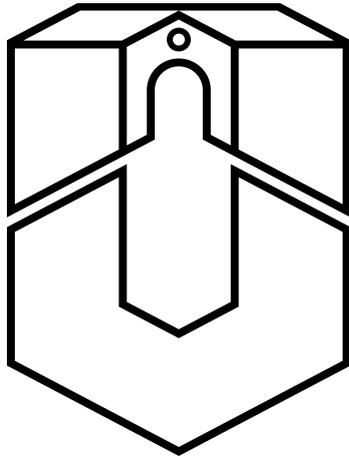


Entwicklung und Anwendung der CARS - Mikroskopie zum Nachweis C-deuterierter Wirkstoffe

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
der Universität Osnabrück



dem Fachbereich Physik vorgelegt von

Gero Maximilian Bergner
aus Wachtberg

Jena 2013

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. Sebastian Schlücker
2. Prof. Dr. Benjamin Dietzek

Prüfer im öffentlichen Promotionskolloquium:

1. Prof. Dr. Sebastian Schlücker
2. Prof. Dr. Benjamin Dietzek
3. Prof. Dr. Mirco Imlau
4. Dr. Mario Einax

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2013

Die vorgestellten Arbeiten wurden am *Institut für Photonische Technologien Jena e. V.* (IPHT) durchgeführt



Eine finanzielle Förderung erfolgte durch den Sonderforschungsbereich 630 an der Universität Würzburg: „Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“, das Projekt ACCORD (Nr. 034041), das Thüringer Kultusministerium (TKM, B578-06001), den Europäischen Fonds für Forschung und Entwicklung (EFRE) sowie durch das IPHT Jena.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Einleitung	5
2.2	RAMAN-Spektroskopie	5
2.2.1	Grundlagen der RAMAN-Streuung	6
2.2.2	Zusammenfassung: Eigenschaften der RAMAN-Streuung	9
2.3	CARS-Mikroskopie	9
2.3.1	Herleitung der CARS-Intensität	9
2.3.2	Forward-CARS und Epi-CARS	15
2.3.3	Die CARS-Suszeptibilität	16
2.3.4	Das CARS-Linienprofil	17
2.3.5	Multiplex-CARS	22
2.3.6	Zusammenfassung: Eigenschaften der CARS-Mikroskopie	23
2.4	Die Sensitivität der RAMAN-Spektroskopie und CARS-Mikroskopie	24
3	CARS-Mikroskopie an C-deutierten Wirkstoffen und Modellsystemen	26
3.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung	26
3.2	Die Aufnahme von C-deutierter Fettsäure in Makrophagen	28
3.2.1	Material und Methoden	28
3.2.2	Ergebnisse	30
3.3	Quantitative RAMAN- und CARS-Mikroskopie	33
3.3.1	Material und Methoden	33
3.3.2	Untersuchungen an C-deutierten Modellsystemen	38
3.3.3	C-deuterte Wirkstoffe	44
3.3.4	β -Carotin	50
3.4	Zusammenfassung und Ausblick	53
4	Impulsformer als durchstimmbare spektrale Filter	55
4.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung	55
4.2	Material und Methoden	56
4.2.1	Die Flüssigkristallmasken	56
4.2.2	Der DAZZLER	65
4.2.3	Breitband-Lichtquellen	70
4.3	Experimente	71
4.3.1	Durchstimmbare Filter auf der Basis von Superkontinuumslichtquellen	71
4.3.2	Der Einsatz von LC-SLM als durchstimmbare spektrale Filter in der (RAMAN-)SPEKTROSKOPIE	75
4.3.3	Ein durchstimmbarer Filter auf der Detektionsseite	80
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	83

5	Quasi-Multiplex-CARS-Mikroskopie	84
5.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung	84
5.2	Material und Methoden	87
5.2.1	Breitband-Lichtquellen für die CARS-Mikroskopie	87
5.2.2	Der Mikrofluidikchip	88
5.2.3	Der DAZZLER als „Schalter“ zwischen RAMAN-Banden	88
5.3	Experimente	90
5.3.1	Die selektive Anregung von RAMAN-Banden im CH-Streckschwingungs- bereich	90
5.3.2	Rekonstruktion des CARS-Linienprofils im Wellenzahlbereich 500 bis 900 cm^{-1}	95
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	99
6	Evolutionsstrategien und CARS-Mikroskopie	100
6.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung	100
6.2	Material und Methoden	101
6.2.1	Kurzeinführung in Evolutionsstrategien	101
6.2.2	Die Wahl des Algorithmus aufgrund von ersten experimentellen Tests: Optimierung der Transmission	105
6.2.3	Der experimentelle Aufbau für die CARS-Mikroskopie	110
6.3	Ergebnisse: Optimierung des Schwingungscontrastes von CARS-Bildern	113
6.3.1	Optimierung des CARS-Intensitätsverhältnisses von CD-Toluol zu CH- Toluol	113
6.3.2	Optimierung von DMSO versus Toluol	117
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	121
7	Zusammenfassung	122
8	Summary	124
9	Publikationen	126
9.1	In diese Doktorarbeit eingegangene Artikel	126
9.2	Weitere, im Rahmen dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen	127
10	Danksagung	128

Kapitel 1

Einleitung

Als LEEUWENHOEK (1632-1723) mit ersten selbstgebauten Mikroskopen (s. Abbildung 1.1 A) Bakterien und rote Blutkörperchen untersuchte und C. V. RAMAN (1888-1970) die inelastische Streuung von Licht an Materie erstmals experimentell nachwies¹, ahnte noch niemand, welche Bedeutung die Kombination von hoher Ortsauflösung und chemischer Information, welche von RAMAN- und kohärenter anti-STOKES RAMAN-Streuungen (CARS, *coherent anti-Stokes Raman scattering*)-Mikroskopie realisiert wird, einmal in der physikalischen Chemie und Biophysik erlangen würde ([1], [2]).

Heutzutage ist es möglich, chemische Information minimal-invasiv, d. h. ohne Vorbehandlung der Probe wie zum Beispiel durch Anfärbung mit einem Fluoreszenzmarker, mit einer Ortsauflösung, die allein durch die Auflösungsgrenze nach ERNST ABBE (1872) bestimmt ist, zu gewinnen. Im Falle der chemischen Bildgebung macht man sich zunutze, dass ein RAMAN-Spektrum einer unbehandelten Probe einen unverwechselbaren chemischen „Fingerabdruck“ darstellt. Vorteilhaft an der RAMAN-Spektroskopie ist, dass ein sehr geringes Probenvolumen ausreicht, um ein Spektrum zu erhalten. Zudem erleichtert die lineare Konzentrationsabhängigkeit die quantitative Analyse. Infolgedessen findet die RAMAN-Spektroskopie in Gebieten wie z. B. der Mineralogie [3], Festkörperphysik und nicht zuletzt der biophysikalischen Chemie Anwendung. Da Wasser, welches als Umgebungsmedium in den meisten biologischen Proben vorhanden ist, nur ein schwacher RAMAN-Streuer ist, eignet sich die RAMAN-Spektroskopie im Gegensatz zur Infrarotspektroskopie zur Untersuchung wässriger Proben in der Biologie und Biomedizin. Anhand des chemischen Fingerabdrucks versucht man, Fortschritte in der Krebsforschung [4], Arterioskleroseforschung [5] und Pharmazie [6] zu erzielen. Wirkstoffe können in Zellen statt durch Anheften eines Fluoreszenzmarkers, also durch externes „labelling“, intrinsisch markiert werden, indem z. B. die Wasserstoffatome an den CH-Bindungen durch Deuteriumatome ersetzt werden [6]. Das von den CD-Banden herrührende RAMAN-Signal ist spektroskopisch gut von den spektralen Beiträgen der Zellbestandteile isoliert und liefert somit einen guten chemischen (und in diesem Beispiel wirkstoff-selektiven) Kontrast. So ist es mit Hilfe der RAMAN-Spektroskopie beispielsweise möglich, die Verteilung von deuterierten Wirkstoffen in Zellen zu visualisieren und zu quantifizieren [7].

Damit die RAMAN-Mikrospektroskopie eine breitere Anwendung finden konnte, mussten noch einige Schwierigkeiten überwunden werden. Da die RAMAN-Streuung sehr schwach ist (nur etwa eines von 10^7 Photonen wird tatsächlich inelastisch gestreut [8]) sind eine hohe spektrale Photonendichte des Anregungslichts sowie empfindliche Detektoren notwendig. Mit der Erfindung des Lasers steht eine ideale Lichtquelle zur Verfügung, da ein Laser monochromatisches Licht hoher Kohärenz, Photonendichte und Strahlqualität besitzt. Mit der Verwendung verschiedener Laserwellenlängen lassen sich gezielt Resonanzeffekte (im UV-VIS-Spektralbereich) ausnutzen oder Fluoreszenz vermeiden (im UV und NIR-Spektralbereich). Trotz der Fortschritte in der Laser- und Detektorentwicklung dauert die Aufnahme eines RAMAN-mikrospektroskopischen Bildes, das für jedes Pixel ein komplettes RAMAN-Spektrum enthält, zu lange, als dass zeitauf-

¹RAMAN wird der Effekt zwar zugeschrieben, tatsächlich wurde die inelastische Streuung von Licht an Materie unabhängig von RAMAN auch von MANDELSTAM und LANDSBERG entdeckt, weshalb die RAMAN-Streuung in der Sowjetunion auch als Mandelstam-Landsberg-Effekt oder „kombinierte Lichtstreuung“ bekannt war.



A



B

Abbildung 1.1: A: Historisches Lichtmikroskop von Robert Hooke. Quelle: <http://www.wikipedia.org/wiki/Lichtmikroskop>. B: Modernes Laser Scanning Mikroskop von ZEISS (LSM Meta 510), das auch Verwendung im CARS-Aufbau am IPHT findet. Abdruck mit freundlicher Genehmigung der CARL ZEISS AG.

gelöst die Aufnahme von Wirkstoffen in Zellen möglich wäre. Die Bildaufnahmezeit hängt auch von der Detektionsgrenze ab. Greift man nicht auf spezielle Techniken wie oberflächenverstärkte RAMAN-Streuung (SERS) oder Resonanz-RAMAN-Streuung zurück, so lassen sich Konzentrationen im Bereich von wenigen mM nachweisen [9].

Einen Ausweg in der Frage der Bildaufnahmezeit bietet die nichtlineare RAMAN-Mikroskopie, speziell die CARS-Mikroskopie [5]: Verwendet man Laser mit einer hohen Repetitionsrate (im MHz-Bereich) und schnelle Laser Scanning Mikroskope (s. Abbildung 1.1 B), erscheint die Verfolgung von Wirkstoffen in Zellen innerhalb von Sekunden realistisch. Aufgrund der kurzen Bildaufnahmezeiten können Gewebeschnitte großflächig, d. h. mehrere Quadratmillimeter, innerhalb von wenigen Minuten, abgerastert werden [10]. CARS wurde schon in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts in der Flammendiagnostik [11] zur Untersuchung von Verbrennungsgasen von Autos angewandt. Daran erinnert auch das Akronym CARS [12]. Es handelt sich hierbei um einen Spezialfall der Vier-Wellen-Mischung, bei der zwei Anregungslaser, Pump und STOKES, ein optisches Gitter bilden und Moleküle kohärent zu Schwingungen antreiben. Ein dritter Laser, der Probe-Strahl, wird anschließend an diesem Gitter gestreut, woraufhin das anti-STOKES-Signal erzeugt wird. Entspricht die Differenzfrequenz von Pump und STOKES einem RAMAN-Übergang, so wird die anti-STOKES-Intensität resonanzverstärkt. Dieses Signal ist im Gegensatz zur spontanen RAMAN-Streuung gerichtet und kohärent. Da es sich also um gerichtete Laser-ähnliche Strahlung handelt, kann es in einiger Entfernung von der Probe detektiert („stand-off-detection“) und somit gut von der hellen Flamme unterschieden werden. Mit der Entwicklung von robusten und relativ kompakten Ti:Sa-Lasern zu Beginn der neunziger Jahre wurde CARS dann auch für die Mikroskopie interessant. Durchstimmbare Laser und optische parametrische Oszillatoren erlauben das Abstimmen der Anregungslaser auf RAMAN-Banden im gesamten interessanten Wellenzahlbereich von ca. $500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Laser im NIR-Spektralbereich bieten den Vorteil einer hohen Eindringtiefe in biologische Proben. Deshalb kam es seit dem Jahr 1999 (s. [13], [14]) zu einer „Renaissance“ der CARS-Mikroskopie, die zuerst 1982 an deuteriertem Wasser in einer nicht-kollinearen Anregungsgeometrie demonstriert wurde [15].

Obwohl die Anwendung von CARS-Mikroskopie und infolgedessen die Anzahl der CARS-Veröffentlichungen in der letzten Dekade zugenommen hat und es sich aufgrund der Möglichkeit einer schnellen Bildaufnahme, der chemischen Spezifität und hohen Ortsauflösung um ein at-

traktives, bildgebendes Verfahren handelt, ist die CARS-Mikroskopie nicht so weit verbreitet wie zum Beispiel die Fluoreszenzmikroskopie in der Biologie und Medizin. Dies liegt zum einen daran, dass die Anschaffung eines gepulsten Lasersystems immer noch recht kostspielig ist und es ausgebildeten Personals bedarf, um es aufzubauen und zu justieren. Zum anderen erlaubt es die limitierte Sensitivität der kohärenten anti-STOKES RAMAN-Streuung nicht, physiologisch relevante, niedrige Konzentrationen im nM bis μM -Bereich nachzuweisen, was beispielsweise für die Wirkstoffforschung von großer Bedeutung wäre. Ein weiterer Nachteil ist bei Verwendung schmalbandiger ps-Laser, die hohen Schwingungskontrast liefern, dass in diesem Falle („single-frequency-CARS“) chemische Information nur einer RAMAN-Bande gewonnen werden kann. Will man mehrere RAMAN-Banden gleichzeitig abfragen, so ist ein breitbandiger Stokes-Laser und ein Spektrometer nötig, um das CARS-Spektrum („Multiplex-CARS“, [16]) aufzunehmen, aus welchem die RAMAN-Information zurückgerechnet werden muss.

Die vorliegende Arbeit widmet sich zwei zentralen Fragestellungen hinsichtlich der Weiterentwicklung der CARS-Mikroskopie in der Wirkstoffforschung: Einerseits wird der Frage nachgegangen, welche Konzentrationen insbesondere von deuterierten (Wirk-)stoffen mit CARS-Mikroskopie nachgewiesen werden können und wie das Detektionslimit herabgesetzt werden kann. Andererseits geht es um die Frage, wie ein CARS-Aufbau verkleinert und vereinfacht werden kann, um die Vorteile der hohen Bildaufnahmegeschwindigkeit eines *single-frequency-CARS* Aufbaus und des hohen Informationsgehalts eines RAMAN-Mapping-Experiments zu vereinen.

Für beide Fragestellungen werden Lichtmodulatoren eingesetzt, die Laserlicht in Amplitude und Phase formen können.

Kapitelübersicht

In *Kapitel 2* werden die theoretischen Grundlagen für die RAMAN- und CARS-Mikroskopie bereitgestellt, die insbesondere für das Verständnis der nachfolgenden Kapitel wichtig sind.

Kapitel 3 befasst sich mit RAMAN- und CARS-Mikroskopie von C-deuterierten Substanzen. Zunächst wird am Beispiel der Visualisierung von deuterierter Palmitinsäure in Makrophagen die chemische Spezifität der CARS-Mikroskopie demonstriert. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden Vorarbeiten zum Nachweis von niedrigen Konzentrationen von C-deuterierten Wirkstoffen vorgestellt. Für diesen quantitativen Nachweis wird ein Mikrofluidik-Chip mit zwei parallelen Kanälen verwendet, die ins Gesichtsfeld eines Mikroskopobjektivs passen. Ein Kanal enthält den deuterierten Analyten, während der zweite Kanal die undeuterierte Substanz als Referenz enthält. Anhand dieser Messmethode, deren Funktion zunächst mit Modellsystemen getestet wird, werden quantitative RAMAN- und CARS-Messungen mit deuterierten Wirkstoffen durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Kapitels erlauben einen Vergleich der Sensitivität von RAMAN- mit CARS-Mikroskopie und die Angabe von Detektionsgrenzen.

Kapitel 4 befasst sich mit Lichtmodulatoren und ihrem Einsatz als flexible, durchstimmbare spektrale Filter in der Fluoreszenz- und RAMAN-Spektroskopie. Die Kombination von (spektral breitbandigen) Primärlichtquellen und Impulsformern erlaubt die Konstruktion von flexiblen, durchstimmbaren (schmalbandigen) Lichtquellen, die Licht nahezu beliebig spektral modulieren können. Zwei Typen von Lichtmodulatoren kommen zum Einsatz und werden am Schluss des Kapitels miteinander verglichen: Flüssigkristallmasken (auf englisch „Liquid-crystal spatial light modulators, kurz LC-SLM“) mit 128 (von CRI) bzw. mit 640 Pixeln (von JENOPTIK) sowie ein akustooptischer Modulator („Dazzler“) von FASTLITE. Der Dazzler wurde zur Realisierung eines Quasi-Multiplex CARS Aufbaus (*Kapitel 5*) und der SLM in einem Aufbau für die optimale Kontrolle von CARS-Bildern (*Kapitel 6*) verwendet.

Kapitel 5 behandelt das Konzept der Quasi-Multiplex-CARS-Mikroskopie. Die Idee war hierbei, den bestehenden CARS-Aufbau zu vereinfachen und zu verkleinern. Das Konzept der Quasi-Multiplex-CARS-Mikroskopie wird erklärt und die Experimente hierzu vorgestellt.

Die Arbeit schließt mit *Kapitel 6*, welches ein Experiment zur optimalen Kontrolle von Schwin-

gungskontrast in CARS-Bildern beschreibt. Der Kontrast eines CARS-Bildes wurde als Rückgabewert für einen selbstlernenden Algorithmus verwendet. Dieser findet die Pixelspannung für einen Laserpuls, der optimalen Kontrast generiert. Nach einer Einführung in das Konzept von evolutionären Strategien werden der Algorithmus, der in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Bioinformatik der FSU Jena entwickelt wurde, und der experimentelle Aufbau vorgestellt. Die Optimierung des Schwingungskontrastes wird anhand von perdeutertem Toluol demonstriert.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Einleitung

Obwohl der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der *nichtlinearen* CARS-Mikroskopie liegt, ist es trotzdem instruktiv, wesentliche Eigenschaften und Herleitungen im Kontext der *linearen* RAMAN-Spektroskopie zu betrachten. Für die *single-frequency*-CARS-Mikrospektroskopie ist die Kenntnis eines RAMAN-Spektrums außerdem unverzichtbar, da in der CARS-Mikroskopie die Wellenlängen der Anregungslaser von vornherein so gewählt werden, dass ihre Differenzfrequenz gerade auf die RAMAN-Bande, die für den chemischen Kontrast ausgewählt wird, abgestimmt wird.

Einen guten Überblick über RAMAN-Spektroskopie und RAMAN-Mikroskopie bieten die Bücher [17] und [18]. CARS-Mikroskopie hingegen ist eine sehr spezielle bildgebende Technik und ist als Sonderfall der nichtlinearen Optik deshalb nur ein Kapitel unter vielen in den meisten einschlägigen Textbüchern über Laserspektroskopie (siehe z. B. die Referenzen [19], [20], [21]). Die Ableitung der Gleichungen in diesem Kapitel folgt im Wesentlichen [22], der Doktorarbeit [23] und dem Review [24]. In der letzten Zeit sind viele lesenswerte Reviews zu CARS-Mikroskopie erschienen (s. z. B. [25], [26], [2] und [27].) Am Schluss dieses Kapitels wird die (theoretisch) erreichbare Sensitivität von Raman-Mikrospektroskopie mit der von CARS Mikroskopie verglichen, das heisst die Nachweisgrenze von Substanzen in kondensierter Phase, deren experimentelle Bestimmung ein zentrales Thema dieser Arbeit darstellt. Die ebenfalls nicht-lineare Spektroskopieart *Stimulated Raman scattering*, kurz *SRS* [28] wurde in dieser Arbeit nicht angewandt. Diese Technik wird kurz angesprochen, da sie verspricht, einige Nachteile, die der CARS-Mikroskopie inhärent sind, zu überwinden.

2.2 RAMAN-Spektroskopie

Unter RAMAN-Streuung versteht man gewöhnlich die inelastische Streuung von Licht an Materie. Das gestreute Licht besitzt aufgrund der Wechselwirkung eine andere Frequenz als das Anregungslicht. Sind bei der Wechselwirkung mit der Probe Translationen der Teilchen von der Probe involviert, spricht man von BRILLOUIN-Streuung. Die RAMAN-Streuung ist nach dem indischen Physiker CHANDRASEKHARA VENKATA RAMAN benannt. Fast zeitgleich wurde sie von den russischen Physikern MANDELSTAM und LANDSBERG entdeckt. In der russischsprachigen Literatur ist die RAMAN-Streuung auch als „kombinierte Lichtstreuung“ bekannt. Die RAMAN-Spektroskopie ist - neben der UV/VIS- Absorptionsspektroskopie und der Infrarotspektroskopie ein wichtiges analytisches Werkzeug in der physikalischen Chemie und der Festkörperphysik, da sie unter anderem strukturelle Information auf der Ebene der untersuchten Moleküle liefert [29].

2.2.1 Grundlagen der RAMAN-Streuung

Die Wechselwirkung mit der Probe äußert sich durch die Induzierung eines Dipolmoments durch ein elektrisches Feld \vec{E} , welches die Ladungen in einem Molekül gegeneinander verschiebt und zu Oszillationen mit der Frequenz des anregenden (Laser-)Lichts anregt. Das induzierte Dipolmoment $\vec{\mu}$ ist über die Gleichung

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E} \quad (2.1)$$

mit dem Anregungslicht verknüpft. Der Polarisierbarkeitstensor α beschreibt die richtungsabhängige Antwort der Probe auf das eingestrahlte elektrische Feld:

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}. \quad (2.2)$$

Die Intensität der gestreuten Strahlung ist dabei proportional zum zeitlichen Mittel des Quadrates der zweiten Ableitung des Dipolmoments:

$$I \propto |\ddot{\mu}|^2. \quad (2.3)$$

Es handelt sich hierbei um einen HERTZSCHEN Dipol, was sich in der Abstrahlcharakteristik widerspiegelt: Parallel zur Dipolachse wird keine Strahlung emittiert, wohingegen die Abstrahlung senkrecht zur Dipolachse am größten ist (s. auch [30] oder [31]).

Für die folgenden Überlegungen wird der Einfachheit halber nur eine Dimension betrachtet. Die Ergebnisse können anschließend auf den allgemeinen Fall von drei Raumrichtungen übertragen werden.

In x-Richtung polarisiertes Anregungslicht, welches sich in z-Richtung ausbreitet, kann durch eine ebene Welle

$$E_x = E_x^0 e^{-\omega_0 z \frac{\kappa}{c}} e^{-i\omega_0(z \frac{n}{c} - t)} \quad (2.4)$$

mit der Kreisfrequenz ω_0 beschrieben werden, wobei in dieser Gleichung E_x^0 die Amplitude bedeutet. Der Faktor $e^{-\omega_0 z \frac{\kappa}{c}}$ beschreibt die Absorption durch das Medium mit dem Imaginärteil des Brechungsindex oder auch Absorptionskoeffizient κ . Der Faktor $e^{-i\omega_0(z \frac{n}{c} - t)}$ schließlich oszilliert mit der Frequenz ω_0 und beschreibt die Ausbreitung der Welle mit der Geschwindigkeit $\frac{c}{n}$. Das Anregungslicht tritt nun mit der Materie in Wechselwirkung, d. h. das oszillierende elektrische Feld verschiebt die negativ geladenen Elektronen relativ zu den positiv geladenen Kernen aus ihrer Ruhelage.

Im Allgemeinen, in der *linearen* Optik, sind die verwendeten Feldstärken klein genug, dass die Auslenkung aus der Ruhelage linear verläuft und die Änderung der Polarisierbarkeit klein ist. Die Polarisierbarkeit α , als Taylorreihe

$$\alpha = \sum_{i=0}^{\infty} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0^i q_v^i \quad (2.5)$$

in Abhängigkeit der Koordinate q (Auslenkung aus der Ruhelage) geschrieben, kann somit nach dem linearen Glied abgebrochen werden:

$$\alpha \approx \alpha^0 + \left(\frac{d\alpha}{dq_v} \right)_0 q_v^0 \cos(\omega_{vib} t). \quad (2.6)$$

Setzt man diese Gleichung in Formel (2.1) für das Dipolmoment ein, so erhält man, sofern man nur den relevanten Realteil berücksichtigt,

$$\vec{\mu} = E_x^0 \alpha^0 \cos(\omega_0 t) + E_x^0 \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \cos(\omega_0 t) \cos(\omega_v t) \quad (2.7)$$

$$= \underbrace{E_x^0 \alpha^0 \cos(\omega_0 t)}_{\text{Rayleigh}} + \frac{1}{2} E_x^0 \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_v^0 \left[\underbrace{\cos((\omega_0 - \omega_v)t)}_{\text{Stokes}} + \underbrace{\cos((\omega_0 + \omega_v)t)}_{\text{anti-Stokes}} \right]. \quad (2.8)$$

Dies bedeutet, dass durch die Wechselwirkung des Lichts mit Materie das Licht nicht nur gestreut wird mit derselben Frequenz ω_0 (die RAYLEIGH-Streuung), sondern auch zwei neue Frequenzen $\omega_0 \pm \omega_{vib}$ entstehen, die als anti-STOKES bzw. STOKES-Frequenz bezeichnet werden (s. auch Abbildung 2.1). Dabei ist das Intensitätsverhältnis mit den Entartungsfaktoren g_0 und g_1 durch die Boltzmann-Verteilung gegeben:

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\omega + \omega_{vib}}{\omega_0 - \omega_{vib}} \right)^4 \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{E_{vib}}{k_B T}} \quad (2.9)$$

Bei Raumtemperatur ($k_B T \approx 200 \text{ cm}^{-1}$) sind höhere vibronische Zustände als der Grundzustand kaum besetzt, weshalb die Intensitäten der STOKES-Linien i. Allg. viel größer als die der anti-STOKES Linien sind. Deshalb wird meistens die STOKES-Seite mit einem RAMAN-Spektrometer detektiert. Die Formel (2.9) kann nicht klassisch abgeleitet werden, weshalb eine quantenmechanische Betrachtung der RAMAN-Streuung notwendig ist.

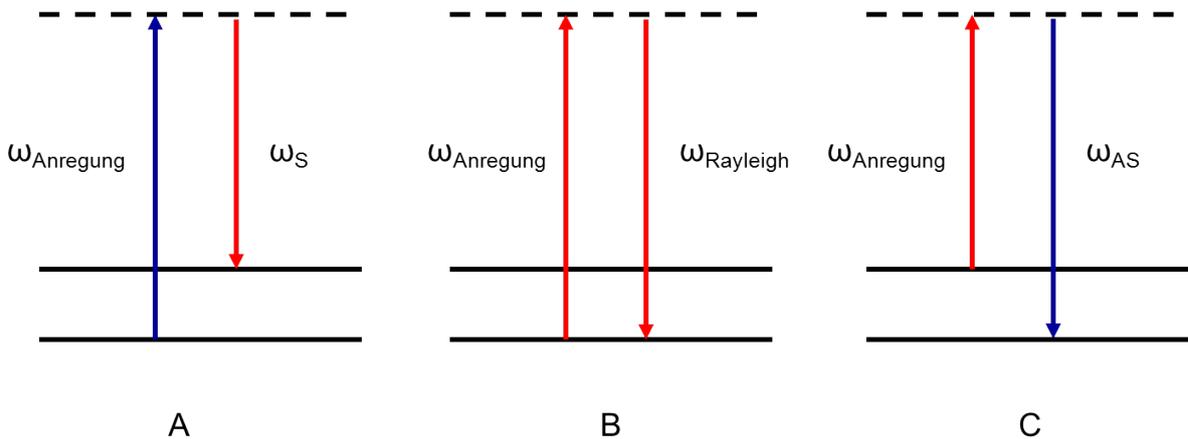


Abbildung 2.1: Streuprozesse A: Energieschema der (STOKES)- RAMAN-Streuung. Das Anregungslicht regt in ein virtuelles Niveau (gestrichelte Linie) an. Das inelastisch gestreute Licht ist energieärmer und daher rotverschoben. Die Energiedifferenz $\Omega = \omega_{\text{Anregung}} - \omega_{\text{Stokes}}$ ist als Bande im Spektrum zu sehen. B: RAYLEIGH-Streuung: Das Anregungslicht wird elastisch gestreut C: Das Anregungslicht wird superelastisch gestreut (anti-STOKES), d. h. der angeregte Zustand ist der Anfangs- und der Grundzustand der Endzustand.

Quantenmechanische Behandlung der RAMAN-Streuung

Bei der quantenmechanischen Behandlung der RAMAN-Streuung, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden soll (s. für eine ausführliche Beschreibung z. B. [32]), wird eine Störungsrechnung zweiter Ordnung durchgeführt. Anstatt der klassischen Polarisierbarkeit $\frac{\partial \alpha}{\partial q}$ wird hier das Polarisierbarkeitsmatrixelement α_{fi} betrachtet, das die Änderung der Polarisierbarkeit zwischen dem Anfangszustand $|i\rangle$ und dem Endzustand $\langle f|$ angibt. Die Intensität des in das Raumwinkelement $d\Omega$ gestreuten Lichts ist gegeben durch (siehe z. B. [17], [18] oder [32]):

$$\boxed{dI_S = C \cdot I_e \cdot \nu^4 \cdot |\vec{e}_e \alpha \vec{e}_s|^2 \cdot d\Omega} \quad (2.10)$$

Hierbei bedeuten C eine Konstante, ν ist die Frequenz des gestreuten Lichts, I_e die Intensität des Anregungslichts, und \vec{e}_e und \vec{e}_s sind die Einheits-Polarisationsvektoren des Anregungs- bzw. des gestreuten Lichts.

α ist der bereits erwähnte Polarisierbarkeitstensor, dessen Matrixelemente

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \langle f | \alpha_{\rho\sigma} | i \rangle \quad (2.11)$$

sich mit der Formel nach KRAMERS, HEISENBERG und DIRAC (KHD)

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_r \left[\frac{\langle f | \hat{\mu}_\rho | r \rangle \langle r | \hat{\mu}_\sigma | i \rangle}{\omega_{ri} - \omega_1 - i\Gamma_r} + \frac{\langle f | \hat{\mu}_\sigma | r \rangle \langle r | \hat{\mu}_\rho | i \rangle}{\omega_{rf} + \omega_1 + i\Gamma_r} \right] \quad (2.12)$$

berechnen lassen. Summiert wird hier über alle angeregten Zustände $|r\rangle$. Gleichung (2.12) ist auch interessant für die Resonanz-Raman(RR)-Streuung, da sich hier Raman-Banden selektiv verstärken lassen. Bei der RR-Spektroskopie strahlt man Licht mit der Energie ω_1 ein, die der Energiedifferenz eines elektronischen Übergangs ω_{ri} entspricht (s. Abbildung 2.2) und *nicht* einem virtuellen Niveau. Deshalb wird der Nenner des ersten Bruchs in (2.12) sehr klein; der zweite Bruch ist im Vergleich zum ersten bedeutungslos und der Ausdruck für das Matrixelement des Polarisierbarkeitstensors sehr groß. Aus der KHD-Gleichung (2.12) lassen sich noch mehr Aussagen, z. B. über Auswahlregeln, ableiten. Dies soll jedoch der Literatur vorbehalten bleiben ([18], [32]).

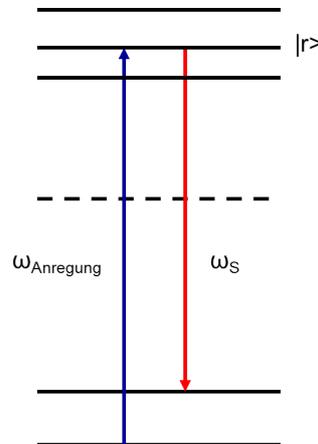


Abbildung 2.2: Schema der Resonanz-RAMAN-Streuung. Die Energie des Anregungslasers entspricht hier einem Schwingungsniveau des angeregten Zustands.

2.2.2 Zusammenfassung: Eigenschaften der RAMAN-Streuung

Folgende wichtige Eigenschaften der RAMAN-Streuung sollen hier festgehalten werden:

- Der RAMAN-Streuquerschnitt hängt sowohl linear von der Teilchenzahl als auch von der Anregungsintensität ab.
- Die RAMAN-Streuung erfolgt *spontan* und ist sowohl *inkohärent* als auch im allgemeinen *isotrop*. Die Polarisation der RAMAN-Streuung kann jedoch stark von der Symmetrie der Moleküle in der Probe abhängen.
- RAMAN-Streuung wird im allgemeinen auf der STOKES-Seite detektiert, das heißt das bezüglich der Anregungswellenlänge inelastisch gestreute, rotverschobene Licht. Leider ist auch das Fluoreszenzlicht rotverschoben, weshalb u. U. das eigentlich interessante RAMAN-Signal von der Fluoreszenz verdeckt sein kann. Dies ist der Fall, wenn die Probe das Anregungslicht absorbiert.
- Die Absorption kann allerdings auch vorteilhaft ausgenutzt werden im Falle der Resonanz-RAMAN-Streuung: Hier wird die Anregungswellenlänge gezielt so gewählt, dass im Absorptionsmaximum, d. h. in elektronischer Resonanz angeregt wird. Statt eines virtuellen Niveaus wird ein höherer elektronischer Zustand angeregt. Somit können einzelne RAMAN-Banden selektiv verstärkt werden. Da der Wirkungsquerschnitt von RR-Streuung bis zu 10^3 -mal höher im Vergleich zu nichtresonanter RAMAN-Streuung ist [18], können u. U. niedrigere Konzentrationen von Analyten detektiert werden.
- Der RAMAN-Streuquerschnitt hängt von der *vierten Potenz* der Anregungsfrequenz ω_0 ab, weshalb eine Anregung mit kurzer Wellenlänge vorteilhaft sein kann. Hier sollte dann allerdings die STOKES-Verschiebung nicht allzu groß sein, damit das RAMAN-Signal nicht von Fluoreszenz überdeckt wird.

2.3 CARS-Mikroskopie

Im Folgenden werden die wichtigsten Begriffe und Techniken, die in der CARS-Mikroskopie und in dieser Arbeit eine Rolle spielen, hergeleitet und beschrieben. Wichtig für das Verständnis dieser Arbeit ist die Herleitung der *CARS-Intensität*, der *Suszeptibilität* sowie als zentraler Begriff der *nichtresonante Hintergrund* und des daraus resultierenden *CARS-Linienprofils*. Dieses bestimmt schließlich die Sensitivität von CARS, d. h. welche Analytkonzentrationen nachgewiesen werden können. An Techniken von Bedeutung sind die *Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie*, die in Kapitel 5 wieder aufgegriffen werden wird, sowie Techniken zur Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrundes und damit Verbesserung der Sensitivität von CARS, die kurz beschrieben werden. Dies erlaubt eine Einordnung der in Kapitel 5 diskutierten Quasi-Multiplex CARS-Mikroskopie und der in Kapitel 6 vorgestellten Methode zur Verbesserung des chemischen Kontrasts eines CARS-Bildes.

2.3.1 Herleitung der CARS-Intensität

CARS ist ein Spezialfall eines Vier-Wellenmischprozesses der nichtlinearen Optik. Solche Prozesse werden beschrieben durch die Polarisation dritter Ordnung, die von den drei einfallenden Wellen erzeugt wird. Es handelt sich also um den dritten Term in der Entwicklung für die Polarisation

$$P_i = \chi_{i,j}^{(1)} E_j + \underbrace{\chi_{i,j,k}^{(2)} E_j E_k + \chi_{i,j,k,l}^{(3)} E_j E_k E_l}_{P_i^{NL}} \quad (2.13)$$

wobei über doppelt auftretende Indizes summiert wird (EINSTEINSche Summenkonvention). Der erste Term wird immer induziert, wenn ein externes elektrisches Feld mit Materie in Wechselwirkung tritt und ist z. B. bei der RAMAN-Streuung relevant. Höhere Terme, die zu einer

nichtlinearen Polarisation P_i^{NL} führen, treten nur bei hinreichend starken elektrischen Feldern auf, die z. B. von gepulsten Lasern erzeugt werden können, da die Suszeptibilität mit zunehmender Ordnung stark abnimmt. Für die Größenordnung dieser gilt etwa

$$\chi^{(1)} : \chi^{(2)} : \chi^{(3)} = 1 : 10^{-10} \frac{\text{cm}}{\text{V}} : 10^{-17} \frac{\text{cm}^2}{\text{V}^2}. \quad (2.14)$$

Gerade Ordnungen χ^{2k} , mit $k \in \mathbb{N}$, sind aufgrund von Symmetrieüberlegungen nur in Medien ohne Inversionszentrum oder an Grenzflächen von Null verschieden.

Die Herleitung der Wellengleichung ausgehend von den MAXWELL-Gleichungen in Materie

Ziel dieses Abschnitts ist es, die Intensität des CARS-Signals I_{AS} (Der Index AS steht für anti-STOKES) in Abhängigkeit der Intensitäten der beiden Anregungslaser I_P und I_S und der Antwort der Probe, der Antwortfunktion χ herzuleiten. Dafür ist eine Bestimmungsgleichung für das resultierende elektrische Feld \vec{E}_{AS} zu lösen, die sich aus der Wellengleichung ergibt. Diese lässt sich aus den Maxwellgleichungen in Materie herleiten welche die Axiome der klassischen Elektrodynamik darstellen¹[31]:

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \quad (2.15)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}, \quad (2.16)$$

$$\nabla \cdot \vec{E} = 0, \quad (2.17)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0. \quad (2.18)$$

In diesen vier Gleichungen, die zunächst im Vakuum gelten, tauchen sowohl das elektrische Feld \vec{E} als auch das magnetische \vec{H} auf. In Materie, wo Ladungen mit $\rho \neq 0$ auftreten, muss noch die Antwort vom Medium, die zu der dielektrischen Verschiebung \vec{D} führt, durch folgende zwei Gleichungen berücksichtigt werden:

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}(\vec{E}), \quad (2.19)$$

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H} + \vec{M}(\vec{H}) \approx \mu_0 \vec{H}. \quad (2.20)$$

In der zweiten Gleichung (2.20) wurde die Magnetisierung \vec{M} Null gesetzt. Dies ist in unserem Fall eine gute Näherung (Ausnahme ist das Gebiet der Metamaterialien). Die Wellengleichung lässt sich nun bestimmen, indem von Gl. (2.15) die Rotation gebildet wird:

$$-\nabla \times \nabla \times \vec{E} = \mu_0 \left(\nabla \times \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \right). \quad (2.21)$$

Dies führt mit Hilfe des GRASSMANNschen Entwicklungssatzes $\nabla \times (\nabla \times \vec{E}) = \nabla(\nabla \cdot \vec{E}) - (\nabla \cdot \nabla) \vec{E}$ und der dritten Maxwellschen Gleichung ($\nabla \cdot \vec{E} = 0$) zu

$$\boxed{\nabla^2 \vec{E} - \frac{n}{c_0^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c_0^2} \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2}} \quad (2.22)$$

Die nichtlineare Polarisation \vec{P}_{NL} ist dann als Quellterm in die Wellengleichung (2.22) einzusetzen. Um die *nichtlineare* Wellengleichung herzuleiten, nutzt man die Linearität dieser Differentialgleichung (kurz DGL) aus. Sie kann gelöst werden durch die allgemeine Lösung der homogenen DGL plus eine spezielle Lösung der inhomogenen DGL. Dies bedeutet, dass sich die Gleichung für einen Laserpuls, den man als Superposition mehrerer Frequenzen auffassen kann, lösen lässt, wenn jede einzelne Frequenz eine Lösung der DGL ist. Ein Laserpuls kann als Wellenpaket beschrieben werden und besteht aus vielen einzelnen Frequenzen. Die Lösung der Wellengleichung für ein Wellenpaket kann als Superposition der Lösungen für jede einzelne Frequenz geschrieben werden, also als eine Überlagerung von ebenen Wellen:

$$E(z, t) = \underbrace{E_0(z, t)}_{\text{Amplitude}} \underbrace{e^{i(kz - \omega t)}}_{\text{Trägerwelle}}. \quad (2.23)$$

Man beachte, dass im Gegensatz zu einer einzelnen ebenen Welle die Amplitude hier selbst eine Funktion von Ort und Zeit ist. Für die Polarisation wählt man als Ansatz entsprechend:

$$P(z, t) = \underbrace{P_0(z, t)}_{\text{Amplitude}} \underbrace{e^{i(k_P z - \omega t)}}_{\text{Trägerwelle}} \quad (2.24)$$

¹Die Maxwell-Gleichungen feierten 2011 ihr 150-jähriges Jubiläum.

Der Term für die Amplitude P_0 wird als zeitlich konstant angenommen. Bevor man mit diesen beiden Gleichungen in die Wellengleichung eingeht, lohnt es sich, die einzelnen Terme für Gleichung 2.22 gesondert zu berechnen:

$$\frac{\partial^2 E}{\partial z^2} = \left(\frac{\partial^2 E_0}{\partial z^2} + 2ik \frac{\partial E_0}{\partial z} - k^2 E \right) e^{i(kz-\omega t)} \quad (2.25)$$

$$\frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \left(\frac{\partial^2 E_0}{\partial t^2} - 2i\omega \frac{\partial E_0}{\partial t} - k^2 E \right) e^{i(kz-\omega t)} \quad (2.26)$$

$$\frac{\partial^2 P^{NL}}{\partial t^2} = \left(\frac{\partial^2 P_0^{NL}}{\partial t^2} + 2ik \frac{\partial P_0^{NL}}{\partial t} - (\omega)^2 P^{NL} \right) e^{i(kz-\omega t)}. \quad (2.27)$$

Im Folgenden werden nun zwei größere Vereinfachungen durchgeführt. Die erste beruht dabei auf einer Näherung, der sogenannten „slowly varying envelope approximation (kurz SVEA)“ (siehe Referenz [33]) und die zweite auf einer Koordinatentransformation ins Bezugssystem des Wellenpakets. Bei der SVEA wird von der Annahme Gebrauch gemacht, dass die Einhüllende sich gegenüber der Trägerwelle räumlich und zeitlich nur langsam ändert:

$$\left| \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} \right| \ll \underbrace{\left| 2 \frac{2\pi}{T} \frac{\partial E_0}{\partial t} \right|}_{2i\omega_0} \ll \underbrace{\left| \frac{4\pi^2}{T^2} \right|}_{\omega_0^2} \quad (2.28)$$

Dies gilt natürlich nur, solange die Einhüllende genügend optische Zyklen enthält, die Pulse also nicht allzu kurz sind (≥ 2 fs für sichtbares Licht. Mathematisch bedeutet dies, dass die zweiten Ableitungen der Amplituden E_0 und P_0 wegfallen. Für die Polarisation fällt, weil sie als konstant angenommen wird, auch die erste Ableitung weg. [33]). Damit vereinfachen sich die Gleichungen (2.25), (2.26) und (2.27) zu

$$\frac{\partial^2 E}{\partial z^2} \cong \left(2ik \frac{\partial E_0}{\partial z} - k^2 E_0 \right) e^{i(kz-\omega t)} \quad (2.29)$$

$$\frac{\partial^2 E}{\partial t^2} \cong \left(-2i\omega \frac{\partial E_0}{\partial t} - k^2 E \right) e^{i(kz-\omega t)} \quad (2.30)$$

$$\frac{\partial^2 P^{NL}}{\partial z^2} \cong \left(-(\omega)^2 P^{NL} \right) e^{i(kz-\omega t)} \quad (2.31)$$

Durch diese Linearisierung erhält man die vereinfachte Wellengleichung für die nichtlineare Polarisation, nachdem die Dispersionsrelation $k = \frac{n}{c_0}\omega$ ausgenutzt wurde, zu:

$$\boxed{\left(\frac{\partial}{\partial z} + \frac{n}{c} \frac{\partial}{\partial t} \right) E_0 = \frac{i}{2\varepsilon_0} \frac{\omega}{nc} P^{NL} e^{-i(k_p - k)z}} \quad (2.32)$$

Der Index „P“ beim Wellenvektor auf der rechten Seite steht dabei für Polarisation. Die Differenz der k-Vektoren $\Delta \vec{k} = \vec{k}_p - \vec{k}$ der Polarisationswelle und der Fundamentalen beschreibt die *Phasenfehlانpassung* zwischen beiden Wellen.

Die zweite Vereinfachung, um Gleichung (2.32) lösen zu können, besteht in einer Koordinatentransformation ins Bezugssystem der Wellenfronten, also $z' = z$ und $t' = t - \frac{z}{v_g}$.

Dies führt mit Hilfe der Kettenregel für partielle Ableitungen zu

$$\frac{dE(t', z')}{dz} = \frac{\partial E}{\partial z'} \underbrace{\frac{\partial z'}{\partial z}}_1 + \frac{\partial E}{\partial t'} \underbrace{\frac{\partial t'}{\partial z}}_{=-\frac{1}{v_g}} \quad (2.33)$$

und

$$\frac{dE(t', z')}{dt} = \frac{\partial E}{\partial z'} \underbrace{\frac{\partial z'}{\partial t}}_{=0} + \frac{\partial E}{\partial t'} \underbrace{\frac{\partial t'}{\partial t}}_{=1}. \quad (2.34)$$

Durch diesen Trick vereinfacht sich Gleichung 2.32, da sich die Zeitableitungen gegenseitig wegheben zu:

$$\boxed{\left(\frac{\partial}{\partial z'}\right) E_0 = \frac{i}{2\varepsilon_0} \frac{\omega}{nc} P^{NL} e^{-i(k_p - k)z'}}. \quad (2.35)$$

Für die nichtlineare Polarisation setzt man jetzt

$$P^{NL} = \varepsilon_0 \chi^{(3)} E_p^2 E_S^* \quad (2.36)$$

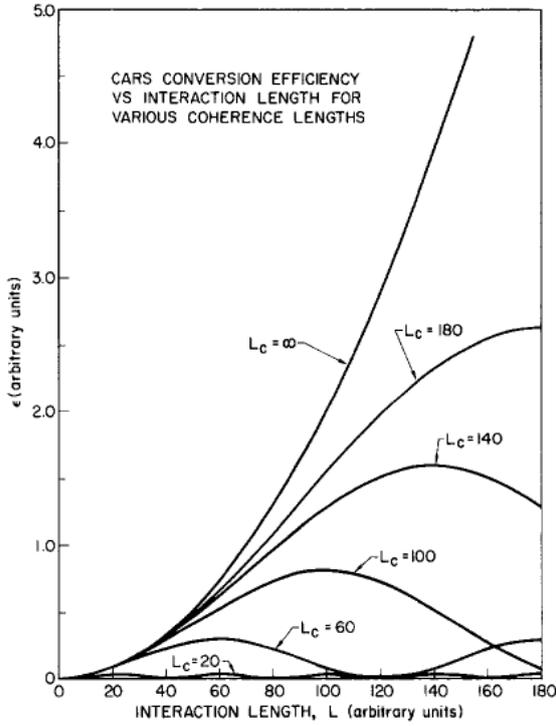
mit den konstanten Amplituden E_p und E_S^* ein, integriert von 0 bis zur gesamten Wechselwirkungslänge L und erhält so als Ergebnis für die Feldstärke des anti-STOKES-Signals

$$E_{AS} = i \frac{\omega_{AS}}{n_{AS} c} \chi^{(3)} E_p^2 E_S^* \frac{e^{i\Delta k L} - 1}{i\Delta k}. \quad (2.37)$$

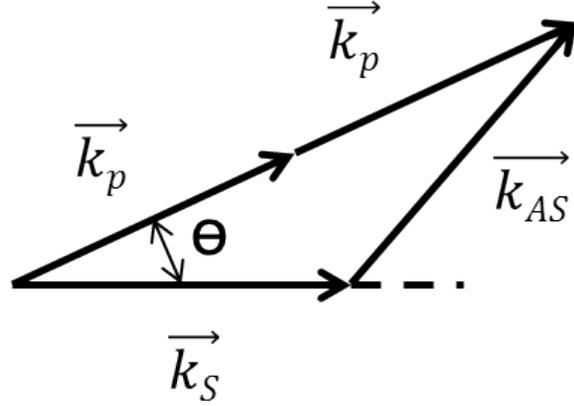
Die anti-STOKES-Intensität erhält man dann durch Bilden des Betragsquadrats:

$$\boxed{I_{AS} \propto |E_{AS}|^2 = \left(\frac{4\pi^2 \omega_{AS}}{n_{AS} c^2}\right)^2 |\chi^{(3)}|^2 \cdot I_p^2 \cdot I_S \cdot L^2 \cdot \underbrace{\frac{\sin\left(\frac{\Delta k L}{2}\right)}{\frac{\Delta k L}{2}}}_{:= \text{sinc}\left(\frac{\Delta k L}{2}\right)}} \quad (2.38)$$

Bemerkung zu Gleichung 2.38 An Gleichung (2.38) lassen sich wichtige Proportionalitäten ablesen: Zum einen hängt die Intensität des anti-STOKES-Signals *quadratisch* von der anti-STOKES-Frequenz ab. Die Wahl der Wellenlängen beeinflusst also die Stärke des CARS-Signals. Zum anderen hängt die anti-STOKES- Intensität quadratisch von der Intensität des Pump-Pulses ab; hier ist es also besonders wichtig, genügend Leistung zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus hängt die Intensität von der Phasenfehlانpassung Δk (s. auch Abbildung 2.3 auf Seite 14) sowie der Wechselwirkungslänge L ab, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen wird.



(a)



(b)

Abbildung 2.3: (a): Abhängigkeit der CARS-Konversionseffizienz von der Wechselwirkungslänge für verschiedene Kohärenzlängen. Entnommen aus [24]. Bild (b): Die Phasenanpassung verlangt für eine nicht-kollineare Anregungsgeometrie, dass die Gleichung $2\vec{k}_p - \vec{k}_S = \vec{k}_{AS}$ erfüllt ist. Diese Situation ist hier gezeigt.

Phasenanpassung bei der CARS-Mikroskopie

In der Gleichung für die CARS-Intensität (2.38) taucht ein Term $\text{sinc}(\Delta k L)$ auf. Dies bedeutet, dass das CARS-Signal eine hohe Intensität aufweist, wenn die Bedingung $\frac{\Delta k L}{2} = n\frac{\pi}{2}$; $n \in \mathbb{N}$ erfüllt ist. Bei nicht zu vernachlässigender Wechselwirkungslänge muss also $\Delta k = 0$ gelten. Diese Bedingung muss z.B. in der BOXCARS-Geometrie erfüllt sein, wenn Pump- und STOKES-Puls nicht-kollinear auf die Probe treffen.

In der Mikroskopie werden die beiden Laserstrahlen jedoch durch ein Mikroskopobjektiv sehr stark auf die Probe fokussiert. Dies hat zur Folge, dass es eine große Verteilung an möglichen Winkeln gibt, wie der Pump- und Stokes-Laserstrahl auf die Probe treffen können. Zu jedem Winkel des Pump gibt es somit einen passenden des Stokes, so dass die Bedingung $|\Delta \vec{k} = 0|$ erfüllt ist. Da es umso mehr mögliche Winkel gibt, je größer der Lichtkegel ist, hängt die Stärke des CARS-Signals von der numerischen Apertur des Objektivs (s. Abbildung 2.4) ab. Da außerdem die Wechselwirkungslänge im Fokus klein ist, gilt näherungsweise $\Delta k L \cong 0$, wodurch die Phasenanpassung relaxiert wird.

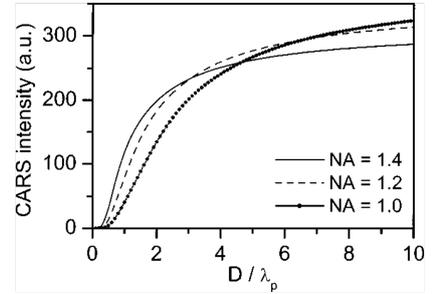


Abbildung 2.4: Abhängigkeit des CARS-Signals eines Mikroskopobjektivs vom Verhältnis des Probendurchmessers zur Wellenlänge sowie der numerischen Apertur als Parameter. Entnommen aus [34].

Die Abhängigkeit des CARS-Signals von der Polarisation von Pump und STOKES

Auch wenn in dieser Arbeit keine explizit polarisationsabhängigen Messungen durchgeführt wurden, so soll an dieser Stelle doch erwähnt werden, dass die Intensität des CARS-Signals

von der Orientierung der Feldvektoren von Pump und STOKES abhängt. Im ungünstigsten Fall (Pump und STOKES sind senkrecht zueinander polarisiert) ist die Intensität um einen Faktor 10 geringer, wie im Folgenden hergeleitet wird. Deshalb wurde bei den Messungen in dieser Arbeit stets darauf geachtet, dass Pump und STOKES parallel zueinander polarisiert sind, was durch eine $\lambda/2$ -Platte realisiert werden kann. Polarisations-CARS (P-CARS) kann auch ausgenutzt werden, um den nichtresonanten Hintergrund zu unterdrücken. Die folgenden Gleichungen sind zitiert aus [35].

In einem entarteten CARS-Schema ($\omega_{pump} = \omega_{probe}$) gibt es nur zwei unabhängige Polarisationsrichtungen $\vec{e}_1 = \vec{e}_p$ und $\vec{e}_2 = \vec{e}_s$. Deshalb gilt für die Suszeptibilität $\chi_{1122}^{(3)} = \chi_{1212}^3$. Generell gilt für ein isotropes Medium [20]

$$\chi_{1111}^{(3)} = \chi_{1122}^{(3)} + \chi_{1212}^{(3)} + \chi_{1221}^{(3)}. \quad (2.39)$$

Bildet man die Projektion des Analysators in Richtung des CARS-Polarisationsvektors, ergibt sich (s. auch Gleichung (2.13))

$$\vec{e}_A^* \cdot \vec{P}^{(3)} = \vec{e}_A^* \cdot ((\chi_{1122}^{(3)} + \chi_{1212}^{(3)})\vec{e}_1(\vec{e}_1 \cdot \vec{e}_2^*) + \chi_{1221}^{(3)}\vec{e}_2 \cdot (\vec{e}_1 \cdot \vec{e}_1))E_1^2 E_2^*. \quad (2.40)$$

Mit der Definition des Depolarisationsverhältnisses $\rho = \frac{\chi_{1221}^{(3)}}{\chi_{1111}^{(3)}}$ lässt sich Gleichung (2.41) schreiben als

$$\vec{e}_A^* \cdot \vec{P}^{(3)} = \chi_{1111}^{(3)}((1 - \rho)(\vec{e}_{AS}^* \cdot \vec{e}_1)(\vec{e}_1 \cdot \vec{e}_2^*) + \rho(\vec{e}_{AS}^* \cdot \vec{e}_2^*))E_1^2 E_2^*. \quad (2.41)$$

Man kann nun durch Symmetriebetrachtungen zeigen [36], dass $\chi_{1121}^{(3)} = \chi_{1211}^{(3)} = \chi_{1221}^{(3)}$ gilt. Dann ist $\rho = \frac{1}{3}$. Sind jetzt, im ungünstigsten Fall, Pump und STOKES senkrecht zueinander polarisiert, gilt für das Skalarprodukt $\vec{e}_1 \cdot \vec{e}_2^* = 0$ und die rechte Seite von Gleichung (2.41) wird zu

$$\frac{1}{3}(\vec{e}_{AS}^* \cdot \vec{e}_2^*)E_1^2 E_2^*. \quad (2.42)$$

Da die Intensität proportional zum Betragsquadrat ist, vermindert sich die die Intensität folglich auf 10 % der ursprünglichen Intensität. Dies gilt sowohl für den nichtresonanten als auch für den resonanten Anteil der Suszeptibilität. Dies bedeutet, dass die Polarisation der Anregungslaser auch für die konventionelle CARS-Mikroskopie von hoher Bedeutung ist. In CARS-Mikroskopie Experimenten wird der zweite Anregungslaser häufig durch Pumpen eines optischen parametrischen Oszillators oder einer Faser erzeugt, die die Polarisation drehen.

2.3.2 Forward-CARS und Epi-CARS

Wie in der RAMAN-Mikrospektroskopie, kann auch in der CARS-Mikroskopie das emittierte anti-STOKES Signal prinzipiell in Transmission (Forward-CARS, kurz „F-CARS“) oder Reflektion („Epi-CARS“) detektiert werden. Die Phasenanpassungsbedingung lautet in diesem Fall nicht $|\Delta\vec{k}|L = 0$, sondern $|\Delta\vec{k}|L \simeq 2|\Delta\vec{k}_{AS}|L = 4\pi n \frac{L}{\lambda_{AS}}$ ([37], [25], [26]). Es kommt also letztlich auf das Verhältnis $\frac{L}{\lambda_{AS}}$ der Abmessung des Objekts zur anti-STOKES-Wellenlänge an. Somit erlaubt die Detektion in Epi-Richtung eine Bildgebung mit besserem Kontrast, da das Medium (die Umgebung des Objekts, die nur zum nichtresonanten Hintergrund beiträgt) die Phasenanpassungsbedingung im Gegensatz zum Objekt erfüllt [25]. Für sehr dicke und nicht transparente Proben ist Epi-CARS die einzig anwendbare Messmethode. Für die in dieser Arbeit betrachteten Fragestellungen ist eine Epi-CARS-Detektion jedoch nicht notwendig, so dass in dieser Arbeit ausschließlich in Transmission gemessene CARS-Bilder (F-CARS) diskutiert werden.

2.3.3 Die CARS-Suszeptibilität

Diese Arbeit beschäftigt sich u. a. mit der Detektionsgrenze von Wirkstoffen, die durch ihre Konzentration, die spektrale Linienform sowie durch das Lösungsmittel bestimmt wird.

In alle späteren Berechnungen geht die Suszeptibilität mit ein. Deshalb soll im Folgenden zunächst die Suszeptibilität des $\chi^{(3)}$ -Prozesses, der die Erzeugung des CARS-Signals beschreibt, hergeleitet werden. Im Prinzip kann diese störungstheoretisch mit Hilfe des Dichtematrixformalismus (siehe Referenz [38]) berechnet werden; die folgende, intuitivere Herleitung lehnt sich eher an [23] und [22] an und geht von der Hamiltonfunktion

$$H = H_0 - \frac{1}{2}\alpha(q)E^2 \quad (2.43)$$

für einen harmonischen Oszillator aus, der durch eine äußere Kraft (nämlich das Anregungslicht, das über das Dipolmoment $\vec{\mu} = \alpha\vec{E}$ an das Feld koppelt) angetrieben wird: Hier wurde ausgenutzt, dass für das Dipolmoment die Beziehung

$$\mu = -\frac{\partial H}{\partial E'} \quad (2.44)$$

gilt. Setzt man für die Polarisierbarkeit die ersten beiden Terme der Taylorentwicklung um die Ruhelage ein (s. Gl. 2.6), wird Formel 2.43 zu

$$H = T + \frac{1}{2}m\Omega^2q^2 - \frac{1}{2}\alpha_0E^2 - \frac{1}{2}\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 qE^2. \quad (2.45)$$

Mit Hilfe des kanonischen Impulses

$$m\ddot{q} = -\frac{\partial H}{\partial q} \quad (2.46)$$

erhält man schließlich die Bewegungsgleichung

$$\ddot{q} + 2\Gamma\dot{q} + \Omega^2q = \underbrace{\frac{1}{2m}\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0}_{F_{ext.}} E^2. \quad (2.47)$$

Die Gleichung (2.47) beschreibt die Auslenkung eines gedämpften harmonischen Oszillators mit getriebener, äußerer Kraft $F_{ext.}$. Γ ist die Dämpfungskonstante der Schwingung und Ω die Eigenfrequenz. Das elektrische Feld E , welches die externe Kraft bewirkt, ist dabei gegeben durch die Superposition der Felder vom Pump- und vom STOKES-Laser, also

$$E = E_p + E_S. \quad (2.48)$$

Für die elektrischen Felder gilt jeweils $E_i = \frac{1}{2}(e^{i(\omega t - kz)} + c.c.)$ - sowohl für das elektrische Feld des Pump- als auch des STOKES-Lasers. Die entscheidende Vereinfachung besteht nun darin, dass man nur die Terme beibehält, die eine Oszillation mit der Frequenz $(\omega_p - \omega_S)$ zeigen, also konstante Terme sowie solche mit $(\omega_p + \omega_S)$, $2\omega_S$, ω_p vernachlässigt, da diese Terme zu weit von der Resonanz entfernt liegen und somit physikalisch nicht von Bedeutung sind. Man wählt nun als Ansatz für die Amplitude $q(t, z) = \frac{1}{2}(q(z)e^{i(-kz + \omega t)} + c.c.)$ und erhält dann

$$\frac{1}{2}\left(\left(q(z)(-\omega^2 + 2i\Gamma\omega + \Omega^2)e^{-i(kz - \omega t)}\right) + c.c.\right) = \frac{1}{2m}\left(\left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial q}\right)_0 E_p E_S^* e^{-i((k_p - k_S)z - (\omega_p - \omega_S)t)} + c.c.\right). \quad (2.49)$$

Ein Vergleich der Exponenten von Gleichung 2.49 liefert dann die beiden Bedingungen $\omega = \omega_p - \omega_S$ und $k = k_p - k_S$. Ein Koeffizientenvergleich von Gleichung 2.49 liefert wiederum die Amplitude $q(z)$:

$$q(z) = \frac{\left(\frac{\partial\alpha_{ij}}{\partial q}\right)_0}{m(\Omega^2 - \omega^2 + 2i\Gamma)} E_p E_S^*. \quad (2.50)$$

Einen Ausdruck für die Suszeptibilität kann man nun herleiten, indem man die nichtlineare Polarisation $P^{NL} = \varepsilon_0 \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q} \right)_0 q E_p$ betrachtet. Setzt man hier den Ausdruck für die Amplitude q aus Gl. 2.49 ein, so erhält man

$$P^{NL} = \frac{\varepsilon_0 \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q} \right)_0^2}{m(\Omega^2 - \omega^2 + 2i\Gamma\omega)} E_p^2 E_S^*. \quad (2.51)$$

Vergleicht man diesen Ausdruck mit Gl. 2.36, $P^{NL} = \varepsilon \chi^{(3)} E_p^2 E_S^*$, kann man für den resonanten Anteil der Suszeptibilität den Ausdruck

$$\boxed{\chi^{(3)R} = \frac{N}{m} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0^2 \frac{1}{D(\Omega, \omega_p - \omega_S)}} \quad (2.52)$$

ablesen mit der Abkürzung des Nenners

$$D((\Omega, \omega_p - \omega_S)) = \Omega^2 - (\omega_p - \omega_S)^2 - 2i\Gamma(\omega_p - \omega_S). \quad (2.53)$$

Der Nenner kann in der Nähe der Resonanz weiter vereinfacht werden. Dann gilt nämlich $(\omega_p - \omega_S) \simeq \Omega_v$ und der Nenner wird zu

$$D \simeq \Omega^2 - \underbrace{(\omega_p - \omega_S)(\omega_p - \omega_S)}_{\Omega} - 2i\Omega = \Omega(\Omega - (\omega_p - \omega_S) - i\Gamma). \quad (2.54)$$

2.3.4 Das CARS-Linienprofil

Im Folgenden wird das Linienprofil eines CARS-Spektrums diskutiert, welches wesentlich komplizierter sein kann als das eines Spektrums spontaner RAMAN-Streuung. Laut Gleichung (2.52) wird die Suszeptibilität für den CARS-Prozess durch ein Lorentzprofil beschrieben und ist also eine komplexe Größe:

$$\chi^{(3)} = \Re(\chi^{(3)}) + i \cdot \Im(\chi^{(3)}). \quad (2.55)$$

Plottet man das Betragsquadrat, welches für das Experiment relevant ist (gemessen wird die CARS-Intensität, siehe Gleichung (2.38)), so erhält man das in (b) gezeigte Profil. Zum Vergleich sind in Abbildung 2.5 (a) Real- und Imaginärteil der Suszeptibilität gezeigt. Der Imaginärteil der Suszeptibilität korrespondiert dabei zu der Intensität im RAMAN-Spektrum. Die Situation ändert sich signifikant, wenn ein unspezifischer, nichtresonanter Untergrund angeregt wird. Dieser Untergrund kann durch eine reelle Konstante χ_{NR} beschrieben werden. Dann wird Gleichung 2.55 modifiziert zu

$$\chi^{(3)} = \Re(\chi) + i\Im(\chi) + \chi^{NR} \quad (2.56)$$

und die CARS-Intensität ist proportional zu

$$|\chi^{(3)}|^2 = (\Re(\chi) + \chi_{NR})^2 + (\Im(\chi))^2 = (\Re(\chi))^2 + 2\Re\chi \cdot \chi_{NR} + (\chi_{NR})^2 + (\Im(\chi))^2. \quad (2.57)$$

In dieser Gleichung taucht nun der Mischterm $2\Re\chi \cdot \chi_{NR}$ auf. Dieser Term ist für die teilweise komplizierte Form von CARS-Spektren verantwortlich. Wie ein konstanter Term die CARS-Intensität beeinflusst, wird beim Vergleich der Graphen b) und c) in Abbildung 2.5 auf Seite 18 deutlich: Der Realteil ist hier deutlich von Null verschieden. Die Linienform um die RAMAN-Resonanz wird asymmetrisch und es zeigt sich ein Maximum, welches zu niedrigeren und ein Minimum, welches zu höheren Wellenzahlen als die spektrale Position der RAMAN-Bande verschoben ist. Durch eine Kurvendiskussion lässt sich die Lage der Extrema von Gl. 2.57 ermitteln. Führt man die Abkürzungen $\Delta := \Omega - \omega$ und $\chi_R := \frac{\varepsilon}{2m\Omega} \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q} \right)_0^2$ ein, so liegen die Extrema bei

$$\Delta_{max,min} = \Omega + \frac{1}{2} \left(-\frac{\chi_R}{\chi_{NR}} \pm \sqrt{\left(\frac{\chi_R}{\chi_{NR}} \right)^2 + 4\Gamma^2} \right) \quad (2.58)$$

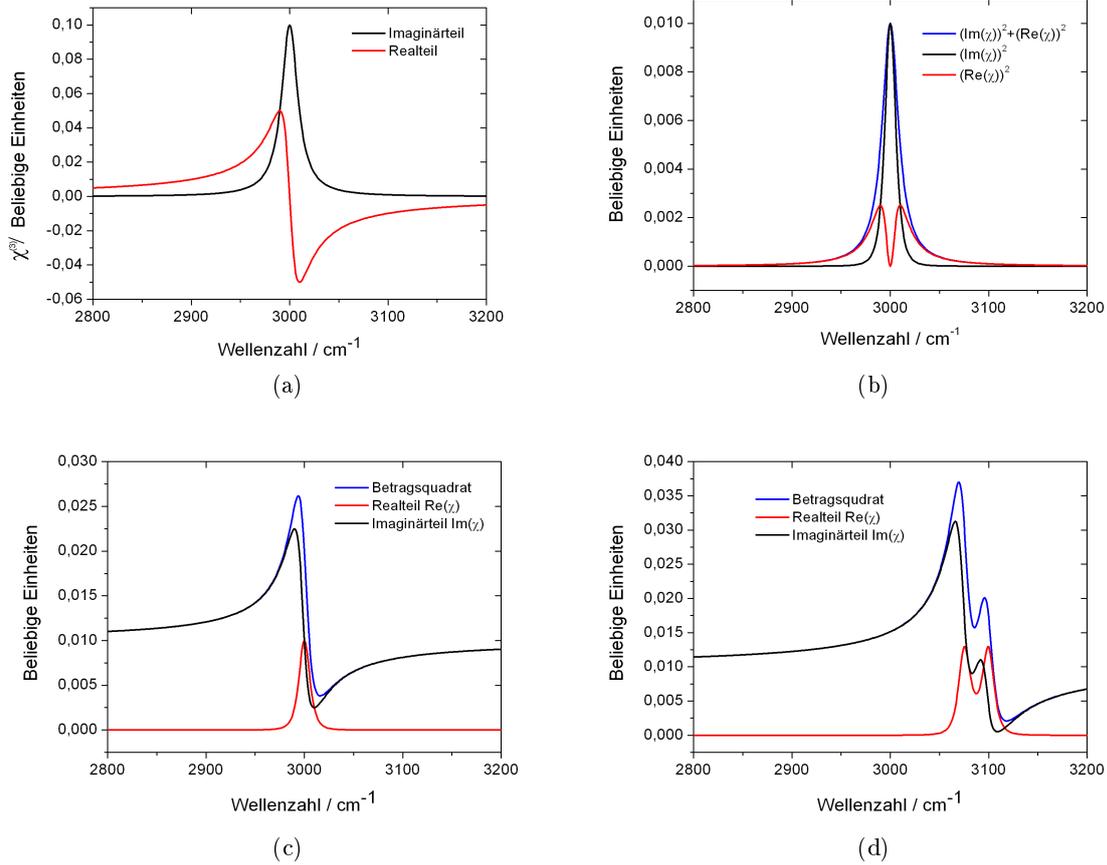


Abbildung 2.5: Verschiedene Auftragungen (vgl. auch [24]) des Real- und Imaginärteils bzw. ihrer Quadrate der $\chi^{(3)}$ -Suszeptibilität mit und ohne nichtresonanten Untergrund, die den Einfluss des nichtresonanten Untergrunds auf die CARS-Linienform zeigen sollen.

