

# Aufbau und Charakterisierung eines Femtosekunden-Laser-Scanning Mikroskops für die Untersuchung nichtlinearer Effekte

DIPLOMARBEIT

FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

PHYSIKALISCH-ASTRONOMISCHE  
FAKULTÄT

eingereicht von: Ralf Wolleschensky  
geboren am : 15. 10. 1972 in Jena

Jena, am 06.01.1998

1. Gutachter : Prof. Dr. rer. nat. R. Sauerbrey

2. Gutachter : Prof. Dr. rer. nat. habil. R. Kowarschik

Tag der Verleihung des Diploms : .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Überblick</b>	<b>6</b>
2.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	6
2.2	Zweiphotonen-Mikroskopie . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Ultrakurze Laserpulse</b>	<b>12</b>
3.1	Kurze Laserpulse . . . . .	13
3.2	Gaußsche Pulse . . . . .	14
3.3	Pulsdiagnostik . . . . .	15
3.4	Ausbreitung von Laserpulsen in optischen Medien . . . . .	18
3.4.1	Lineare Pulspropagation . . . . .	18
3.4.2	Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Wechselwirkungen im Präparat</b>	<b>25</b>
4.1	Biologische Präparate . . . . .	25
4.1.1	Absorptionsmechanismen . . . . .	26
4.1.2	Anregungsfluß . . . . .	27
4.1.3	Fluoreszenz nach Zweiphotonen-Absorption: . . . . .	28
4.1.4	Signal- zu Rauschverhältnis (SNR) . . . . .	28
4.1.5	Methoden zur Bestimmung des Wirkungsquerschnitts von Farbstoffen . . . . .	29
4.1.6	Auflösungsvermögen in einem Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskop . . . . .	30
4.2	Halbleiter . . . . .	36
4.2.1	Optical Beam Induced Current (OBIC) . . . . .	37
4.2.2	Erzeugung der Zweiten Harmonischen (SHG) in Halbleitern . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Charakterisierung des Mikroskops LSM 410</b>	<b>40</b>
5.1	Versuchsaufbau . . . . .	40
5.1.1	Lasersysteme . . . . .	40
5.1.2	Modifikationen am LSM 410 . . . . .	43
5.1.3	Direktkopplung . . . . .	45
5.1.4	Faserkopplung . . . . .	46
5.1.5	Messung der Dispersion . . . . .	47
5.2	Messungen und Diskussion . . . . .	49
5.2.1	Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) . . . . .	49
5.2.2	Kompensation der GVD . . . . .	50
5.3	Ergebnis . . . . .	54

<b>6</b>	<b>Charakterisierung von Farbstoffen</b>	<b>55</b>
6.1	Versuchsaufbau . . . . .	55
6.2	Messungen und Diskussionen . . . . .	55
6.2.1	Funktionelle Zusammenhänge . . . . .	55
6.2.2	Wirkungsquerschnitte . . . . .	57
6.2.3	Punkt–Bild–Funktion (PSF) . . . . .	60
6.3	Ergebnis . . . . .	62
<b>7</b>	<b>Anwendungsbeispiele des LSM mit fs–Laser</b>	<b>63</b>
7.1	Untersuchung biologischer Präparate . . . . .	63
7.2	Untersuchung von Festkörper- bzw. Halbleitermaterialien . . . . .	66
7.2.1	Optical Beam Induced Current (OBIC) . . . . .	66
7.2.2	Erzeugung der Zweiten Harmonischen . . . . .	68
7.3	Ergebnis . . . . .	71
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Mikroskopie ist seit einigen Jahrhunderten in Biologie und Medizin ein Hilfsmittel, das den Fortgang der Forschung wesentlich mitbestimmt hat. Obgleich das Prinzip des Mikroskops spätestens seit Abbes theoretischen Abhandlungen [1] bekannt ist, werden dennoch immer wieder neue Varianten entwickelt, wie zum Beispiel die konfokale Mikroskopie [2, 3] oder in jüngster Zeit die Zweiphotonen-Mikroskopie [4, 5]. Diese beiden Methoden ermöglichen es, über die Anregung geeigneter Farbstoffe dreidimensionale Bilder von transparenten Objekten aufzuzeichnen. Bei der konfokalen Mikroskopie ist dazu ein aufwendiges Detektionsverfahren notwendig. Die Zweiphotonen-Mikroskopie ermöglicht es hingegen durch die spezielle Art der Anregung, dreidimensionale Bilder aufzuzeichnen. Im kleinen Bereich des Fokus ist die Intensität des Lasers hoch genug, um eine Anregung des Farbstoffs zu erzielen. Somit entsteht das gesamte Fluoreszenzlicht ausschließlich in diesem Bereich. Es können dadurch vereinfachte Detektionsverfahren angewandt werden.

Um die zur Zweiphotonen-Mikroskopie notwendigen Intensitäten zu erreichen, sind entweder Laser mit hoher mittlerer Energie, die jedoch zu einer hohen Strahlenbelastung führen oder Laser mit geringer Pulsbreite notwendig. Besonders geeignet sind Femtosekundenlaser mit einer hohen Repetitionsrate, denn bei ihnen liegt die zur Anregung notwendige Energie extrem niedrig. Femtosekundenimpulse werden beim Durchgang durch Glasmaterialien zeitlich verlängert, ein Effekt, der hier unerwünscht ist. Durch geeignete Mittel kann der Pulsverbreiterung entgegengewirkt werden und so die Energiebelastung minimiert werden. Um dies zu bewerkstelligen, müssen geeignete optische Komponenten entwickelt und Autokorrelationsmethoden erprobt werden, die den Erfolg der Maßnahmen zeigen.

Ein erstes Ziel der Diplomarbeit ist es, unterschiedliche kommerziell erhältliche Femtosekundenlaser an ein ebenfalls kommerziell erhältliches Laserscanning Mikroskop anzukoppeln und die Eigenschaften des Systems zu charakterisieren. Als Ergebnis dieser ersten Untersuchungen soll ein vollständig im Femtosekundenbereich charakterisiertes Laser-Scan-Mikroskop zur Verfügung stehen, das es ermöglicht, dreidimensionale Bilder von biologischen Objekten mit minimaler Pulsenergie aufzunehmen.

Weiterhin zeigen die in der konfokalen Mikroskopie gebräuchlichen Farbstoffe bei einer Zweiphotonen-Anregung ein abweichendes Verhalten. Die Wirkungsquerschnitte sind wesentlich geringer und die Absorptionsbänder breiter. Es können somit verschiedene Farbstoffe mit einer festen Anregungswellenlänge simultan angeregt werden.

Die Emissionsspektren der Farbstoffe sind jedoch unabhängig von der Art der Anregung.

Die Eigenschaften von Farbstoffen, die in der konfokalen Mikroskopie häufig verwendet wer-

den, stehen im zweiten Teil der Diplomarbeit im Vordergrund. Diese sollen vor allem auf ihre Verwendbarkeit in der Zweiphotonen-Mikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm getestet werden. Weiterhin soll ein Parametersatz festgelegt werden, in dem eine Zweiphotonen-Absorption stattfindet.

Der Einsatz des Laser-Scan-Mikroskops mit einem Femtosekundenlaser als Lichtquelle wäre auch bei der Untersuchung von Halbleitern denkbar. Durch die vorhandenen hohen Intensitäten ist die Erzeugung der Zweiten Harmonischen oder eines photoinduzierten Ladungsträgerstroms in p-n-Übergängen möglich, wodurch Aussagen über die Kristallstruktur oder Fehlstellen in integrierten Schaltkreisen getroffen werden. Die speziellen Eigenschaften dieser Effekte werden am Ende des zweiten Teils der Diplomarbeit untersucht.

# Kapitel 2

## Überblick

### 2.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskope zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet. Die eingestrahelten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch Absorption eines Photons Abb. 2.1 a) aus dem untersten Vibrationsniveau des Grundzustands  $S_0$  in ein angeregtes Vibrationsniveau eines höheren Zustands  $S_1$  an. Für ein angeregtes Molekül gibt es mehrere Möglichkeiten, in den Grundzustand zurückzugelangen. Die Prozesse, die hierbei auftreten, sind in Abb. 2.1 dargestellt und werden wie folgt definiert:

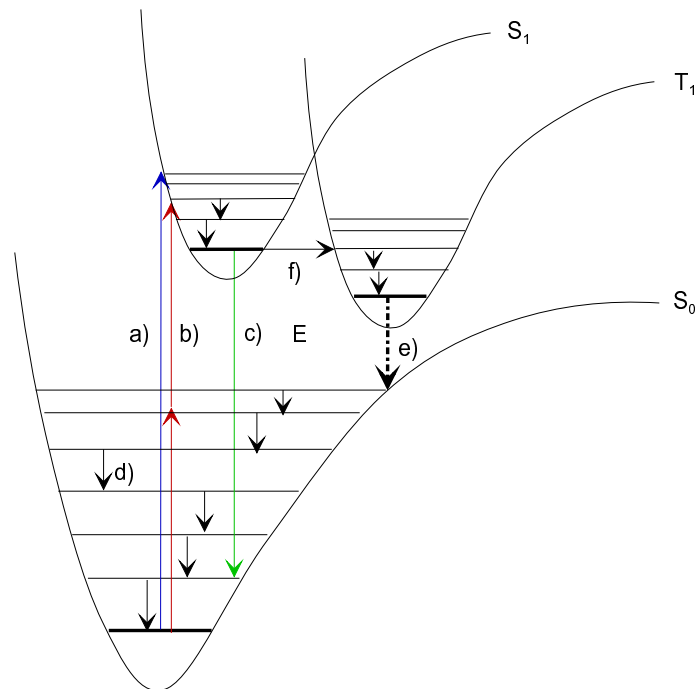


Abbildung 2.1: An- und Abregungsprozesse in einem Molekül a) Einphotonen-Absorption; b) Zweiphotonen-Absorption; c) Fluoreszenz; d) Relaxation; e) Phosphoreszenz und f) Innere Konversion

Durch Stöße mit anderen Molekülen kann das angeregte Molekül Vibrationsenergie verlieren. Durch diesen sehr schnellen Prozeß (einige Pikosekunden), der als **Relaxation (d)** bezeichnet wird, gelangt das Molekül schrittweise in das unterste Vibrationsniveau von  $S_1$ .

Als **Fluoreszenz (c)** wird der direkte spontane Übergang vom angeregten Singulettniveau  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  bezeichnet. Die Wellenlänge  $\lambda_e$  des ausgesendeten Lichtes (Emissionswellenlänge) ergibt sich näherungsweise aus der Energiedifferenz  $\Delta E$  der beiden Niveaus mit  $\Delta E = h \frac{c}{\lambda_e}$ . Die Lebensdauer des angeregten Singulettniveaus  $S_1$  beträgt im Normalfall einige Nanosekunden. Durch die im Vergleich zum Fluoreszenzübergang sehr schnellen Relaxationsprozesse ist die Emissionswellenlänge gegenüber der Anregungswellenlänge immer rotverschoben. Diese Verschiebung wird als **Stokesverschiebung** bezeichnet. Sie ermöglicht eine Trennung des Fluoreszenzlichtes vom Anregungslicht.

Wenn sich ein Vibrationsniveau von  $S_1$  mit einem Vibrationsniveau des ersten Triplett-niveaus  $T_1$  überlagert, kann das angeregte Molekül strahlungslos von einem Singulettzustand in den Triplettzustand übergehen. Dieser Vorgang wird als **innere Konversion (f)** bezeichnet. Im Triplettzustand gelangt das Molekül wiederum durch Relaxation in das unterste Vibrationsniveau. Innere Konversion findet auch zwischen höheren Singulettzuständen  $S_n$  ( $n = 2, 3, \dots$ ) und dem  $S_1$ -Niveau statt. Die Lebensdauer dieser Übergänge liegt meist im Pikosekundenbereich. Es findet somit keine Abregung des Moleküls durch Fluoreszenz aus einem hochangeregten Niveau in den Grundzustand statt, sondern diese relaxieren strahlungslos in das unterste Vibrationsniveau des ersten angeregten Zustands.

Einen Übergang vom ersten Triplettniveau  $T_1$  in den Grundzustand  $S_0$  unter Aussendung eines Photons bezeichnet man als **Phosphoreszenz (e)**. Übergänge zwischen Triplett- und Singulettzuständen sind in der elektrischen Dipolnäherung aufgrund der Spinerhaltung verboten. Bei Strahlungsübergängen sind diese Prozesse nicht absolut verboten. Durch die Spin-Bahn-Kopplung kann es zu einem langsamen Zerfall des angeregten Triplett-niveaus kommen. Die Lebensdauer des untersten Triplettzustands  $T_1$  ist dadurch sehr groß und beträgt einige Mikrosekunden bis Sekunden.

Eine innere Konversion ist auch zwischen  $S_1$  und  $S_0$  möglich. Nicht alle angeregten Moleküle gelangen somit unter Aussendung von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in den Grundzustand. Dies führt zum Begriff der Quanteneffizienz.

Die **Quanteneffizienz**  $\Phi$  ist ein Maß für die Fluoreszenzausbeute eines Farbstoffs. Sie berechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl der Zustände  $N_F$ , die unter Aussendung von Fluoreszenz zerfallen, zu der Gesamtzahl der angeregten Zustände  $N_G$  entsprechend:

$$\Phi = \frac{N_F}{N_G}$$

Das Fluoreszenzlicht wird in einem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten dichroitischen Filtern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt detektiert. Dadurch ist die Darstellung der einzelnen, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteile möglich. Zur Anregung der Farbstoffmoleküle mit Hilfe einer Einphotonen-Absorption ist eine energiereiche, kurzweilige Strahlung nötig. Die Einphotonen-Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben.

In einem **Laser-Scan-Mikroskop (LSM)** werden zur Anregung der verschiedenen Farbstoffe Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Der Laserstrahl wird hierzu beugungsbegrenzt fokussiert. Der Fokus rastert die Probe dann punktförmig in x-y-Richtung ab. Die Einphotonen-Anregung der Farbstoffe erfolgt jedoch im gesamten Fokuskegel entsprechend Abb. 2.2 b. Eine Untersuchung von dicken Präparaten ist mit dieser Anordnung nicht möglich, da die Auflösung durch Streu- und Fluoreszenzlichtanteile außerhalb der Fokusebene beschränkt wird.



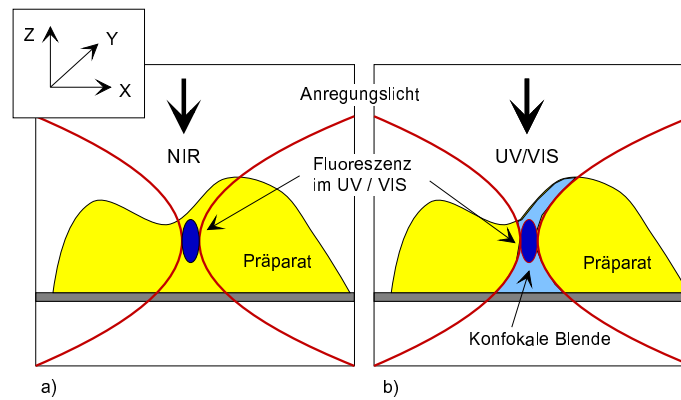


Abbildung 2.2: Anregung in einem Präparat mit a) Zweiphotonen-Absorption und b) mit Einphotonen-Absorption

Eine Methode zur Unterdrückung der Streu- und Fluoreszenzlichtanteile aus anderen Fokusebenen wurde von Minsky im Jahre 1957 aufgezeigt.

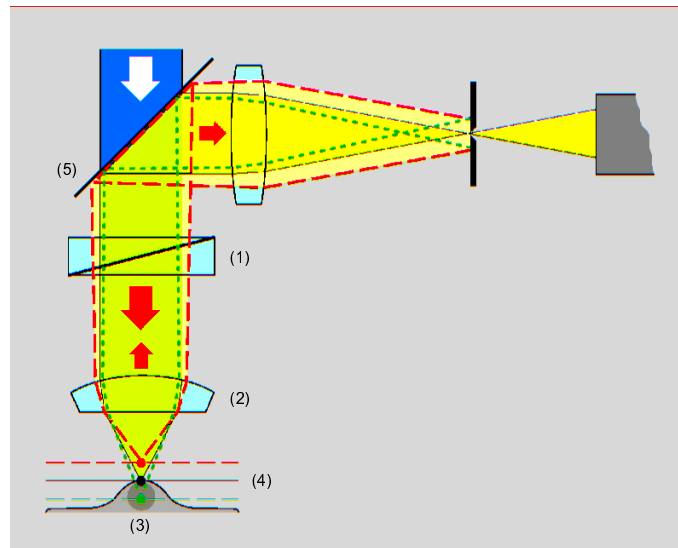


Abbildung 2.3: Konfokales Prinzip: (1) Scanner; (2) Objektiv; (3) Präparat; (4) Fokusebene; (5) Dichroitischer Strahlteiler

Abb. 2.3 zeigt schematisch die als **konfokales Prinzip** [3] bezeichnete Methode. Das Laserlicht wird mit Hilfe des Objektivs (2) beugungsbegrenzt über die Scanner (1) und die Tubuslinse in das Präparat (3) abgebildet. Fluoreszenzlicht, das aus der Fokusebene (4) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, gelangt über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (5). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch wirkt die Blende wie ein Raumfilter, und die Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus werden unterdrückt (gestrichelte Strahlengänge). Hinter der Blende befindet sich ein Detektor zur Messung des Fluoreszenzlichtes. Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird somit nur die Ebene (**optischer Schnitt**) wiedergegeben, die sich in der

Fokusebene des Objektivs befindet.

Durch die Aufzeichnung mehrerer optischer Schnitte in der  $x$ - $y$ -Ebene in verschiedenen Tiefen  $z$  der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden.

Die Dicke der optischen Schnitte, d.h. die **Tiefenauflösung** des LSM wird durch die Größe der konfokalen Blende bestimmt. Dabei gilt: Je kleiner der Blendendurchmesser ist, desto größer ist die Tiefenauflösung des konfokalen LSM.

Das konfokale LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Nachteilig ist jedoch, daß zur Einphotonen-Anregung kurzwellige Laserstrahlung (UV, VIS) verwendet werden muß, die im gesamten Präparat entlang des Fokuskegels zu Strahlungsschädigungen führen kann [6, 7]. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff bestimmt. Dadurch müssen zur Anregung von Mehrfachfluoreszenzen verschiedene Laser eingesetzt werden. Durch das aufwendige Detektionsverfahren werden weiterhin hohe Anforderungen an die verwendeten Optiken gestellt.

## 2.2 Zweiphotonen-Mikroskopie

Eine Anregung der Farbstoffmoleküle kann auch durch die simultane Absorption von zwei Photonen, entsprechend Abb. 2.1 b) auf Seite 6, erfolgen. Dieser nichtlineare Prozess 2. Ordnung wurde von Maria Göppert-Mayer im Jahre 1931 vorhergesagt [8]. Die Emissionswellenlänge ist hier immer kleiner als die Anregungswellenlänge.

Die Farbstoffe zeigen allerdings bei dieser nichtlinearen Anregung im Gegensatz zur Einphotonen-Absorption ein anderes Verhalten. Die Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte der Farbstoffe, d.h. die Wahrscheinlichkeiten, ein Farbstoffmolekül in den angeregten Zustand zu befördern, sind wesentlich geringer als bei der Einphotonen-Absorption und liegen bei einigen  $10^{-50} \left[ \frac{\text{cm}^4 \text{s}}{\text{Photon}} \right]$ .

Deshalb sind zur Anregung eines Zweiphotonen-Übergangs in Farbstoffen hohe Intensitäten (Photonendichten) von größer  $2 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$  notwendig (vgl. Abschnitt 4.1.3), die nur im Fokus der Probe erzielt werden können.

Diese Eigenschaften der Zweiphotonen-Absorption können in der Fluoreszenzmikroskopie ausgenutzt werden und führen zu folgenden Vorteilen gegenüber der konfokalen Einphotonen Laser-Scan-Mikroskopie:

1. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt bei der Zweiphotonen-Absorption aufgrund der notwendigen hohen Intensitäten nur im Fokus des Objektivs. Das Zweiphotonen-LSM ist dadurch ohne konfokale Blende tiefendiskriminiert (siehe auch Abb. 2.2 a auf Seite 8). Die Ortsauflösung resultiert also aus der Art der Anregung und nicht mehr wie in einem konfokalen Einphotonen-LSM aus der Art der Detektion. Sie wird nun allein durch die Größe des Objektivfokus in der Probe bestimmt. Es können dadurch wesentlich einfachere Detektionsmethoden angewandt werden, da das Fluoreszenzlicht 'nur' noch aufgesammelt werden muß.  
S. Hell et al. [9] fand beim Vergleich der Auflösung unter gepulster (730 nm, 217 fs, 76 MHz) und unter kontinuierlicher Anregung (730 nm, cw) keine signifikante Änderung der Auflösung, jedoch eine Erhöhung des Kontrastes. Für Pulslängen kleiner 10 fs wird sogar eine um 30 Prozent höhere axiale Auflösung (Tiefenauflösung) bei gepulster Anregung erwartet [10].
2. Bleicheffekte können bei der Zweiphotonen-Anregung minimiert werden, da eine Absorption und damit ein evtl. Ausbleichen nur im Fokus erfolgt. Die Probe kann somit wenigstens

einmal abgescannt werden.

3. Strahlungsschäden werden bei der Zweiphotonen-Anregung durch den Einsatz von nahinfraroter und gepulster Laserstrahlung gering gehalten, da die Einphotonen-Absorption des meist wässrigen Gewebes im Wellenlängenbereich von 700 - 1400 nm minimal ist. Die Anregung von speziellen UV-Farbstoffen ist ebenfalls möglich. Vergleichsmessungen zwischen der Zweiphotonen-Anregung (710 nm, 140 fs, 82 MHz, 12 mW) und konfokaler UV-Laser-Scan-Mikroskopie an biologischen Präparaten wurden von Sako et al. [12] beschrieben. Bei der Untersuchung von mit Indo-1 gefärbten F-Zellen fanden sie eine 2- bis 4-fache Ausbleichrate bei der UV-Anregung im Vergleich zur Zweiphotonen-Anregung.
4. Die Eindringtiefen von nahinfraroter Strahlung sind wesentlich größer als z.B. von UV-Strahlung. Somit können auch wesentlich dickere Proben (größer 500  $\mu\text{m}$ ) untersucht werden. Diese extrem hohen Eindringtiefen sind besonders in der Neurologie bei der Untersuchung von dicken Hirnschnitten interessant. Durch die Präparierung der Schnitte werden meist die oberen Schichten des Objekts zerstört. Die Informationen können nur aus tieferen Schichten gewonnen werden.
5. In einem Zweiphotonen-Mikroskop können mit Hilfe einer Anregungswellenlänge mehrere Farbstoffe simultan angeregt werden. Dies liegt daran, daß bei der Zweiphotonen-Absorption auch Zustände angeregt werden, die für Einphotonen-Dipol-Übergänge aufgrund der Auswahlregeln verboten sind. Die Emissionsspektren gleichen denen des Einphotonenfalles, weil das angeregte Molekül nicht 'weiß', wie es in diesen Zustand gelangte. Dies kann sich nachteilig auswirken, wenn sich die Emissionsspektren der Farbstoffe überlagern.

Die Zweiphotonen-Mikroskopie ist somit besonders zur Untersuchung von dicken biologischen Schnitten und von Lebendpräparaten geeignet. Die Detektion kann auf eine einfache Art und Weise erfolgen.

Die zur Zweiphotonen-Anregung notwendigen hohen Intensitäten von größer  $2 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$  können besonders vorteilhaft durch die Kombination eines Ultrakurzpulslaser mit einem LSM realisiert werden. In dem LSM wird dazu die Laserstrahlung beugungsbegrenzt auf ein sehr kleines Volumen von etwa  $0.1 \mu\text{m}^3$  fokussiert. Durch die Verwendung eines Kurzpulslasers wird die mittlere Laserleistung zusätzlich auf ein kleines Zeitintervall konzentriert.

Ein Kurzpulslaser zeichnet sich durch die Kenngrößen Pulslänge, Pulsenergie und Pulswiederholrate (Repetitionsrate) aus. Durch die ersten beiden Kenngrößen wird die Spitzenleistung (Pulsenergie pro Pulslänge) und damit die Intensität (Spitzenleistung pro Fläche) eines Pulses bestimmt. Diese Größen sind für die Anregung des Zweiphotonen-Übergangs verantwortlich. Aus der Repetitionsrate, d.h. der Anzahl der Pulse pro Sekunde und der Spitzenleistung kann die mittlere Leistung berechnet werden. Die Repetitionsrate und damit die mittlere Leistung bestimmen das Signal- zu Rauschverhältnis und die Bildaufnahmezeiten. Sie bewirken ein Aufheizen des Präparates. Besonders bei Lebendpräparaten führen mittlere Leistungen von größer 6 mW zu einer Störung der Zellteilung, und für mittlere Leistungen von größer 10 mW erfolgt eine vollständige Zerstörung der Zellen [6]. Im allgemeinen gilt: Je kürzer die Pulslänge ist, desto höher ist die Spitzenleistung und desto geringer ist die mittlere Leistung.

Zur Zweiphotonen-Mikroskopie sind somit Laser mit möglichst kurzen Pulsängen und damit hohen Spitzenleistungen bei gleichzeitig niedrigen mittleren Leistungen am besten geeignet. Eine solche Quelle stellen die Femtosekundenlaser dar, die mit einer Pulslänge von einigen 100 fs kommerziell erhältlich sind, wobei sich die Wellenlängen im infraroten Spektralbereich von

$> 700$  nm bewegen. Mit Hilfe dieser Laser ist zur Bereitstellung der notwendigen Intensitäten von  $\geq 2 \cdot 10^8$  W/cm<sup>2</sup> eine mittlere Leistung von  $\geq 5$   $\mu$ W notwendig (vgl. Abschnitt 4.1.3).

Aufgrund der bisherigen Einsatzgebiete des verwendeten LSM wurden die komplexen Optiksysteeme des Mikroskops, inklusive der Objektive, bisher nur für den ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich optimiert und charakterisiert. Gepulste Lichtquellen fanden bisher keine Verwendung.

Ultrakurze Laserpulse besitzen aufgrund ihrer kurzen Pulslängen einige spezielle Eigenschaften. Zur Charakterisierung des optischen Systems sind deshalb folgende, für kurze Laserpulse charakteristische Techniken zu verwenden: die Messung der Pulslänge durch die Aufnahme der Autokorrelation, die Berücksichtigung der Pulsverbreiterung durch den Einfluß der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) und die Möglichkeiten der Kompensation der GVD in einer Prechirp-Einheit. Die in den Experimenten verwendeten Techniken sollen im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

# Kapitel 3

## Ultrakurze Laserpulse

Die Pulslänge ultrakurzer Laserpulse ist durch die spektrale Breite  $\Delta\lambda$  des Lasermediums gegeben. Typisch sind Werte von  $\Delta\lambda/\lambda_c \approx 1 \dots 10\%$ , wobei  $\lambda_c$  die Mittenwellenlänge des Pulses ist. Die Ausbreitung eines solchen Pulses in einem optischen Medium kann mit Hilfe der Maxwell'schen Gleichungen beschrieben werden. Dies erfolgt im ersten Teil dieses Kapitels.

Die Pulsform im Zeit- und im Frequenzbereich kann grundsätzlich durch verschiedene Profile dargestellt werden. Durch das in dieser Arbeit verwendete Gaußsche Profil läßt sich ein relativ einfacher mathematischer Formalismus, der die Ausbreitung eines solchen Pulses in einem optischen Medium ausreichend gut beschreibt, ableiten. Im zweiten Teil dieses Abschnitts wird gezeigt, daß zur vollständigen Charakterisierung eines ultrakurzen Laserpulses die Halbwertsbreiten des Gaußschen Profils im Frequenz- und im Zeitraum ausreichen.

Zur Bestimmung der Pulslängen sind spezielle Techniken erforderlich, da herkömmliche Meßmethoden (z.B. Photodioden) aufgrund ihrer langsamen Antwortzeiten versagen. Spezielle Meßmethoden werden im dritten Abschnitt aufgeführt.

In normal dispersiven Medien, wie z.B. optischen Gläsern, breiten sich die im Vergleich zur Mittenwellenlänge rotverschobenen Wellenlängenanteile mit einer höheren Gruppengeschwindigkeit aus als die blauverschobenen Wellenlängenanteile. Somit kommt es zu einer zeitlichen Verbreiterung des Eingangspulses. Dieser lineare Effekt wird als Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) bezeichnet. Die Wellenlängenanteile des Pulses sind nach Durchlaufen des Mediums zeitlich geordnet. Diese Anordnung der Wellenlängenanteile wird als Phasenmodulation oder Chirp bezeichnet. Durch einen Gaußpuls mit linearem Chirp kann die Ausbreitung in einem optischen Medium hinreichend gut und mit einem relativ einfachen mathematischen Formalismus beschrieben werden. Wird zusätzlich ein Chirp höherer Ordnung betrachtet, dann erfolgt die Berechnung der Pulsverbreiterung numerisch. Im allgemeinen gilt: Je kürzer die Pulslänge ist, desto breiter ist das Spektrum des Pulses und dementsprechend größer wird die Verbreiterung des Pulses beim Durchlaufen des optischen Mediums. Dieser Effekt ist jedoch unerwünscht, da sich das Fluoreszenzsignal bei der Zweiphotonen-Absorption mit größer werdender Pulslänge verringert. Der Verringerung des Signals kann zum einen mit Hilfe einer Erhöhung der mittleren Leistung – was zu einer Verstärkung der Belastung (Aufheizen) der biologischen Präparate führen würde – oder mit Hilfe von geeigneten Kompensationsmethoden (Prechirping) entgegengewirkt werden. Beim Prechirpen wird die Phasenmodulation des Pulses in einer Prechirp-Einheit so eingestellt, daß die blauverschobenen Wellenlängenanteile den rotverschobenen Wellenlängenanteilen vorauslaufen. Im normal dispersiven Medium laufen die Wellenlängenanteile wieder zusammen. Die Phasenmodulation, d.h. die Pulsverbreiterung kann somit kompensiert werden.

Des weiteren können bei der Ausbreitung ultrakurzer Laserpulse in optischen Medien nichtlineare Prozesse (wie Selbstphasenmodulation (SPM) oder Kreuzphasenmodulation (XPM)) auftreten.

Diese nichtlinearen Prozesse sind jedoch an hohe Intensitäten und große Wechselwirkungslängen mit dem Medium geknüpft und wurden mit geeigneten Methoden (wie Abschwächung der mittleren Leistung des Lasers) unterdrückt und sollen deshalb nicht näher erläutert werden.

Nichtlineare Effekte verändern außerdem die Form und das Spektrum des Pulses, wobei die linearen Effekte (GVD) die zeitliche Breite, jedoch nicht das Spektrum verändern. Die linearen Effekte (GVD) und die Möglichkeiten ihrer Kompensation sollen im letzten Teil dieses Abschnitts speziell für Gaußsche Pulse mathematisch beschrieben werden.

### 3.1 Kurze Laserpulse

Die Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften von ultrakurzen Laserpulsen ist an die Abhandlungen in Referenz [15] angelehnt.

Aus den MAXWELLSchen Gleichungen kann man die Wellengleichung für die Ausbreitung eines optischen Feldes in einem homogenen, isotropen, nicht magnetischen Medium ableiten. Sie lautet:

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{c^2} = \epsilon_0 \mu_0$$

$\vec{E}$  und  $\vec{P}$  sind die elektrische Feldstärke bzw. die Polarisation des Mediums.  $c$  steht für die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, wobei  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante und  $\mu_0$  die Permeabilitätszahl in Vakuum sind.

Unter der Annahme einer skalaren Wellenausbreitung in  $z$ -Richtung und einer quasimonochromatischen Welle mit einer Mittenfrequenz  $\omega_0$  ergibt sich als eine allgemeine Lösung der Wellengleichung:

$$E(z, t) = E_0 \exp\{i(kz - \omega_0 t)\} + c.c.$$

$c.c.$  bezeichnet das Komplex-Konjugierte des ersten Terms.

Die zeitlich Einhüllende des Laserpulses  $E_0$  variiert im Vergleich zum zweiten Term langsam in  $z$ -Richtung (Slowly Varying Envelope Approximation – SVGA). Für einen Laserpuls ist nicht nur die Einhüllende eine Funktion der Zeit, sondern auch die Phase  $\phi(t)$ . Die Zeitabhängigkeit des elektrischen Feldes für eine beliebige Pulsform an einem festen Ort  $z = 0$  ergibt sich dann aus:

$$E(t) = E_0(t) \exp\{-i\phi(t)\} \tag{3.1}$$

In der Realität hat jeder Puls eine bestimmte spektrale Breite. Die Beschreibung eines beliebigen Pulses kann alternativ mit Hilfe seiner FOURIERkomponenten erfolgen.

$$E(t) = \mathcal{F}^{-1}[\tilde{E}(\omega)] = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} d\omega \tilde{E}(\omega) \exp\{-i\omega t\} \tag{3.2}$$

Entsprechend gilt für die Transformation in den Frequenzraum:

$$\tilde{E}(\omega) = \mathcal{F}[E(t)] = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} dt E(t) \exp\{i\omega t\} \tag{3.3}$$

Diese Transformationen in den Zeit- bzw. Frequenzbereich sind bis auf einen konstanten Phasenfaktor eindeutig. Die Halbwertsbreiten im Frequenz- bzw. im Zeitbereich (Full Width Half Maximum–FWHM) sind wichtige Parameter zur Beschreibung von Laserpulsen. Die FWHM ist im Zeitraum und analog im Frequenzraum wie folgt definiert:

$$\Delta\tau = 2t_1/2 \quad \text{mit} \quad E(t_1/2) = \frac{1}{2}E(0) \quad , \quad (3.4)$$

wobei angenommen wurde, daß die maximale Amplitude von  $E$  bei  $t = 0$  auftritt. Für das Zeit–Bandbreiten–Produkt aus  $\Delta\tau$  und  $\Delta\omega$  ergibt sich, je nach verwendeter Pulsform, ein charakteristischer Wert. Dieser Wert ist minimal für einen bandbreitenbegrenzten Puls. Das bedeutet, daß der Puls keine Phasenmodulation besitzt. Man spricht in diesem Fall auch von einem chirp–freien Puls.

