

# 三聚氰胺晶体的相干反斯托克斯拉曼散射显微成像研究

邸亚盟<sup>1,2</sup>, 刘硕<sup>1,2</sup>, 白振旭<sup>1,2</sup>, 邓岩岩<sup>1,2</sup>, 吕志伟<sup>1,2</sup>, 夏元钦<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>河北工业大学先进激光技术研究中心, 天津, 300401;

<sup>2</sup>河北省先进激光技术与装备重点实验室, 天津, 300401

**摘要** 利用单个飞秒激光振荡器作为激发源, 搭建了光谱聚焦相干反斯托克斯拉曼散射 (CARS) 显微成像系统, 采用 SF10 材质的玻璃棒对飞秒脉冲引入啾啾, 以提高光谱分辨率, 实现单一拉曼位移探测。实验以三聚氰胺为样品, 开展了光谱聚焦 CARS 显微成像研究。同时, 在光谱聚焦 CARS 显微成像系统的泵浦和斯托克斯光路中插入半波片, 通过旋转半波片角度, 进而改变线偏振激发脉冲的偏振方向。并研究了样品特定区域的共振信号/非共振背景的比值随半波片偏转角度的变化趋势, 得到了样品特定区域的共振信号/非共振背景的比值最大时半波片的偏转角度。

**关键词** 显微; 相干反斯托克斯拉曼散射; 显微成像; 光谱聚焦; 三聚氰胺; 非共振背景

中图分类号 O437.3

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.1018001

## Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopic Imaging of Melamine Crystals

Di Yameng<sup>1,2</sup>, Liu Shuo<sup>1,2</sup>, Bai Zhenxu<sup>1,2</sup>, Deng Yanyan<sup>1,2</sup>, Lü Zhiwei<sup>1,2</sup>, Xia Yuanqin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Advanced Laser Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China;

<sup>2</sup>Hebei Key Laboratory of Advanced Laser Technology and Equipment, Tianjin 300401, China

**Abstract** The excitation source for a spectrally focused coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopic imaging system is a single femtosecond laser oscillator. The system uses a glass rod composed of SF10 to introduce a chirp into the femtosecond pulse for an enhanced spectral resolution. For single Raman displacement detection, a melamine sample is used to perform experimental spectrally focused CARS microscopic imaging research. Moreover, a half-wave plate is inserted in the pump and Stokes optical path of the spectral focus CARS microscopic imaging system. By changing the half wave, the polarization direction of the linearly polarized excitation pulse is changed, and the variation trend of the ratio of the resonant signal/nonresonant background with respect to the deflection angle of the half-wave plate is studied. Furthermore, the deflection angle of the half-wave plate is determined using the maximum ratio of the resonant signal/nonresonant background in a specific region of the sample.

**Key words** microscopy; coherent anti-Stokes Raman scattering; microscopy imaging; spectral focusing; melamine; non-resonant background

收稿日期: 2021-04-08; 修回日期: 2021-05-18; 录用日期: 2021-06-02

基金项目: 国家自然科学基金 (61675057, 61975050)

通信作者: \*xiayq@hebut.edu.cn

## 1 引言

相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)显微成像利用光与物质相互作用产生 CARS 信号进行成像<sup>[1]</sup>,具有高化学选择性、高化学特异性和高分辨率的特点,在生命科学和生命医学等领域有着广泛的应用<sup>[2-8]</sup>。由于拉曼线宽通常约为  $10\text{ cm}^{-1}$ ,与皮秒激光脉冲的线宽相当。因此,与飞秒激光相比,使用皮秒激光作为成像光源能够获得更高的信噪比与更小的非共振背景<sup>[9]</sup>。但是,皮秒激光带宽较窄,只能探测单一频率的拉曼位移,难以区分复杂的分子结构。针对这一点,Hellerer 等<sup>[10]</sup>提出了一种快速改变泵浦(Pump)光和斯托克斯(Stokes)光频率差的光谱聚焦法。该方法利用飞秒激光在色散介质中传输产生群速色散的特性,对入射宽带飞秒激光引入线性啁啾,从而降低其瞬时光谱带宽。通过调节两束啁啾脉冲之间的延迟,改变两束脉冲的瞬时频率差,进而实现不同频率拉曼位移扫描。基于这一理念,多个从事相关领域的课题组采用多种方案实现了光谱聚焦 CARS 显微成像。根据成像光源结构的不同,大致可以分为采用单个飞秒激光器同步光学参量振荡器作为成像光源<sup>[11]</sup>、飞秒激光器与光子晶体光纤相结合作为成像光源<sup>[12-14]</sup>、光纤激光器作为成像光源<sup>[15-17]</sup>、单个飞秒固体激光振荡器作为成像光源<sup>[18-20]</sup>这四种方式。在这几种成像方式中,基于光学参量振荡器与飞秒激光器组合的方案,虽然操作相对简单。但是,光学参量振荡器设备成本较高而且占地空间较大。基于飞秒激光器与光子晶体光纤相结合的方案,虽然具有实验装置紧凑、实验成本较低的优点。但是,光子晶体光纤将脉冲能量分散在整个频谱上,极大地增加了图像采集的时间。基于光纤结构的激光器作为成像光源的方案,虽然具有小型化集约化的优点,但是,由于光纤纤芯的限制,基于光线结构的激光器在脉冲能量方面与固体激光器相比仍有待提高。与前面