(a): Real- und Imaginärteil einer Lorentzkurve mit $\Gamma=10 \text{ cm}^{-1}$ Halbwertsbreite zentriert um eine RAMAN-Resonanz bei $\Omega=3000 \text{ cm}^{-1}$ in Abhängigkeit der Wellenzahldifferenz $\omega_p - \omega_S$. (b): Die Quadrate des Real-, des Imaginär- sowie des Betragsquadrats der Suszeptibilität. Man beachte, dass der Realteil in Resonanz verschwindet. (c): CARS-Linienprofil, das den Einfluss des nichtresonanten Hintergrunds zeigt. Hier wurde $\chi_{NR}=0,01$ gesetzt. (d): CARS-Linienprofil mit demselben nichtresonanten Hintergrund und zwei benachbarten RAMAN-Banden bei 2975 und 3000 cm^{-1} .

Der Abstand des Maximums vom Minimum ist dann gegeben durch

$$\omega_{max} - \omega_{min} = -\sqrt{\left[\frac{\chi_R}{\chi_{NR}}\right] + 4\Gamma^2}. \quad (2.59)$$

und hängt offensichtlich vom Verhältnis der resonanten zur nichtresonanten Antwortfunktion ab.

Die Linienform wird noch komplizierter, wenn RAMAN-Banden im Spektrum eng benachbart liegen (s. Abbildung 2.5(d) auf Seite 18). Experimentell kann durch diese Effekte ein CARS-Spektrum sehr verschieden vom RAMAN-Spektrum sein. Zwei Extrembeispiele eines CARS-Spektrums sind in Abbildung 2.6 auf Seite 19 gegenübergestellt.

Links ist die typische Linienform eines CARS-Spektrums zu sehen am Beispiel von atmosphärischem Stickstoff. Völlig konträr dagegen das CARS-Spektrum von β -Ionon. Hier scheinen sich alle Banden gerade so zu überlagern, dass das CARS-Spektrum wie das RAMAN-Spektrum aussieht. Die Linienform eines CARS-Spektrums kann also völlig unterschiedlich sein und hängt von vielen Parametern ab. Die Gesamt-Suszeptibilität einer Probe kann im Wesentlichen durch

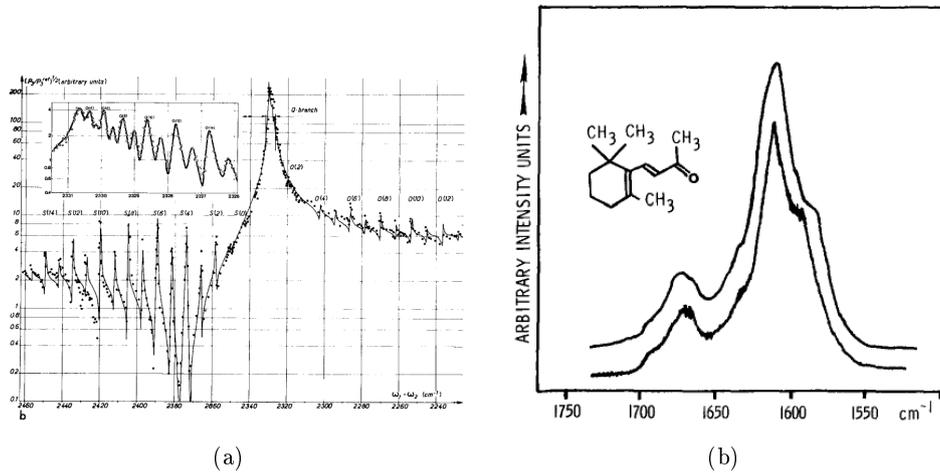


Abbildung 2.6: Zwei Extrembeispiele von CARS-Spektren aus der Literatur, die mit schmalbandigen Anregungslasern aufgenommen wurden. (a): CARS-Spektrum von atmosphärischem Stickstoff. Entnommen aus [39] mit freundlicher Genehmigung des American Institute of Aeronautics and Astronautics. (b): RAMAN-Spektrum und CARS-Spektrum (obere Kurve) von β -ionon. Bemerkenswerterweise sehen RAMAN- und CARS-Spektrum ziemlich ähnlich aus. Die Abbildung ist entnommen aus [12].

$$\chi_{CARS}^{(3)} = \chi_R^{(3)}(\omega) + \chi_{TP}(\omega) + \chi_{NR} = \frac{A_R}{(\omega_{pump} - \omega_{Stokes}) - \Omega - i\Gamma} + \frac{A_{TP}}{\Omega_{TP} - 2\omega_p - i\Gamma} + const \quad (2.60)$$

beschrieben werden. Es handelt sich hier um den resonanten Beitrag, den nichtresonanten Beitrag sowie Beiträge von Zwei-Photonenresonanz χ_{TP} , einem Spezialfall der Vier-Wellenmischung. Die drei Terme in dieser Gleichung stammen von drei verschiedenen Kombinationen eines Vier-Wellen-Mischprozesses und sind in Abbildung 2.7 auf Seite 20 graphisch dargestellt.

Der Mischterm $2\Re\chi \cdot \chi_{NR}$ ist auch dafür verantwortlich, dass die Konzentrationsabhängigkeit des CARS-Signals je nach spezifischer experimenteller Situation entweder linear oder quadratisch verläuft, wie im Folgenden gezeigt wird.

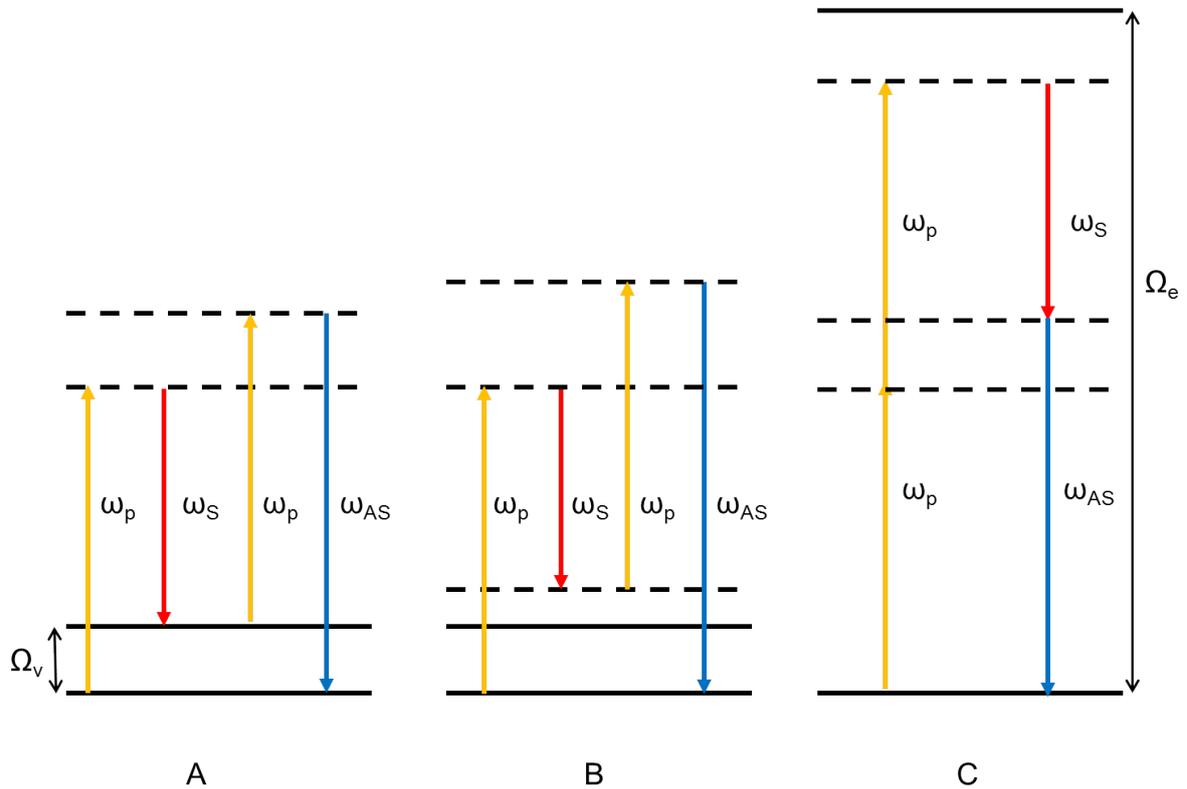


Abbildung 2.7: Die drei wichtigsten Termschemata für Vier-Wellenmischung in der nichtlinearen Mikroskopie. A) CARS, hier wird eine RAMAN-aktive Schwingung der Kreisfrequenz Ω_v resonant angetrieben; B) Nicht-RAMAN-resonantes Vier-Wellenmischen; die Differenzfrequenz von Pump und STOKES ist leicht von der Resonanz verstimmt. C) Zwei-Photonen-Resonanz. $\hbar\Omega_e$ ist die Energie, die notwendig ist, um einen elektronischen Zustand anzuregen. Es ist $\hbar\Omega_e \gg \hbar\Omega_v$.

Lösungen

Die folgenden Überlegungen zur Herleitung der Konzentrationsabhängigkeit des anti-STOKES-Signals in Lösungen stammen aus [40]. Das anti-STOKES-Signal einer Lösung setzt sich zusammen aus der Antwortfunktion der Lösung χ_{LM} und derjenigen des gelösten Stoffs χ_A , wodurch sich für das Betragsquadrat der Gesamt-Suszeptibilität ergibt:

$$|\chi_{Gesamt}|^2 = |N_{LM}\chi_{LM} + N_A\chi_A|^2. \quad (2.61)$$

$N_{LM,A}$ bezeichnet die Teilchenanzahl und $\chi_{LM,A}$ die Suszeptibilität pro Molekül des Lösungsmittels bzw. des gelösten Stoffs. Da die Suszeptibilitäten komplexe Zahlen $\chi = \Re(\chi) + i\Im(\chi)$ sind, ergibt sich ausgeschrieben

$$|\chi_{Gesamt}|^2 = (N_{LM}\Re(\chi_{LM}) + N_A\Re(\chi_A))^2 + (N_{LM}\Im(\chi_{LM}) + N_A\Im(\chi_A))^2. \quad (2.62)$$

Falls die Differenzfrequenz ($\omega_p - \omega_S$) sich in der Nähe einer RAMAN-Resonanz des Lösungsmittels befindet, andererseits aber sowohl weit entfernt von RAMAN-Resonanzen und elektronischen Resonanzen des Lösungsmittels ist, kann die Gesamt-Suszeptibilität geschrieben werden als

$$|\chi_{Gesamt}|^2 = N_{LM}^2 |\chi_{LM}|^2 \left| 1 + \frac{N_{LM}}{N_A} \frac{\frac{\Im\chi_A}{\chi_{LM}}}{\frac{\Delta\omega}{\Gamma} + i} \right|^2, \quad (2.63)$$

da die Suszeptibilität des Lösungsmittels als rein reell und die des gelösten Stoffs als rein imaginär angenommen wird. Zusätzlich wird die Variable $\Im\chi_A$ als $\frac{\chi_A}{\frac{\Delta\omega}{\Gamma} + i}$ geschrieben, wobei $\Delta\omega = \Omega_{vib} - (\omega_p - \omega_S)$ ist. Nun können für zwei Grenzfälle Aussagen getroffen werden. Entweder ist die Konzentration des gelösten Stoffs sehr groß, so dass

$$N_A \gg N_{LM} \frac{\chi_{LM}}{\Im(\chi_A)} \quad (2.64)$$

gilt. Dies bedeutet, dass der Ausdruck in (2.63) für $\Delta\omega = 0$ maximal wird. Die anti-STOKES-Frequenz ist proportional zum Quadrat der Konzentration N_A^2 . Für kleinere Konzentrationen, wenn also die Bedingung (2.64) nicht gilt, ist das maximale anti-STOKES-Signal an der Stelle

$$\Delta\omega = \Gamma \left(-\frac{b}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{b^2 + 4} \right) \quad (2.65)$$

mit der Abkürzung $b = \frac{N_A}{N_{LM}} \frac{\chi_{LM}}{\chi_A}$, wie man durch Nullsetzen der Ableitung findet. Bemerkenswert an Gl. 2.65 ist die Konzentrationsabhängigkeit des Maximums, ohne dass eine Wechselwirkung des gelösten Stoffs mit dem Lösungsmittel in die Rechnung eingegangen ist. Für kleine Konzentrationen N_A , für die $N_A^2 \ll N_A$ gilt, ergibt sich mit $\Delta\omega \cong 0$ aus Gleichung 2.63

$$|\chi_{Gesamt}|^2 = N_{LM}^2 |\chi_{LM}|^2 + N_{LM} N_A \chi_{LM} \Im(\chi_A). \quad (2.66)$$

In diesem Grenzfall hängt die Intensität des anti-STOKES-Signals also linear von der Konzentration des gelösten Stoffes ab. Die minimal detektierbare Konzentration hängt vom Verhältnis $\frac{\chi_{LM}}{\chi_A}$ ab und ist offensichtlich um so kleiner, je kleiner der nichtresonante Response vom Lösungsmittel ist.

Es sei darauf hingewiesen, dass diese Überlegungen aus einer Zeit stammen, als CARS-Spektroskopie mit Nanosekunden-Pulsen durchgeführt wurde, die spektral sehr schmalbandig sind ($\leq 1\text{cm}^{-1}$). Die CARS-Mikroskopie-Experimente wurden hingegen mit spektral deutlich breiteren Pikosekundenpulsen durchgeführt, die somit einen größeren nichtresonanten Hintergrund anregen. Die Annahme, dass der Imaginärteil der Suszeptibilität des Lösungsmittels exakt gleich Null ist, ist somit u. U. nicht gerechtfertigt.

2.3.5 Multiplex-CARS

Wenn die Wellenlängen von Pump und STOKES auf eine RAMAN-Resonanz abgestimmt werden, erfolgt die Anregung schmalbandig, d.h. mit etwa $10\text{--}30\text{ cm}^{-1}$ spektral breiten Anregungspulsen wird nur eine RAMAN-Bande angeregt und abgefragt (s. Schema in Abbildung 2.8 auf Seite 22). Im Gegensatz zur RAMAN-Mikrospektroskopie also, wo jedes Pixel eines Bildes die volle spektrale Information enthält, wird bei dieser „single-frequency“-CARS-Mikroskopie zunächst nur die Wellenzahldifferenz, auf die die beiden Anregungslaser abgestimmt sind, zur Bildgebung verwendet. Um andere Wellenzahlbereiche abzufragen, z. B. um ein nichtresonantes Bild aufzunehmen, muss ein Laser, z.B. der Pump-Puls, durchgestimmt werden. Eine andere Möglichkeit, chemische Information über einen breiteren Spektralbereich zu gewinnen, ist Multiplex (M-CARS): Bei dieser Technik werden mehrere RAMAN-Banden gleichzeitig durch einen spektral breitbandigen Stokes-Puls angeregt. Mit einem Spektrometer wird dann ein CARS-Spektrum über den gesamten Spektralbereich wie bei der RAMAN-Mikrospektroskopie aufgenommen. Die Schwierigkeit bei M-CARS besteht darin, dass aus dem CARS-Spektrum die RAMAN-Information erst noch extrahiert werden muss, da - wie oben gezeigt - in CARS-Spektren Interferenzen auftreten. Tragen mehrere molekulare Spezies (Index k) mit ihren eigenen RAMAN-Banden, im Folgenden mit j indiziert, zu einem CARS-Spektrum bei, berechnet sich die CARS-Intensität zu

$$I_{CARS} \propto \left| \sum_k N_k \chi_k^{(3)} \right|^2 = \left| \sum_k N_k \left(\chi_{NR,k}^{(3)} + \underbrace{\sum_j \frac{a_j}{\Delta_j - i\Gamma_j}}_{\chi_{R,k}^{(3)}} \right) \right|^2. \quad (2.67)$$

([41]). Die RAMAN-Information, die im Imaginärteil der Suszeptibilität enthalten ist, muss erst noch mit Hilfe eines Algorithmus aus den Rohdaten extrahiert werden [42]. Ein Multiplex-CARS-Spektrum kann sehr kompliziert und vom RAMAN-Spektrum verschieden sein. Ein Multiplex-CARS-Spektrum einer in Wasser gelösten Mischung aus AMP, ADP und ATP (Konzentration insgesamt 500 mmol/L) ist in Abbildung 2.8 (b) zusammen mit dem daraus berechneten RAMAN-Spektrum abgebildet.

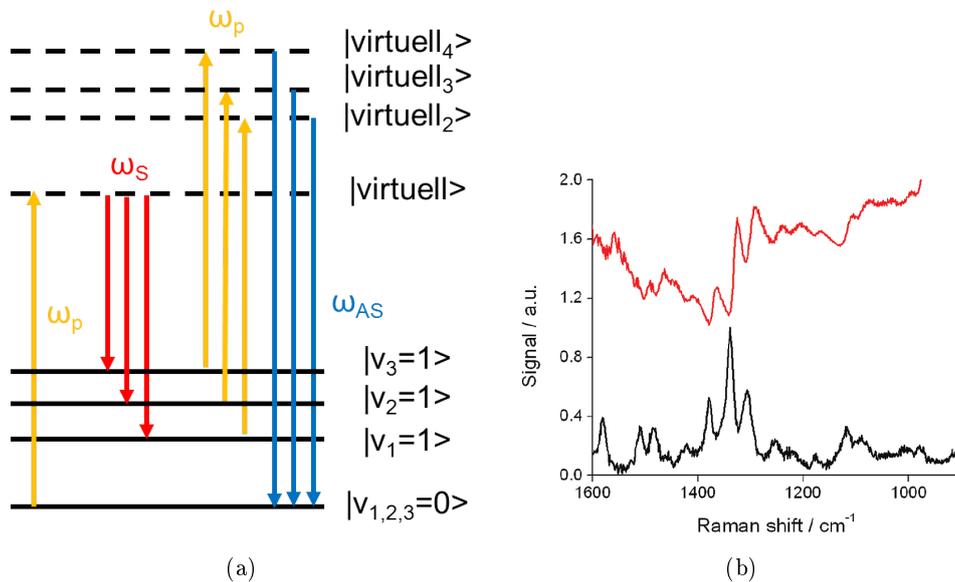


Abbildung 2.8: (a): Multiplex-Termschema. (b): M-CARS-Spektrum (rot) und das daraus extrahierte RAMAN-Spektrum einer AMP/ADP/ATP-Mischung (Gesamtkonzentration: 500 mM in Wasser). Die Abbildung ist mit freundlicher Genehmigung entnommen aus [42] (©2006 American Chemical Society).

Eine interessante Anwendung in der Biophysik von M-CARS ist in Referenz [16] zu finden. Hier wird gezeigt, dass es mit Hilfe der M-CARS Mikroskopie möglich ist, zwischen geordneten und ungeordneten (die zwei verschiedenen Phasen darstellen) Lipidvesikeln zu unterscheiden.

In Kapitel 5 wird „Quasi-Multiplex-CARS“ vorgestellt werden, was einen Kompromiss zwischen spektraler Information und Geschwindigkeit darstellt.

Methoden zur Unterdrückung des nichtresonanten Untergrundes

Um den Untergrund von CARS zu unterdrücken, sind einige experimentelle Schemata entwickelt worden. Dies sind im Folgenden:

- P-CARS. Hierbei wird ausgenutzt, dass das resonante CARS-Signal unter einem anderen Winkel des Analysators detektiert werden kann als das nichtresonante Signal.
- Heterodyne Detektion mittels Interferometer. Die Sensitivität der CARS-Mikroskopie kann über einen *heterodyn*en Ansatz gesteigert werden (siehe z. B. [43]). Hierbei wird das anti-Stokes-Signal mit einem „lokalen Oszillator“ zur Interferenz gebracht. Hierdurch erhält man in der CARS-Intensität einen Mischterm, der von der Phase zwischen den beiden abhängt. Durch eine geeignete Wahl dieser Phase kann der nichtresonante Hintergrund unterdrückt werden.
- Pulsformungs-Techniken. Diese Techniken verwenden meist einen Impulsformer, um die Phase und/oder Polarisation derart zu modulieren, dass die Beiträge des nichtresonanten Hintergrunds miteinander destruktiv interferieren (s. z. B. [44]).
- Zeitlicher Versatz zwischen Anregung und Abfrage im CARS-Prozess. Hier wird ausgenutzt, dass aufgrund der schnelleren Bewegung der Elektronen die nichtresonante Anregung viel schneller abklingt als die resonante Anregung der Kernbewegung. Führt man eine zeitliche Verzögerung zwischen dem Anregungs- und dem Abfrageprozess ein, bleibt nur noch das resonante Signal zur Detektion übrig.

Es soll an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich betont werden, dass in dieser Arbeit zwar versucht wurde, die Sensitivität bzw. den chemischen Kontrast der CARS-Mikroskopie zu verbessern, aber explizit kein Schema zur Hintergrundunterdrückung entwickelt bzw. angewandt wurde.

2.3.6 Zusammenfassung: Eigenschaften der CARS-Mikroskopie

Auch für die kohärente anti-STOKES RAMAN-Streuung sollen kurz die wichtigsten Punkte festgehalten werden:

- Das CARS-Signal ist gerichtet und kohärent. Die Signalintensität ist im Prinzip um den Faktor $\eta \simeq 10^3 - 10^6$ [22] als im Falle der RAMAN-Streuung höher. Dies ist aber strenggenommen nur für schmalbandige Nanosekundenpulse gültig.
- Der chemische Kontrast eines CARS-Bildes hängt vom Verhältnis der Suszeptibilitäten $\frac{\chi_R^{(3)}}{\chi_{NR}^{(3)}}$ ab. Für optimalen Kontrast sind ps-Pulse am besten geeignet.
- Da im Falle von CARS zuerst die Amplituden aufsummiert werden und dann das Betragsquadrat gebildet (im Gegensatz zur RAMAN-Streuung) wird, ist die Intensität des CARS-Signals quadratisch von der Teilchenkonzentration abhängig. Dies erschwert den Nachweis niedriger Konzentrationen.
- Durch die starke Fokussierung des Mikroskopobjektivs ist die Phasen Anpassung relaxiert. Pump und STOKES können also in kollinearere Geometrie verwendet werden.
- Als Multiphotonentechnik (drei Photonen werden im Fokus benötigt) ist CARS-Mikroskopie intrinsisch konfokal. Dies bedeutet eine hohe Ortsauflösung auch in vertikaler (z-)Richtung.
- Durch Deuterierung lassen sich Substanzen spektroskopisch aufgrund der isolierten Lage der CD-RAMAN-Banden im Spektrum gut von z. B. Zellbestandteilen unterscheiden.

2.4 Die Sensitivität der RAMAN-Spektroskopie und CARS-Mikroskopie

Es stellt sich die Frage, ob man die Sensitivität von CARS-Mikroskopie herleiten kann, wenn diese für RAMAN-Mikroskopie bekannt ist. In der RAMAN-Spektroskopie lassen sich typischerweise, je nach Substanz und experimentellen Gegebenheiten (Laserwellenlänge, Leistung, Detektor, etc.), Konzentrationen im μM bis mM - Bereich nachweisen, bei Verwendung anderer Techniken, wie Resonanz-RAMAN- oder oberflächenverstärkter RAMAN-Streuung sogar noch niedrigere Konzentrationen. Obwohl CARS ein verwandter Prozess ist, lässt sich diese Frage nicht ohne Weiteres befriedigend beantworten, da für die Nachweisgrenze das Verhältnis $\frac{\chi_{res}}{\chi_{NR}}$ entscheidend ist, welches aber stark von der Laserwellenlänge und vor allem von der Pulsdauer ([45], s. auch Abbildung 2.9) abhängt.

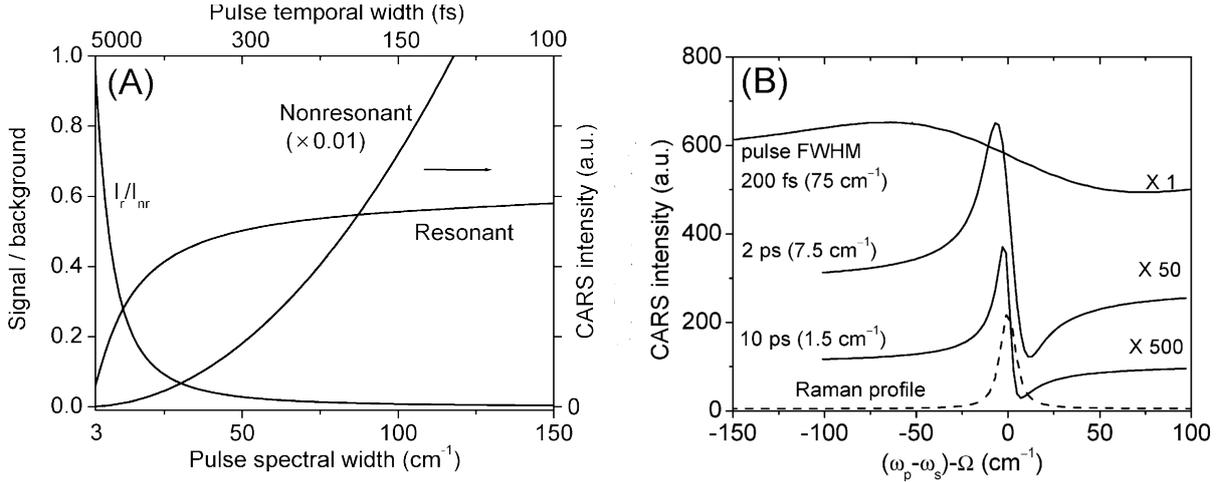


Abbildung 2.9: Die Grafik ist aus [45] entnommen. Gezeigt ist in Abbildung (A) das theoretisch berechnete Intensitätsverhältnis $\frac{I_R}{I_{NR}}$, welches ein Maß für den chemischen Kontrast ist, in Abhängigkeit der spektralen Breite der Anregung. Abbildung (B) zeigt das CARS-Linienprofil, welches mit Femtosekundenanregung kaum zu erkennen ist, aber mit Verwendung von spektral schmalbandigen ps-Pulsen deutlich aufgelöst werden kann.

Es ist somit fraglich, wie fair ein solcher Vergleich überhaupt ausfallen wird. In der Literatur findet sich im Buch von *Akhmanov* ([22]), ein Standardwerk in der russischsprachigen Literatur, welches leider bis heute nicht ins Englische übersetzt worden ist, eine solche Abschätzung. Eine ähnliche Abschätzung findet sich in [24]. Im Unterkapitel über die CARS-Intensität wurde bereits ein Ausdruck für die CARS-Intensität hergeleitet. *Akhmanov* schreibt diese Gleichung für die CARS-Spitzen-Leistung für fokussierte Gaußstrahlen auf:

$$P_{CARS} = \left(LN \frac{d\sigma}{d\Omega} \right)^2 \frac{2^6 \pi^2 c^4}{\omega_c^6 \hbar^2 \Gamma^2 n^4} \text{sinc}^2 \left(\frac{\Delta k L}{2} \right) \frac{P_1 P_2 P_3}{\omega^4}, \quad (2.68)$$

wobei Ω der Raumwinkel ist, mit dem das gestreute Licht detektiert wird, P_0 die Leistung des Anregungslichts und $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ der differentielle RAMAN-Streuquerschnitt ist. Weiterhin bedeuten als weitere relevante Größen L die Wechselwirkungslänge, N die Teilchenzahl und ω den Strahldurchmesser im Fokus. P_1 , P_2 und P_3 bezeichnen die Leistung des Pump- bzw. STOKES- und Probe-Lasers. Näherungsweise wurde angenommen, dass die Kreisfrequenz ω_c des Anregungslichtes für die RAMAN-Streuung der Kreisfrequenz des emittierten anti-STOKES-Lichts entspricht: $\omega_c \simeq \omega_a$. Die Gleichung 2.68 lässt sich nun in Beziehung zu der Formel

$$P_{Raman} = LN \frac{d\sigma}{d\Omega} P_0 \Omega \quad (2.69)$$

für die Leistung des gestreuten RAMAN-Lichtes setzen.

Bildet man zum Vergleich schließlich das Verhältnis zwischen der RAMAN- und CARS-Intensität,

$$\eta = \frac{p_{CARS}}{p_{Raman}} = \left(LN \frac{d\sigma}{d\Omega} \right) \frac{2^6 \pi^2 c^4}{\omega_c^6 \hbar^2 \Gamma^2 n^4} \text{sinc}^2 \left(\frac{\Delta k L}{2} \right) \frac{P_1 P_2}{\omega^4} \frac{1}{\Omega} \quad (2.70)$$

so lässt sich die Leistung des CARS-Signals gegenüber derjenigen des RAMAN-Signals abschätzen.

Akhmanov kommt schließlich zu dem Ergebnis, dass für ausgeprägte RAMAN-Banden (also ein zu vernachlässigender nichtresonanter Hintergrund) die abgestrahlte CARS-Leistung für Stoffe in kondensierter Phase um den Faktor 10^3 - 10^6 -mal höher ist als die Leistung der RAMAN-Intensität bei gleicher Peakleistung.

Es soll an dieser Stelle aber darauf hingewiesen werden, dass die Formel (2.70) durch die Annahme von monochromatischem Licht (also Dauerstrich- oder ns-Laserpulsen entsprechend) abgeleitet wurde. Entsprechend ist der nichtresonante Hintergrund, der zwangsläufig bei der Verwendung von ps- oder fs-Pulsen mit angeregt wird, nicht berücksichtigt. Diese Abschätzungen können also nur eine theoretische, untere Schranke für die zu erwartende Sensitivität mit Piko- oder Femtosekundenpulsen sein.

Stimulierte RAMAN-Streuung

Es gibt noch eine andere nichtlineare Variante der RAMAN-Streuung, *Stimulierte RAMAN-Streuung*, kurz SRS, welche in junger Vergangenheit im Kontext von RAMAN-basierter Bildgebung verstärkt diskutiert wird. Ausführlich soll hierauf jedoch nicht eingegangen werden. Dies würde den Rahmen dieses Grundlagenkapitels sprengen. Für detaillierte Informationen sei auf die Referenzen [28], [46] und [47] verwiesen. Erwähnenswert ist SRS, da im Gegensatz zu CARS-Mikroskopie SRS den Vorteil bietet, dass kein nichtresonanter Hintergrund angeregt wird. Die detektierte Intensität hängt deshalb - im Unterschied zu CARS - *linear* mit der Konzentration des Analyten ab. Anstatt eine Molekülschwingung kohärent mit der Differenzfrequenz Ω wie bei CARS anzutreiben, wird die Besetzungszahl eines RAMAN-Übergangs mit dem Energieunterschied $\hbar\Omega$ geändert, der durch zwei Frequenzen, den RAMAN-Pump-Puls und den RAMAN-Probe, eingestellt wird. Deshalb - aufgrund der Energieerhaltung - tritt im Anregungsstrahl (Pump) ein Energieverlust mit der Intensitätsdifferenz ΔI_I auf (Photonen werden „vernichtet“)- (auch als „RAMAN-loss“ bezeichnet), wohingegen im Probe-Strahl entsprechend Photonen erzeugt werden und eine Intensitätserhöhung ΔI_g detektiert wird. Üblicherweise ([48]) wird ein breitbandiger Stokes- und ein schmalbandiger Pump- Puls verwendet, wodurch man nach Referenzierung auf ein Spektrum, das nur mit dem Pump-Puls aufgenommen wird, ein komplettes RAMAN-Spektrum erhält. Die Detektion ist allerdings aufwendiger als im Falle der CARS-Mikroskopie, da ein schwaches Differenzsignal mit Lock-In-Detektion registriert werden muss.

Kapitel 3

CARS-Mikroskopie an C-deuterierten Wirkstoffen und Modellsystemen

3.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Wie im vorangegangenen Kapitel 2 dargelegt wurde, eignen sich die RAMAN- und CARS-Mikroskopie aufgrund ihrer chemischen Spezifität zur selektiven Bildgebung von charakteristischen, über ihre Schwingungsfrequenzen identifizierbaren funktionellen Gruppen, und somit z. B. zur Visualisierung der Lipid-, Protein-, und DNA-Verteilung. Da jeder Stoff seinen ihm eigenen, charakteristischen, „molekularen Fingerabdruck“ besitzt (s. auch [1])¹, können verschiedene Stoffe voneinander unterschieden werden, solange die nachzuweisenden Stoffe in ausreichender Konzentration vorliegen und das experimentelle Detektionssystem eine Aufnahme der relevanten Photonen in vertretbarer Zeit zulässt.

In der CARS-Mikroskopie sind aufgrund ihrer hohen RAMAN-Streuquerschnitte (und hohen lokalen Konzentrationen in biologischen Proben) vor allem die RAMAN-Banden von β -Carotin (z. B. die RAMAN-Bande der C=C-Streckschwingung bei 1520 cm^{-1}) und der Bereich der CH-Streckschwingung interessant ($2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, s. auch [18]). Interessiert man sich nun für den Nachweis von Stoffen, die selbst im CH-Bereich starke RAMAN-Banden aufweisen, so wird es bei niedrigen Konzentrationen schwierig, diese RAMAN-Banden von denen z. B. des Lösungsmittels zu unterscheiden. Andererseits existieren im RAMAN-Spektrum zwischen ca. $1700\text{ und }2800\text{ cm}^{-1}$ in den meisten Fällen keine nennenswerten spektralen Beiträge (eine Ausnahme bildet hier z. B. die CN-Valenzschwingung bei ca. 2200 cm^{-1}). Es bietet sich daher an, diesen spektralen Bereich zu nutzen. Dies kann erreicht werden, indem man ausnutzt, dass die Schwingungsfrequenzen ν über

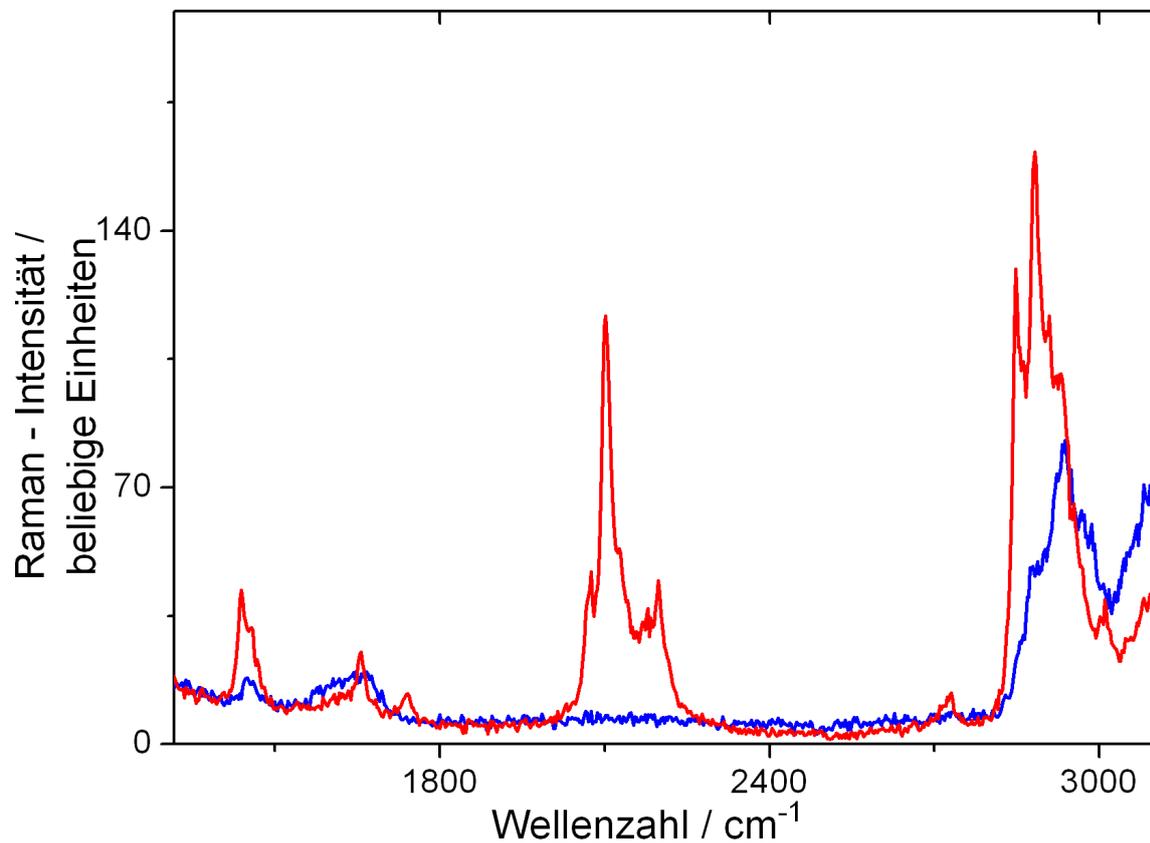
$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.1)$$

von der (reduzierten) Molekülmasse μ abhängen (s. [18]). Die Formel 3.1 lässt sich aus der Bewegungsgleichung für den harmonischen Oszillator herleiten.

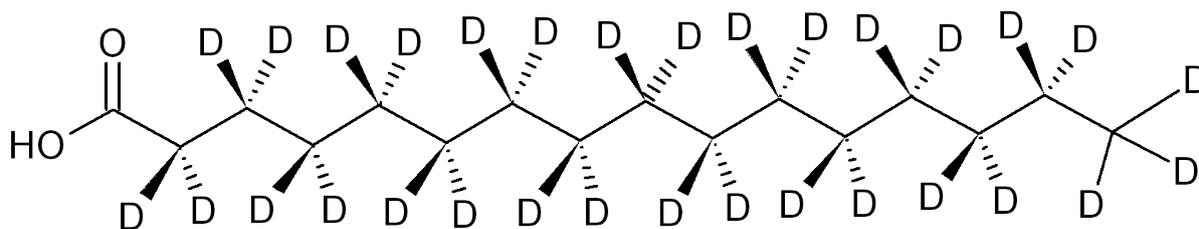
Deutert man beispielsweise alle CH-Bindungen von Palmitinsäure, so erhöht sich die reduzierte Masse der Oszillatoren und die Lage der RAMAN-Banden verschiebt sich von $2800\text{ bis }3100\text{ cm}^{-1}$ zu niedrigeren Wellenzahlen im Bereich $2100\text{ bis }2300\text{ cm}^{-1}$ (s. Abbildung 3.1 auf Seite 27). Somit lassen sich in der RAMAN- und CARS-Mikroskopie zelluläre Komponenten, die ja in diesem Bereich keine spektralen Beiträge besitzen, von den deuterierten Komponenten mittels der CD-Streckschwingung unterscheiden.

Beispielhaft sind hier zwei RAMAN-Spektren von zwei verschiedenen Punkten innerhalb einer Zelle gezeigt (s. Abbildung 3.1 auf Seite 27). Die Komponenten, die mit deuterierter Palmitinsäure inkubiert wurden, lassen sich aufgrund der CD-Streckschwingung bei ca. 2100 cm^{-1} gut von den spektralen Beiträgen der Zellbestandteile unterscheiden (s. auch Abschnitt 3.2).

¹Im Folgenden wird deshalb auch vom „Fingerprint“-Bereich gesprochen, womit der Wellenzahlbereich von $500\text{ - }1700\text{ cm}^{-1}$ gemeint ist.



(a)



(b)

Abbildung 3.1: (a): RAMAN-Spektren von Lipideinschlüssen mit perdeuterierter Palmitinsäure (rot) und vom Zellkörper (blau). (b): Strukturformel von deuterierter Palmitinsäure. Es sind besonders viele (31) CD-Oszillatoren pro Molekül vorhanden.

Im Gegensatz zu deuterierten OH-Bindungen bleiben diese stabil, die Wasserstoffatome der CH-Bindungen tauschen also nicht gegen die Deuteriumatome der CD-Bindung aus. Im Folgenden werden nur CD-Bindungen betrachtet, man spricht auch von *C-deuterierten* Substanzen. In der RAMAN-Mikroskopie wurde dieses Konzept bereits erfolgreich angewandt, um z. B. die Aufnahme von deuterierten Liposomen in Zellen zeitlich aufgelöst zu verfolgen [7]. Auch lassen sich mit Hilfe der CARS-Mikroskopie die Aufnahme von Nanopartikeln oder die Verteilung von deuterierten Lipiden in Zellen visualisieren.

In dieser Arbeit werden u. a. Wirkstoffe untersucht, die von zwei Teilprojektpartnern innerhalb des Sonderforschungsbereichs SFB 630 an der Universität Würzburg synthetisiert wurden. Dabei handelt es sich zum einen um Derivate der Etacrynsäure [49], eine Substanz, deren Wirksamkeit im Zusammenhang mit Viren und Parasiten nachgewiesen worden ist [49]. Die Etacrynsäure ist von MARKUS SCHILLER vom Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie (Prof. T. SCHIRMEISTER) aus dem Teilprojekt (TP) A4 des SFB 630 synthetisiert worden.

Zum anderen wurde ein dem Naphthylisochinolin (s. [50]) – ein Wirkstoff, der in der Malariaforschung eine bedeutende Rolle spielt – ähnlicher Stoff, nämlich, kurz *d*₅-NIQ charakterisiert. Dieser Wirkstoff wurde von CHRISTIAN ALBERT aus der Gruppe von Prof. BRINGMANN aus

dem TP A2 des SFB 630 hergestellt.² Es handelt sich hier um zwei verschiedene Klassen von Stoffen: Die Etacrinsäure ist ein Wirkstoff, der die CD - Bindungen eher an den Seitenketten (also „alkyl-artig“) aufweist, wohingegen bei d_5 -NIQ die CD-Bindungen an den Benzolringen („arylartig“) zu finden sind (s. u.).

Ein Anliegen dieses Kapitels ist es, sowohl Konzentrationen dieser C-deutერიerten Wirkstoffe anzugeben, die sich noch zuverlässig und reproduzierbar mit RAMAN- und CARS-Mikroskopie nachweisen lassen, als auch die dafür notwendigen experimentellen Bedingungen. Dies dient als Vorbereitung für den folgenden Schritt der Verbesserung der Detektionsgrenze.

Da CARS anders als die RAMAN- Streuung einen mit dem resonanten Signal interferierenden nichtresonanten Untergrund aufweist (s. Kapitel 2), reicht es nicht, nur das resonante Signal vom Analyten alleine im Mikroskop zu detektieren. Zumindest ein zweites, unter nicht-resonanten Bedingungen aufgenommenes CARS-Bild ist zum Vergleich erforderlich, zumal das spektrale Maximum des CARS-Signals durch Interferenz der beiden Beiträge verschoben sein kann (s. auch Abschnitt 2.3.4). Noch besser ist es daher, das nichtresonante Bild gleichzeitig zusammen mit dem resonanten Signal aufzunehmen. Dies kann z. B. durch die Verwendung eines zweiten STOKES-Lasers realisiert werden ([51]). In dieser Arbeit wird das nichtresonante Signal quasi-gleichzeitig mit dem resonanten Signal aufgenommen. Ein CARS-Bild enthält räumlich getrennt beide Informationen. Diese einfache quantitative Analyse - im Gegensatz zu anderen quantitativen Methoden, die die Phase extrahieren (s. [27]) erlaubt eine Normierung auf den nichtresonanten Hintergrund (in [27] auch Intensitätskalibration genannt) und ist somit unabhängig von Laserfluktuationen und Detektorrauschen.

3.2 Die Aufnahme von C-deutერიierter Fettsäure in Makrophagen

Zur Demonstration des Konzepts der Isotopenmarkierung durch Deuterium wurden in dieser Arbeit CARS-Experimente mit deutერიierter Fettsäure in Makrophagen durchgeführt. Makrophagen sind eine spezielle Form von weissen Blutkörperchen, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Fettstoffwechsels spielen, da sie Fette verdauen. Ein besseres Verständnis der Fettregulation könnte einen wichtigen Beitrag in der Arterioskleroserecherche liefern. Die Ergebnisse dieses Abschnitts wurden teilweise in [5] veröffentlicht.

3.2.1 Material und Methoden

Der experimentelle Aufbau für CARS-Experimente

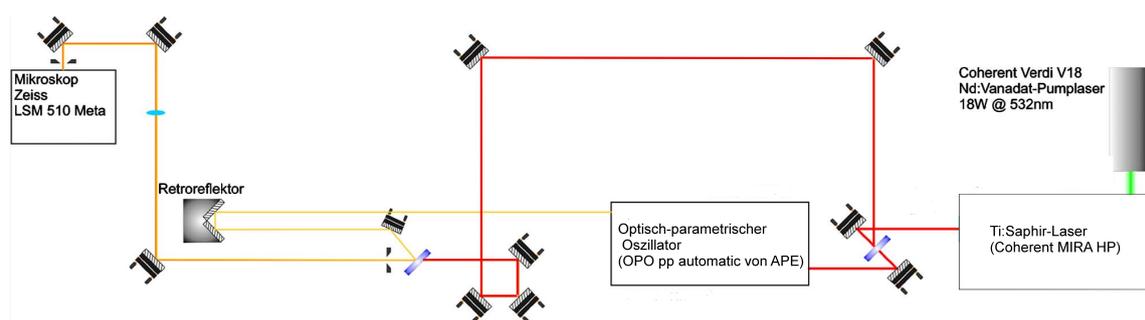


Abbildung 3.2: Der experimentelle Aufbau für konventionelle single-frequency CARS-Mikroskopie am IPHT, mit einem OPO als STOKES-Laser, wie er für die Messungen von den Makrophagen und quantitative Messungen von Naphthalin und NIQ verwendet wurde. Mit Hilfe einer Verzögerungsstrecke werden die Pulse zeitlich und mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels räumlich überlagert. Anschließend werden die Laserstrahlen ins Mikroskop eingekoppelt.

²Auf das d_5 - NIQ wurde zurückgegriffen, da es Probleme mit dem ursprünglichen d- NIQ gab, wo eine CD-Bande im RAMAN-Spektrum aufgrund starker Fluoreszenz nicht nachzuweisen war.

Der experimentelle Aufbau für *konventionelle* CARS-Mikroskopie³ ist in Abbildung 3.2 auf Seite 28 dargestellt. Er weist eine hohe Flexibilität auf, da auf RAMAN-Banden von etwa 1500-3500 cm^{-1} sowohl im sichtbaren (500-830 nm) als auch infraroten (830-1600 nm) Wellenlängenbereich abgestimmt werden kann. Dies kann sowohl mit schmalbandigen ps-Pulsen als auch breiten fs-Pulsen erfolgen.

Nach der Justage der Laser bzw. OPOs müssen die Strahlen überlagert werden. Dies geschieht durch einen dichroischen Spiegel, welcher den Pump-Strahl reflektiert und den STOKES transmittiert. Nach dem Justieren beider Strahlen durch zwei Irisblenden sind diese dann räumlich überlagert und werden nach Fokussierung durch eine langbrennweitige Linse in ein kommerzielles Fluoreszenz-Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 META von ZEISS) durch einen externen Eingang eingekoppelt. Die zeitliche Überlagerung („Time zero“) wurde zuvor durch eine manuelle Verzögerungsstrecke für den Pump-Strahl sichergestellt, z. B. durch die Erzeugung der zweiten Harmonischen von Pump und STOKES (SHG) sowie ihrer Kreuzkorrelation in einem BBO-Kristall. Nach der Einkopplung gelangen nun die beiden Laserstrahlen durch Optiken im Mikroskop (Strahlteiler, Filter etc.) und ein Mikroskopobjektiv auf die Probe. Dabei gehen bis zu 50 Prozent (je nach Objektiv und Wellenlänge) der vor dem Mikroskop vorhandenen Leistung verloren (s. hierzu auch [52]). In der Probe wird nun das CARS-Signal erzeugt. Nach Trennung der Anregungslaser durch geeignete Kurzpassfilter wird das um mehrere Größenordnungen schwächere anti-STOKES-Signal in Transmission (F-CARS, s. Kapitel 2) auf einen Photomultiplier mit einem Kollimator abgebildet. Die CARS-Bilder werden nun durch eine scan-Einheit, die die Laser über die Probe abrastert, als Falschfarbenbilder aufgenommen. Die übliche Darstellung ist ein Graustufenbild (Farbtiefe 8 oder 12 bit).

Probenpräparation

Die Präparation der Zellen wurde von der Arbeitsgruppe LORKOWSKI am Institut für Ernährungswissenschaften durchgeführt. Details der Probenpräparation finden sich in der Referenz [5]. Die Zellen wurden auf CaF_2 -Objektträger aufgewachsen, also *in vitro*, und mit einer 400 μM Lösung mit serum-komplexierter deuterierter Palmitinsäure inkubiert. Danach war genug Fettsäure in kleinen Lipidvesikeln angesammelt, um die Palmitinsäure mit RAMAN- und CARS-Mikroskopie nachweisen zu können.

RAMAN-Mapping-Experimente

In Ergänzung und als Vorbereitung für die CARS-Experimente wurden Raman-Mapping-Experimente von Dr. CHRISTIAN MATTHÄUS durchgeführt. Genaue Einzelheiten zu dem verwendeten RAMAN-Spektrometer von WITEC und zur Bildauswertung finden sich in Referenz [5]. Als Anregungswellenlänge wurde die 488 nm- Linie eines Ar^+ -Ionen-Lasers verwendet. Die Leistung auf der Probe betrug etwa 30 mW und jedes Spektrum wurde innerhalb von 250 ms aufgenommen.

Bildauswertung

Mit Hilfe eines „Spectral unmixing“-Algorithmus wurde das in Abbildung 3.3 C gezeigte Bild erhalten. Dieser Algorithmus⁴ zerlegt für jedes Pixel das RAMAN-Spektrum in mehrere Einzelspektren (die möglichst unähnlich untereinander sind und somit eine Basis bilden, um ein RAMAN-Spektrum als Linearkombinationen aus diesen Einzelspektren darzustellen), („Endmember“), dessen Anzahl vorher vorgegeben wird und bestimmt einen Gewichtungsfaktor für jedes Einzelspektrum, der angibt, zu welchem Anteil das Einzelspektrum zum Gesamtspektrum beiträgt. Stellt man diese Gewichtungsfaktoren grafisch dar, erhält man das Falschfarbenbild in Abbildung 3.3.

³Mit konventioneller CARS-Mikroskopie ist CARS-Mikroskopie ohne Techniken zur Hintergrundunterdrückung wie z. B. Pulsformung gemeint.

⁴Als Algorithmus wurde VCA (vertex component analysis) verwendet.

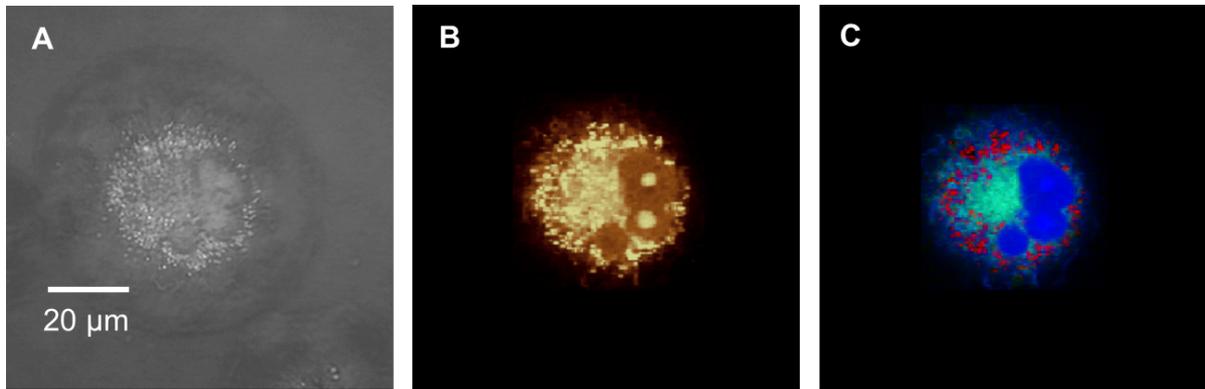


Abbildung 3.3: Eine Makrophage nach 30 Minuten Inkubationszeit, hier mit deuterierter Oleinsäure. A: Hellfeldbild. B: Verteilung der CH-Intensitäten. C: RAMAN-Bild nach Klassifizierung durch den VCA-Algorithmus. Die Bereiche in rot sind den CD-Intensitäten (also der Fettsäure) zuzuordnen, diejenigen in grün (Cytoplasma) und blau (Proteine, hier sind die drei Zellkerne sichtbar) den Zellbestandteilen. Die Abbildung wurde von DR. C. MATTHÄUS zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Ergebnisse

RAMAN-Bilder

Die Lipidvesikel sind zwar auch im Hellfeldbild in der Abbildung 3.3 A zu sehen, aber erst das RAMAN-Bild in Abbildung C offenbart die chemische Zusammensetzung und beweist, dass es sich um Einschlüsse der deuterierten Palmitinsäure handelt. In Abbildung B sind die über die CH-Streckschwingungsregion integrierte Intensitäten dargestellt, die auch in den Lipideinschlüssen vorhanden sind.

Die RAMAN-Bilder in Abbildung 3.3 B und C zeigen die Verteilung von deuterierter Palmitinsäure mit hoher Ortsauflösung (ca. 500 nm) und spektraler, d. h. chemischer Information. Die Aufnahme von 10.000 Spektren ist jedoch mit 250 ms Aufnahmezeit pro Pixel (und damit pro Spektrum) vergleichsweise lang. Um die relevante chemische Information im Wellenzahlbereich um 2100 cm^{-1} zu erhalten, bietet sich deshalb die CARS-Mikroskopie an.

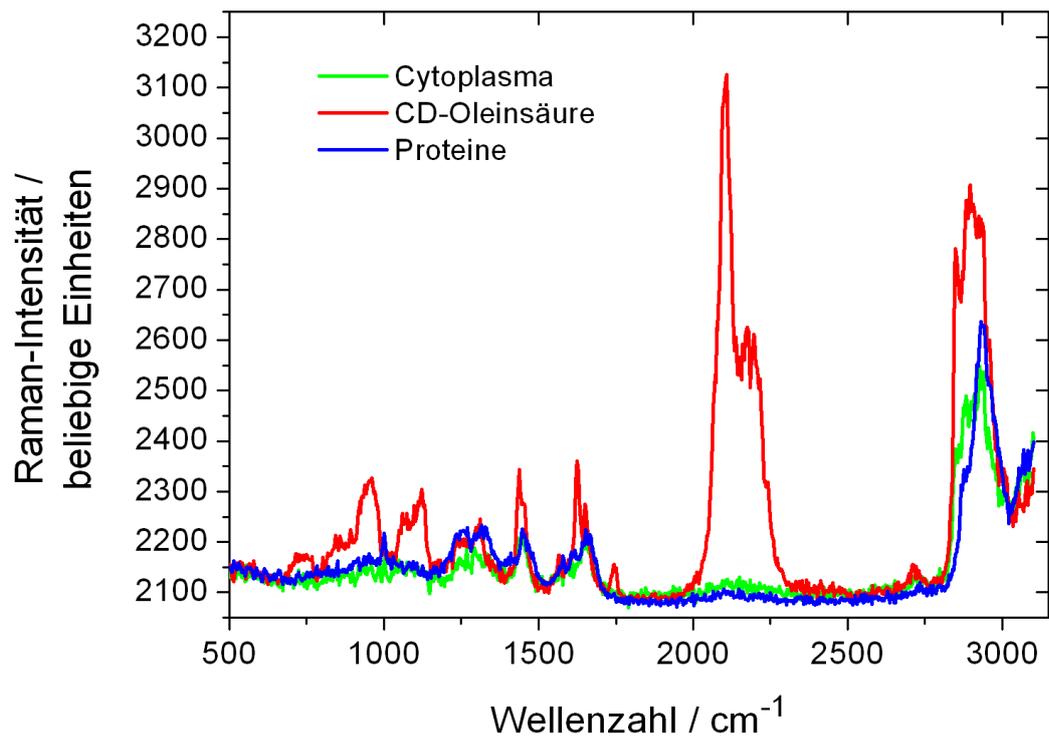


Abbildung 3.4: RAMAN-Spektren von Zellbestandteilen ohne (grün und blau) bzw. mit deuterierter Palmitinsäure (rot). Diese Spektren beziehen sich auf das RAMAN-Bild in Abbildung 3.3 B. Die Abbildung wurde von DR. C. MATTHÄUS zur Verfügung gestellt.

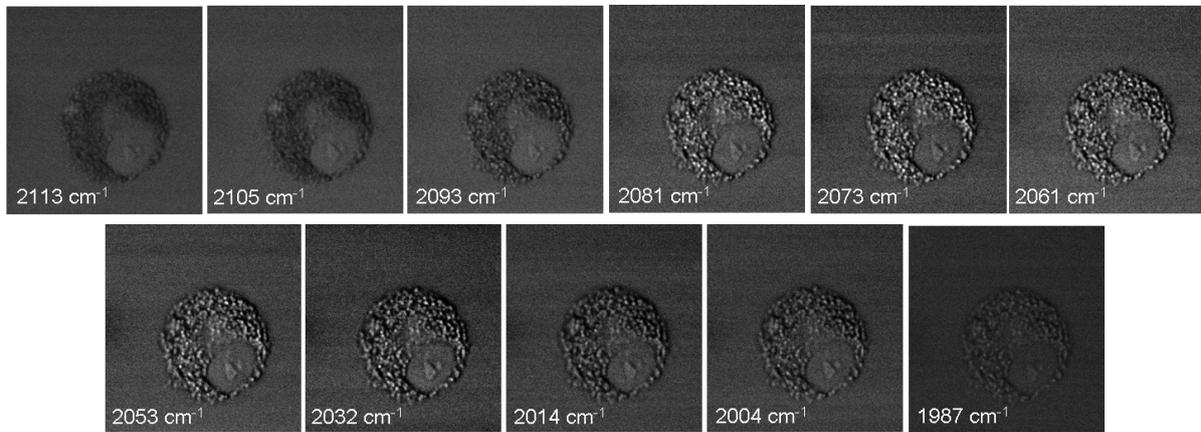


Abbildung 3.5: Wellenzahlabhängige F-CARS-Messungen (in Transmission) von Makrophagen, die mit deuterierter Palmitinsäure inkubiert wurden. Wie man sieht, tritt der maximale chemische Kontrast bei 2061 cm^{-1} auf. Dies ist - wie bei CARS-Messungen nicht ungewöhnlich (s. Kapitel 2) - etwa 40 cm^{-1} blauverschoben relativ zu der RAMAN-Bande der CD - Streckschwingung bei 2104 cm^{-1} (s. RAMAN-Spektrum in Abbildung 3.1 auf Seite 27). Vgl. [5].

CARS-Bilder

Die chemische Information, die mit den RAMAN-Mikrospektroskopie-Experimenten erhalten wurde, lässt sich auch mit der CARS-Mikroskopie mit dem Vorteil der höheren Bildaufnahmegeschwindigkeit (ein Bild mit 512×512 Pixeln ist in ca. 1 Sekunde aufgenommen) und der höheren Auflösung (in axialer Richtung) gewinnen. Allerdings ist - aufgrund der Justage und Filter - der Wellenlängenbereich, welcher abgefragt werden kann, auf wenige Nanometer beschränkt. Im Folgenden wurde für die Aufnahme der CARS-Bilder der in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Aufbau (s. Abbildung 3.2 auf Seite 28) für Single-frequency-CARS (eine RAMAN-Bande wird abgefragt) verwendet. Als STOKES-Puls wurde hierbei der MIRA bei der festen Wellenlänge $\lambda_S = 833,4\text{ nm}$ verwendet. Um nun chemischen Kontrast zu visualisieren, wurde der Pump-Puls zwischen 709 und 715,5 nm durchgestimmt, d.h. relative Wellenzahlen zwischen 2113 und 1987 cm^{-1} wurden abgefragt. Diese wellenlängenabhängige Messung ist in Abbildung 3.5 auf Seite 32 zu sehen. Deutlich zu erkennen ist ein erhöhter Schwingungskontrast zwischen 2060 und 2080 cm^{-1} . Dies ist spektral etwa $30\text{-}40\text{ cm}^{-1}$ blauverschoben relativ zu der spektralen Lage im RAMAN-Spektrum, was aber durch die Form der CARS-Dispersion erklärt werden kann (s. Abschnitt 2.3.4). Für jede spektrale Position (also zur Aufnahme eines in Abbildung 3.5 auf Seite 32 dargestellten CARS-Bildes) wurden 16 einzelne Bilder gemittelt.

Die CARS-Bilder von mit deuterierter Fettsäure inkubierten Makrophagen zeigen, dass hier die Sensitivität ausreicht, um chemischen Kontrast zu erzeugen. Dies wird insbesondere deutlich, wenn man die Bilder betrachtet, die unter nichtresonanten Bedingungen aufgenommen worden sind (s. z. B. die CARS-Bilder in Abbildung 3.5 auf Seite 32, die bei 2113 oder 1987 cm^{-1} aufgenommen wurden). Somit stellt die CARS-Mikroskopie ein Werkzeug dar, deuterierte Stoffe in Zellen zu visualisieren. Allerdings liegt die Fettsäure, die eine ausgeprägte Bande im RAMAN-Spektrum besitzt, durch die Ansammlung in den Tröpfchen in hoher Konzentration vor. Der nächste Abschnitt geht der Frage nach, welche Konzentrationen von deuterierten Substanzen mit der hier vorgestellten „konventionellen“ CARS-Mikroskopie detektiert werden können.

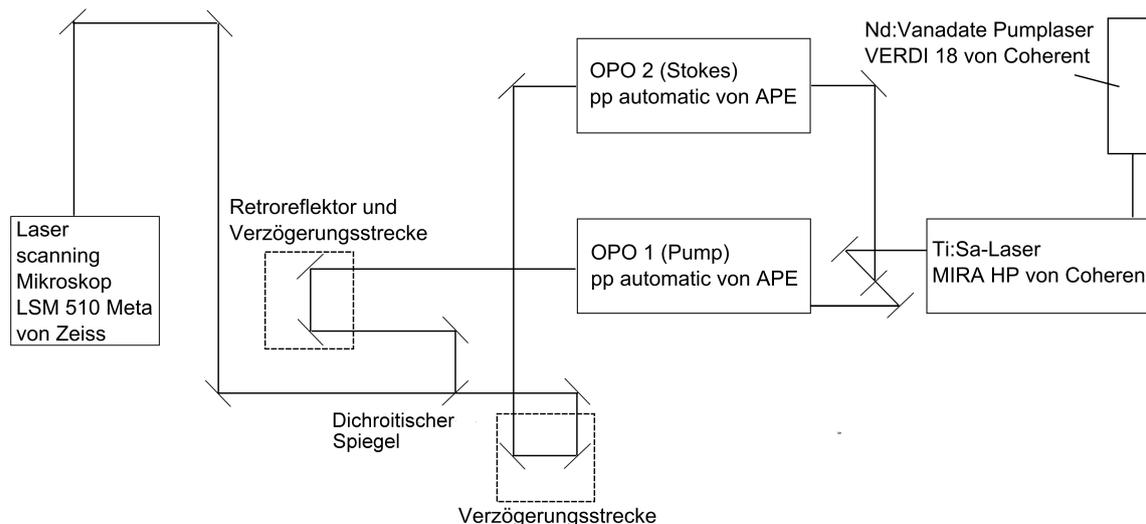


Abbildung 3.6: Experimenteller Aufbau mit zwei optischen parametrischen Oszillatoren, wie er für die quantitativen Messungen der binären Toluol/perdeuteriertes Toluol-Mischung verwendet wurde. Hier wird ein zweiter OPO vom Ti:Sa-Laser gepumpt, um die zweite Anregungswellenlänge, den STOKES, bereitzustellen. Wie beim Aufbau mit nur einem OPO (s. Abbildung 3.2 auf Seite 28) werden Pump und STOKES nach Durchlaufen einer Verzögerungsstrecke rekombiniert und in das Laser Scanning Mikroskop eingekoppelt.

