

## 低指纹区的光谱聚焦 CARS 显微成像

张宁<sup>1,2</sup>, 侯国忠<sup>3</sup>, 邓岩岩<sup>1,2</sup>, 刘硕<sup>1,2</sup>, 王雨雷<sup>1,2</sup>, 吕志伟<sup>1,2</sup>, 夏元钦<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>河北工业大学电子信息工程学院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;<sup>3</sup>哈尔滨工业大学可调谐激光技术国家级重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080

**摘要** 利用单个飞秒振荡器为激发光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,使用二向色镜获得了泵浦光与斯托克斯光,开展了聚苯乙烯样品低指纹区的光谱聚焦 CARS 二维与三维显微成像研究。在光谱聚焦 CARS 二维成像研究中,通过改变泵浦-斯托克斯的延迟时间,获得了随延迟时间变化的光谱聚焦 CARS 信号强度谱,通过与聚苯乙烯拉曼光谱的对比,分析了在改变泵浦-斯托克斯的延迟时间过程中被激发的拉曼振动的切换情况。同时,在固定的拉曼振动模式,通过对聚苯乙烯样品进行断层扫描,实现了对聚苯乙烯样品的三维 CARS 成像。

**关键词** 光谱聚焦; 拉曼振动; CARS 信号; 三维成像

中图分类号 O437.3

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.2418001

## Focusing Spectral CARS Microscopic Imaging in Low Fingerprint Regions

Zhang Ning<sup>1,2</sup>, Hou Guozhong<sup>3</sup>, Deng Yanyan<sup>1,2</sup>, Liu Shuo<sup>1,2</sup>, Wang Yulei<sup>1,2</sup>, Lü Zhiwei<sup>1,2</sup>, Xia Yuanqin<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Center for Advanced Laser Technology, School of Electronic and Information Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China;<sup>2</sup>Hebei Key Laboratory of Advanced Laser Technology and Equipment, Tianjin 300401, China;<sup>3</sup>State Key Laboratory of Tunable Laser Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, Heilongjiang, China

**Abstract** A spectral focusing coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microimaging system was developed using a femtosecond oscillator as the excitation source. Pump light and Stokes light were obtained by using dichromatic mirrors. Two- and three-dimensional microscopic imaging studies of the spectral focusing CARS imaging in the low-fingerprint region of polystyrene samples were carried out. While changing the delay time of pump-Stokes during two-dimensional imaging, CARS signal intensity spectra that varied with delay time were obtained. The switching of excited Raman vibrations in the process of changing the pump-Stokes delay time was analyzed by comparing it to the polystyrene Raman spectra. Furthermore, the three-dimensional CARS imaging was realized by tomography in the fixed Raman vibration mode for polystyrene samples.

**Key words** spectral focusing; Raman vibration; CARS signal; 3D imaging

## 1 引言

相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)显微成像是当今热门的显微成像技术之一, CARS 显微成像具有化学特异性高、无需染色标记、分辨率高等优点, 在生物、医学方面得到广泛的应用<sup>[1-7]</sup>。宽带的飞秒激光可以实现超宽带的拉曼激发, 因此在 CARS 显微成像应用

中, 宽带的飞秒激光比窄线宽的纳秒激光或者皮秒激光具有更好的前景。但是由飞秒脉冲激发的 CARS 光谱的分辨率较低, 为了解决这一问题, 多种技术手段被提出来, 其中包括脉冲整形方法和光谱聚焦方法。2004 年, Knutsen 等<sup>[8]</sup>通过对泵浦光进行整形(皮秒脉冲), 提高了异辛烷和甲醇的飞秒双光束 CARS 光谱分辨率, 分辨率达  $5 \text{ cm}^{-1}$ , 高分辨率的飞秒 CARS 有利于

收稿日期: 2022-04-08; 修回日期: 2022-04-13; 录用日期: 2022-04-27

基金项目: 国家自然科学基金(61675057, 62075056)、河北省自然科学基金(F2021202055)

通信作者: \*xiayq@hebut.edu.cn

其应用于成像。2006年, Konradi等<sup>[9]</sup>利用斯托克斯光脉冲整形方法选择性激发苯和氯仿的拉曼振动模, 通过一种反馈控制的最优化方法, 可以控制两种样品拉曼振动模强度比, 此种方法有利于对邻近的拉曼振动模进行超快动力学研究。2013年, Lütgens等<sup>[10]</sup>直接使用皮秒的光学参量放大器(OPA)提供泵浦光和探测光, 飞秒的OPA提供斯托克斯光, 进而提高环乙烷飞秒CARS光谱的频域分辨率, 时域上的拍频信号也更加明显。光谱聚焦方法具有结构简单、调节灵活的优点, 利用色散介质对泵浦光脉冲和斯托克斯光引入匹配的线性啁啾, 提升光谱分辨率。在固定的泵浦-斯托克斯时间延迟下, 光谱聚焦方法可以实现对特定拉曼振动的激发, 并通过调节泵浦-斯托克斯时间延迟实现对拉曼振动的切换。光谱聚焦方法由Zumbusch课题组<sup>[11]</sup>于2004年首次提出, 该课题组使用双通光栅和透镜组成的脉冲展宽器对入射宽带脉冲引入线性啁啾, 从而降低瞬时光谱带宽, 通过改变泵浦光与斯托克斯光之间的延迟, 在一定范围内调节两束激光脉冲的瞬时频率差, 极大地提高了光谱分辨率。但是该方法采用了再生放大器和OPA系统作为光源, 成像速度相对较慢。Borri课题组<sup>[12]</sup>在2008年对光谱聚焦方法进行了改进, 选择高色散的玻璃棒引入线性啁啾, 调节光路中玻璃棒的长度即可改变泵浦光和斯托克斯光的啁啾程度, 该方法简化了光路调节的过程, 并且系统使用光学参量振荡器(OPO)提高了成像速度。随后, Borri课题组<sup>[13]</sup>对光谱聚集理论进行了较为全面的分析, 推导了利用玻璃棒引入线性啁啾时所能达到的极限光谱分辨率。