Die Phase  $\phi(t)$  weicht im Normalfall nur geringfügig von der Phase  $\phi(0)$  ab und kann deshalb in eine TAYLORreihe um  $\phi(0)$  entwickelt werden:

$$\phi(t) = \phi(0) + \omega_0 t + \frac{1}{2}At^2 + \frac{1}{6}Bt^3 + \dots \quad (3.5)$$

Die momentane Kreisfrequenz ergibt sich dann aus folgender Beziehung:

$$\omega(t) = \frac{d\phi(t)}{dt} = \omega_0 + At + \frac{1}{2}Bt^2 + \dots \quad , \quad (3.6)$$

wobei  $A$  als linearer Chirpparameter,  $B$  als quadratischer Chirpparameter bezeichnet werden. Beide Parameter beschreiben Prozesse, bei denen sich die Kreisfrequenz zeitlich linear bzw. quadratisch ändert.

Weder das elektrische Feld noch seine Fouriertransformierte können direkt gemessen werden. Meßbar sind dagegen die Intensitäten  $I(t)$  und  $I(\omega)$ . Diese hängen mit dem elektrischen Feld wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned} I(t) &= \epsilon_0 c |E(t)|^2 \\ I(\omega) &= \epsilon_0 c |\tilde{E}(\omega)|^2 = |\mathcal{F}[E(t)]|^2 \end{aligned} \quad (3.7)$$

Die Intensitäts–Halbwertsbreiten unterscheiden sich von denen des elektrischen Feldes um einen von der Pulsform abhängigen Faktor. Phaseninformationen sind durch die Messung der Intensitäten nicht gewinnbar.

## 3.2 Gaußsche Pulse

Die im vorigen Abschnitt gewonnenen funktionellen Zusammenhänge sollen nun speziell auf Gaußsche Pulse mit einem linearen Chirp angewendet werden. Die definierten Größen bilden die Grundlage für die Ableitungen in den folgenden Kapiteln.

Das elektrische Feld im Zeit- und im Frequenzraum kann für einen Gaußschen Puls mit einem linearen Chirpparameter  $A$  wie folgt ausgedrückt werden:

$$\begin{aligned}
E(t) &= \exp \left[ -a^2(1 - iA)t^2 + i\omega_0 t \right] \\
&= \exp(-a^2 t^2) \exp \left[ i(a^2 A t^2 + \omega_0 t) \right] \\
\tilde{E}(\omega) &\sim \exp \left[ -\frac{(\omega - \omega_0)^2}{4a^2(1 + A^2)}(1 + iA) \right]
\end{aligned} \tag{3.8}$$

Die Momentanfrequenz ist dann entsprechend Gl. (3.6) :

$$\omega(t) = \omega_0 + 2a^2 A t, \tag{3.9}$$

wobei  $2a^2 A$  dem linearen Chirp entspricht. Für die Intensitäten ergibt sich dann:

$$\begin{aligned}
I(t) &\sim \exp \left[ -2a^2 t^2 \right] \\
I(\omega) &\sim \exp \left[ -\frac{(\omega - \omega_0)^2}{2a^2(1 + A^2)} \right]
\end{aligned} \tag{3.10}$$

Tabelle 3.1 faßt die Halbwertsbreiten und die Zeit–Bandbreiten–Produkte für einen Gaußschen Puls zusammen.

Tabelle 3.1: Charakteristische Parameter für einen Gaußschen Puls

	FWHM	Zeit–Bandbreiten–Produkt
$E(t)$	$\frac{2\sqrt{\ln 2}}{a}$	
$\tilde{E}(\omega)$	$4a\sqrt{(1 + A^2) \ln 2}$	$8 \ln 2 \sqrt{1 + A^2}$
$I(t)$	$\Delta\tau = \frac{\sqrt{2 \ln 2}}{a}$	
$I(\omega)$	$\Delta\omega = 2a\sqrt{2(1 + A^2) \ln 2}$	$4 \ln 2 \sqrt{1 + A^2}$

Mit Hilfe des Zeit–Bandbreiten–Produkts kann der lineare Chirpparameter  $A$  aus der Pulslänge im Zeit- und im Frequenzbereich berechnet werden.

### 3.3 Pulsdiagnostik

Konventionelle Methoden, wie z.B. die Verwendung von Photodioden oder von Streikkameras, sind für die Untersuchung von Femtosekunden–Pulsen ungeeignet. Deshalb müssen zur Untersuchung spezielle Techniken, wie Autokorrelations- oder Kreuzkorrelationsmethoden verwendet werden. Erstere wurden aufgrund ihrer einfachen Realisierbarkeit in den Experimenten eingesetzt. Im folgenden sollen die Grundlagen der Autokorrelationsmethode zusammengestellt und der Aufbau des Autokorrelators beschrieben werden.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß ein Puls mit Hilfe von Strahlteilern in  $n$  gleiche Pulse aufgeteilt wird, wobei diese gegeneinander zeitlich verschoben werden können. Anschließend werden die Pulse in einem nichtlinearen Medium überlagert und das von der zeitlichen Verschiebung



abhängige Signal aufgezeichnet. Aus dem so aufgezeichneten Signal sind Rückschlüsse auf die Pulslänge möglich. Entsprechend dem verwendeten Versuchsaufbau unterscheidet man zwischen Korrelationen mit und ohne Hintergrund sowie zwischen Intensitätskorrelationen und interferometrischen Korrelationen. Für die allgemeine interferometrische Korrelation n-ter Ordnung mit Hintergrund  $g_n^{(B)}(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_{n-1})$  ergibt sich entsprechend [15, 16]:

$$g_n^{(B)}(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_{n-1}) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} |[E(t) + E(t + \tau_1) + \dots + E(t + \tau_{n-1})]^n|^2 dt}{n \int_{-\infty}^{\infty} |E(t)|^{2n} dt} \quad (3.11)$$

Der in den Experimenten verwendete Aufbau des Autokorrelators ist in Abb. 3.1 dargestellt. Er besteht im wesentlichen aus einem Michelson-Interferometer, in dem zwei möglichst identische Pulse erzeugt werden. Durch die Variation eines Interferometerarmes kann ein Puls gegenüber dem anderen zeitlich verzögert werden. Als nichtlineares Medium wurde die Zweiphotonen-Absorption (siehe Abschnitt 4.1.1) in einer Farbstoffküvette [17] und die Generierung der zweiten Harmonischen (SHG-Erzeugung in einem Kristall wie BBO) verwendet. In beiden entstehen nichtlineare Effekte zweiter Ordnung. Die Komponenten sind so angeordnet, daß die Autokorrelation mit Hintergrund gemessen werden konnte. Für die interferometrische Autokorrelation zweiter Ordnung mit Hintergrund  $g_2^{(B)}(\tau)$  ergibt sich:

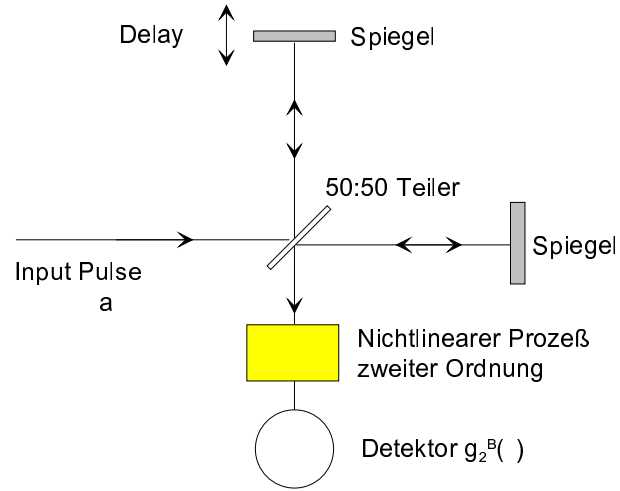


Abbildung 3.1: Aufbau zur Messung der Autokorrelation zweiter Ordnung mit Hintergrund

$$g_2^{(B)}(\tau) = \frac{\int dt |E(t) + E(t - \tau)|^4}{2 \int dt |E(t)|^4} \quad (3.12)$$

$\tau$  ist die zeitliche Verzögerung des einen Pulses gegenüber dem anderen. Bei der Intensitätsautokorrelation mitteln sich die schnellen Oszillationen heraus. Man erhält für die Intensitätsautokorrelation zweiter Ordnung mit Hintergrund  $G_2^{(B)}(\tau)$ :

$$G_2^{(B)}(\tau) = 1 + 2G_2^{(0)}(\tau) \quad \text{und} \quad G_2^{(0)}(\tau) = \frac{\int dt I(t)I(t - \tau)}{\int dt I^2(t)} \quad (3.13)$$

Beim Einsetzen von Gl. (3.8) in Gl. (3.12) folgt für einen Puls mit einem Gaußprofil die interferometrische Autokorrelation zweiter Ordnung mit Hintergrund.

$$g_2^{(B)}(\tau) = 1 + 2 \exp[-a^2 \tau^2] + 4 \exp\left[-a^2 \tau^2 \frac{3 + A^2}{4}\right] \cos \frac{Aa^2 \tau^2}{2} \cos \omega_0 \tau + \exp[-a^2(1 + A^2)\tau^2] \cos 2\omega_0 \tau \quad (3.14)$$

Die Intensitätsautokorrelation zweiter Ordnung ist dann:

$$G_2^{(B)}(\tau) = 1 + 2 \exp[-a^2 \tau^2] \quad (3.15)$$

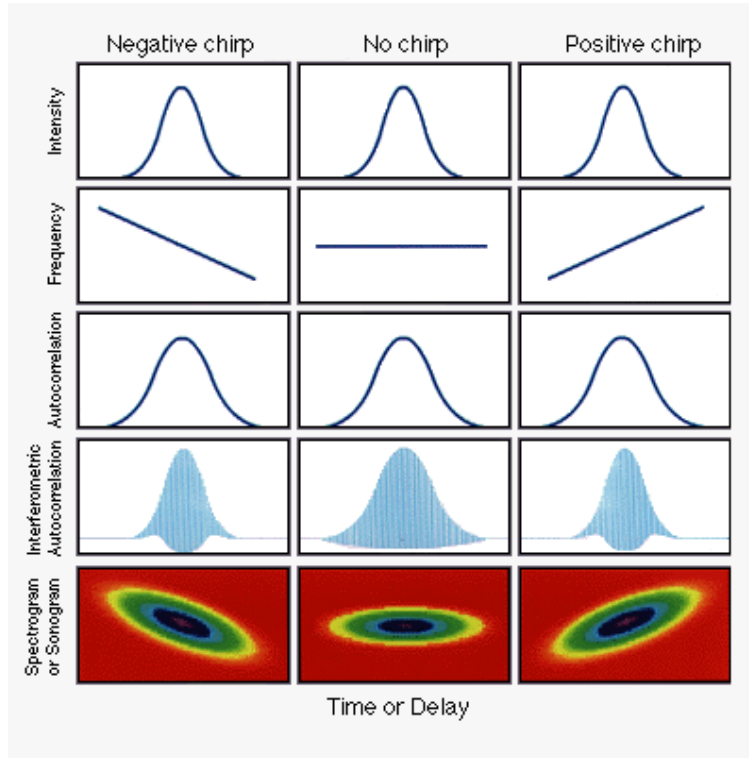


Abbildung 3.2: Messbare Funktionen zur Charakterisierung von Pulsen: Intensitätsverlauf; Frequenzverlauf; Intensitätsautokorrelation; Interferometrische Autokorrelation; FROG-Diagramm (Chirp 3. Ordnung)

Das Kontrastverhältnis der interferometrischen Autokorrelation und Intensitätsautokorrelation zweiter Ordnung mit Hintergrund beträgt 8:1 bzw. 3:1. Die Autokorrelationen zweiter Ordnung sind immer symmetrisch. Somit können keine detaillierten Aussagen über die Pulsform getroffen werden. Man kann nicht erkennen, ob z.B. ein Puls eine steile Kante **vorn** oder **hinten** besitzt. Sind die Pulse phasenmoduliert, schränkt sich der Bereich, in dem sich die Pulse konstruktiv überlagern können, ein. Die interferometrische Autokorrelationsfunktion schnürt sich dadurch auf den Verlauf der Intensitätsautokorrelation ein [18]. Aus dem interferometrischen Autokorrelationssignal sind somit Aussagen über die Größe eines Chirpes, aber nicht über das Vorzeichen des Chirpes möglich [19].

Dieser Sachverhalt ist in Abb. 3.2 für verschiedene Phasenmodulationen (2. Zeile) (negativer, kein und positiver Chirp) dargestellt. Aus der Aufnahme des Intensitätsverlaufs (1. Zeile) oder der Intensitätsautokorrelation (3. Zeile) sind nur die Pulslängen bestimmbar, jedoch keine Aussagen über die Phasenmodulation möglich. Aus der interferometrischen Autokorrelation (4. Zeile) ist der Betrag der Phasenmodulation bestimmbar, jedoch nicht das Vorzeichen der Phasenmodulation. Wird zusätzlich zur Autokorrelation das Spektrum des Autokorrelationssignals mit aufgezeichnet, dann kann aus dem Spektrogramm (5. Zeile) auch auf das Vorzeichen der Phasenmodulation geschlossen werden. Dieses Verfahren wird als frequenz aufgelöste Korrelation (Frequency Resolved Optical Grating – FROG) bezeichnet.

Die FWHM des Intensitätsprofils  $\Delta\tau$  ist mit der FWHM der Intensitätsautokorrelation  $\Delta\tau_G$  über einen konstanten, von der Pulsform abhängigen Faktor verknüpft. Für einen Gaußpuls ergibt sich:

$$\frac{\Delta\tau}{\Delta\tau_G} = \frac{1}{\sqrt{2}} \quad (3.16)$$

### 3.4 Ausbreitung von Laserpulsen in optischen Medien

Die Ausbreitung eines ultrakurzen Pulses in einem optischen System wird durch die Dispersion des Systems charakterisiert. Diese bestimmt sich aus den Materialkonstanten des optischen Mediums und aus der Mittenwellenlänge des Pulses. Mit Hilfe der Dispersion kann die Pulsverbreiterung, d.h. die Pulslänge in der Probe für den entsprechenden Eingangspuls berechnet werden.

Die Dispersion kann mit folgenden Methoden gemessen werden: Zum einen kann sie aus der Messung der spektralen Breite, der Pulslänge des Eingangspulses und der Pulslänge in der Probe, d.h. nach Durchlaufen des Systems ermittelt werden (siehe Gl. (3.27)). Man erhält somit einen nur von experimentell zu bestimmenden Größen abhängigen Wert.

Zum anderen kann die Dispersion durch die Kenntnis der optischen Wege und der genauen Zusammensetzung der optischen Materialien berechnet werden (siehe Gl. (3.21)). Man erhält einen Wert, der nur von den Materialien abhängt und der zum Vergleich mit der experimentell ermittelten Dispersion herangezogen werden kann.

Einen weiteren Vergleichswert für die Dispersion erhält man aus der Bestimmung der zur Kompensation der GVD notwendigen negativen Dispersion in einer Prechirp-Einheit (siehe Gl. (3.29) und Gl. (3.30)).

Die Gleichungen zur Bestimmung der Dispersion mit Hilfe der o.g. drei Varianten sollen in dem folgenden Abschnitt hergeleitet werden.

#### 3.4.1 Lineare Pulspropagation

In dispersiven Medien ist der Brechungsindex  $n = n(\lambda)$  eine Funktion der Wellenlänge. Wie schon gezeigt wurde, ist jeder Puls aus mehreren spektralen Komponenten zusammengesetzt. Durch die Dispersion bewegen sich diese Komponenten mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch das Material. Der sich daraus ergebende Einfluß auf die Pulse wird in diesem Abschnitt untersucht.

Der Puls habe am Ort  $z = 0$  die Pulslänge  $\Delta\tau_0$  und einen Chirp von A. Die Rechnung zur Ausbreitung des Pulses wird im Frequenzraum durchgeführt [13, 20], da die Antwort des Mediums auf die einzelnen Pulsfrequenzen durch die Messung der Brechzahländerungen bekannt ist.

In Abb. 3.3 ist der Algorithmus zur Berechnung der Dispersion dargestellt. Das Eingangsfeld  $E(t, 0)$  wird fouriertransformiert, und man erhält das elektrische Feld im Frequenzraum  $\tilde{E}(\omega, 0)$  entsprechend Gl. (3.8). Nun wird die Phase  $\Phi(\omega)$ , d.h. die Antwort des Systems auf die einzelnen Frequenzanteile des Pulses, mit dem elektrischen Feld multipliziert. Anschließend erfolgt eine Rücktransformation von  $\tilde{E}(\omega, z)$  in den Zeitbereich. Man erhält auf diese Weise eine Beziehung zwischen der Dispersion  $\beta(\omega)z$ , der Eingangspulslänge  $\Delta\tau_0$ , der spektralen Breite  $\Delta\lambda$  und der Ausgangspulslänge  $\Delta\tau(z)$ .

Die Phase  $\Phi(\omega)$ , die der Puls nach Durchlaufen des Mediums besitzt, kann in eine TAYLORreihe um die Zentralfrequenz bis zur dritten Ordnung entwickelt werden. Bei der Ausbreitung werden Absorptionen vernachlässigt.

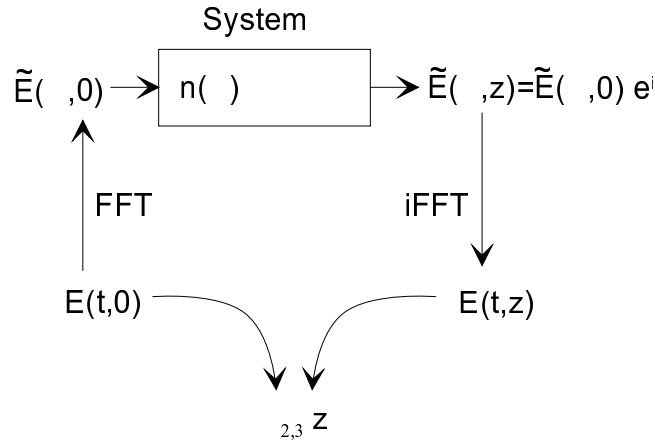


Abbildung 3.3: Rechenalgorithmus zur mathematischen Beschreibung der Ausbreitung ultrakurzer Laserpulse in optischen Medien

$$\phi(\omega) = \phi(\omega_0) + \left. \frac{d\phi}{d\omega} \right|_{\omega_0} (\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \left. \frac{d^2\phi}{d\omega^2} \right|_{\omega_0} (\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{6} \left. \frac{d^3\phi}{d\omega^3} \right|_{\omega_0} (\omega - \omega_0)^3 + \dots \quad (3.17)$$

und mit  $\phi(\omega) = \beta(\omega)z$  ergibt sich daraus für die Dispersion  $\beta(\omega)z$ :

$$\beta(\omega)z = \beta_0(\omega_0)z + \beta_1 z \cdot (\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \beta_2 z \cdot (\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{6} \beta_3 z \cdot (\omega - \omega_0)^3 + \dots \quad (3.18)$$

Die Phase des Pulses wird also beim Durchlaufen des Mediums um  $t_\Phi = \beta_0(\omega_0)z/\omega_0 = z/v_\Phi(\omega_0)$  verzögert, wobei  $v_\Phi$  die Geschwindigkeit der Phase im Medium ist. Die Einhüllende des Pulses verzögert sich dagegen um  $t_g = \beta_1 z = z/v_g$ .  $v_g$  bezeichnet die Gruppengeschwindigkeit im optischen Medium. Als GVD wird  $\beta_2 = \frac{d}{d\omega} \frac{1}{v_g(\omega)}$  bezeichnet.

Die Phase ist weiterhin über die Dispersionsrelation mit der Brechzahl  $n(\omega)$  verknüpft. Für diese und die Ableitungen der Phase nach der Frequenz ergeben sich:

$$\begin{aligned} \phi(\omega) &= \beta(\omega)z = \frac{z}{c_0} \omega n(\omega) \\ \frac{d\phi}{d\omega} &= \frac{z}{c_0} \left( n(\omega) + \omega \frac{dn}{d\omega} \right) \\ \frac{d^2\phi}{d\omega^2} &= \frac{z}{c_0} \left( 2 \frac{dn}{d\omega} + \omega \frac{d^2n}{d\omega^2} \right) \\ \frac{d^3\phi}{d\omega^3} &= \frac{z}{c_0} \left( 3 \frac{d^2n}{d\omega^2} + \omega \frac{d^3n}{d\omega^3} \right) \end{aligned} \quad (3.19)$$

Die Materialdispersion kann mit Hilfe der Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex  $n(\omega)$  oder mit der Wellenlängenabhängigkeit  $n(\lambda)$  beschrieben werden. Für die Umrechnung der 1. bis 3. Ableitungen von der Frequenz- in die Wellenlängendarstellung ergeben sich folgende Faktoren:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{d\omega} &= -\frac{\lambda^2}{2\pi c_0} \frac{d}{d\lambda} \\
\frac{d^2}{d\omega^2} &= \frac{\lambda^2}{(2\pi c_0)^2} \left( \lambda^2 \frac{d^2}{d\lambda^2} + 2\lambda \frac{d}{d\lambda} \right) \\
\frac{d^3}{d\omega^3} &= -\frac{\lambda^3}{(2\pi c_0)^3} \left( \lambda^3 \frac{d^3}{d\lambda^3} + 6\lambda^2 \frac{d^2}{d\lambda^2} + 6\lambda \frac{d}{d\lambda} \right)
\end{aligned} \tag{3.20}$$

Somit folgt aus Gl. (3.18) und Gl. (3.19) mit Gl. (3.20) für  $\beta_2 z$  und für  $\beta_3 z$ :

$$\begin{aligned}
\beta_2 z &= \frac{\lambda_c^3 z}{2\pi c_0^2} \frac{d^2 n}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_c} \\
\beta_3 z &= -\frac{\lambda_c^4 z}{4\pi^2 c_0^3} \left( 3 \frac{d^2 n}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_c} + \lambda_c \frac{d^3 n}{d\lambda^3} \Big|_{\lambda_c} \right),
\end{aligned} \tag{3.21}$$

wobei  $\lambda_c$  die Mittenwellenlänge im Vakuum ist. Da optische Systeme meist aus mehreren Komponenten bestehen, ergibt sich die Gesamtdispersion des Systems aus der Summe der Dispersionen der Einzelkomponenten.

Das elektrische Feld im Frequenzbereich nach der Propagation des Pulses durch das optische Medium ist proportional zu:

$$\begin{aligned}
E(\omega, z) &\sim E(\omega) \exp[-i\beta(\omega)z] \\
&= \exp \left[ -\frac{(\omega - \omega_0)^2}{4a^2(1 + A^2)} (1 + iA) \right] \exp[-i\beta(\omega)z]
\end{aligned} \tag{3.22}$$

Zur Bestimmung des Einflusses der Dispersion auf die Pulsform werden im folgenden zwei Methoden beschrieben. Bei der ersten werden nur Dispersionen bis einschließlich der zweiten Ordnung betrachtet. Die Lösung des Problems erfolgt hier exakt. In der zweiten Methode wird zusätzlich die dritte Ordnung mit berücksichtigt. Die Pulsverbreiterung wird hier numerisch bestimmt.

**1. Ausbreitung ohne Dispersion dritter Ordnung:** Gl. (3.22) kann nun folgendermaßen geschrieben werden:

$$E(\omega, z) = \exp \left[ -\frac{(\omega - \omega_0)^2}{4\Gamma(z)} \right] \tag{3.23}$$

Damit ist die Pulsform nach der linearen Propagation immer noch gaußförmig. Sie wird also durch die Dispersion zweiter Ordnung nicht verändert. Die Rücktransformation in den Zeitbereich ergibt:

$$\begin{aligned}
E(t, z) &\sim \exp[i(\omega_0 t - \beta_0 z)] \exp \left[ -\Gamma(z)^2 (t - \beta_1 z)^2 \right] \\
\Gamma(z)^2 &= a^2 \frac{1 - i2\beta_2 z a^2 (1 + A^2)}{(1 + 2\beta_2 z a^2 A)^2 + (2\beta_2 z a^2)^2}
\end{aligned} \tag{3.24}$$

Aus Gl. (3.24) ist ersichtlich, daß sich der Puls verbreitert, wenn  $\beta_2 \neq 0$  ist.

$$\Delta\tau(z) = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\operatorname{Re}(\Gamma(z))} = \Delta\tau_0 \sqrt{(1 + 2a^2 A \beta_2 z)^2 + (2a^2 \beta_2 z)^2} \quad (3.25)$$

Die einzelnen Pulsfrequenzanteile werden zeitlich geordnet. Somit entsteht eine Phasenmodulation.

$$A(z) = \operatorname{Im}(\Gamma(z)) = \frac{2\beta_2 z a^2 (1 + A^2)}{(1 + 2\beta_2 z a^2 A)^2 + (2\beta_2 z a^2)^2} \quad (3.26)$$

Ob diese Phasenmodulation, d.h. der Chirp positiv oder negativ wird, hängt davon ab, ob es sich um ein normal ( $\beta_2 > 0$ ) oder anormal ( $\beta_2 < 0$ ) dispersives Medium handelt. Optische Gläser sind im sichtbaren Spektralbereich immer normal dispersiv. Die gegenüber der Mittenwellenlänge rotverschobenen Wellenlängenanteile eilen den blauverschobenen voraus. Das Spektrum des Pulses bleibt von der GVD unberührt.

Die Dispersion des durchlaufenen Mediums oder Systemes der Länge  $l$  kann durch die Messung der Eingangspulslänge  $\Delta\tau_0$ , der spektralen Breite  $\Delta\lambda$  und der Pulslänge nach dem Medium oder System  $\Delta\tau(l)$  mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\beta_2 l = \frac{1}{2a^2(1 + A^2)} \left[ -A \pm \sqrt{(1 + A^2) \left( \frac{\Delta\tau(l)}{\Delta\tau_0} \right)^2 - 1} \right] \quad (3.27)$$

Mit Hilfe von Gl. (3.21) kann die Dispersion des Systemes unter Verwendung der Materialkonstanten, d.h. unter Verwendung der zweiten Ableitungen der Brechzahl nach der Wellenlänge berechnet werden. Man erhält somit einen Vergleichswert für die mit Gl. (3.27) berechnete Dispersion.

Um den Einfluß der zu messenden Eingangsgrößen ( $\Delta\tau_0$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $\lambda_c$  und  $\Delta\tau(l)$ ) auf die Bestimmung der Dispersion  $\beta_2 z$  zu veranschaulichen, wurden in Abb. 3.4 die Abhängigkeiten dargestellt. Dabei wurde jeweils eine Meßgröße variiert, wobei die jeweils verbleibenden Größen konstant gehalten wurden. Man erkennt, daß  $\beta_2 z$  entscheidend, d.h. nichtlinear von der spektralen Breite  $\Delta\lambda$  und der Eingangspulslänge  $\Delta\tau_0$  abhängt. Deshalb muß deren Messung mit besonderer Sorgfalt erfolgen.

**2. Ausbreitung mit Dispersion dritter Ordnung:** Der Einfluß der Dispersion 3. Ordnung  $\beta_3 z$  auf die Pulslänge kann durch die numerische Rücktransformation in den Zeitraum bestimmt werden:

$$E(t, z) = \int_{-\infty}^{\infty} E(\omega) \exp \left[ -i \left[ \frac{1}{2} \beta_2 z + \frac{1}{6} \beta_3 z \right] \right] \exp[-i\omega t] d\omega \quad (3.28)$$

Mit obiger Formel und Gl. (3.21) sowie Gl. (3.8) kann man die Pulslänge  $\Delta\tau(z)$  nach Durchlaufen des Mediums unter Verwendung des Chirpes  $A$ , der Eingangspulslänge  $\Delta\tau_0$  und der Gesamtdispersion  $\beta(\omega)z$  berechnen.

Beim Ausbreiten eines Gaußschen Pulses in einem Medium mit Dispersion dritter Ordnung wird die Pulsform asymmetrisch. Es entstehen Oszillationen an einer Flanke des Pulsprofils. Für eine negative Dispersion dritter Ordnung bilden sich die Oszillationen am Anfang des Pulses und für eine positive Dispersion dritter Ordnung am Ende des Pulses [13].

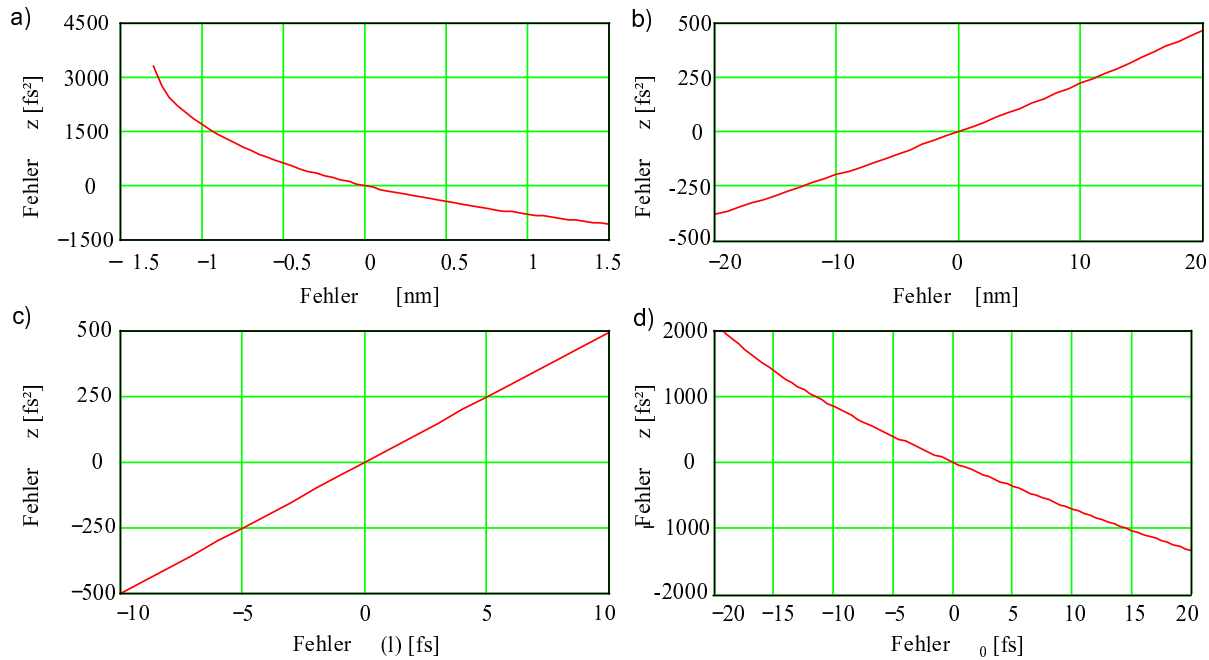


Abbildung 3.4: Einfluß der Meßgrößen a) Spektrale Breite  $\Delta\lambda$  mit  $(\lambda_c, \Delta\tau_0, \Delta\tau(l) = \text{const.})$ ; b) Mittenwellenlänge  $\lambda_c$  mit  $(\Delta\lambda, \Delta\tau_0, \Delta\tau(l) = \text{const.})$ ; c) Pulslänge nach dem Medium  $\Delta\tau(l)$  mit  $(\lambda_c, \Delta\lambda, \Delta\tau_0 = \text{const.})$ ; d) Eingangspulslänge  $\Delta\tau_0$  mit  $(\lambda_c, \Delta\lambda, \Delta\tau(l) = \text{const.})$  auf die Bestimmung der Dispersion 2. Ordnung  $\beta_2 z$

### 3.4.2 Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD)

Wie in Abschnitt 3.4.1 erwähnt, erhält ein bandbreitenbegrenzter Gaußscher Puls beim Durchlaufen eines normal dispersiven Mediums einen positiven Chirp, wobei das Spektrum unverändert bleibt. Der Puls verbreitert sich somit zeitlich. Wird der Puls jedoch vor Eintritt in das normal dispersive Medium durch ein Medium mit anormaler Dispersion geschickt, so verbreitert er sich ebenfalls zeitlich. Er erhält jedoch einen negativen Chirp (Prechirping). Ein Puls mit einem negativen Chirp wird in einem normal dispersiven Medium entsprechend Gl. (3.25) verkürzt. Wenn man also ein anormal dispersives Medium mit einem normal dispersiven Medium kombiniert, kann man erreichen, daß die Pulslänge nach der Propagation durch diese beiden Medien unverändert ist. Dies geschieht genau dann, wenn sich die erzeugten Phasenmodulationen (positiver und negativer Chirp), d.h. die Dispersionen gerade aufheben.

