
Spektrale Modulationen in der Femtosekunden-Stimulierten Raman-Mikroskopie

Evelyn Christine Plötz



München 2011

Spektrale Modulationen in der Femtosekunden-Stimulierten Raman-Mikroskopie

Evelyn Christine Plötz

Dissertationsschrift
angefertigt an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Evelyn Christine Plötz
aus München

München, den 29. September 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Gilch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2011

Zusammenfassung

Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie (FSRM) stellt eine neuartige Technik im Bereich der Schwingungsmikroskopie dar, die die optische Bildgebung mit der chemischen Sensitivität der Raman-Streuung kombiniert. Sie ermöglicht eine quantitative, orts aufgelöste Darstellung mikroskopischer Präparate. In der FSRM beruht der chemische Kontrast auf der Femtosekunden-stimulierten Raman-Streuung (FSRS), einem nichtlinearen Raman-Prozess, dessen Signal gegenüber der spontanen Raman-Streuung um mehrere Größenordnungen verstärkt ist [McC03]. Die FSRM profitiert daher von verkürzten Messzeiten sowie einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis [Kuk07]. Obwohl es sich bei der FSRS um einen optisch nichtlinearen Effekt handelt, gleicht ihre spektrale Signatur der (polarisierter) spontaner Raman-Spektren. Signalbeiträge einer möglichen Autofluoreszenz der Probe tragen nicht bei. FSRM erweist sich als besonders geeignet für die chemische Bildgebung von biologischen Systemen, wie Zellen und Gewebe. Deren Signalstärken sind äußerst niedrig und erfordern daher Daten mit hohen Signal/Rausch-Verhältnissen [Kra09a] für eine spezifische Analyse. All diese Anforderungen kann FSRM erfüllen. Die lineare Abhängigkeit des FSRS-Signals von der Konzentration der Probe erleichtert zudem die quantitative Analyse der molekularen Probenzusammensetzung. Die Zusammensetzung zellulären Gewebes auf molekularer Ebene ist sehr heterogen [Kra09a]. Eine spektral breitbandige Information – wie sie die FSRM liefert – ist daher zur chemisch-spezifischen Bildgebung unabdingbar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, FSRM in der biologischen und medizinischen Bildgebung zu implementieren.

FSRM ist eine rasternde Mikroskopie-Technik, die auf der nichtlinearen Wechselwirkung zweier ultrakurzer Laserimpulse mit einem Raman-aktiven Medium beruht. Es kommen ein spektral schmaler und intensiver Pikosekundenimpuls (Raman-Pumpimpuls) sowie ein spektral breitbandiger und schwacher Femtosekunden-Impuls (Raman-Abtastimpuls) zum Einsatz. Beide Laserimpulse werden kollinear in ein rasterndes Mikroskop eingekoppelt, an dessen Fokus stimulierte Raman-Streuung in der Probe auftritt. Diese Wechselwirkung führt zu einer spektralen Modifikation des Raman-Abtastimpulses, dessen Spektrum in An- und Abwesenheit des Raman-Pumpimpulses mit Hilfe eines Vielkanaldetektors aufgezeichnet wird. Das FSRS-Spektrum ergibt sich aus dem Verhältnis der beiden detektierten Spektren. Durch Abrastern der Probe wird das orts aufgelöste FSRS-Spektrum bestimmt. Als bisherige Laserquelle diente ein Laser-/Verstärkersystem, dessen Lichtleistung nicht kompatibel zu den Anforderungen biologischer Systemen ist [Hop01, Nie04]. Der erste Teil der Arbeit beschreibt die neuentwickelte Lichtquelle für FSRM, welche auf einem hoch-repetierenden Laser-Oszillator beruht. Dessen ultrakurze Laserimpulse weisen eine spektrale Bandbreite von über 3000 cm^{-1} auf und dienen direkt als Raman-Abtastimpulse. Der Raman-Pumpimpuls wird mithilfe eines Ytterbium-basierten Faserverstärkers aus dem Spektrum des Lasers generiert.

Stimulierte Raman-Mikroskopie gilt als eine *störungsfreie*, nichtlineare Mikroskopie-Technik [Owy78, Plo07b, Fre08]. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals über einen zusätzlichen nichtlinearen Beitrag in der FSRM berichtet, der sich als eine starke Oszillation der Grundlinie im Spektrum bemerkbar macht. Er führt zu einer Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses sowie zur Verringerung der spektralen Selektivität. Als Ursache kann eine spektrale Interferenz zwischen dem elektrischen Feld des Raman-Abtastimpulses und einem zu-

sätzlichen, in einem Vier-Wellen-Mischprozess zwischen Raman-Pump- und Raman-Abtastimpuls erzeugten Feld identifiziert werden. Eigenschaften und Methoden zur Unterdrückung der spektralen Interferenz werden vorgestellt.

Abstract

Femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM) is an upcoming technique in vibrational microscopy that combines optical imaging with the chemical sensitivity of Raman scattering. It allows for the quantitative, space resolved representation of microscopic samples. In FSRM, chemical contrast relies on femtosecond stimulated Raman scattering (FSRS), a nonlinear Raman process providing signal levels, that are strongly amplified with respect to spontaneous Raman scattering [McC03]. Therefore, FSRM benefits from shortened exposure times and improved signal/noise-ratios [Kuk07]. Even though FSRS is an optically nonlinear effect, its spectral signature resembles the (polarised) spontaneous Raman spectra. Autofluorescence of the sample does not contribute to the FSRS signature. FSRM turns out to be suitable for chemical imaging of biological systems, as cells and tissues. Since their signal strengths are quite low, data with high signal/noise-ratios [Kra09a] is essential for the specific analysis of the sample. These requirements can be provided by FSRM. Moreover, the linear dependency of the FSRS signal on the sample concentration facilitates the quantitative analysis of its molecular composition. Given that tissue shows a wide heterogeneity on the molecular level [Kra09a], spectrally broad information, which is indeed provided by FSRM, is indispensable for chemically sensitive imaging. The intention of the present work was to establish FSRM as a tool for biological and medical imaging.

FSRM is a scanning technique that relies on the nonlinear interaction of two ultrashort laser pulses with a Raman active medium. One of them is a spectrally narrow and intense picosecond pulse (Raman pump pulse), the other a spectrally broad and weak femtosecond pulse (Raman probe pulse). Both pulses are coupled collinearly into a scanning microscope where stimulated Raman scattering occurs in the sample positioned at the focus. This interaction leads to a spectral modification of the Raman probe pulse, which is recorded by the aid of a multi-channel detector. Its FSRS spectrum can be obtained by referencing the femtosecond pulse in presence of the Raman pump pulse to the one in absence. By raster-scanning the sample space-resolved FSRS spectra are retrieved. In the first FSRM setup a laser/amplifier system served as laser source. Its peak intensities are not compatible with the requirements of biological systems [Hop01, Nie04]. Therefore a new light source has been developed for FSRM. It is based on a laser oscillator running at high repetition rate, which provides ultrashort femtosecond pulses with a spectral width over more than 3000 cm^{-1} . These serve directly as Raman probe pulses. The Raman pump pulse is generated out of the laser spectrum by means of a ytterbium based fiber amplifier.

Stimulated Raman microscopy is considered as a disturbance-free, nonlinear microscopy technique [Owy78, Plo07b, Fre08]. In the context of this work, a further nonlinear contribution to the FSRS signal is reported for the first time. It shows up as a strong oscillation of the baseline in the spectrum and deteriorates the signal/noise-ratio as well as the spectral selectivity. This background can be identified as a spectral interference between the Raman probe pulse and an additional electric field, which is generated by a four-wave-mixing process between the Raman pump and Raman probe pulse. Properties and methods to suppress the spectral interferences are presented.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kohärente Raman-Bildgebung	11
2.1	Kohärente Anti-Stokes Raman-Mikroskopie	11
2.2	Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie	16
2.3	Hyperspektrale Bildgebung	25
2.3.1	Datenverarbeitung	25
2.3.2	Univariate Datenanalyse	27
2.3.3	Multivariate Datenanalyse	28
3	Laserquellen in der FSRM	35
4	Spektrale Modulationen in der FSRM	53
4.1	Charakterisierung und Unterdrückung spektraler Interferenzen	56
4.2	Ursprung der spektralen Interferenz in der FSRM	62
5	Schlussfolgerung und Ausblick	71
	Anhang	75
	Abkürzungsverzeichnis	77
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	83
	Literaturverzeichnis	85
	Veröffentlichungen	103
	Lebenslauf	105
	Danksagung	107

1 Einleitung

The microscope image is the interference effect of a diffraction phenomenon.

(Frits Zernike - Nobel Lecture, 1953)

Über Jahrhunderte hinweg war Lichtmikroskopie die wichtigste optische Methode, um Fragestellungen der Zellbiologie zu beantworten. Während die vergrößernde Wirkung von Linsen bereits im Mittelalter bekannt war [AH21, Bac67], finden sich Mikroskope, die aus Objektiv und Okular zusammengesetzt sind, erst seit Beginn des 17. Jahrhundert [Hoo65]. Die ersten aus zwei Linsen bestehenden Systeme werden Johann und Zacharias Janssen sowie Hans Lippershey um 1590 [His11] zugeschrieben. Diese, sowie auch nachfolgende zusammengesetzte Mikroskope zeichneten sich jedoch durch eine geringe Vergrößerung und Bildqualität aus. Die technische Entwicklung von aberrationsfreien und farbkorrigierten Mikroskopobjektiven sollte noch rund 250 Jahre auf sich warten lassen [Mul10].

Anfänge der Lichtmikroskopie

Erste biologische Studien an pflanzlichem Gewebe und Fossilien gehen auf den Mitbegründer der Lichtmikroskopie Robert Hooke im Jahre 1665 zurück [Hoo65, Mil02]. Er verwendete erstmalig den Begriff *Zelle*, um kleine, räumliche Kompartimente in Korkschichten mittels seines zweilinsigen Mikroskops zu beschreiben. Im gleichen Zeitraum gelang es Anton van Leeuwenhoek kurzbrennweitige, bikonvexe Linsen zu fertigen und als Lupen einzusetzen. Eine 50-200-fache Vergrößerung erlaubte es ihm im Jahre 1683 über Protozoen, Blut- und Kapillargefäße sowie Bakterien zu berichten [Mil02]. Obwohl der Begriff *Zelle* zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt war, sollte es weitere 170 Jahre dauern, bis der Botaniker Matthias Schleiden und der Physiologe Theodor Schwann 1838/39 [Sch38, Sch47] erkannten, dass die Zelle den kleinsten lebenden Baustein eines Organismus darstellt. Damit hatte die Geburtsstunde der Zellbiologie geschlagen.

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts rückte die Anatomie pflanzlichen Gewebes und ihre systematische Erforschung in den Vordergrund. Auch der Frage nach Abstammungs- und Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Spezies wurde nachgegangen. So entdeckte Hugo von Mohl 1835 [Jes01], dass sich Zellen durch Teilung vermehren. Die Entdeckung des zentralen Teils der lebenden Zelle, des Zellkerns, wird dem schottischen Botaniker Robert Brown 1831 [Bro66] zugeschrieben, obgleich detaillierte Zeichnungen des Kerns bereits in Arbeiten über Pflanzenzellen von van Leeuwenhoek zu finden sind. Die eigentliche Funktion dieses Zellkompartiments war zu diesem Zeitpunkt jedoch unbekannt. Zur gleichen Zeit, 1835, wird auch der Nucleolus (damals "Keimfleck" genannt) erstmal erwähnt [Lo06].

Die Aufklärung weiterer Zellorganellen in tierischen und pflanzlichen Eukaryontenzellen wurde im Laufe des 19. Jahrhunderts von verschiedenen Forschern vorangetrieben. Julius von Sachs brachte 1861 das Molekül Chlorophyll, welches vom französischen Chemiker Pierre Pelletier im Jahre 1817 isoliert worden war, erstmals mit dem Zellorganell *Chloroplast* in Verbindung und wies nach, dass die Photosynthese tatsächlich innerhalb dieses Organells stattfindet [Mil02]. Acht Jahre zuvor berichtete Rudolf Albert von Kolliker über die Entdeckung der Mitochondrien in Tierzellen; der deutsche Mikrobiologe Carl Benda benannte diese winzigen Strukturen 1898 schließlich Mitochondrien. Im gleichen Jahr veröffentlichte der Pathologe und spätere Nobelpreisträger Camillo Golgi seine Arbeit über eine intrazelluläre Struktur – den *Inneren Retikularapparat* – in Neuronen. Die Existenz und Schlüsselfunktion des nach ihm benannten Golgi-Apparats wurde jedoch lange Zeit bestritten und konnte erst in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt werden [Far98].

Mit Hilfe der optischen Lichtmikroskopie war es nun möglich geworden, systematisch in den Mikrokosmos vorzudringen und diesen zu erforschen. Es konnten jedoch keine Strukturen kleiner als etwa 350 nm aufgelöst werden. Lord Rayleigh [Ray74] und Ernst Abbé [Abb73a, Abb73b] gelang es schließlich diesen Sachverhalt physikalisch zu erklären und mathematisch zu beschreiben. Sie erkannten, dass die abgebildeten Details eines Objekts stark von der Wellenlänge des verwendeten Lichts und den Maßen der Linsen des Mikroskops abhängen. Die am Objekt gebeugten Elementarwellen werden vom Mikroskopobjektiv gesammelt und am Bildpunkt kohärent überlagert. Objekt und Abbild stimmen nur dann exakt überein, wenn alle Beugungsordnungen durch das Mikroskop erfasst werden können. So wurde die Auflösungsgrenze als die kleinste Periodizität Λ_{min} definiert, die in einem Bild noch unterschieden werden kann. Diese hängt gemäß

$$\Lambda_{min} = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (1.1)$$

von der Wellenlänge λ der verwendeten Lichtquelle und der numerischen Apertur NA des Mikroskopobjektivs ab, welche Abbé als $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ [Abb73a] formulierte. Die numerische Apertur berücksichtigt dabei den Öffnungswinkel 2α des Objektivs sowie den Brechungsindex n des umgebenden Materials. Sie kann für gewöhnliche Objektive Werte zwischen 0 und ~ 1 annehmen¹ und erlaubt beispielsweise im gelben Spektralbereich um 570 nm eine maximale Auflösung von 350 nm. Durch technischen und wissenschaftlichen Fortschritt in der Optik gelang es während des 18. und 19. Jahrhunderts Instrumente zu bauen, die diese Grenze erreichen.

Technische Entwicklung

Ein entscheidender Durchbruch in der strukturellen Zellaufklärung ergab sich durch de Broglies Erkenntnis im Jahre 1924, dass auch elementare Teilchen Welleneigenschaften besitzen. Dies war der Grundstein für die Entwicklung des Transmissionselektronenmikroskops (TEM)

¹ Für Öl- und Wasserimmersionsobjektive, wie sie Giovanni Amici 1840/50 [Dav10] erstmals entwickelte, kann heute ein Maximalwert von ~ 1.5 erzielt werden.

im Jahre 1931 durch den späteren Nobelpreisträger Ernst Ruska. Die Wellenlänge der Elektronen hängt invers proportional von ihrer Geschwindigkeit ab. Für typische Beschleunigungsspannungen in der TEM von etwa 100-200 kV [Rei08] bedeutet der Einsatz von Elektronen an Stelle von Photonen eine rund 10^5 -fach kleinere Wellenlänge verglichen zur Lichtmikroskopie. Die daraus resultierende Auflösungsverbesserung wird jedoch durch die Abbildung begrenzt, das heißt, durch die Fähigkeit, den einfallenden Elektronenstrahl mit Hilfe von magnetischen Feldern zu fokussieren. Die Auflösungsgrenze von Transmissionselektronenmikroskopen liegt derzeit im Ångstrom-Bereich [Rei08], die von Raster-Elektronenmikroskopen (SEM) eine Größenordnung darüber [Rei98] (vergleiche Abb. 1.1).

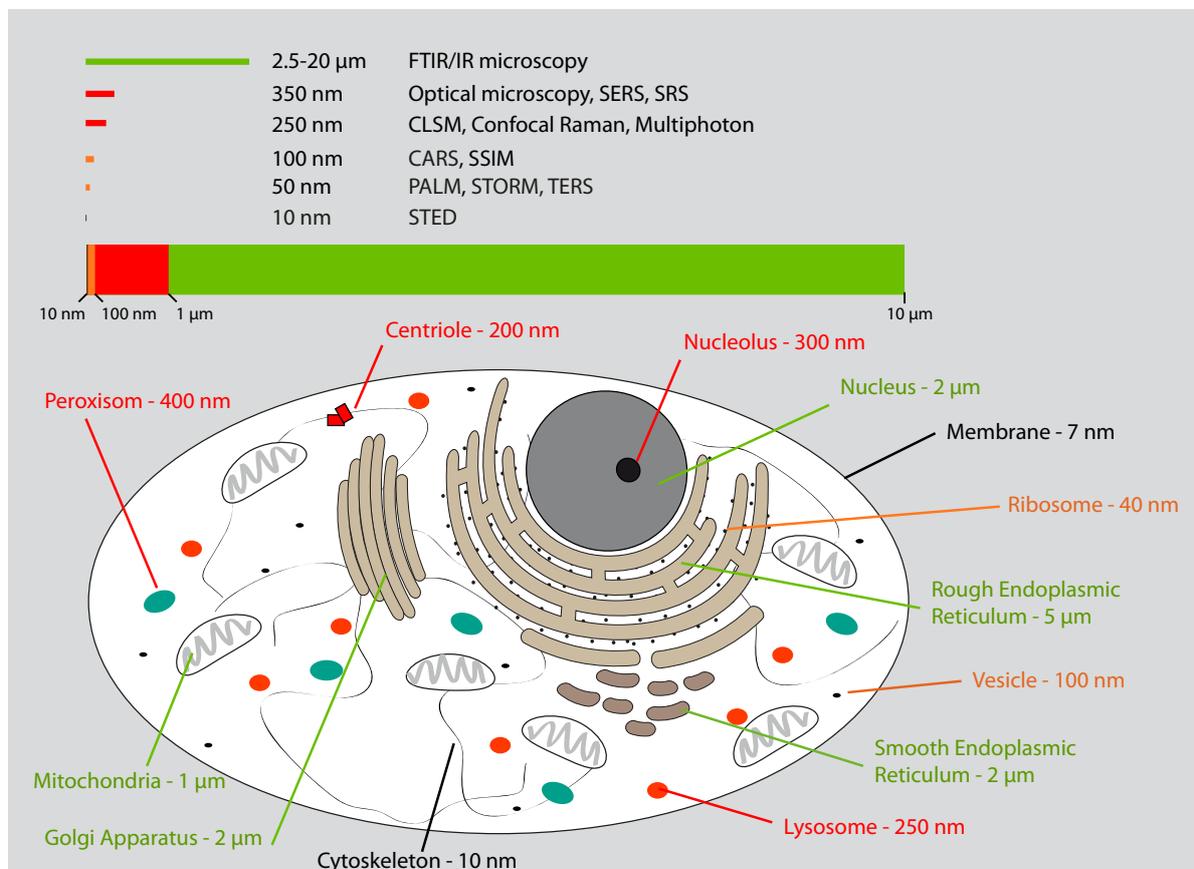


Abbildung 1.1: Einsatzbereich lichtmikroskopischer Verfahren in der Zellbiologie. Die Auflösungsgrenze ausgewählter Mikroskopie-Techniken wird anhand der Zellkompartimente einer eukaryontischen Zelle diskutiert (siehe Text). Eine doppelwandige Membran mit einem Durchmesser von 10 µm und einer Dicke von 7 nm umgibt die im Zytoplasma eingebetteten Organellen. Organellen mit einem Durchmesser unter 10 nm sind schwarz, unter 100 nm orange, unter 1 µm rot und unter 10 µm grün gekennzeichnet. Die Auflösungsgrenzen der Mikroskopieverfahren sind darüber dargestellt und identisch farblich kodiert. Nach Ref. [Pet10]. Die Werte der lateralen, räumlichen Auflösung, die der Abbildung zugrundeliegen, können im Anhang der Tabelle 1 entnommen werden.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gelang es, weitere Strukturen innerhalb der Zelle aufzulösen und deren Organisation und Funktion zu untersuchen. So konnte der Belgier Albert

Claude 1955 die Struktur des endoplasmatischen Retikulums nachweisen. Die Existenz des Golgi-Apparats wurde schließlich bestätigt [Far98]. Zudem hatte Claude 1930 das Verfahren der differentiellen Zentrifugation entwickelt, bei der nach Zellaufschluss einzelne Zellorganellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Abzentrifugieren voneinander getrennt werden können. Die Kombination beider Verfahren ermöglichte es, seinem Studenten George Palade 1955 das Ribosom nachzuweisen. Im gleichen Jahr identifizierte der Brite Christian de Duve das Lysosom und Peroxisom als weitere organisatorische Bestandteile der eukaryontischen Zelle. Für diese Entdeckungen wurden sie schließlich 1974 mit dem Medizin-Nobelpreis für ihre Beiträge zur *strukturellen und funktionellen Organisation der Zelle* ausgezeichnet.

Elektronenmikroskopische Techniken veränderten unser strukturelles Verständnis von Zellen und Gewebe grundlegend. Eukaryontische Zellen weisen typischerweise einen Durchmesser zwischen 10-20 μm [Alb02] auf. Ihre Zellorganellen sind von einer rund 10 nm dicken, multifunktionalen Membran umgeben (Abb. 1.1). Ihre dreidimensionale Gestalt verdankt die Zelle einem dynamischen Geflecht aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten sowie Aktin- und Myosinfilamenten - dem sogenannten Zytoskelett. Die Durchmesser der verschiedenen Filamente wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zu 7 nm (für Aktin) bis 25 nm (für Mikrotubuli)² bestimmt [Fri00]. Das Hauptorganell, der Zellkern (zusammen mit seinem Nukleolus), wird vom Endoplasmatischen Retikulum umgeben. Daran benachbart liegt der Golgi-Apparat, der ebenso wie die Mitochondrien noch mittels Lichtmikroskopie nachgewiesen werden konnte. Abgesehen von Ribosomen, die sich an den Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums befinden, bewegen sich die übrigen Strukturen wie Lysosome oder Vesikel frei im Zytoplasma.

Elektronenmikroskopische Techniken liefern hochaufgelöste, jedoch statische Aufnahmen auf der Nanometer-Skala. Sie sind nicht dazu geeignet, dynamische Prozesse in Echtzeit zu untersuchen. Lebende Zellen beziehungsweise Organismen können nicht in ihrem natürlichen Zustand betrachtet werden, da die zu untersuchenden Proben chemisch fixiert und im Vakuum behandelt werden [Sch10a]. Der heutige Anspruch der Zellbiologie an mikroskopische Techniken, das heißt bildgebende Techniken im Sub-Mikrometer-Bereich, besteht weniger in der Strukturaufklärung, vielmehr in der Aufklärung der (chemischen) Zusammensetzung und Funktion einzelner Bausteine, sowie in der Beobachtung dynamischer Prozesse in lebenden Systemen [Pet10]. Es gilt dabei, die dreidimensionale, räumliche Bildinformation mit der analytisch chemischen Information der unpräparierten Probe zu kombinieren und dies nicht nur in qualitativer, sondern auch quantitativer Form [Day11]. Eine mögliche Fragestellung aus der Pharmazie wäre zum Beispiel die Aufnahme eines Medikaments in den Organismus. So ist zum einen die lokale Konzentration der Substanz von Interesse, das heißt wo sie sich anreichert, zum andern der Prozess der Substanzaufnahme in die Zelle selbst. Die Wirkung des Medikaments, aber auch die Rolle des einzelnen Zellbausteins bei diesem Prozess gilt es herauszufinden. Die Technik muss also in der Lage sein, zwischen verschiedenen Substanzen eindeutig zu unterscheiden und darüber hinaus diese zu quantifizieren.

² in Abbildung 1.1 ist der Durchschnittswert der Intermediärfilamente [Ish68] angegeben

Eine Schlüsselerfindung hin zur Aufklärung der Funktionalität einzelner Zellkompartimente stellt die Entwicklung des Lasers dar. Sie ermöglichte die nachfolgende Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie, sowie der konfokalen, laser-scannenden Mikroskopie (CLSM), bei der die räumliche Auflösung um einen Faktor $1/\sqrt{2}$ besser als in der herkömmlichen Lichtmikroskopie ist [Paw06]. Mit Aufkommen der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, bei der Fluoreszenzfarbstoffe über hochspezifische Antikörper an die Probe koppeln, war es so zum Beispiel möglich, die Vernetzung der einzelnen Bausteine des Zytoskeletts und ihr komplexes Zusammenspiel sichtbar zu machen [Fri00]. So etablierte sie die Intermediärfilamente als eigenständige Untergruppe.

In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird die Probe im Fokus Punkt für Punkt abgerastert und das Fluoreszenzsignal (der Marker) beugungsbegrenzt detektiert. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von neuen Fluoreszenztechniken entwickelt, die sich zum einen bezüglich ihrer Photoanregung (Multi-/Einzelphotonen-Fluoreszenzmikroskopie), zum anderen bezüglich ihrer Methodik (Nah-/Fernfeld-Methoden), aber auch der (nicht)linearen Wechselwirkung mit dem Chromophor [Sch10a] unterscheiden lassen. Multiphotonen-Mikroskopie beruht auf der Interaktion zweier (oder mehrerer) Photonen im nahinfraroten Spektralbereich mit einem Medium. In der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie (TPF) [Den90] kommt es in Folge der Absorption zweier Photonen zur elektronischen Anregung von Zuständen, die eigentlich nur über Photonen im UV/VIS Spektralbereich angeregt werden könnten, und zur anschließenden Fluoreszenz. Die verwendete IR-Strahlung wird – vor allem in Gewebe – weniger gestreut. Sie ermöglicht so eine größere Eindringtiefe und hat zugleich weniger Photoschäden zur Folge [Hop01]. Aufgrund der Nichtlinearität des Prozesses ist das Signal auf den Fokuspunkt des Mikroskops beschränkt. Trotz höherer Wellenlänge 2λ (3λ ...) konnten laterale Auflösungen besser als 300 nm erzielt werden (siehe Abb. 1.1). Mit dem Ziel, die Auflösungsgrenze der optischen Lichtmikroskopie zu verbessern, beziehungsweise zu überwinden, lassen sich bei direkter Fluoreszenzanregung zwei Typen unterscheiden. Mit gängigen Nahfeldmethoden wie TIRF³ [Sch10a] und SNOM⁴ [Hec00] werden *axiale* Auflösungen im sub-100 nm Bereich erzielt. Eine *laterale* Auflösung im sub-100 nm Bereich konnte inzwischen auch mit Fernfeldtechniken wie SSIM⁵, STORM⁶ und PALM⁷ erreicht werden (siehe Abb. 1.1). Mit STED⁸ konnten sogar erstmalig 10 nm unterboten werden [Rit09].

Die Mehrzahl der Fluoreszenztechniken heute basiert auf dem Einsatz von Markermolekülen. Nicht die Autofluoreszenz der Probe selbst, sondern das Fluoreszenzsignal des Markers wird detektiert. Gruppen-spezifische Marker sind sicherlich gut, um komplexe Systeme, wie beispielsweise das Cytoskelett, auf einfachem Niveau zu untersuchen, sie verändern jedoch die natürliche Umgebung der Probe [Che04]. Möchte man die Wechselwirkung verschiede-

³ Alle verwendeten Abkürzungen sind im Anhang dieser Arbeit auf Seite 77 zusammengefasst:

engl. total internal reflection fluorescence (microscopy)

⁴ engl. scanning near-field optical microscopy – SNOM unterbietet die Beugungsgrenze zugleich auch in lateraler Ausdehnung um einen Faktor 10-15 [Hec00].

⁵ engl. saturated structured illumination microscopy

⁶ engl. stochastic optical reconstruction microscopy

⁷ engl. photoactivation localization microscopy

⁸ engl. stimulated emission depletion

ner Zellbestandteile miteinander zur gleichen Zeit beobachten, so muss jede Spezies getrennt markiert und mit einem Farbstoff versehen werden, dessen Emissionsspektrum mit dem der übrigen Fluorophore einen geringen spektralen Überlapp aufweist. Des Weiteren sind Markermoleküle meist nur für Gruppen, wie zum Beispiel für Lipide und Fettsäuren [Sli09] vorhanden, jedoch nicht für deren einzelne, molekulare Bestandteile. Für quantitative Aussagen während einer Messung eignet sich das Fluoreszenzsignal nur bedingt, da es sich lediglich für geringe Konzentrationen linear verhält [Lak06]. (Photo)-chemische Reaktionen können zu Phototoxizität und Ausbleichen des Markers führen. Letzteres verringert wiederum die Lebenszeit des Fluorophors und somit den zugänglichen Beobachtungszeitraum während einer Messung. Fluoreszenztechniken sind daher nur eingeschränkt fähig, räumliche Bildinformation mit analytisch chemischer Information der eigentlichen Probe zu kombinieren.

Chemisch sensitive Mikroskopie

Chemische Bildgebung basierend auf den molekularen Schwingungsfreiheitsgraden der Probe ermöglicht hingegen den direkten Zugang zu ungefärbten Proben ohne zusätzliches Markieren [Che04]. Die hohe Korrelation zwischen molekularer Struktur und spektraler Schwingungssignatur der Moleküle ermöglicht eine chemisch spezifische sowie (potentiell) quantitative Identifikation verschiedener Substanzen. Sowohl Raman- als auch Infrarot-Spektroskopie werden erfolgreich als Kontrastmechanismus zur Bildgebung eingesetzt [Sal09, Kat96]. Beide Techniken sind nichtinvasiv; ihr chemischer Kontrast beruht allein auf den molekularen Eigenschwingungen des unbehandelten Systems. Ein Einfärben oder Markieren wie in der Fluoreszenzmikroskopie ist nicht notwendig [Mat07]. Mit der Entwicklung kommerzieller Vielkanal-Detektoren, ist es möglich geworden, die zur Identifikation der einzelnen Substanzen notwendige, spektrale Breitbandinformation gleichzeitig aufzuzeichnen und mit Ortsinformation zu kombinieren [Sal09].

(FT)IR-Mikroskopie beruht auf der Absorption von elektromagnetischer Strahlung im infraroten Spektralbereich (IR), bei der die Energie eines absorbierten Photons genau einer molekularen Schwingungsanregung des Mediums entspricht. Dieser intrinsische Kontrastmechanismus erlaubt es, Systeme sowohl qualitativ als auch quantitativ zu untersuchen. Aufgrund der großen Wellenlängen im mittleren IR (2.5-25 μm) kommt es zu geringeren Photoschäden [Hop01] sowie zur verminderten Streuung des eingestrahlt Lichtes. Neben der geringen räumlichen Auflösung im μm -Bereich [Sal09] behindert jedoch die starke Absorption von Wasser im IR die Anwendung der Infrarot-Mikroskopie für *Live-Cell*-Studien [Che04].

Spontane Raman-Mikroskopie umgeht diese Limitierungen der Infrarot-Mikroskopie. Sie kombiniert die Eigenschaften der Lichtmikroskopie mit denen der Raman-Spektroskopie. Mit Hilfe der konfokalen Lichtmikroskopie werden nun Raman-Spektren als Funktion des Ortes mit einer lateralen Auflösung im Bereich von $\sim 300\text{-}1000$ nm (abhängig von der Anregungswellenlänge) aufgezeichnet. Des Weiteren ist der Einfluss des Wassers sehr gering. Wasser weist nur kleine Raman-Streuquerschnitte auf und lässt sich bezüglich seiner Bandenlage meist gut von den spektralen Signaturen anderer organischer Substanzen abgrenzen. Raman-Mikroskopie eignet sich daher sehr gut für Bio-Imaging, also für die chemische Bildgebung von Zellen und Gewebe [Sal09]. So findet sie große Anwendung im Bereich der

Tumordiagnostik und Krankheitserkennung [Kra06, Kra09a, Beg09], der Stammzellenforschung [Cha09, Chi09] sowie der Echtzeit-Beobachtung metabolischer Aktivitäten in Zellen [Hua03, Hua04, Pul09]. Sie wird jedoch ebenso in der Pharmazie [McG08], der Archäologie [Col09, Bio09], der Material- und Nanowissenschaft [Lia10, Dre10] oder sogar zur Sprengstoffdetektion [Ali09] eingesetzt.

Der spontanen Raman-Streuung liegt ein inelastischer Streuprozess von elektromagnetischer Strahlung an Materie zugrunde [Ram28]. Inelastisch bedeutet dabei, dass sich die Moleküle des streuenden Mediums vor und nach der Streuung in unterschiedlichen Energiezuständen befinden; sie sind schwingungsangeregt. Raman-Streuung ist ein schwacher Prozess: typische Streuquerschnitte liegen im Bereich von 10^{-28} cm^{-2} [Lon02], während elektronische Absorptionsquerschnitte im UV/VIS-Spektralbereich Werte um 10^{-16} cm^{-2} aufweisen [Tur09]. Im Gegensatz zur IR-Mikroskopie, deren Signal kollinear detektiert wird, erfolgt die Raman-Streuung in alle Raumrichtungen, so dass nur ein kleiner Teil, der tatsächlich gestreuten Photonen registriert werden kann. Für eine gute Signalqualität führt dieser Umstand zusammen mit den geringen Streuquerschnitten zu langen Messzeiten, die sich von Sekunden bis Minuten erstrecken können [Lon02, Sal09]. Eine Erhöhung der Laserleistungen ist ebenfalls nur eingeschränkt möglich, da diese verstärkt zu Photoschäden der Probe aufgrund von Multiphotonen-Absorption [Hop01] führt. Ferner ist die spontane Raman-Streuung nicht dazu geeignet, (stark) fluoreszierende Proben zu untersuchen. Die um 12 Größenordnungen stärkere Absorption und daran anschließende Fluoreszenz verdeckt das spontane Raman-Signal vollständig.

Stimulierte Raman-Mikroskopie

Die vorliegende Arbeit behandelt den Einsatz der Femtosekunden-stimulierten Raman-Streuung (FSRS) in der Mikroskopie. Im Rahmen meiner Diplomarbeit [Plo07a] konnte ich erstmals nachweisen, dass FSRS als Kontrastmechanismus zur Bildgebung eingesetzt werden kann. FSRS ist ein nichtlinearer Raman-Prozess, der gegenüber der spontanen Raman-Streuung um mehrere Größenordnungen verstärkt ist [Fro11]. Sein Signal ist selbstphasenangepasst und wird gerichtet emittiert. Im Gegensatz zu anderen verstärkten Raman-Prozessen, wie der Resonanz-Raman-Streuung (RRS) [War77], oberflächen-verstärkten Raman-Streuung (SERS) [Le 09] und kohärenten anti-Stokes Raman-Streuung (CARS) [Mül07, Eva08], stimmen FSRS-Spektren mit denen polarisierter, spontaner Raman-Spektren sowohl in Bandenposition als auch Signalhöhe überein. Ein nichtresonanter Untergrund wie in (CARS) [Mül07, Eva08] trägt nicht zum Signal bei. Bei einem verstärktem Signalniveau liefert FSRS somit zur spontanen Raman-Streuung identische Schwingungsspektren und dies bei verkürzten Messzeiten [Kuk07, Fro11]. Das beschleunigte Abtasten der Probe schont vor allem biologische Proben und ebnet den Weg hin zu Echtzeitaufnahmen von Zellprozessen. Von besonderem Vorteil ist hierbei die lineare Konzentrationsabhängigkeit der FSRS-Signatur. Sie ermöglicht eine quantitative Analyse der chemischen Zusammensetzung von Stoffgemischen, wie es zum Beispiel in Zellen und Gewebe der Fall ist. Der auf FSRS basierende, chemische Kontrast ermöglicht es der Femtosekunden-stimulierten Raman-Mikroskopie (FSRM), die Zusammensetzung unbekannter, unbehandelter Proben orts aufgelöst und zugleich chemisch-selektiv darzustellen.

Verschiedene Gruppen haben seit 2007 auf stimulierter Raman-Streuung basierende, rasternde Mikroskope aufgebaut. Sie verwenden zwei Pikosekunden-Laser im 80 MHz-Bereich, die zum einen optisch [Fre08, Oze09, Gam10], zum anderen elektronisch [Nan09, Sli09] aufeinander synchronisiert werden. Die im (N)IR-Spektralbereich angesiedelten Impulse sind dabei so aufeinander abgestimmt, dass sie exakt eine Raman-Resonanz der jeweiligen Probe adressieren können. Beide Impulse werden in (meist) kommerzielle Mikroskopsysteme eingekoppelt und treten dort mit der Probe in Wechselwirkung. Stimulierte Raman-Streuung führt zu einem Energieübertrag zwischen dem Pump- und Abtastimpuls, wobei die Signalländerung des Abtastimpulses mittels Einzelkanal-Lock-in-Detektion mit einer Sensitivität von $10^{-6} - 10^{-7}$ [Fre08] aufgezeichnet wird. Dieser Ansatz erlaubt eine schnelle, qualitative Bildgebung. Dem chemischen Kontrast der FSRM-Aufnahme liegt das Signal einer einzelnen Raman-Resonanz zugrunde. Für Probesubstanzen mit spektral überlappenden Schwingungsresonanzen ist es nicht möglich, quantitative Aussagen zu treffen. Zur vollständigen, spektralen Charakterisierung von biologischen Proben, deren exakte Zusammensetzung (meist) unbekannt ist, muss das Spektrum am Probenort abgerastert werden. Hierfür wird die Wellenlänge eines der Pikosekunden-Laserimpulse durchgestimmt, wodurch die Aufnahmezeit deutlich verlängert wird. Es wird von Scan-Zeiten im Minuten-Bereich berichtet [Gam10].

Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie (FSRM) hingegen erlaubt es, alle Raman-Resonanzen einer Probe über den kompletten Spektralbereich gleichzeitig zu adressieren. Wir haben diesen Ansatz daher seit 2007 im Rahmen meiner vorliegenden Doktorarbeit weiterverfolgt und FSRM mit dem Ziel weiterentwickelt, sie als chemische Bildgebung für biologische Anwendungen breitbandig einzusetzen. Die Ergebnisse der Arbeit sind in kumulativer Form zusammengefasst und in drei Teile gegliedert:

Kapitel 2 behandelt die Eigenschaften und theoretischen Grundlagen der stimulierten Raman-Mikroskopie. Im ersten Abschnitt wird die stimulierte Raman-Streuung im Rahmen der nichtlinearen Optik behandelt. Ihr chemischer Kontrast wird für die hyperspektrale Bildgebung verwendet, welche Teil des nachfolgenden Abschnitts ist.

Die FSRM beruht auf der Wechselwirkung zweier synchronisierter, ultrakurzer Laserimpulse mit der Probe. In unserem ersten Aufbau werden hierfür Laserimpulse eines Laser-/Verstärkersystems mit einer Wiederholrate von 1 kHz [Plo07b] verwendet. Die mittels nichtlinearer Optik maßgeschneiderten Impulse führen am Fokus des Mikroskops zur stimulierten Raman-Streuung in der Probe. Die auftretenden Spitzenleistungen sind jedoch für biologische Proben nicht verträglich [Vog05, Cui09]. Eine Verringerung der Impulsenergien, ist auf der kHz-Anlage nicht möglich, da das FSRS-Signal direkt proportional zur Raman-Pumpintensität [Plo07b] ist. Es wurde daher ein neues Laserkonzept basierend auf einem Laseroszillator bei 75 MHz entwickelt und realisiert [Plo09]. Es ist in **Kapitel 3** beschrieben.

Verschiedene Messungen an Flüssigkeiten sowie Festkörpern zeigen eine starke Oszillation der Grundlinie in den orts aufgelöst aufgenommenen FSRS-Spektren, in Folge derer einzelne Raman-Resonanzen zum Teil unterdrückt, aber auch überhöht sind. Dieser Effekt wurde bereits in der zeitaufgelösten FSRS-Spektroskopie berichtet [Kuk03, Jin04] und dort als ein Artefakt der Kreuzphasenmodulation (XPM) zwischen den Raman-Pump- und Raman-

Abtastimpulsen diskutiert. Diese Interpretation kann nicht mit den vorliegenden, experimentellen Ergebnissen in Einklang gebracht werden. Die physikalische Ursache dieses Effektes konnte mit Hilfe von Messungen und Simulationen ermittelt werden [Plo11] und ist Gegenstand des **Kapitels 4**. Es werden Eigenschaften und Auswirkung der spektralen Modulationen in der FSRM, sowie experimentelle Möglichkeiten zur Unterdrückung [Plo10] vorgestellt.

2 Kohärente Raman-Bildgebung

A conspicuous phenomenon was observed by me in ice and in optical glasses.

(C.V. Raman - Nobel lecture, 1930)

Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie (FSRM) beruht auf einem nichtlinearen Effekt dritter Ordnung. In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen dieser Technik erarbeitet. Der erste Abschnitt fasst die Entstehungsgeschichte und Eigenschaften der stimulierten Raman-Mikroskopie zusammen. Ihr chemischer Kontrast basiert auf der stimulierten Raman-Streuung, welche anschließend im Rahmen der nichtlinearen Optik behandelt wird. Der letzte Abschnitt befasst sich mit der hyperspektralen Bildgebung: es wird der Frage nachgegangen, wie die stimulierte Raman-Streuung (SRS) spektral breitbandig zur Mikroskopie eingesetzt wird und wie die orts aufgelöste, spektrale Information zur chemischen Bildgebung genutzt werden kann.

Wie in der Einleitung dargelegt, handelt es sich beim Raman-Effekt um einen schwachen Prozess, der lange Belichtungszeiten zur Folge hat [Lon02, Sal09]. Dies in Kombination mit der oftmals auftretenden Autofluoreszenz der Probe erschwert den Einsatz spontaner Raman-Mikroskopie für mikroskopische Studien an lebenden Systemen [Kra09a]. Ein vielversprechender Ansatz zur Verstärkung des Raman-Signals sind nichtinvasive, kohärente Techniken, wie die kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (CARS) und SRS, welche allein auf der nichtlinearen Interaktion zwischen Licht mit Materie beruhen. Der zuerst in der Raman-Mikroskopie verwendete kohärente Verstärkungsmechanismus ist CARS [Mül07]. Seine Eigenschaften werden im Folgenden kurz beschrieben und spektrale Unterschiede zur spontanen Raman-Streuung herausgearbeitet. Eine ausführlichere Darstellung ist zum Beispiel in den Übersichtsarbeiten Refn. [Vol05, Rod06, Mül07, Eva08, Day11, Paw06] zu finden. Dem gegenüber steht SRS, dessen verstärkte, spektrale Signatur mit denen polarisierter, spontaner Raman-Spektren übereinstimmt. Dies war für uns Anlass, SRS als Verstärkungsmechanismus in der Mikroskopie zu verwenden [Plo07b] und sie spektral breitbandig in der FSRM einzusetzen.

2.1 Kohärente Anti-Stokes Raman-Mikroskopie

Kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (CARS) wurde erstmals 1965 von Terhune et al. [Mak65] beschrieben und fand alsbald Einsatz in der Spektroskopie [Beg74, Tol77a, Tol77b]. Ihr Einsatz in der Mikroskopie wurde 1982 von Duncan et al. [Dun82] gezeigt und mit Aufkommen abstimmbarer, gepulster Nahinfrarotlaser von Zumbusch et al. [Zum99] schließ-

lich etabliert. CARS-(Mikro-)Spektroskopie wird heute in verschiedenen Bereichen angefangen von der Katalyse [Day11], der Bildgebung biologisch-medizinischer Systeme [Eva08, Kra09a, Pez11] bis hin zur Untersuchung von Verbrennungsvorgängen [Roy10] und mikrobiologischen Typisierungen [Pes08] eingesetzt. In der Zellbiologie und Histologie wird CARS-Mikroskopie vor allem zur Darstellung von Lipidverteilungen verwendet [Paw06, Le07, Fu08, Huf08, Bon09, Mey11, Imi11].

CARS kann als Sonderfall des Vier-Wellen-Mischens (FWM) betrachtet werden, bei dem drei elektrische Felder, das des Raman-Pumpimpulses $E_P(\omega_P)$, des Stokes-Impulses $E_S(\omega_S)$ und des Abtast-Impulses $E_{Pr}(\omega_{Pr})$ mit der Probe in Wechselwirkung treten. Fällt die Frequenzdifferenz $\omega_P - \omega_S$ mit einer molekularen Eigenschwingung ω_i des Mediums zusammen, so wird das Ensemble an schwingenden Molekülen kohärent durch die eingestrahlten elektrischen Felder angetrieben. Infolgedessen kommt es zur verstärkten Emission eines anti-Stokes-Signals bei der Frequenz $\omega_{AS} = \omega_P + \omega_{Pr} - \omega_S$ [She84]. Das Schema des CARS-Prozesses ist in Abb. 2.1(a) dargestellt. Experimentell kommen meist nur zwei Laser zum Einsatz, wobei die Frequenz des Pumpimpulses ω_P und Abtastimpulses ω_{Pr} identisch gewählt werden. Man spricht von 2-Farben-CARS beziehungsweise degeneriertem CARS [Vol05, Mü107]. Wird einer der monochromatischen Laserimpulse überdies durch einen breitbandigen, ultrakurzen Laserimpuls ersetzt, ist es möglich, mehrere Eigenfrequenzen der Probe gleichzeitig zu adressieren (Abb. 2.1(b)). In der als Breitband-CARS (mCARS) bezeichnete Technik wird meist der Stokes-Impuls spektral breitbandig gewählt [Mü107, vV07, Bon09, Par10, Oku08].

