

时域相干拉曼散射技术浅析(特邀)

余乔智, 祁亚峰, 熊汗青*

北京大学未来技术学院, 国家生物医学成像科学中心, 北京 100871

摘要 相干拉曼散射(CRS)技术作为一种重要的无标记化学成像技术,通过相干激发分子协同振动对拉曼散射信号进行增益,显著地提高了成像速度,广泛应用于材料学、生物化学、肿瘤诊断、药代动力学等领域。超快脉冲激光器的出现实现了亚皮秒持续时间的脉冲输出,使得通过脉冲激发实现大量振动模式的同步相干激发成为新的CRS实现途径。从相干拉曼散射基本原理出发,介绍时域相干拉曼散射的主要实现途径,着重讨论时域受激拉曼散射(SRS)和时域相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)的最新进展与应用。

关键词 拉曼光谱技术; 相干拉曼散射; 受激拉曼散射; 相干反斯托克斯拉曼散射; 时域; 频域

中图分类号 O437

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP240515

Time-Domain Coherent Raman Scattering Techniques (Invited)

Yu Qiaozhi, Qi Yafeng, Xiong Hanqing*

National Biomedical Imaging Center, College of Future Technology, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract Coherent Raman scattering (CRS) is an important label-free chemical imaging modality that enhances Raman scattering signals via the coherent excitation of vibrational modes in molecules. Coherent enhancement considerably increases the speed of imaging and has various applications in many fields, such as material science, biochemistry, tumor diagnosis, and pharmacokinetics. The emergence of ultrafast pulsed lasers with sub-picosecond pulse durations has introduced novel pathways for CRS through the impulsive excitation of numerous vibrational modes in a synchronous and coherent manner. After discussing the fundamental principles of CRS, this study introduces the main methods of time-domain CRS. Moreover, the latest advances and applications of time-domain stimulated Raman scattering (SRS) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) have been discussed.

Key words Raman spectroscopy; coherent Raman scattering; stimulated Raman scattering; coherent anti-Stokes Raman scattering; time-domain; frequency-domain

1 引言

当光与物质相互作用发生散射时,绝大部分散射光的频率不变(弹性散射),而其中极小一部分散射光则会发生频率变化(非弹性散射)。拉曼散射是一种典型的非弹性散射,它由印度物理学家Raman^[1]于1928年首次发现。拉曼散射的经典光学定性解释非常直观,即介质中微观分子振动导致介质极化率的变化,这种极化率随分子振动的变化会对入射光进行调制,进而导致散射光频率的变化。然而传统自发拉曼散射的信号十分微弱,典型的拉曼模式散射截面仅为 10^{-30} cm²^[2],比典型单分子荧光染料的吸收截面小

10^{14} 。因此,多种拉曼信号增强技术应运而生,其中典型代表为相干拉曼散射(CRS)技术。相干拉曼散射是一种相干激发过程,经典光学认为是双色激光场的干涉拍频驱动分子作受迫振动,即泵浦激光和斯托克斯激光的频率差($\omega_p - \omega_s$)与分子某拉曼振动模式共振,在此过程下所有被激发的分子振动具有明确的相位关系,因此振动引起的光场调制可以干涉相长,实现巨大的增益。与自发拉曼散射相比,在不引起生物体明显光损伤的光功率下,其效率可提高 10^8 倍^[3-4]。

与自发拉曼散射不同,在CRS中,通常需要利用泵浦和斯托克斯两束激光来激发样品。若探测的分子振动模式的谐振频率为 ω_R ,当满足共振条件($\omega_p -$

收稿日期: 2024-01-12; 修回日期: 2024-02-09; 录用日期: 2024-02-19; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(62275004)

通信作者: *xiong.hanqing@pku.edu.cn

$\omega_s = \omega_R$)时,被激发的分子会发生协同相干振动^[5],产生 4 种主要的相干拉曼过程:相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)、相干斯托克斯拉曼散射(CSRS)、受激拉曼损耗(SRL)及受激拉曼增益(SRG)。CARS 过程会产生频率为 $2\omega_p - \omega_s$ 、相对泵浦光偏蓝的反斯托克斯光。由于产生了新的频率成分,因而需要考虑相位匹配条件。该过程本质上是一个中间能级(即分子拉曼振动能级)共振的四波混频过程,必然伴随其他介质分子(比如溶剂等非共振状态的分子)的非共振四波混频过程导致的非共振背景,并且信号的大小与待测分子的浓度、拉曼散射截面并不成线性关系^[6]。而 CSRS 过程的信号(频率为 $2\omega_s - \omega_p$)较斯托克斯光红移,会受到较强的荧光干扰,因而很少用于 CRS 的研究中。SRL 和 SRG 为受激拉曼散射(SRS)过程,由于产生的信号场频率与泵浦或斯托克斯场频率一致,天然实现相位匹配,其信号大小与分子浓度和拉曼散射截面成线性关系。CARS 和 SRS 都是广泛用于生物医学成像的三阶非线性过程,但信号特征不同,实际应用时需要考虑的具体技术细节也不同。

CARS 在 1965 年被福特公司的科学家 Terhune 和 Maker 等^[7]首次报道。使用气体激光器激发, Duncan 等^[8]在 1982 年首次将 CARS 应用于成像领域。1999 年哈佛大学谢晓亮研究组^[9]使用大数值孔径物镜聚焦高重复频率的窄带皮秒激光进行共线激发,实现了活细胞的三维 CARS 显微成像,引起了人们对相干拉曼散射显微镜这一领域广泛的关注。然而 CARS 信号固有的非共振背景以及信号强度与被检测物浓度之间的非线性关系影响了其在定量研究上的应用。SRS 现象于 1962 年被首次报道^[10],随后在 1977 年 Owyong 等^[11]用连续激光发展了 SRS 光谱学。2008 年,谢晓亮研究组^[12]利用共线皮秒激光激发以及锁相放大技术发展出了高速、高灵敏度的 SRS 成像系统,拉开了现代 SRS 成像研究的序幕。SRS 无相位匹配问题,受非共振背景的干扰较弱,所探测到的光谱与自发拉曼基本一致(即信号与分子浓度或散射截面成线性关系)。这些优势使得 SRS 在显微成像领域迅速发展。

当前用于生物医学成像领域的相干拉曼光谱成像技术主要以双色场频域激发技术为主。例如,在频域受激拉曼散射成像中,窄带皮秒的激发策略^[12-13]实现了在生物样品中高灵敏、快速的化学特异性成像,而宽带飞秒脉冲^[14]和窄带皮秒脉冲^[15-16]结合的激发策略则实现了高光谱的多色成像。然而,窄带皮秒脉冲的脉宽较大,能量密度较低,这导致激发效率较低且时间分辨能力较差;飞秒脉冲虽然能达到较高的激发效率和时间分辨能力,但较大的带宽却使得其在频域的光谱分辨率下降。这一频域-时域的不确定性关系是频域 SRS 技术无法规避的典型约束。