Zur Erzeugung einer anormalen Dispersion können Gitter- oder Prismenkompressoren verwendet werden. Der Aufbau eines Prismen- bzw. eines Gitterkompressors ist in Abb. 3.5 dargestellt. Die Funktionsweise des Prismenkompressors soll im folgenden näher erläutert werden. Der einfallende Strahl (1) wird aufgrund seiner spektralen Breite im Prisma 1 räumlich in seine spektralen Anteile zerlegt. Anschließend durchlaufen die rotverschobenen Wellenlängenanteile (2) in Prisma 2 einen längeren Glasweg als die blauverschobenen (3). Somit kommt es zu einer zeitlichen Aufspaltung der spektralen Anteile. Am Spiegel wird der Strahl in sich selbst mit einem Parallelversatz reflektiert. Der Parallelversatz ist zur Trennung des einlaufenden und des auslaufenden Strahls notwendig. Am Ausgang des Prismenkompressors sind die spektralen Komponenten wiederum räumlich überlagert und der Puls besitzt eine negative Phasenmodulation (Chirp). Für einen Prismenkompressor mit einem Abstand der Prismen (Spitze–Spitze)  $L$  und einer Ein-

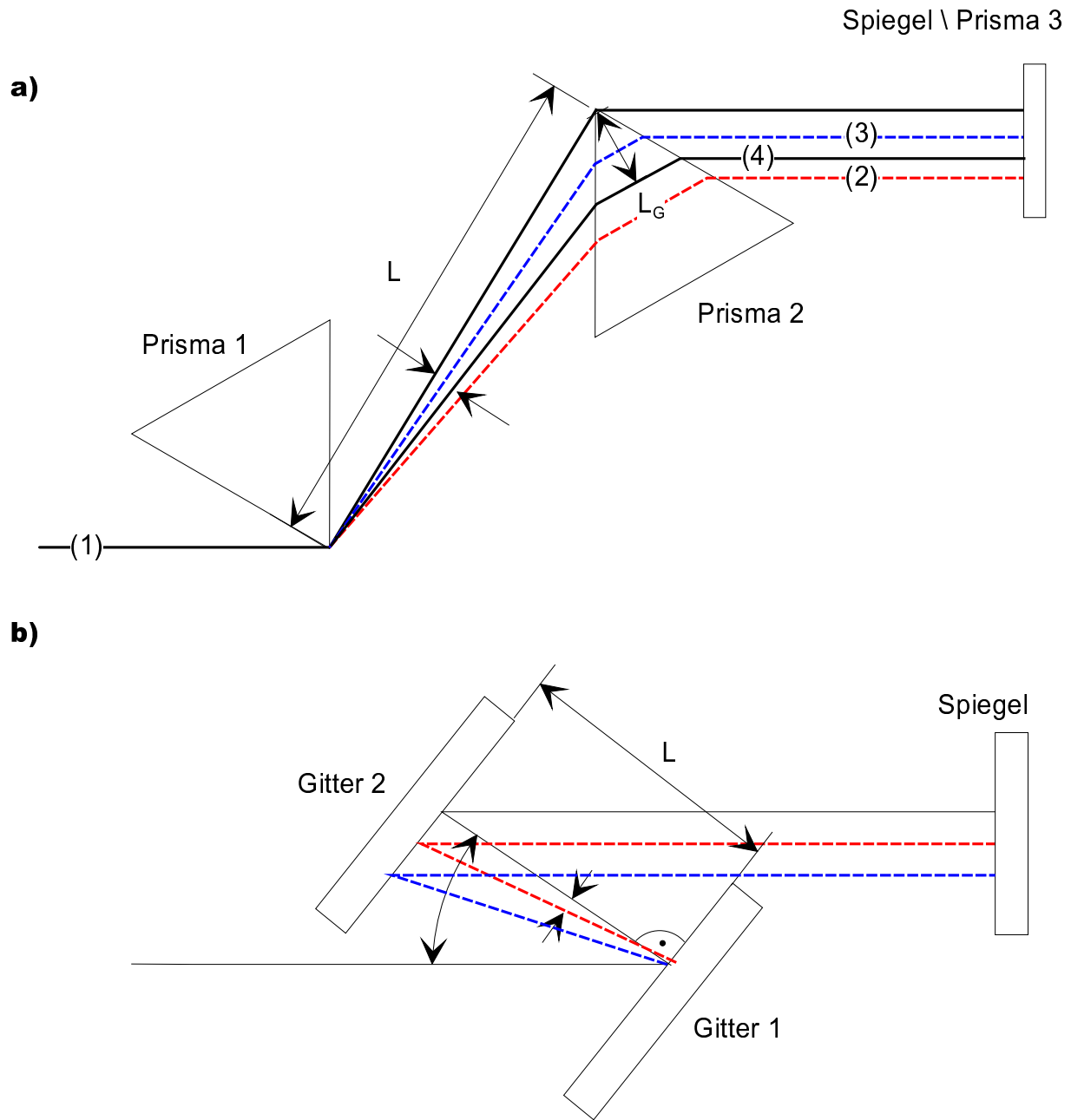


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau zur Pulscompression: (a) Prismenkompressor, (b) Gitterkompressor

tauchtiefe des Strahls (4) der Mittenwellenlänge im 2. Prisma (Spitze-Strahl)  $L_G$  ergibt sich die effektive Dispersion bei einem symmetrischen Durchgang durch die Prismen aus [21]:



$$\begin{aligned}
\beta_2 l_{eff} &= \frac{\lambda_c^3}{2\pi c_0^2} \frac{d^2 P}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_c} L \\
\beta_3 l_{eff} &= -\frac{\lambda_c^4}{4\pi^2 c_0^3} \left( 3 \frac{d^2 P}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_c} + \lambda_c \frac{d^3 P}{d\lambda^3} \Big|_{\lambda_c} \right) L
\end{aligned} \tag{3.29}$$

mit:

$$\begin{aligned}
\frac{d^2 P}{d\lambda^2} &= 4 \left[ \frac{d^2 n}{d\lambda^2} + (2n(\lambda) - n(\lambda)^{-3}) \left( \frac{dn}{d\lambda} \right)^2 \right] \sin \delta - 8 \left( \frac{dn}{d\lambda} \right)^2 \cos \delta \\
\frac{d^3 P}{d\lambda^3} &= 4 \frac{d^3 n}{d\lambda^3} \sin \delta - 24 \frac{dn}{d\lambda} \frac{d^2 n}{d\lambda^2} \cos \delta \\
\text{wobei } \delta &\approx \arcsin \left[ \frac{L_G}{L} \right]
\end{aligned}$$

Die effektive Dispersion ist somit proportional zum Abstand der Prismen  $L$ . Mit der Änderung dieses Abstands  $L$  kann die Dispersion grob vorgewählt werden. Die Feineinstellung der Dispersion geschieht über eine Änderung der Eintauchtiefe  $L_G$ , da die Strahlführung bei dieser Verschiebung unverändert bleibt.

Im Vergleich dazu erhält man bei einem Gitterkompressor für die effektive Dispersion [21, 22]:

$$\begin{aligned}
\beta_2 l_{eff} &= -\frac{\lambda_c^3}{\pi c_0^2 d^2} \left[ 1 - \left( \frac{\lambda_c}{d} - \sin \gamma \right)^2 \right]^{-\frac{3}{2}} L \\
\beta_3 l_{eff} &= -\beta_2 l_{eff} \frac{6\pi \lambda_c}{c_0} \cdot \frac{1 + \frac{\lambda_c}{d} \sin \gamma - \sin^2 \gamma}{1 - \left( \frac{\lambda_c}{d} - \sin \gamma \right)^2},
\end{aligned} \tag{3.30}$$

wobei  $d$  der Abstand zwischen zwei Gitterlinien,  $\gamma$  der Einfallswinkel und  $L$  der senkrechte Gitterabstand sind. Die effektive Dispersion ist wie beim Prismenkompressor proportional zum Abstand der Gitter  $L$ .

Wie aus Gl. (3.29) und Gl. (3.30) hervorgeht, ist die Dispersion zweiter Ordnung in beiden Fällen negativ und proportional zum Abstand der Gitter bzw. der Prismen. Mit einem Gitterkompressor kann jedoch eine wesentlich höhere Dispersion zweiter Ordnung erzeugt werden. Die Dispersion dritter Ordnung kann beim Prismenkompressor kleiner Null werden. Ein Prismenkompressor eignet sich somit auch zur Kompensation der 3. Ordnung. Dies ist bei Verwendung eines einfachen Gitterkompressors nicht möglich. Durch die Veränderung des Einfallswinkels kann die 3. Ordnung minimiert werden. Sie wird jedoch nicht negativ. Wie sich in den Experimenten herausstellen wird, ist der Gitterkompressor sogar ausschlaggebend für die Erzeugung der Dispersion 3. Ordnung. Somit wird auch die minimal erreichbare Pulslänge entscheidend durch den Gitterkompressor bestimmt.

Die Berechnung der Pulsverbreiterung kann wiederum mit Gl. (3.28) oder Gl. (3.25) erfolgen.

# Kapitel 4

## Wechselwirkungen im Präparat

Nachdem in Kapitel 3 die zur Charakterisierung und Optimierung notwendigen Zusammenhänge abgeleitet wurden, sollen in diesem Kapitel die im Präparat auftretenden nichtlinearen Effekte vorgestellt werden. Die derzeit möglichen Anwendungsgebiete eines LSM mit einem Femtosekundenlaser als Lichtquelle werden in Anwendungen zur Untersuchung biologischer Präparate und in Anwendungen zur Untersuchung von Festkörper- bzw. Halbleitermaterialien unterteilt. Wegen der Notwendigkeit hoher Intensitäten von größer  $2 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$  erfolgt die Generierung der nichtlinearen Effekte mit einer hohen Ortsauflösung. Aufgrund der gepulsten Anregung kann das Signal zusätzlich mit einer hohen Zeitauflösung detektiert werden.

### 4.1 Biologische Präparate

Die Wechselwirkung von Strahlung mit Farbstoffen steht bei der Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten im Vordergrund. Ein Modell zur Beschreibung des Verhaltens und zur Charakterisierung der Einphotonen- und der Zweiphotonen-Absorptionseigenschaften der Farbstoffe soll in diesem Abschnitt vorgestellt werden.

Neben der simultanen Absorption von zwei Photonen kann es auch zu einer simultanen Absorption von drei und mehr Photonen kommen. Diese Mehrphotonen-Absorptionen sind aber aufgrund der immer kleiner werdenden Wirkungsquerschnitte an immer höhere Intensitäten geknüpft. Sie sind aber prinzipiell mit der verwendeten Versuchsanordnung anregbar. Deshalb muß eine Festlegung der Laserparameter (Pulslänge und mittlere Leistung am Ausgang des Lasers), bei denen eine 'reine' Zweiphotonen-Anregung stattfindet, erfolgen. Da es sich bei der Zweiphotonen-Absorption um einen nichtlinearen Effekt zweiter Ordnung handelt, kann sie neben der Zweiphotonen-Mikroskopie auch zur Bestimmung der Pulslänge in der Probe verwendet werden (vgl. Abschnitt 3.3). Zur exakten Auswertung der so aufgenommenen Autokorrelationsfunktionen ist die Festlegung der Laserparameter ebenfalls notwendig.

Dazu sollen im ersten Teil dieses Abschnitts, ausgehend von der Absorption in Farbstoffen, die Abhängigkeiten des Fluoreszenzsignals von den Laserparametern (Repetitionsrate, Pulslänge, mittlere Leistung und Wellenlänge), den Mikroskopparametern (Vergrößerung und Apertur des Objektivs) und den Eigenschaften der Farbstoffe (Konzentration, Quanteneffizienz und Wirkungsquerschnitt) abgeleitet werden. Anschließend werden, basierend auf den gefundenen Zusammenhängen, verschiedene Methoden zur experimentellen Bestimmung der Wirkungsquerschnitte von verschiedenen Farbstoffen vorgestellt.

Wie schon erwähnt, kann die konfokale Blende bei der Zweiphotonen-Mikroskopie entfallen. Die Auflösung des Mikroskops wird allein durch die Größe des Fokus bestimmt. Der letzte Teil

dieses Abschnitts beschäftigt sich deshalb mit dem Auflösungsvermögen eines Zweiphotonen-Mikroskops.

Bei den Ableitungen in den Abschnitten 4.1.1 bis 4.1.5 wird angenommen, daß die Tiefenschärfe sehr viel größer als die Probendicke oder die Absorptionslänge ist. Das bedeutet, daß sich der Beleuchtungsquerschnitt im Präparat nur wenig ändert. Durch diese Annahme wird das Verhalten der Farbstoffe bei einer Zweiphotonen-Absorption makroskopisch wiedergegeben. Die Vereinfachung entfällt im letzten Abschnitt bei der Untersuchung des Auflösungsvermögens in einem Zweiphotonen-Mikroskop.

#### 4.1.1 Absorptionsmechanismen

**Einphotonen-Absorption:** Die Einphotonen-Absorption, die Licht beim Durchdringen eines Farbstoffs erfährt, kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes beschrieben werden [24].

$$\frac{dF}{dx} = -n\sigma_1 F \longrightarrow F(x) = F_0 \exp[-n\sigma_1 x]$$

$F_0$  ist hierbei der Photonenfluß in  $\left[\frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{s}}\right]$  an der Oberfläche des Farbstoffs und  $F(x)$  der Photonenfluß in der Tiefe  $x$ .  $\sigma_1$  ist der Wirkungsquerschnitt der Einphotonen-Absorption in  $[\text{cm}^2]$ . Die Teilchenzahldichte der Farbstoffmoleküle  $n$  in  $[\text{cm}^{-3}]$  ergibt sich aus  $n = C_0 L$ , wobei  $C_0$  die Farbstoffkonzentration in  $[\text{mol}/\text{cm}^3]$  und  $L$  die Loschmidt-Zahl ist. Typische Werte für Farbstoffe in Zellen sind  $C_0 = 10^{-4} \text{ mol/l}$  und  $\sigma_1 = 10^{-17} \text{ cm}^2$ .

Für den absorbierten Photonenfluß bei Einphotonen-Anregung folgt:

$$\begin{aligned} F_{abs}(x) &= F_0 - F(x) \\ &\approx n\sigma_1 x F_0, \text{ falls } n\sigma_1 x \ll 1 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Der absorbierte Photonenfluß hängt somit in erster Näherung bei geringer Absorption linear vom Anregungsfluß ab. Die Näherung mit den o.g. typischen Werten  $n \cdot \sigma_1 \cdot x \approx 0.6 \text{ cm}^{-1} \cdot x$  ist nur für geringe Eindringtiefen  $x < 1 \text{ mm}$  gerechtfertigt.

**Zweiphotonen-Absorption:** Maria Göppert-Mayer fand bei der Untersuchung eines Zwei-Niveau-Systems eine quadratische Abhängigkeit der Übergangswahrscheinlichkeit in den angeregten Zustand von der Anregungsintensität. Für den Photonenfluß in der Tiefe  $x$  nach einem Zweiphotonen-Übergang ergibt sich in ähnlicher Weise wie für das Lambert-Beersche Gesetz [24]:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} F &= -n\sigma_2 F^2 \\ \hookrightarrow F(x) &= \frac{F_0}{1 + F_0 n \sigma_2 x} \end{aligned}$$

$\sigma_2$  ist hier der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt in  $[\text{cm}^4 \text{s}]$ .

Die Einphotonen-Absorption kann bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm vernachlässigt werden, da  $F_0 n \sigma_1 x \ll 1$  ist. Für den in der Tiefe  $x$  absorbierten Fluß  $F_{abs}(x)$  ergibt sich mit obiger Formel:

$$\begin{aligned}
F_{abs}(x) &= F(x) - F_0 = \frac{F_0^2 n \sigma_2 x}{1 + F_0 n \sigma_2 x} \\
\hookrightarrow F_{abs}(x) &\approx n \sigma_2 F_0^2 x, \text{ falls } F_0 n \sigma_2 x \ll 1
\end{aligned} \tag{4.2}$$

Die Näherung in Gl. (4.2) ist für die typischen Werte in Tabelle 4.1 (vgl. Abschnitt 4.1.3) erfüllt, da  $n \sigma_2 F_0 x \approx 10^{-7} \text{ cm}^{-1} \cdot x$  ergeben.

### 4.1.2 Anregungsfluß

**Gepulstes Anregungslicht:** Die mittlere Leistung  $P_{avg}$  eines Lasers, der Pulse mit einer Repetitionsrate von  $f$  und einer Pulslänge  $\Delta\tau$  aussendet, ergibt sich aus dem Integral über das Gaußsche Pulsprofil (Gl. (3.10)), multipliziert mit der Repetitionsrate und der Pulsspitzenleistung  $P_{peak}$ .

$$\begin{aligned}
P_{avg} &= P_{peak} f \int_{-\infty}^{\infty} dt \exp[-2a^2 t^2] \\
&= \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln 2}} P_{peak} f \Delta\tau \\
\hookrightarrow P_{peak} &= \sqrt{\frac{4 \ln 2}{\pi}} \frac{P_{avg}}{f \Delta\tau} \approx 0.94 \cdot \frac{P_{avg}}{f \Delta\tau}
\end{aligned} \tag{4.3}$$

Für den Anregungsfluß  $F_0$  in  $\left[\frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ s}}\right]$  bei einem Beleuchtungsquerschnitt von  $A_0$  ergibt sich mit Gl. (4.3):

$$\begin{aligned}
F_0 &= \underbrace{\frac{P_{peak}}{A_0}}_{I_0} \frac{\lambda_c}{hc} \\
&= I_0 \cdot \frac{\lambda_c}{hc}
\end{aligned} \tag{4.4}$$

$I_0$  ist die Intensität der Anregungsstrahlung in  $[W/\text{cm}^2]$ , bezogen auf den Beleuchtungsquerschnitt.

**Fokussiertes Anregungslicht:** Der Anregungsfluß kann, wie aus Gl. (4.4) ersichtlich, durch eine Fokussierung der Strahlung vergrößert werden. Der minimale Fokus wird mit Hilfe der Gaußschen Optik berechnet.

Laserstrahlung kann nicht punktförmig fokussiert werden, sondern es ergibt sich eine von der Wellenlänge abhängige Strahltaile. Die Taille ist weiterhin von der Brennweite  $f_{lens}$  und dem Durchmesser der Objektivpupille  $d_{pupil}$  abhängig. Die Größe der Strahltaile wird mit folgender Gleichung näherungsweise bestimmt:

$$\begin{aligned}
w_0 &\approx \frac{2}{\pi} \lambda_c \frac{f_{lens}}{d_{pupil}} \\
\hookrightarrow A_0 &= \pi \cdot w_0^2
\end{aligned} \tag{4.5}$$

Für den absorbierten Anregungsfluß in  $\left[\frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2\text{s}}\right]$  bei fokussierter und gepulster Beleuchtung ergibt sich mit Gl. (4.2)–Gl. (4.5) :

$$F_{abs} = \sqrt{\frac{2\ln(2)}{\pi}} \left[\frac{\lambda_c}{hc}\right]^2 n\sigma_2 \frac{x}{\pi^2 w_0^4} \frac{P_{avg}^2}{f^2 \Delta\tau^2} \quad (4.6)$$

#### 4.1.3 Fluoreszenz nach Zweiphotonen–Absorption:

Die zeitgemittelte Fluoreszenz  $S_2$  in  $[\text{Photonen}]$ , die in einem Volumen  $V = A_0 x$  entsteht, läßt sich unter Berücksichtigung der Quanteneffizienz  $\Phi_2$  und Gl. (4.6) folgendermaßen bestimmen:

$$\begin{aligned} S_2 &= \Phi_2 \cdot A_0 \cdot \int_{-\infty}^{\infty} F_{abs} dt \\ &= \underbrace{\Phi_2 \sqrt{\frac{2 \cdot \ln(2)}{\pi}} \left[\frac{\lambda_c}{hc}\right]^2 n \frac{x}{\pi w_0^2 f^2} \sigma_2 \frac{P_{avg}^2}{\Delta\tau}}_{\gamma \cdot \frac{P_{avg}^2}{\Delta\tau}} \quad (4.7) \\ &= \gamma \cdot \frac{P_{avg}^2}{\Delta\tau} \end{aligned}$$

Das Zweiphotonen–Fluoreszenzsignal hängt, wie in Gl. (4.7) ersichtlich ist, quadratisch von der mittleren Anregungsleistung, der Repetitionsrate und dem Beleuchtungsquerschnitt ab [25]. Entscheidend für die Erzeugung eines hohen Fluoreszenzsignals sind somit eine möglichst hohe Pulsspitzenleistung und eine möglichst starke Fokussierung der Anregungsstrahlung.

Die Fluoreszenzleistung  $P^{fl}$  in  $[W]$  ergibt sich näherungsweise aus:

$$P^{fl} = S_2 \cdot \frac{hc}{\lambda_e} \cdot \frac{1}{\Delta\tau}, \quad (4.8)$$

wobei  $\lambda_e$  die Mittenwellenlänge des Fluoreszenzlichtes ist.

Die mit einem typischen Photomultiplier (PMT) minimal detektierbare Fluoreszenzleistung  $P_{min}^{fl}$  wird durch den Dunkelstrom ( $I_{dark} \approx 1 \text{ nA}$ ), die Quanteneffizienz ( $Q \approx 30 \%$ ) und die Kathodenempfindlichkeit ( $Sens \approx 70 \text{ mA/W}$ ) bestimmt. Mit den o.g. Werten folgt hieraus:

$$\begin{aligned} P_{min}^{fl} &= Sens \cdot Q \cdot I_{dark} \\ &\approx 2 \cdot 10^{-8} W \end{aligned} \quad (4.9)$$

Die minimale mittlere Anregungsleistung, die zur Detektion eines Zweiphotonen-Fluoreszenzsignals mit dem o.g. PMT notwendig ist, ergibt sich beim Einsetzen von  $P_{min}^{fl}$  in Gl. (4.8) mit Gl. (4.7). Daraus berechnete charakteristische Werte sind in Tabelle 4.1 auf Seite 29 zusammengefaßt.

#### 4.1.4 Signal- zu Rauschverhältnis (SNR)

Die Beschreibung elektromagnetischer Strahlung kann auch mit dem Teilchenmodell erfolgen. Die daraus entstehende Photonostatistik gehorcht in guter Näherung der Poissonverteilung, solange die Anzahl der Fluoreszenzphotonen kleiner als  $\approx 1000$  ist [26]. Für das Photonengeräusch ergibt sich:  $N_2 = \sqrt{S_2}$ , wobei  $S_2$  mit Hilfe von Gl. (4.7) berechnet werden kann. Für das SNR

Tabelle 4.1: Charakteristische Größen und sich daraus ergebende Pulsparameter bei einer Zweiphotonen-Absorption

Farbstoff					Fokus		Detektor
$\sigma_2$	$\Phi_2$	$C_0$	$n$	$\lambda_e$	$x$	$w_0$	$P_{min}^{fl}$
$[cm^4 s]$	$[\%]$	$[mol/l]$	$[cm^{-3}]$	$[nm]$	$[\mu m]$	$[nm]$	$[W]$
$10^{-50}$	$< 70$	$10^{-4}$	$10^{16}$	400	1.5	500	$2 \cdot 10^{-8}$
					Gl. (4.5)		Gl. (4.9)
Puls							
$\Delta\tau$	$\lambda_c$	$f$			$P_{avg}^{min}$	$I_0^{min}$	$F_0^{min}$
$[fs]$	$[nm]$	$[MHz]$			$[\mu W]$	$[W/cm^2]$	$[\frac{Photonen}{cm^2 s}]$
200	800	76			5	$2 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^{26}$
					Gl. (4.8)	Gl. (4.4)	Gl. (4.4)

in  $[Photonen]$  erhält man somit:

$$\frac{S_2}{N_2} = \underbrace{\alpha(\sigma_2) \frac{1}{\sqrt{\Delta\tau}}}_{\gamma_{SNR}(\Delta\tau)} \cdot P_{avg}$$

$$\text{mit } \alpha(\sigma_2) = \left[ \frac{2 \cdot \ln(2)}{\pi} \right]^{\frac{1}{4}} \frac{\lambda_c}{hc} \sqrt{n\Phi_2 x} \frac{\sqrt{\sigma_2}}{\sqrt{\pi} w_0 f} \quad (4.10)$$

Die in diesem Abschnitt gefundenen Abhängigkeiten des SNR bzw. des Zweiphotonenfluoreszenzsignals von den Meßparametern sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Funktionelle Zusammenhänge bei der Zweiphotonen-Absorption

	Einheit	$P_{avg}$	$\Delta\tau$
$S_2$	$[Photonen]$	$P_{avg}^2$	$\frac{1}{\Delta\tau}$
$\frac{S_2}{N_2}$	$[Photonen]$	$P_{avg}$	$\frac{1}{\sqrt{\Delta\tau}}$
$\gamma_{SNR}$	$[Photonen/W]$		$\frac{1}{\sqrt{\Delta\tau}}$
$\alpha(\sigma_2)$	$[Photonen \frac{\sqrt{fs}}{W}]$		

Mit Hilfe der quadratischen bzw. der linearen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals bzw. des SNR von der mittleren Leistung kann überprüft werden, ob eine Zweiphotonen-Anregung vorliegt.

#### 4.1.5 Methoden zur Bestimmung des Wirkungsquerschnitts von Farbstoffen

In Gl. (4.7) und in Gl. (4.10) sind die Zweiphotonenwirkungsquerschnitte  $\sigma_2$  in den Größen  $\gamma$  bzw.  $\gamma_{SNR}$  enthalten. Daraus leiten sich zwei mögliche Verfahren zur experimentellen Bestimmung des Wirkungsquerschnitts ab.

**1. Fluoreszenzsignal als Funktion der mittleren Leistung:** Bei der Messung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der mittleren Leistung sollte sich eine quadratische Abhängigkeit ergeben. Wenn man beide Größen in doppelt-logarithmischem Maßstab aufträgt, sollte eine Gerade mit dem Anstieg zwei und mit einem Nulldurchgang  $\gamma/\Delta\tau$  entstehen. Durch die Bestimmung der Achsenabschnitte  $\gamma/\Delta\tau$  kann anschließend mit Gl. (4.7) auf den Wirkungsquerschnitt  $\sigma_2$  geschlossen werden.

**2. SNR als Funktion der mittleren Leistung:** Hierbei sollte sich beim Auftragen des SNR über der mittleren Leistung eine Gerade mit dem Anstieg  $\gamma_{SNR}$  ergeben, die durch den Koordinatenursprung verläuft. Der Wirkungsquerschnitt kann in diesem Fall aus der Steigung der Geraden mit Gl. (4.10) bestimmt werden.

In beiden Fällen ist zur genauen quantitativen Bestimmung des Wirkungsquerschnitts der Absorptionsweg  $x$  und der Beleuchtungsquerschnitt  $A_0$  bzw. die Strahltaile  $w_0$  unbekannt. Jedoch ist eine Bestimmung unter Zugrundelegung eines Wirkungsquerschnitts von einem Referenzfarbstoff ohne diese beiden Größen möglich. Der unbekannte Wirkungsquerschnitt bei Verwendung des zweiten Verfahrens ergibt sich dann folgendermaßen:

$$\sigma_2 \Phi_2 = \frac{\gamma_{SNR}(\Delta\tau)^2}{\gamma_{SNR}^{ref}(\Delta\tau)} \frac{[\sigma_2 \Phi_2 n]_{ref}}{n} \quad (4.11)$$

#### 4.1.6 Auflösungsvermögen in einem Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskop

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, fehlen zur exakten Bestimmung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitts noch die Absorptionsweglänge  $x$  und der Beleuchtungsquerschnitt  $A_0$  bzw.  $w_0$ . Die Absorptionsweglänge  $x$  entspricht der axialen Fokusausbildung und der Beleuchtungsquerschnitt  $A_0$  der lateralen Fokusausbildung. Im Bereich der lateralen und axialen Fokusausbildung, dem Fokusbereich, findet die Zweiphotonen-Anregung statt. Durch die Fokusbildung wird das Auflösungsvermögen des Zweiphotonen-LSM bestimmt.

Die Intensität entlang eines Gaußschen Strahlprofils für einen  $TEM_{00}$ -Mode ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$I(t, \rho, z) = I_0 \cdot \exp \left[ -2a^2 \left( t - \frac{z}{c} - \frac{\rho^2}{2cR(z)} \right)^2 \right] \cdot \exp \left[ -2 \frac{\rho^2}{w(z)^2} \right] \cdot \left( \frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \quad (4.12)$$

mit  $I_0 = \frac{P_{peak}}{w_0^2 \pi}$  und  $R(z) = z \left[ 1 + \left( \frac{z_r}{z} \right)^2 \right]$

Durch den Term mit  $R(z)$  ergibt sich eine gekrümmte Phasenfront. Die Phasenfront kann jedoch in der Nähe des Fokus als eben angenommen werden, wodurch dieser Term entfallen kann.  $\rho$  ist hierbei die laterale und  $z$  die axiale Raumkoordinate.

Die Abhängigkeit des Strahlquerschnitts  $w(z)$  von der Position  $z$ , gemessen von der Hauptebene der Linse (siehe Abb. 4.1), kann mit folgender Gleichung für eine  $TEM_{00}$ -Mode wiedergegeben werden.

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_r} \right)^2} \quad \text{mit} \quad z_r = \pi \frac{w_0^2}{\lambda_c} \quad (4.13)$$

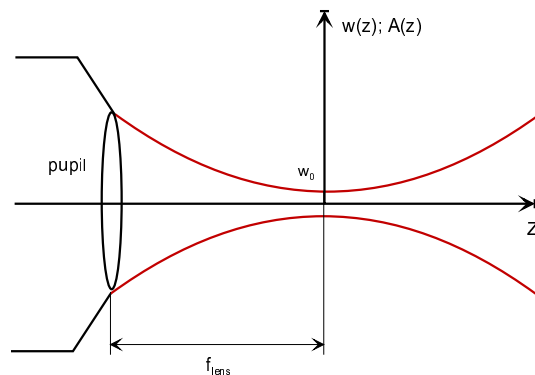


Abbildung 4.1: Fokussierung von Laserstrahlung – Gaußsche Optik

Das zeitgemittelte Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal  $S_2(\rho, z)$  ergibt sich mit Gl. (4.12) und Gl. (4.13) aus:

$$S_2(\rho, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_2 \sigma_2 n I(t, \rho, z)^2 dt \tag{4.14}$$

Abb. 4.2 zeigt das mittels einer Ein- und einer Zweiphotonen-Absorption erzeugte Fluoreszenzsignal entlang eines fokussierten Gaußschen Strahls.

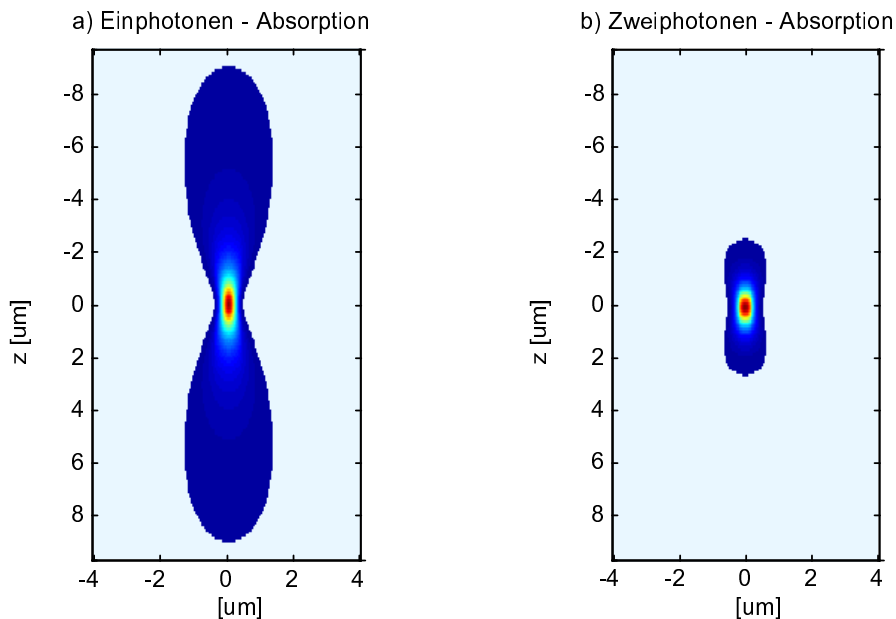


Abbildung 4.2: Berechnetes Fluoreszenzsignal entlang eines fokussierten Gaußschen Strahls, wobei  $\rho$  und  $z$  die laterale bzw. die axiale Raumkoordinate sind

Die maximale Fluoreszenz ergibt sich für  $z = 0$  und  $\rho = 0$ , d.h. im Fokus des Objektivs. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Anregungsintensität fällt das Fluoreszenzsignal bei der Zweiphotonen-Absorption außerhalb des Fokus stärker ab als bei der Einphotonen-Absorption. Die Zweiphotonen-Anregung erfolgt somit tiefensensitiv in einem



kleinen Fokusbereichen. Die Einphotonen-Absorption ist nicht tiefendiskriminiert, da die Farbstoffmoleküle in einem wesentlich größeren Fokusbereichen (etwa Faktor 4) angeregt werden. Beim Scannen des Fokus über eine beliebige Objektform  $g(z, z_0) \cdot f(\rho, \rho_0)$  ergibt sich die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Scanposition mit folgender Gleichung:

$$S_2(\rho_0, z_0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_2 \sigma_2 n I(t, \rho, z)^2 g(z, z_0) \cdot f(\rho, \rho_0) dt \, 2\pi \rho \, d\rho \, dz \quad (4.15)$$

$\rho_0$  und  $z_0$  stellen die laterale und die axiale Verschiebung des Objektschwerpunkts vom Objektivfokus dar.

Zwei spezielle Objektformen (Kugel, Farbstoffsee – Kante) eignen sich besonders zur experimentellen Bestimmung der axialen Fokusbereiche. Gl. (4.15) wird in den folgenden Abschnitten auf diese beiden Objektformen angewendet.

