

用于水分子相干拉曼散射成像的光纤光源研究

李典典¹, 毕思敏², 郝强¹, 季敏标², 杨康文^{1*}¹上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海 200093;²复旦大学物理学系表面物理国家重点实验室, 上海 200433

摘要 水是生物体中含量最多的一种物质,了解生物体内水的分布对于理解水的生理功能来说至关重要。相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)作为一种非侵入的成像技术,能够对生物体内的水分子进行实时且免标记的成像。因此,设计并搭建了用于水的CARS被动同步光纤激光器系统,该被动同步系统由掺铒和掺镱锁模光纤激光器构成,通过将主脉冲注入到从激光器腔内引入非对易相移,进而实现无源同步,同步失配距离达到347 μm 。结合功率放大技术、倍频技术和脉冲压缩技术,双路输出平均功率分别为146 mW和2 W,脉冲宽度分别为146.0 fs和9.1 ps。使用所搭建的同步光源在3156 cm^{-1} 处对新鲜小鼠耳朵组织进行CARS成像,成像效果良好。该同步光纤光源有望推动CARS技术在快速、实时、高效病理学检测领域的应用。

关键词 光纤激光器; 被动同步; 非线性光学; 相干反斯托克斯拉曼散射

中图分类号 O437 **文献标志码** A

DOI: 10.3788/AOS231380

水为生物系统的功能调节和降解提供了重要的化学贡献,在细胞体积调节、营养转运、废物清除和热调节中起着核心作用,并为生物反应提供介质^[1-3]。相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)成像技术作为生物医学应用中的重要工具,具有化学特异性、免标记、高灵敏度等优点,被广泛应用于脑瘤分析^[4]、疾病病理学分析^[5]以及药代动力学^[6]等领域。因此,CARS成像技术是研究生物体内水分布状态潜在且强大的工具。

现有光纤式相干拉曼散射光源技术主要包括孤子自频移^[7]、光纤超连续谱展宽^[8]、光纤光学参量振荡器(FOPO)^[9]和主/被动同步技术^[10-11]。孤子自频移产生的光谱很宽,会降低成像分辨率。光纤超连续谱展宽的光谱密度极低,每个波长的平均功率都会受到限制。FOPO需要满足相位匹配条件,而且随着泵浦功率的增加,光谱宽度会发生变化,转换效率也会受到限制。主动同步技术需要精密的电子学反馈,增加了系统的复杂性。被动同步技术是一种基于全光调制的同步技术,其特点在于无须依赖复杂的电子学反馈过程即可实现脉冲的精确同步。因此,被动同步技术被广泛应用于相干拉曼散射成像。2020年,Kong等^[12]利用被动同步技术搭建了自同步的双色光纤激光器,并在2845 cm^{-1} 和2930 cm^{-1} 处得到人类活细胞的受激拉曼散射(SRS)和CARS成像图像。由于他们采用的是非线性偏振旋转(NPR)的锁模方式,因此锁模容易受到

外部环境的影响。同年,Yang等^[11]提出并实现了一种全保偏的被动同步光纤激光器系统,并在2850 cm^{-1} 和2930 cm^{-1} 处获得了小鼠耳朵的CARS成像图像。该系统基于全保偏的结构,稳定性更好。2023年,Kong等^[13]也利用被动同步技术获得了在2850 cm^{-1} 和3055 cm^{-1} 处的高速受激拉曼成像图像。但以上研究仅得到了C—H键的CARS或者SRS成像图像,并没有获得水的CARS成像图像。因此,我们设计并搭建了用于水的CARS成像的全保偏被动同步双色光源。