超快脉冲激光的发展、亚皮秒激光的普及为通过

超短脉冲激发实现大量分子振动模式的同时相干激发提供了基础。其中,脉冲激发受激拉曼散射(ISRS)和傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射(FT-CARS)利用超短脉冲激光来激发样品中的分子振动并从时域探测拉曼散射信号。从时域采集信号的方法绕开了不确定性关系的制约,兼具了高光谱分辨率与高时间分辨率,因此可以用于研究分子振动和精细的动力学过程^[17-19],为分子光谱学与显微成像领域提供了新的选择。经过多年的发展,时域相干拉曼散射技术已经演化出多种变种和分支,因此通过一篇文章难以详尽描述其全貌。本文将主要关注两种主流技术,即所述的 FT-CARS 和 ISRS。将从脉冲激发的基本原理出发,介绍时域相干拉曼散射的实现过程,并着重介绍 FT-CARS 和 ISRS 的研究进展和最新应用。

2 基本原理

常规的频域相干拉曼散射过程利用双色激发场完成某单一目标分子振动的相干激发,而脉冲激发拉曼散射则通过较宽带的单脉冲激发实现大量目标振动模式的相干激发。首先考虑脉冲激发的时域物理图像。当光与物质相互作用时会激发分子偶极产生振荡。如果单脉冲激发下的频谱宽度大于目标拉曼模式的振动频率,即激发脉冲宽度小于分子振荡的偶极振荡周期,那么光场就只会作用在分子振荡的初始阶段,随后分子在没有电场的情况下作自由的振荡弛豫。这种振荡会对物质的极化率产生一个周期性的调制,可以通过一束探测光检测样品折射率的变化从而获取分子的振动信息。常用的分子振动频率在 $30\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ($1\sim 100\text{ THz}$) 范围内,对应的振动周期在 1 ps 到 10 fs 的范围内^[20]。一般情况下为了获得较高波数的光谱信号,单脉冲激发选取的激光脉宽普遍小于 100 fs。为实现这一激发策略,需要能发出超短脉冲的激光光源,这也是 ISRS 技术起步的一个难题。传统的氩氦激光器、半导体激光器等无法将脉冲压缩到几十飞秒的量级(即频谱范围几十太赫兹),因此不具备进行 ISRS 实验的条件^[20]。不过随着激光技术的发展与革新,相继出现了锁模染料激光器、固态克尔透镜锁模激光器(典型代表为钛蓝宝石(Ti:Sapphire)激光器)以及锁模光纤激光器、光纤超连续谱产生激光器等新一代超快激光器,将激光脉宽压缩到了几十飞秒乃至十飞秒以下,这也为开展 ISRS 实验研究提供了先决条件。

在拥有脉宽低至数十飞秒的脉冲激光光源后,研究人员开始使用脉冲激发受激拉曼散射以极高的时间分辨率探测分子中的超快动力学过程。1985 年麻省理工学院的 Nelson 教授团队^[21]首次演示了在时域采集信号的脉冲激发受激拉曼散射,并随后在 CH_2Br_2 中成功检测到了 173 cm^{-1} 位置的卤素弯曲模式^[22]。他们的激发策略被称为“瞬态光栅”:两束同源但不共线的

脉冲激光同步作用在样品上,通过受激拉曼散射过程向分子振动模式施加周期性的驱动力,得到样品中分子振动频率为 Ω_m 的驻波振荡响应,如图 1(a)所示。需

要注意的是,为了实现脉冲激发受激拉曼散射,此时激发脉冲的脉冲宽度 τ_p 应当小于目标拉曼模式的振荡周期 τ_m 。

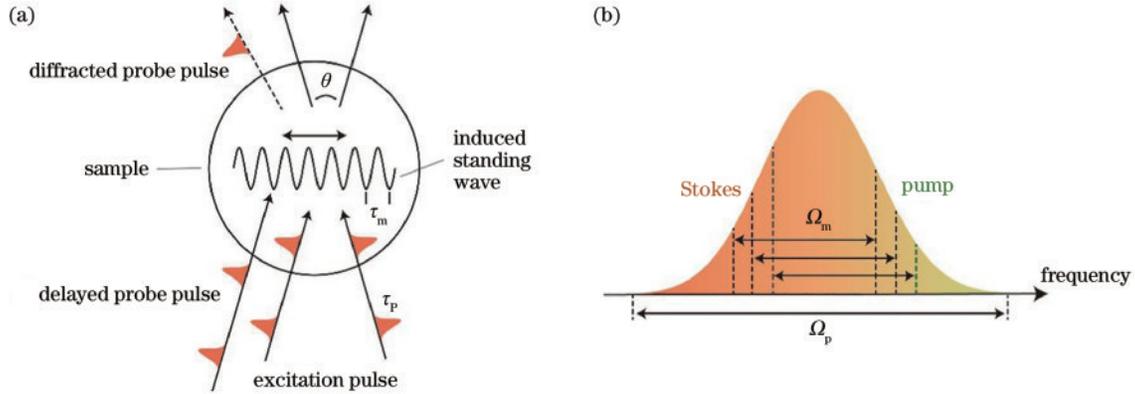


图 1 脉冲激发受激拉曼散射。(a)脉冲激发受激拉曼散射的“瞬态光栅”激发策略示意图;(b)对应的脉冲频域范围与振动模式频率之间的关系

Fig. 1 Impulsive stimulated Raman scattering. (a) Schematic of ISRS; (b) relationship between spectral range of laser pulse and frequency of certain vibrational mode

从频域上理解,对应激发脉冲的频率覆盖范围 Ω_p 应当大于分子的振动频率 Ω_m ,才能通过单脉冲激发产生拉曼过程,如图 1(b)所示。频率为 Ω_m 的驻波振荡会周期性调制样品的电极化率,因此当一束延时可调的探测脉冲(可由同一激光器产生)以特定角度入射时,会在相位匹配角方向产生相干散射,即发生衍射现象,就像经过了光栅作用一般。基于此,根据探测衍射的 ISRS 信号的振荡周期和衰减速率,就可以得到样品中分子的振动频率和其退相干速率。

入到激光扫描显微镜中,如图 2 所示。通过调整脉冲之间的时间延迟实现了对 CARS 信号的时间分辨,最终通过对时域相干强度迹线进行傅里叶变换,得到了聚苯乙烯中最高达到 1500 cm^{-1} 的包含多个拉曼峰的光谱数据。

对于一个带宽较大的脉冲,分子的一个特定振动模式 (Ω_m) 的激发由频谱内所有满足共振条件的频率成分对所决定,如图 1(b)所示。最终分子振动态 (Ω_m) 的概率幅大小(其平方代表该振动能级上的布居数)^[23] 可以表示为

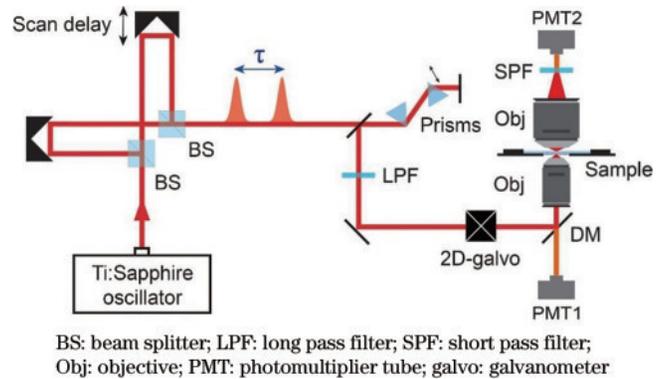


图 2 傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射系统示意图^[25]
Fig. 2 Setup of FT-CARS system^[25]

$$A(\Omega_m) \propto \int |E(\omega)| |E(\omega - \Omega_m)| e^{i[\phi(\omega) - \phi(\omega - \Omega_m)]} d\omega, \quad (1)$$