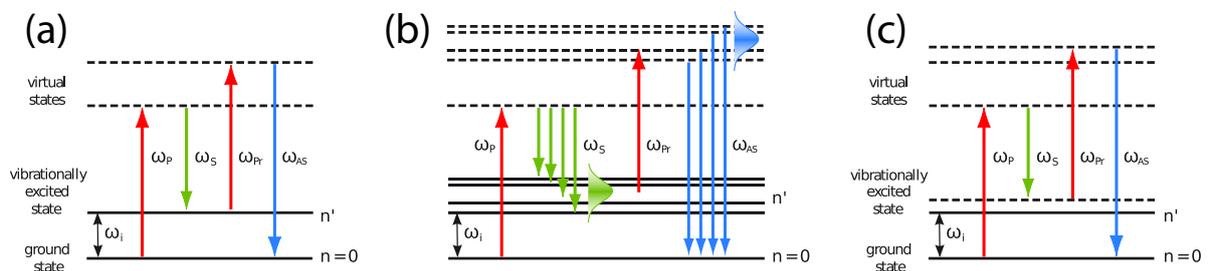


Abbildung 2.1: Schema des CARS-Prozesses. (a) Resonanter Beitrag. Drei elektrische Felder treten mit einem Medium in Wechselwirkung. Fällt die Frequenzdifferenz $\omega_P - \omega_S$ mit der Eigenfrequenz ω_i des Mediums zusammen, so kommt es zur verstärkten Emission eines anti-Stokes-Signals bei der Frequenz ω_{AS} . (b) Durch den Einsatz eines spektral breitbandigen Lichtfeldes lassen sich mehrere Raman-Resonanzen eines Mediums gleichzeitig adressieren. (c) Nicht-resonanter Beitrag. CARS ist ein Sonderfall des Vier-Wellen-Mischens. Auch im nicht-resonanten Fall wird ein blau-verschobenes Feld generiert. Gestrichelte Linien kennzeichnen virtuelle Niveaus.

CARS-Mikroskopie erlaubt es, ebenso wie die spontane Raman-Mikroskopie, ungefärbte Proben basierend auf ihrem Schwingungscontrast zu untersuchen. Die kohärente anti-Stokes Raman-Streuung bietet dabei Signalstärken, die um 4-6 Größenordnungen [Bon09, Par10, Dja07] gegenüber denen der spontanen Raman-Streuung erhöht sind. Dies hat daher kürzere Aufnahmezeiten bei gleichem Signal/Rausch-Verhältnis zur Folge. Wird – nicht wie in mCARS – nur eine Schwingungsfrequenz adressiert, so können in Kombination mit einem laserscannenden Mikroskop Abbildungsgeschwindigkeiten von über 20 Bildausschnitten pro Sekunde bei einer Messdauer von 160 ns pro Pixel [Eva05] erreicht werden. Die

fehlende spektrale Information verhindert jedoch eine quantitative Analyse der Probenzusammensetzung. Die quadratische Abhängigkeit des CARS-Signals von der Probenkonzentration erschwert zudem eine Analyse von Stoffgemischen. Im Gegensatz zur spontanen Raman-Streuung ist das CARS-Signal nicht untergrundfrei. Dies soll Gegenstand des folgenden Abschnitts sein.

Das CARS-Signal

Zur theoretischen Beschreibung des CARS-Prozesses wurden verschiedene-Formalismen vorgestellt [She76, Lot76, Pen79, Muk86, Boy92, Muk95]. Dieser Abschnitt folgt dem klassischen Formalismus gekoppelter Wellengleichungen nach Ref. [Pen79]. Während des CARS-Prozesses treten drei elektrische Felder, die des Raman-Pumpimpulses \mathbf{E}_P , des Stokes-Impulses \mathbf{E}_S und des Abtast-Impulses \mathbf{E}_{Pr} mit der Probe in Wechselwirkung. Im Medium induzieren sie eine makroskopische Polarisation \mathbf{P} , welche bezüglich des elektrischen Feldes $\mathbf{E} = \mathbf{E}_P + \mathbf{E}_S + \mathbf{E}_{Pr}$ in einer Taylorreihe entwickelt werden kann:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \underline{\chi}^{(1)} \cdot \mathbf{E} + \varepsilon_0 (\underline{\chi}^{(2)} \cdot \mathbf{E}\mathbf{E} + \underline{\chi}^{(3)} \cdot \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots) = \mathbf{P}_L + \mathbf{P}_{NL} \quad (2.1)$$

ε_0 ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, \mathbf{P}_L und \mathbf{P}_{NL} die lineare sowie nichtlinearen Anteile der Polarisation. $\underline{\chi}^{(n)}$ stellt den Suszeptibilitätstensor n -ter Ordnung dar und berücksichtigt den Einfluss des Mediums. Während $\underline{\chi}^{(1)}$ optisch lineare Effekte, wie Absorption oder Dispersion beschreibt, trägt $\underline{\chi}^{(2)}$ in isotropen Medien wie Flüssigkeiten hingegen nicht bei. $\underline{\chi}^{(3)}$ stellt für große Feldstärken der eingestrahlten ultrakurzen Laserimpulse somit den dominierenden nichtlinearen Beitrag zur nichtlinearen Polarisation \mathbf{P}_{NL} dar. Die für CARS verantwortliche, nichtlineare Polarisation 3. Ordnung ergibt sich unter Annahme ebener, sich in z -Richtung ausbreitender Wellen zu¹

$$P^{(3)}(-\omega_{AS}; \omega_P, -\omega_S, \omega_{Pr}) = \frac{1}{2} \cdot \{ \varepsilon_0 \chi^{(3)}(-\omega_{AS}; \omega_P, -\omega_S, \omega_{Pr}) E_P(\omega_P) E_S^*(\omega_S) E_{Pr}(\omega_{Pr}) \\ \times \exp [i(k_P - k_S + k_{Pr})z - i\omega_{AS}t] + c.c. \} \quad (2.2)$$

Das detektierte CARS-Signal hängt quadratisch vom emittierten Feld E_{AS} ab, dessen Quelle die nichtlineare Polarisierbarkeit $P^{(3)}$ darstellt. Durch Lösen der Wellengleichung für elektrische Felder [Yar07, Eq. 8.3-2] erhalten wir das CARS-Signal

$$I \propto |E_{CARS}|^2 = \left(\frac{\omega_{AS}}{n_{AS}} \right)^2 \cdot |\chi^{(3)}|^2 \cdot I_P I_S I_{Pr} \cdot z^2 \cdot \left(\frac{\sin(\Delta k z / 2)}{\Delta k z / 2} \right)^2. \quad (2.3)$$

n_{AS} beschreibt den frequenzabhängigen Brechungsindex an der Frequenz ω_{AS} . Das CARS-Signal skaliert linear mit den Intensitäten der eingestrahlten Felder. Im Fall des degenerierten

¹ Für in z -Richtung kopropagierende, parallel polarisierte Lichtfelder reduziert sich $\underline{\chi}^{(3)}$ auf ein Matrixelement und kann im Folgenden als skalare Größe $\chi^{(3)}$ behandelt werden. Auf eine vektorielle Schreibweise wird im weiteren Abschnitt verzichtet.

CARS ergibt sich für den Pump-Impuls eine quadratische Abhängigkeit. Sie ermöglicht eine verbesserte räumliche Auflösung in der Mikroskopie [Day11]. Das CARS-Signal ist gerichtet und wird aufgrund seines nichtlinearen Wesens vornehmlich im Fokalvolumen erzeugt. Es erlaubt, einzelne Schichten ohne den Einsatz von Irisblenden wie in der Fluoreszenzmikroskopie abzubilden. Während in der CARS-Spektroskopie die Phasenfehlanpassung $\Delta k = k_{AS} - (k_P - k_S + k_{Pr})$, die der letzte Term in Gleichung 2.3 beschreibt, aufgrund des frequenzabhängigen Brechungsindex von zentraler Bedeutung ist [Mül07], spielt sie in der Mikroskopie nur eine untergeordnete Rolle [Che04]. Die Schichtdicken relevanter Proben betragen nur einige Mikrometer, so dass die damit verbundene Wechselwirkungslänge z kleiner als $\pi/\Delta k$ ist. Das CARS-Signal skaliert quadratisch mit der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi^{(3)}$. Diese dominiert das Frequenzverhalten der CARS-Intensität und setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen [Pen79]:

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \quad (2.4)$$

Die als resonanter Beitrag bezeichnete Größe $\chi_R^{(3)}$ ist direkt proportional zum Raman-Streuquerschnitt und zur Konzentration des Mediums [Pen79]. Sie ist komplexwertig und trägt nur an den Eigenresonanzen des Systems zum CARS-Signal bei. Die reellwertige Größe $\chi_{NR}^{(3)}$ gibt die elektronische Antwort der Probe wieder. Sie wird als nicht-resonanter Untergrund bezeichnet und ist näherungsweise frequenzunabhängig. Ihr konstanter Beitrag zu $\chi^{(3)}$ hat eine zusätzliche, ebenfalls blauverschobene Emission zur Folge, unabhängig davon, ob eine Eigenschwingung des Systems adressiert ist oder nicht.

CARS ist ein kohärenter Prozess, bei dem beide Beiträge, die resonante sowie nicht-resonante Antwort der Probe, interferieren. Die quadratische Abhängigkeit des CARS-Signals von der nichtlinearen Suszeptibilität hat drei Terme zur Folge:

$$|\chi^{(3)}|^2 = |\chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}|^2 = |\chi_R^{(3)}|^2 + |\chi_{NR}^{(3)}|^2 + 2 \cdot \chi_{NR}^{(3)} \cdot \text{Re}\{\chi_R^{(3)}\} \quad (2.5)$$

einen quadratischen Beitrag des resonanten und nicht-resonanten Untergrunds, sowie einen Mischterms aus beiden. Letzterer erschwert eine einfache Subtraktion des nicht-resonanten Beitrags. Das CARS-Signal hängt quadratisch vom resonanten Beitrag $\chi_R^{(3)}$ ab, welcher linear mit der Anzahl der streuenden Moleküle im Probenvolumen verknüpft ist. Für stark Raman-streuende Substanzen skaliert das CARS-Signal daher im Gegensatz zur spontanen Raman-Streuung quadratisch mit der Konzentration. Dies erschwert eine direkte quantitative Analyse von Proben, vor allem Gemischen [Day11]. Im Grenzfall einer geringen Konzentration an Raman-aktiven Molekülen im Fokalvolumen oder schwach Raman-aktiver Substanzen skaliert das CARS-Signal ebenfalls linear [Day11]. Der nicht-resonante Signalbeitrag kann das Raman-Signal jedoch vollständig verdecken [Jur11].

CARS-Spektren besitzen aufgrund des nicht-resonanten Untergrunds eine dispersive Liniennform und stimmen nicht mit denen spontaner Raman-Spektren überein. In Spektralbereichen mit vielen Banden, wie dem Fingerprintbereich lassen sich CARS-Spektren nur schwer

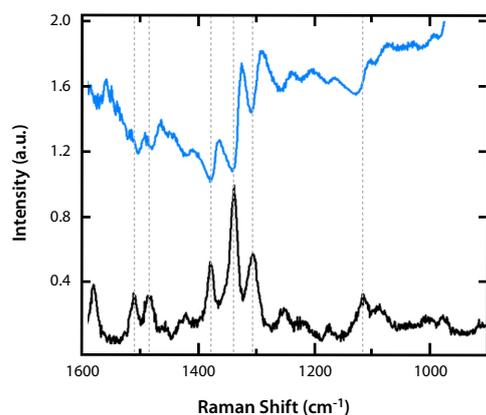


Abbildung 2.2: Einfluss des nicht-resonanten Beitrags in CARS. Zum Vergleich sind das spontane Raman-Spektrum (schwarz) und das mCARS-Spektrum (blau) einer Mischung von AMP/ADP/ATP in Wasser gezeigt. Die Gesamtkonzentration der äquimolaren Lösung beträgt 500 mM. Während sich das spontane Spektrum durch lorentzförmige Banden auszeichnet, ist die CARS-Signatur durch einen deutlichen Offset und eine dispersive Linienform gekennzeichnet. Entnommen aus Ref. [Var06].

interpretieren [Eva08]. Die chemische Selektivität des Spektrums ist aufgrund des nicht-resonanten Untergrunds deutlich reduziert [Kra09a]. Dies soll in Abbildung 2.2 an einem Beispiel aus der Literatur [Var06] dargestellt werden. Eine Mischung der Biomoleküle Adenosinmonophosphat (AMP), -diphosphat (ADP) und -triphosphat (ATP) in Wasser wurde mit Hilfe von spontaner Raman-Spektroskopie (schwarz) und mCARS-Spektroskopie (blau) untersucht. Während sich das spontane Raman-Spektrum durch lorentzförmige Raman-Resonanzen [Lon02] auszeichnet, weist die CARS-Signatur einen klaren Offset auf. Ihre Linienform ist aufgrund des nichtlinearen Untergrunds stark dispersiv, rotverschoben und gegenüber dem normalen Raman-Spektrum verzerrt.

Die Existenz des nicht-resonanten Untergrunds hat den Einsatz der CARS-Mikroskopie lange Zeit behindert [Eva08]. So wurde ein großer Aufwand betrieben, neue Techniken zu entwickeln, die diesen kohärenten Störbeitrag unterdrücken, oder zumindest sinnvoll einzusetzen wissen [Mül07]. Sie können hinsichtlich ihrer Implementierung unterschieden werden. Neben numerischen Verfahren [Liu09, Var06, Rin07, Che07] werden experimentelle Ansätze verwendet, die beispielsweise die Richtungsabhängigkeit des CARS-Signals [Fan10, Che01b, Vol01] oder die unterschiedliche Polarisationsabhängigkeit des resonanten und nicht-resonanten Beitrags [Che01a, Che04] ausnutzen. Neben anderen Techniken [Gan06, Bur06, Fan10, Jur11, Lan09, Kon10, Kra09a] kommen zeitaufgelöste [Vol02] und heterodyne Detektionsschemata [Pot06] sowie nichtlineare, interferometrische CARS-Mikroskope [Eva04, And06, Ors10] zum Einsatz.

Mit Hilfe dieser Techniken lässt sich der Einfluss des nicht-resonanten Störbeitrags reduzieren. Sie haben jedoch oft eine Verringerung des resonanten Signalbeitrags zur Folge oder sind mit erheblichem, experimentellen Aufwand verbunden [Fan10]. Die physikalische Ursache des elektronischen Beitrags $\chi_{NR}^{(3)}$ lässt sich zudem nicht unterbinden. Wir haben daher begonnen, die Eigenschaften einer weiteren nichtlinearen Raman-Technik, der Femtosekundenstimulierten Raman-Streuung zu nutzen und sie als chemischen Kontrastmechanismus in der Mikroskopie einzusetzen. Bei dieser erwartet man ein untergrundfreies Signal [Owy78]. Ihre physikalischen Grundlagen sowie technische Implementierung sind Gegenstand des folgenden Abschnitts.

2.2 Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie

Stimulierte Raman-Streuung (SRS) wurde 1962 während der Entwicklung eines modengekoppelten Rubinlasers entdeckt [Woo62, Eck62]. Die als Güteschalter verwendete Kerr-Zelle enthielt Nitrobenzol, und führte bei hohen Laserintensitäten zur Abschwächung des Pumpimpulses und zu einer zusätzlich rotverschobenen Emission. Zwei Jahre später konnte der inverse Prozess – die stimulierte Raman-Abschwächung – experimentell beobachtet werden [Jon64]. Eine theoretische Beschreibung beider Entdeckungen folgte unmittelbar [Blo67] und war Inhalt verschiedener Übersichtsarbeiten der 70er und 80er Jahre [Kai72, Pen79, Blo87]. Seit der Entwicklung durchstimmbarer Farbstofflaser zu Beginn der 70er Jahre [Zin11] wird SRS für spektroskopischen Untersuchungen verwendet [Owy77, Lau78, Lev79].

Femtosekunden-stimulierte Raman-Streuung (FSRS) hingegen, die auch als breitband-stimulierte Raman-Streuung bezeichnet wird, ist eine Neuentwicklung. Sie wurde erstmals 1999 von der Gruppe um M. Yoshizawa in der zeitaufgelösten Femtosekunden-Spektroskopie eingesetzt [Yos00] und in der Gruppe von R. Mathies schließlich etabliert [Kuk07, Fro11].

Der erfolgreiche Einsatz von SRS beziehungsweise FSRS in der Mikroskopie konnte erstmals 2007 in meiner Diplomarbeit demonstriert werden [Plo07b]. In der Zwischenzeit haben auch andere Gruppen [Fre08, Nan09, Oze09, Gam10, Sli10] SRS-Mikroskope entwickelt. Diese werden mit den in der FSRM verwendeten Aufbauten in Kapitel 3 verglichen.

Stimulierte Raman-Mikroskopie wird in der bio-medizinischen Bildgebung, sowie für Fragestellungen der Pharmakologie [Saa11a, Sli09] und Lebensmittelchemie [Roe11, Saa10b] eingesetzt. In der bio-medizinischen Bildgebung diente sie zur Visualisierung verschiedener Zell- und Gewebetypen *in vitro* [Fre08, Nan09, Oze10a, Sli09] als auch *in vivo* [Min11, Oze10a, Saa10a, Wan11], zur Darstellung von Substanzverteilung [Fre08, Min11] sowie zum RNAi-Screening [Wan11] in lebenden Organismen.

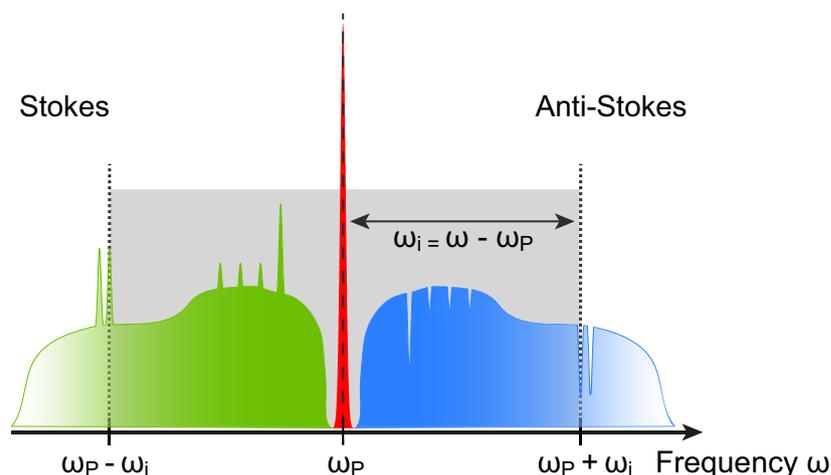


Abbildung 2.3: FSRS-Experiment. Ein spektral schmaler Raman-Pumpimpuls (Frequenz ω_P) und ein spektral breiter Raman-Abtastimpuls (Frequenzkomponenten ω) treten mit einem Medium in Wechselwirkung. Bei einer Übereinstimmung der Frequenzdifferenz $\Delta\omega = |\omega - \omega_P|$ mit der Frequenz einzelner, molekulare Schwingungsmoden ω_i der Probe kommt es zur stimulierte Raman-Streuung. Diese macht sich im Spektrum des Abtastimpulses als Signalabnahme (anti-Stokes-Seite), beziehungsweise Signalzunahme (Stokes-Seite) der zugehörigen Frequenzkomponenten bemerkbar.

In der FSRS-Technik kommen zwei kurze Laserimpulse zum Einsatz: zum einen ein spektral breiter Femtosekunden-Impuls mit Frequenzen ω zur Abfrage – er wird im Folgenden als Raman-Abtastimpuls bezeichnet; zum andern ein intensiver, spektral schmaler Pikosekundenimpuls mit Frequenz ω_P – er wird im Folgenden als Raman-Pumpimpuls bezeichnet. Bei zeitgleichem Auftreffen der Felder auf ein Medium kommt es zu einer Anregung solcher molekularen Schwingungsmoden ω_i der Probe, deren Frequenz mit der Differenzfrequenz $\omega - \omega_P$ der Laserimpulse zusammenfällt. Es gilt

$$\omega_i = |\omega - \omega_P|. \quad (2.6)$$

In Folge der kohärenten Wechselwirkung zwischen den eingestrahnten Laserimpulsen und den Schwingungsmoden des Mediums führt die stimulierte Raman-Streuung für Frequenzen $\omega < \omega_P$ (Stokes-Seite) zu einer exponentiellen Verstärkung des Raman-Abtastimpulses und gleichzeitig zu einer exponentiellen Abschwächung des Raman-Pumpimpulses. Für Frequenzen $\omega > \omega_P$ (anti-Stokes-Seite) sind die Rollen vertauscht. Es kommt zur Verstärkung des Raman-Pumpimpulses und Abschwächung des Raman-Abtastimpulses an den zugehörigen Eigenmoden des Systems. Beide Beträge können im Spektrum des Femtosekunden-Impulses beobachtet werden (siehe Abb. 2.3).

In Anlehnung an die Nomenklatur der spontanen Raman-Spektroskopie werden auch für die stimulierte Raman-Streuung die Begriffe *Stokes* und *anti-Stokes* verwendet. Sie bezeichnen jedoch keine unterschiedlichen Streuprozesse, sondern dienen allein zur Benennung der bezüglich des Raman-Pumpimpulses rotverschobenen beziehungsweise blauverschobenen Spektralbereiche. Im Gegensatz zur spontanen Raman-Streuung, bei der ein Signal auf der anti-Stokes-Seite nur bei Schwingungsanregung des Mediums beobachtet werden kann, ist für die stimulierte Raman-Streuung auf der anti-Stokes-Seite keine Besetzung des angeregten Zustandes notwendig. Sowohl im stimulierten Stokes- als auch anti-Stokes-Prozesses wird Energie, die einem Anregungsquantum der molekularen Schwingung ω_i des Moleküls entspricht, aus dem eingestrahnten Strahlungsfeld auf das Molekül übertragen. Stimulierte Raman-Streuung erlaubt somit eine spektroskopische Untersuchung von Prozessen im Schwingungsgrundzustand der Moleküle. Die spektroskopische Information des FSRS-Prozesses kann durch Detektion des Raman-Abtastimpulses in Anwesenheit $I_{Pr}^P(\omega)$ und Abwesenheit des Raman-Abtastimpulses $I_{Pr}(\omega)$ zugänglich gemacht werden. Durch Referenzieren beider Spektren gemäß

$$R(\omega) = \frac{I_{Pr}^P(\omega)}{I_{Pr}(\omega)} - 1 \quad (2.7)$$

erhält man das FSRS-Signal $R(\omega)$. Die Signaländerungen sind in in Abb. 2.4 schematisch dargestellt. Auf der Stokes-Seite zeichnet sich das FSRS-Spektrum durch ein positives Signal (Raman-Gain) auf der anti-Stokes-Seite durch ein negatives Signal (Raman-Loss) aus. Beide Spektren gleichen einem linear polarisierten, spontanen Raman-Spektrum – ihre Signalstärke ist jedoch um mehrere Größenordnungen [McC03] erhöht. Die exponentielle Verstärkung der SRS-Signals sowie ihr zugrundeliegender Mechanismus sind Gegenstand des folgenden Abschnitts.

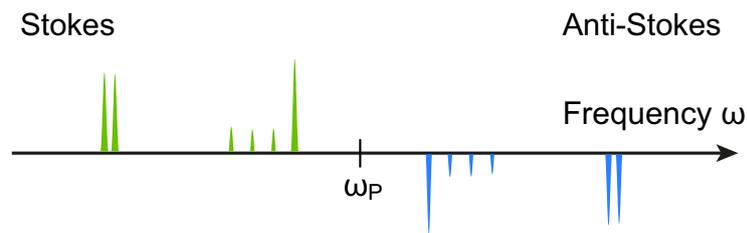


Abbildung 2.4: Schematisches FSRS-Spektrum. Durch Referenzieren des Raman-Abtastspektrum in Anwesenheit des Raman-Pumpimpulses auf das in Abwesenheit erhält man das FSRS-Spektrum. Die stimulierte Raman-Streuung macht sich dabei als positives Signal auf der Stokes-Seite und negatives Signal auf der anti-Stokes-Seite bemerkbar.

Das SRS-Signal

Stimulierte Raman-Streuung (SRS) ist ein nichtlinearer Raman-Prozess, bei dem Photonen inelastisch an Materie gestreut werden. Eine vollständige Beschreibung dieses Prozesses erfordert eine quantenmechanische Darstellung sowohl des Moleküls, der eingestrahlten, elektromagnetischen Felder, als auch der stimulierten Raman-Wechselwirkung selbst. Zur theoretischen Beschreibung der stimulierten Raman-Streuung wurden seit ihrer Entdeckung 1962 verschiedene, quantenmechanische [Hel63, Muk95] aber auch (semi-)klassische Ansätze [Lou63, Blo64, She65, Pen79, Boy92] vorgestellt, die in der Lage sind, Teilaspekte der SRS, wie beispielsweise das Signal/Rausch-Verhältnis [Oze10b], zu erklären. Bei den Lichtintensitäten, die typischerweise in der stimulierten Raman-Streuung eingesetzt werden, tritt die Körnigkeit des Lichts, seine Quantisierung, dabei in den Hintergrund und erlaubt eine klassische Beschreibung in Form ebener, elektromagnetischer Wellen. Dies ist Ausgangspunkt für die vereinfachte Beschreibung der SRS in (semi-)klassischen Betrachtungen. Der weitere Abschnitt folgt einer klassischen Beschreibung der stimulierten Raman-Streuung in Form gekoppelter, elektromagnetischer Wellen [Pen79, Boy92]. Die molekulare Antwort wird in Form eines oszillierenden Dipols berücksichtigt, der durch das einfallende elektrische Feld von außen induziert wird. Die modifizierte makroskopische Polarisation des Mediums, führt zur Erzeugung neuer Frequenzen. Der gepulste Charakter der FSRS wird zudem in den Arbeiten von Lee et al. [Lee04] sowie Yoon et al. [Yoo05] berücksichtigt. Eine vollständig, quantenmechanische Beschreibung von FSRS ist noch immer Gegenstand aktueller Forschung [Sun08, Mar10, Meh09].

Im Rahmen der nichtlinearen Optik kann die stimulierte Raman-Streuung als ein kohärenter Prozess zwischen drei eingehenden elektrischen Feldern und einem Raman-aktiven Medium behandelt werden. Er wird im Folgenden für die stimulierte Stokes-Streuung beschrieben und anschließend auf den Fall der stimulierten anti-Stokes-Streuung übertragen. Zwei einfallende Lichtfelder, die des Raman-Pumpimpulses mit Frequenz ω_P sowie des Stokes-Impulses mit Frequenz ω_S , führen zu einer kohärenten Schwingungsanregung des Mediums, welche allmählich mit einer ihrer charakteristischen Dephasierungszeit $T_{2,i}$ zerfällt (siehe Abbildung 2.5). Diese Schwingungsanregung modifiziert die makroskopische Polarisation des Moleküls periodisch mit der Schwingungsfrequenz ω_i des Moleküls und führt in einer weiteren Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld des Raman-Pumpimpulses zur Emission

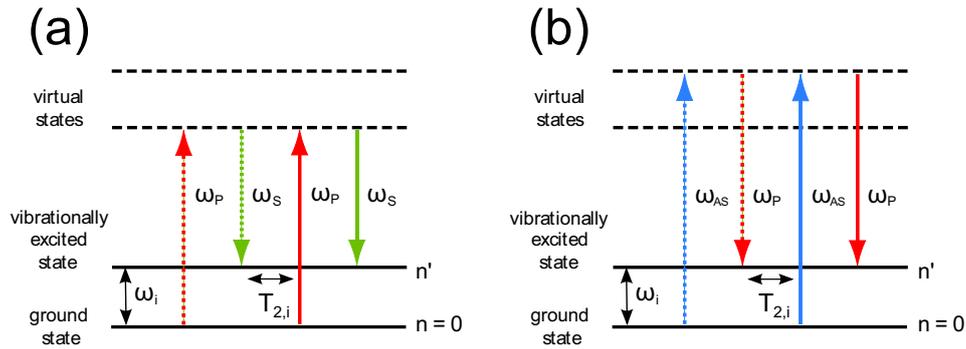


Abbildung 2.5: Schema des SRS-Prozesses. (a) Stokes-Prozess. Die elektrischen Felder des Raman-Pumpimpulses ω_p und des Raman-Abtastimpulses ω führen zu einer Schwingungsanregung ω_i des Mediums, die mit der Dephasierungszeit $T_{2,i}$ zerfällt. Eine weitere Anregung durch den Raman-Pumpimpuls führt schließlich zur stimulierten Emission und somit Verstärkung des Abtastimpulses. (b) Anti-Stokes-Prozess. Die Rolle der elektrischen Felder von Raman-Pump- und Raman-Abtastimpuls sind vertauscht. Der SRS-Prozess führt nun zur Verstärkung des Raman-Pumpimpulses und zur Abschwächung des Abtastimpulses.

eines elektrischen Feldes mit Frequenz ω_S . Die Überlagerung zwischen dem einfallenden Raman-Pumpimpuls und dem emittierten Stokes-Impuls wiederum, führt zu einer Schwebung, dessen Frequenz identisch mit der molekularen Schwingungsfrequenz ist. Diese wiederum verstärkt die Schwingungsamplitude, welche eine Verstärkung des Stokes-Impulses zur Folge hat. Das exponentielle Anwachsen des SRS-Signals in Abhängigkeit der Amplitude des Pump-Impulses und der Wegstrecke, die das Licht im Medium zurücklegt, beschreibt der nachfolgende Abschnitt.

In der FSRM finden zwei linear polarisierte, Gauss-förmige Laserimpulse, der Raman-Pumpimpuls mit Amplitude E_P sowie der Stokes-Impuls mit Amplitude E_S , Verwendung. Unter der Annahme von bandbreitenlimitierten Laserimpulsen, welche eine Zentralfrequenz ω_0 und eine Impulsdauer τ_0 besitzen und sich in z -Richtung ausbreiten, lassen sich ihre elektrischen Felder im Frequenzraum in folgender Form beschreiben [Lee04]

$$E(z, \omega) = E_0 \sqrt{2\pi\tau_0} \cdot \exp \left\{ -(\omega - \omega_0)^2 \tau_0^2 / 2 \right\} \cdot \exp (i\omega_0 z / c). \quad (2.8)$$

c stellt die Lichtgeschwindigkeit dar. Der Index 0 dient hierbei als Platzhalter für die Indizes der beiden Laserimpulse. Die nichtlineare Antwort des Mediums auf die eingestrahlten Lichtfelder kann durch die nichtlineare Suszeptibilität 3. Ordnung $\chi^{(3)}$ beschrieben werden. Diese reduziert sich in der FSRM für isotrope Medien auf ein Matricelement $\chi_{1111}^{(3)}$ und wird in Gl. (2.9) ebenso wie die elektrischen Felder der Laserimpulse als skalare Größe behandelt. Der für die stimulierte Raman-Streuung verantwortliche Term der nichtlinearen Polarisation $P^{(3)}$ [Pen79, Boy92, Yar07] ergibt sich an der Frequenz $\omega_S = \omega_P - \omega_i$ zu

$$P^{(3)}(\omega_S, z, t) = \frac{6}{2} \cdot \{ \varepsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_S) |E_P(\omega_P)|^2 E_S(\omega_S) \times \exp \{ ik_S z \} + c.c. \} \quad (2.9)$$

Die zeitlichen Abhängigkeit der nichtlinearen Polarisation $P^{(3)}$ führt zur Erzeugung eines neuen elektrischen Feldes E_S mit Wellenvektor $k_S = \omega_S/c$. Die getriebenen Wellengleichung für das neu erzeugte Feld vereinfacht sich in der SVA-Näherung² zu [Boy92, Eq. 10.3.20]

$$\frac{dE_S}{dz} = \frac{3i\omega_S}{n_S c_0} \chi^{(3)}(\omega_S) |E_P(\omega_P)|^2 E_S \quad (2.10)$$

wobei n_S den Brechungsindex des Mediums an der Frequenz ω_S berücksichtigt. Durch Integration ergibt sich das emittierte Stokes-Feld zu

$$E_S(z, \omega) = E_S(0, \omega) \cdot \exp \left\{ \frac{3i\omega_S}{n_S c_0} \chi^{(3)}(\omega_S) |E_P(\omega_P)|^2 z \right\}. \quad (2.11)$$

$E_S(0, \omega)$ bezeichnet den Stokes-Impuls vor der SRS-Wechselwirkung. Dieser erfährt beim Durchqueren des Mediums eine exponentielle Verstärkung in Abhängigkeit der zurückgelegten Wegstrecke sowie der Intensität des Raman-Pumpimpulses. Der Vorfaktor im Exponenten wird in der Literatur [Pen79] häufig unter dem Begriff des Raman-Verstärkung-Koeffizient G zusammengefasst. Er ist linear mit der nichtlinearen Suszeptibilität des Mediums verknüpft

$$G(\omega_S) = -\frac{3\omega_S}{n_S c_0} \text{Im}\{\chi^{(3)}(\omega_S)\}. \quad (2.12)$$

Das kohärente Signal der stimulierte Raman-Streuung liegt bei den gleichen Anregungsfrequenzen wie die des transmittierten Stokes-Impulses. Das gemessene FSRS-Signal (vergleiche Gl. (2.7)) ergibt sich daher aus dem referenzierten Betragsquadrat des Stokes-Impulses vor und nach der Interaktion mit der Probe.

$$R(\omega) = \frac{|E_S(\omega, z)|^2}{|E_S(\omega, 0)|^2} - 1 = \exp \left\{ 2G(\omega) |E_P(\omega_P)|^2 z \right\} - 1 \quad (2.13)$$

Für kleine Werte des Exponenten kann der Ausdruck entwickelt werden. Die gemessene Raman-Verstärkung lässt sich schreiben als

$$R(\omega) \approx 2 \cdot G(\omega) |E_P(\omega_P)|^2 \cdot z \quad (2.14)$$

Wie in Abschnitt 2.1 ausgeführt, besitzt die nichtlineare Suszeptibilität $\chi^{(3)}$ sowohl einen elektronischen, nichtresonanten Anteil $\chi_{NR}^{(3)}$ als auch einen resonanten Anteil $\chi_R^{(3)}$ (siehe Gleichung (2.1)). Da nur der resonante Beitrag eine komplexwertige Größe darstellt, skaliert das Signal der stimulierten Raman-Streuung linear mit dem Imaginärteil des resonanten Beitrags $\chi_R^{(3)}$. Dieser wird auch als Raman-Suszeptibilität bezeichnet und hat folgende Gestalt

² engl. slowly varying amplitude - Unter der Annahme, die Feldamplitude ändere sich langsam bezüglich des Ortes, d.h. $\frac{\partial^2 E}{\partial z^2} \ll \frac{k \partial E}{\partial z}$, vereinfacht sich die Wellengleichung auf eine Differentialgleichung 1. Ordnung.

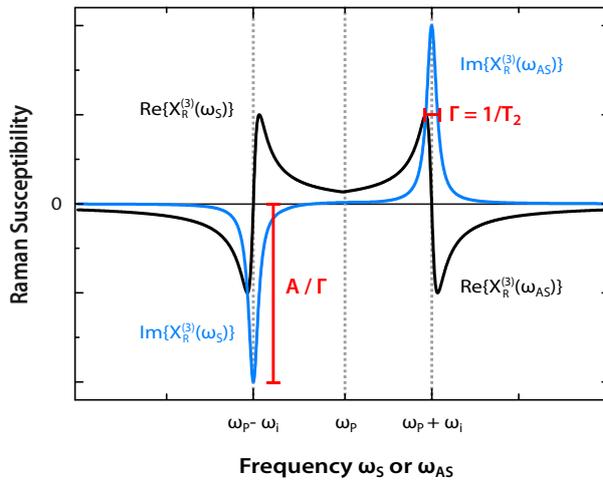


Abbildung 2.6: Raman-Suszeptibilität $\chi_R^{(3)}$ Real- (schwarz) und Imaginärteil (blau) der Raman-Suszeptibilität $\chi_R^{(3)}$ als Funktion der Stokes- beziehungsweise anti-Stokes-Frequenz. Während der Realteil an den Resonanzen $\omega_P \pm \omega_i$ durch eine dispersive Linienform gezeichnet ist, weist der Imaginärteil eine Lorentz-förmige Gestalt auf. Dessen Halbwertsbreite ist über Γ und seine Amplitude über A/Γ gegeben. Der negative Wert für $\omega_S = \omega_P - \omega_i$ beziehungsweise positiver Wert für $\omega_{AS} = \omega_P + \omega_i$ hat eine Verstärkung beziehungsweise Abschwächung des SRS-Signals zur Folge. Nach Ref. [Boy92].

$$\chi_R^{(3)}(\omega) = \frac{A}{\omega_i - (\omega_P - \omega) - i \cdot \Gamma} \quad (2.15)$$

$\Gamma = 1/T_{2,i}$ beschreibt die Halbwertsbreite der Raman-Linie und ist invers proportional zur Dephasierungszeit $T_{2,i}$ der Schwingungskohärenz. ω_i beschreibt die Frequenz der Raman-Resonanz und A/Γ die Amplitude der Lorentzkurve. Beide Beiträge der komplexwertigen Größe sind in Abbildung 2.6 dargestellt. Während sich der Realteil durch seine dispersive Linienform auszeichnet, weist der Imaginärteil von $\chi_R^{(3)}$ eine Lorentz-förmige Gestalt³ auf. Abbildung 2.6 zeigt die nichtlineare Suszeptibilität als Funktion der Stokes-Frequenz ω_S sowie anti-Stokes-Frequenz ω_{AS} . Es gilt [Pen79]

$$\chi_R^{(3)}(\omega_S) = (\chi_R^{(3)}(\omega_{AS}))^* \quad (2.16)$$

Nachdem der Imaginärteil der nichtlinearen Suszeptibilität an der Raman-Resonanz $\omega_P - \omega_i$ negativ ist [Boy92], führt die stimulierte Raman-Wechselwirkung für den Stokes-Impuls zu einer exponentiellen Verstärkung. Diese kann zum Beispiel zur Verstärkung von Laserimpulsen in Faser-Lasern eingesetzt werden [Yar07]. Für den anti-Stokes-Impuls hingegen hat die positive Amplitude eine exponentielle Abnahme während des SRS-Prozesses zur Folge.

Die nichtlineare Suszeptibilität selbst ist direkt proportional zum spontanen Raman-Streuquerschnitt $\left. \frac{d\sigma}{d\Omega} \right|_{spR}$ sowie zur Konzentration $[C]$ der Probe [Pen79]. Das detektierte FSRS-Signal hängt daher insgesamt von folgenden Größen ab

$$R(\omega) \approx Const. \cdot \left. \frac{d\sigma}{d\Omega} \right|_{spR} \cdot \omega \cdot z \cdot I_P \cdot [C] \quad (2.17)$$

³ Hierbei wird davon ausgegangen, dass die spektrale Auflösung des Experiments besser als die Linienbreite des molekularen Übergangs ist, und diese nur homogen verbreitet ist [Pen79].

Eigenschaften

Stimulierte Raman-Streuung ist eine kohärente Form der Raman-Streuung, welche im Gegensatz zu CARS untergrundfrei ist. Die elektronische Antwort des Mediums, beschrieben durch ihre nichtlineare Suszeptibilität $\chi_{NR}^{(3)}$, interferiert nicht mit dem zu detektierenden Signal. Das FSR-Spektrum ist direkt proportional zum Streuquerschnitt $\frac{d\sigma}{d\Omega}|_{spR}$ der spontanen Raman-Streuung und somit identisch zur spontanen Raman-Signatur der Probe. Zur gleichen Zeit besitzt SRS aufgrund der exponentiellen Verstärkung des emittierten Stokes-Strahls gegenüber der spontanen Raman-Streuung ein um 4-7 Größenordnungen [Sli10, Kuk07] höheres Signalniveau. Dieses hat höhere Signal/Rausch-Verhältnisse der Spektren [Owy77, Kuk07, Min11] sowie kürzere Aufnahmezeiten zur Folge [McC03]. Stimulierte Raman-Mikroskopie kann hiervon profitieren und erlaubt – abhängig von der Anzahl der ausgelesenen Kanäle beziehungsweise gleichzeitig detektierten Spektralkomponenten – Rastergeschwindigkeiten zwischen 100 ns - 10 ms pro Pixel [Saa10a, Plo09]. Gegenüber CARS weist SRS vergleichbare [Oze09] oder gar überlegene Signal/Rausch-Verhältnisse im Fall schwach Raman-aktiver Substanzen [Min11] auf. Im Gegensatz zur spontanen Raman-Streuung ist die stimulierte Raman-Streuung ein gerichteter Prozess, bei dem das erzeugte Feld mit den eingestrahlenen Laserfeldern kopropagiert. Das gerichtete SRS-Signal kann in der Spektroskopie [Boy92] wie in der Mikroskopie [Plo09, Fre08, Sli10] sowohl in Vorwärts- als auch Rückwärtsstreuung detektiert werden. Das inkohärente Signal einer möglichen Autofluoreszenz der Probe trägt gegenüber des gerichteten Signals der stimulierten Raman-Streuung kaum bei [Sli10]. Bei Verwendung hochauflösender Mikroskopobjektive könnte sie zwar auf der Stokes-Seite für einen geringen Untergrunds sorgen, auf das blauverschoben detektierte Signal in der FSRM hat sie jedoch keinen Einfluss. Im Gegensatz zur CARS, ist SRS selbst-phasenangepasst, das heißt die Impulserhaltung $\mathbf{k}_{FSRS} = \mathbf{k}_P - \mathbf{k}_P + \mathbf{k}_S = \mathbf{k}_S$ ist automatisch für alle Spektralkomponenten erfüllt. Dies ermöglicht den Einsatz breitbandiger Laserimpulse in der FSRM beziehungsweise der FSRM und erlaubt sowohl eine kollineare [Plo07b] als auch gekreuzte [Lai06] Strahlführung⁴. Die Breite des Weißlichtimpulses gibt hierbei das spektrale Beobachtungsfenster der Raman-Wechselwirkung vor und erlaubt es alle Raman-Resonanzen unter 4000 cm^{-1} gleichzeitig zu adressieren [Plo07b, Plo09]. Die spektrale Breite des Raman-Pumpimpulses bestimmt die spektrale Auflösung auf etwa $15\text{-}20 \text{ cm}^{-1}$ [Plo07b, Plo09]. Stimulierte Raman-Streuung skaliert ebenso wie die spontane Raman-Streuung linear mit der Probenkonzentration, wodurch sie sich sehr gut zur direkten, chemisch-sensitiven Analyse von Stoffgemischen eignet. Sie ist in der Lage, Konzentrationen im mikro- bis millimolaren Bereich zu detektieren [Fre08, Lai06, Plo09]. Das Signal der stimulierten Raman-Streuung beschränkt sich aufgrund der nichtlinearen Raman-Wechselwirkung ausschließlich auf das Fokalvolumen. FSRM ist daher in der Lage, auch dicken Proben schichtweise abzubilden und dreidimensionale, beugungsbegrenzte Rekonstruktionen der Probe vorzunehmen [Saa10a].

Bei der stimulierten Raman-Streuung wird das Raman-aktive Medium aus seinem Schwingungsgrundzustand in den ersten angeregten Schwingungszustand angehoben. Ein Unterschied in der Wahl des Spektralbereichs bezüglich Stokes- und anti-Stokes-Seite ist dabei nicht gegeben. Für die Raman-Verstärkung gilt [Pen79]

⁴ Eine gekreuzte Strahlführung wird in der FSRM noch nicht verwendet, da sie eine verringerte räumliche Auflösung zur Folge hat.

$$G(\omega_S) = \frac{\omega_S n_{AS}}{n_S \omega_{AS}} \cdot |G(\omega_{AS})| \quad (2.18)$$

wobei ω_S bzw. ω_{AS} die Frequenz, an der das FSRS-Signal detektiert wird, und n_S bzw. n_{AS} den zugehörigen Brechungsindex bezeichnet. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 2.7(a) anhand der Raman-Gain- und Raman-Loss-Spektren von Cyclohexan gezeigt. Beide Spektren weisen eine identische spektrale Signatur auf. Die Amplitude des Raman-Loss-Spektrums ist leicht erhöht. Um eine Vergleichbarkeit der Spektren experimentell zu gewährleisten, wurde während der Messung nur ein Langpass- gegen einen Kurzpassfilter ausgetauscht. Spektrale Abweichungen im Bereich der hochfrequenten Raman-Resonanzen im Raman-Loss-Spektrum sind auf die mangelnde spektrale Auflösung des Gitterspektrographens⁵ zurückzuführen. Eine nicht-unterdrückte Oszillation der Grundlinie im Raman-Loss-Spektrum (siehe Kapitel 4) kann hier durch Spline-Subtraktion eliminiert werden.