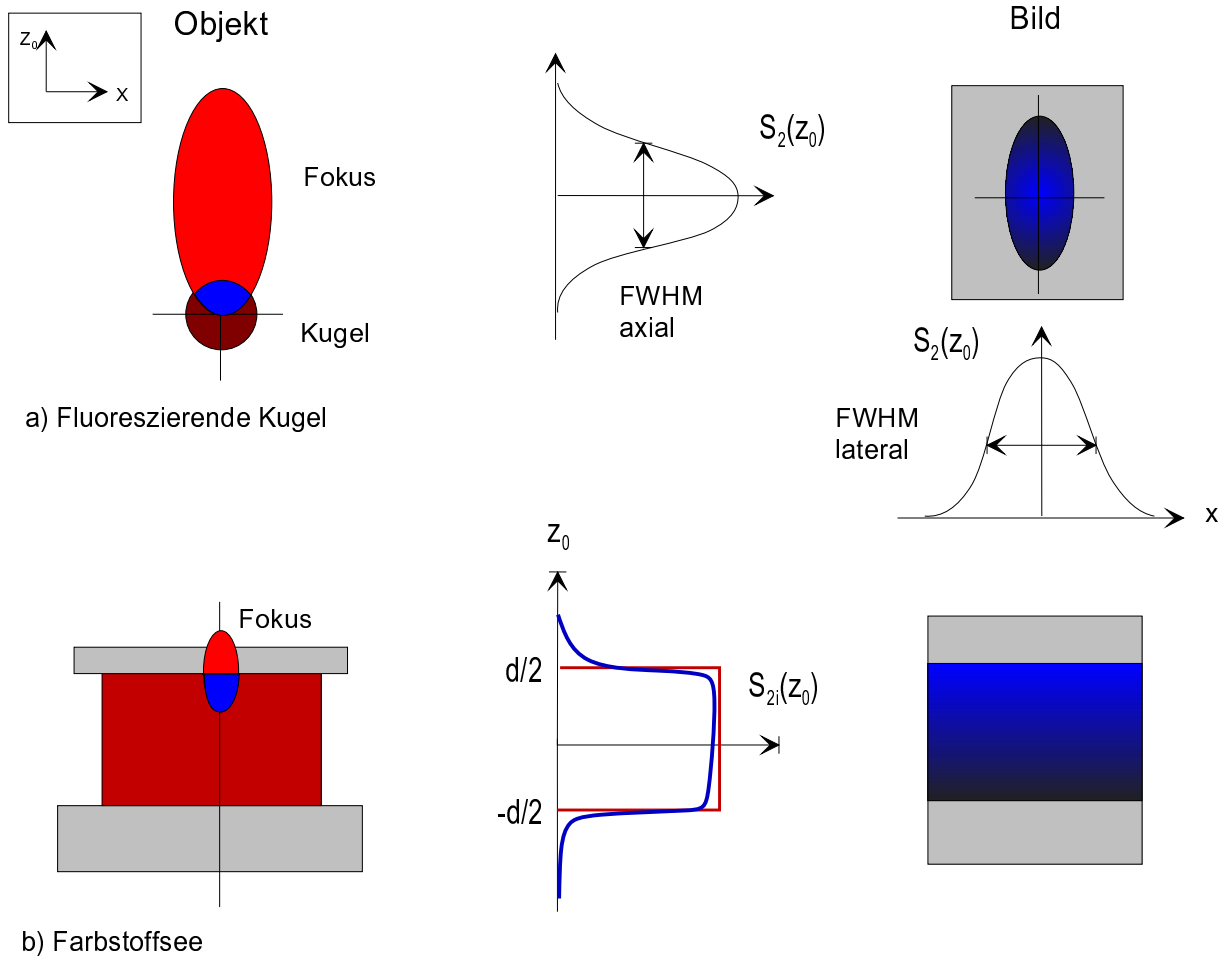


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung von zwei Verfahren zur Bestimmung des Auflösungsvermögens: a) durch die Messung der PSF; b) durch die Detektion des Fluoreszenzsignals beim Eintauchen in einen Farbstoffsee

## Fluoreszierendes Punktobjekt

Die Bestimmung des Fokusvolumens kann am einfachsten durch die Aufnahme der Punkt-Bild-Funktion (Point-Spread-Funktion – PSF) erfolgen [3]. Hierzu wird eine fluoreszierende Kugel verwendet, deren Durchmesser sehr viel kleiner als das zu erwartende Fokusvolumen ist. Man hat somit eine Punktlichtquelle im Objektraum zu Verfügung. Für die Objektform  $g(z, z_0) \cdot f(\rho, \rho_0)$  wird bei den Berechnungen eine Delta-Funktion angenommen. Die Kugel wird, entsprechend Abb. 4.3 a), in  $z_0$ -Richtung durch den Fokus bewegt und das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Das Fokusvolumen ergibt sich dann aus der axialen und lateralen Halbwertsbreite der resultierenden PSF, durch die Bestimmung der Halbwertsbreite einer angefitteten Gaußfunktion. Aus Gl. (4.15) folgt für das zeitgemittelte Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal beim Scannen in axialer Richtung über die fluoreszierende Kugel (Delta-Funktion):

$$S_{2i}(z_0) = \frac{1}{8} \pi^{\frac{3}{2}} \left( \frac{\lambda_c}{hc} \right)^2 \Phi_2 \sigma_2 n \frac{I_0^2}{a} \left( \frac{w_0^2}{w(z_0)} \right)^2 \quad (4.16)$$

Die axiale Fokausdehnung ist wiederum durch die Halbwertsbreite von  $S_{2i}(z_0)$  gegeben. Die axiale Fokausdehnung berechnet sich numerisch aus der Lösung der Integrale in Gl. (4.15). Im folgenden soll die Abhängigkeit des Fokusvolumens von der Pulslänge und der mittleren Anregungsleistung abgeleitet werden.

Das räumliche Intensitätsprofil für einen Gaußschen Puls wurde in Gl. (4.12) mit Gl. (4.13) formuliert. Zur Bestimmung des Fokusvolumens wird angenommen, daß für die Detektion des Zweiphotonen-Signals ein Schwellwert  $I_S$  existiert. Für Anregungsintensitäten oberhalb dieses Schwellwertes findet eine Detektion des Zweiphotonen-Signals statt. Der Schwellwert ist von den Parametern der Detektionseinrichtung (Transmission im Detektionskanal, Photomultiplier) abhängig. Das Fokusvolumen kann nun aus der Breite des quadrierten Intensitätsprofils an der Schwelle näherungsweise berechnet werden.

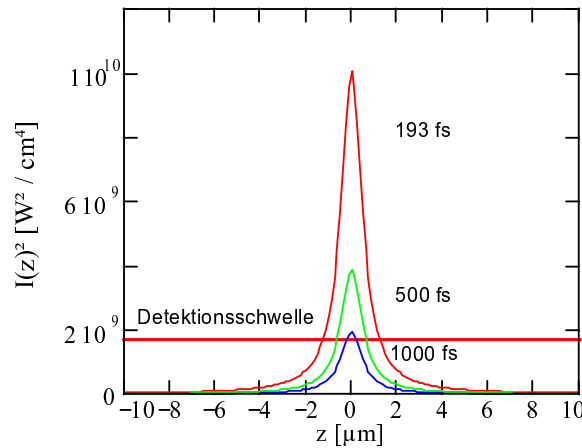


Abbildung 4.4: Profil der axialen quadratischen Anregungsintensität eines fokussierten Gaußschen Strahles für verschiedene Pulslängen bei konstanter mittlerer Leistung – Zusätzlich eingezeichnet ist die Detektionsschwelle, die durch die Parameter des verwendeten Detektors bestimmt wird.

Abb. 4.4 zeigt die quadratische axiale Anregungsintensität in Abhängigkeit von der Pulslänge

bei gleichbleibender mittlerer Leistung. Ähnliche Graphen ergeben sich auch für die laterale Anregungsintensität bzw. für die Abhängigkeiten von der mittleren Leistung bei gleichbleibender Pulslänge. Man erkennt aus dieser Abbildung, daß für die verschiedenen Pulsängen das Fokusvolumen, in dem ein Zweiphotonensignal registriert wird, für die kürzeste Pulslänge am größten ist, wenn die mittlere Leistung konstant gehalten wird. Nach Quadrieren und Umstellen von Gl. (4.12) ergibt sich für die axiale Fokusaussdehnung für  $\rho = 0$ :

$$\Delta z = 2\sqrt{\frac{1.76}{\pi} \frac{P_{avg}}{\tau f w_0^2} \frac{z_r^2}{\sqrt{I_s}} - z_r^2} \quad (4.17)$$

und für die laterale Fokusaussdehnung für  $z = 0$ :

$$\Delta \rho = 2\sqrt{-\frac{w_0^2}{4} \ln \left[ \frac{I_s}{\left(\frac{1.76}{\pi} \frac{P_{avg}}{\tau f w_0^2}\right)^2} \right]} \quad (4.18)$$

Abb. 4.5 zeigt die Abhängigkeiten der axialen und der lateralen Auflösung von der Pulslänge und der mittleren Leistung bei konstanter Detektionsschwelle.

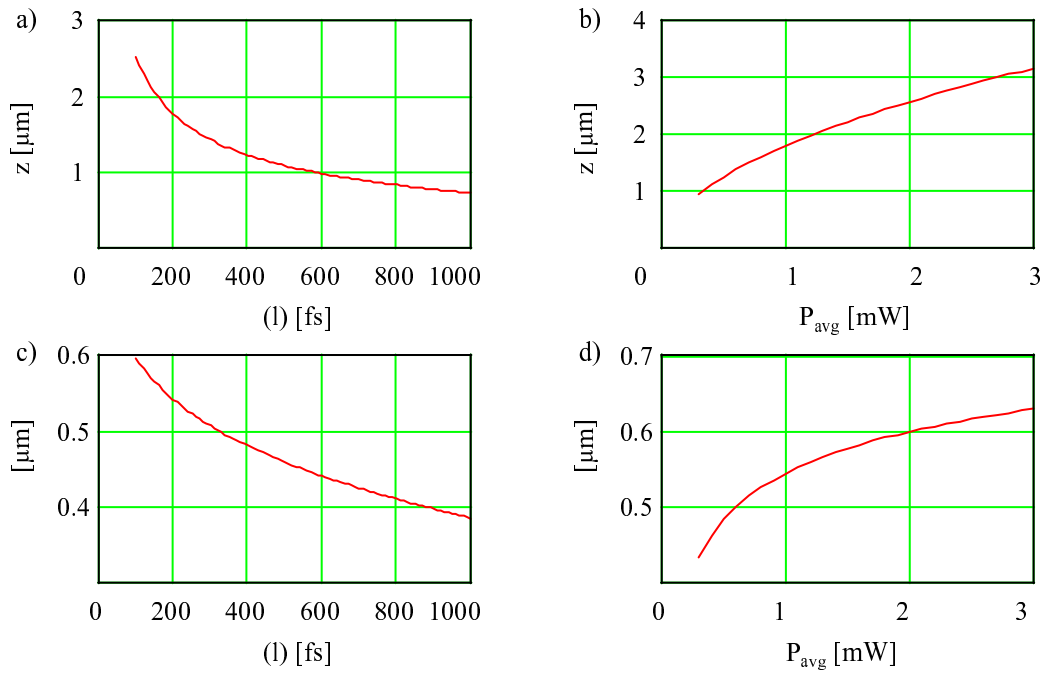


Abbildung 4.5: Axiale ( $\Delta z$ ) und laterale Auflösung ( $\Delta \rho$ ) in einem Zweiphotonen-Mikroskop in Abhängigkeit von der Pulslänge ( $\Delta \tau$ ) und der mittleren Leistung ( $P_{avg}$ ): a)  $\Delta z = f(\Delta \tau)$ ; b)  $\Delta z = f(P_{avg})$ ; c)  $\Delta \rho = f(\Delta \tau)$ ; d)  $\Delta \rho = f(P_{avg})$

Die Auflösung in der Zweiphotonen-Mikroskopie ist somit nicht nur von der Art der Fokussierung, sondern auch von der Pulsintensität abhängig. Maximale Auflösung wird für Pulsintensitäten nahe der Detektionsschwelle erzielt, da hier das effektive Fokusvolumen, entsprechend Abb. 4.4, am kleinsten ist. Wird z.B. die Pulslänge verringert, so muß entweder die mittlere Leistung ebenfalls verkleinert (siehe Abb. 4.5 b)) oder die Detektionsschwelle erhöht werden.

Eine Erhöhung der Detektionsschwelle kann z.B. durch die Verkleinerung der Verstärkung des PMT erfolgen.

Die Abhängigkeit des Auflösungsvermögens von der Pulsintensität ist auf den ersten Blick erstaunlich, da die axiale und laterale Auflösung in einem konfokalen Einphotonen-LSM nur von der Art der Fokussierung und der Detektion, d.h. von der Größe der konfokalen Blende abhängt.

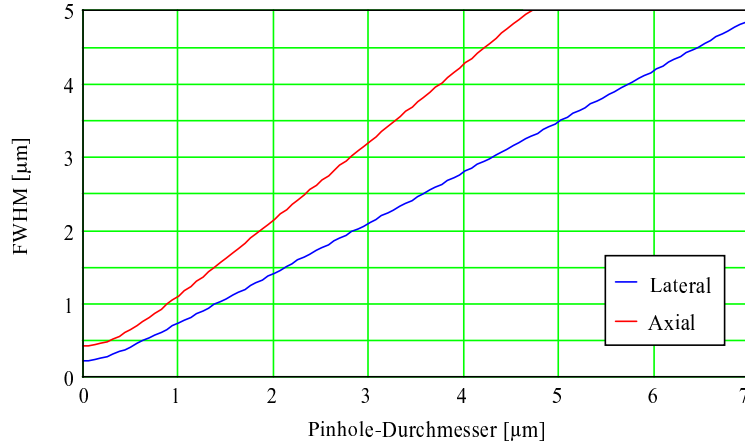


Abbildung 4.6: *Laterale und axiale Auflösung in einem konfokalen Einphotonen-LSM aufgetragen über dem Durchmesser der konfokalen Blende: Wellenlänge 488 nm; Objektiv C-Apochromat 40x/1.2 W*

Abb. 4.6 zeigt die laterale und die axiale Auflösung in Abhängigkeit von dem Blendendurchmesser, berechnet mit folgenden Gleichungen für das Objektiv C-Apochromat 40x/1.2 W bei einer Wellenlänge von 488 nm:

$$\Delta\rho = \sqrt{\left[\frac{0.51 \lambda_e}{N_A}\right]^2 + P_H^2} \quad (4.19)$$

$$\Delta z = \sqrt{\left[\frac{0.88 \lambda_e}{n - \sqrt{n^2 - N_A^2}}\right]^2 + \left[\frac{\sqrt{2} n P_H}{N_A}\right]^2}$$

$N_A$  ist die numerische Apertur des Objektivs und  $P_H$  der Blendendurchmesser in der Objektebene. Im Mittel ist die axiale Fokusausbildung um einen Faktor 2 schlechter als die laterale Fokusausbildung (gilt für Einphotonen- und Zweiphotonen-Mikroskopie). Als Grenzwerte für die laterale und die axiale Auflösung bei einer infinitesimal kleinen Blende ergeben sich:

$$\Delta\rho = \frac{0.51 \lambda_e}{N_A}$$

$$\Delta z = \frac{0.88 \lambda_e}{n - \sqrt{n^2 - N_A^2}}$$

### Fluoreszierender Farbstoffsee

In einer weiteren Methode zur Bestimmung der axialen Fokusausbildung verwendet man einen Farbstoffsee. Das Aufzeichnen des Fluoreszenzsignals erfolgt nun in x-z-Richtung, entsprechend

Abb. 4.3 b). Im folgenden soll die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Eintauchtiefe hergeleitet werden. Es wird dabei angenommen, daß der Anregungsfluß nicht durch Absorptionsprozesse oder Deformationen des Fokus durch Aberrationen geschwächt wird.

Die Objektform des fluoreszierenden Farbstoffsees kann wie folgt geschrieben werden:

$$g(z, z_0) \cdot f(\rho, \rho_0) = \Theta(z - z_0) \quad (4.20)$$

Durch die Integration von Gl. (4.15) bei Verwendung der o.g. Objektform erhält man für das integrierte Fluoreszenzsignal  $S_{2i}$  in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe  $z_0$ :

$$S_{2i}(z_0) = \frac{1}{16} \pi^{\frac{3}{2}} \left( \frac{\lambda_c}{hc} \right)^2 \Phi_2 \sigma_2 n I_0^2 z_r w_0^2 \left[ \pi - 2 \operatorname{atan} \left( \frac{z_0}{z_r} \right) \right] \frac{1}{a} \quad (4.21)$$

Die axiale Fokusausbildung  $\Delta z$  bestimmt sich aus der Differenz der Eintauchtiefen  $z_{01}$  und  $z_{02}$ .  $z_{01}$  und  $z_{02}$  werden an folgenden Stellen der Kurve  $S_{2i}(z_0)$  gemessen:

$$S_{2i}(z_{01}) = 0.8 S_{2i_{max}} ; S_{2i}(z_{02}) = 0.2 S_{2i_{max}}$$

Das Signal- zu Rauschverhältnis ergibt sich entsprechend Gl. (4.21) zu:

$$\frac{S_{2i}}{N_{2i}} = \underbrace{\frac{1}{8} \left( \frac{2^3}{\pi \ln 2} \right)^{\frac{1}{4}} \frac{\sqrt{\Phi_2 \sigma_2 n I_0^2 z_r} \lambda_c}{f w_0 hc} \sqrt{\pi - 2 \operatorname{atan} \left( \frac{z_0}{z_r} \right)} \frac{P_{avg}}{\sqrt{\tau}}}_{\alpha(\sigma_2)} \quad (4.22)$$

Die exakte Bestimmung des Wirkungsquerschnitts kann nun folgendermaßen geschehen.

Aus der Messung des Signal- zu Rauschverhältnisses als Funktion der mittleren Leistung für verschiedene Pulslängen kann  $\gamma_{SNR}$  in Abhängigkeit von der Pulslänge  $\Delta\tau$  berechnet werden. Aus dieser Abhängigkeit wird der Anstieg  $\alpha(\sigma_2)$  ermittelt. Der Wirkungsquerschnitt berechnet sich aus dem Anstieg  $\alpha$ , der Eintauchtiefe  $z_0$  und der Strahltaile  $w_0$  mit folgendem Ausdruck:

$$\Phi_2 \sigma_2 = 16 \frac{\sqrt{2\pi \ln 2}}{\pi - 2 \operatorname{atan} \left( \frac{z_0}{z_r} \right)} \left( \frac{hc}{\lambda_c} \right)^2 \frac{(f w_0)^2}{n z_r} \alpha^2(\sigma_2) \quad (4.23)$$

## 4.2 Halbleiter

Laser-Scan-Mikroskope werden außerdem zur Untersuchung von Halbleitermaterialien eingesetzt. In p-n-Übergängen können beispielsweise Ladungsträgerpaare mit Hilfe der Einstrahlung von Photonen erzeugt werden (Optical Beam Induced Current – OBIC). Diese Ladungsträgerströme werden anschließend pixelsynchron detektiert. Somit sind Fehlstellen in den p-n-Übergängen und fehlerhafte Kontaktierungen auf einem fertigen integrierten Schaltkreis detektierbar. Bei der Herstellung von Halbleitern werden durch die immer komplexeren integrierten Schaltungen immer höhere Anforderungen an die Methoden zur Detektion von Fehlstellen gestellt. Dabei werden auch Verfahren notwendig, die, wie schon praktiziert, nicht nur in zwei Dimensionen, sondern auch tiefendiskriminiert Störstellen auflösen können. Durch das Ausnutzen der Zweiphotonen-Absorption in Halbleitern können Störstellen tiefendiskriminiert mit hoher Effizienz lokalisiert werden. Das Verfahren wird im ersten Abschnitt vorgestellt.

Ein neues Anwendungsfeld des LSM mit einem Femtosekundenlaser als Lichtquelle ist der Einsatz zur Untersuchung von Festkörpermateriale. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden hohen

Intensitäten können Oberwellen (Second Harmonic Generation – SHG) erzeugt werden. Dieser nichtlineare Effekt ist an die Polarisation des Materials gebunden. Das Material strahlt mit exakt der halben Wellenlänge ab. Das SH-Signal ist zur tiefendiskriminierten Detektion von Kristallfehlern einsetzbar. Es können Kristallstrukturen unterschieden, Dotierungen bestimmt und Anlagerungen von Molekülen an Halbleiteroberflächen überwacht werden [27]. Aufgrund des Entstehungsortes des SH-Signals unterscheidet man zwischen dem Oberflächen- und dem Volumen-SH-Signal, wobei letzteres nur in Medien ohne Inversionssymmetrie auftritt. Die Oberflächen-SH entsteht nur in den obersten Atomlagen eines Mediums, da hier die Symmetrie stets gebrochen ist. Die Wechselwirkungslänge zur Erzeugung des Oberflächen-SH-Signals beträgt deshalb nur einige  $\text{\AA}$ . Bei der Volumen-SH beträgt sie dagegen  $\lambda/2\pi \approx 1000 \text{ \AA}$ , wodurch das Volumen-SH-Signal dem Oberflächen-SH-Signal überwiegt.

Herkömmliche Verfahren zur Oberflächenanalyse verwenden die Röntgenbeugung. Bei ihnen beträgt jedoch die Wechselwirkungslänge einige Mikrometer. Sie ist damit wesentlich größer als bei der SH-Erzeugung. Die SH-Erzeugung und besonders die Oberflächen-SH-Erzeugung ist somit wesentlich oberflächenspezifischer. Dieses Verfahren wird im zweiten Abschnitt näher beschrieben.

#### 4.2.1 Optical Beam Induced Current (OBIC)

Zur Detektion von Kristalldefekten, z.B. in Siliziumwafern werden standardmäßig Kontakt-Techniken, wie z.B. OBIC (Optical Beam Induced Current), LIVA (Light Induced Voltage Alteration) [28] und quantitative Emissionsmikroskopie [29] eingesetzt. Dazu wird entweder der zu untersuchende Wafer kontaktiert (prober station), oder es wird der fertig kontaktierte Chip verwendet. Beim LIVA-Verfahren wird eine konstante Spannung an die Prober-Elektroden angelegt. Die Spannungsänderungen werden dann in Abhängigkeit von der Scanposition registriert.

Beim OBIC-Verfahren werden durch Photonen mit einer Energie größer als die Bandlückenenergie  $E_g$  in p-n-Übergängen Elektron-Loch Paare erzeugt, siehe Abb. 4.7. Für die Wellenlänge des Anregungslichtes  $\lambda_c$  muß gelten:

$$\lambda_c < \lambda_0 = \frac{hc}{E_g} \quad (4.24)$$

$\lambda_0$  bezeichnet hier die Wellenlänge, oberhalb derer keinerlei Absorption im Halbleiter erfolgt. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes entsteht auf diese Weise ein von der Scanposition abhängiger Ladungsträgerstrom  $I$ . Dieser Ladungsträgerstrom kann zur Lokalisierung von Gitterfehlstellen herangezogen werden. Nachteilig bei dieser Methode ist, daß hierbei keine Tiefendiskriminierung erfolgen kann. Deshalb muß der Wafer nach der Lokalisierung der Fehlstellen Schicht für Schicht abgetragen und jede Schicht mit einem Elektronen-Mikroskop untersucht werden.

Eine Untersuchung der Chips von der Rückseite (Backside OBIC) ist notwendig, wenn auf der Vorderseite optisch undurchdringbare Metallschichten aufgebracht sind. Hierzu werden meist Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm verwendet. Das Licht durchdringt bei dieser

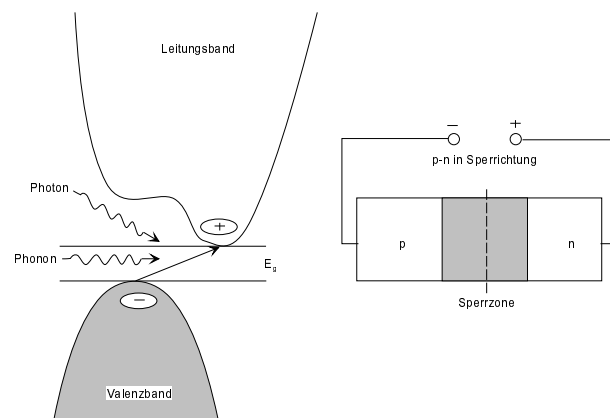


Abbildung 4.7: Band zu Band Absorption in einem indirekten Halbleiter wie Silizium

Wellenlänge nahe der Bandkante von Silizium hinreichend gut auch dotiertes Silizium ( $E_g = 1.12$  eV;  $\lambda_0 = 1100$  nm).

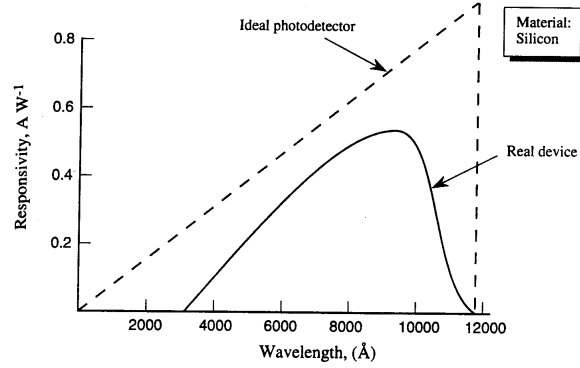


Abbildung 4.8: Spektrale Abhängigkeit der erzeugten Elektron–Loch–Paare am Beispiel von Silizium

Gleichzeitig verringert sich jedoch, wie aus Abb. 4.8 hervorgeht, die Quanteneffizienz zur Erzeugung der Elektron–Loch–Paare. Die Quanteneffizienz besitzt für Silizium ein Maximum bei einer Wellenlänge von ca. 1000 nm [30].

Analog zur Zweiphotonen–Absorption in Farbstoffen, können durch die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen im infrarotem Wellenlängenbereich oberhalb der Bandkante von Silizium die oben aufgeführten Nachteile überwunden werden (TOBIC) [31]. Es kommt bei Verwendung dieser Methode zu einer effizienten Erzeugung von Elektron–Loch–Paaren. Gleichzeitig verringert sich die Absorption der Strahlung beim Durchdringen des Substrates.

Das Detektionssignal, d.h. der Ladungsträgerstrom läßt sich analog zur Ein- und Zweiphotonen–Absorption in Farbstoffen in Abschnitt 4.1 herleiten. Bei einer Zweiphotonenanregung hängt der Ladungsträgerstrom  $I_{TOBIC}$  vom Quadrat des Anregungsflusses  $F_0$  bzw. der mittleren Leistung  $P_{avg}$  ab. Bei der Einphotonenabsorption ist der Ladungsträgerstrom  $I_{OBIC}$  proportional zum Anregungsfluß  $F_0$  bzw. der mittleren Leistung  $P_{avg}$ .

$$\begin{aligned} I_{TOBIC} &= \alpha_2 F_0^2 \propto \alpha_2 P_{avg}^2 \\ I_{OBIC} &= \alpha_1 F_0 \propto \alpha_1 P_{avg} \end{aligned} \quad (4.25)$$

Im Zweiphotonenfall wird der Ladungsträgerstrom somit nur im Fokus hochaperturiger Mikroskopobjektive und am vorteilhaftesten mit Hilfe von Kurzpulslasern bei einer Wellenlänge von 1500 nm erzeugt. Dadurch können mit diesem Verfahren Fehlstellen im Halbleiter mit einer hohen räumlichen Auflösung detektiert werden.

Der Ladungsträgerstrom ist weiterhin abhängig von der Größe des Rekombinationsbereichs, d.h. von der Größe der Dotierung und des angelegten Feldes.

#### 4.2.2 Erzeugung der Zweiten Harmonischen (SHG) in Halbleitern

Die Quelle des Signals der Zweiten Harmonischen (SH) ist die nichtlineare Polarisation zweiter Ordnung. Für die Polarisation  $P_i(2\omega)$  ergibt sich in der Dipolapproximation:

$$P_i(2\omega) = \chi_{ijk}^{(2)} : E_j(\omega) E_k(\omega) \quad (4.26)$$

$E_i$  beschreibt die einfallende elektrische Feldamplitude und  $\chi_{ijk}^{(2)}$  den Suszeptibilitätstensor zweiter Ordnung. Die Symmetrie des Tensors wird durch die Symmetrie des bestrahlten Kristalls definiert. Verschiedene Kristallstrukturen (z.B. von Siliziumkarbid (SiC)) werden somit durch unterschiedliche Tensoren wegen der unterschiedlichen Kristallsymmetrien beschrieben. Weiterhin unterscheiden sich die Tensoren des Oberflächenanteils von denen des Volumenanteils der SH.

Das SH-Signal ergibt sich aus der Lösung der Maxwell-Gleichungen unter Verwendung von Gl. (4.26). Es hängt quadratisch von der Anregungsintensität bzw. von der mittleren Leistung  $P_{avg}$  ab. Die Wellenlänge des SH-Signals entspricht genau der halben Anregungswellenlänge.

In Medien mit Inversionssymmetrie, z.B. in Silizium, muß das einfallende elektrische Feld  $E(\omega)$  bzw.  $-E(\omega)$  eine Polarisation von  $P_i(2\omega)$  bzw.  $-P_i(2\omega)$  erzeugen. Dies widerspricht jedoch Gl. (4.26). Somit muß in Medien mit Inversionssymmetrie  $\chi_{ijk}^{(2)}$  identisch Null sein. Eine Erzeugung eines SH-Signals ist deshalb nur an der Oberfläche, d.h. in den obersten Atomlagen möglich, da hier die Inversionssymmetrie gebrochen ist.

In Medien ohne Inversionssymmetrie, z.B. in Siliziumkarbid oder in Gallium Arsenid (GaAs), ist zusätzlich zur Oberflächen-SH auch eine Volumen-SH erlaubt. Die Volumen-SH dominiert i.a. über die Oberflächen-SH aufgrund ihrer längeren Wechselwirkungslänge von etwa  $\lambda/2\pi$ . Es ist schwierig, diese beiden Signale zu separieren, da sie oft die gleiche azimuthale Rotationsanisotropie besitzen [32].

Informationen über die untersuchte Kristallstruktur können aus dem Suszeptibilitätstensor durch die Untersuchung der azimuthalen Rotationsanisotropie des SH-Signals gewonnen werden [33]. Verschiedene Polytypen von SiC erzeugen ein SH-Signal mit unterschiedlicher Effizienz. Durch das Abrastern der Oberflächen einer Probe können dadurch Regionen mit abweichender Kristallstruktur sichtbar gemacht werden [33].



# Kapitel 5

## Charakterisierung des Mikroskops LSM 410

In diesem Kapitel werden Versuchsaufbau und Ergebnisse der Messungen zur Charakterisierung und zur Optimierung des LSM im Femtosekundenbereich behandelt.

Im ersten Teil des Kapitels wird der verwendete Versuchsaufbau beschrieben.

Der zweite Teil des Kapitels befaßt sich mit den Ergebnissen der Messungen. Bei den Messungen wurde wie folgt vorgegangen: In einem ersten Experiment wurde der Femtosekundenlaser direkt in das Mikroskop eingekoppelt und die Pulsverbreiterung im LSM zusammen mit verschiedenen Objektiven bestimmt. Daraus läßt sich die Dispersion, die durch diese Komponenten erzeugt wird, berechnen.

Anschließend wurde diese GVD mit einem Prismenkompressor kompensiert. Die Messungen erfolgten exemplarisch für das LSM einschließlich des PlanNeofluar 40x/1.3 oil Objektivs. Falls hiermit eine Kompensation der GVD möglich ist, so sollte dies auch für alle verbleibenden Objektive möglich sein.

Nachdem die GVD des LSM erfolgreich kompensiert war, wurde der Femtosekundenlaser über eine 2 m lange Glasfaser an das Mikroskop gekoppelt und die Gesamtdispersion ermittelt. Diese Art der Kopplung hat gegenüber der Direktkopplung mehrere Vorteile. Die Justage des Lasers wird von der Justage des Mikroskops abgekoppelt. Der Laser kann räumlich von dem sehr vibrationsempfindlichen Mikroskop getrennt werden. Zusätzlich erhält man einen 'sauberen'  $TEM_{00}$ -Mode am Ausgang der Glasfaser. Dies ist für die Erzeugung eines möglichst idealen beugungsbegrenzten Fokus nötig. Auch hier konnte die Dispersion kompensiert werden. Jedoch wurde jetzt ein Gitterkompressor verwendet, da mit ihm eine um den Faktor 10 größere negative Dispersion im Vergleich zum Prismenkompressor erzeugt werden kann.

### 5.1 Versuchsaufbau

#### 5.1.1 Lasersysteme

Zur Erzeugung von Femtosekundenpulsen sind zur Zeit Titan-Saphir-Lasersysteme am gebräuchlichsten. Diese sind jedoch sehr justieraufwendig und platzintensiv. Eine neue und wesentlich kleinere Quelle zur Erzeugung von Femtosekundenpulsen sind Faserlaser. Eine Justage der Komponenten ist bei ihnen nicht nötig. Somit wäre deren Einsatz in einem kommerziellen Produkt denkbar. Ihre Spitzenleistung von 1 kW ist wesentlich geringer als bei den Titan-Saphir-Lasersystemen, deren maximale Spitzenleistung bei 50 kW liegt. Jedoch sollte zur Anregung eines Zweiphotonen-Übergangs eine Spitzenleistung von 1 kW theoretisch ausreichen, so daß

der Titan-Saphir-Laser generell abgeschwächt werden mußte. Beide Lasersysteme wurden in den Experimenten eingesetzt. In den Experimenten soll geklärt werden, ob die Spitzenleistung des Faserlasers für die Zweiphotonen-Anregung ausreicht. Auf die Funktionsweise der verwendeten Laser wird im folgenden eingegangen.