式中: Ω_m 代表共振模式所处的频率。从式(1)容易得出,当所有满足共振条件的频率成分对之间保持同相位时,产生的信号强度最大,而这一条件仅当脉冲满足傅里叶变换极限时才成立。因此, ISRS 的实验光路中普遍需要引入严格的色散管理。这意味着 ISRS 系统中的群速色散(GVD)、三阶色散(TOD)甚至一些空间色散效应都需要被严格校正^[24]。常用的方法包括采用光栅对、棱镜对(补偿二阶和三阶色散)及空间光调制器(补偿任意色散)等。

图 3 展示了 FT-CARS 的时域作用图景。可调相对延时的泵浦和斯托克斯脉冲对序列(在 FT-CARS 中实际上是同一脉冲的不同频率成分)周期性作用在样品上。通过进行延时扫描来探测两个脉冲先后激发的分子振动随延时变化的相干特性。当两个脉冲的相对延时为分子振动周期的整数倍时(相干时间内),即 $\tau = k\tau_m$, 两次脉冲激发的振动相干相长,增强了偶极振荡,导致产生的 CARS 信号增强;而当两次脉冲激发的振动相位反向导致相干相消时(图 3 中右侧脉冲对),产生的 CARS 信号就会减弱。这一激发相干过程使得分子振动频率 Ω_m 被编码进 CARS 信号的时域相干迹线中,并可以通过傅里叶变换得到解码。此外,因为 FT-CARS 采用了共线激发与探测策略,所以其相

相较于 ISRS 中单独使用探测脉冲探测介质极化率的调制,直接探测相干拉曼散射信号强度随时间的变化无疑是更直接的一种思路。FT-CARS 就采用了这一探测方式。最早 FT-CARS 显微成像技术报道于 2006 年^[25]。Joffre 研究组使用 20 fs 的单一飞秒激光源和迈克耳孙干涉仪,以生成两个脉冲副本,并将它们输

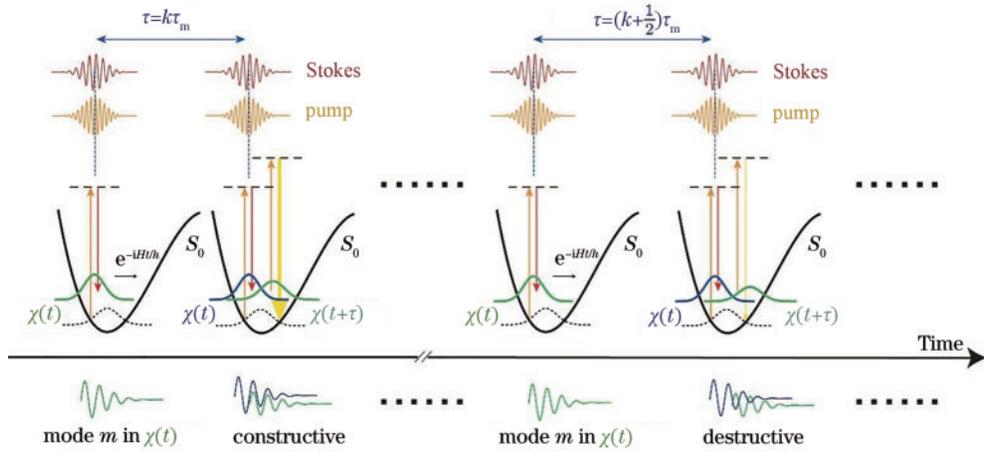


图3 FT-CARS的时域作用图景。时间轴上方是脉冲对序列激发包含多个振动模式的振动波包 $\chi(t)$ 和 $\chi(t+\tau)$,时间轴下方是需要探测的某一单一频率的特定振动模式

Fig. 3 Time-domain picture of FT-CARS process. Above the time axis is the vibrational wave packets $\chi(t)$ and $\chi(t+\tau)$ excited by pulse-pair sequence, which contain various vibrational modes. Below the time axis is the vibration of the target mode with single frequency to be detected

较初代 ISRS 更易应用于成像领域。Joffre 研究组也利用 FT-CARS 首次实现了聚苯乙烯微球的高光谱成像^[25]。

3 主要技术及进展

介绍的 ISRS 技术和 FT-CARS 经过多年的发展,已经演化出多种变种和分支,并在光谱范围、探测灵敏度、光谱通量、延时扫描等各方面均取得了突破,且部分技术已经应用于成像领域。将分别介绍脉冲激发受激拉曼散射和傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射的主要进展。

3.1 脉冲激发受激拉曼散射的主要进展

Nelson 研究组提出瞬态光栅 ISRS 激发策略后,Oron 研究组对其进行改进,基于同样的原理提出了瞬态透镜的激发策略^[26]。他们根据时间改变泵浦和探测脉冲聚焦在样品上的空间重叠程度,重叠区域的折射率以中心为最大值,呈近似双曲线变化。基于此原理

探测到了拉曼过程引起的克尔效应导致的光强的时间、空间变化(通过孔径约束探测)。瞬态透镜的共线激发的光路使其更易应用于成像中,Oron 研究组也在文中以 2D 图谱初步展示了 CH_2Br_2 等物质的空间散射截面随延时的变化关系。

McMorrow 等^[27]则利用平衡探测光克尔效应(OHD-OKE)来探测样品的折射率调制,通过不同探测光偏振产生的双折射得到强度调制的 ISRS 信号。他们利用非共线的泵浦光和探测光激发,且彼此的线偏振相差 45° 。当延时发生变化时振动强度被调制,因而探测光产生的双折射随延时变化,通过交叉偏振检测探测光的强度,可以得到其随时间的变化关系。

此外,还可以直接通过激发过程产生的相位差来探测样品折射率的调制,基于 Sagnac 干涉仪的 ISRS 探测方法先后被 Martinez 研究组^[28]和 Goda 研究组^[29]报道,如图 4 所示,这一策略主要利用了 Sagnac 干涉仪,

