empfindlich für mechanische Schwingungen sind. Der Signalverlust während einer Langzeitmessung, wurde mit einem axialen Drift des fokusierenden Objektivs in Verbindung gebracht (vgl. Abschnitt 8.2). Um dies zu vermeiden muss die Objektivhalterung neu gestaltet werden. Es ist hier empfehlenswert auf die breite Expertise einschlägiger Mikroskopieunternehmen zu bauen. Die optimale Lösung wäre mit Sicherheit ein vollständiger Mikroskopieaufbau eines solchen Unternehmens. Eine weitere Quelle mechanischer Vibration auf dem optischen Tisch ist der Piezoversteller zur Unterdrückung des Vierwellenmischuntergrundes (siehe Abschnitt 5.1). Der Piezoversteller bewegt einen Spiegel mit 19 KHz oszillatorisch. Diese Schwingung ist eine Rauschquelle für jedes mechanische Bauteil auf dem optischen Tisch. Es ist zu überlegen, ob der nötige Phasenversatz nicht mit einem elektro-optischen Modulator zu erreichen wäre.

8.4.4 “Rauschminderung“ mit SVD und Baselinekorrektur

Die Grundlinie der Ramanspektren bei einem Bildscan zeigt systematisch Abweichungen von der erwarteten Nulllinie einer referenzierten Messung: Meistens zeigt sie einen generellen Versatz, bei der Transmission durch Kanten einer Probe aber auch eine Verkippung (siehe Abbildung B.1 im Anhang). Diese Änderungen der Grundlinie treten unter gleichen Voraussetzungen gleich auf und sind deswegen mit Sicherheit systematisch. Momentan sind die detaillierten Ursachen jedoch noch nicht geklärt (siehe Abschnitt 8.2). Die Ramanspektren sind wegen der Abweichung der Basislinie nicht direkt interpretierbar. Das Problem einer stark variierenden Grundlinie ist aber in der konventionellen Ramanspektroskopie aufgrund der Autofluoreszenz der Probe durchaus bekannt [241, 242]. Dementsprechend wurden verschiedene Methoden entwickelt die Abweichung der Grundlinie zu korrigieren [241, 242, 243]. Die Adaption einer solchen Technik zur Korrektur der gemessenen Grundlinienartefakte würde die Interpretation der Ramanspektren aus Bildscans vereinfachen. Sowohl in der konventionellen Ramanmikroskopie als auch in der kohärenten Ramanmikroskopie wurde die SVD zur Rauschminderung der Spektren eingesetzt [69, 37]. In Anbetracht des niedrigen Signal-zu Rauschverhältnis des FSRM-Aufbaus bei biologischen Proben sollte auch diese Möglichkeit der Rauschminderung in Betracht gezogen werden.

8.4.5 Anwendung der FSRM in der Zellbiologie

Wie in diesem Kapitel dargelegt ist es mit dem FSRM-Aufbau momentan nicht möglich den “Fingerprint“-Bereich einer Zelle als Kontrast zur Bildgebung zu verwenden. Es wurden jedoch einige Verbesserungsvorschläge für den Aufbau aufgezählt. Diese betreffen die Lichtquelle, den Detektor und die Auswertung: Gelingt es das alte Signalniveau zu erreichen, indem der Pumpimpuls optimiert wird, gewinnt man einen Faktor 3 im SNR . Mit der höheren Ausleserate des ULTRA-Detektors kann maximal ein weiterer Faktor 2 im SNR gewonnen werden. Um tatsächlich anhand des “Fingerprint“-Bereiches abbilden zu können, würde im idealisierten, Schrotrausch-begrenzten Fall noch ein Faktor 2,7 fehlen. Hier könnte eine Rauschminderung mit Hilfe der SVD eine entscheidende Verbesserung des SNR bewirken. Die Demonstration einer solchen Messung könnte als erste “echte“ Anwendung der FSRM als Technik größere Beachtung verschaffen und die Tür zu weiteren Anwendungen öffnen.

Anhang A

Spontane Ramanspektren einiger erwähnter Substanzen

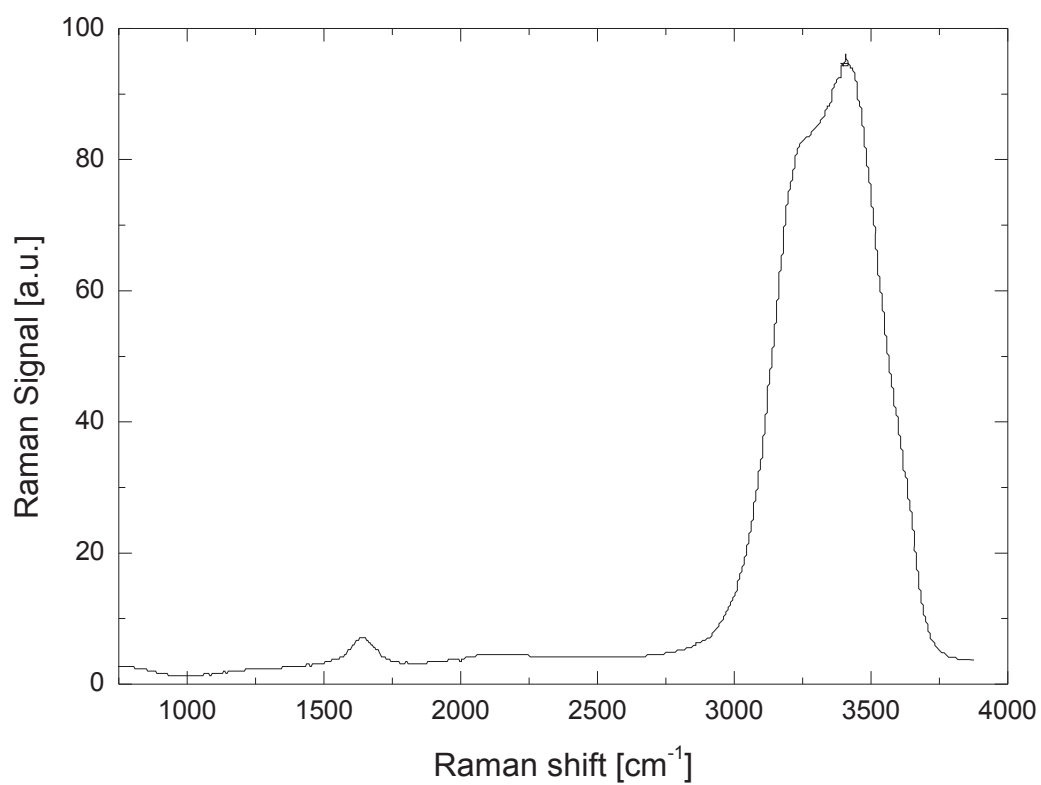


Abbildung A.1: Spontanes Ramanspektrum von Wasser. SDBSWeb: <http://sdb.sriodb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 09.04.2013);

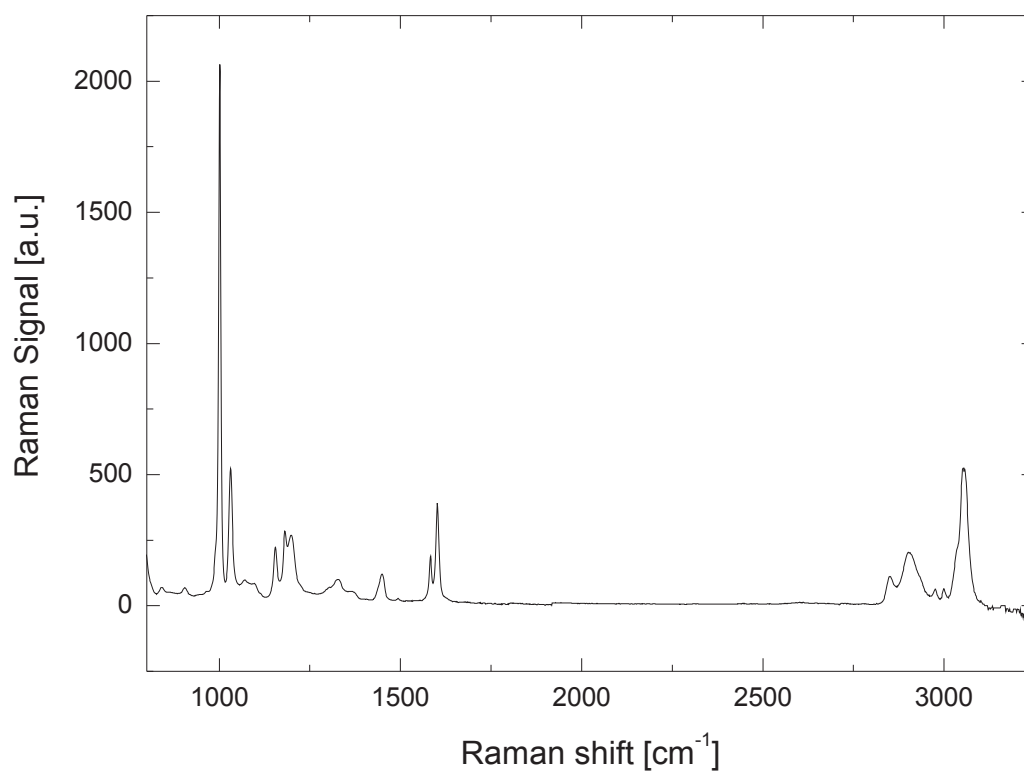


Abbildung A.2: Spontanes Ramanspektrum von Polystyrol. Aus www.spectraonline.com; Caltech Mineral Spectroscopy Server. Heruntergeladen am 09.04.2013.