### Titan-Saphir-Laser

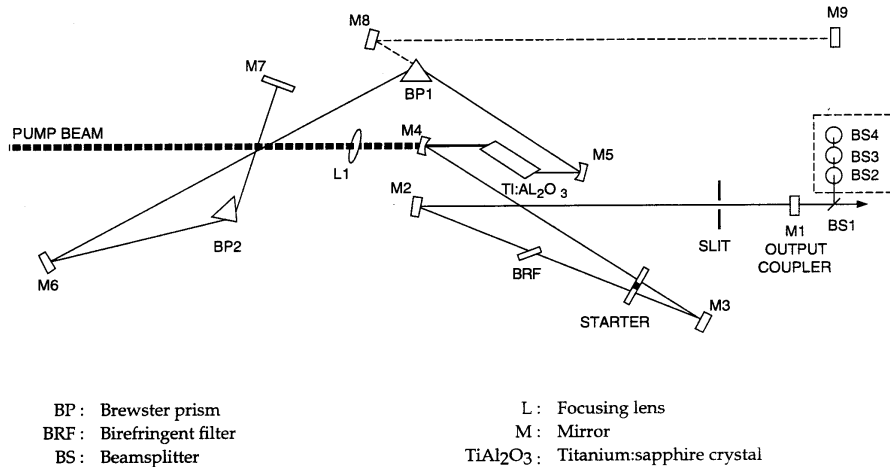


Abbildung 5.1: Aufbau des Titan-Saphir-Lasers

Bei dem verwendeten Lasersystem handelt es sich um einen Laser vom Typ 'MIRA 900 F', (Fa.: Coherent, Santa Clara, USA). Den prinzipiellen Aufbau zeigt Abb. 5.1 [35]. Als Verstärkermittel dient ein Titan-Saphir-Kristall. Dieser wird durch einen Multiline-Argon-Ionen Laser 'INNOVA 310' der gleichen Firma mit einer mittleren Leistung von 8 W gepumpt. Die Pumpwellenlängen reichen von 457 nm bis 514 nm.

Zur Erzeugung des Pulsbetriebs wird in diesem Laser der Kerr-Effekt ausgenutzt, d.h. die Brechzahl im Pumpkristall ändert sich in Abhängigkeit von der Intensität. Somit wird eine zusätzliche Bikonvex-Linse erzeugt. Der aufgrund seiner geringeren Intensität schwächer fokussierte cw-Anteil wird anschließend mit Hilfe eines Spaltes unterdrückt. Dies ist schematisch in der Abb. 5.2 aufgeführt. Somit wird nur der gepulste Anteil weiter verstärkt. Man erhält auf diese Weise einen sättigbaren Absorber, dessen Eigenschaften unabhängig von der verwendeten Wellenlänge sind und der im Gegensatz zu den sonst häufig verwendeten Farbstoffen keinerlei Serviceaufwand erfordert.

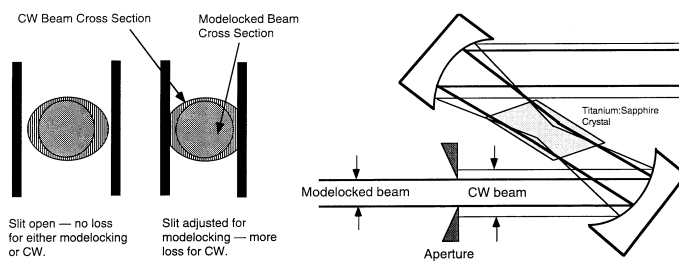


Abbildung 5.2: a) Strahlquerschnitt und b) Strahlgeometrie im KLM-modengekoppelten TiSa Laser

Durch die hohen Intensitäten im Laserresonator kommt es des Weiteren zur Selbst-Phasen-Modulation (SPM). Dadurch werden neue Frequenzen generiert. Um jedoch am Laserausgang einen chirpfreien Laserpuls zu erhalten, wird ein Prismenkompressor eingesetzt. Dieser Prozess

wird außerdem zur Selbstregulierung der Pulsleistung verwendet. Wird der Puls intensiver, so erzeugt er eine größere Selbstphasenmodulation. Er wird dadurch instabil. Die Pulse sind nur dann stabil, wenn sich der negative Chirp – erzeugt durch SPM – gerade mit dem positiven Chirp der GVD aufhebt.

Mit Hilfe derartiger Mechanismen ist es mit diesem Laser möglich, Pulse mit einer minimalen Pulslänge von 100 fs, einer mittleren Leistung von maximal 1 W bei einer Repetitionsrate von 76 MHz zu erzeugen. Mit drei Spiegelsätzen ist der Laser außerdem über einen Wellenlängenbereich von 680 bis 1100 nm durchstimmbare. In den Experimenten war der Wellenlängenbereich des Lasers von 680 bis 830 nm einstellbar. Er wurde jedoch fast ausschließlich bei einer Wellenlänge von 800 nm betrieben, um die Ergebnisse mit dem im folgenden Abschnitt näher beschriebenen Faserlaser vergleichen zu können.

## Faserlaser

Bei dem verwendeten Faserlaser 'FA7806', (Fa.: Imra, Ann Arbor, USA) handelt es sich um einen Prototyp. Dieser erzeugt Pulse mit einer Pulslänge von 90 fs bei einer Wellenlänge von 780 nm. Die mittlere Leistung beträgt  $600 \mu\text{W}$  bei einer Repetitionsrate von 6 MHz. Es können somit beachtliche Spitzenleistungen von rund 1 kW erzeugt werden.

Das Verstärkermedium besteht aus einer mit  $\text{Er}^{3+}$ -Ionen dotierten Glasfaser. Dieses Verstärkermedium ist für den Aufbau von Faserlasern besonders geeignet, da die Emission bei 1560 nm liegt und bei dieser Wellenlänge die Absorption und die Dispersion in Glasfasern gering sind. Das Verstärkermedium wird meist bei einer Wellenlänge von 980 nm oder 1480 nm mit speziellen Laserdioden gepumpt. Zur Erzeugung der gewünschten Wellenlänge von 780 nm muß nach dem Laserresonator noch ein SHG-Kristall zur Erzeugung der zweiten Harmonischen nachgeschaltet werden.

Der genaue Aufbau des verwendeten Laserresonators ist nicht bekannt. In der Literatur [13, 36] fanden sich zwei mögliche Aufbauten eines  $\text{Er}^{3+}$ -Faserlasers, mit denen die oben spezifizierten Parameter erreicht werden können. In beiden Fällen sind die Laser passiv modengekoppelt.

Im ersten Fall wird die additive Pulsmodenkopplung ausgenutzt. Der Aufbau, der in der Literatur auch als 'figure-8' bezeichnet wird, ist in Abb. 5.3 zu sehen. Der zentrale 50:50-Koppler spaltet die Strahlung in zwei gleichgroße, sich entgegengesetzt bewegende Pulse auf. Die dotierte Faser wird in die Nähe eines Ausgangs des zentralen 50:50-Kopplers gebracht. Somit wird der entgegen dem Uhrzeigersinn laufende Puls **nach** und der im Uhrzeigersinn laufende Puls **vor** dem Durchlaufen der Faserschleife verstärkt. Diese Konfiguration wird auch als Nonlinear Amplifying-Loop Mirror (NALM) bezeichnet. Beide Pulse erzeugen somit beim Durchlaufen der Faserschleife verschiedene nichtlineare Phasenverschiebungen durch SPM. Im zentralen 50:50-Koppler überlagern sich beide Pulse interferometrisch, und es kommt hierbei zum Abschneiden der sich destruktiv überlagernden Pulsteile. Der NALM wirkt also wie ein sättigbarer Absorber. Die Laserstrahlung wird über den

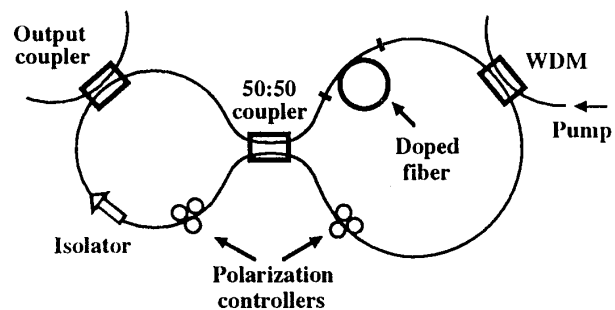


Abbildung 5.3: Aufbau eines 'figure-8' Resonators

zentralen 50:50-Koppler ausgekoppelt.

Faserlaser können weiterhin mit Hilfe einer intensitätsabhängigen Änderung der Polarisation durch SPM und Kreuz-Phasen-Modulation (XPM) passiv modengekoppelt werden. Abb. 5.4 zeigt einen Ringresonator, in dem sich ein Polarisationsisolator zwischen zwei Polarisatoren (polarization controllern) (vgl. Aufbau) befindet. Der Polarisationsisolator hat die Aufgabe eines Isolators und eines Polarisators, wodurch die Strahlung linear polarisiert wird. Nach dem ersten Polarisator (polarization controller) ist die Strahlung elliptisch polarisiert. Aufgrund der Wirkung von SPM und XPM ändert sich die Polarisation des Pulses beim Durchlaufen der dotierten Faser. Der zweite Polarisator (polarization controller) ist so eingestellt, daß nur der intensitätsstarke Teil des Pulses den Polarisationsisolator passieren kann. Die Flanken des Pulses werden unterdrückt. Der Puls wird somit bei jedem Umlauf verkürzt. Die Anordnung wirkt also wiederum wie ein sättigbarer Absorber. Die Laserstrahlung wird über den Auskoppler (output coupler) ausgekoppelt.

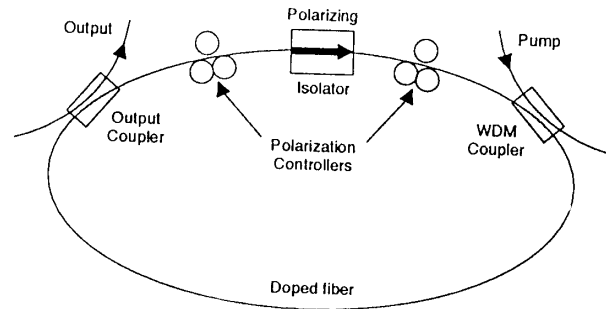


Abbildung 5.4: Aufbau eines passiv modengekoppelten Lasers mit Ringresonator

### 5.1.2 Modifikationen am LSM 410

In einem konfokalen LSM wird das Präparat mit den Scannern punktförmig und telezentrisch in der x-y-Ebene abgerastert. Im LSM 410 (Fa.: Carl Zeiss Jena GmbH) Abb. 5.5 werden dazu zwei unabhängig ansteuerbare Galvoscanner verwendet. Dadurch können beliebige Scanfelder mit einer Scangeschwindigkeit von bis zu 700 Zeilen pro Sekunde realisiert werden. Die so gewonnenen optischen Schnitte werden anschließend im Rechner zum Beispiel zu einem dreidimensionalen Bild weiter verarbeitet.

Zur Detektion stehen zwei verschiedene Fluoreszenzkanäle (1,2 – descanned) mit voneinander unabhängig steuerbaren konfokalen Blenden (PH) zur Verfügung. Die konfokalen Blenden können stufenlos geöffnet werden. Es kann somit im Einphotonenbetrieb die gewünschte Tiefendiskriminierung eingestellt werden.

Für die Anregung der Fluoreszenz können bis zu zwei interne Laser (HeNe 543 nm und 633 nm) verwendet werden. Zusätzlich kann man zwei externe Laser über spezielle Eingänge einkoppeln. Beide Eingänge wurden zur Einkopplung der Kurzpuls laser genutzt.

Die Modifikationen am LSM 410 umfassen den Einbau bzw. den Austausch von dichroitischen Strahlteilern (DBC, DBS) und Emissionsfiltern (EF), entsprechend Abb. 5.5 (blau gezeichnet). Als Strahlteiler werden Kurzpaßfilter (KP 670; Fa.: Zeiss) verwendet, die die Wellenlängenbereiche oberhalb von 670 nm reflektieren und unterhalb von 670 nm transmittieren. Als Emissionsfilter dienen Blockfilter (SWP 685; Fa.: Zeiss), die die Strahlung oberhalb von 685 nm blocken. Vor jedem Detektor befanden sich zwei dieser Filter, um das Unterdrückungsverhältnis zu erhöhen. Das Unterdrückungsverhältnis der Anregungsstrahlung  $S_{800\text{ nm}}$  zur Fluoreszenzstrahlung  $S_{\text{Emission}}$  ist bei diesen Filtern:

$$\frac{S_{\text{Emission}}}{S_{800\text{ nm}}} \approx \frac{0.9^2}{0.0008^2} = 1100^2 = 1 \cdot 10^6$$

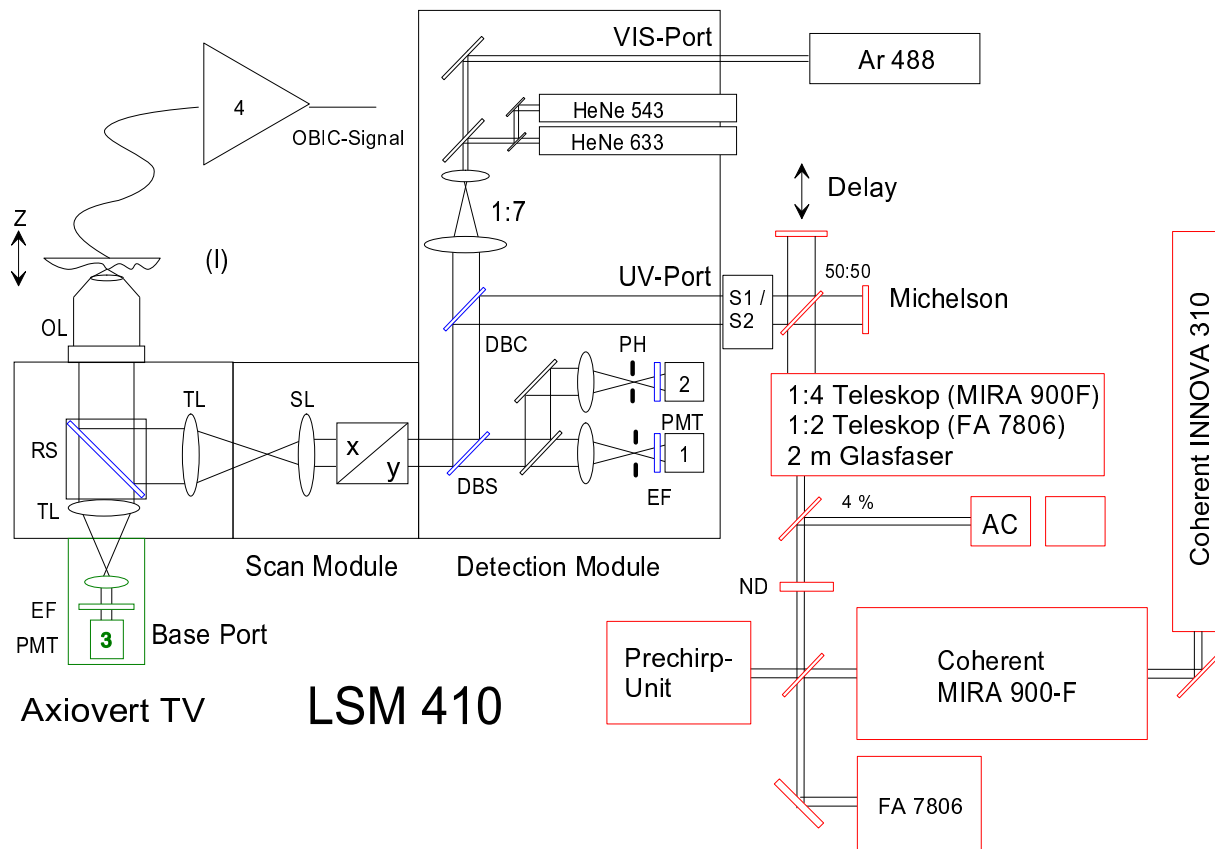


Abbildung 5.5: Schematischer Versuchsaufbau

Da man bei der Zweiphotonen-Mikroskopie tiefendiskriminiert anregt, ist zur Aufnahme eines optischen Schnittes keine konfokale Blende erforderlich. Deshalb wird zur Detektion die konfokale Blende vollständig geöffnet.

Zusätzlich zu den bestehenden Detektionskanälen wurde ein externer (nondescanned) Detektionskanal (3, grün gezeichnet) aufgebaut und getestet. Hierbei wird das Fluoreszenzlicht nach dem Objektiv, d.h. im Unendlichstrahlengang, vom Anregungslicht mit dem DBS, der sich im Reflektorschieber (RS) befindet, abgetrennt. Anschließend wird das Licht direkt auf einem Detektor abgebildet, der am TV-Eingang des Mikroskops, entsprechend Abb. 5.5, befestigt ist. Vor dem Detektor sind Emissionsfilter (SWP 685) fest eingebaut. Durch die geringe Anzahl von optischen Komponenten wurde eine bessere Effizienz in diesem Emissionstrahlengang erwartet. Die Transmission in Kanal 3 ist jedoch nur um einen Faktor 1.5 größer als in den Kanälen 1 und 2. Das läßt darauf schließen, daß der kommerziell realisierte Detektionsstrahlengang sehr effizient ist. Darüberhinaus ist der Kanal 3 sehr anfällig gegenüber Raumlicht, da durch das Fehlen der Scanner Licht aus dem gesamten Öffnungswinkel des Objektivs detektiert wird. In den Kanälen 1 und 2 wird dagegen nur der Weg für jeweils einen speziellen Scanpunkt des gesamten Scanfeldes, abhängig von der Stellung der Scanspiegel, freigegeben. Der Kanal 3 ist deshalb nur für extrem schwache Fluoreszenzsignale geeignet. Dabei muß jegliches Fremdlicht unterdrückt werden.

Die externen Komponenten zur Ankopplung der Lasersysteme sind in Abb. 5.5 rot eingezeichnet. Bei ihnen handelt es sich um die Lasersysteme, ein Neutralfilterrad (ND) zur Abschwächung der Laser, die Prechirp-Einheit zur Kompensation der GVD, eine Aufweitungsoptik und einen Michelson-Autokorrektor zur Messung der Pulslänge in der Probe. Direkt vor dem LSM befanden sich zwei Justierspiegel (S1/S2). Mit ihnen erfolgte die Justage der externen Laser auf die optische Achse des LSM unter Verwendung eines internen justierten Lasers als Referenzlaser. Dazu wurde abwechselnd ein Bild eines Gitterpräparates mit jeweils einem Laser aufgenommen und der externe Laser solange 'bewegt', bis beide Bilder des Gitters sich überlagerten.

Die Eingangspulslänge  $\Delta\tau_0$  wurde direkt nach dem Laser mit einem SHG-Autokorrektor (AC) (Pulse Check, Fa: APE; Berlin) gemessen. Zur Bestimmung der spektralen Breite  $\Delta\lambda$  wurde ein Gitterspektrometer ( $\Lambda$ ) (Grating Monochromator, Fa: Zeiss) verwendet, das ebenfalls wahlweise in den Strahlengang eingebracht werden konnte. Aus diesen beiden Größen kann die Phasenmodulation  $A$  des Pulses am Ausgang des Lasers mit Gl. (3.1) bestimmt werden.

Der genaue Aufbau der Komponenten in den einzelnen Experimenten wird in den nächsten Abschnitten erläutert.

### 5.1.3 Direktkopplung

Die einfachste Art der Kopplung erfolgt durch die direkte Einspiegelung des KurzpulsLasers in das LSM über einen der beiden zur Verfügung stehenden Eingänge (UV-Eingang, VIS-Eingang), entsprechend Abb. 5.5.

Bei der Einkopplung sind die Polarisation zur effizienten Reflexion der Laserstrahlung und der Strahldurchmesser zur Ausleuchtung des Objektivs zu beachten. Eine vollständige Ausleuchtung der Objektivpupille ist notwendig, da besonders die Randstrahlen zur beugungsbegrenzten Fokussierung und damit zur Auflösung beitragen. Die Polarisation muß an beiden externen Eingängen des LSM horizontal sein. Damit wird sichergestellt, daß die Strahlung am DBC senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist und optimale Reflexionseigenschaften vorliegen.

Die interne Vergrößerung des LSM  $M_1$  beträgt 1.82. Im VIS-Eingang befindet sich zusätzlich ein fester 1:7-Aufweiter. Der Strahldurchmesser  $d$  am Eingang des LSM bestimmt sich aus der Größe der Pupille  $d_{pupil}$  des verwendeten Mikroskopobjektivs und aus den Vergrößerungsfaktoren von LSM  $M_1$  und Aufweiter  $M_2$  gemäß folgender Gleichung:

$$d = \frac{d_{pupil}}{M_1 M_2} \quad (5.1)$$

Die Austrittspupillen der verwendeten Objektive schwanken von 4 mm für hochvergrößernde Objektive bis 10.7 mm für Objektive mit geringerer Vergrößerung. Die Objektivpupille des PlanNeofluar 63x/1.25 oil wurde als Richtwert zur Berechnung von  $d$  verwendet. Deren Größe beträgt  $d_{pupil} = 6.6$  mm.

**Einkopplung über den UV-Eingang:** Entsprechend Gl. (5.1) ist bei Verwendung des UV-Eingangs ein Strahldurchmesser von  $d = 3.6$  mm am Eingang zur Ausleuchtung des Objektivs erforderlich. Der 'Mira 900F' besitzt eine doppelte Strahltaile von 0.8 mm bei  $1/e^2$ . Deshalb wurde zwischen Laser und LSM ein 1:4-Teleskop eingebaut. Die doppelte Strahltaile des 'FA 7806' betrug bei  $1/e^2$  3 mm. Beim Einsatz dieses Lasers wurde mit einem 1:2-Teleskop aufgeweitet.

**Einkopplung über den VIS-Eingang:** Durch den zusätzlichen 1:7-Aufweiter ergibt sich, entsprechend Gl. (5.1), ein Strahldurchmesser am Eingang des LSM von 0.5 mm. Die Strahltaile des 'Mira 900F' wurde mit einer Sammellinse durch eine 1:1-Abbildung auf die erste Linse

des internen Aufweilers transformiert, da der Laserstrahl eine Divergenz von 1.5 mrad aufweist. Ohne diese 1:1-Abbildung würde es zu einer Überstrahlung des Aufweilers und damit zu einem Strahlungsverlust kommen. Die Brennweite der Sammellinse wird durch den Abstand Laser-Aufweiler bestimmt. In den Experimenten betrug die Brennweite 800 mm. Der 'FA 7806' wurde nicht über diesen Eingang, sondern nur über den UV-Eingang eingekoppelt.

Die **Kompensation der Dispersion des LSM-Komponenten** erfolgte mit der in Abb. 5.5 dargestellten Prechirpeinheit. Diese bestand im wesentlichen aus zwei Prismen (F7)  $P_1$ ,  $P_2$  und einem Umlenkprisma  $P_3$ . Das Prisma  $P_2$  konnte vertikal zur Strahlrichtung verschoben werden (siehe Aufbau Prismenkompressor Abb. 3.5 a) auf Seite 23). Die Größe der Dispersion der Prechirpeinheit war somit feinfühlig einstellbar.

Die **Transmissionen bei einer Wellenlänge von 800 nm** durch die Einzelkomponenten und durch das Gesamtsystem wurden mit einem Leistungsmesser bestimmt und sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Transmission im LSM 410 bei 800 nm

Komponente	Transmission in Prozent	
	UV-Eingang	VIS-Eingang
Externer Spiegel New Focus 5103	98.5	
DBS / DBC (KP 670)	93.9	
Mikroskop (Eingang bis zur Objektivpupille)	72	47

Der VIS-Eingang hat damit eine um 35 % geringere Transmission als der UV-Eingang. Des weiteren ist die Einkopplung über den VIS-Eingang störanfälliger. Dies liegt an der Abbildung der Strahltaile des Lasers auf die Frontlinse des internen Aufweilers. Der UV-Eingang wurde deshalb für die Einkopplung des Lasers bevorzugt verwendet.

#### 5.1.4 Faserkopplung

Zur mechanischen Entkopplung von Lasersystem und Mikroskop wurde eine 2 m lange polarisationserhaltende Monomode-Glasfaser (Fa.: PointSource, Winchester, UK) verwendet. Der Kerndurchmesser betrug 5  $\mu\text{m}$ . Die Verwendung einer Monomodefaser ist zur Unterdrückung der Modendispersion notwendig.

Der Aufbau ähnelt dem Aufbau in Abb. 5.5 zur Direktkopplung des Lasers über den UV-Eingang. Es wurde lediglich der Aufweiler durch die Glasfaser mit fester Lasereinkoppel- und Auskoppeloptik ersetzt. Die für den 'Mira 900F' erforderliche 1:4-Aufweitung erfolgte durch die Art der Auskoppeloptik der Glasfaser. Die Transmission durch die Glasfaser betrug etwa 42 % bei einer Wellenlänge von 800 nm. Ursache für die relativ niedrige Koppeleffizienz war das elliptische Strahlprofil des Lasers. Laut Herstellerangaben beträgt die maximale Transmission bei dieser Wellenlänge 62 %.

Zur Kompensation der Dispersion wurde hier ein Gitterkompressor (651 Linien/mm) (Abb. 3.5 b) verwendet. Der Einfallswinkel betrug 0 Grad. Der senkrechte Abstand der beiden Gitter war einstellbar. Zur Umlenkung wurde ein Dachkantenspiegel eingesetzt.

### 5.1.5 Messung der Dispersion

Die Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$  wurde mit dem im Abschnitt 3.3 beschriebenen Michelson-Autokorrelator gemessen. Dazu wurde eine Farbstoffküvette (Microslides 0.2 mm; Nr. 3520; Vitro Dynamics) gefüllt mit APSS (0.1 Molar) als Probe verwendet und das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Stellung des einen Interferometerarmes  $\tau$  aufgezeichnet. Vor der Aufnahme der Autokorrelationsfunktionen wurden die Parameter (Eingangspulslänge und mittlere Anregungsleistung), bei denen eine Zweiphotonen-Absorption erfolgt, festgelegt (vgl. Abschnitt 6). Die Verschiebung des Interferometerarmes erfolgte motorisiert und kontinuierlich während des Scannens eines Bildes. Durch die Aneinanderreihung der einzelnen Zeilen des Bildes (512 x 512 Pixel) wurde die interferometrische Autokorrelationsfunktion  $g_2^{(B)}(\tau)$  aus diesem Bild gewonnen.

Die normierte Autokorrelation  $g_2^{(B)}(\tau)$  ergibt sich aus dem Hintergrundsignal  $S_B$  und den Fluoreszenzsignalen beim Blocken von jeweils einem Interferometerarm  $S_1$  und  $S_2$  aus folgender Beziehung:

$$g_2^{(B)}(\tau) = \frac{g_2^{\prime(B)}(\tau) - S_B}{S_1 + S_2 - 2S_B} \quad (5.2)$$

Das normierte Autokorrelationssignal  $g_2^{(B)}(\tau)$  wurde anschließend fouriertransformiert, alle Frequenzanteile um  $\omega_0$  und um  $2 \cdot \omega_0$  abgeschnitten und wieder rücktransformiert.

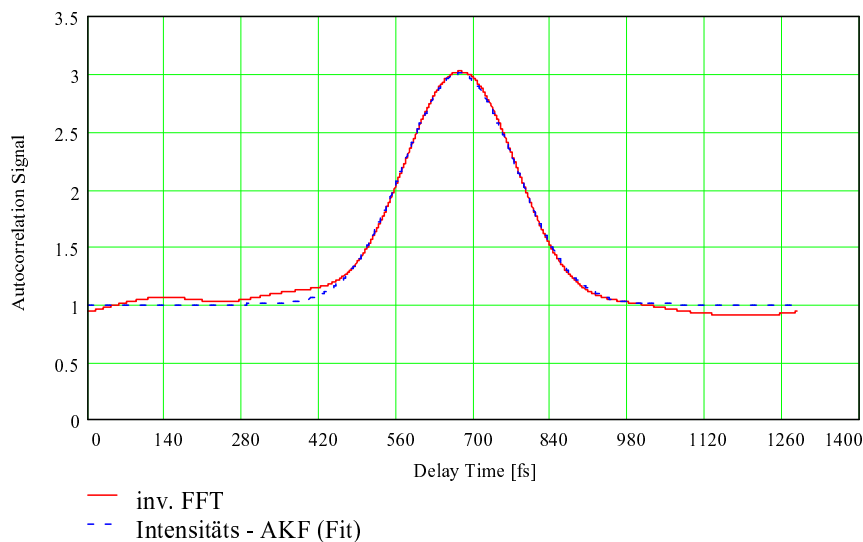


Abbildung 5.6: *Intensitäts-Autokorrelationsfunktion, berechnet aus einer in der Probe gemessenen interferometrischen Zweiphotonen-Autokorrelation; Objektiv PN 40x/1.3 oil*

Es wurde somit die interferometrische Autokorrelation in eine Intensitätsautokorrelation  $G_2^{(B)}(\tau)$  umgewandelt. Durch eine Mittelung über die schnellen Frequenzanteile der interferometrischen Autokorrelation entsteht ebenfalls die Intensitätsautokorrelation. Die Fouriertransformation wurde jedoch bevorzugt, da ihre Berechnung schneller erfolgt.

Abb. 5.6 zeigt die auf diese Weise gefundene Intensitätsautokorrelation für das Mikroskop einschließlich des Objektivs PlanNeofluar 40x/1.3 oil. Das Kontrastverhältnis beträgt in Übereinstimmung mit der Theorie 3 : 1. An die so erhaltenen Wertepaare (rote Kurve) wurde Gl. (3.15)



angefittet (in Abb. 5.6 blau gezeichnet). Daraus ergibt sich die Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$ .

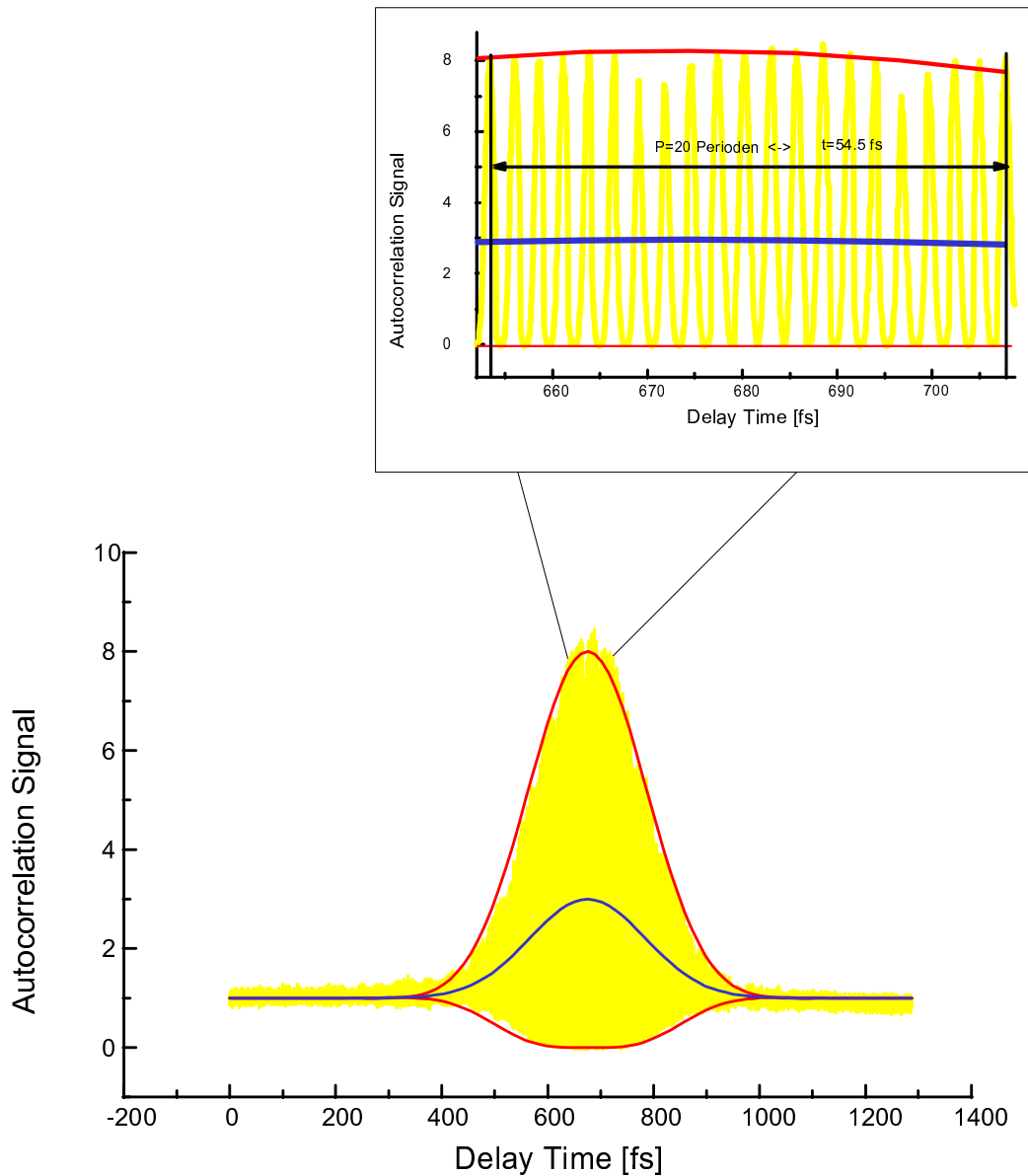


Abbildung 5.7: Interferometrische Zweiphotonen-Autokorrelationsfunktion, gemessen in der Probe mit einem PN 40x/1.3 oil Objektiv; gefittete Einhüllende der interferometrischen Zweiphotonen-Autokorrelationsfunktion (rot gezeichnet) und gefittete Intensitäts-Autokorrelation (blau gezeichnet) bei Annahme Gaußscher Pulse

Bei vorgegebener Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$  und am Laserausgang  $\Delta\tau_0$  wurde der Chirp des Eingangspulses in Gl. (3.14) variiert und der beste Fit der Einhüllenden an die gemessene interferometrische Autokorrelation bestimmt. Die Einhüllenden für konstruktive und für destruktive Interferenz ergeben sich durch das Ersetzen von  $\omega_0\tau$  durch  $\pi$  bzw. durch  $2\pi$  in Gl. (3.14). Abb. 5.7 zeigt exemplarisch die normierte interferometrische Autokorrelation, die unter oben genannten Bedingungen mit dem Objektiv PlanNeofluar 40x/1.3 oil gemessen wurde. Zusätz-

lich eingezeichnet sind die angefitteten Einhüllenden der interferometrischen Autokorrelation (rot) und der Intensitätsautokorrelation (blau). Beide Einhüllenden beschreiben den gemessenen Verlauf sehr gut. Das Kontrastverhältnis beträgt, wie theoretisch ermittelt, 8 : 1. Die gute Übereinstimmung der angefitteten Einhüllenden mit dem gemessenen Kurvenverlauf deutet darauf hin, daß die angenommene Gaußsche Pulsform zur Modellierung geeignet ist.