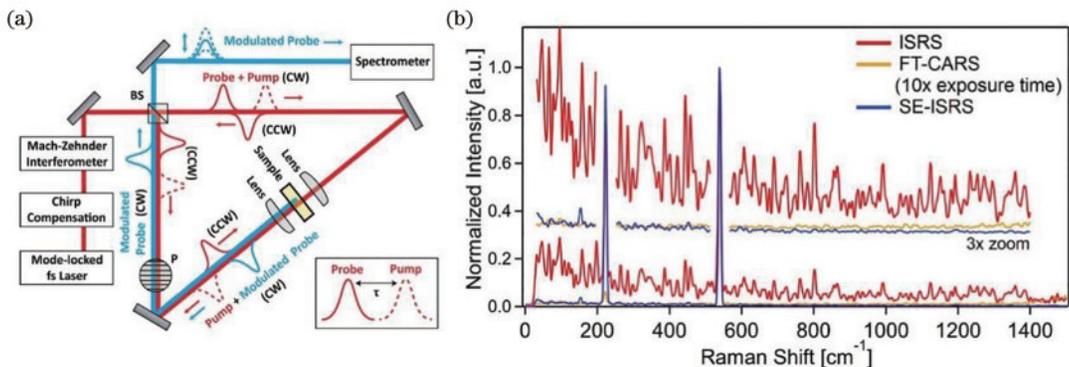


图4 Sagnac增强的脉冲激发受激拉曼散射^[28]。(a) SE-ISRS的光路示意图;(b) ISRS、FT-CARS和SE-ISRS采集的溴仿的拉曼光谱对比

Fig. 4 Sagnac-enhanced impulsive stimulated Raman scattering^[28]. (a) Schematic of SE-ISRS optical path; (b) comparison of Raman spectra of bromoform acquired by ISRS, FT-CARS, and SE-ISRS spectroscopies

使得低波数占主导的瑞利散射背景干涉产生相干相消,而产生的 ISRS 信号经过干涉仪后的强度随两臂相位差(正比于折射率)而被调制,其包含的振动模式可以通过傅里叶变换得到,光路如图 4(a)所示。这一策略较好地压制了非共振背景,大幅度提高了低波数 ISRS 光谱的信噪比;如图 4(b)所示,Godá 研究组的光谱强度相较于传统 ISRS 提高了 5 倍以上。此后 Godá 团队^[30]通过同时检测 SE-ISRS 和 FT-CARS 信号,在低波数和指纹区实现了每秒 24000 个光谱的采集速度,信噪比相较于单独的 SE-ISRS 或 FT-CARS 都有大幅提升。

前述方法主要基于两束具有相对延时脉冲的共同作用实现对样品分子的激发。然而,随着脉冲整形技术的不断发展,能够仅通过一束单独的超短脉冲来实现对样品的激发与检测。这一技术进步显著简化了光谱或成像系统的复杂性,称为单脉冲激发受激拉曼散射技术。正如式(1)所示,光谱中两频率成分 ω 和 $\omega -$

Ω_m 之间相互干涉决定了特定分子模式 Ω_m 的激发效率。然而,如果对光谱相位以频率 Ω 进行周期性的调制,那么除了特定振动模式 $\Omega_m = N\Omega$ 之外,其他模式均干涉相消,从而实现了模式选择。从时域上看,周期性的光谱相位调制等价于将脉冲在时域上划分成一系列等间距的脉冲阵列,因此当分子振动模式 Ω_m 的周期与脉冲阵列之间的延时差 τ 匹配时,该模式就会被相干激发。Dudovich 等^[23]利用这一原理在 2002 年首次实现了单脉冲激发光谱及成像系统。具体实验系统使用一个输出 80 MHz 重复频率、20 fs 脉宽的变换极限脉冲的钛蓝宝石激光器、一个可编程空间光调制器^[31]、一个光探测器,实现了 400~800 cm^{-1} 范围的 CARS 光谱采集。图 5 展示了该脉冲整形系统和对含有 CH_2Br_2 的微孔板的成像结果。随后的研究中,通过更精细的激光脉冲选择,该研究团队成功将光谱探测范围拓展到整个指纹区域^[32]。

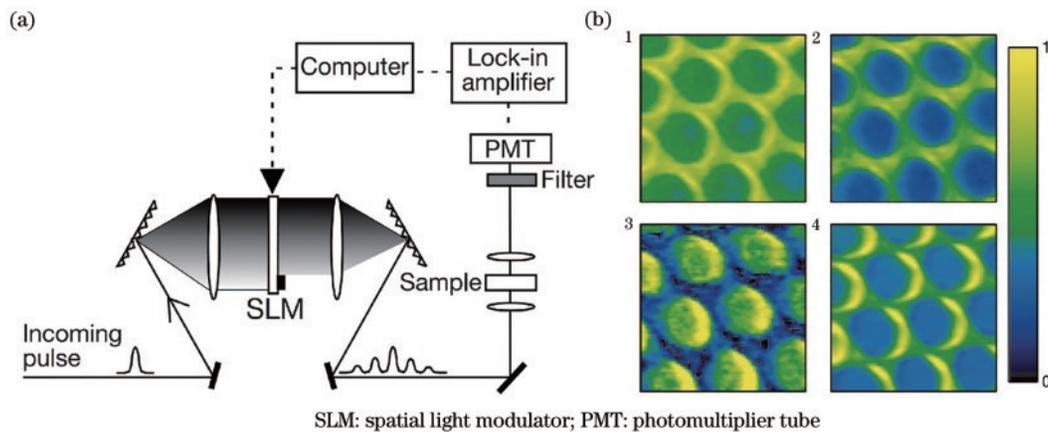


图 5 单脉冲激发受激拉曼散射^[23]。(a)单脉冲激发受激拉曼散射光路中的脉冲整形示意图;(b)含有 CH_2Br_2 的微孔板的成像结果,其中 1 和 2 为脉冲整形最大化和最小化相干激发 577 cm^{-1} 模式的成像结果,3 为图像 1 和图像 2 相减得到的结果,4 为使用傅里叶变换极限脉冲的成像结果

Fig. 5 Single-pulse impulsive stimulated Raman scattering^[23]. (a) Setup of pulse shaping in single-pulse ISRS; (b) single-pulse CARS images of a glass capillary plate with CH_2Br_2 . 1 is image with shaped pulse maximizing the resonant contribution of the CH_2Br_2 577 cm^{-1} level, 2 is image with shaped pulse minimizing the same mode, 3 is obtained by subtraction of image 1 and image 2, 4 is image obtained with Fourier transform-limited pulse

通过脉冲整形的方法还能演化出其他脉冲激发的策略。第一种策略是在脉冲光谱的高频位置的一个窄带宽内引入一个 π 的相位差,这导致在非共振背景出现了波谷的干涉特征,从而在几乎不影响共振信号大小的前提下一定程度上减少非共振背景^[33]。另一种策略是在脉冲光谱的高频位置使用一个 V 形的陷波滤波器^[34],同样可以达到减少非共振背景的作用。此外,基于单脉冲激发的策略还有许多变体。例如结合相位与振幅调制,以实现非共振背景的量子相干控制,从而实现更优的信噪比^[35]。也有其他研究者使用多组窄带的相位调制和滤波处理实现了更好的光谱采集效果^[36-37]。

基于上述技术发展的 ISRS 傅里叶变换迈克耳孙光谱仪可用于测量大批量透明液体。Falconieri 等^[38]

