

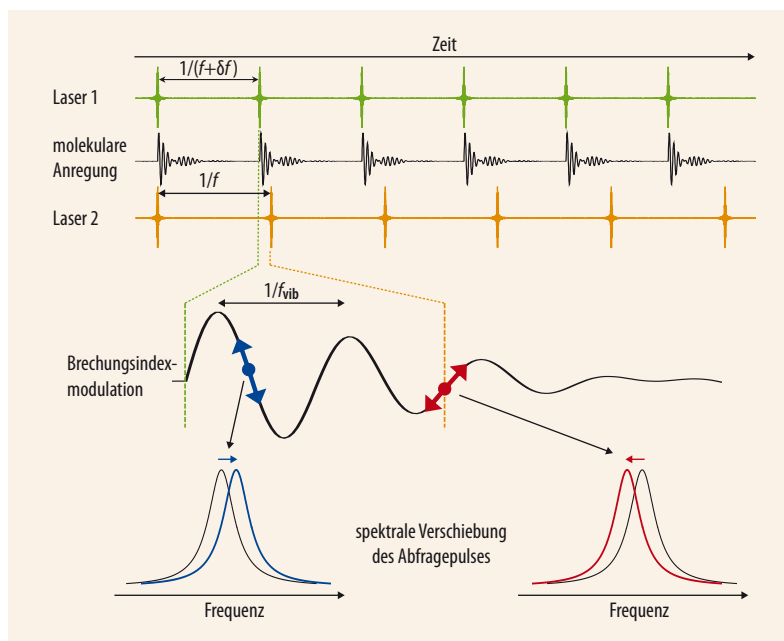
■ Markierungsfrei und spektral aufgelöst

Die schnelle Fourier-Transform-CARS-Spektroskopie mit Laserfrequenzkämmen ermöglicht eine molekularselektive und spektrale Bildgebung.

Die mittlerweile gängigen modengekoppelten Kurzpuls-Laser ermöglichen eine rasante Entwicklung neuer optischer kohärenter Mikroskopietechniken. Dank ihrer hohen Pulsenergien erzeugen nichtlineare optische Phänomene einen intrinsischen Bildkontrast, eine vorherige Markierung der Probe mit fluoreszierenden Molekülen oder streuenden Nanopartikeln ist dabei nicht nötig. Unter den bisher demonstrierten Mechanismen stößt gegenwärtig die kohärente Raman-Streuungs-Mikroskopie auf großes Interesse, da sie eine molekularselektive Bildgebung unter Ausnutzung von Schwingungsresonanzen erlaubt.

Die kohärente Raman-Streuung ist ein Vierwellen-Mischprozess, bei dem mindestens zwei Laserpulse unterschiedlicher Wellenlänge mit der Probe wechselwirken. Stimmt deren Photonenenergie mit der Frequenz eines molekularen Schwingungsübergangs f_{vib} überein, interferieren die aktiv gepumpten und in Phase oszillierenden Molekülbindungen. Dies führt zu einer resonanten Verstärkung der kohärenten Raman-Streuung. Das Signal entsteht wegen der nichtlinearen Abhängigkeit von der Anregungsintensität nur im Fokus und ermöglicht daher durch Rastern eine dreidimensionale Bildgebung. Wesentliche Beschränkungen konventioneller Schwingungsmikroskopietechniken, wie die geringe räumliche Auflösung in der IR-Mikroskopie und die sehr kleinen Streuintensitäten in der spontanen Raman-Mikroskopie, lassen sich somit vermeiden. So gelang es mithilfe der Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) sowie der Stimulierten Raman-Streuungsmikroskopie (SRS) bereits, eine Vielzahl von materialwissenschaftlichen und biomedizinischen Fragen zu beantworten [1].

Die Beobachtung nur einer Resonanz reicht oft nicht aus, um die chemische und physikalische



Das Prinzip der CARS-Spektroskopie mit zwei Laserfrequenzkämmen in der Zeitdomäne [6]: Ein Puls des Lasers 1 regt mehrere Raman-aktive Molekülschwingungen stimuliert an. Ein zeitverzögerter Puls des Lasers 2 fragt deren freien Raman-Induktionszerfall von wenigen Piko- bis zu mehreren Nanosekunden ab (oben). Aufgrund der Frequenzkamm-Differenz δf variiert die Zeitverzögerung von Pulspaar zu Pulspaar linear, und die Funktion der beiden Pulse wechselt mit jeder Periode $1/(2\delta f)$. Somit wird die zeitliche Modulation der kohä-

Struktur von molekularen Verbindungen nichtinvasiv innerhalb einer komplexen und heterogenen Probenumgebung (z. B. in einer lebenden Zelle) zu identifizieren. Um die gesamte Raman-Antwort einer mikroskopischen Probe aufzeichnen zu können, wurde in den letzten Jahren insbesondere die CARS-Mikrospektroskopie in der Frequenz- sowie in der Zeitdomäne weiterentwickelt und eine hohe räumliche und spektroskopische Auflösung erreicht [2].