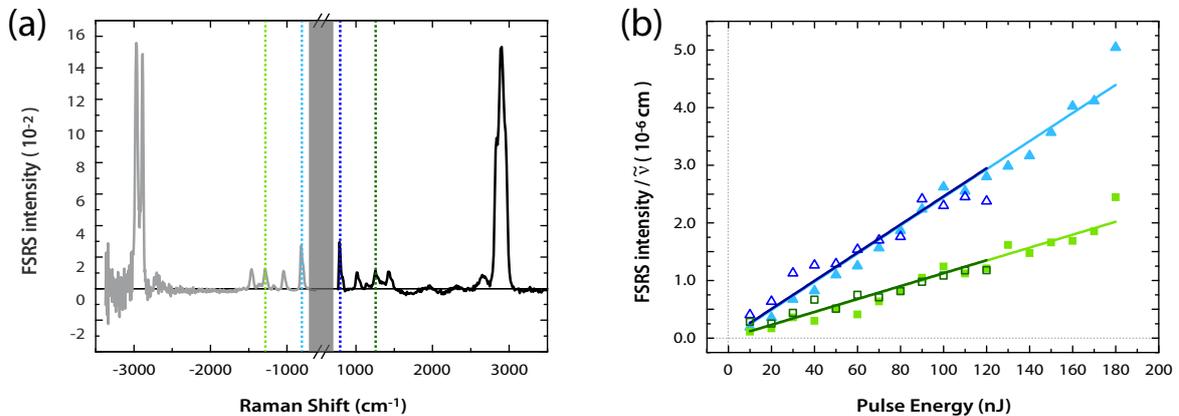


Abbildung 2.7: Linearität des FSRS-Signals auf Stokes- und anti-Stokes-Seite. (a) Raman-Gain- (grau) und Raman-Loss-Spektrum (schwarz) von Cyclohexan. Die Energie des Raman-Pumpimpulses beträgt 100 nJ. Ihre spektralen Signaturen stimmen überein. (b) Auf Detektionsfrequenz normiertes FSRS-Signal der Raman-Resonanzen von Cyclohexan bei 800 cm⁻¹ (blau) und 1200 cm⁻¹ (grün) als Funktion der Raman-Pumpenergie. Stokes- (gefüllte Symbole) wie anti-Stokes-Seite (offene Symbole) weisen ein identisches, lineares Verhalten auf. Die Steigungen der an die Messdaten angepassten Geraden (durchgezogene Linien) stimmen für beide Spektralbereiche sehr gut überein. Die Daten wurden auf der kHz-Anlage [Plo07b] aufgezeichnet.

Das gemessene FSRS-Signal skaliert für geringe Intensitäten des eingestrahlt Raman-Pumpimpulses linear mit dessen Intensität I_P . Dies zeigt Abbildung 2.7(b). Es wurden das Raman-Gain- sowie Raman-Loss-Spektrum von Cyclohexan für verschiedene Energien aufgenommen. Für einen Vergleich der Spektren auf Stokes- und anti-Stokes-Seite, wurden die Bandenhöhen auf ihre Detektionsfrequenz $\tilde{\nu} = \omega/2\pi c_0$ normiert (siehe Gleichung (2.17)). Die korrigierte Signalamplitude der in Abb. 2.7(a) farblich markierten Raman-Resonanzen bei 800 cm⁻¹ (blau) sowie 1200 cm⁻¹ (grün) sind als Funktion der Impulsenergie in Abbildung 2.7(b) dargestellt. Beide Resonanzen zeigen sowohl auf der Stokes- als auch auf der

⁵ Die Dispersion des Gitters sorgt für eine konstante Auflösung $\Delta\lambda$ auf der Wellenlängenskala λ , jedoch nicht auf der Energieskala ausgedrückt in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$.

anti-Stokes-Seite eine lineare Abhängigkeit auf. Dabei sind ihre Steigungen sowie ihre Signalstärken identisch. Die spektroskopische Information der (Femtosekunden-)stimulierten Raman-Streuung ist erwartungsgemäß auf Stokes- und anti-Stokes-Seite identisch. Eine zusätzliche Signalverstärkung auf der anti-Stokes-Seite, wie es von S. Umapathy [Uma09] berichtet wurde, kann nicht bestätigt werden.

FSRS dient in der vorliegenden Arbeit als Kontrast-Mechanismus in der Mikroskopie. Ihr Einsatz zur chemisch sensitiven, hyperspektralen Bildgebung ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

2.3 Hyperspektrale Bildgebung

Chemischer Kontrast in der optischen Mikroskopie beruht auf spektroskopischer Information. Die stimulierte Raman-Mikroskopie kennt zwei verschiedene Möglichkeiten, spektral aufgelöste Bildgebung zu betreiben: zum einen das *SRS-Imaging*, bei dem Mikroskopaufnahmen für einzelne Wellenlängen bzw. Banden gemacht werden und die Abfragewellenlänge falls nötig durchgestimmt werden kann; zum anderen das *Mapping* bei dem ein komplettes Spektrum an jedem Punkt der Probe aufgenommen wird.

Beim SRS-Imaging kann das gemessene Signal direkt als Funktion des Ortes aufgetragen werden. Dieser Ansatz erlaubt hohe Abbildungsgeschwindigkeiten von 100 ns pro Bildpixel [Saa10a], sowie eine chemisch sensitive, jedoch meist qualitative Bildgebung, da in vielen Fällen das Signal einer adressierten Raman-Resonanz nicht nur einer Substanz eindeutig zugeordnet werden kann. Die fehlende spektrale Information verhindert einen analytischen Einsatz von SRS-Imaging.

In der FSRM hingegen wird die Probe an jedem abgerasterten Punkt durch ein komplettes Spektrum charakterisiert. Man spricht von *hyperspektraler* Bildgebung [Sal09], bei der spektrale mit zusätzlicher, räumlicher Information kombiniert wird. Dies geht zu Lasten der Abbildungsgeschwindigkeit, welche nun durch die Aufnahmezeit pro Spektrum limitiert ist. Im MHz-FSRM-Aufbau [Plo09] beträgt sie aktuell 10 ms pro Bildpixel. Bei 512 ausgelesenen Kanälen des Diodenarrays entspricht dies $\approx 20 \mu\text{s}$ pro ausgelesenen Kanal. Ein zusätzlicher Geschwindigkeitsgewinn kann jedoch durch geringere Mittelungszeiten pro Spektrum, sowie den Einsatz anderer Rasterverfahren [Sch03, Ham08] erzielt werden. Das Aufzeichnen der kompletten, spektralen Information der Probe an jedem Bildpunkt erlaubt eine Identifikation sowie quantitative Analyse der Probenzusammensetzung. Die örtliche Verteilung einzelner Probenbestandteile kann chemisch sensitiv angetragen werden. Die Qualität der FSRM-Aufnahme wird dabei von drei Faktoren beeinflusst. Die räumliche Auflösung des FSRM-Aufbaus sowie die Rasterung der Probe bestimmen, welche strukturellen Details der Probe erfasst werden können. Die spektrale Auflösung des Aufbaus begrenzt den Zugang zu schwingungsspektroskopischen Details der aufgezeichneten FSRS-Signaturen. Zuletzt entscheidet die hyperspektrale Datenauswertung der orts aufgelösten Spektren und ihre Umwandlung in einzelne digitale Bilder darüber, welche chemische Information räumlich verteilt dargestellt werden kann.

2.3.1 Datenverarbeitung

Abbildung 2.8 fasst den Datenverarbeitungsprozess während der FSRS-Bildgebung zusammen. Das gemessene Spektrum $I(\lambda)$ des Raman-Abtastimpuls wird aufgezeichnet und als Funktion der Wellenlänge λ , der An- oder Abwesenheit des Raman-Pumpimpulses (*on/off*) sowie des Ortes x, y als Datenmatrix $I(\lambda, \text{on/off}, x, y)$ abgespeichert. Die FSRS-Spektren werden nun gemäß Gleichung (2.7) für jeden einzelnen Bildpunkt als Funktion der Raman-Verschiebung bestimmt und zugleich spektral korrigiert. Dies umfasst eine Korrektur der spektralen Grundlinie (siehe Kapitel 4) sowie das Entfernen eines vertikalen Versatzes der Grundlinie, wie es beispielsweise aufgrund von thermischen Linsen oder Kerr-Linsen, welche

vom Raman-Pumpimpuls induziert werden, auftreten kann. Zum anderen kann eine Rauschglättung der Spektren [Sav64, Sal09] sowie eine Filterung gegen Störeffekte der Messelektronik (Spikes) vorgenommen werden. Der anschließend vorliegende hyperspektrale Datensatz $R(\omega, x, y)$ wird mit Hilfe der, in diesem Abschnitt behandelten, multivariaten Datenanalysen ausgewertet: seine spektroskopische Information wird auf eine eindimensionale Größe reduziert und mit Hilfe von Farbtabelle (LUT) farblich kodiert als Funktion des Ortes angetragen. Es entsteht ein digitales Abbild der Probe im Mikroskop, wobei die Pixelgröße in der FSRM durch die eingestellte Schrittweiten des rasternden Mikroskops bestimmt ist. Das ursprünglich aus der digitalen Signalverarbeitung stammende Nyquist-Kriterium [Pre92] beschreibt die optimale Schrittweite δx , um kleinste Details der Probe in der Größe der Beugungsgrenze Λ_{min} auch digital sichtbar zu machen. Ausgehend vom Rayleigh-Kriterium (Gleichung (1.1)) ergibt sich die Schrittweite und somit Pixelgröße in Abhängigkeit der Numerischen Apertur NA des Objektivs und der verwendeten Wellenlänge λ zu

$$\delta x \leq \frac{\Lambda_{min}}{2.3} \approx 0.265 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2.19)$$

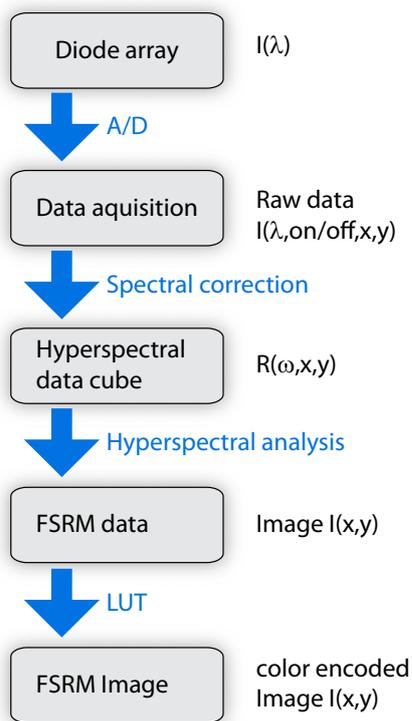


Abbildung 2.8: Datenverarbeitung in der FSRM.

Bei gegebener, experimenteller Konfiguration, d.h. für eine feste Wellenlänge und gewähltes Objektiv, hat das Nyquist-Kriterium in der FSRM zur Folge, dass die Schrittweite während der Messung auf die zu rasternde Probe abgestimmt werden muss. Während eine zu klein gewählte Schrittweite (Überabtasten) lange Messzeiten sowie große Datenmengen zur Folge hat, kommt es im umgekehrten Falle zu einem Informationsverlust und fehlerhaften Bildern. Man spricht von *Aliasing* [Paw06]. Ebenso hängt der Bildkontrast von der Datenverarbeitung und Digitalisierung ab. Nicht nur das Signal/Rausch-Verhältnis der Spektren, sowie der chemische Kontrast zwischen verschiedenen Spektren, sondern auch die hyperspektrale Analyse mit anschließender, farblichen Kodierung bestimmen den Informationsgehalt des Bildes. Bei der Transformation der spektroskopischen Information des hyperspektralen Datensatz $R(\omega, x, y)$ in ein digitales Bild $I(x, y)$ sollte möglichst keine Information verloren gehen. Methoden zur chemischen Bildgebung, sogenannte multivariate Datenanalysen übernehmen hierbei eine Schlüsselrolle. Die verschiedenen Auswertungsmethoden sind Gegenstand des nachfolgenden Abschnitts.

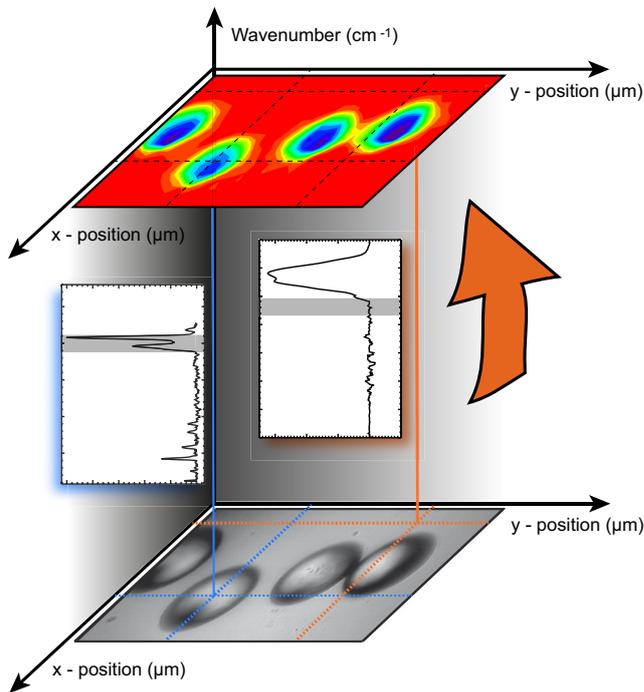


Abbildung 2.9: Univariater Datenauswertung in der FSRM. Eine Probe – im vorliegenden Beispiel in Wasser dispergierte Polystyrol-Kugeln – wird schrittweise abgerastert, wobei an jedem Punkt ein FSRS-Spektrum aufgenommen wird. Der sich ergebende hyperspektrale Datensatz enthält die komplette, spektrale Information der Probe. Für eine räumliche Darstellung der chemischen Verteilungen innerhalb der Probe kann der Datensatz unter anderem univariat ausgewertet werden. Die Signalstärke einer Raman-Mode (hier am Beispiel der C-H-Streck-Schwingung aufgezeigt) wird als Funktion des Ortes angetragen. Blau bedeutet auf der Farbskala einen hohen Wert des FSRS-Signals, rot einen niedrigen. Der rote Bereich stimmt in diesem Fall mit dem des Wassers überein. Die strukturelle Information gleicht der Transmissionsaufnahme unten. Nach Ref. [Pl07b].

2.3.2 Univariater Datenanalyse

Bei der univariaten Datenanalyse wird die örtliche Verteilung einer bestimmten Substanz der Probe anhand eines einzelnen, spektralen Merkmals, einer Bande beziehungsweise eines Spektralbereichs sichtbar gemacht. Hierfür wird das FSRS-Spektrum bei einer für die Substanz charakteristischen Schwingungsmode ω_i im Intervall $\delta\omega$ als Funktion des Ortes angetragen

$$I(x, y)|_{\omega_i} = \int_{\omega_i - \delta\omega}^{\omega_i + \delta\omega} R(\omega, x, y) d\omega \quad (2.20)$$

Das sich ergebende, zweidimensionale Abbild der Probe $I(x, y)|_{\omega_i}$ kann nun entsprechend farblich kodiert dargestellt werden. Abbildung 2.9 zeigt den univariaten Auswertungsprozess am Beispiel von in Wasser dispergierten Polystyrol-Kugeln (30 μm) auf. Die Probe besteht aus zwei Bestandteilen – Wasser und Polystyrol – deren FSRS-Spektrum kaum miteinander spektral überlappen. Eine univariate Datenauswertung kann daher sowohl über einzelne Banden des Polystyrol-Spektrums als auch über die breite Bande von Wasser durchgeführt werden, um deren chemische Verteilung sichtbar zu machen. In Abbildung 2.9 dient die Raman-Signatur der C-H-Streck-Schwingungen zwischen 2800 und 3050 cm^{-1} von Polystyrol als Unterscheidungsmerkmal. Ihr Signal pro Pixel wird aufsummiert und gegen den Ort angetragen. Hohe Werte sind dabei farblich blau, niedrige Werte rot dargestellt. Das entstehende FSRM-Bild kombiniert die strukturelle Information mit der chemischen Information der FSRS-Spektroskopie.

Eine univariate Datenauswertung liefert für einzelne, schmalbandige Raman-Resonanzen identische Aufnahmen wie das SRS-Imaging. Auch in der FSRM muss die Probenzusam-

mensetzung bekannt sein, um eine geeignete Raman-Frequenz zur Bildgebung auszuwählen. Der Großteil der Daten wird jedoch nicht genutzt. Mit Hilfe einer univariaten Datenauswertung lassen sich zudem nur solche chemische Bestandteile in der Probe charakterisieren, die sich spektral in mindestens einer Raman-Bande unterscheiden. Überlagern sich einzelne Banden, ergibt sich das detektierte Signal als lineare Superposition aller beitragenden Substanzen. Eine eindeutige Zuordnung ist daher nicht möglich. Bei Multikomponenten-Gemischen, wie biologischem Gewebe oder Zellen, kann eine univariate Datenauswertung eine eindeutige Zuordnungen zum Beispiel zwischen Proteinen und Lipiden nicht ausreichend vornehmen. An dieser Stelle kann die FSRM von der Vielfalt der multivariaten Analysemethoden profitieren. Eine kurze Übersicht der zur Verfügung stehenden, sogenannten chemometrischen Verfahren gibt der folgende Abschnitt.

2.3.3 Multivariate Datenanalyse

Chemometrie ist ein Teilgebiet der analytischen Chemie, die sich verschiedener mathematischer wie statistischer Methoden bedient [Sal09], um chemische – in der FSRM spektroskopische – Messdaten in interpretierbare, leicht darstellbare Information weiterzuverarbeiten. Hierbei finden vor allem Verfahren der multivariaten Statistik Verwendung. Von multivariater Analyse wird gesprochen, wenn mindestens 2 (oder mehrere) Merkmale eines Datensatzes zur Charakterisierung der Probe herangezogen werden. Hauptaugenmerk der Analyse liegt dabei auf einer effektiven Datenreduktion ohne Verlust relevanter Information. Es gilt vorhandene Strukturen zu erkennen, und diese von redundanter Information oder Nichtinformation (Rauschen) zu separieren [Kes07].

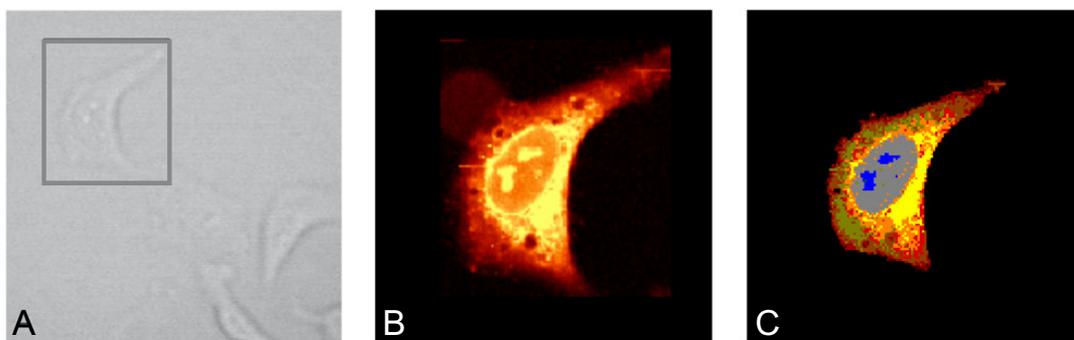


Abbildung 2.10: Potential der multivariaten Datenauswertung. Abbildung einer Hautkrebs-(HeLa)-Zelle mit Hilfe von Lichtmikroskopie (A) und spontaner Raman-Mikroskopie (B-C). (B) Eine univariate Auswertung bezüglich der C-H-Streck-Signatur zwischen $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ macht den Zellkern und das Zytoplasma kenntlich. (C) Eine hierarchische Clusteranalyse (9 Cluster) basierend auf dem Spektralbereich zwischen $1200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ erlaubt die chemische Unterscheidung verschiedener Zellorganellen ohne Markierung der Probe. Entnommen aus Ref. [Mat07]. Mit freundlicher Genehmigung durch Prof. M. Diem. Copyright © 2007 The Biophysical Society.

Im Gegensatz zur univariaten Datenanalyse charakterisieren chemometrische Methoden die Probenzusammensetzung nicht nur anhand eines spektralen Merkmals, sondern anhand des vollständigen Spektrums pro Bildpunkt. Abbildung 2.10 verdeutlicht den Vorzug breitbandiger, spektraler Information in der hyperspektralen Bildgebung. Die Darstellung zeigt Aufnah-

men einer Hautkrebszelle, die mit Hilfe herkömmlicher Lichtmikroskopie (A) sowie spontaner Raman-Mikroskopie (B-C) gemacht wurden. Eine univariate Datenauswertung (B) bezüglich der Raman-Signatur der C-H-Schwingung zwischen $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ zeigt die räumliche Verteilung *organischen Materials*. Zellkern und Zytoplasma heben sich zwar von einander ab, eine genaue Darstellung der unterschiedlichen Verteilung von Lipiden oder Proteinen ist aber nicht möglich. Stattdessen erscheinen das Zytoplasma sowie die Nucleoli, deren Hauptbestandteil die rRNA darstellt, gleich. Eine multivariate Auswertung (C) basierend auf einer hierarchischen Clusteranalyse hingegen kann verschiedene Zellorganellen wie Nucleoli und Plasma aufgrund ihrer verschiedenen spektralen Signaturen ohne zusätzliche Markierungen unterscheiden [Mat07]. Eine Analyse der zugrundeliegenden Clusterspektren sowie ein nachfolgender Vergleich mit aus der Literatur bekannten Raman-Signaturen gibt Auskunft über die chemische Zusammensetzung für jeden Bildpunkt.

Multivariate Auswertemethoden können in zwei Gruppen unterteilt werden, die der strukturprüfenden sowie die der strukturentdeckenden Verfahren [Bac08]. Analysemethoden des ersten Typs suchen nach geeigneten, charakteristischen Merkmalen (basierend auf bestehenden Datenmodellen), anhand derer Spektren voneinander unterschieden werden können. In Kombination mit strukturentdeckenden Methoden, werden sie oftmals verwendet, um geeignete Parameter zu bestimmen, die zur Unterscheidung von Gruppen – beispielsweise bei Clusteranalysen – herangezogen werden können. Zu den strukturprüfenden Verfahren werden Methoden wie die Diskriminanzanalyse oder Regressionsanalyse gezählt. Beide haben bereits in der biomedizinischen Bildgebung Anwendung [Kan09, Osh10, Kra09b, Hed10] gefunden.

Strukturentdeckende Verfahren, zu denen die Faktorenanalyse, Clusteranalysen oder neuronale Netze gezählt werden [Bac08], haben hingegen das Ziel, vorhandene Strukturen in großen Datensätzen aufzuspüren. Sie klassifizieren und unterteilen diesen. Das Aufdecken von Strukturen ist immer mit einer Komprimierung der Datengröße verbunden, die durch Bündelung der Spektren zu einzelnen Gruppen [Bac08] wie beispielsweise in der Clusteranalyse, oder durch Bündelung der spektralen Merkmale zu einem charakteristischen Wert wie in der Faktorenanalyse erzielt wird [Kes07]. Die Vielzahl der spektralen Merkmale eines Spektrums wird auf einen Wert, die Gruppenzugehörigkeit beziehungsweise die gewichteten Gemeinsamkeit zu einer Komponente reduziert. Ihre Analyse hyperspektraler Datensätze geschieht gewöhnlich ohne Kenntnis vorhandener Muster oder Modelle [Bac08]. Sie kann jedoch mit solchen kombiniert werden; man spricht dann von überwachten Methoden [Sal09].

Strukturentdeckende Verfahren werden in der hyperspektralen Bildgebung vor allem dann eingesetzt, wenn die chemische Zusammensetzung der Probe so komplex ist, dass sich aufgezeichnete Spektren zwischen benachbarten Bildpunkten spektral kaum noch unterscheiden. Diese Stärke wird zunehmend in der biomedizinischen Bildgebung ausgenutzt. Es finden sowohl Clusteranalysen [Kra11, vM05, Mat07, Pul09, Las04, Mil10] als auch Faktorenanalysen Anwendung [Shi09, Clu09]. Eine ausführliche Übersicht der zur Raman-Bildgebung eingesetzten, multivariaten Verfahren und ihrer Anwendungen vermitteln beispielsweise folgende Arbeiten [Sal09, Kes07, Bac08, Gel96, Shi09, Kra11]. Ihr Vorgehen zur Datenanalyse und Bildgebung wird im Folgenden exemplarisch an der in der FSRM angewendeten Hauptkomponentenanalyse aufgezeigt.

Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist ein häufig verwendetes Verfahren der angewandten, linearen Algebra. Sie wird zur Gruppe der Faktorenanalyse gezählt. Dieser Begriff wird in der Chemie synonym für die PCA verwendet [Kes07]. In der Mathematik wird sie zudem als Hauptachsentransformation oder Singularwertzerlegung (SVD) bezeichnet. Ihre Aufgabe in der multivariaten Bildanalyse ist die Strukturerkennung sowie gleichzeitige Komprimierung der Datengröße. Sie wird ebenfalls zur Rauschfilterung verwendet [Wal03]. Eine ausführliche Übersicht zur PCA findet sich beispielsweise in [Wal03, Kes07].

Die Zielsetzung der PCA lässt sich am Beispiel eines mikroskopischen Präparats veranschaulichen, das aus zwei sich mischenden Substanzen aufgebaut ist. Charakterisiert man diese Probe mit FSRM, so lässt sich jedes aufgezeichnete FSRS-Spektrum im Idealfall als Linearkombination der FSRS-Spektren der beiden zugrundeliegenden Substanzen beschreiben. Sind die FSRS-Spektren der Grundsubstanzen bekannt, so lässt sich die Probenzusammensetzung also allein durch die gewichteten Beiträge bezüglich der zwei Hauptkomponenten charakterisieren und die Größe des Datensatzes deutlich reduzieren. Ziel der PCA ist es nun, den umgekehrten Weg zu gehen und aus vorliegenden Messdaten die Spektren der zugrundeliegenden Hauptsubstanzen zu ermitteln. Die Anzahl der gefundenen Komponenten ist im Idealfall identisch mit der Anzahl der vorliegenden Substanzen. Reale Messdaten besitzen jedoch ein endliches Rauschen, so dass die ermittelte Anzahl der signifikanten Spektren immer größer ist. Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über das Vorgehen der PCA.

Mathematisch betrachtet, ist die PCA eine lineare sowie orthogonale Transformation. Sie drückt den ursprünglichen, vieldimensionalen Datensatz mittels Koordinatentransformation durch latente Spektren, sogenannte Hauptkomponenten (PC) aus. Diese sind nicht miteinander korreliert. Die Hauptkomponenten werden so berechnet, dass sie die maximale Varianz des Datensatzes in absteigender Reihenfolge an Wichtigkeit berücksichtigen [Sal09]. Die Anzahl der berechneten Spektren ist gleich der Anzahl der gemessenen, spektralen Kanäle, also der Wellenzahlintervalle. Alle Hauptkomponenten zusammen ergeben eine neue, nun unkorrelierte, also orthogonale Basis des Datenraums. Die ursprünglichen Spektren des gemessenen, hyperspektralen Datensatzes werden als Linearkombinationen der Hauptkomponenten ausgedrückt.

Der mit FSRM gemessene und aufbereitete Datensatz $R(\omega, x, y)$ wird in der PCA als eine $m \times n$ große Datenmatrix⁶ $R[m; n]$ behandelt. n bezeichnet die Anzahl der aufgezeichneten, spektralen Kanäle und m die Anzahl der gemessenen Bildpunkte. Die Hauptkomponenten werden in zwei Schritten berechnet. Ausgangspunkt der PCA ist die Berechnung der Kovarianzmatrix des Datensatzes bezüglich der spektralen Kanäle [Mil10]

$$\underline{C} = \text{Cov}(\underline{R}) = \underline{R} \cdot \underline{R}^T \quad (2.21)$$

⁶ Die Notation orientiert sich an Kapitel 2.1. Skalare werden in kleinen Buchstaben, Vektoren in dicken Buchstaben und Matrizen mit Unterstrich gekennzeichnet.

Diese beschreibt die Korrelation zwischen verschiedenen Kanälen im Spektrum. Die resultierende $n \times n$ große Matrix \underline{C} wird im zweiten Schritt diagonalisiert. Die sich ergebenden Eigenwerte σ_i beschreiben die spektrale Varianz des Datensatzes. Die zugehörigen Hauptkomponenten \underline{PC}_i ergeben sich aus dem Produkt der Datenmatrix und dem berechneten Eigenvektor \underline{E}_i zu

$$\underline{PC}_i = \underline{R} \cdot \underline{E}_i \quad (2.22)$$

Die ursprünglichen Spektren können nun in der neugeschaffenen Basis als Linearkombination der Hauptkomponenten ausgedrückt werden

$$\underline{R} = \underline{E}^T \cdot \underline{P} \quad (2.23)$$

wobei $\underline{E} = [\underline{E}_1, \underline{E}_2, \dots, \underline{E}_n]$ die Matrix der Eigenvektoren und $\underline{P} = [\underline{PC}_1, \underline{PC}_2, \dots, \underline{PC}_n]$ die sogenannte Faktorenmatrix bezeichnet. Die zugehörigen Eigenwerte – im Weiteren als *Scores* bezeichnet – beschreiben, wieviel Anteil die einzelnen Hauptkomponenten an der Gesamtvarianz des Datensatzes besitzen. Sie sind innerhalb der Faktorenmatrix nach absteigender Reihenfolge an Wichtigkeit angeordnet. Es tragen daher nur eine geringe Anzahl an Spektren zur kompletten, spektralen Variation innerhalb des Datensatzes bei. Die übrigen beschreiben die mit dem Rauschen verknüpften Signalbeiträge [Sal09] und können vernachlässigt werden.

Durch die PCA reduziert sich die spektrale Information pro Bildpunkt auf eine kleine Anzahl bezüglich der Hauptkomponenten gewichteter Faktoren. Diese *Scores* werden nun ortsverteilt angetragen. Abbildung 2.11 zeigt die Ergebnisse einer PCA-Analyse an Mikroskopie-Eichstandards bestehend aus Polystyrol⁷ (PS, 10 μm , blau markiert) und Melaminharz⁸ ($\emptyset > 10 \mu\text{m}$, grün markiert) eingebettet in Lack⁹. Die Schrittweite während der FSRM-Aufnahme beträgt 2 μm . Alle drei Bestandteile sind Polymerverbindungen, deren Raman-Resonzen sowohl für C-H-Streck-Schwingungen um 3000 cm^{-1} sowie im Fingerprintbereich stark überlappen. Spektrale Unterschiede innerhalb ihrer FSRS-Spektren sind rot eingerahmt: Während das FSRS-Signal gemäß Gl. (2.7) Werte im Prozentbereich aufweist, liegen die Signaländerungen eine Größenordnung darunter. Für eine univariate Datenauswertung wäre daher ein sehr detailliertes Wissen über die Schwingungsspektren der reinen Substanzen notwendig. PCA macht deren räumliche Verteilung innerhalb der Probe ohne Vorwissen über die Probenzusammensetzung sichtbar. Die vorliegenden, hyperspektralen Daten können durch vier Hauptkomponenten repräsentiert werden, die 83% der spektralen Information wiedergeben. Die erste Hauptkomponente stellt ein gewichtetes Durchschnittsspektrum aller beitragenden Substanzen dar (siehe Abb. 2.11). Ihre Relevanz beträgt rund 72%. Die errechnete \underline{PC}_1 wird durch die C-H-Resonanz um 3000 cm^{-1} dominiert. Die zweite Komponente unterscheidet

⁷ Hersteller: Fluka/Sigma-Aldrich; Art 72822

⁸ Hersteller: Fluka/Sigma-Aldrich; aus Melamin-Formaldehyd-Derivaten; Art. 96062

⁹ Hersteller: Mabelline Jade; Express Finish 40; Bestandteile: Propylacetat, Ethylacetat, Nitrocellulose, Isopropanol und Acetyl-Tributyl-Citrat.

2 Kohärente Raman-Bildgebung

sich von der ersten, vor allem durch Signaländerungen um 3100 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} . Die PS-Kugeln lassen sich in dieser Darstellung klar vom Lack sowie den Melaminharz-Kugeln unterscheiden. In den FSRM-Aufnahmen der dritten und vierten Komponente lässt sich die Verteilung des Lacks sowie der Melaminharz-Kugeln sichtbar machen. Mikroskopie-Eichstandards sind optisch sehr inhomogene Proben, die einen großen Anteil des eingestreuten Laserlichts aufgrund des Unterschieds im Brechungsindex ablenken beziehungsweise streuen. Dies hat ein schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis der Daten zur Folge. Die fehlenden 17 % der spektralen Information im Datensatz kann hier dem Rauschen beziehungsweise systematischen Messfehlern zugeordnet werden.

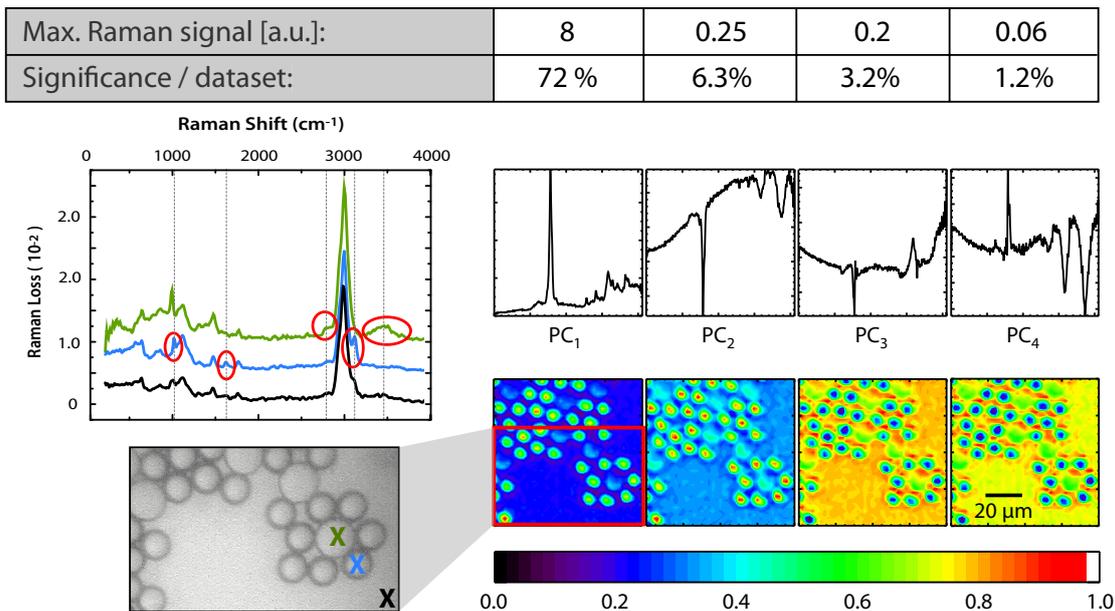


Abbildung 2.11: PCA-Analyse in der FSRM. Durchlichtaufnahme (links) sowie FSRM-Aufnahmen (rechts) einer Polymermischung bestehend aus in Lack (schwarz markiert) eingebetteten PS- ($10\text{ }\mu\text{m}$, blau markiert) und Melaminharz-Kugeln ($\text{Ø} > 10\text{ }\mu\text{m}$, grün markiert). Die FSRM-Aufnahmen beruhen auf den ersten vier Hauptkomponenten einer PCA-Analyse. Deren zugehörigen Spektren und Relevanz innerhalb des Datensatzes (0-100%) sind darüber dargestellt. (Für weitere Details siehe Text).

Faktorenanalysen, wie beispielsweise die Hauptkomponentenanalyse sind universell. Sie eignen sich für unbekannte Proben, die aufgrund ihrer komplexen, chemischen Zusammensetzung durch eine univariate Auswertung nur unzulänglich analysiert werden können. Sie erlaubt, einfache Strukturen zunächst sichtbar zu machen und sich einen groben Überblick über die Probenverteilung zu verschaffen. Für eine eindeutige Identifizierung aller chemischen Bestandteile der Probe ist eine gleiche Anzahl von Hauptkomponenten nötig. In den meisten Fällen sind jedoch nur die ersten PCs zur Analyse geeignet, da das Signal/Rausch-Verhältnis für höhere Komponenten sich deutlich verschlechtert. Für Vielkomponenten-Systeme kann die PCA daher nur eine qualitative Analyse vornehmen. Die den Bildern zugrundeliegenden Hauptkomponenten beschreiben keine realen Raman-Spektren. Sie sind Ergebnisse eines numerischen Algorithmus, wobei die zueinander orthogonalen Hauptkomponenten im Gegensatz zu den positiv-definiten Raman-Spektren sowohl negative wie positive Amplituden

besitzen können. Hauptkomponentenanalysen eignen sich jedoch recht gut als Ausgangspunkt für weitere Verfahren [Not06]. Sie sind zum einen in der Lage, die vorliegende Datenmenge deutlich zu reduzieren, zum anderen erlauben sie in wenig komplexen Probensystemen die Untersuchung chemischer Gradienten, da die PCA ebenfalls ein linearer Algorithmus ist [Sal09]. FSRM, deren Signal sich aus der linearen Superposition der chemischen Bestandteile der untersuchten Probe zusammensetzt, kann hiervon profitieren. Für sehr komplexe Untersuchungsobjekte, beziehungsweise Proben mit minimalen, spektralen Änderungen zwischen den Bildpunkten, haben sich allerdings Clustermethoden, wie beispielsweise die hierarchische Clusteranalyse [Sal09, Kra11] in der hyperspektralen Bildgebung etabliert.

Die im letzten Abschnitt beschriebene hyperspektrale Bildgebung beschreibt die Analyse orts aufgelöster, stimulierter Raman-Spektren, die mit Hilfe eines rasternden Mikroskops aufgenommen werden. Die für die stimulierte Raman-Spektroskopie benötigten ultrakurzen Laserimpulse sowie die in der stimulierten Raman-Mikroskopie implementierten Aufbauten sind Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

3 Laserquellen in der FSRM

The laser is an intrinsically nonlinear device.

(Roy Glauber - Nobel Lecture, 2005)

Das vorliegende Kapitel beschäftigt sich mit den technischen Voraussetzungen und physikalischen Eigenschaften der Lichtquellen, die für einen Einsatz in der FSRM notwendig sind. Im Gegensatz zur spontanen Raman-Streuung, bei der nur eine monochromatische Laserquelle verwendet wird, beruht die SRS auf der Interaktion zweier, im sub-Pikosekunden-Bereich synchronisierter Laserimpulse, die mit der Probe in Wechselwirkung treten. Anhand der spektralen Breite des Raman-Abtastimpulses lassen sich in der SRS-Mikroskopie zwei verschiedene Ansätze unterscheiden: zum einen das *SRS Imaging*, im Weiteren als Einkanal-SRS-Mikroskopie (scSRS) bezeichnet, zum anderen die *FSRM*. Ihr technischen und konzeptuellen Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten werden im Folgenden gegenübergestellt. Nach einem kurzen Überblick über den in der SRS-Mikroskopie verwendeten Spektralbereich werden zunächst die technischen Realisierungen der scSRS-Mikroskopie vorgestellt. Der nachfolgenden Abschnitt schließlich befasst sich mit den für die FSRM benötigten Lichtquellen, sowie den ihnen zugrundeliegenden Konzepten. Die für den Einsatz in der (bio-) medizinischen Bildgebung entwickelte Laserquelle bildet den Abschluss des Kapitels.

Sowohl in der FSRM als auch scSRS-Mikroskopie werden Laserquellen im NIR zwischen 700 und 1100 nm verwendet. Dies ist sicherlich durch den weitverbreiteten Einsatz von Titan:Saphir-Lasern [Zin11] mitbegründet. Der verwendete Wellenlängenbereich stellt sich speziell für (bio-)medizinische Proben zusätzlich als vorteilhaft heraus. Zellen und Gewebe sind hoch streuende, nur teilweise transparente Objekte [Ye09], die ein Eindringen elektromagnetischer Strahlung erschweren. Ihre Ausbreitung erfolgt in den meisten biologischen Geweben in Vorwärtsrichtung [Nie04] und wird primär durch Absorption sowie Streuung beeinflusst [Wel95]. Während im infraroten Spektralbereich die Absorption von Wasser beiträgt, dominieren Makromolekülen wie Aminosäuren und Pigmente (zum Beispiel Hämoglobin oder Melanin) das Absorptionsverhalten des Gewebes im UV und sichtbaren Spektralbereich [Nie04]. Beide Gruppen weisen eine geringe Absorption im Spektralbereich zwischen 650 und 1200 nm auf [Nie04]. Ein Auslösen chemischer Reaktionen durch Multiphotonen-Absorption kann dabei für geringe Anregungsdichten des Lasers vermieden werden [Hop01]. Ferner wird die Eindringtiefe durch die inverse Abhängigkeit der Streuung¹ von der Wellenlänge bestimmt. Im NIR-Spektralbereich treten deutlich geringere Eindring- und Ablenkverluste auf. Dies eröffnet der FSRM den Zugang zu tieferen Gewebeschichten [Wel95] und verringert zudem das Anwachsen der effektiven Fokusgröße aufgrund von Streuung [Eva08].

¹ Hier sind als Signalbeiträge S zur elastischen Streuung vor allem die Rayleigh- (mit $S \sim 1/\lambda^4$) sowie Mie-Streuung (mit $S \sim 1/\lambda^x$, $0.4 \leq x \leq 0.5$) zu nennen.

In der scSRS-Mikroskopie kommen zwei synchronisierte, monochromatische Laserimpulse, ein Pumpimpuls mit Frequenz ω_P sowie ein Stokes-Impuls mit Frequenz $\omega_S < \omega_P$, zum Einsatz, die mit der Probe interagieren. Mindestens einer der beiden Laserquellen ist dabei durchstimmbare, damit ihre Frequenzdifferenz $\Delta\omega = \omega_P - \omega_S$ so abgestimmt werden kann, dass sie mit genau einer Schwingungsresonanz ω_i der Probe in Resonanz ist. Stimulierte Raman-Streuung führt dann zu einer exponentiell verstärkten Signaländerung beider Laserimpulse: während die Intensität des Raman-Pumpimpuls an der Frequenz ω_P abnimmt, gewinnt der Stokes-Impuls an der Frequenz ω_S in gleichem Maße an Signalstärke. Die detektierte Signaländerung $\Delta I_S = \Delta I_P$ nimmt für die in der scSRS-Mikroskopie verwendeten Laserquellen Werte im Bereich $10^{-4} - 10^{-5}$ an [Fre08, Gam10, Nan09, Oze09, Sli09] an. Diese wird in allen implementierten Aufbauten einkanalig mittels hochfrequenter, phasensensitiver Detektion registriert. Diese besteht aus einem Intensitätsmodulator² und einem Lock-in-Verstärker. Mit Ausnahme der Gruppe um Ozeki et al. [Oze09] wird in der scSRS-Mikroskopie die stimulierte Raman-Abschwächung (SRL) des Pumpimpulses gemessen.

Unter Verwendung zweier Pikosekunden-Laser mit einer Repetitionsrate im 80 MHz-Bereich können Raman-Resonanzen hochaufgelöst adressiert werden. Die Laserquellen sind dabei elektronisch [Nan09, Sli09] oder optisch [Fre08, Oze09, Gam10] aufeinander synchronisiert. Ihre spektrale Bandbreite beträgt zwischen 3 und 15 cm^{-1} [Fre08, Gam10, Nan09, Sli09]. In der scSRS-Mikroskopie können drei Laser-Konzepte unterschieden werden. Zum Einen finden zwei baugleiche, moden-gekoppelte ps-Laseroszillatoren [Nan09, Sli09] Anwendung, die jeweils elektronisch aufeinander synchronisiert werden. Die Synchronisation zweier unterschiedlicher Lasertypen für die scSRS-Mikroskopie wurde inzwischen ebenfalls berichtet [Oze10b, Wan10, Fre11]. Ausgehend von nur einer Laserquelle verwenden zwei weitere Gruppen [Fre08, Oze09] einen moden-gekoppelten Laseroszillator als Raman-Pumpimpuls, der zugleich einen daran angeschlossenen OPO³ zur Gewinnung des Stokes-Impulses betreibt. Die Impulsdauer des jeweiligen Oszillators gibt hierbei die spektrale Auflösung des Experiments zu etwa 5 cm^{-1} [Fre08] beziehungsweise 175 cm^{-1} [Oze09] vor. Gabetta et al. [Gam10] verwendet hingegen einen Femtosekunden-Oszillator, dessen 70 fs-Laserimpulse durch spektrales Einschränken während der Frequenzverdopplung in periodisch gepolten Lithiumniobat (PPLN) Kristallen als Raman-Pumpimpuls eingesetzt wird. Die Laserfundamentale dient darüber hinaus zur Weißlichterzeugung in Photonischen Kristallfasern⁴. Das erzeugte Kontinuum wird ebenfalls durch Frequenzverdopplung im PPLN-Kristall spektral eingeschränkt und als durchstimmbarer Stokes-Impuls verwendet.

Die Frequenz der verwendeten Pikosekunden-Laserimpulse wird nun so gewählt, dass ihre Frequenzdifferenz eine bestimmte Schwingungsresonanz der zu untersuchenden Probe stimuliert anregen kann. Das verstärkte SRS-Signal wird zur chemisch-selektiven Bildgebung der Probe im Fokus eines rasternden Mikroskops genutzt. Bei Messdauern von 100 ns - 300 μs pro Pixel [Fre08, Saa10a, Saa11a] ermöglicht die scSRS-Mikroskopie Abbildungsgeschwin-

² Es werden Akusto-/elektro-optische Modulatoren sowie Pockelszellen verwendet.