这些方案相比,基于单个飞秒激光振荡器的方法利用二向色镜将飞秒激光分为两束,分别作为 Pump 光和 Stokes 光,既节约了成本又很好地保证了两束光的同步与稳定。但是,基于单光源的光谱聚焦方案缺乏简单有效的抑制非共振背景的方法。由于共振信号和非共振背景与激发脉冲的偏振特性密切相关,因此,通过改变激发脉冲的偏振特性即可实现非共振背景的抑制。半波片作为改变激光脉冲偏振特性的常用器件,在改变脉冲偏振方面具有良好的效果。基于以上原因,本文以单个飞秒激光振荡器为光源搭建光谱聚焦 CARS 显微成像系统,利用二向色镜将飞秒激光分为两束,分别作为 Pump 光和 Stokes 光。通过在 Pump 光和 Stokes 光光路中插入半波片改变其偏振角度进而实现对三聚氰胺样品的非共振背景抑制。该方案仅需单个脉冲激光器便可实现三聚氰胺样品非共振背景抑制成像,不仅易于操作和维护,而且兼顾成像分辨率与成像对比度。

## 2 光谱聚焦原理与仿真

光谱聚焦技术利用光在色散介质(如玻璃棒)中传播时,不同波长的光折射程度不同,产生群速色散效应,使脉冲啁啾展宽,调节 Pump 光和 Stokes 光的频率差,进而实现样品拉曼位移的扫描。光谱聚焦的核心要点在于使 Pump 光和 Stokes 光啁啾大小相同,只有这样才可以保证 Pump 光与 Stokes 光的瞬时频差恒定且使两者瞬时光谱带宽较窄,进而提高样品的成像分辨率。本实验同样基于这一理念展开,在 Pump 光和 Stokes 光光路中分别插入长度不同的 SF10 玻璃棒,使其脉冲啁啾展宽。根据 Sellmeier 色散方程可知,SF10 玻璃棒中波长与折射率的关系为

$$n^2(\lambda) = 1 + \sum_{m=1}^3 \frac{A_m \lambda^2}{\lambda^2 - B_m}, \quad (1)$$

式中: $\lambda$ 代表波长; $A_m$ 与 $B_m$ 代表色散参数,它的值与玻璃棒的材质有关。SF10 玻璃棒的色散参数表示为

$$\begin{cases} (A_1, A_2, A_3) = (1.62153902, 0.256287842, 1.64447552) \\ (B_1, B_2, B_3) = (0.0122241457, 0.0595736775, 147.468793) \mu\text{m}^2 \end{cases} \quad (2)$$

在 Pump 光与 Stokes 光穿过 SF10 玻璃棒时,因不同波长的光在玻璃棒中的折射率不同,产生群速色散效应。群速色散具体公式为

$$k'' = \frac{\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{d^2 n}{d\lambda^2}, \quad (3)$$

式中: $k''$ 代表色散中介质的群速色散,它的国际单位是  $\text{s}^2/\text{m}$ ;  $c$  代表光速; $\lambda$  代表波长; $n$  代表光的折射率。

群速色散后的脉冲会随之展宽,脉冲展宽公式为

$$\tau(z) = \tau_0 \sqrt{1 + \left( \frac{4 \ln 2 |k''z|}{\tau_0^2} \right)^2}, \quad (4)$$

式中： $\tau$ 代表展宽后的脉冲宽度； $\tau_0$ 代表初始脉冲宽度； $z$ 代表玻璃棒长度。

如果玻璃棒长度到达一定值，则产生的线性啁啾的大小和初始脉冲的宽度无关。可近似为

$$\beta(z) = \frac{1}{2z|k''|}, \quad (z \gg \frac{\tau_0^2}{|k''|}, \tau \gg \tau_0), \quad (5)$$

式中： $\beta$ 代表啁啾参数。

利用式(5)仿真得到线性啁啾参数与玻璃棒长度的关系图，如图 1(a)所示，可以看出，Pump 光和 Stokes 光线性啁啾数值的大小随玻璃棒长度的增加而变小。当 Pump 光和 Stoke 光中插入的玻璃棒长度超过于 10 cm 时，线性啁啾参数不再随玻璃棒长度增加而明显变化。由于 Pump 光脉冲和 Stoke 光

脉冲的中心波长和频率成分不同，因此，需要在两路光路中插入不同长度的玻璃棒，从而确保 Pump 光脉冲和 Stoke 光脉冲的线性啁啾参数相同。由式(4)可知，光路中插入的玻璃棒长度越长，飞秒脉冲的展宽程度越明显。但是，光路中插入的玻璃棒长度并非越长越好。一方面，光路中插入的玻璃棒长度越长，Pump 光脉冲和 Stoke 光脉冲的损耗越明显。另一方面，激光脉冲过度展宽时其激发效率会下降。这两点都会造成 CARS 信号强度降低，从而增加 CARS 信号的探测难度。因此，虽然能够实现 Pump 光脉冲和 Stoke 光脉冲线性啁啾参数匹配的的玻璃棒长度组合有很多，但并不是所有的长度组合都能实现较好的成像结果。基于此，选择在 Pump 光路中插入长度为 11 cm 的 SF10 玻璃棒，从图 1(b)中虚线位置可以看出，此时 Stokes 光路需要插入的 SF10 玻璃棒长度为 11.5 cm。