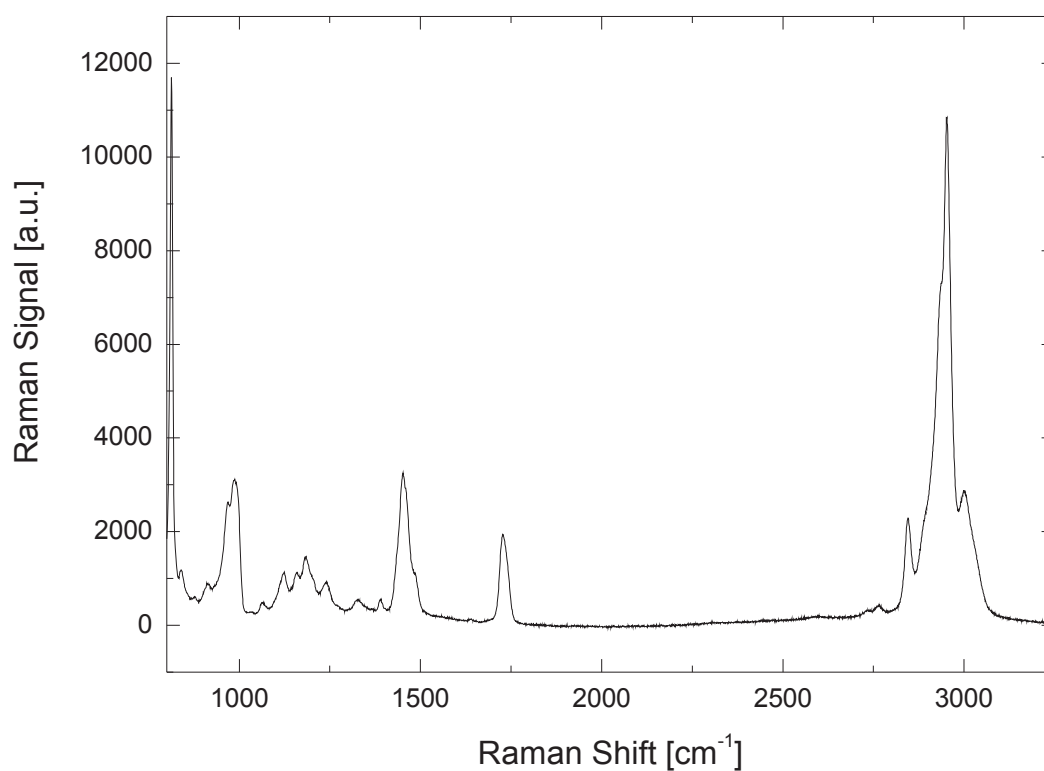


Abbildung A.3: Spontanes Ramanspektrum von Polymethylmethacrylate. Aus www.spectraonline.com; Jobin Yvon Raman Spectra of Polymers. Heruntergeladen am 09.04.2013.

Anhang B

Spektrale Artefakt bei der Bildgebung mit FSRS

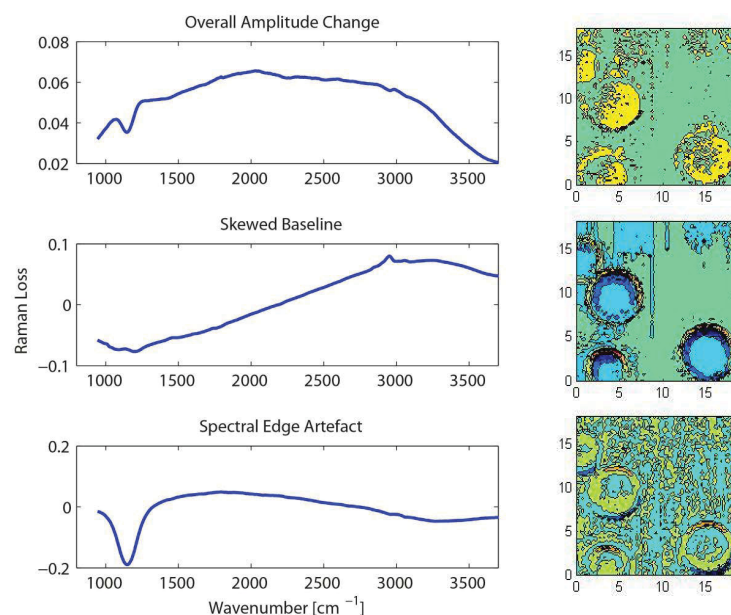


Abbildung B.1: Die ersten drei PCA-Komponenten (Links) und ihre Gewichte (rechts) einer Aufnahme von Polymermikroskopiestandards (PMS) in einer wässrigen Dispersion. Die erste Komponente (oben) gleicht, abgesehen von dem negativen Einbruch bei ca. 1100 cm^{-1} dem Laserspektrum. Diese Komponente tritt innerhalb der PMS auf. Die zweite Komponente zeigt eine Verkipfung der Grundlinie. Diese Verkipfung tritt an den Grenzen zwischen den PMS und dem Wasser und innerhalb der PMS auf. An den Grenzflächen ist das Vorzeichen der Verkipfung entgegengesetzt zu der Verkipfung innerhalb der PMS. Dritte Komponente zeigt deutlich das spektrale Artefakt, das auch in der ersten Komponente auftrat. Dieses Artefakt tritt nur an den Grenzflächen zwischen Wasser und PMS auf, die senkrecht zur Verfahrriichtung des Piezotisches stehen. Dabei ist das Vorzeichen des Artefakts beim Eintreten in die PMS entgegengesetzt zu dem Vorzeichen beim Austreten aus den PMS.

Anhang C

GVD einiger Objektive

objective	man.	GVD [fs ²]	method	Laser	reference
20× Fluor 0.75 NA	Zeiss	1773	Femtosecond stimulated Raman scattering, xfrog	Fusion BB, Femtolasers	
20× Fluor 0.75 NA	Zeiss	1675	Manufacturer		[220]
32× C-Achromat 0.85 NA	Zeiss	2420	Femtosecond stimulated Raman scattering, xfrog	Fusion BB, Femtolasers	
32× C-Achromat 0.85 NA	Zeiss	2413	Manufacturer		[220]
40× C-Apochromat 1.1 NA W	Zeiss	2570	Femtosecond stimulated Raman scattering, xfrog	Fusion BB, Femtolasers	
40× C-Apochromat 1.1 NA W	Zeiss	2273	Manufacturer		[220]
20× Achroplan 0.5 NA	Zeiss	3818.7	2nd order inter. autocorrelation, dispersion compensating mirrors	Femtosome Compact, Femtolasers	[150]
40× Achroplan 0.8 NA	Zeiss	4000.0	2nd order inter. autocorrelation, dispersion compensating mirrors	Femtosome Compact, Femtolasers	[150]
63× Achroplan 0.95 NA	Zeiss	3728.0	2nd order inter. autocorrelation, dispersion compensating mirrors	Femtosome Compact, Femtolasers	[150]
100× Achroplan 1.0 NA	Zeiss	3463.0	2nd order inter. autocorrelation, dispersion compensating mirrors	Femtosome Compact, Femtolasers	[150]
20× Plan-Apochromat 0.75 NA	Zeiss	3728.0	2nd order inter. autocorrelation, dispersion compensating mirrors	Femtosome Compact Femtolasers	[150]
63× C-Apochromat 1.2 NA	Zeiss	4528.0	2nd order inter. autocorrelation, dispersion compensating mirrors	Femtosome Compact Femtolaser	[150]
40× PlanNeofluar 1.3 NA oil	Zeiss	4538±600	2nd order inter. autocorrelation	Mira 900F, Coherent	[151]
63× PlanNeofluar 1.25 NA oil	Zeiss	5390±600	2nd order inter. autocorrelation	Mira 900F, Coherent	[151]
100× PlanNeofluar 1.3 NA oil	Zeiss	5218±600	2nd order inter. autocorrelation	Mira 900F, Coherent	[151]
40× C-Apochromat 1.2 NA W	Zeiss	5113±600	2nd order inter. autocorrelation	Mira 900F, Coherent	[151]
63× C-Apochromat 1.2 NA W	Zeiss	4646±600	2nd order inter. autocorrelation	Mira 900F, Coherent	[151]