Langbein等<sup>[14]</sup>在2009年利用输出脉宽为10 fs的单个飞秒振荡器实现了高光谱CARS显微成像, 二向色镜的光谱选择和玻璃元件的线性啁啾实现了在大光谱范围( $800\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ )内可调谐的振动激发。2013年, Pope等<sup>[15]</sup>使用输出脉宽为5 fs的单个飞秒振荡器将CARS光谱分辨率提高到 $10\text{ cm}^{-1}$ , 并获得了 $1200\sim 3800\text{ cm}^{-1}$ 振动范围内的CARS图像。单个飞秒振荡器不仅简化了实验装置, 而且超宽带的激励光源也拓展了光谱探测范围。Stolow课题组<sup>[16]</sup>利用光子晶体光纤替代固态OPO, 搭建多模CARS系统, 该系统具有可变光谱分辨率和宽拉曼可调谐范围( $2500\sim 4100\text{ cm}^{-1}$ ), 在系统中采用光谱聚焦方法可以提高CARS成像光谱分辨率。光子晶体光纤价格低廉、体积小, 因而更加适合紧凑的光学系统。随后该课题组<sup>[17]</sup>还尝试利用飞秒Er/Yb光纤振荡器和超高非线性光纤作为光源, 构建了一套全光纤高光谱CARS系统, 将光谱扫描范围从 $2400\text{ cm}^{-1}$ 扩展到 $3400\text{ cm}^{-1}$ 。2014年, Stolow课题组<sup>[18]</sup>又将高光谱多模CARS成像光谱探测范围拓展至指纹区( $850\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ ), 同时结合二次谐波成像对纤维素含量和骨密度进行了观测。利用光子晶体光纤和超高非线性光纤提供斯托克

斯光源虽然可以简化实验装置, 节约系统成本, 但此类设备输出稳定性易受环境和泵浦脉冲影响。2018年, Mohseni等<sup>[19]</sup>详细研究了色散对相干拉曼散射成像中应用光谱聚焦所获得的光谱分辨率的影响, 给出了精确确定所述效应的实验例子和已知方程的浓缩表示, 这有助于将光谱聚焦技术直接集成到任何多模态显微镜。2020年, Herdzyk等<sup>[20]</sup>提出了一种基于100 fs钛蓝宝石激光器的显微成像系统, 实现了调谐范围为 $900\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 的光谱聚焦CARS显微成像, 该系统适合观察厚样本。

目前, 光谱聚焦CARS显微成像装置可以覆盖 $800\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 拉曼振动区域, 实现对该范围内拉曼振动的CARS显微成像。指纹区的CARS显微成像多集中在 $850\text{ cm}^{-1}$ 以上, 但是关于低指纹区( $<800\text{ cm}^{-1}$ )的光谱聚焦CARS显微成像的研究尚为空白。本文仅利用单个飞秒激光振荡器搭建了光谱聚焦CARS显微成像系统, 大幅减小了实验设备体积并降低了实验成本。通过选取滤波片, 探测到了 $650\sim 950\text{ cm}^{-1}$ 拉曼波段产生的CARS信号, 开展了关于低指纹区的光谱聚焦CARS显微成像研究, 获得了聚苯乙烯样品低指纹区( $600\sim 900\text{ cm}^{-1}$ )的光谱聚焦CARS显微成像结果, 并通过Z轴扫描实现了对聚苯乙烯样品的三维重构。

## 2 显微成像系统的设计与搭建

实验中搭建的光谱聚焦CARS成像系统如图1所示, 采用钛蓝宝石飞秒激光振荡器(Mai Tai, Spectra-Physics公司)作为激发光源。当进行光谱聚焦CARS显微成像实验时, 飞秒激光振荡器输出的激光脉冲(中心波长为800 nm, 脉宽为40 fs, 半峰全宽为60 nm, 重复频率为42 MHz, 功率为550 mW)经分离波长为776 nm的二向色镜(DM)分为两束光。其中反射脉冲作为泵浦光, 而透射脉冲作为斯托克斯光, 用于激发CARS信号。使用光谱仪(Kymera 328i-B2, Andor公司)测得对应光谱, 光谱如图2所示。实线为飞秒激光振荡器的输出光谱; 虚线为二向色镜的发射光谱, 即泵浦脉冲光谱; 点虚线为二向色镜的透射光谱, 即斯托克斯脉冲光谱。泵浦脉冲的中心波长为775 nm, 宽带的斯托克斯脉冲的波长为785~840 nm, 可以实现 $0\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围的拉曼激发。成像系统通过不同滤波片探测了 $650\sim 950\text{ cm}^{-1}$ 拉曼波段产生的CARS信号。