图1为由掺铒光纤激光器(EDFL)和掺镱光纤激光器(YDFL)组成的全保偏被动同步光纤激光器系统。振荡器均采用基于非线性放大环形镜(NALM)的锁模方案。光路呈现“9”字型结构,由环形腔和线性臂组成。其中,EDFL环形腔部分包括长度为80 cm的掺铒光纤(EDF)、光分束器(OC)和相移器(PS)。PS用来提供 $\pi/2$ 非对易线性相位差,以降低光纤激光器的锁模阈值。50:50 OC的一端连接光纤反射镜(OFM)构成线性臂,另一端用于监控锁模。通过20:80 OC的20%输出端口输出种子光,种子光经掺铒光纤放大器1(EDFA 1)放大后进入脉冲分离器(divider)。脉冲分离器由三级钽酸钇(YVO_4)晶体构成,将入射的单脉冲分为8个子脉冲^[14]。被分离的子脉冲通过准直器(Col)耦合进入光纤主放大器,放大后由光纤法拉第反射镜(FRM)反射,并再次通过脉冲分

收稿日期: 2023-08-09; 修回日期: 2023-09-25; 录用日期: 2023-11-06; 网络首发日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(11974248)

通信作者: *kangwenyang@yeah.net

离器合成为单个脉冲,单个脉冲通过 port 1 输出并耦合进入光纤压缩。最后,输出的脉冲进入倍频模块,倍频模块由半波片(HWP)、周期性铌酸锂晶体(PPLN)和透镜 L1、L2 组成。透镜 L1 和 L2 的焦距均

为 8 mm,并分别镀有带宽为 1050~1700 nm 和 650~1050 nm 的增透膜。L1 的作用是将光斑聚焦在 PPLN 晶体上,L2 的作用是将倍频光准直后作为泵浦光输出。