Tabelle C.1: GVD einiger Objekte

Anhang D

Filterkurven des Strahlteilers zur Abspaltung des Seedimpulses

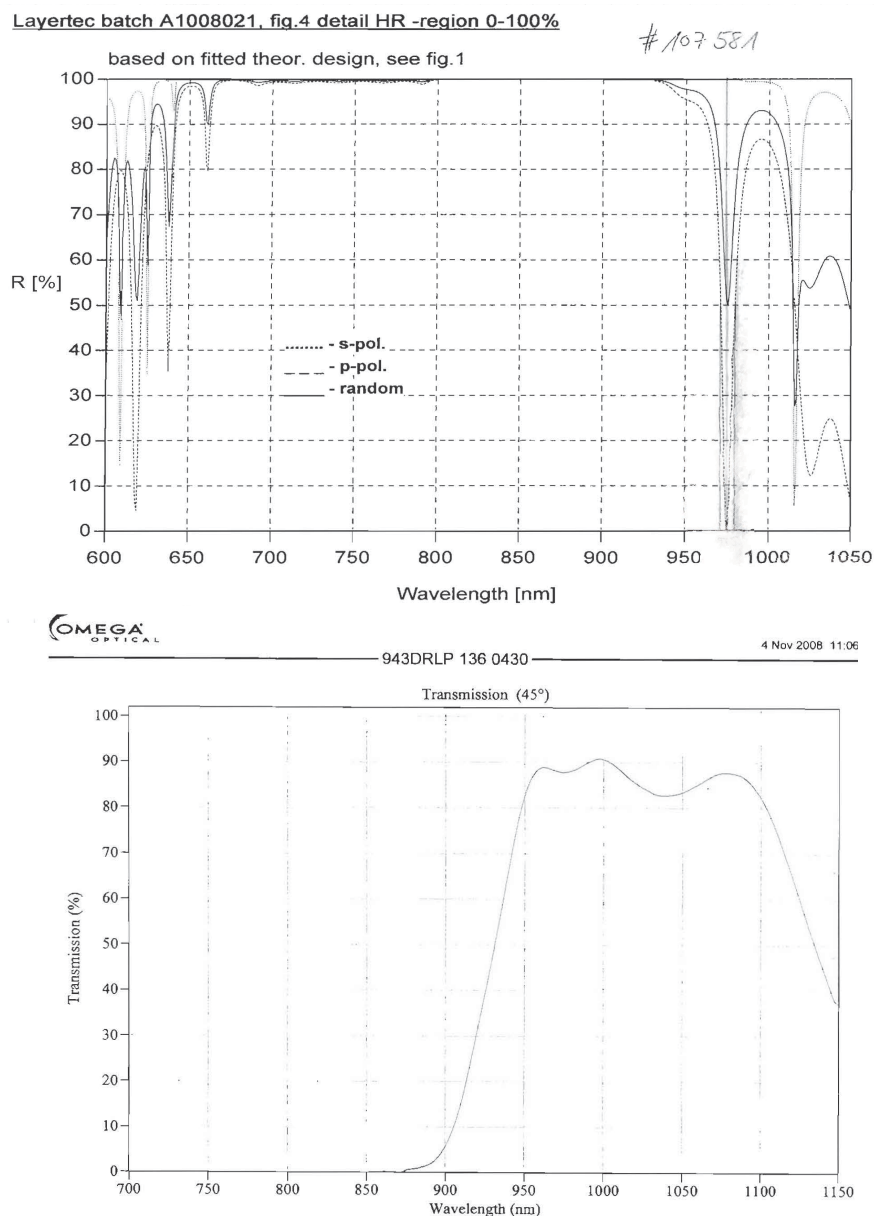


Abbildung D.1: Filterkurven der beiden verwendeten Strahlteiler zur Abspaltung des Seedimpulses

Literaturverzeichnis

- [1] C. V. Raman and K. S. Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048):501–502, March 1928.
- [2] B. Schrader, editor. *Infrared and Raman Spectroscopy*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1995.
- [3] W. Kaiser and M. Maier. *Laser Handbook*. North-Holland, Amsterdam, 1972.
- [4] John E. Bertie, Shuliang L. Zhang, and C. Dale Keefe. Measurement and use of absolute infrared absorption intensities of neat liquids. *Vibrational Spectroscopy*, 8(2):215 – 229, 1995. (Issue containing selected lectures and posters of the 6th Austrian-Hungarian International Conference on Vibrational Spectroscopy).
- [5] Helmut Günzler and Herbert Michael Heise. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996.
- [6] Joseph B. Lambert, Scott Gronert, Herbert F. Shurvell, and David A. Lightner. *Spektroskopie Strukturaufklärung in der organischen Chemie*. Pearson Deutschland GmbH, München, 2012.
- [7] Alexei A. Kornyshev, Dominic J. Lee, Sergey Leikin, and Aaron Wynveen. Structure and interactions of biological helices. *Rev. Mod. Phys.*, 79:943–996, Aug 2007.
- [8] Jeff Abramson, Irina Smirnova, Vladimir Kasho, Gillian Verner, H. Ronald Kaback, and So Iwata. Structure and mechanism of the lactose permease of escherichia coli. *Science*, 301(5633):610–615, 2003.
- [9] Vassilis Koronakis, Andrew Sharff, Eva Koronakis, Ben Luisi, and Colin Hughes. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789):914–919, June 2000.
- [10] Hans-Ulrich Gremlich and Bing Yan, editors. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. Marcel Dekker, 2001.
- [11] Hans Siebert. *Anwendungen der Schwingungsspektroskopie in der anorganischen Chemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1966.

- [12] P. Kukura, D. W. McCamant, and R. A. Mathies. Femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58:461–488, 2007.
- [13] E. T. J. Nibbering, H. Fidder, and E. Pines. Ultrafast chemistry: Using time-resolved vibrational spectroscopy for interrogation of structural dynamics. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 56:337–367, 2005.
- [14] Michael Schmitt and Jürgen Popp. Raman-Spektroskopie. Biomedizinische Diagnostik. *Chemie in unserer Zeit*, 45(1):14–23, 2011.
- [15] Friedrich Siebert and Peter Hildebrandt. *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [16] Kevin B. Biggs, Karin M. Balss, and Cynthia A. Maryanoff. Pore Networks and Polymer Rearrangement on a Drug-Eluting Stent as Revealed by Correlated Confocal Raman and Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 28(21):8238–8243, 2012.
- [17] Mikhail N. Slipchenko, Hongtao Chen, David R. Ely, Yookyung Jung, M. Teresa Carvajal, and Ji-Xin Cheng. Vibrational imaging of tablets by epi-detected stimulated Raman scattering microscopy. *Analyst*, 135:2613–2619, 2010.
- [18] G. Puppels, F. Demul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D. Arndt-Jovin, and T. Jovin. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature*, 347(6290):301–303, 1990.
- [19] M. Diem, M. Romeo, S. Boydston-White, M. Miljkovic, and C. Matthaus. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004). *Analyst*, 129(10):880–885, 2004.
- [20] Masaya Okada, Nicholas Isaac Smith, Almar Flotildes Palonpon, Hiromi Endo, Satoshi Kawata, Mikiko Sodeoka, and Katsumasa Fujita. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 109(1):28–32, JAN 3 2012.
- [21] Z. Fei, A. S. Rodin, G. O. Andreev, W. Bao, A. S. McLeod, M. Wagner, L. M. Zhang, Z. Zhao, M. Thiemens, G. Dominguez, M. M. Fogler, A. H. Castro Neto, C. N. Lau, F. Keilmann, and D. N. Basov. Gate-tuning of graphene plasmons revealed by infrared nano-imaging. *Nature*, 487:82–85, June 2012.
- [22] A. Steele, F. M. McCubbin, M. Fries, L. Kater, N. Z. Boctor, M. L. Fogel, P. G. Conrad, M. Glamoclija, M. Spencer, A. L. Morrow, M. R. Hammond, R. N. Zare, E. P. Vicenzi, S. Siljeström, R. Bowden, C. D. K. Herd, B. O. Mysen, S. B. Shirey, H. E. F. Amundsen, A. H. Treiman, E. S. Bullock, and A. J. T. Jull. A reduced organic carbon component in martian basalts. *Science*, 337(6091):212–215, 2012.

- [23] Howell G. M. Edwards. Probing history with Raman spectroscopy. *Analyst*, 129:870–879, 2004.
- [24] Robin J. H. Clark. Raman microscopy: application to the identification of pigments on medieval manuscripts. *Chem. Soc. Rev.*, 24:187–196, 1995.
- [25] M. Delhaye and P. Dhamelincourt. Raman microprobe and microscope with laser excitation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 3(1):33–43, 1975.
- [26] G. J. Rosasco, E. S. Etz, and W. A. Cassatt. The Analysis of Discrete Fine Particles by Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 29(5):396–404, Sep 1975.
- [27] Reiner Salzer and Heinz W. Siesler, editors. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [28] C. Matthaus, T. Chernenko, J.A. Newmark, C.M. Warner, and M. Diem. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microscopy. *Biophys. J.*, 93(2):668–673, 2007.
- [29] Henk-Jan van Manen, Aufried Lenferink, and Cees Otto. Noninvasive Imaging of Protein Metabolic Labeling in Single Human Cells Using Stable Isotopes and Raman Microscopy. *Analytical Chemistry*, 80(24):9576–9582, 2008. PMID: 19006335.
- [30] X. Nan, J. Cheng, and X. Xie. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Lipid Res.*, 44(11):2202–2208, 2003.
- [31] Herbert Harms. *Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie*. Stauffen Verlag, Kamp-Lintfort, 1965.
- [32] Shabnam Jaffer and Ira J. Bleiweiss. Beyond hematoxylin and eosin-the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Investigation*, 22(3):445–465, 2004.
- [33] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotech*, 21(11):1369–1377, November 2003.
- [34] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- [35] Brad Chazotte. Labeling cell structures with nonimmunological fluorescent dyes. In Rafael Yuste, editor, *Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.