在泵浦光路和斯托克斯光路中, 分别引入长度为10 cm和11.4 cm的SF10玻璃棒(glass), 使二者产生匹配的线性啁啾。啁啾的泵浦脉冲和斯托克斯脉冲通过第2个二向色镜进行合束; 经包含X轴扫描镜和Y轴扫描镜的扫描振镜(GVSM002, Thorlabs公司)及焦距为97 mm的扫描透镜后, 注入到倒置显微镜(IX71, Olympus公司)中; 再经过焦距为175 mm管透镜后, 由放大倍数为40、数值孔径为0.65的物镜(Olympus公司)聚焦在聚苯乙烯样品上, 从而激发聚苯乙烯分子的

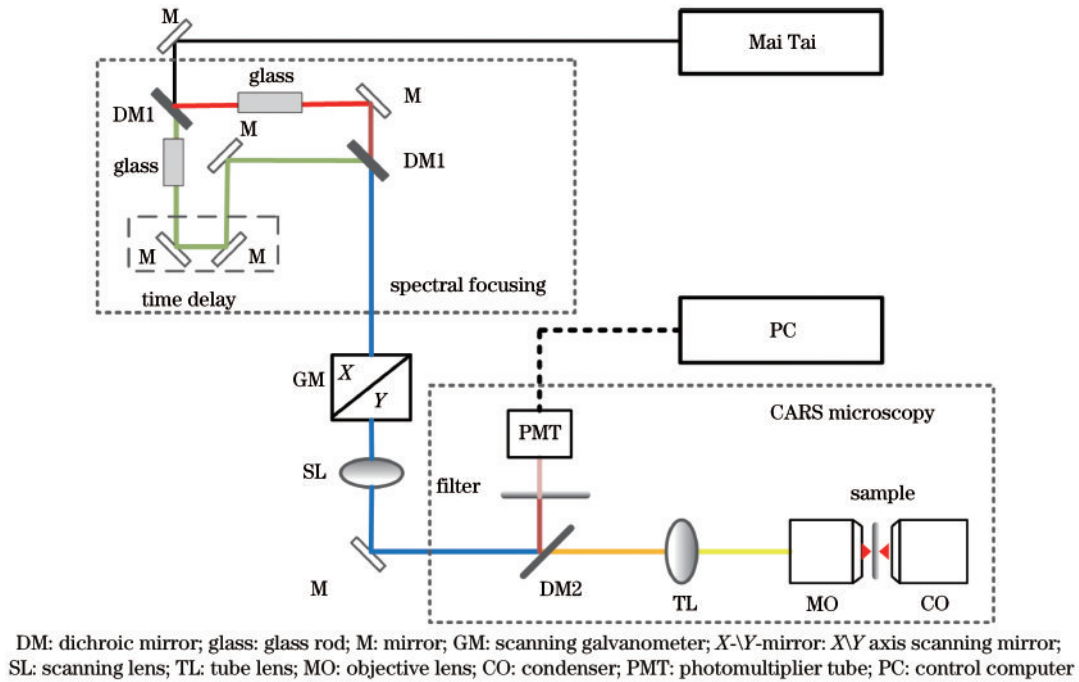


图 1 光谱聚焦 CARS 显微成像系统示意图

Fig. 1 Schematic of the spectral focusing CARS microscope imaging system

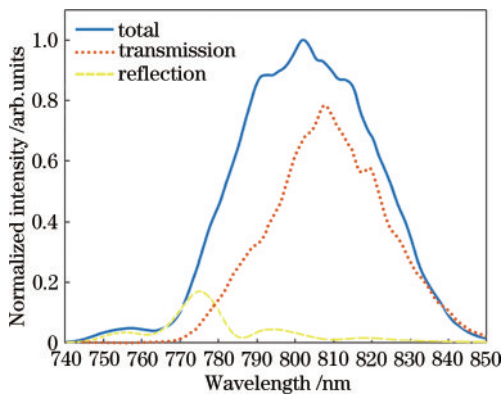


图 2 飞秒激光振荡器的总输出光谱和 DM 的反射部分/透射部分

Fig. 2 Total output spectrum of femtosecond laser oscillator and reflection/transmission of DM

光谱聚焦 CARS 信号。扫描透镜和管透镜的透镜组合可以使激光光束在小角度扫描过程中不偏离物镜的数值孔径。成像过程中对样品反射形成的后向 CARS 信号进行探测,在显微镜中内置合适的二向色镜 (680dcspxr, Chroma 公司),在实现透射激发脉冲的同时反射光谱聚焦 CARS 信号,从而实现光谱聚焦 CARS 信号与激发背景分离。选取的光谱聚焦 CARS 信号再经过显微系统配置的滤波片组合 (NC212066-ET670sp) 后,由光电倍增管 (R3896, Hamamatsu 公司) 进行探测,用于光谱聚焦 CARS 显微成像。在成像过程中,通过调节斯托克斯光路中的时间延迟装置,实现聚苯乙烯样品不同拉曼振动的激发,获得了不同拉曼振动下的 CARS 显微成像。