3.3 Quantitative RAMAN- und CARS-Mikroskopie

Die bisherigen Messungen waren eher qualitativ. Im Folgenden soll es um quantitative CARS-Messungen gehen, d. h. es geht darum zu bestimmen, welche Konzentrationen an deuterierten Stoffen notwendig sind, um im Bild sichtbaren chemischen Kontrast zu erzeugen.

3.3.1 Material und Methoden

Die CARS-Experimente wurden mit einem dem bereits weiter oben eingeführten ähnlichen Aufbau durchgeführt. Da zu diesem Zeitpunkt der Messungen der oben beschriebene, im Vergleich einfachere Aufbau noch nicht in Betrieb war, wurden zwei OPOs eingesetzt, die vom MIRA gepumpt wurden. Die Justageprozedur unterscheidet sich nicht vom oben gezeigten Aufbau.

In dieser Arbeit wurde zur gleichzeitigen Aufnahme des relevanten CARS-Signals und des nicht-RAMAN-resonanten Hintergrundes als Probe ein Mikrofluidik-Chip gewählt, der im IPHT hergestellt wurde. Der Chip weist zwei parallele Kanäle im Abstand von ca. $200 \mu\text{m}$ auf. Dieser Abstand ist kleiner als die Abmessungen des Messfeldes von einem Mikroskopobjektiv (beim verwendeten 20x-Objektiv beträgt das Messfeld ca. $600 \times 600 \mu\text{m}$) sind. Der zu messende, deuterierte Analyt wird in einen Kanal gefüllt, der nichtdeuterierte, der nur nichtresonantes Signal liefert, dient als Referenz und befindet sich im parallelen, zweiten Kanal. Auf die genaue Auswertung der CARS-Bilder mit Hilfe dieser Messmethode wird in Abschnitt 3.3.1 eingegangen. Von dieser Vorgehensweise - der simultanen Messung des resonanten CARS-Signals vom deuterierten Analyten zusammen mit dem undeuterierten als Referenzsubstanz - wird auch in Kapitel 5 und 6 Gebrauch gemacht werden, da es hiermit möglich ist, das CARS-Signal unabhängig von der Laserleistung und Detektorcharakteristiken zu messen. Im Gegensatz zu diesem Kapitel wird in Kap. 5 jedoch auf RAMAN-Banden des undeuterierten Analyten abgestimmt und der deuterierte Analyt dient als interne Normierung.

In diesem Kapitel nun werden zunächst Modellsysteme für die Wirkstoffe untersucht, um eine erste Einschätzung für die Sensitivität zu erhalten und die Messmethode zu etablieren. Als Mo-

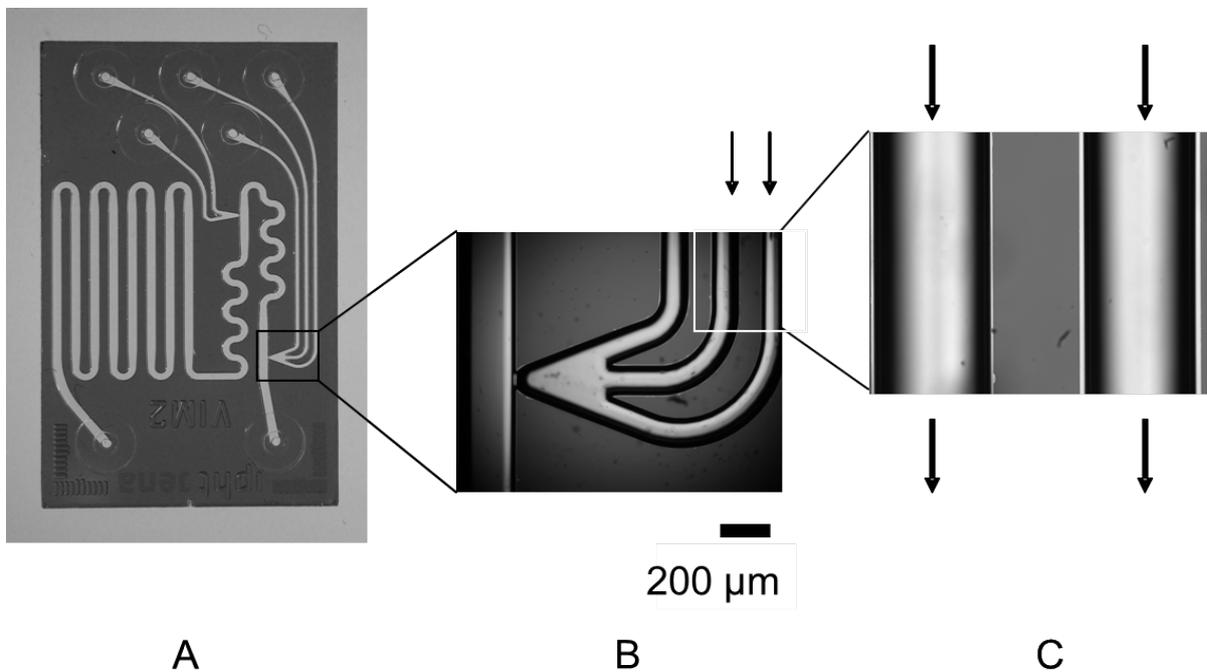


Abbildung 3.7: Bild des Mikrofluidikchips. A) Ganzer Chip. B) Ausschnitt des Kreuzungspunktes der Kanäle C) Ausschnitt für CARS-Mikroskopie. Da sich in diesem Chip die Kanäle in einem Kreuzungspunkt treffen, war ein Spritzenpumpensystem notwendig, dass die Analyten mit einem konstanten Druck durch die Kanäle pumpt, um einen Rückfluss der Analyten und somit eine Vermischung in den einzelnen Kanälen zu verhindern.

dellssysteme dienen Toluol, ein organisches Lösungsmittel mit starken RAMAN-Banden sowohl von der aromatischen als auch der aliphatischen CH- bzw. CD-Streckschwingung und außerdem Naphthalin, dass in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst wurde. Die Sensitivität für beide Modellsysteme wurde sowohl mit RAMAN- als auch mit CARS-Mikroskopie untersucht und die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.3.2 zusammengefasst. Der zweite Teil dieses Kapitels stellt dann quantitative Untersuchungen an den Wirkstoffen vor. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind teilweise in [53] und [54] veröffentlicht worden.

Quantitative Bestimmung des Bildkontrasts und Bildauswertung

Die Wahl der Bildmetrik

Zur Festlegung der Detektionsgrenze ist zunächst eine Definition von Kontrast notwendig. In den CARS-Bildern werden zwei Intensitätsbereiche I_1 und I_2 miteinander verglichen. Der Kontrast

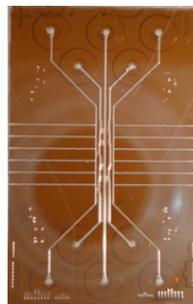


Abbildung 3.8: Mikrofluidikchip, wie er im späteren Verlauf der Doktorarbeit zum Einsatz kam. Im Gegensatz zu dem Chip in Abbildung 3.7 besitzt er vollständig getrennte Kanäle. Somit ist kein Spritzenpumpensystem notwendig, das für einen konstanten Fluss sorgen muss.

lässt sich durch das Verhältnis dieser Intensitäten definieren, wobei es hier mehrere Möglichkeiten gibt:

- Es wird im einfachsten Falle der Quotient aus zwei Intensitäten gebildet: $r_1 = \frac{I_1}{I_2}$, mit dem Fehler $\Delta r_1 = \sqrt{\left(\frac{1}{I_2}\right)^2(\Delta I_1)^2 + \left(\frac{I_1}{I_2^2}\right)^2(\Delta I_2)^2}$.
- Der Quotient $r_2 = \frac{I_1 - I_2}{I_2} = \frac{I_1}{I_2} - 1$ normiert auf die Intensität I_2 . Die Unsicherheit dieses Quotienten ist durch diejenige von r_1 gegeben, da sich die beiden Quotienten r_1 und r_2 nur um eine Konstante unterscheiden.
- Der Quotient $r_3 = \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2}$ normiert den Unterschied zwischen den beiden Kanälen auf die Gesamtintensität mit dem Fehler $\Delta r_3 = \sqrt{\frac{(2I_2)^2(\Delta I_1)^2 + (2I_1)^2(\Delta I_2)^2}{(I_1 + I_2)^2}}$.

Im Folgenden wurde stets das Verhältnis r_1 berechnet. Das Verhältnis r_2 entspricht im Wesentlichen r_1 und r_3 ist zwischen 0 und 1 normiert, so dass Information über das Verhältnis $\frac{I_{R+NR}}{I_{NR}}$ verlorengeht. Die Berechnung der Unsicherheit des Intensitätsverhältnisses r_1 ergibt sich aus dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz, das die Einzelfehler ΔI_1 und ΔI_2 berücksichtigt. Die Berechnung des Fehlers spielt eine wesentliche Rolle, nicht nur z. B. für die (willkürliche) Festlegung der Nachweisgrenze, sondern auch in Kapitel 6 über evolutionäre Algorithmen, wo die Varianz ein Teil des Rückgabewerts ist.

Für die Bildauswertung wurden die Bilder mit der ZEISS-Software (eine gute Alternative ist übrigens IMAGEJ) exportiert und in MATLAB eingelesen. Ein selbstgeschriebenes Programm berechnet das Kontrastverhältnis r_1 , das inverse Verhältnis $\frac{1}{r_1}$ sowie deren Standardabweichungen $\Delta r_1, \Delta\left(\frac{1}{r_1}\right)$ und wahlweise ein Intensitätsprofil entlang einer horizontalen Linie des Bildes. Ebenso wird die Anzahl der herangezogenen Pixel ausgegeben. Die Bildausschnitte, aus denen I_1 und I_2 berechnet werden, können manuell ausgewählt und die Bildeckpunkte („Vertizes“) gespeichert werden, so dass nachfolgende Bilder (z.B. bei verschiedenen Konzentrationen oder Wellenzahlen) mit denselben Bildausschnitten ausgewertet werden können. Ebenso können ganze Serien von Bildern automatisiert eingelesen werden. Ein Schnappschuss von der graphischen Oberfläche dieses Programms ist in Abbildung 3.9 zu sehen.

Im konkreten Fall wurden die Bilder so ausgewertet, dass für die zwei Bildregionen I_1 und I_2 in den beiden Kanälen etwa über $50 \times 50 = 2500$ Pixel gemittelt wurde. Die Standardabweichung resultiert dabei aus der Intensitätsabweichung der Pixel innerhalb eines Bildes, welches letztendlich bei der Messung gespeichert wurde und eine Mittelung über 16 Bilder darstellt. Um eine hinreichende Bildqualität zu erreichen, wurde die Belichtungszeit pro Pixel auf $6,4 \mu\text{s}$, für die Bilder in der Nähe der Resonanz sogar bis auf $25,6 \mu\text{s}$ heraufgesetzt, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Eine weitere Erhöhung der Belichtungszeit bringt kaum Verbesserung der Bildqualität, aber erhöht die Aufnahmezeit für ein Bild beträchtlich (von ursprünglich 11 Sekunden für ein Bild auf einige Minuten). Während dieser Zeit können Laserinstabilitäten auftreten, so dass das Bild neu aufgenommen werden muss.

Kalibrationsbild Zur quantitativen Messung des chemischen Kontrasts ist eine exakte Justage der Laserstrahlen nötig. Dies bedeutet, dass - falls der Chip mit dem identischen Analyten befüllt ist, z.B. beide Kanäle mit undeutertem Toluol - ein Intensitätsverhältnis von 1:1 resultieren sollte. Dies ist in der Realität nicht der Fall, da die Einkopplung ins Mikroskop u. U. nicht exakt geradlinig entlang der optischen Achse verläuft bzw. durch geeignete Justierung der Einkopplung es erreicht werden muss, dass die Ausleuchtung des Bildes möglichst homogen erfolgt. Zusätzlich nimmt die Ausleuchtung eines CARS-Bildes aufgrund der chromatischen Aberration des Objektivs (Pump and STOKES haben unterschiedliche Wellenlängen, die mehr als 100 nm auseinanderliegen) radial nach aussen ab. Außerdem muss das CARS-Signal über einen Kondensator geeignet kollimiert werden, dessen Position die Ausleuchtung des dahinterliegenden Photomultipliers beeinflusst. Um somit das Kontrastverhältnis zu bestimmen, muss vor der Messung des Analyten zuerst eine Kalibrationsmessung durchgeführt werden, bei der sich

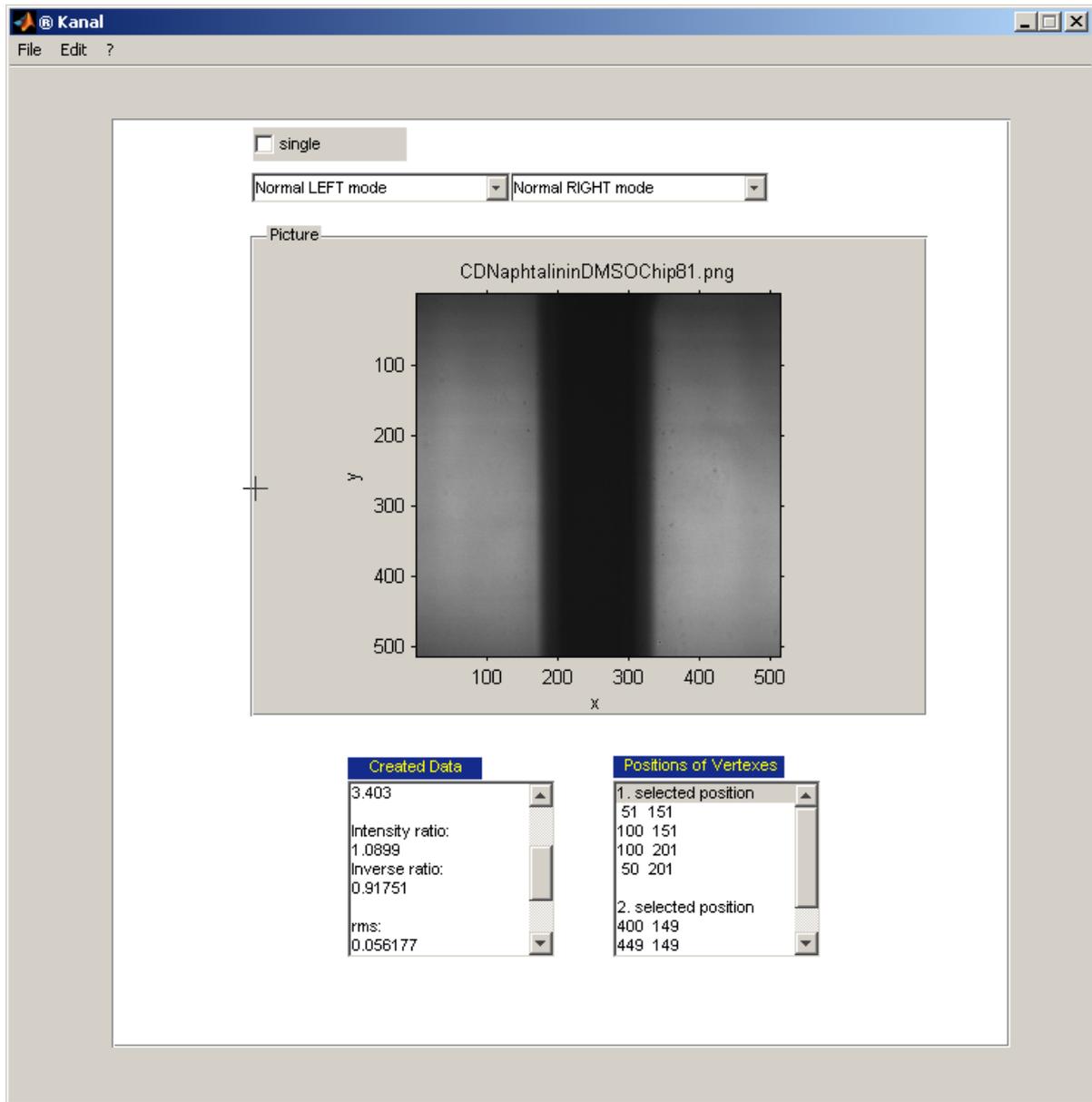


Abbildung 3.9: Schnappschuss des GUI (Graphical User Interface) zur quantitativen Auswertung von CARS-Bildern mit MATLAB.

in beiden Kanälen des Mikrofluidikchips derselbe Analyt befindet. Die konzentrationsabhängigen Messungen müssen dann mit Hilfe dieses Wertes durch Division der Intensitätsverhältnisse korrigiert werden.

Wie in Kapitel 2 dargestellt, ist die Konzentrationsabhängigkeit des CARS-Signals nicht linear, sondern linear bis quadratisch, also ein Polynom zweiter Ordnung mit den konstanten Koeffizienten a , b und c :

$$I_{AS} \propto (a + b \cdot N + c \cdot N^2) \cdot e^{-\kappa(N)d}. \quad (3.2)$$

Strenggenommen muss noch die Absorption der Probe entlang der Länge d betrachtet werden, die ebenfalls von der Konzentration abhängt und durch den exponentiellen Faktor κ in (3.2) beschrieben wird. Im Folgenden wird dieser Faktor jedoch vernachlässigt, da mit farblosen

Analyten gearbeitet wird. Bildet man den Quotienten aus den Intensitätswerten der beiden Kanäle, so erhält man, da in beiden Kanälen der nichtresonante Untergrund zum Signal beiträgt:

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{I_{R+NR}}{I_{NR}} \propto 1 + 2 \underbrace{\frac{\Re(\chi^3)}{\chi_{NR}^3}}_{\propto x_{C_7D_8}} + \underbrace{\frac{|\chi_R^3|^2}{(\chi_{NR}^3)^2}}_{\propto x_{C_7D_8}^2} \quad (3.3)$$

Je nach Verhältnis von resonantem RAMAN-Signal zum nichtspezifischen nichtresonanten Hintergrund ergibt die Auftragung des Intensitätsverhältnis über die Konzentration eine Parabel oder eine Gerade.

3.3.2 Untersuchungen an C-deutierten Modellsystemen

Binäre Mischungen aus Toluol und perdeutertem Toluol

Vor der Quantifizierung des CARS-Signals von C-deutierten Wirkstoffen wurde zunächst auf reines, perdeutertes Toluol⁵ als Modellsystem zurückgegriffen. Dieses hat als Lösungsmittel im Gegensatz zu gelösten Stoffen eine sehr hohe Dichte an CD-Oszillatoren und zeigt sehr starke RAMAN-Banden im Wellenzahlbereich der CD-Streckschwingungen. Diese stammen von der aliphatischen CD-Streckschwingung bei 2120 bzw. der aromatischen CD-Streckschwingung bei 2280 cm^{-1} (s. RAMAN-Spektren und Strukturformel von deutertem Toluol in Abbildung 3.10 auf Seite 38).

RAMAN-Spektren Um eine Obergrenze für den Nachweis von deutertem Wirkstoffen mittels CARS-Mikroskopie angeben zu können, wurden zunächst RAMAN-Spektren von binären $\text{C}_7\text{D}_8/\text{C}_7\text{H}_8$ -Mischungen bei Molenbrüchen von $x_{\text{C}_7\text{D}_8/\text{C}_7\text{H}_8} = x_{\text{CD}} = 0,001$ bis 1 aufgenommen. Die Spektren in Abbildung 3.10 auf Seite 38 für die Molenbrüche $x_{\text{CD}} = 0,1$ bis 1 vermitteln einen Eindruck der Intensitätsverhältnisse der RAMAN-Banden für perdeutertes Toluol und von binären Mischungen aus undeutertem und perdeutertem Toluol. Die CD-Banden im Bereich von ca. 2100 bis 2300 cm^{-1} von deutertem Toluol sind mit Hilfe eines RAMAN-Spektrometers bis zu einem Molenbruch von $x_{\text{CD}} = 0,001$ ($c = 10$ mmol/L) erkennbar.

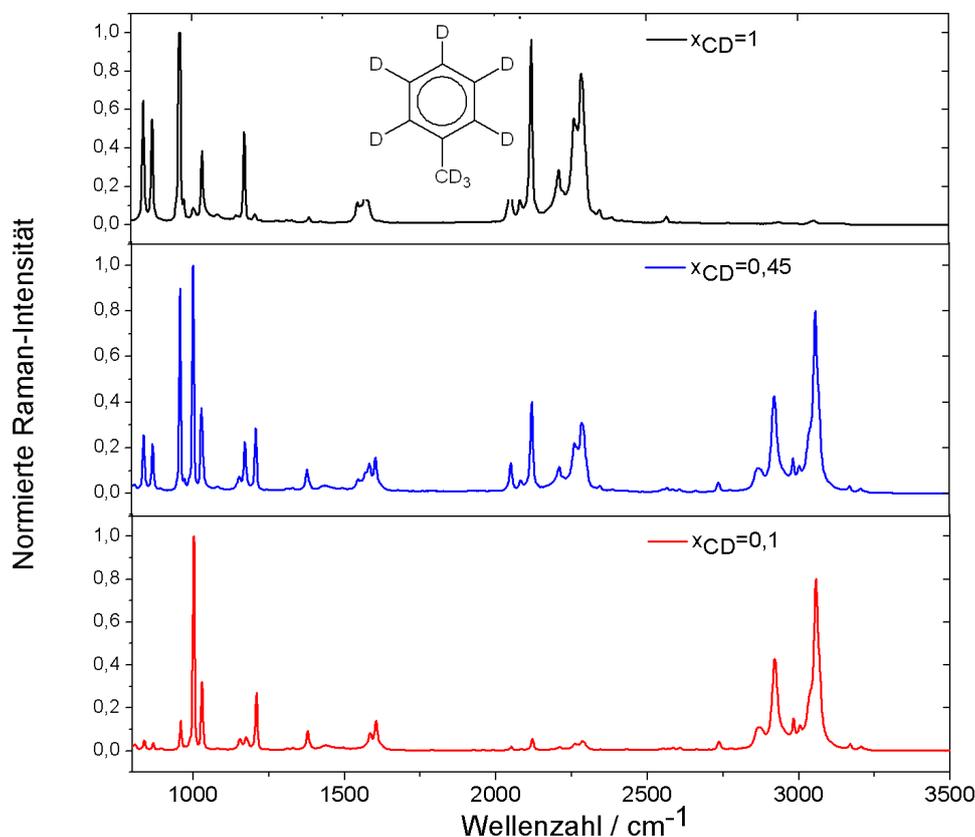


Abbildung 3.10: RAMAN-Spektren von binären Mischungen aus undeutertem und perdeutertem Toluol (s. auch Strukturformel) für die Molenbrüche $x_{\text{C}_7\text{D}_8/\text{C}_7\text{H}_8} = 1, 0,45$ und $0,1$. Man erkennt eine deutliche Abnahme der RAMAN-Intensität der CD-Streckschwingungsbanden im Bereich von 2100 bis 2300 cm^{-1} zu kleineren Molenbrüchen.

Konzentrationsabhängige CARS-Untersuchungen an binären $\text{C}_7\text{H}_8/\text{C}_7\text{D}_8$ -Mischungen

Für die Anwendbarkeit in der Wirkstoffforschung ist die Detektionsgrenze interessant, die durch die CARS-Mikroskopie vorgegeben ist. Die Sensitivität muss also aus einem Bild - und nicht

⁵Mit perdeutert ist gemeint, dass bei einem Molekül *alle* Wasserstoffatome durch Deuterium ausgetauscht wurden.

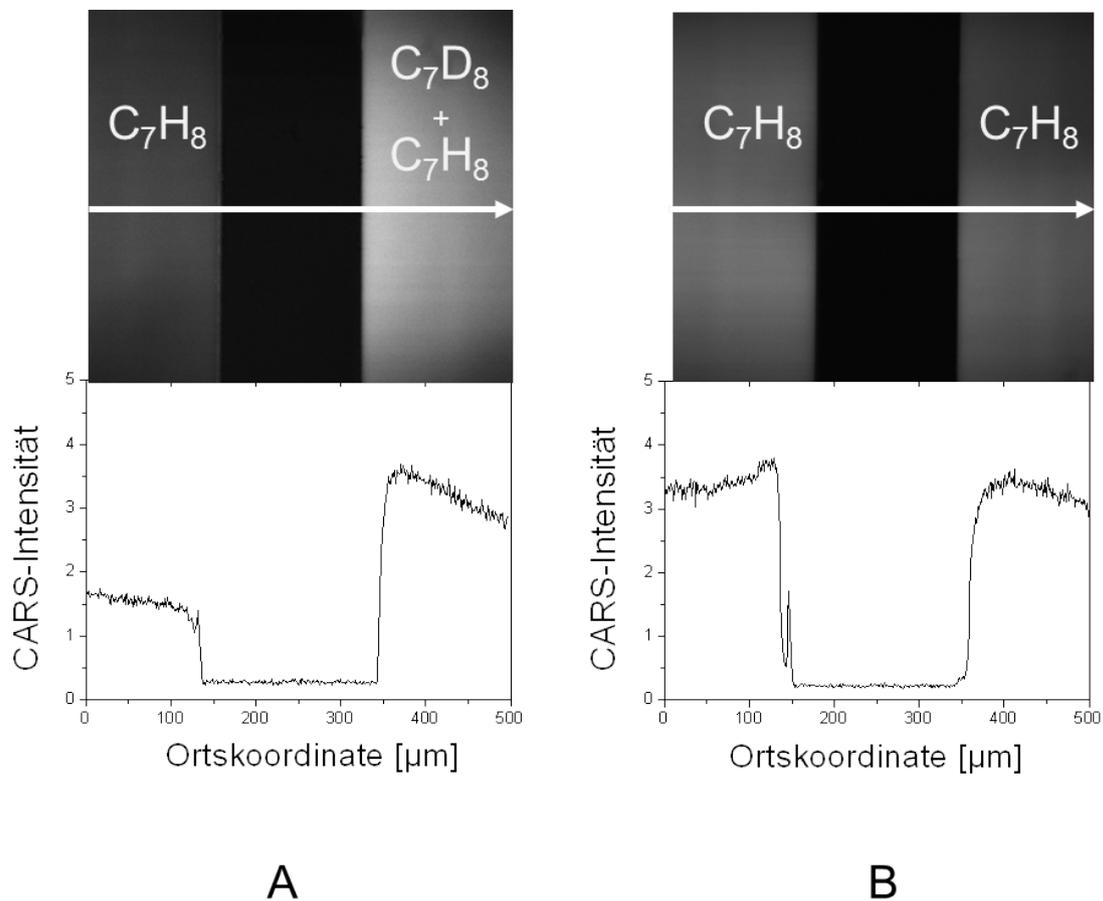


Abbildung 3.11: CARS-Bilder vom Bildausschnitt des Mikrofluidikchips, wie er in Abbildung 3.7 auf Seite 34 gezeigt ist. Die Wellenzahldifferenz vom Pump- und STOKES-Laser ist auf die aromatische CD-Streckschwingung von deuteriertem Toluol (C_7D_8) abgestimmt (s. auch RAMAN-Spektren in Abbildung 3.10 auf Seite 38). Der rechte Kanal enthält hier binäre Mischungen von Toluol mit deuteriertem Toluol. In Bild A ist dies für den Molenbruch $x_{CD}=1$ gezeigt. In diesem Bild ist chemischer Kontrast durch eine Intensitätserhöhung im entsprechenden Kanal sichtbar (Bild A). Dies ist auf den RAMAN-resonanten Beitrag der CD-Streckschwingung zurückzuführen. Zur Kontrolle wurde ein Bild mit undeuteriertem Toluol in beiden Kanälen aufgenommen (Bild B). Theoretisch sollte dies die gleiche Intensität in beiden Kanälen zur Folge haben (also kein chemischer Kontrast sichtbar sein).

aus einem Spektrum - bestimmt werden. Zur Bestimmung der Detektionsgrenze wurde der in Abschnitt 3.3.1 vorgestellte Mikrofluidikchip zusammen mit einem Spritzenpumpensystem verwendet. Der linke Kanal enthielt dabei undeuteriertes Toluol (C_7H_8) als Referenz und der rechte eine binäre Mischung aus deuteriertem und undeuteriertem Toluol. Für den Fall reinen perdeuterierten (C_7D_8) Toluols im rechten Kanal sind in Abbildung 3.11 ein CARS-Bild in Resonanz mit der aromatischen CD-Streckschwingung (Bild A) und eines außerhalb dieser Resonanz (Bild B) gezeigt. Im Falle der nichtresonanten Anregung (Bild B) ist die CARS-Intensität in beiden Kanälen fast gleich. Die Intensitätserhöhung im rechten Kanal in Bild A ist auf den RAMAN-resonanten Beitrag der CD-Streckschwingung zurückzuführen. Dies ist ein Indiz für rein chemischen Kontrast. In einer Konzentrationsreihe von $x_{C_7D_8} = 1$ bis 0,01 wurde nun das Verhältnis von C_7D_8 zu C_7H_8 erniedrigt und CARS-Bilder um den Bereich der Resonanz aufgenommen. Das Ergebnis dieser quantitativen Untersuchung ist in Abbildung 3.12 auf Seite 40 zu sehen: Eine Kurvenanpassung durch die Datenpunkte deutet einen quadratischen Verlauf des Intensitätsverhältnisses in Abhängigkeit vom Molenbruch an, wie es für ein starkes CARS-Signal und nach Gleichung (3.3) zu erwarten ist (s. auch [55]). Ein Verhältnis von Eins bedeutet keinen Kontrast zwischen beiden Kanälen. Dieses Verhältnis - und damit die Detek-

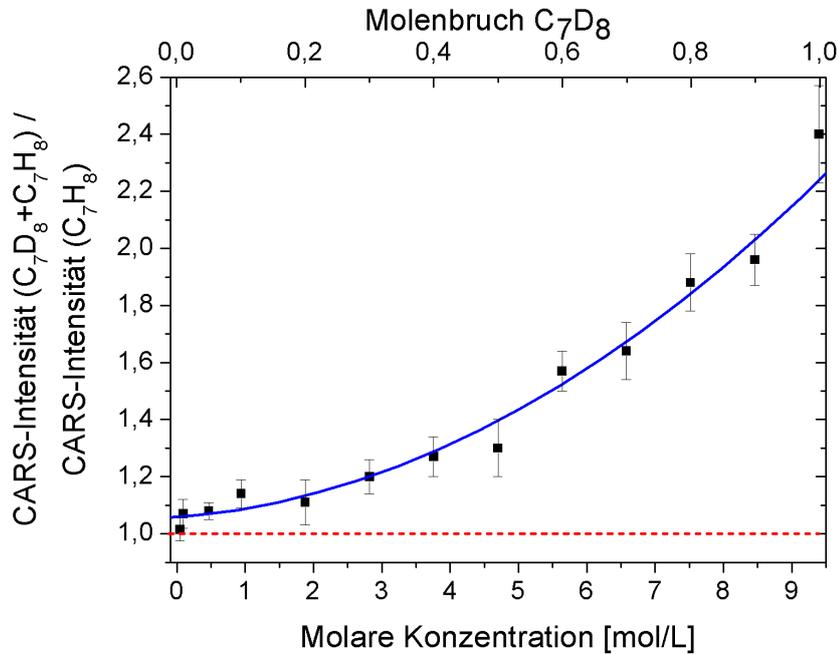


Abbildung 3.12: Abhängigkeit des CARS-Intensitätsverhältnisses $\frac{I_{CD/CH-Toluol}}{I_{CH-Toluol}}$ vom Molenbruch CD-Toluol/CH-Toluol im Bereich 0,01 bis 1 (ein Molenbruch von 1 entspricht einer Konzentration von ca. 9,4 mol/L). Zu erkennen ist eine quadratische Abhängigkeit von der Konzentration von deuteriertem Toluol in der binären Mischung. Die Detektionsgrenze (angedeutet durch die rote gestrichelte Linie) ist etwa bei einem Molenbruch von 0,05 erreicht, was einer Konzentration von ca. 470 mmol/L entspricht.

tionsgrenze nach dieser Definition - ist bei einem Molenbruch von 0,05 oder umgerechnet einer Konzentration von 470 mmol/L erreicht, da hier die zur Abszisse parallele Gerade durch 1 vom Fehlerbalken berührt wird. Dieser Wert erscheint auf den ersten Blick sehr hoch, da Konzentrationen von Wirkstoffen unter physiologischen Bedingungen eher im nanomolaren Bereich liegen, ist aber konsistent mit anderen quantitativen Untersuchungen aus der Literatur, die von einer Detektionsgrenze von ca. 30 mM berichten [56]. Nimmt man ein Fokaltvolumen von $1 \mu\text{m}^3$ an, so lässt sich die Konzentration c mit Hilfe der Avogadrozahl N_A in eine Teilchenzahl N gemäß $N = c \cdot N_A \cdot V$ umrechnen. Für eine Detektionsgrenze von 470 mM ergibt sich eine Teilchenzahl von ca. $3 \cdot 10^8$.

CARS-Spektren Als ergänzende Messung wurden nicht nur CARS-Bilder, sondern auch CARS-Spektren in einer Küvette außerhalb des Mikroskops aufgenommen. Mit dem Aufbau, der in Abbildung 3.6 auf Seite 33 gezeigt ist, wurden hierzu in kollinearer Anregungsgeometrie die Anregungslaser in eine 1 mm dicke Küvette stark mit einem Objektiv (10x NA 0,25) fokussiert.

Die Detektion erfolgte mit einem Spektrometer (Ocean optics), in das über eine Faser das von der Probe emittierte anti-STOKES-Licht eingekoppelt wurde. Für jede Wellenlänge des Pump-Pulses wurde ein Spektrum aufgenommen. Hierzu wurde der OPO, der den Pump-Puls erzeugt, im Bereich von ca. 638 bis 646 nm (das entspricht zusammen mit der STOKES-Wellenlänge bei 748 nm einer relativen Wellenzahl von ca. 2300 bis 2100 cm^{-1}) durchgestimmt. Exemplarisch sind CARS-Spektren für zwei Molenbrüche in Abbildung 3.13 auf Seite 41 zusammen mit den RAMAN-Spektren in diesem Wellenzahlbereich gezeigt. Jeder der in Abbildung 3.13 auf Seite 41 gezeigten Datenpunkte entspricht dabei dem Intensitätswert des anti-STOKES-Signals im Maximum. Die Lage der beiden Maxima im CARS-Spektrum stimmt bis auf eine für das Linienprofil typische Verschiebung von ca. 30 cm^{-1} gut mit derjenigen in den RAMAN-Spektren überein. Bildet man das Verhältnis der Intensitäten im Maximum (bei 2105 cm^{-1}) und dem Untergrund (bei 2190 cm^{-1}), so ergibt sich ein „Kontrast“-Verhältnis von etwa ca. 4:1, also etwas höher als im Falle der CARS-Bilder (2,5:1 bis 3:1).

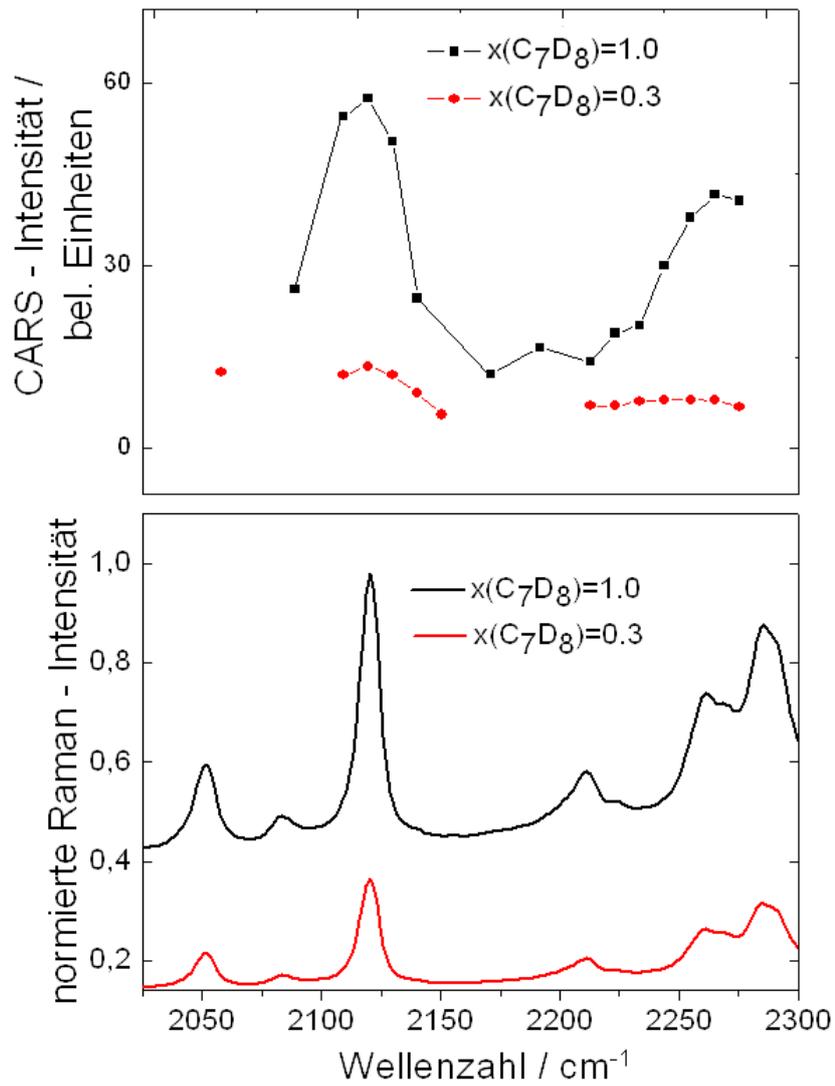


Abbildung 3.13: CARS-Spektren von binären Mischungen aus perdeuteriertem Toluol und undeuteriertem Toluol für zwei Molenbrüche. Zum Vergleich sind unten die entsprechenden RAMAN-Spektren gezeigt.

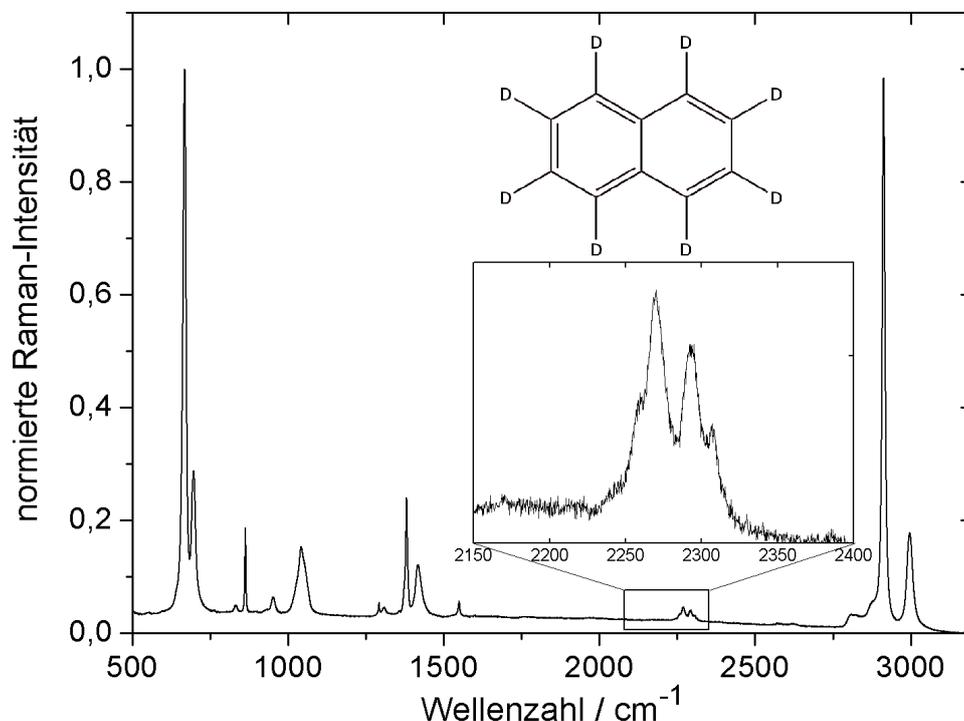


Abbildung 3.14: RAMAN-Spektrum von einer 500 mM-Lösung deuterierten Naphthalins (s. auch Strukturformel) in DMSO. Der Bereich um die RAMAN-Banden der CD-Streckschwingung bei ca. 2280 cm^{-1} ist noch einmal vergrößert dargestellt.

Chemischer Kontrast von gelösten Stoffen: perdeuteriertes Naphthalin als Modellsystem

Die binären Mischungen aus Toluol und perdeuteriertem Toluol weisen, da es sich um Flüssigkeiten handelt, eine sehr hohe Konzentration an CD-Oszillatoren auf und liefern bis in den 500 mM-Konzentrationsbereich einen starken chemischen Kontrast. Der nächste Schritt besteht nun in der Betrachtung von deuterierten Stoffen, die in organischen Lösungsmitteln *gelöst* sind. Dies kommt der Realität der (später diskutierten) Wirkstoffe unter physiologischen Bedingungen näher. Die herstellbare Konzentration ist naturgemäß kleiner als die der binären Mischung und somit schwieriger zu detektieren. Als Modellsystem insbesondere für die Wirkstoffklasse der Naphthylisochinoline eignet sich Naphthalin (s. Strukturformel in Abbildung 3.14). In Abbildung 3.14 ist ein RAMAN-Spektrum von in DMSO gelöstem perdeuteriertem Naphthalin (d-Naphthalin) bei einer Konzentration von 500 mM zu sehen. Die RAMAN-Banden der CD-Streckschwingungen des perdeuterierten Naphthalins liegen im Bereich von 2280 bis 2300 cm^{-1} (s. Abbildung 3.14), ganz ähnlich wie im Falle von Naphthylisochinolin (s. Abschnitt 3.3.3). Als Lösungsmittel wurde DMSO gewählt, da auch die später diskutierten Wirkstoffe in DMSO gelöst wurden.

Konzentrationsabhängige CARS-Messungen

Konzentrationsabhängige CARS-Messungen wurden für perdeuteriertes Naphthalin ($\text{C}_{10}\text{D}_{12}$) ebenfalls durchgeführt. Hierbei wurde dieselbe Konzentration von deuteriertem Naphthalin in DMSO gelöst und mit derjenigen von undeuteriertem Naphthalin in DMSO im zweiten Kanal des Mikrofluidikchips verglichen. Das Ergebnis dieser konzentrationsabhängigen Messung ist in Abbildung 3.15 auf Seite 43 zu sehen: Zieht man wieder die Fehlerbalken zur Bestimmung der Nachweisgrenze heran, so lässt sich eine Detektionsgrenze von ca. 200 mM angeben. Dies liefert einen ersten Anhaltspunkt für die detektierbaren Konzentrationen der Wirkstoffe, da es sich hier auch um gelöste Stoffe handelt, die gegen den Untergrund vom Lösungsmittel detektiert werden müssen. Die Detektionsgrenze liegt in etwa in der Größenordnung von derjenigen für perdeuteriertes Toluol. Dass sie niedriger liegt, könnte mit der höheren Anzahl von CD-Oszillatoren (12

bei Naphthalin gegenüber 8 bei Toluol) zusammenhängen, wenn auch ein Vergleich aufgrund der Verschiedenheit der Modellsysteme (gelöster Stoff versus Lösungsmittel) schwierig ist. Zudem sind nicht nur die Konzentrationen, sondern auch die RAMAN-Streuquerschnitte unterschiedlich. Die Konzentrationsabhängigkeit von gelöstem Naphthalin lässt sich besser mit einer Gerade als durch eine Parabel beschreiben (s. Abbildung 3.15, vgl. auch Gleichung 2.66).

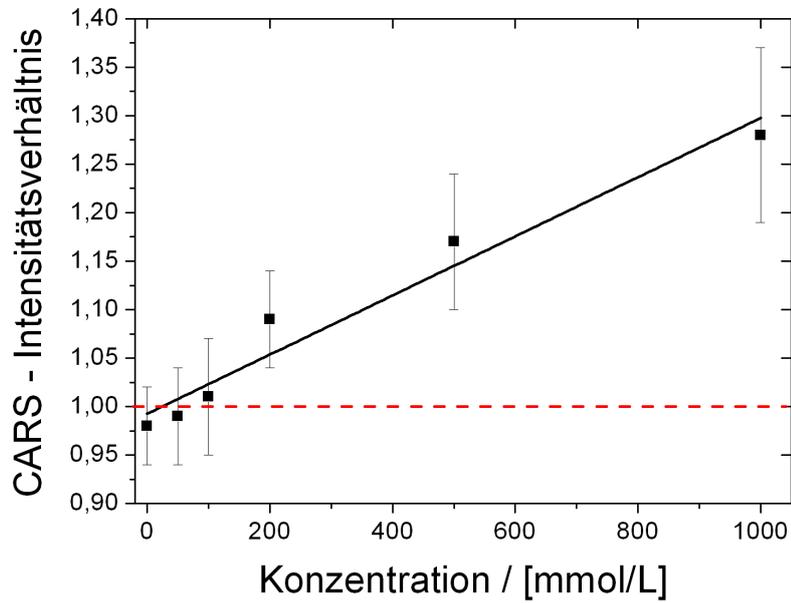


Abbildung 3.15: Konzentrationsabhängige CARS-Messungen von perdeuteriertem Naphthalin in DMSO. Konzentrationen größer als 200 mM können noch detektiert werden, da der Fehlerbalken für diese Konzentration nicht die horizontale Linie durch Eins (hier rot eingezeichnet) einschließt.

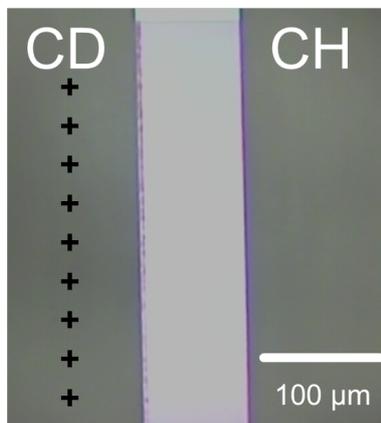


Abbildung 3.16: Ausschnitt (Hellfeldbild) des Zwei-Kanalchips mit einer Kamera vom RAMAN-Spektrometer aufgenommen. Im linken Kanal sind mit schwarzen Kreuzen die Positionen angedeutet, an denen ein RAMAN-Spektrum von d_5 -NIQ aufgenommen wurde.

3.3.3 C-deuterierte Wirkstoffe

Material und Methoden

Im Folgenden werden die Wirkstoffe vorgestellt, die mittels RAMAN-Mikrospektroskopie und CARS-Mikroskopie untersucht wurden. Es handelt sich um drei Stoffe: Naphtylisoquinolin, Etacrynsäure, sowie das n-Hexylamid der Etacrynsäure. Die Strukturformeln dieser Substanzen sind in Abbildung 3.17 auf Seite 45 abgebildet. Die Details über die Synthese dieser Wirkstoffe sind in der Referenz [54] nachzulesen. Alle Wirkstoffe wurden in DMSO gelöst, da die zum Nachweis erforderlichen hohen Konzentrationen im mM-Bereich nicht mit Wasser als Lösungsmittel herstellbar waren. Normalerweise werden die Wirkstoffe in einer höchstens 10-prozentigen DMSO-in Wasser-Mischung gelöst, um Cytotoxizität zu vermeiden. Generell stellt die schlechte Löslichkeit von einigen Wirkstoffen in Wasser ein großes Problem in der pharmazeutischen Forschung dar.

Mikrofluidikchip Für quantitative RAMAN- und CARS-Messungen wurde wiederum der Zwei-Kanal-Mikrofluidikchip (s. Abbildung 3.8 auf Seite 34) herangezogen. Der Bildausschnitt in Abbildung 3.16 auf Seite 44 zeigt die beiden Kanäle, die durch die Kamera des verwendeten RAMAN-Spektrometers zu sehen sind. Entlang des oberen Kanals, der die deuterierte Substanz enthält, wurden zehn RAMAN-Spektren für jede Konzentration aufgenommen und anschließend gemittelt. Es handelt sich hier also um eine *räumliche* Mittelung. Dies wurde durchgeführt, um die Ergebnisse besser mit den CARS-Experimenten vergleichen zu können, bei denen die Probe vom Laserstrahl abgerastert wird. Bei der Aufnahme der RAMAN-Spektren im Mikrofluidikchip stellte es sich heraus, dass aufgrund von Fluoreszenz (vermutlich von Verunreinigungen der Kanalwände herrührend) die RAMAN-Signatur der CD-Bande ab einer Konzentration von 50 mM nicht mehr beobachtbar war. Deshalb wurde für niedrigere Konzentrationen eine einfache 1 mm-dicke Quartz-Küvette verwendet, mit der Konzentrationen von 10 mM detektiert werden konnten.

RAMAN-Spektrometer Zur Aufnahme der RAMAN-Spektren wurde ein kommerzielles RAMAN-Spektrometer (HORIBA-JOBIN-YVON, Modell LabRam) verwendet. Die Probe wurde mit einem HeNe-Laser der Wellenlänge 632,8 nm angeregt, wobei die Leistung auf der Probe etwa 10 mW betrug. Die Laserstrahlung wurde im Falle der Feststoffe mit einem 100x-Objektiv, im Falle der Messungen in Lösung, also für die Küvette und den Mikrofluidikchip, mit einem 10x-Objektiv fokussiert. Das RAMAN-Signal wurde in Rückstreugeometrie kollimiert und mit Hilfe eines Gitters mit 600 Strichen/mm spektral zerlegt und dann auf eine Peltier-gekühlte CCD-Kamera abgebildet.

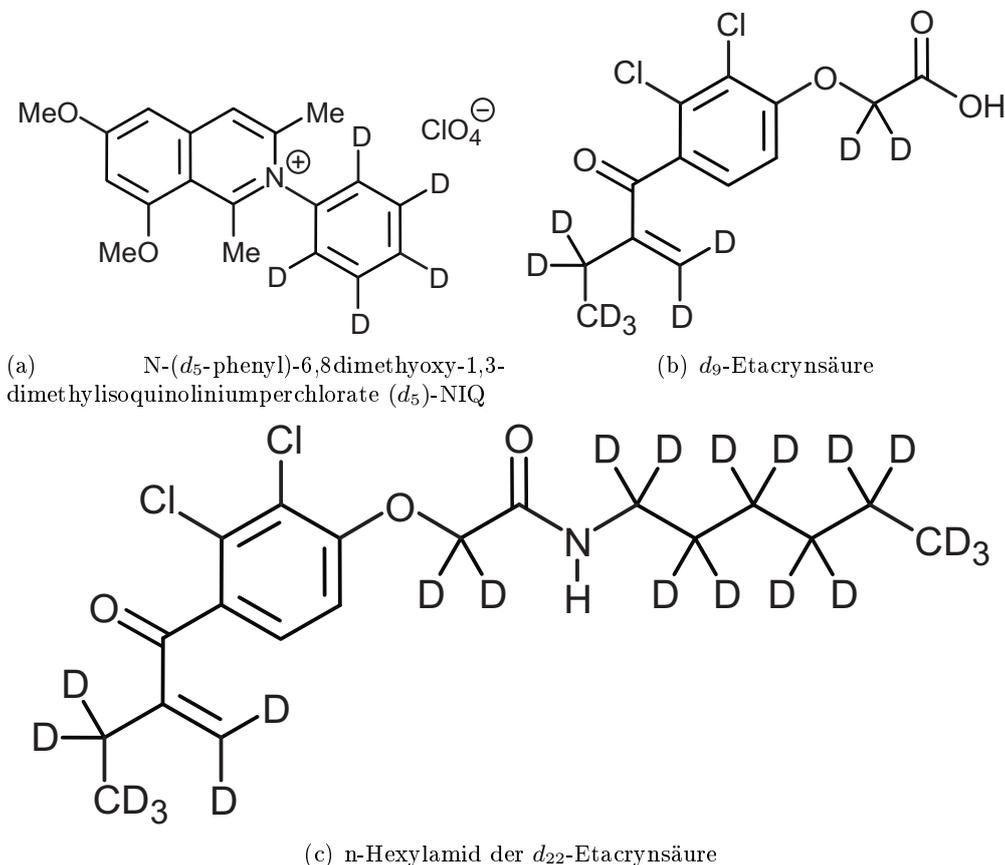


Abbildung 3.17: Strukturformeln der untersuchten Wirkstoffe.

Quantitative Auswertung der RAMAN-Spektren Nach Aufnahme der Spektren in Abbildung 3.16 auf Seite 44 (und ggf. Mittelung im Falle des d_5 -NIQ, s. oben) wurde von den Spektren der Untergund abgezogen. Hierzu kam eine fertige Routine, die den „SNIP“-Algorithmus (s. [57]) in der Skriptsprache *R* implementiert hat⁶, zum Einsatz. Anschließend wurde die integrierte RAMAN-Intensität um den Bereich der CD-Streckschwingung ($2270\text{--}2320\text{ cm}^{-1}$ im Falle von d_5 – NIQ; $2055\text{--}2260\text{ cm}^{-1}$ im Falle von d_9 -Etacrynsäure) im RAMAN-Spektrum ermittelt und auf die integrierte RAMAN-Intensität der Lösungsmittelbande von DMSO bei 1045 cm^{-1} (ca. $990\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$) normiert. Dieses RAMAN-intensitätsverhältnis $\frac{I_{CD}}{I_{DMSO}}$ wurde dann über der Konzentration an gelöstem Wirkstoff in DMSO aufgetragen (s. Abbildung 3.21 auf Seite 48).

RAMAN-Spektren der Wirkstoffe Die RAMAN-Spektren der drei Wirkstoffe sind in Abbildung 3.18 auf Seite 46, Abbildung 3.19 auf Seite 47 und Abbildung 3.20 auf Seite 47 gezeigt. Alle Spektren wurden jeweils für den undeuterten Feststoff (A), den deuterierten Feststoff (B) und den deuterierten Wirkstoff in einer 300 mM-Lösung in DMSO in einer Küvette gemessen. Das RAMAN-Spektrum aller drei Wirkstoffe ist gut zu erkennen, insbesondere was die Lage der CD-Banden betrifft. Im Falle der Spektren in Lösung ist die Intensität der CD-Banden natürlich deutlich schwächer gegenüber den RAMAN-Banden des Lösungsmittels, weshalb diese Spektren noch einmal vergrößert als Ausschnitt gezeigt sind. In Tabelle 3.1 auf Seite 46 werden die RAMAN-Intensitätsverhältnisse für alle drei Wirkstoffe für eine 300 mM-Lösung in DMSO miteinander verglichen. Das in der Tabelle aufgelistete Intensitätsverhältnis $\frac{I_{CD}}{I_{DMSO}}$ wurde *entweder* durch die Integration der Intensität über eine RAMAN-Bande ermittelt *oder* aber durch Summation der RAMAN-Intensität über die gesamte CD-Streckschwingungsregion. Für den Wirkstoff d_5 – NIQs, welches im Wesentlichen nur eine starke RAMAN-Bande bei ca. 2300 cm^{-1} besitzt (s. Abbildung 3.20 auf Seite 47), ist das Verhältnis in beiden Fällen 0,07. Betrachtet man die beiden Derivate der Etacrynsäure, so zeigen diese vier RAMAN-Banden in der CD-Streckschwingungsregion (s. Abbildung 3.18 auf Seite 46). Deshalb sind die Verhältnisse

⁶Es handelt sich hierbei um eine mit MATLAB vergleichbare, freie Software

$\frac{I_{CD}}{I_{DMSO}}$	d_5 -NIQ	d_9 -Etacrynsäure	d_{22} - Etacrynsäure-hexylamid
CD-Peak	0,07	0,04	0,08
Gesamter CD-Bereich	0,07	0,1	0,39

Tabelle 3.1: RAMAN-Intensitätsverhältnisse für 300 mM-Lösungen für d_5 -NIQ, d_9 -Etacrynsäure sowie d_{22} - Etacrynsäure-hexylamid in DMSO. Der höhere Deuterierungsgrad des d_{22} -Etacrynsäurederivates spiegelt sich direkt in dem höheren RAMAN-Intensitätsverhältnis wieder.

hier deutlich anders, wenn man die gesamte CD-Streckschwingungsregion (d_9 -Etacrynsäure-tert-butylamid: 2055 - 2260 cm^{-1} ; d_{22} -Etacrynsäure-n-hexylamid: 2188 - 2260 cm^{-1}) betrachtet. Das höchste Verhältnis hat d_{22} -Etacrynsäure-n-hexylamid mit einem Wert von $0,39$.

Erhöht man in der Synthese die Anzahl der CD-Bindungen und damit die Anzahl der CD-Oszillatoren pro Molekül, sollte man eine höhere Signalintensität erwarten. Dies zeigt sich entsprechend im RAMAN-Spektrum von der stärker deuterierten d_{22} -Etacrynsäure gegenüber dem Spektrum von der d_9 -Etacrynsäure.

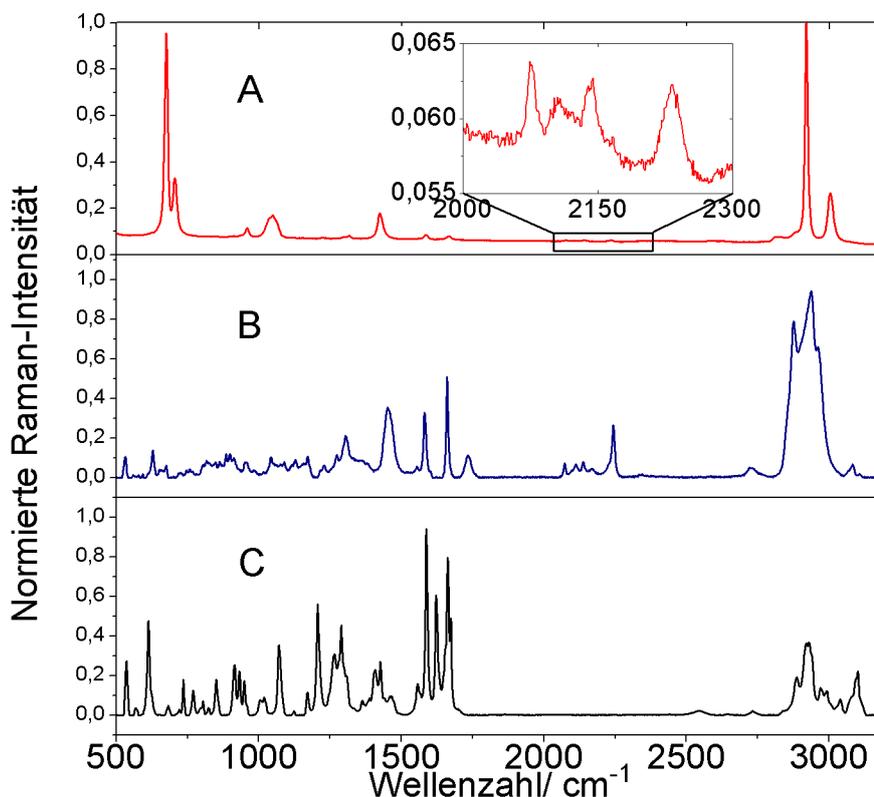


Abbildung 3.18: RAMAN-Spektren der d_9 -Etacrynsäure. A: Undeuterte Substanz als Feststoff, B: Deuterte Substanz als Feststoff, C: 300 mM Lösung der deuterierten Substanz in DMSO.

Konzentrationsabhängige RAMAN-Messungen

Die Ergebnisse quantitativer RAMAN-spektroskopischer Messungen sind in Abbildung 3.21 auf Seite 48 gezeigt. Sowohl im Falle von d_5 - NIQ (b) als auch im Falle von d_9 -Etacrynsäure (a) offenbart sich eine lineare Konzentrationsabhängigkeit, wie sie in der RAMAN-Spektroskopie auch zu erwarten ist (s. Kapitel 2). In einer Küvette sind beide Wirkstoffe bis etwa 10 mmol/L unter den gegebenen experimentellen Bedingungen detektierbar.

Konzentrationsabhängige CARS-Messungen

Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene und für d-Toluol und d-Naphthalin angewandte Methode wurde auch für d_5 -NIQ angewandt, um quantitative CARS-Messungen durchzuführen. Dies bedeutet, dass ein Kanal des Mikrofluidikchips das deuterierte NIQ in DMSO gelöst enthielt und

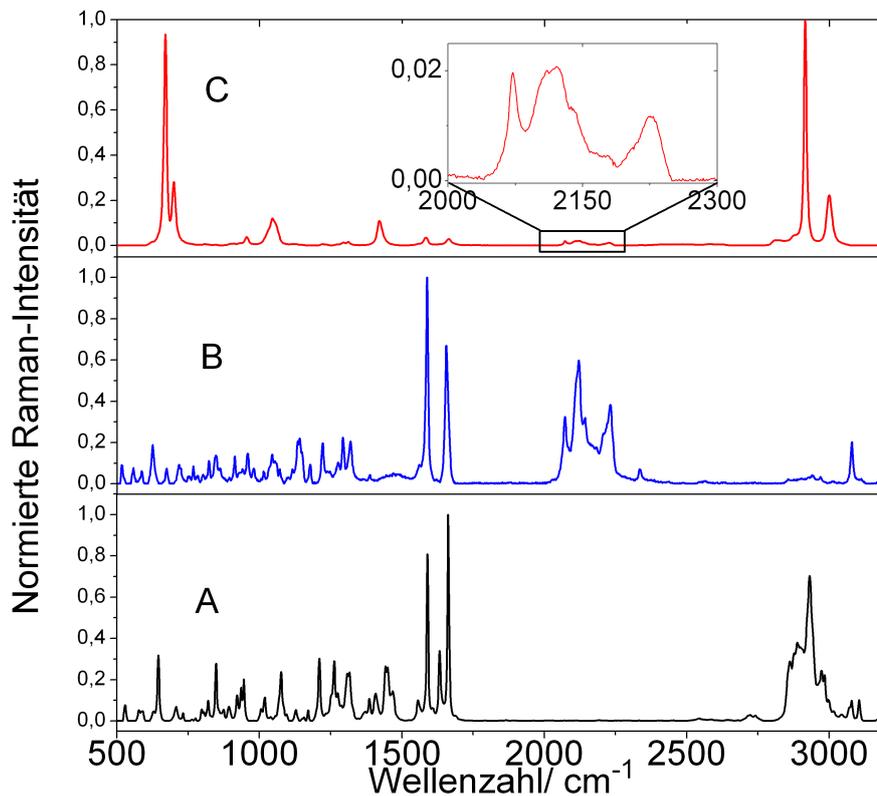


Abbildung 3.19: RAMAN-Spektren des n-Hexylamids der d₂₂-Etacrynsäure. A: Undeuterierte Substanz als Feststoff, B: Deuterierte Substanz als Feststoff, C: 300 mM Lösung der deuterierten Substanz in DMSO.

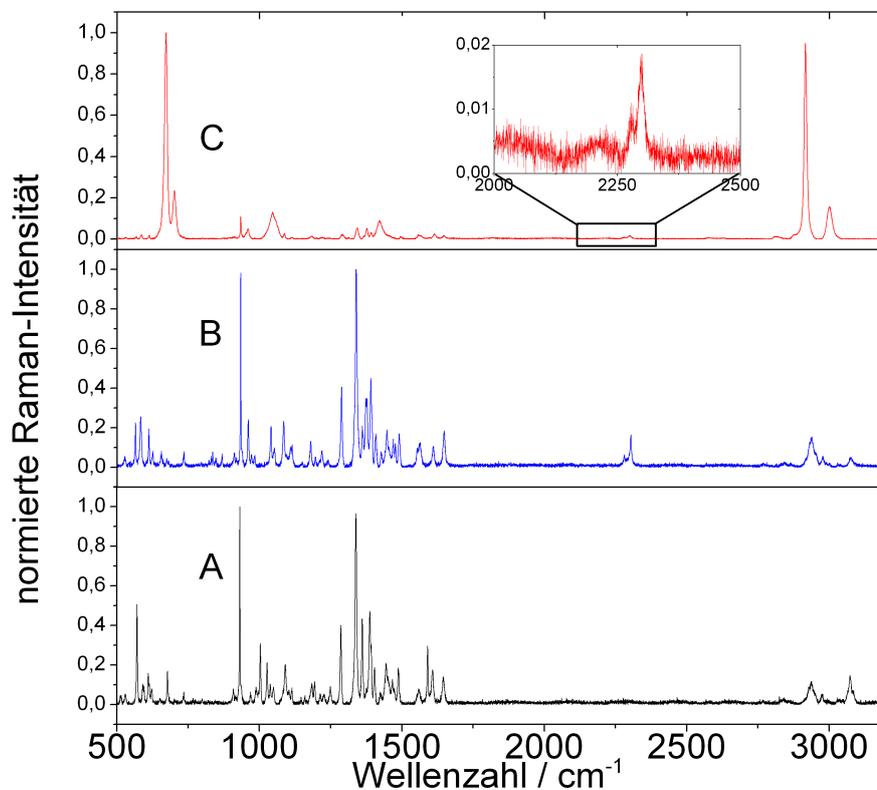


Abbildung 3.20: RAMAN-Spektren von undeuteriertem NIQ als Feststoff (A), d₅-NIQ als Feststoff (B), und einer 300 mM Lösung von d₅-NIQ in DMSO (C).

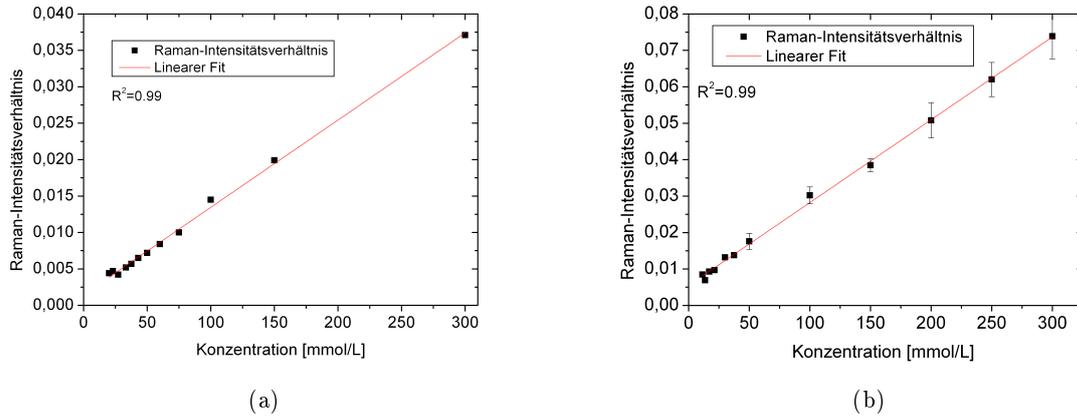


Abbildung 3.21: Konzentrationsabhängige RAMAN-Messungen von d_9 -Etacrinsäure (a) und d_5 -NIQ (b). Die RAMAN-Intensität der CD-Bande der Wirkstoffe wurde auf die Lösungsmittelbande von DMSO bei 1045 cm^{-1} normiert und über der Konzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken resultieren aus der räumlichen Mittelung entlang der schwarzen Kreuze im oberen Kanal im Hellfeldbild (s. auch Abbildung 3.16 auf Seite 44). Die Punkte ohne Fehlerbalken stammen von einer Messung mit einer 1 mm-dicken Quartz-Küvette.