³ engl. optical parametrical oscillator

⁴ Diese Glasfasern werden entlang der Längsrichtung von Kanälen mit mikroskopischem Querschnitt durchzogen. Deren regelmäßige Anordnung leitet das Licht wie in einem zweidimensionalen Kristall. [Rus08]

digkeiten von bis zu 25 Bildausschnitten pro Sekunde. Für Proben mit spektral überlappenden Schwingungsresonanzen ist es hierbei nicht möglich, quantitative Aussagen über die Probenzusammensetzung zu treffen. Hierfür wird die komplette, spektroskopische Information der Probe benötigt, so dass das zugehörige Spektrum Punkt für Punkt abgerastert werden muss. Dies erfordert, mindestens einen der synchronisierten Pikosekunden-Laserimpulse über einen spektralen Bereich von $800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ variieren zu können, was mit einem nicht unerheblichen Zeitaufwand verbunden ist. Gambetta et al. [Gam10] sowie Roeffaers et al. [Roe11] berichten von Scan-Zeiten im Minutenbereich für ein Spektrum von 200 cm^{-1} .

Die fehlende spektrale Information in der SRS-Mikroskopie war Anlass für die Gruppe um X.S. Xie [Fre11] ihr bestehendes Mikroskop zu erweitern. In dieser Anwendung wird ein breitbandiger Femtosekunden-Oszillator elektronisch mit einem Pikosekunden-Oszillator synchronisiert. Die spektrale Auflösung ist hierbei durch den Pikosekunden-Impuls gegeben. Im vorgestellten STE-SRS-Aufbau [Fre11] wird das Abtastspektrum S_1 des Femtosekunden-Impulses mit Hilfe eines polarisationmodulierenden Impulsformers so manipuliert, dass ausgewählte Raman-Moden einer einzelnen Substanz in der Probe gezielt angeregt werden können. Das gemessene SRS-Signal, der Raman-Gain des Pump-Impulses, ergibt sich als Summe aller Signaländerungen im Raman-Abtastspektrum. Probenbestandteile, die (teilweise) überlappende Raman-Signaturen besitzen, tragen in dieser Einzel-Messung ebenso zum gemessenen Signal bei. Durch eine alternierende Abfrage der Probe mit einem zweiten Abfrageimpuls S_2 , dessen Spektralkomponenten zum ersten 'orthogonal' sind, ist es möglich, deren Beitrag zu ermitteln. Das STE-SRS-Signal der untersuchten Substanz ergibt sich aus der Differenz, der beiden gemessenen Signale zu $S = S_1 - S_2$. In Kombination mit einem rasternden Mikroskop erlaubt STE-SRS die räumliche Verteilung einer einzelnen Substanz chemisch sensitiv zu verfolgen. Die Form des Abfragespektrums (ebenso seines Negativs) ist jedoch für jede Substanz individuell zu wählen und zudem von der Anzahl der zu unterscheidenden Komponenten abhängig. Deren Quantität bestimmt die notwendige Anzahl der zu präparierenden Spektralkomponenten des Abtastimpulses, um unterschiedliche Probenbestandteile eindeutig voneinander abgrenzen zu können. Für jede zu bestimmende Substanz muss ein (spontanes) Raman-Spektrum zuvor bekannt sein, um den benötigten Abfrageimpuls exakt manipulieren zu können. STE-SRS ist daher nicht zur Untersuchung unbekannter Substanzen geeignet [Fre11] und ist aufgrund der notwendigen, ausgeklügelten Laseranregung technisch sehr anspruchsvoll, sowie kostenintensiv. Sie ist für den routinemäßigen Einsatz wenig geeignet.

Breitbandige, stimulierte Raman-Mikroskopie [Plo07b, Plo10] erlaubt hingegen – wie in Kapitel 2 bereits ausführlich dargelegt wurde – die direkte, quantitative Untersuchung unbehandelter sowie unbekannter Proben(-gemische). In der FSRM kommt ebenfalls ein spektral eingeschränkter Pikosekunden-Laserimpuls zum Einsatz, dessen spektrale Weite auf die Linienbreite typischer Raman-Resonanzen abgestimmt ist [Kuk07]. Er ist für die Raman-Streuung verantwortlich und in Abb. 3.1 rot dargestellt. Dieser als Raman-Pumpimpuls bezeichnete Laserimpuls wird nun mit einem schwachen, blauverschobenen Femtosekunden-Impuls kombiniert. Seine spektrale Bandbreite ermöglicht eine gleichzeitige Beobachtung aller Raman-Resonanzen der Probe. Er ist für die exponentiell verstärkte Signaländerung des FSRM-Spektrums verantwortlich und in Abb. 3.1 in blau gezeigt. Beide Laserimpulse werden zeitlich und räumlich miteinander in Überlapp gebracht und kollinear nun in ein

rasterndes Mikroskop eingekoppelt. Am Fokus des Mikroskops kommt es zur stimulierten Raman-Streuung an der Probe, welche sich als Signalabnahme im Spektrum des Weißlichtimpulses und gleichzeitiger Signalzunahme des Raman-Pumpimpulses bemerkbar macht. Der spektral modulierte Raman-Abtastimpuls wird nach dem Mikroskop mit Hilfe von Filtern vom Raman-Pumpimpuls getrennt und anschließend per Spektrograph und Vielkanaldetektor (Diodenarray) aufgezeichnet. In der FSRM wird somit die Signalabnahme (Raman-Loss) im Spektrum des Weißlichtimpulses an den zugehörigen Raman-Resonanzen detektiert. Durch abwechselndes Blocken des Raman-Pumpimpuls kann das unveränderte und modulierte Spektrum des Weißlichtimpulses aufgezeichnet und das FSRS-Spektrum der Probe am Fokus des Mikroskops bestimmt werden. Durch Abrastern der Probe kann die chemische Zusammensetzung der Probe orts aufgelöst verfolgt werden.

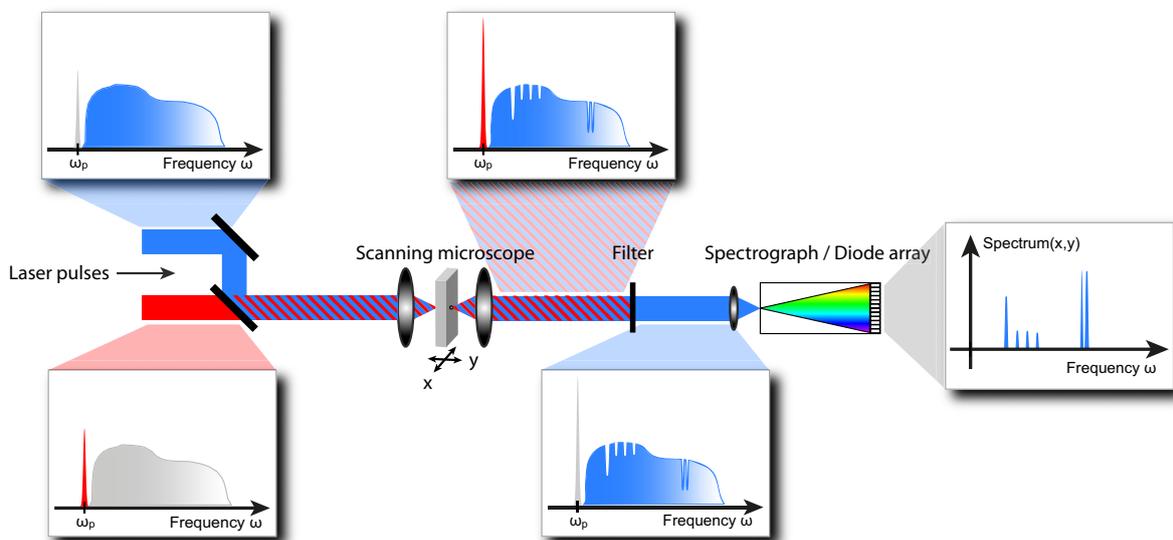


Abbildung 3.1: Prinzip eines FSRS-Mikroskops. Ein intensiver Pikosekunden-Laserimpuls (rot; Raman-Pumpimpuls) und ein dazu blauverschobener, schwacher Femtosekunden-Laserimpuls (blau; Raman-Abtastimpuls) werden kollinear in ein rasterndes Mikroskop eingekoppelt. Stimulierte Raman-Streuung in der Probe führt zu einer spektralen Abnahme des Weißlichtimpulses an den zugehörigen Raman-Resonanzen (bei gleichzeitigen Zunahme des Raman-Pumpimpulses). Das Spektrum des Raman-Abtastimpulses wird wechselweise mit und ohne Anregung des Raman-Pumpimpulses aufgezeichnet und aufeinander referenziert (in der Darstellung ist nur das Weißlichtspektrum nach Interaktion mit dem Raman-Pumpimpuls dargestellt). Das sich ergebende FSRS-Spektrum spiegelt die Probenzusammensetzung am Fokus des rasternden Mikroskops wieder. Durch schrittweises Verfahren der Probe ergibt sich ein hyperspektraler Datensatz der Probe.

Die Laserquelle unseres ersten FSRM-Aufbaus [Plo07b] beruht auf einem Laser-/Verstärkersystem (Abb. 3.2) mit einer Wiederholrate von 1 kHz, welches Femtosekunden-Laserimpulse mittlerer spektraler Breite um 775 nm liefert. Diese sind jedoch spektral zu breit, um als Raman-Pumpimpulse dienen zu können und gleichzeitig zu schmalbandig, um alle möglichen Raman-Resonanzen der Probe abzufragen. Beide Impulse werden daher durch optische Manipulation der Laserfundamentalen gewonnen. Der spektral schmalbandige Raman-Pumpimpuls wird durch spektrales Einschränken der Fundamentalen gewonnen. Hierfür

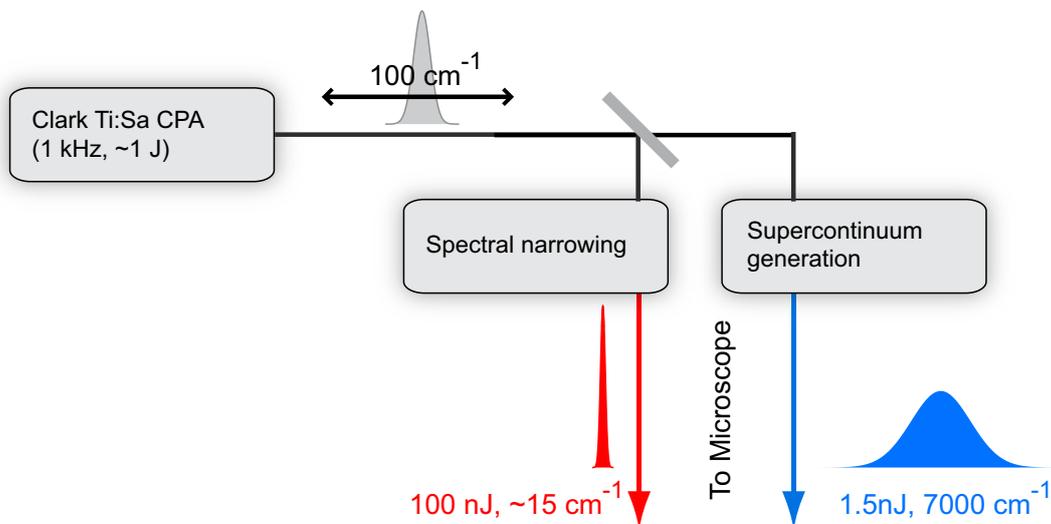


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Lichtquelle im kHz-Aufbau. Ein Titan:Saphir basiertes Laser-/Verstärkersystem liefert Laserimpulse mit einer spektralen Breite von 100 cm^{-1} . Der für FSRM benötigte schmalbandige Laserimpuls (Raman-Pumpimpuls) wird durch spektrales Einschränken mittels eines Bandpassfilters gewonnen. Um alle Raman-Resonanzen ($> 3000 \text{ cm}^{-1}$) einer Probe adressieren zu können, wird der zweite Laserimpuls (Raman-Abtastimpuls) durch Superkontinuums-erzeugung spektral verbreitert.

kommt ein spektral schmaler Bandpassfilter zum Einsatz, um den Aufbau dabei möglichst einfach zu halten. Eine spektrale Einengung der Impulse wäre aber auch durch räumliches Filtern mit Hilfe von Blenden in der Fourier-Ebene eines Null-Dispersion-Impulsformers in 4f-Anordnung möglich [Pon11]. Beide Ansätze sind mit einem starken Energieverlust der Impulse verbunden. Im UV/VIS-Bereich sowie infraroten Spektralbereich werden für die Erzeugung spektral schmalbandiger Impulse zudem $\chi^{(2)}$ -Prozesse [Xu04] wie Differenz-Frequenzmischen [Kol07], Summenfrequenz-Erzeugung [Lai06] sowie Parametrische Verstärkung in OPA- [Shi06] und NOPA-Prozessen [Co10] genutzt. Diese erzeugen durchstimmbare Laserimpulse mit hinreichender Impulsenergie, welche es beispielsweise erlauben, eine zusätzliche, elektronische Resonanz-Verstärkung des FSRS-Signals im nahen UV zu nutzen [Lai06].

Eine ausreichende Bandbreite der Raman-Abtastimpulse kann durch Superkontinuums-erzeugung (SCG) [Alf89, Cou07] der Laserfundamentalen in stark nichtlinearen Medien erzielt werden. Während in MHz-Oszillatoren aufgrund der niedrigen Impulsenergien Photoni-sche Kristallfasern [Rus03, Dud06] verwendet werden, finden für Laser-/Verstärkersysteme im kHz-Bereich Flüssigkeiten, Gläser sowie Kristalle Verwendung [Alf89, Cou07]. Für die FSRM wurde ein Saphir-Kristall verwendet, da er im sichtbaren bis nahinfraroten Spektralbereich ein intensives sowie stabiles Weißlichtspektrum liefert [Rie00]. Die spektrale Breite der Laserfundamentalen kann so von zuvor 100 cm^{-1} auf über 7000 cm^{-1} erweitert werden.

Auf der kHz-Anlage [Pl007b] kommen Raman-Pumpimpulse mit einer Energie von 50-100 nJ zum Einsatz. Die Impulsenergie des Abtastimpulses liegt um einen Faktor 50 darunter. Beide Impulse werden anschließend in ein rasterndes Mikroskop kollinear eingekoppelt, an dessen Fokus sie eine breitbandig stimulierte Raman-Streuung in der Probe induzieren. Typische FSRS-Signalhöhen liegen für die angegebenen Impulsenergien im Prozentbereich. Die damit verbundenen Spitzenintensitäten erreichen jedoch Werte zwischen 10^{11} bis 10^{13} W/cm² und sind ungeeignet für biologische Proben wie Zellen oder Gewebe [Hop01]. Durch die Wechselwirkung ultrakurzer Laserimpulse im Pikosekunden- bis Femtosekunden-Bereich mit Gewebe können verschiedene Formen von Photoschäden auftreten. Die Art und das Ausmaß der Schädigung hängen dabei vor allem von der Wellenlänge, der Leistungsdichte sowie der Impulsdauer der verwendeten Laserstrahlung ab [Nie04]. Abhängig vom Gewebetyp können unterschiedliche Mechanismen durchaus zur gleichen Zeit beitragen. Laserimpulse im sub-Nanosekundenbereich schädigen das Gewebe bei zu hoher Intensität vor allem aufgrund von plama-induzierter Ablation sowie Photodisruption. Diese Prozesse werden unter dem Begriff *Optischer Zusammenbruch* zusammengefasst. Ablation beschreibt die Freisetzung einzelner Molekülfragmente aus dem Gewebe aufgrund von intermolekularen Bildungsbrüchen. Dies kann zum einen in Folge von Absorption im UV-Bereich (Photoablation) zum anderen aber auch durch ein laserinduziertes Mikroplasma (plasmainduzierte Ablation) geschehen. Photodisruption bezeichnet das mechanische Zerreißen des Gewebes als Folge der sich ausbreitenden Schockwelle, welche durch die laserinduzierten Plasmaexpansion hervorgerufen wird. Mit wachsender Intensität der eingestrahelten Felder gewinnt dieser Prozess an Bedeutung, da nun nicht nur Energie an das Gewebe selbst, sondern auch an das erzeugte, absorbierende Plasma abgegeben wird. Der Übergang zwischen Photoablation und Photodisruption ist dabei fließend und hängt von der Leistungsdichte des eingestrahlichten Laserfeldes sowie dem Gewebetyp ab [Nie04].

Zur biologischen Bildgebung darf die Spitzenintensität der in der FSRM verwendeten Laserimpulse nur Werte kleiner als $\sim 10^{11}$ W/cm² [Nie04] annehmen. Auf der kHz-Anlage wird dieser empirische Grenzwert jeweils überschritten und würde zum optischen Zusammenbruch des Gewebes führen. Eine Energieverringering des Raman-Pumpimpulses hat jedoch eine lineare Abnahme des FSRS-Signals zur Folge (siehe Gl. (2.17)). Die Intensität des Weißlichtimpulses kann kaum verringert werden (zum Beispiel mit Graufiltern nach der Erzeugung), da der Raman-Abtastimpuls die Seedphotonen der stimulierten Raman-Streuung zur Verfügung stellt und das Signal/Rausch-Verhältnis des FSRS-Spektrums bestimmt. Der Raman-Abtastimpuls wird zudem in einem nichtlinearen Prozess erzeugt. Während die spektrale Form und Intensität des Weißlichts von der Leistung der Laserfundamentalen sowie der Justage des Strahlengangs bestimmt werden, hängt die Stabilität des Superkontinuums stark vom Rauschen des zugrundeliegenden Laser/Verstärkersystems ab. Typische Werte der Leistungsschwankung betragen ~ 1 % (RMS). Dies stellt eine untere Schranke für das Schwanken des Weißlichts, aber auch für das Schwanken des FSRS-Spektrums bei kürzester Aufnahmezeit dar. Dieses wird auf der kHz-Anlage durch Referenzieren zweier aufeinanderfolgender Weißlichtimpulse in An- und Abwesenheit des Raman-Pumpimpulses (siehe Gl. (2.7)) bestimmt, um spektrale Schwankungen auszugleichen. Durch ein anschließendes Mitteln der Einzelschluss-FSRS-Spektren kann zwar das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert werden, es hat aber verlängerte Mittelungszeiten im 100 ms-Bereich zur Folge [Pl007b].

Für den Einsatz der FSRM in der (bio-)medizinischen Bildgebung wurde daher eine neue Lichtquelle entwickelt, deren Spitzenleistungen mit den Anforderungen biologischer Proben kompatibel ist. Auf der neuen Anlage wird der Raman-Abtastimpuls nun nicht mehr durch nicht-lineare Prozesse erzeugt, sondern direkt von einem Femtosekunden-Laser emittiert (Abb. 3). Dies ist von Vorteil, da das Rauschen gängiger Oszillatoren nur wenige Promille beträgt. Im nachfolgend beschriebenen Aufbau sind 0.1% (RMS) spezifiziert.

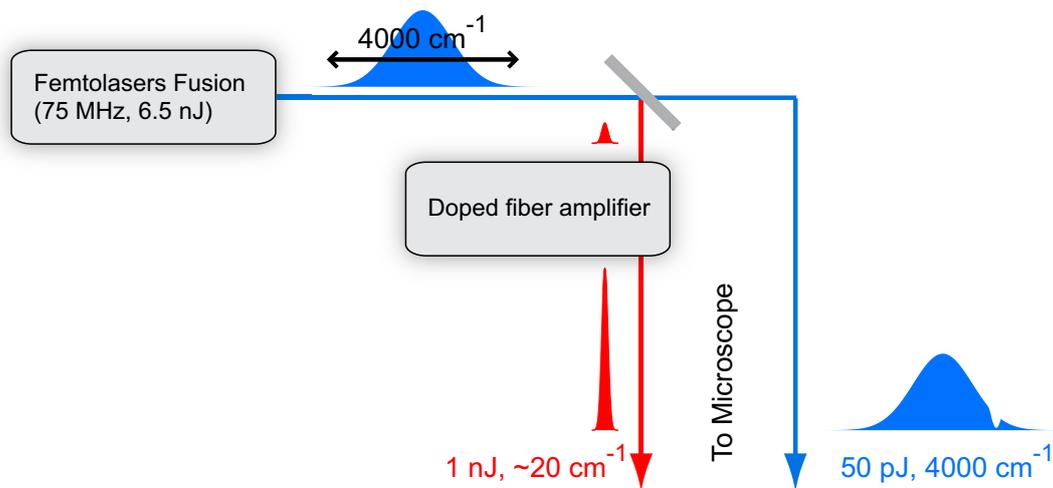


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Lichtquelle im MHz-Aufbau. Ein Titan-Saphir-basierter fs-Oszillator liefert ultrakurze Impulse. Die damit verknüpfte, spektrale Bandbreite erlaubt es, die Laserimpulse direkt als Raman-Abtastimpulse in der FSRM einzusetzen. Aus der niederfrequenten Flanke des Laser-Spektrums wird mit Hilfe eines Bandpassfilters ein spektral schmaler Bereich abgegriffen und in einen dotierten Faserverstärker eingekoppelt. Dieser Spektralbereich fällt direkt mit dem Emissionsmaximum des Faserverstärkers zusammen. Der dort nachverstärkte und spektral eingeschränkte Laserimpuls dient als Raman-Pumpimpuls. Er wird zusammen mit einem Anteil der Laserfundamentalen ins Mikroskop eingekoppelt.

Das fs-Lasersystem (Femtolasers, Fusion BB) emittiert ultrakurze Laserimpulse mit einer Dauer von unter 10 fs. Die damit verbundene spektrale Bandbreite von mehr als 125 nm ist ausreichend, um alle Raman-Resonanzen in organischen Materialien [Sch95] simultan adressieren zu können (unter der Prämisse, dass sich der Raman-Pumpimpuls spektral an einer der Flanken des Spektrums befindet). Diese Impulse werden direkt als Raman-Abtastimpulse verwendet. Im Gegensatz dazu wird nun der Raman-Pumpimpuls in einem weiteren optischen Verfahren generiert. Hierfür wird aus der langwelligen Flanke des Laser-Spektrums ein schmaler Bereich mittels Bandpassfilter abgegriffen und in einen dioden-gepumpten, Yb^{3+} -dotierten Faser-Verstärker eingekoppelt. Die Verstärkung des Seed-Strahls basiert auf einem 3-Niveau-Übergang von Yb^{3+} Ionen [Pas95, Sel03, Fu04] des Verstärkermediums, welches von einem 915 nm Diodenlaser gepumpt wird. Die Emissionswellenlänge des Verstärkers liegt bei 980 nm, d.h. bezüglich des fs-Laser-Spektrums in der äußersten roten Flanke des Spektrums. Es können somit alle Raman-Resonanzen bzw. ihre zugehörigen Frequenzen im

Abtastspektrum adressiert werden. Die spektrale Halbwertsbreite des Raman-Pumpimpulses beträgt 18 cm^{-1} und ist auf die Breite einer typischen Raman-Resonanz in Lösung [Sch95] abgestimmt. Die Ausgangsleistung des Lasers von etwa 450 mW entspricht bei einer Repetitionsrate von 75 MHz einer Impulsenergie von 6 nJ. Das Lasersystem liefert für den Raman-Abtastimpuls somit einen Faktor 4 mehr Energie als auf der kHz-FSRM-Anlage. Es werden jedoch nur Raman-Abtastimpulse mit einer Energie von etwa 25-125 pJ verwendet, um eine Photoschädigung der Probe zu vermeiden. Die Energie des Raman-Pumpimpulses beträgt am Fokus des rasternden Mikroskops $\sim 500 \text{ pJ}$. Die höhere Wiederholrate des Lasers erlaubt zudem eine höhere Bildaufnahmezeit des Mikroskops. Der nachfolgende Abschnitt beschreibt ausführlich die Laserquelle des neu realisierten FSRM-Aufbaus. Er ist ein Abdruck des Artikels⁵

Evelyn Ploetz, Benjamin Marx, Thomas Klein, Robert Huber, Peter Gilch: „A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy“, *Opt. Express* **17** (2009) 18612-18620, DOI: 10.1364/OE.17.018612.

⁵ Reprinted from *Opt. Express* 17(21): E. Ploetz, B. Marx, T. Klein, R. Huber, and P. Gilch: A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy, p. 18612-18620, ©2009, Optical Society of America, Inc.

A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy

E. Ploetz^{1,†}, B. Marx^{1,†}, T. Klein¹, R. Huber¹ and P. Gilch^{1,2,*}

¹ *Lehrstuhl für BioMolekulare Optik and
Center of Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München
Oettingenstr. 67, D-80538 München, Germany*

² *Institut für Physikalische Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany*

[†] *These authors contributed equally to this publication.*

peter.gilch@physik.lmu.de

Abstract: In femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM) a spectrally broad pulse (Raman probe) and a spectrally narrow pulse (Raman pump) interact in a sample and thereby generate a Raman spectrum of the focal volume. Here a novel light source for FSRM is presented. It consists of an 8-fs laser (repetition rate of 75 MHz) operating as Raman probe. A Yb³⁺ based fiber amplifier generates the Raman pump light at 980 nm. The amplifier is seeded by the spectral wing of the 8-fs laser output which ensures synchronisation of pump and probe pulses. Spectral and temporal characteristics of these pulses are reported and simultaneous recording of broadband Raman spectra relying on these pulses is demonstrated.

© 2009 Optical Society of America

OCIS codes: (180.5655) Raman microscopy; (180.4315) Nonlinear microscopy; (320.7090) Ultrafast lasers; (140.3280) Laser amplifiers

References and links

1. G. Turrell and J. Corset, eds., *Raman microscopy developments and applications* (Academic Press, San Diego, 1996).
2. M. Diem, M. Romeo, S. Boydston-White, M. Miljkovic, and C. Matthäus, "A decade of vibrational microspectroscopy of human cells and tissue (1994-2004)," *Analyst* **129**(10), 880–885 (2004).
3. I. Notingher and L. L. Hench, "Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro," *Expert Rev. Med. Devices* **3**(2), 215–234 (2006).
4. B. de Jong, T. Bakker, K. Maquelin, T. van der Kwast, C. Bangma, D. Kok, and G. Puppels, "Discrimination between nontumor bladder tissue and tumor by Raman spectroscopy," *Anal. Chem.* **78**(22), 7761–7769 (2006).
5. C. Lieber, S. Majumder, D. Billheimer, D. Ellis, and A. Mahadevan-Jansen, "Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro," *J. Biomed. Opt.* **13**(2), 024013 (2008).
6. M. Ibelings, K. Maquelin, H. Endtz, H. Bruining, and G. Puppels, "Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy," *Clin. Microbiol. Infect.* **11**(5), 353–358 (2005).
7. D. Willemsse-Erix, M. Scholtes-Timmerman, J. Jachtenberg, W. van Leeuwen, D. Horst-Kreft, T. Schut, R. Deurenberg, G. Puppels, A. van Belkum, M. Vos, and K. Maquelin, "Optical Fingerprinting in Bacterial Epidemiology: Raman Spectroscopy as a Real-Time Typing Method," *J. Clin. Microbiol.* **47**(3), 652–659 (2009).
8. J. Dong and Y. Ozaki, "FTIR and FT-Raman studies of partially miscible poly(methyl methacrylate)/poly(4-vinylphenol) blends in solid states," *Macromolecules* **30**(2), 286–292 (1997).
9. B. von Vacano, L. Meyer, and M. Motzkus, "Rapid polymer blend imaging with quantitative broadband multiplex CARS microscopy," *J. Raman Spectrosc.* **38**(7), 916–926 (2007).
10. J. Koenig and J. Bobiak, "Raman and infrared imaging of dynamic polymer systems," *Macromol. Mater. Eng.* **292**(7), 801–816 (2007).

11. A. Zumbusch, G. Holtom, and X. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.* **82**(20), 4142–4145 (1999).
12. J. Cheng and X. Xie, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications," *J. Phys. Chem. B* **108**(3), 827–840 (2004).
13. A. Volkmer, "Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *J. Phys. D-applied Phys.* **38**(5), R59–R81 (2005).
14. M. Müller and A. Zumbusch, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Chem. PhysChem.* **8**(15), 2157–2170 (2007).
15. C. Evans and X. Xie, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine," *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 883–909 (2008).
16. A. Penzkofer, A. Laubereau, and W. Kaiser, "High-intensity Raman interactions," *Prog. Quantum Electron.* **6**(2), 56–140 (1979).
17. J. Cheng, A. Volkmer, L. Book, and X. Xie, "An epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity," *J. Phys. Chem. B* **105**(7), 1277–1280 (2001).
18. E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, and P. Gilch, "Femtosecond stimulated Raman microscopy," *Appl. Phys. B - Lasers Opt.* **87**(3), 389–393 (2007).
19. M. Yoshizawa and M. Kurosawa, "Femtosecond time-resolved Raman spectroscopy using stimulated Raman scattering," *Phys. Rev. A* **61**, 013808 (2000).
20. P. Kukura, D. W. McCamant, and R. A. Mathies, "Femtosecond stimulated Raman spectroscopy," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 461–488 (2007).
21. D. McCamant, P. Kukura, and R. Mathies, "Femtosecond broadband stimulated Raman: A new approach for high-performance vibrational spectroscopy," *Appl. Spectrosc.* **57**(11), 1317–1323 (2003).
22. A. Vogel, J. Noack, G. Huttman, and G. Paltauf, "Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues," *Appl. Phys. B-Lasers Opt.* **81**(8), 1015–1047 (2005).
23. C. Freudiger, W. Min, B. Saar, S. Lu, G. Holtom, C. He, J. Tsai, J. Kang, and X. Xie, "Label-Free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy," *Science* **322**(5909), 1857–1861 (2008).
24. P. Nandakumar, A. Kovalev, and A. Volkmer, "Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy," *New J. Phys.* **11**(3), 033026 (2009).
25. Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy," *Opt. Express* **17**(5), 3651–3658 (2009).
26. K. Kieu, B. Saar, G. Holtom, X. Xie, and F. Wise, "High-power picosecond fiber source for coherent Raman microscopy," *Opt. Lett.* **34**(13), 2051–2053 (2009).
27. Q. Hao, W. Li, and H. Zeng, "High-power Yb-doped fiber amplification system synchronized with a few-cycle Ti:sapphire laser," *Opt. Express* **17**(7), 5815–5821 (2009).
28. R. Paschotta, J. Nilsson, A.C. Tropper and D.C. Hanna, "Ytterbium-Doped Fiber Amplifiers," *IEEE J. Quantum Electron.* **33**(7), 1049–1056 (1997).
29. H. Pask, R. Carman, D. Hanna, A. Tropper, C. Mackechnie, P. Barber, and J. Dawes, "Ytterbium-doped silica fiber lasers - versatile sources for the 1-1.2 μm region," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **1**(1), 2–13 (1995).
30. R. Selvas, J. K. Sahu, L. B. Fu, J. N. Jang, J. Nilsson, A. B. Grudinin, K. H. Yla-Jarkko, S. A. Alam, P. W. Turner, and J. Moore, "High-power, low-noise, Yb-doped, cladding-pumped, three-level fiber sources at 980 nm," *Opt. Lett.* **28**(13), 1093–1095 (2003).
31. L. B. Fu, M. Ibsen, D. J. Richardson, and D. N. Payne, "977-nm all-fiber DFB laser," *IEEE Photon. Technol. Lett.* **16**(11), 2442–2444 (2004).
32. S. Laimgruber, H. Schachenmayr, B. Schmidt, W. Zinth, and P. Gilch, "A femtosecond stimulated Raman spectrograph for the near ultraviolet," *Appl. Phys. B-Lasers Opt.* **85**(4), 557–564 (2006).
33. I. Kozma, P. Baum, U. Schmidhammer, S. Lochbrunner, and E. Riedle, "Compact autocorrelator for the online measurement of tunable 10 femtosecond pulses," *Rev. Sci. Instrum.* **75**(7), 2323–2327 (2004).
34. A. Savitzky and M. Golay, "Smoothing + differentiation of data by simplified least squares procedures," *Anal. Chem.* **36**(8), 1627 (1964).
35. S. Lee, D. Zhang, D. McCamant, P. Kukura, and R. Mathies, "Theory of femtosecond stimulated Raman spectroscopy," *J. Chem. Phys.* **121**(8), 3632–3642 (2004).
36. S. Yoon, D. McCamant, P. Kukura, R. Mathies, D. Zhang, and S. Lee, "Dependence of line shapes in femtosecond broadband stimulated Raman spectroscopy on pump-probe time delay," *J. Chem. Phys.* **122**(2), 024505 (2005).
37. E. Ploetz, B. Marx, and P. Gilch, "Disturbing interference pattern in femtosecond stimulated Raman microscopy," *J. Raman Spectros.* **in press** (2009).
38. B. Schrader, ed., *Infrared and Raman Spectroscopy* (VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1995).
39. B. Schrader and W. Meier, eds., *Raman/IR Atlas of Organic Compounds* (Verlag Chemie, Weinheim, 1975).

1. Introduction

Raman microscopy and micro-spectroscopy [1, 2, 3] find applications in, e.g. histology [4, 5], microbial typing [6, 7], and polymer science [8, 9, 10]. These research areas profit from the good correlation between spectral signatures of Raman scattering and chemical structures. Raman microscopy thus carries the potential for label-free identification and quantification of chemical entities on the micrometer length scale.

Conventional Raman microscopy rests on the spontaneous Raman effect. It suffers from low Raman cross sections and concomitantly small signal levels and/or long acquisition times [1]. This has motivated the introduction of non-linear techniques into Raman microscopy.

During the last decade the focus has hereby been laid on coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) [11, 12, 13, 14]. The CARS effect indeed increases signal levels tremendously [15] — yet, at certain expenses. Due to a non-resonant background CARS spectra are distorted in comparison to conventional Raman spectra [14, 16, 17]. The CARS spectrum of a sample containing several components is not the (weighted) sum of the individual CARS spectra. CARS signals scale quadratically with sample concentrations [15]. All three properties hamper the analysis of CARS data.

We have recently demonstrated the applicability of a different non-linear effect in Raman microscopy, namely femtosecond stimulated Raman scattering (FSRS) [18]. In FSRS which originates from time resolved spectroscopy [19, 20] two synchronized laser pulses are employed (Fig. 1). An intense and spectrally narrow pulse (center frequency ω_0) is referred to

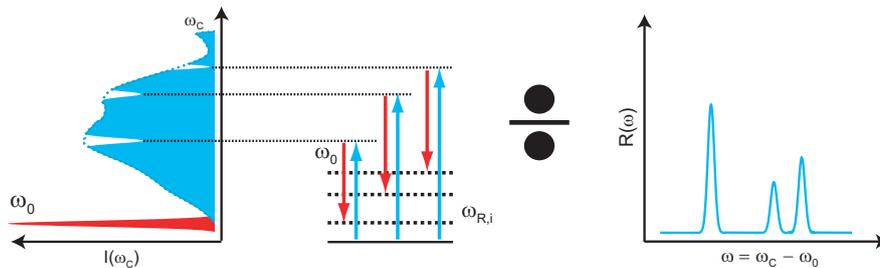


Fig. 1. Scheme of the FSRS effect. Two laser pulses, an intense spectrally narrow pulse (Raman pump, red, frequency ω_0) and a spectrally broad pulse (Raman probe, blue), interact with a Raman active medium. For frequency components $\omega_c > \omega_0$ (anti-Stokes side) satisfying the Raman condition stimulated Raman interactions lead to attenuations of the Raman probe spectrum. Referencing the modified probe spectrum to the original one affords the Raman spectrum of the medium.

as Raman pump. Its width $\Delta\omega_0$ limits the spectral resolution. A spectrally broad and less intense pulse serves as Raman probe (frequency components ω_c). Ideally, its spectral width $\Delta\omega_{pr}$ should exceed 3000 cm^{-1} , so that Raman resonances up to the largest frequency shifts can be detected. Raman pump and probe pulses overlap in space and time at the sample location. Due to stimulated Raman interactions the probe spectrum experiences modulations whenever the following condition is fulfilled: $|\omega_c - \omega_0| = \omega_{R,i}$. Hereby, $\omega_{R,i}$ denote the Raman resonances of the sample. On the anti-Stokes side ($\omega_c - \omega_0 > 0$) stimulated Raman interactions lead to a signal reduction of the probe light (stimulated Raman loss, SRL), whereas on the Stokes side ($\omega_c - \omega_0 < 0$) enhancements of the probe pulses (stimulated Raman gain, SRG) are observed. In the experiments described below the first condition applies. The Raman spectrum $R(\omega_c - \omega_0)$ is obtained from the modulated spectrum $I_{pr}^{RP}(\omega_c - \omega_0)$ — that is the spectrum in presence of

the Raman pump — by dividing it by the spectrum in absence of the pump $I_{pr}(\omega_c - \omega_0)$:

$$R(\omega_c - \omega_0) = 1 - \frac{I_{pr}^{RP}(\omega_c - \omega_0)}{I_{pr}(\omega_c - \omega_0)} \quad (1)$$

Provided that the polarization planes of pump and probe beams are parallel, the spectrum $R(\omega_c - \omega_0)$ is equivalent to the polarized Raman spectrum in conventional Raman spectroscopy [21]. The spectra obtained that way are undistorted in comparison to conventional ones, show additivity with respect to the contributions of individual components and scale linearly with the concentration.

In our first demonstration of femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM) [18] we have utilized a femtosecond laser amplifier system running at 1 kHz. Raman pump pulses were generated by spectrally narrowing the output pulses of the amplifier. Probe pulses were obtained by continuum generation in a sapphire plate. With this setup a simultaneous (multi-channel) detection of complete Raman spectra as a function of the position in the sample is possible. For a couple of reasons this proof of principle setup is not suited for “real world” applications in microscopy. Because of the low repetition rate of the amplifier (1 kHz) the energy of the Raman pump pulse needs to be of the order of 100 nJ. This translates into a peak intensity at the focal point of 10^{12} W/cm² which is deemed to be too high for bio-imaging [22]. Further, generating the Raman probe light via continuum generation is a substantial source of noise. The white light continuum has intensity variation of the order of 10^{-2} and its spectral shape shows fluctuations with time. Finally, laser amplifiers are complex and maintenance intensive instruments and are thus not very likely to enter microscopy labs.

Several groups have recently shown that stimulated Raman microscopy is feasible with pulsed lasers operating in the 100 MHz range [23, 24, 25, 26]. In these experiments two synchronized picosecond laser pulses interact with each other. Stimulated Raman processes transfer intensity between these two pulses. Thanks to lock-in detection schemes these setups are very sensitive (intensity changes down to 10^{-7} can be recorded [23]). Yet, recording of complete Raman spectra requires the tuning of one of the pulses over a wide range and this tuning of course increases the acquisition times.

Here, we describe a laser light source, specifically tailored for the application in femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM). In contrast to a related light source described in ref. [27], we apply fiber amplification of picosecond laser pulses in the three level regime of a core pumped single mode fiber for the first time. The ~ 10 x higher small signal gain coefficient at the three level transition around 975 nm enables the application of an extremely short length of amplification fiber [28], which dramatically reduces the effect of self phase modulation. This is the key to realize spectrally narrow pump pulses with low chirp at high efficiency and without external compression. Further, a careful characterisation of relative intensity noise, power, stability, wavelength and spectral shape is given. We demonstrate high speed Raman spectroscopy with full spectral coverage to show the suitability of the source for FSRM.

2. Description of the Setup

The light source relies on the large spectral band-width of sub-10-fs lasers. Because of this width the pulses emitted by such a laser can immediately serve as Raman probe pulses. No non-linear conversions are required. Raman pump pulses can be obtained by amplification of spectral components at the low or high frequency edge of the laser spectrum. In the actual setup (Fig. 2) pulses are supplied by a femtosecond laser (Fusion BB-300 from Femtolasers) emitting 8 fs pulses at a repetition rate of 75 MHz. This laser offers a good compromise between band-width and spectral smoothness (see Fig. 3). Lasers with even larger bandwidth often exhibit strong spectral modulations which renders them less suitable for spectroscopy. The average

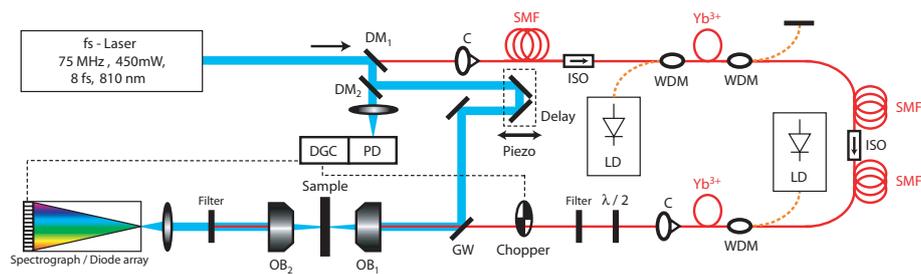


Fig. 2. Schematic of the FSRM setup. For description see text. Dichroitic mirror: $DM_{1,2}$, C: Collimator, SMF: single mode fiber, ISO: optical isolator, LD: pump laser diode, WDM: wavelength division multiplexer, Yb^{3+} : ytterbium-doped fiber, PD: photo diode, DGC: delay generator card, GW: glass wedge, OB: microscope objective.

power of the laser amounts to 450 mW which translates into a pulse energy of 6 nJ.

The pulse train emitted by the laser passes a dielectric turning mirror (Layertec, type 107581) which transmits a spectrally narrow region around 980 nm. The reflected light serves as Raman probe. It passes a delay stage with which the temporal overlap between Raman pump and probe pulses at the sample can be achieved. Excursions of the delay stage in the micrometer range can be induced by a piezo actuator (Piezomechanik GmbH, type Pst 150/5x5/20). The transmitted light is coupled into a fiber amplifier. In the amplifier the pulses first pass a fiber based isolator (OFR, type IO-F-980APC) which decreases the amplified stimulated emission (ASE) and protects the femtosecond laser. The pulses then arrive at a wavelength division multiplexer (WDM, Optolink, type WDM-T-12-917-90-FA) which allows to feed the laser seed and the pump light into the amplifier. A diode laser (Axcel Photonics, type BF-915-0200-P5A) operating at 915 nm pumps the amplifier. Its maximum output power amounts to 200 mW. A Yb^{3+} doped single mode fiber (Liekki, type YB1200-4/125) of 5.2 cm length is used for amplification. Since the transition around 980 nm of the Yb^{3+} ions on which we rely here is of three-level nature [29, 30, 31] the length of the fiber needs to be well chosen. Otherwise, amplified light will be attenuated by absorption. Via a second WDM the pre-amplified seed is sent to a second amplifier stage and pump light is rejected. The second amplifier is identical in design to first except for the out-coupling. To minimize self-phase modulation of the amplified pulses after the second amplifier stage these pulses are coupled out immediately after the second Yb^{3+} doped fiber. Residual pump light is rejected by a bandpass filter (Lot-Oriel, type CH-980-20-24.2U). Pulses leaving the amplifier (Raman pump in the following) are re-collimated (C collimator, Thorlabs, type CFC-11-B-APC) and are combined with the Raman probe pulses by a glass wedge. The wedge transmits most of the Raman pump light and reflects $\sim 0.5\%$ of the Raman probe power.

Transmitted Raman pump and reflected Raman probe light enter a microscope objective (Leitz, 20 \times , NA 0.4) which focuses the light beam onto the sample. After re-collimation by a second identical objective the Raman pump light is rejected by a set of filters (Layertec type, 107581, two Laser Components, type HR1035) and the remaining probe light is focused onto a spectrograph (Princeton Instruments, Acton SP2358). It is equipped with a 300 lines/mm grating blazed at 775 nm. With this grating the spectrograph features a linear dispersion of 10 nm/mm. The dispersed light is detected with a 512 element diode array (Hamamatsu, type S3901-512Q). The pixel pitch of 50 μm of the diode array limits the spectral resolution of detection system to 0.5 nm or $\sim 7\text{ cm}^{-1}$. The diode array is controlled by Tec5 electronics. The detection system is identical to the one described in ref. [18, 32] except that now an array with a larger fullwell capacity is used. The array is read-out at its maximal rate of 1 kHz. A

chopper placed in the Raman pump branch operates at 500 Hz. Thereby, alternately spectra with pump on and pump off are recorded. To trigger the chopper and the read-out electronics a small portion of the laser output is sent to a photo-diode (Thorlabs, type Det10A/M). The 75 MHz signal of this diode is then frequency divided to 1 kHz by a delay generator card (Bergmann Meßgeräte Entwicklung, type BME-SG05p).