基于该仪器提出了一种基于其中一个光谱仪臂的快速调制延迟的数据采集策略,该策略可在更短的时间内测量散射和吸收样品。同时该仪器不会受到微气泡的产生、加热效应或样品中由于越来越高的激发而产生的热不稳定性的影响,非常适用于具有紧密光束聚焦的振动显微镜应用。ISRS 除了在常规的指纹区和高频区检测到光谱信号外,也可以探测到低区域拉曼谱线 ($< 200 \text{ cm}^{-1}$),Oron 研究组^[39]提出了一种通过激发拉曼散射引起的光谱位移来检测低频拉曼谱线的方法,可用于精密拉曼测量。该方法不需要任何光谱过滤,同样可以解决低波数区域拉曼谱线 ($< 200 \text{ cm}^{-1}$) 被强瑞利散射掩盖而无法探测的问题。

在 Oron 研究组^[40]的进一步研究中,利用声光可编程色散滤波器成功在卡马西平二水合物晶体 (CBZ

DH)中实现了基于光谱位移探测的低波数高光谱成像,达到了亚秒级的帧率,成像结果如图 6 所示。对比

发现,相较于克尔透镜探测方法,拉曼光谱位移探测能够得到更接近自发拉曼的光谱形状。

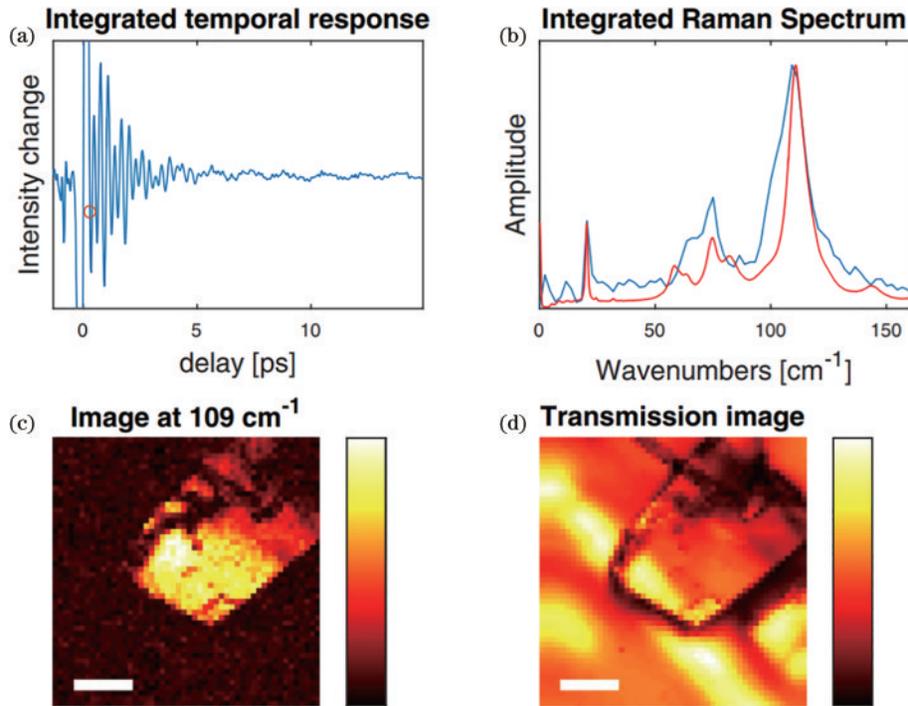


图 6 通过探测拉曼光谱位移得到的 CBZ DH 高光谱图像^[40]。(a)信号强度随延时的变化曲线;(b)对图 6(a)进行傅里叶变换得到的光谱(蓝线)和自发拉曼光谱(红线);(c)波数为 109 cm^{-1} 时对应的图像;(d)透射图像

Fig. 6 CBZ DH crystal measured by the Raman-induced spectral shift technique^[40]. (a) Measured modulated intensity as a function of the pump-probe delay; (b) Fourier transform of the time-domain oscillations resolves the vibrational frequencies of the molecules (blue) that can be compared with the spontaneous Raman spectrum from the same sample (red); (c) image resolved around 109 cm^{-1} ; (d) transmission image of the crystal

3.2 傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射的主要进展

FT-CARS 这一技术在近年得到了广泛的发展。在 Joffre 研究组首次实现 FT-CARS 探测后, Leone 研究组^[41]随后利用傅里叶光谱干涉法提取傅里叶变换的 CARS 信号(FTSI-CARS), 利用非共振背景信号是实数而共振信号是复数的特点, 得到了去背景的 CARS 信号。东京大学 Goda 团队^[42]则在 2017 年基于更高速的延时扫描技巧实现了超快的 FT-CARS 光谱采集, 实现了每秒 50000 个光谱的采集速度和 4.2 cm^{-1} 的光谱分辨率。随后 Goda 团队^[43]又将超快 FT-CARS 这一技术应用到了显微成像, 可以实现单像素仅 42 μs 的积分时间。图 7 展示了以 2.4 frame/s 帧率的图片采集速度对 100 \times 100 像素的聚合物微球和湖红球菌细胞进行高光谱成像的结果, 单次成像带宽可以覆盖 600~1200 cm^{-1} , 空间分辨率为 0.95 μm , 光谱分辨率为 37 cm^{-1} 。作为这一技术的后续应用, 基于 FT-CARS 的流式细胞仪可以高通量地获取指纹区的光谱(400~1600 cm^{-1}), 实现了高通量无标记的单细胞分析^[44]; 同时, 借助 FT-CARS 高光谱分辨的特点, 可以实现多通道检测, 从而进一步提高检测效率^[45]。

除了 Goda 团队展示的指纹区 FT-CARS 成像外,

研究人员在超低波数和高波数区域同样取得了进展。Ren 等^[46]开发了太赫兹相干反斯托克斯拉曼散射 (THz-CARS) 显微镜, 该显微镜通过使用相应成分的低频集体模式显示生物组织的化学选择性成像, 可在低至 20 cm^{-1} 的超低频率和约 14 cm^{-1} 的光谱分辨率情况下进行实验。该团队证明该技术可以在骨和火鸡腿肌腱中区分胶原蛋白和羟基磷灰石, 如图 8 所示, 该技术对观察生物大分子的低频振动模式并进一步阐明其相应的生物学功能具有重要意义。对于高波数的探测, Ideguchi 研究组^[47]使用了亚 10 fs 的极短脉冲探测到了高达 3240 cm^{-1} 的 CARS 光谱信号。近日, 清华大学尉昊赞研究组^[48]采用双色飞秒脉冲序列激发分子振动, 用两束 100 fs 左右的脉冲激光同样将 FT-CARS 的光谱探测范围延伸到了 3000 cm^{-1} 以上, 同时有效简化了使用极短脉冲所需的精细色散控制。这有助于 FT-CARS 技术探测拉曼静默区及以上波数的生物材料、聚合物及化学正交探针, 具有广阔的成像应用前景。

所述的 FT-CARS 技术基本都使用脉冲激光序列与干涉仪延时扫描系统。Picque 团队^[49]于 2013 年在 *Nature* 报道了基于双光梳光源产生延时变化的脉冲对序列激发 CARS 信号的全新激发策略, 这无疑是 FT-