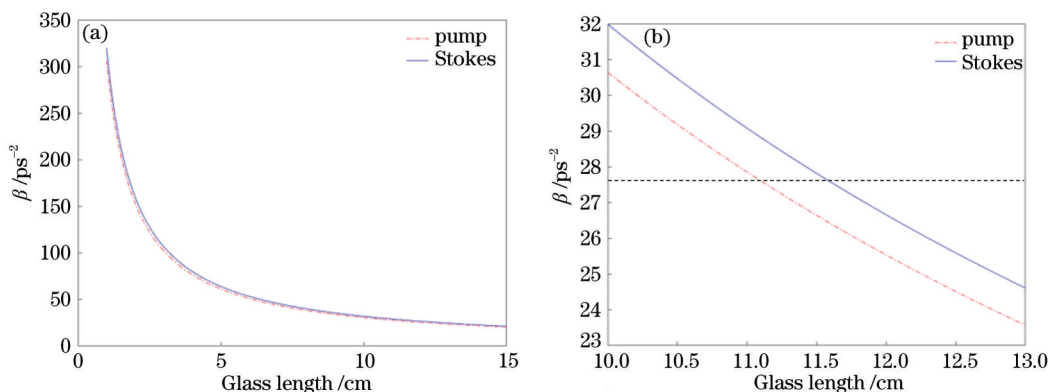


图 1 线性啁啾参数与玻璃棒长度的关系。(a)玻璃棒长度为 1~15 cm 时的啁啾变化；(b)玻璃棒长度为 10~13 cm 时的啁啾变化  
Fig. 1 Relationship between linear chirp parameters and glass rod length. (a) Change of chirp when glass rod length is 1-15 cm; (b) change of chirp when glass rod length is 10-13 cm

### 3 光谱聚焦显微成像系统的设计与实验

光谱聚焦成像系统如图 2 所示，钛蓝宝石飞秒激光振荡器发出中心波长为 800 nm，脉宽为 120 fs 的线偏振飞秒激光脉冲，经分离波长为 808 nm 的二向色镜(DM)后分为两束光，两束光分别作为 Pump 光和 Stokes 光，用于激发 CARS 信号。其中 Pump 光的中心波长为 778 nm，Stokes 中心波长为 820 nm。在 Pump 光和 Stokes 光中分别引入长度为 11 cm 和 11.5 cm 的 SF10 玻璃棒使二者产生相同的线性啁啾，展宽后的两路激光脉冲再次经二向色镜合束，之后通过扫描振镜以及扫描透镜注入到 Olympus 生产的 IX71 倒置显微镜中。Pump 光与 Stokes 光经

显微物镜聚焦后激发放置在载物台上的样品，其中透射的 CARS 信号经聚光器收集后被前向探测光电倍增管(PMT)采集，反射的 CARS 信号经 DM 反射后被后向探测 PMT 采集，带通滤光片用于滤除残余的 Pump 光与 Stokes 光及其他非线性信号。PMT 采集的信号经过电脑处理后，便获得显微成像结果。其中，显微镜物镜的数值孔径(NA)大小为 1.25，显微镜的放大倍率为 400 倍，显微镜入口处，Pump 光和 Stokes 光功率分别约为 20 mW 和 50 mW。

在搭建完成光谱聚焦 CARS 显微成像系统后，利用三聚氰胺固体试剂配置成像样品，通过便携式拉曼光谱仪(必达泰克公司)测得该样品在 1000 cm<sup>-1</sup>以内存在若干明显拉曼峰，分别位于 583, 676, 782, 984 cm<sup>-1</sup>。由于本成像系统的波长配置匹

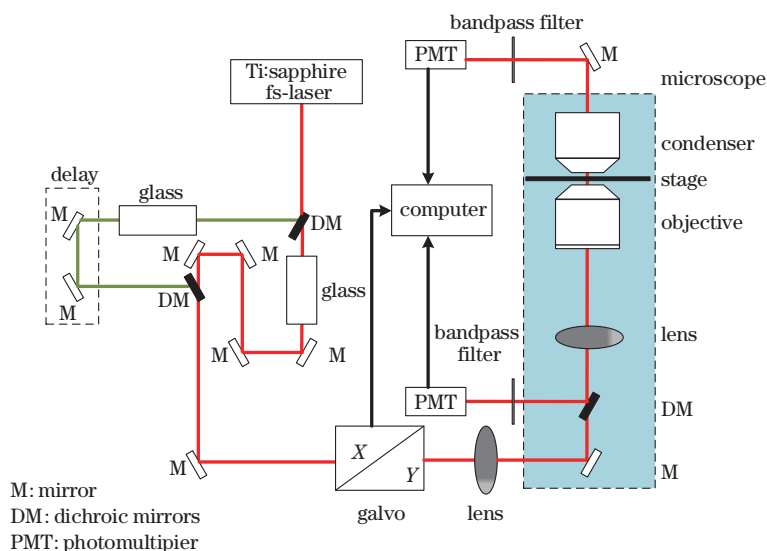


图 2 光谱聚焦 CARS 显微成像系统总体设计方案

Fig. 2 Overall design scheme of spectral focusing cars microscopic imaging system