3. Characterisation of the Light Source

The spectrum of the Raman probe pulse (Fig. 3(a)), i.e. the femtosecond laser pulse being reflected by the dielectric mirror (DM1 in Fig. 2), peaks at 12250 cm^{-1} and has a width of 2000 cm^{-1} (FWHM). Including the spectral wings this width suffices to address even the largest

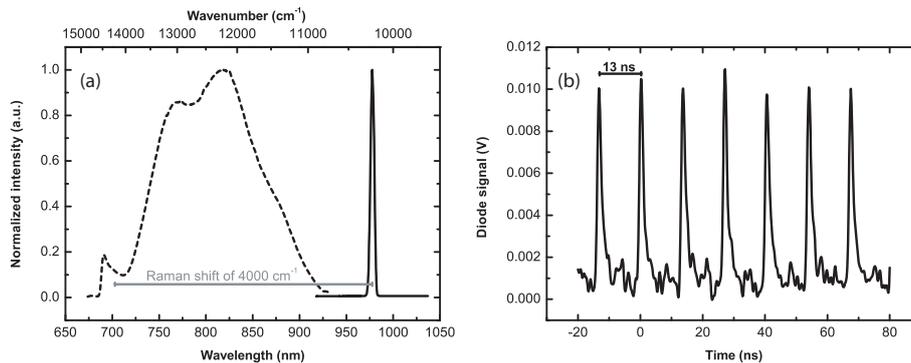


Fig. 3. (a) Spectra of Raman pump (solid) and probe pulses (dashed). Due to the spectral position of the Raman pump pulse and the width of the probe pulse Raman shifts of up to 4000 cm^{-1} can be covered. (b) Oscilloscope trace of the pump pulse train. Its repetition rate matches the one of the 8 fs laser. The offset of this trace is due to ASE.

Raman shifts of organic compounds of around 3500 cm^{-1} . This is possible provided that the Raman pump is located at the very edge of the laser spectrum — as for the Raman pump with a frequency ω_0 of 10230 cm^{-1} used in the present setup. The width $\Delta\omega_0$ of the Raman pump pulse equals to 49 cm^{-1} (FWHM). The average power of the light leaving the fiber amplifier amounts to 72 mW. To distinguish between the contribution of the pulses and the ASE to this power, the emission of the amplifier was analyzed using a fast photodiode (Thorlabs, type Det10A/M) and a digital oscilloscope. The recorded time trace (Fig. 3(b)) shows that the amplified pulses feature the repetition rate of the femtosecond laser. The oscilloscope trace shows in addition to the spikes of the pulses a small pedestal caused by ASE. The temporal integral over one pulse E_{pulse} in relation to the total integral E_{total} over one cycle yields a fraction of E_{pulse}/E_{total} of 0.74. This implies that the amplifier delivers 54 mW (or 0.7 nJ per pulse) of pulsed output. The power of the seed prior to amplification in the pertinent spectral range was $42\text{ }\mu\text{W}$. Thus, the pulses are amplified by 31 dB. The amplification retains the linear polarisation of the light.

The temporal properties of the Raman pump and probe pulses were characterised using an autocorrelator similar in design to one described in ref. [33]. The autocorrelation traces (Fig. 4) afforded durations — based on a Gaussian deconvolution — of 14 fs and 1.2 ps for probe and pump pulses, respectively. Since the pulses have passed 1.4 m of air when they are measured they are already stretched from the 8 fs specified by the manufacturer to 14 fs. The duration of the pump pulse is 4 times the duration of a bandwidth limited pulse. This chirp results from the group velocity dispersion (GVD) the pulses experience while propagating through the fiber. An estimate based on the Sellmeier coefficients of fused silica and the waveguide dispersion yields a GVD at 980 nm of $\sim 50\text{ ps}/(\text{nm km})$. The Raman pump pulse has a bandwidth of 5 nm and

propagates through 4 m of fiber. This results in a duration of ~ 1 ps as seen in the experiment.

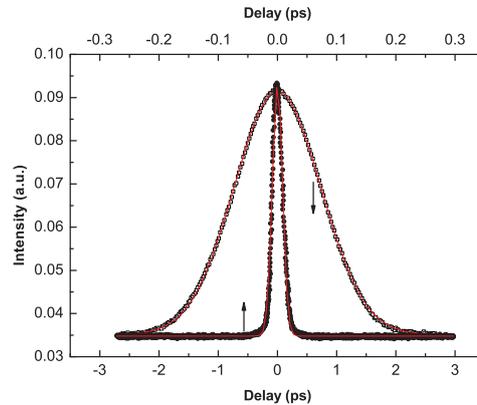


Fig. 4. Autocorrelation traces of Raman pump (open squares, lower axis applies) and probe pulses (solid circles, upper axis applies). The solid lines symbolise Gaussian fits. The deconvoluted duration of the probe pulse amounts to 14 fs, that of the pump to 1.2 ps.

4. Recording of Raman Spectra

Spectra recorded for neat benzonitrile and water demonstrate that with this laser light source Raman data can be obtained (Fig. 5 and 6). The liquids were held in 1 mm fused silica cuvettes placed between the two microscope objectives. We stress that the interaction length for the stimulated Raman process is not 1 mm but is given by twice the Rayleigh length of the objective. We estimate that length to be 10 μm . When Raman pump (energy of 0.7 nJ) and probe (0.03 nJ) are made to overlap in space and time at the focal point of the objectives, signal reductions on the Raman probe spectrum can be observed. Referring to Eq. (1), these reductions yield the (stimulated) Raman spectrum of the sample. The diode array detection employed here puts a lower limit to the acquisition time of a Raman spectrum of 2 ms. It requires 1 ms to record one pump on and one pump off spectrum. For this acquisition time resonances of benzonitrile at 1011, 1194, 1601, 2235, and 3083 cm^{-1} are discernible matching published data [39] (spectrum (a) in Fig. 5 represents the raw data, spectrum (b) is obtained by applying Savitzky-Golay smoothing [34]). The stimulated Raman effect amounts to 10^{-3} . The noise level as estimated from spectral regions free from Raman resonances is around 10^{-4} . The line width of the Raman resonances is ~ 40 cm^{-1} (FWHM). This is smaller than the spectral width of the Raman pump pulse (50 cm^{-1}). This is surprising at first sight since the width of the Raman pump should limit the spectral resolution [35]. Yet, the pump pulses employed here are chirped. The Raman probe light, therefore, does not interact with all spectral components of the pump light. This chirp is also responsible for the small spikes at the high frequency edge of the Raman resonance. Simulations (data not shown) based on a coupled wave description of FSRS [35, 36] reproduce this effect.

Spectra (a) and (b) in Fig. 5 exhibit spectral modulations at wavenumbers larger than 3000 cm^{-1} . These modulations are due to spectral interferences between the Raman probe pulse and the Raman pump pulse which has experienced non-linear frequency broadening at the sample location [37]. Eq. (4) in ref. [37] states the effect is most pronounced when the ratio between the intensity of the broadened pump pulse and that of the probe pulse is large. Since for Raman shifts larger than 3000 cm^{-1} the probe spectrum decreases substantially (see Fig. 3) the modulations are most pronounced here. This effect shows interferometric sensitivity and can

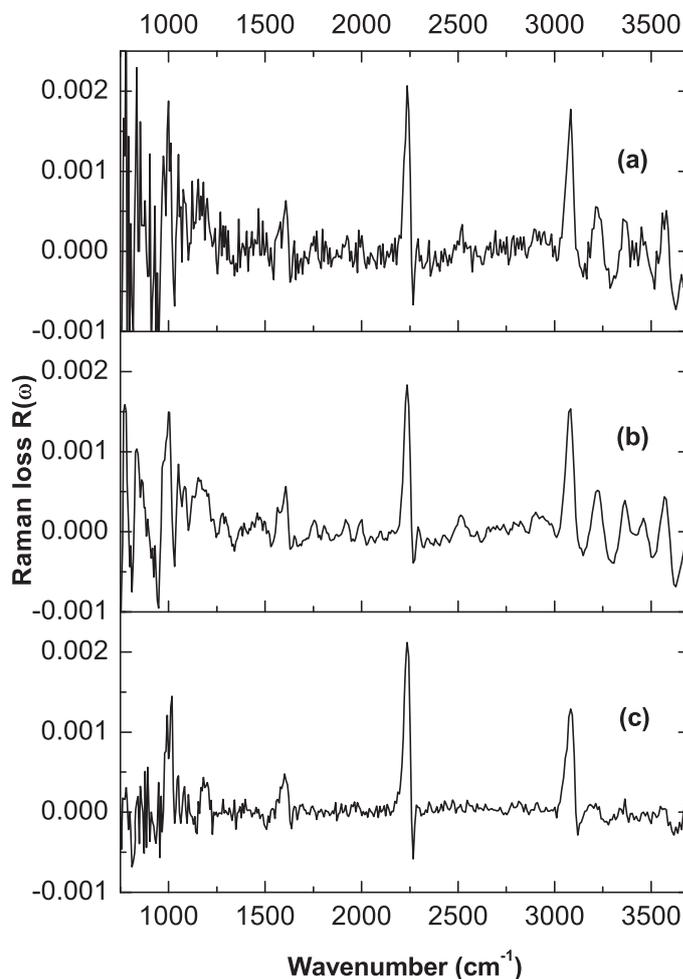


Fig. 5. (Stimulated) Raman spectra of benzonitrile recorded with the setup described in Fig. 2. For spectrum (a) the lowest possible acquisition time of 2 ms (1 ms pump on/off) was chosen. Spectrum (b) was obtained from (a) by applying Savitzky-Golay smoothing. For spectrum (c) the acquisition time was 10 ms, no smoothing was applied.

therefore be averaged out by changing the delay between pump and probe on the length scale of a wavelength [37]. A piezo actuator (see Fig. 2) periodically varies the delay between pump and probe at a frequency of 80 Hz. Obviously, for an acquisition time of 2 ms this frequency does not suffice to average the modulations out. For an acquisition time of 20 ms, however, these modulations are virtually gone.

Benzonitrile features a largest Raman shift of $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$. Higher shifts of up to $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ are observed for molecules containing OH or NH groups [38]. At least for organic molecules these may be considered as the largest Raman shifts. The spectrum obtained for water (Fig. 6) exhibits the well known broad OH stretching resonance peaking around 3300 cm^{-1}

[39]. This demonstrates that with the present setup Raman resonances up to 3500 cm^{-1} can be covered.

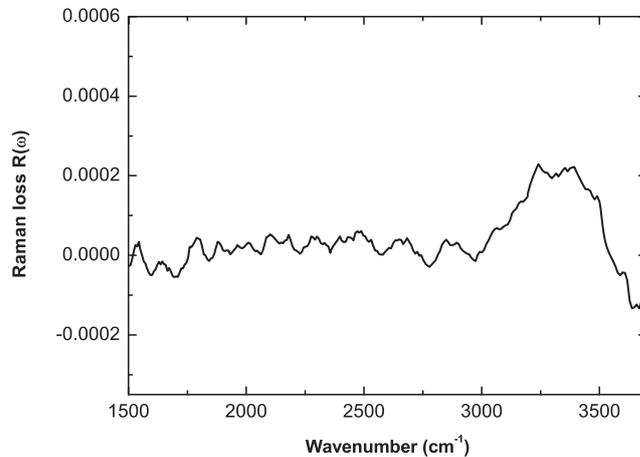


Fig. 6. (Simulated) Raman spectra of water. The acquisition time was 20 ms, Savitzky-Golay smoothing was applied. The spectrum shows that with the present light source even modes with the largest Raman shifts can be addressed.

5. Conclusions

These results clearly show that with the light source described here complete Raman spectra of substances in the focal point of a microscope can be recorded. By raster-scanning the sample as described in ref. [18] it will be possible to generate Raman images. Presently, the shortest pixel dwell time in this imaging process will be 2 ms. It is limited by the read-out rate of the detection system. This system was originally designed for a 1 kHz laser / amplifier light source. It remains to be seen whether with faster multi-channel detectors even shorter pixel dwell times are possible.

Our light source is also compatible with lock-in detection schemes described in ref. [23, 24, 25]. It only requires an exit slit in the spectrograph combined with a single channel detector and an acousto-optical modulator in the Raman pump branch.

Acknowledgements

Financial support of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (project Gi349/2-1) is gratefully acknowledged. E.P. thanks the Boehringer Ingelheim Fonds for a PhD fellowship. T.K. and R.H. acknowledge support from the Emmy Noether program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG - HU 1006/2-1) and the European Union project FUN OCT (FP7 HEALTH, contract no. 201880). We thank our bachelor student Mario Mangold for help in recording some of the data presented.

4 Spektrale Modulationen in der FSRM

When a problem has been solved in principle it is still far from having been solved specifically.

(Manfred Eigen - Nobel lecture, 1967)

Eine große Stärke der stimulierten Raman-Streuung ist ihre Fähigkeit, das Signalniveau gegenüber dem spontanen Streuprozess deutlich anzuheben. Es wird von 7 Größenordnungen [Kuk07] berichtet. Aufgrund der verstärkten Signale ist es möglich, FSRS-Spektren in wenigen Millisekunden aufzuzeichnen, wohingegen bei spontanen Spektren Belichtungszeiten im Sekundenbereich üblich sind [Sal09]. Das FSRS-Signal skaliert dabei weiterhin linear mit der Probenkonzentration und liefert gleichzeitig Spektren, die untergrundfrei [Owy78] und spektral identisch zu denen polarisierter, spontaner Raman-Signaturen [McC03] sind.

Stimulierte Raman-Streuung beruht auf der nichtlinearen Wechselwirkung zweier Laserfelder mit den Schwingungsfreiheitsgraden des Mediums. Wählt man als Raman-Abtastimpuls einen ultrakurzen, und somit spektral breitbandigen Laserimpuls so ist es möglich, nicht nur einzelne Raman-Resonanzen, sondern das komplette Spektrum gleichzeitig abzufragen. Abbildung 4.1 zeigt ein stimuliertes Raman-Spektrum von Benzotrinitril (schwarz). Die aus der Literatur bekannten Raman-Resonanzen [Sch75] bei 999, 1026, 1132, 1597, 2228 und 3068 cm^{-1} sind klar zu erkennen. Entgegen theoretischer Vorhersagen [Owy78, Plo07b, Fre08] wird in der FSRS-Mikroskopie jedoch einen nichtlinearen Störbeitrag in den aufgenommenen Raman-Spektren beobachtet, welche sich in Form einer oszillatorischen Änderung der Grundlinie bemerkbar macht. Ihr Einfluss auf das FSRS-Spektrum von Benzotrinitril ist in Abbildung 4.1 in blau dargestellt. Die Signalamplitude des Effekts ist von vergleichbarer Größe zum detektierten FSRS-Signal und trägt über einen breiten Spektralbereich gleichermaßen bei. Eine Verfälschung der Raman-Signaturen ist die Folge: In Abhängigkeit der jeweiligen Phase der Oszillation, führen die Modulationen zu einer Unterdrückung oder Überhöhung der Raman-Banden. Diese hat bei der hyperspektralen Datenauswertung eine Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses¹ der FSRM-Aufnahmen zur Folge. Die spektrale Signaländerung ist durch rote Pfeile an den zugehörigen Raman-Resonanzen (grau-gestrichelte Linien) angedeutet.

Ein Auftreten dieses nichtlinearen Störbeitrags wurde zuvor in zeitaufgelösten FSRS-Experimenten beobachtet [Kuk03, Jin04] und als Beitrag einer Kreuzphasenmodulation (XPM) zwischen dem Raman-Pumpimpuls und -Abtastimpuls im Medium interpretiert. Diese Erklärung lässt sich jedoch nicht mit den in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnissen in Einklang bringen.

¹ Bei einer univariaten Auswertung beispielsweise, kann *a priori* nicht zwischen purem Raman-Signal und der Modulationsamplitude unterschieden werden.

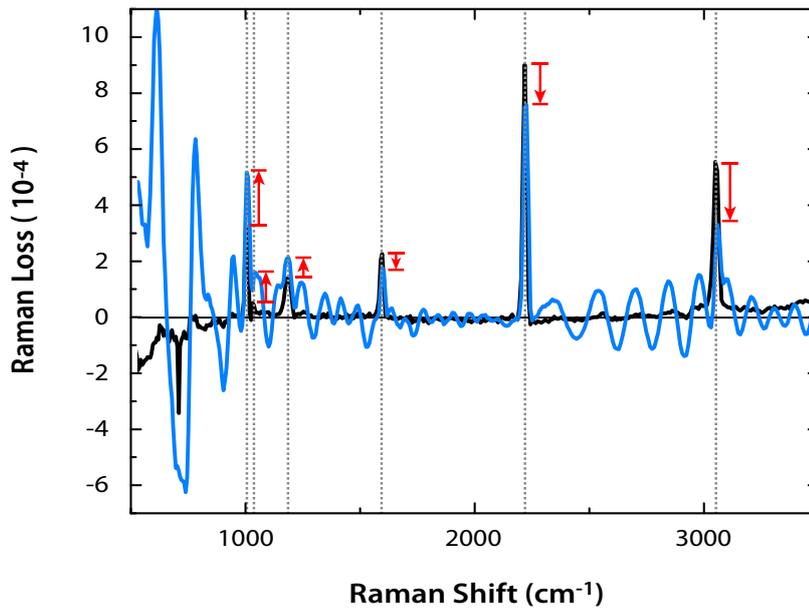


Abbildung 4.1: Spektrale Modulationen im FSR-Spektrum von Benzonitril. Das FSR-Spektrum von Benzonitril ist in schwarz dargestellt. Zusätzlich zu den aus der Literatur bekannten Raman-Resonanzen (durch gestrichelte Linien gekennzeichnet) ist eine markante Oszillation der Grundlinie (blau) von vergleichbarer Höhe zu beobachten. Der Effekt verringert das Signal/Rausch-Verhältnis und führt zu verfälschten Signalstärken der einzelnen Raman-Resonanzen. Ihre Abnahme sowie Zunahme sind durch rote Pfeile dargestellt. In beiden Spektren ist über $7.5 \cdot 10^8$ Laserschüsse gemittelt worden. Die Impulsenergie des Raman-Pumpimpulses beträgt 660 pJ, die des Raman-Abtastimpulses 21.3 pJ.

gen. Im Fall einer XPM würde der intensive Raman-Pumpimpuls im vermittelnden Medium eine zeitabhängige Änderung des Brechungsindex induzieren. Bei zeitlichem Überlapp der Impulse führt diese Änderung zu einer spektralen Verschiebung des Weißlichtimpulses. Dessen Frequenzkomponenten werden dabei so durchmischert, dass Komponenten mit Frequenz ω_0 , die zeitgleich mit dem Intensitätsmaximum des Raman-Pumpimpuls die Probe durchwandern, symmetrisch zu größeren und kleineren Werten verschoben werden. Dies hätte eine Abnahme des Weißlichtimpulses an der Frequenz ω_0 sowie eine zusätzliche Erzeugung von Frequenzkomponenten bei $\omega_0 \pm \Delta\omega$ zur Folge. Die maximale XPM-Verschiebung $\Delta\omega$ kann für zwei linear polarisierte Laserimpulse mit einer homogenen Gauß'schen Intensitätsverteilung und der Intensität I_P des Raman-Pumpimpulses nach folgender Gleichung [Rul05, Vog02] abgeschätzt werden

$$\Delta\omega = \omega_0 \cdot \frac{2 \cdot n_2 \cdot L}{c_0} \cdot \frac{\partial I_P(t)}{\partial t} \quad (4.1)$$

L beschreibt die Wechselwirkungslänge der Laserimpulse im Medium mit nichtlinearem Brechungsindex n_2 und c_0 die Lichtgeschwindigkeit. Das spektrale Erscheinungsbild der XPM hängt dabei stark vom Chirp des Weißlichtimpulses ab [Lor02]. Je größer hierbei der zeitliche Versatz zwischen den Spektralkomponenten des Weißlichtimpulses ist, desto stärker

und spektral lokalisierter ist der Signalbeitrag der Kreuzphasenmodulation [Lor02]. Die in der FSRM beobachtete Modulation der Grundlinie zeigt dieses Verhalten hingegen nicht. Die Oszillation tritt gleichmäßig über einen kompletten Spektralbereich von mehr als 250 nm auf. Mit zunehmendem Chirp des Weißlichtimpulses nimmt die Oszillationsfrequenz der Modulation zwar zu (siehe Abschnitt 4.2), die Amplitude sowie der Spektralbereich werden davon jedoch kaum beeinflusst. Eine Erklärung für die Abhängigkeit der Signalamplitude der Modulation von der Weißlichtintensität kann XPM zudem nicht liefern (vergleiche Abschnitt 4.2).

Der in Abbildung 4.1 dargestellte Effekt wird nicht nur in Flüssigkeiten, sondern auch in amorphen und kristallinen Festkörper beobachtet, d.h. in *jeder* untersuchten Probe, und behindert den Einsatz der FSRM zur quantitativen, chemischen Bildgebung. Der Effekt wurde daher eingehend studiert. Die Ergebnisse sind Gegenstand dieses Kapitels.

Die in Abschnitt 4.1 abgedruckte Publikation „*Disturbing interference patterns in femtosecond stimulated Raman microscopy*“ charakterisiert den nichtlinearen Störbeitrag zunächst experimentell und stellt Möglichkeiten vor, diesen zu unterdrücken. Die Messungen hierfür wurden auf der kHz-Anlage [Plo07b] durchgeführt. Es stellt sich heraus, dass der Effekt nur bei zeitlichem und örtlichem Überlapp zwischen Raman-Pumpimpuls und -Abtastimpuls beobachtet werden kann. Des Weiteren reagiert die Amplitude der Modulation äußerst empfindlich auf eine Dejustage der eingekoppelten Laserimpulse und stellt sich zudem als interferometrisch sensitiv auf Verzögerungen zwischen dem Raman-Pumpimpuls und -Abtastimpuls heraus. Der Effekt kann somit als eine spektrale Interferenz zwischen dem Raman-Abtastimpuls und einem zusätzlich erzeugten, elektrischen Feld identifiziert werden. Dieses wird vom Raman-Abtastimpuls heterodyn verstärkt und führt zu einer spektralen Interferenz auf dem Detektor. Als Erzeugungsprozess wird eine einsetzende Kontinuumserzeugung (SCG) des Raman-Pumpimpulses vermutet. Dies wird zum einen auf die direkte Skalierung der Signalhöhe mit der Intensität des Raman-Pumpimpulses zurückgeführt, zum anderen auf die Tatsache, dass sich die Impulsenergien des Raman-Pumpimpuls an der Schwelle zur einsetzender Selbstfokussierung befinden. Letztere wird als Vorstufe zur Weißlichterzeugung angesehen [Cou07].

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die spektrale Interferenz auch auf der in Kapitel 3 beschriebenen Anlage beobachtet wird. Dem Aufbau liegt ein Laseroszillator zugrunde, der Impulse mit 2 Größenordnungen geringeren Energien zur Verfügung stellt. Eine durch den Raman-Pumpimpuls verursachte, einsetzende Weißlichterzeugung muss daher als Hauptbeitrag des Signals ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Amplitude der Modulation ebenfalls mit der Intensität des eingestrahlen Raman-Abtastimpuls skaliert. Dieser Befund kann mit dem Modell eines spektral verbreiterten Raman-Pumpimpulses ebenfalls nicht in Einklang gebracht werden. Die in Abschnitt 4.2 abgedruckte Publikation „*Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy*“ stellt daher ein überarbeitetes Modell zum physikalischen Ursprung der spektralen Interferenz vor. Als Mechanismus kann ein Vier-Wellen-Mischen (FWM) zwischen den Frequenzkomponenten des Raman-Abtastimpulses sowie Raman-Pumpimpuls identifiziert werden. Das zusätzlich erzeugte FWM-Feld weist einen breiten Überlapp mit dem Spektralbereich des Weißlichtimpulses auf. Eine Simulation der gemessenen Interferenzen zeigt eine große Übereinstimmung

zwischen Experiment und Theorie. Sowohl die in Abschnitt 4.1 zusammengefassten Eigenschaften, als auch die Abhängigkeiten der Modulationsamplitude von den Intensitäten der eingehenden Laserfelder sowie des nichtlinearen Brechungsindex n_2 des Mediums werden vom Modell berücksichtigt und können experimentell bestätigt werden.

4.1 Charakterisierung und Unterdrückung spektraler Interferenzen

In der FSRM kommen ein schwacher, spektral breiter Femtosekunden-Laserimpuls sowie ein intensiver Pikosekundenimpuls zum Einsatz, um Raman-Spektren der Probe am Fokus eines rasternden Mikroskops aufzuzeichnen. Neben den gewünschten Raman-Signaturen sind zudem spektrale Modulationen von vergleichbarer Signalstärke zu beobachten. Der folgende Abdruck des Artikels²

Evelyn Ploetz, Benjamin Marx, Peter Gilch: „*Disturbing interference patterns in femtosecond stimulated Raman microscopy*“, *J. Raman Spectrosc.* **41** (2010) 609-613, DOI: 10.1002/jrs.2488.

fasst die Eigenschaften der spektralen Modulationen zusammen und stellt Methoden vor, um deren Störbeiträge zu unterdrücken. Die der Veröffentlichung zugrundeliegenden Messungen wurden mit dem kHz-FSRM-Aufbau [Plo07b] aufgenommen, auf dem die Impulsenergien des Raman-Pumpimpulses nur zwischen 1–200 nJ variiert werden konnten. Da die Impulsenergien die Schwelle zur Weißlichterzeugung erreichen, werden als Ursache der spektralen Modulationen eine Interferenz des Raman-Abtastimpuls mit einem spektral verbreiterten Raman-Pumpimpuls angenommen.

² Reprinted from *J. Raman Spectrosc.* 41(6): E. Ploetz, B. Marx, and P. Gilch: *Disturbing interference patterns in femtosecond stimulated Raman microscopy*, p. 609-613, ©2010, with permission from John Wiley & Sons, Ltd.

Disturbing interference patterns in femtosecond stimulated Raman microscopy

E. Ploetz,^a B. Marx^a and P. Gilch^{a,b*}

Femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM) is an upcoming technique in nonlinear microscopy which facilitates rapid chemical mapping. It employs femtosecond white-light pulses as probe pulses and intense picosecond pulses as pump pulses. Stimulated Raman scattering (SRS) occurs at the focus of a scanning microscope. Chemical constituents in the sample are identified via their Raman signatures. In this article, disturbing interference patterns in FSRM are reported. They are caused by a broadening of the pump pulse due to nonlinear interactions in the focal region of the microscope and reduce the signal-to-noise ratio. The properties of these modulations are explored, and the methods to suppress them are presented. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Raman microscopy; stimulated Raman scattering; femtosecond laser pulse; spectral modulations; white-light generation

Introduction

Raman microscopy combines the spatial resolution of optical microscopy with the chemical sensitivity of vibrational spectroscopy.^[1] It can yield chemical maps of microscopic objects without resorting to molecular labels.^[1] Conventional Raman microscopy relies on spontaneous Raman scattering. It thus suffers from low cross sections and concomitant low signal levels leading to long acquisition times.^[2] During the last decade, huge efforts have been made to increase the signal levels by means of nonlinear Raman techniques.^[3–11] Focus has thereby been laid on coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS).^[3–5] With CARS, the signal level of Raman microscopy is increased and it nowadays enables video-rate acquisition of Raman images.^[12] Unfortunately, CARS spectra are often severely distorted in comparison with conventional Raman spectra because of a nonresonant background. This distortion hinders the interpretation of the CARS images. Different approaches have been suggested to suppress or reduce this background.^[5,13–15] In spectra based on a different nonlinear Raman process – stimulated Raman scattering (SRS) – this type of background is absent and the spectra match the conventional ones.^[16] This property has led to efforts to utilize SRS in microscopy.^[7–9,11] It has been shown that SRS is superior to CARS in terms of spectral shapes and that the two techniques feature the same signal-to-noise level.^[9]

Present approaches used in SRS microscopy can be divided into two groups: (1) Setups using high repetition femtosecond lasers (~100 MHz) in combination with 'single frequency' lock-in detection;^[8,9,11] (2) Instruments relying on femtosecond laser amplifiers (repetition rate on the order of 1 kHz) and broad-band detection.^[7] For the second approach we have coined the phrase 'Femtosecond stimulated Raman microscopy' (FSRM).^[7]

In this setup, a portion of the output of a laser/amplifier system is fed into two branches (Fig. 1). In one branch, the output pulse is spectrally narrowed to ~15 cm⁻¹. This pulse of frequency ω_0 is referred to as Raman pump. In the second branch, a femtosecond white-light continuum is generated, e.g. in a sapphire plate. The white light (frequency components ω_c) constitutes the Raman

probe. Both pulses are guided into a scanning microscope. The pulses overlap in space and time at the focal point of this microscope. Stimulated Raman interactions caused by the characteristic eigen modes of the sample affect the intensity of the Raman probe spectrum $I_{pr}(\omega_c)$. The spectral position of the effects are given by $|\omega_c - \omega_0| = \omega_{R,i}$. Here, $\omega_{R,i}$ are the Raman resonances of the sample. The effects are positive (Raman gain) for $\omega_c < \omega_0$ and negative (Raman loss) for $\omega_c > \omega_0$. In the present experiments, the Raman loss signal, $\omega_c > \omega_0$, was recorded. By taking the ratio between the Raman probe spectra in absence $I_{pr}(\omega_c - \omega_0)$ and presence $I_{pr}^{RP}(\omega_c - \omega_0)$ of the Raman pump pulse,

$$R(\omega_c - \omega_0) = -\frac{I_{pr}^{RP}(\omega_c - \omega_0)}{I_{pr}(\omega_c - \omega_0)} + 1 \quad (1)$$

one obtains a stimulated Raman spectrum which is equivalent to a (polarized) spontaneous one. In Figs 2–4, 6, and 7, we refer to the FSRM signal as *Ramanloss* or *Ratio*, depending on whether the medium features a Raman activity or not.

While recording Raman images with FSRM, we have noticed spectral modulations of the Raman probe spectrum on top of the stimulated Raman signature. This effect has also been reported in time-resolved FSRM spectroscopy^[17,18] and was explained as a cross-phase modulation (XPM) artifact. We describe here the properties of these modulations and suggest an origin other than XPM. Based on our findings, techniques to suppress the modulations will be presented.

* Correspondence to: P. Gilch, Lehrstuhl für BioMolekulare Optik and Center of Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oettingenstr. 67, D-80538 München, Germany. E-mail: peter.gilch@physik.lmu.de

a Lehrstuhl für BioMolekulare Optik and Center of Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oettingenstr. 67, D-80538 München, Germany

b Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

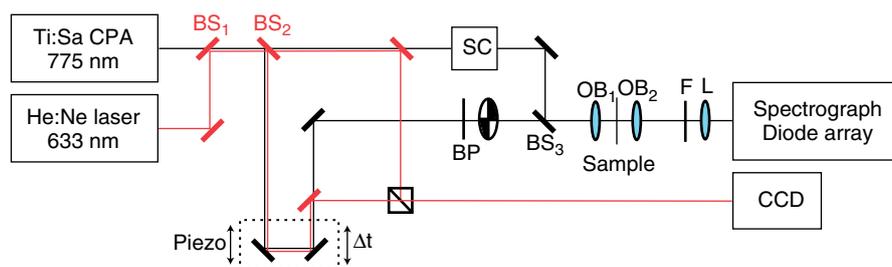


Figure 1. Schematic of the FSRM setup. SC, supercontinuum generation; BP, bandpass filter; F, notch filter, OB₁, Cassegrainian microscope objective; OB₂, refractive microscope objective. The He-Ne laser is coupled in an interferometer used to calibrate the piezo stage.

Experimental

Figure 1 shows our present implementation of FSRM, described in detail in Ref. [7]. Femtosecond pulses (775 nm) with an energy of 20 μJ delivered by a 1 kHz Ti:Sapphire amplifier are coupled into the setup. The pulse energy is distributed equally over two branches. In the Raman Pump branch, the pulses are spectrally narrowed to 15 cm^{-1} by a bandpass filter (Andover Corp., ANDV10 565, 776 nm) corresponding to a pulse duration of ~ 1 ps. The Raman pump pulse passes a chopper wheel (New Focus, 3501 Optical Chopper) blocking every second pulse. An optical delay line adjusts the temporal overlap of the two pulses in the microscope. The energy of the Raman pump pulse coupled into the microscope is ~ 100 nJ. In the Raman probe branch, a supercontinuum is generated in a 7-mm sapphire crystal. After collimation by a spherical mirror (focal length of 75 mm), the Raman probe and Raman pump pulses are combined by a dielectric mirror (0.3 mm, HR 635) reflecting the Raman probe light in the spectral range of 580 to 730 nm. The energy of the white-light pulse focused on the sample by a reflecting objective (Ealing, 36 \times , NA 0.5) is ~ 2 nJ and its pulse duration is about 250 fs. The white light which has passed the sample is recollimated by a refractive microscope objective (Leitz, 20 \times , NA 0.4) and detected via a spectrograph (Princeton Instruments, Acton SP2300 equipped with 300 and 600 grooves/mm gratings) and a 512-element diode array (Hamamatsu S3902-512Q) readout at 1 kHz.^[19] The Raman pump light is rejected by a notch filter (Kaiser Optical Systems, HNPF-810-1.0) placed in front of the spectrograph. To characterize the interference patterns, an additional piezo translation stage (PiezoJena, PX 100 SG) controlled by a voltage amplifier system (PiezoJena, ENV 40 SG, RS 232) has been inserted into the delay stage. The resolution of the piezo is about 0.8 nm with a repeatability of 29 nm. To ensure the accuracy of the piezo translation stage by interferometry,^[20] an additional He:Ne cw laser (Laser 2000, LHRP-0201, 633 nm, 2 mW) has been inserted. Its laser light follows the paths of the Raman pump and probe pulses. The interference pattern and therefore the path difference is detected via a charge-coupled device (CCD) camera (Teli, CS8620HCi).

Results and Discussion

The modulations mentioned in the introduction can, for instance, be observed when recording a stimulated Raman spectrum of neat cyclohexane (Fig. 2). The spectrum features the well-known Raman resonances of cyclohexane^[21] at 803, 1029, 1267, 1446, and around 2900 cm^{-1} . In addition, modulations comparable in magnitude to the weaker Raman bands are observed, which obstruct their

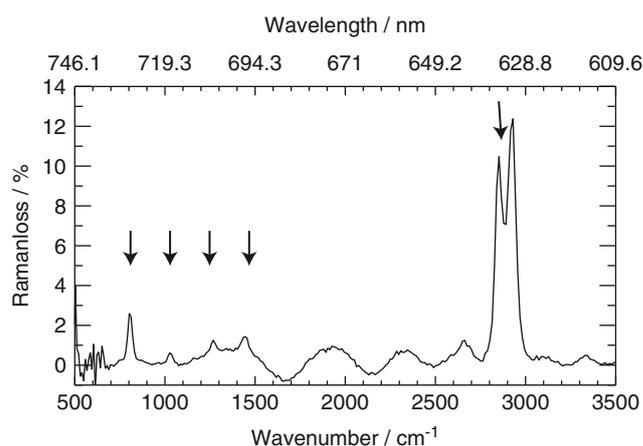


Figure 2. FSRM spectrum of neat cyclohexane averaged over 500 Raman pump pulses. The energy of the Raman pump pulse E_{RP} is ~ 50 nJ. Arrows mark the Raman resonances.

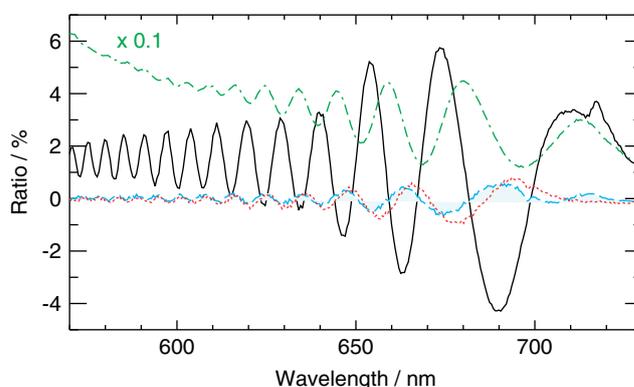


Figure 3. Interference patterns recorded for different materials (averaged over 500 Raman pump pulses, $E_{\text{RP}} = 92$ nJ). Spectra of fused silica (dotted), BK7 glass (dashed), SF5 glass (solid), and SrTiO₃ (dashed-dotted) are shown.

detection. Some important properties of these modulations are the following: They require temporal overlap of the Raman pump and probe pulse. They are more sensitive towards de-adjustments than the Raman signal, i.e. a small angular misalignment of pump and probe beams coupled into the microscope reduces the modulations to a larger extent than the Raman signals. For the modulations to occur, no Raman resonances in the same spectral range are required. Different materials with no high-frequency Raman modes also generate these modulations (Fig. 3). Their magnitudes scale with the nonlinear refractive index n_2 , i.e. for a

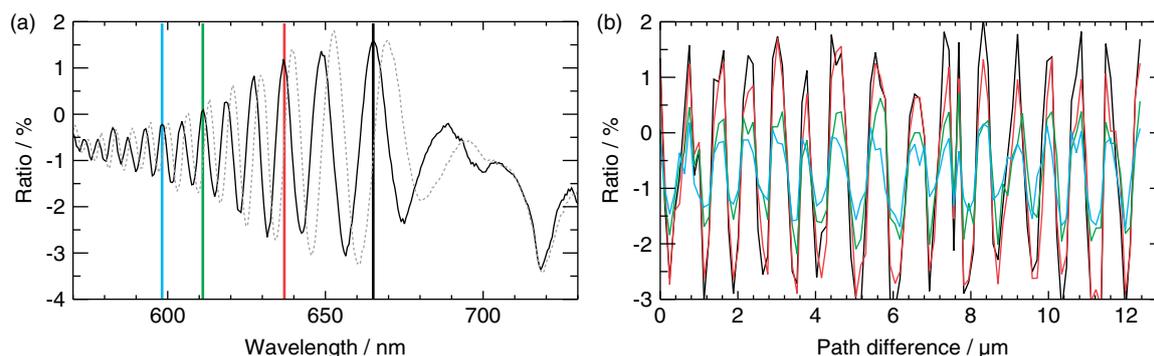


Figure 4. Interference pattern of SF5 as a function of the relative delay of pump and probe pulse. (a) Signal at delay τ_0 (black) and delay $\tau = 126$ nm (gray). The interference patterns are shifting spectrally. (b) Signal as a function of the delay for fixed wavelengths shown at 665 nm (black), 638 nm (red), 612 nm (green), and 598 nm (blue). The periodicity is identical for all wavelengths.

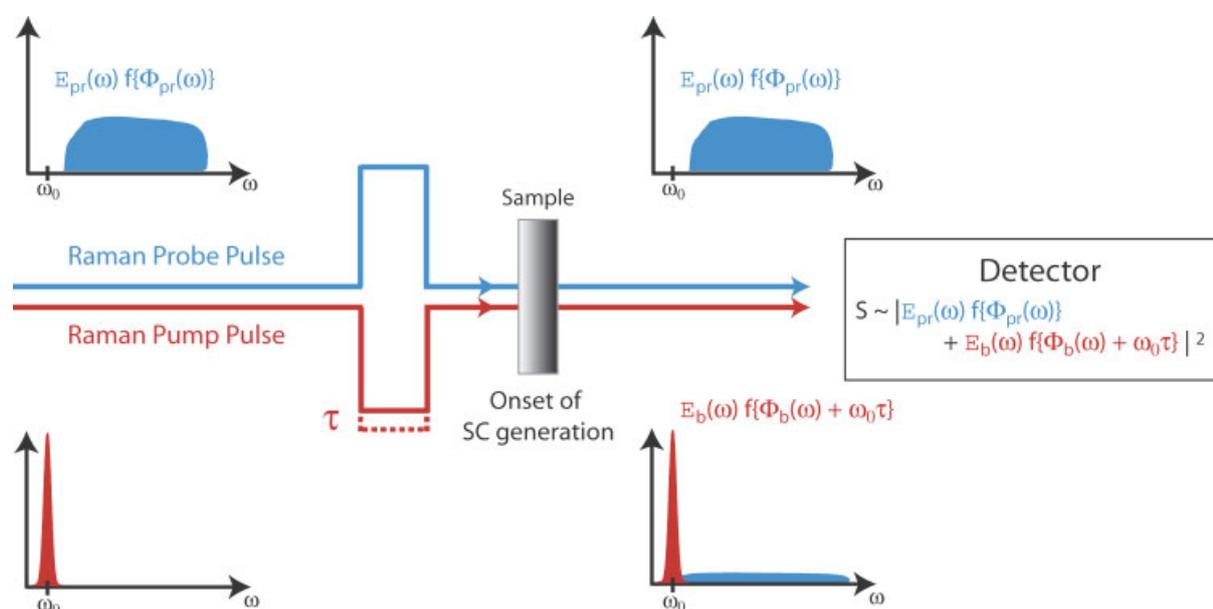


Figure 5. Scheme illustrating the interference effect. A supercontinuum probe pulse and an intense, spectrally narrow pump pulse are coupled into the microscope. Both light fields are spectrally well separated. By nonlinear interaction with the sample, the Raman Pump pulse experiences a spectral broadening enabling both pulses to interfere. By varying the delay τ between Raman pump and Raman probe pulse, the modulation patterns are shifting spectrally. The added phase shift $\omega_0\tau$ is constant and affects all frequencies equally.

constant energy of the Raman pump, the signals increase in the following way: (the index n_2 in multiples of $(10^{-20} \text{ m}^2/\text{W})$ is given in brackets): fused silica (3.67),^[22] BK7 (3.4),^[22] SF5 (12), and SrTiO₃ (20).^[23] The value for SF5 has been computed using Eqn (5) in Ref. [24] and Eqn (2) in Ref. [25]. The pertinent input parameters were taken from datasheets published by Schott AG.^[26]

The modulations turned out to be interferometrically sensitive. They vanish if mechanical vibrations are introduced into the setup, e.g. by knocking on the laser table, while averaging over some spectra (10–100 were sufficient). A more quantitative assessment of this interferometric property is obtained when the delay time τ between pump and probe pulses is changed by introducing a path difference $\Delta x = c\tau$ with sub-wavelength step size (Fig. 4). c denotes the speed of light. Scanning the delay on this length scale results in phase changes of the modulations – the maxima gradually turn into minima and vice versa (Fig. 4(a)). Note that the periodicity of these phase changes is identical for all detection wavelengths (Fig. 4(b)). It amounts to 800 nm, which is very close to the wavelength λ_0 of the Raman pump light 775 nm.

These findings clearly indicate that the modulations are caused by spectral interferences similar to the ones used in spectral phase interferometry for direct electric field reconstruction (SPIDER)^[27,28] to characterize ultrashort laser pulses. Yet, for spectral interferences to occur, both light fields involved need to contain frequency components at the spectral location where they are observed. *Prior* to passing through the sample, the Raman pump pulse contains no frequency components in the detection window (Fig. 5). Obviously, the Raman pump pulse experiences a spectral broadening in the sample (further discussed below). Due to this broadening, spectral interference between the electric field of the Raman probe $E_{pr}(\omega)$ and that of the broadened Raman pump $E_b(\omega)$ becomes possible. The detected signal intensity $I(\omega)_{pr}^{RP}$ is given by

$$I_{pr}^{RP}(\omega) \propto |\mathcal{E}_{pr}(\omega) e^{-i\Phi_{pr}(\omega)} + \mathcal{E}_b(\omega) e^{-i(\Phi_b(\omega) + \omega_0\tau)}|^2$$

$$\propto I_{pr}(\omega) + I_b(\omega) + 2\sqrt{I_{pr}(\omega)I_b(\omega)} \cos(\Phi(\omega) + \omega_0\tau) \quad (2)$$

with frequency ω , the spectral envelopes $\mathcal{E}_{pr,b}$, the delay time τ between both fields, and the spectral phases $\Phi_{pr,b}(\omega)$. The

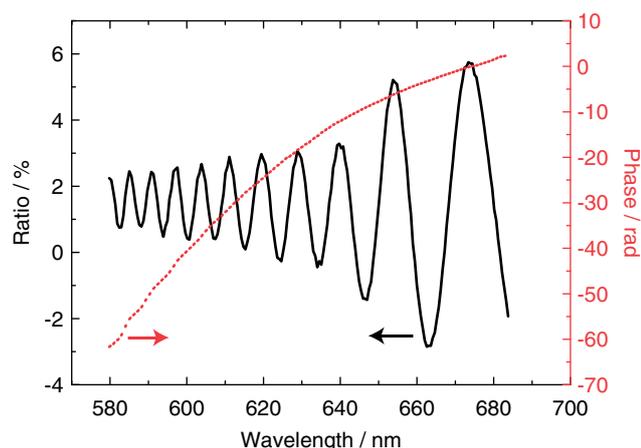


Figure 6. Interference pattern of SF5 glass (averaged over 500 Raman pump pulses, $E_{RP} = 92$ nJ, solid line) and phase difference Φ retrieved from this pattern (dotted line).

phase difference $\Phi(\omega)$ is given by $\Phi(\omega) = \Phi_{pr}(\omega) - \Phi_b(\omega)$. When referencing to the spectrum of the Raman probe $I_{pr}(\omega)$ in absence of the pump according to Eqn (1), one obtains

$$R(\omega) = -\frac{I_{pr}^{RP}(\omega)}{I_{pr}(\omega)} + 1 = -\frac{I_b(\omega)}{I_{pr}(\omega)} - 2\sqrt{\frac{I_b(\omega)}{I_{pr}(\omega)}} \cos(\Phi(\omega) + \omega_o\tau) \quad (3)$$

Since the broadened Raman pump spectrum $I_b(\omega)$ is much weaker than the Raman probe spectrum, the expression can be simplified to

$$R(\omega) \approx -2\sqrt{\frac{I_b(\omega)}{I_{pr}(\omega)}} \cos(\Phi(\omega) + \omega_o\tau) \quad (4)$$

According to this expression, the spectrum of the broadened Raman pump pulse experiences a heterodyne detection. The envelope of the modulation thus depends on the spectrum $I_b(\omega)$. Its magnitude can be estimated to be 4–5 orders smaller than the Raman probe spectrum (Fig. 2.), so it cannot be detected directly in the present FSRM setup. The phase of the modulation is given by the phase difference between the fields $E_{pr}(\omega)$ and $E_b(\omega)$, namely $\Phi(\omega)$. It can be evaluated by fast Fourier transform (FFT) techniques as in a SPIDER apparatus.^[28] A second-order term dominates the phase in the recorded spectra (Fig. 6). This term

corresponds to a group delay dispersion (GDD) of 350 fs^2 . After its generation close to the back (in beam direction) of the sapphire plate, the Raman probe light transverses ~ 2 mm of sapphire material. A computation based on its dispersion properties^[29] shows that the pulse thereby gathers $\sim 200 \text{ fs}^2$ of GDD, matching the experimental magnitude. If the reflective microscope objective is replaced by the refractive one, the Raman probe pulse gains additional GDD while transversing the microscope. Thereby, the resulting modulations become closer spaced on the frequency axis (data not shown). Changing the delay time τ results in an additional phase shift given by $\omega_o\tau = 2\pi \frac{c}{\lambda_o} \tau$ (Eqn (4)). Since the phase is added to the pump pulse prior broadening, the delay affects the modulations detected at different frequencies with the same periodicity. This is exactly what is observed experimentally (Fig. 4(b)).