Aus der Periodendauer (siehe Detailzeichnung in Abb. 5.7) kann die Zentralwellenlänge  $\lambda_c$  der Laserstrahlung mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\begin{aligned}\omega_0 \Delta t &= 2\pi \quad (\text{Bedingung für eine Periode}) \\ \hookrightarrow \lambda_c &= c \frac{\Delta t}{P}\end{aligned}$$

$\Delta t$  ist die Zeitdauer für  $P$  Perioden. Die Messung der Wellenlänge erfolgt mit dieser Methode sehr genau. Der absolute Fehler berechnet sich aus dem Abstand bzw. der Unsicherheit der Meßpunkte bei der Aufnahme der Autokorrelationsfunktion. Für die in Abb. 5.7 dargestellte Autokorrelationsfunktion ergibt sich bei einer Mittelung über 20 Perioden eine Wellenlänge von  $(817 \pm 1)$  nm. Würde man über entsprechend mehr Perioden mitteln, könnte der absolute Fehler der Messung noch weiter reduziert werden.

## 5.2 Messungen und Diskussion

### 5.2.1 Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD)

Die Messungen zur Bestimmung der GVD des Mikroskops wurden bei einer Direktkopplung des Lasers 'Mira 900F' über den UV-Eingang durchgeführt.

Tabelle 5.2: Pulsverbreiterungen und die daraus resultierenden Dispersionen für das gesamte System einschließlich Objektiv

Objectiv	Pulsbreite in der Probe [fs]	theoretische Dispersion	
		gemessene Dispersion Gl. (3.27) [fs <sup>2</sup> ]	Gl. (3.21) Achsstrahl [fs <sup>2</sup> ]    Randstrahl [fs <sup>2</sup> ]
PN40x/1.3 oil	218 ± 5	4538 ± 600	5119      5028
PN63x/1.25 oil	235 ± 5	5390 ± 600	4737      4709
PN100x/1.3 oil	232 ± 5	5218 ± 600	4441      4373
C-Apo40x/1.2 W	220 ± 5	5113 ± 600	5335      5228
C-Apo63x/1.2 W	230 ± 5	4646 ± 600	5249      5317

In Tabelle 5.2 sind die Verbreiterungen von  $(138 \pm 5)$  fs Pulsen (spektrale Breite  $(8.1 \pm 0.5)$  nm, Wellenlänge  $(796 \pm 1)$  nm) und die daraus resultierenden Dispersionsparameter für das gesamte Mikroskop einschließlich Objektiv zusammengefaßt. Vermessen wurden die folgenden in der konfokalen Mikroskopie häufig verwendeten achromatisch korrigierten Zeiss-Objektive: PlanNeofluar 40x/1.3 oil, PlanNeofluar 63x/1.25 oil, PlanNeofluar 100x/1.3 oil, C-Apochromat 40x/1.2 water, und C-Apochromat 63x/1.2 water.

Die Dispersionsparameter wurden entsprechend Gl. (3.27) und Gl. (3.21) aus den experimentell ermittelten Daten (siehe Abschnitt 5.1.5) und aus den Materialdaten bestimmt. Die Berechnung

aus den Materialdaten erfolgte für einen Strahl auf der optischen Achse und für einen Strahl am äußersten Rand der Eintrittspupille des Mikroskops [37]. Dabei konnten keine starken Abweichungen zwischen diesen beiden Extremwerten des optischen Weges gefunden werden. Die experimentell bestimmten Dispersionen stimmen mit den berechneten Dispersionen im Rahmen der Fehlerintervalle überein.

Die Werte in Tabelle 5.2 zeigen auch, daß der Verbreiterungsfaktor von 1.5 nahezu unabhängig vom verwendeten Objektiv ist. Deshalb kann eine Kompensation der Gruppendispersionseffekte mit einem Prismenkompressor mit einer festen negativen Dispersion erfolgen.

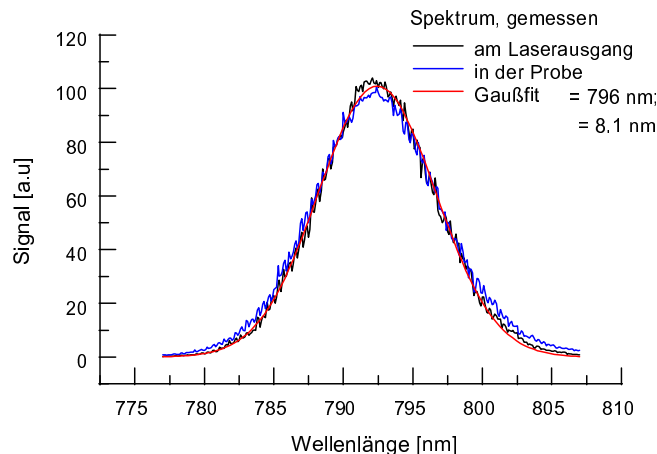


Abbildung 5.8: *Spektrum, gemessen am Laserausgang und in der Probe bei einer direkten Kopplung des Lasers*

Das Spektrum am Laserausgang und in der Probe ist in Abb. 5.8 dargestellt. Es sind keine Veränderungen in der Form des Spektrums zu sehen. Somit traten keine nichtlinearen Effekte (wie SPM) auf.

Zur Bestimmung des Fehlerintervalls der Dispersion wurden als absolute Fehler für die Wellenlänge  $\pm 1$  nm, für die spektrale Breite  $\pm 0.5$  nm und für die Messung der Pulslängen  $\pm 5$  fs angenommen. Damit ergab sich ein absoluter Fehler für die experimentelle Bestimmung der Dispersion von  $\pm 600$  fs<sup>2</sup> (Gl. (3.27)).

## 5.2.2 Kompensation der GVD

### Direktkopplung über den UV-Eingang

Bei der direkten Kopplung des Lasers über den UV-Eingang müssen die GVD der optischen Komponenten des Mikroskops kompensiert werden. Dies kann mit Hilfe des in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Prismenkompressors erfolgen.

In Abschnitt 5.2.1 zeigte sich, daß die Dispersion, die durch das Mikroskop erzeugt wird, etwa 5000 fs<sup>2</sup> beträgt. Zur Kompensation der GVD muß somit durch den Prismenkompressor der gleiche Betrag an negativer Dispersion erzeugt werden. Bei Verwendung von Prismen aus F7-Glas und bei einem Winkel von  $\delta = 0.5$  Grad ergibt sich laut Gl. (3.29) ein Abstand der Prismen (Spitze-Spitze) von  $L = 90$  cm zur Kompensation dieser 5000 fs<sup>2</sup>.

Abb. 5.9 zeigt die Pulslänge  $\Delta\tau(l)$  in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe  $L_G$  bei einem festen Prismenabstand  $L$  von 90 cm. An die Wertepaare wurde Gl. (3.25) angefitet. Sie ist in der Abbildung rot eingezeichnet. Die Pulslänge am Laserausgang betrug  $\Delta\tau_0 = (127 \pm 5)$  fs,

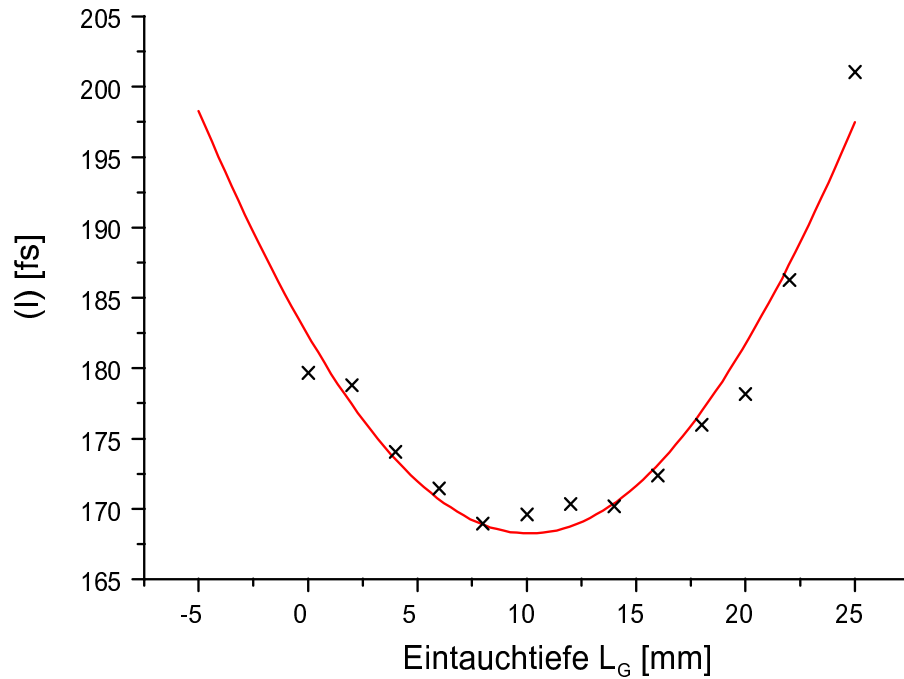


Abbildung 5.9: Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$  in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe  $L_G$  bei einem Prismenabstand von  $L = 90$  cm und einer direkten Kopplung des Lasers; Objektiv: PN 40x/1.3 oil

die spektrale Breite  $\Delta\lambda = (8.3 \pm 0.5)$  nm und die Wellenlänge  $\lambda = (793 \pm 1)$  nm. Daraus ergeben sich ein Chirp von  $A = (0.55 \pm 0.20)$  und eine minimale erreichbare Pulslänge von  $(111 \pm 5)$  fs. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die Pulslänge – wie mit Gl. (3.29) vorausgesagt – bei einer Eintauchtiefe von  $L_G = (9.0 \pm 1)$  mm und einem Prismenabstand von  $L = (90 \pm 1)$  cm ein Minimum besitzt. Aus den oben aufgeführten experimentell bestimmten Werten und den Materialkonstanten ergeben sich die folgenden Dispersionen 2. und 3. Ordnung:

Komponente	theoretische Dispersion		
	2. Ordnung [fs <sup>2</sup> ]	3. Ordnung [fs <sup>3</sup> ]	
Mikroskop mit PN 40x/1.3 oil	4538	2900	Gl. (3.21)
Prismenkompressor	$-4382 \pm 570$	$-16015 \pm 520$	Gl. (3.29)
Gesamt	$156 \pm 570$	$-13115 \pm 520$	

Eine vollständige Kompression der Pulsverbreiterung war jedoch nicht möglich. Stattdessen wurden  $(166 \pm 5)$  fs erzielt. Ursache hierfür könnte das Dachkantenprisma zur Umlenkung der Strahlung im Kompressor gewesen sein. Unter der Annahme einer vollständigen Kompensation der Dispersion 2. Ordnung resultiert durch die Dispersion 3. Ordnung von  $-13000$  fs<sup>3</sup> (Gl. (3.29)) eine Verbreiterung der Eingangspulse ( $\Delta\tau_0 = 111$  fs,  $A=0$ ) auf 115 fs (Gl. (3.28)). Der Beitrag der Dispersion 3. Ordnung ist somit vernachlässigbar.

In einer genaueren Untersuchung des Kompressors wurde ein unerklärliches Verhalten der Prismeneinheit festgestellt. In einer direkt nach dem Kompressor gemessenen Intensitätsautokorrelation entstanden Kurven mit symmetrischen Schultern in etwa 2/3 des maximalen Signals. Diese

Schultern waren nicht leistungsabhängig (SPM ausgeschlossen). Jedoch war ein Einfluß von der Länge des Glasweges durch das 2. Prisma erkennbar. Dieses Verhalten des Prismenkompressors könnte für die minimal erreichbare Pulslänge ausschlaggebend gewesen sein. Eine weitere Ursache könnten auch die im Mikroskop vorhandenen dichroitischen Schichten sein. Jedoch konnte keine Veränderung des Spektrums nach Durchlaufen des gesamten Mikroskops nachgewiesen werden.

### Faserkopplung

Der Laser wurde, entsprechend dem Aufbau in Abschnitt 5.1.4, an das Mikroskop mit einer Glasfaser angeschlossen. Zur Vermeidung von nichtlinearen Effekten in der Glasfaser mußte die mittlere Leistung des Lasers vor Eintritt in die Glasfaser begrenzt werden. Unterhalb dieses Grenzwertes für die mittlere Leistung können nichtlineare Effekte vernachlässigt werden.

Der Einfluß der SPM wurde für eine Faser aus Quarz mit einer Länge von 2 m und einem Kerndurchmesser von  $5 \mu\text{m}$  abgeschätzt. Die Abschätzung ergab eine spektrale Verbreiterung von 127 fs-Pulsen (792 nm, 76 MHz) von 8.9 nm auf 9.8 nm für eine mittlere Leistung von 20 mW. Da der absolute Fehler der Messung der spektralen Breite  $\pm 0.5 \text{ nm}$  betrug, ist die SPM für o.g. Pulse bis zu einer mittleren Leistung von 20 mW vernachlässigbar. Dieser Schwellwert von max. 20 mW in der Faser ist prinzipiell unabhängig von Anordnung der Gitter als Pulsstrecke oder als Pulskompressor. Bei der Anordnung der Gitter als Pulsstrecke kann sie sich jedoch durch nicht komplett komprimierbare Pulse (siehe weiter unten; Pulslänge 200 fs) auf 30 mW erhöhen.

Die Leistung am Eingang der Faser mußte deshalb auf max. 30 mW begrenzt werden. Bis zu dieser mittleren Leistung blieb das Spektrum der Pulse (spektrale Breite  $(8.9 \pm 0.5) \text{ nm}$ , Wellenlänge  $(792 \pm 1) \text{ nm}$ ) beim Durchgang unverändert (siehe Abb. 5.10).

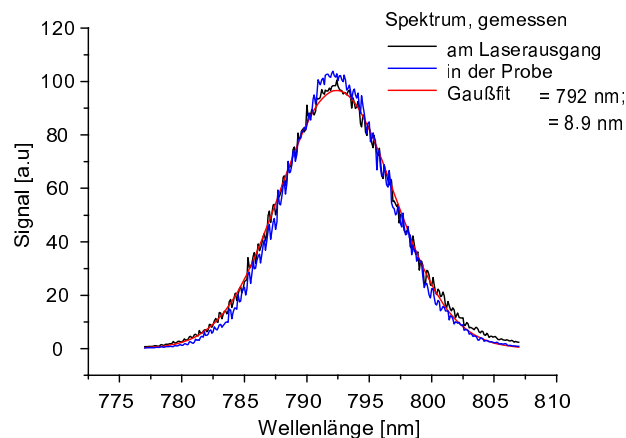


Abbildung 5.10: *Spektrum, gemessen am Laserausgang und in der Probe bei Ankopplung des Lasers über eine 2 m lange Glasfaser; Objektiv: PN 40x/1.3 oil*

Die Pulslänge änderte sich jedoch von  $(127 \pm 5) \text{ fs}$  am Eingang der Faser auf  $(3.5 \pm 0.1) \text{ ps}$  am Ausgang der Faser. Der Verbreiterungsfaktor von 30 würde das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal um drei Größenordnungen verringern.

Entsprechend Gl. (3.21) ergibt sich eine Dispersion 2. Ordnung von  $76950 \text{ fs}^2$  aus den Materialkonstanten der Glasfaser (Annahme Material: Quarz) ohne Koppeloptiken und des Mikroskops einschließlich des Objektivs PN 40x/1.3 oil bei dieser Wellenlänge. Bei Verwendung des Prismenkompressors aus dem vorigen Absatz müßten sich zur Kompensation dieser GVD die Prismen in

einem Abstand von rund 6 m befinden. Deshalb wurde zur Kompensation ein Gitterkompressor verwendet. Unter Verwendung von Gl. (3.30) ergibt sich für einen Einfallswinkel von  $\gamma = 0$  Grad und einer Linienzahl von 651/mm ein Gitterabstand von 6.5 cm. Der Beugungswinkel der ersten Ordnung beträgt bei dieser Anordnung 33 Grad.

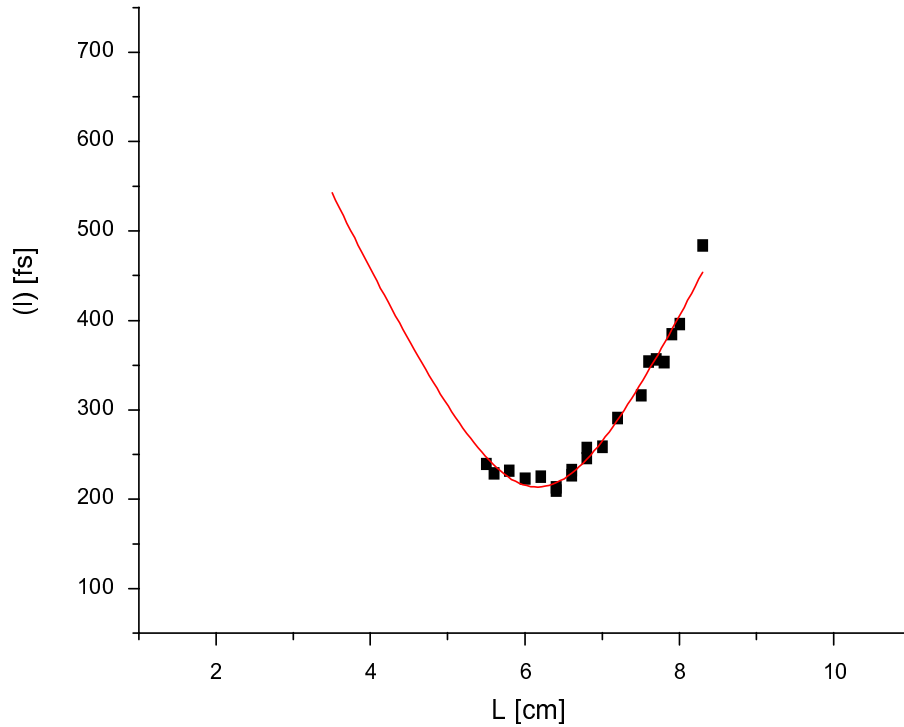


Abbildung 5.11: Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$  in Abhängigkeit vom Gitterabstand  $L$  bei Ankopplung des Lasers über eine 2 m lange Glasfaser; Objektiv: PN 40x/1.3 oil

In Abb. 5.11 ist die Abhängigkeit der Pulslänge über dem senkrechten Abstand der Gitter  $L$  aufgetragen. Die minimale Pulslänge von  $(197 \pm 5)$  fs wird für einen Gitterabstand von  $(6.2 \pm 0.1)$  cm erreicht. Dies steht in sehr gutem Einklang mit dem erwarteten Wert von 6.5 cm. An die Wertepaare wurde Gl. (3.25) angefitet. Die Kurve ist in der Abb. 5.11 rot dargestellt.

Mit dem experimentell bestimmten Wert für den Gitterabstand von  $L = 6.2$  cm und den Materialkonstanten für die Glaskomponenten ergeben sich folgende Dispersionen 2. und 3. Ordnung:

Komponente	theoretische Dispersion		
	2. Ordnung [fs <sup>2</sup> ]	3. Ordnung [fs <sup>3</sup> ]	
Mikroskop mit PN 40x/1.3 oil	4538	$2.9 \cdot 10^3$	Gl. (3.21)
2 m Glasfaser (Quarz)	72420	$5.5 \cdot 10^4$	Gl. (3.21)
Gitterkompressor	$-73400 \pm 2000$	$(5.0 \pm 0.1) \cdot 10^6$	Gl. (3.30)
Gesamt	$3558 \pm 2000$	$(5.1 \pm 0.1) \cdot 10^6$	

Somit ist die Dispersion 3. Ordnung des Gitterkompressors um einen Faktor 100 größer als die der 2 m langen Glasfaser und um einen Faktor 2000 größer als die des Mikroskops. Bei einer vollständigen Kompensation der Dispersion 2. Ordnung und des Eingangschirpes verbleibt eine Dispersion 3. Ordnung von  $5.1 \cdot 10^6$  fs<sup>3</sup>. Unter Verwendung von Gl. (3.28) ergibt sich für die Pul-

se ( $\Delta\tau_0 = 104$  fs,  $A=0$ ) durch die verbleibende Dispersion 3. Ordnung eine minimale Pulslänge von 230 fs. Die Dispersion 3. Ordnung des Gitterkompressors ist somit ausschlaggebend für die erreichbare minimale Pulslänge.

Methoden zur Kompensation der Dispersionen höherer Ordnung sind in [38, 39] aufgeführt. Hierzu werden zusätzlich zwei Zylinderspiegel in den Gitterkompressor eingebaut. Durch die Kombination der sphärischen Aberration der Spiegel und der Winkeldispersion der Gitter können die Dispersionen höherer Ordnung kompensiert werden.

### 5.3 Ergebnis

In diesem Kapitel wurde die Dispersion für das LSM 410 einschließlich verschiedener Zeiss-Objektive bei einer Wellenlänge von 793 nm vermessen. Die Dispersion ist nahezu unabhängig vom verwendeten Objektiv und beträgt bei dieser Wellenlänge etwa  $5000$   $fs^2$ . Die Kompensation der GVD ist mit Hilfe eines Prismenkompressors möglich. Die Transmission durch das LSM 410 bei der Nutzung des UV-Eingangs beträgt 72 %.

Die beim Anschluß des Lasers an das LSM 410 über eine 2 m lange Glasfaser entstehende Pulsverbreiterung ist mit Hilfe eines Gitterkompressors nahezu komplett kompensierbar. Die minimale Pulslänge wird durch die Dispersion 3. Ordnung im Gitterkompressor bestimmt. Die GVD beträgt in diesem Fall etwa  $73000$   $fs^2$ . Zur Untersuchung der nichtlinearen Effekte im nächsten Kapitel stehen somit Pulse mit einer Pulslänge von minimal 200 fs, eine Repetitionsrate von 76 MHz und einer mittleren Leistung von maximal 15 mW bei einer Wellenlänge von rund 800 nm im Präparat zur Verfügung.

# Kapitel 6

## Charakterisierung von Farbstoffen

Die Eigenschaften von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bei Beleuchtung mit ultrakurzen Pulsen sollen in diesem Kapitel experimentell untersucht werden.

### 6.1 Versuchsaufbau

Verwendet wurde der in Abschnitt 5.1.4 beschriebene Versuchsaufbau. Durch die Verstellung des Abstandes der beiden Gitter konnte die Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l_{eff})$  in einem Bereich von 265 fs bis 1900 fs eingestellt werden. Mit Hilfe des vor dem Mikroskop befindlichen Neutralfilterrades (ND) wurde die mittlere Leistung  $P_{avg}$  in der Probe von 200  $\mu\text{W}$  bis 1100  $\mu\text{W}$  variiert.

Folgende gelöste Farbstoffe wurden untersucht: Rhodamin 123 Hydrat in DMF (0.01 M), Rhodamin B in DMF (0.01 M), Coumarin 138 in DMF (0.01 M), Coumarin 153 in DMF (0.01 M), Coumarin 307 in Ethanol ( $6 \cdot 10^{-3}$  M) und APSS in DMF (0.1 M). Bei letzterem handelt es sich um einen speziellen Zweiphotonen-Farbstoff mit einem um den Faktor 100 größeren Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt. Die anderen Farbstoffe werden in der Einphotonen-Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung biologischer Präparate eingesetzt. Die Farbstoffe wurden zur Messung der funktionellen Zusammenhänge und der Wirkungsquerschnitte in Küvetten (Microslides 0.2 mm; Nr. 3520; Vitro Dynamics) gefüllt.

Bei der Bestimmung der Point Spread Function (PSF; Punkt-Bild-Funktion) wurde der Farbstoff auf einen Objekträger gebracht, mit einem Deckglas (0.17 mm) bedeckt und mit Lack versiegelt. Dies war notwendig, da die Objektive unter Berücksichtigung dieses Deckglases optisch korrigiert sind und die PSF stark von der Dicke des Glases abhängt.

Zur Detektion der Fluoreszenz wurden der kommerzielle Detektionsstrahlengang (CH 1) und das Objektiv PlanNeofluar 40x/1.3 oil verwendet. Alle Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 800 nm mit dem 'Mira 900F', um diese mit dem 'FA7806' vergleichen zu können.

### 6.2 Messungen und Diskussionen

#### 6.2.1 Funktionelle Zusammenhänge

Die Messungen erfolgten zunächst mit APSS (0.1 M), da bei diesem Farbstoff eine starke Fluoreszenz über einen großen Meßbereich erwartet wurde.

Zur Aufnahme der funktionellen Abhängigkeiten (vgl. Abschnitt 4.1.1) wurde bei einer vorgegebenen Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l_{eff})$  die mittlere Leistung in der Probe  $P_{avg}$  variiert.



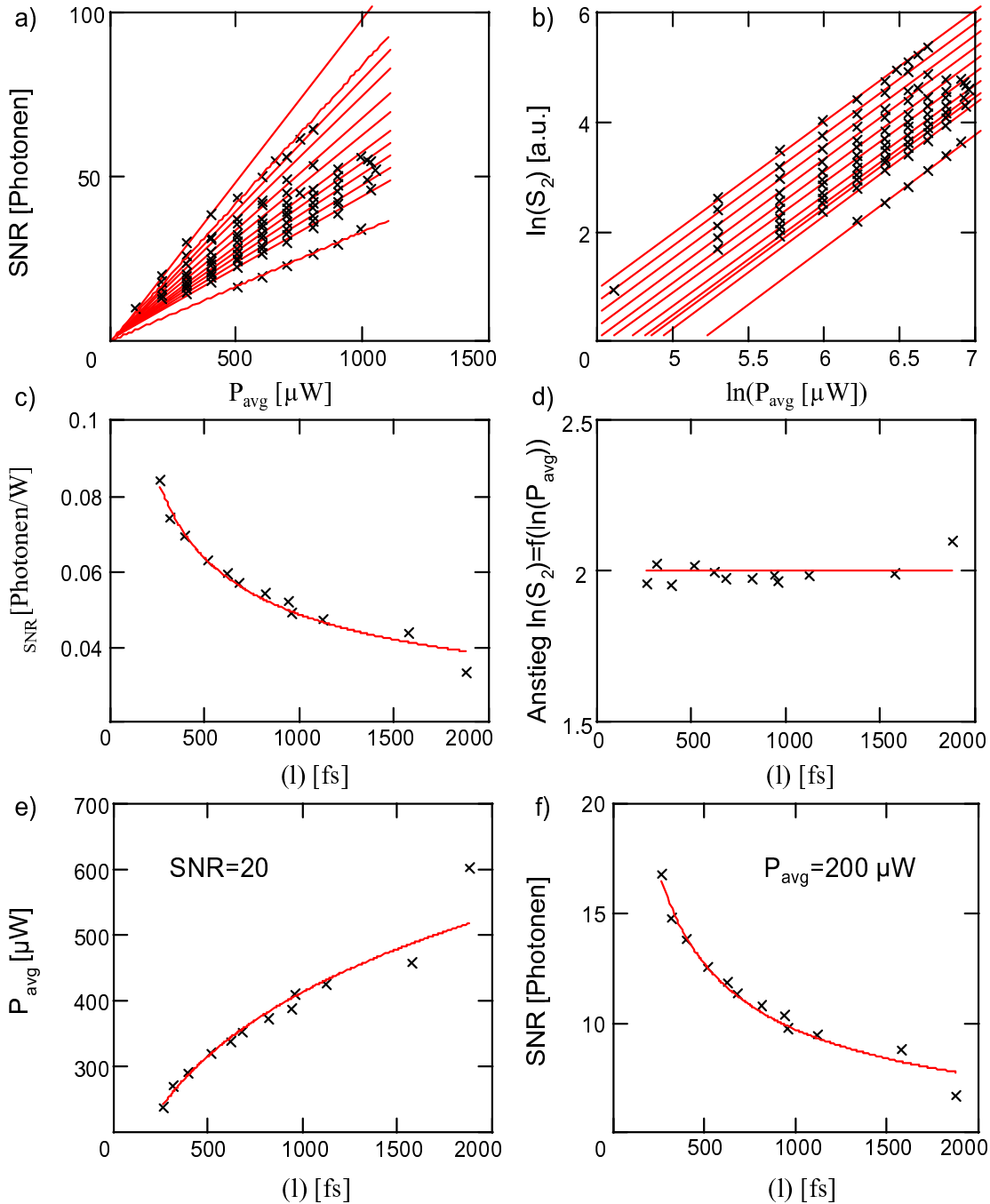


Abbildung 6.1: Gemessene und berechnete (rot gezeichnet) funktionelle Abhängigkeiten bei einer Zweiphotonen-Absorption: a)  $S_2/N_2 = f(P_{avg})$ , aufgetragen für verschiedene Pulslängen in der Probe  $\Delta\tau(l)$ ; b)  $\ln S_2 = f(\ln P_{avg})$ , aufgetragen für verschiedene Pulslängen in der Probe  $\Delta\tau(l)$ ; c) aus Abb. a) resultierende Anstiege  $\gamma_{SNR}$  als Funktion der Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$ ; d) aus Abb. b) resultierende Anstiege als Funktion der Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$ ; e) Notwendige mittlere Leistung um  $SNR = 20$  für verschiedene Pulslängen in der Probe zu erreichen; f)  $S_2/N_2 = f(\Delta\tau(l))$  für  $P_{avg} = 200 \mu$ W

Aufgezeichnet wurden das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal und das SNR. Dies geschah durch die Aufnahme eines x-y-Bildes aus dem ein Histogramm erstellt wurde. Das Histogramm sollte einer Gaußschen Glockenverteilung genügen. Aus dem Verhältnis des Signals  $S_2$  (Maximum der Glockenkurve) zur Standardabweichung der Glockenkurve  $N_2$  ergibt sich das SNR  $S_2/N_2$ .

Abb. 6.1 a) zeigt die gemessene Abhängigkeit des SNR von der mittleren Leistung für verschiedene Pulslängen in der Probe. Jeweils rot eingezeichnet sind die angefitzten theoretisch zu erwartenden Abhängigkeiten (vgl. Gl. (4.10)). In Abb. 6.1 c) sind die aus a) ermittelten Anstiege des Signal- zu Rauschverhältnisses über der Pulslänge dargestellt. Nach Anfitzen von Gl. (4.10) ergab sich  $\alpha(\sigma_2) = (0.570 \pm 0.005) \text{Photonen} \cdot \text{mW}^{-1} \cdot \text{fs}^{0.5}$ .

In Abb. 6.1 b) ist das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal doppelt logarithmisch über der mittleren Leistung für verschiedene Pulslängen aufgetragen. Abb. 6.1 d) zeigt die resultierenden Anstiege der Geraden als Funktion der Pulslänge. Als Fitfunktion diente Gl. (4.7).

Aufgrund der guten Übereinstimmung der Meßwerte mit den Kurvenverläufen der Fitfunktionen liegt im Bereich von 260 fs bis 1800 fs für die Pulslänge und im Bereich von 200  $\mu\text{W}$  bis 1100  $\mu\text{W}$  für die mittlere Leistung eine 'reine' Zweiphotonen-Absorption vor, die mit dem Modell in Abschnitt 4.1.1 beschrieben werden kann. Weiterhin kann das Photonenrauschen in diesem Bereich mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden.

Ausschlaggebend für die visuelle Qualität eines Bildes, z.B. eines Präparates, ist das SNR, das einen möglichst großen Wert annehmen sollte. Aus Abb. 6.1 f) geht hervor, daß das SNR nicht-linear mit kleiner werdender Pulslänge bei konstanter mittlerer Leistung anwächst. Somit sind für die Aufnahme von Bildern mit hoher Qualität kurze Pulslängen nötig.

Des weiteren kann durch die Verwendung von möglichst kurzen Pulsen die mittlere Leistung minimiert werden, da diese nichtlinear mit kleiner werdender Pulslänge bei konstantem SNR sinkt (Abb. 6.1 e). Eine geringe mittlere Leistung ist besonders bei der Untersuchung von Lebendpräparaten wichtig, da diese sonst die Zellen schädigen kann.

## 6.2.2 Wirkungsquerschnitte

### Vergleichsmessungen

Die Messungen erfolgten analog zu den Messungen in Abschnitt 6.2.1, jedoch jetzt bei einer konstanten Pulslänge von 200 fs in der Probe. Die Abhängigkeiten des SNR von der mittleren Leistung in der Probe für die einzelnen Farbstoffe sind in Abb. 6.2 dargestellt. Zusätzlich eingezeichnet sind die theoretisch zu erwartenden Kurvenverläufe (vgl. Tabelle 4.2). Diese Kurven geben die experimentell gefundenen Wertepaare sehr gut wieder. Unter der Verwendung des effektiven Wirkungsquerschnitts  $\Phi_2\sigma_2$  eines Farbstoffs (hier Rhodamin B in DMF) können aus den Anstiegen der Geraden  $\gamma_{SNR}(200 \text{ fs})$  die Wirkungsquerschnitte der verbleibenden Farbstoffe berechnet werden (vgl. Gl. (4.11)). Tabelle 6.1 zeigt die auf diese Weise bestimmten Wirkungsquerschnitte mit den in der Literatur gefundenen Werten. Eine gute Übereinstimmung konnte gefunden werden. In Spalte 2 ist der Anstieg des Zweiphotonen-Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der mittleren Leistung für einige Farbstoffe eingetragen. Der Anstieg 2 zeigt, daß eine Zweiphotonen-Absorption vorlag.