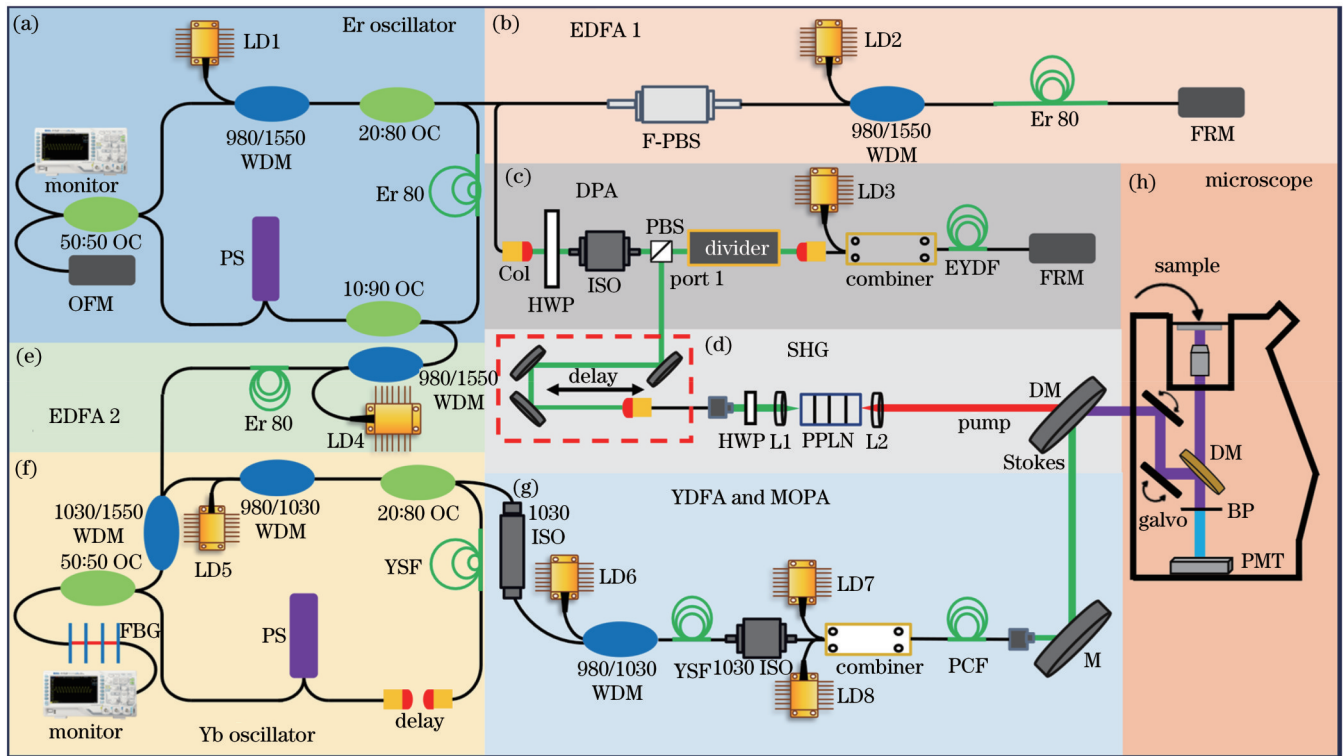


图 1 实验装置。(a)掺铒光纤振荡器;(b)掺铒光纤放大器 1;(c)分离脉冲放大器;(d)二次谐波产生;(e)掺铒光纤放大器 2;(f)掺铒光纤振荡器;(g)掺铒光纤放大器和主振荡功率放大器;(h)显微镜

Fig. 1 Experimental setup. (a) Er oscillator; (b) Er-doped fiber amplifier 1; (c) divided pulse amplifier; (d) second harmonic generation; (e) Er-doped fiber amplifier 2; (f) Yb oscillator; (g) Yb-doped fiber amplifier and master oscillator power amplifier; (h) microscope

YDFL 振荡器的结构与 EDFL 振荡器相似,呈现“9”字型,不同的是 YDFL 振荡器在线性端采用中心波长为 1040 nm、3 dB 带宽为 1 nm 的光纤布拉格光栅(FBG),并且在环形腔部分加入了 1030/1550 nm 的波分复用器(WDM)和光学延时线。其中,1030/1550 nm WDM 的作用是将主激光器的脉冲注入至从激光器中,通过调节腔内光学延时线的距离来精确调节从激光器的重复频率,并以此来补偿环境扰动对激光器的重复频率影响,增强被动同步系统的稳定性。锁模后,从激光器同样使用 20:80 OC 20% 的输出端口输出种子光,同时使用偏振相关隔离器(ISO)来防止后向的传输光回返从而影响激光器的正常工作。此后,光功率通过掺铒光纤放大器(YDFA)和主振荡功率放大器(MOPA)系统被放大至 2 W,从而为相干拉曼散射成像提供一个高功率的斯托克斯光输出。

在图 1 的实验装置中,当 EDFL 和 YDFL 的泵浦功率分别为 158 mW 和 236 mW 时,可实现自启动锁模。图 2(a)~(d)是 EDFL 和 YDFL 输出的光谱和脉宽。如图 2(a)所示,掺铒光纤振荡器输出的中心波长为 1570.41 nm,3 dB 带宽为 8.33 nm。用频谱分析仪对锁

模光纤激光器的输出脉冲进行了测量,其基本重复频率为 49.7802 MHz。输出脉冲经过两级放大系统后,在色散和非线性效应的共同作用下,光谱展宽为 26.09 nm,压缩后脉宽为 151 fs,输出功率为 508 mW。通过旋转 HWP 改变入射光的偏振方向,以满足晶体的相位匹配条件,从而提高倍频效率。本实验中倍频效率最高为 28.7%,对应的输出功率为 146 mW。倍频光输出特性如图 3(a)所示,倍频光中心波长为 783 nm,3 dB 带宽为 6.56 nm。倍频光相对于基频光光谱明显变窄,这是由晶体接收带宽有限造成的,对应的脉冲宽度为 146.0 fs。图 3(b)中的插图是在准直透镜后 18 cm 处的倍频光光斑图像,光斑半径为 0.78 mm,光斑圆度为 95%, M^2 因子为 1.18。YDFL 的输出光谱如图 2(c)所示,振荡器输出中心波长为 1040.6 nm,3 dB 带宽为 0.3 nm,基本重复频率为 24.8901 MHz。由于在 MOPA 系统中使用了模场直径为 15 μm 的大模场光子晶体光纤(DC-135/14-PM-YB),降低了光纤内的非线性效应,从而有效抑制了光谱分裂。放大后光谱 3 dB 带宽展宽到了 1.72 nm,相应的脉冲宽度为 9.1 ps。