配三聚氰胺晶体在  $676\text{ cm}^{-1}$  位置的振动。因此,通过时间延迟装置,调节 Pump 光脉冲和 Stokes 光脉冲之间的频率差,使其频率差等于三聚氰胺晶体在

$676\text{ cm}^{-1}$  位置的振动频率,采集产生的 CARS 信号,得到的成像结果如图 3(a)所示。其尺寸大小为  $420\text{ }\mu\text{m} \times 420\text{ }\mu\text{m}$ ,像素参数为  $1000\text{ pixel} \times 1000\text{ pixel}$ ,

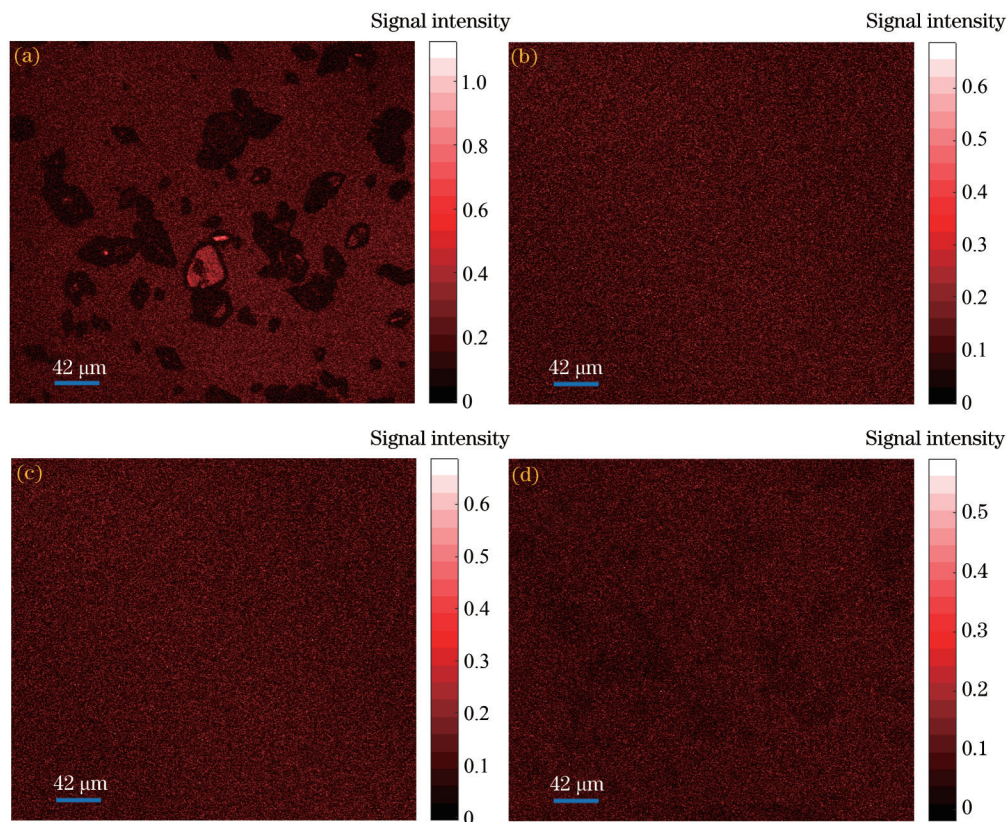


图 3 不同条件下三聚氰胺 CARS 显微成像结果。(a)时间重合时三聚氰胺 CARS 显微成像结果;(b)挡 Pump 脉冲成像结果;(c)挡 Stokes 脉冲成像结果;(d)非时间零点成像结果

Fig. 3 Melamine CARS microscopic imaging results under different conditions. (a) Melamine CARS microscopic imaging results under time coincidence; (b) shift pump pulse imaging results; (c) shift Stokes pulse imaging results; (d) non-time zero imaging results

每个像素点间的距离大小为  $0.42\ \mu\text{m}$ 。从图中可以清晰地看出三聚氰胺晶体轮廓,为了验证采集到的成像结果确实为 CARS 显微成像结果,分别挡住 Pump 光和 Stokes 光,采集的成像结果如图 3(b)和(c)所示,可以看出图 3(a)中呈现的成像结果消失。此外,在不挡住 Pump 光和 Stokes 光情况下,改变 Pump 光和 Stokes 光光脉冲的延迟时间,使两束光的脉冲时间不再重合。此时,采集成像结果如图 3(d)所示,图 3(a)中呈现的成像结果同样不复存在。因此,可以确定图 3(a)中产生的成像结果确实为 CARS 显微成像。