光谱聚焦 CARS 显微成像采用的样品为购置的聚苯乙烯粉末 (化学纯), 纯度高达 99.5%。在制备聚苯乙烯成像样品时,先取少量聚苯乙烯粉末置于盛有适量纯净水的容器中,并进行充分的搅拌摇匀处理;随后用胶头滴管吸取适量的混合液滴在载玻片上,随着纯净水的蒸发,聚苯乙烯附着在载玻片上,同时起到了使聚苯乙烯分散分布的效果。因为聚苯乙烯不溶于纯净水且不与纯净水反应,其形态和光谱特性并不会发生改变。

### 3 光谱聚焦 CARS 显微成像实验分析

#### 3.1 聚苯乙烯光谱聚焦 CARS 二维显微成像实验研究

在开展成像研究之前,需调节斯托克斯光路中的时间延迟装置,使得泵浦光脉冲和斯托克斯光脉冲实现时间重合,从而激发出样品的 CARS 信号。CARS 信号开始出现的泵浦-斯托克斯时间延迟定义为泵浦-斯托克斯时间延迟的时间零点。BBO 晶体具有较高的抗光损伤阈值、较宽的吸收范围、极宽的透光范围等优异的光学性能,因此被广泛用作倍频与和频晶体。在实验中,将合束后的两束激光聚焦在 BBO 晶体上,当两束激光出现和频信号时,即判定泵浦光和斯托克斯光实现了时间重合。斯托克斯光波长在 800 nm 附近,通过 BBO 晶体后会出现倍频现象,如图 3(a) 所示。图 3(a) 中的光斑即为斯托克斯光的倍频信号。通过调节电动平移台,泵浦光和斯托克斯光具有相同的光程,即时间重合,此时会出现两束光的和频信号,如图 3(b) 所示。和频信号的出现使得图 3(b) 中光斑在

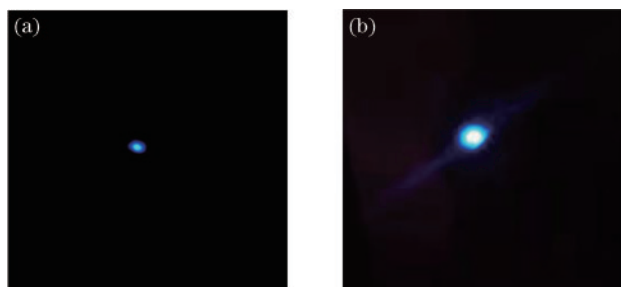


图3 信号对比图。(a)倍频信号;(b)和频信号

Fig. 3 Signal contrast diagram. (a) Multiply frequency signal; (b) sum frequency signal

尺寸和亮度方面明显强于图3(a),即泵浦光和斯托克斯光实现了时间重合。

然后,通过固定步距  $1\ \mu\text{m}$ ,移动斯托克斯光路中的时间延迟装置,即以  $6.667\ \text{fs}$  为固定步距来改变泵浦-斯托克斯时间延迟,在每个泵浦-斯托克斯时间延迟开展光谱聚焦 CARS 显微成像,直至 CARS 信号消失为

止。实验中显微成像的图像尺寸大小为  $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ ,每幅图像包含  $1000 \times 1000$  个像素点,单像素停留时间为  $5 \sim 9\ \mu\text{s}$ ,单帧图像采集时间为  $4 \sim 8\ \text{s}$ 。

通过目镜观测到成像区域的聚苯乙烯样品如图4(a)所示,清晰的块状聚苯乙烯粉末位于成像区域中心,以  $6.667\ \text{fs}$  为固定步距改变泵浦-斯托克斯时间延迟,获得不同泵浦-斯托克斯时间延迟下的 CARS 显微成像结果。其中泵浦-斯托克斯时间延迟为  $100, 320, 540, 660, 900, 1200\ \text{fs}$  时,图4(a)中样品对应的 CARS 显微成像结果如图4(b)~(g)所示。通过观察可以看出,在这6个不同延迟时间下,对成像区域中心的块状聚苯乙烯粉末均激发了 CARS 信号,但是 CARS 信号强度并不相同,这是因为在不同的泵浦-斯托克斯时间延迟,不同的拉曼振动被激发。从这6幅光谱聚焦 CARS 图像可以看出,聚苯乙烯粉末产生的 CARS 信号经历了先增强、后减弱、再增强、再减弱的变化过程。