- [36] Agumu Tashiro, Chunmei Zhao, Hoonkyo Suh, and Fred H. Gage. Preparation and use of retroviral vectors for labeling, imaging, and genetically manipulating cells. In Rafael Yuste, editor, *Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [37] Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, P. R. Day, James, Mischa Bonn, and Hiro-o Hamaguchi. Quantitative CARS Molecular Fingerprinting of Single Living Cells with the Use of the Maximum Entropy Method. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(38):6773–6777, 2010.
- [38] C. Evans, E. Potma, M. Puoris’haag, D. Cote, C. Lin, and X. Xie. Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(46):16807–16812, 2005.
- [39] Steve Begin, Erik Belanger, Sophie Laffray, Real Vallee, and Daniel Cote. In vivo optical monitoring of tissue pathologies and diseases with vibrational contrast. *Journal of Biophotonics*, 2(11):632–642, 2009.
- [40] James P. R. Day, Katrin F. Domke, Gianluca Rago, Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, Erik M. Vartiainen, and Mischa Bonn. Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(24):7713–7725, 2011.
- [41] C. V. Raman and K. S. Krishnan. Molecular Spectra in the Extreme Infra-Red. *Nature*, 122(3069):278, August 1928.
- [42] C. V. Raman and K. S. Krishnan. The Negative Absorption of Radiation. *Nature*, 122(3062):12–13, July 1928.
- [43] T. H. MAIMAN. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*, 187(4736):493–494, 1960.
- [44] Wolfgang Zinth, Alfred Laubereau, and Wolfgang Kaiser. The long journey to the laser and its rapid development after 1960. *The European Physical Journal H*, 36:153–181, 2011.
- [45] H. KOGELNIK and S. P. S. PORTO. Continuous Helium-Neon Red Laser as a Raman Source. *J. Opt. Soc. Am.*, 53(12):1446–1447, Dec 1963.
- [46] Roland C. Hawes, Kenyon P. George, David Carl. Nelson, and Richard. Beckwith. Laser excitation of Raman spectra. *Analytical Chemistry*, 38(13):1842–1847, 1966.
- [47] Stanley K. Freeman and Donald O. Landon. Small-sample handling in laser Raman spectrometry. *Analytical Chemistry*, 41(2):398–400, 1969.

- [48] M. Fujiwara, H. Hamaguchi, and M. Tasumi. Measurements of Spontaneous Raman Scattering with Nd:YAG 1064-nm Laser Light. *Appl. Spectrosc.*, 40(2):137–139, Feb 1986.
- [49] T. Hirschfeld and B. Chase. FT-Raman Spectroscopy: Development and Justification. *Appl. Spectrosc.*, 40(2):133–137, Feb 1986.
- [50] Josef Brandmüller, Herbert Hacker, and Heinz W. Schrätter. Photoelektrische Registrierung der Raman-Spektren farbiger Substanzen mit He-Ne- 6328 Å Laser-Erregung. *Chemische Berichte*, 99(3):765–775, 1966.
- [51] W. Kiefer. Laser-excited Resonance Raman Spectra of Small Molecules and Ions—A Review. *Applied Spectroscopy*, 28(2):115–134, 1974.
- [52] M.D. Levenson and S.S. Kano, editors. *Introduction to Nonlinear Laser Spectroscopy*. Acad. Press, San Diego, 1988.
- [53] E. Woodbury and W. Ng. *Proc. IRE*, 50:2367, 1962.
- [54] Gisela Eckhardt, R. W. Hellwarth, F. J. McClung, S. E. Schwarz, D. Weiner, and E. J. Woodbury. Stimulated Raman Scattering from Organic Liquids. *Phys. Rev. Lett.*, 9:455–457, Dec 1962.
- [55] P. D. Maker and R. W. Terhune. Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength. *Phys. Rev.*, 137:A801–A818, Feb 1965.
- [56] M. Duncan, J. Reintjes, and T. Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Opt. Lett.*, 7(8):350–352, 1982.
- [57] W. Sibbett, A. A. Lagatsky, and C. T. A. Brown. The development and application of femtosecond laser systems. *Opt. Express*, 20(7):6989–7001, 2012.
- [58] A. Zumbusch, G. Holtom, and X. Xie. Three-dimensional vibrational imaging by coherent Anti-Stokes Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.*, 82(20):4142–4145, 1999.
- [59] F. Ganikhanov, S. Carrasco, X. Xie, M. Katz, W. Seitz, and D. Kopf. Broadly tunable dual-wavelength light source for coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt. Lett.*, 31(9):1292–1294, 2006.
- [60] E. Ploetz, B. Marx, T. Klein, R. Huber, and P. Gilch. A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy. *Opt. Express*, 17(21):18612–18620, 2009.
- [61] K. Kieu, B.G. Saar, G.R. Holtom, X.S. Xie, and F.W. Wise. High-power picosecond fiber source for coherent Raman microscopy. *Opt. Lett.*, 34(13):2051–2053, 2009.

- [62] Günther Krauss, Tobias Hanke, Alexander Sell, Daniel Träutlein, Alfred Leitenstorfer, Romedi Selm, Martin Winterhalder, and Andreas Zumbusch. Compact coherent anti-Stokes Raman scattering microscope based on a picosecond two-color Er: fiber laser system. *Optics Letters*, 34(18):2847–2849, 2009.
- [63] Yasuyuki Ozeki, Yuma Kitagawa, Kazuhiko Sumimura, Norihiko Nishizawa, Wataru Umemura, Shin’ichiro Kajiyama, Kiichi Fukui, and Kazuyoshi Itoh. Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses. *Opt. Express*, 18(13):13708–13719, Jun 2010.
- [64] A. Gambetta, V. Kumar, G. Grancini, D. Polli, R. Ramponi, G. Cerullo, and M. Marangoni. Fiber-format stimulated-Raman-scattering microscopy from a single laser oscillator. *Opt. Lett.*, 35(2):226–228, 2010.
- [65] Romedi Selm, Martin Winterhalder, Andreas Zumbusch, Günther Krauss, Tobias Hanke, Alexander Sell, and Alfred Leitenstorfer. Ultrabroadband background-free coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy based on a compact Er: fiber laser system. *Opt. Lett.*, 35(19):3282–3284, Oct 2010.
- [66] Adrian F. Pegoraro, Andrew Ridsdale, Douglas J. Moffatt, John P. Pezacki, Brian K. Thomas, Libin Fu, Liang Dong, Martin E. Fermann, and Albert Stolow. All-fiber CARS microscopy of live cells. *Opt. Express*, 17(23):20700–20706, Nov 2009.
- [67] Wei Min, Christian W. Freudiger, Sijia Lu, and X. Sunney Xie. Coherent nonlinear optical imaging: Beyond fluorescence microscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62(1):507–530, 2011.
- [68] A. Feofanov, S. Sharonov, P. Valisa, E. Da Silva, I. Nabiev, and M. Manfait. A new confocal stigmatic spectrometer for micro-Raman and microfluorescence spectral imaging analysis: Design and applications. *Review of Scientific Instruments*, 66(5):3146–3158, 1995.
- [69] Henk-Jan van Manen, Yvonne M. Kraan, Dirk Roos, and Cees Otto. Intracellular Chemical Imaging of Heme-Containing Enzymes Involved in Innate Immunity Using Resonance Raman Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(48):18762–18771, 2004.
- [70] G. Puppels, W. Colier, J. Olminkhof, C. Otto, F. Demul, and J. Greve. Description and performance of a highly sensitive confocal Raman microspectrometer. *J. Raman Spectrosc.*, 22(4):217–225, 1991.
- [71] William L. Kubasek, Yang Wang, Gerald A. Thomas, Thomas W. Patapoff, Karl Heinz Schoenwaelder, Johan H. Van der Sande, and Warner L. Peticolas. Raman spectra of the model b-dna oligomer d(cgcgaattcgcg)₂ and of the dna in living salmon sperm show that both have very similar b-type conformations. *Biochemistry*, 25(23):7440–7445, 1986.

- [72] Konrad Meister, Diedrich A. Schmidt, Erik Brundermann, and Martina Havenith. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. *Analyst*, 135:1370–1374, 2010.
- [73] N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, E. Volokhina, G. Vrensen, J. Greve, and C. Otto. Nonresonant Confocal Raman Imaging of DNA and Protein Distribution in Apoptotic Cells. *Biophys. J.*, 84:3968–3981, 2003.
- [74] P. R. T. Jess, V. Garcés-Chávez, D. Smith, M. Mazilu, L. Paterson, A. Riches, C. S. Herrington, W. Sibbett, and K. Dholakia. Dual beam fibre trap for Raman microspectroscopy of single cells. *Opt. Express*, 14(12):5779–5791, Jun 2006.
- [75] Ravi Guntupalli. Novel back-illuminated ccd enhances low-light-level detection. *Laser Focus World*, 46(4):63 – 66, 2010.
- [76] Horiba Jobin Yvon. RA-TN01 Introduction to Raman imaging. technical note, Horiba Jobin Yvon, 2012.
- [77] Ultrafast Confocal Raman Imaging - Application Examples. application note, Witec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, Lise-Meitner-Straße 6, D-89081 Ulm, Germany, 2008.
- [78] Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Masaya Okada, Jun Ando, Almar Palonpon, Katsumasa Fujita, Satoshi Kawata, and Mikiko Sodeoka. Imaging of EdU, an Alkyne-Tagged Cell Proliferation Probe, by Raman Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 133(16):6102–6105, 2011.
- [79] Ewen Smith and Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.
- [80] P. A. Mosier-Boss, S. H. Lieberman, and R. Newbery. Fluorescence Rejection in Raman Spectroscopy by Shifted-Spectra, Edge Detection, and FFT Filtering Techniques. *Appl. Spectrosc.*, 49(5):630–638, May 1995.
- [81] C.A. Lieber, S.K. Majumder, D. Billheimer, D.L. Ellis, and A. Mahadevan-Jansen. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *J. Biomed. Opt.*, 13(2):024013, 2008.
- [82] Andrew P. Shreve, Nerine J. Cherepy, and Richard A. Mathies. Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique. *Appl. Spectrosc.*, 46(4):707–711, Apr 1992.
- [83] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday. Soc.*, (9):14–19, 1950.