为了进一步分析显微成像的成像分辨率,利用

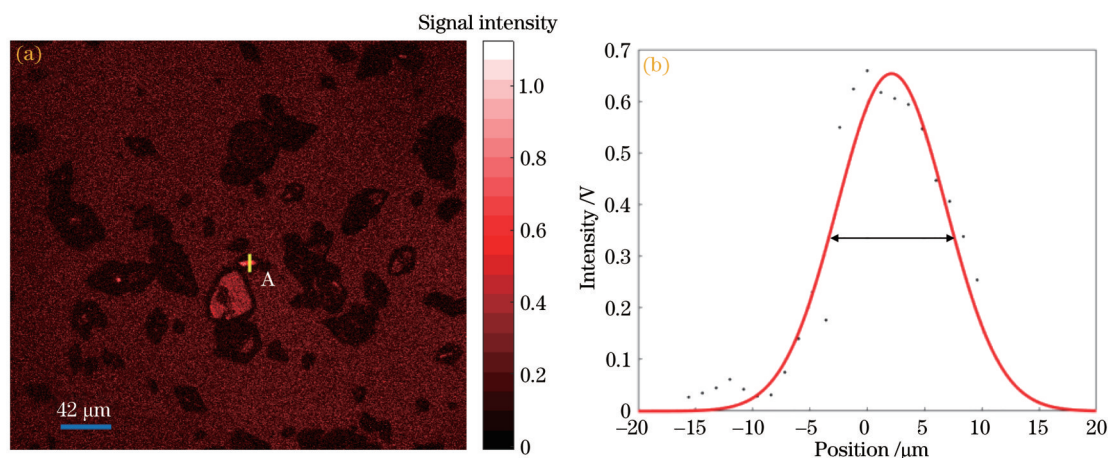


图 4 三聚氰胺 CARS 显微成像及高斯拟合曲线。(a)三聚氰胺 CARS 显微成像;(b) A 区域 CARS 信号高斯拟合曲线  
Fig. 4 Microscopic imaging and Gaussian fitting curve of melamine CARS. (a) Microscopic imaging of melamine CARS;  
(b) Gaussian fitting curve of CARS signal in A region

成像结果显示出较强的非共振背景,导致部分尺寸较小的三聚氰胺产生的 CARS 信号湮没其中,从而呈现较暗状态。Pump 光和 Stokes 光脉冲的偏振方向可以很大程度地影响非共振背景,为了改变激发脉冲的偏振方向,我们在两束光光路中分别插入半波片(波长为  $808\ \text{nm}$ ),调节半波片角度,使得激发脉冲偏振方向与未插入半波片时最大程度接近,设置此时半波片角度为  $0^\circ$ 。在实际操作中,对于图 5(a)中方框区域的样品成像,当半波片旋转角度过小时,其成像变化不明显,当半波片偏转角度过大时,方框区域样品的成像图像变化太大,难以找到共振信号/非共振背景最大时半波片的旋转角度。经多次实验发现,以  $5^\circ$  间隔旋转半波片时,既保证了在旋转半波片时成像有较为明显的变化,又使得成像变化不会太大以至于错过共振信号/非共振背景最大时半波片的旋转角度。因此,在实际实验时,选择以  $5^\circ$  间隔旋转对应的半波片。由于线偏振光偏振方向的旋转角度是半波片旋转

MATLAB 找到图 4(a)中三聚氰胺 CARS 显微成像样品画竖线位置的 A 区域,通过观察可知, A 区域三聚氰胺样品 CARS 信号的强度呈现由灰暗至明亮再到灰暗,理论上其强度变化应为高斯曲线型。该区域三聚氰胺样品 CARS 信号强度经高斯点扩散函数拟合后的曲线如图 4(b)所示,图中的实线为理想高斯曲线,实心原点为采样点。可以看出,此处 CARS 信号强度变化近似为高斯曲线型,其半峰全宽即为实际的分辨率大小,通过比例转换可知,其半峰全宽约为  $11\ \mu\text{m}$ ,因此可以推算出该系统分辨率可达到  $11\ \mu\text{m}$ 。

角度的 2 倍,半波片的旋转角度仅需覆盖  $0^\circ\sim 85^\circ$  范围。首先在 Pump 光中插入半波片,旋转角度范围为  $0^\circ\sim 85^\circ$ ,其中偏转角为  $0^\circ$ 、 $20^\circ$ 、 $40^\circ$ 、 $60^\circ$ 、 $80^\circ$  时对应的成像结果如图 5(a)~(e)所示。在成像结果中随机选取代表共振信号强度的像素区域 A,其区域大小为 100 pixel。同理,在成像结果中随机选取代表非共振背景强度的像素区域 B,其区域大小为 100 pixel。对像素区域 A 和像素区域 B 的信号强度取平均值,像素区域 A 与像素区域 B 信号的强度平均值随半波片旋转角度的强度变化曲线如图 5(g)所示。在图 5(g)中,蓝色长点线为像素区域 A 的平均值对应的共振信号强度变化曲线,绿色圆点线为像素区域 B 的平均值对应的非共振背景强度变化曲线,红色实线为二者强度比值的变化曲线。由图 5(g)可以看出,共振信号和非共振背景随半波片的旋转角度具有不同的表现,当旋转角度为  $70^\circ$  时,共振信号与非共振信号比值最大,此时图 5(a)中方框区域能实现最大程度地抑制非共振背景,对应的成像结果如