Bei der Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie regt jedes Pulspaar mehrere Raman-Resonanzen über einen weiten Frequenzbereich gleichzeitig an. Die molekülspezifischen Informationen lassen sich dabei direkt aus der Messung der Positionen, der Amplituden und der Breiten der Raman-Resonanzen

renten Molekülschwingungen regelmäßig reproduziert. Da die Oszillation einer molekularen Schwingungsamplitude den Probenbrechungsindex mit der Periode $1/f_{\text{vib}}$ moduliert, wird der Abfragepuls abhängig vom Zeitpunkt seiner Wechselwirkung mit den Molekülen innerhalb ihres Schwingungszyklus spektral verschoben (Mitte und unten). Die Interferenz beider Laserfrequenzkämme ergibt eine zeitlich periodische Intensitätsmodulation der CARS-Emission.

in der Frequenzdomäne gewinnen. Diese Technik erlaubt eine hyperspektrale CARS-Bildgebung von lebenden Zellen über den gesamten, biologisch relevanten Spektralbereich ($\leq 4500 \text{ cm}^{-1}$) mit Aufnahmezeiten von $\geq 700 \mu\text{s}$ pro Bildpixel, die allein durch die Ausleserate des verwendeten Multikanaldetektors limitiert sind. Kürzere Aufnahmezeiten von nur $20 \mu\text{s}$ pro CARS-Spektrum sind für einen kleineren Spektralbereich (ca. 1000 cm^{-1}) mit weniger spektralen Pixeln gelungen [3].

Die CARS-Mikrospektroskopie in der Zeitdomäne [4], bei der die zeitliche Interferenz und das Abklingen der kohärent angeregten Molekülschwingungen beobachtet wird, liefert grundsätzlich die gleichen Informationen, da sie über eine Fourier-Transformation mit

denen in der Frequenzdomäne verknüpft sind. Da für die Zeitverzögerungen zumeist Spiegel mechanisch verschoben wurden, war die Fourier-transformierte CARS-Mikrospektroskopie [5] bisher zu langsam für eine breite Anwendung.

Die Arbeitsgruppe von Theodor Hänsch und Nathalie Picqué hat kürzlich eine neue Methode für schnelle Fourier-Transform-CARS-Mikrospektroskopie vorgestellt, die ohne mechanisch bewegliche Elemente auskommt [6]. Hier stammt das CARS-Signal von zwei Laserfrequenzkämmen, erzeugt von zwei modengekoppelten Femtosekundenlasern mit etwas unterschiedlichen Pulswiederholraten f und $f + \delta f$. Die Frequenzkämme weisen jeweils ein optisches Spektrum mit ca. 10^5 exakt äquidistanten Linien mit den Abständen f und $f + \delta f$ auf [7]. Sobald eine Differenzfrequenz zwischen zwei Kammlinien in Resonanz mit einer molekularen Schwingungsfrequenz bei f_{vib} ist, tritt in der Probe eine Raman-Zweiphotonenanregung auf. Die kohärenten Raman-Anregungen beider Laserfrequenzkämme interferieren miteinander und bewirken durch eine erneute Wechselwirkung mit den Laserfrequenzkämmen eine zeitlich periodische CARS-Intensitätsmodulation mit der Schwebungsfrequenz $f_{\text{vib}} \delta f / f$. Dies entspricht einer Transformation des Schwingungsspektrums um den Faktor $\delta f / f$ (typisch 10^{-7} bis 10^{-6}) in den Radiofrequenzbereich, was eine schnelle und effektive Messung der zeitlichen Intensitätsmodulation mit einer Silizium-Photodiode erlaubt. Die Fourier-Transformation der Schwebung ergibt schließlich das gesuchte Raman-Spektrum der Probenmoleküle. Die Abb. veranschaulicht das Prinzip der CARS-Anregung mit zwei Laserfrequenzkämmen in der dazu komplementären Zeitdomäne.

Im „Proof of Principle“-Experiment von Ideguchi et al. [6] gelang es, mittels einer kolinearen Fokussierung der zwei Laserfrequenzkämme das Raman-Spektrum einer Mischung aus verschiedenen Flüssigkeiten mit einer Ortsauflösung von $1,9 \mu\text{m}$ zu messen. Der

Spektralbereich lag unter 1500 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung $\geq 4 \text{ cm}^{-1}$. Dabei zeigte sich auch, dass eine chemisch-selektive Bildgebung mit einer Messzeit von nur $12 \mu\text{s}$ pro Bildpixelspektrum prinzipiell machbar ist.