As to the origin of the spectral broadening, it is necessarily caused by a nonlinearity of the sample. The magnitude of the modulation increases with the nonlinear refractive index n_2 of the medium. However, the broadening due to self phase modulation (SPM) is too weak to explain the effect. The contribution of SPM can be estimated from

$$\Delta\omega(t) = -\omega_o n_2 L / 2c \frac{dl(t)}{dt} \quad (5)$$

where L denotes the interaction length and $l(t)$ the intensity of the propagating light field.^[30] Inserting the typical parameters (focal area $A \sim 10 \mu\text{m}^2$, pulse duration $t_p = 1$ ps, pulse energy $E = 100$ nJ, $L = 10 \mu\text{m}$, $n_2 = 3 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2/\text{W}$ (value for fused silica)) SPM would lead to a broadening of $\sim 10^{-6} \cdot \omega_o$, which is much too small. It is well known that white-light generation results in broadening much larger than predicted by Eqn (5).^[31] Yet, 'genuine' white-light generation can be observed with the naked eye, which is not the case here. Further, the input peak power employed here is an order of magnitude below the threshold for self-focusing collapse in the medium starting white-light generation.^[31–33] Presumably, what is observed here is the 'onset' of white-light generation. This onset of white-light generation can interfere with the genuine white light generated in the Raman probe branch. Stable phase relations required for these interferences have also been observed for two genuine (amplified) white-light continua.^[34–36]

Their interferometric origin paves the way to suppress the modulations. Periodically changing of the delay time τ with a wobbler averages the modulations out (Fig. 7a). The modulations are also absent when Raman pump and probe pulses propagate in

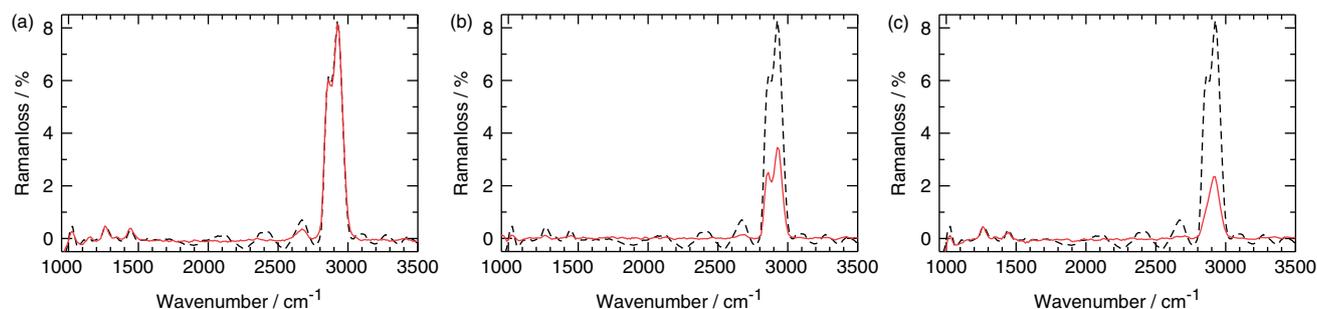


Figure 7. FSRM spectrum of neat cyclohexane averaged over 1000 Raman pump pulses. The energy of the Raman pump pulse was $E_{RP} \sim 50$ nJ. (a) Spectra with (solid)/without (dotted) the wobbler. The driving frequency of the wobbler was $f_0 = 107.64$ Hz. (b) Spectra for co-propagating (dotted)/counter-propagating (solid) Raman pump and Raman probe pulses. The Raman signal is reduced because of a smaller interaction length in the sample. (c) Spectra for parallel (dotted) and perpendicular (solid) relative polarization of Raman pump and Raman probe pulses.

opposite direction through the scanning microscope (Fig. 7b). The Raman pump pulse is focused onto the sample by the second objective OB₂, while the supercontinuum pulse follows the scheme described in Fig. 1. Since the effective interaction length is reduced in the backward scattering process,^[37] the Raman signal is diminished by a factor of ~2. Another possibility to reduce the interferences between both light fields is to polarize the Raman probe pulse perpendicular to the pump pulse (Fig. 7c). In conventional Raman spectroscopy, intensity depends on the relative orientation of the polarization plane of the excitation light and the transmission axis of an analyser in front of the detector.^[38] In stimulated Raman spectroscopy it depends on the relative orientation of the polarization plane of the Raman pump and the probe light.^[39] In either case, the dependencies can be described by depolarization ratios ρ . The symmetric CH stretching vibration of cyclohexane at 2900 cm⁻¹ and also the ring mode at 803 cm⁻¹ feature small values of ρ .^[21] They are concomitantly strongly affected by a change of the relative polarization (Fig. 7c).

In conclusion, we have reported on the disturbing interference patterns that have been observed in FSRM. The Raman probe spectrum interferes with the onset of a continuum generated by the pump pulse in the focal region of the microscope. We could show that this effect can be suppressed because of its interferometric origin. The present setup^[7] is based on a 1-kHz laser amplifier system and uses Raman pump pulses with rather high energies of ~100 nJ at the edge of continuum generation. In setups for stimulated Raman microscopy employing high repetition lasers (~100 MHz),^[8,9,11] pulse energies are much lower (~50 pJ). It remains to be seen whether with such low energies modulations of the type described here also show up. We further note that the effect could constitute a time-zero artifact in transient absorption spectroscopy.

Acknowledgements

Financial support of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (project Gi349/2-1) is gratefully acknowledged. E.P. thanks the Boehringer Ingelheim Fonds for a PhD fellowship.

References

- [1] G. Turrell, J. Corset, *Raman Microscopy Developments and Applications*, Academic Press: San Diego, **1996**.
- [2] N. Sijtsema, S. Wouters, C. De Grauw, C. Otto, J. Greve, *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 348.
- [3] A. Zumbusch, G. Holtom, X. S. Xie, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 4142.
- [4] J. Cheng, X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 827.
- [5] A. Volkmer, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, *38*, R59.
- [6] M. Müller, A. Zumbusch, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2157.
- [7] E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, P. Gilch, *Appl. Phys. B* **2007**, *87*, 389.
- [8] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, X. S. Xie, *Science* **2008**, *322*, 1857.
- [9] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, K. Itoh, *Opt. Express* **2009**, *17*, 3651.
- [10] A. Nikolaenko, V. V. Krishnamachari, E. O. Potma, *Phys. Rev. A* **2009**, *79*, 013823.
- [11] P. Nandakumar, A. Kovalev, A. Volkmer, *New J. Phys.* **2009**, *11*, 033026.
- [12] C. Evans, E. Potma, M. Puoris'haag, D. Cote, C. Lin, X. S. Xie, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 16807.
- [13] F. Ganikhanov, C. Evans, B. Saar, X. S. Xie, *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 1872.
- [14] J. Ogilvie, E. Beaurepaire, A. Alexandrou, M. Joffre, *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 480.
- [15] O. Burkacky, A. Zumbusch, C. Brackmann, A. Enejder, *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 3656.
- [16] P. Kukura, D. W. McCamant, R. A. Mathies, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 461.
- [17] P. Kukura, D. W. McCamant, P. H. Davis, R. A. Mathies, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *382*, 81.
- [18] S. Jin, Y. Lee, J. Yu, S. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 1829.
- [19] S. Laimgruber, H. Schachenmayr, B. Schmidt, W. Zinth, P. Gilch, *Appl. Phys. B* **2006**, *85*, 557.
- [20] M. Takeda, H. Ina, S. Kobayashi, *J. Opt. Soc. Am.* **1982**, *72*, 156.
- [21] M. J. Pelletier, *Appl. Spectrosc.* **1999**, *52*, 1087.
- [22] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press: Boston, **1992**.
- [23] R. Nakamura, Y. Kanematsu, *J. Luminescence* **2001**, *94*, 559.
- [24] P. R. Watekar, S. Ju, W. T. Han, *J. Non-Cryst. Solids* **2008**, *354*, 431.
- [25] M. Sheik-Bahae, A. A. Said, T.-H. Wei, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, *26*, 760.
- [26] Schott, http://www.schott.com/advanced_optics/german/download/datasheet_all_german.pdf, **2009**, 17/03/2009.
- [27] C. Iaconis, I. A. Walmsley, *Opt. Lett.* **1998**, *23*, 792.
- [28] C. Iaconis, I. A. Walmsley, *IEEE J. Quantum Electron.* **1999**, *35*, 501.
- [29] I. H. Malitson, *J. Opt. Soc. Am.* **1962**, *52*, 1377.
- [30] C. Hirlimann, in *Femtosecond Laser Pulses: Principles and Experiments* (Ed: C. Rullière), Springer Science+Business Media, LLC: New York, **2005**, pp. 25.
- [31] A. Couairon, A. Mysyrowicz, *Phys. Rep.* **2007**, *441*, 47.
- [32] G. Fibich, A. L. Gaeta, *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 335.
- [33] R. W. Boyd, S. G. Lukishova, Y. R. Shen, *Self-focusing: Past and Present: Fundamentals and Prospects*, Springer Science+Business Media, LLC: New York, **2009**.
- [34] M. Bellini, T. W. Hänsch, *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 1049.
- [35] A. Baltuška, T. Fuji, T. Kobayashi, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 133901.
- [36] P. Baum, E. Riedle, M. Greve, H. R. Telle, *Opt. Lett.* **2005**, *30*, 2028.
- [37] A. Penzkofer, A. Laubereau, W. Kaiser, *Prog. Quantum Electron.* **1979**, *6*, 56.
- [38] D. A. Long, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **2002**.
- [39] D. W. McCamant, P. Kukura, R. A. Mathies, *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1317.

4.2 Ursprung der spektralen Interferenz in der FSRM

Die im vorhergehenden Abschnitt vorgeschlagene spektrale Interferenz zwischen dem Raman-Abtastimpuls und einem vom Raman-Pumpimpuls erzeugten, einsetzenden Weißlichtkontinuums muss als Ursache der Modulationen ausgeschlossen werden. Die Modulationen treten während weiterer Untersuchungen ebenfalls auf der neuen MHz-FSRM-Anlage auf. Hier kommen Raman-Pumpimpulse zum Einsatz, die um 2 Größenordnungen geringere Energien besitzen. Im folgenden Abdruck des Artikels³

Evelyn Ploetz, Benjamin Marx, Peter Gilch: „*Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy*“, J. Raman Spectrosc. (2011), DOI: 10.1002/jrs.2884.

wird daher ein überarbeitetes Modell zum physikalischen Ursprung der Modulationen vorgestellt. Als Ursache kann ein Vier-Wellen-Mischprozess (FWM) identifiziert werden, bei dem das elektrische Feld des Raman-Pumpimpulses mit zwei elektrischen Feldern des Raman-Abtastimpulses über ein Medium in Wechselwirkung tritt. Das zusätzlich erzeugte Feld erfährt eine heterodyne Verstärkung durch den Weißlichtimpuls und interferiert mit diesem auf dem Detektor. Ausgehend von diesem Modell konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den durchgeführten Simulationen und den gemessenen Modulationen erzielt werden. Die lineare Skalierung der Amplitude mit dem nichtlinearen Brechungsindex n_2 des vermittelnden Mediums, konnte für verschiedene transparente Proben experimentell bestätigt werden. Die Abhängigkeit der Modulationsamplitude von den Impulsenergien des Raman-Pump- und Raman-Abtastimpulses wurden jeweils über 4 bzw. 2 Größenordnungen experimentell untersucht und stimmen mit dem Modell überein.

³ Reprinted from J. Raman Spectrosc.: E. Ploetz, B. Marx, and P. Gilch: Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy, DOI: 10.1002/jrs.2884, ©2011, with permission from John Wiley & Sons, Ltd.

Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy[†]

E. Ploetz,^{a,b} B. Marx^{a,b} and P. Gilch^{a,b*}

In femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM), a spectrally narrow (Raman pump) pulse and a broad (Raman probe) laser pulse are employed to generate the Raman spectra of microscopic objects. The resulting spectra exhibit, in addition to the Raman bands, spectral modulations of comparable amplitude. Here a model is devised that attributes these modulations to a four-wave mixing (FWM) process. Two light fields of the probe pulse and one field of the pump pulse serve as input fields. The resulting FWM field experiences a heterodyne amplification by the probe field. Simulations based on this model reproduce the appearance of the spectral modulations. Furthermore, the amplitude of the modulations exhibits dependences on the energies of pump and probe pulses as well as on the nonlinear refractive index n_2 , which are in line with the model. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Raman microscopy; stimulated Raman scattering; femtosecond laser pulses; four-wave mixing

Introduction

Microscopic imaging techniques based on stimulated Raman scattering have recently attracted considerable interest.^[1–6] As in coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy,^[7] the aim is to profit from the chemical specificity of Raman spectra and to enhance the signal level by a nonlinear process. Stimulated Raman scattering features some advantages over CARS, as there are^[1,2] spectra matching spontaneous (conventional) ones, linear concentration scaling and additivity in terms of contributions of components. Setups for stimulated Raman microscopy can be divided into scanning and broadband ones. Scanning instruments^[2–6] use two picosecond laser pulses with a frequency difference matching the Raman resonance of interest. In the broadband approach, which we have termed femtosecond stimulated Raman microscopy (FSRM),^[1] stimulated processes are induced by an intense picosecond pulse (Raman pump) and a weaker femtosecond pulse (Raman probe). The spectral width of the latter is chosen to be so large that all Raman resonances can be addressed simultaneously (Fig. 1). Therefore, FSRM, though presently lags behind scanning approaches in terms of sensitivity, yields the complete spectra simultaneously.

However, in addition to the (desired) Raman bands, FSRM features disturbing spectral modulations.^[8] The essential properties of the interferences are the following: (1) they require temporal overlap of pump and probe pulses; (2) they exhibit interferometric sensitivity; (3) the phase of the modulations changes sign when varying the spatial delay between the two pulses by $\lambda_{\text{pump}}/2$ (λ_{pump} , being the wavelengths of the pump pulse); (4) the modulations become more closely spaced on the frequency axis when the chirp of the probe pulse is increased and (5) the amplitude of the modulations rises with increasing nonlinear refractive index n_2 of the sample. These observations led us to a model for the origin of the interference pattern,^[8] which turned out to be incomplete. In the previous model, the Raman pump pulse was thought to undergo a spectral broadening due to the nonlinearity of the sample. The broadened pulse would then

be heterodyned by the probe light. This model explains the five properties of the modulations listed above. Yet, concerning the mechanism of the broadening, it has its flaws.^[8] The spectral width gained by self-phase modulation was shown to be too small. The power of the pump pulse was deemed to be slightly below the threshold for white light generation.^[9] The broadening was finally attributed to the ‘onset of white light generation’.

The study on the modulations was performed relying on a 1 kHz femtosecond laser-amplifier system as a pulse source.^[11] The energy of the Raman pump pulse was of the order of 50 nJ. Meanwhile, we have constructed a setup using a 75 MHz femtosecond laser.^[3] For this setup, the energy of the Raman pump is around 0.5 nJ. Despite the fact that the pulse energies and – all other parameters being similar – also the pulse intensities are two orders of magnitude lower for the 75 MHz setup, modulations are still observed. This prompted us to reconsider the origin of the modulations. We will here devise a model that incorporates the properties listed above, reproduces the spectral shape of the modulations and accounts for the appearance of the modulations over a wide range of pump energies.

* Correspondence to: P. Gilch, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany.
E-mail: peter.gilch@uni-duesseldorf.de

† This article is part of the Journal of Raman Spectroscopy special issue entitled “Proceedings of the 9th European Conference on Nonlinear Optical Spectroscopy (ECONOS), Bremen, Germany, June 21–23, 2010” edited by Peter Radi, PSI, Villigen, Switzerland, and Arnulf Materny, Jacobs University, Bremen, Germany.

a Lehrstuhl für BioMolekulare Optik and Center of Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München, D-80538 München, Germany

b Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany

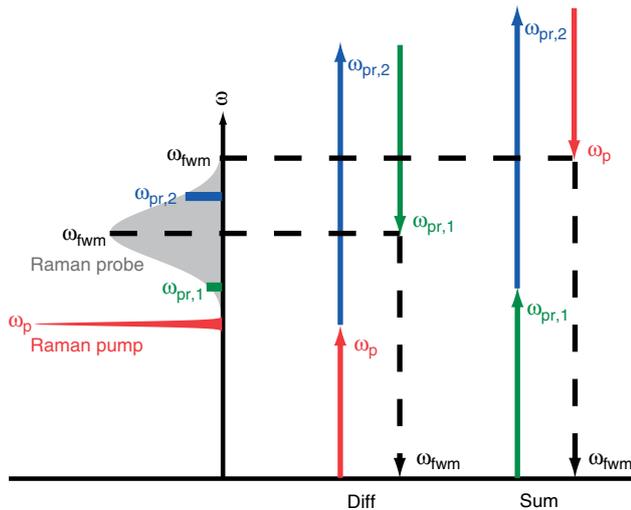


Figure 1. Schematic of the FWM processes causing the spectral modulations in FSRM. In the FSRM experiments dealt with here, spectrally narrow Raman pump pulses (depicted in red) interact with spectrally broad probe pulses (depicted in gray). The frequency components of the probe pulse ω_{pr} are larger than the frequency of Raman pump ω_p . Two FWM processes involving two light fields of the probe ($\omega_{pr,1}$, green and $\omega_{pr,2}$, blue) and the field of the pump can generate light fields (frequency ω_{fwm}) falling in the spectral range of the probe light. In the first process termed ‘diff’, the frequency components of the probe light are subtracted, and in the second one termed ‘sum’ they are added. Since the probe field contains a continuum of frequency components, the resulting FWM field is also continuous.

Four-Wave Mixing Model

We ascribe the modulations to a nonresonant four-wave mixing (FWM) process involving input light fields of the Raman pump and probe pulse. These input fields generate a field oscillating at a frequency ω_{fwm} . For a spectral interference to occur, ω_{fwm} needs to fall into the interval $[\omega_{pr,min}, \omega_{pr,max}] - \omega_{pr}$ represents the frequencies of the probe light (Fig. 1). This reduces the various possible FWM processes to the following two:

$$\begin{aligned}\omega_{fwm}^{diff} &= \omega_p - \omega_{pr,1} + \omega_{pr,2}, & (1) \\ \omega_{fwm}^{sum} &= -\omega_p + \omega_{pr,1} + \omega_{pr,2}.\end{aligned} & (2)$$

Here, ω_p is the frequency of the Raman pump pulse. For the FSRM setups considered here,^[1,3] the frequency ω_p is smaller than all frequency components ω_{pr} of the probe light. Two light fields of the probe light act as input fields, where $\omega_{pr,1} \leq \omega_{pr,2}$. We refer to the first FWM process as ‘diff(ERENCE)’ since the frequency components ω_{pr} are subtracted. The FWM field $E_{fwm}^{diff}(\omega_{fwm})$ for this process is given by (e.g. Ref. [10])

$$\begin{aligned}E_{fwm}^{diff}(\omega_{fwm}) &= E_{fwm}^{diff}(\omega_p + \Delta) \\ &\propto \chi^{(3)} E_p(\omega_p) \int_{-\infty}^{\infty} E_{pr}^*(\omega_{pr} - \Delta) E_{pr}(\omega_{pr}) d\omega_{pr}.\end{aligned} & (3)$$

$\Delta \geq 0$ is the difference between the two frequencies $\omega_{pr,2}$ and $\omega_{pr,1}$. $E_{pr}(\omega_{pr})$ is the electric field of the probe light. Since in the experiment all fields share the same plane of polarization, the vector notation is omitted. For the same reason, we treat the nonlinear susceptibility of third-order $\chi^{(3)}$ as a scalar quantity. Since for the materials studied the light fields are off-resonant with regard to electronic excitation, $\chi^{(3)}$ is taken to be frequency

independent. In Eqn (3) there is no additional convolution integral for the electric field of the Raman pump pulse $E_p(\omega_p)$ since the spectral width of the pump pulse is roughly two orders of magnitude smaller than that of the probe. Therefore, we take its amplitude spectrum to be delta-shaped. The output field for the second FWM process, which we refer to as ‘sum’, is computed from

$$\begin{aligned}E_{fwm}^{sum}(\omega_{fwm}) &= E_{fwm}^{sum}(\Sigma - \omega_p) \\ &\propto \chi^{(3)} E_p^*(\omega_p) \int_{-\infty}^{\infty} E_{pr}(\Sigma - \omega_{pr}) E_{pr}(\omega_{pr}) d\omega_{pr}.\end{aligned} & (4)$$

$\Sigma > 0$ denotes the sum between the two frequencies $\omega_{pr,2}$ and $\omega_{pr,1}$. This sum lies in the range of $[\min(2\omega_{pr,1}); \max(2\omega_{pr,2})]$. In the following, we drop the index ‘fwm’ in frequency argument. The total FWM field is the sum of the two contributions:

$$E_{fwm}(\omega) = E_{fwm}^{diff}(\omega) + E_{fwm}^{sum}(\omega). & (5)$$

It is this field that then experiences a heterodyne detection:

$$\begin{aligned}|E_{pr}(\omega) + E_{fwm}(\omega)|^2 &\propto I_{pr}(\omega) + I_{fwm}(\omega) \\ &+ 2\sqrt{I_{pr}(\omega)I_{fwm}(\omega)} \cdot \cos(\Phi(\omega)).\end{aligned} & (6)$$

$I_{pr}(\omega)$ and $I_{fwm}(\omega)$ are the spectral intensities of the probe and the FWM light, respectively. $\Phi(\omega)$ refers to the phase difference between the two light fields.

In the following, we will work with referenced values commonly employed in stimulated Raman spectroscopy. The (stimulated) Raman spectrum is here computed from the measured probe spectrum in the absence $I_{pr}(\omega)$ and in presence $I_{pr}(\omega)^P$ of the Raman pump via

$$R(\omega) = 1 - \frac{I_{pr}(\omega)^P}{I_{pr}(\omega)}. & (7)$$

In the present context, the spectral intensity $I_{pr}(\omega)^P$ in presence of the pump pulse is given by Eqn (6) and thus the ‘Raman’ spectrum becomes

$$R(\omega) = -2 \frac{|E_{fwm}(\omega)| \cdot |E_{pr}(\omega)|}{I_{pr}(\omega)} \cdot \cos(\Phi(\omega)). & (8)$$

Here, the second term in Eqn (6) has been neglected since the spectral intensity $I_{fwm}(\omega)$ is much smaller than $I_{pr}(\omega)$ and the cross term.

From these considerations, it is obvious that one requires the complex electric fields $E_{pr}(\omega)$ and $E_p(\omega)$, i.e. amplitude and phase, to compute the spectral shape of the modulations. The spectral amplitude of the probe light $E_{pr}(\omega)$ can be obtained from the measured spectral intensity of the probe light as detailed in the methods part. The spectral phase $\phi_{pr}(\omega)$ of the probe pulse can be measured by techniques such as FROG^[11,12] or SPIDER.^[13] In the present study, we have employed a cross-correlation technique (see below) affording a frequency-dependent delay time $\tau(\omega)$. An integration yields the spectral phase:^[14]

$$\phi_{pr}(\omega) = - \int_0^{\omega} \tau(\omega) d\omega. & (9)$$

As justified above, the pump light is considered to be delta-shaped in frequency space and its field E_p can thus be written as

$$E_p = |E_p| e^{-i\omega_p \tau_d}. & (10)$$

τ_d is an ‘arbitrary’ delay time between the pump and probe pulse. As experimentally verified,^[8] it is this delay time that leads to an

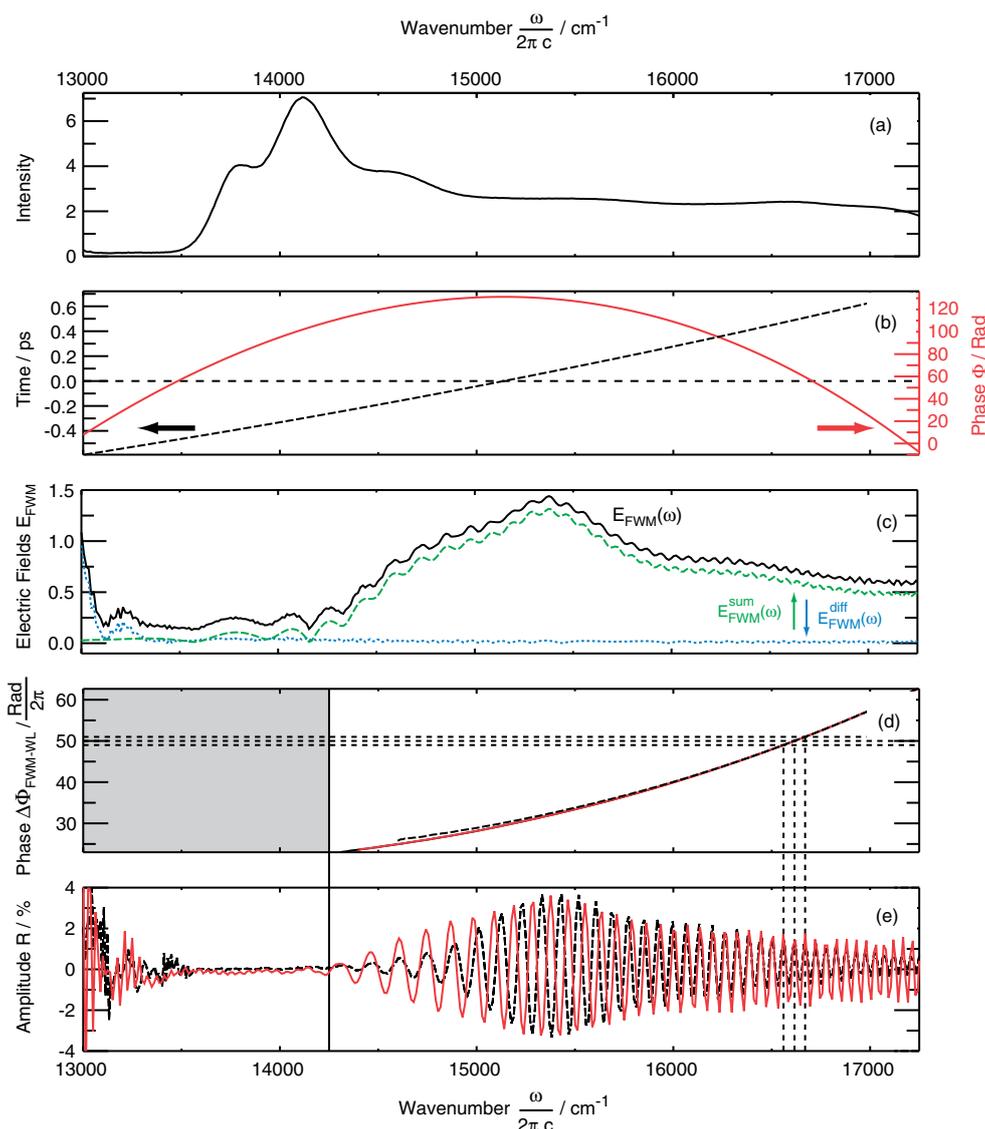


Figure 2. Measured and simulated interference patterns in SF5 glass recorded with the 1 kHz setup. The Raman pump and Raman probe energies at the focal point amounted to 44.8 and 1.1 nJ, respectively. (a) Spectrum (power per wavenumber interval) of the probe light. (b) Measured frequency-dependent delay $\tau(\omega)$ (black, dashed line) of the probe light components and the resulting spectral phase $\Phi(\omega)$ (red, solid line). (c) Computed amplitudes of the FWM field $E_{\text{FWM}}(\omega)$ (black, solid line). For better visualization, this graph has been shifted vertically. The two contributions to that field, the 'difference' term $E_{\text{FWM}}^{\text{diff}}(\omega)$ (blue, dotted line) and the 'sum' term $E_{\text{FWM}}^{\text{sum}}(\omega)$ (green, dashed line) are also depicted. (d) Simulated (red, solid line) and measured (black, dashed line) phase of the heterodyned FSRM signal in multiples of 2π . Whenever the phase difference $|\Phi_{\text{pr}}(\omega) - \Phi_{\text{FWM}}(\omega)|$ is a multiple of 2π , maxima in the spectrum given in (e) are observed. (e) Simulated (red, solid line) and measured (black, dashed line) spectral interference pattern. The dashed vertical and horizontal lines highlight that the phase difference $|\Phi_{\text{pr}}(\omega) - \Phi_{\text{FWM}}(\omega)|$ for adjacent maxima equals one cycle.

additional, constant phase shift for all frequencies in the generated FWM field. Due to the interferometric nature of the effect, this phase shift allows the elimination of the FWM contributions in FSRM measurements. In the following section, the measured and computed contributions of the FWM field to the FSRM signal are discussed. Moreover, its dependences on experimental parameters predicted by the FWM model are reviewed.

Results and Discussion

Measured and computed spectral interferences

With the 1 kHz setup, the spectral interference has been observed for probe frequencies higher and lower than the Raman pump

frequency (data not shown). In the following, we will only discuss data recorded for probe frequencies higher than the Raman pump frequency, since the megahertz setup does not supply probe frequencies lower than the Raman pump frequency.

Relying on experimental input data, we will now compute the spectral modulations observed in the FSRM signal. The interference patterns – recorded with both the 1 kHz and 75 MHz setups – were analyzed and simulated on the basis of the model given in the last section. Since for the 1 kHz setup the amplitude and phase data were measured, we will focus on these measurements. For the 1 kHz setup, the pump and probe pulses were derived from the output pulses of a laser-amplifier system by spectral narrowing and white light generation, respectively. The Raman probe light thus exhibits the spectral characteristics of a white

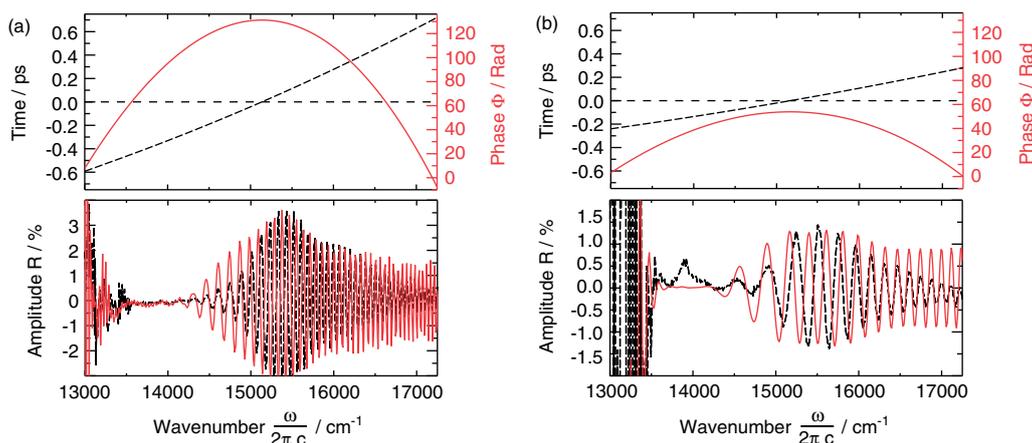


Figure 3. Spectral interference patterns in SF5 glass depending on the chirp of the Raman probe pulse. (a) Large chirp. (b) Small chirp. The upper panel depicts delay times (black, dashed lines) determined experimentally and the respective spectral phase (red, solid lines). In the lower panels, simulated (red, solid lines) and measured (black, dashed lines) interference patterns are compared. Differences in chirp were introduced by focusing the probe light with refractive (a) and reflective (b) objectives. All data were recorded on the 1 kHz setup.

light continuum (Fig. 2(a)).^[14,15] an intense peak close to the laser fundamental (located at $1/775 \text{ nm} = 12\,900 \text{ cm}^{-1}$), a plateau at higher wavenumbers and a dropoff for even higher wavenumbers. The spectral intensity can be converted into a spectral amplitude $|E_{\text{pr}}(\omega_{\text{pr}})|$ by taking the square root (Eqn (15)). The spectral phase was obtained by first measuring the frequency-dependent delay $\tau(\omega_{\text{pr}})$ using a Kerr gate technique (for details see ‘Experimental’ section). In a measurement using refractive microscope objectives (Fig. 2(b)), the total time delay in the spectral range between $13\,400$ and $17\,250 \text{ cm}^{-1}$ amounts to 1.21 ps . An estimate of this value based on the thickness and dispersion parameters of the material which the probe pulse traverses on the way to the sample [sapphire plate (3 mm), filters (6 mm of BK7 glass), microscope objective (modeled by 2 mm of SF2, 2 mm of SF10 and 5 mm of BK7 glass)] yields a similar value of 1.24 ps . Since the dependence of τ on ω_{pr} is roughly linear, the spectral phase $\phi_{\text{pr}}(\omega_{\text{pr}})$ computed via Eqn (9) is dominated by a quadratic term (Fig. 2(b)). The frequency at which τ equals zero and for which ϕ_{pr} exhibits a maximum was located in the center of the probe spectrum (Fig. 2(d)). The electric field of the probe light

$$E_{\text{pr}}(\omega_{\text{pr}}) = |E_{\text{pr}}(\omega_{\text{pr}})|e^{-i\phi_{\text{pr}}(\omega_{\text{pr}})} \quad (11)$$

is thereby completely characterized. Inserting this field in the pertinent Eqns (3–5) yields the FWM field $E_{\text{fwm}}(\omega)$. Obviously, the amplitude of this field (Fig. 2(c)) (partially) falls into the spectral range of the probe light and can thus cause a spectral interference. The difference contribution $E_{\text{fwm}}^{\text{diff}}(\omega)$ peaks at the low-frequency edge of the probe light and the sum contribution $E_{\text{fwm}}^{\text{sum}}(\omega)$ approximately in the spectral center of the probe light. The latter term dominates the FWM field in the spectral range of interest (Fig. 2(c)). The FWM field differs in phase (ϕ_{fwm}) from that of the probe light (ϕ_{pr}). When the two fields heterodyne, maxima (minima) in the spectra are observed when the phase difference $|\phi_{\text{pr}}(\omega) - \phi_{\text{fwm}}(\omega)|$ equals $2m \cdot \pi$ ($(2m + 1) \cdot \pi$), $m = 0, 1, 2, \dots$ (Fig. 2(d)). The phase difference $|\phi_{\text{pr}}(\omega) - \phi_{\text{fwm}}(\omega)|$ based on the simulation is nearly identical to the one measured. The latter is obtained by ‘counting’ the maxima in the experimental spectrum plotted in Fig. 2(e) (details are given in the ‘Methods’ section).

The computed heterodyned spectrum in the referenced representation (Eqn (8)) shares all properties of the experimental

spectrum. The depicted experimental spectrum was recorded for SF5 glass. This material was chosen since it features no Raman resonances in the spectral range covered and exhibits a substantial nonlinearity. The spectral shape of the modulations is identical for other materials. The computed spectrum reproduces the shape of the spectral envelope of the modulations as well as their spacing. Apart from a general scaling factor for the amplitude of the FWM field, the only adjustable parameter was the delay τ_d between the pump and probe light. Since the FWM field is dominated by only one term (the sum term), the effect of this delay is to add the term $\omega_p \tau_d$ to the phase difference $\phi_{\text{pr}}(\omega) - \phi_{\text{fwm}}(\omega)$. This results in a shift of the interference pattern along the frequency axis. When changing $\omega_p \tau_d$ by π or multiples of it, the interference pattern changes sign. This is exactly what has been observed experimentally.^[8]

We now turn to the influence of the chirp of the probe pulse on the interference pattern. For the data presented until now, a substantial part of the chirp was introduced by the (refractive) microscope objective. Replacing the refractive objective by a reflective one reduces the total delay time in the spectral range covered from 1.2 to 0.5 ps (Fig. 3). Concomitantly, the spectral phase becomes flatter. As a result, the spacing of the modulations becomes larger. This is observed experimentally and well reproduced by the simulations.

For the 75 MHz setup,^[3] the output pulse of an 8 fs laser directly serves as the Raman probe. Its spectral shape (Fig. 4(a)) differs substantially from the white light continuum constituting the Raman probe in the 1 kHz setup. As before, the starting point for the computation is the spectrum of the probe light which is converted into a spectral amplitude. Since we had no FROG or related technique at hand to determine the spectral phase ϕ_{pr} of the probe light, we estimated that phase (Fig. 4(b)). We used the thicknesses and dispersion parameters of the materials the probe light traverses on the way to the sample. As outlined above, this approach is justified. The referenced modulation spectrum computed with this input field matches the experimental one in the central part of the spectrum (Fig. 4(d)). On the low-frequency side of the spectrum, strong modulations are *measured* but not reproduced by the simulation. Still, the measured modulations exhibit interferometric properties. On the high-frequency side of the spectrum, the simulated

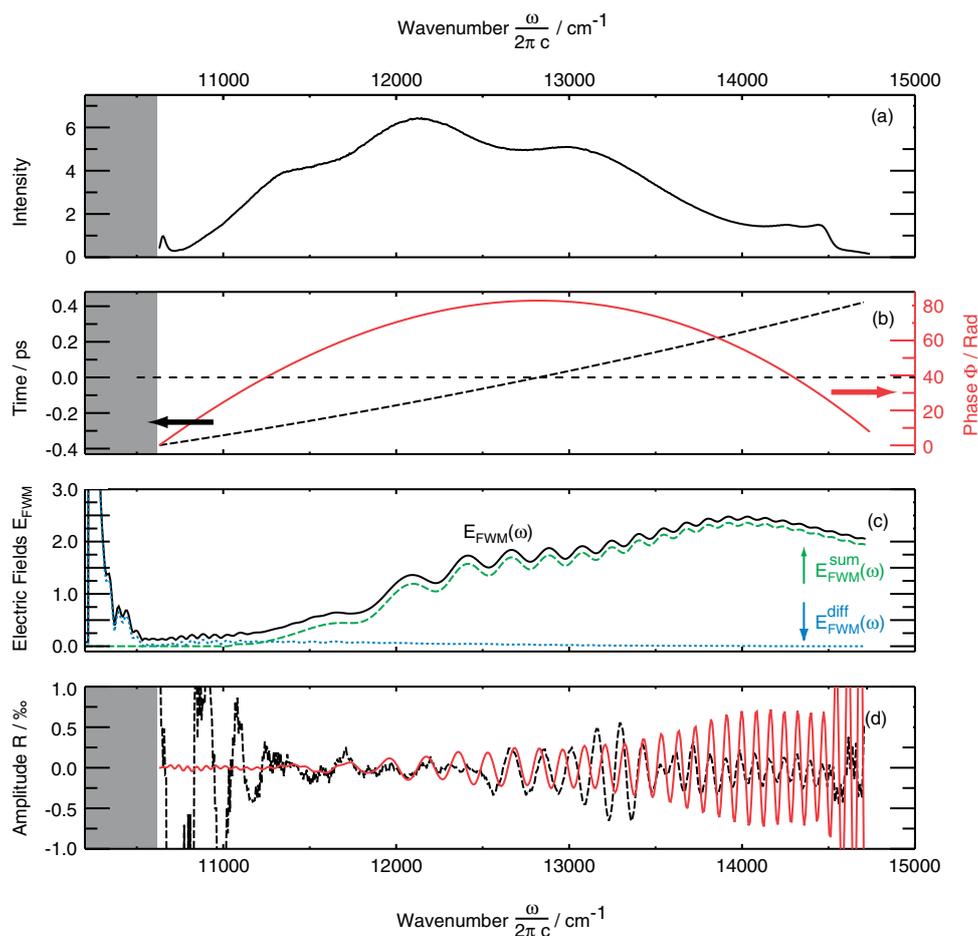


Figure 4. Measured and simulated interference patterns in SF5 glass recorded with the 75 MHz setup. The Raman pump and Raman probe energies at the focal point amount to 0.5 and 0.2 nJ, respectively. (a) Spectrum (power per wavenumber interval) of the probe light. (b) Time delay $\tau(\omega)$ (black, dashed line) and spectral phase $\Phi(\omega)$ (red, solid line) of the probe light based on dispersion data. (c) Computed amplitudes of the FWM field $E_{\text{FWM}}(\omega)$ (black, solid line). For better visualization, this graph has been shifted vertically. The two contributions to that field, the 'difference' term $E_{\text{FWM}}^{\text{diff}}(\omega)$ (blue, dotted line) and the 'sum' term $E_{\text{FWM}}^{\text{sum}}(\omega)$ (green, dashed line) are also depicted. (d) Simulated (red, solid line) and measured (black, dashed line) spectral interference pattern.

amplitude is higher than the measured one. Several aspects might resolve this discrepancy. First, on the 75 MHz setup, the chirp was not determined experimentally and it strongly affects the difference term.^[16] This term is most pronounced on the low-frequency edge of the spectrum (Fig. 4(c)) where the measured amplitude is much higher than the simulated one. Second, the discrepancies are strong at the spectral edges with low probe light intensities. Here, the experimental ratio $R(\omega)$ (Eqn (7)) is less well defined than in the central part of the spectrum. Third, the 75 MHz setup is not phase-stable, i.e. while accumulating data over typically 75 000 shots, some of the modulations average out.

The modulations observed using the 1 kHz and the 75 MHz setups extend over the complete Raman window. This favors the FWM model presented here over the spectral broadening hypothesis advocated in our earlier paper.^[8] Spectral broadenings are expected to start at the input frequency, i.e. the Raman pump frequency, and spread out to large frequency shifts with increasing intensity.^[17] The Raman pump intensities on the two setups differ by two orders of magnitude. Still, the spectral coverage of the modulations is identical, which – as our simulations have shown – is in line with the FWM model.