为了实现被动同步,主激光器输出的脉冲经过

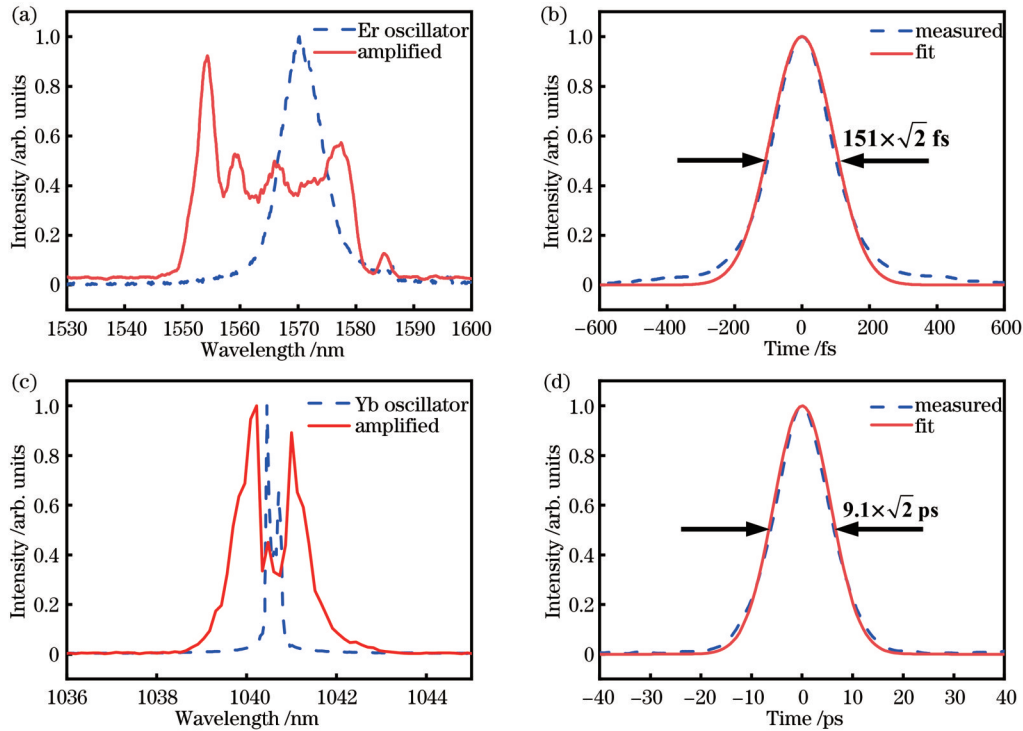


图 2 光谱和脉宽。(a)EDFL的输出光谱;(b)泵浦光自相关轨迹;(c)YDFL的输出光谱;(d)斯托克斯光自相关轨迹
Fig. 2 Spectra and pulse widths. (a) Output spectra of EDFL; (b) autocorrelation traces of pump light; (c) output spectra of YDFL; (d) autocorrelation traces of Stokes light