- [84] Changan Xie and Yong-qing Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques. *Journal of Applied Physics*, 93(5):2982–2986, mar 2003.
- [85] Iacopo Osticioli, Angela Zoppi, and Emilio Mario Castellucci. Fluorescence and Raman spectra on painting materials: reconstruction of spectra with mathematical methods. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(10):974–980, 2006.
- [86] Konrad Meister, Johanna Niesel, Ulrich Schatzschneider, Nils Metzler-Nolte, Dietrich A. Schmidt, and Martina Havenith. Markierungsfreie Visualisierung von löslichen Metallcarbonylkomplexen in lebenden Zellen mit Hilfe von Raman-Mikrospektroskopie. *Angewandte Chemie*, 122(19):3307–3307, 2010.
- [87] T. Hayakawa, S. Hayashi, S. Miyazawa, T. Ohashi, and K. Watanabe. Polarized Raman mapping method for estimation of refractive index differences on grain-boundaries and in-line transmission properties of polycrystalline alumina. *Opt. Mater. Express*, 2(7):914–919, Jul 2012.
- [88] Marek Janko, Polina Davydovskaya, Michael Bauer, Albert Zink, and Robert W. Stark. Anisotropic Raman scattering in collagen bundles. *Opt. Lett.*, 35(16):2765–2767, Aug 2010.
- [89] M. Cui, B.R. Bachler, and J.P. Ogilvie. Comparing coherent and spontaneous Raman scattering under biological imaging conditions. *Opt Lett*, 34(6):773–775, 2009.
- [90] Takeo Minamikawa, Mamoru Hashimoto, Katsumasa Fujita, Satoshi Kawata, and Tsutomu Araki. Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and its applications for real-time imaging. *Optics Express*, 17(12):9526–9536, June 2009.
- [91] C.L. Evans and X.S. Xie. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1:883–909, 2008.
- [92] M. Müller and A. Zumbusch. Coherent Anti-Stokes Raman scattering microscopy. *ChemPhysChem*, 8(15):2157–2170, 2007.
- [93] Jae Yong Lee, Se-Hwa Kim, Dae Won Moon, and Eun Seong Lee. Three-color multiplex CARS for fast imaging and microspectroscopy in the entire CHn stretching vibrational region. *Optics Express*, 17(25):22281–22295, 2009.
- [94] Y.J. Lee, Y. Liu, and M.T. Cicerone. Characterization of three-color CARS in a two-pulse broadband CARS spectrum. *Opt. Lett.*, 32(22):3370–3372, 2007.
- [95] R.W. Boyd, editor. *Nonlinear Optics. Third Edition*. Academic Press, Amsterdam, Boston, 2008.

- [96] J. Cheng and X. Xie. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications. *J. Phys. Chem. B*, 108(3):827–840, 2004.
- [97] X. Nan, E. Potma, and X. Xie. Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Biophys. J.*, 91(2):728–735, 2006.
- [98] Erik T. Garbacik, Jeroen P. Korterik, Cees Otto, Shaul Mukamel, Jennifer L. Hersek, and Herman L. Offerhaus. Background-free nonlinear microspectroscopy with vibrational molecular interferometry. *Phys. Rev. Lett.*, 107:253902, Dec 2011.
- [99] Chao Fang, Fake Lu, Wei Zheng, and Zhiwei Huang. Triple-frequency symmetric subtraction scheme for nonresonant background suppression in coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *Opt. Express*, 18(15):15714–15724, Jul 2010.
- [100] Stanislav O. Konorov, Michael W. Blades, and Robin F. B. Turner. Non-resonant background suppression by destructive interference in coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy. *Opt. Express*, 19(27):25925–25934, Dec 2011.
- [101] F. Ganikhanov, C. Evans, B. Saar, and X. Xie. High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy. *Opt. Lett.*, 31(12):1872–1874, 2006.
- [102] Erik M. Vartiainen, Hilde A. Rinia, Michiel Müller, and Mischa Bonn. Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Opt. Express*, 14(8):3622–3630, Apr 2006.
- [103] Yuexin Liu, Young Jong Lee, and Marcus T. Cicerone. Broadband CARS spectral phase retrieval using a time-domain Kramers–Kronig transform. *Opt. Lett.*, 34(9):1363–1365, May 2009.
- [104] Sapun H. Parekh, Young Jong Lee, Khaled A. Aamer, and Marcus T. Cicerone. Label-Free Cellular Imaging by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Biophysical journal*, 99(8):2695 – 2704, 2010.
- [105] P. Nandakumar, A. Kovalev, and A. Volkmer. Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS). 17th Int. Conf. on Laser Spectroscopy (ICOLS’05) T54 and 8th European/French Israeli Symp. on Nonlinear and Quantum Optics (Frisno-8), 2005.
- [106] P. Nandakumar, A. Kovalev, and A. Volkmer. Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy. *New Journal of Physics*, 11(3):033026 (9pp), 2009.
- [107] E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, and P. Gilch. Femtosecond stimulated Raman microscopy. *Appl. Phys. B - Lasers Opt.*, 87(3):389–393, 2007.

- [108] C.W. Freudiger, W. Min, B.G. Saar, S. Lu, G.R. Holtom, C. He, J.C. Tsai, J.X. Kang, and X.S. Xie. Label-free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Science*, 322(5909):1857–1861, 2008.
- [109] Brian G. Saar, Christian W. Freudiger, Jay Reichman, C. Michael Stanley, Gary R. Holtom, and X. Sunney Xie. Video-rate Molecular Imaging in Vivo with Stimulated Raman Scattering. *Science*, 330(6009):1368–1370, 2010.
- [110] Brian G. Saar, Richard S. Johnston, Christian W. Freudiger, X. Sunney Xie, and Eric J. Seibel. Coherent Raman scanning fiber endoscopy. *Opt. Lett.*, 36(13):2396–2398, Jul 2011.
- [111] Meng C Wang, Wei Min, Christian W Freudiger, Gary Ruvkun, and X Sunney Xie. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. *Nat Meth*, 8(2):135–138, February 2011.
- [112] Brian G. Saar, L. Rodrigo Contreras-Rojas, X. Sunney Xie, and Richard H. Guy. Imaging Drug Delivery to Skin with Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Molecular Pharmaceutics*, 8(3):969–975, 2011.
- [113] Maarten B. J. Roeffaers, Xu Zhang, Christian W. Freudiger, Brian G. Saar, Marjolein van Ruijven, Gerard van Dalen, Chunhong Xiao, and X. Sunney Xie. Label-free imaging of biomolecules in food products using stimulated Raman microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 16(2):021118, 2011.
- [114] Brian G. Saar, Yining Zeng, Christian W. Freudiger, Yu-San Liu, Michael E. Himmel, X. Sunney Xie, and Shi-You Ding. Label-free, Real-Time Monitoring of Biomass Processing with Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(32):5476–5479, 2010.
- [115] Xu Zhang, Maarten B. J. Roeffaers, Srinjan Basu, Joseph R. Daniele, Dan Fu, Christian W. Freudiger, Gary R. Holtom, and X. Sunney Xie. Label-free Live-Cell Imaging of Nucleic Acids Using Stimulated Raman Scattering Microscopy. *ChemPhysChem*, 13(4):1054–1059, 2012.
- [116] Y. Ozeki and K. Itoh. Stimulated Raman scattering microscopy for live-cell imaging with high contrast and high sensitivity. *Laser Physics*, 20:1114–1118, 2010. 10.1134/S1054660X10090318.
- [117] Christian W. Freudiger, Maarten B. J. Roeffaers, Xu Zhang, Brian G. Saar, Wei Min, and X. Sunney Xie. Optical Heterodyne-Detected Raman-Induced Kerr Effect (OHD-RIKE) Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(18):5574–5581, 2011.
- [118] Brandon R. Bachler, Martin E. Fermann, and Jennifer P. Ogilvie. Multiplex Raman induced Kerr effect microscopy. *Opt. Express*, 20(2):835–844, Jan 2012.