### Exakte Bestimmung

Entsprechend Abschnitt 4.1.1 fehlen zur exakten Bestimmung des Wirkungsquerschnitts die Absorptionslänge  $\Delta z$  und die Strahltaile  $w_0$ . Deren Bestimmung soll am Beispiel eines Farbstoffs (APSS) erfolgen.

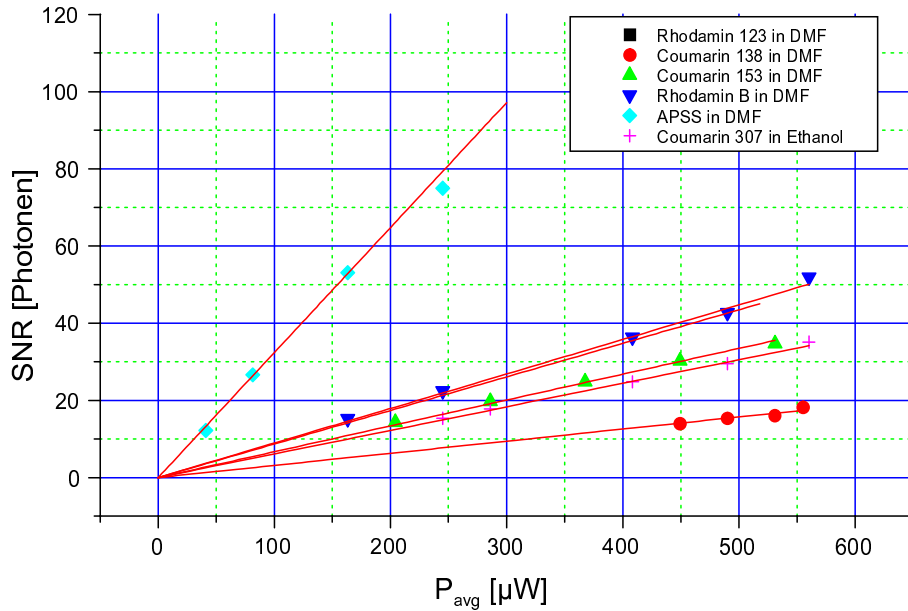


Abbildung 6.2: SNR in Abhängigkeit von der mittleren Leistung für verschiedene Farbstoffe bei konstanter Pulslänge in der Probe von  $\Delta\tau(l) = 200$  fs und einer Wellenlänge von  $\lambda = 800$  nm

Tabelle 6.1: Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte für verschiedene Farbstofflösungen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 800$  nm

Farbstoff	Konzentration [M]	Anstieg	Zweiphotonen Absorptionsquerschnitte [ $10^{-50}$ cm <sup>4</sup> s / photons]		
			gemessen	Literatur	Ref.
APSS in DMF	0.1	$1.96 \pm 0.02$	$110 \pm 6$	87.4	[40]
Rhodamin 123 in DMF	0.01		$80 \pm 5$		
Coumarin 307 in Ethanol	0.006	$2.01 \pm 0.04$	$65 \pm 4$		
Coumarin 138 in DMF	0.01		$10 \pm 1$		
Coumarin 153 in DMF	0.01		$47 \pm 2$		
Rhodamin B in DMF	0.01	$2.03 \pm 0.04$	Referenz	84	[25]

Die Absorptionslänge  $\Delta z$  wurde mit Hilfe der Aufnahme des Zweiphotonen-Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe in einen Farbstoffsee, entsprechend Abschnitt 4.1.1, bestimmt. Abb. 6.3 zeigt das aufgezeichnete Signal. Aus dem Anstieg der Kante ergibt sich die Größe des Fokus in axialer Richtung zu  $\Delta z = (1.5 \pm 0.1) \mu m$ . Die Strahltaile ist entsprechend den Messungen der Punkt-Bild-Funktion (Abschnitt 6.2.3)  $w_0 = (450 \pm 10) nm$ . Die Eintauchtiefe  $z_0$  betrug  $(2.0 \pm 0.1) \mu m$ . Der Parameter  $\alpha(\sigma_2) = (0.570 \pm 0.005) \text{Photonen} \cdot mW^{-1} \cdot fs^{0.5}$  wurde bei der Messung der funktionellen Zusammenhänge bestimmt. Mit diesen Parametern ergibt sich, entsprechend Gl. (4.23), für APSS ein Wirkungsquerschnitt von  $\Phi_2 \sigma_2 = (100 \pm 20) \cdot 10^{-50} cm^4 s$  bei einer Wellenlänge von 800 nm. Dieser Wert ist in sehr gutem Einklang mit dem im vorigen Abschnitt bestimmten Wert von  $(110 \pm 6) \cdot 10^{-50} cm^4 s$ .

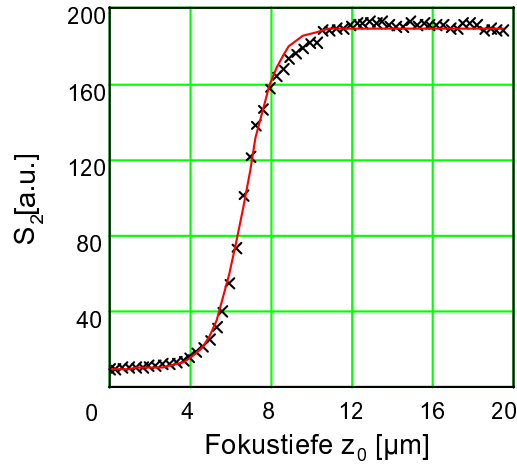


Abbildung 6.3: Abhängigkeit des Zweiphotonen-Fluoreszenzsignals beim Eintauchen des Fokus (Eintauchtiefe  $z$ ) in einen Farbstoffsee (APSS (0.1 Molar)); Objektiv: PN 40x/1.3 oil;  $\lambda = 800 \text{ nm}$ ;  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$

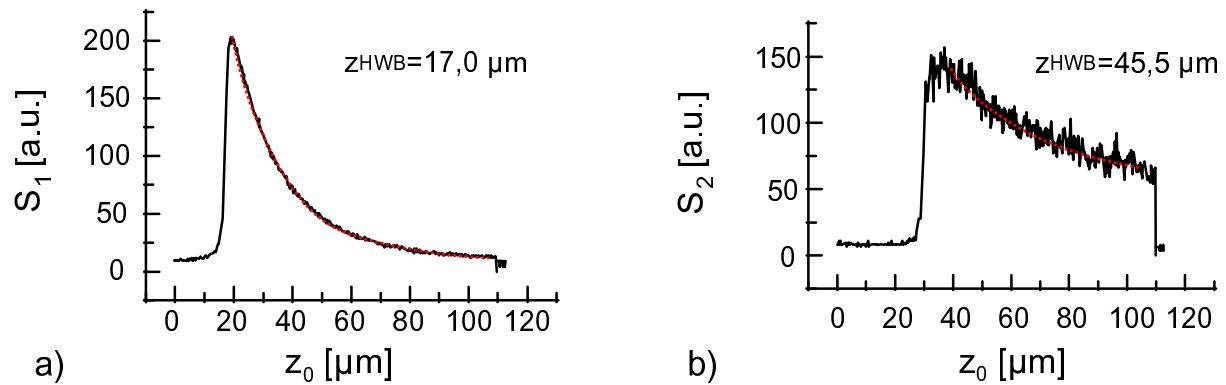


Abbildung 6.4: Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals beim Eintauchen des Fokus (Eintauchtiefe  $z$ ) in einen Farbstoffsee (Rhodamin B (0.01 Molar)): a) Einphotonen-Anregung mit HeNe-Laser (543 nm) und b) Zweiphotonen-Anregung mit 800 nm und  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ; Objektiv: PN 40x/1.3 oil

Der gleiche Versuchsaufbau wurde anschließend zur Untersuchung des Verhaltens des Fluoreszenzsignals beim Eindringen in einen Farbstoffsee verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff diente diesmal Rhodamin B (0.01 Molar). Abb. 6.4 zeigt die Abhängigkeit zum einen bei einer Einphotonen-Anregung mit 543 nm und zum anderen bei einer Zweiphotonen-Anregung mit 800 nm. Bei der Anregung mit 543 nm ist ein stärkerer Abfall (Halbwertstiefe:  $17 \mu\text{m}$ ) als bei der Anregung mit 800 nm (Halbwertstiefe:  $45.5 \mu\text{m}$ ) zu erkennen. Dies verdeutlicht die geringe Absorption der Anregungsstrahlung bei 800 nm. Dadurch können mit Hilfe der Zweiphotonen-Anregung wesentlich dickere Präparate untersucht werden. Die Eindringtiefe wird beschränkt durch die Absorption der Fluoreszenz und durch Aberrationen. Aberrationen entstehen durch Brechzahlunterschiede zwischen der Immersion und dem Präparat, wodurch es zu Abweichungen vom optimalen Fokus kommt.

### 6.2.3 Punkt-Bild-Funktion (PSF)

Das Verfahren zur Aufnahme der PSF wurde in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Als Punktobjekte wurden Fluoreszenzkügelchen mit einem Durchmesser von 175 nm (Point Source Kit (505/515); Molecular Probes), die entsprechend der beiliegenden Anleitung präpariert wurden, verwendet. Als Objektiv wurde das C-Apochromat 40x/1.2 W verwendet, da es sich bei diesem um ein speziell für die Anwendung in der konfokalen Mikroskopie entwickeltes Objektiv handelt.

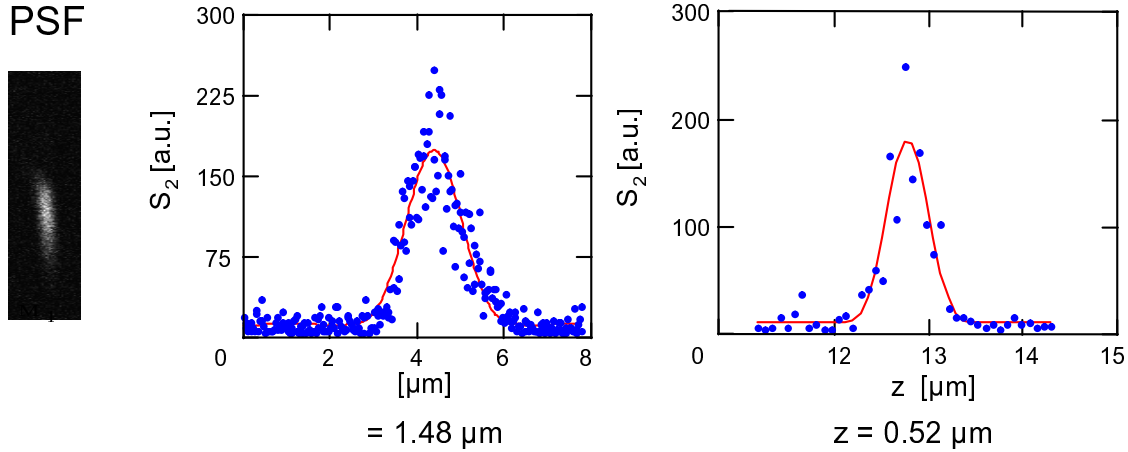


Abbildung 6.5: Point Spread Function einer 175 nm Kugel, aufgenommen mit dem C-Apochromat 40x/1.2 W bei einer Pulslänge von  $\Delta\tau(l) = 200$  fs und einer Wellenlänge von  $\lambda = 800$  nm

In Abb. 6.5 ist eine aufgenommene PSF dargestellt. Die Pulslänge in der Probe und die Wellenlänge betragen  $(200 \pm 5)$  fs bzw. 800 nm. Die Auswertung der PSF für die Zweiphotonen-Anregung ergab eine laterale FWHM von  $(520 \pm 10)$  nm und eine axiale FWHM von  $(1.48 \pm 0.01)$   $\mu\text{m}$ . Die axiale Breite stimmt mit der Messung in einem Fluoreszenzsee überein. Mit Hilfe von Gl. (4.16) oder Gl. (4.21) ergibt sich eine effektive Strahltaile von  $w_0 = (450 \pm 10)$  nm. Mit Gl. (4.5) folgt hieraus ein effektiver Pupillendurchmesser von 5.8 mm. Da die Randstrahlen besonders zur beugungsbegrenzten Abbildung beitragen, hängt die Größe der Strahltaile stark vom Ausleuchtungsprofil der Objektivpupille ab. Theoretisch ergibt sich mit Gl. (4.5) bei Annahme einer gleichmäßigen Ausleuchtung der Pupille (9.5 mm) eine Strahltaile von  $w_0 = 215$  nm im Fokus des Objektivs. Die starke Abweichung vom gemessenen Wert ist deshalb durch die Ausleuchtung der Objektivpupille mit einem Gaußprofil zu erklären. Zur Erhöhung des Auflösungsvermögens müßte der Strahl vor dem Eintritt in die Objektivpupille noch stärker aufgeweitet werden (etwa Faktor 2). Dies würde jedoch speziell bei Objektiven mit einer hohen Vergrößerung zu starken Energieverlusten durch eine Überstrahlung der Objektivpupille führen.

Bei Verwendung des Argon-Lasers (488 nm) und einer extrem kleinen konfokalen Blende (Pinhole 0.6  $\mu\text{m}$ ) ergab sich im Einphotonenbetrieb eine laterale Auflösung von  $(250 \pm 10)$  nm und eine axiale Auflösung von  $(650 \pm 10)$  nm. Die laterale und die axiale Auflösung ist im Einklang mit der mit Gl. (4.19) theoretisch erwarteten lateralen Auflösung von 218 nm und axialen Auflösung von 600 nm.

Die Auflösung des Zweiphotonen-LSM ist unter den oben genannten Bedingungen um einen Faktor 2 schlechter als die des konfokalen LSM. In vielen Fällen bei der Untersuchung von schwach fluoreszierenden Präparaten kann die konfokale Blende jedoch nicht so weit geschlossen werden, da sich das SNR zu stark verschlechtern würde. Somit kann die Auflösung im Zweiphotonen-LSM

bei extrem schwachen Fluoreszenzsignalen sogar besser als die im konfokalen Einphotonen-LSM werden, wenn der Blendendurchmesser größer als  $1.2 \mu\text{m}$  ist (vgl. Abb. 4.6 auf Seite 35).

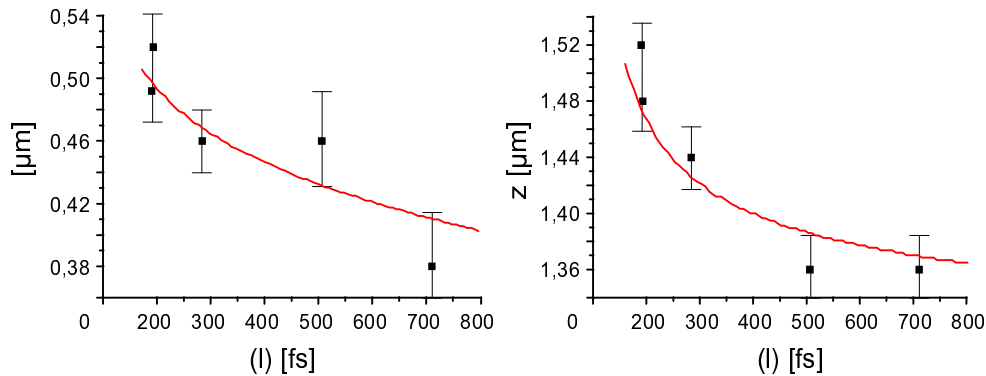


Abbildung 6.6: Gemessene und mit den Gl. (4.17) bzw. (4.18) berechnete Abhängigkeit der lateralen  $\Delta\rho$  und der axialen Fokausdehnung  $\Delta z$  von der Pulslänge in der Probe  $\Delta\tau(l)$  bei gleichbleibender mittlerer Leistung von  $P_{avg} = 1 \text{ mW}$ ; Objektiv: C-Apo 40x/1.2 W

In einem weiteren Experiment wurde die Pulslänge im Bereich von 190 fs bis 700 fs variiert. Die Abhängigkeit der lateralen und der axialen Auflösung von der Pulslänge bei konstanter mittlerer Leistung und bei einer konstanten Detektionsschwelle (Einstellung des PMT) ist in Abb. 6.6 dargestellt. Man erkennt in beiden Diagrammen eine Verringerung der Auflösung mit kleiner werdender Pulslänge.

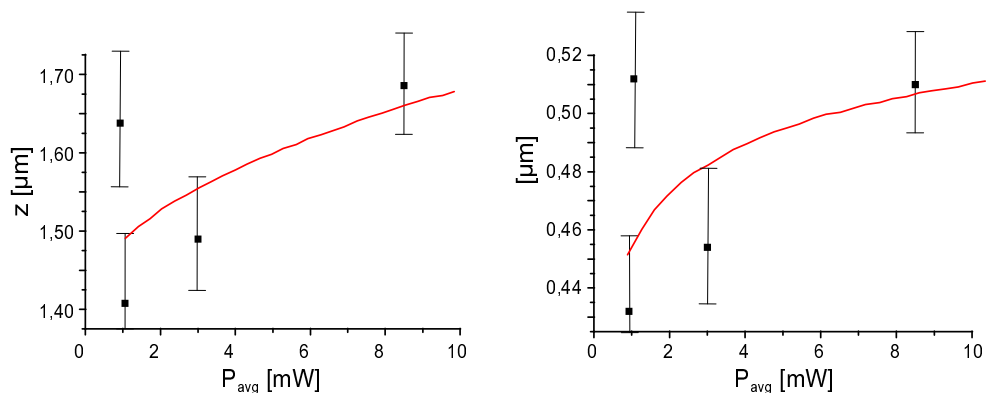


Abbildung 6.7: Gemessene und mit Gl. (4.17) bzw. (4.18) berechnete Abhängigkeit der lateralen  $\Delta\rho$  und der axialen Fokausdehnung  $\Delta z$  von der mittleren Leistung  $P_{avg}$  bei gleichbleibender Pulslänge in der Probe von  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ; Objektiv: C-Apo 40x/1.2 W

Abb. 6.7 zeigt die Abhängigkeiten der axialen und der lateralen Auflösung von der mittleren Leistung bei gleichbleibender Pulslänge von 200 fs und bei einer konstanten Detektionsschwelle. Mit größer werdender mittlerer Leistung nimmt das Fokusvolumen zu.

Die Tendenzen der funktionellen Abhängigkeiten des Auflösungsvermögens von der Pulslänge bzw. von der mittleren Leistung sind in beiden Messungen im Einklang mit den in Abschnitt 4.1.6 berechneten Kurven. Das minimale Fokusvolumen ergibt sich für Pulsintensitäten nahe der Detektionsschwelle. Die Detektionsschwelle wurde durch die Einstellung der Verstärkung des

PMT auf die minimal eingesetzte mittlere Leistung bzw. die maximal verwendete Pulslänge abgeglichen. Die große Streuung der Meßwerte entsteht durch die starke Abnahme des SNR bei der Verringerung der mittleren Leistung bzw. der Vergrößerung der Pulslänge. Der Einsatz von Lock-In Techniken wäre bei einer erneuten Messung der Abhängigkeiten angebracht.

### 6.3 Ergebnis

Mit dem verwendeten Versuchsaufbau ist eine Zweiphotonen-Anregung und eine Bestimmung der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte möglich. Ein Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal ist mit einer Anregungswellenlänge von 800 nm in verschiedenen, in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Farbstoffen detektierbar. Die Auflösung im Zweiphotonen-LSM ist besser als 520 nm in lateraler und 1.48  $\mu\text{m}$  in axialer Richtung. Für die Aufnahme von Zweiphotonenbildern mit hoher Qualität ist eine kurze Pulslänge notwendig, um ein möglichst hohes SNR zu erzielen.

# Kapitel 7

## Anwendungsbeispiele des LSM mit fs-Laser

In Abschnitt 2.2 wurden mehrere Vorteile des Zweiphotonen-LSM gegenüber dem konfokalen Einphotonen-LSM aufgeführt. Diese Vorteile wurden schon im Abschnitt 6 anhand von Messungen in Farbstoffküvetten überprüft und sollen im ersten Teil dieses Kapitels noch bei der Untersuchung von biologischen Präparaten mit dem optimierten LSM nachgewiesen werden. Der zweite Teil des Kapitels beschäftigt sich mit der Anwendung des optimierten Mikroskops zur Detektion von Materialeigenschaften und von Fehlstrukturen in integrierten Schaltkreisen.

### 7.1 Untersuchung biologischer Präparate

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 5.5 auf Seite 44 dargestellt. Für die Messungen wurden beide Lasersysteme verwendet, wobei wahlweise der Faserlaser direkt und der 'Mira 900F' mit der 2 m langen Glasfaser in das LSM gekoppelt wurde.

Die Vorteile des Zweiphotonen-LSM werden im folgenden noch einmal aufgelistet.

1. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt bei der Zweiphotonen-Absorption aufgrund der notwendigen hohen Intensitäten nur im Fokus des Objektivs. Die Zweiphotonen-Mikroskopie ist dadurch ohne konfokale Blende tiefendiskriminiert.

Abb. 7.1 a) zeigt optische Schnitte durch einen Maiglöckchenstengel (*Convalaria Stem*). Die Gesamtdicke des Präparates betrug  $40 \mu\text{m}$ . Gemessen wurde die Eigenfluoreszenz des Präparates. Zur Detektion wurde das PlanNeofluar 40x/1.3 oil Objektiv verwendet. Das Scanfeld betrug  $107 \times 107 \mu\text{m}^2$ .

Bei der Verwendung eines Einphotonen-LSM ohne konfokale Blende würde der Betrachter das große Hintergrundbild sehen. Durch die Fluoreszenzlichtanteile außerhalb der Fokusebene gehen die Tiefeninformationen verloren. Erst durch den Einsatz einer konfokalen Blende (Durchmesser:  $0.8 \mu\text{m}$ ) (Teilbild 1) können diese Anteile unterdrückt und optische Schnitte aufgezeichnet werden. Im Teilbild 2 ist das Signal zu sehen, das sich bei Zweiphotonen-Anregung ergibt. Die konfokale Blende wurde bei dieser Messung geöffnet. Es wird deutlich, daß die optische Schnittdicke in der Zweiphotonen-Mikroskopie mit der der konfokalen Mikroskopie vergleichbar ist. Diese Aussage wird zusätzlich durch die Messungen an Fluoreszenzkugeln in Abschnitt 6.2.3 gestützt. Da in vielen Fällen bei der Untersuchung von schwach fluoreszierenden Präparaten die konfokale Blende nicht weiter geschlossen werden kann, weil sich das SNR zu stark verschlechtern würde, kann die Auflösung beim Zweiphotonen-LSM sogar besser als beim konfokalen Einphotonen-LSM



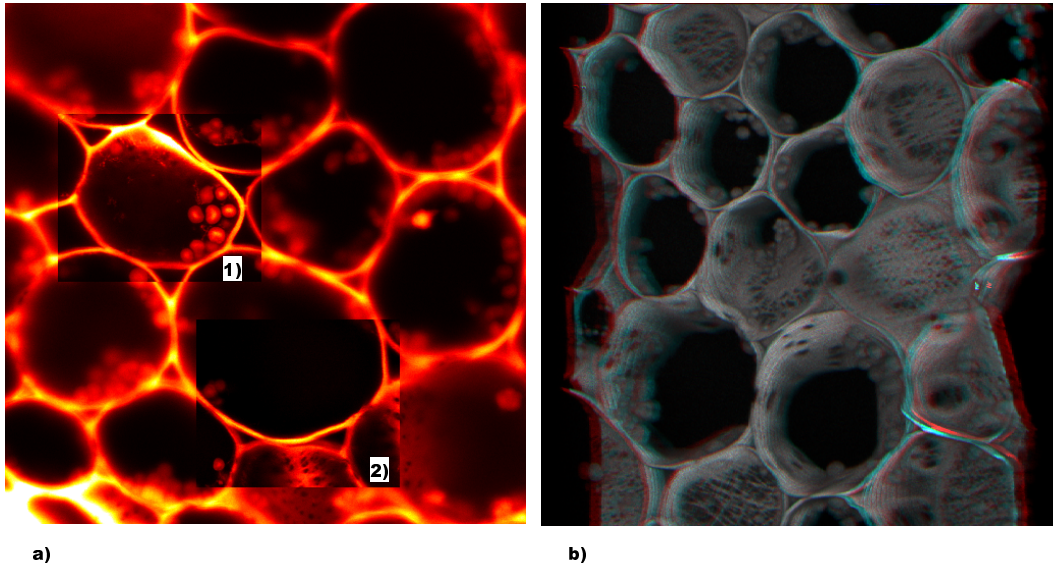


Abbildung 7.1: Tiefendiskriminierung a) optische Schnitte: Einphotonen-Anregung ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ ) ohne konfokale Blende (großes Bild), Einphotonen-Anregung mit konfokaler Blende ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ , Blendendurchmesser =  $0.8 \mu\text{m}$ ) (Teilbild 1), Zweiphotonen-Anregung ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ,  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ) ohne konfokale Blende (Teilbild 2); b) aus 57 optischen Schnitten berechnetes Stereobild aufgenommen mit einer Zweiphotonen-Anregung ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ,  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ); Objekt: Maiglöckchenstengel (Dicke  $30 \mu\text{m}$ ); Scanfeld:  $107 \times 107 \mu\text{m}^2$

werden.

Zur Anregung der Zweiphotonen-Absorption reichte eine mittlere Leistung von nur  $200 \mu\text{W}$  bei einer Pulslänge von  $200 \text{ fs}$  und einer Wellenlänge von  $780 \text{ nm}$  aus. Abb. 7.1 b) zeigt ein Stereobild des gleichen Präparates, das aus 57 optischen Schnitten berechnet wurde.

2. Strahlungsschäden werden bei der Zweiphotonen-Anregung durch den Einsatz von nahinfraroter und gepulster Laserstrahlung gering gehalten, da die Absorption des meist wässrigen Gewebes im Wellenlängenbereich von  $700 - 1400 \text{ nm}$  minimal ist. Die Anregung von speziellen UV-Farbstoffen ist ebenfalls möglich.
3. Bleicheffekte können bei der Zweiphotonen-Anregung minimiert werden, da eine Absorption und damit ein Ausbleichen nur im Fokus erfolgt.

Abb. 7.2 zeigt die 3-dimensionale Projektion von DAPI gefärbten Chromosomen in PtK2-Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der Zellteilung befinden. Die Projektion wurde aus 25 optischen Schnitten gewonnen. Zur Detektion wurde das PlanNeofluar 40x/1.3 oil Objektiv verwendet, wobei das Scanfeld  $107 \times 107 \mu\text{m}^2$  betrug. Die mittlere Leistung und die Pulslänge in der Probe waren  $1 \text{ mW}$  bzw.  $200 \text{ fs}$ . DAPI ist ein spezieller Farbstoff, der sich nur in den Chromosomen anlagert und im Einphotonenfall nur mit UV-Strahlung ( $364/351 \text{ nm}$ ) angeregt werden kann. Eine Untersuchung mit UV-Strahlung führt jedoch zu einem starken Ausbleichen und zu einer schnellen Zerstörung der Zellen [6, 7]. Bei Verwendung der Zweiphotonen-Anregung konnte auch nach einer Scanzeit von länger als  $30 \text{ min}$  kein Ausbleichen bzw. keine Zerstörung der Zellen festgestellt werden. Dies zeigt klar den Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie bei der Untersuchung von Lebendpräparaten.

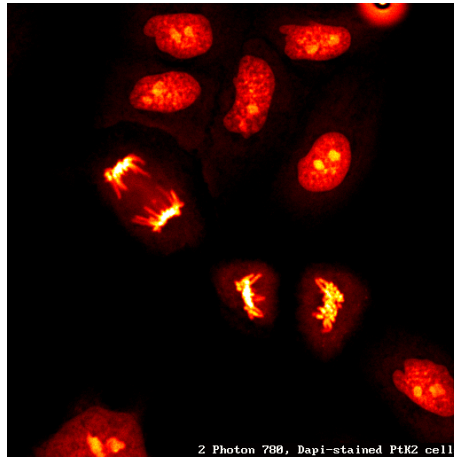


Abbildung 7.2: Möglichkeit der Anregung von UV-Farbstoffen mittels Zweiphotonen-Absorption ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ,  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ); Objekt: Zellteilung von PtK2-Zellen mit DAPI gefärbt; Scanfeld:  $107 \times 107 \mu\text{m}^2$

4. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Eindringtiefen von nahinfraroter Strahlung wesentlich größer sind als z.B. von UV-Strahlung.

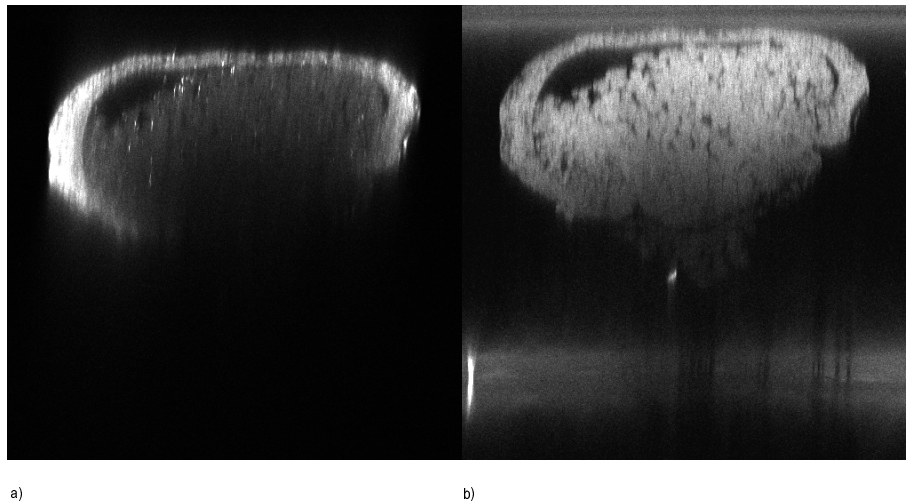


Abbildung 7.3: Vergleich der Eindringtiefen a) bei Einphotonen-Anregung mit konfokaler Blende ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ , Blendendurchmesser =  $10 \mu\text{m}$ ); b) bei Zweiphotonen-Anregung ohne konfokale Blende; Objekt: Froschei; Scanfeld:  $1.28 \times 1.28 \text{ mm}$

In Abb. 7.3 ist ein optischer x-z-Schnitt (Tiefenprofil) durch ein Froschei auf der linken Seite mit konfokaler Einphotonen-Anregung ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ , Blendendurchmesser =  $10 \mu\text{m}$ ) und auf der rechten Seite mit Zweiphotonen-Anregung ( $800 \text{ nm}$ ) dargestellt. Die Skalierung und die Position des x-z-Schnittes der beiden Bilder sind identisch. Das Scanfeld betrug  $1.28 \times 1.28 \text{ mm}$ , wobei ein Objektiv PlanNeofluar 10x/0.3 verwendet wurde. Bei der konfokalen Mikroskopie ( $543 \text{ nm}$ ) beträgt die Eindringtiefe in das Gewebe ca.  $80 \mu\text{m}$ . Informationen aus tiefer liegenden Gewebeschichten gehen bei dieser Art der Anregung

verloren. Wird jedoch die Zweiphotonenmikroskopie verwendet, kann das gesamte Frotschei durchdrungen werden, und man erhält in diesem Fall noch ein Signal in einer Tiefe von  $700 \mu\text{m}$ .

Diese hohen Eindringtiefen der nahinfraroten Strahlung konnten auch bei der Untersuchung von Farbstoffküvetten nachgewiesen werden. Hierbei ergab sich bei einer Anregung mit  $543 \text{ nm}$  eine Halbwertstiefe von  $17 \mu\text{m}$  und bei  $800 \text{ nm}$  eine Halbwertstiefe von  $45.5 \mu\text{m}$ .

5. In einem Zweiphotonen-Mikroskop können mit Hilfe einer Anregungswellenlänge mehrere Farbstoffe simultan angeregt werden. Die Emissionspektren gleichen denen des Einphotonenfalles.

Alle Messungen wurden bei einer Wellenlänge von  $800 \text{ nm}$  durchgeführt. Mit dieser Wellenlänge konnte eine Vielzahl von Farbstoffen mit einer Zweiphotonen-Absorption angeregt werden, die im folgenden aufgelistet wird.

In Küvetten wurden verwendet: Rhodamin 123 Hydrat in DMF ( $0.01 \text{ M}$ ), Rhodamin B in DMF ( $0.01 \text{ M}$ ), Coumarin 138 in DMF ( $0.01 \text{ M}$ ), Coumarin 153 in DMF ( $0.01 \text{ M}$ ), Coumarin 307 in Ethanol ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) und APSS in DMF ( $0.1 \text{ M}$ ). Die Wirkungsquerschnitte dieser Farbstoffe wurden in Abschnitt 6 vermessen.

In biologischen Präparaten konnten folgende Farbstoffe angeregt werden: DAPI, Rhodamin B, Höchst, Lucifer Yellow, FITC, Biocytin, Cy 3, NADH (Eigenfluoreszenz)

## 7.2 Untersuchung von Festkörper- bzw. Halbleitermaterialien

Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 5.5 auf Seite 44. Zur Messung des OBIC- bzw. des TOBIC-Signals wurde der mit 4 bezeichnete Detektor (OBIC-Adapter, Fa.: Carl Zeiss Jena GmbH) verwendet. Sämtliche Messungen erfolgten mit dem Coherent 'Mira 900 F' bei einer Wellenlänge von  $800 \text{ nm}$ .