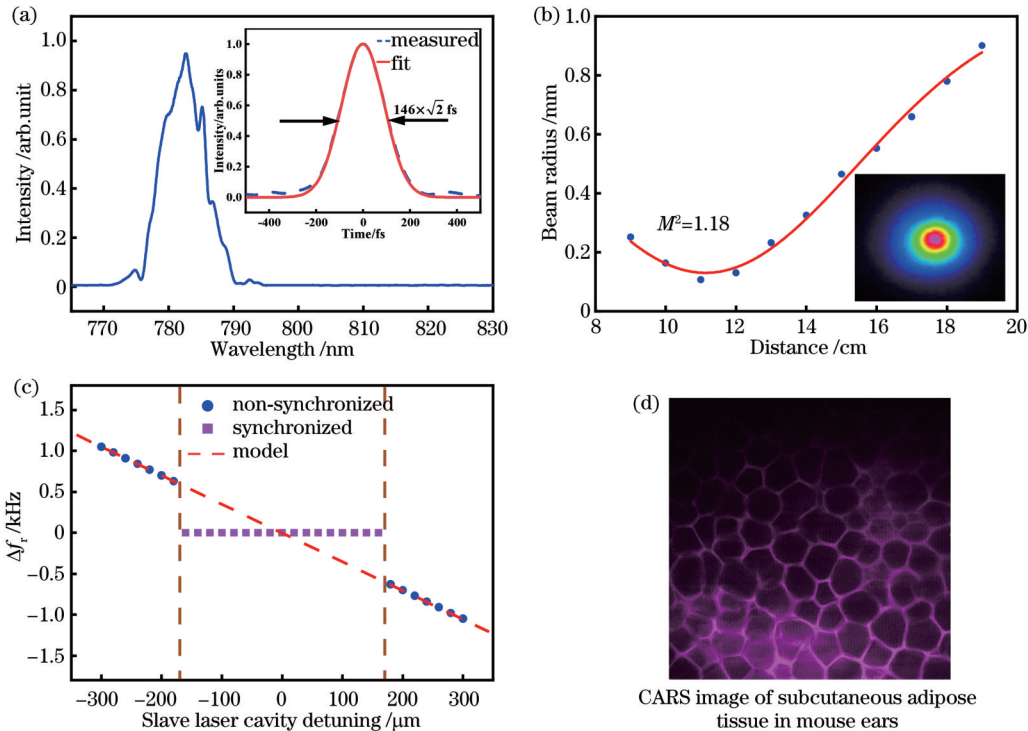


图 3 实验结果。(a)倍频光光谱及自相关轨迹;(b)倍频光的光束轮廓和 M^2 测量结果;(c)从激光器重复频率随腔长失配的变化;(d)在 3156 cm^{-1} 处对小鼠耳朵皮下脂肪组织的 CARS 成像结果
Fig. 3 Experimental results. (a) Frequency-doubling light spectrum and autocorrelation traces; (b) beam profile and M^2 measurement result of frequency-doubling light; (c) variation of the repetition rate of the slave laser with the mismatch of cavity length; (d) CARS image of subcutaneous adipose tissue in mouse ears at 3156 cm^{-1}

EDFA 2 被放大至 36 mW, 然后通过 1030/1550 WDM 注入至从激光器中, 当调节掺镱光纤振荡器中的延时线使得从激光器的重复频率为主激光器重复频率的 1/2 时, 两激光器即可实现同步, 这在以前的研究中被证实过^[15]。由于非线性交叉相位调制(XPM)作用, 注入的脉冲在NALM的一个方向引起额外的相移, 提供了一个基于克尔效应的强度调制, 此外, 基于全保偏的设计, 同步可以通过光注入立即启动, 无须任何偏振态的优化。图 3(c) 为频域特性随腔长失配的变化情况, 其中, 横坐标表示从激光器腔长失配的变化, 纵坐标表示重复频率 Δf_r 的变化, 圆点和方块分别表示在无注入和有注入情况下的重复频率变化。无脉冲注入时, 从激光器处于自由运转状态, 重复频率会随着腔长失配的变化而发生线性变化。在有脉冲注入的情况下, 当从激光器的重复频率逐渐靠近主激光器重复频率 1/2 时, 就会被同步系统锁定, 从而进入同步状态。然而, 这种同步锁定范围是有限的, 当腔长变化超过同步系统锁定范围时, 同步系统就会失去锁定, 实验测得的同步系统的锁定范围为 $-173.5 \sim 173.5 \mu\text{m}$ 。