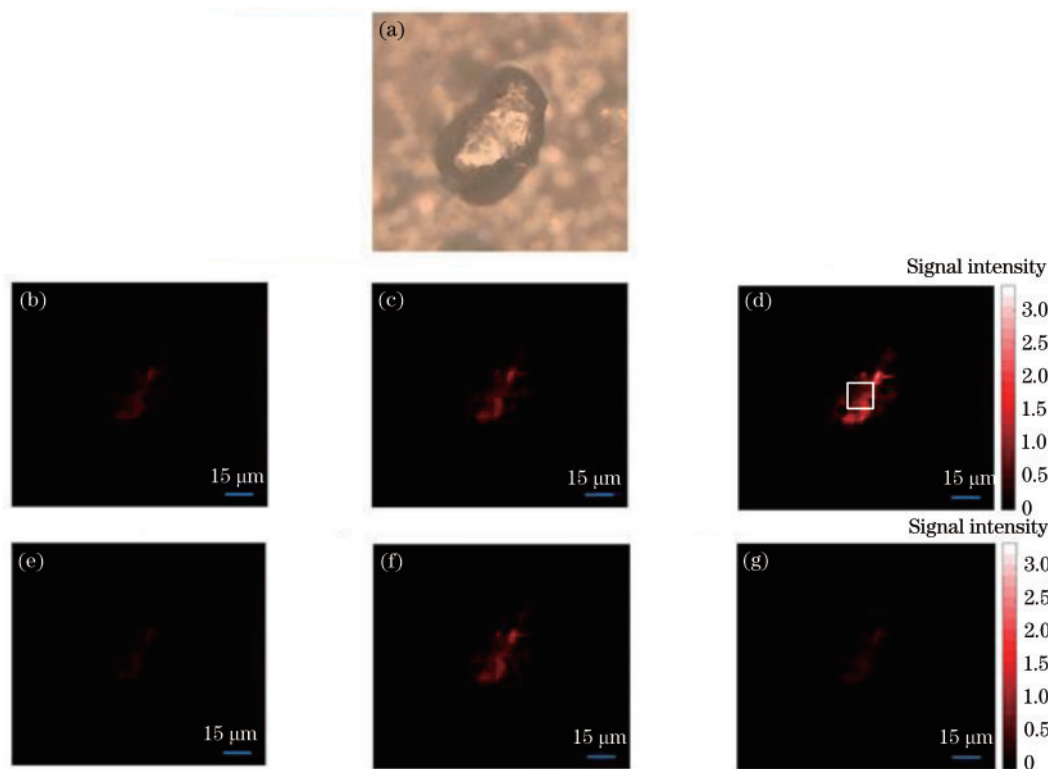


图4 CARS 显微成像结果。(a)目镜视场中的聚苯乙烯粉末样品图片;(b)~(g)泵浦-斯托克斯延迟分别为  $100, 320, 540, 660, 900, 1200\ \text{fs}$  时,聚苯乙烯样品的 CARS 显微成像结果

Fig. 4 CARS microscopic imaging results. (a) Image of the polystyrene powder sample in the field of view of the eyepiece; (b)~(g) CARS microscopic imaging results of sample in the red frame range with pump-Stokes delays of  $100, 320, 540, 660, 900, 1200\ \text{fs}$

为了详细了解 CARS 信号强度随泵浦-斯托克斯时间延迟变化而变化的趋势,在调节泵浦-斯托克斯时间延迟过程中拉曼振动的激发情况下,选取中心位置有明显 CARS 信号的区域为信号区,如图4(d)中方框区域所示。将实验中在不同延迟时间下聚苯乙烯粉末信号区大于  $1.5$  的 CARS 信号强度累加起来并进行归一化处理,获得信号区 CARS 信号强度随泵浦-斯托克

斯时间延迟变化的归一化变化曲线,即归一化的光谱聚焦 CARS 信号强度谱,如图5(a)所示。光谱聚焦 CARS 信号强度谱曲线呈现出4个 CARS 信号强度峰值,分别出现在泵浦-斯托克斯时间延迟为  $400\ \text{fs}, 520\ \text{fs}, 627\ \text{fs}$  及  $893\ \text{fs}$  的情况下。利用便携式拉曼光谱仪(BWS415-785H, B&W Tek 公司)测得聚苯乙烯粉末的自发拉曼光谱,系统可激发的拉曼波数为  $650 \sim$

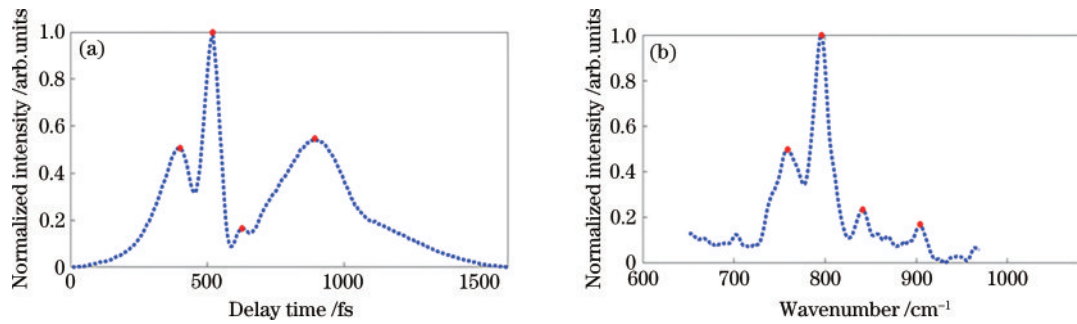


图5 对比结果图。(a)聚苯乙烯的光谱聚焦CARS信号强度谱;(b)聚苯乙烯的拉曼光谱

Fig. 5 Comparison results. (a) Spectral focusing CARS signal intensity spectrum of polystyrene; (b) Raman spectrum of polystyrene