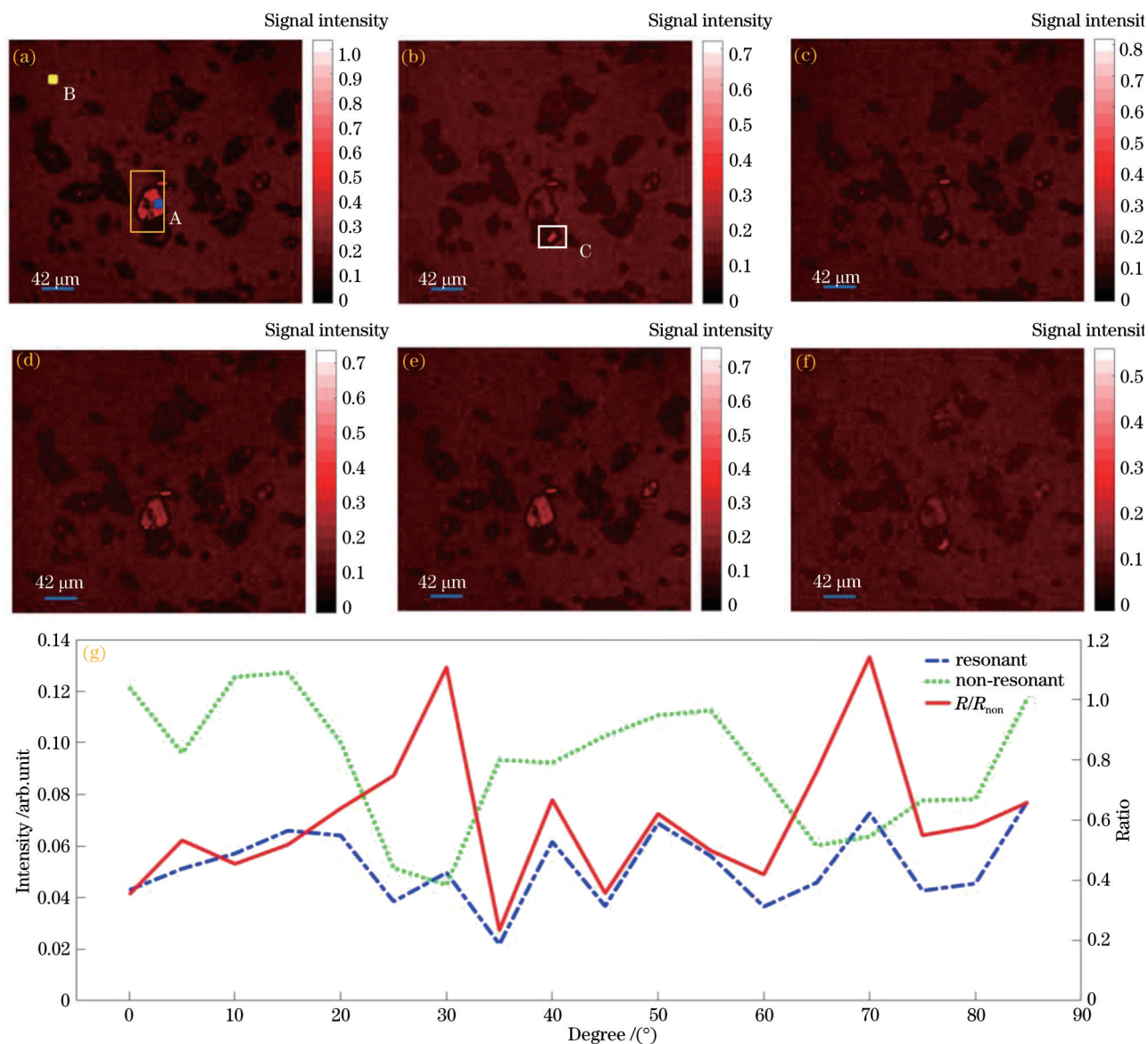


图 5 Pump 光中不同半波片旋转角度下三聚氰胺 CARS 显微成像结果。(a)~(e) 旋转角度为 0°、20°、40°、60°、80° 时对应的成像结果；(f) 最大抑制非共振背景成像结果；(g) 共振信号、非共振背景以及共振信号与非共振信号比值变化

Fig. 5 Melamine CARs microscopic imaging results under different rotation angles of half wave plate in the pump light. (a)-(e) Imaging results corresponding to rotation angles of 0°, 20°, 40°, 60°, and 80°; (f) imaging result of maximum inhibition of non-resonant background; (g) resonance signal, non-resonant background, and ratio changes of resonance signal to non-resonant signal

图 5(f) 显示, 此时三聚氰胺产生的 CARS 信号最大程度地显现出来。

值得注意的是, 在改变半波片光轴角度时, 成像结果中部分样品 [如 图 5(b) 中标记的像素 C 区域] 产生的 CARS 信号变化趋势与像素区域 A 区域的 CARS 信号强度变化出现差异。这是由于三聚氰胺晶体的各向异性所致, 不同样品晶体会对相同偏振特性激发脉冲产生不同的激发响应。但成像结果显示, 图 5(b) 中 C 区域对应样品产生的 CARS

信号也经历了近似的强度调制趋势, 其共振信号与非共振信号最大比值出现在另一个角度。

利用相同的方法, 我们在 Stokes 光路中插入半波片, 研究了图 6(a) 中方框区域的共振信号/非共振背景与 Stokes 光路中半波片角度的关系, 结果如图 6(a)~(d) 所示, 其中图 6(a)、(b) 对应半波片角度分别为 20° 和 50°。同样选取区域大小为 100 pixel 的 A、B 像素区域对其信号强度取平均值, 共振信号、非共振背景以及共振信号与非共振信号比值变化如