最后, 使用所搭建的同步光纤激光器对未染色的小鼠耳朵皮下脂肪组织进行 CARS 成像。在泵浦光束分支插入自由空间光延迟线, 以确保来自两个光纤激光器的脉冲在时间上重叠。同时使用 790/1030 nm 的二向色镜将泵浦光束和斯托克斯光束在空间上进行合束, 之后将双色脉冲激光注入商用显微镜(Olympus, FV1200)进行 CARS 成像, 图像采集速率为 $2 \mu\text{s}/\text{pixel}$, 成像尺寸为 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$, 获取图像所需时间为 1.08 s。实验中使用放大倍数为 25、数值孔径为 1.2 的物镜将双色激光脉冲聚焦到样品上, 并使用短通滤波片(700 nm)和带通滤波片($640 \pm 20 \text{ nm}$)来消除背景光, 然后利用光电倍增管(PMT)来收集信号。由于所使用的生物样品为小鼠耳朵皮下脂肪组织, 细胞内所含的脂质成分较多, 而细胞外部主要由水环境构成, 因此, 如图 3(d) 中的紫色通道所示, 能够清晰地观察到细胞间隙水的分布状态。

综上所述, 本文研究了一种用于非线性生物医学成像的被动同步双色光源, 利用 XPM 机制将掺镱激光脉冲注入到掺镱激光腔内, 实现了稳定同步。研究了在有注入和无注入的情况下重复频率变化与腔长失配的关系, 并在 3156 cm^{-1} 处对新鲜小鼠耳朵皮下脂肪组织进行 CARS 成像, 成像效果良好。所搭建的被动同步双色激光器系统为研究细胞内外水分子含量、水分子运动、温度监控等提供了稳定的 CARS 成像光源。

参 考 文 献

- [1] Choi D S, Lim S, Park J S, et al. Label-free live-cell imaging of internalized microplastics and cytoplasmic organelles with multicolor CARS microscopy[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(5): 3045-3055.
- [2] Sugimura T, Kajimoto S, Nakabayashi T. Label-free imaging of intracellular temperature by using the O—H stretching Raman band of water[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2020, 59(20): 7755-7760.
- [3] Shi L X, Hu F H, Min W. Optical mapping of biological water in single live cells by stimulated Raman excited fluorescence microscopy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4764.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 吴凡, 李商羽, 洪维礼, 等. 高光谱相干拉曼散射技术及其应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617003.
Wu F, Li S Y, Hong W L, et al. Hyperspectral coherent Raman scattering and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617003.
- [7] Li B, Wang M R, Charan K, et al. Investigation of the long wavelength limit of soliton self-frequency shift in a silica fiber[J]. *Optics Express*, 2018, 26(15): 19637-19647.
- [8] Yang K W, Huo L Z, Ao J P, et al. Fast tunable all-polarization-maintaining supercontinuum fiber laser for CARS microscopy[J]. *Applied Physics Express*, 2021, 14(6): 062004.
- [9] Yang K W, Jiang J S, Guo Z R, et al. Tunable femtosecond laser from 965 to 1025 nm in fiber optical parametric oscillator [J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2018, 30(7): 607-610.
- [10] Guo C Y, Lian S P, Ruan S C, et al. 1/1.5 μm synchronized dual-band mode-locked fiber laser[J]. *IEEE Photonics Journal*, 2020, 13(1): 1500708.
- [11] Yang K W, Shen Y, Ao J P, et al. Passively synchronized mode-locked fiber lasers for coherent anti-Stokes Raman imaging [J]. *Optics Express*, 2020, 28(9): 13721-13730.
- [12] Kong C H, Pilger C, Hachmeister H, et al. High-contrast, fast chemical imaging by coherent Raman scattering using a self-synchronized two-colour fibre laser[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 25.
- [13] Kong C H, Pilger C, Kunisch M, et al. Hyperspectral coherent Raman scattering (CRS) microscopy based on a rapidly tunable and environmentally stable fiber laser[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2023: 2300521.
- [14] 杨康文, 郝强, 曾和平. 超短脉冲偏振分割放大技术研究进展(特邀)[J]. *红外与激光工程*, 2018, 47(1): 0103004.
Yang K W, Hao Q, Zeng H P. Advances in ultrashort divided-pulse amplification systems (invited) [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2018, 47(1): 0103004.
- [15] Yoshitomi D, Zhou X Y, Kobayashi Y, et al. Long-term stable passive synchronization of 50 μJ femtosecond Yb-doped fiber chirped-pulse amplifier with a mode-locked Ti: sapphire laser[J]. *Optics Express*, 2010, 18(25): 26027-26036.