950  $\text{cm}^{-1}$ ,在该范围内聚苯乙烯的归一化拉曼光谱如图5(b)所示。

通过比较图5(a)和图5(b)可以发现,聚苯乙烯的光谱聚焦CARS信号强度谱和650~950  $\text{cm}^{-1}$ 范围内的拉曼光谱具有相似的变化趋势。在拉曼光谱中,位于759  $\text{cm}^{-1}$ 、796  $\text{cm}^{-1}$ 、841  $\text{cm}^{-1}$ 及904  $\text{cm}^{-1}$ 的4个峰值在光谱聚焦CARS信号强度谱中得到对应映射,分别对应光谱聚焦CARS信号强度谱中位于400 fs、520 fs、627 fs及893 fs位置的峰值。可见,当泵浦-斯托克斯时间延迟为400 fs、520 fs、627 fs及893 fs时,光谱聚焦成像系统分别实现了对聚苯乙烯分子中759  $\text{cm}^{-1}$ 、796  $\text{cm}^{-1}$ 、841  $\text{cm}^{-1}$ 及904  $\text{cm}^{-1}$ 位置的拉曼振动激发,通过改变泵浦-斯托克斯时间延迟,实现了对拉曼振动的切换。同时,聚苯乙烯的光谱聚焦CARS信号强度谱和拉曼光谱也存在一定的差异,光谱聚焦CARS信号强度谱中,泵浦-斯托克斯时间延迟为893 fs时的峰值是一个强峰,而在拉曼光谱中对应的是一个弱峰,二者在强度和谱型上存在较大差异。这是由于当泵浦-斯托克斯时间延迟为893 fs时,泵浦光脉冲和斯托克斯光脉冲重合度高,产生明显的非共振背景。受其影响,CARS信号强度明显增强,聚苯乙

烯的光谱聚焦CARS信号强度谱相较拉曼光谱产生了光谱畸变,在接下来的研究工作中对非共振背景的抑制将会是研究重点。

在光谱分辨率方面,光谱聚焦CARS显微成像系统的光谱分辨率可以由光谱聚焦CARS信号随泵浦-斯托克斯延迟时间变化的强度谱进行标定,成像系统采集到归一化的强度谱如图5(a)所示。第二强度峰具有优于其他峰的强度和线宽,半峰全宽为72 fs。图中的泵浦-斯托克斯延迟时间和拉曼波数具有线性的对应关系,72 fs对应22.2  $\text{cm}^{-1}$ ,故系统的光谱分辨率可以达22.2  $\text{cm}^{-1}$ 。在空间分辨率方面,利用MATLAB软件找到图6(a)聚苯乙烯CARS显微成像中竖线位置的A区域,A区域聚苯乙烯样品CARS信号的强度由灰暗至明亮再到灰暗,理论上强度变化应为高斯曲线型。该区域聚苯乙烯样品CARS信号强度经高斯点扩散函数拟合后的曲线如图6(b)所示,实线为理想高斯曲线,实心点为采样点。可以看出,此处CARS信号强度变化近似为高斯线型,其半峰全宽即为实际的分辨率大小。通过比例转换,能够得到半峰全宽为3.5  $\mu\text{m}$ 左右,因此可以推算出成像系统的空间分辨率可达3.5  $\mu\text{m}$ 。

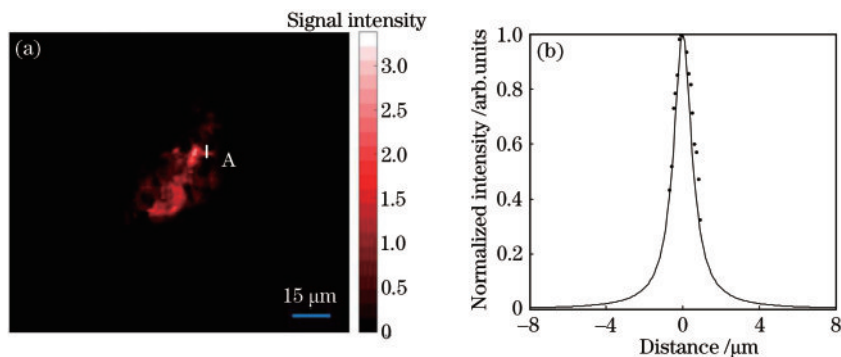


图6 高斯拟合结果。(a)聚苯乙烯CARS显微成像;(b)A区域CARS信号高斯拟合曲线

Fig. 6 Gaussian fitting result. (a) CARS microscopic imaging of polystyrene; (b) Gaussian fitting curve of CARS signal in region A

### 3.2 聚苯乙烯光谱聚焦CARS显微成像三维重构

实现样品的3D成像是CARS显微成像的重要内容,由于CARS过程是三阶非线性光学过程,拥有卓越的空间分辨率,可以实现对样品的断层扫描成像。

由图5(a)可以看出,当泵浦-斯托克斯时间延迟为520 fs时,可以获得极强的CARS信号强度,非共振背景干扰微弱,可以实现高对比度的CARS成像结果。因此,将泵浦-斯托克斯时间延迟固定在520 fs,通过对