- [119] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh. Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy. *Opt. Expr.*, 17(5):3651–3658, 2009.
- [120] Esben Ravn Andresen, Pascal Berto, and Hervé Rigneault. Stimulated Raman scattering microscopy by spectral focusing and fiber-generated soliton as Stokes pulse. *Opt. Lett.*, 36(13):2387–2389, Jul 2011.
- [121] Hope T. Beier, Gary D. Noojin, and Benjamin A. Rockwell. Stimulated Raman scattering using a single femtosecond oscillator with flexibility for imaging and spectral applications. *Opt. Express*, 19(20):18885–18892, Sep 2011.
- [122] Yasuyuki Ozeki, Wataru Umemura, Kazuhiko Sumimura, Norihiko Nishizawa, Kiichi Fukui, and Kazuyoshi Itoh. Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband fiber laser pulses. *Opt. Lett.*, 37(3):431–433, Feb 2012.
- [123] Delong Zhang, Mikhail N. Slipchenko, and Ji-Xin Cheng. Highly Sensitive Vibrational Imaging by Femtosecond Pulse Stimulated Raman Loss. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(11):1248–1253, 2011.
- [124] Keisuke Nose, Yasuyuki Ozeki, Tatsuya Kishi, Kazuhiko Sumimura, Norihiko Nishizawa, Kiichi Fukui, Yasuo Kanematsu, and Kazuyoshi Itoh. Sensitivity enhancement of fiber-laser-based stimulated Raman scattering microscopy by collinear balanced detection technique. *Opt. Express*, 20(13):13958–13965, Jun 2012.
- [125] Yasuyuki Ozeki, Wataru Umemura, Yoichi Otsuka, Shuya Satoh, Hiroyuki Hashimoto, Kazuhiko Sumimura, Norihiko Nishizawa, Kiichi Fukui, and Kazuyoshi Itoh. High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering. *Nat Photon*, 6(12):845–851, December 2012.
- [126] Lingjie Kong, Minbiao Ji, Gary R. Holtom, Dan Fu, Christian W. Freudiger, and X. Sunney Xie. Multicolor stimulated Raman scattering microscopy with a rapidly tunable optical parametric oscillator. *Opt. Lett.*, 38(2):145–147, Jan 2013.
- [127] Christian W. Freudiger, Wei Min, Gary R. Holtom, Bingwei Xu, Marcos Dantus, and X. Sunney Xie. Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy. *Nat Photon*, 5(2):103–109, February 2011.
- [128] Dan Fu, Fa-Ke Lu, Xu Zhang, Christian Freudiger, Douglas R. Pernik, Gary Holtom, and Xiaoliang Sunney Xie. Quantitative Chemical Imaging with Multiplex Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 134(8):3623–3626, 2012.
- [129] Foil A. Miller. *Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra*, chapter 1. Introduction, pages 1–32. John Wiley & Sons, Inc., 2004.

- [130] Alexander Hopt and Erwin Neher. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 80:2029 – 2036, April 2001.
- [131] Christoph Krafft, Benjamin Dietzek, Michael Schmitt, and Jürgen Popp. Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications. *Journal of Biomedical Optics*, 17(4):040801–1–040801–15, 2012.
- [132] A. Vogel, J. Noack, G. Huttman, and G. Paltauf. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl. Phys. B-Lasers Opt.*, 81(8):1015–1047, 2005.
- [133] Aisada Uchugonova, Matthias Lessel, Sander Nietzsche, Christian Zeitz, Karin Jacobs, Cornelius Lemke, and Karsten König. Nanosurgery of cells and chromosomes using near-infrared twelve-femtosecond laser pulses. *Journal of Biomedical Optics*, 17(10):101502, 2012.
- [134] Ivan P. Christov, Vency D. Stoev, Margaret M. Murnane, and Henry C. Kapteyn. Sub-10-fs operation of Kerr-lens mode-locked lasers. *Opt. Lett.*, 21(18):1493–1495, Sep 1996.
- [135] A. Stingl, M. Lenzner, Ch. Spielmann, F. Krausz, and R. Szipöcs. Sub-10-fs mirror-dispersion-controlled Ti:sapphire laser. *Opt. Lett.*, 20(6):602–604, Mar 1995.
- [136] I. D. Jung, F. X. Kärtner, N. Matuschek, D. H. Sutter, F. Morier-Genoud, G. Zhang, U. Keller, V. Scheuer, M. Tilsch, and T. Tschudi. Self-starting 6.5-fs pulses from a Ti:sapphire laser. *Opt. Lett.*, 22(13):1009–1011, Jul 1997.
- [137] A.E. Siegman. *Lasers*. Univ. Science Books, Mill Valley, CA, 1986.
- [138] R. J. Collins, D. F. Nelson, A. L. Schawlow, W. Bond, C. G. B. Garrett, and W. Kaiser. Coherence, Narrowing, Directionality, and Relaxation Oscillations in the Light Emission from Ruby. *Phys. Rev. Lett.*, 5:303–305, Oct 1960.
- [139] Walter Koechner. Optical resonator. In *Solid-State Laser Engineering*, volume 1 of *Springer Series in Optical Sciences*, pages 210–299. Springer New York, 2006.
- [140] Walter Koechner. Energy transfer between radiation and atomic transitions. In *Solid-State Laser Engineering*, volume 1 of *Springer Series in Optical Sciences*, pages 11–37. Springer New York, 2006.
- [141] R. Paschotta, J. Nilsson, A.C. Tropper, and D.C. Hanna. Ytterbium-doped fiber amplifiers. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 33(7):1049 –1056, jul 1997.
- [142] L. Cohen, editor. *Time-Frequency Analysis*. Prentice-Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey, 1995.
- [143] Walter Koechner. *Solid-state Laser Engineering*. Springer, 6 edition, 2006.

- [144] J.C. Diels and W. Rudolph, editors. *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*, Fundamentals, Techniques, and Applications on a Femtosecond Time Scale. Academic Press Inc. / Elsevier Inc., 2 edition, 2006.
- [145] U. Keller. Ultrafast solid-state laser oscillators: a success story for the last 20 years with no end in sight. *Applied Physics B*, 100:15–28, 2010.
- [146] R. Szipocs, K. Ferencz, C. Spielmann, and F. Krausz. Chirped multilayer coatings for broad-band dispersion control in femtosecond lasers. *Opt. Lett.*, 19(3):201–203, 1994.
- [147] Christian Spielmann, P.F. Curley, T. Brabec, and Ferenc Krausz. Ultrabroadband femtosecond lasers. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 30(4):1100–1114, 1994.
- [148] C. Rullière, editor. *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Springer-Verlag, Berlin, 1998.
- [149] Bengt Edlen. The refractive index of air. *Metrologia*, 2(2):71–80, 1966.
- [150] Adam M. Larson and Alvin T. Yeh. Ex vivo characterization of sub-10-fs pulses. *Opt. Lett.*, 31(11):1681–1683, Jun 2006.
- [151] R. Wolleschensky, T. Feurer, R. Sauerbrey, and U. Simon. Characterization and optimization of a laser-scanning microscope in the femtosecond regime. *Applied Physics B*, 67:87–94, 1998.
- [152] Tobias Jochum. Bildgebung mit einem hochrepetitiven Femtosekunden-Stimulierten Raman Mikroskop. Bachelor thesis, Ludwig-Maximilians Universität München, 2011.
- [153] R. Trebino, K.W. DeLong, D.N. Fittinghoff, J.N. Sweetser, M.A. Krumbugel, B.A. Richman, and D.J. Kane. Measuring ultrashort laser pulses in the time-frequency domain using frequency-resolved optical gating. *Rev. Scientific Instruments*, 68(9):3277–3295, 1997.
- [154] C. Iaconis and I.A. Walmsley. Self-referencing spectral interferometry for measuring ultrashort optical pulses. *IEEE J. Quantum Electronics*, 35(4):501–509, 1999.
- [155] I.Z. Kozma, P. Baum, U. Schmidhammer, S. Lochbrunner, and E. Riedle. Compact autocorrelator for the online measurement of tunable 10 femtosecond pulses. *Rev. Sci. Instrum.*, 75(7):2323–2327, 2004.
- [156] J. Geissler, G. Beaven, and J.P. Boutruche, editors. *Optical Fibres*. Pergamon Press, 1986.
- [157] N. Grote and H. Venghaus, editors. *Fibre Optic Communication Devices*. Springer Series in Photonics. Springer Verlag, 2001.

- [158] D. Gloge. Weakly guiding fibers. *Appl. Opt.*, 10(10):2252–2258, Oct 1971.
- [159] Dietrich Marcuse. Excitation of the dominant mode of a round fiber by a gaussian beam. *Bell System Technical Journal*, 49:1695–1703, 1970.
- [160] Corning. Corning hi 1060 & rc hi 1060 specialty optical fibers data sheet, 2010.
- [161] Govind P. Agrawal. *Nonlinear Fiber Optics*. Academic Press, 1989.
- [162] C. Rullière, editor. *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2 edition, 2005.
- [163] A. Ghatak and Thyagarajan. *Introduction to fiber optics*. Cambridge University Press, 1998.
- [164] H. W. Etzel, H. W. Gandy, and R. J. Ginther. Stimulated Emission of Infrared Radiation from Ytterbium Activated Silicate Glass. *Appl. Opt.*, 1(4):534–536, Jul 1962.
- [165] Frank Träger, editor. *Springer Handbook of Lasers and Optics*. Springer, 2007.
- [166] H.M. Pask, R.J. Carman, D.C. Hanna, A.C. Tropper, C.J. Mackechnie, P.R. Barber, and J.M. Dawes. Ytterbium-doped silica fiber lasers - versatile sources for the 1-1.2 μ m region. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 1(1):2–13, 1995.
- [167] P. Lacovara, H. K. Choi, C. A. Wang, R. L. Aggarwal, and T. Y. Fan. Room-temperature diode-pumped Yb:YAG laser. *Opt. Lett.*, 16(14):1089–1091, Jul 1991.
- [168] Stefan Kück and Günter Huber. Festkörperlaser. *Physikalische Blätter*, 57:43–49, 2001.
- [169] C.R. Giles and E. Desurvire. Modeling erbium-doped fiber amplifiers. *Lightwave Technology, Journal of*, 9(2):271 –283, feb 1991.
- [170] C. Barnard, P. Myslinski, J. Chrostowski, and M. Kavehrad. Analytical model for rare-earth-doped fiber amplifiers and lasers. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 30(8):1817 –1830, aug 1994.
- [171] E. Jaunart and P. Crahay. Accurate EDFA modelling using a simple method. *Optical and Quantum Electronics*, 27:881–886, 1995. 10.1007/BF00558480.
- [172] C. R. Giles, E. Desurvire, and J. R. Simpson. Transient gain and cross talk in erbium-doped fiber amplifiers. *Opt. Lett.*, 14(16):880–882, Aug 1989.
- [173] Laser Quantum GmbH. finesse technical data sheet; <http://www.laserquantum.com/de/products/detail.cfm?id=33> heruntergeladen am 14.03.2013.