Fiber Laser for Coherent Raman Scattering Imaging of Liquid Water

Li Diandian¹, Bi Simin², Hao Qiang¹, Ji Minbiao², Yang Kangwen^{1*}

¹*School of Optical Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;*

²*State Key Laboratory of Surface Physics, Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China*

Abstract

Objective Water provides an important chemical contribution to the function and degradation of biological systems, plays a central role in regulating cell volume, nutrient transport, waste removal, and thermal regulation, and serves as a medium for biological reactions. Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging, as an important tool in biomedical applications, has the advantages of chemical specificity, free of label, high sensitivity, and so on, and it is widely used in brain tumor analysis, disease pathology analysis, and pharmacokinetics. Therefore, it is of great significance to study the CARS imaging light source for water molecules.

Methods Two synchronous mode-locked fiber lasers are constructed using the mode-locking scheme of a nonlinear amplifying loop mirror (NALM). A portion of the pulse output of the erbium-doped fiber laser is output by pulse amplification module and frequency doubling module, which is called pump light, while another portion of the pulse is injected into the ytterbium-doped fiber laser to achieve pulse synchronization. The output pulse of the injected ytterbium-doped fiber laser is then amplified and emitted as Stokes light. An appropriate central wavelength fiber Bragg grating (FBG) is selected to control the central wavelength of the output pulse in the ytterbium-doped fiber laser, ensuring that the frequency difference between the two lasers and the vibration frequency of water meet the resonance condition. Finally, a dichroic mirror (DM) is used to spatially combine the pump light and Stokes light. The synchronous two-color pulses are injected into a commercial microscope (Olympus, FV1200) for CARS imaging.

Results and Discussions In the experiment, a master-slave injection passive synchronous two-color fiber light source is built, consisting of pump light and Stokes light. The central wavelengths of the two outputs are 783 nm [Fig. 3(a)] and 1040.6 nm [Fig. 2(c)], respectively. The pulse widths are 146.0 fs [Fig. 3(a)] and 9.1 ps [Fig. 2(d)], with an output power of 146 mW and 2 W, respectively. The relationship between repetition frequency variation and cavity length mismatch with and without injection is studied. The maximum synchronous mismatch distance reaches 347 μm [Fig. 3(c)]. Finally, CARS imaging of fresh mouse ear subcutaneous adipose tissue is performed at 3156 cm^{-1} , as shown in the purple channel in Fig. 3(d). The distribution of intercellular water can be clearly observed.

Conclusions In this paper, a CARS passive synchronous fiber laser for water is designed and constructed. The main pulse is injected into the slave laser cavity to achieve pulse synchronization. The relationship between frequency variation and cavity length mismatch with and without injection is studied. CARS imaging is performed on fresh mouse ear subcutaneous adipose tissue at 3156 cm^{-1} , and the imaging results are satisfactory. The passive synchronous two-color laser is expected to promote the application of CARS technology in the field of fast, real-time, and efficient pathology detection.

Key words fiber laser; passive synchronization; nonlinear optics; coherent anti-Stokes Raman scattering