聚苯乙烯分子中  $796\text{ cm}^{-1}$  拉曼振动进行激发,开展聚苯乙烯样品的三维成像研究。

对图 7(a)所示的近三角形聚苯乙烯粉末开展三维成像研究,在三维成像过程中,利用 Z 轴扫描方法,以固定步距  $1\text{ }\mu\text{m}$  移动物镜焦面,在  $0\sim 16\text{ }\mu\text{m}$  的 Z 轴范

围自下而上对样品进行断层扫描。对图 7(a)所示的近三角形聚苯乙烯粉末进行 CARS 显微成像,实现 17 处 Z 轴位置的 CARS 显微成像结果,其中  $0, 4, 7, 10, 13, 16\text{ }\mu\text{m}$  位置的 CARS 显微成像结果如图 7(b)~(g)所示。

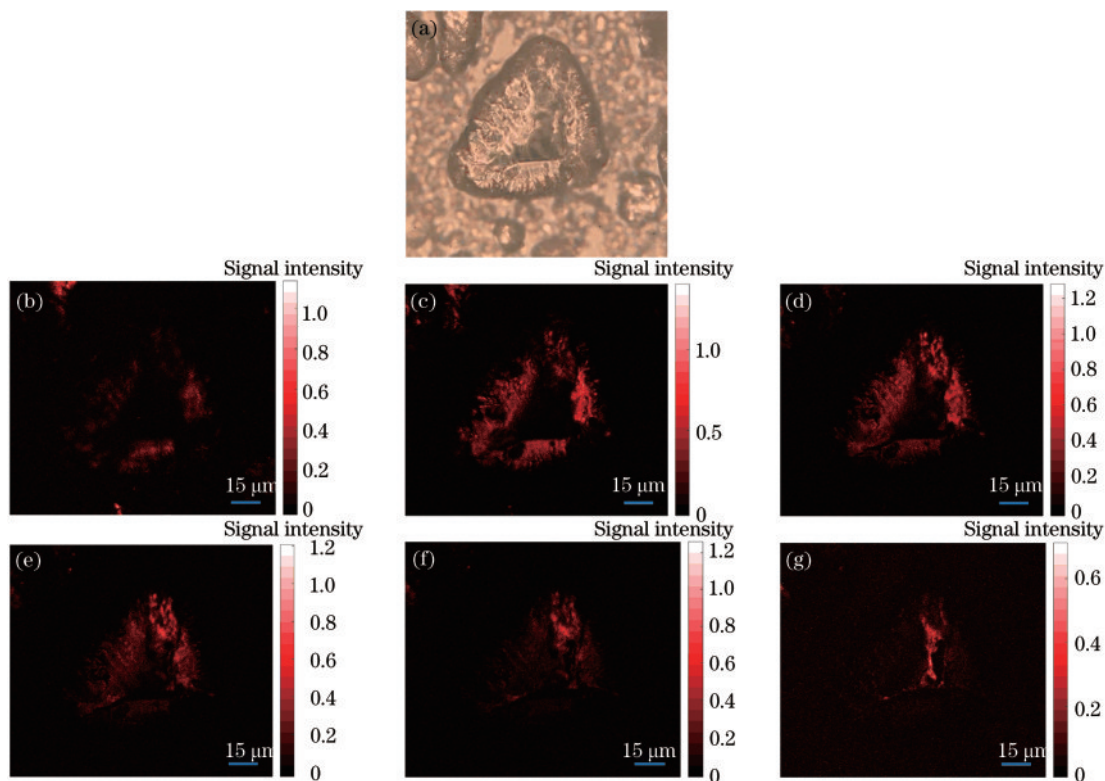


图 7 CARS 显微成像结果。(a)目镜视场中的聚苯乙烯粉末样品图片;(b)~(g)Z轴扫描方法得到的位于  $0, 4, 7, 10, 13, 16\text{ }\mu\text{m}$  位置的 CARS 显微成像结果

Fig. 7 CARS microscopic imaging results. (a) Image of the polystyrene powder sample in the field of view of the eyepiece; (b)~(g) results of CARS microscopic imaging at the positions of  $0, 4, 7, 10, 13, 16\text{ }\mu\text{m}$  obtained by Z-axis scanning

随着焦面位置的变化,聚苯乙烯粉末产生的 CARS 信号分布出现了明显变化,这一定程度上反映了 CARS 显微成像具有高空间分辨率的特性,随后利用三维重构方法获得图 7(a)中聚苯乙烯粉末的 3D 成像结果。图 8(a)为聚苯乙烯样品的 3D 重构结果,对

应的空间体积为  $150\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m} \times 16\text{ }\mu\text{m}$ 。3D 成像结果的俯视图如图 8(b)所示,从中能够清晰地看出聚苯乙烯样品的结构变化。对比目镜观测的图像和 3D 成像结果,CARS 显微成像高度还原了样品的 3D 轮廓和表面细节,并呈现出更清晰的对比度,呈现出目镜观