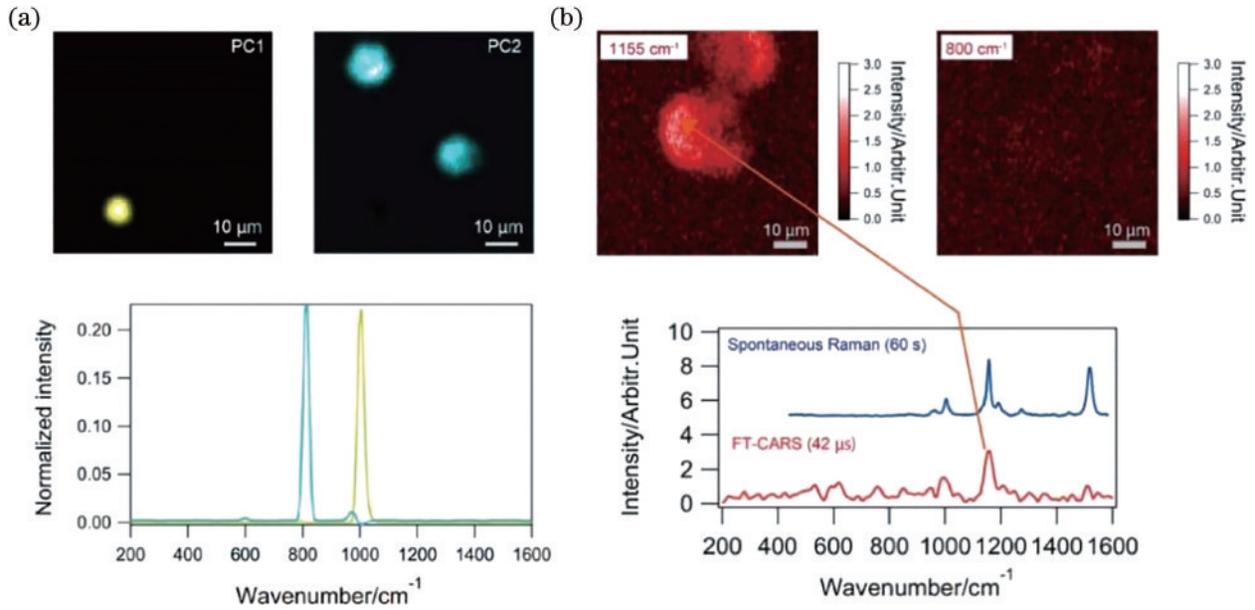


图 7 FT-CARS 成像结果^[43]。(a) 聚合物微球的高光谱成像结果, 左上和右上分别为 810 cm^{-1} 和 1003 cm^{-1} 处的成像结果, 下方为对应光谱; (b) 湖红球菌细胞的高光谱成像结果, 左上和右上分别为 1155 cm^{-1} 和 800 cm^{-1} 处的成像结果, 下方为对应光谱

Fig. 7 FT-CARS imaging^[43]. (a) High-spectral imaging results of polymer beads. Top left and top right are images at 810 cm^{-1} and 1003 cm^{-1} , below of them is the corresponding spectra; (b) high-spectral imaging results of *Haematococcus lacustris* cells. Top left and top right are images at 1155 cm^{-1} and 800 cm^{-1} , below of them is the corresponding spectra

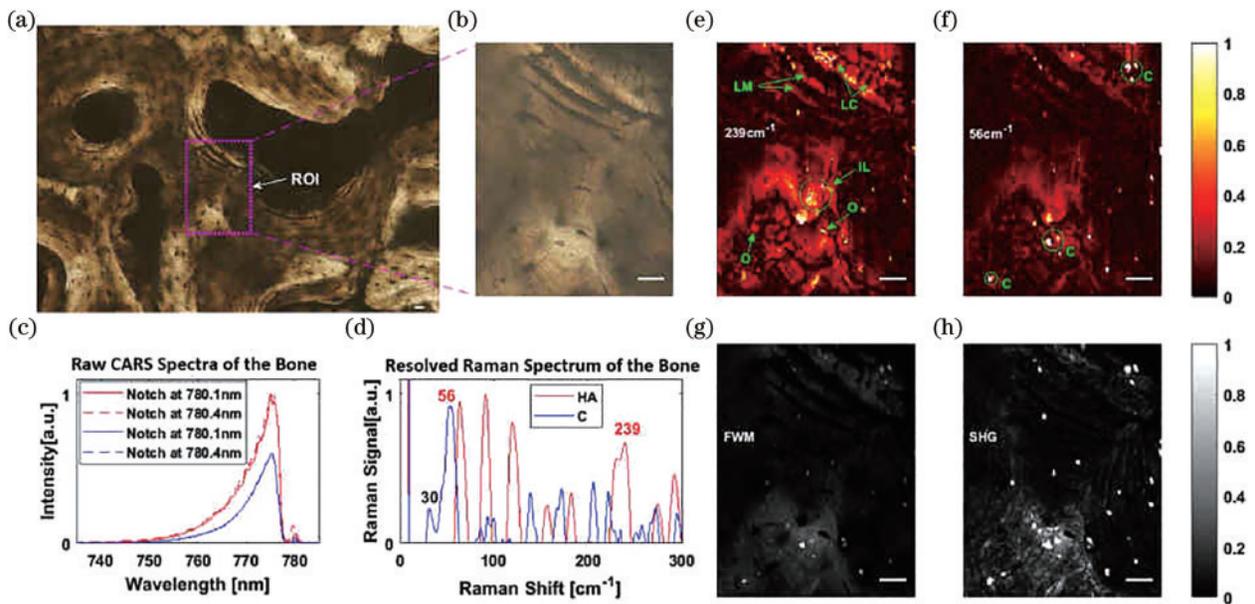


图 8 THz-CARS 对羟基磷灰石和胶原蛋白的成像结果, 比例尺为 $20\text{ }\mu\text{m}$ ^[46]。(a) 宽场成像结果; (b) 感兴趣的区域; (c) 区域内两像素测量到的原始 CRAS 信号; (d) 对应的羟基磷灰石和胶原蛋白的拉曼光谱; (e) 羟基磷灰石在 239 cm^{-1} 的图像; (f) 胶原蛋白在 56 cm^{-1} 的图像; (g) 四波混频图像; (h) 400 nm 处的二次谐波产生图像

Fig. 8 THz-CARS imaging of HA and collagen (C), scale bars is $20\text{ }\mu\text{m}$. (a) Wide-field imaging (WFI) of the ROI; (b) the ROI; (c) raw measured THz CARS spectra of the bone at two different pixels in the ROI; (d) corresponding resolved Raman spectra of HA and C; (e) HA at 239 cm^{-1} ; (f) collagen at 56 cm^{-1} ; (g) FWM image; (h) SHG image at 400 nm

CARS 领域的一个重要进展。他们使用两个重复频率略微不同的飞秒光学频率梳, 使得泵浦光与斯托克斯光之间产生周期性的延时扫描, 并在时域探测 CARS 信号的强度变化。得益于光梳的窄脉宽和延时扫描的高效性, 可以使用单个光电探测器快速采集 $200\sim$

1400 cm^{-1} 内所有分子振动模式的高光谱数据。这一特性使其在成像速度上具有天然优势。如图 9 所示, 该策略对混合了六氟苯、硝基苯、硝基甲烷和甲苯的微孔板实现了快速的高光谱成像, 仅用 24.3 ms 的采样数据就得到了 45×45 像素信噪比较佳的高光谱图像。