- [174] Thomas Klein, Wolfgang Wieser, Christoph M. Eigenwillig, Benjamin R. Biedermann, and Robert Huber. Megahertz OCT for ultrawide-field retinal imaging with a 1050 nm Fourier domain mode-locked laser. *Opt. Express*, 19(4):3044–3062, Feb 2011.
- [175] module test report, bf-915-0200-p5a; 8.5.2009. Technical report, Axcel Photonics, Inc.
- [176] W. Zinth and H.-J. Körner, editors. *Physik III: Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*. Oldenbourg, München, Wien, 1998³.
- [177] Robert W. Boyd. Order-of-magnitude estimates of the nonlinear optical susceptibility. *Journal of Modern Optics*, 46(3):367–378, 1999.
- [178] D.A. Long, editor. *The Raman Effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2002.
- [179] D. Lee and A.C. Albrecht. *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*. Wiley Heyden, London, 1985.
- [180] Eric C. Le Ru and Pablo G. Etchegoin. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Elsevier, 2009.
- [181] F. Munhoz, S. Brustlein, R. Hostein, P. Berto, S. Brasselet, and H. Rigneault. Polarization resolved stimulated raman scattering: probing depolarization ratios of liquids. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(3):419–424, 2012.
- [182] M. Yoshizawa and M. Kurosawa. Femtosecond time-resolved Raman spectroscopy using stimulated Raman scattering. *Phys. Rev. A*, 61:013808, 2000.
- [183] S. Yoon, D. McCamant, P. Kukura, R. Mathies, D. Zhang, and S. Lee. Dependence of line shapes in femtosecond broadband stimulated Raman spectroscopy on pump-probe time delay. *J. Chem. Phys.*, 122(2):024505–1–024505–9, 2005.
- [184] P. Kukura, D.W. McCamant, S. Yoon, D.B. Wandschneider, and R.A. Mathies. Structural Observation of the Primary Isomerization in Vision with Femtosecond-Stimulated Raman. *Science*, 310:1006–1009, 2005.
- [185] E. Ploetz, B. Marx, and P. Gilch. Disturbing interference pattern in femtosecond stimulated Raman microscopy. *J.Raman Spectros.*, 41(6):609–613, 2010.
- [186] E. Ploetz. *Spektrale Modulationen in der Femtosekunden-Stimulierten Raman-Mikroskopie*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2011.

- [187] E. Ploetz, B. Marx, and P. Gilch. Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(10):1875–1882, 2011.
- [188] B. Schrader and W. Meier, editors. *Raman/IR Atlas of Organic Compounds*. Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
- [189] Dieter Gerlach. *Geschichte der Mikroskopie*. Verlag Harri Deutsch, 2009.
- [190] J.B. Pawley, editor. *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, New York, 1995.
- [191] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, Jun 1994.
- [192] Bonnie O. Leung and Keng C. Chou. Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology. *APPLIED SPECTROSCOPY*, 65(9):967–980, SEP 2011.
- [193] Born and Wolfe. *Principles of Optics*. Pergamon Press, 1975.
- [194] G. Tempea, B. Považay, A. Assion, A. Isemann, W. Pervak, M. Kempe, A. Stingl, and W. Drexler. Undistorted delivery of sub-15-fs pulses via high-numerical-aperture microscope objectives. pages 64420P–64420P–5, 2007.
- [195] P. Török, PD Higdon, and T. Wilson. On the general properties of polarised light conventional and confocal microscopes. *Optics communications*, 148(4-6):300–315, 1998.
- [196] Adrian F. Pegoraro, Andrew Ridsdale, Douglas J. Moffatt, Yiwei Jia, John Paul Pezacki, and Albert Stolow. Optimally chirped multimodal CARS microscopy based on a single ti:sapphire oscillator. *Optics Express*, 17(4):2984–2996, February 2009.
- [197] R J Smith, M G Somekh, S D Sharples, M C Pitter, I Harrison, and C Rossignol. Parallel detection of low modulation depth signals: application to picosecond ultrasonics. *Measurement Science and Technology*, 19(5):055301, 2008.
- [198] W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, and W.T. Vetterling. *Numerical Recipes in C, second edition*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [199] J.M. Lerner and Thevenon. Optics of spectroscopy. Technical report, Jobin Yvon, 1988.
- [200] Princeton Instruments. Acton standard series of monochromators and spectrographs. <http://www.princetoninstruments.com/products/spec/actonseries/dsheet.aspx>.
- [201] Solid State Division Hamamatsu Photonics K.K. Nmos linear image sensor s3901/s3904 series, Juli 2010.

- [202] Solid State Division Hamamatsu Photonics K.K. Nmos linear image sensor s8380/s8381 series, Juli 2010.
- [203] Solid State Division Hamamatsu Photonics K.K. Characteristic and use of nmos linear image sensors. Technical report, Hamamatsu Photonics K.K., Solid State Division, 2002.
- [204] Gregory M. Greetham, Pierre Burgos, Qian Cao, Ian P. Clark, Peter S. Codd, Richard C. Farrow, Michael W. George, Moschos Kogimtzis, Pavel Matousek, Anthony W. Parker, Mark R. Pollard, David A. Robinson, Zhi-Jun Xin, and Michael Towrie. Ultra: A unique instrument for time-resolved spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 64(12):1311–1319, Dec 2010.
- [205] I.N. Bronstein, K.A. Semendjajew, G. Musiol, and H. Mühlig. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, 2005.
- [206] Alan V. Oppenheim and Ronald W. Schafer. *Zeitdiskrete Signalbearbeitung*. Oldenbourg, 1995.
- [207] Andreas Vernaleken, Bernhard Schmidt, Martin Wolferstetter, Theodor W. Hänsch, Ronald Holzwarth, and Peter Hommelhoff. Carrier-envelope frequency stabilization of a Ti:sapphire oscillator using different pump lasers. *Opt. Express*, 20(16):18387–18396, Jul 2012.
- [208] A. Poppe, L. Xu, F. Krausz, and C. Spielmann. Noise characterization of sub-10-fs Ti:sapphire oscillators. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 4(2):179–184, mar/apr 1998.
- [209] Theresa D. Mulder, Ryan P. Scott, and Brian H. Kolner. Amplitude and envelope phase noise of a modelocked laser predicted from its noise transfer function and the pump noise power spectrum. *Opt. Express*, 16(18):14186–14191, Sep 2008.
- [210] R.P. Scott, C. Langrock, and B.H. Kolner. High-dynamic-range laser amplitude and phase noise measurement techniques. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 7(4):641–655, jul/aug 2001.
- [211] Ryan P. Scott, Theresa D. Mulder, Katherine A. Baker, and Brian H. Kolner. Amplitude and phase noise sensitivity of modelocked Ti:sapphire lasers in terms of a complex noise transfer function. *Opt. Express*, 15(14):9090–9095, Jul 2007.
- [212] Dieter Meschede. *Optik, Licht und Laser*. Teubner B.G. GmbH, 1999.
- [213] Albert Rose. *Vision : human and electronic*. New York : Plenum Pr., New York, 1973.
- [214] Hans-Otto Georgii. *Stochastik*. Walter de Gruyter, 2004.