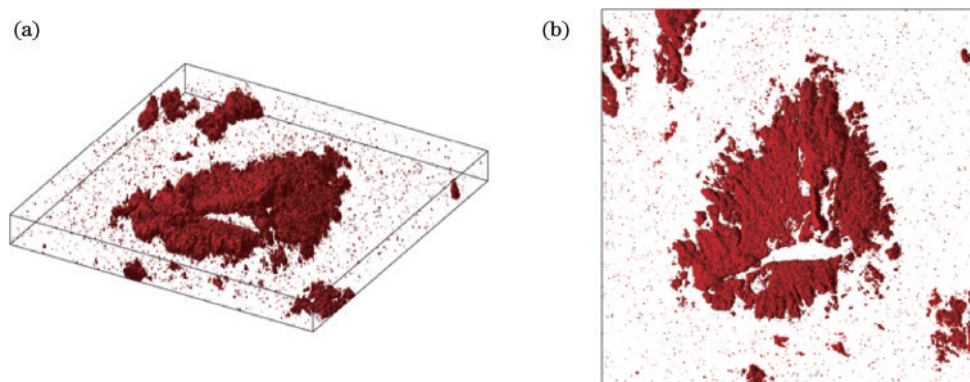


图 8 三维成像结果。(a)近三角形聚苯乙烯粉末的 3D 重构;(b)3D 重构的俯视图

Fig. 8 Three-dimensional imaging results. (a) 3D reconstruction of nearly triangular polystyrene powder; (b) top view of 3D reconstruction

测图像不具备的 3D 立体感。

## 4 结 论

利用单个飞秒激光振荡器搭建了光谱聚焦 CARS 显微成像系统,实现了对聚苯乙烯样品的低指纹区 ( $650\sim 950\text{ cm}^{-1}$ ) 光谱聚焦 CARS 显微成像。通过改变泵浦-斯托克斯时间延迟,得到了对应不同延迟时间的成像结果,并获得了光谱聚焦 CARS 信号随泵浦-斯托克斯时间延迟变化的强度谱;通过与聚苯乙烯的拉曼光谱对比,分析了调谐泵浦-斯托克斯时间延迟过程中拉曼振动的激发情况,并观察到了非共振背景的影响。通过固定泵浦-斯托克斯时间延迟,激发聚苯乙烯  $796\text{ cm}^{-1}$  位置的拉曼振动。利用 Z 轴扫描方法,实现了对聚苯乙烯粉末的三维断层扫描,通过三维重构,实现了对聚苯乙烯粉末的 3D 成像。

### 参 考 文 献

- [1] Garbacik E T, Korai R P, Frater E 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(4): 046009.
- [2] 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.
- [3] 曹怡涛, 王雪, 路鑫超, 等. 无标记光学显微成像技术及其在生物医学的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617012.  
Cao Y T, Wang X, Lu X C, et al. Label-free optical microscopy technique and its biomedical applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617012.
- [4] 杨泽文, 张璐, 吕宁, 等. 生物折射率三维无标记定量成像研究进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507201.  
Yang Z W, Zhang L, Lü N, et al. Progress of three-dimensional, label-free quantitative imaging of refractive index in biological samples[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507201.
- [5] 王潇, 涂世杰, 刘鑫, 等. 三维超分辨显微成像技术的研究进展及展望[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(22): 2200001.  
Wang X, Tu S J, Liu X, et al. Advance and prospect for three-dimensional super-resolution microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(22): 2200001.
- [6] Mizuguchi T, Momotake A, Hishida M, et al. Multimodal multiphoton imaging of the lipid bilayer by dye-based sum-frequency generation and coherent anti-stokes Raman scattering[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(8): 5656-5660.
- [7] Pohling C, Bocklitz T, Duarte A S, et al. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy of brain tissue with higher ranking data classification for biomedical imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(6): 066005.
- [8] Knutsen K P, Johnson J C, Miller A E, et al. High spectral resolution multiplex CARS spectroscopy using chirped pulses[J]. *Chemical Physics Letters*, 2004, 387(4/5/6): 436-441.
- [9] Konradi J, Singh A K, Materny A. Selective excitation of molecular modes in a mixture by optimal control of electronically nonresonant femtosecond four-wave mixing spectroscopy[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, 180(3): 289-299.
- [10] Lütgens M, Chatzipapadopoulos S, Lochbrunner S. Ultrafast CARS with improved spectral resolution[J]. *EPJ Web of Conferences*, 2013, 41: 05007.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Langbein W, Rocha-Mendoza I, Borri P. Single source coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing[J]. *Applied Physics Letters*, 2009, 95(8): 081109.
- [15] 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.
- [16] Pegoraro A F, Ridsdale A, Moffatt D J, et al. Optimally chirped multimodal CARS microscopy based on a single Ti: sapphire oscillator[J]. *Optics Express*, 2009, 17(4): 2984-2996.
- [17] Pegoraro A F, Ridsdale A, Moffatt D J, et al. All-fiber CARS microscopy of live cells[J]. *Optics Express*, 2009, 17(23): 20700-20706.
- [18] Pegoraro A F, Slepikov A D, Ridsdale A, et al. Hyperspectral multimodal CARS microscopy in the fingerprint region[J]. *Journal of Biophotonics*, 2014, 7(1/2): 49-58.
- [19] Mohseni M, Polzer C, Hellerer T. Resolution of spectral focusing in coherent Raman imaging[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 10230-10241.
- [20] Herdzik K P, Bourdakos K N, Johnson P B, et al. Multimodal spectral focusing CARS and SFG microscopy with a tailored coherent continuum from a microstructured fiber[J]. *Applied Physics B*, 2020, 126(5): 84.