Zur Aufnahme der Zweiten Harmonischen diente der erste Kanal des Mikroskops. Da das SH-Signal genau die halbe Wellenlänge der Grundwelle besitzt (also  $400 \text{ nm}$ ), wurden zum Blocken des Anregungslichtes  $8 \text{ mm BG 39}$  Filter anstelle der SWP 685 als Emissionsfilter (EF) verwendet. Das Unterdrückungsverhältnis der Oberwelle  $S_{2\omega}$  zur Grundwelle  $S_{\omega}$  ist:

$$\frac{S_{2\omega}}{S_{\omega}} \approx \frac{0.95^8}{0.001^8} = 6 \cdot 10^{23}$$

Die Effizienz der SH-Erzeugung beträgt etwa  $10^{-11}$  für die Erzeugung an der Oberfläche und etwa  $10^{-9}$  für die Erzeugung im Volumen. Mit dem o.g. Unterdrückungsverhältnis kann man deshalb davon ausgehen, daß nur ein SH-Signal und keine Anregungsstrahlung detektiert wird.

### 7.2.1 Optical Beam Induced Current (OBIC)

In einem ersten Experiment wurde überprüft, ob und in welchem Bereich ein TOBIC-Signal erzeugt werden kann. Dazu wurde der in einem p-n-Übergang erzeugte Ladungsträgerstrom in Abhängigkeit von der eingestrahnten mittleren Leistung bei konstanter Pulslänge in der Probe von  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$  aufgezeichnet.

Der gemessene Kurvenverlauf ist in Abb. 7.4 a) auf der nächsten Seite doppeltlogarithmisch dargestellt. Die Wellenlänge betrug hier  $800 \text{ nm}$ . Zur Beleuchtung wurde das PN 40x/0.75 Objektiv verwendet. Bei einem reinen (T)OBIC-Signal müßte sich eine Gerade mit dem Anstieg 2 ergeben. Gemessen wurde jedoch im unteren Bereich ein Anstieg von  $(1.07 \pm 0.09)$  und im oberen Bereich (ab  $56 \mu\text{W}$ ) ein Anstieg von  $(1.66 \pm 0.05)$ . Da die Bandkante von Silizium bei

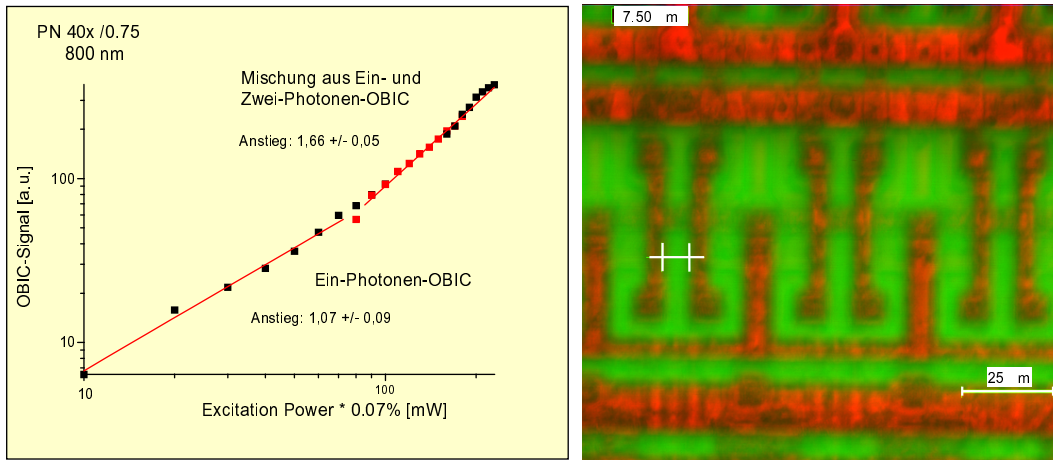


Abbildung 7.4: a) (T)OBIC-Signal in Abhängigkeit von der mittleren Leistung; b) Überlagerung des detektierten (T)OBIC-Signals (grün) mit dem Reflexionssignal (rot) bei einer mittleren Anregungsleistung von  $77 \mu\text{W}$ ; ( $\lambda = 800\text{nm}$ ,  $\Delta\tau(l) = 200\text{fs}$ ); Objekt: Integrierter Schaltkreis

rund  $1100 \text{ nm}$  liegt, findet im unteren Bereich bis  $56 \mu\text{W}$  eine Einphotonen-Absorption und im oberen Bereich eine Mischung aus einer Ein- und einer Zweiphotonen-Absorption statt. Bei einer Mischung ergibt sich theoretisch ein Anstieg von  $\approx 1.61$ , denn das OBIC-Signal ergibt sich hier näherungsweise aus:

$$S \sim \alpha_1 F_0 + \alpha_2 F_0^2 \approx \alpha F_0^{1.61} \quad \text{für } \alpha \approx \alpha_1 \approx \alpha_2$$

Die maximale mittlere Leistung war durch den dynamischen Bereich des Verstärkers zur Detektion des Ladungsträgerstroms begrenzt. Alle weiteren Messungen wurden oberhalb von  $56 \mu\text{W}$  durchgeführt.

Abb. 7.4 b) zeigt die Überlagerung des Reflexionssignals (rot) mit dem (T)OBIC-Signal (grün). Im reflektierten Licht erkennt man die Leitungsbahnen des integrierten Schaltkreises. Das (T)OBIC-Signal gibt die Stellen wieder, an denen sich ein p-n-Übergang befindet.

In Abb. 7.5 auf der nächsten Seite sind zwei x-z-Scans dargestellt, wobei jeweils das OBIC bzw. das (T)OBIC-Signal detektiert wurde. Helle Strukturen verkörpern Stellen mit einem hohen induzierten Ladungsträgerstrom. In a) wurde zur Beleuchtung ein HeNe Laser  $543 \text{ nm}$  verwendet. Eine Tiefeninformation ist nur schwer erkennbar. In b) wurde die Aufnahme wiederholt, jedoch diesmal mit dem 'Mira 900F' bei einer Wellenlänge von  $800 \text{ nm}$ . Man erkennt in diesem Fall einzelne Strukturen, die jedoch verwischt sind. Die Ursache für die Verwischung der Strukturen ist die gleichzeitig auftretende Einphotonen- und Zweiphotonen-Absorption. Es sind jedoch wesentlich mehr Strukturen sichtbar. Dies zeigt klar die Möglichkeiten des TOBIC-Verfahrens. Abb. 7.5 c) zeigt schematisch einen möglichen Aufbau des Schaltkreises. 1) und 3) bezeichnen jeweils Gebiete, die p- bzw. n-dotiert sind (oder umgekehrt). An der Grenzfläche zwischen beiden Gebieten (Rekombinationszone) findet die Erzeugung eines Ladungsträgerstroms statt (rot eingezeichnet).

Da das TOBIC-Verfahren auf einem nichtlinearen Effekt 2. Ordnung beruht, kann es zur Detektion der Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung, entsprechend Abschnitt 3.3 [41], eingesetzt werden. Man ist hiermit unabhängig von den Eigenschaften (Konzentration, Sättigungsverhalten, Bleichverhalten) des sonst verwendeten Farbstoffs.

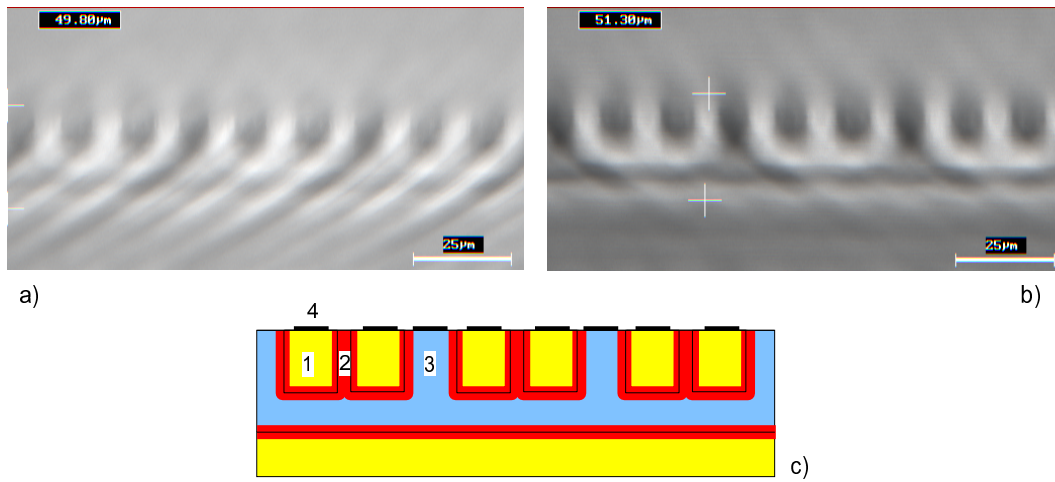


Abbildung 7.5: Tiefenprofil ( $x$ - $z$ -Scan) in einem integrierten Schaltkreis: a) Einphotonen-Absorption (OBIC), erzeugt mit einem HeNe-Laser  $\lambda = 543 \text{ nm}$ ; b) Mischung aus Einphotonen- und Zweiphotonen-Absorption ((T)OBIC) bei einer mittleren Anregungsleistung von  $77 \mu\text{W}$  ( $\lambda = 800 \text{ nm}$  und  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ); c) mögliches schematisches Tiefenprofil: 1) Gebiet 1 (gelb gezeichnet) p- oder n-dotiert, 2) Bereich des p-n-Übergangs in dem (T)OBIC-Signal detektiert wird (rot gezeichnet), 3) Gebiet 2 (blau gezeichnet) n- oder p-dotiert, 4) Kontaktierungen

## 7.2.2 Erzeugung der Zweiten Harmonischen

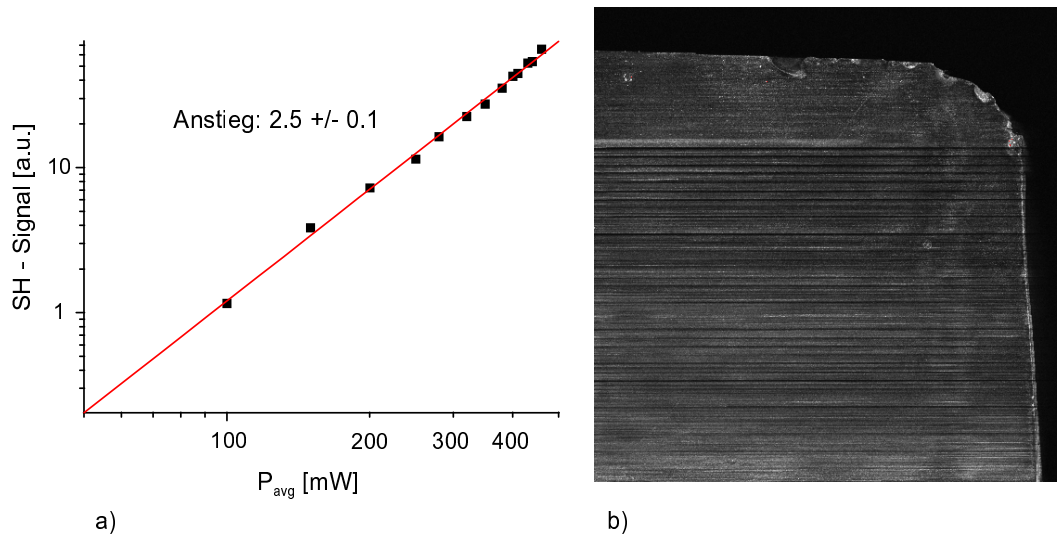


Abbildung 7.6: a) SH-Signal in Abhängigkeit von der mittleren Leistung; b) SH-Signal; Objekt: Cadmiumtellurid, aufgedampft auf Zinkselenid detektiert mit PlanNeofluar 10x/0.3; ( $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ ;  $\lambda = 800 \text{ nm}$ )

Abb. 7.6 a) zeigt das mit einem PlanNeofluar 10x/0.3 detektierte SH-Signal von Cadmium Tellurid auf Zinkselenid in Abhängigkeit von der mittleren Leistung in doppelt logarithmischem Maßstab. Der gemessene Anstieg von  $(2.6 \pm 0.04)$  legt eine Erzeugung der SH nahe. Der Kristall

weist keine Inversionssymmetrie auf. Somit werden das Volumen- und das Oberflächen-SH-Signal gleichzeitig detektiert.

Abb. 7.6 b) zeigt das gemessene SH-Signal. Für einen idealen Kristall sollte sich ein homogenes Signal ergeben. Das Scanfeld der Messung betrug  $1.3 \times 1.3 \text{ mm}^2$ . Bei der Messung des SH-Signals wurde probeweise ein Polarisator vor den Detektor geschaltet. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit des Signals von der Polarisation festgestellt werden.

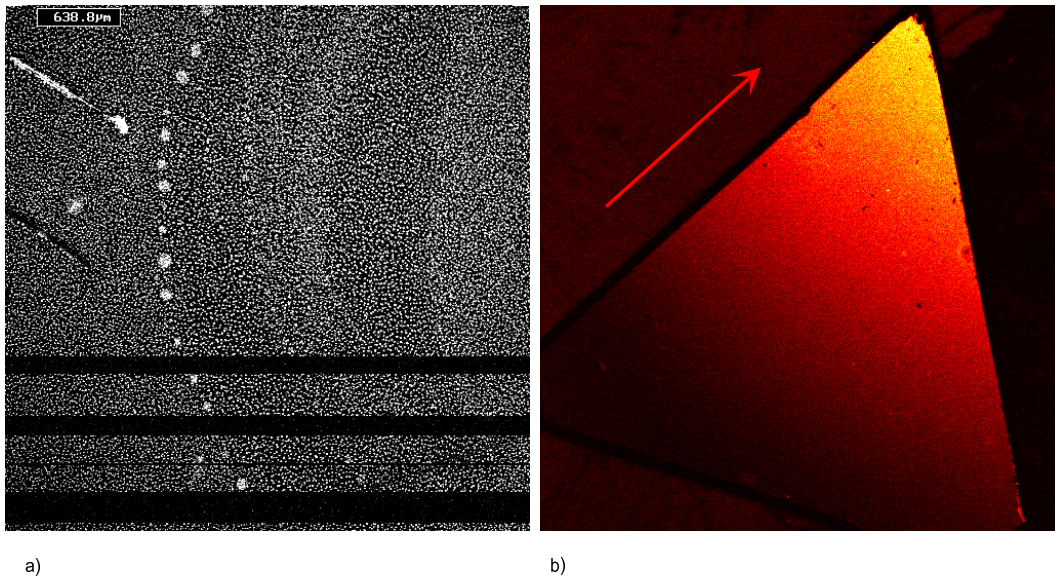


Abbildung 7.7: a) SH-Signal von SiC (UE 5-3); Scanfeld:  $0.6 \times 0.6 \text{ mm}^2$ ; b) SH-Signal von AlN, aufgedampft auf Si (111) mit unterschiedlicher Dicke (Schichtdickengradient siehe Pfeil); Scanfeld:  $5.1 \times 5.1 \text{ mm}^2$  [Pulsparameter in beiden Fällen:  $(\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}; \lambda = 800 \text{ nm})$ ]

In Abb. 7.7 sind die SH-Signale von SiC und AlNSi (111) dargestellt. Beide Kristalle besitzen keine Inversionssymmetrie. Deshalb wurde in beiden Fällen das Volumen- und das Oberflächen-SH-Signal detektiert. Die hellen Punkte in a) verkörpern Stellen mit einem starken SH-Signal (vermutlich Fehlstellen im Kristall). Für die Erzeugung des SH-Signals sind hohe Spitzenleistungen notwendig. Durch den Rückreflex von der Oberfläche des Kristalls kann der Pulsbetrieb des Lasers bei hochreflektierenden Proben gestört werden. Dadurch geht der Laser in den cw-Betrieb über, und es wird kein SH-Signal mehr erzeugt (schwarze Streifen im Bild). Das Scanfeld mit einem PlanNeofluar 20x/0.5 betrug  $0.6 \times 0.6 \text{ mm}^2$ .

Bei der Herstellung der Probe in b) wurde auf Si(111) eine unterschiedlich starke Schicht von Aluminiumnitrid (AlN) aufgedampft. Der Schichtdickengradient zeigt in die obere Spitze des Dreiecks (Pfeil). Da die Wechselwirkungslänge mit steigender Schichtdicke zunimmt, steigt das Volumen-SH-Signal entlang des Schichtdickengradienten an. Das Scanfeld betrug bei Verwendung des PlanNeofluar 2.5x/0.075:  $5.1 \times 5.1 \text{ mm}^2$ .

Abb. 7.8 zeigt das SH-Signal (rot gezeichnet) und das zugehörige Reflexionssignal (grün gezeichnet) von GaAs. Es wird das Volumen- und das Oberflächen-SH-Signal detektiert, da der Kristall keine Inversionssymmetrie aufweist. Das Scanfeld betrug  $320 \times 320 \mu\text{m}^2$  mit einem PlanNeofluar 5x/0.15. Am oberen Rand der Probe ist das Kontrastverhältnis invertiert, d.h. an Stellen geringer Reflektivität wird das meiste SH-Signal erzeugt. In der Mitte des Bildes (rot eingekreist) sind einige helle Punkte zu sehen. Im Reflexionsbild sind diese nicht meßbar. Bei ihnen könnte es sich um Fehler in der Kristallstruktur handeln. Ein Vergleich der Stelle mit an-

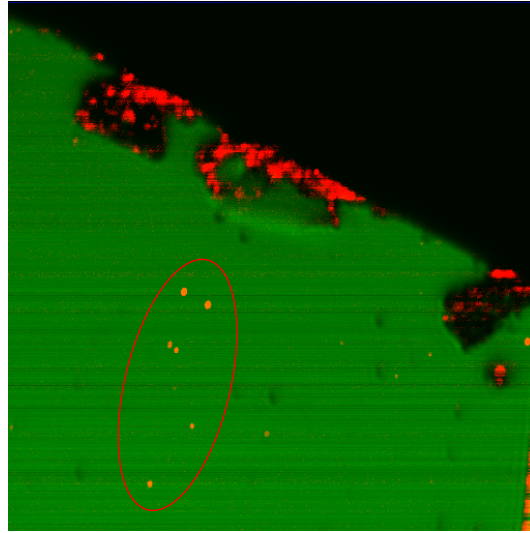


Abbildung 7.8: Überlagerung des SH-Signals (rot – gezeichnet) und des Reflexionssignals (grün – gezeichnet) in Gallium Arsenid (GaAs); Scanfeld:  $320 \times 320 \mu\text{m}^2$  [Pulsparameter:  $(\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}; \lambda = 800 \text{ nm})$ ]

deren Meßverfahren zur Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften (Röntgenbeugung) war nicht möglich. Messungen an SiC [33] zeigten eine Korrelation zwischen beiden Meßverfahren.

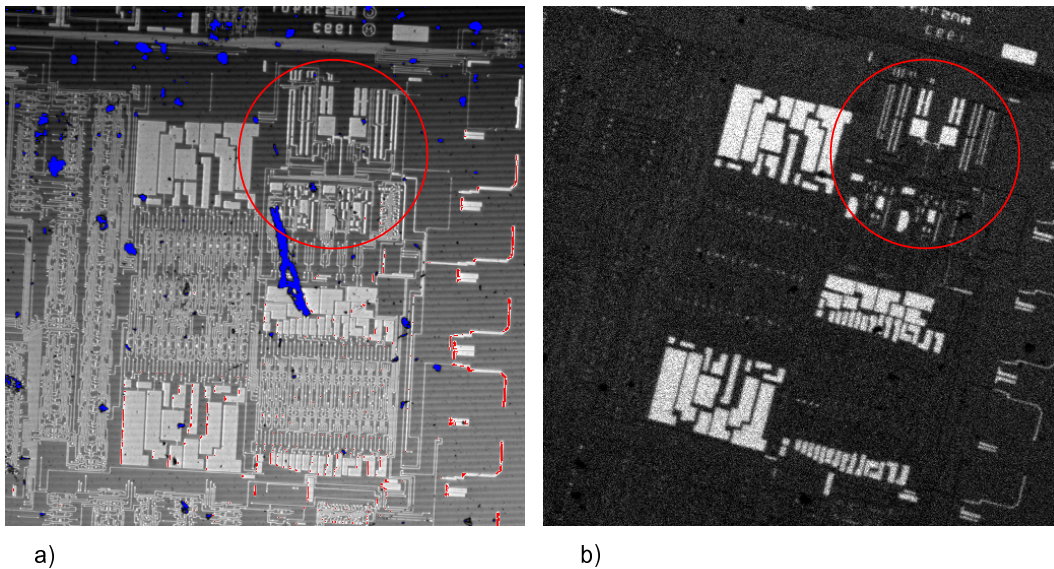


Abbildung 7.9: Integrierter Schaltkreis: a) Reflexionssignal, gemessen mit einem HeNe-Laser bei  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ; b) SH-Signal; Pulsparameter:  $(\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}; \lambda = 800 \text{ nm})$ ; Scanfeld in beiden Fällen:  $2.2 \times 2.2 \text{ mm}^2$

In Abb. 7.9 a) ist das Reflexionsbild eines integrierten Schaltkreises mit einem HeNe-Laser (633 nm) aufgenommen worden. Teilbild b) zeigt das zugehörige Oberflächen-SH-Signal, das mit dem Femtosekundenlaser mit den Pulsparametern  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$  und  $\lambda = 800 \text{ nm}$  detek-

tiert wurde. In b) sind nur ausgewählte Strukturen (wahrscheinlich dotierte Gebiete) sichtbar. An einzelnen Stellen tauchen im SH-Bild unterschiedliche Kontraste (rot eingekreist) auf, die im Reflexionsbild nicht unterscheidbar waren. Es könnte sich hierbei um verschiedene Materialien handeln. Die Interferenzen, die im Reflexionsbild auftauchen, sind im SH-Bild nicht sichtbar. Das Scanfeld betrug mit einem PlanNeofluar 2.5x/0.075:  $2.2 \times 2.2 \text{ mm}^2$ .

### 7.3 Ergebnis

Alle in Abschnitt 2.2 genannten Vorteile des Zweiphotonen-LSM im Vergleich zum Einphotonen-LSM konnten in diesem Kapitel anhand von biologischen Präparaten demonstriert werden. Die Leistung des Faserlasers ist für den Einsatz in einem Zweiphotonen-Mikroskop zur Untersuchung von biologischen Präparaten ausreichend. Zur Anregung eines Zweiphotonen-Überganges in biologischen Präparaten wurden mittlere Leistungen von einigen mW bei einer Pulslänge von 200 fs und einer Wellenlänge von 800 nm verwendet.

Das Zweiphotonen-LSM kann neben der Anwendung zur Untersuchung von biologischen Präparaten auch zur Untersuchung von Halbleiter- und von Festkörpermateriale eingesetzt werden. In p-n-Übergängen kann bei Verwendung von Pulsen mit einer Pulslänge von  $\Delta\tau(l) = 200 \text{ fs}$ , einer Wellenlänge von  $\lambda = 800 \text{ nm}$  und einer mittleren Leistung von einigen  $10 \mu\text{W}$  die Zweiphotonen-Absorption zur effizienten Erzeugung eines Ladungsträgerstroms verwendet werden. Das entstehende TOBIC-Signal ist tiefendiskriminiert.

In integrierten Schaltungen, SiC, GaAs, AlNSi (111) und Cadmium Tellurid konnte ein SH-Signal erzeugt werden. Eine genaue Zuordnung des detektierten SH-Signals zu Fehlstellen im Kristall und zu verschiedenen Kristallstrukturen war wegen des Fehlens von Vergleichsmessungen nicht möglich.



# Kapitel 8

## Zusammenfassung

Das Laser-Scan-Mikroskop (LSM) wurde für Femtosekundenpulse im nahinfraroten Spektralbereich charakterisiert. Durch die Messung der Pulsverbreiterung eines Femtosekundenpulses beim Durchlaufen des LSM wurde die Dispersion 2. Ordnung des gesamten optischen Systems einschließlich der Objektive berechnet. Bei einer Wellenlänge von 800 nm betrug die Dispersion 2. Ordnung etwa  $5000 \text{ fs}^2$ . Sie ist von dem verwendeten Objektiv nahezu unabhängig. Die so ermittelten Dispersionen 2. Ordnung stimmten mit den aus den Materialkonstanten jeder einzelnen optischen Komponente berechneten Dispersionen 2. Ordnung sehr gut überein. Die Dispersion 2. Ordnung des LSM wurde nahezu vollständig mit einem Prismenkompressor kompensiert.

Die bei der Ankopplung des Femtosekundenlasers an das LSM über eine 2 m lange polarisationserhaltende Monomode-Glasfaser entstehende Verbreiterung der Pulse wurde durch einen einfachen Gitterkompressor kompensiert. Mit dieser Anordnung standen Pulse mit einer Pulslänge von 193 fs bei einer Wellenlänge von 800 nm und einer Repetitionsrate von 76 MHz im Präparat zur Verfügung. Die mittlere Leistung betrug max. 15 mW.

Die Wirkungsquerschnitte von verschiedenen Farbstoffen wurden bei einer Wellenlänge von 800 nm vermessen. Die Abhängigkeit der Zweiphotonen-Absorption von den Pulsparametern (mittlere Leistung und Pulslänge in der Probe) wurde bestimmt. Der Bereich, in dem eine 'reine' Zweiphotonen-Absorption stattfindet, wurde exemplarisch für den Farbstoff APSS festgelegt. Die Messungen ergaben, daß für die Aufnahme von Zweiphotonenbildern mit hoher Qualität eine kurze Pulslänge notwendig ist, da das Signal- zu Rauschverhältnis nichtlinear mit kürzer werdender Pulslänge ansteigt.

Das Auflösungsvermögen des optimierten Zweiphotonen-LSM wurde bestimmt. Bei der Untersuchung von Farbstoffen in Küvetten und in biologischen Präparaten mit dem Zweiphotonen-LSM wurde im allgemeinen eine vergleichbar große laterale und axiale Auflösung wie mit einem konfokalen Einphotonen-LSM erzielt. Bei der Untersuchung von schwach fluoreszierenden Präparaten in einem konfokalen Einphotonen-LSM kann die konfokale Blende nicht beliebig geschlossen werden, weil sich das Signal- zu Rauschverhältnis zu stark verschlechtern würde. Die Auflösung im Zweiphotonen-LSM kann in diesem Falle besser als im konfokalen Einphotonen-LSM werden. Die Vorteile des Zweiphotonen-LSM im Vergleich zum Einphotonen-LSM konnten bei der Untersuchung von Farbstoffen in Küvetten und biologischen Präparaten demonstriert werden. Der Zweiphotonen-Übergang in biologischen Präparaten kann bei einer Wellenlänge von 800 nm mit einer Spitzenleistung von  $\approx 60 \text{ W}$  angeregt werden. Die Leistung eines Faserlasers ist somit für den Einsatz in einem Zweiphotonen-LSM zur Untersuchung von biologischen Präparaten ausreichend.

In Festkörper- und Halbleitermaterialien können mit dem Zweiphotonen-LSM Signale der Zweiten Harmonischen (SH-Signal) und photoinduzierte Ladungsträgerströme (TOBIC) erzeugt werden. Das TOBIC-Signal konnte effizient mit einer äußerst geringen mittleren Leistung von einigen  $10 \mu\text{W}$  im Fokus des Objektivs generiert werden. Eine Tiefendiskriminierung ist im Falle der Zweiphotonen-Absorption sichtbar.

Bei der Erzeugung des SH-Signals wurde in den meisten Fällen eine Umkehr des Kontrastverhältnisses im Vergleich zum Reflexionsbild festgestellt. Zur genauen Zuordnung des erzeugten SH-Signals zu Fehlstellen oder zur Kristallstruktur sollten bestehende Meßverfahren (wie Röntgenbeugung) hinzugezogen werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] E. Abbe: 'Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop', Ed. O. Lummer, F. Reiche, Braunschweig (1910)
- [2] J. Lichtman: Spektrum der Wiss. **10**, 78-87 (1994)
- [3] J. Pawley: 'Handbook of biological confocal microscopy', Plenum Press, New York (1995)
- [4] W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb: Science **248**, 73 (1990)
- [5] D.W. Piston, W.W. Webb: Biophysics **59**, 156 (1991)
- [6] K. König, P.T.C. So, W.W. Mantulin, E. Gratton: Opt. Lett. **22**, 2 (1997)
- [7] K. König, U. Simon, K.J. Halbhuber: Cellular and Molecular Biology **42**, 8 (1996)
- [8] M. Göppert-Mayer: Ann. Physik **9**, 273 (1931)
- [9] S. Hell, P. Hänninen, J. Salo, A. Kuusisto, E. Soini, T. Wilson, J. Tan: Opt.Comm. **113**, 144-152 (1994)
- [10] M. Gu, C. Sheppard: J. of Modern Opt. **42**, 747-762 (1995)
- [11] C.J.R. Sheppard, M. Gu: Optik **86**, 3 (1990)
- [12] Y. Sako, A. Sekihata, Y. Yanagisawa, M. Yamamoto, Y. Shimada, K. Ozaki, A. Kusumi: J. Microscopy **185**, 9 (1997)
- [13] G.P. Agrawal: 'Nonlinear fiber optics', Academic Press (2nd ed.), San Diego (1995)
- [14] R.W. Boyd: 'Nonlinear Optics', Academic Press Inc., San Diego (1992)
- [15] T. Feurer, R. Sauerbrey: 'Experimental Methods in Physical Sciences', Ed. F.B. Dunning and R.G. Hulet Vol. 29C, Academic Press Inc. (1997)
- [16] J.C. Diels, W. Rudolph: 'Ultrashort Laser Pulse Phenomena', Academic Press Inc. (1996)
- [17] G.H.. Brakenhoff, M. Müller, J. Squire: J. Microscopy **179**, 253 (1995)
- [18] J. Diels, J. Fontaine, I. McMichael, F. Simoni: Appl. Opt. **24**, 1270 (1985)
- [19] S.P. LeBlanc, G. Szabo, R. Sauerbrey: Opt. Lett. **16**, 1508 (1991)
- [20] B. Saleh, M Teich: 'Fundamentals of photonics', John Wiley and Sons, Inc., USA (1991)
- [21] R.L. Fork, C.H. Brito Cruz, P.C. Becker, C.V. Shank: Opt. Lett. **12**, 483 (1987)

- [22] E.B. Treacy: IEEE **5**, 454 (1969)
- [23] C.V. Shank, R.L. Fork, R. Yen, R.H. Stolen: Appl. Phys. Lett. **40**, 761 (1982)
- [24] H. Haken, H. Wolf: 'Molekülphysik und Quantenchemie', Springer-Verlag, Berlin (1991)
- [25] C. Xu, W.W. Webb: JOSA B **13**, 481 (1996)
- [26] F.K. Kneubühl, M.W. Sigrist: 'Laser', B.G. Teubner, Stuttgart (1991)
- [27] Y.R. Shen: Nature **337**, 519-525 (1989)
- [28] E. Cole, J. Soden, J. Rife, D. Barton, Ch. Henderson: IEEE / IRPS **32**, 388-398 (1994)
- [29] J. Kölzer, C. Boit, A. Dallmann, G. Deboy, J. Otto, D. Weinmann: J. Appl. Phys. **71** **11**, R23-41 (1992)
- [30] J. Singh: 'Semiconductor Optoelectronics', McGraw-Hill Book Co., New York (1995)
- [31] Ch. Xu, W. Denk: Postdeadline Paper at CLEO , (1997)
- [32] P. Guyot-Sionnest, Y.R. Shen: Phys. Rev. B **42**, 9263 (1988)
- [33] C. Jordan, H. Schillinger, L. Dressler, S. Karmann, W. Richter, K. Goetz, G. Marowsky, R. Sauerbrey: Appl. Phys. A **65**, 251-257 (1997)
- [34] C. Jordan, E. Canto-Said, G. Marowsky: Appl. Phys. B **58**, 111-115 (1994)
- [35] Coherent: 'Mira Model 900-F Laser Operator's Manual', ()
- [36] M. Fermann: Appl. Phys. B **58**, 197-209 (1994)
- [37] Optikrechenzentrum-Mikroskopie: Carl Zeiss Jena GmbH , (1997)
- [38] C. Barty: Laser Focus World , 93-106 (June 1996)
- [39] B. Lemoff, C. Barty: Opt. Letters **18**, 1651 (1993)
- [40] J.D. Bhawalkar, A. Shih, S.I. Pan, W.S. Liou, J. Swiatkiewicz, B.A. Reinhardt, P.N. Prasad, P.C. Cheng: Bioimaging **4**, 3 (1996)
- [41] T. Feurer, A. Glass, R. Sauerbrey: Appl. Phys. B **65**, 295-297 (1997)

# Erklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Jena, am 30. 12. 1997

---

Ralf Wolleschensky

# Danksagung

Dank sagen möchte ich an dieser Stelle all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. R. Sauerbrey für die Vergabe dieses interessanten und vielseitigen Themas der Diplomarbeit,

Herrn Dr. Thomas Feurer als Betreuer für die vielen anregenden und klärenden Diskussionen und Hinweise zu den Experimenten sowie zur Anfertigung der Diplomarbeit

und

Herrn Dr. Ulrich Simon von der Firma Carl Zeiss Jena GmbH für die Anregung des Themas und die Bereitstellung eines großen Teils der Ausrüstung sowie für die Unterstützung bei den Experimenten.

Weiterhin möchte ich den o.g. Herren für die Ermöglichung der Präsentation der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Symposien danken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Optik und Quantenelektronik und der Entwicklungsabteilung Mikroskopie der Carl Zeiss Jena GmbH danke ich für die angenehme und motivierende Atmosphäre und wertvolle Diskussionen.

Der Carl-Zeiss-Schott-Förderstiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung der Diplomarbeit.