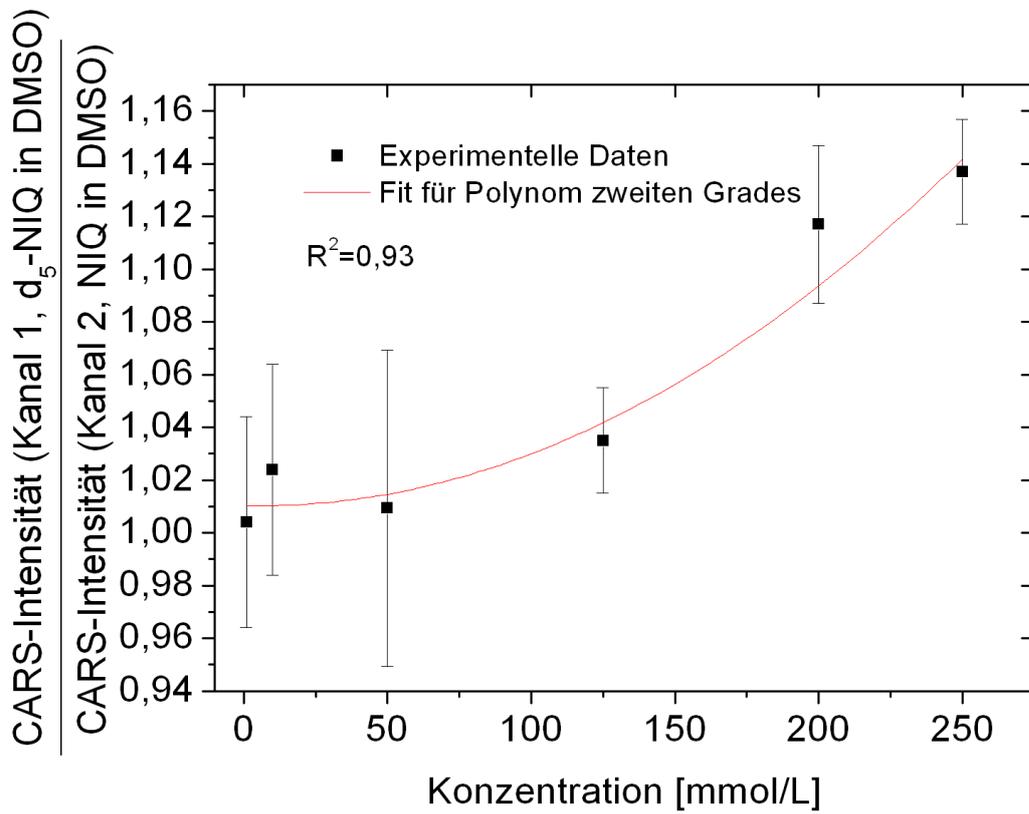
der zweite, zur Referenz dienende Kanal das undeuterte NIQ in derselben Konzentration. Die Wellenlängen von Pump ($698\text{--}702\text{ nm}$) und STOKES (ca. 831 nm) wurden auf die Wellenzahldifferenz von ca. 2300 cm^{-1} abgestimmt, wobei der Aufbau in Abbildung 3.2 auf Seite 28 verwendet wurde, also der Pump-Puls verändert und der STOKES-Puls konstant gehalten wurde. In einem Bereich von $\pm 2\text{ nm}$ um die Lage der RAMAN-Resonanz wurden CARS-Bilder in $0,5\text{ nm}$ -Schritten (dies entspricht ca. 10 cm^{-1} bei 700 nm) aufgenommen, um dann das Bild mit dem höchsten Kontrastverhältnis als Datenpunkt auszuwählen. Dies wurde für die höchste Konzentration 250 mM durchgeführt. Das Ergebnis dieser quantitativen Messreihe ist in Abbildung 3.22 auf Seite 49 (a) zu sehen: Wie schon bei der Messreihe für das Modellsystem Toluol kann die Kurve durch ein Polynom zweiter Ordnung angepasst werden. Eine lineare Kurvenanpassung, wie sie ja theoretisch auch denkbar wäre, beschreibt die Konzentrationsabhängigkeit offenbar schlechter (s. Abbildung 3.22 (b)). Das höchste Kontrastverhältnis zwischen den beiden Kanälen im Mikrofluidikchip beträgt $1:1,12$ für eine Konzentration von 250 mmol/L , was deutlich niedriger als im Falle von deuteriertem Toluol, aber durchaus vergleichbar mit deuteriertem Naphthalin in DMSO ist (s. Abbildung 3.15 auf Seite 43). Die Detektionsgrenze liegt auch hier in der Größenordnung von etwa 100 mM .

Zwischenfazit: Die Sensitivität für C-deuterte Substanzen

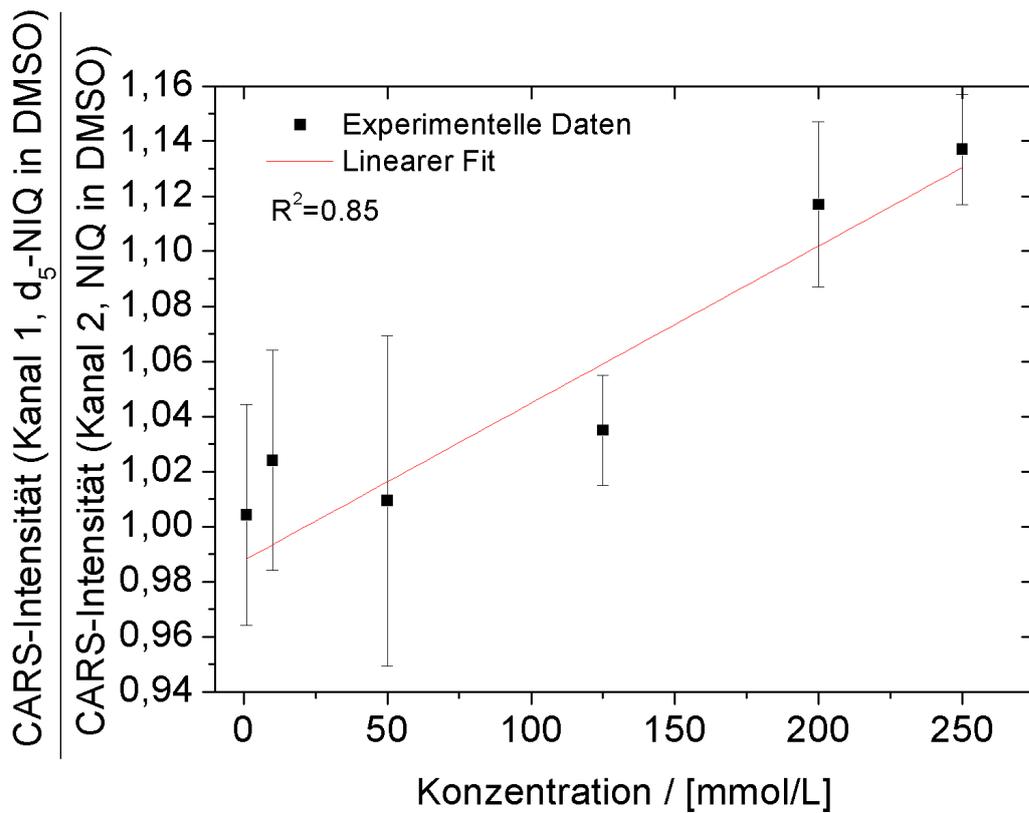
Anhand der quantitativen Messungen an C-deuterten Substanzen lässt sich Folgendes festhalten:

- Die Sensitivität des konventionellen CARS-Aufbaus am IPHT reicht aus, um deuterierte Fettsäure in Zellen mit chemischem Kontrast nachzuweisen.
- Die Detektionsgrenze ist für RAMAN-Spektroskopie um mindestens eine Größenordnung besser als für CARS-Mikroskopie mit Pikosekundenpulsen.
- Mittels RAMAN-Spektroskopie lassen sich Konzentrationen bis zu 50 mM detektieren.
- Mit dem CARS-Aufbau am IPHT für „single-frequency“-CARS-Mikroskopie und etwa 20 cm^{-1} breiten ps-Pulsen lassen sich C-deuterte Substanzen bis 100 mM detektieren.

Dies gilt erst einmal für die untersuchten Substanzen; dass die Sensitivität auch deutlich besser sein kann, soll im folgenden Abschnitt kurz diskutiert werden.



(a)



(b)

Abbildung 3.22: Konzentrationsabhängige CARS-Messungen von d_5 -NIQ in DMSO. Konzentrationen größer als 100 mM können noch detektiert werden. Ein Polynom zweiten Grades liefert eine bessere Anpassung an die experimentellen Daten als eine Gerade.

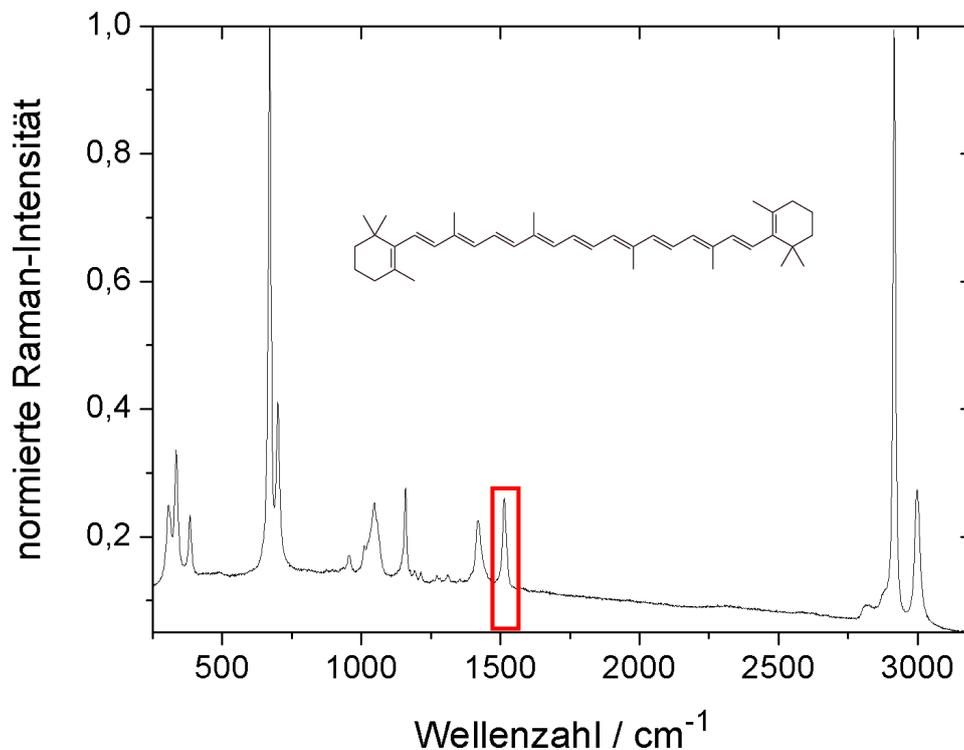


Abbildung 3.23: RAMAN-Spektrum von β -Carotin in einer $150 \mu\text{M}$ -Lösung, aufgenommen bei einer Laseranregungswellenlänge von 633 nm . Das Lösungsmittel war Tetrahydrofuran. Der rote Rahmen markiert den Wellenzahlbereich, der für die CARS-Mikroskopie verwendet wurde, nämlich der Bereich um die RAMAN-Bande bei 1520 cm^{-1} .

3.3.4 β -Carotin

Quantitative Messungen wurden nicht nur mit deuterierten Stoffen durchgeführt. Steht keine perdeuterierte Substanz als Referenz zur Verfügung, so kann man z. B. das anti-STOKES-Signal von dem gelösten Stoff in einen und nur das Lösungsmittel im anderen Kanal miteinander vergleichen. Dies ist im Allgemeinen eine gute Näherung, solange der nichtresonante Untergrund vom Analyten nicht zu hoch ist. Im vorliegenden Fall wurde mit ps-Pulsen die Nachweisgrenze von β -Carotin abgeschätzt, welches aufgrund seiner hohen Polarisierbarkeit ein sehr starker RAMAN-Streuer ist (s. RAMAN-Spektrum in Abbildung 3.23 auf Seite 50). Dazu kommt ein Resonanzeffekt, d. h. die RAMAN-Banden werden verstärkt, da β -Carotin im sichtbaren Spektralbereich absorbiert und bei ca. 450 nm ein Absorptionsmaximum aufweist (s. Absorptionsspektrum in Abbildung 3.24 auf Seite 51).

β -Carotin ist ein geeigneter Modellanalyt, da es ein wichtiges Antioxidanz im menschlichen Organismus darstellt. Zudem besitzt es RAMAN-Banden im „Fingerprint“-Bereich, die relativ stark ausgeprägt sind. Der „Fingerprint“-Bereich, der aufgrund der zahlreichen, biologisch relevanten RAMAN-Banden sehr interessant ist, gilt in der CARS-Mikroskopie als schwierig, da die RAMAN-Banden eng benachbart liegen und einen eher geringen RAMAN-Streuquerschnitt aufweisen. Zudem ist die Konzentration von z. B. Proteinen und DNA im Allgemeinen gering. So zeigen z. B. Messungen von Hämin, ein Porphyrin von hoher biologischer Relevanz (s. [58]), im Mikrofluidikchip *keinen* chemischen Kontrast bei 1374 cm^{-1} .⁷ Zahlreiche biologische Proben weisen einen hohen Gehalt an Carotenoiden auf, weshalb sie sich auch gut zur Bildgebung mittels RAMAN- und CARS-Mikroskopie eignen [59]. Die Anregung erfolgte im sichtbaren Spektralbereich bei etwa 640 nm (Pump) und 710 nm (STOKES), was einer relativen Wellenzahl von etwa 1540 cm^{-1} entspricht. Die Bande der C=C-Valenzschwingung liegt bei etwa 1520 cm^{-1} , wie im RAMAN-Spektrum (s. Abbildung 3.23 auf Seite 50) zu sehen ist. Die rote Wellenlänge des Pump-Lasers befindet sich noch in „prä-Resonanz“ (s. Absorptionsspektrum in Abbildung

⁷Dies könnte auch an der Anregungswellenlänge von 640 nm gelegen haben, die nicht in der elektronischen Resonanz lag.

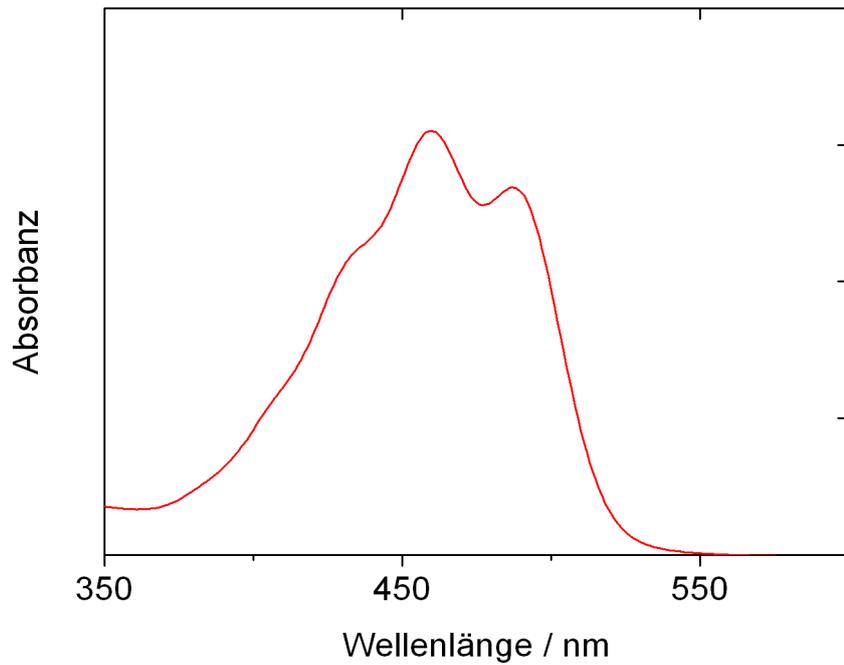


Abbildung 3.24: UV/VIS-Absorptionsspektrum von β -Carotin.

3.24 auf Seite 51). Das anti-STOKES-Signal liegt für die oben gewählten Anregungswellenlängen bei ca. 682 nm. Die CARS-Resonanz ist sehr schmalbandig, wie man an den resonant - und off-resonant aufgenommenen CARS-Bildern sieht (s. Abbildung 3.25 auf Seite 52). Im Gegensatz zu den deuterierten Wirkstoffen kann eine Konzentration von $100 \mu M$ noch nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen an β -Carotin zeigen, dass die Sensitivität der CARS-Mikroskopie bei Analyten mit hoher Polarisierbarkeit durchaus ausreichen kann, um μM -Konzentrationen nachzuweisen.

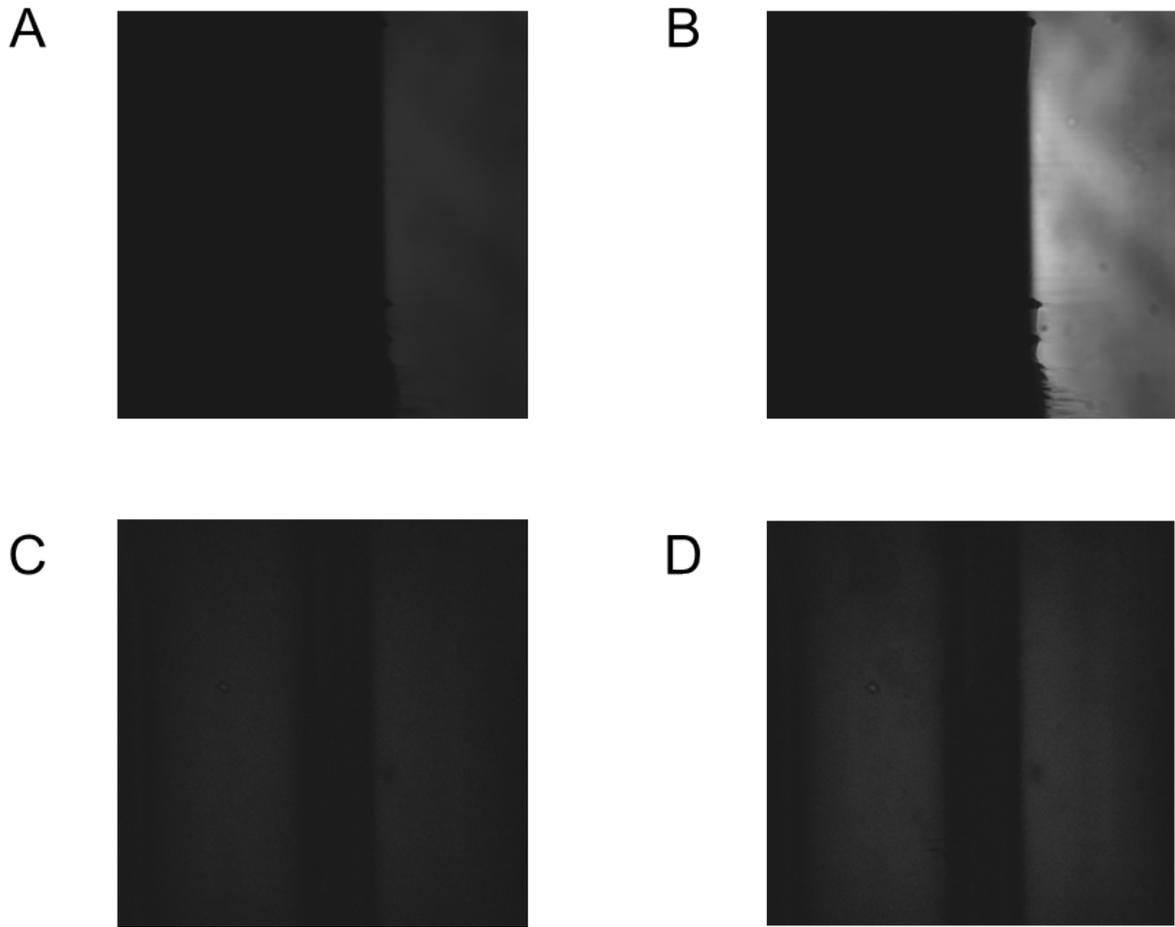


Abbildung 3.25: CARS-Bilder von β -Carotin in Lösung (rechter Kanal des Mikrofluidikchips) versus Lösungsmittel Tetrahydrofuran (linker Kanal) bei hoher (100 mM) und niedriger (100 μ M) Konzentration, jeweils in resonanter und nichtresonanter Bedingung aufgenommen. A: Off-resonant (1590 cm^{-1}), 100 mM; B: Resonant, 1540 cm^{-1} , 100 mM; C: Offresonant, 100 μ M; D: Resonant, 100 μ M.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde dargelegt, wie die chemische Spezifität von nichtinvasiven, schwingungskontrastbasierten Techniken wie RAMAN- und CARS-Mikroskopie ausgenutzt werden kann, um gezielt durch Deuterium intrinsisch markierte Wirkstoffe oder Fettsäuren innerhalb von Zellen nachzuweisen. Die deuterierte Fettsäure in Form von Lipidvesikeln liegt hier in hoher lokaler Konzentration vor. Um grundsätzlich die Fähigkeit des Ansatzes zu zeigen, wurden CARS-Bilder - und zum Vergleich RAMAN-Bilder - von Makrophagen präsentiert, die mit C-deuterierter Palmitinsäure inkubiert wurden. Die Ansammlung der Fettsäure, welche intensive RAMAN-Banden im CD-Streckschwingungsbereich aufweist, konnte mit schmalbandigen ps-Pulsen, die auf die CD-Bande abgestimmt wurden, gut visualisiert werden. Für die Zukunft sind zeitaufgelöste CARS-Experimente an den Makrophagen geplant, wofür eine temperierbare Probenhalterung angeschafft wurde. Der Fokus der auf dieser Arbeit aufbauenden Experimente wird darauf liegen, CARS-Bilder im Abstand innerhalb von wenigen Minuten aufzunehmen, um den Prozess der Aufnahme, Verteilung und Verdauung der Fettsäuren durch die Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden detailliert verfolgen zu können.

Die mittels RAMAN- und CARS-Mikroskopie nachweisbaren Konzentrationen von C-deuterten Substanzen wurden zunächst anhand von Modellsystemen wie deuteriertem Toluol und deuteriertem, in DMSO gelöstem Naphthalin abgeschätzt [53]. Zur Bestimmung dieser Detektionsgrenzen wurde ein Mikrofluidikchip eingesetzt, der es erlaubt, simultan die CARS-Intensität der deuterierten Substanz mit derjenigen von der undeuterten Substanz als Referenz aufzunehmen und zu vergleichen. Somit kann das Intensitätsverhältnis, welches in diesem Kapitel zur Definition des Schwingungskontrastes herangezogen wurde, nahezu unabhängig von Laserfluktuationen bestimmt werden.

Bei den quantitativen Messungen stellte es sich heraus, dass mit dem bestehenden CARS-Aufbau am IPHT C-deutierte Substanzen im Konzentrationsbereich von ca. 100 mM noch nachgewiesen werden können. Im Falle von spektral breiten (ca. 180 cm^{-1}) Femtosekundenpulsen konnte hingegen *kein* Schwingungskontrast nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze im Falle von CARS-Mikroskopie hängt also deutlich von der spektralen Breite der Anregungspulse ab (s. Kapitel 2). Durch die Wahl der Anregungswellenlänge ließe sich eventuell auch die Nachweisgrenze verbessern, da Prozesse wie Zweiphotonenabsorption den Kontrast verringern können (s. auch Kapitel 2). Solche Studien wurden in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Auch für medizinisch interessantere Wirkstoffe wie Etacrynsäure und d_5 -Naphthylisochinolin gelöst in DMSO wurden quantitative Messungen durchgeführt [54]. Bei den RAMAN-Messungen wurde hierbei die RAMAN-Intensität der CD-Banden auf eine Lösungsmittelbande normiert.

Da, im Gegensatz zur Spektroskopie, bei „single-frequency-CARS-Mikroskopie“ keine Referenz-Raman-Bande zur Verfügung steht, wurde zur Referenzierung auf einen Mikrofluidikchip zurückgegriffen. Dieser bietet die Möglichkeit, in *einem* Bild, in welchem zwei parallele Kanäle zu sehen sind, nicht nur das anti-STOKES Signal von der eigentlich interessierenden, deuterierten Substanz zu messen. Vielmehr steht räumlich getrennt, aber fast zeitgleich auch dasjenige in einem zweiten Kanal zur Normierung auf den nicht RAMAN-resonanten Beitrag zur Verfügung. Der Bildkontrast (gemeint ist Schwingungskontrast) ist dann gegeben durch das Verhältnis der Intensitäten der beiden Kanäle r :

$$r = \frac{I_{\text{Kanal mit CD-Substanz}}}{I_{\text{Referenzkanal mit CH-Substanz}}}. \quad (3.4)$$

Der maximale Kontrast betrug etwa $r=3:1$ im Falle von perdeutertem Toluol (Molenbruch 1 oder Konzentration 9,4 M) und schmalbandigen ps-Pulsen. Für gelöste, deuterierte Stoffe betrug das Kontrastverhältnis aber nur etwa 1,15:1 für 300 mM- Konzentrationen [53]. Im Falle der RAMAN-Spektroskopie ließen sich bis zu zehnmal niedrigere Konzentrationen an gelösten Analyten nachweisen. Allerdings stellt sich die Frage, wie angebracht ein solcher Vergleich ist, da im Falle der CARS-Mikroskopie keine CARS-Spektren für die Bestimmung der Detektionsgrenze ausgewertet wurden. Außerdem sind die experimentellen Bedingungen (Laserleistung, Detektor, Objektiv) recht unterschiedlich.

Die Detektionsgrenzen von CARS-Mikroskopie wurden mit den mittels RAMAN-Mikrospektroskopie erhaltenen Werten verglichen. Dabei wurde gezeigt, dass mit spontaner RAMAN-Streuung Konzentrationen von einigen mM nachgewiesen werden können, während hingegen mit dem am IPHT vorhandenen Aufbau für „single-frequency“- CARS-Mikroskopie ohne Unterdrückung des nichtresonanten Untergrunds Konzentrationen von etwa 100-200 mM noch nachweisbar sind [54]. Befindet man sich mit der Anregungswellenlänge bzw. der Wellenlänge des anti-STOKES-Signals in elektronischer Resonanz, so im Falle von β -Carotin, sind Konzentrationen im μ M-Bereich im „Fingerprint“-Bereich noch detektierbar, welcher aufgrund der zahlreichen, benachbarten und im Vergleich zur CH-Streckschwingungsregion schwach ausgeprägten RAMAN-Banden als generell schwierig zugänglich für die CARS-Mikroskopie gilt. Das Fazit dieses Kapitels lautet, dass in Einzelfällen „single-frequency“ CARS-Mikroskopie geeignet ist, um deuterierte Stoffe in Zellen nachzuweisen, aber aufgrund der ermittelten Detektionsgrenzen im mM-Bereich es sehr schwierig sein wird, zeitabhängige Aufnahme- und Transportprozesse von Metaboliten oder Wirkstoffen orts aufgelöst in Zellen zu verfolgen. Entweder man steigt auf andere Techniken wie stimulierte RAMAN-Streuung um oder es gelingt durch Techniken, die den Untergrund gezielt unterdrücken, die Detektionsgrenze zu erniedrigen. In Kapitel 6 wird vorgestellt, wie mittels eines heuristischen Ansatzes versucht werden könnte, indirekt die Detektionsgrenze von deuterierten Substanzen zu verbessern.

Kapitel 4

Impulsformer als durchstimmbare spektrale Filter

4.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Impulsformer und deren Charakterisierung vorgestellt. Die Inhalte der Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2 können auch als Vorbereitung für die Kapitel 5 und 6 aufgefasst werden, in denen dann die Anwendungen der Impulsformer in der CARS-Mikroskopie diskutiert werden. In Abschnitt 4.3 werden konkrete Anwendungen für Lichtmodulatoren als durchstimmbare Filter in der RAMAN- und Fluoreszenzspektroskopie aufgezeigt.

Zwei Arten von Lichtmodulatoren wurden in dieser Arbeit eingesetzt: Flüssigkristallmasken (englisch: liquid-crystal-spatial light modulators, kurz LC-SLMs) und akustooptische Modulatoren (englisch: acoustooptic programmable dispersive filter, kurz AOPDF). Zum Einsatz kam hier zunächst ein Lichtmodulator mit 128 Pixeln der Firma CAMBRIDGE RESEARCH INSTRUMENTS (kurz CRI). Später stand dann auch ein SLM mit 640 Pixeln von JENOPTIK zur Verfügung. Andererseits kam ein AOPDF des Herstellers FASTLITE zum Einsatz. Der AOPDF wurde für die „Quasi-Multiplex CARS-Mikroskopie“ (s. Kapitel 5) eingesetzt; der LC-SLM zur Optimierung von CARS-Bildern¹. Der AOPDF wurde von FASTLITE im Rahmen des EU-Projekts „ACCORD“² zur Verfügung gestellt und wird von FASTLITE unter dem Produktnamen DAZZLER vertrieben. Die Zielstellung dieses Projekts und die zugehörigen Experimente werden in Kapitel 5 beschrieben. Beide Arten von Lichtmodulatoren sind in der Lage, Licht im sichtbaren Spektralbereich (siehe Abschnitt 4.3.1) in Amplitude und Phase derart zu formen, dass nahezu jede beliebige Pulsform innerhalb des Spektralbereichs, der durch den einfallenden Lichtimpuls vorgegeben ist, generiert werden kann [60].

In diesem Kapitel geht es um den Einsatz von diesen Lichtmodulatoren in der Spektroskopie als flexible, durchstimmbare Filter. Prinzipiell sind sowohl der SLM als auch der AOPDF für die Pulsformung geeignet, weisen aber gewisse Unterschiede in Handhabung und Funktionalität auf, die in diesem Kapitel erörtert werden. Zunächst werden die Funktionsweise und Handhabung der Impulsformer beschrieben. Nach der Beschreibung der Charakterisierung werden drei Experimente vorgestellt, bei denen die Impulsformer als durchstimmbare, spektrale Filter zum Einsatz kamen: In Zusammenarbeit mit der Faserabteilung des IPHT wurde das Spektrum einer Superkontinuumslichtquelle alternativ sowohl mit dem AOPDF als auch mit dem SLM moduliert und untersucht, ob sich diese flexiblen Lichtquellen für die RAMAN-Spektroskopie eignen. In einem konkreten RAMAN-Spektroskopie-Experiment diente ein LC-SLM zur Modulation des ursprünglich spektral breiten Anregungslichts zweier optisch-parametrischer Oszillatoren, um die Anregungswellenlänge spektral schmalbandig durchzustimmen. In einem dritten Experiment wurde ein SLM dazu verwendet, ein Fluoreszenz-Spektrum aufzunehmen, ohne ein Vielkanal-

¹Die Wahl der Impulsformer war projektbezogen; tatsächlich sind sowohl der SLM als auch der AOPDF für beide Experimente geeignet.

²Das Akronym steht für Advanced Components Cooperation for Optoelectronic Research and Development

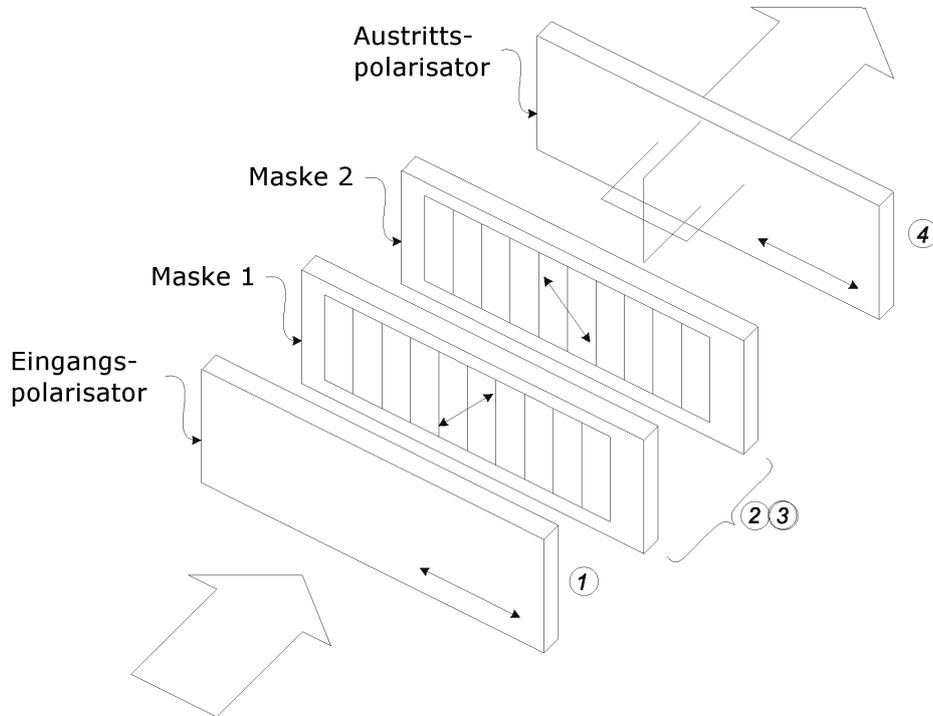


Abbildung 4.1: Prinzipieller Aufbau eines SLM-Doppelmodulators mit Ein- und Ausgangspolarisatoren (Mit (1) bzw. (4) beziffert) und den beiden Flüssigkristallmasken (mit (2) und (3) bezeichnet). Jede Maske des Doppelmodulators besteht aus 128 5 mm hohen (CRI-SLM) oder 640 10 mm hohen Streifen (JENOPTIK). Der Abstand der Streifen zueinander beträgt $100 \mu\text{m}$. Die geometrischen Abmessungen der aktiven Fläche vom CRI- und vom JENOPTIK-Doppelmodulator sind verschieden (CRI: $12,8 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$; JENOPTIK: $64 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$). Mit freundlicher Genehmigung von CRI aus [63] entnommen.

Spektrometer einzusetzen. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden teilweise in den Referenzen [61] und [62] veröffentlicht.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Die Flüssigkristallmasken

Funktionsweise

Die Lichtmodulatoren von CRI und JENOPTIK bestehen aus zwei in einem Abstand d_{LC} hintereinander angeordneten Masken (s. Abbildung 4.1) aus jeweils 128 (CRI) bzw. 640 (JENOPTIK) Flüssigkristallzellen, die zwischen zwei Elektroden aus Indium-Zinn-Oxid (kurz ITO) gehalten werden (s. Abbildung 4.2). Die ITO-Elektroden sind an den Innenseiten gebürstet, um den Flüssigkristallen eine Orientierung zu geben. Durch diese doppelbrechenden Flüssigkristalle erfährt das Licht eine Phasenretardation, die von der Orientierung der Flüssigkristalle zu der Polarisation des einfallenden Lichts abhängt. Die Phasengeschwindigkeit $\frac{\omega \cdot n}{c}$ des Lichts ist entlang der beiden zueinander senkrechten optischen Achsen aufgrund der beiden Brechungsindizes n_o und n_e entlang der ordinären und der extraordinären Achse unterschiedlich. Durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden richten sich die Flüssigkristalle zwischen den Elektroden entlang der Richtung des elektrischen Feldes aus und ändern ihre Orientierung, die von der Stärke der angelegten Spannung U abhängt. Hierüber kann die Phasenretardation $\Delta\phi$ für jede Flüssigkristallzelle über

$$\Delta\phi(\omega, U) = \frac{\omega}{c}(n_e - n_o) \cdot d_{LC} \quad (4.1)$$

eingestellt werden [64].

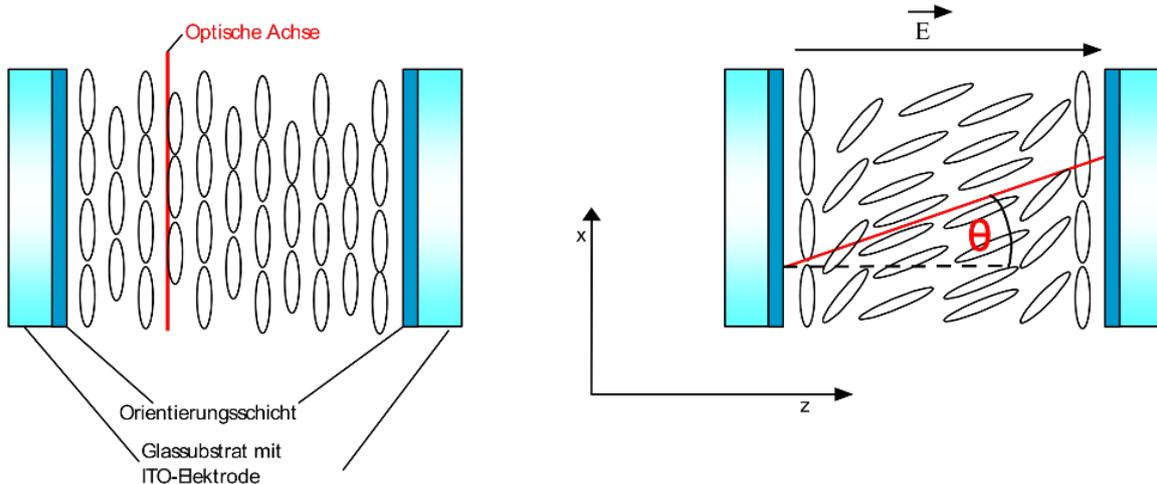


Abbildung 4.2: Der SLM besteht aus zwei miteinander gekoppelten Flüssigkristallzellen, die einzeln angesteuert werden können. Hier sind die Flüssigkristalle innerhalb einer solchen Zelle schematisch gezeigt, die sich bei Anlegen eines elektrischen Felds drehen. Hierdurch ändert sich die optische Wirkung auf linear polarisiertes Licht, das sich in z-Richtung ausbreitet. Wenn kein elektrisches Feld ($U=0$) zwischen den ITO-Elektroden angelegt ist, sind alle Flüssigkristalle parallel zu den Elektroden ausgerichtet. Mit freundlicher Genehmigung von JENOPTIK aus [64] entnommen.

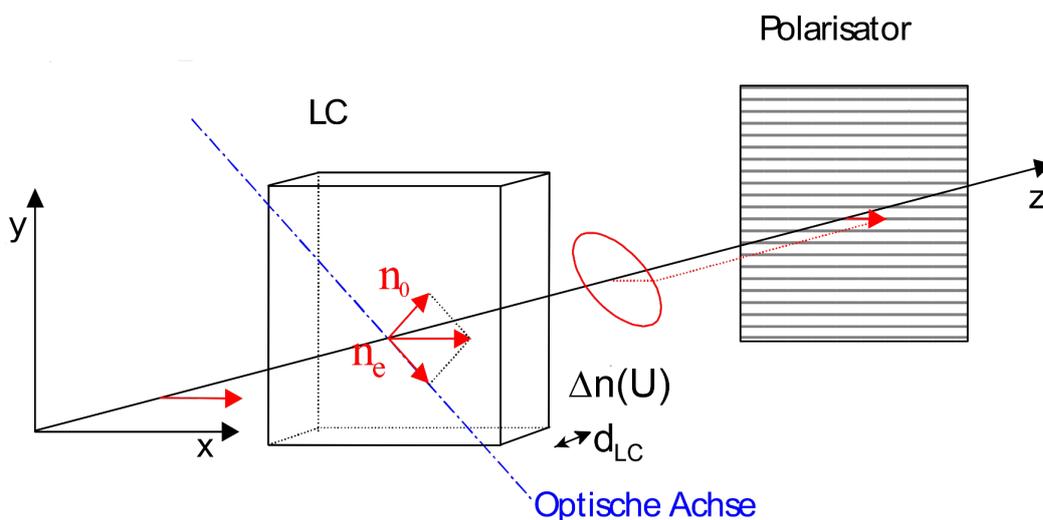


Abbildung 4.3: Polarisationsverhältnisse beim Durchgang durch eine Flüssigkristallzelle. Der horizontal polarisierte Lichtstrahl kann in eine Komponente entlang der ordentlichen und der dazu senkrechten extraordinären Achse zerlegt werden. Aus [64] entnommen.

Charakterisierung

Der Zusammenhang (4.1) muss für den Lichtmodulator experimentell ermittelt werden (Kalibration). Dann ist bekannt, wie der Lichtmodulator das einfallende zeitabhängige elektrische Feld $\vec{E}(t)$ in Amplitude und Phase beeinflusst. Mathematisch formuliert heisst dies, dass die Transferfunktion T zu bestimmen ist, die durch den Zusammenhang

$$\vec{E}_{aus}(t) = \vec{E}_{ein}(t) \otimes T(t) \quad (4.2)$$

gegeben ist, wobei \vec{E}_{ein} und \vec{E}_{aus} das ein- bzw. ausgehende elektrische Feld bezeichnen. In der Frequenzdomäne vereinfacht sich Gleichung (4.2) zu

$$\vec{E}_{aus}(\Omega) = T(\Omega) \cdot \vec{E}_{ein}(\Omega) \quad (4.3)$$

mit der fouriertransformierten Transferfunktion

$$T(\Omega) = \int_{-\infty}^{\infty} d\Omega T(t) e^{-i\Omega t}. \quad (4.4)$$

Die Charakterisierung von Transmission und Phase Der verwendete Amplituden- und Phasenmodulator besteht aus zwei Flüssigkristallmasken mit je 128 Streifen³ (s. Abbildung 4.1 auf Seite 56), die hintereinander angeordnet sind. Die Polarisationsfilter, die nur horizontal polarisiertes Licht durchlassen, sind auf das Gehäuse geschraubt. Man kann nun zeigen [64], dass es durch die Verwendung von zwei Masken möglich ist, Amplitude und Phase unabhängig voneinander zu modulieren. Dies wird durch den Zusammenhang

$$E_{n,aus} = E_{n,ein} \cdot \underbrace{e^{i\frac{\Delta\phi^{(1)} + \Delta\phi^{(2)}}{2}}}_{\text{Phasenmodulation}} \cdot \underbrace{\cos\left(\frac{\Delta\phi^{(1)} - \Delta\phi^{(2)}}{2}\right)}_{\text{Amplitudenmodulation}} \quad (4.5)$$

beschrieben. Der Index n in dieser Gleichung bedeutet die Nummer des Streifens (bzw. Pixelnummer) der Maske, also entweder $n=1, \dots, 128$ im Falle des CRI oder $n=1, \dots, 640$ im Falle des JENOPTIK-Impulsformers. Dieser Index ist im Folgenden unterdrückt. $\Delta\phi^{1,2}$ bedeutet die Phasenretardation, die durch die Maske 1 bzw. 2 verursacht wird. Gleichung (4.5) bedeutet, dass die Gesamt-Amplitudenmodulation durch die *Phasendifferenz* der beiden Masken und die Gesamt-Phase durch den *arithmetischen Mittelwert* der Phasen beider Masken bestimmt wird – vorausgesetzt beide Masken wären genau identisch gefertigt, was in der Praxis nicht möglich ist, weshalb für beide Masken eine Kalibration durchgeführt werden muss. Die Kalibration wird durch eine Messung der Transmission in Abhängigkeit der Steuerspannung U durchgeführt. Die Transmission T ergibt sich durch Bilden des Betragsquadrats der Amplitude A. Wenn U_1 und U_2 die Steuerspannungen der beiden Masken bedeuten, gilt, ausgehend von Gleichung (4.5) der Zusammenhang

$$T(U_1, U_2) = \cos^2\left(\frac{\Delta\phi^{(1)} - \Delta\phi^{(2)}}{2}\right) = \frac{1}{2}[1 + \cos(\Delta\phi_1(U_1)) - \Delta\phi_1(U_2)]. \quad (4.6)$$

Zur Kalibration ist es zweckmässig, eine der beiden Masken auf den maximalen Wert (also eine Konstante) zu setzen. Dann nimmt die Phasenverschiebung einen sehr kleinen Wert an (theoretisch Null) und die Phasenverschiebungen der einzelnen Masken ergeben sich zu:

$$\Delta\phi(U_1) = \Delta\phi(U_2^{max}) \pm \arccos(2T(U_1, U_2^{max}) - 1) \quad (4.7)$$

³Im Folgenden ist von „Pixeln“ die Rede.

$$\Delta\phi(U_2) = \Delta\phi(U_1^{max}) \pm \arccos(2T(U_1^{max}, U_2) - 1). \quad (4.8)$$

Da Gesamt-Phase und Amplitude von der Differenz bzw. dem Mittelwert der beiden Einzel-Phasenretardationen abhängen, führen die beiden konstanten Phasen $\phi(U_1^{max})$ und $\phi(U_2^{max})$ nur zu einer konstanten Verschiebung. Zur Vereinfachung kann daher $\Delta\phi(U^{max}) = 0$ angenommen werden. Nach der Aufnahme der Transmissionskurven kann aus den Gleichungen (4.7) und (4.8) somit die Phasen- und Amplitudencharakteristik ausgerechnet werden.

Die Kalibration erfolgte für den CRI- und JENOPTIK-Impulsformer mit jeweils unterschiedlichen Aufbauten. Im Falle des CRI-Lichtmodulators wurde ein Programm geschrieben, das den Impulsformer und ein Spektrometer (Andor, LOT) ansteuert. Mit einer Weißlichtquelle, die vor dem LC-SLM platziert wurde, wurde die Transmission für Wellenlängen im Bereich von 550 bis 900 nm aufgenommen. Mit Hilfe des Spektrometers wurde dann die Charakteristik für jede Wellenlänge erhalten. Gemäß den Gleichungen (4.7) und (4.8) wurden dann die Transmissions- und Phasencharakteristika (s. Abbildung 4.4) bestimmt. Die Einzelheiten zur Berechnung der in Abbildung 4.4 gezeigten Amplituden- und Phasencharakteristik sind in der Diplomarbeit von ERIK VATER [52] nachzulesen.

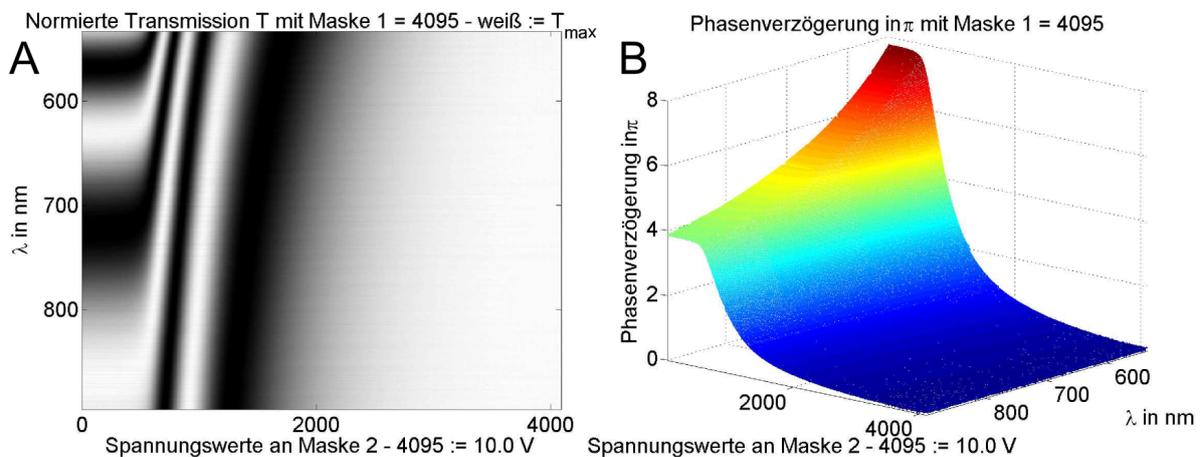
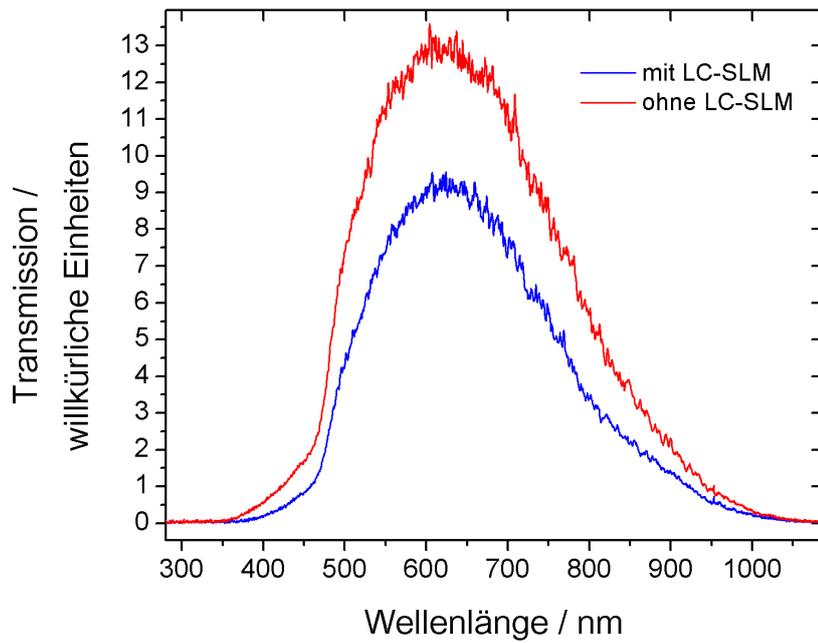
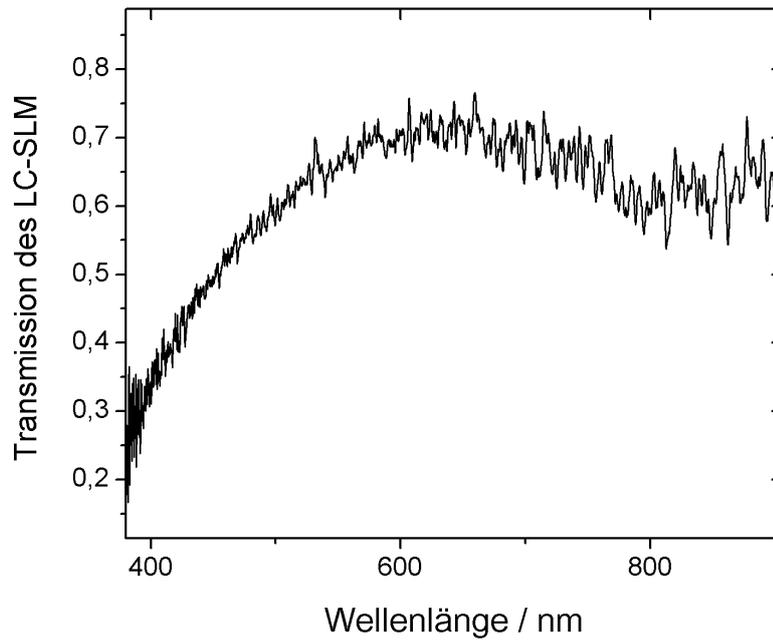


Abbildung 4.4: Transmissions-(Bild A) und Phasencharakteristik (Bild B) des SLM von CRI in Abhängigkeit der Wellenlänge und angelegten Pixelspannung. Für die Aufnahme dieser Kalibrationskurven wurde Maske 1 auf den konstanten Spannungswert $U=10$ V gesetzt und die Spannung der Maske 2 im Bereich von 0 bis 10 V variiert. Aus [52] entnommen.



(a)



(b)

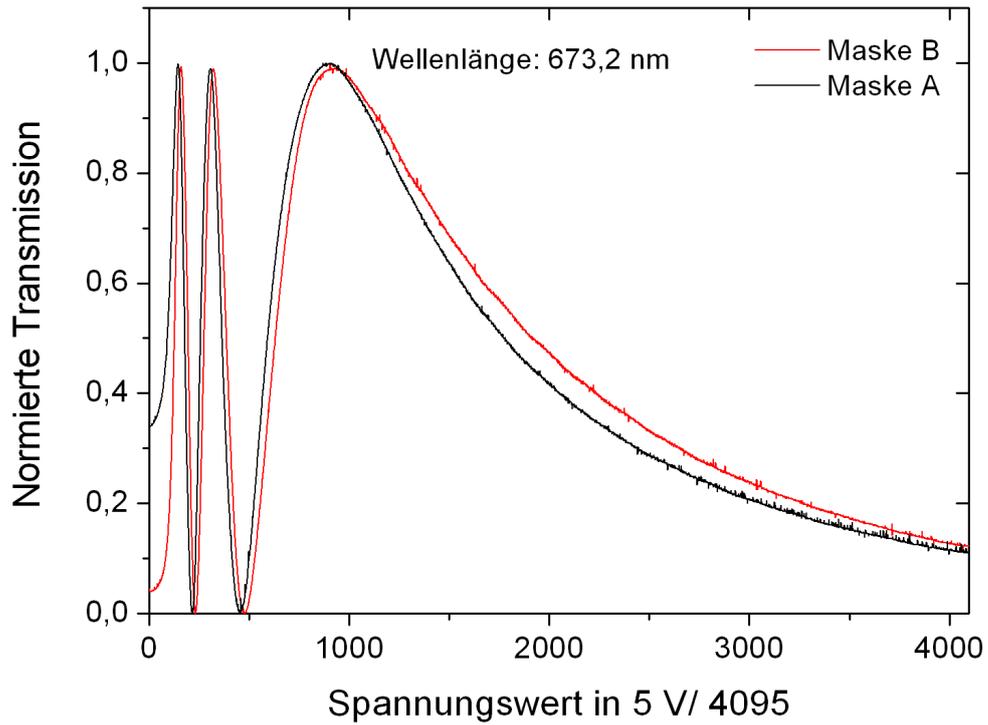
Abbildung 4.5: Transmission des LC-SLM von CRI im sichtbaren Spektralbereich. In Bild (a) ist das Spektrum von horizontal polarisiertem Licht einer Halogenlampe mit (blau) und ohne (rot) LC-SLM gezeigt. Die Kurve in Bild (b), die das Verhältnis der Transmission mit LC-SLM zu der Transmission ohne den LC-SLM zeigt, erhält man durch Division der in (a) gezeigten Spektren.

Vgl. auch [52].

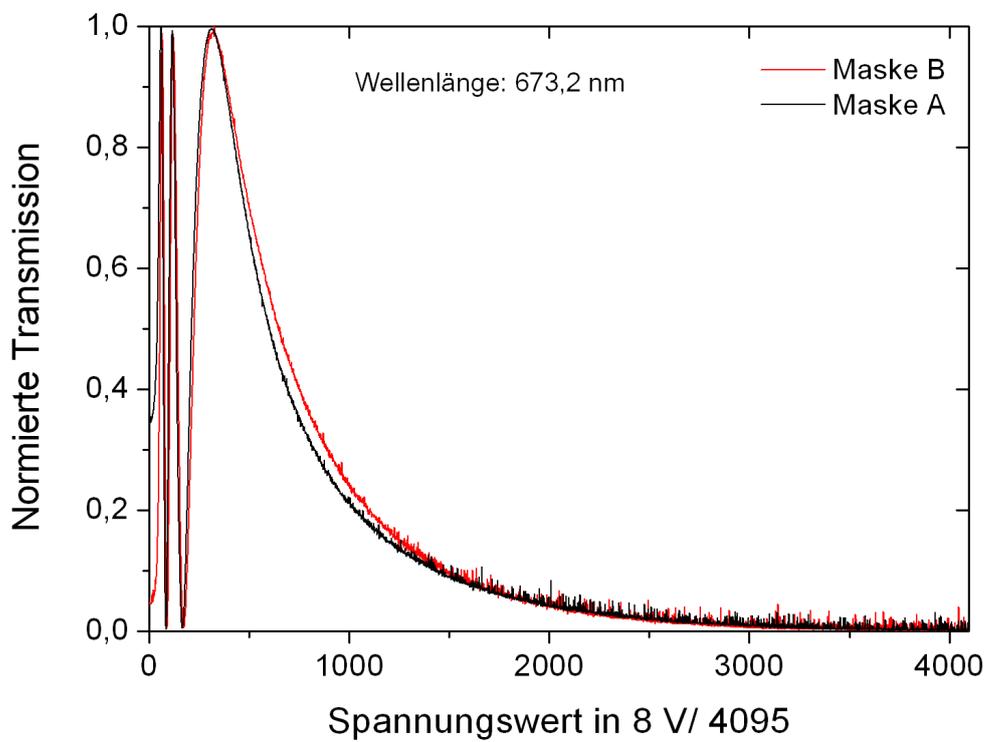
Zusätzlich wurde eine zweite Flüssigkristallmaske, der Doppelmodulator *SLM-S 640d* von JENOPTIK angeschafft. Dieser Typ wurde von JENOPTIK in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von MOTZKUS und der FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA entwickelt. Trotz des ähnlichen Funktionsprinzips gibt es Unterschiede zum Modulator von CRI:

- Es gibt zwei Spannungsmodi (5 V und 8 V Maximalspannung), mit denen die Flüssigkristallmasken betrieben werden können. Durch die Verwendung von 8 V ist die Kurve auf der Spannungsachse gestaucht (s. Abbildung 4.6 auf Seite 62), wodurch schneller zwischen keiner und maximaler Transmission geschaltet werden kann. Ein Nachteil ist das größere Rauschen bei höheren Pixelspannungen. Dieser Nachteil besteht beim Betrieb mit 5 V Maximalspannung nicht. In dieser Arbeit wurden die Experimente mit 5V Pixelspannung durchgeführt.
- Statt 128 Pixeln (CRI) können 640 Pixel (JENOPTIK) angesteuert werden. Die aktive Fläche ist dementsprechend 64 statt 12,8 mm breit.
- Der LC-SLM von JENOPTIK besitzt Temperatursensoren an den Rändern der Flüssigkristallmaske, mit deren Hilfe die Temperatur überwacht werden kann. Die Temperatur hat durchaus einen Einfluß auf die Kalibrierung. Da die Kalibrierung vom experimentellen Aufbau sowie der Temperatur abhängt, wird empfohlen, vor jedem Justage-Umbau eine Kalibrierung durchzuführen (s. [64]).
- Der LC-SLM von JENOPTIK besitzt einen integrierten Analog/Digital (A/D)-Wandler, wodurch sich die Kalibrierung mit Hilfe der bereits mitgelieferten LABVIEW-Programme besonders einfach gestaltet.

Für den JENOPTIK-Impulsformer existierte bereits ein mitgeliefertes LABVIEW-Programm, das den Impulsformer ansteuert und die Amplituden- und Phasencharakteristik automatisch aus der gemessenen Transmission berechnet. Die Transmission kann mit einer Photodiode gemessen und mittels des in den Impulsformer integrierten A/D-Wandler eingelesen werden. Im Unterschied zum Impulsformer von CRI wird aber erstens hier keine Weißlichtquelle verwendet, sondern monochromatisches Licht, welches einige (nicht alle 640) Pixel beleuchtet. Als Lichtquelle kann z. B. ein HeNe-Laser (632,8 nm) verwendet werden. Für die in Abbildung 4.6 auf Seite 62 gezeigten Kalibrierungskurven wurde der OPO des CARS-Aufbaus verwendet. Der zweite Unterschied zum CRI-Impulsformer besteht darin, dass der Lichtmodulator zwischen zwei gekreuzten und nicht parallelen Polarisatoren platziert wird, was den Zusammenhang zwischen Spannung und Phase beeinflusst ([65], [64]).



(a)



(b)

Abbildung 4.6: Transmissionscharakteristik für den Impulsformer von JENOPTIK für die Wellenlänge 673,2 nm und zwei Spannungsbereiche. Die Wellenlänge 673,2 nm entspricht etwa der Wellenlänge, bei der dieser Impulsformer in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

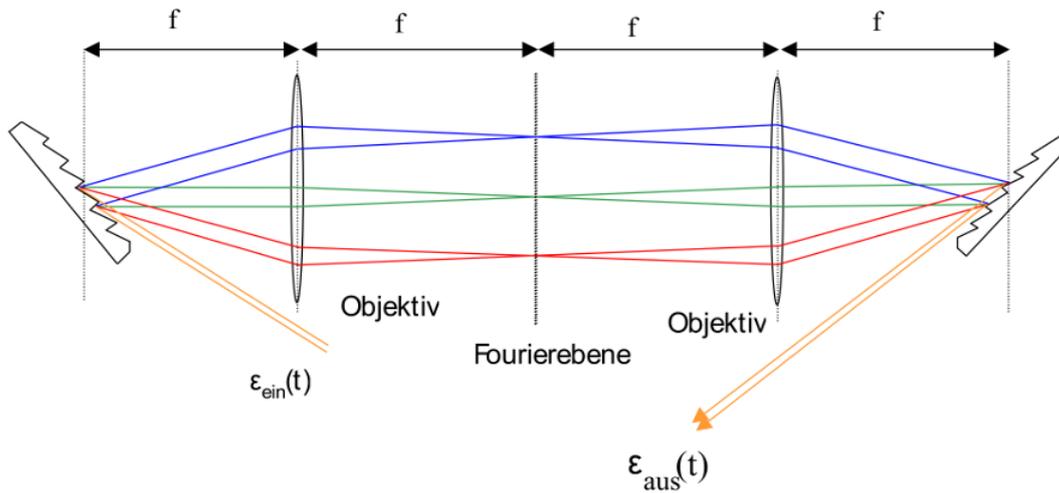


Abbildung 4.7: Der SLM wird in einer symmetrischen 4f-Anordnung verwendet, die aus einem Gitterpaar und zwei Zylinderlinsen („Objektive“) besteht. Mit freundlicher Genehmigung von JENOPTIK aus [64] entnommen.

Der Null-Dispersions-Kompressor und die spektrale Auflösung in der Fourierebene

Um den Impulsformer einzusetzen, wurde ein 4f-Aufbau mit Zylinderlinsen verwendet. Die Zylinderlinsen werden eingesetzt, um den Laserstrahl nicht punktförmig in der Fourierebene zu fokussieren und somit eine Zerstörung der Flüssigkristallmaske zu vermeiden.⁴ Um die Maske optimal auszuleuchten, sind einige geometrische Betrachtungen notwendig: Je mehr Pixel pro nm zur Verfügung stehen, desto feiner kann das Spektrum geformt werden. Dies ist insbesondere für die in dieser Doktorarbeit vorwiegend verwendete Amplitudenmodulation, d. h. der Einsatz des LC-SLM als durchstimmbarer spektraler Filter, von Interesse. Die Auflösung⁵ ist durch den gesamten 4f-Aufbau gegeben und hängt von der Strichzahl der Gitter d , des Einfallswinkels α , der Brennweite f der Linsen sowie der Wellenlänge λ des einfallenden Lichtes ab. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden für den Impulsformer von CRI durchgängig ein goldbeschichtetes Gitterpaar (ZEISS) mit 1800 Strichen/mm sowie zwei für den nah-infraroten Spektralbereich geeignete Zylinderlinsen mit 80 mm Fokusslänge verwendet. Mit Hilfe dieser Parameter ist es möglich, die spektrale Auflösung zu berechnen und damit auch, ob das Spektrum überhaupt auf das aktive Fenster passt, welches im Falle des Impulsformers von CRI 12,8 mm breit ist. Zur Berechnung ist es nützlich, Abbildung 4.8(a) auf Seite 64 zu betrachten und den Beugungswinkel von den zwei Randstrahlen, die auf die Maske abgebildet werden, zu berechnen. Die Beugung des auf das erste Gitter treffenden Lichtstrahls der Wellenlänge λ ist durch die Gittergleichung

$$\sin \alpha + \sin \beta = m\lambda d \quad (4.9)$$

gegeben, wobei α den Einfallswinkel und β den Beugungswinkel zum Lot hin betrachtet bezeichnet. Im Folgenden wird nur die erste Beugungsordnung, also $m=1$, betrachtet. Wenn das Spektrum des einfallenden Lichtimpulses aus der Zentralwellenlänge λ_0 sowie einer Halbwertsbreite von $\Delta\lambda$ besteht, so ist die Lage der Randstrahlen $\lambda_1 = \lambda_0 + \frac{\Delta\lambda}{2}$ sowie $\lambda_2 = \lambda_0 - \frac{\Delta\lambda}{2}$ in der Fourierebene zu berechnen. Dies gelingt durch die trigonometrische Beziehung (s. Abbildung 4.8(a) auf Seite 64)

$$x = 2f \tan(\beta_1 - \beta_0), \quad (4.10)$$

⁴Andere Aufbauten sind denkbar, wie z. B. in Reflektion oder die Verwendung von sphärischen Spiegeln, was es erlaubt, ein breites Spektrum in der Fourierebene abzubilden und eine breite Flüssigkristallmaske (z. B. die des JENOPTIK-Modulators) optimal auszuleuchten.

⁵Mit spektraler Auflösung ist im Folgenden gemeint, auf wieviel Pixel der Flüssigkristallmaske 1 nm des einfallenden Spektrums abgebildet wird.

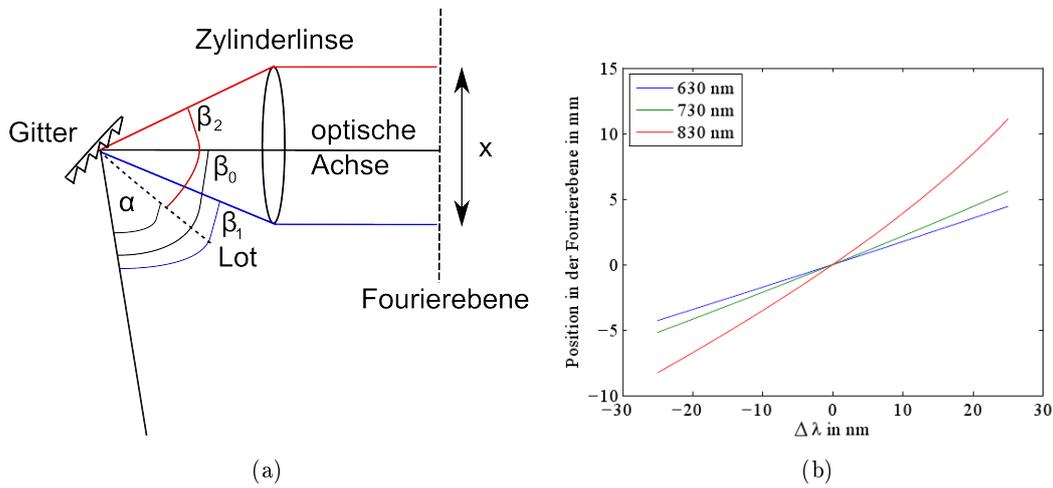


Abbildung 4.8: Die spektrale Auflösung des LC-SLMs in der Fourierebene wird durch die Brennweite der Linsen und die Strichzahl des Gitters bestimmt. (s. Bild (a)). Aus diesen Parametern lässt sich dann die Ausleuchtung der Maske berechnen (s. Bild (b)). Dies ist exemplarisch für die drei Zentralwellenlängen 630, 730 und 830 nm und einem Einfallswinkel zum Gitter von 35° gezeigt. Der Zusammenhang Wellenlänge/Pixel kann für eine Zentralwellenlänge von 630 nm näherungsweise durch eine Gerade beschrieben werden.

wobei x die Position in der Fourierebene, f die Brennweite der Zylinderlinsen und β_1 sowie β_0 die Beugungswinkel der Randwellenlänge λ_1 - sowie der Zentralwellenlänge λ_0 bezeichnen.⁶

Die Position des Spektrums in der Fourierebene ist in Abbildung 4.8(b) für die Zentralwellenlängen 630, 730 und 830 nm für einen Einfallswinkel von 35° grafisch dargestellt. Die Berechnung der Position in Abhängigkeit der Wellenlänge erlaubt die richtige Auswahl der Gitter und Zylinderlinsen und eine grobe Vorjustage.