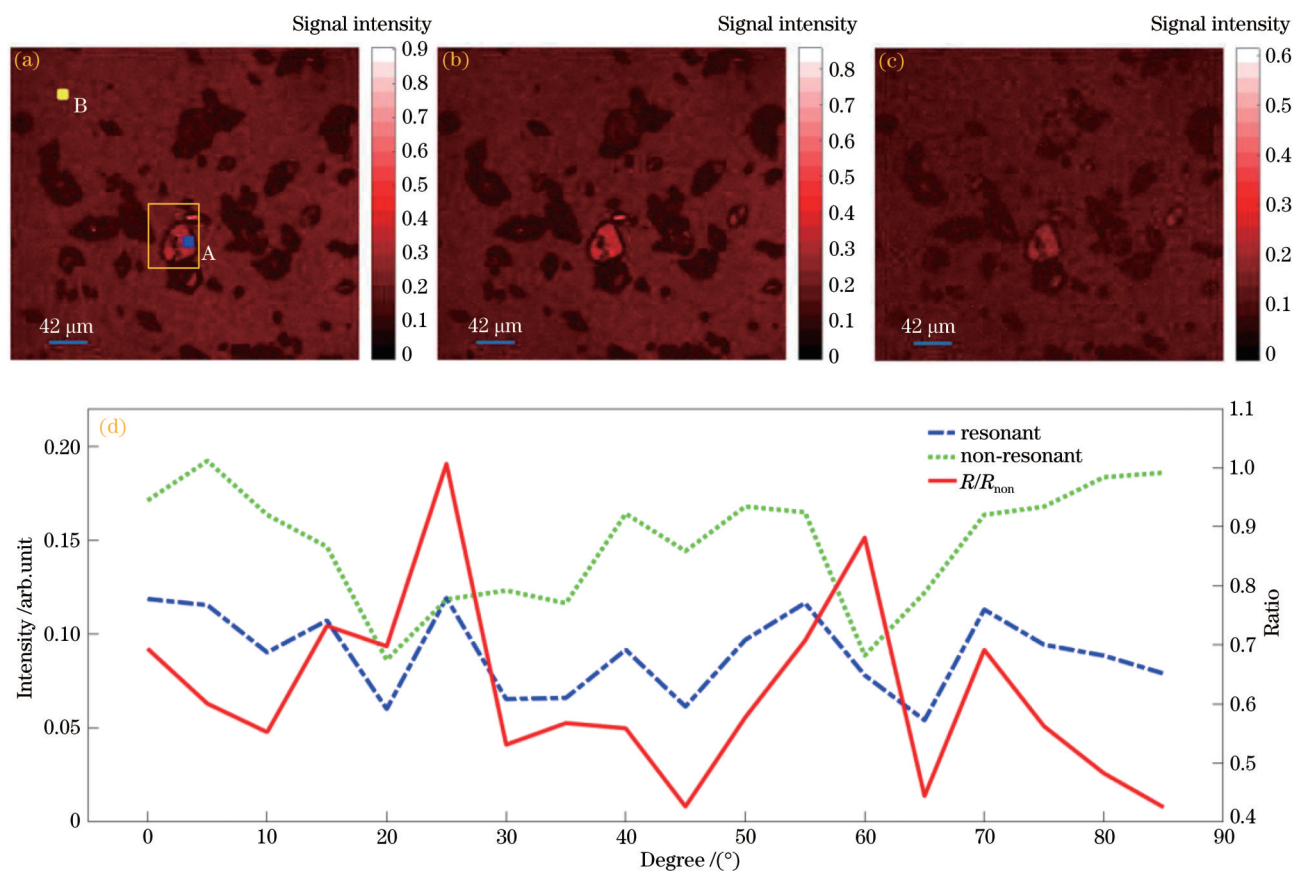


图 6 Stokes 光中不同半波片旋转角度下三聚氰胺 CARS 显微成像结果。(a)(b) 旋转角度为 20° 和 70° 时对应的成像结果; (c) 最大抑制非共振背景成像结果; (d) 共振信号、非共振背景以及共振信号与非共振信号比值变化

Fig. 6 Melamine CARS microscopic imaging results under different rotation angles of half wave plate in Stokes light. (a)(b) Imaging results corresponding to rotation angles of 20° and 70°; (c) imaging result of maximum inhibition of non-resonant background; (d) resonance signal, non-resonant background and ratio changes of resonance signal to non-resonant signal

6(d) 所示。从图中可以看出,在 25° 时方框区域的非共振背景得到最大抑制,成像结果如图 6(c) 所示。

分别比较在 Pump 光路中插入半波片和 Stokes 光路中插入半波片两种情况,共振信号/非共振背景曲线呈现出相似的变化情况,均出现两处较高的峰值。这说明在 Pump 光路和 Stokes 光路中插入半波片可以取得相似的效果,但是两条曲线又有所差别。当在 Pump 光路中插入半波片时,样品的特定区域共振信号/非共振背景曲线峰值出现在 70° (最强) 和 30° (次强),而当在 Stokes 光路中插入半波片时,样品的特定区域共振信号/非共振背景曲线峰值出现在 25° (最强) 和 60° (次强)。这是因为半波片对应波长为 808 nm,而 Pump 光脉冲和 Stokes 光脉冲的中心波长分别为 778 nm 和 820 nm。因此,线偏振的 Pump 光脉冲和 Stokes 光脉冲偏振方向的旋转角度并非严格地为半波片旋转角度的 2 倍。而且,由于脉冲的宽带特性,Pump 光脉冲和 Stokes 光脉冲的偏振态也会