Als Spielart der Fourier-Transform-Spektroskopie limitieren auch hier nur die Länge des aufgezeichneten Interferogramms und die spektralen Bandbreiten der Laserpulse die spektrale Auflösung und Breite des detektierten Spektrums. Die Periodendauer $1/f$ der Laserpulse begrenzt jedoch die minimale Zeit für die Aufnahme sukzessiver Spektren. Während die kohärente Raman-Anregung innerhalb weniger Pikosekunden dephasiert, ist eine erneute Anregung erst nach der nächsten Pulsperiode (ca. 10 ns) möglich. Somit ist in der Praxis die Gesamtzeit zwischen zwei Spektren bisher noch auf etwa 10 ms limitiert. Im Hinblick auf eine verkürzte Totzeit sind hier Frequenzkammgeneratoren mit sehr viel höheren Pulswiederholraten im GHz-Bereich sehr vielversprechend.

Um in Zukunft eine beugungsbegrenzte Ortsauflösung erreichen zu können, ist eine stärkere Fokussierung der Laserfrequenzkämme mit Objektiven hoher numerischer Apertur und eine entsprechende Vorkompensation der Pulsdispersion höherer Ordnungen notwendig. Letzteres ist von besonderer Bedeutung, wenn kürzere Femtosekundenpulse angestrebt werden, um ein

spektral breitbandigeres Raman-Spektrum zu gewinnen. Dies würde die simultane Messung der molekularen Raman-Antwort einer Probe im gesamten Spektralbereich über $\geq 3000 \text{ cm}^{-1}$ erlauben. Um das hohe Potenzial der CARS-Bildgebung auch für die markierungsfreie Bildgebung von lebenden Zellen und Geweben in der biologischen und biomedizinischen Forschung evaluieren zu können, ist es nötig, die verwendeten Pulsenergien von derzeit mehreren Nanojoule um mindestens eine Größenordnung bei gleichbleibend hoher Detektionssensitivität zu reduzieren. Die Kombination der Frequenzkamm-Spektroskopie mit der optischen Mikroskopie ist ein spannendes und interdisziplinäres Forschungsfeld, welches für die nahe Zukunft viele interessante Anwendungen in der Physik, der Chemie, den Lebens- und Materialwissenschaften verspricht.

Andreas Volkmer

- [1] J. X. Cheng und X. S. Xie (Hrsg.), Coherent Raman Scattering Microscopy, CRC Press (2012)
- [2] A. Volkmer, J. Phys. D: Appl. Phys. **38**, R59 (2005)
- [3] B. C. Chen und S. H. Lim, J. Phys. Chem. B **112**, 3653 (2008)
- [4] A. Volkmer et al., Appl. Phys. Lett. **80**, 1505 (2002)
- [5] J. P. Ogilvie et al., Opt. Lett. **31**, 480 (2006)
- [6] T. Ideguchi et al., Nature **502**, 355 (2013)
- [7] Th. W. Hänsch, Rev. Mod. Phys. **78**, 1297 (2006)

KURZGEFASST

■ Übergang zum Verkehrsstau

Stau bei hoher Verkehrsdichte und freie Fahrt bei niedrigem Verkehrsaufkommen: Wer kennt das nicht? Japanische Physiker untersuchten Stauentstehung als dynamischen Phasenübergang. Sie ließen Autos im Kreis fahren und nahmen deren Position mit einem Laserscanner auf. Die bestimmte kritische Autodichte steht im Einklang mit der auf Autobahnen beobachteten. S. Tadaki et al., New J. Phys. **15**, 103034 (2013)

■ Atomare Datenspeicher

Ein einzelnes Holmium-Atom auf einer Platinoberfläche weist bei tiefen Temperaturen eine extrem hohe Spinstabilität auf: Erst nach mehreren Minuten

klappte das magnetische Moment des Atoms um, wie Forscher aus Karlsruhe, Halle und Leipzig gezeigt haben. T. Miyamachi et al., Nature **503**, 242 (2013)

■ Zerstörungsfreier Photonennachweis

Ein am MPI für Quantenoptik in Garching entwickelter Detektor weist einzelne Photonen nach, ohne sie zu zerstören. In einem optischen Resonator befindet sich ein Rubidium-Atom, das in einer Überlagerung von zwei Zuständen präpariert ist. Wird ein Photon reflektiert, verschiebt sich die Phase der Zustände zueinander, womit sich das Photon nachweisen lässt. A. Reiserer et al., Science Exp., DOI: 10.1126/science.1246164

Andreas Volkmer, Ph.D., 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57 70550 Stuttgart