Dependences

In addition to the interference patterns, the FWM model also implicates certain dependences of the modulation amplitude on the energies of the laser pulses as well as on the nonlinearity of the medium. Equations (3–8) predict the following dependences of the referenced spectrum $R(\omega)$ on the nonlinear refractive index n_2 and the intensities of pump (I_p) and probe (I_{pr}) light:

$$R(\omega) \propto \sqrt{I_{pr} \cdot I_p} \cdot n_2 \quad (12)$$

(Note that the nonlinear refractive index n_2 scales linearly with $\chi^{(3)}$.^[18]) These dependences have been tested experimentally on both the kilohertz setup and the megahertz setup. For these experiments benzene served as the sample. Benzene exhibits a high nonlinearity and its (stimulated) Raman bands can be used to optimize pump/probe overlap and can serve as an 'internal' intensity measure. The modulation amplitude is given as half the difference between minimum and maximum of the referenced signal in a spectral region without Raman resonances (Raman Shift between 2400 and 2900 cm^{-1}). At low pulse energies (and thereby intensities) of Raman probe and pump pulse, the modulation amplitude follows the expected square root dependence on Raman probe and Raman pump intensities (Fig. 5(a)–(c)). Due to the noise

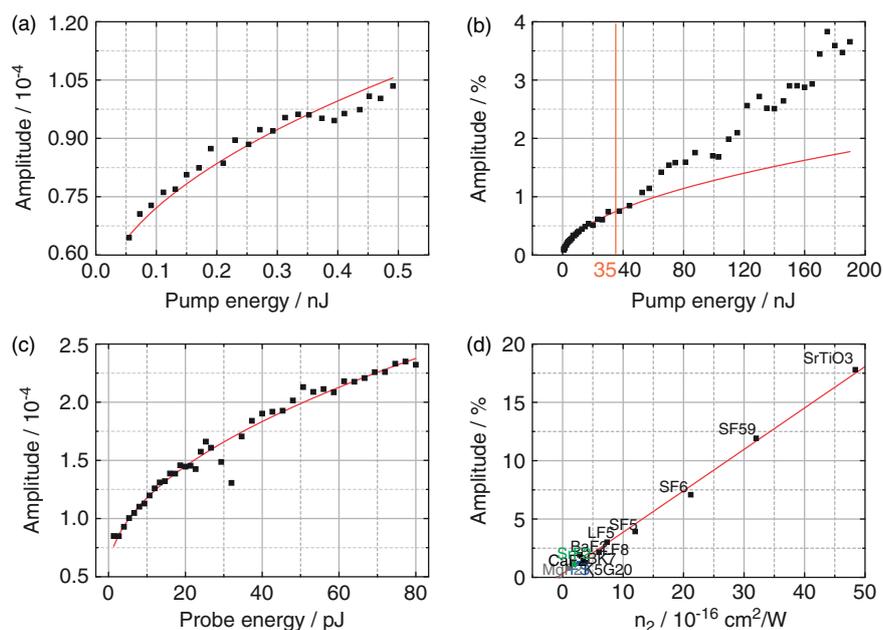


Figure 5. Dependence of the modulation amplitude on the pump and probe energy as well as on the nonlinear refractive index n_2 . Squares represent experimental data and solid lines are the fits. (a) Variation of the pump energy on the megahertz setup. The energy of the probe pulse was 20 pJ. (b) Variation of the pump energy on the kilohertz setup. The energy of the probe pulse was 1.13 nJ. The orange line at 35 nJ marks the onset of self-focusing in benzene. (c) Variation of the probe energy on the megahertz setup. The energy of the pump pulse was 0.5 nJ. (d) Amplitude for various glasses and crystals with largely differing nonlinear refractive indices n_2 . References for these values are summarized in Table 1.

floor of detector and the laser, a modulation amplitude is also present for zero pump energy. This effect is only discernible for the low energies employed in the measurements depicted in Fig. 5(a) and (c). If the pump intensity is increased over a certain value, the modulation amplitude deviates from a square root dependence (Fig. 5(c)). This value matches the critical value for self-focusing in benzene surprisingly well (35 nJ according to Ref. [9,19]). Self-focusing is the starting mechanism of supercontinuum generation.^[9] So the deviation from the square root behavior might be taken as an indication that for *high* pump intensities also the 'onset' of continuum generation might contribute to the spectral modulations as suggested in our previous paper.^[8]

For fixed Raman pump energies (44.8 nJ) and Raman probe energies (1.1 nJ), a number of different glasses and cubic crystals were measured on the kilohertz setup (Fig. 5(d)). The materials investigated cover a range of nonlinearities from $\sim 1 \cdot 10^{-16}$ to $\sim 50 \cdot 10^{-16}$ cm²/W (Table 1). The amplitude changes by the same factor and exhibits a clear linear correlation.

Conclusion

The comparison of simulated and experimental data presented here gives strong evidence that the spectral modulations in FSRM are due to an FWM process in combination with heterodyning. For the simulations, no assumption on the material properties was made other than that $\chi^{(3)}$ is nonvanishing. Since this applies to all materials, these modulations will always show up if certain measures are not taken. For setups using narrowband probe and pump pulses,^[2–6] the 'sum' term has no spectral components in common with its incident fields and will thus not be heterodyned. The 'diff' term, however, might contribute. In broadband SRS microscopy, the 'sum' term will also vanish if the frequency difference between the smallest probe frequency and the pump

Table 1. Nonlinear refractive indices n_2 taken from literature		
Materials	n_2 (10^{-16} cm ² /W)	Reference
Liquids		
Benzene	168	[19]
Cubic crystals		
BaF ₂	2.85	[23]
CaF ₂	1.9	[23]
MgF ₂	0.92	[23]
SrF ₂	1.76	[23]
SrTiO ₃	48.4	[24]
Glasses (trade names of the Schott AG)		
BK7	3.4	[18]
FS	2.73	[25]
K5G20	3.66	[26]
LF5	7.35	[27]
LF8	6 ^a	
SF5	12 ^a	
SF59	32	[28]
SF6	21.2	[25]

^a The values for LF8 and SF5 are calculated according to Ref. [27] with parameters from Ref. [29]. All values are given for 1064 nm light.

frequency is larger than the bandwidth of the probe pulse itself. As shown experimentally, the modulations can be suppressed by different methods:^[8] By using (1) perpendicular polarizations or (2) counterpropagation of probe and pump pulses the interference is circumvented but the Raman signal is also reduced. (3) By constantly changing the phase relation of probe and pump pulse during the measurement, the modulations can be averaged out. These measures were detailed in our previous paper,^[8] and the

present model is perfectly in line with them. We finally note that, since the effect depends on the chirp of the probe pulse, it might be used to characterize the phase properties of ultrashort laser pulses.

Experimental and Computational Methods

The 1 kHz^[1,8] and 75 MHz setups^[3] have been detailed before. Here, only the pertinent experimental parameters are summarized. In the 1 kHz setup, the probe light is generated via white light generation in sapphire. Using long-pass and short-pass filters it was spectrally restricted to 590–750 nm. The energy of the probe pulses at the sample amounted to ~ 1.5 nJ. The pump pulse was obtained by spectrally narrowing the output of a laser amplifier system to 15 cm^{-1} by a band-pass filter. To characterize the chirp of the probe light by Kerr gating (e.g. Ref. [20]), the band-pass filter in the Raman pump branch was removed. Pump pulses – now exhibiting a duration of ~ 150 fs – served as gate pulses. The Raman probe light was extinguished using crossed wire-grid polarizers (Moxtek, PPL04) placed in front of and behind the scanning microscope. The polarization plane of the gate pulse was set to an angle of 45° with respect to the transmission axis of the first polarizer. A cover slip of $170 \mu\text{m}$ thickness located at the focal point of the microscope served as the Kerr medium. Spectra of the light transmitted due to Kerr effect were recorded as a function of the time delay between probe and gate pulses. The resulting two-dimensional data were analyzed as follows. For each detection frequency ω , the time trace was inspected and the maximum of the transmitted light located. The temporal position of this maximum was taken to be the delay time $\tau_d(\omega)$ at that frequency. A numerical integration according to Eqn (9) then afforded the spectral phase $\phi(\omega)$.

For FSRM measurements relying on the 75 MHz laser system, the output of the 8 fs laser serves directly as the Raman probe pulse. For the measurement described here, the pulse energy was attenuated to 30–300 pJ. The Raman pump pulse was obtained by feeding the spectral components of the laser spectrum around 980 nm into a two-stage Yb³⁺ fiber-based amplifier. A fiber Bragg grating reduced its spectral width to 18 cm^{-1} . The Raman pump energy amounted to ~ 0.5 nJ.

For either setup, the relative polarization of pump and probe light was parallel. For varying the pulse energies, two additional wire-grid polarizers were inserted and their transmission axis rotated with respect to each other. For all measurements, the scanning microscopes were equipped with two identical refractive objectives (Leitz, epi-plan, NA 0.4, 20 \times), offering a transmission in the near-infrared (NIR) region of more than 80%. To demonstrate the dependence of the spectral interference on the chirp, the focusing objective was replaced by a reflective one (Ealing, cassegrainian, NA 0.5, 36 \times).

To evaluate the dependence of the modulation amplitude on the nonlinearity, data were recorded for the materials listed in Table 1.

The array records ‘counts’ in a constant wavelength interval $\Delta\lambda \approx 0.5$ nm. Using a black body radiator as reference, the spectral sensitivity of the detection system is corrected for. One thereby obtains spectral data points $N(\lambda)\Delta\lambda$ which are proportional to quanta per readout event. These values are converted to the frequency axis via (c is the speed of light)

$$N(\omega) = N(\lambda) \cdot 2\pi c \cdot \lambda^2. \quad (13)$$

To obtain data points that are proportional to the intensity (in units of W/m^2) $N(\omega) \cdot \Delta\omega$ is multiplied by the energy of one quantum

$\hbar\omega$:

$$I(\omega) = N(\omega) \cdot \Delta\omega \cdot \hbar\omega. \quad (14)$$

The related spectral amplitude $|E(\omega)|$ is then given by (ϵ_0 is the dielectric constant and n the refractive index)

$$|E(\omega)| = \frac{1}{\Delta\omega} \sqrt{\frac{I(\omega)}{\epsilon_0 c n}}. \quad (15)$$

Since the spectral phase $\phi(\omega)$ has been determined by the Kerr gating (see above), the electric field of the probe pulse is now completely characterized.

The convolution integrals (Eqns (3)–(4)) yielding the two contribution of the FWM field were approximated by summations. For that purpose, an equidistant frequency axis $\omega = \omega_p + j \cdot \Delta\omega$, $j = 0, 1, 2, \dots, M$ was introduced with a spacing of $\Delta\omega \sim 1.9 \times 10^{12}$ Hz (ω_p refers to the frequency of the Raman pump pulse, $M + 1$ to the number of data points) The measured spectral data points of the probe light are equally spaced on a wavelength axis (not on a frequency axis). Hence, its data points E_j for the equidistant frequency axis were obtained by interpolation. The difference contribution to the FWM field (Eqn (3)) is approximately given by

$$E_{\text{fwm},k}^{\text{diff}} \propto E_p \sum_{j=0}^{M-k} E_j^* E_{j+k}, \quad \omega_{\text{fwm},k} = \omega_p + k\Delta\omega, \quad k = 0, 1, 2, \dots, M. \quad (16)$$

The sum contribution (Eqn (4)) is computed via

$$E_{\text{fwm},k}^{\text{sum}} \propto E_p^* \sum_{j=0}^k E_j E_{k-j}, \quad \omega_{\text{fwm},k} = \omega_p + k\Delta\omega, \quad k = 0, 1, 2, \dots, M. \quad (17)$$

Setting the maximum value of k to M ensures that only frequency components $\omega_{\text{fwm},k}$ are computed that fall into the range of the probe light. The two contributions are summed to obtain the total FWM field. The phase of this field is computed via

$$\phi_{\text{fwm}}(\omega) = i \ln \frac{E_{\text{fwm}}(\omega)}{|E_{\text{fwm}}(\omega)|}. \quad (18)$$

The resulting phase is not monotonic, but it shows jumps from $-\pi$ to π . These jumps are removed by shifting the phase by $\pm 2\pi$ at locations of the jumps.^[21] The sign of the shift depends on the slope at the location of the jump. For comparison, the spectral phase was also extracted from the measured modulations. Therefore, first the ‘analytical’ signal^[22] was computed and then Eqn (18) was applied.

Acknowledgements

We thank H. Offerhaus (University of Twente) for inspiring us to come up with the FWM model. Financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (project GI 349/2-1) is gratefully acknowledged. E. P. thanks the Boehringer Ingelheim Fonds for grant of a PhD fellowship. We thank our undergraduate student Timo Weisbarth for help in recording some of the data presented.

References

- [1] E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, P. Gilch, *Appl. Phys. B* **2007**, 87, 389.

- [2] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, X. S. Xie, *Science* **2008**, 322, 1857.
- [3] E. Ploetz, B. Marx, T. Klein, R. Huber, P. Gilch, *Opt. Express* **2009**, 17, 18612.
- [4] P. Nandakumar, A. Kovalev, A. Volkmer, *New J. Phys.* **2009**, 11, 033026.
- [5] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, K. Itoh, *Opt. Express* **2009**, 17, 3651.
- [6] A. Gambetta, V. Kumar, G. Grancini, D. Polli, R. Ramponi, G. Cerullo, M. Marangoni, *Opt. Lett.* **2010**, 35, 226.
- [7] J. Cheng, X. Xie, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 827.
- [8] E. Ploetz, B. Marx, P. Gilch, *J. Raman Spectros.* **2010**, 41, 609.
- [9] A. Couairon, A. Mysyrowicz, *Phys. Rep.* **2007**, 441, 47.
- [10] Y. J. Lee, M. T. Cicerone, *Opt. Express* **2009**, 17, 123.
- [11] D. J. Kane, R. Trebino, *IEEE J. Quantum Electron.* **1993**, 29, 571.
- [12] R. Trebino, K. W. DeLong, D. N. Fittinghoff, J. N. Sweetser, M. A. Krumbugel, B. A. Richman, D. J. Kane, *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, 68, 3277.
- [13] C. Iaconis, I. A. Walmsley, *Opt. Lett.* **1998**, 23, 792.
- [14] A. W. Weiner, *Ultrafast Opt.*, Wiley: Hoboken, **2009**.
- [15] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spörlein, W. Zinth, *Appl. Phys. B* **2000**, 71, 457.
- [16] Y. J. Lee, Y. Liu, M. T. Cicerone, *Opt. Lett.* **2007**, 32, 3370.
- [17] M. Bradler, P. Baum, E. Riedle, *Appl. Phys. B* **2009**, 97, 561.
- [18] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press: Boston, **1992**.
- [19] P. P. Ho, R. R. Alfano, *Phys. Rev. A* **1979**, 20, 2170.
- [20] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, P. Gilch, *Appl. Phys. B* **2003**, 76, 809.
- [21] M. Takeda, H. Ina, S. Kobayashi, *J. Opt. Soc. Am.* **1982**, 72, 156.
- [22] L. Cohen, *Time-Frequency Analysis*, Prentice-Hall PTR: Upper Saddle River, **1995**.
- [23] D. Milam, M. J. Weber, A. J. Glass, *Appl. Phys. Lett.* **1977**, 31, 822.
- [24] R. Adair, L. L. Chase, S. A. Payne, *J. Opt. Soc. Am. B* **1987**, 4, 875.
- [25] M. J. Weber, D. Milam, W. L. Smith, *Opt. Eng.* **1978**, 17, 463.
- [26] H. Hack, N. Neuroth, *Appl. Opt.* **1982**, 21, 3239.
- [27] J. Neauport, N. Blanchot, C. Rouyer, C. Sauteret, *Appl. Opt.* **2007**, 46, 1568.
- [28] D. W. Hall, M. A. Newhouse, N. F. Borrelli, W. H. Dumbaugh, D. L. Weidman, *Appl. Phys. Lett.* **1989**, 54, 1293.
- [29] A. G. Schott, *Datasheets*, **2009**.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Without discussing this [...] in detail, let me give you the result.

(Wilhelm Wien, Nobel lecture, 1911)

In der vorliegenden Arbeit wurden die experimentellen Grundlagen geschaffen, um die Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie (FSRM) zur chemischen Bildgebung für bio-medizinische Fragestellungen zu nutzen. Ihr Kontrastmechanismus beruht auf der stimulierten Raman-Streuung, deren Signal im Gegensatz zu anderen nichtlinearen Raman-Techniken, wie CARS oder CSRS¹, frei von Beiträgen eines nicht-resonanten Untergrunds ist. Ihre spektrale Signatur gleicht der spontaner Raman-Spektren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals festgestellt werden, dass in der FSRM aufgrund der spektralen Breite des Abtastimpulses weitere Vier-Wellen-Mischprozesse (FWM) auftreten, die zur stimulierten Raman-Streuung simultan ablaufen. Abbildung 5.1 fasst die in der FSRM beobachteten $\chi^{(3)}$ -Prozesse zusammen.

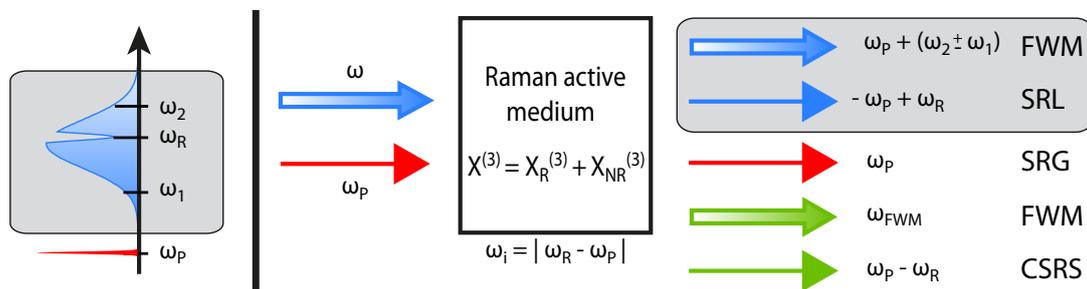


Abbildung 5.1: Beteiligte $\chi^{(3)}$ -Prozesse in der FSRM. Ein schmalbandiger Pumpimpuls mit Frequenz ω_P und ein spektral breiter Laserimpuls mit Frequenzen ω (breiter Pfeil) interagieren mit einem Raman-aktiven Medium. Der resonante Beitrag der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi_R^{(3)}$ vermittelt die kohärenten Raman-Prozesse SRL, SRG sowie CSRS. Zudem sorgt der elektronische Anteil der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi_{NR}^{(3)}$ für die Erzeugung neuer Frequenzkomponenten durch verschiedene Vier-Wellen-Mischprozesse (FWM). Im spektralen Beobachtungsfenster der FSRM (graue Boxen) werden zwei unterschiedliche FWM-Prozesse beobachtet.

Die in der FSRM verwendeten Laserimpulse – der Raman-Pumpimpuls (Frequenz ω_P) sowie der spektral breite Abtastimpuls (Frequenzkomponenten ω) – interagieren mit einer Raman-aktiven Probe (Schwingungsfrequenz ω_i). Der resonante Beitrag der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi_R^{(3)}$ vermittelt die kohärenten Raman-Prozesse SRL, SRG sowie CSRS. Darüber hinaus werden neue Frequenzkomponenten in unterschiedlichen Vier-Wellen-Misch-

¹ engl. coherent Stokes Raman scattering

prozessen zwischen dem Pumpimpuls und den Frequenzkomponenten ω_1, ω_2 des spektral breiten Abtastimpulses erzeugt [Plo11]. Im spektralen Beobachtungsfenster der FSRM (graue Box) tragen zwei Prozesse bei. Auf der Stokes-Seite treten vier weitere FWM-Prozesse auf; sie sind in Abb. 5.1 stellvertretend durch einen FWM-Prozess dargestellt. Sie werden, ebenso wie der Signalbeitrag von CSRS, in FSRM nicht registriert. Auf der anti-Stokes-Seite hingegen tragen beide FWM-Beiträge abhängig von den experimentellen Gegebenheiten zum gemessenen FSRS-Signal bei. Sie machen sich in Form einer spektralen Interferenz mit dem detektierenden Weißlichtimpuls im FSRS-Spektrum bemerkbar. In der FSRM wird das Auftreten des FWM-Feldes durch die kollineare Strahlführung in der Mikroskopie begünstigt. Für eine leicht gewinkelte Einkopplung der Laserimpulse kann ihr Störbeitrag verglichen zum exponentiell verstärkten Signal des SRS-Prozesses jedoch unterdrückt werden. In der einkanaligen SRS-Mikroskopie [Fre08] hingegen hat der erzeugte FWM-Beitrag keinen spektralen Überlapp; die erzeugten Spektralkomponenten lassen sich leicht vom Raman-Signal trennen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Techniken entwickelt werden, die in der Lage sind, eine spektrale Interferenz erfolgreich zu unterdrücken. Der Effekt lässt sich aber auch gezielt verwenden. So könnte er zur Impulscharakterisierung ultrakurzer Laserimpulse eingesetzt werden, wie es derzeit mit FROG oder SPIDER [Tre97, Iac99] möglich ist. Die spektrale Interferenz zwischen dem detektierenden Weißlichtimpuls und dem erzeugten FWM-Feld eröffnet einen direkten Zugang zur Phase des eingesetzten Raman-Abtastimpulses [Plo11]. Darüber hinaus skaliert die Einhüllende der Modulation mit der Amplitude der am Fokus des Mikroskops anwesenden spektralen Komponenten des Femtosekunden-Impulses. Aus einer spektralen Abweichung dieses Spektrums bezüglich des Weißlichtspektrums könnten mögliche Abbildungsfehler, wie beispielsweise die chromatische Abberation des abbildenden Systems ermittelt werden. Darüber hinaus eignet sich dieser Effekt zur Materialcharakterisierung. So skaliert die Amplitude der spektralen Modulation direkt mit der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi^{(3)}$ und somit dem nichtlinearen Brechungsindex n_2 des Mediums. Anstelle von DFWM- oder z-Scan-Methoden [Hag88, SB90] könnte dieser Effekt zur Bestimmung der Nichtlinearität von Raman-inaktiven, optischen Materialien herangezogen werden.

Für den Einsatz der FSRM zur chemischen Bildgebung an bio-medizinischen Systemen wurde eine neue Laserquelle entwickelt. Diese basiert auf der Kombination eines spektral superbreitbandigen Laseroszillators mit einem faserbasierten Verstärker und nutzt den nahinfraroten Spektralbereich zur Untersuchung von Proben. Dies ist nicht nur für biologische Materialien von Vorteil [Nie04], sondern auch in Bezug auf die spektralen Modulationen. Der nichtresonante Anteil der nichtlinearen Suszeptibilität $\chi_{NR}^{(3)}$ erfährt im nahinfraroten Spektralbereich eine geringere Verstärkung [Eva08]. Der störende Einfluss der FWM-Prozesse in FSRM ist folglich gemindert. Die hohe Repetitionsrate der neuen Laserquelle hat geringere Spitzenintensitäten der eingesetzten Laserimpulse zur Folge, wodurch mögliche Photoschäden an biologischen Materialien erheblich verringert werden können. Die hohe, spektrale Stabilität des Laseroszillators und somit der Raman-Abtastimpulse erlaubt eine schnellere Aufnahme der Spektren (mit einer Breite von mehr als 3000 cm^{-1}), welche derzeit 10 ms pro Bildpunkt beträgt. Durch den Einsatz eines Vielkanaldetektors mit schnellerer Ausleserate könnte die Repetitionsrate des Lasers im MHz-Bereich besser genutzt und die Bildwiederhol-

rate in der FSRM deutlich erhöht werden. Der aktuelle Aufbau besitzt eine spektrale Auflösung von 18 cm^{-1} sowie eine laterale Auflösung von unter $1 \mu\text{m}$.

Die neue Laserquelle ist somit genau auf die Anforderung der Zellbiologie und Histologie ausgerichtet. Sie ermöglicht es, die analytischen Fähigkeiten der FSRM zur chemischen Bildgebung an Gewebe einzusetzen. Es gilt zunächst morphologische Unterschiede verschiedener Zelltypen auch auf molekularer Ebene nachzuzeichnen. Das detektierte FSRM-Signal gleicht einer chemischen Momentaufnahme der Probe im Fokus. Sie erfasst sowohl die einzelnen Zellkompartimente des zellulären Bausteins, als auch dessen aktuellen metabolischen Zustand. Multivariate Datenanalysemethoden können hierbei helfen, Unterschiede zwischen verschiedenen Gewebesorten sichtbar zu machen [Sal09]. Aufbauend auf diesen Studien könnte die FSRM die Histologie im Bereich der morphologischen Diagnostik unterstützen, bei der Gewebeproben allein aufgrund ihrer Erscheinung sowie ihres Verhaltens gegenüber verschiedener Farbstoffe beurteilt werden. In vielen Krankheitsverläufen geht die chemische Veränderung einer morphologischen Strukturänderung des Gewebes voraus. Die FSRM könnte in der Histopathologie daher zur Frühdiagnostik eingesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass spontane Raman-Mikroskopie zur Klassifizierung verschiedener Tumorarten geeignet ist, jedoch durch geringe Signalniveaus limitiert ist [Don10]. Das schwache Raman-Signal biologischen Gewebes [Kra09a] kann hierbei vom verstärkten Signalniveau [Sli10, Kuk07] der stimulierten Raman-Streuung profitieren. Die geringe Aufnahmezeiten pro Bildpunkt konnte inzwischen eindrucksvoll zur bio-medizinischen Bildgebung [Fre08, Saa10a, Saa11b] *in vivo* eingesetzt werden. Neben der bio-medizinischen Diagnostik könnte die FSRM auch zur Klassifizierung und schnellen Identifizierung verschiedener Mikroorganismen [WE09], wie beispielsweise Bakterien verwendet werden. Weitere Einsatzgebiete der FSRM liegen sicherlich auch im Bereich der Materialwissenschaften oder Festkörperphysik. So könnte sie bei der Charakterisierung und Optimierung von Lochleitermaterial in porösen Schichten [Sch09], wie sie in Solarzellen eingesetzt werden [Rob06], Anwendung finden. Polymerbasierte Solarzellen [Kro02] zeigen bei anhaltender Bestrahlung und dem damit verbundenen Ladungstransport ein einsetzendes Degradieren der photoaktiven Schichten. Die FSRM könnte deren thermische beziehungsweise photochemische Zersetzung orts aufgelöst untersuchen und damit zur besseren Fertigung photoaktiver Schichten beitragen. Ein Einsatz in der Polymerforschung ist somit ebenso denkbar. FSRM jedenfalls ist eine vielseitige Methode, die Einblicke in verschiedene physikalische sowie chemische Systeme auf molekularer Ebene vermittelt. Sie besitzt großes Potential als analytisches Werkzeug in der medizinischen Diagnostik und wird voraussichtlich auch in Zukunft eine bedeutende Rolle in der chemisch sensitiven Bildgebung spielen.

Anhang

Technik	Laterale Auflösung / nm	Referenz
CARS	100	[Pet10]
CLSM	180-250	[Sch10a, Hor08]
Confocal Raman	250	[Day11]
FTIR / IR microscopy	2500-20000	[Pet10]
Multiphoton	250	[Squ01, Zip03, Pet10]
<i>TPF</i>	250	[Squ01, Zip03]
<i>ThPF</i>	290	[Chu05]
<i>SHG</i>	250	[Squ01, Zip03]
<i>THG</i>	230	[Chu05]
Optical microscopy	250-350	[Hor08]
PALM	20-50	[Sch10a]
SERS	350	[Sch10b]
SSIM	50	[Sch10a]
SRS	250-350	[Plo07a]
SSIM	50	[Hei02, Gus05]
STED	~ 10	[Sch10a, Pet10, Rit09]
STORM	20-50	[Sch10a]
TERS	50	[Bai08]

Tabelle 1: Laterale Auflösung lichtmikroskopischer Techniken, dargestellt in Abbildung 1.1.

Abkürzungsverzeichnis

Der überwiegende Teil der Abkürzungen stammt aus dem Englischen. Die deutsche Übersetzung ist in diesem Fall kursiv angegeben.

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
APD	Avalanche-Photodiode
ATP	Adenosintriphosphat
A/D	Analog-Digital(-Wandlung)
CARS	coherent anti-Stokes Raman scattering <i>Kohärente anti-Stokes Raman-Streuung</i>
mCARS	multiplexed CARS - <i>Breitband-CARS</i>
scCARS	single-channel CARS - <i>einkanaliges CARS</i>
CCD	charge-coupled device - <i>ladungsgekoppeltes Bauteil</i>
CF	confocal fluorescence microscopy - <i>konfokale Fluoreszenzmikroskopie</i>
CLSM	confocal laser scanning microscopy - <i>konfokale laserscannende Mikroskopie</i>
CMOS	complementary metal oxide semiconductor <i>komplementär-symmetrischer Metall-Oxid-Halbleiter</i>
CPA	chirped pulse amplifier - <i>Verstärker gechirpter Impulse</i>
CSRS	coherent Stokes Raman scattering - <i>Kohärente Stokes Raman-Streuung</i>
DFWM	degenerated Four-wave mixing - <i>entartetes Vier-Wellen-Mischen</i>
DNA	desoxyribonucleic acid - <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
FROG	frequency resolved optical gating - <i>frequenz-aufgelöstes optisches Schalten</i>
FSRS	Femtosekunden-stimulierte Raman-Streuung
FSRM	Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
FWM	Four-wave mixing - <i>Vier-Wellen-Mischen</i>
HCA	hierarchical cluster analysis - <i>Hierarchische Clusteranalyse</i>
IR	Infrarot
LUT	look-up table - <i>Farbtabelle</i>
OPA	optical parametric amplifier - <i>optisch parametrischer Verstärker</i>

OPO	optical parametric oscillator - <i>optisch parametrischer Oszillator</i>
NA	Numerische Apertur
NIR	Nah-Infrarot
PALM	photoactivation localization microscopy <i>photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie</i>
PC	principal component - <i>Hauptkomponente</i>
PCA	principal component analysis - <i>Hauptkomponentenanalyse</i>
PMT	photomultiplier tube - <i>Photoelektronenvervielfacher</i>
PPLN	periodic poled lithium niobate - <i>periodisch gepoltes Lithiumniobat</i>
PS	Polystyrol
RIKE	Raman-induzierter Kerr-Effekt
OHD-RIKE	optical heterodyne-detected Raman-induced Kerr effect <i>Optisch heterodyn detektierter, Raman-induzierter Kerr-Effekt</i>
RMS	root mean square - <i>quadratisches Mittel</i>
RNA	ribonucleic acid - <i>Ribonukleinsäure</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
RRS	resonance Raman scattering - <i>resonante Raman-Streuung</i>
SCG	supercontinuum generation - <i>Superkontinuumserzeugung</i>
SEM	scanning electron microscopy - <i>Rasterelektronenmikroskopie</i>
SERS	surface-enhanced Raman scattering - <i>oberflächenverstärkte Raman-Streuung</i>
SHG	second harmonic generation - <i>Frequenzverdopplung</i>
SIMS	secondary ion mass spectroscopy - <i>Sekundärionen-Massenspektroskopie</i>
SLM	spatial light modulator - <i>räumlicher Lichtmodulator</i>
SNOM	scanning near-field optical microscopy - <i>optische Rasternahfeldmikroskopie</i>
SPIDER	spectral phase interferometry for direct electric field reconstruction <i>Spektrale Phaseninterferometrie zur direkten Rekonstruktion des elektrischen Feldes</i>
SRG	stimulated Raman gain - <i>stimulierte Raman-Verstärkung</i>
SRL	stimulated Raman loss - <i>stimulierte Raman-Abnahme</i>
SRS	stimulated Raman scattering - <i>stimulierte Raman-Streuung</i>
scSRS	single-channel SRS - <i>einkanaliges SRS</i>
STE-SRS	spectrally tailored excitation SRS - <i>spektral manipulierte Anregungs-SRS</i>
SSIM	saturated structured illumination microscopy <i>gesättigte strukturierte Beleuchtungsmikroskopie</i>

STED	stimulated emission depletion - <i>stimulierte Emissionsabregung</i>
STM	scanning tunneling microscopy - <i>Rastertunnelmikroskopie</i>
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy <i>stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie</i>
SVA	slowly varying amplitude - <i>langsam veränderliche Amplitude</i>
SVD	singular value decomposition - <i>Singularwertzerlegung</i>
TERS	tip-enhanced Raman scattering - <i>spitzenverstärkte Raman-Streuung</i>
TEM	transmission electron microscopy - <i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>
THG	third harmonic generation - <i>Frequenzverdreifachung</i>
TIRF	total internal reflection fluorescence - <i>interne Totalreflexionsfluoreszenz</i>
TPA	two photon absorption - <i>2-Photonen-Absorption</i>
TPE	two photon excitation - <i>2-Photonen-Anregung</i>
TPF	two photon fluorescence - <i>2-Photonen-Fluoreszenz</i>
ThPF	three photon fluorescence - <i>3-Photonen-Fluoreszenz</i>
URLS	ultrafast Raman loss scattering - <i>Ultraschnelle Raman-Loss-Streuung</i>
UV	Ultraviolett
VIS	visible - <i>sichtbar</i>
Yb	Ytterbium
$\chi^{(1)}$	Optische Suszeptibilität
$\chi^{(n)}$	Nichtlineare Suszeptibilität n. Ordnung
XPM	cross-phase modulation - <i>Kreuzphasenmodulation</i>

Einheiten

Hertz Hz	Frequenzeinheit
<i>kHz</i>	<i>Kilohertz</i>
<i>MHz</i>	<i>Megahertz</i>
Joule J	Energieeinheit
<i>mJ</i>	<i>Millijoule</i>
<i>μJ</i>	<i>Mikrojoule</i>
<i>nJ</i>	<i>Nanojoule</i>
<i>pJ</i>	<i>Pikojoule</i>
Meter m	Längeneinheit
<i>mm</i>	<i>Millimeter</i>
<i>μm</i>	<i>Mikrometer</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
Sekunde s	Zeiteinheit
<i>ms</i>	<i>Millisekunde</i>
<i>μs</i>	<i>Mikrosekunde</i>
<i>ns</i>	<i>Nanosekunde</i>
<i>ps</i>	<i>Pikosekunde</i>
<i>fs</i>	<i>Femtosekunde</i>
Watt W	Leistungseinheit
<i>mW</i>	<i>Milliwatt</i>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

1.1	Einsatzbereich lichtmikroskopischer Verfahren in der Zellbiologie	3
2.1	Schema des CARS-Prozesses	12
2.2	Einfluss des nichtresonanten Beitrags in CARS.	15
2.3	FSRS-Experiment	16
2.4	Schematisches FSRS-Spektrum	18
2.5	Schema des SRS-Prozesses	19
2.6	Raman-Suszeptibilität $\chi_R^{(3)}$	21
2.7	Linearität des FSRS-Signals auf Stokes- und anti-Stokes-Seite	23
2.8	Datenverarbeitung in der FSRM	26
2.9	Univariate Datenauswertung in der FSRM	27
2.10	Potential der multivariaten Datenauswertung	28
2.11	PCA-Analyse in der FSRM	32
3.1	Prinzip eines FSRS-Mikroskops	38
3.2	Konzept der kHz-Laserquelle	39
3.3	Konzept der MHz-Laserquelle	41
4.1	Spektrale Modulationen im FSRS-Spektrum von Benzonitril	54
5.1	Beteiligte $\chi^{(3)}$ -Prozesse in der FSRM	71

Tabellen

1	Laterale Auflösung lichtmikroskopischer Techniken	75
---	---	----

Literaturverzeichnis

- [Abb73a] E. ABBE. *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Archiv für Mikroskopische Anatomie 9:413–468, 1873. 2
- [Abb73b] E. ABBE. *Ueber einen neuen Beleuchtungsapparat am Mikroskop*. Archiv für Mikroskopische Anatomie 9:469–480, 1873. 2
- [AH21] AL-HAZEN. *Kitab-al-Manadhirn — Opticae thesaurus*, 1021. 1
- [Alb02] B. ALBERTS, Herausgeber. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 4 Auflage, 2002. 4
- [Alf89] R. ALFANO, Herausgeber. *The Supercontinuum Laser Source*. Springer, New York, 1 Auflage, 1989. 39
- [Ali09] E. ALI, H. EDWARDS, I. SCOWEN. *Raman spectroscopy and security applications: the detection of explosives and precursors on clothing*. J. Raman Spectrosc. 40(12):2009–2014, 2009. 7
- [And06] E. ANDRESEN, S. KEIDING, E. POTMA. *Picosecond anti-Stokes generation in a photonic-crystal fiber for interferometric CARS microscopy*. Opt. Express 14(16):7246–7251, 2006. 15
- [Bac67] R. BACON. *Opus Majus*, 1267. 1
- [Bac08] K. BACKHAUS, B. ERICHSON, W. PLINKE, R. WEIBER. *Multivariate Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 12 Auflage, 2008. 29
- [Bai08] E. BAILO, V. DECKERT. *Tip-enhanced Raman scattering*. Chem. Soc. Rev. 37(5):921–930, 2008. 75
- [Beg74] R. BEGLEY, A. HARVEY, R. YER. *Coherent anti-Stokes Raman-Spectroscopy*. Appl. Phys. Lett. 25(7):387–390, 1974. 11
- [Beg09] S. BEGIN, E. BELANGER, S. LAFFRAY, R. VALLEE, D. COTE. *In vivo optical monitoring of tissue pathologies and diseases with vibrational contrast*. J. Biophotonics 2(11):632–642, 2009. 7
- [Bio09] S. BIOLETTI, R. LEAHY, J. FIELDS, B. MEEHAN, W. BLAU. *The examination of the Book of Kells using micro-Raman spectroscopy*. J. Raman Spectrosc. 40(8):1043–1049, 2009. 7

- [Blo64] N. BLOEMBERGEN, Y. SHEN. *Coupling between vibrations + light waves in Raman laser media*. Phys. Rev. Lett. 12(18):504, 1964. 18
- [Blo67] N. BLOEMBERGEN. *The stimulated Raman effect*. Am. J. Phys. 35:989–1023, 1967. 16
- [Blo87] N. BLOEMBERGEN. *A Quarter century of stimulated Raman scattering*. Pure Appl. Chem. 59(10):1229–1236, 1987. 16
- [Bon09] M. BONN, M. MÜLLER, H. RINIA, K. BURGER. *Imaging of chemical and physical state of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy*. J. Raman Spectrosc. 40(7):763–769, 2009. 12
- [Boy92] R. BOYD, Herausgeber. *Nonlinear Optics*. Acad. Press, Boston, 1 Auflage, 1992. 13, 18, 19, 20, 21, 22
- [Bro66] R. BROWN. *Miscellaneous Botanical Works, Vol. I*, Kapitel On the Organs and Mode of Fecundation of Orchidex and Asclepiadea, 1866. 1
- [Bur06] O. BURKACKY, A. ZUMBUSCH, C. BRACKMANN, A. ENEJDER. *Dual-pump coherent anti-Stokes-Raman scattering microscopy*. Opt. Lett. 31(24):3656–3658, 2006. 15
- [Cha09] J. CHAN, D. LIEU. *Label-free biochemical characterization of stem cells using vibrational spectroscopy*. J. Biophotonics 2(11):656–668, 2009. 7
- [Che01a] J. CHENG, L. BOOK, X. XIE. *Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Opt. Lett. 26(17):1341–1343, 2001. 15
- [Che01b] J. CHENG, A. VOLKMER, L. BOOK, X. XIE. *An epi-detected coherent anti-stokes raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity*. J. Phys. Chem. B 105(7):1277–1280, 2001. 15
- [Che04] J. CHENG, X. XIE. *Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications*. J. Phys. Chem. B 108(3):827–840, 2004. 5, 6, 14, 15
- [Che07] J. CHENG. *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*. Appl. Spectrosc. 61(9):197A–208A, 2007. 15
- [Chi09] H. CHIANG, F. PENG, S. HUNG, Y. FENG. *In situ Raman spectroscopic monitoring of hydroxyapatite as human mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts*. J. Raman Spectrosc. 40(5):546–549, 2009. 7
- [Chu05] S. CHU, S. TAI, C. HO, C. LIN, C. SUN. *High-resolution simultaneous three-photon fluorescence and third-harmonic-generation microscopy*. Microsc. Res. Techniq. 66(4):193–197, 2005. 75

- [Clu09] G. CLUFF, M. SHORT, H. LUI, D. MCLEAN, H. ZENG, M. KORBELIK, M. CHEN. *Comparison of connective tissue invaded by Lewis lung carcinoma to healthy connective tissue by means of micro-Raman spectroscopy*. J. Raman Spectrosc. 40(8):1087–1090, 2009. 29
- [Co10] D. CO, J. LOCKARD, D. MCCAMANT, M. WASIELEWSKI. *Narrow-bandwidth tunable picosecond pulses in the visible produced by noncollinear optical parametric amplification with a chirped blue pump*. Appl. Opt. 49(10):1880–1885, 2010. 39
- [Col09] P. COLOMBAN, A. TOURNIE, P. RICCIARDI. *Raman spectroscopy of copper nanoparticle-containing glass matrices: ancient red stained-glass windows*. J. Raman Spectrosc. 40(12):1949–1955, 2009. 7
- [Cou07] A. COUAIRON, A. MYSYROWICZ. *Femtosecond filamentation in transparent media*. Physics Reports 441(2 – 4):47 – 189, 2007. 39, 55
- [Cui09] M. CUI, B. BACHLER, J. OGILVIE. *Comparing coherent and spontaneous Raman scattering under biological imaging conditions*. Opt. Lett. 34(6):773–775, 2009. 8
- [Dav10] M. DAVIDSON. *Pioneers in optics: Giovanni Battista Amici and Girolamo Cardano*. Microsc. Today 18:50–52, 2010. 2
- [Day11] 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 115:7713–7725, 2011. 4, 11, 12, 14, 75
- [Den90] W. DENK, J. STRICKLER, W. WEBB. *2-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science 248(4951):73–76, 1990. 5
- [Dja07] N. DJAKER, P. LENNE, D. MARGUET, A. COLONNA, C. HADJUR, H. RIGNEAULT. *Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy (CARS): Instrumentation and applications*. Nucl. Instrum. Meth. A 571(1-2):177 – 181, 2007. 12
- [Don10] P. DONFACK, M. REHDERS, K. BRIX, P. BOUKAMP, A. MATERNY. *Micro Raman spectroscopy for monitoring alterations between human skin keratinocytes HaCaT and their tumorigenic derivatives A5RT3 – toward a Raman characterization of a skin carcinoma model*. J. Raman Spectrosc. 41(1):16–26, 2010. 73
- [Dre10] M. DRESSELHAUS, A. JORIO, R. SAITO. *Characterizing Graphene, Graphite, and Carbon Nanotubes by Raman Spectroscopy*. Annu. Rev. Condens. Matter Phys. 1:89–108, 2010. 7
- [Dud06] J. DUDLEY, G. GENTY, S. COEN. *Supercontinuum generation in photonic crystal fiber*. Rev. Mod. Phys. 78(4):1135–1184, 2006. 39
- [Dun82] M. DUNCAN, J. REINTJES, T. MANUCCIA. *Scanning coherent anti-stokes raman microscope*. Opt. Lett. 7(8):350–352, 1982. 11

- [Eck62] G. ECKHARDT, R. HELLWARTH, F. MCCLUNG, S. SCHWARZ, D. WEINER, E. WOODBURY. *Stimulated Raman Scattering From Organic Liquids*. Phys. Rev. Lett. 9(11):455–457, 1962. 16
- [Eva04] C. EVANS, E. POTMA, X. XIE. *Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility $\chi^{(3)}$ for vibrational microscopy*. Opt. Lett. 29(24):2923–2925, 2004. 15
- [Eva05] C. EVANS, E. POTMA, M. PUORIS’HAAG, D. COTE, C. LIN, X. XIE. *Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(46):16807–16812, 2005. 12
- [Eva08] C. EVANS, X. XIE. *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine*. Annu. Rev. Anal. Chem. 1:883–909, 2008. 7, 11, 12, 15, 35, 72
- [Fan10] C. FANG, F. LU, W. ZHENG, Z. HUANG. *Triple-frequency symmetric subtraction scheme for nonresonant background suppression in coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy*. Opt. Express 18(15):15714–15724, 2010. 15
- [Far98] M. FARQUHARA, G. PALADE. *The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy*. Trends in Cell Biology 8(1):2–10, 1998. 2, 4
- [Fre08] C. FREUDIGER, W. MIN, B. SAAR, S. LU, G. HOLTOM, C. HE, J. TSAI, J. KANG, X. XIE. *Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy*. Science 322(5909):1857–1861, 2008. v, vii, 8, 16, 22, 36, 53, 72, 73
- [Fre11] C. FREUDIGER, W. MIN, G. HOLTOM, B. XU, M. DANTUS, X. XIE. *Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy*. Nat. Photon. 5(2):103–109, 2011. 36, 37
- [Fri00] E. FRIXIONE. *Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: A 300-year epic*. Cell Motil. Cytoskeleton 46(2):73–94, 2000. 4, 5
- [Fro11] R. FRONTIERA, R. MATHIES. *Femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. Laser Photon. Rev. 5(1):102–113, 2011. 7, 16
- [Fu04] L. B. FU, M. IBSEN, D. J. RICHARDSON, D. N. PAYNE. *977-nm all-fiber DFB laser*. IEEE Photonic Tech. Lett. 16(11):2442–2444, 2004. 41
- [Fu08] Y. FU, T. HUFF, H. WANG, H. WANG, J. CHENG. *Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Opt. Express 16(24):19396–19409, 2008. 12

- [Gam10] A. GAMBETTA, V. KUMAR, G. GRANCINI, D. POLLI, R. RAMPONI, G. CERULLO, M. MARANGONI. *Fiber-format stimulated-Raman-scattering microscopy from a single laser oscillator*. *Opt. Lett.* 35(2):226–228, 2010. 8, 16, 36, 37
- [Gan06] F. GANIKHANOV, C. EVANS, B. SAAR, X. XIE. *High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy*. *Opt. Lett.* 31(12):1872–1874, 2006. 15
- [Gel96] P. GELADI, H. GRAHN. *Multivariate Image Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1 Auflage, 1996. 29
- [Gus05] M. GUSTAFSSON. *Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(37):13081–13086, 2005. 75
- [Hag88] D. HAGAN, E. CANTO, E. MEISAK, M. SOILEAU, E. VAN STRYLAND. *Pico-second degenerate four-wave mixing studies in ZnSe*. In *Tech. Dig. Conf. Lasers Electro-Opt.*, Band 7, Seite 160. Anaheim, CA, 1988. 72
- [Ham08] K. HAMADA, K. FUJITA, N. SMITH, M. KOBAYASHI, Y. INOUE, S. KAWATA. *Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells*. *J. Biomed. Opt.* 13(4):044027, 2008. 25
- [Hec00] B. HECHT, B. SICK, U. WILD, V. DECKERT, R. ZENOBI, O. MARTIN, D. POHL. *Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications*. *J. Chem. Phys.* 112(18):7761–7774, 2000. 5
- [Hed10] M. HEDEGAARD, C. KRAFFT, H. DITZEL, L. JOHANSEN, S. HASSING, J. POPP. *Discriminating Isogenic Cancer Cells and Identifying Altered Unsaturated Fatty Acid Content as Associated with Metastasis Status, Using K-Means Clustering and Partial Least Squares-Discriminant Analysis of Raman Maps*. *Anal. Chem.* 82(7):2797–2802, 2010. 29
- [Hei02] R. HEINTZMANN, T. JOVIN, C. CREMER. *Saturated patterned excitation microscopy — a concept for optical resolution improvement*. *J. Opt. Soc. Am. A* 19(8):1599–1609, 2002. 75
- [Hel63] R. HELLWARTH. *Theory of stimulated Raman scattering*. *Phys. Rev.* 1(5):1850, 1963. 18
- [His11] *History of optical microscopes*. ©Encyclopedia Britannica, Inc., Jun 2011.
URL <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/380582/microscope/275736/History-of-optical-microscopes> 1
- [Hoo65] R. HOOKE. *Micrographia*, 1665. 1
- [Hop01] A. HOPT, E. NEHER. *Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy*. *Biophys. J.* 80(4):2029–2036, 2001. v, vii, 5, 6, 7, 35, 40