Die Justage der Flüssigkristallmaske

Nachdem der Zusammenhang zwischen Phase und angelegter Steuerspannung für beide Masken bekannt ist, muss der Pulsformer noch in den optischen 4f-Aufbau eingefügt werden. Entsprechende Justageanleitungen findet man z. B. in [66]. Im Wesentlichen ist darauf zu achten, dass der Laserstrahl den 4f-Aufbau möglichst (sowohl zeitlich wie räumlich) ungechirpt verlässt, wenn kein Impulsformer in der Fourierebene des Null-Dispersionskompressors steht. Wird der Impulsformer auch eingesetzt, um die Phase zu modulieren, z. B. für die Optimierungsexperimente in Kapitel 6, muss hier noch größere Sorgfalt angewandt werden als in Experimenten, in denen er ausschließlich als spektralem Filter dient. In diesem Kapitel werden solche Experimente diskutiert, in denen der Impulsformer lediglich als spektraler Filter dient.

⁶Man beachte, dass die Position x auch vom Einfallswinkel abhängt. Typische Einfallswinkel α liegen im Bereich $20 - 40^\circ$.

4.2.2 Der DAZZLER

Funktionsweise

Der DAZZLER kann, ebenso wie die LC-SLM, Pulse im sichtbaren Spektralbereich (500-900 nm) modulieren. Jedoch sind Funktionsweise und Handhabung völlig unterschiedlich. Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise findet sich z. B. in den Referenzen [60], [65], [67] und der Diplomarbeit von E. VATER [52]. In diesem Kapitel soll nur kurz auf die wesentlichen physikalischen Eigenschaften eingegangen werden. In Abbildung 4.9 ist der DAZZLER in der Draufsicht zu sehen: Mit Hilfe eines Schallgenerators wird in einem doppelbrechenden TeO_2 -Kristall ein akustisches Gitter erzeugt, an dem ein optischer Laserpuls gemäß der Bragg-Bedingung

$$\sin \theta = \left(\frac{m\lambda}{2\Lambda} \right) \quad (4.11)$$

gebeugt wird. Hierbei sind θ der Beugungswinkel, m die Beugungsordnung und λ und Λ die Periode der optischen bzw. akustischen Welle. Betrachtet man den DAZZLER, so fällt neben der kompakten Bauart (etwa $5 \times 5 \times 2 \text{ cm}^3$, s. auch Abbildung 4.9, ohne Schallwellen-Generator) zuerst auf, dass er nicht in einem 4f-Aufbau mit zwei Gittern platziert wird wie der SLM, obwohl es auch akustooptische Modulatoren gibt, die einen 4f-Aufbau benötigen. Der Kristall des DAZZLERS ist nun so konstruiert, dass die Dispersion (laut Gleichung 4.11) vernachlässigbar ist und alle Wellenlängen in dieselbe Richtung gebeugt werden. Dies konnte im Labor zumindest in einer Entfernung von einigen Metern experimentell bestätigt werden. Der gebeugte Strahl verlässt den Kristall unter einem Winkel von $3,6^\circ$ relativ zum ungebeugten (der die optische Achse definiert), der den Kristall unter einem kleineren Winkel von 1° verlässt. Die Polarisation des einfallenden Lichtimpulses, welcher linear polarisiert sein muss, wird dabei um 90° gedreht.

Da der Kristall doppelbrechend ist, können die einzelnen Frequenzkomponenten zeitlich gegeneinander verzögert werden. Die Polarisierungen von unterschiedlichen Wellenlängen werden zu verschiedenen Zeitpunkten rotiert. Dass die dabei notwendige Phasen Anpassung gegeben ist, wird im Folgenden anhand des einfacheren kollinearen Falles (einfallender und gebeugter Laserstrahl haben dieselbe Richtung) gezeigt, ist aber auf den hier relevanten quasi-kollinearen Fall (die beiden Strahlen unterscheiden sich in der Richtung um wenige Grad) Fall erweiterbar [60]. Wird eine akustische Welle durch den Kristall geschickt, d. h. es werden lokale Dichteschwankungen entlang der Propagationsrichtung (hier ist es die z -Richtung) erzeugt, so wird eine dielektrische Störung entlang der z -Achse induziert. Wird die akustische Welle als frequenzmoduliert angenommen, lässt sich der Dielektrizitätstensor als

$$\epsilon(z) = \epsilon + 2\epsilon_1(z) \cos(\Psi(z)) \quad (4.12)$$

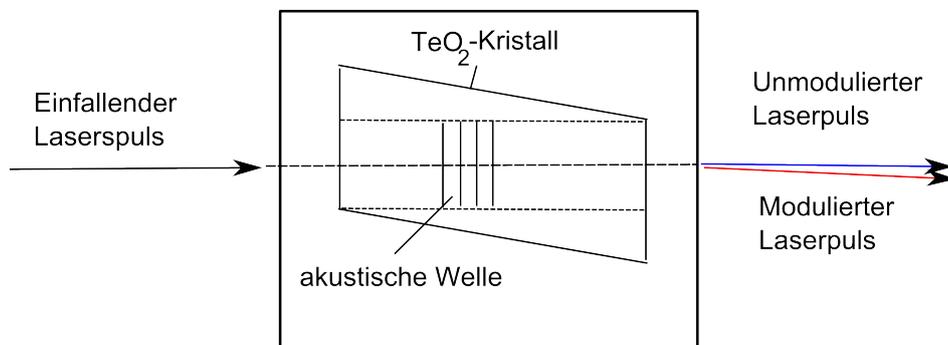


Abbildung 4.9: Schematische Draufsicht auf den DAZZLER. Der einfallende Laserstrahl, der p -polarisiert sein muss, propagiert durch einen 25 mm langen TeO_2 -Kristall und wird um etwa 1° abgelenkt. Wird eine akustische Welle durch den Kristall geschickt, wird der Strahl um etwa $3,6^\circ$ gebeugt [68].

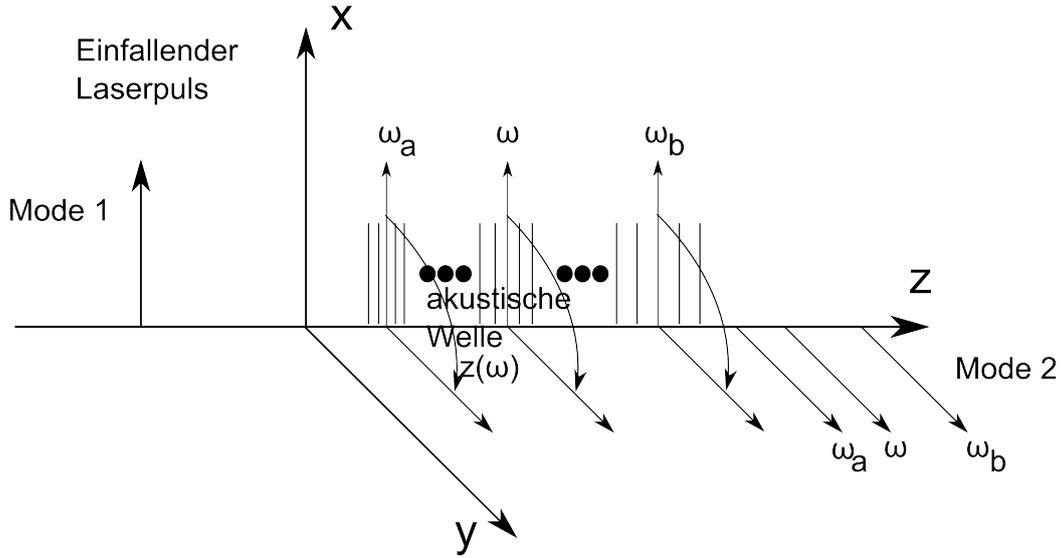


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Funktionsweise vom AOPDF. Die akustische Welle und die gebeugte optische Welle sind hier kollinear dargestellt.

schreiben, wobei ϵ den ungestörten, im System des Kristalls diagonalen Dielektrizitätstensor beschreibt. Die Störung, dessen Amplitude ϵ_1 sehr viel kleiner als die Amplitude des ungestörten Tensors ϵ ist, ist mit der akustischen Phase Ψ moduliert, die durch

$$\Psi(z) = \int_0^z K(z) dz \quad (4.13)$$

gegeben ist. $K(z)$ bedeutet hier die instantane räumliche Frequenz der akustischen Welle.

Die optischen Pulse können als Superposition der einzelnen Spektralkomponenten gemäß

$$\vec{E}(t, \vec{r}) = \int \vec{E}(\omega, \vec{r}) e^{i\omega t} d\omega \quad (4.14)$$

aufgefasst werden. Im Folgenden wird deshalb der Einfachheit halber jede Spektralkomponente einzeln betrachtet. Ohne Interaktion mit einer akustischen Welle können die einzelnen Spektralkomponenten als ebene Wellen geschrieben werden:

$$\vec{E}_m(\omega, \vec{r}) = \sqrt{S(\omega)} \vec{e}_m e^{-ik_m(\omega)z} \quad (4.15)$$

mit den Indizes $m=1,2$, den Polarisationsvektoren

$\vec{e}_m = \sqrt{\frac{2\mu_0\omega}{k_m(\omega)}} \vec{p}_m$, wobei $\vec{p}_{1,2}$ Einheitsvektoren entlang der beiden optischen Achsen sind. Es gilt die Dispersionsrelation $k_m(\omega) = \frac{n_m(\omega)}{c}$.

Der elektrische Feldvektor im Kristall muss nun der nichtlinearen Wellengleichung

$$\frac{d^2}{dz^2} \vec{E}(\omega, \vec{r}) + \omega^2 \mu_0 \epsilon(z) \vec{E}(\omega, \vec{r}) = 0, \quad (4.16)$$

welche nur von der z -Koordinate abhängt, genügen. Falls keine Störung anliegt, also $\epsilon_1(z) = 0$ ist, wird diese Gleichung von dem Ansatz 4.15 gelöst. Die allgemeine Lösung ist durch

$$\vec{E}(\omega, \vec{r}) = \sqrt{S(\omega)} \left(A_1(z) \vec{e}_1 e^{-ik_1(\omega)z} + A_2(z) \vec{e}_2 e^{-ik_2(\omega)z} \right) \quad (4.17)$$

gegeben. Setzt man diese allgemeine Lösung und den Ausdruck für den Dielektrizitätstensor (Gl. 4.12) in die Wellengleichung 4.16 ein, erhält man zwei gekoppelte Differentialgleichungen:

$$\frac{d}{dz}A_1(z) = -i\kappa(z)A_2(z) \left(e^{-i\phi_+(z)} + e^{-i\phi_-(z)} \right) \quad (4.18)$$

und

$$\frac{d}{dz}A_2(z) = -i\kappa(z)A_1(z) \left(e^{i\phi_+(z)} + e^{-i\phi_-(z)} \right). \quad (4.19)$$

Hierbei bedeuten die Abkürzungen $\phi_{\pm}(z) = [k_2(\omega) - k_1(\omega)]z \pm \psi(z)$ und $\kappa(z) = \frac{\omega^2 \mu_0}{2\sqrt{k_1(\omega)k_2(\omega)}} \vec{p}_1 \cdot \epsilon_1(z) \cdot \vec{p}_2$. Energietransfer zwischen den optischen Moden gibt es nur, wenn die Phasen Anpassung zwischen der akustischen und optischen Welle gegeben ist, wenn also die Bedingung

$$\frac{d}{dz}\phi_{\pm} = 0 = k_2(\omega) - k_1(\omega) \pm K(z) \quad (4.20)$$

erfüllt ist. Diese Gleichung kann auch als

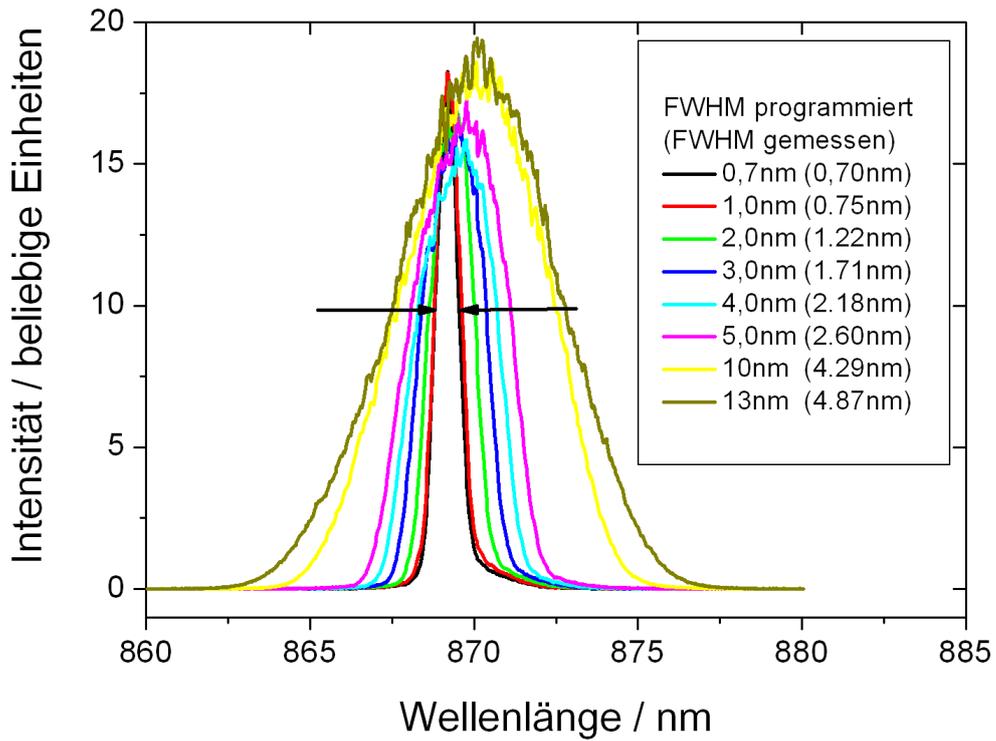
$$K(z(\omega)) = k_1(\omega) - k_2(\omega) = \frac{\omega}{c}(n_1(\omega) - n_2(\omega)) \quad (4.21)$$

geschrieben werden. Damit ist gezeigt, dass aufgrund der Kopplung von akustischen und optischen Moden ein Energieübertrag zwischen den beiden optischen Moden und damit Pulsformung möglich ist [60].

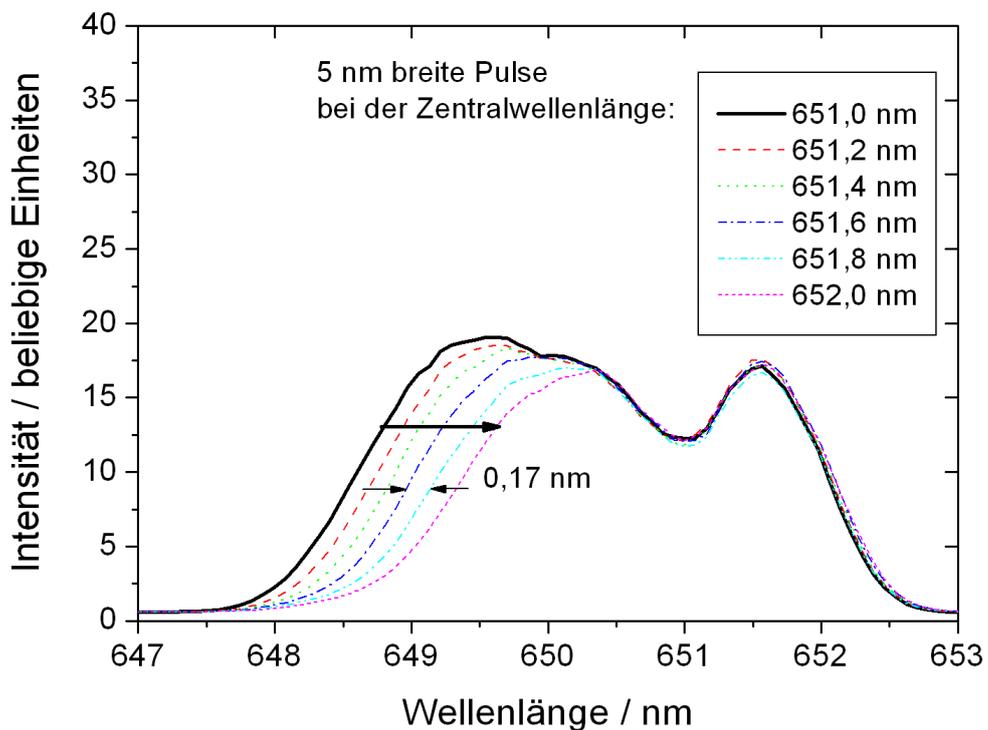
Spektrale Auflösung

Für die spektrale Auflösung des DAZZLERS (s. auch [52]) gibt es zwei sinnvolle Definitionen: Zum einen lässt sich eine Angabe über die minimal mögliche Schrittweite bei der Verschiebung eines spektralen Bereichs („Fensters“) machen. So lässt sich beispielsweise die kurzwellige Flanke des gebeugten Spektrums in Schritten von etwa 0,2 nm verschieben (s. Abbildung 4.11 auf Seite 68 b). Dies wurde realisiert, indem ein 5 nm breites Filter-Fenster so zu einem durchgehenden Puls programmiert wurde, dass die linke Pulsflanke abgeschnitten wurde. Dieses Fenster wurde dann spektral verschoben.

Diese Angabe ist verschieden von der kleinsten Halbwertsbreite, die man mit dem DAZZLER aus einem Spektrum filtern kann (dies stellt die zweite mögliche Definition der spektralen Auflösung dar). Dies wird in Abbildung 4.11(a) auf Seite 68 illustriert: Das ungeformte 5 nm breite Spektrum kann mit Hilfe des Impulsformers auf eine Halbwertsbreite von 0,7 nm reduziert werden.



(a)



(b)

Abbildung 4.11: Der DAZZLER ermöglicht das Erzeugen von schmalbandigen Spektren durch spektrales Filtern. Bild (a) zeigt, wie die linke Kante des 5 nm breiten Spektrums in etwa 0,2 nm- Schritten verschoben werden kann. Der DAZZLER kann eine minimale Breite von 0,7 nm von einem 5 nm breiten Spektrum filtern. Programmiert man eine geringere Breite, wird das Spektrum sogar breiter (Bild (b)). Vgl. [52].

Transmission

Der DAZZLER arbeitet – anders als der SLM – nicht in Transmission, sondern beugt den einkommenden Laserstrahl. Deshalb stellt sich zunächst die Frage nach der Definition der Transmission; beim AOPDF sollte man besser von Beugungseffizienz sprechen. Im Gegensatz zum LC-SLM liegen hinter dem AOPDF der ungebeugte und gebeugte (=modulierte) Laserstrahl räumlich getrennt vor, was vorteilhaft genutzt werden kann.

Wird der Laserstrahl nicht gebeugt, so erhält man die in Abbildung 4.12 gezeigten schwarzen Datenpunkte, die das Verhältnis der transmittierten zur einfallenden Intensität wiedergeben. Es handelt sich hier um die Transmission der Wellenlängen zwischen 550 und bis 740 nm (mit dem OPO gemessen) und 832 nm (mit dem Ti:Sa-Laser gemessen). Die reine Transmission liegt im untersuchten Spektralbereich zwischen 80 und 98 %.

Wird eine akustische Welle durch den Kristall geschickt, so teilt sich die Intensität nach dem DAZZLER auf den ungebeugten und den gebeugten Strahl auf. Die roten Datenpunkte in Abbildung 4.12 zeigen das Verhältnis der Intensität zwischen dem gebeugten und dem einfallenden Laserstrahl. Dieses Intensitätsverhältnis ist größer als 45 % und beträgt im Bereich von 550 bis 700 nm etwa 60 - 70 %. Dies ist vergleichbar mit dem LC-SLM, da dieser in einen 4f-Aufbau integriert ist und somit Verluste an den Gittern hinzukommen.⁷

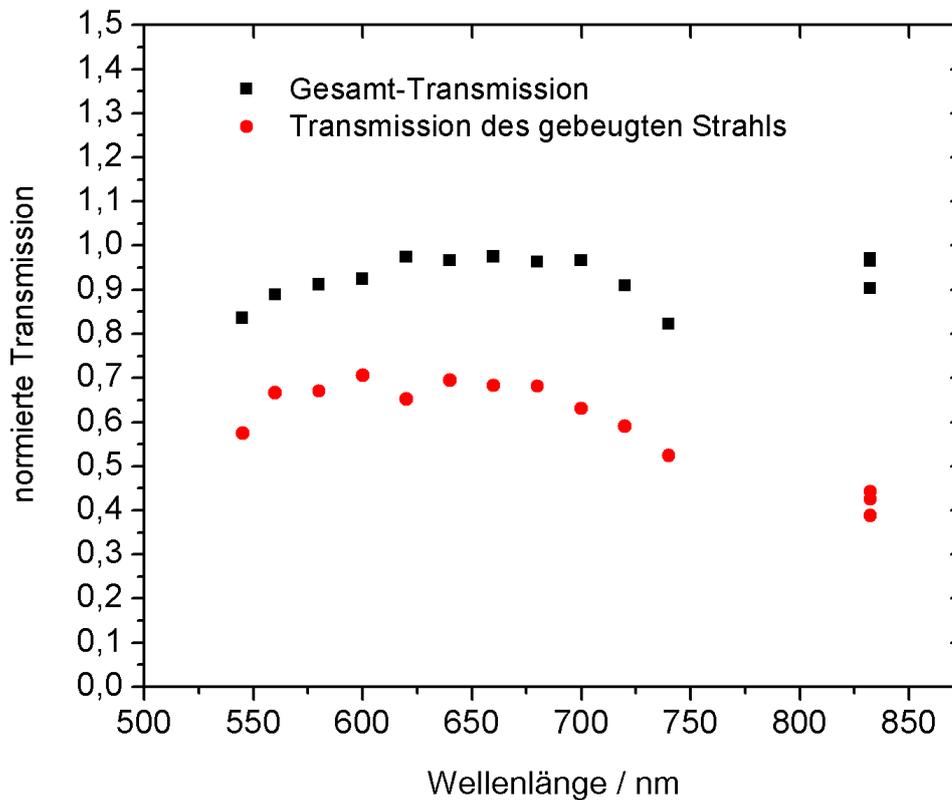


Abbildung 4.12: Transmission des DAZZLERS. Die schwarzen Datenpunkte zeigen die Transmission, wenn keine akustische Welle den einfallenden Laserstrahl beugt. Die roten Datenpunkte geben das Verhältnis der Durchschnittsleistung von dem gebeugten zum einfallenden Laserstrahl wieder. Das Spektrum hatte eine Breite von 1-3 nm und der DAZZLER wurde für eine Breite von 10 nm programmiert. Vgl. [52].

⁷Man beachte, dass bei dieser experimentellen Bestimmung der Beugungseffizienz die programmierte Halbwertsbreite *größer* als die des einfallenden Laserspektrums ist.

4.2.3 Breitband-Lichtquellen

Beide Arten von Impulsformern wurden nun für die folgenden Experimente dazu verwendet, ein breites ($\gg 10$ nm) Spektrum einer Primärlichtquelle zu modulieren, das durch eine photonische Kristallfaser (PCF) generiert wurde. Die Anforderungen an eine PCF für die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Experimente sind:

- eine hinreichende Puls-zu-Puls-Stabilität während des Experiments, um den Einfluss der ohnehin vorhandenen (und durch die nichtlineare Faser noch verstärkten) Laserfluktuationen auf die gemessene Intensität gering zu halten.
- eine möglichst einfache Justage. Damit ist insbesondere die Einkopplung mit Hilfe eines xyz-Tisches mit drei differentiellen Mikrometerschrauben⁸ gemeint, die stabil bleiben sollte. Im Idealfall nimmt man hierfür einen piezogesteuerten Tisch, der mit Hilfe einer Rückkopplungsschleife die Einkopplung stabil hält. In dieser Arbeit stand jedoch nur eine manuelle Einkopplungsmöglichkeit zur Verfügung.
- eine Null-Dispersions-Wellenlänge im für das Experiment abgestimmten spektralen Bereich. Die ZDW sollte in dem spektralen Bereich liegen, wo die Faser gepumpt wird. „ZDW“ steht für *zero-dispersion-wavelength*, übersetzt Null-Dispersions-Wellenlänge und bedeutet, dass Licht dieser Wellenlänge dispersionsfrei in der Faser propagiert.
- ein möglichst enger Kern, um eine hohe Leistungsdichte (für nichtlineare Effekte von Bedeutung) zu erzielen und die Ausbildung von höheren Schwingungsmoden zu vermeiden. Gewünscht ist nur die niedrigste Mode mit gaußförmigem Intensitätsprofil (TEM_{00}), da diese am besten mit einem Mikroskopobjektiv fokussiert werden kann.
- eine einfache Handhabbarkeit: Die Einkopplung in die Faser sollte über den Messzeitraum stabil sein. Ebenso sollte das Faserende nicht degradieren, d. h. zu empfindlich gegenüber hoher Laserleistung sein. In dieser Arbeit wurden alle Fasern daraufhin getestet, inwieweit die Leistung während der Messung stabil blieb.
- Polarisationserhaltung: Im allgemeinen ist die Ausgangspolarisation der Faser ungleich der Polarisation des Lichtes, das zum Pumpen der Faser verwendet wurde. Das Ausgangslicht ist i. Allg. auch nicht unbedingt linear polarisiert. Man verliert also einen erheblichen Anteil der Ausgangsleistung, da die Impulsformer eine definierte lineare Polarisation benötigen (s. Kapitel 4).

Alle diese Eigenschaften sind für Experimente in der Spektroskopie und Mikroskopie relevant und werden mit zunehmender Komplexität der Experimente (z. B. in der CARS-Mikroskopie) wichtiger.

⁸Solche Schrauben haben eine Auflösung von 50 nm und einen Stellweg von 300 μm .

4.3 Experimente

4.3.1 Durchstimmbare Filter auf der Basis von Superkontinuumslichtquellen

In diesem Abschnitt wird eine kompakte Lichtquelle vorgestellt, die als Hauptkomponenten eine photonische Kristallfaser enthält, die von einem Mikrochip-Laser gepumpt wird und einen Lichtmodulator zur spektralen Filterung besitzt (s. Abbildung 4.13). Die Kombination des Lasers mit der Faser stellt dabei die Primärlichtquelle dar. Sowohl der DAZZLER als auch die Flüssigkristallmaske kamen für diese Experimente zum Einsatz. Mit der Kombination aus einer PCF und eines Lichtmodulators lässt sich eine Lichtquelle konstruieren, die im Rahmen des Spektrums der PCF und der Transmission des Lichtmodulators in einem breiten Spektralbereich (s. auch Abbildung 4.14 auf Seite 72) durchstimmbar, flexibel und kompakt ist. In diesem Abschnitt werden nun der AOPDF und der SLM in ihrer Eignung als spektraler Filter miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs, der in Zusammenarbeit mit der Faserabteilung des IPHT durchgeführt wurde, wurden teilweise in [62] veröffentlicht. Die Primärlichtquelle besteht aus einer 2,5 m langen Faser, die von einem Mikrochip-Laser gepumpt wurde, der eine Repetitionsrate von 23,5 kHz bei einer Pulslänge von 650 ps hatte. Die Ausgangsleistung des Lasers betrug etwa 200 mW und wurde mit Hilfe eines Polarisators zwischen zwei Halbwellenplättchen abgeschwächt. Das so erzeugte Superkontinuum reicht von ca. 550 bis 2220 nm (s. Abbildung 4.14 auf Seite 72) mit einer Gesamtleistung von 57 mW. Die Faser wies einen Polarisationsgrad von 90 % auf [62].

Die Luftlöcher besitzen effektiv einen kleineren Brechungsindex als der Kern, so dass das Licht durch Totalreflektion geführt wird. Der große Vorteil der PCFs besteht darin, dass sich durch das Design des Faserquerschnitts (insbesondere durch die Größe der Luftlöcher d , deren Abstand Λ zueinander sowie deren Verhältnis d/Λ) die Eigenschaften der Faser in weiten Grenzen maßschneidern lassen.

Im Folgenden wurden nun der AOPDF und der LC-SLM als zwei mögliche spektrale Filter zur Modulation dieser Primärlichtquelle eingesetzt.

Der LC-SLM als durchstimmbarer Filter

Das erste Konzept zur spektralen Filterung des Superkontinuums bedient sich eines 4f-Aufbaus mit dem LC-SLM in der Fourierebene. Der spektrale Bereich von 735 bis 768 nm wurde auf die 12,8 mm breite aktive Fläche des LC-SLM abgebildet (s. Abbildung 4.15 auf Seite 73). In diesem Wellenlängenbereich beträgt die Transmission des LC-SLM 65 % (s. Abbildung 4.5 auf Seite 60).

Die Abbildung 4.15 auf Seite 73 zeigt die Transmissionsspektren, die zur Demonstration der spektralen Filterung mit dem LC-SLM aufgenommen wurden. Hierzu wurde eine unterschiedliche Anzahl von Pixeln auf volle Transmission geschaltet. Dabei diente ein Pixel bei 735 nm als

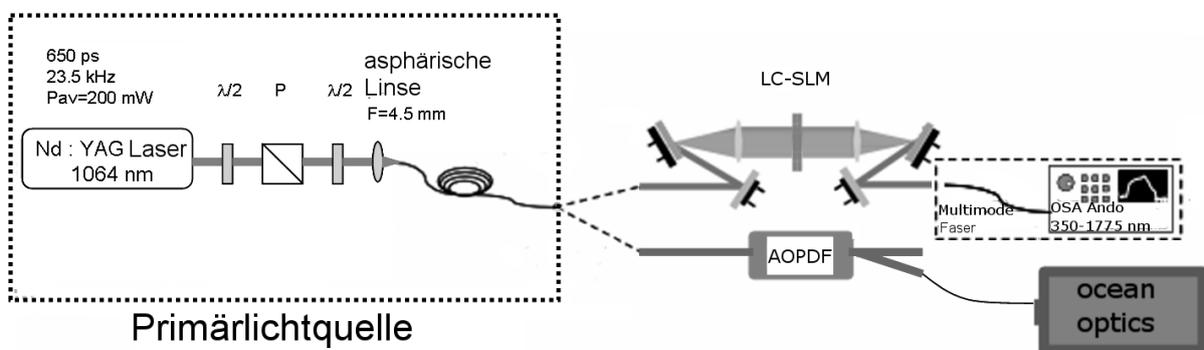


Abbildung 4.13: Experimenteller Aufbau. Als Primärlichtquelle dient eine nichtlineare Faser, die von einem kompakten Mikrochip-Laser gepumpt wird. $\lambda/2$: Halbwellenplättchen; P: Polarisator; OSA: Optical spectrum analyzer. Die Primärlichtquelle wird entweder zusammen mit dem LC-SLM oder dem AOPDF verwendet.

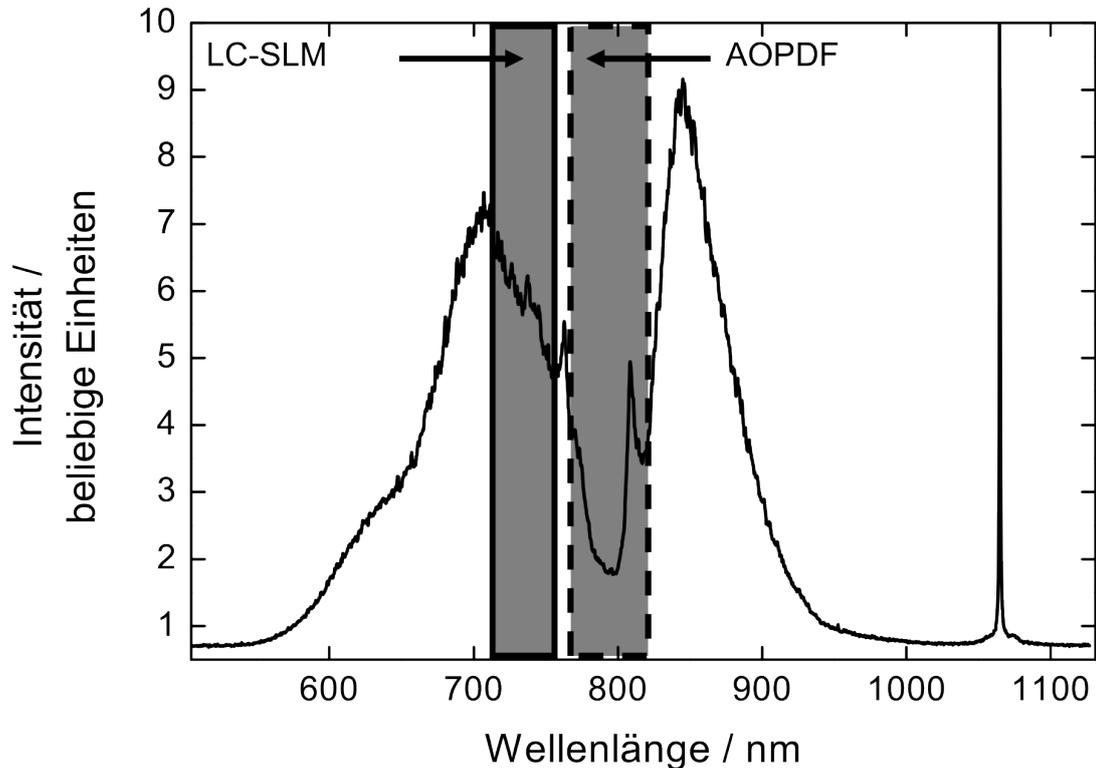


Abbildung 4.14: Spektrum der Superkontinuumslichtquelle. Es sind die spektralen Bereiche eingezeichnet, die mit dem LC-SLM bzw. dem AOPDF moduliert wurden. Deutlich ist die Pumpwellenlänge bei 1064 nm im Ausgangsspektrum der PCF zu erkennen.

Referenz, welches immer auf hell (volle Transmission) geschaltet war. In Abbildung 4.15(a) auf Seite 73 ist der Unterschied zwischen hell (Spektrum 2) und dunkel (Spektrum 1) gezeigt.

Zum Vergleich der Transmission ist es nützlich, den Hell-Dunkel-Kontrast

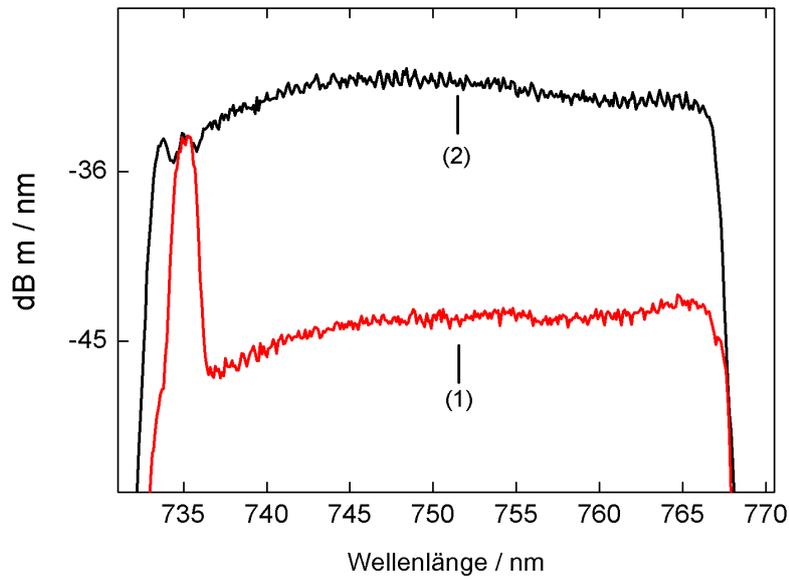
$$K := \frac{P_{max}}{P_{min}} \quad (4.22)$$

zu definieren.⁹ Im Falle des SLM war dieses Verhältnis von hell zu dunkel geschalteten Pixeln besser als etwa $K=20:1$ (s. auch Abbildung 4.15(a) auf Seite 73). Zusätzlich lassen sich mit dem SLM simultan verschiedene Pixel ansteuern, so dass eine hohe Flexibilität erreicht wird, was die Form des gewünschten Spektrums angeht. Dies könnte z. B. durch die einfache Verwendung eines in der Fourierebene verfahrbaren Schlitzes [69] nicht erreicht werden. In Abbildung 4.15 auf Seite 73 b sind die Transmissionsspektren für die volle Transmission der Pixel 60-68 (Spektrum 4) sowie für die gleichzeitige volle Transmission der Pixel 40-60 und 80 dargestellt, wenn alle anderen Pixel dunkel geschaltet sind.

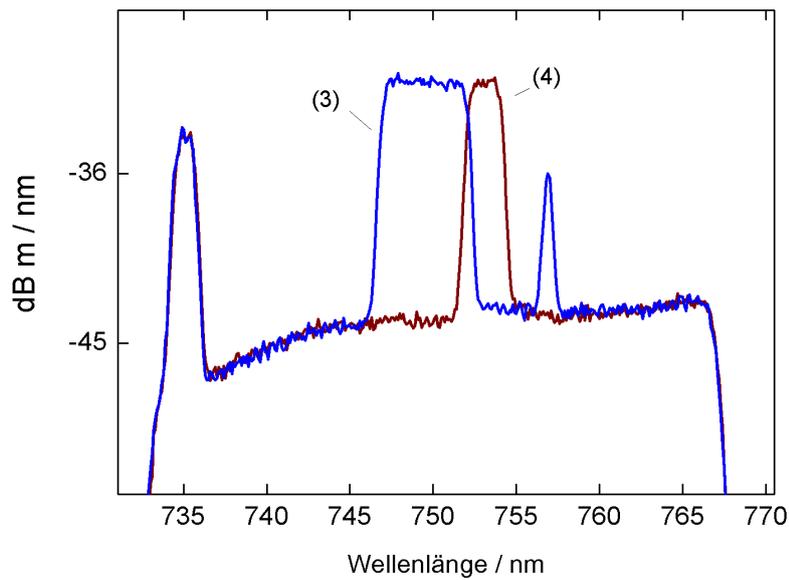
Die spektrale Auflösung dieses 4f-Aufbaus ist besser als 1 nm/Pixel, was bei der verwendeten Zentralwellenlänge ca. $20\text{-}30 \text{ cm}^{-1}/\text{Pixel}$ entspricht. Dies ist z. B. für Experimente in der Fluoreszenzspektroskopie bereits ausreichend. Hingegen sind RAMAN-Banden, insbesondere in dem „Fingerprint“-Spektralbereich oft weniger als 10 cm^{-1} breit; hier muss durch Auswahl geeigneter Gitter und Linsen (s. Abschnitt 4.2.1) die Auflösung erhöht werden.¹⁰

⁹Diese Definition unterscheidet sich von derjenigen in [52], um den LC-SLM besser mit dem AOPDF vergleichen zu können.

¹⁰Falls eine höhere Auflösung erforderlich sein sollte, können Gitter mit höherer Strichzahl und/oder Linsen mit längerer Brennweite eingesetzt werden (s. o.).



(a)



(b)

Abbildung 4.15: Mit dem LC-SLM modulierte Spektren. Die schwarze Kurve (2) in Bild (a) stellt die volle Transmission des LC-SLMs dar. Die rote Kurve entsteht bei Null-Transmission (128 Pixel bis auf Referenzpixel bei 735 nm). In Bild (b) wird die Flexibilität des LCM demonstriert: Die blaue Kurve (3) zeigt die Transmission des SLM, wenn gleichzeitig die Pixel 40 bis 60 und Pixel 80 auf volle Transmission geschaltet sind. Spektrum (4) zeigt die Transmission von Pixel 60 bis 68. Für Referenzzwecke war das Pixel bei 735 nm immer auf volle Transmission geschaltet.

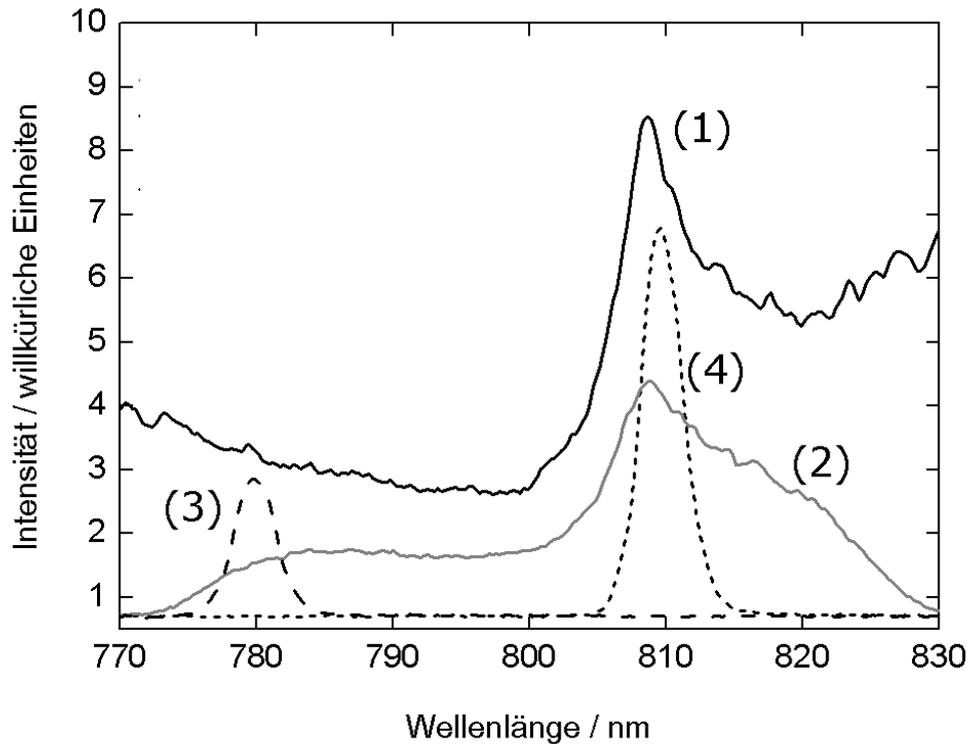


Abbildung 4.16: Mit dem AOPDF modulierte Spektren. Die durchgezogene schwarze Kurve (1) stellt noch einmal einen Ausschnitt des Spektrums der Primärlichtquelle im Bereich von 770 bis 840 nm dar. Die durchgezogene graue Kurve (2) zeigt das modulierte Spektrum mit einer programmierten Halbwertsbreite von 50 nm und die gestrichelten Kurven (3) und (4) das modulierte Spektrum mit einer Breite von 5 nm.

Der AOPDF als durchstimmbarer Filter

Der zweite Aufbau hinter der Primärlichtquelle verwendet den DAZZLER zur spektralen Impulsformung. Aufgrund der Tatsache, dass der gebeugte Strahl räumlich getrennt vom ungebeugten ist, beträgt der Kontrast K hier unendlich (s. Gleichung 4.22).

Die spektrale Filterung eines breiteren spektralen Bereichs durch den AOPDF ist in Abbildung 4.16 auf Seite 74 demonstriert: Die durchgezogene schwarze Kurve (1) zeigt noch einmal das unmodulierte Spektrum der Faser in diesem Wellenlängenbereich, aus dem entweder 50 nm (graue Kurve (2)) oder 5 nm breite (gestrichelte und gepunktete Kurven (3) und (4)) Stücke gefiltert wurden. Im Unterschied zu den Messungen zur Charakterisierung ist hier die Breite des eingehenden Spektrums größer als die programmierte Halbwertsbreite. Bezogen auf die einkommende Laserleistung betrug die Beugungseffizienz des 50 nm breiten gebeugten Spektrums 5 % und diejenige des 5 nm breiten 1 %.

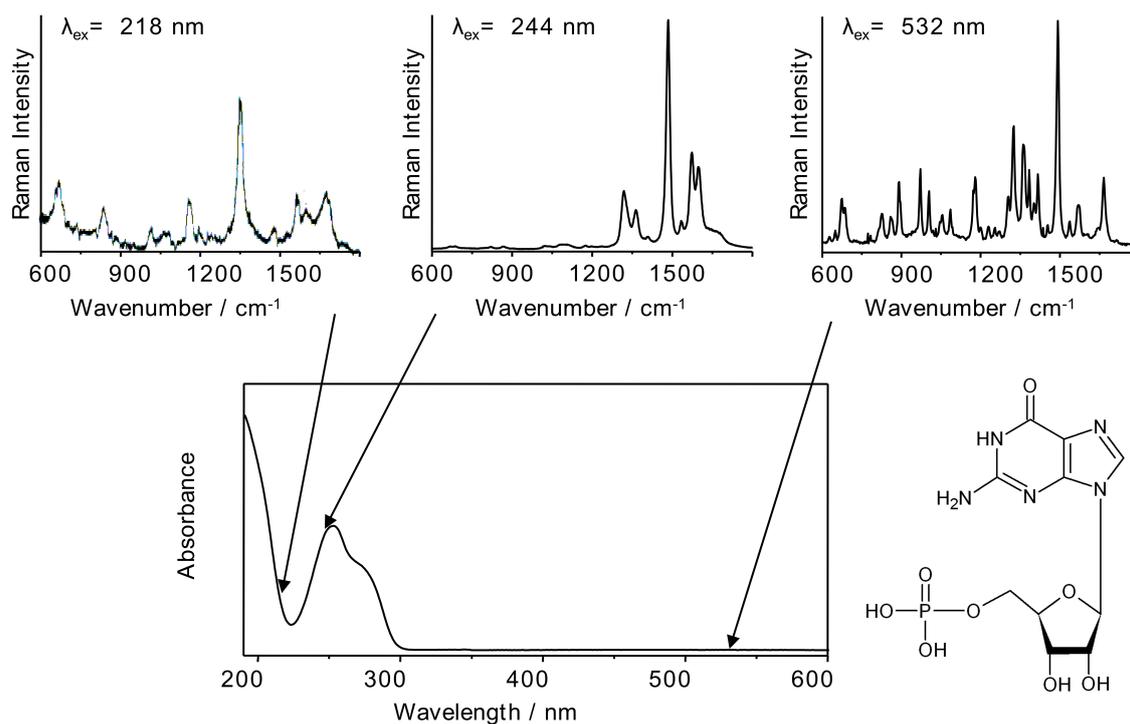


Abbildung 4.17: RAMAN-Spektren von Guanosin-5'-Monophosphat bei drei verschiedenen Wellenlängen. Die Spektren bei 218 und 244 nm sind in elektronischer Resonanz des Analyten aufgenommen worden. Entnommen aus Referenz [70].

4.3.2 Der Einsatz von LC-SLM als durchstimmbare spektrale Filter in der (RAMAN-)SPEKTROSKOPIE

Als erste Anwendung wurde der LC-SLM als durchstimmbarer, spektraler Filter eingesetzt. Solche Filter sind in der Laserspektroskopie insbesondere dann nützlich, wenn sie durchstimmbare sind und die Anregungsbreite (FWHM) schmalbandig gewählt werden kann. In der Resonanz-RAMAN-Spektroskopie (RR-Spektroskopie, s. Kapitel 2) können mit Hilfe geeigneter Wellenlängen (meist im UV) elektronisch angeregte und reale (anstatt virtueller wie bei normaler, nichtresonanter RAMAN-Streuung) Zustände für die RAMAN-Streuung verwendet werden. Solche im Vergleich zu virtuellen Niveaus langlebigen Zustände führen zu einer erhöhten RAMAN-Intensität. In der Resonanz-RAMAN-Spektroskopie können beispielsweise durch Anregung der Probe in der elektronischen Absorption Banden selektiv verstärkt werden (s. Abbildung 4.17). Idealerweise hätte man hierfür einen durchstimmbaren Laser zur Verfügung. In der Regel stehen in der RR-Spektroskopie jedoch nur diskrete, einzelne Laserlinien von Dioden- oder Gasionenlasern zur Verfügung.

Die Idee ist nun, durch die Kombination einer Primärlichtquelle mit einem breiten Spektrum (z. B. mit Hilfe einer photonischen Kristallfaser, s. auch Abschnitt 4.2.3) und eines SLM eine flexible, durchstimmbare, sekundäre Lichtquelle für die Anregung von (Resonanz-)RAMAN-Spektren zu konstruieren. Im Idealfall weist die Primärlichtquelle nicht nur ein breites Spektrum und eine hohe Leistungsdichte auf, sondern ist kompakt und einfach zu handhaben, so dass die Sekundärlichtquelle einfacher als z. B. ein durchstimmbarer OPO ist. Als Primärlichtquelle wurde für die folgenden Experimente dennoch vorerst keine Superkontinuumslichtquelle eingesetzt, da abgesehen von Leistungsschwankungen die verfügbare spektrale Leistungsdichte um etwa zwei Größenordnungen niedriger war als im Falle der OPOs. Nicht zuletzt gestaltete sich

durch die sehr gute Strahlqualität der OPOs die Justage wesentlich einfacher als im Falle der nichtlinearen Faser.

Als Demonstrationsexperiment wurde der Aufbau realisiert, wie er in Abbildung 4.18 dargestellt ist: Als Primärlichtquelle in diesem „proof-of-concept-Experiment“ dienen die Spektren zweier OPO, deren Zentralwellenlänge so gewählt ist, dass die Einzelspektren nahtlos aneinandergefügt ein etwa 10 nm breites Gesamtspektrum ergeben. Die Kombination erfolgt durch einen einfachen Strahlteiler. Anschließend erfolgt direkt die Modulation durch den SLM, der in der Fourierebene eines 4f-Aufbaus steht. Dieser besteht aus zwei Gittern (1800/mm) und zwei Zylinderlinsen mit 80 mm Brennweite. Nach der Kollimation durch das zweite Gitter wird das Anregungslicht mit dem modulierten Spektrum auf eine Küvette mit Chloroform fokussiert. Da entlang der Polarisationsrichtung der Anregung kein Streulicht abgestrahlt wird (s. Kapitel 2) und das RAMAN-Spektrum in 90°-Richtung zur Anregung detektiert wird, wurde die Polarisationsrichtung vor der Küvette mit einer $\frac{\lambda}{2}$ -Platte senkrecht eingestellt. Zu Justagezwecken wurde eine Farbstofflösung (Rhodamin 6G in Ethanol) verwendet, welche eine intensive RAYLEIGH-Strahlung emittiert. Nach der Kollimation des RAYLEIGH- bzw. RAMAN-Lichts mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs und anschließender Fokussierung auf den Faserkopf wurde das Spektrum schließlich mit Hilfe eines Spektrometers mit Peltier-gekühlter CCD (Andor, LOT) bei einer Akquisitionszeit von etwa 100 s aufgenommen. Durch Drehen des Gitters wurde das intensive RAYLEIGH-Licht, anders als die RAMAN-Intensität, nicht auf die CCD-Zeile abgebildet¹¹.

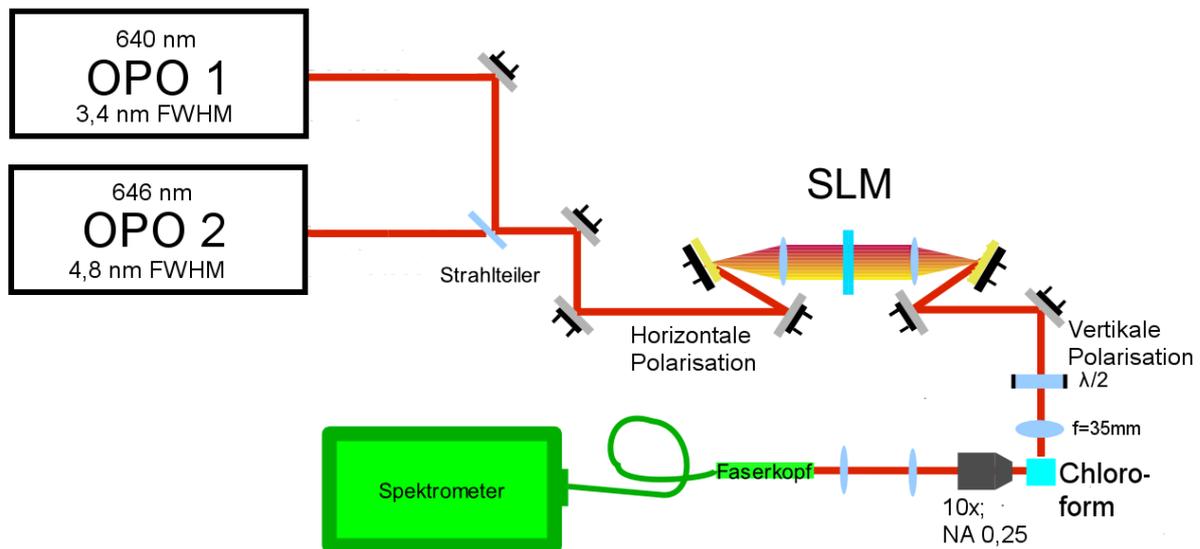


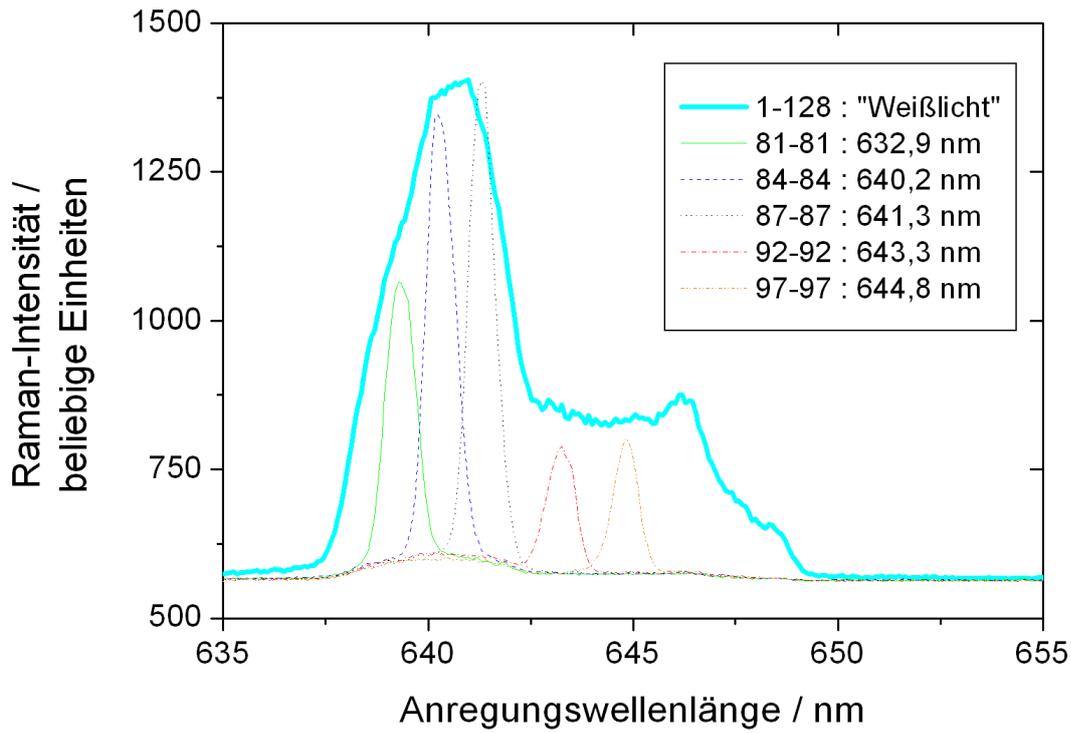
Abbildung 4.18: Experimenteller Aufbau für eine durchstimmbare Lichtquelle. Der Aufbau besteht im Wesentlichen aus einer Breitbandlichtquelle (In diesem „proof-of-concept-Experiment“ als Kombination zweier OPO), dem SLM als spektralen, durchstimmbaren Filter und einer Peltier- gekühlten CCD-Kamera, um das RAMAN-Spektrum von Chloroform (CHCl_3) aufzunehmen. Der SLM selektiert aus einem etwa 10 nm breiten Primärspektrum etwa 1 nm breite Anregungsspektren. Somit kann die Anregungswellenlänge in dem Wellenlängenbereich von 638 bis 645 nm durchgestimmt werden.

¹¹Üblicherweise wird in der RAMAN-Spektroskopie ein schmalbandiger Notch-Filter verwendet, um die RAYLEIGH-Streuung zu unterdrücken.

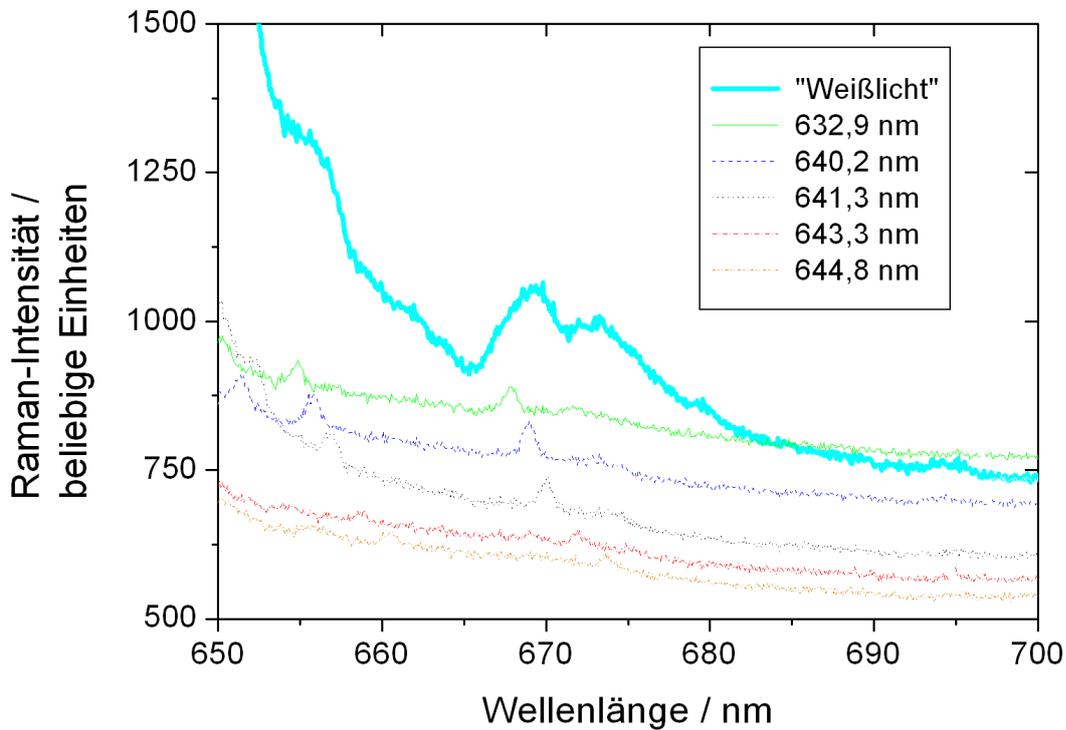
Diskussion der Ergebnisse

Die mit diesem Demonstrationsaufbau erhaltenen RAMAN-Spektren von Chloroform (CHCl_3) sind in Abbildung 4.19(b) auf Seite 78 (Rohdaten) und in Abbildung 4.20(b) auf Seite 79 (untergrundkorrigiert) zu sehen. Mit Verschieben der Anregungswellenlänge (s. Abbildung 4.19(a) auf Seite 78) mit Hilfe des LC-SLM verschiebt sich auch die Lage der RAMAN-Banden auf der Wellenlängenachse (s. Abbildung 4.19(b) auf Seite 78).

Deutlich sind in dem gezeigten Wellenzahlbereich die symmetrische CCl-Streckschwingung (670 cm^{-1}), die entartete CCl-Streckschwingung (761 cm^{-1}), die symmetrische Deformationsschwingung (366 cm^{-1}) und die entartete Deformationsschwingung (264 cm^{-1}) zu erkennen, wie sie auch in einem RAMAN-Spektrum zu sehen sind (Abbildung 4.20(a) auf Seite 79), welches mit einem kommerziellen RAMAN-Spektrometer mit einer peltiergekühlten CCD-Kamera (HORIBA-JOBIN-YVON, Anregung mit $632,8\text{ nm}$, etwa 10 mW auf der Probe) zum Vergleich gemessen wurde.

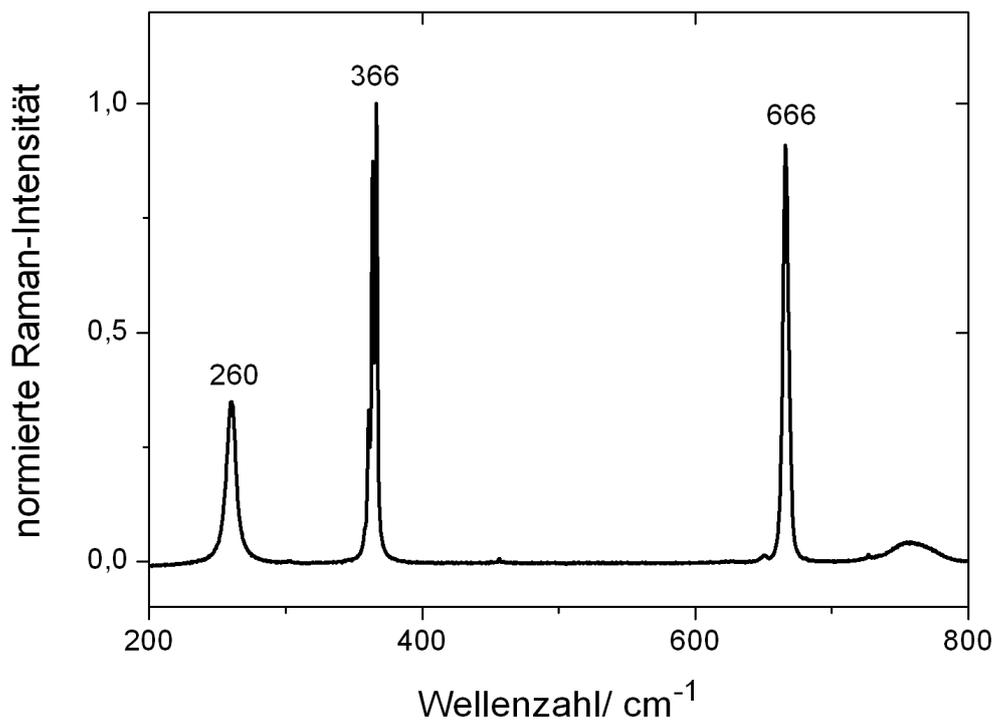


(a)

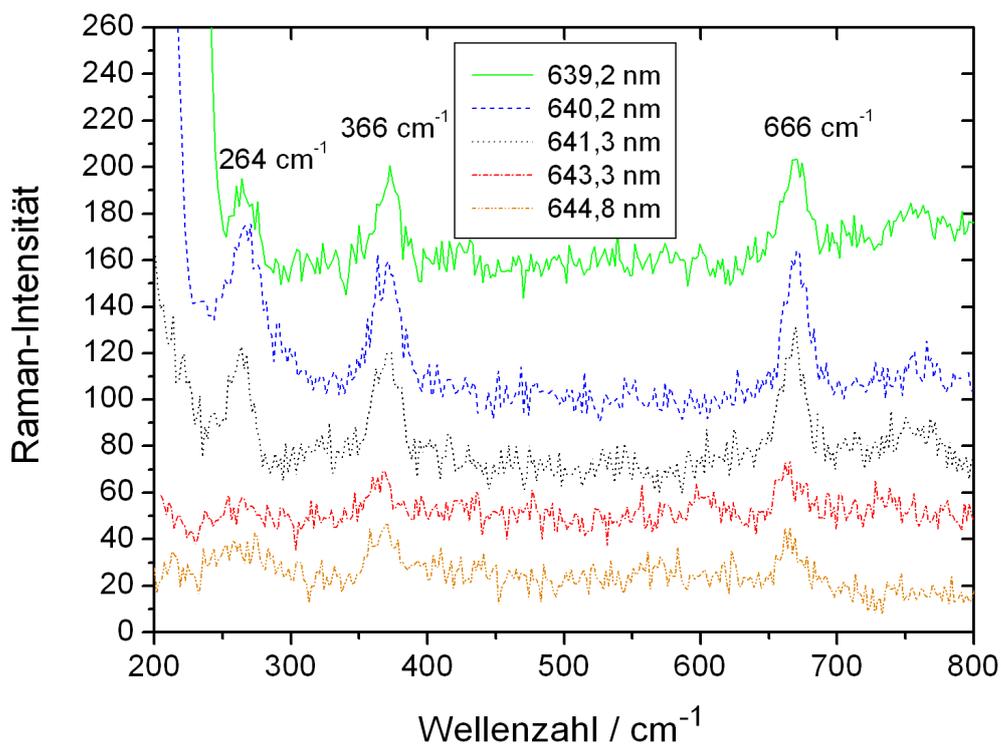


(b)

Abbildung 4.19: (a): RAYLEIGH-Streuung von Chloroform vom 12 nm breiten unmodulierten Spektrum des OPO (cyanfarbene Kurve, als „Weißlicht“ bezeichnet) und von den spektral gefilterten Spektren bei den in der Legende angegebenen Zentralwellenlängen von 632,9 bis 644,8 nm, die durch das Hellschalten eines Pixels aufgenommen wurden. (b): RAMAN-Spektren (Rohdaten), die bei den mit dem SLM durchgestimmten Anregungswellenlängen aufgenommen wurden. Vgl. [52].



