

引用格式: WANG Haoyu, ZHANG Jiaojiao, WANG Nan, et al. Theoretical and Experimental Studies on Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy Based on Supercontinuum Fiber Laser[J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(10):1011003
王浩宇,张娇娇,王楠,等. 基于超连续谱光源的相干反斯托克斯拉曼散射成像理论与实验可行性研究[J]. 光子学报, 2021, 50(10):1011003

基于超连续谱光源的相干反斯托克斯拉曼散射 成像理论与实验可行性研究

王浩宇,张娇娇,王楠,周王婷,徐欣怡,曾琦,陈雪利

(西安电子科技大学 生命科学技术学院, 西安 710071)

摘 要: 将超连续谱光纤激光器引入到相干反斯托克斯拉曼散射成像系统,以解决当前相干反斯托克斯拉曼散射成像系统造价昂贵、体积庞大的问题。首先分析了基于超连续谱光源的相干反斯托克斯拉曼散射成像理论及其影响因素;接着搭建了一套基于超连续谱光源的相干反斯托克斯拉曼散射成像系统,并进行了成像性能测试。在物镜、功率、浓度等不同影响因素的情况下,系统测试的实验结果与数值仿真结果具有高度一致性,验证了基于超连续谱光源的相干反斯托克斯拉曼散射成像理论与实验的可行性。

关键词: 非线性光学;无标记显微成像;拉曼散射成像;相干反斯托克斯拉曼散射;显微成像;超连续谱光纤激光器

中图分类号:O657.319

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20215010.1011003

Theoretical and Experimental Studies on Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy Based on Supercontinuum Fiber Laser

WANG Haoyu, ZHANG Jiaojiao, WANG Nan, ZHOU Wangting, XU Xinyi,
ZENG Qi, CHEN Xueli

(School of Life Science and Technology, Xidian University, Xi'an 710071, China)

Abstract: A coherent anti-Stokes Raman scattering microscope is built by using a supercontinuum fiber laser, towards a solution of the disadvantages in current imaging system, such as the cost and bulk-size. Firstly, the theory of supercontinuum fiber laser-based coherent anti-Stokes Raman scattering imaging is deduced and its influencing factors are analyzed. An experimental setup for the supercontinuum fiber laser-based coherent anti-Stokes Raman scattering microscope is then built up, while its experimental feasibility is demonstrated. Different influencing factors, including objective lens, laser power and concentration, are selected to demonstrate that the test results are highly consistent with theoretical ones. The results prove the theoretical and experimental feasibility of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy based on supercontinuum fiber laser.

Key words: Nonlinear optics; Label-free microscopic imaging; Raman Scattering imaging; Coherent anti-Stokes Raman scattering; Microscopy; Supercontinuum fiber laser

OCIS Codes: 110.1650; 190.4380; 180.5655; 300.6230; 060.2350

基金项目: 中央高校基本科研业务费(No. QTZX2105), 陕西省重点研发计划项目(No. 2021ZDLSF04-05), 国家重点研发计划精准医学专项课题(No. 2018YFC0910600), 国家自然科学基金(No. 81871397), 国家“万人计划”青年拔尖人才支持计划, 陕西省杰出青年科学基金(No. 2020JC-27), 陕西省“特支计划”青年拔尖人才。

第一作者: 王浩宇(1995—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为相干反斯托克斯拉曼散射成像。Email: why13289351502@163.com

导师(通讯作者): 陈雪利(1984—), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为生物医学光子学成像与检测技术。Email: xlchen@xidian.edu.cn

收稿日期: 2021-07-16; **录用日期:** 2021-09-06

<http://www.photon.ac.cn>

0 引言

相干反斯托克斯拉曼散射(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS)显微镜是一种通过非线性激励微弱拉曼信号的无标记显微成像技术,相比于自发拉曼散射,其信号强度可提升3~5个数量级,从而实现活细胞和组织的无标记快速成像^[1-2]。目前实验室的CARS成像系统大多数采用最先进的固态激光器和频率转换系统,具有优异的稳定性和较高的脉冲输出能量;然而,该设备造价昂贵,体积庞大,对环境变化较为敏感,阻碍了CARS系统的应用。体积紧凑、价格相对较低的光纤激光器为此提供了新的解决方案,然而大多数光纤介质的发射带宽较窄,导致光纤激光器的波长可调性相对较差^[3]。超连续谱的频谱范围可以从400 nm一直连续扩展至2 500 nm^[4]。超连续谱光源光纤激光器具有相干性好、调谐范围宽、输出功率高、成本低等优点,较适合进行CARS成像相关研究,在生物研究和临床应用中具有较大的应用潜力。