- [Hor08] G. HORNYAK, J. DUTTA, H. TIBBALS, A. RAO, Herausgeber. *Introduction to Nanoscience*. CRC Press - Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, Florida, 1. Auflage, 2008. 75
- [Hua03] Y. HUANG, T. KARASHIMA, M. YAMAMOTO, H. HAMAGUCHI. *Molecular-level pursuit of yeast mitosis by time- and space-resolved Raman spectroscopy*. *J. Raman Spectrosc.* 34:1–3, 2003. 7
- [Hua04] Y. HUANG, T. KARASHIMA, M. YAMAMOTO, T. OGURA, H. HAMAGUCHI. *Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell*. *J. Raman Spectrosc.* 35:525–526, 2004. 7
- [Huf08] T. HUFF, Y. SHI, Y. FU, H. WANG, J. CHENG. *Multimodal nonlinear optical microscopy and applications to central nervous system imaging*. *IEEE J. Sel. Top. Quant.* 14(1):4–9, 2008. 12
- [Iac99] C. IACONIS, I. WALMSLEY. *Self-referencing spectral interferometry for measuring ultrashort optical pulses*. *IEEE J. Quantum Electron.* 35(4):501–509, 1999. 72
- [Imi11] J. IMITOLA, D. COTE, S. RASMUSSEN, X. XIE, Y. LIU, T. CHITNIS, R. SIDMAN, C. LIN, S. KHOURY. *Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction in multiple sclerosis-like lesions in mice*. *J. Biomed. Opt.* 16(2):021109, 2011. 12
- [Ish68] H. ISHIKAWA, R. BISCHOFF, H. HOLTZER. *Mitosis and intermediate filament-sized filaments in developing skeletal muscle*. *J. Cell Biol.* 38:538–555, 1968. 4
- [Jes01] H. JESSEN, H. SCHULZE, Herausgeber. *Botanik in Frage und Antwort: über 1300 Fragen und Antworten*. Schaper, Alfeld; Hannover, 15. Auflage, 2001. 1
- [Jin04] S. JIN, Y. LEE, J. YU, S. KIM. *Development of femtosecond stimulated Raman spectroscopy: stimulated Raman gain via elimination of cross phase modulation*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 25(12):1829–1832, 2004. 8, 53
- [Jon64] W. JONES, B. STOICHEFF. *Inverse Raman Spectra: Induced Absorption at Optical Frequencies*. *Phys. Rev. Lett.* 15:657–659, 1964. 16
- [Jur11] M. JURNA, J. HEREK, H. OFFERHAUS. *Implementation of vibrational phase contrast coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. *Appl. Opt.* 50(13):1839–1842, 2011. 14, 15
- [Kai72] W. KAISER, M. MAIER. *Laser Handbook*. North-Holland, Amsterdam, 1972. 16
- [Kan09] E. KANTER, S. MAJUMDER, E. VARGIS, A. ROBICHAUX-VIEHOEVER, G. KANTER, H. SHAPPELL, H. JONES, A. MAHADEVAN-JANSEN. *Multiclass discrimination of cervical precancers using Raman spectroscopy*. *J. Raman Spectrosc.* 40(2):205–211, 2009. 29

- [Kat96] J. E. KATON. *Infrared microspectroscopy. A review of fundamentals and applications*. Micron 27(5):303–314, 1996. 6
- [Kes07] W. KESSLER. *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1 Auflage, 2007. 28, 29, 30
- [Kol07] F. KOLLER, K. HAISER, M. HUBER, T. SCHRADER, N. REGNER, W. SCHREIER, W. ZINTH. *Generation of narrowband subpicosecond mid-infrared pulses via difference frequency mixing of chirped near-infrared pulses*. Opt. Lett. 32(22):3339–3341, 2007. 39
- [Kon10] S. KONOROV, M. BLADES, R. TURNER. *Lorentzian Amplitude and Phase Pulse Shaping for Nonresonant Background Suppression and Enhanced Spectral Resolution in Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy and Microscopy*. Appl. Spectrosc. 64(7):767–774, 2010. 15
- [Kra06] C. KRAFFT, V. SERGO. *Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues*. Spectr.-Int. J. 20(5-6):195–218, 2006. 7
- [Kra09a] C. KRAFFT, B. DIETZEK, J. POPP. *Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues*. Analyst 134(6):1046–1057, 2009. v, vii, 7, 11, 12, 15, 73
- [Kra09b] C. KRAFFT, G. STEINER, C. BELEITES, R. SALZER. *Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy*. J. Biophotonics 2(1-2):13–28, 2009. 29
- [Kra11] C. KRAFFT, M. DIDERHOSHAN, P. RECKNAGEL, M. MILJKOVIC, M. BAUER, J. POPP. *Crisp and soft multivariate methods visualize individual cell nuclei in Raman images of liver tissue sections*. Vib. Spectrosc. 55(1):90–100, 2011. 29, 33
- [Kro02] J. M. KROON, M. WIENK, W. VERHEES, J. HUMMELEN. *Accurate efficiency determination and stability studies of conjugated polymer/fullerene solar cells*. Thin Solid Films 403-404:223–228, 2002. 73
- [Kuk03] P. KUKURA, D. MCCAMANT, P. DAVIS, R. MATHIES. *Vibrational structure of the S-2 (1B(u)) excited state of diphenyloctatetraene observed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. Chem. Phys. Lett. 382:81–86, 2003. 8, 53
- [Kuk07] P. KUKURA, D. MCCAMANT, R. MATHIES. *Femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. Annu. Rev. Phys. Chem. 58:461–488, 2007. v, vii, 7, 16, 22, 37, 53, 73
- [Lai06] S. LAIMGRUBER, H. SCHACHENMAYR, B. SCHMIDT, W. ZINTH, P. GILCH. *A femtosecond stimulated Raman spectrograph for the near ultraviolet*. Appl. Phys. B 85(4):557–564, 2006. 22, 39
- [Lak06] J. R. LAKOWICZ, Herausgeber. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, NY, 3 Auflage, 2006. 6

- [Lan09] W. LANGBEIN, I. ROCHA-MENDOZA, P. BORRI. *Coherent anti-Stokes Raman micro-spectroscopy using spectral focusing: theory and experiment*. J. Raman Spectrosc. 40(7):800–808, 2009. 15
- [Las04] P. LASCH, W. HAENSCH, D. NAUMANN, M. DIEM. *Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis*. Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1688(2):176–186, 2004. 29
- [Lau78] A. LAUBEREAU, W. KAISER. *Vibrational dynamics of liquids and solids investigated by picosecond light pulses*. Rev. Mod. Phys. 50(3):607–665, 1978. 16
- [Le 09] E. C. LE RU, P. G. ETCHEGOIN, Herausgeber. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1 Auflage, 2009. 7
- [Le07] T. LE, I. LANGOHR, M. LOCKER, M. STUREK, J. CHENG. *Label-free molecular imaging of atherosclerotic lesions using multimodal nonlinear optical microscopy*. J. Biomed. Opt. 12(5):054007, 2007. 12
- [Lee04] S. LEE, D. ZHANG, D. MCCAMANT, P. KUKURA, R. MATHIES. *Theory of femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. J. Chem. Phys. 121(8):3632–3642, 2004. 18, 19
- [Lev79] B. LEVINE, C. SHANK, J. HERITAGE. *Surface vibrational spectroscopy using stimulated Raman scattering*. IEEE J. Quantum Electron. 15:1418–1432, 1979. 16
- [Lia10] F. LIANG, B. CHEN. *A Review on Biomedical Applications of Single-Walled Carbon Nanotubes*. Curr. Med. Chem. 17(1):10–24, 2010. 7
- [Liu09] Y. LIU, Y. LEE, M. CICERONE. *Fast extraction of resonant vibrational response from CARS spectra with arbitrary nonresonant background*. J. Raman Spectrosc. 40(7):726–731, 2009. 15
- [Lo06] S. LO, C. LEE, H. LAI. *The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings*. Cell Research 16:530–538, 2006. 1
- [Lon02] D. A. LONG, Herausgeber. *The Raman Effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1 Auflage, 2002. 7, 11, 15
- [Lor02] M. LORENC, M. ZIOLEK, R. NASKRECKI, J. KAROLCZAK, J. KUBICKI, A. MACIEJEWSKI. *Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy*. Appl. Phys. B 74(1):19–27, 2002. 54, 55
- [Lot76] H. LOTEM, R. LYNCH, N. BLOEMBERGEN. *Interference between Raman resonances in 4-wave difference mixing*. Phys. Rev. A 14(5):1748–1755, 1976. 13
- [Lou63] R. LOUDON. *Theory of stimulated Raman scattering from lattice vibrations*. Proc. Phys. Soc. Lond. 82(527):393, 1963. 18

- [Mak65] P. MAKER, R. TERHUNE. *Study of optical effects due to an induced polarization third order in electric field strength*. Phys. Rev. 137(3A):A801–A818, 1965. 11
- [Mar10] M. MARROCCO. *Vectorial descriptions of nonlinear Raman microscopy*. J. Raman Spectrosc. 41(8):882–889, 2010. 18
- [Mat07] C. MATTHÄUS, T. CHERNENKO, J. NEWMARK, C. WARNER, M. DIEM. *Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microscopy*. Biophys. J. 93(2):668–673, 2007. 6, 28, 29
- [McC03] D. MCCAMANT, P. KUKURA, R. MATHIES. *Femtosecond broadband stimulated Raman: A new approach for high-performance vibrational spectroscopy*. Appl. Spectrosc. 57(11):1317–1323, 2003. v, vii, 17, 22, 53
- [McG08] C. MCGOVERIN, T. RADES, K. GORDON. *Recent Pharmaceutical Applications of Raman and Terahertz Spectroscopies*. J. Pharm. Sci. 97(11):4598–4621, 2008. 7
- [Meh09] R. MEHLENBACHER, B. LYONS, K. WILSON, Y. DU, D. MCCAMANT. *Theoretical analysis of anharmonic coupling and cascading Raman signals observed with femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. J. Chem. Phys. 131(24):244512, 2009. 18
- [Mey11] T. MEYER, N. BERGNER, C. BIELECKI, C. KRAFFT, D. AKIMOV, B. ROMEIKE, R. REICHART, R. KALFF, B. DIETZEK, J. POPP. *Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis*. J. Biomed. Opt. 16(2):021113, 2011. 12
- [Mil02] D. MILLAR, I. MILLAR, J. MILLAR, M. MILLAR. *The Cambridge dictionary of scientists*. Cambridge University Press, New York, 2 Auflage, 2002. 1, 2
- [Mil10] M. MILJKOVIĆ, T. CHERNENKO, M. ROMEO, B. BIRD, C. MATTHÄUS, M. DIEM. *Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets*. Analyst 135(8):2002–2013, 2010. 29, 30
- [Min11] W. MIN, C. FREUDIGER, S. LU, X. XIE. *Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy*. Annu. Rev. Phys. Chem. 62:507–530, 2011. 16, 22
- [Muk86] S. MUKAMEL, R. LORING. *Nonlinear response function for time-domain and frequency-domain four-wave mixing*. J. Opt. Soc. Am. B 3(4):595–606, 1986. 13
- [Muk95] S. MUKAMEL, Herausgeber. *Principles of nonlinear optical spectroscopy*. Oxford Univ. Press, New York, 1995. 13, 18
- [Mül07] M. MÜLLER, A. ZUMBUSCH. *Coherent Anti-Stokes Raman scattering microscopy*. ChemPhysChem 8(15):2157–2170, 2007. 7, 11, 12, 14, 15

- [Mul10] M. MULISCH, U. WELSCH, Herausgeber. *Romeis Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 18. Auflage, 2010. 1
- [Nan09] P. NANDAKUMAR, A. KOVALEV, A. VOLKMER. *Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy*. New J. Phys. 11(3):033026 (9pp), 2009. 8, 16, 36
- [Nie04] M. NIEMZ, Herausgeber. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. Springer, Berlin, 3 Auflage, 2004. v, vii, 35, 40, 72
- [Not06] I. NOTINGHER, L. HENCH. *Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro*. Expert Review of Medical Devices 3(2):215–234, 2006. 33
- [Oku08] M. OKUNO, H. KANO, P. LEPROUX, V. COUDERC, H. HAMAGUCHI. *Ultra-broadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared*. Opt. Lett. 33(9):923–925, 2008. 12
- [Ors10] K. ORSEL, E. GARBACIK, M. JURNA, J. KORTERIK, C. OTTO, J. HEREK, H. OFFERHAUS. *Heterodyne interferometric polarization coherent anti-Stokes Raman scattering (HIP-CARS) spectroscopy*. J. Raman Spectrosc. 41(12):1678–1681, 2010. 15
- [Osh10] Y. OSHIMA, H. SHINZAWA, T. TAKENAKA, C. FURIHATA, H. SATO. *Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy*. J. Biomed. Opt. 15(1):017009, 2010. 29
- [Owy77] A. OWYOUNG. *Sensitivity limitations for CW stimulated Raman spectroscopy*. Opt. Commun. 22(3):323–328, 1977. 16, 22
- [Owy78] A. OWYOUNG. *Coherent Raman gain spectroscopy using CW laser sources*. IEEE J. Quantum Electron. 14:192–203, 1978. v, vii, 15, 53
- [Oze09] Y. OZEKI, F. DAKE, S. KAJIYAMA, K. FUKUI, K. ITOH. *Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy*. Opt. Express 17(5):3651–3658, 2009. 8, 16, 22, 36
- [Oze10a] Y. OZEKI, K. ITOH. *Stimulated Raman Scattering Microscopy for Live-Cell Imaging with High Contrast and High Sensitivity*. Laser Phys. 20(5):1114–1118, 2010. 16
- [Oze10b] Y. OZEKI, Y. KITAGAWA, K. SUMIMURA, N. NISHIZAWA, W. UMEMURA, S. KAJIYAMA, K. FUKUI, K. ITOH. *Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses*. Opt. Express 18(13):13708–13719, 2010. 18, 36

- [Par10] S. PAREKH, Y. LEE, K. AAMER, M. CICERONE. *Label-Free Cellular Imaging by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*. *Biophys. J.* 99(8):2695–2704, 2010. 12
- [Pas95] H. PASK, R. CARMAN, D. HANNA, A. TROPPER, C. MACKECHNIE, P. BARBER, J. DAWES. *Ytterbium-doped silica fiber lasers - versatile sources for the 1-1.2 μm region*. *IEEE J. Sel. Top. Quant.* 1(1):2–13, 1995. 41
- [Paw06] J. PAWLEY, Herausgeber. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer, New York, NY, 3 Auflage, 2006. 5, 11, 12, 26
- [Pen79] A. PENZKOFER, A. LAUBEREAU, W. KAISER. *High-intensity Raman interactions*. *Prog. Quantum Electron.* 6(2):56–140, 1979. 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22
- [Pes08] D. PESTOV, X. WANG, G. ARIUNBOLD, R. MURAWSKI, V. SAUTENKOV, A. DOGARIU, A. SOKOLOV, M. SCULLY. *Single-shot detection of bacterial endospores via coherent Raman spectroscopy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(2):422–427, 2008. 12
- [Pet10] C. PETIBOIS. *Imaging methods for elemental, chemical, molecular, and morphological analyses of single cells*. *Anal. Bioanal. Chem.* 397(6):2051–2065, 2010. 3, 4, 75
- [Pez11] J. PEZACKI, J. BLAKE, D. DANIELSON, D. KENNEDY, R. LYN, R. SINGARAVELU. *Chemical contrast for imaging living systems: molecular vibrations drive CARS microscopy*. *Nat. Chem. Biol.* 7(3):137–145, 2011. 12
- [Plo07a] E. PLOETZ. *Femtosekunden Stimulierte Raman Mikroskopie (FSRM)*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2007. 7, 75
- [Plo07b] E. PLOETZ, S. LAIMGRUBER, S. BERNER, W. ZINTH, P. GILCH. *Femtosecond stimulated Raman microscopy*. *Appl. Phys. B* 87(3):389–393, 2007. v, vii, 8, 11, 16, 22, 23, 27, 37, 38, 40, 53, 55, 56
- [Plo09] E. PLOETZ, B. MARX, T. KLEIN, R. HUBER, P. GILCH. *A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*. *Opt. Express* 17(21):18612–18620, 2009. 8, 22, 25
- [Plo10] E. PLOETZ, B. MARX, P. GILCH. *Disturbing interference pattern in femtosecond stimulated Raman microscopy*. *J. Raman Spectrosc.* 41(6):609–613, 2010. 9, 37
- [Plo11] E. PLOETZ, B. MARX, P. GILCH. *Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy*. *J. Raman Spectrosc.* DOI: 10.1002/jrs.2884, 2011. 9, 72
- [Pon11] E. PONTECORVO, S. KAPETANAKI, M. BADIOLI, D. BRIDA, M. MARANGONI, G. CERULLO, T. SCOPIGNO. *Femtosecond stimulated Raman spectrometer in the 320-520 nm range*. *Opt. Express* 19(2):1107–1112, 2011. 39

- [Pot06] E. POTMA, C. EVANS, X. XIE. *Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging*. Opt. Lett. 31(2):241–243, 2006. 15
- [Pre92] W. PRESS, B. FLANNERY, S. TEUKOLSKY, W. VETTERLING. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, Cambridge, 2 Auflage, 1992. 26
- [Pul09] V. PULLY, C. OTTO. *The intensity of the 1602 cm⁻¹ band in human cells is related to mitochondrial activity*. J. Raman Spectrosc. 40(5):473–475, 2009. 7, 29
- [Ram28] C. RAMAN, K. KRISHNAN. *A new type of secondary radiation*. Nature 121:501–502, 1928. 7
- [Ray74] L. RAYLEIGH. *XII. On the manufacture and theory of diffraction-gratings*. Philosophical Magazine Series 4 47:81–93, 1874. 2
- [Rei98] L. REIMER. *Scanning electron microscopy. Physics of image formation and microanalysis*. Springer Series in Optical Sciences, Vol. 45. Springer-Verlag, Berlin, 2. Auflage, 1998. 3
- [Rei08] L. REIMER, H. KOHL. *Transmission Electron Microscopy. Physics of Image Formation*. Springer Series in Optical Sciences, Vol. 36. Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage, 2008. 3
- [Rie00] E. RIEDLE, M. BEUTTER, S. LOCHBRUNNER, J. PIEL, S. SCHENKL, S. SPÖRLEIN, W. ZINTH. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*. Appl. Phys. B 71(3):457–465, 2000. 39
- [Rin07] H. RINIA, M. BONN, M. MÜLLER, E. VARTIAINEN. *Quantitative CARS spectroscopy using the maximum entropy method: the main lipid phase transition*. ChemPhysChem 8(2):279–287, 2007. 15
- [Rit09] E. RITTWEGER, K. HAN, S. IRVINE, C. EGGELING, S. HELL. *STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution*. Nat. Photon. 3:144–147, 2009. 5, 75
- [Rob06] N. ROBERTSON. *Optimierung farbstoffsensibilisierter Solarzellen*. Angew. Chem. 118(15):2398–2405, 2006. 73
- [Rod06] L. RODRIGUEZ, S. LOCKETT, G. HOLTOM. *Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: A biological review*. Cytom. Part A 69A(8):779–791, 2006. 11
- [Roe11] M. ROEFFAERS, X. ZHANG, C. FREUDIGER, B. SAAR, M. VAN RUIJVEN, G. VAN DALEN, C. XIAO, X. XIE. *Label-free imaging of biomolecules in food products using stimulated Raman microscopy*. J. Biomed. Opt. 16(2):021118, 2011. 16, 37
- [Roy10] S. ROY, J. GORD, A. PATNAIK. *Recent advances in coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy: Fundamental developments and applications in reacting flows*. Prog. Energy Combust. Sci. 36(2):280–306, 2010. 12

- [Rul05] C. RULLIÈRE, Herausgeber. *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2. Auflage, 2005. 54
- [Rus03] P. RUSSELL. *Photonic crystal fibers*. *Science* 299(5605):358–362, 2003. 39
- [Rus08] R. RUSSELL. *Eingesperrtes Licht. Photonische Kristallfasern*. *Physik in unserer Zeit* 39(4):168–174, 2008. 36
- [Saa10a] B. SAAR, C. FREUDIGER, J. REICHMAN, C. STANLEY, G. HOLTOM, X. XIE. *Video-Rate Molecular Imaging in Vivo with Stimulated Raman Scattering*. *Science* 330(6009):1368–1370, 2010. 16, 22, 25, 36, 73
- [Saa10b] B. SAAR, Y. ZENG, C. FREUDIGER, Y. LIU, M. HIMMEL, X. XIE, S. DING. *Label-Free, Real-Time Monitoring of Biomass Processing with Stimulated Raman Scattering Microscopy*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(32):5476–5479, 2010. 16
- [Saa11a] B. SAAR, L. CONTRERAS-ROJAS, X. XIE, R. GUY. *Imaging Drug Delivery to Skin with Stimulated Raman Scattering Microscopy*. *Mol. Pharm.* 8(3):969–975, 2011. 16, 36
- [Saa11b] B. SAAR, R. JOHNSTON, C. FREUDIGER, X. XIE, E. SEIBEL. *Coherent Raman scanning fiber endoscopy*. *Opt. Lett.* 36(23):2396–2398, 2011. 73
- [Sal09] R. SALZER, H. SIESLER, Herausgeber. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1 Auflage, 2009. 6, 7, 11, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 53, 73
- [Sav64] A. SAVITZKY, M. GOLAY. *Smoothing + differentiation of data by simplified least squares procedures*. *Analytical Chem.* 36(8):1627, 1964. 26
- [SB90] M. SHEIK-BAHAE, A. SAID, T.-H. WEI, D. HAGAN, E. V. STRYLAND. *Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam*. *IEEE J. Quantum Electron.* 26(4):760–769, 1990. 72
- [Sch38] M. SCHLEIDEN, Herausgeber. *Contributions to Phytogenesis*, 1838. 1
- [Sch47] T. SCHWANN, M. SCHLEYDEN, Herausgeber. *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. Sydenham Society, 1847. 1
- [Sch75] B. SCHRADER, W. MEIER, Herausgeber. *Raman/IR Atlas of Organic Compounds*. VCH, Weinheim, 1 Auflage, 1975. 53
- [Sch95] B. SCHRADER, Herausgeber. *Infrared and Raman Spectroscopy. Methods and Applications*. VCH, Weinheim, 1 Auflage, 1995. 41, 42
- [Sch03] S. SCHLÜCKER, M. SCHAEBERLE, S. HUFFMAN, I. LEVIN. *Raman microspectroscopy: A comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies*. *Anal. Chem.* 75(16):4312–4318, 2003. 25

- [Sch09] T. SCHMID, C. CAMUS, S. LEHMANN, D. ABOU-RAS, C. FISCHER, M. LUX-STEINER, R. ZENOBI. *Spatially resolved characterization of chemical species and crystal structures in CuInS₂ and CuGa₂S₄ thin films using Raman microscopy*. *Physica Status Solidi (A)* 206(5):1013–1016, 2009. 73
- [Sch10a] L. SCHERMELLEH, R. HEINTZMANN, H. LEONHARDT. *A guide to super-resolution fluorescence microscopy*. *J. Cell Biol.* 190(2):165–175, 2010. 4, 5, 75
- [Sch10b] S. SCHLÜCKER, Herausgeber. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1 Auflage, 2010. 75
- [Sel03] R. SELVAS, J. K. SAHU, L. B. FU, J. N. JANG, J. NILSSON, A. B. GRUDININ, K. H. YLA-JARKKO, S. A. ALAM, P. W. TURNER, J. MOORE. *High-power, low-noise, Yb-doped, cladding-pumped, three-level fiber sources at 980 nm*. *Opt. Lett.* 28(13):1093–1095, 2003. 41
- [She65] Y. SHEN, W. BLOEMBERGEN. *Theory of stimulated Brillouin and Raman scattering*. *Phys. Rev. A* 137:1787, 1965. 18
- [She76] Y. SHEN. *Recent advances in nonlinear optics*. *Rev. Mod. Phys.* 48(1):1–32, 1976. 13
- [She84] Y. SHEN, Herausgeber. *The principles of nonlinear optics*. Wiley, New York, 1 Auflage, 1984. 12
- [Shi06] S. SHIM, R. MATHIES. *Generation of narrow-bandwidth picosecond visible pulses from broadband femtosecond pulses for femtosecond stimulated Raman*. *Appl. Phys. Lett.* 89(12), 2006. 39
- [Shi09] H. SHINZAWA, K. AWA, W. KANEMATSU, Y. OZAKI. *Multivariate data analysis for Raman spectroscopic imaging*. *J. Raman Spectrosc.* 40(12):1720–1725, 2009. 29
- [Sli09] M. SLIPCHENKO, T. LE, H. CHEN, J. CHENG. *High-Speed Vibrational Imaging and Spectral Analysis of Lipid Bodies by Compound Raman Microscopy*. *J. Phys. Chem. B* 113(21):7681–7686, 2009. 6, 8, 16, 36
- [Sli10] M. SLIPCHENKO, H. CHEN, D. ELY, Y. JUNG, M. CARVAJAL, J. CHENG. *Vibrational imaging of tablets by epi-detected stimulated Raman scattering microscopy*. *Analyst* 135(10):2613–2619, 2010. 16, 22, 73
- [Squ01] J. SQUIER, M. MÜLLER. *High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging*. *Rev. Sci. Instrum.* 72(7):2855–2867, 2001. 75
- [Sun08] Z. SUN, J. LU, D. ZHANG, S. LEE. *Quantum theory of (femtosecond) time-resolved stimulated Raman scattering*. *J. Chem. Phys.* 128(14):144114, 2008. 18

- [Tol77a] W. TOLLES, J. NIBLER, J. McDONALD, A. HARVEY. *Review of theory and application of Coherent anti-Stokes Raman-Spectroscopy (CARS)*. Appl. Spectrosc. 31(4):253–271, 1977. 11
- [Tol77b] W. TOLLES, R. TURNER. *Comparative analysis of analytical capabilities of Coherent anti-Stokes Raman-Spectroscopy (CARS) relative to Raman-scattering and absorption spectroscopy*. Appl. Spectrosc. 31(2):96–103, 1977. 11
- [Tre97] R. TREBINO, K. DELONG, D. FITTINGHOFF, J. SWEETSER, M. KRUMBUGEL, B. RICHMAN, D. KANE. *Measuring ultrashort laser pulses in the time-frequency domain using frequency-resolved optical gating*. Rev. Sci. Instrum. 68(9):3277–3295, 1997. 72
- [Tur09] N. TURRO, V. RAMAMURTHY, J. SCAIANO. *Principles of Molecular Photochemistry. An Introduction*. University Sciences Books, Sausalito, California, 1 Auflage, 2009. 7
- [Uma09] S. UMAPATHY, A. LAKSHMANNA, B. MALLICK. *Ultrafast Raman loss spectroscopy*. J. Raman Spectrosc. 40(3):235–237, 2009. 24
- [Var06] E. VARTIAINEN, H. RINIA, M. MÜLLER, M. BONN. *Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra*. Opt. Express 14(8):3622–3630, 2006. 15
- [vM05] H. VAN MANEN, Y. KRAAN, D. ROOS, C. OTTO. *Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(29):10159–10164, 2005. 29
- [Vog02] E. VOGES, K. PETERMANN, Herausgeber. *Optische Kommunikationstechnik: Handbuch für Wissenschaft und Industrie*. Springer, Berlin, 1 Auflage, 2002. 54
- [Vog05] A. VOGEL, J. NOACK, G. HUTTMAN, G. PALTAUF. *Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues*. Appl. Phys. B 81(8):1015–1047, 2005. 8
- [Vol01] A. VOLKMER, J. CHENG, X. XIE. *Vibrational imaging with high sensitivity via epidetecting coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Phys. Rev. Lett. 87:023901–023904, 2001. 15
- [Vol02] A. VOLKMER, L. BOOK, X. XIE. *Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay*. Appl. Phys. Lett. 80(9):1505–1507, 2002. 15
- [Vol05] A. VOLKMER. *Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. J. Phys. D-applied Phys. 38(5):R59–R81, 2005. 11, 12
- [vV07] B. VON VACANO, L. MEYER, M. MOTZKUS. *Rapid polymer blend imaging with quantitative broadband multiplex CARS microscopy*. J. Raman Spectrosc. 38(7):916–926, 2007. 12

- [Wal03] M. WALL, A. RECHTSTEINER, L. ROCHA. *Singular Value Decomposition and Principal Component Analysis*. In D. BERRAR, W. DUBITZKY, M. GRANZOW, Herausgeber, *A Practical Approach to Microarray Data Analysis*, Seiten 91–109. Springer US, 1 Auflage, 2003. 30
- [Wan10] K. WANG, C. FREUDIGER, J. LEE, B. SAAR, X. XIE, C. XU. *Synchronized time-lens source for coherent Raman scattering microscopy*. *Opt. Express* 18(23):24019–24024, 2010. 36
- [Wan11] M. WANG, W. MIN, C. FREUDIGER, G. RUVKUN, X. XIE. *RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy*. *Nat. Meth.* 8(2):135–138, 2011. 16
- [War77] A. WARSHEL. *Interpretation of Resonance Raman Spectra of Biological Molecules*. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6(1):273–300, 1977. 7
- [WE09] D. WILLEMSE-ERIX, M. SCHOLTES-TIMMERMAN, J. JACHTENBERG, W. VAN LEEUWEN, D. HORST-KREFT, T. SCHUT, R. DEURENBERG, G. PUPPELS, A. VAN BELKUM, M. VOS, K. MAQUELIN. *Optical Fingerprinting in Bacterial Epidemiology: Raman Spectroscopy as a Real-Time Typing Method*. *J. Clin. Microbiol.* 47(3):652–659, 2009. 73
- [Wel95] A. WELCH, M. GEMERT, Herausgeber. *Optical- Response of Laser-Irradiated Tissue*. Springer, Berlin, 1 Auflage, 1995. 35
- [Woo62] E. WOODBURY, W. NG. *Ruby laser operation in the near IR*. *Proc. IRE* 50:2367, 1962. 16
- [Xu04] G. XU, L. QIAN, T. WANG, H. ZHU, C. ZHU, D. FAN. *Spectral narrowing and temporal expanding of femtosecond pulses by use of quadratic nonlinear processes*. *IEEE J. Sel. Top. Quant.* 10(1):174–180, 2004. 39
- [Yar07] A. YARIV, P. YEH, Herausgeber. *Photonics: optical electronics in modern communications*. Oxford University Press, New York, NY, 6 Auflage, 2007. 13, 19, 21
- [Ye09] T. YE, D. FU, W. WARREN. *Nonlinear Absorption Microscopy*. *Photochem. Photobiol.* 85:631–645, 2009. 35
- [Yoo05] S. YOON, D. MCCAMANT, P. KUKURA, R. MATHIES, D. ZHANG, S. LEE. *Dependence of line shapes in femtosecond broadband stimulated Raman spectroscopy on pump-probe time delay*. *J. Chem. Phys.* 122(2):024505, 2005. 18
- [Yos00] M. YOSHIKAWA, M. KUROSAWA. *Femtosecond time-resolved Raman spectroscopy using stimulated Raman scattering*. *Phys. Rev. A* 61:013808, 2000. 16
- [Zin11] W. ZINTH, A. LAUBEREAU, W. KAISER. *The long journey to the laser and its rapid development after 1960*. *Eur. Phys. J. H*, 2011. 16, 35

- [Zip03] W. ZIPFEL, R. WILLIAMS, W. WEBB. *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat. Biotech. 21(11):1369–1377, 2003. 75
- [Zum99] A. ZUMBUSCH, G. HOLTOM, X. XIE. *Three-dimensional vibrational imaging by coherent Anti-Stokes Raman scattering*. Phys. Rev. Lett. 82(20):4142–4145, 1999. 11

Veröffentlichungen

Zeitschriftenartikel

1. E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, P. Gilch: *Femtosecond stimulated Raman microscopy*, Appl. Phys. B 87 (3), 389-393, 2007, DOI: [10.1007/s00340-007-2630-x](https://doi.org/10.1007/s00340-007-2630-x).
2. E. Ploetz, B. Marx, T. Klein, R. Huber, P. Gilch: *A 75 MHz Light Source for Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*, Optics Express 17 (21), 18612-18620, 2009, DOI: [10.1364/OE.17.018612](https://doi.org/10.1364/OE.17.018612).
» veröffentlicht in: Virtual Journal of Ultrafast Science 9 (1) November 2009.
» veröffentlicht in: Virtual Journal of Biomedical Optics 4 (12) Januar 2010, p. 18612.
3. E. Ploetz, B. Marx, P. Gilch: *Disturbing interference patterns in femtosecond stimulated Raman microscopy*, J. Raman Spectrosc. 41 (6), 609-613, 2010, DOI: [10.1002/jrs.2488](https://doi.org/10.1002/jrs.2488).
4. E. Ploetz, B. Marx, P. Gilch: *Origin of spectral interferences in femtosecond stimulated Raman microscopy*, J. Raman Spectrosc., 2011, DOI: [10.1002/jrs.2884](https://doi.org/10.1002/jrs.2884).

Weitere Veröffentlichungen

1. E. Ploetz, S. Laimgruber, P. Gilch: *A novel imaging system: Femtosecond Stimulated Raman Microscopy (FSRM)*, Proceed. 13th Int. Conf. on Time-resolv. Vibr. Spectr., Freising, 19.-25. Mai 2007, p. 28 .
2. E. Ploetz: *Chemical imaging using femtosecond-stimulated Raman microscopy (FSRM)*, B.I.F. FUTURA 23 (2), p. 102-103, 2008, ISSN: 0179-6372
3. B. Marx, E.C. Ploetz, P. Gilch: *Spectral Interferences In Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*, AIP Conf. Proc. 1267 (1), 45-46, 2010, DOI: [10.1063/1.3482615](https://doi.org/10.1063/1.3482615).
4. E.C. Ploetz, M. Gellner, M. Schütz, B. Marx, S. Schlücker, P. Gilch: *Surface Enhancement in Femtosecond Stimulated Raman Scattering*, AIP Conf. Proc. 1267 (1), 88-89, 2010, DOI: [10.1063/1.3482872](https://doi.org/10.1063/1.3482872).
5. E. Ploetz, B. Marx, P. Gilch: *Broadband Stimulated Raman Microscopy*, AIP Conf. Proc. 1267 (1), 96-97, 2010, DOI: [10.1063/1.3482919](https://doi.org/10.1063/1.3482919).

Beiträge auf Konferenzen

- I. ●E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, P. Gilch: *Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*, Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Düsseldorf/Deutschland, 19.-23. März 2007, Vortrag.
- II. ●E. Ploetz, S. Laimgruber, P. Gilch: *A novel imaging system: Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*, 13th Int. Conf. on Time-resolv. Vibr. Spectr., Freising/Deutschland, 19.-25. Mai 2007, Poster.
- III. ●E. Ploetz, S. Laimgruber, P. Gilch: *A new approach in Raman Imaging: Femtosecond Stimulated Raman Microscopy (FSRM)*, 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM 2007), Paris/France, 1.-6. September 2007, Vortrag.
- IV. ●E. Ploetz, S. Laimgruber, P. Gilch: *Femtosecond Stimulated Raman microscopy*, 1st European Conference on CARS microscopy (microCARS 2008), Igls/Austria, 25.-27. Mai 2008, Poster.
- V. ●E. Ploetz, S. Laimgruber, P. Gilch: *Femtosecond Stimulated Raman microscopy (FSRM)*, 21st International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2008), London/Großbritannien, 17.-22. August 2008, Vortrag.
- VI. B. Marx, E. Ploetz, ●P. Gilch: *Disturbing spectral interferences and their suppression in Femtosecond Stimulated Raman microscopy*, Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Hamburg/Deutschland, 2.-9. März 2009, Vortrag.
- VII. ●B. Marx, E.C. Ploetz, P. Gilch: *An oscillator based light source for femtosecond stimulated Raman microscopy*, 9th European Conf. on Nonlinear Optical Spectroscopy (ECONOS 2010), Bremen/Deutschland, 21.-23. Juni 2010, Poster.
- VIII. E.C. Ploetz, B. Marx, ●P. Gilch: *Broadband Stimulated Raman Microscopy*, 22nd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2010), Boston/USA, 8.-13. August 2010, Vortrag.
- IX. ●E.C. Ploetz, M. Gellner, M. Schütz, B. Marx, S. Schlücker, P. Gilch: *Surface Enhancement in Femtosecond Stimulated Raman Scattering*, 22nd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2010), Boston/USA, 8.-13. August 2010, Vortrag.
- X. ●B. Marx, E.C. Ploetz, P. Gilch: *Spectral Interferences In Femtosecond Stimulated Raman Microscopy*, 22nd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2010), Boston/USA, 8.-13. August 2010, Vortrag.
- XI. ●B. Marx, E. Ploetz, P. Gilch: *Light sources for femtosecond stimulated Raman microscopy*, 2nd European Conference on CARS microscopy (microCARS 2010), Bad Honnef/Deutschland, 18.-20. Oktober 2010, Vortrag.
- XII. ●B. Marx, E. Ploetz, P. Gilch: *Towards bio-imaging using Femtosecond stimulated Raman microscopy*, CARS explorer symposium 2011, Marseille/France, 20.-21. Juni 2011, Vortrag.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Evelyn Christine Plötz, ledig

geboren am 08.03.1982 in München

Ausbildung und Tätigkeiten

07/2001	Abitur am Theresia-Gerhardinger-Gymnasium am Anger, München
10/1998–09/2001	Jungstudium Gitarre, Hochschule für Musik und Theater, München
10/2001–07/2007	Studium der Physik (Diplom) an der LMU München
03/2003	Vordiplom
08/2003–04/2004	Praktikum, LMU, LS Biomolekulare Optik, AG Prof. W. Zinth
09/2004–09/2005	Auslandssemester an der Université Paris IX - Sud, Orsay / Frankreich
05/2005–08/2005	Praktikum, CNRS, Laboratoire de PhotoPhysique Moléculaire, Orsay/ Frankreich, AG Prof. M.-P. Fontaine-Aupart
03/2006–05/2006	Praktikum, LMU, LS Weiche kondensierte Materie, AG Prof. J. Rädler
08/2006–07/2007	Diplomarbeit, LMU, LS Biomolekulare Optik, AG PD P. Gilch: über <i>Femtosekunden-stimulierte Raman-Mikroskopie</i>
07/2007	Diplom
09/2007–09/2011	Promotion in Physik an der LMU München – Wissenschaftl. Mitarbeiter:
09/2007–09/2010	LMU München, LS für Biomolekulare Optik, AG PD P. Gilch
10/2010–09/2011	HHU Düsseldorf, Institut für Physikalische Chemie II, AG Prof. P. Gilch
ab 10/2011	RUG Groningen / Niederlande, Zernike Institut, LS für Einzelmolekül-Biophysik, AG Dr. T. Cordes

Mitarbeit in der Lehre

10/2002–02/2003	LMU, Tutor zur Vorlesung Analysis I für Informatiker, Prof. M. Schottenloher
10/2003–02/2004	LMU, Betreuer im Physikpraktikum für Chemiker, Prof. H. Betz
10/2008–10/2008	LMU, Übungen zur Vorlesung Physik für Chemiker PN II, PD. P. Gilch

Danksagung

On a logarithmic scale, this is the same span as between a millisecond and a day or between a second and the duration of the studies for a doctor's degree.

(M. Eigen - Nobel lecture, 1967)

Abschließend möchte ich allen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen und mich in dieser Zeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

*meinen Modulationen ... die mich mit großer Treue heimgesucht haben.
Ohne sie gäb's keine Doktorarbeit ☺... aber natürlich auch:*

Prof. Dr. Peter Gilch: für die Betreuung und Ermöglichung dieser Doktorarbeit. Ich möchte mich herzlich für die persönliche Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, aber auch für die spannende Reise ins Reich der nichtlinearen Mikroskopie und (Laser-) Spektroskopie sowie für die lehrreichen Jahre im Administrations- und Antragsdschungel. Besonders zu schätzen weiß ich die vielen Diskussionen und Ideen, die zur Entwicklung der FSRM-Aufbauten geführt haben, sowie die schnelle und konstruktive Durchsicht meiner Dissertation und unserer Veröffentlichungen.

Prof. Dr. Wolfgang Zinth: für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Möglichkeit, meine Doktorarbeit und die dafür notwendigen Experimente an seinem Lehrstuhl durchführen zu können. Ich bedanke mich für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine zahlreichen Anregungen.

Benjamin Marx: für die großartige Unterstützung im Labor und beim Verfassen unserer Veröffentlichungen. Ich danke für die hingebungsvolle Pflege und Justage unseres Femtosekunden-Lasers, sowie seine erfrischende und pragmatische Weise, mich auf den Boden der Tatsachen und den richtigen Weg zurückzuholen.

unsere Bachelorstudenten: Jurica Bacurin, Timo Weisbarth, Tobias Jochum, und Mario Mangold für ihre tatkräftige Unterstützung und lehrreiche Betreuung.

der AG Gilch: Dr. Stefan Laimgruber, Dr. Thomas Schmierer, Dr. Björn Heinz, Gerald Ryssek, Torben Villnow, Sascha Fröbel, Felix Gmerek für die super Zusammenarbeit, die gemeinsamen Messnächte im Southpark, die tiefenpsychologischen Sitzungen im Mooren, sowie die wertvollen (Mess-)Tips und Tricks. Danke!

den Kollegen: Dr. Stefan Laimgruber und Teja Herzog (Mini-Spektrometer); Dr. Martin Hennig (SAW-Chips); sowie Dr. Thomas Brust, Dr. Simone Draxler und Pablo Dominguez (RC-LH2-Komplexe) für die Nebenprojekte und die daraus resultierende Wissenserweiterung.

der AG Schlücker, HHU Osnabrück: Prof. Sebastian Schlücker, Magdalena Gellner und Max Schütz - für die Herstellung der Proben, die Telefonhotline sowie die spannende Reise auf das mir bis dahin unbekannte Terrain von SERS

der AG Huber: Dr. Robert Huber, Thomas Klein, Christoph Eigenwillig und Wolfgang Wieser für Support und Know-How in Faser- und Elektronik-Fragen

der AG Riedle: Prof. Eberhard Riedle, Nils Krebs, Max Bradler, Christian Homann und Dr. Igor Pugliesi für Optik-Leihgaben, Nachhilfe in Nichtlinearer Optik und Laserphysik und vielen, guten Ratschlägen ...

dem BMO- und der HHU-Crew: (und natürlich auch bei all denjenigen, die ich vergessen habe ... Mea culpa.) für das tolle Arbeitsklima.

der Werkstatt: Rudi Schwarz, Alfons Stork und Christian Hausmann für die schnelle und perfekte Umsetzung meiner kreativen Baupläne und Sonderwünsche.

dem IT-Support: dem LRZ; Markus Breuer, Florian Trommer und Dr. Karl-Heinz Mantel für die super Wartung unseres Computernetzwerks am BMO; dem Linux-basierten Tec5-Treiber und den in *C* geschriebenen Messprogrammen, welche mich hartnäckig begleitet haben; Torben Villnow für seine Unterstützung und nicht zuletzt möchte ich mich beim ZIM der HHU für die bemühte Unterstützung in Fragen der Netzwerk- und Server-Administration bedanken.

dem Sekretariat: Alexandra Michaelis, Marianne Widmann-Diermeier und Veronika Mendorf, für die uneingeschränkte Hilfe in administrativen Fragen und dafür, dass sie so manchen Vertrag noch im letzten Moment unter Dach und Fach gebracht haben.

der BIF, CIPSM und der DFG: für die Finanzierung meiner Doktorandenstelle sowie unseres Projekts. Dem BIF möchte ich für die Unterstützung und bereichernden Meetings in Lautrach und Gracht danken.

Und zu guter Letzt gilt mein Dank:

den Korrekturlesern: Gerald Ryseck, Dr. Constanze Sobotta, Dr. Stefan Laimgruber, Benjamin Marx, Torben Villnow und Dr. Thomas Schmierer, die in ihrer teilweise akribischen Art jedem einzelnen Buchstabendreher, Anglizismus und Laborjargon den Kampf angesagt haben.

und vor allem meiner Familie und Freunden: die mich in den letzten Jahre durch meine Doktorarbeit begleitet und getragen haben: allen voran meiner Mutter, die mir auch spätabends (telefonisch) beratend zur Seite stand. Ihr habt mich in sämtlichen Phasen meiner Doktorjahre ertragen und mit Geduld und Zuspruch meinen Frust ausgebadet. Ich danke euch von Herzen!