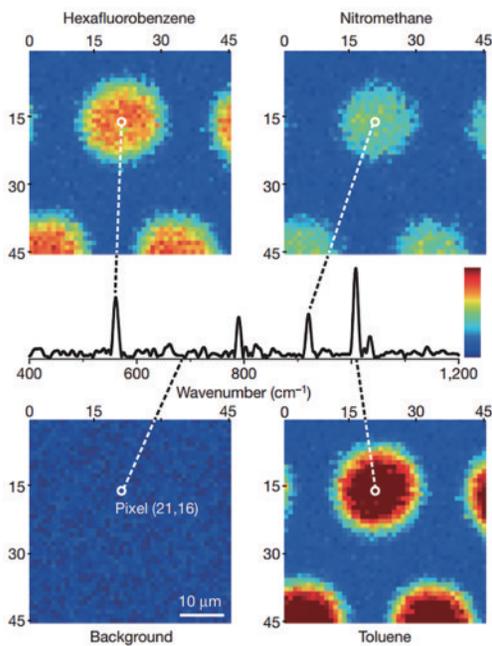


图9 双光梳 FT-CARS 对混合了六氟苯、硝基苯、硝基甲烷和甲苯的微孔板的高光谱成像结果^[49]

Fig. 9 Dual-comb FT-CARS hyperspectral imaging of a capillary plate with holes filled with a mixture of hexafluorobenzene, nitrobenzene, nitromethane, and toluene

上述的双光梳激发策略虽然精妙,但是由于两个光梳的重复频率是固定的,大部分采样时间中相邻两脉冲的间隔并不在相干长度内,导致有效延时扫描的占空比很小,仅为 1% 左右。Goda 研究组^[50]针对这一不足进行了改进,通过不断精细调节光梳的谐振腔长以控制两个光梳的重复频率差异随时间的变化,使得原先延时扫描 1% 的占空比提高到了接近 100%,得到了惊人的每秒 100000 光谱的超高采集速率和大幅提升的信噪比。

近期,一种新型的将拉曼散射与荧光发射耦合的混合光谱技术实现了全远场具有单分子灵敏度的拉曼光谱技术^[51]。与 CARS 略微不同的是,该方法探测的是荧光信号并非 CARS 信号。然而,该技术缺乏有效的高光谱激发方法,且会遇到由电子跃迁带来的固有强荧光背景,为此本课题组提出了一种基于瞬态受激拉曼激发荧光(T-SREF)的超快时域光谱技术^[52]。本技术抛开现有的窄带皮秒脉冲激发策略,使用宽带飞秒脉冲序列进行激发,通过对脉冲序列的相对延时进行扫描来编码时域荧光信号。单次激发实现的无背景高光谱 SREF 信号的新型傅里叶光谱技术是傅里叶变换方法在受激拉曼散射光谱上的首次应用,可为超多路荧光检测和分子动力学传感提供新的研究途径。

4 小结与展望

超快激光器的出现与发展使得飞秒级别的超短脉冲很容易获得,因此促进了对与常规双色相干激发过

程不同的时域相干拉曼散射过程的研究。本文简要介绍了时域相干拉曼散射技术的一般性原理和应用,特别是单脉冲激发拉曼散射技术和傅里叶变换相干反斯托克斯拉曼散射。目前时域相干拉曼散射技术已在激发光源、延时扫描策略、信号激发方法等方面取得了一系列进展,但是在实际应用,尤其是生物医学成像应用上仍然存在一些问题。例如,该技术在系统稳定性、灵敏度等方面还有提高空间,且缺乏与自发拉曼光谱严格一致的激发方法。未来可能的研究方向:从物理原理出发,尝试提出新颖的光谱学时域信号激发与探测策略,以提高相干拉曼系统的探测灵敏度,抑制非共振背景,并使谱线形状接近作为金标准的自发拉曼光谱;也可以从工程仪器方面进行改进,通过利用双色大带宽、高重复频率超快激光器实现更大带宽的光谱获取范围、更优的时间分辨性能并尝试实现和其他商用光谱仪、显微镜的兼容联用,以得到取长补短的多模态成像设备。相信随着新的激光技术的应用和新的激发策略不断被发掘,未来时域相干拉曼散射技术将能够进一步拓展其在物理、化学与生物医学多个交叉学科领域的测量与表征应用,例如:根据时间分辨化学反应中的超快分子动力学过程,可以揭示化学反应机理,助力材料科学与工艺的研究;利用时域采集信号天然的高光谱成像性质,可以实现光谱分辨率更高的高光谱拉曼成像显微镜,批量获取生物样本分子指纹区高复杂度的无标记高光谱图像;利用快速宽带光谱采集的优势,则可以开发新一代的高通量内窥镜等医疗器械,助力临床诊断与精准医疗。同时,这些优质的光谱与图像数据可以为大数据与医学人工智能的研究提供基础数据。

参 考 文 献

- [1] Raman C V. A change in the wavelength in light scattering[J]. Nature, 1928, 121(3051): 619.
- [2] Nie S, Emory S R. Probing single molecules and nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering[J]. Science, 1997, 275(5303): 1102-1106.
- [3] Rigneault H, Berto P. Tutorial: coherent Raman light matter interaction processes[J]. APL Photonics, 2018, 3 (9): 091101.
- [4] Min W, Freudiger C W, Lu S J, et al. Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy [J]. Annual Review of Physical Chemistry, 2011, 62, 507-530.
- [5] Laubereau A, Kaiser W. Vibrational dynamics of liquids and solids investigated using picosecond light pulses[J]. Reviews of Modern Physics, 50(3), 607-665, 1978.
- [6] Cheng J X, Xie X S. Coherent antistokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2004, 108(3): 827-840.
- [7] Terhune R W, Maker P D, Savage C M. Measurements of nonlinear light scattering[J]. Physical Review Letters,