随半波片的旋转而轻微地偏离线偏振态。

## 4 结 论

本文在实验上设计搭建了一个基于单个飞秒激光振荡器的光谱聚焦 CARS 显微成像系统并利用该系统实现了对三聚氰胺样品 676 cm<sup>-1</sup> 波数的 CARS 显微成像,其成像分辨率可达到十几微米,通过改变偏振片的旋转角度研究了样品的特定区域共振信号/非共振背景与半波片角度的关系,在 Pump 光中插入半波片对三聚氰胺晶体进行不同角度的偏振成像情况下,当旋转角度为 70° 时,样品的特定区域共振信号/非共振背景比值最大,能实现最大程度地抑制非共振背景。在 Stokes 光中插入半波片对三聚氰胺进行偏振成像情况下,当旋转角度为 25° 时,样品的特定区域非共振背景得到最大抑制。实验结果证明,本文所搭建的光谱聚焦显微成像系统在兼顾分辨率的同时能对样品的特定区域

的非共振背景进行有效抑制。由于光学元件的影响,在成像过程中存在高阶色散,在接下来对光路进行改进和优化时,本课题组打算采用空间光调制器精确调节实验产生的高阶色散,从而获得更高质量的 CARS 显微成像。

### 参 考 文 献

- [1] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes Raman scattering[J]. *Physical Review Letters*, 1999, 82(20): 4142-4145.
- [2] 李姿霖, 李少伟, 张思鹭, 等. 相干拉曼散射显微技术及其在生物医学领域的应用[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207005.  
Li Z L, Li S W, Zhang S L, et al. Coherent Raman scattering microscopy technique and its biomedical applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207005.
- [3] 张博涵, 郭莉, 姚冽, 等. 受激拉曼散射显微技术用于快速无标记病理成像[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207018.  
Zhang B H, Guo L, Yao L, et al. Rapid histological imaging using stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207018.
- [4] 祁亚峰, 刘宇宏, 刘大猛. 拉曼光谱技术在肿瘤诊断上的应用研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(22): 220001.  
Qi Y F, Liu Y H, Liu D M. Research progress on application of Raman spectroscopy in tumor diagnosis [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(22): 220001.
- [5] Fung A A, Shi L Y. Mammalian cell and tissue imaging using Raman and coherent Raman microscopy [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2020, 12(6): e1501.
- [6] Bocklitz T, Meyer T, Schmitt M, et al. Invited article: comparison of hyperspectral coherent Raman scattering microscopies for biomedical applications [J]. *APL Photonics*, 2018, 3(9): 092404.
- [7] 周前, 袁景和, 周卫, 等. 相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术及其在生物医学领域的应用[J]. *电子显微学报*, 2015, 34(3): 261-271.  
Zhou Q, Yuan J H, Zhou W, et al. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and its biomedical application[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2015, 34(3): 261-271.
- [8] GarbaciE T, KoraiR P, FraterE H, et al. In planta imaging of  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinolic acid in *Cannabis sativa* L. with hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18: 046009.
- [9] Cheng J X, Volkmer A, Book L D, et al. An epide- tected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105(7): 1277-1280.
- [10] Hellerer T, Enejder A M K, Zumbusch A. Spectral focusing: high spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(1): 25-27.
- [11] Rocha-Mendoza I, Langbein W, Borri P. Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion[J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 93(20): 201103.
- [12] Feig J E, Hewing B, Smith J D, et al. High-density lipoprotein and atherosclerosis regression[J]. *Circulation Research*, 2014, 114(1): 205-213.
- [13] Slepko A D, Ridsdale A, Pegoraro A F, et al. Multimodal CARS microscopy of structured carbohydrate biopolymers[J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(5): 1347-1357.
- [14] Pegoraro A F, Slepko A D, Ridsdale A, et al. High performance multimodal CARS microscopy using a single femtosecond source[J]. *Proceedings of SPIE*, 2010, 7569: 756908.
- [15] Valensise C M, Giuseppi A, Vernuccio F, et al. Removing non-resonant background from CARS spectra via deep learning[J]. *APL Photonics*, 2020, 5(6): 061305.
- [16] Qin Y K, Cromey B, Batjargal O, et al. All-fiber single-cavity dual-comb for coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy based on spectral focusing[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(1): 146-149.
- [17] Chen K, Wu T, Chen T, et al. Spectral focusing dual-comb coherent anti-Stokes Raman spectroscopic imaging[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(18): 3634-3637.
- [18] Mohseni M, Polzer C, Hellerer T. Resolution of spectral focusing in coherent Raman imaging[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 10230-10241.
- [19] Pope I, Langbein W, Watson P, et al. Simultaneous hyperspectral differential-CARS, TPF and SHG microscopy with a single 5 fs Ti: Sa laser[J]. *Optics Express*, 2013, 21(6): 7096-7106.
- [20] Langbein W, Rocha-Mendoza I, Borri P. Coherent anti-Stokes Raman micro-spectroscopy using spectral focusing: theory and experiment[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009, 40(7): 800-808.