(a)



(b)

Abbildung 4.20: (a): RAMAN-Spektrum von Chloroform, das mit einem konventionellen RAMAN-Spektrometer (HORIBA-JOBIN-YVON) bei 632,8 nm aufgenommen wurde, (b): Untergrundkorrigierte RAMAN-Spektren, die mit dem Demonstrationsaufbau bei den Anregungswellenlängen 639,2 bis 644,8 nm aufgenommen wurden. Der Deutlichkeit halber sind diese Spektren übereinander versetzt angeordnet. Vgl. [52].

4.3.3 Ein durchstimmbarer Filter auf der Detektionsseite

Durchstimmbarer spektraler Filter auf der Detektionsseite als Ein-Kanal-Spektrometer

Eine Flüssigkristallmaske lässt sich nicht nur als spektraler durchstimmbarer Filter für Anregungsspektren einsetzen, sondern auch auf der Detektionsseite – als Ersatz für ein Viel-Kanal-Spektrometer. Hierzu wurde das Experiment, wie es in Abbildung 4.21 dargestellt ist, aufgebaut. Das 3 bis 4 nm breite Anregungsspektrum des OPO kann zunächst mit einem ersten SLM moduliert werden (wie im Experiment in Abschnitt 4.3.2 vorher beschrieben), aufgrund der geringen spektralen Breite bietet sich hier der SLM von CRI an, da das aktive Fenster mit 12,8 mm im Vergleich zum SLM von JENOPTIK recht schmal ist. Aufgrund des Intensitätsverlusts aufgrund der Gitter und Linsen wurde jedoch zunächst auf einen 4f-Aufbau auf der Anregungsseite verzichtet.

Der JENOPTIK-Impulsformer dient nun dazu, in Kombination mit einer hinter dem 4f-Aufbau platzierten Photodiode ein Fluoreszenzspektrum von Nilblau aufzunehmen, indem sukzessive die Pixel (jeweils Streifen von 10 Pixeln, die anderen Pixel bleiben dunkel) der Flüssigkristallmaske auf volle Transmission geschaltet werden. Da Nilblau in Ethanol bei etwa 630 nm absorbiert und bei etwa 670 nm emittiert¹², wurde der OPO auf etwa 633 nm eingestellt (der Wellenlänge eines HeNe-Lasers entsprechend). Mit Hilfe eines ULWD¹³-Objektivs (20x; NA=0,4) wurde das Anregungslicht in eine 1 cm-dicke Küvette mit Nilblau in Ethanol (Absorbanz etwa 1,5) fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wurde in 180°-Rückstreurichtung durch dasselbe Objektiv wieder kollimiert und mittels zweier 650 nm-Langpassfilter vom Anregungslicht abgetrennt. Für den JENOPTIK-Lichtmodulator wurde die Transmission für 673,2 nm mit Hilfe des

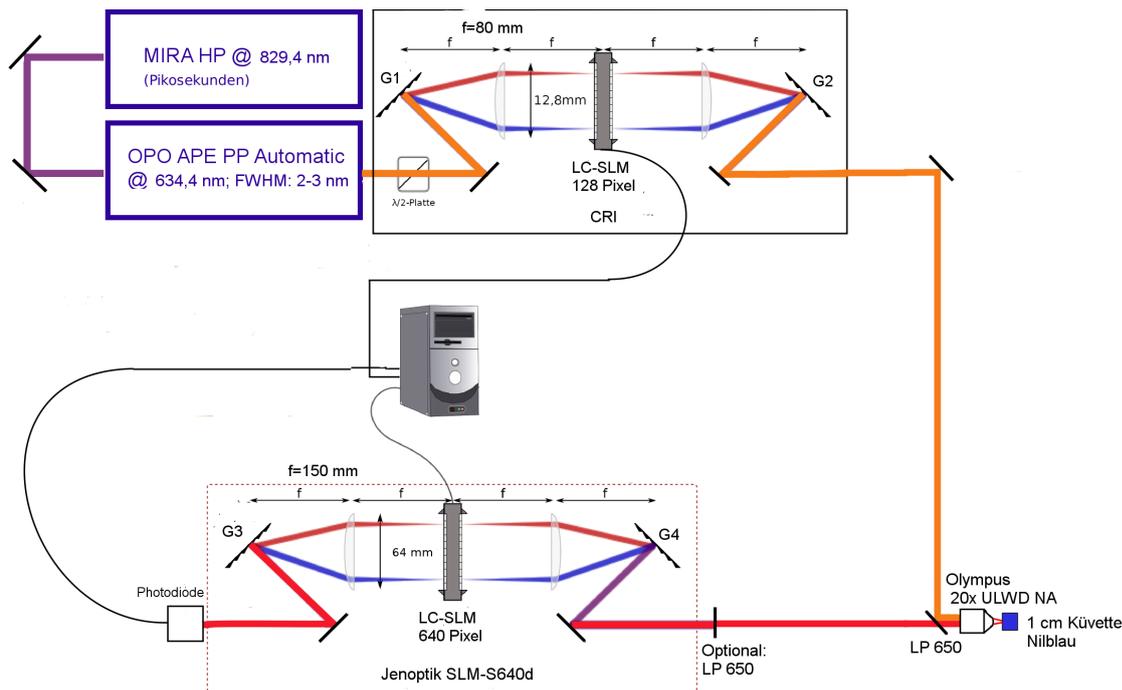
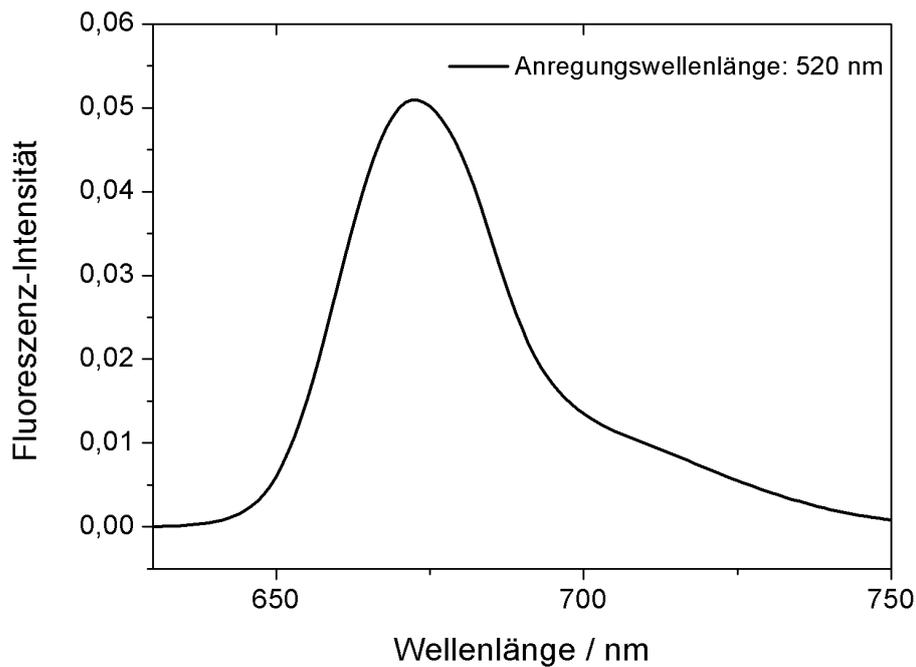


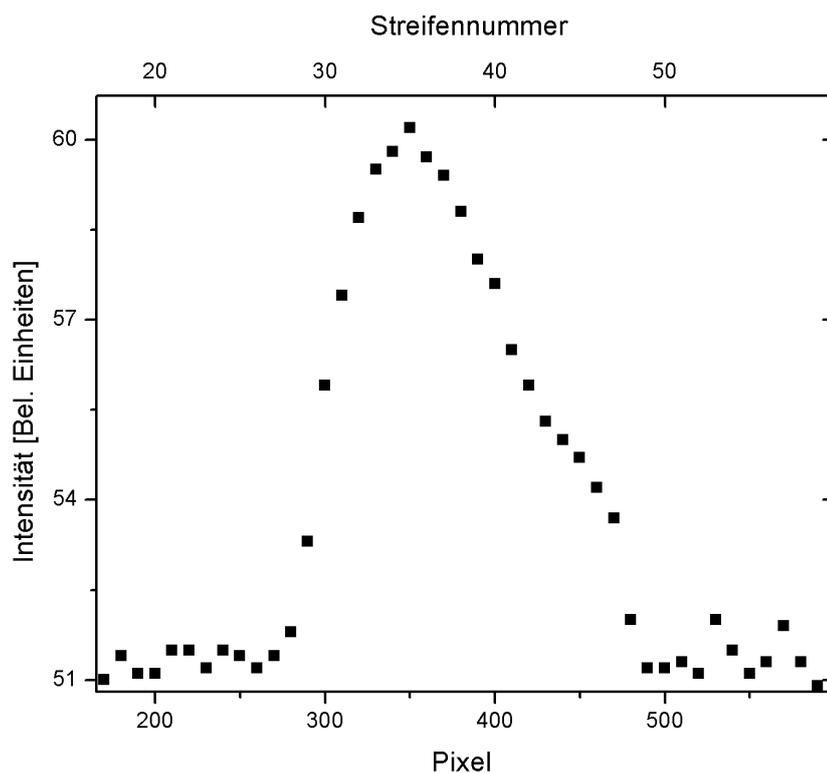
Abbildung 4.21: Experimenteller Aufbau mit zwei LC-SLM. Die Impulsformer sind in unterschiedlichen 4f-Aufbauten (G1 und G2: 1800 Linien/mm; G3 und G4: 1200 Linien/mm) integriert. Sowohl auf der Anregungs- als auch auf der Detektionsseite wird ein LC-SLM als durchstimmbarer spektraler Filter genutzt. Dabei wurde jedoch zunächst auf den ersten SLM auf der Anregungsseite verzichtet, um mehr Intensität auf der Probe zur Verfügung zu haben. Als Testprobe wurde Nilblau verwendet, ein stark fluoreszierender Farbstoff, der bei etwa 630 nm absorbiert und bei 670 nm ein Emissionsmaximum aufweist. Als Anregungslichtquelle stand der OPO im ps-Modus mit einer Ausgangsleistung von etwa 200 mW zur Verfügung.

¹²Die Lage der Absorption- und Emissionsmaxima hängt vom Lösungsmittel ab.

¹³Die Abkürzung ULWD steht für Ultra long working distance.



(a)



(b)

Abbildung 4.22: (a): Fluoreszenzspektrum, das mit einem konventionellen Fluoreszenzspektrometer (Jasco FP 6000) aufgenommen wurde. Die Anregung erfolgte bei 520 nm. b): Pseudo-Fluoreszenz-Spektrum, welches mit dem Aufbau aus Abbildung 4.21 von Nilblau aufgenommen wurde. Hierbei wurden jeweils 10 Pixel zu einem Streifen voller Transmission zusammengeschaltet und 60 Streifen aufgenommen. Die Schulter bei etwa 700 nm ist gut zu erkennen (Pixel 430). Die Kante bei etwa Pixel 475 stammt von der zu schmalen Zylinderlinse, die das Spektrum bei etwa 710 nm abschneidet.

OPOs zuvor gemessen (s. Abschnitt 4.2.2). Die Form des Fluoreszenzspektrums kann zumindest bis etwa 710 nm rekonstruiert werden. Ab dieser Wellenlänge wird das Spektrum durch die verwendete (zu schmale) Zylinderlinse im 4f-Aufbau abgeschnitten.

Wird ein 4f-Aufbau zusätzlich zur spektralen Filterung des Anregungsspektrum verwendet, muss aufgrund der hohen Intensitätsverluste an den Gittern mehr Intensität vom OPO und/oder ein empfindlicherer Detektor, z. B. ein Photonenvervielfacher, eingesetzt werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn nicht Fluoreszenz, sondern RAMAN-Streuung detektiert werden soll.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden Arbeiten vorgestellt, die zum Ziel hatten, den Einsatz von Lichtmodulatoren, die als spektrale Filter in der Laserspektroskopie entweder zur Amplitudenmodulation des Anregungs- oder des von der Probe emittierten Spektrums eingesetzt werden können, zu untersuchen.

Die Kombination von Lichtmodulatoren und Superkontinuumslichtquellen ermöglicht den Aufbau von neuartigen Lichtquellen, die es ermöglichen, nahezu jede beliebige Pulsform zu generieren. Dies wird nur eingeschränkt durch den Spektralbereich, in dem der Lichtmodulator arbeiten kann und der durch die Lichtquelle - in dem hier untersuchten Fall eine Photonische Kristallfaser - vorgegeben ist. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl mit dem LC-SLM als auch mit dem AOPDF möglich ist einen breiteren (50-100 nm) Bereich spektral zu formen. Im Prinzip sind auch andere Wellenlängen oder breitere Spektren denkbar: Nachteilig ist dann, dass beim LC-SLM die Gitter und Linsen z. B. für andere Wellenlängenbereiche oder spektrale Auflösungen neu justiert werden müssen; bei breiteren Halbwertsbreiten als 100 nm nimmt die Beugungseffizienz des AOPDF ab.

Die Demonstrationsexperimente wurden im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt, wo die beiden vorhandenen Impulsformer, die Flüssigkristallmaske und der akustooptische Modulator die höchste Transmission bzw. Beugungseffizienz besitzen; andere, interessante Spektralbereiche wie das UV (für Resonanz-RAMAN und die Fluoreszenzmikroskopie interessant) oder der IR-Bereich (CARS-Mikroskopie und IR-Spektroskopie) müssen erst noch durch die Entwicklung von Fasern im UV- Bereich und von Lichtmodulatoren im UV- und IR- Bereich erschlossen werden.

Der Vergleich zwischen der Flüssigkristallmaske und dem akustooptischen Modulator fällt ausgeglichen aus: Prinzipiell sind für die Amplitudenmodulation beide Lichtmodulatoren geeignet [62]. Der DAZZLER erweist sich als kompakter und einfacher in der Handhabung als der LC-SLM; dafür ist es aber auch schwieriger, die Parameter wie z. B. Transmission (bzw. Beugungseffizienz) und Phase unabhängig voneinander zu variieren. Zudem erschwert die Tatsache, dass eine akustische Welle mit einer Repetitionsrate im kHz-Bereich durch den Kristall geschickt wird, den Einsatz in der Mikroskopie mit Laser Scanning Mikroskopen, worauf im nächsten Kapitel noch eingegangen werden wird.

Es konnte gezeigt werden, dass ein RAMAN-Spektrum von einem starken RAMAN-Streuer bei verschiedenen Anregungswellenlängen, die durch den Impulsformer generiert werden, aufgenommen werden kann. Die Kombination eines Lichtmodulators mit einer Breitband-Lichtquelle stellt daher eine flexible, schnell durchstimmbare Lichtquelle für die RAMAN-Spektroskopie dar. Die spektrale Auflösung von etwa 25 cm^{-1} ist für die Laserspektroskopie nicht zufriedenstellend, könnte aber durch Linsen einer mit einer längeren Brennweite und einer höheren Anzahl von Pixeln der Flüssigkristallmaske gesteigert werden.

Bei einem zweiten Demonstrationsexperiment wurde nicht das Anregungsspektrum, sondern das Emissionsspektrum eines Fluophors mit Hilfe eines Impulsformers aufgenommen. Der Aufbau, bestehend aus einem OPO als Lichtquelle, dem Impulsformer als spektraler Filter und einer Photodiode als Ein-Kanal-Detektor diente dabei als Ersatz für ein Vielkanal-Spektrometer mit CCD-Zeile. Ein Emissionsspektrum kann ausreichend rekonstruiert werden. Der nächste Schritt würde in der Aufnahme eines RAMAN-Spektrums in dieser Messgeometrie bestehen; dies erfordert aber aufgrund der viel schwächeren RAMAN-Streuung eine höhere Lichtintensität bzw. einen empfindlicheren Detektor.

Die Anwendung von Lichtmodulatoren als spektrale Filter ist nicht nur für die RAMAN-Spektroskopie von Interesse. Im nächsten Kapitel geht es um die Anwendung in der CARS-Mikroskopie.

Kapitel 5

Quasi-Multiplex-CARS-Mikroskopie

5.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Ein Aufbau für CARS-Mikroskopie, wie er in Kapitel 3 beschrieben ist, hat gegenüber der RAMAN-Mikrospektroskopie den Nachteil, dass die spektrale Information, die in jedem Pixel eines RAMAN-Mikroskopbildes (ein solches stellt einen Daten-Kubus mit den Kanten $\text{Pixel}[\mu\text{m}] \times \text{Pixel}[\mu\text{m}] \times \text{Wellenzahl} [\text{cm}^{-1}]$ dar) enthalten ist, sehr begrenzt ist, nämlich genau auf den spektralen Bereich, der mit Hilfe der Zentralwellenlängen und spektralen Breiten der beiden Anregungslaser PUMP und STOKES vorgegeben ist. Ein Ausweg ist die Multiplex-CARS-Mikroskopie (s. Kapitel 2), die einen spektral schmalbandigen Pump- und einen breitbandigen STOKES zur Anregung der RAMAN-Moden verwendet. Durch den breitbandigen STOKES-Puls werden gleichzeitig mehrere RAMAN-Banden erfasst und angeregt. Entsprechend liefert die Probe ein anti-STOKES-Signal über einen breiteren spektralen Bereich. Da jedoch die spektrale Linienform des CARS-Signals durch Interferenzen der RAMAN-resonanten Beiträge mit dem nichtresonanten Hintergrund im Gegensatz zum Spektrum spontaner RAMAN-Streuung sehr kompliziert sein kann (s. auch Kapitel 2), insbesondere bei vielen eng benachbarten RAMAN-Banden, kann ein solches Spektrum nicht ohne weiteres ausgewertet werden. Die eigentliche Information (das RAMAN-Spektrum) ist im Imaginärteil der Suszeptibilität (s. Abschnitt 2.3.3) enthalten, der erst durch eine Datenanalyse aus dem ursprünglich gemessenen CARS-Spektrum extrahiert werden muss. Multiplex-CARS erfordert also nicht nur ein empfindliches CCD-Spektrometer, was den Einsatz von schnellen, komfortablen Laser Scanning Mikroskopen in Transmission erschwert, sondern auch eine sorgfältige Datenanalyse und somit Speicherplatz und Rechenkapazität.

Aufgrund dieser Nachteile ist ein Kompromiss sinnvoll, der einerseits die Komplexität eines Multiplex-CARS-Aufbaus reduziert und andererseits den Informationsgehalt eines gewöhnlichen, „single-frequency“-CARS-Aufbaus erhöht. Dieser Kompromiss lautet „Quasi-Multiplex“ (QM)-CARS-Mikroskopie. Bei dieser Technik wird wie bei Multiplex-CARS der Wellenzahlbereich durch ein breitbandiges STOKES-Spektrum vorgegeben. Das Schema für Quasi-Multiplex CARS-Mikroskopie ist in Abbildung 5.1 auf Seite 85 dargestellt.

Im Gegensatz zur gängigen Multiplex-CARS-Mikroskopie werden die RAMAN-Moden nicht simultan angeregt. Vielmehr wird aus dem breiten Spektrum die relative Wellenzahl, die einem RAMAN-Übergang entspricht, durch Amplitudenmodulation aus diesem ursprünglich breitbandigen Spektrum ausgewählt. Die Information von mehreren RAMAN-Banden wird dann hintereinander abgefragt¹.

Die experimentelle Umsetzung dieser QM-CARS-Mikroskopie besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: Einer stabilen, leistungsfähigen und gut fokussierbaren Breitband-Lichtquelle, mit der im Idealfall alle wichtigen RAMAN-Banden abgefragt werden können (also von $500 - 3500 \text{ cm}^{-1}$) und einem Impulsformer als durchstimmbarem Filter, der aus dieser Breitband-Lichtquelle die im Gegensatz zur Multiplex-CARS-Mikroskopie schmalbandigen Anregungswellenlängen sequentiell selektiert. Die RAMAN-Banden werden somit in schneller Abfolge quasi-

¹Etwa zur gleichen Zeit wurde „shaper-assisted-Multiplex-CARS“ von der Gruppe MOTZKUS demonstriert [71]. Es handelt sich hierbei um QM-CARS mit einer Flüssigkristallmaske als Lichtmodulator.

simultan abgefragt. Die spektrale Information ist dann in einer Abfolge von CARS-Bildern enthalten und kann daraus rekonstruiert werden.

In Abbildung 5.2 auf Seite 86 ist zu sehen, wie ein Aufbau zur QM-CARS-Mikroskopie im einfachsten Falle aussehen könnte. Es handelt es sich hier um den Aufbau, wie er im Rahmen des ACCORD-Projekts vorgeschlagen wurde.

Dieses Projekt hatte die Vereinfachung des CARS-Aufbaus und die Umsetzung eines QM-CARS-Schemas zum Ziel. Im Gegensatz zum konventionellen Schema (s. Abbildung 3.6 auf Seite 33) sind die beiden OPOs ersetzt worden durch die Kombination einer PCF mit dem AOPDF. Neben dem Einsatz des AOPDF als durchstimmbarem Filter bietet dieser vereinfachte Aufbau

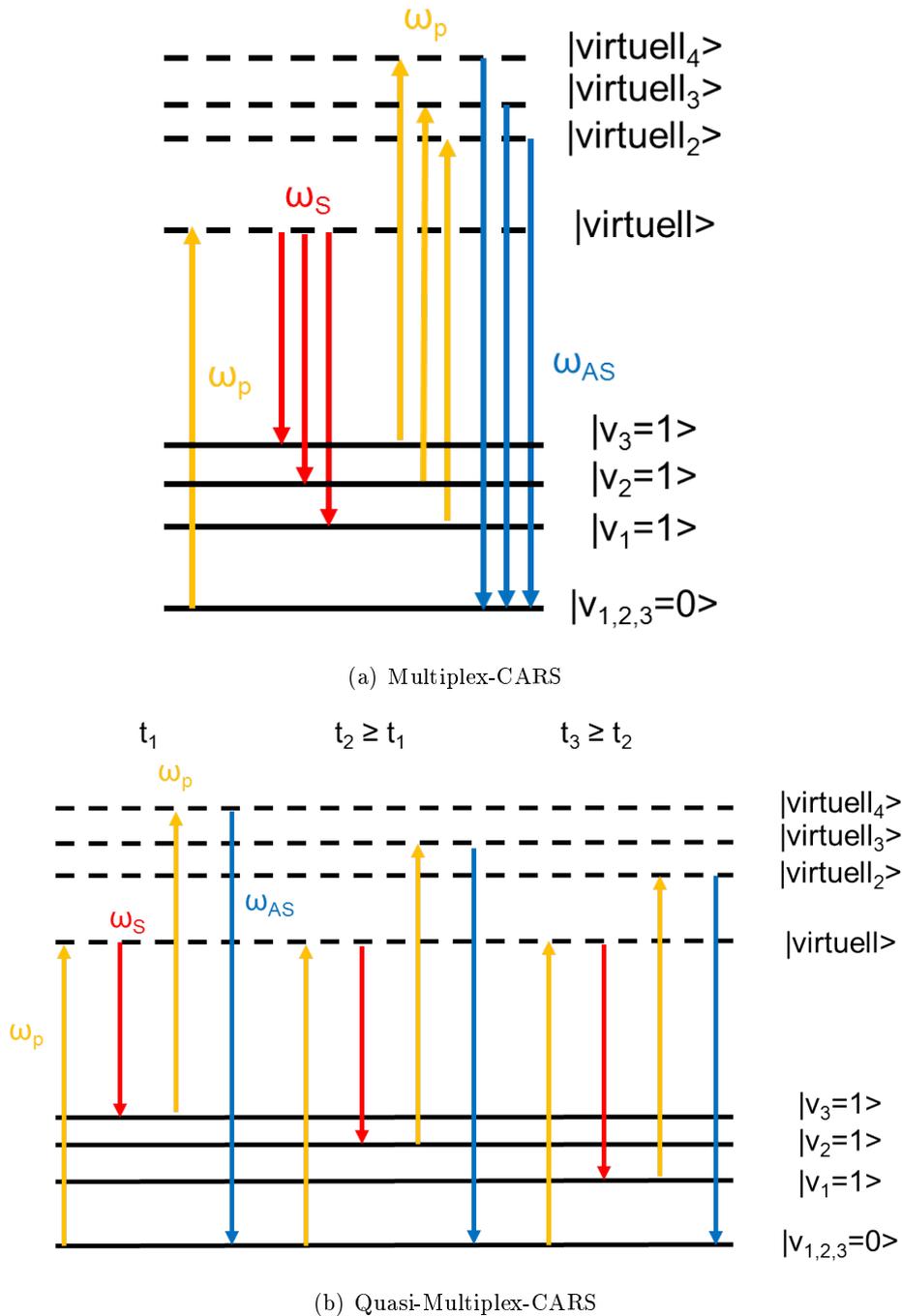


Abbildung 5.1: Schemata von Multiplex-CARS (a) und Quasi-Multiplex-CARS (b) im Vergleich. Im Gegensatz zur Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie werden die RAMAN-Banden (hier exemplarisch drei dargestellt) nicht simultan abgefragt. Vielmehr werden zu verschiedenen Zeiten t_1 bis t_3 (die aber im Bereich der Schaltzeit vom AOPDF liegen können, d. h. einige ms) die RAMAN-Banden zur chemischen Bildgebung verwendet.

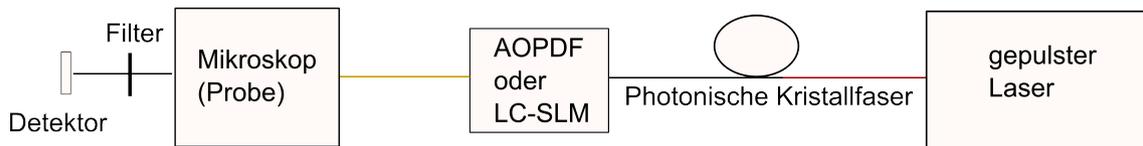


Abbildung 5.2: Schema eines vereinfachten Aufbaus für QM-CARS-Mikroskopie. Dieser Aufbau besteht aus einer photonischen Kristallfaser als Breitband-Lichtquelle und einem Lichtmodulator, der aus dem Spektrum der PCF die schmalbandige STOKES-Wellenlänge auswählt. In Verbindung mit einem Laser Scanning Mikroskop und einem gepulsten Laser hoher Repetitionsrate ist ein schnelles Schalten zwischen verschiedenen RAMAN-Banden und kurzen CARS-Bildaufnahmezeiten möglich.

die zusätzliche Möglichkeit, die unvermeidliche Dispersion durch die immer noch beträchtliche Anzahl an Optiken (insbesondere im Mikroskop) zu kompensieren. Es handelt sich bei diesem Vorschlag um ein „single-beam-CARS“-Schema, d.h. Pump- und STOKES werden aus einer einzigen Lichtquelle genutzt und nur durch den AOPDF aus dem breitbandigen Spektrum der PCF heraus moduliert.

Dies setzt natürlich eine entsprechend geeignete Lichtquelle voraus, deren Anforderungen in diesem Kapitel diskutiert werden. In dieser Arbeit wurde zunächst der AOPDF in den vorhandenen CARS-Aufbau (s. Abbildung 3.6 auf Seite 33 in Kapitel 3) integriert, um die Machbarkeit von QM-Mikroskopie zunächst am Beispiel der Wellenzahlregion $2900 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ exemplarisch zu zeigen. In einem zweiten Schritt wurde statt eines OPOs eine PCF als Breitband-Lichtquelle für den STOKES-Puls und der AOPDF zur Modulation des STOKES-Spektrums verwendet. Auf diese Weise konnte der chemische Kontrast in der Wellenzahlregion $500 - 900 \text{ cm}^{-1}$ aus CARS-Bildern rekonstruiert werden. Dieser Ansatz wird in Abschnitt 5.3.2 erläutert. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind teilweise in [72] und [73] veröffentlicht worden.

Die Idee des „Quasi-Multiplexing“ ist auf andere nichtlineare Mikroskopiearten übertragbar: So kann z. B. perspektivisch die selektive Anregung von verschiedenen Spezies auch in der Fluoreszenzmikroskopie ausgenutzt werden. Dies wurde z.B. in [74] gezeigt, wo Fluophore durch Pulsformung selektiv angeregt und somit chemisch sehr spezifische Fluoreszenzmikroskop-Bilder aufgenommen wurden.

In diesem Kapitel geht es um Demonstrationsexperimente von QM-CARS-Mikrospektroskopie mit Hilfe des durch das ACCORD-Projekt zur Verfügung gestellten AOPDF.

5.2 Material und Methoden

Für die Durchführung der QM-CARS-Experimente wurden drei Hauptkomponenten verwendet:

- eine spektral breite Lichtquelle, um einen großen Wellenzahlbereich zur Bildgebung verwenden zu können,
- ein Impulsformer, der aus dem ursprünglich breiten STOKES-Spektrum die relative Wellenzahl durch spektrale Filterung einstellt, und
- als Testprobe zur Quantifizierung des chemischen Kontrasts der in Kapitel 3 eingeführte Mikrofluidikchip mit zwei Kanälen im Bildfeld eines Mikroskopobjektivs. Im Gegensatz zu den in Kapitel 3 dargelegten Experimenten dient hier der Kanal mit der deuterierten Substanz als Referenz.

Im Folgenden werden die Anforderungen dieser drei Komponenten spezifiziert und beschrieben, wie sie in dieser Arbeit realisiert wurden.

5.2.1 Breitband-Lichtquellen für die CARS-Mikroskopie

Für die CARS-Mikroskopie sind photonische Kristallfasern (PCFs) von Interesse (s. [75], [76]), da sich mit ihnen ein sehr breites (mehrere 100 nm breites) Spektrum erzeugen lässt (s. Abschnitt 5.3.2). Die Anforderungen an eine solche photonische Faser sind in Abschnitt 4.2.3 zusammengefasst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene kommerzielle und im IPHT hergestellte photonische Kristallfasern hinsichtlich ihrer Eignung für QM-CARS-Mikroskopie charakterisiert (s. auch [52]). Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Faserabteilung des IPHT. In Abbildung 5.3 (b) ist beispielhaft ein Querschnitt einer PCF gezeigt, wie sie in den hier dargestellten Experimenten verwendet wurde. Das für eine solche Faser charakteristische Verhältnis des Loch-Durchmessers zum Loch-zu-Loch-Abstand d/Λ bestimmt neben der Faserlänge und Pump-Leistung und der Pulsdauer das Ausgangsspektrum [77].

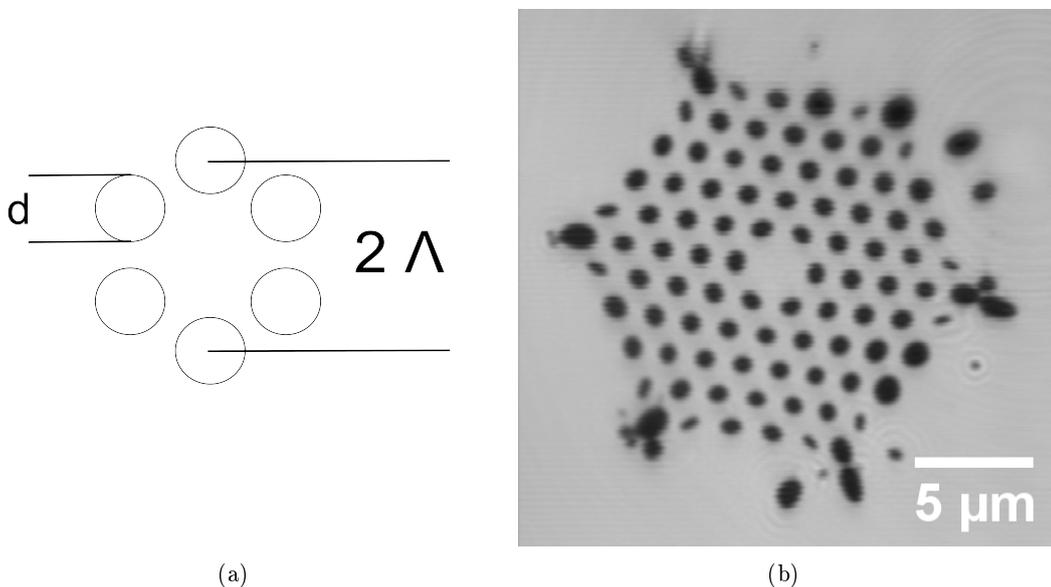


Abbildung 5.3: Typischer hexagonaler Querschnitt mit Lochdurchmesser d und Loch-zu-Loch-Abstand Λ einer Photonischen Kristallfaser (a). In Bild (b) ist der Querschnitt der Faser gezeigt, die im Quasi-Multiplex-CARS-Experiment verwendet wurde. Diese Faser wurde im IPHT hergestellt.

5.2.2 Der Mikrofluidikchip

In Kapitel 3 wurde ein Mikrofluidikchip vorgestellt, der zwei parallele Kanäle im Bildfeld eines Mikroskopobjektivs aufweist. Dies erlaubt die Definition eines Bildkontrastverhältnisses zwischen den Intensitäten in den beiden Kanälen. Im Unterschied zu den vorherigen Experimenten (s. Abschnitt 3.3) wird hier jedoch die Rolle des Analyten und der Referenzsubstanz vertauscht: Die RAMAN-Banden von undeutertem Toluol werden für die chemische Bildgebung ausgenutzt, während der mit perdeutertem Toluol befüllte zweite Kanal als Referenz dient. Das Intensitätsverhältnis definiert wiederum den Schwingungscontrast in den CARS-Bildern.

5.2.3 Der DAZZLER als „Schalter“ zwischen RAMAN-Banden

Die QM-Experimente wurden mit dem im vorhergehenden Kapitel bereits vorgestellten DAZZLER realisiert (s. Kapitel 5). Da sich der DAZZLER als durchstimmbarer Filter eignet, bietet sich der Einsatz als „Schalter“ zwischen verschiedenen RAMAN-Banden in der CARS-Bildgebung an. Bei der Verwendung eines Laser Scanning Mikroskops stößt man jedoch auf einen Artefakt: Da die Wiederholfrequenz von etwa 33 kHz, mit der die akustische Welle durch den Kristall des DAZZLERS geschickt wird, nicht mit der Rasterfrequenz des Laser Scanning Mikroskops synchronisiert ist, kommt es bei der Bildaufnahme zu einem diagonalen Streifenmuster (s. Abbildung 5.4 auf Seite 89), wenn der Laser von links nach rechts (und von oben nach unten) die Probe abrastert. Durch Variation der Scangeschwindigkeit und/oder Mittelung von mehreren Bildern kann dieses Streifenmuster abgeschwächt, aber nicht vollständig unterdrückt werden. In Abbildung 5.4 auf Seite 89 ist das Streifenmuster durch zeilenweise Fouriertransformation herausgefiltert worden. Im Folgenden sind aufgrund des Streifenmusters die gezeigten CARS-Intensitätsprofile entsprechend geglättet worden.

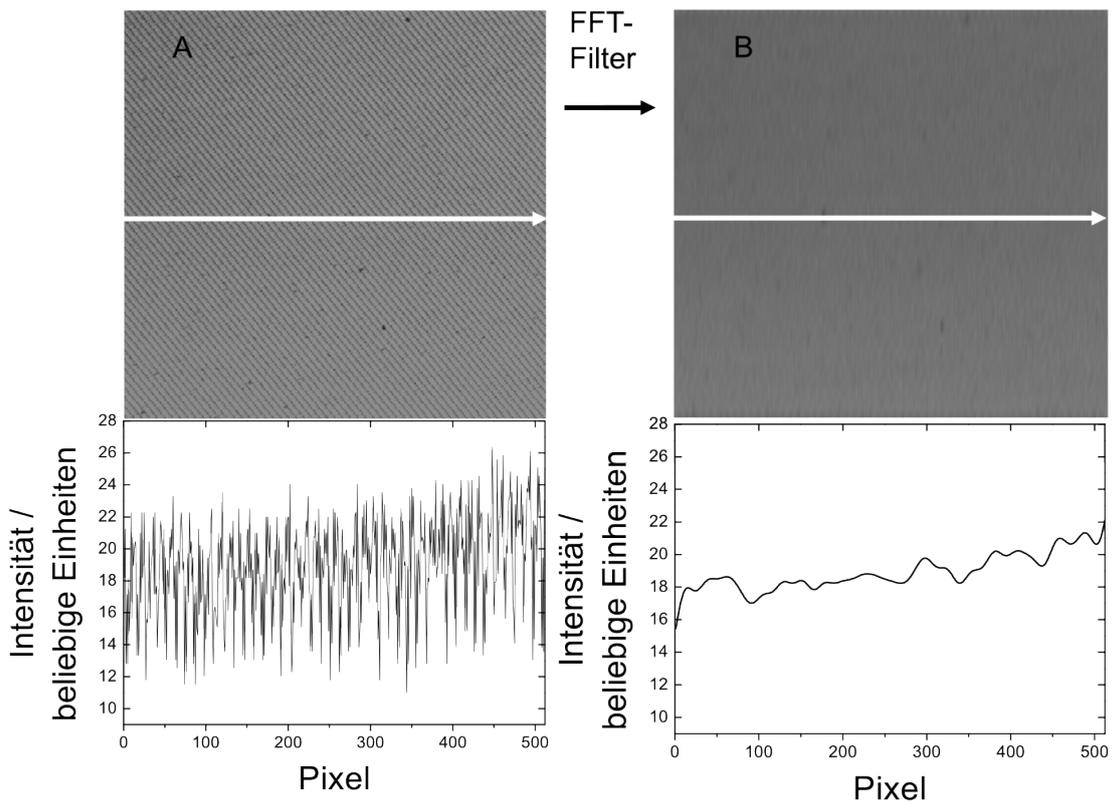


Abbildung 5.4: Bild A: Laser-Scanning-Bild eines Glasobjektträgers mit dem AOPDF im Strahlengang eines HeNe-Lasers. Die diagonalen Streifen im Bild resultieren aus Nicht-Übereinstimmung der Laseranfrequenz und der Repetitionsrate der akustischen Welle, die nicht miteinander synchronisiert sind. Bild B: Dasselbe Bild nach zeilenweiser Fouriertransformation. Unterhalb der Bilder ist jeweils entlang der weißen Pfeile das Intensitätsprofil gezeigt.

5.3 Experimente

5.3.1 Die selektive Anregung von RAMAN-Banden im CH-Streckschwingungsbereich

Demonstration mit Pikosekundenpulsen

Mit dem DAZZLER wurde demonstriert, dass durch Modulation des Anregungsspektrums der Schwingungscontrast in den entsprechenden CARS-Bildern manipuliert werden kann. Der DAZZLER modulierte dabei entweder das Spektrum des Pump- oder des STOKES-Pulses. Das zu modulierende Spektrum wird dabei vom OPO erzeugt, der ein 3 nm (ca. 44 cm^{-1}) breites Spektrum liefert. Mit dem DAZZLER wurde dann ein 1,25 nm ($28,5\text{ cm}^{-1}$) breites Spektrum selektiert, um entweder bei 661,8 nm (resultierend in einer Wellenzahldifferenz von 3086 cm^{-1}) oder bei 660,8 nm (einer Wellenzahldifferenz von 3064 cm^{-1} entsprechend) ein CARS-Bild aufzunehmen. Die Wellenzahldifferenz von 3086 cm^{-1} sollte dabei zur Anregung der aromatischen CH-Streckschwingung von Toluol (s. RAMAN-Spektrum in Abbildung 3.10 auf Seite 38) führen. In Abbildung 5.5 sind die resultierenden CARS-Bilder für 3086 cm^{-1} (Bild a) und 3064 cm^{-1} (Bild b) gezeigt. In Bild (a) ist die Intensität des CH-Toluol-Kanals im Vergleich zum Referenzkanal erhöht; Bild (a) zeigt im Gegensatz zu (b) erhöhten Bildkontrast, welcher allein durch die Amplitudenmodulation des STOKES-Spektrums erreicht wurde. Offenbar handelt es sich bei Bild (a) um ein Bild mit Raman-resonantem Beitrag, während Bild (b) nur den nichtresonanten Beitrag zeigt. Somit konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe des DAZZLERS RAMAN-resonante bzw. nichtresonante Bedingungen einstellen lassen. Dies stellt aber noch kein

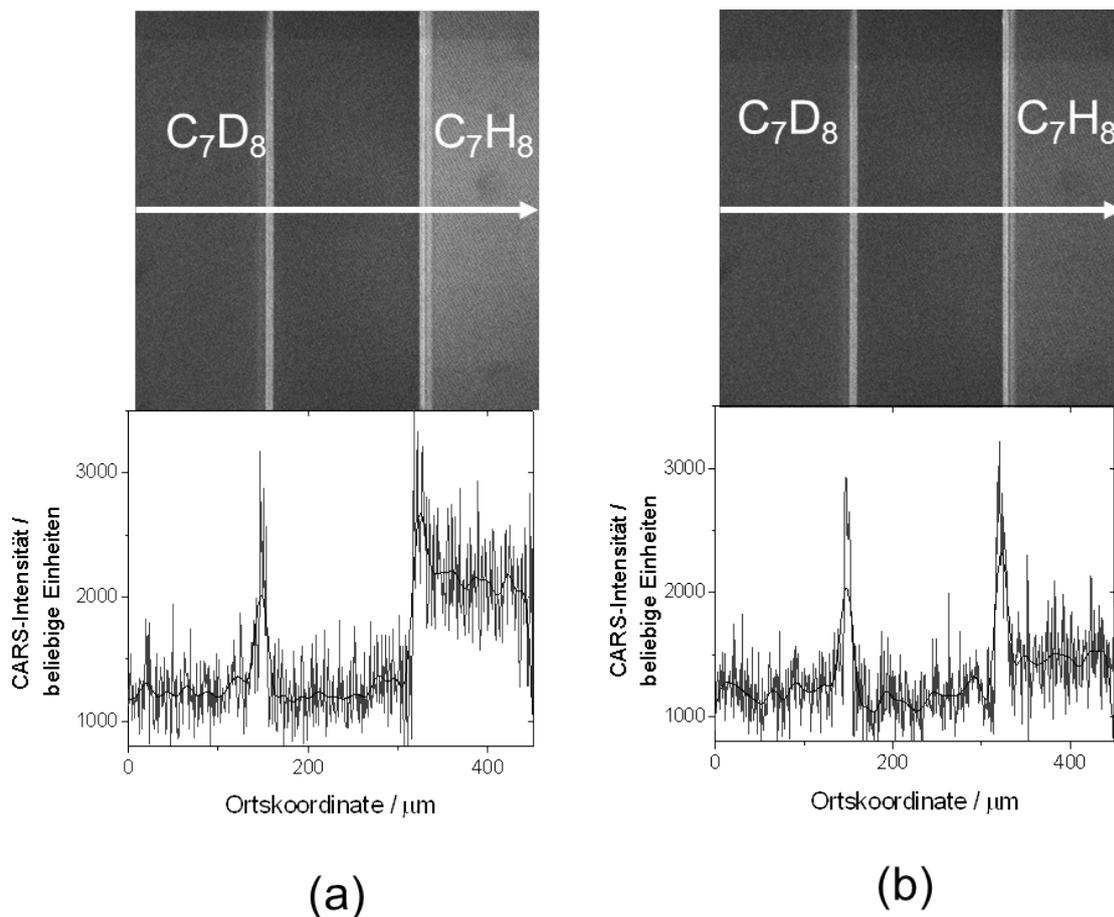


Abbildung 5.5: CARS-Bilder des Mikrofluidikchips unter resonanter Anregung (Bild a) und nichtresonanter Anregung (Bild b) von Toluol. Die Intensitätsprofile sind aufgrund des vom DAZZLER verursachten Streifenmusters geglättet worden. Offensichtlich ist es möglich, mit Hilfe des DAZZLERS zwischen RAMAN-resonanten und nichtresonanten Bedingungen zu schalten.

Quasi-Multiplexing dar, weil nicht zwischen unterschiedlichen RAMAN-Banden geschaltet wird. Dazu ist eine größere Anregungsbandbreite, wie sie mit Femtosekundenpulsen erreicht werden kann, notwendig.

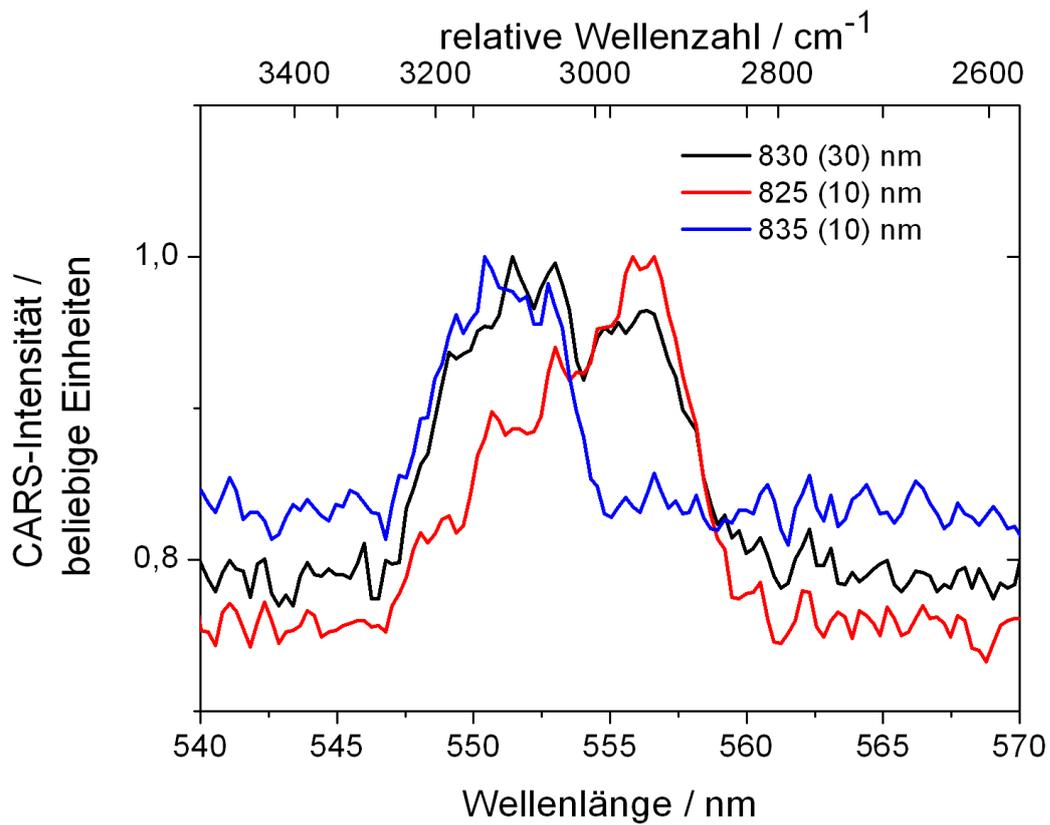
Selektive Auswahl von RAMAN-Banden zur chemischen Bildgebung

Die 170 cm^{-1} spektral breiten Femtosekundenpulse ermöglichen das Schalten zwischen RAMAN-Banden. Die Idee des QM-CARS wurde zunächst anhand der CH-Streckschwingung von Toluol demonstriert. Toluol besitzt in diesem Wellenzahlbereich zwei ausgeprägte RAMAN-Banden, die asymmetrische CH-Streckschwingung bei 2920 cm^{-1} und die symmetrische bei 3057 cm^{-1} (s. auch RAMAN-Spektrum in Abbildung 3.10 auf Seite 38). Wird nun für CARS-Mikroskopie der Laser im fs-Modus eingesetzt, so lassen sich, wenn die Zentralwellenlänge des Lasers (830 nm) zusammen mit dem schmalbandigen OPO² ($1,5\text{ nm}$) auf die Wellenzahldifferenz von 3000 cm^{-1} abgestimmt wird, mit Hilfe der relativ großen spektralen Breite von ca. 170 cm^{-1} beide Raman-Banden von Toluol in der CH-Streckschwingungsregion anregen. Im Gegensatz zu dem Experiment mit Pikosekundenpulsen wird hier das STOKES-Spektrum moduliert. Die selektive Anregung einer, beider oder keiner von den beiden RAMAN-Banden lässt sich sowohl spektroskopisch (s. Abbildung 5.6(a) auf Seite 92) als auch unter dem Mikroskop (s. Abbildung 5.6(b) auf Seite 92) mit Hilfe des Mikrofluidikchips demonstrieren. Die Zentralwellenlänge des MIRA ist mit 830 nm gerade so gewählt, dass zusammen mit der Pump-Wellenlänge bei $665,7\text{ nm}$ die Differenzwellenzahl von 2974 cm^{-1} zwischen die beiden RAMAN-Banden von Toluol fällt.

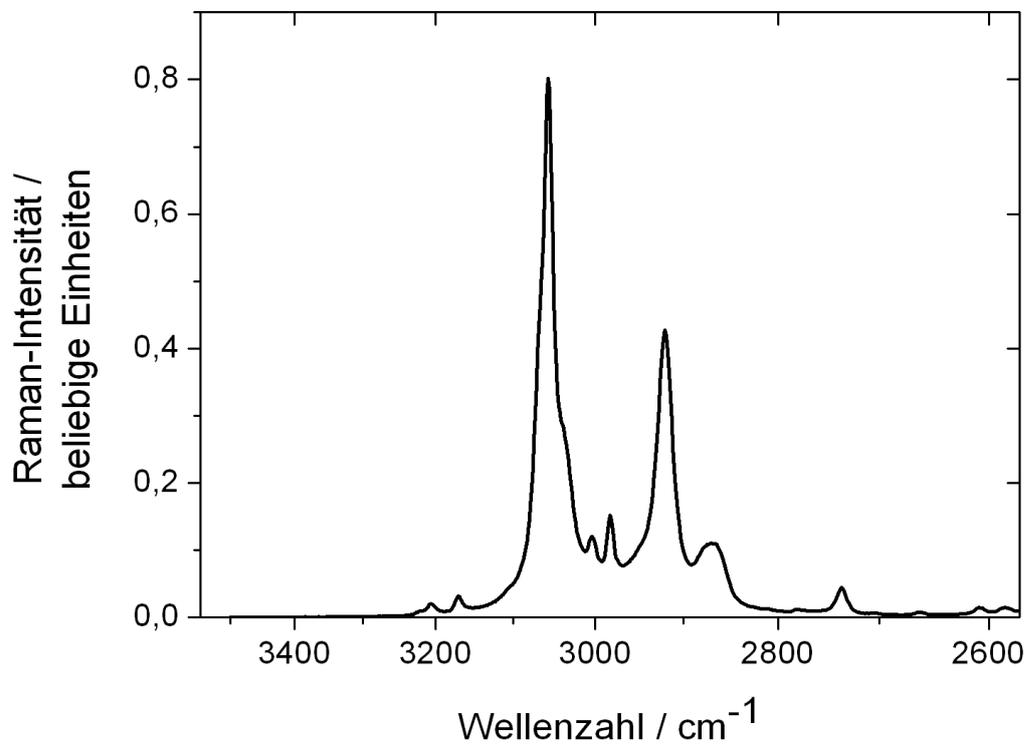
Obwohl der Vorteil von QM-CARS gerade darin besteht, dass *kein* Spektrometer benötigt wird, ist es trotzdem instruktiv, Quasi-Multiplex-CARS – nicht zuletzt als Kontrolle – spektral zu betrachten. Deshalb wurden (s. auch Kapitel 3) Quasi-Multiplex-CARS-Spektren in kollinearer Anregungsgeometrie aufgenommen. Pump und STOKES wurden stark mit einem 10 x- Objektiv in eine Küvette mit Toluol fokussiert. Mit Hilfe des DAZZLERS wurde nun die Wellenlänge des STOKES spektral gefiltert und das anti-STOKES-Signal mit Hilfe eines Spektrometers detektiert (Vgl. auch Abschnitt 3.3.2 in Kapitel 3). In Abbildung 5.6 auf Seite 92 sind CARS-Spektren gezeigt, die mit dem DAZZLER im Strahlengang aufgenommen wurden. Dabei war es möglich, selektiv eine der beiden RAMAN-Banden von Toluol anzuregen. Hierzu wurde ein Filterfenster von 10 nm um die Zentralwellenlänge 825 nm (rotes Spektrum) oder 835 nm (blaues Spektrum) programmiert, so dass eine relative Wellenzahl von entweder 2900 cm^{-1} oder 3045 cm^{-1} resultierte. Ebenso war die simultane Anregung beider Banden möglich (schwarzes Spektrum).

Innerhalb eines 170 cm^{-1} breiten STOKES-Spektrums ist es also möglich, mit Hilfe des DAZZLERS zwischen zwei RAMAN-Banden innerhalb dieses Wellenzahlbereichs zu schalten. Kann mit diesem STOKES-Spektrum nur eine RAMAN-Bande zur Bildgebung verwendet werden, so erlaubt es der DAZZLER, die Breite des modulierten Spektrums anzupassen, so dass der chemische Bildkontrast optimiert wird.

²Dieses schmalbandige Spektrum kann durch Wahl eines Dispersionsblocks mit geeigneter Länge erreicht werden.



(a)



(b)

Abbildung 5.6: Multiplex-CARS-Spektren von Toluol und das RAMAN-Spektrum im entsprechenden Wellenzahlbereich zum Vergleich.

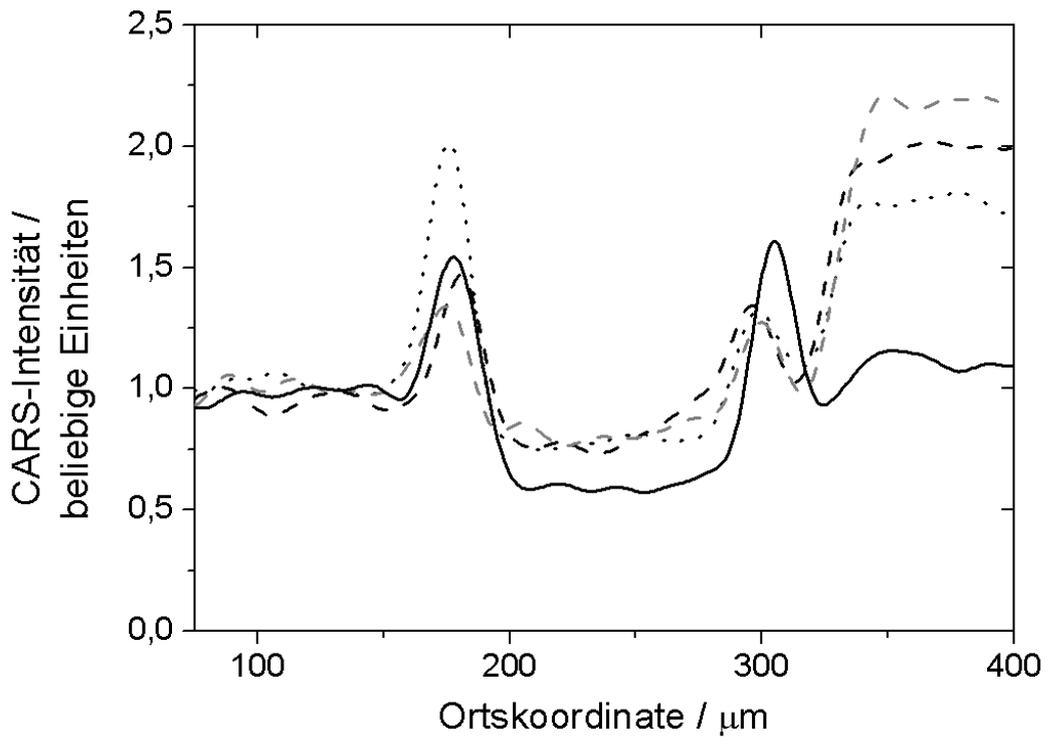


Abbildung 5.7: CARS-Intensitätsprofile vom Mikrofluidikchip bei verschiedenen Halbwertsbreiten des STOKES-Spektrums. Die Intensitätsprofile sind auf den nichtresonanten Hintergrund von deuteriertem Toluol im linken Kanal normiert. Die durchgezogene schwarze Kurve zeigt das Intensitätsprofil, wenn aufgrund des gewählten Anregungsspektrums (830 nm mit einer FWHM von 5 nm, d. h. Platzierung der Differenzfrequenz von Pump und STOKES genau zwischen die beiden RAMAN-Banden von Toluol im CH-Streckschwingungsbereich) kaum chemischer Bildkontrast generiert wird.

Erhöhen des chemischen Kontrasts durch Modulation der Halbwertsbreite

Der chemische Kontrast eines CARS-Bildes hängt u. a. von der Breite des Anregungsspektrums ab, welches vom DAZZLER geformt werden kann. Mit dem DAZZLER im STOKES-Strahlengang wurde die Halbwertsbreite des Stokes-Spektrums moduliert. Dabei ging es darum, zu zeigen, dass man mit Hilfe des DAZZLERS nicht nur zwischen verschiedenen RAMAN-Banden schalten kann, sondern den Kontrast, der durch eine RAMAN Bande erzeugt wird, gezielt verbessern kann.

Die Zentralwellenlänge wurde dabei nicht verändert und entsprach zusammen mit dem Pump-Laser einer relativen Wellenzahl von 2920 cm^{-1} , um die aromatische CH-Streckschwingung von Toluol zur Bildgebung zur verwenden. Bei einer unveränderten Halbwertsbreite von 12 nm (174 cm^{-1}) ist kaum chemischer Kontrast von Toluol gegenüber perdeuteriertem Toluol zu erkennen (s. schwarze Kurve in Abbildung 5.8), während bei einer reduzierten Halbwertsbreite von 5 nm der Bildkontrast, der durch das Intensitätsverhältnis der beiden Kanäle gegeben ist, um den Faktor 1,5 erhöht wird (blaue Kurve).

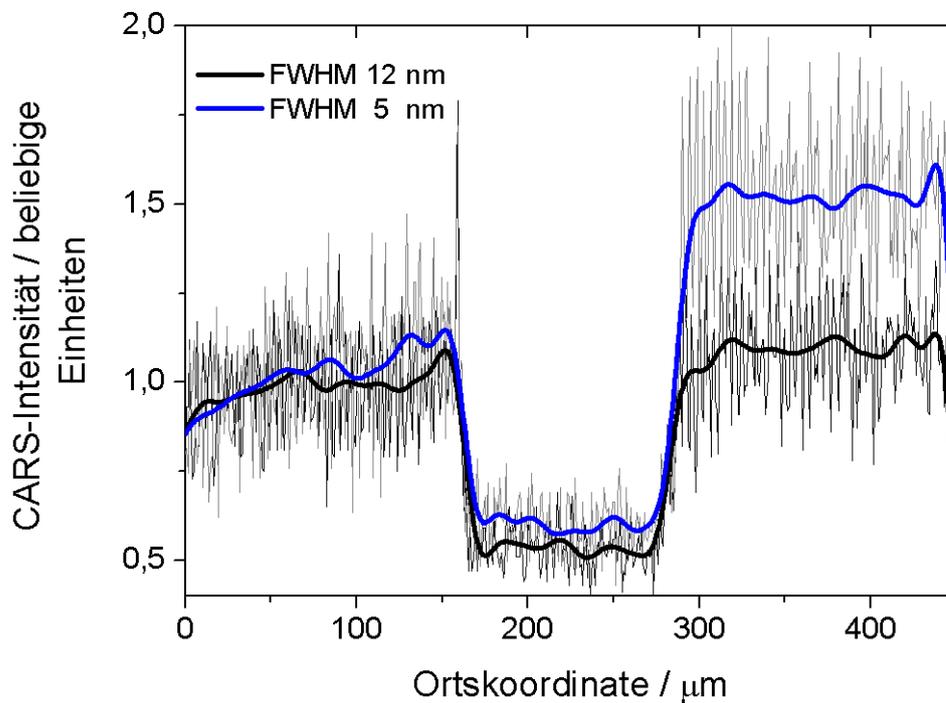


Abbildung 5.8: CARS-Intensitätsprofile vom Zweikanal-Mikrofluidikchip bei breiter (12 nm) und schmalbandiger (5 nm) Anregung. Bei schmalbandiger Anregung wird der chemische Kontrast von Toluol (rechter Kanal) gegenüber perdeuteriertem Toluol (im linken Kanal) sichtbar. Beide Intensitätsprofile sind auf denselben nichtresonanten Hintergrund normiert worden.

5.3.2 Rekonstruktion des CARS-Linienprofils im Wellenzahlbereich 500 bis 900 cm^{-1}

Da man durch den fs-Oszillator auf eine Bandbreite von ca. 170 cm^{-1} beschränkt ist, bieten sich für die Bildgebung von RAMAN-Banden von 500 bis in die für CARS-Mikroskopie interessanten CH-Wellenzahlregionen von etwa 3100 cm^{-1} sogenannte Superkontinuumslichtquellen an. Insbesondere photonische Kristallfasern bieten hier die Möglichkeit, durch gezieltes Maßschneidern von Parametern der Querschnittsgeometrie [77] nahezu beliebige Spektren zu erzeugen. Die Vorhersage und Simulation von Spektren ist jedoch nicht trivial, da verschiedene Prozesse wie RAMAN-Streuung, Vier-Wellenmischung, Selbstphasenmodulation und Solitonen-Teilung beitragen und sich wechselseitig beeinflussen. Nichtlineare Fasern lassen sich in der CARS-Mikroskopie auf zweierlei Weise einsetzen:

- Die Wellenlängen von Pump und STOKES werden gleichzeitig aus derselben Faser verwendet. Dies hat den Vorteil, dass die beiden Pulse bereits räumlich und zeitlich synchronisiert sind. Der Nachteil besteht darin, dass nicht beliebig viel Leistung zur Verfügung steht. Idealerweise wäre das Leistungsspektrum so beschaffen, dass pro nm einige mW mit definierter, linearer Polarisation zur Verfügung stehen.
- Die Faser dient zur Erzeugung allein des STOKES-Spektrums. Der Nachteil ist, dass der räumliche und zeitliche Überlapp mit dem Pump-Puls hergestellt werden muss. Der Vorteil ist, dass durch den Pump-Puls viel Leistung zur Erzeugung des CARS-Signals zur Verfügung steht.

Für die Umsetzung des QM-Multiplex-Schemas wurde die zweite Vorgehensweise gewählt.

Experimenteller Aufbau

Diese Kriterien zugrunde gelegt, wurde eine im IPHT hergestellte Faser mit $\frac{d}{\Lambda} = 0,5$ und einem Kerndurchmesser von $2,6 \mu\text{m}$ verwendet. Ein Laserscanbild vom Querschnitt ist in Abbildung 5.3(b) auf Seite 87 abgebildet. Diese Faser wurde in einem experimentellen Aufbau, wie er in Abbildung 5.9 dargestellt ist, zur Erzeugung eines breitbandigen STOKES-Spektrums eingesetzt. Die Leistung des MIRA im Pikosekundenmodus wurde durch einen Strahlteiler aufgeteilt, um vor dem Einkoppelobjektiv (ULWD 20x / NA 0,4) $1,5 \text{ W}$ zur Verfügung zu haben und das breitere STOKES-Spektrum zu generieren (s. Abbildung 5.10 auf Seite 97). Der Rest des MIRA-Strahls wurde für den Pump im CARS-Schema verwendet. Die Wellenlänge der Pump-Pulse war 722 nm mit einer Halbwertsbreite von etwa 1 nm .

Nach der Kollimation des aus der Faser ausgekoppelten Lichts (hierzu wurde eine asphärische Linse mit der Brennweite $4,5 \text{ mm}$ verwendet) wurde die Ausgangspolarisation für die vom DAZZLER benötigte angepasst. Anschließend wurde das breite Spektrum mit dem Lichtmodulator gefiltert, um schmalbandig (etwa $1,5 \text{ nm FWHM}$) anregen zu können. Das vom DAZZLER

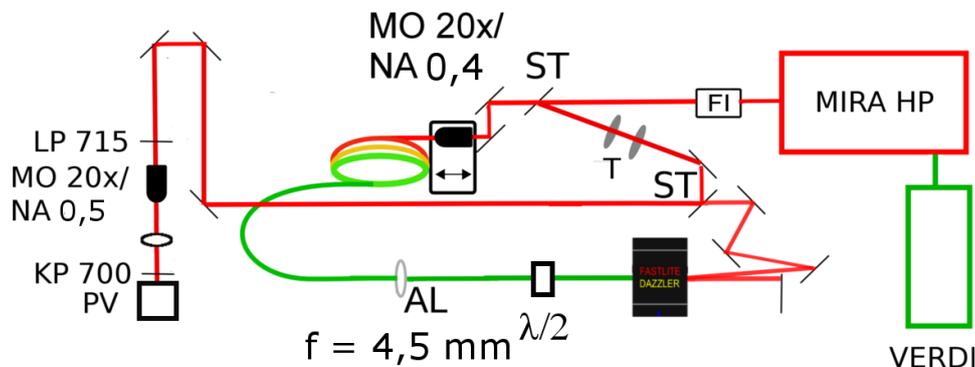
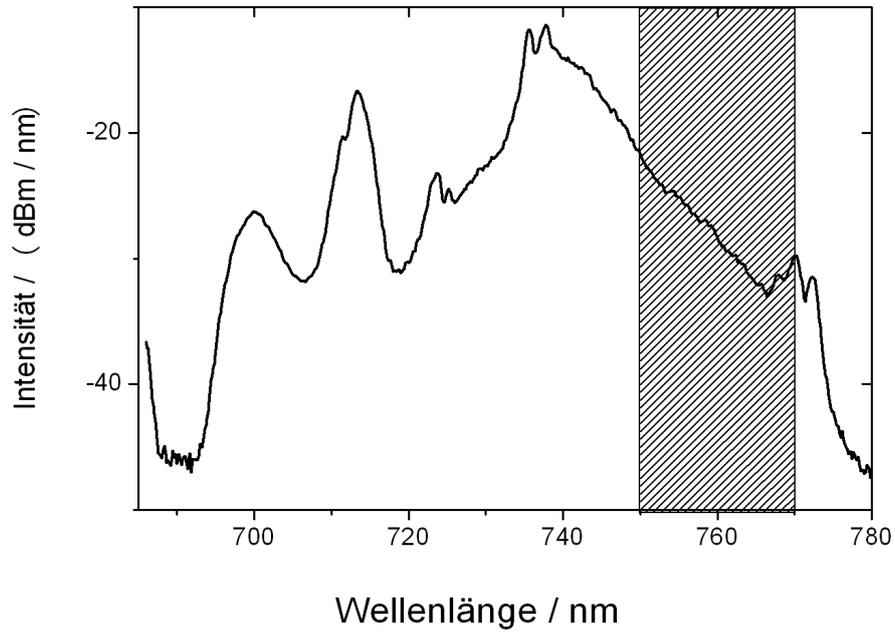
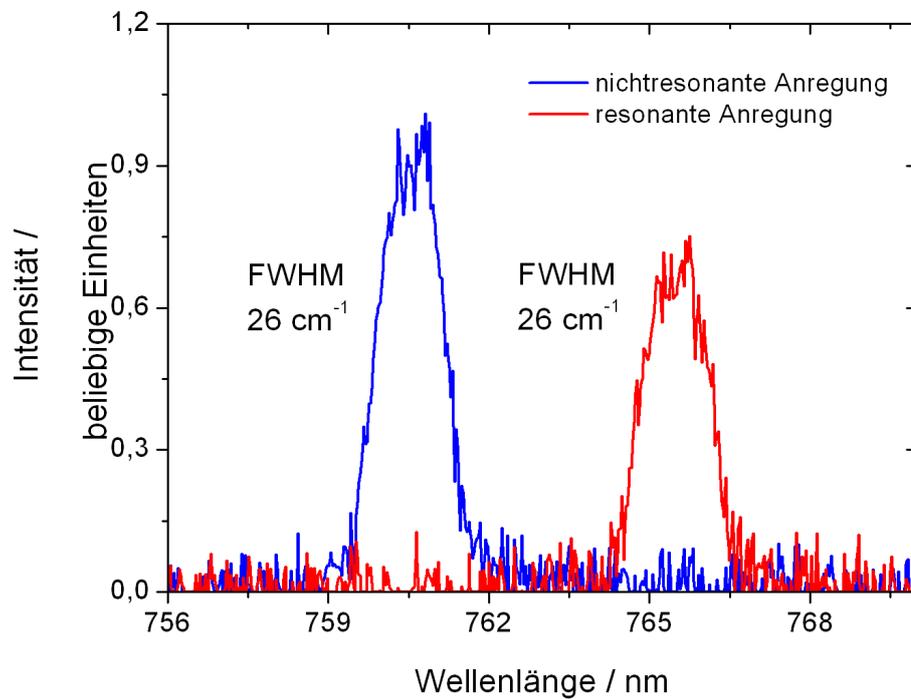


Abbildung 5.9: Experimenteller Aufbau für die QM-CARS-Mikroskopie. Es bedeuten: T: Teleskop; AL: Asphärische Linse; FI: Faraday-Isolator; $\lambda/2$: $\lambda/2$ -Platte; ST: Strahlteiler; LP: Langpassfilter; KP: Kurzpassfilter; MO: Mikroskopobjektiv; PV: Photonenvervielfacher.

modulierte Licht wurde dann mit Hilfe eines Strahlteilers mit dem Pump-Laser kombiniert. Der zeitliche Überlapp wurde zuvor durch Anpassen des optischen Weges (Geometrische Länge \times Brechungsindex) der Faser und einer Verzögerungsstrecke sichergestellt. Somit stand effektiv eine durchstimmbare Lichtquelle für den STOKES-Laser zur Verfügung, mit der sich relative Wellenzahlen im Bereich von ca. 500 bis 900 cm^{-1} für die CARS-Bildgebung nutzen ließen. Hierbei konnte mit einer spektralen Anregungsbreite von nur 27 cm^{-1} (bei einer Zentralwellenlänge von 750 nm) gearbeitet werden.