- 1965, 14(17): 681-684.
- [8] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope[J]. *Optics Letters*, 1982, 7(8): 350-352.
- [9] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent antiStokes Raman scattering[J]. *Physical Review Letters*, 1999, 82(20): 4142-4145.
- [10] Woodbury E J N W K. Ruby laser operation in near IR [J]. *Proceedings of the IRE*, 1962, 50(11): 2347-2348.
- [11] Owyong A, Jones E D. Stimulated Raman spectroscopy using low-power cw lasers[J]. *Optics Letters*, 1977, 1(5): 152-154.
- [12] Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Science*, 2008, 322 (5909): 1857-1861.
- [13] Ozeki Y, Umemura W, Otsuka Y, et al. High-speed molecular spectral imaging of tissue using stimulated Raman scattering[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6, 845-851.
- [14] Fu D, Holtom G, Freudiger C, et al. Hyperspectral imaging with stimulated Raman scattering using chirped femtosecond lasers[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117(16): 4634-4640.
- [15] Freudiger C W, Min W, Holtom G R, et al. Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2011, 5: 103-109.
- [16] Liao C S, Slipchenko M N, Wang P, et al. Microsecond-scale vibrational spectroscopic imaging by multiplex-stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Light, Science & Applications*, 4 (2015) e265.
- [17] Kukura P, McCamant D W, Yoon S, et al. Structural observation of primary isomerization in vision using femtosecond-stimulated Raman[J]. *Science*, 2005, 310 (5750): 1006-1009.
- [18] Kuramochi H, Tahara T. Tracking ultrafast structural dynamics by time-domain Raman spectroscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143 (26): 9699-9717.
- [19] Kuramochi H, Takeuchi S, Yonezawa K, et al. Probing the early stages of photoreception in photoactive yellow protein using ultrafast time-domain Raman spectroscopy [J]. *Nature Chemistry*, 2017, 9: 660-666.
- [20] Oron D, Raanan D, Soffer Y. Impulsive SRS microscopy [M]//Cheng J X, Min W, Ozeki Y, et al. *Stimulated Raman scattering microscopy*. Amsterdam: Elsevier, 2022: 99-113.
- [21] de Silvestri S, Fujimoto J G, Ippen E P, et al. Femtosecond time-resolved measurements of optic phonon dephasing by impulsive stimulated Raman scattering in α -perylene crystal from 20 to 300 K[J]. *Chemical Physics Letters*, 1985, 116(2/3): 146-152.
- [22] Ruhman S, Joly A G, Nelson K A. Coherent molecular vibrational motion is observed in the time domain through impulsive stimulated Raman scattering[J]. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 1988, 24(2), 460-469.
- [23] Dudovich N, Oron D, Silberberg Y. Single-pulse coherently controlled nonlinear Raman spectroscopy and microscopy[J]. *Nature*, 2002, 418(6897): 512-514.
- [24] Bor Z, Horváth Z L. Distortion of femtosecond pulses in the lenses Wave optical description[J]. *Optics Communications*, 1992, 94(4): 249-258.
- [25] Ogilvie J P, Beaupaire E, Alexandrou A, et al. Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(4): 480-482.
- [26] Raanan D, Lüttig J, Silberberg Y, et al. Vibrational spectroscopy via stimulated Raman-induced Kerr lensing [J]. *APL Photonics*, 2018, 3(9): 092501.
- [27] McMorro D, Lotshaw W T, Kenney-Wallace G A. Femtosecond Raman-induced Kerr effect. Temporal evolution of vibrational normal modes in halogenated methanes[J]. *Chemical Physics Letters*, 1988, 145(4): 309-314.
- [28] Wahlstrand J K, Merlin R, Li X Q, et al. Impulsive stimulated Raman scattering: comparison between phase-sensitive and spectrally filtered techniques[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(8): 926-928.
- [29] Peterson W, Hiramatsu K, Goda K. Sagnac-enhanced impulsive stimulated Raman scattering for highly sensitive low-frequency Raman spectroscopy[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(21): 5282-5285.
- [30] Peterson W, de Pablo J G, Lindley M, et al. Ultrafast impulsive Raman spectroscopy across the terahertz fingerprint region [J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(1), 016003.
- [31] Weiner A. M. Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2000, 71(5): 1929-1960.
- [32] Dudovich N, Oron D, Silberberg Y. Single-pulse coherent anti-Stokes Raman spectroscopy in the fingerprint spectral region[J]. *Journal of Chemical Physics*, 2003, 118(20): 9208-9215.
- [33] Oron D, Dudovich N, Silberberg Y. Single-pulse phase-contrast nonlinear Raman spectroscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2002, 89(27): 273001.
- [34] Katz O, Levitt J M, Grinvald E, et al. Single-beam coherent Raman spectroscopy and microscopy via spectral Notch shaping[J]. *Optics Express*, 2010, 18(22): 22693-22701.
- [35] Oron D, Silberberg Y. Control and measurement of a nonresonant Raman wavepacket using a single ultrashort pulse[J]. *Chemical Physics*, 2005, 318(1/2): 163-169.
- [36] Oron D, Dudovich N, Silberberg Y. All-optical processing in coherent nonlinear spectroscopy[J]. *Physical Review A*, 2004, 70(2): 023415.
- [37] Ren L Q, Frostig H, Kumar S, et al. Coherently-enhanced lock-in-free chirped-CARS microscopy by Notch filtering[J]. *Optics Express*, 2017, 25(23): 28201-28209.
- [38] Falconieri M, Gagliardi S, Rondino F, et al. High-sensitivity impulsive stimulated Raman spectrometer with fast data acquisition[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*,

- 2021, 52(3), 664-669.
- [39] Raanan D, Ren L Q, Oron D, et al. Impulsive Raman spectroscopy via precision measurement of frequency shift with low-energy excitation [J]. *Optics Letters*, 43 (3), 470-473.
- [40] Raanan D, Audier X, Shivkumar S, et al. Sub-second hyper-spectral low-frequency vibrational imaging via impulsive Raman excitation[J]. *Optics Letters*, 2019, 44 (21): 5153-5156.
- [41] Lim S H, Chen B C, Sung J. Fourier transform spectral interferometric coherent anti-Stokes Raman scattering (FTSI-CARS) microscopy[J]. *Proceedings of SPIE*, 2008, 6860, 686013.
- [42] Tamamitsu M, Sakaki Y, Nakamura T, et al. Ultrafast broadband Fourier-transform CARS spectroscopy at 50000 spectra/s enabled by a scanning Fourier-domain delay line[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2017, 91, 163-169.
- [43] Kinogawa R, Hiramatsu K, Hashimoto K, et al. High-speed broadband Fourier-transform coherent antiStokes Raman scattering spectral microscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2019, 50(8): 1141-1146.
- [44] Hiramatsu K, Ideguchi T, Yonamine Y, et al. High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry[J]. *Science Advances*, 2019, 5(1): eaau0241.
- [45] Nishiyama R, Hiramatsu K, Kawamura S, et al. Color-scalable flow cytometry with Raman tags[J]. *PNAS Nexus*, 2023, 2(2): pgad001.
- [46] Ren L Q, Hurwitz I, Raanan D, et al. Terahertz coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Optica*, 2019, 6(1): 52-55.
- [47] Hashimoto K, Omachi J, Ideguchi T. Ultra-broadband rapid-scan Fourier-transform CARS spectroscopy with sub-10-fs optical pulses[J]. *Optics Express*, 2018, 26 (11): 14307-14314.
- [48] Lu M J, Zhang Y J, Chen X Y, et al. Interpulse stimulation Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman spectroscopy[J]. *Photonics Research*, 2023, 11 (2): 357-363.
- [49] Ideguchi T, Holzner S, Bernhardt B, et al. Coherent Raman spectro-imaging using laser frequency combs[J]. *Nature*, 2013, 502(7471): 355-358.
- [50] Kameyama R, Takizawa S, Hiramatsu K, et al. Dual-comb coherent Raman spectroscopy with near 100% duty cycle[J]. *ACS Photonics*, 2021, 8(4), 975-981.
- [51] Xiong H Q, Shi L X, Wei L, et al. Stimulated Raman-excited fluorescence spectroscopy and imaging[J]. *Nature Photonics*, 2019, 13(6): 412-417.
- [52] Yu Q Z, Yao Z J, Zhang H L, et al. Transient-stimulated Raman-excited fluorescence spectroscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145 (14): 7758-7762.