- [215] J.H.S. Green and D.J. Harrison. Vibrational spectra of benzene derivatives - xvii. benzonitrile and substituted benzonitriles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 32(6):1279 – 1286, 1976.
- [216] M.J. Pelletier. Effects of temperature on cyclohexane Raman bands. *Appl. Spectr.*, 53(9):1087–1096, 1999.
- [217] Kenneth B. Wiberg and Andrew Shrake. A vibrational study of cyclohexane and some of its isotopic derivatives: Raman and infrared spectra and assignments of cyclohexane and cyclohexane-d₁₂. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 27(7):1139 – 1151, 1971.
- [218] S. Linden, H. Giessen, and J. Kuhl. Xfrog - a new method for amplitude and phase characterization of weak ultrashort pulses. *physica status solidi (b)*, 206(1):119–124, 1998.
- [219] Romedi Selm, Günther Krauss, Alfred Leitenstorfer, and Andreas Zumbusch. Non-iterative characterization of few-cycle laser pulses using flat-top gates. *Opt. Express*, 20(6):5955–5961, Mar 2012.
- [220] Zeiss. Herstellerangabe der Firma Zeiss auf direkte Nachfrage.
- [221] R. Ahlrichs, M. Bär, H.-P. Baron, R. Bauernschmitt, S. Böcker, N. Crawford, P. Deglmann, M. Ehrig, K. Eichkorn, S. Elliott, F. Furche, F. Haase, M. Häser, C. Hättig, H. Horn, C. Huber, U. Huniar, M. Kattannek, A. Köhn, C. Kölmel, M. Kollwitz, K. May, P. Nava, C. Ochsenfeld, H. Öhm, H. Patzelt, D. Rappoport, O. Rubner, A. Schäfer, U. Schneider, M. Sierka, O. Treutler, B. Unterreiner, M. von Arnim, F. Weigend, P. Weis, and H. Weiss. Turbomole (vers. 5.10). Technical report, Universität Karlsruhe, 2008.
- [222] Johannes Neugebauer, Markus Reiher, Carsten Kind, and Bernd A. Hess. Quantum chemical calculation of vibrational spectra of large molecules - Raman and IR spectra for Buckminsterfullerene. *Journal of Computational Chemistry*, 23(9):895–910, 2002.
- [223] Stefka Nikolova Kasarova, Nina Georgieva Sultanova, Christo Dimitrov Ivanov, and Ivan Dechev Nikolov. Analysis of the dispersion of optical plastic materials. *Optical Materials*, 29(11):1481 – 1490, 2007.
- [224] George M. Hale and Marvin R. Querry. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. *Appl. Opt.*, 12(3):555–563, Mar 1973.
- [225] Hervé Abdi and Lynne J. Williams. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(4):433–459, 2010.
- [226] Inc The Mathworks. princomp: Principal component analysis (pca) on data/ in matlab documation: * r2012b * statistics toolbox * multivariate data analysis * principle component analysis (pca) and canonical correlation, 2012.

- [227] Christoph Pohling, Tiago Buckup, Axel Pagenstecher, and Marcus Motzkus. Chemoselective imaging of mouse brain tissue via multiplex CARS microscopy. *Biomed. Opt. Express*, 2(8):2110–2116, Aug 2011.
- [228] B. Alberts, editor. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 4 edition, 2002.
- [229] Maziyar Parsa. Neues Detektionsverfahren für die FSRM. Bachelor thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2012.
- [230] W. Sibbett, R.S. Grant, and D.E. Spence. Broadly tunable femtosecond solid-state laser sources. *Applied Physics B*, 58:171–181, 1994.
- [231] D. E. Spence, J. M. Dudley, K. Lamb, W. E. Sleat, and W. Sibbett. Nearly quantum-limited timing jitter in a self-mode-locked Ti:sapphire laser. *Opt. Lett.*, 19(7):481–483, Apr 1994.
- [232] He Wang, Chengquan Li, Jason Tackett, Hiroki Mashiko, Christopher M. Nakamura, Eric Moon, and Zenghu Chang. Power locking of high-repetition-rate chirped pulse amplifiers. *Applied Physics B*, 89:275–279, 2007.
- [233] Takuya KANAI, Samuel BOHMAN, Akira SUDA, Shigeru YAMAGUCHI, and Katsumi MIDORIKAWA. Development of a pointing and power stabilization system for intense few-cycle lasers. *The Review of Laser Engineering*, 36(APLS):1109–1112, 2008.
- [234] Mitsunobu Miyagi and Shigeo Nishida. Pulse spreading in a single-mode fiber due to third-order dispersion. *Appl. Opt.*, 18(5):678–682, Mar 1979.
- [235] D. Strickland and G. Mourou. Compression of amplified chirped optical pulses. *Opt. Commun.*, 56(3):219–221, 1985.
- [236] Julien Fatome, Bertrand Kibler, Esben R. Andresen, Hervé Rigneault, and Christophe Finot. All-fiber transform-limited spectral compression by self-phase modulation of amplitude-shaped pulses. In *Nonlinear Photonics*, page NTu2D.7. Optical Society of America, 2012.
- [237] M. Oberthaler and R. A. Hopfel. Special narrowing of ultrashort laser pulses by self-phase modulation in optical fibers. *Applied Physics Letters*, 63(8):1017–1019, 1993.
- [238] S. A. Planas, N. L. Pires Mansur, C. H. Brito Cruz, and H. L. Fragnito. Spectral narrowing in the propagation of chirped pulses in single-mode fibers. *Opt. Lett.*, 18(9):699–701, May 1993.
- [239] PHILLIP C. D. HOBBS. Reaching the shot noise limit for \$10. *Opt. Photon. News*, 2(4):17–23, Apr 1991.

- [240] Roger A. Light, Richard J. Smith, Nicholas S. Johnston, Steve D. Sharples, Michael G. Somekh, and Mark C. Pitter. Highly parallel CMOS lock-in optical sensor array for hyperspectral recording in scanned imaging systems. *Proc. SPIE 7570, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XVII*, pages 75700U–75700U–10, 2010.
- [241] Chad A. Lieber and Anita Mahadevan-Jansen. Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Appl. Spectrosc.*, 57(11):1363–1367, Nov 2003.
- [242] Alex Cao, Abhilash K. Pandya, Gulay K. Serhatkulu, Rachel E. Weber, Houbai Dai, Jagdish S. Thakur, Vaman M. Naik, Ratna Naik, Gregory W. Auner, Raja Rabah, and D. Carl Freeman. A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(9):1199–1205, 2007.
- [243] Andreas F. Ruckstuhl, Matthew P. Jacobson, Robert W. Field, and James A. Dodd. Baseline subtraction using robust local regression estimation. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 68(2):179 – 193, 2001.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Gilch dafür, dass ich meine Doktorarbeit unter seiner Betreuung anfertigen durfte und er mir über die Jahre in München und Düsseldorf jederzeit mit Rat zur Seite stand.

Ich danke Herrn Professor Weinkauff für die unkomplizierte Übernahme der Zweitgutachter-schaft.

Ich danke Herrn Professor Zinth, weil er am Anfang des Projektes in München Räume und Material zur Verfügung gestellt hat und vor allem immer interessiert war an dem Fortkom-men der Arbeit und nie um einen Ratschlag verlegen.

Ich danke Herrn Dr. Robert Huber für die Idee des Faserverstärkers und die vielen anderen Ideen und auch das Ausleihen von Faserwerkzeug und -teilen, die in München den ersten Erfolg ermöglicht haben.

Ich danke Janine Benz und meiner Schwester Anna Marx für das rasche Korrekturlesen der Arbeit.

Ich danke meiner lieben Kollegin Frau Dr. Evelyn Plötz für Ihre großen Bemühungen um das FSRM-Projekt und unsere gemeinsamen Publikationen.

Ich danke dem Herrn Kollegen Gerald Ryseck für den grünen Tee, alle Ideen, die er uner-müdlich vorgetragen hat, darunter der Hinweis auf das phasestepping, das Rose-Kriterium, grayscale morphology, Polarisisationseffekte beim Fokussieren und ziemlich viele andere Sa-chen.

Ich danke Thomas Klein und den Huber-Buam für die Unterstützung bei dem Aufbau des Faserverstärkers und die gute Labornachbarschaft in München.

Ich danke Herrn Lars Czerwinski, dass er die Arbeit an dem FSRM-Projekt fortführt und für die kulinarischen Mitbringsel.

Ich danke den Kollegen Torben Villnow und Ramona Mundt und Sascha Fröbel für die Süßigkeiten, ihre Geduld mit mir und die gemeinschaftliche Arbeit.

Ich danke den Bachelorstudenten Mario Mangold, Timo Weisbarth, Tobias Jochum und den Diplomstudenten Mazyar Parsa und Anja Kristen für Ihre Beiträge zu dem FSRM Projekt.

Ich danke allen Kollegen in den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Zinth, Herrn Prof. Riedle und Dr. Robert Huber in München für das gute Arbeitsklima.

Ich danke der 6. Gemeinschaft, St. Philipp Neri München, und der 3. Gemeinschaft, St. Marien Köln, und ihren Katechisten für die geistige Begleitung.

Dem Herren Martin Härtl und Benedikt Huyer-May sei für den freundschaftlichen Rat und

gemeinsame Essen in München, den Herren Aaron Gallardo-Sanchez, Kevin Kandathil und Bernhard Galleitner für die freundschaftliche Begleitung und unterschiedlichste Unternehmungen in Köln und an der deutsch -österreichischen Grenze gedankt.

Insbesondere hat Herr Gallardo mir sehr mit seinem Bügeleisen, seiner Waschmaschine und seinem Fernseher geholfen.

Ich möchte mich bei Familie Neuhoff bedanken, dass ich während der Zeit des Umzuges bei Ihnen wohnen konnte.

Ich danke meinen Geschwistern David, Anna und Jonas für die Gespräche und die Freude, die wir an den Festen in München teilen konnten.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung in allen Belangen in allen Jahren.

Ich danke Gott, dass er mich bisher hierher geführt hat und mir nie an etwas hat fehlen lassen und der Kirche, die mir in Zeiten der Bedrängnis Stütze war.

Die hier vorgelegte Arbeit habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen
Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche
unternommen.

Düsseldorf, 13.5.2013

(Benjamin Marx)