(a)



(b)

Abbildung 5.10: (a): Spektrum der photonischen Kristallfaser (PCF). Der spektrale Bereich, der für dieses Experiment moduliert wurde, ist schraffiert dargestellt. (b): 1,5 nm breite Anregungsspektren, die aus dem 100 nm breiten Spektrum (Bild (a)) spektral gefiltert wurden.

Im Folgenden wurden CARS-Bilder vom Mikrofluidikchip mit Toluol als Analyten und perdeutertem Toluol als Referenz bei verschiedenen relativen Wellenzahlen aufgenommen. Die Intensität der beiden Kanäle wurde, wie schon in den vorherigen Experimenten (s. Kapitel 3), miteinander ins Verhältnis gesetzt und somit ein Maß für chemischen Kontrast definiert.

Das Ergebnis dieser wellenlängenabhängigen Messungen ist in Abbildung 5.11 zu sehen. Jeder Datenpunkt dieses „Pseudo“-CARS-Spektrums entspricht dabei dem Intensitätsverhältnis von Toluol zu perdeutertem Toluol eines CARS-Bildes. Zum Vergleich sind unterhalb dieses Linienprofils die RAMAN-Spektren von Toluol und perdeutertem Toluol gezeigt. Die Maxima im Spektrum können den RAMAN-Banden von Toluol bei 625 und 780 cm^{-1} zugeordnet werden. Die ausgeprägte Intensität der RAMAN-Bande bei 780 cm^{-1} führt zu dem maximalen Kontrastverhältnis in der untersuchten Wellenzahlregion von etwa $1,8$. Andererseits gibt es auch „umgekehrten“ Kontrast: In der untersuchten Wellenzahlregion besitzt auch perdeutertes Toluol RAMAN-Banden bei 720 und 840 cm^{-1} . Wird diese Wellenzahldifferenz mit Hilfe des DAZZLERS eingestellt, zeigt sich dies als Minimum im Linienprofil. Bemerkenswert ist, dass dieses Linienprofil einem CARS-Spektrum recht nahe kommt, ohne ein Spektrometer verwendet zu haben.

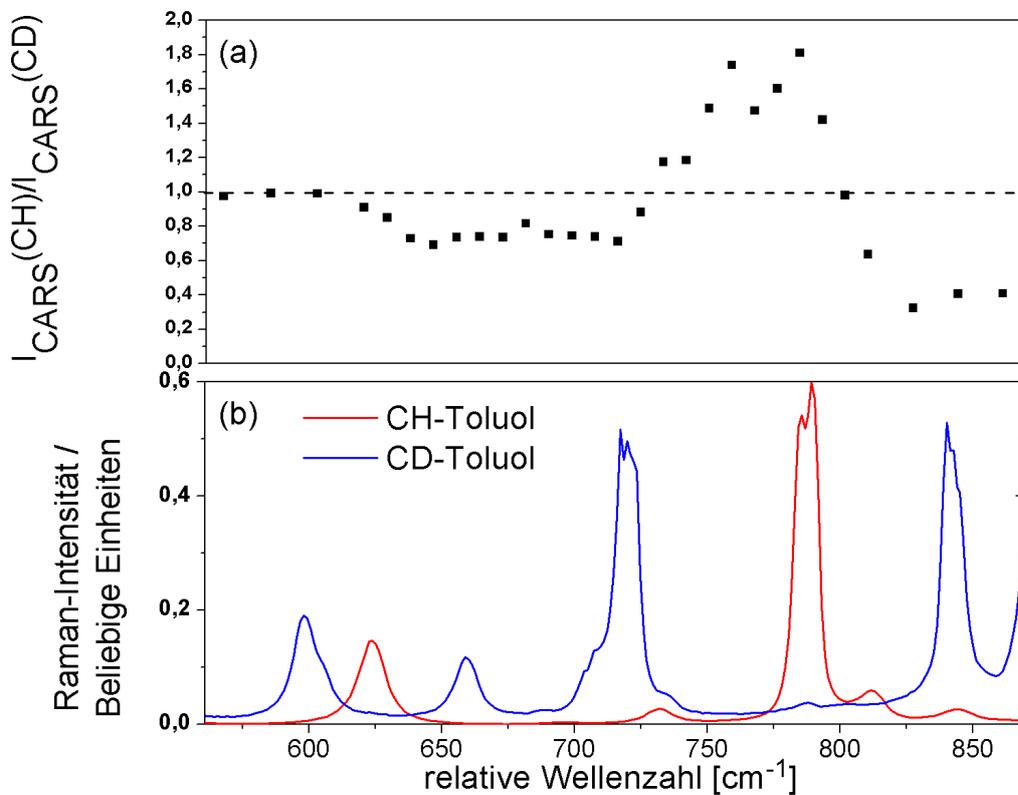


Abbildung 5.11: Aus CARS-Bildern rekonstruiertes CARS-Pseudo-Spektrum (Bild (a)) im Bereich von ca. 500 bis 900 cm^{-1} und RAMAN-Spektren von CD-Toluol und CH-Toluol in diesem Bereich (Bild (b)). Jeder Punkt im Linienprofil entspricht dem Intensitätsverhältnis von CH-Toluol zu CD-Toluol bei der jeweiligen Wellenlänge.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Dieses Kapitel befasste sich mit „Quasi-Multiplex-CARS-Mikroskopie“, einer Methode, die einen Kompromiss zwischen Multiplex-CARS und single-band-CARS darstellt. Hierbei werden RAMAN-Banden in schneller Abfolge abgefragt, ohne dass ein Spektrometer notwendig ist. Die Umsetzung dieser Technik erfolgte mit Hilfe eines kompakten akustooptischen Modulators, der aus einem breitbandigen Spektrum die für guten chemischen Kontrast notwendigen schmalbandigen Anteile herausselektierte. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, schnell zwischen verschiedenen RAMAN-Banden innerhalb der gegebenen Breite des Eingangsspektrums zu wechseln und chemischen Kontrast zu generieren [72].

Es konnten wichtige Schritte hin zu einer QM-CARS-Mikroskopie mit einer einzigen Primärlichtquelle realisiert werden [73]. Nach dem Testen von Photonischen Kristallfasern (hinsichtlich Spektrum, Leistung, Polarisation, Dispersion und Stabilität), die für Quasi-Multiplex CARS geeignet sein könnten, wurde eine Faser zur Erzeugung eines breitbandigen STOKES in einen Aufbau für Zwei-Farben QM-CARS zusammen mit dem Lichtmodulator integriert. Der AOPDF bietet im Vergleich zu einem LC-SLM in einem 4f-Aufbau durch seine kompakte Bauweise hier den Vorteil, dass durch die geringe Dispersion der zeitliche Überlapp zwischen Pump und STOKES einfach gefunden werden kann.

Der QM-CARS Aufbau wurde mit Hilfe eines Mikrofluidik-Chips getestet (s. Kapitel 3), der eine Quantifizierung des RAMAN-resonanten Anteils durch Normierung auf den nichtresonanten Beitrag im zweiten Kanal erlaubt. Anhand einer Abfolge von CARS-Bildern, die mit Hilfe des Lichtmodulators bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufgenommen wurden, konnte ein Pseudo-CARS-Spektrum von Toluol aus den Bildern im Bereich von 500 bis 900 cm^{-1} rekonstruiert werden. Für eine Weiterentwicklung ist die Ausdehnung dieses Bereichs bis etwa 3500 cm^{-1} von Interesse, um auch den CH-Streckschwingungsbereich für die Bildgebung nutzen zu können. Zusätzlich ließe sich der Aufbau weiter vereinfachen, wenn Pump und STOKES gleichzeitig aus der Faser mit Hilfe des Lichtmodulators generiert werden könnten. Hierzu ist es erforderlich, die verfügbare Leistung an der Probe zu steigern, z. B. indem Fasern mit höherer Ausgangsleistung, Lichtmodulatoren mit höherer Beugungseffizienz und Optiken mit besseren Transmissionseigenschaften verwendet werden.

Kapitel 6

Evolutionstrategien und CARS-Mikroskopie

6.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Wie in den Kapiteln 2 und 3 dargestellt, sind die mittels CARS-Mikrospektroskopie ermittelten Detektionsgrenzen für C-deuterte Substanzen in Lösung im 100-500 mM-Bereich, die unter den vorgefundenen experimentellen Bedingungen ermittelt wurden, nicht zufriedenstellend. Schließlich sollen die Wirkstoffe perspektivisch in physiologisch relevanten Konzentrationen, d.h. im nM- μ M-Bereich, nachgewiesen werden können. Diese hohen Detektionsgrenzen resultieren vor allem aus dem Fehlen eines experimentellen Aufbaus, welcher den nichtresonanten Untergrund effektiv unterdrückt und somit die Sensitivität erhöht. Eine Unterdrückung des Untergrundes ist z. B. möglich durch polarisationssensitive CARS-Mikroskopie oder heterodyne Detektion [43] (s. auch Kapitel 2). Solche Schemata sind allerdings recht komplex aufzubauen und zu handhaben. Auch durch die Verwendung eines Impulsformers und Ausnutzung von Anregung in elektronischer Resonanz [78] ist versucht worden, niedrigere Konzentrationen als bislang möglich nachzuweisen. Hier hat man sich allerdings auf ein „open-loop“-Schema beschränkt, d. h. der Lichtmodulator moduliert die Phase, um dem CARS-Spektrum ein Muster aufzuprägen (s. z. B. [44]). Die Intensität des CARS-Signals oder das Verhältnis zwischen dem Signal in Resonanz zum nichtresonanten Signal geht hierbei jedoch nicht als Rückgabewert in die dem Impulsformer programmierte Pulsform ein.

Ein anderer Ansatz greift auf eine geschlossene Lernschleife („closed-loop“) zurück. Hierbei findet ein Impulsformer z. B. die Pulsform, die zu einer maximalen anti-STOKES-Intensität in einem definierten Wellenzahlbereich führt. Dies ist spektroskopisch erfolgreich gezeigt worden [79]. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurde ein Impulsformer eingesetzt, der mittels eines evolutionären Algorithmus den optimalen Bild- bzw. Schwingungskontrast selbstständig durch Ausprobieren verschiedener Werte für Amplitude und Phase finden soll. Das Neuartige dieses Ansatzes besteht dabei im Optimieren eines CARS-Bildes anstatt eines Spektrums, bei dem der chemische Kontrast eines CARS-Bildes als Fitnesswert für eine Evolutionstrategie dient [80].

Evolutionstrategien sind robust gegenüber Rauschen und werden dort eingesetzt, wo es zu kompliziert ist, eine Lösung mit klassischen Optimierungsverfahren auf direktem Wege zu finden (s. z. B. [81]). Dies ist gerade in (zwangsweise immer mehr oder weniger rauschbehafteten) Experimenten oft der Fall, weshalb in Ultrakurzzeitspektroskopie-Experimenten ein solcher Algorithmus z. B. dazu dient, Reaktionsausbeuten zu optimieren oder gar verschiedene Reaktionskanäle zu steuern [82]. Diese Experimente mit geschlossener Lernschleife sind unter den Stichworten „Optimale Steuerung“ oder „Kohärente Kontrolle“ bekannt [83]. Die Interpretation der optimalen Lösung ist jedoch oftmals nicht einfach, weswegen eine sorgfältige Pulscharakterisierung, z. B. mittels FROG [33] oder MIIPS [84] wünschenswert ist. Im Falle der CARS-Mikroskopie wird die Pulscharakterisierung zudem durch die Tatsache erschwert, dass man (im besten Fall gleichzeitig zur Detektion des anti-STOKES-Signals der Probe) eigentlich die Phase charakterisieren müsste, die direkt in der Fokalebene vorliegt. Dies ist aber allein schon aus Platzgründen nicht praktikabel.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene evolutionäre Algorithmen in Zusammenarbeit mit BERND KAMPE und PETER DITTRICH vom Lehrstuhl für Biosystemanalyse an der Fakultät für Mathematik und Informatik der Universität Jena mit dem LC-SLM getestet. In der Diplomarbeit von BERND KAMPE [85] finden sich Details zur Theorie dieser Algorithmen, deren Funktionsweise auch mit Hilfe eines theoretischen Kugelmodells getestet wurde, wobei der Abstand zum Ursprung minimiert wird ([85], [86]).

Nach einer Einführung in die wichtigsten Grundbegriffe der Evolutionsstrategien wird in diesem Kapitel auf die verwendeten Algorithmen und deren Besonderheiten eingegangen. Im nächsten Abschnitt werden erste Tests der Algorithmen beschrieben und die Algorithmen werden hinsichtlich ihrer Konvergenzgeschwindigkeit, Stetigkeit und dem Optimierungsergebnis verglichen. Als Test-Fitnessfunktion dient hierbei zunächst die Transmission des Impulsformers (Optimierung der Amplitude bei gleichzeitiger Variation der Phase). Schließlich wird auf erste Ergebnisse, die darauf abzielen, den Schwingungscontrast von CARS-Bildern (Amplitude *und* Phase) zu optimieren, Bezug genommen. Zur Quantifizierung des chemischen Contrastes wird wieder der Mikrofluidik-Chip verwendet (s. Kap. 3 auf Seite 26). Der Rückgabewert hier ist ein Intensitätsverhältnis, welches den chemischen Contrast eines CARS-Bildes widerspiegelt. Somit hat man hier ein Werkzeug in der Hand, um gezielt den Schwingungscontrast von deuterierten Wirkstoffen, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, zu verbessern.

6.2 Material und Methoden

Die Werkzeuge zur CARS-Bildoptimierung sind einerseits der evolutionäre Algorithmus und auf der anderen Seite der experimentelle Aufbau. Die Wahl des für die CARS-Mikroskopie genutzten Algorithmus und der experimentelle Aufbau werden in diesem Abschnitt beschrieben.

6.2.1 Kurzeinführung in Evolutionsstrategien

Evolutionsstrategien (kurz: ES) wurden von Pionieren wie RECHENBERG ([87], [88]) und SCHWEFEL [89] in den 1960er Jahren entwickelt. Sie werden zur Lösung von komplizierten natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fragestellungen eingesetzt. Die Idee ist hierbei, eine physikalische Messgröße zu optimieren. Diese Messgröße hängt von einem Satz von Parametern ab, deren Anzahl die Dimension des Optimierungsproblems bestimmt. In unserem Fall ist die Messgröße eine Intensität oder ein Intensitätsverhältnis. Die zu variierenden Parameter sind die Spannungswerte der Flüssigkristallmaske. Durch Ausprobieren von diesen Parametern und anschließender Auswertung der Messgröße wird versucht, dem (globalen) Optimum möglichst nahe zu kommen. Dies geschieht nach dem Vorbild der Biologie: Durch das Zusammenspiel der drei wichtigen Prozesse *Selektion*, *Mutation* und *Rekombination* wird im Laufe der Generationen (dem Optimierungslauf) versucht, die optimale Lösung zu finden. Diese Begriffe der ES-Theorie werden im Folgenden erklärt. Für tiefere Erklärungen sei auf das Buch von WEICKER [86] verwiesen.

Ein evolutionärer Algorithmus erzeugt beim ersten Schritt eine Population aus μ Eltern. In den Experimenten in dieser Arbeit besteht jeder Elter¹ aus den 128 Spannungswerten für eine Flüssigkristallmaske des Impulsformers. Die andere Maske des Doppelmodulators wird auf einen konstanten Spannungswert gesetzt.² Bei der ersten Generation ist die Auswahl der Spannungswerte noch rein zufällig. Anschließend wird das Experiment durchgeführt (d. h. ein Intensitätswert wird mit der Einstellung eines Elters aufgenommen) und dem Algorithmus als *Fitnesswert* zurückgegeben. Nach Auswertung dieses Fitnesswertes und Bewertung der Individuen einer Generation aufgrund ihrer Fitness (Selektion) erfolgt die Neu-Zusammenstellung einer Nachkommen-Generation (Rekombination und Mutation), um so neue, bessere Fitnesswerte zu erzielen. Dies wiederholt sich, bis nach einer gewissen Anzahl von Iterationen (Abbruchkriterien) der Algorithmus terminiert.

¹In der Biologie ist Elter als Singular von Eltern gebräuchlich

²Es wurden auch Versuche durchgeführt, wo beide Masken optimiert wurden; für die CARS-Mikroskopie wurde dies aber nicht angewandt.

Wahl der Fitnessfunktion

Die Wahl der Fitnessfunktion F ist von zentraler Bedeutung für Optimierungsexperimente, da von dieser Funktion nicht nur der zu optimierende experimentelle Parameter, sondern auch die Effizienz der Optimierung abhängt.

Die Fitness Φ jedes Individuums \vec{x}_i wird durch die Fitnessfunktion $F(\vec{x})$ bestimmt. Diese ist hier gleich einer Intensität oder einem Intensitätsverhältnis gewählt:

$$\Phi(\vec{x}_i) = F(\vec{x}_i) = \frac{I_1}{I_2} \quad (\text{für alle } i = 1, 2, \dots, \mu). \quad (6.1)$$

Diese Wahl der Fitnessfunktion erscheint auf den ersten Blick sehr einfach. Andere Arbeitsgruppen verwenden z. B. die Funktion

$$F = \frac{A - c}{c^{-1} - B} \quad (6.2)$$

(s. [90]), um den problematischen Nenner in Gl. 6.1 zu umgehen. Diese Funktion wurde in einem Experiment verwendet, um die Zweiphotonenfluoreszenz eines Farbstoffes zu optimieren. Die SHG-Intensität eines nichtlinearen Kristalls diente hier als Referenz. Hier bedeuten A =Zweiphotonen-Fluoreszenzintensität, B =SHG-Intensität und $c=0,8$. Für die vorgestellten Experimente hat jedoch die Formel 6.1 ihren Zweck erfüllt.

Referenz-Individuum

Während eines Optimierungsexperiments, welches bis zu 1,5 Std. dauern kann, bleiben (Laser-) Instabilitäten nicht aus. Im besten Fall gibt es nur eine konstante Drift wie im Falle der Halogenlampe, die sich im Laufe der Zeit erwärmt und somit heller wird. Bei den CARS-Mikroskopie-Experimenten werden Laser verwendet, deren Intensitäten fluktuieren und eventuell auch in der Wellenlänge driften. Dies führt zu Leistungsschwankungen auf der Probe, die sich infolge der nichtlinearen Leistungsabhängigkeit des CARS-Signals (s. Gleichung 2.38) noch verstärken. Deshalb wurde, um diesen Verlauf zu verfolgen und um den Optimierungsverlauf besser bewerten zu können, zu Beginn einer jeden Generation ein Referenzindividuum, d. h. ein fester Satz von Spannungswerten an der Flüssigkristallmaske, eingestellt, dessen Werte der Anfangspopulation entsprechen. Für diese Einstellung der Flüssigkristallmaske wurde dann ein CARS-Bild aufgenommen. Für die Zukunft könnte man außerdem das Referenzindividuum zur Berechnung des Fitnesswertes heranziehen.

Im Falle der CARS-Optimierungsexperimente wurden die Optimierungsverläufe nachbearbeitet, d. h. der beste Wert einer Generation wurde erst durch den Referenzwert geteilt und dann gegen die Anzahl der Generationen aufgetragen.

Selektion

Nachdem für jedes Individuum einer Generation ein experimenteller Fitnesswert ermittelt wurde, werden nun die Individuen nach ihrer Fitness bewertet. Eine vor dem Durchlauf festgelegte Anzahl von Individuen (in dieser Arbeit die drei Besten) wird für die nun folgende Rekombination übernommen.

Dominante und intermediäre Rekombination

Jedes Individuum der Generation wird wie oben dargestellt mit einer experimentell bestimmten Fitness bewertet. Um die Nachkommen zu bilden, wird bei der dominanten Rekombination der Elter für jeden Parameter zufällig bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Elter ausgewählt wird, ist durch die Fitness (die „Güte“) gegeben, die somit einen Gewichtungsfaktor darstellt.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Algorithmen handelt es sich um sogenannte (μ, λ) -Strategien („Komma“-Strategien), wobei nach Konvention μ die Anzahl der Eltern und λ die Anzahl der Nachkommen einer Generation bezeichnet. Das Komma in dieser Schreibweise bedeutet,

dass die Eltern nicht mit in die nächste Generation übernommen werden, im Gegensatz zu den „Plus“-Strategien, die mit $(\mu + \lambda)$ notiert werden. Die Komma-Strategien sind besonders unter stark rauschbehafteten Bedingungen, also den vorliegenden im Experiment, vorteilhaft, da sie verhindern, dass sich der Algorithmus in vermeintlichen Optima verfängt. Sie wurden deshalb ausschließlich angewandt.

In der Regel wurde das Verhältnis $\mu/\lambda = 3/10$, also 3 Eltern und 10 Nachkommen, oder 4/20 angewandt. Das Verhältnis der Anzahl Eltern zu Nachkommen $\frac{\lambda}{\mu}$, auch Selektionsdruck genannt, bestimmt sich aus einer Formel für die Fortschrittsrate für $(\mu/\mu_I, \lambda)$ -Strategien in Abhängigkeit von der Anzahl der Eltern (s. [91]). Die Schreibweise „ μ/ρ “ bedeutet, dass von μ Eltern eine Untermenge von ρ Eltern zur Rekombination verwendet wird. In unserem Fall war immer $\mu = \rho$. Der Index „I“ steht hierbei für *intermediäre* Rekombination. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zur oben erwähnten dominanten Rekombination die Parameter *aller* Eltern gleichermaßen in die Bildung der Nachkommen eingehen. Zur Reduktion des Rauscheinflusses wurden die Parameter der Eltern gemittelt, so dass die Nachkommen effektiv aus *einem* Elter erzeugt wurden.

Mutation

Ein evolutionärer Algorithmus zeichnet sich gerade dadurch aus, dass er nicht nur die besten Individuen x_j einer Generation herausselektiert, sondern vielmehr durch Variation der Individuen neue Lösungsmöglichkeiten ausprobiert. Im konkreten Fall werden die Nachkommen λ durch Addieren einer normalverteilten Zufallszahl $\mathcal{N}(X, s)$ erzeugt:

$$x_{j,neu} = x_{j,alt} + \sigma \cdot \mathcal{N}(0, 1) \text{ für alle Nachkommen } j = 1, \dots, \lambda. \quad (6.3)$$

Mit der Notation $\mathcal{N}(X, s)$ ist im Folgenden eine normalverteilte Zufallszahl bezeichnet, die entsprechend der Wahrscheinlichkeitsdichte

$$\phi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi s}} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2s}(x - X)^2\right) \quad (6.4)$$

verteilt ist, welche um X zentriert ist und die Varianz s besitzt. Die Varianz sollte nicht mit der Mutationsstärke σ verwechselt werden.³ Die Mutationsstärke bestimmt die Variation, die auf die Nachkommen angewandt wird, um den Parameterraum auf lokale Optima abzusuchen. Der Vektor der Spannungswerte (die normalverteilte Zufallszahlen sind), die auf die Spannungswerte der zuvor selektierten und rekombinierten Nachkommen (Gleichung 6.3) aufaddiert werden, wird im Folgenden als *Mutationsvektor* bezeichnet.

Anpassung der Schrittweite Die einer solchen Mutation unterzogenen Individuen sind mit der Wahrscheinlichkeitsdichte

$$\phi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2}x^2\right) \quad (6.5)$$

verteilt (dabei wurde im Unterschied zu Gleichung 6.4 $X=0$ und $s=1$ gesetzt). Dabei wird angenommen, dass zu Beginn das globale Optimum noch nicht gefunden worden ist. Entsprechend groß muss σ sein. Wichtig ist nun, dass bei *selbstanpassenden*⁴ Algorithmen, die in unserem Fall zum Einsatz kamen, die Mutationsstärke selbst Teil des Parametervektors ist, also Mutation unterworfen wird. Es wird nun angenommen, dass durch den Mutationsprozess indirekt die Mutationsstärke für die aktuelle Generation angepasst wird. Ist die Mutationsstärke zu Beginn nicht optimal, so wird sie entweder hochgeregelt, so dass mehr Spielraum vorhanden ist, oder über den Optimierungsprozess heruntergefahren, da gegen Ende das Optimum näher sein sollte und eine geringere Streuung notwendig ist. Die Mutationsstärke wird – global – gemäß einer Exponentialfunktion im Laufe der Optimierung heruntergeregelt:

$$\sigma_{j,neu} = \sigma_{alt} \cdot \exp(\tau \cdot \mathcal{N}(0, 1)). \quad (6.6)$$

³Aus diesem Grund wird die Varianz hier nicht – wie sonst üblich – mit σ sondern mit s bezeichnet.

⁴Im Folgenden wird deshalb die einfache Kommastrategie „commaself-ES“ genannt.

Der Faktor τ in Gleichung 6.6 hängt dabei von der Dimension (hier: Die Anzahl der variierten Pixel des LC-SLMs) ab. In den Experimenten wurde für diese Konstante die Formel

$$\tau = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot D}} \quad (6.7)$$

mit $D = 128$ verwendet. Diese Art des Verlaufs der Mutationsstärke über die Generationen hat die Eigenschaft, dass kleine Änderungen häufiger als große sind (aufgrund der Normalverteilung) und die Mutationsstärke nicht negativ werden kann. Außerdem weist dieser Mutationsoperator keine Richtung auf. Erst die Selektion drängt den Suchprozess aufgrund der Fitness der Nachkommen in eine bestimmte Richtung.

Abbruchkriterien

Durch das experimentell unvermeidliche Rauschen kann die Situation entstehen, dass eventuell gefundene Optima wieder verlassen werden und der Algorithmus nicht abbricht, obwohl kein besserer Wert gefunden wird. Da Zeit ein wichtiges Kriterium darstellt und ohnehin Zeit durch die Bildaufnahme (ca. 2 Sekunden), Rechen- und Pufferzeit verloren geht, ist es wünschenswert, dass der Algorithmus möglichst bald terminiert, wenn innerhalb von einer festzulegenden Anzahl von Generationen kein besserer Wert gefunden werden kann. Deshalb wurde hier ein Algorithmus etabliert, der das Experiment abbricht, wenn entweder

- die Differenz von Maximum und Minimum der Bestwerte der letzten fünf Generationen unterhalb des experimentell bestimmten Rauschpegels liegt oder
- innerhalb von 10 Generationen kein besserer Wert gefunden wird.

Der generelle Ablauf einer Evolutionsstrategie

Von der Erzeugung der ersten Generation bis zum Abbruch einer Optimierung verlaufen evolutionäre Algorithmen im Allgemeinen nach einem festen Schema. Die in dieser Arbeit eingesetzten Evolutionsstrategien laufen in folgender Reihenfolge ab:

- Erzeuge eine Population aus 3 Eltern. In der ersten Generation ist diese Erzeugung komplett zufällig.
- Werte durch Aufnehmen einer Intensität oder eines Intensitätsverhältnisses (s. Abschnitt 6.2.1) die Fitness für jedes Individuum aus. Bestimme die Eltern der folgenden Generation, indem die bezüglich ihrer Fitness besten Individuen von einer Generation ausgewählt werden.
- Mittle die Parameter der Eltern, so dass aus effektiv einem Elter die nächsten Nachkommen erzeugt werden.
- Erzeuge die Nachkommen durch Addition normalverteilter Zufallszahlen auf die Parameter des Elter.
- Fahre mit dem ersten Schritt fort, bis eines der Abbruchkriterien (s. o.) erfüllt ist.

6.2.2 Die Wahl des Algorithmus aufgrund von ersten experimentellen Tests: Optimierung der Transmission

Um die Algorithmen experimentell zu testen, wurde als erstes Experiment die Transmission des LC-SLMs (s. Aufbau in Abbildung 6.1 und Spektrum der Lampe in Abbildung 4.5 auf Seite 60) optimiert. Hierzu wurde als Lichtquelle eine Halogenlampe eingesetzt. Zusätzlich bestand der Aufbau aus einer Blende, dem dahintergesetzten Impulsformer und einer Photodiode zur Detektion des vom Impulsformer transmittierten Lichts. Die (negativen) Spannungswerte der Photodiode wurden über einen A/D-Wandler (Multifunktions-Datenerfassungsmodul USB-6009 von NATIONAL INSTRUMENTS) in den Rechner eingelesen und standen dem evolutionären Algorithmus zur Verfügung, der diese Spannung minimieren (=optimieren) sollte. Die Transmission hängt laut Gleichung 4.5 aus Kapitel 4 von der Steuerspannung ab. Die gleichzeitige Variation der Phase ist dabei unerheblich, da das Licht inkohärent ist. Aber auch für die CARS-Mikroskopie-Optimierungsexperimente wurde die Rolle der Phase nicht betrachtet.) Die Ergebnisse der Optimierungsdurchläufe sind in Abbildung 6.3 auf Seite 107 dargestellt. Es wurden im Wesentlichen drei Strategien getestet: Die *thinning-ES*, die *sigma-ES* und eine Kombination aus beiden, die *sigma-thinning-ES*. Diese Strategien werden im Folgenden erklärt.

Die comma-self-ES

Die comma-self-ES war die einfachste Evolutionsstrategie, die in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Dabei handelte es sich um eine (3/3,10)-Strategie, d. h. die Eltern wurden nicht als Nachkommen übernommen. Das „self“ steht für die Mutationsstärke, die sich im Laufe der Optimierung selbst anpasst.

Die thinning-ES

Der „thinning“-Algorithmus ist ideal auf eine Flüssigkristallmaske als Lichtmodulator zugeschnitten. Er wurde zuerst von MIZOGUCHI (s. [92]) vorgestellt. Die Idee ist hierbei, zu Beginn der Optimierung nicht alle 128 Pixel der Maske zu nutzen, sondern zwischen einer am Anfang festgelegten Anzahl von Stützstellen zu interpolieren. Legt man eine Stützstellenanzahl von 16 fest, so werden zu Beginn der Optimierung effektiv nur die Spannungen von 16 Pixeln variiert und die Spannungswerte der Pixel dazwischen interpoliert. Erst wenn nach einer festgelegten Bedingung (z. B. Zeit, Anzahl der Generationen seit dem letzten gefundenen Bestwert, Unterschreiten einer Rauschgrenze ähnlich der Abbruchkriterien) keine Verbesserung festgestellt wird, wird die Anzahl der Stützstellenpixel erhöht. Aufgrund der zu Anfang „ausgedünnten“ Anzahl von Pixeln heißt diese Evolutionsstrategie thinning-ES. Im Gegensatz zu [92], wo linear zwischen den Stützstellen interpoliert wird, wird in dieser Arbeit jedoch eine Interpolation mit Polynomen dritter Ordnung (kubische *Splines*) verwendet, was deutlich exakter ist [85]. Das Prinzip dieses Algorithmus ist in Abbildung 6.2 auf Seite 106 dargestellt. Die Idee, am Anfang, wo große

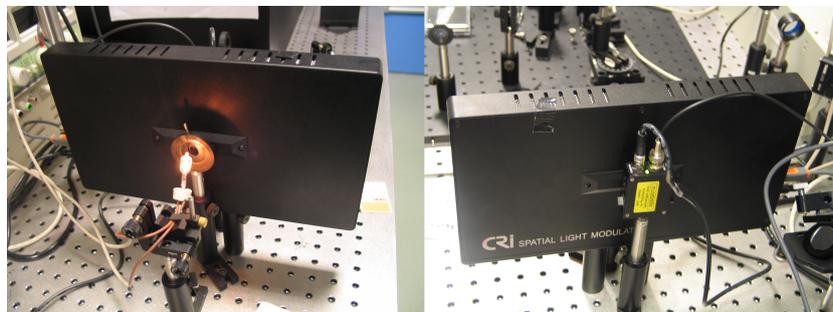


Abbildung 6.1: Einfacher experimenteller Aufbau zum Optimieren der Transmission des Impulsformers. Die Halogenlampe emittiert in einem Spektralbereich von ca. 400-800 nm (s. Abbildung 4.5 auf Seite 60) und beleuchtet die gesamte aktive Fläche des LC-SLMs. Die Transmission wird mit einer Photodiode auf der anderen Seite des LC-SLMs detektiert und mit einem A/D-Wandler dem Algorithmus als negativer Spannungswert übergeben. Vgl. [85].

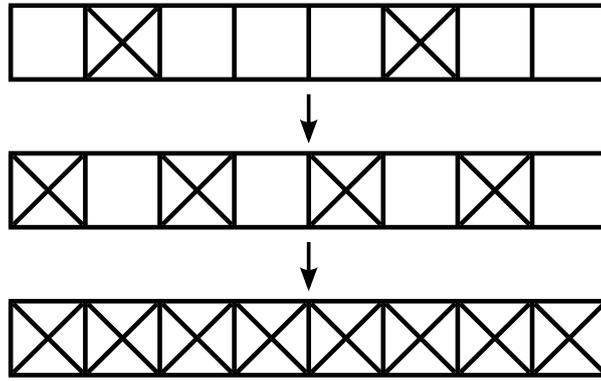


Abbildung 6.2: Prinzip des „thinning“-Algorithmus: Zu Beginn werden nur wenige Pixelspannungen effektiv variiert und die Pixelspannungen zwischen den Stützstellen werden interpoliert (linear oder mit Splines, siehe Haupttext). Nach festzulegenden Kriterien (Zeit, Anzahl Generationen, Unterschreiten einer Rauschgrenze) werden, wenn kein Fortschritt erzielt wird, nach und nach mehr Stützstellen hinzugezogen, bis schließlich alle Pixel variiert werden. Wenn nicht mehr Pixel herangezogen werden können, wird die Optimierung abgebrochen. Mit freundlicher Genehmigung aus [85] entnommen.

Veränderungen auftreten, effektiv wenige und zum Schluss, wo die Änderungen (wahrscheinlich) eher klein sind, mehrere (alle) Pixel zu nutzen, bringt deutliche Geschwindigkeitsvorteile, insbesondere, wenn der Algorithmus mit anderen Verfahren kombiniert wird.

Die „commaself-ES“ stellt einen Spezialfall der „thinning-ES“ dar, wobei die Anfangsschrittweite Eins ist, also die Spannungen sämtlicher Pixel von Anfang an optimiert werden (hier 128).

Die *sigma-ES* (gewichtete Rekombination)

Bei den zuvor beschriebenen Algorithmen geht die Fitness der verschiedenen Individuen nicht in die Rekombination mit ein. Es gibt jedoch auch eine Möglichkeit, diese Information für den Schritt der Rekombination zu nutzen, und zwar durch eine *gewichtete* Rekombination (s. [85], [93] und [94]). Im Gegensatz zur sonst angewandten *intermediären* Rekombination wird hier zwischen den Besten untereinander durch die Einführung von Gewichten unterschieden. Als Unterscheidungsmerkmal dient die Fitness; die Individuen werden nach ihrer Fitness gewichtet. 50 % der Population erhalten hierbei positive, die anderen 50 % negative Gewichte. Die Gewichtung bezieht sich jedoch im Unterschied zur intermediären Rekombination nicht auf die Individuen, sondern nur auf die Mutationsvektoren. Die Mutationsvektoren werden nach der Fitness der durch sie veränderten Individuen sortiert und gewichtet. Die Mutationsstärke wird aus dem Mittelwert der μ besten Individuen bestimmt.⁵

Die *sigma-thinning-ES*

In der Hoffnung, einen weiteren Geschwindigkeitsvorteil im Experiment zu erzielen, wurde die „thinning-ES“ zusätzlich mit der „self-opt-ES“ kombiniert. Man erhält dann die *sigma-thinning-ES*. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Parameterwerte der Eltern nach der Sortierung mit Hilfe der Gewichte und anschließender Mutation nochmals interpoliert werden.

Die Wahl des Algorithmus

Zum Vergleich sind Optimierungsverläufe aller getesteten ES in Abbildung 6.1 auf Seite 105 dargestellt: Die *sigma-ES*, die *thinning-ES* sowie als Kombination beider ES die *sigma-thinning-ES* mit 16 oder 64 effektiven Pixeln zu Beginn. Die *sigma-thinning-ES* findet sehr schnell das

⁵Werden die μ besten Individuen mit $1/\mu$ und die restlichen mit Null gewichtet, erhält man den Grenzfall der ungewichteten ES.

Optimum, erleidet aber auch Rücksprünge und terminiert nicht mit einem dem Optimum nahen Wert (s. Abbildung 6.3). Die Abbruchkriterien waren zu diesem Testzeitpunkt noch nicht ausgereift, so daß jeder Durchlauf etwa 20-40 Minuten dauerte. Da von allen getesteten Algorithmen die thinning-ES die stabilsten Optimierungsläufe zeigte, wurde dieser Algorithmus für die Optimierung des chemischen Bildkontrasts in der CARS-Mikroskopie gewählt. Anschließend wurden Tests zur optimalen Einstellung der initialen Parameter durchgeführt.

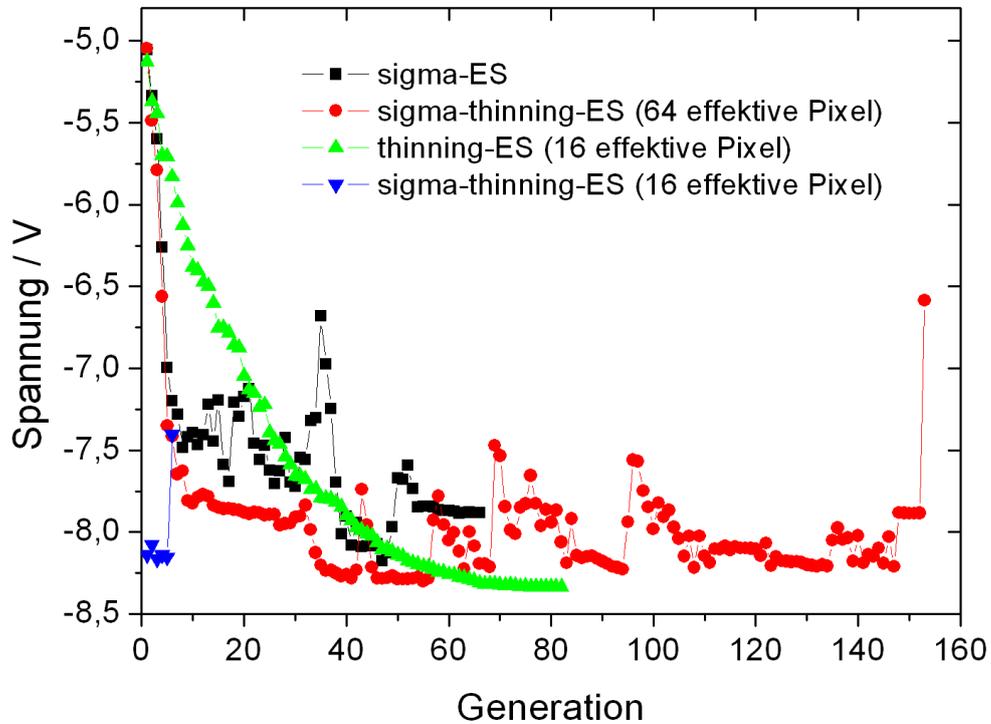


Abbildung 6.3: Ergebnisse von Optimierungsdurchläufen dreier verschiedener Evolutionsstrategien (ES): Der thinning-ES, der self-opt sowie die Kombination beider Algorithmen mit zwei (64 effektive Pixel) und acht (16 effektive Pixel) Stützstellen zu Beginn. Das Optimum ist hier ein Minimum, was von der Programmierung der Algorithmen herrührt. Das negative Vorzeichen stammt von der Eingangspolung des A/D-Wandlers. Auffällig ist, dass die Optimierungskurve der „thinning-ES“ im Vergleich zu den beiden anderen Strategien, insbesondere der sigma-thinning-ES mit 8 Stützstellen, keine so großen Rücksprünge aufweist, sondern monoton abfällt. Vgl. [85].

Einzustellende Parameter

Vor dem Start eines Optimierungslaufs müssen die Anfangsbedingungen festgelegt werden. Folgende Parameter müssen je nach Problemstellung angepasst werden und sind nicht voneinander unabhängig:

- die Anzahl der Eltern, meist 3 oder 4.
Generell gilt, dass mit einer höheren Anzahl von Eltern auch bessere Ergebnisse erzielt werden, da die Auswertung von mehr Individuen den Einfluss des experimentellen Rauschens vermindert. Allerdings muss bei einer Erhöhung der Elternanzahl auch das Verhältnis Eltern/Nachkommen beibehalten werden, was die Laufzeit des Algorithmus vergrößert. Da bei den Tests mit der Halogenlampe aber nur eine unwesentliche Verbesserung bei Verwendung von z. B. 9 statt 3 Eltern erzielt wurde (s. Abbildung 6.4), wurden im Folgenden entweder 3 oder, bei höherer Dimension (mehr effektive Pixel zu Beginn) 4 Eltern verwendet.
- Das Verhältnis von der Anzahl der Eltern zu der Anzahl der Nachkommen (der Selektionsdruck) $\frac{\mu}{\lambda}$, hier 3/10 oder 4/20.
- Die initiale Mutationsschrittweite (40, d.h, entweder 1 % von 4095 oder 400, also 10 %).
- Die Anzahl der Pixel oder auch Dimensionen (zwischen 30 (Halogenlampe) und 128 (Mikroskopie-Experimente))
- Die Interpolationsschrittweite zu Beginn (zwischen 2 (64 effektiv genutzte Pixel) und 8 (16 effektiv genutzte Pixel))
- Die Anfangspopulation (128 Spannungswerte zwischen 0 und 4095), hier entweder 1300 (0 % Transmission), 1575 (30 %), 4095 (100 %), ein zufällig gewählter Startvektor oder aber die beste Population oder Endpopulation eines vorherigen Optimierungsdurchlaufs.

Die Werte für die Anzahl der Eltern und die Mutationsstärke zu Beginn ist nicht willkürlich, sondern von der Dimension D des Problems (hier: $D=128$) abhängig. Eine Wertetabelle, die angibt, welche Anzahl von Eltern für den maximalen Fortschritt in Abhängigkeit der Dimension des Problems empfehlenswert ist, findet sich in [91]. Diese wird durch Maximieren des Fortschritts in Abhängigkeit der Mutationsstärke bzw. Anzahl der Eltern numerisch berechnet und liefert die zu wählende Mutationsstärke bzw. Anzahl von Eltern bei festgelegter Dimension und Anzahl der Nachkommen. Für $D \rightarrow \infty$ strebt die Anzahl der Eltern laut [91] gegen $\mu = 0,27 \cdot \lambda$.

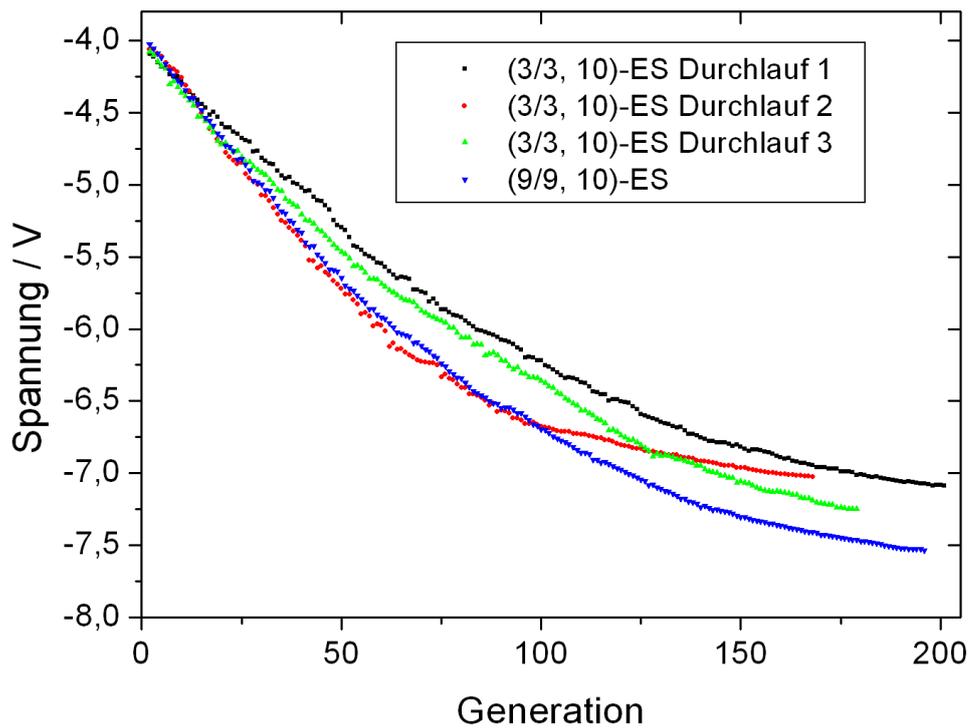


Abbildung 6.4: Optimierungsverläufe von Transmissionsexperimenten mit 3 und mit 9 Eltern. Der Verlauf mit 9 Eltern ist nur unwesentlich besser als einer der drei Optimierungsläufe mit 3 Eltern, dafür aber dreimal so langsam. Die Bezeichnung μ/μ_I steht für intermediäre Rekombination, was bedeutet, dass die Nachkommen sämtlicher Eltern zu gleichen Teilen gebildet werden. Vgl. [85].

6.2.3 Der experimentelle Aufbau für die CARS-Mikroskopie

Der verwendete experimentelle Aufbau zur Optimierung von CARS-Bildern ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Der Unterschied zu dem gewöhnlichen CARS-Aufbau von Abbildung 3.2 auf Seite 28 in Kapitel 3 auf Seite 26 besteht in dem 4-f-Aufbau im Stokes-Strahlengang, der die Modulation des Spektrums zulässt. Für diese Experimente wurden die Pulse vom MIRA bei 835,7 nm mit einer FWHM von etwa 12 nm, moduliert und mittels des OPO entweder auf die CD- (ca. 700 nm, entspricht zusammen mit dem STOKES einer relativen Wellenzahl von 2320 cm^{-1}) oder CH-Bande (ca. 667 nm, entspricht einer relativen Wellenzahl von 3020 cm^{-1}) abgestimmt. Die modulierten STOKES-Pulse wurden mittels eines kommerziellen Autokorrelators und eines Spektrometers charakterisiert.

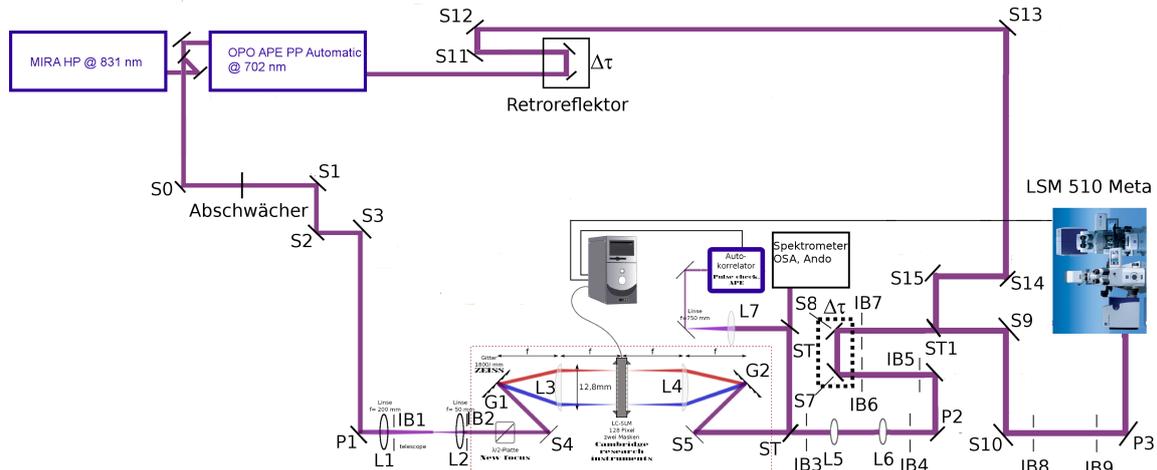


Abbildung 6.5: Experimenteller Aufbau für CARS-Mikroskopie zur Bildoptimierung. Der Pump-Puls wird wie beim konventionellen Aufbau durch einen OPO bereitgestellt. Der Lichtmodulator im 4f-Aufbau formt den STOKES-Puls. Dieser wird durch einen Autokorrelator (PULSECHECK von APE) und ein Spektrometer (OPTICAL SPECTRUM ANALYZER, ANDO) charakterisiert. Um beide Pulse zeitlich zu synchronisieren, läuft der STOKES nach dem LC-SLM über eine Verzögerungsstrecke. Anschließend werden beide Pulse über einen Strahlteiler (ST1) vereinigt und ins Laser Scanning Mikroskop eingekoppelt. Die Abkürzungen bedeuten: S: Spiegel; IB: Irisblende; ST: Strahlteiler; P: Periskop; G: Gitter; L: Linse.

Pulscharakterisierung durch Spektrum und Autokorrelation

Das vom LC-SLM modulierte und optimierte STOKES-Anregungsspektrum wurde mit Hilfe eines Strahlteilers (s. Abbildung 6.5 auf Seite 110) sowohl in ein Spektrometer (OPTICAL SPECTRUM ANALYSER, ANDO) als auch in einen Autokorrelator (PULSECHECK VON APE) zur Charakterisierung der Pulsform eingekoppelt. Die Intensität des Laserpulses wird im Autokorrelator durch ein MICHELSON-Interferometer aufgespalten, von dem ein Arm verfahren wird (s. Abbildung 6.6). Aus der Wegstreckendifferenz ΔL kann auf die Zeit $\Delta\tau = \frac{\Delta L}{c}$ geschlossen werden. Von beiden Armen des Interferometers werden die Strahlen dann in einen nichtlinearen BBO-Kristall fokussiert, welcher nicht-kollinear die zweite Harmonische erzeugt. Der Laserpuls wird also mit sich selbst überlagert. Mit Hilfe eines Photonenvervielfachers wird dann die Intensität der Autokorrelation

$$I \propto \int dt E(t - \tau) E(t) \quad (6.8)$$

gemessen, die maximal wird, wenn die Wegstrecke in beiden Armen genau gleich ist, d. h. die Pulse im BBO-Kristall optimal zeitlich überlappen. Die Messung der Pulsdauer gibt allerdings nur eine Abschätzung der im Experiment tatsächlich vorliegenden Pulsdauer, da die Messung vor dem Mikroskop erfolgen muss und die Pulse beim Durchlaufen der Mikroskopoptiken noch verzerrt werden⁶. Ideal wäre eine Pulscharakterisierung in der Fokalebene mit Hilfe eines FROG (s. [33]), welcher für jede Wellenlänge die Pulsdauer mit Hilfe eines transform-limitierten Referenzpulses bestimmt.

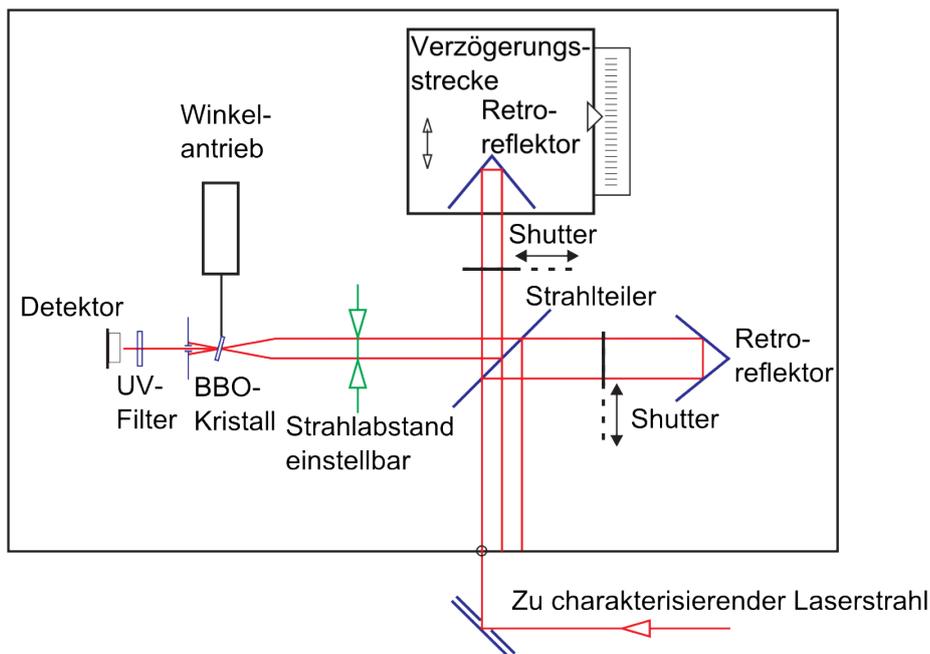


Abbildung 6.6: Schema vom Strahlengang innerhalb des Autokorrelators PULSECHECK von APE. Es handelt sich hierbei um ein MICHELSON-Interferometer. Der zu charakterisierende Laserstrahl wird dabei durch einen halbdurchlässigen Strahlteiler in zwei Teile aufgespalten. Ein Teil läuft über eine verfahrbare Verzögerungsstrecke. Nach der Wiedervereinigung durch den Strahlteiler werden beide Teile mit unterschiedlichem Winkel in einen BBO-Kristall fokussiert. Die Autokorrelation wird nun durch Verfahren der Verzögerungsstrecke und gleichzeitiger Detektion mit z. B. einem Photonenvervielfacher registriert, nachdem die Fundamentale mit einem UV-Filter herausgefiltert wurde.

⁶Seit Kurzem wird von der Firma APE ein Autokorrelator namens CARPE vertrieben, der die Pulsdauer direkt hinter dem Mikroskopobjektiv messen kann.

Justage des 4f-Aufbaus

Die Justage des 4f-Aufbaus wurde schon in Kapitel 4 auf Seite 55 angesprochen. Da in dem hier diskutierten Experiment - anders als in den oben diskutierten Experimenten - aber auch die Phase der geformten Pulse eine Rolle spielt, musste bei der Justage auch auf die Minimierung der Dispersion durch die optischen Elemente des 4f-Aufbaus geachtet werden. Hierzu wurde in Abhängigkeit der Position der Gitter die Autokorrelation gemessen und so die Positionen der Gitter bestimmt, die die geringste Pulsdauer lieferten. Die Pulsdauer des ungeformten Referenzpulses betrug etwa 380 fs. Ein residualer räumlicher Chirp konnte trotz aufwendiger Justage nicht beseitigt werden und wurde mit Hilfe eines Teleskops aus zwei Zylinderlinsen (s. Abbildung 6.5 auf Seite 110) kompensiert, damit letztendlich das Objektiv im Mikroskop gut ausgeleuchtet und ein hinreichend guter Überlapp zwischen Stokes und Pump erzielt werden konnte. Das vom Photonenvervielfacher detektierte CARS-Signal wurde dann durch die Positionierung der zweiten Zylinderlinse optimiert.

Der Detektor und Rückgabewert

Zur Detektion des CARS-Signals in den Optimierungsexperimenten wurde wie üblich ein Photomultiplier verwendet. Das aufgenommene Bild wurde als 16-bit-Bild als TIFF (Tagged Image File Format) gespeichert. Zur Weiterverarbeitung wurde das Graustufenbild als Intensitätsmatrix ($\{x\text{-Position}\} \times \{y\text{-Position}\} \times \{\text{Intensität}(x,y)\}$) eingelesen. Nun wurde über eine hinreichend große Anzahl von Pixeln gemittelt und dem Algorithmus entweder ein Intensitätsmittelwert über einen definierten Bereich oder ein Intensitätsverhältnis als Rückkopplungssignal übergeben. Außerdem wird - wie in Abschnitt 6.2.1 erläutert wurde - die Standardabweichung dem Algorithmus übergeben, da hierüber die Mutationsstärke angepasst und die Standardabweichung als ein Maß für das Rauschen (die Intensitätsfluktuationen) für das Abbruchkriterium herangezogen wird.

Die Standardabweichung und das gestutzte Mittel

Da das Rauschen unter Umständen so groß sein kann, dass in der dem Algorithmus übergebenen Standardabweichung auch Ausreißer mit wenig Informationsgehalt enthalten sein können, macht es Sinn, nicht den *arithmetischen* Mittelwert für die Berechnung der Standardabweichung zu verwenden. Vielmehr wird vom *gestutzten* Mittel Gebrauch gemacht: Die Intensitätswerte, welche direkt vom Auswerten des Bildes erhalten werden, werden sortiert und der Median (nicht der arithmetische Mittelwert) wird bestimmt. Um den Median herum wird ein Bereich (1-10 % der Intensitätsskala) ausgewählt und für die Berechnung der modifizierten Standardabweichung festgelegt, die dem Algorithmus zurückgegeben wird. Diese ist immer noch zu dem tatsächlich gemessenen Rauschen proportional, enthält aber keine Ausreißer mehr. Die Breite des Bereichs muss individuell den experimentellen Bedingungen angepasst werden.

6.3 Ergebnisse:

Optimierung des Schwingungscontrastes von CARS-Bildern

6.3.1 Optimierung des CARS-Intensitätsverhältnisses von CD-Toluol zu CH-Toluol

Da die Optimierungsexperimente auf die Erniedrigung der Nachweisgrenze von deuterierten (Wirk-)stoffen hinzielen, wurde der Bildkontrast – wieder bei einem Modellsystem beginnend – von perdeuteriertem Toluol gegenüber undeuteriertem Toluol optimiert. Hierbei wurde teilweise auf Ergebnisse von Kapitel 3 zurückgegriffen, in denen quantitative CARS-Experimente an binären Mischungen aus perdeuteriertem und undeuteriertem Toluol durchgeführt wurden. Wie in Kapitel 3 wurde ein Zwei-Kanal Mikrofluidikchip zur Quantifizierung des Bildkontrasts verwendet, dessen rechter Kanal perdeuteriertes Toluol als Analyt enthält, wohingegen undeuteriertes Toluol im linken Kanal als Referenz dient. Die Differenzfrequenz von Pump und STOKES $\Omega = \omega_p - \omega_s$ wurde auf die CD-Streckschwingungsbande von perdeuteriertem Toluol bei ca. 2280 cm^{-1} (s. RAMAN-Spektrum in Abbildung 6.7 (a)) abgestimmt.

Hierzu wurde der MIRA (Stokes) auf eine Wellenlänge von $835,7 \text{ nm}$ mit einer FWHM von ca. 10 nm und der OPO (Pump) auf eine Wellenlänge von $701,5 \text{ nm}$ und einer FWHM von $3,5$ bis 4 nm justiert. Aufgrund der großen Halbwertsbreite des ungeformten Stokesspektrums (=Referenz) ergibt sich kaum Kontrast im CARS-Bild (s. Abbildung 6.8 auf Seite 114). Ein typischer Optimierungsdurchlauf ist in Abbildung 6.9 auf Seite 115 dargestellt. Das optimierte CARS-Bild in Abbildung 6.8 auf Seite 114 weist einen Kontrast auf, der um den Faktor $1,15$ besser als derjenige des Referenzindividuum ist. Diese Kontrastverbesserung wird offenbar durch ein schmalbandigeres Anregungsspektrum erzielt (s. Abbildung 6.10 auf Seite 116). Das ursprünglich etwa 6 nm breite Anregungsspektrum ist im optimierten Fall nur noch etwa $4,5 \text{ nm}$ breit, was 64 cm^{-1} entspricht.

Zur Kontrolle wurde auch das umgekehrte Verhältnis, also die CARS-Intensität von Toluol mit derjenigen von perdeuteriertem Toluol zur Normierung optimiert. Wie man am Optimierungsverlauf in Abbildung 6.9 auf Seite 115 erkennt, terminiert der Algorithmus nach einer ähnlichen Anzahl von Generationen. Dieser *inverse* Kontrast kann hier um den Faktor $1,20$ verbessert werden. Die Kontrastverbesserung wird wieder durch die Einengung des breitbandigen Spektrums in Übereinstimmung zum RAMAN-Spektrum erzielt. Diesmal wird der zum vorherigen Optimierungsexperiment komplementäre Flügel des Spektrums selektiert (s. Abbildung 6.10 auf Seite 116). Die Autokorrelation zeigt eine zeitliche Streckung des STOKES-Pulses für beide Optimierungsläufe (460 bzw. 400 fs für die Optimierung des inversen Intensitätsverhältnisses gegenüber 350 fs für die Referenz), wie dies auch zu erwarten ist, wenn einzelne Spektral-

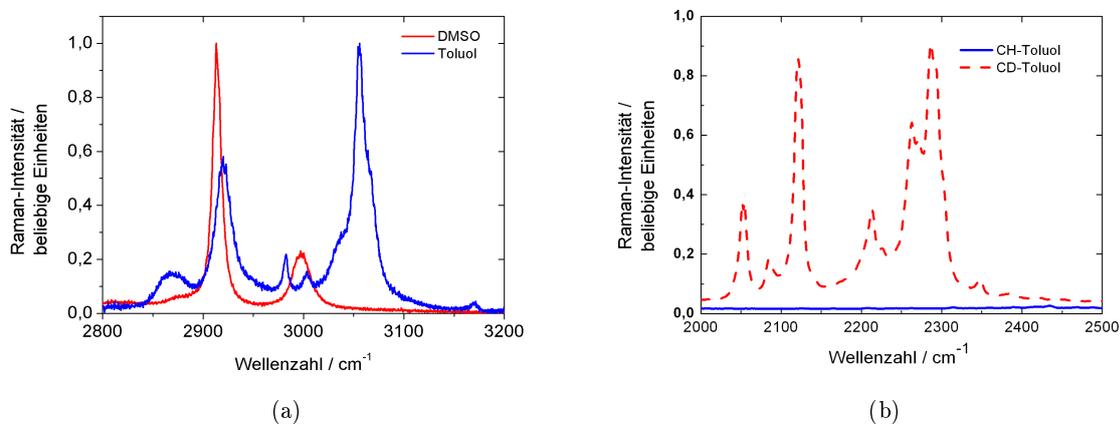


Abbildung 6.7: RAMAN-Spektren von CD-Toluol/CH-Toluol (Bild (a)) bzw. DMSO und Toluol (Bild (b)) in der Wellenzahlregion, in der die CARS-Mikroskopie Experimente mit dem Pump- und dem geformten STOKES-Puls durchgeführt wurden.

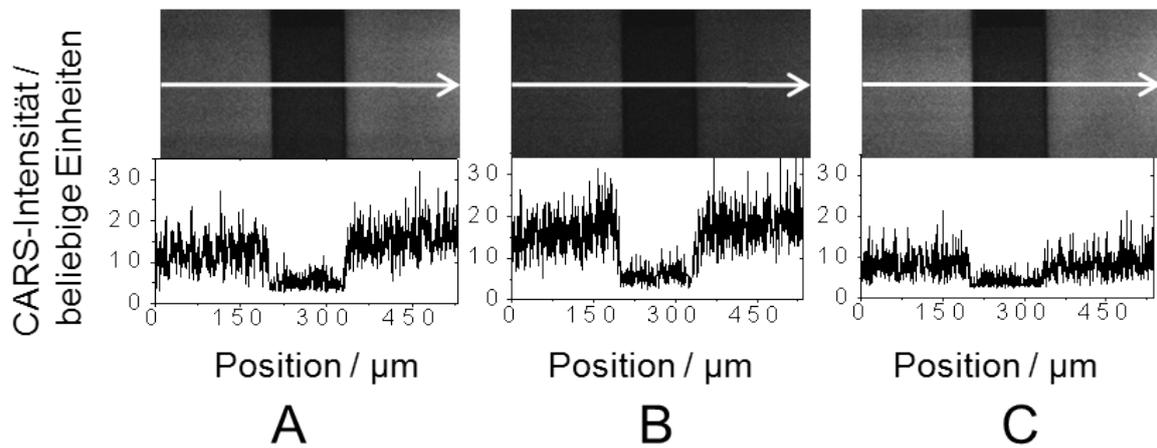
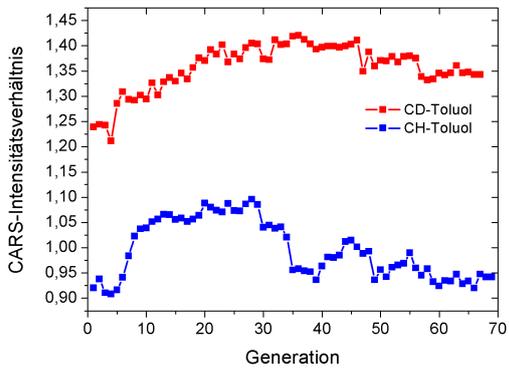


Abbildung 6.8: Optimierte CARS-Bilder. Im jeweils linken Kanal des Mikrofluidikchips befindet sich undeutertes Toluol als Referenz und im jeweils rechten perdeutertes Toluol als Analyt. A): Optimiertes Bild von CD-Toluol gegenüber CH-Toluol. B) : Referenzbild, das mit dem ungeformten Spektrum aufgenommen wurde. C): Optimiertes Bild von CH-Toluol gegenüber CD-Toluol.

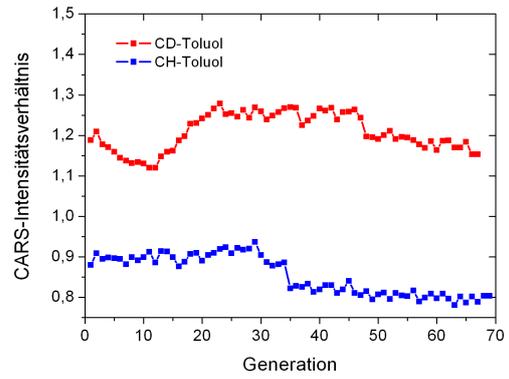
komponenten ausgeschnitten werden. Gleichwohl sind die Pulse nicht transform-limitiert: Ein transform-limitierter Puls hätte bei 350 fs ein 2,9 nm breites Spektrum⁷.

Die Optimierungsdurchläufe sind reproduzierbar, sofern nicht unerwartete Schwankungen, z. B. spektrale Verschiebungen im Spektrum des Pump-OPOs auftreten. Dies sieht man z. B. bei etwa Generation 35, wo der Fitnesswert wahrscheinlich aufgrund einer spektralen Drift des Pump-Spektrums einbricht, wie man am Verlauf der Referenz in Abbildung 6.9 (b) sieht. Trotzdem kann der Algorithmus damit offenbar umgehen und terminiert nach etwa 70 Generationen. Die Mutationsstärke (s. Abbildung 6.9 auf Seite 115) scheint sich anzupassen und regelt nach Generation 35 hoch, um dann gemäß Gleichung 6.6 erneut exponentiell abzufallen.

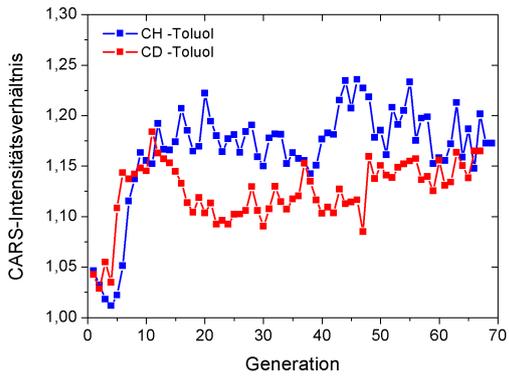
⁷Bei einem angenommenen Gauß-förmigen Puls und einem Bandbreitenprodukt von $\Delta\nu \cdot \Delta\tau = K = 0,4413$.



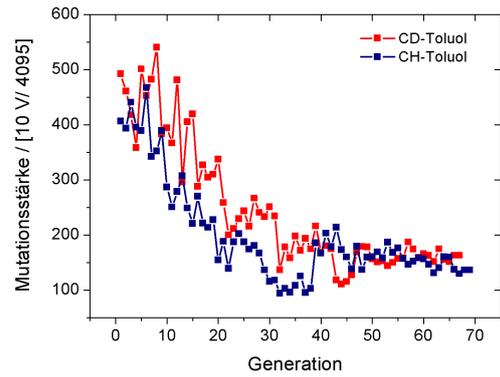
(a)



(b)

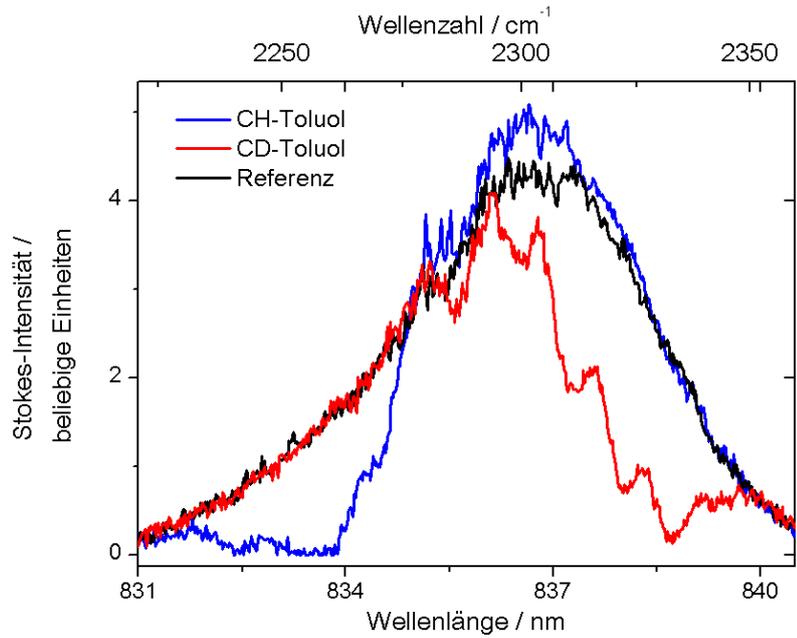


(c)

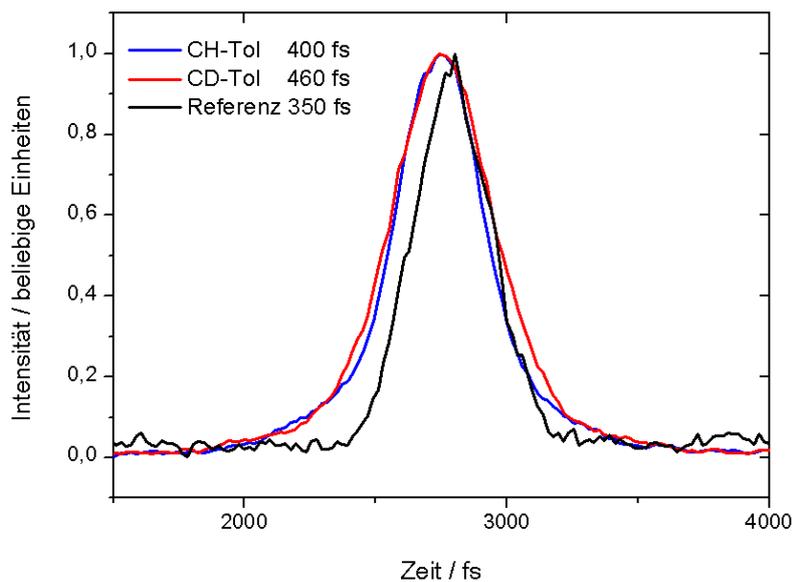


(d)

Abbildung 6.9: Verläufe der CD-Toluol/CH-Toluol (in rot) bzw. CH-Toluol/CD-Toluol-Optimierung (blau). Die Optimierung wurde mit der Anfangsbedingung durchgeführt, dass die Transmission des Impulsformers 100 % betrug. Bild (a): Optimierungsverlauf (Rohdaten) ohne Normierung auf den Referenzvektor. (b): Verlauf des Referenzvektors. (c): Auf den Referenzvektor normierter Optimierungsverlauf. (d): Verlauf der Mutationsstärke.



(a)



(b)

Abbildung 6.10: Zeitliche und spektrale Charakterisierung des geformten STOKES-Pulses für perdeuteriertes Toluol im rechten und für undeuteriertes Toluol im linken Kanal des Mikrofluidikchips. STOKES-Spektren des Referenzpulses sowie der optimierten Pulse. (a): Das STOKES-Spektrum für die Optimierung von CD-Toluol gegenüber CH-Toluol ist komplementär (der kurzwellige Teil des Spektrums wird selektiert; bei der Optimierung von CH-Toluol ist es der langwellige Flügel) zu demjenigen von der Optimierung von CH-Toluol gegen CD-Toluol. (b): Autokorrelation für das (CD-Toluol)/(CH-Toluol)-Optimierungsexperiment. Der Referenzpuls liefert die kürzeste Pulsdauer.

6.3.2 Optimierung von DMSO versus Toluol

Bei der Optimierung der CARS-Intensität von perdeutertem gegenüber undeutertem Toluol liegen nur die RAMAN-Banden von deuteriertem Toluol innerhalb der spektralen Breite der Anregungslaserwellenlänge. Das Potenzial zur Optimierung von CARS-Bildern lässt sich deutlicher beim System DMSO und Toluol demonstrieren, d. h. der Befüllung des Mikrofluidikchips mit DMSO in einen und Toluol im anderen Kanal. Dies lag vor allem an den experimentellen Bedingungen. Der OPO ließ sich bei 664 bis 670 nm (auf die CH-Banden abstimmend) mit 150 mW auf eine etwa doppelt so hohe Ausgangsleistung justieren wie bei 701 nm (auf die CD-Banden abstimmend). Sowohl DMSO als auch Toluol (im Gegensatz zum binären System CD-Toluol/CH-Toluol) weisen starke RAMAN-Banden im CH-Streckschwingungsbereich auf (s. RAMAN-Spektrum in Abbildung 6.7(a) auf Seite 113). Mit Hilfe des ungeformten STOKES-Spektrums, also der vollen Halbwertsbreite, werden sowohl die RAMAN-Banden von Toluol als auch von DMSO angeregt. Dies führt dazu, dass kaum chemischer Kontrast im CARS-Bild sichtbar ist (s. Abbildung 6.11 b). Stellt man als zu optimierenden Parameter(=Fitness) das Intensitätsverhältnis DMSO zu Toluol ein, kann der Algorithmus den Kontrast um den Faktor 2,6 verbessern (s. Abbildung 6.12 auf der nächsten Seite), bevor das Abbruchkriterium, welches einen Abbruch vorsieht wenn kein besserer Wert innerhalb von 10 Generationen gefunden wird, nach etwa 100 Generationen die Optimierung terminiert. Etwa die gleiche Anzahl von Generationen benötigt der Algorithmus, um das *inverse* Kontrastverhältnis, also die CARS-Intensität von DMSO versus Toluol um den Faktor 2,2 zu verbessern. Die Optimierungskurve, die Referenz, der durch die Referenz geteilte Optimierungsverlauf sowie der Verlauf der Mutationsstärke sind in Abbildung 6.12 auf Seite 118 dargestellt. Am Ende der Optimierung weisen die STOKES-Spektren den in Abbildung 6.13 auf Seite 119 gezeigten Verlauf auf. Betrachtet man das Spektrum für die Optimierung von Toluol gegenüber DMSO, so fällt die „M“-förmige Struktur der erhaltenen Spektren auf (s. Abbildung 6.13 auf Seite 119 a). Dies könnte von der selektiven Anregung der beiden RAMAN-Banden von Toluol im CH-Streckschwingungsbereich stammen (s. RAMAN-Spektren in Abbildung 6.7 auf Seite 113). Im Falle der Optimierung der CARS-Intensität von DMSO gegen Toluol wird dagegen nur ein Teil des Spektrums herausgeschnitten (s. Abbildung 6.13 auf Seite 119). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Ramanspektrum von DMSO (s. rote Kurve in Abbildung 6.7 auf Seite 113 (a)), welches bei 2920 cm^{-1} die RAMAN-Bande mit der höchsten Intensität im RAMAN-Spektrum aufweist.

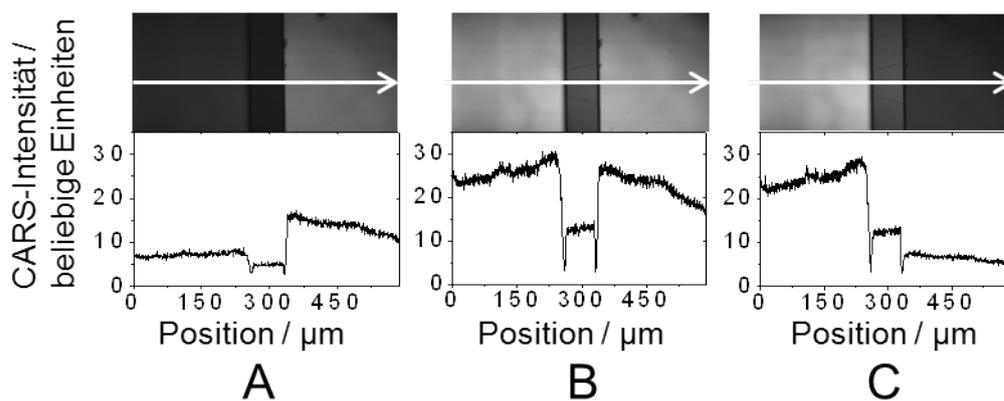
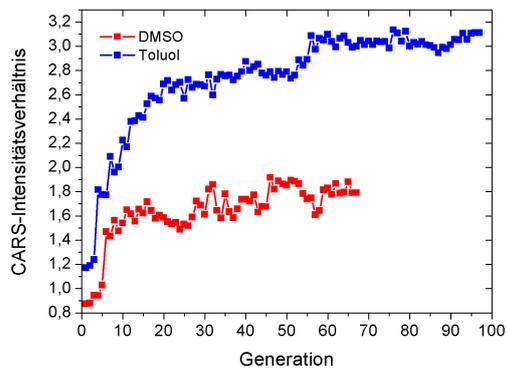
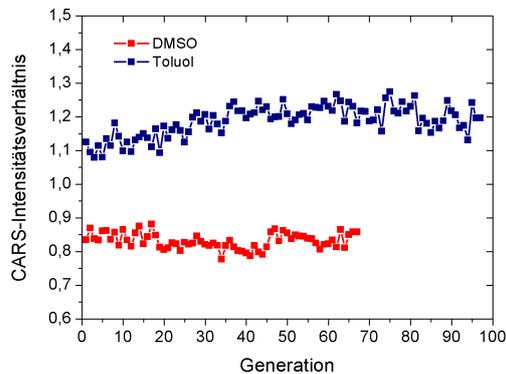


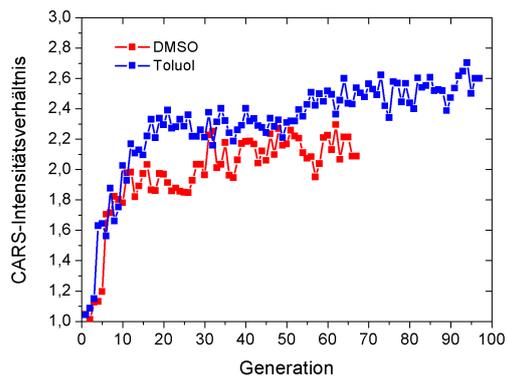
Abbildung 6.11: Optimierte CARS-Bilder von DMSO im rechten und Toluol im linken Kanal des Mikrofluidikchips. A: Optimierung von DMSO gegenüber Toluol. B: Referenzbild, aufgenommen mit dem ungeformten Spektrum des Startvektors. C: Optimierung von Toluol gegenüber DMSO. Im Gegensatz zu den optimierten CARS-Bildern im CD/CH-Toluol Optimierungsexperiment (siehe Abbildung 6.8 auf Seite 114) ist hier das Signal-zu-Rausch Verhältnis vor allem aufgrund der höheren Leistung des OPO bei $667,5\text{ nm}$ (anstatt bei $701,5\text{ nm}$ im Falle des CD/CH-Toluol Optimierungsexperiments) deutlich besser.



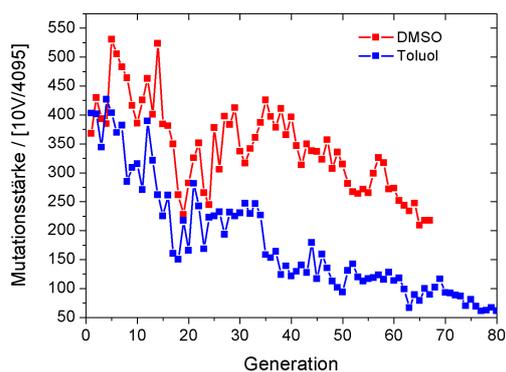
(a)



(b)



(c)

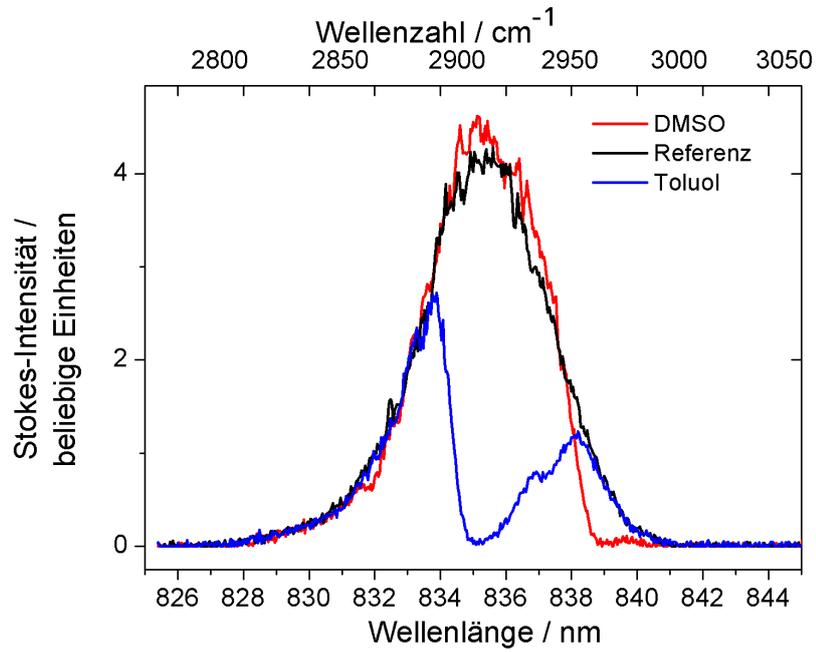


(d)

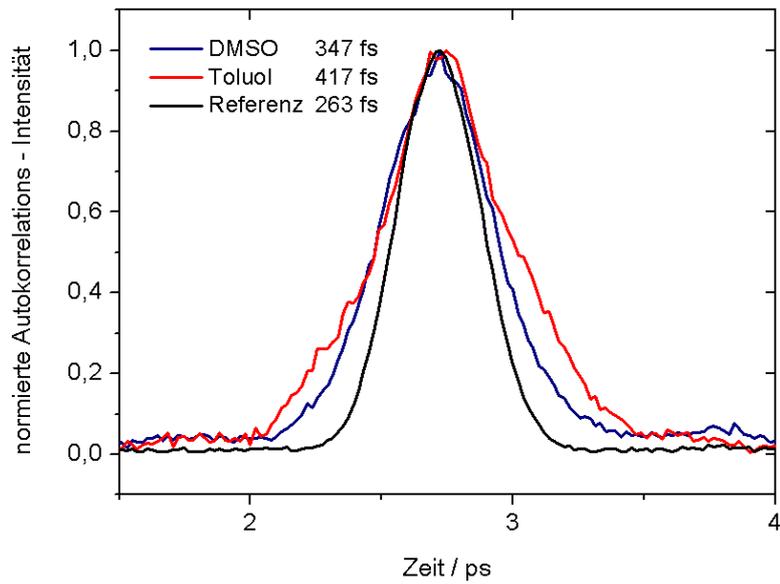
Abbildung 6.12: Optimierungsverlauf des CARS-Intensitätsverhältnisses von DMSO zu Toluol und vice versa. (a): Optimierungsverlauf (Rohdaten) ohne Normierung auf den Referenzvektor. (b): Verlauf des Referenzvektors. (c): Optimierungsdurchläufe nach Normierung auf den Referenzvektor. Hier wurden die Werte aus Abbildung (a) durch die Referenz (Bild (b)) geteilt. (d): Verlauf der Mutationsstärke.

Die Pulsdauer des STOKES-Pulses ist mit 420 fs für die Optimierung von Toluol bzw. mit 350 fs für die Optimierung von DMSO wie schon bei der Optimierung von CD-Toluol gegenüber CH-Toluol länger als die eines transform-limitierten Pulses, welche sich mit einem Bandbreitenprodukt von $K=0,4413$ für gaußförmige Pulse (s. z. B. [95])⁸ mit einer spektralen Breite von etwa 6 nm zu ca. 200 fs berechnet.

⁸ $\Delta\nu \cdot \Delta\tau = K$



(a)



(b)

Abbildung 6.13: Spektren des geformten STOKES-Pulses und des ungeformten als Referenz sowie die zugehörigen Autokorrelationskurven für das DMSO/Toluol-Optimierungsexperiment. Der Referenzpuls liefert die kürzeste Pulsdauer.

Artefakte

Trotz der erfolgreichen Demonstration der Optimierung von chemischem Kontrast in CARS-Bildern soll an dieser Stelle kurz auf Artefakte hingewiesen werden, die für die Interpretation der Ergebnisse bedeutsam sind:

Die STOKES-Spektren der optimierten Pulse erscheinen nur geringfügig moduliert. Es standen tatsächlich jedoch nur etwa 6 nm spektrale Breite zum Modulieren zur Verfügung. Diese Intensität ist etwa gaußförmig über die Flüssigkristallmaske verteilt und somit ist die Leistung, mit der die Probe angeregt wird, von der Wellenlänge abhängig. Dies kann dazu führen, dass je nach der spektralen Lage der RAMAN-Banden im ungünstigsten Falle der nichtresonante Hintergrund mit einer höheren spektralen Leistungsdichte als der RAMAN-resonante Beitrag angeregt wird. Ideal wäre hier ein breites, kastenförmiges Spektrum.

Bei den Optimierungsexperimenten stellte es sich heraus, dass das Endergebnis von den anfangs eingestellten Startparametern abhängt. Beispielhaft sind in Abbildung 6.14 Optimierungsdurchläufe gezeigt, die bei unterschiedlichen Startbedingungen aufgenommen wurden. Eine unterschiedlich eingestellte Sensitivität des Photonenvervielfachers (800 von 4095 Stufen gegenüber 773; dies hat mehr Rauschen im Bild zur Folge) scheint sich auf das Optimierungsergebnis weit weniger auszuwirken als die Wahl der zu Beginn eingestellten Transmission des Impulsformers (0, 33, 100 % Transmission; dabei entspricht ein Spannungswert von 1300 0% Transmission, ein Wert von 1575 33 % Transmission und 4095 100 % Transmission des Startvektors).

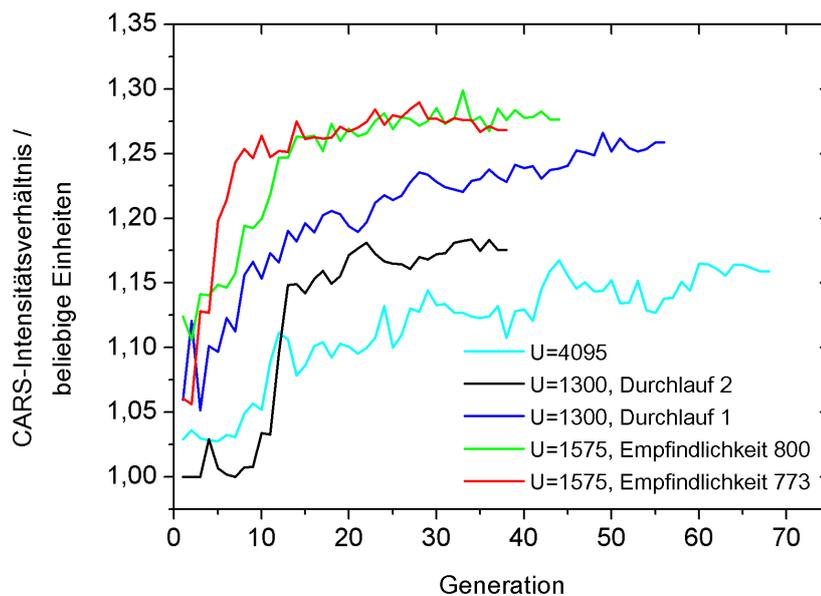


Abbildung 6.14: Optimierungsdurchläufe mit unterschiedlichen Startbedingungen. Gezeigt sind Rohdaten, die nicht durch einen Referenzvektor geteilt wurden.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Evolutionsstrategien getestet, um erstmalig gezielt den chemischen Bildkontrast eines CARS-Bildes zu optimieren. Im Gegensatz zu anderen Strategien, die das Verhältnis vom resonanten Signal zum nichtresonanten Hintergrund spektroskopisch optimieren, wurde hier direkt das CARS-Intensitätsverhältnis vom Analyten zu einer Referenz aus einem Bild als Rückgabewert für eine Evolutionsstrategie (ES) verwendet [80]. In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biosystemanalyse an der Fakultät für Mathematik und Informatik der Universität Jena wurden hierbei verschiedene ES hinsichtlich ihrer Konvergenzgeschwindigkeit, Robustheit gegen Rauschen und Reproduzierbarkeit getestet. Es stellte sich bei ersten Tests zur Optimierung der Transmission einer Halogenlampe mit Hilfe der Flüssigkristallmaske heraus, dass der „thinning“-Algorithmus am besten geeignet erschien, da hier keine Rücksprünge auftraten. Deshalb wurde dieser Algorithmus auch für die CARS-Mikroskopie verwendet. Hierbei wurde als Rückgabewert und somit als Fitnesswert nicht die absolute Transmission benutzt, sondern ein Intensitätsverhältnis, welches von zwei räumlich getrennten Intensitätswerten innerhalb eines CARS-Bildes berechnet wurde. Als Probe unter dem CARS-Mikroskop wurde dabei wieder der Mikrofluidikchip eingesetzt; in die Kanäle wurde entweder Toluol/perdeuteriertes Toluol oder Toluol/DMSO gefüllt. Anschließend wurde versucht, das CARS-Intensitätsverhältnis zwischen beiden Kanälen zu optimieren. Es stellte sich heraus, dass der Optimierungsalgorithmus innerhalb von etwa einer Stunde (inklusive Rechen- und Bildaufnahmezeit) selektiv die Bildintensität durch Modulation des STOKES-Spektrums steuern konnte. Im Falle des Toluols/DMSO-Systems konnte der Kontrast gegenüber dem Wert zu Beginn der Optimierung um den Faktor 2,6 gesteigert werden. Das Experiment zielte natürlich letztendlich darauf ab, das Detektionslimit deuterierter (Wirk-)stoffe zu senken. Dieses Ziel konnte vorerst nicht erreicht werden; vielmehr konnte vorläufig gezeigt werden, dass der Kontrast sich mit Hilfe des LC-SLMs und einer ES optimieren lässt. Mit Femtosekundenpulsen konnte der Kontrast um den Faktor 1,15 gesteigert werden. Trotz der Demonstration der Machbarkeit eines solchen Experiments zur Bildkontrastoptimierung [80] konnte der chemische Kontrast also *nicht* über dasjenige mit schmalbandigen ps-Pulsen ermittelte gesteigert werden, welches für den Fall perdeuteriertes Toluol/Toluol 2,5:1 betrug (s. Kapitel 3 auf Seite 26). Für zukünftige Experimente wäre interessant, bis zu welchen Konzentrationen der Algorithmus selektiv die RAMAN-Bande der CD-Streckschwingung anregen kann.

Kapitel 7

Zusammenfassung

„Entwicklung und Anwendung der CARS - Mikroskopie zum Nachweis C-deuterierter Wirkstoffe“ – so lautet der Titel dieser Arbeit. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Weiterentwicklung der CARS-mikrospektroskopischen Technik, mit dem Ziel niedrige Konzentrationen von deuterierten Wirkstoffen im Bildkontrast nachweisen zu können.

Bevor der Aufbau zum Nachweis niedrigerer Konzentrationen weiterentwickelt wurde, wurden Untersuchungen mittels RAMAN- und konventioneller CARS-Mikroskopie an C-deuterierten Wirkstoffen und Modellsystemen durchgeführt. Diese Wirkstoffe wurden im Kontext des SFB 630 untersucht. Dabei stellte es sich heraus, dass mit Hilfe der RAMAN-Mikrospektroskopie Konzentrationen deuterierter Wirkstoffe im 10-50 mM-Bereich anhand ihrer RAMAN-Intensität im CD-Streckschwingungsbereich noch nachgewiesen werden konnten. Als nächster Schritt standen quantitative Messungen mit Hilfe der CARS-Mikroskopie an. Hierbei wurden mit Hilfe eines konventionellen CARS-Aufbaus die Anregungswellenlängen Pump und STOKES so eingestellt, dass ihre Wellenzahldifferenz gerade der spektralen Lage der CD-Bande im RAMAN-Spektrum der jeweiligen Substanz entsprach. Da im Gegensatz zur RAMAN-Spektroskopie ein nicht-spezifischer Untergrund angeregt wird, musste die anti-STOKES-Intensität auf diesen Untergrund normiert werden. Für diese quantitativen CARS-Messungen wurde daher ein Mikrofluidik-Chip verwendet. Dieser Chip erlaubte es durch die Detektion zweier Kanäle im Bildfeld des Mikroskops, das CARS-Signal auf den nichtresonanten Untergrund zu referenzieren. Hierbei enthielt der Referenzkanal den undeuterten Analyten, welcher nur einen unspezifischen nicht-resonanten Hintergrund generierte. Diese quantitativen CARS-Messungen offenbarten dabei eine Detektionsgrenze von etwa 100-200 mM - noch weit entfernt von physiologisch relevanten Wirkstoffkonzentrationen im nM- Bereich.

Um den Schwingungskontrast, der die Detektionsgrenze bestimmt, zu verbessern, wurde auf einen Lichtmodulator zurückgegriffen, der die Lichtpulse in Amplitude und Phase manipulieren kann. Um den chemischen Kontrast zu quantifizieren, wurde auch hier der Mikrofluidikchip mit zwei Kanälen im Bildfeld eingesetzt. Das Intensitätsverhältnis dieser Kanäle wurde hier direkt als Rückgabewert für einen selbstlernenden Algorithmus verwendet, der selbständig die optimale Pulsform finden sollte. Es stellte sich bei ersten Versuchen heraus, dass der Kontrast um den Faktor 1,15 für das Verhältnis perdeuteriertes Toluol im einen Kanal gegenüber undeutertem Toluol im anderen Kanal gesteigert werden konnte. Im Bereich der CH-Streckschwingung konnte der Kontrast am Beispiel Toluol/Dimethylsulfoxid sogar um den Faktor 2,6 gesteigert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, den chemischen Bildkontrast, der letztendlich die Detektionsgrenze bestimmt, zu optimieren. In den hier durchgeführten Machbarkeitsstudien stellte sich heraus, dass der CARS-Bildkontrast mit schmalbandigen ps-Pulsen sehr viel besser ist als der optimierte Kontrast mit geformten Femtosekundenpulsen. Interessant ist die Frage, welche Konzentration an deuterierten Wirkstoffen mit geformten fs-Pulsen noch detektierbar sein wird. Vielleicht wird es perspektivisch möglich sein, CARS-Bilder von Wirkstoffen in Zellen zu detektieren, wenn vorher das Anregungsspektrum zur Detektion des Wirkstoffes optimiert wurde. Hier eröffnet sich eine vielfältige Anwendungspalette, da man letztendlich nicht auf die CARS-Mikroskopie beschränkt ist: Ebenso lassen sich breitbandige Spektren für andere nichtlineare Mikroskopietechniken wie die FSRS-, SHG-, THG- oder Zwei-

photonenfluoreszenzmikroskopie formen, um - je nach Anwendung - den optimalen Bildkontrast zu generieren.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Weiterentwicklung und Vereinfachung des CARS-Mikroskopie-Aufbaus. Ein Schritt in dieser Richtung bestand darin, durchstimmbare Filter zu verwenden, mit deren Hilfe in schneller Abfolge schmale Anregungsspektren aus einem ursprünglich breitbandigen Spektrum ausgeschnitten werden können. Diese Lichtquellen bestanden aus einer breitbandigen Primärlichtquelle und einem Impulsformer als spektralem Filter. In einer Vergleichsstudie mit Hilfe eines mit einer Faser erzeugten Superkontinuums als Primärlichtquelle wurde gezeigt, dass sich sowohl ein akustooptischer Modulator (AOM) als auch eine Flüssigkristallmaske (liquid-crystal spatial light modulator, kurz LC-SLM) als durchstimmbare spektrale Filter eignen. Die Anwendbarkeit solcher Filter in der RAMAN-Spektroskopie wurde anhand eines Demonstrationsaufbaus gezeigt, mit dem sich RAMAN-Spektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufnehmen lassen, ohne dass die Lichtquelle gewechselt werden muss. Der Lichtmodulator agierte hierbei als flexibler, durchstimmbarer Filter für das *Anregungslicht*. Analog dazu wurde anhand einer fluoreszierenden Probe gezeigt, dass sich ein solcher Impulsformer auch eignet, als durchstimmbarer Filter zusammen mit einer Photodiode als Ein-Kanal-Detektor ein *Emissions*-Spektrum ohne Viel-Kanal-Spektrometer aufzunehmen. Die Impulsformer wurden nicht nur in der Spektroskopie eingesetzt, sondern auch in der nicht-linearen Quasi-Multiplex (QM-CARS)-Mikroskopie - auch „Shaper-assisted Multiplex CARS genannt“ ([71], [96]). Bei dieser Technik werden die Impulsformer als „Schalter“ eingesetzt, um zwischen verschiedenen, bildgebenden RAMAN-Banden zu wechseln. Dies wurde zuerst anhand der CH-Streckschwingungsregion im Bereich von 2900 bis 3100 cm^{-1} gezeigt. Hier konnten durch spektrales Filtern eines ca. 170 cm^{-1} breiten Laserspektrums selektiv RAMAN-Banden angeregt werden; dies konnte sowohl anhand eines CARS-Spektrums von Toluol in einer Küvette als auch durch CARS-Bilder von Toluol und perdeuteriertem Toluol in einem Mikrofluidikchip belegt werden, indem mit dem AOM die STOKES-Wellenlänge durchgestimmt wurde.

Die Vereinfachung des CARS-Aufbaus geschah schließlich durch die Umsetzung eines Schemas für Quasi-Multiplex-CARS-Mikroskopie. Hierbei diente ein akustooptischer Modulator als spektraler Filter, um zwischen verschiedenen RAMAN-Banden für die chemische Bildgebung zu wechseln. Durch einen Demonstrationsaufbau, hauptsächlich bestehend aus einer nichtlinearen Faser als Breitbandlichtquelle und einem akustooptischen Modulator als spektralem Filter, wurde gezeigt, dass mit solch einem in Relation zu einem Aufbau für konventionelle CARS-Mikroskopie kompakten Aufbau Schwingungskontrast generiert werden kann. Dies wurde in der *Fingerprint*-Wellenzahlregion von Toluol gezeigt. In diesem Experiment diente perdeuteriertes Toluol als Referenz - im Gegensatz zu den quantitativen CARS-Messungen, wo die undeuterte Substanz zur Referenzierung diente. Um Bildartefakte zu vermeiden, die aufgrund der unterschiedlichen Repetitionsrate der akustischen Welle und der Scan-Frequenz des Laser Scanning Mikroskops entstehen, wäre es erforderlich, den AOM mit Hilfe des Scanning Mikroskops triggern zu können. Eine mögliche Lösung könnte darin bestehen, nach Synchronisation der Repetitionsrate des AOPDF mit der Scanfrequenz des LSM zwei Bilder aufzunehmen. Diese Bilder, die sich gerade um eine halbe Periode des resultierenden Streifenmusters unterscheiden müssten, könnten dann nach der Messung konstruktiv überlagert werden. Der gezeigte Aufbau könnte noch weiter vereinfacht werden, indem aus einer *einzigsten* Lichtquelle Pump- und STOKES-Puls geformt würden („single-band CARS“). Hierfür ist aber eine hohe Beugungseffizienz des akustooptischen Modulators notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CARS-Mikroskopie als schnelle, nicht-invasive bildgebende Technik eine attraktive Alternative zur Fluoreszenzmikroskopie sein könnte, wenn deren Eigenschaften noch weiter optimiert werden. Dies betrifft sowohl die relativ hohe Nachweisgrenze im Bereich von Analyten im mM-Konzentrationsbereich als auch die Komplexität eines CARS-Messaufbaus. Beiden Gesichtspunkten wurde mit dem Einsatz von Lichtmodulatoren begegnet. Es konnten erfolgreich erste Schritte sowohl auf dem Weg zu einem vereinfachten CARS-Aufbau als auch zu einer Optimierung von Schwingungskontrast aufgezeigt werden.

Kapitel 8

Summary

This work aimed at the development of microspectroscopic tools to lower the detection limit of C-deuterated drugs in CARS microscopy. The first step towards this ambitious goal was to determine the detection limit given by RAMAN microspectroscopy and by existing setups for CARS microscopy. This was accomplished by measuring different concentrations of deuterated drugs and perdeuterated model systems. It turned out that concentrations in the 10-50 mM-range could be detected via RAMAN microspectroscopy. To determine the detection limit for CARS microscopy a microfluidic chip was employed, because of the additional excitation of a nonresonant background during CARS. Having two channels in the field of view of a microscope objective enabled quantifying the ratio of the RAMAN-resonant signal to the nonspecific background. One channel contained the deuterated compound with a defined concentration; whereas, the second, serving as a reference, contained only the undeuterated substance. These quantitative CARS measurements with narrow-band picosecond pulses revealed a detection limit of ca. 100-200 mM for deuterated drugs in solution – worse than the limit previously determined by RAMAN spectroscopy and far away from physiologically relevant concentrations usually employed in drug research (nM range).

In order to improve the chemical contrast of CARS microscopy and thus lowering the detection limit, light modulators – a liquid-crystal spatial light modulator (LC-SLM) and an acoustooptic modulator (AOM) – were employed to shape the excitation laser pulses. Before implementing these pulse shapers, they were characterized and tested. The LC-SLM was used to modulate the amplitude of the excitation laser in a RAMAN spectroscopic experiment. By spectrally filtering a spectrally broad light source, RAMAN spectra could be recorded with different narrow-band *excitation* wavelengths without changing the initial light source. In a second line of experiments, the LC-SLM was employed to shape the *emission* spectrum of a fluorescent dye in order to record the spectrum with a photo diode as a single-channel detector instead of a spectrometer with a CCD detector.

Spectral filtering with both light modulators was then demonstrated in concert with a supercontinuum light source. The broad spectrum of this primary light source was spectrally filtered either by the LC-SLM or the AOM. The combination of this spectrally broad light source and a light modulator provides a tunable, flexible light source for laser spectroscopy.

The main application of the AOM was its use as a fast switch between RAMAN bands in CARS microscopy. For a first demonstration, the spectrum of the laser (ca. 170 cm^{-1}) was shaped to select RAMAN bands in the CH-stretching region. The selective excitation could be demonstrated by recording a multiplex-CARS spectrum of toluene in a cuvette as well as by recording CARS images of toluene and perdeuterated toluene in the microfluidic chip. In order to be able to shape a broader spectral range, a scheme for “quasi-multiplex”(QM) CARS microscopy was implemented, which allowed for fast switching between different RAMAN bands. The setup for QM microscopy consisted of a photonic crystal fiber as a broadband light source and the AOM as a tunable spectral filter. By spectral filtering of the excitation spectrum, CARS images of toluene and perdeuterated toluene in a microfluidic chip were recorded at

different wavenumbers in the fingerprint region. Subsequently, a “pseudo”-CARS line profile was extracted from these images. Future experiments may demonstrate that the spectrum shaped by the AOM is narrow enough to restore vibrational contrast. In the future, this setup could be further improved by using the fiber for both the pump and the Stokes pulse simultaneously. To do so, a high diffraction efficiency of the AOM is needed. Furthermore, the repetition rate of the acoustic wave has to be synchronized with the scanning frequency of the microscope, as it was not the case in our experiments.

The final experimental CARS setup of this work optimized the chemical contrast of the CARS images in order to improve sensitivity. This setup included the LC-SLM using an evolutionary algorithm which searched for the optimal shape of the excitation pulse. The CARS image contrast between the two channels of a microfluidic chip was used directly as a feed back value for this algorithm. It turned out that the image contrast could be improved by a factor of 1.15 for perdeuterated toluene versus undeuterated toluene. For toluene versus DMSO, in the two channels of the chip, the contrast could even be enhanced by a factor of 2.6.

In conclusion, two major drawbacks of CARS microscopy were investigated within this thesis: The complexity of a CARS microscopy setup and its relatively low sensitivity. Both issues were addressed by employing light modulators that improve the shape of the excitation laser pulses. The pulse shapers were able to switch quickly between different RAMAN bands and found the optimal pulse shape by an evolutionary algorithm. It could be shown that chemical image contrast can be optimized and RAMAN bands can be selectively excited by such shaped laser pulses. Nevertheless, these experiments serve only as the first step towards optimizing the contrast in CARS images. As it turned out the contrast generated by ps-pulses is much better than the contrast generated by optimally shaped fs-pulses. In future it should be investigated what concentration is detectable using such shaped excitation laser pulses. Perhaps it will be possible to track deuterated drugs in cells when the excitation laser pulses are optimized for the RAMAN band of the CD-stretching vibration. There are a lot of possibilities to apply such shaped laser pulses, especially since these can also be applied to any kind of nonlinear microscopy (e.g. femtosecond stimulated RAMAN scattering, second harmonic generation, third harmonic generation, or two-photon fluorescence microscopy).

Kapitel 9

Publikationen

9.1 In diese Doktorarbeit eingegangene Artikel

- E. Vater, G. Bergner, D. Akimov, S. Schlücker, H. Bartelt, B. Dietzek und J. Popp, „Tunable light source for narrow-band excitation: Application to Raman spectroscopy“, *Laser Phys. Lett.* **6**, 639-643 (2009).
- G. Bergner, S. Chatzipapadopoulos, D. Akimov, B. Dietzek, D. Malsch, T. Henkel, S. Schlücker und J. Popp, „Quantitative CARS microscopic detection of analytes and their isotopomers in a two-channel microfluidic chip“, *Small* **5**, 2816-2818 (2009).
- G. Bergner, E. Vater, D. Akimov, S. Schlücker, H. Bartelt, B. Dietzek und J. Popp, „Tunable narrow band filter for CARS microscopy“, *Laser Phys. Lett.* **7**, 510-516 (2010).
- V. Tombelaine, G. Bergner, E. Vater, S. Schlücker, J. Popp, H. Bartelt und R. Jamier, „Spectrally shaped light from supercontinuum fiber light sources“, *Optics Communications* **284**, 1970-1974 (2011).
- G. Bergner, D. Akimov, S. Schlücker, H. Bartelt, B. Dietzek und J. Popp, „Tunable optical setup with high flexibility for spectrally resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy“, *Laser Phys. Lett.* **8**, 541-546 (2011).
- G. Bergner, C. R. Albert, M. Schiller, G. Bringmann, T. Schirmeister, B. Dietzek, S. Niebling, S. Schlücker und J. Popp, „Quantitative detection of C-deuterated drugs by CARS microscopy and Raman microspectroscopy“, *Analyst* **136**, 3686-3693 (2011).
- Ch. Matthäus, G. Bergner, C. Krafft, B. Dietzek, S. Lorkowski und J. Popp, „Monitoring intra-cellular lipid metabolism in macrophages by Raman- and CARS-microscopy“, *Proceedings of SPIE 2010*, 771511-771511-8.
- G. Bergner, B. Kampe, P. Dittrich, B. Dietzek, S. Schlücker und J. Popp, „Optimal control of Coherent ant-Stokes Raman scattering image contrast“, *Appl. Phys. Lett.* **100**, 2611061-2611064 (2012).

9.2 Weitere, im Rahmen dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen

- M. Klapper, M. Ehmke, D. Palgunow, M. Böhme, C. Matthäus, G. Bergner, B. Dietzek, J. Popp und F. Döring, „Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in *Caenorhabditis elegans* reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches“, *J. Lipid. Res.* **8**, 1281-1293 (2011).
- C. Matthäus, G. Bergner, C. Krafft, B. Dietzek, B. R. Brehm, B. Romeike und J. Popp, „Characterization of atherosclerotic plaque-depositions by infrared, Raman and CARS microscopy“, *Proceedings of SPIE* 2011.
- S. Schlücker, M. Salehi, G. Bergner, M. Schütz, P. Ströbel, A. Marx, I. Petersen, B. Dietzek und J. Popp, „Immuno-SECARS microscopy: Immunohistochemistry with SERS-labeled antibodies and CARS microscopy“, *Analytical Chemistry* **83**, 7081-7085 (2011).
- C. Matthäus, S. Dochow, G. Bergner, A. Lattermann, B. F. M. Romeike, E. Marple, C. Krafft, B. Dietzek, B. R. Brehm und J. Popp, „In vivo characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman-probe spectroscopy and in vitro CARS microscopic imaging on a rabbit model“, *Anal. Chem.* **84**, 7845–7851 (2012).

Tagungsbeiträge

- G. Bergner, D. Akimov, M. Schmitt, S. Schlücker und J. Popp, „Detection of C-Deuterium compounds by CARS microscopy“, DPG-Frühjahrstagung, Darmstadt 2008.
- G. Bergner, S. Chatzipapadopoulos, S. Schlücker, D. Akimov, M. Schmitt und J. Popp, „Quantitative CARS microscopy: Detection of C-Deuterium compounds“, International Conference on Raman spectroscopy (ICORS), London 2008.
- „CARS microscopy: Principles and applications in drug research“, Vortrag im Rahmen des Doktorandensymposiums „New Trends in Infectious Disease Research“ des SFB 630, Bronnbach 2008.
- „Two-channel microfluidic CARS for Quantifying Pure Vibrational Contrast of Model Analytes“, SPIE Photonics Europe 2010, Brüssel 2010.
- G. Bergner, B. Dietzek, H. Bartelt, S. Schlücker und J. Popp, „Quantification and Improvement of vibrational contrast of the CARS signal of organic compounds and its deuterated isotopomers“, μ -CARS 2010, Physikzentrum Bad Honnef, Bad Honnef 2010.
- G. Bergner, D. Akimov, B. Dietzek, S. Schlücker und J. Popp, „Microfluidic-CARS: Determining detection limits with CARS microspectroscopy“, University of Twente, ECONOS, Twente 2011.
- G. Bergner, T. Henkel, B. Dietzek, S. Schlücker, H. Bartelt und J. Popp, „Development of CARS microscopy for biomedical diagnostics“, SPIE EBCO 2011, München 2011.

Kapitel 10

Danksagung

Zum Schluß gebührt einer Reihe von Personen mein aufrichtiger Dank:

Prof. Dr. Schlücker danke ich für die Vergabe des Themas und viele Anregungen und Hilfestellungen.

Prof. Popp danke ich für die Aufnahme ans IPHT, die sehr gute Ausstattung der Labore, seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht und das Ermöglichen der Teilnahme an Konferenzen.

Prof. Dr. Benjamin Dietzek sei nicht nur für das Übernahme des Zweitgutachtens, sondern für eine ganze Reihe anderer Dinge gedankt: So danke ich ihm für die Betreuung der Arbeit von IPHT-Seite ebenso wie für das Vorantreiben der Projekte und Publikationen und das Schaffen produktiver Rahmenbedingungen.

Prof. Dr. Dr. h. c. Gerhard Bringmann danke ich für die Aufnahme in den Sonderforschungsbereich SFB 630 „Erkennung, Gewinnung und funktionelle Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“.

Dr. Denis Akimov danke ich sehr für die humorvolle und geduldige Bantwortung zahlreicher Fragen rund um RAMAN und CARS und die praktische Hilfe im Labor.

Martin Ranke danke ich für die Erstellung eines Programms zur Auswertung der CARS-Bilder. Für die kompetente Unterstützung bei zahlreichen technischen Problemen sei Dr. Nicolae Tarcea herzlichst gedankt.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Erik Vater, mit dem es viel Spaß gemacht hat, den LC-SLM aufzubauen.

Bernd Kampe sei für die gute Zusammenarbeit, was die Entwicklung der evolutionäre Algorithmen angeht und darüber hinaus für die Beantwortung zahlreicher Fragen und Hilfestellungen (und Pizzamuffins) gedankt.

Christian Matthäus danke ich für eine gute Zusammenarbeit hinsichtlich der Makrophagenexperimente. Unvergeßlich sind die Abende am IPHT mit Bier und Pizza.

Professor Dr. Hartmut Bartelt und Vincent Tombelaine sei für die gute Zusammenarbeit hinsichtlich der Faserexperimente gedankt.

Dr. George Sarau danke ich für die Duldung meiner Messungen an seinem RAMAN-Spektrometer. Nadine Vogler, Julia Meyer-Ilse, Sebastian Börner, Christian Matthäus, Bernhard Kampe, Sandro Heuke und Johann Schäfer sei für das Korrekturlesen dieser Arbeit herzlich gedankt.

Der Arbeitsgruppe Spektroskopie/Mikroskopie am IPHT sei für eine angenehm-kollegiale Arbeitsatmosphäre gedankt.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Schmitt, J. Popp, *Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century*, J. Raman Spectrosc. **37**, 20–28 (2006).
- [2] C. L. Evans, X. S. Xie, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine*, Annu. Rev. Anal. Chem. **1**, 883–904 (2008).
- [3] D. Dörfer, W. Schumacher, N. Tarcea, M. Schmitt, J. Popp, *Quantitative mineral analysis using Raman spectroscopy and chemometric techniques*, J. Raman Spectrosc. **41**, 684–689 (2010).
- [4] N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, I. Latka, C. Krafft, N. Bendsoe, K. Svanberg, B. Dietzek, J. Popp, *Multimodal imaging to study the morphochemistry of basal cell carcinoma*, J. Biophotonics **3**, 728–736 (2010).
- [5] C. Matthäus, G. Bergner, C. Krafft, B. Dietzek, S. Lorkowski, J. Popp, *Monitoring intracellular lipid metabolism in macrophages by Raman- and CARS-microscopy*, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng., 771511-771511-8 (2010).
- [6] C. Matthäus, T. Chernenko, J. A. Newmark, C. M. Warner, M. Diem, *Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy*, Biophys. J. **93**, 668–673 (2007).
- [7] C. Matthäus, A. Kale, T. Chernenko, V. Torchilin, Diem, *New Ways of Imaging Uptake and Intracellular Fate of Lipoosomal Drug Carrier Systems inside Individual Cells, Based on Raman Microscopy*, Molecular Pharmaceutics **5**, 287–293 (2007).
- [8] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, vierte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim (2006).
- [9] M. Diem, P. R. Griffiths, J. M. C. (Eds.), *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Wiley & sons.
- [10] C. Krafft, A. A. Ramoji, C. Bielecki, N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, P. Roesch, M. Schmitt, B. Dietzek, I. Petersen, A. Stallmach, J. Popp, *A comparative Raman and CARS imaging study of colon tissue*, J. Biophotonics **2**, 303–312 (2009).
- [11] P. D. Maker, R. W. Terhune, *Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength*, Phys. Rev. A **137**, A801–818 (1964).
- [12] R. F. Begley, A. B. Harvey, R. L. Byer, J. Hudson, *Raman spectroscopy with intense, coherent, anti-Stokes beams*, J. Chem. Phys. **61**, 2466 (1974).
- [13] A. Zumbusch, G. R. Holtom, X. S. Xie, *Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering*, Phys. Rev. Lett. **82**, 4142–4145 (1999).
- [14] A. M. Zheltikov, *Coherent anti-Stokes Raman scattering: from proof-of-the-principle experiments to femtosecond CARS and higher order wave-mixing generalizations*, J. Raman Spectrosc. **31**, 653–667 (2000).
- [15] M. Duncan, J. Reintjes, T. Manuccia, *Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope*, Opt. Lett. **7**, 350–352 (1982).

- [16] G. W. H. Wurpel, J. M. Schins, M. Müller, *Chemical specificity in three-dimensional imaging with multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, Opt. Lett. **27**, 1093–1095 (2002).
- [17] G. Turrell, *Raman Microscopy*, Elsevier Academic Press, San Diego (1996).
- [18] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy A Practical Approach*, Wiley and sons (2005).
- [19] Demtröder, *Laserspektroskopie*, 4. Auflage, Springer-Verlag Heidelberg (2004).
- [20] Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, Wiley Interscience, New York (1984).
- [21] Boyd, *Nonlinear Optics*, 3. Auflage, Academic Press New York (2008).
- [22] S. A. Akhmanov, N. Koroteev, *Methods of Nonlinear Optics in Light Scattering Spectroscopy*, Nauka, Moskau (1981).
- [23] T. Hellerer, *CARS-Mikroskopie: Entwicklung und Anwendung*, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München (2004).
- [24] W. M. Tolles, J. W. Nibler, J. R. McDonald, A. B. Harvey, *A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS)*, Appl. Spectrosc. **31**, 253–271 (1977).
- [25] J.-X. Cheng, X. S. Xie, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications*, J. Phys. Chem. B **108**, 827–840 (2004).
- [26] M. Müller, A. Zumbusch, *Coherent anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*, ChemPhysChem **8**, 2156–2170 (2007).
- [27] J. Day, K. Domke, G. Rago, H. Kano, H. Hamaguchi, E. Vartiainen, M. Bonn, *Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy*, J. Phys. Chem. B **24**, 7713–7725 (2011).
- [28] W. Min, C. W. Freudiger, S. Lu, X. S. Xie, *Coherent Nonlinear Optical Imaging: Beyond Fluorescence Microscopy* **62**, 507–530 (2011).
- [29] B. Schrader, *Chemische Anwendungen der Raman-Spektroskopie*, Angewandte Chemie **21**, 925–964 (1973).
- [30] W. Demtröder, *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*, zweite Auflage, Springer (1999).
- [31] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*, zweite Auflage, deGruyter, Berlin (2002).
- [32] D. A. Long, *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*, John Wiley and sons (2002).
- [33] R. Trebino, *Frequency-Resolved Optical Gating: The Measurement of Ultrashort Laser Pulses*, Kluwer Academic Publishers (2000).
- [34] J. X. Cheng, A. Volkmer, X. S. Xie, *Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, J. Opt. Soc. Am. B **19**, 1363–1375 (2002).
- [35] A. Chikisev, Yu, G. W. Lucassen, N. I. Koroteev, C. Otto, J. Greve, *Polarization sensitive coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy of the amide I band of proteins in solutions*, Biophys. J. **63**, 976–985 (1992).
- [36] D. A. Kleinman, Phys. Rev. **126**, 1977 (1962).
- [37] A. Volkmer, J.-X. Cheng, X. S. Xie, Phys. Rev. Lett. **87**, 023901 (2001).

- [38] S. Mukamel, *Principles of Nonlinear Optics and Spectroscopy*, Oxford University Press (1995).
- [39] F. Moya, S. Druet, M. Pealat, J. Taran, *Flame investigation by coherent anti-Stokes Raman scattering*, American Institute of Aeronautics and Astronautics Paper **76**, 29 (1976).
- [40] J. F. Reintjes, *Nonlinear Optical Parametric Processes in Liquids and Gases*, Academic Press (1984).
- [41] M. Müller, J. M. Schins, *Imaging the Thermodynamic State of Lipid Membranes with Multiplex CARS Microscopy*, J. Phys. Chem. B **106**, 3715–3723 (2002).
- [42] H. A. Rinia, M. Bonn, M. Müller, *Quantitative Multiplex CARS Spectroscopy in Congested Spectral Regions*, J. Phys. Chem. B **110**, 4472–4479 (2006).
- [43] E. O. Potma, C. L. Evans, X. S. Xie, *Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging*, Opt. Lett. **31**, 241–243 (2006).
- [44] D. Oron, N. Dudovich, Y. Silberberg, *Femtosecond Phase-and-Polarization Control for Background-Free Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*, Phys. Rev. Lett. **90**, 213902/1–213902–4 (2003).
- [45] J. X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, X. S. Xie, *An Epi-Detected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (E-CARS) Microscope with High Spectral Resolution and High Sensitivity*, J. Chem. B **105**, 1277 (2001).
- [46] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, X. S. Xie, *Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy*, Science **322**, 1857–1860 (2008).
- [47] C. W. Freudiger, W. Min, G. R. Holtom, B. Xu, M. Dantus, X. Sunney Xie, *Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy*, Nat. Photonics **5**, 103–109 (2011).
- [48] E. Ploetz, B. Marx, T. Klein, R. Huber, P. Gilch, *A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*, Opt. Express **17**, 18613–18620 (2009).
- [49] U. Kaeppler, N. Stiefl, M. Schiller, R. Vicik, A. Breuning, W. Schmitz, D. Rupprecht, C. Schmuck, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister, *A New Lead for Nonpeptidic Active-Site-Directed Inhibitors of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Main Protease Discovered by a Combination of Screening and Docking Methods*, J. Med. Chem. **48**, 6832–6842 (2005).
- [50] A. Ponte-Sucre, J. H. Faber, T. Gulder, I. Kajahn, S. E. H. Pedersen, M. Schultheis, G. Bringmann, H. Moll, *Activities of Naphthylisoquinoline Alkaloids and Synthetic Analogs against Leishmania major*, Antimicrob. Agents Ch. **51**, 188–194 (2007).
- [51] O. Burkacky, A. Zumbusch, C. Brackmann, A. Enejder, Opt. Lett. **31**, 3656–3658 (2006).
- [52] E. Vater, *Quasi-Multiplex CARS-Mikroskopie*, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller Universität Jena (2009).
- [53] G. Bergner, S. Chatzipapadopoulos, D. Akimov, B. Dietzek, D. Malsch, T. Henkel, S. Schlücker, J. Popp, *Quantitative CARS Microscopic Detection of Analytes and Their Isotopomers in a Two-Channel Microfluidic Chip*, Small **5**, 2816–2818 (2009).
- [54] G. Bergner, C. R. Albert, M. Schiller, G. Bringmann, T. Schirmeister, B. Dietzek, S. Niebling, S. Schlücker, J. Popp, *Quantitative detection of C-deuterated drugs by CARS microscopy and Raman microspectroscopy*, Analyst **136**, 3686–3693 (2011).

- [55] A. Dogariu, A. Goltsov, H. Xia, M. Scully, *Concentration dependence in coherent Raman scattering*, Journal of Modern Optics **55**, 3255–3261 (2008).
- [56] E. Kang, H. Wang, I. Kwon, J. Robinson, K. Park, J. Cheng, *In situ visualization of paclitaxel distribution and release by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, Anal. Chem. **78**, 8036–8043 (2006).
- [57] C. G. Ryan, E. Clayton, W. L. Griffin, S. H. Sie, D. R. Cousens, *SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of PIXE spectra in geoscience applications*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms **34**, 396–402 (1988).
- [58] U. Neugebauer, S. Heinemann, M. Schmitt, J. Popp, *Combination of Patch Clamp and Raman Spectroscopy for Single-Cell Analysis*, Anal. Chem. **83**, 344–350 (2011).
- [59] C. Brackmann, A. Bengtsson, M. L. Alminger, U. Svanberg, A. Enejder, *Visualization of β -carotene and starch granules in plant cells using CARS and SHG microscopy*, J. Raman Spectrosc. **42**, 586–592 (2011).
- [60] F. Verluise, V. Laude, J. P. Huignard, P. Tournois, A. Migus, *Arbitrary dispersion control of ultrashort optical pulses with acoustic waves*, J. Opt. Soc. Am. B **17**, 138–145 (2000).
- [61] E. Vater, G. Bergner, D. Akimov, S. Schlücker, H. Bartelt, B. Dietzek, J. Popp, *Tunable light source for narrowband laser excitation: application to Raman spectroscopy*, Laser Phys. Lett. **6**, 639–643 (2009).
- [62] V. Tombelaine, G. Bergner, E. Vater, S. Schlücker, B. Dietzek, J. Popp, H. Bartelt, R. Jamier, *Spectrally shaped light from supercontinuum fiber light sources*, Opt. Commun. **284**, 1970–1974 (2011).
- [63] Cambridge Research and Instrumentation, Inc., *Spatial Light Modulator (SLM) System User's Manual, Version 1.3* (2004).
- [64] *SLM-S640d, Technische Dokumentation Version Mai 2010/V5.02*.
- [65] A. Yariv, P. Yeh, *Optical waves in crystals*, Wiley series in pure and applied Optics, Wiley interscience (1984).
- [66] A. Bartelt, *Steuerung der Wellenpaketdynamik in kleinen Alkaliclustern mit optimierten Femtosekundenpulsen*, Dissertation, Freie Universität Berlin (2002).
- [67] F. Verluise, V. Laude, Z. Cheng, C. Spielmann, P. Tournois, *Amplitude and phase control of ultrashort pulses by use of an acousto-optic programmable dispersive filter: pulse compression and shaping*, Opt. Lett. **25**, 575–577 (2000).
- [68] *Dazzler operating manual, Fastlite* (2005).
- [69] F. Lu, W. Zheng, J. Lin, Z. Huang, *Integrated coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton microscopy for biomolecular imaging using spectral filtering of a femtosecond laser*, Appl. Phys. Lett. **96**, 133701 (2010).
- [70] U. Neugebauer, *Characterization of bacteria, antibiotics of the fluoroquinolone type and their biological targets DNA and gyrase utilizing the unique potential of vibrational spectroscopy*, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2007).
- [71] J. Rehlinger, C. Pohling, T. Buckup, M. Motzkus, *Multiplex coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy with tailored Stokes spectrum*, Opt. Lett. **35**, 3721–3723 (2010).
- [72] G. Bergner, E. Vater, D. Akimov, S. Schlücker, H. Bartelt, B. Dietzek, J. Popp, *Tunable narrow band filter for CARS microscopy*, Laser Phys. Lett. **7**, 510–516 (2010).

- [73] G. Bergner, D. Akimov, S. Schlücker, H. Bartelt, B. Dietzek, J. Popp, *Tunable optical setup with high flexibility for spectrally resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, Laser Phys. Lett. **8**, 541–546 (2011).
- [74] G. Labroille, R. S. Pillai, X. Solinas, C. Boudoux, N. Olivier, E. Beaurepaire, M. Joffre, *Dispersion-based pulse shaping for multiplexed two-photon fluorescence microscopy*, Opt. Lett. **20**, 3444–3446 (2010).
- [75] H. N. Paulsen, K. M. Hilligse, J. Thogersen, S. R. Keiding, J. J. Larsen, *Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a photonic crystal fiber based light source*, Opt. Lett. **28**, 1123–1125 (2003).
- [76] E. R. Andresen, H. N. Paulsen, V. Birkedal, J. Thogersen, S. R. Keiding, *Broadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing photonic-crystal fibers*, J. Opt. Soc. Am. B **22**, 1934–1938 (2005).
- [77] P. S. Russell, *Photonic-Crystal Fibers*, J. Lightwave Technol. **24**, 4729–4749 (2006).
- [78] W. Min, S. Lu, G. R. Holtom, X. S. Xie, *Triple-Resonance Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy*, ChemPhysChem **10**, 344–347 (2009).
- [79] J. Konradi, A. K. Singh, A. Materny, *Mode-focusing in molecules by feedback-controlled shaping of femtosecond laser pulses*, Phys. Chem. Chem. Phys. **7**, 3574 (2005).
- [80] G. Bergner, S. Schlücker, B. Kampe, P. Dittrich, B. Dietzek, J. Popp, *Optimal control of coherent anti-Stokes Raman scattering image contrast*, Appl. Phys. Lett. **100**, 261106 (2012).
- [81] D. V. Arnold, H.-G. Beyer, *A Comparison of Evolution Strategies with Other Direct Search Methods in the Presence of Noise*, Comput. Optim. Appl. **24**, 135–159 (2003).
- [82] P. Nuernberger, G. Vogt, T. Brixner, G. Gerber, *Femtosecond quantum control of molecular dynamics in the condensed phase*, Phys. Chem. Chem. Phys. **9**, 2470–2497 (2007).
- [83] B. Dietzek, B. Brueggemann, T. Pascher, A. Yartsev, *Pump-Shaped Dump Optimal Control Reveals the Nuclear Reaction Pathway of Isomerization of a Photoexcited Cyanine Dye*, J. Opt. Soc. Am. **129**, 13014–13021 (2007).
- [84] V. V. Lozovoy, I. Pastirk, M. Dantus, *Multiphoton intrapulse interference 4*, Opt. Lett. **29**, 775–777 (2004).
- [85] B. Kampe, *fs-Pulsformung mit Hilfe von Evolutionsstrategien in der Biophotonik*, Diplomarbeit, Fakultät für Mathematik und Informatik, Universität Jena (2010).
- [86] K. Weicker, *Evolutionäre Algorithmen*, Teubner Verlag, 2. Auflage (2002).
- [87] I. Rechenberg, *Evolutionsstrategie '94.*, Frommann-Holzboog Verlag Stuttgart (1994).
- [88] I. Rechenberg, *Evolutionsstrategie: Optimierung technischer Systeme nach Prinzipien der biologischen Evolution*, Frommann-Holzboog Verlag, Stuttgart (1973).
- [89] H.-P. Beyer, H.-G. und Schwefel, *Evolution strategies - A comprehensive introduction.*, Natural Computing **287**, 101–130 (2002).
- [90] E. Tkaczyk, K. Mauring, A. Tkaczyk, V. Krasnenko, J. Ye, J. Baker Jr, T. Norris, *Control of the blue fluorescent protein with advanced evolutionary pulse shaping*, Biochem. Biophys. Res. Co. **376**, 733–737 (2008).
- [91] H.-G. Beyer, D. O. C. Science, *Toward a Theory of Evolution Strategies: On the Benefits of Sex - the (μ/μ , λ) Theory* (1995).

- [92] R. Mizoguchi, K. Onda, S. S. Kano, A. Wada, *Thinning-out in optimized pulse shaping method using genetic algorithm*, Rev. Sci. Ins. **74**, 2670 (2003).
- [93] D. V. Arnold, *Weighted multirecombination evolution strategies*, Theor. Comp. Sci. **361.1**, 18–37 (2006).
- [94] H.-G. Beyer, Melkozerov, *GECCO '08: Mutative σ -Self-Adaptation Can Beat Cumulative Step Size Adaptation when Using Weighted Recombination*, ACM , 487–494 (2008).
- [95] C. Rullière (Ed.), *Femtosecond Laser Pulses*, Springer, 2. Auflage, Berlin (2004).
- [96] J. Reh binder, C. Pohling, T. Buckup, M. Motzkus, *Shaper Assisted Multiplex CARS*, in 466. WE-Heraeus-Seminar, μ CARS 2010, Physikzentrum Bad Honnef (2010).

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

„Entwicklung und Anwendung der CARS-Mikroskopie zum Nachweis C-deuterierter Wirkstoffe“

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Wedel, den 31. August 2013

.....
(Gero Bergner)