2005年和2008年,KANO H和HAMAGUCHI H O利用光子晶体光纤产生的超连续谱技术开发了超宽带多路CARS显微光谱系统,然而,其搭建系统采用电荷耦合元件(Charge Coupled Device, CCD)结合压电台进行显微成像,成像速度较慢,每个像素的曝光时间为分别为0.5 s和0.3 s^[5-6]。2014年,JR C C使用一束窄带的770 nm探测光和一束超连续谱光作为激发光源获取生物样本的三维信息,该系统具有灵敏度高、光谱宽度较宽的优点,单光谱的获取时间可提升至3.5 ms。同样地,该系统采用了CCD配合三维压电平台的方式进行成像,因此成像速度仍与振镜扫描方式存在巨大差距^[7]。2018年,SHEN Yujie提出基于皮秒激光产生超连续谱的宽场CARS显微镜,可以实现视频级的成像速率,然而,由于使用宽场成像方式,成像分辨率达不到较高的水平^[8]。2017年,LI Yan提出了一种基于超连续谱光纤激光光源的宽谱CARS显微光谱仪,可获取700~1 900 cm^{-1} 范围内分辨率优于10 cm^{-1} 的CARS光谱^[9-10],并且通过平移台移动样本方式获取了维甲酸的CARS图像,但是其成像速度较慢,在百秒量级的时间内只能获取 $114 \times 82 \mu\text{m}^2$, 22×10 像素的图像^[9]。随后,LI Yan展示了一种基于紧凑超连续谱全光纤激光光源的多模CARS显微镜,实现了较高光谱分辨率的CARS成像,但是其展示的成像像素点较少,分辨率较差,导致采集图像的细节丢失^[11]。

基于CARS成像系统目前存在的问题和超连续谱光纤激光器的独特优势,本文选用超连续谱光纤激光器作为激发光源,研制基于超连续谱光源的CARS成像系统进行研究,在降低了CARS成像系统成本的同时有望获得更高分辨率以及更快速度的成像结果。

1 基于超连续谱光源的CARS成像理论

CARS信号的产生是一个三阶非线性四波混频过程,主要通过探测激光聚焦内分子群的振动相干性来克服自发拉曼散射的微弱性^[12]。信号产生过程表现为输入和输出光子的交换能量,使其在非线性过程后分子的量子态保持不变(即处于基态)。频率为 ω_p 的泵浦光和频率为 ω_{pr} 的探测光以及频率为 ω_s 的斯托克斯光与介质中的分子相互作用,一般情况下,探测光的频率和泵浦光的频率相等($\omega_p = \omega_{pr}$);如果泵浦和斯托克斯的频率差($\omega_p - \omega_s$)和某个化学键的振动频率 Ω 匹配时,即 $\Omega = \omega_p - \omega_s$,则会产生一个新的波长的散射信号—反斯托克斯拉曼散射,使得物质中的分子得到共振增强,从而产生频率为 $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$ 的CARS信号。

在CARS过程中,由强电场与物质相互作用产生的三阶非线性电极化可表示为^[13]

$$p^{(3)} \propto \chi^{(3)} E_p^2 \cdot E_s^* \quad (1)$$

式中, $\chi^{(3)}$ 为三阶非线性磁化率, E_p 、 E_s^* 分别为泵浦光、斯托克斯光的电场,因而入射光电场的平面波展开形式可以表示为

$$E(z, t) = \frac{1}{2} \left[E_p(z, \omega_p) \exp(i k_p z - i \omega_p t) + E_s(z, \omega_s) \exp(i k_s z - i \omega_s t) + E_{pr}(z, \omega_{pr}) \exp(i k_{pr} z - i \omega_{pr} t) + C \right] \quad (2)$$

式中, k_p 为泵浦光的相位随距离的变化率,同样 k_s 为斯托克斯光的相位随距离的变化率, z 为激发光穿过样本的厚度, t 为时间, E_{pr} 为探测光的电场, k_{pr} 为频率为 ω_{pr} 探测光的相位随距离的变化率, C 为常数。

将入射光电场和三阶非线性电极化代入耦合波方程,可求解得^[14]

$$I_{\text{CARS}} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_s L^2 \left[\frac{\sin(\Delta k L/2)}{\Delta k L/2} \right]^2 \quad (3)$$

式中, L 为在介质中传播的距离, I_s 、 I_p 分别为斯托克斯光强、泵浦光光强, I_{CARS} 为 CARS 信号强度, $\Delta k = k_1 - k_2 + k_3 - k_4$ 是极化场的有效波矢 ($k_1 - k_2 + k_3$) 与辐射场的波矢之间沿 z 轴的波矢 (k_4) 失配量。式(3)展示了 CARS 信号的几个重要特征。首先, CARS 信号与非线性磁化率的平方幅度成正比, 又因为 $\chi_{\text{CARS}}^{(3)}$ 与散射分子的密度成正比, 所以 CARS 信号强度与可以产生信号的样本浓度成平方关系, 即对于包含高浓度散射分子的介质, CARS 信号特别强。其次, CARS 信号强度与斯托克斯光强度成线性关系, 与泵浦光强度成平方关系。最后, 式(3)揭示了波矢量失配的程度对于有效建立相干辐射场幅度的重要性。如果感应的非线性极化和辐射场之间的波矢失配量 Δk 为零, 则 CARS 信号强度达到最大化, 此条件表明, 只有在非线性相位相同的情况下, 非线性场才能有效地建立, 整个介质的极化与传播信号场的相位保持同步。另外, 由于三阶磁化率包含振动共振 $\chi_{\text{R}}^{(3)}$ 和振动非共振 $\chi_{\text{NR}}^{(3)}$ 部分, 因此 $\chi_{\text{CARS}}^{(3)} = \chi_{\text{R}}^{(3)} + \chi_{\text{NR}}^{(3)}$ 平方模运算会在共振和非共振贡献之间产生干扰项, 这些干扰项引起了 CARS 中众所周知的非共振背景的干扰。由于前向和后向传播方向上波矢量失配的幅度不同, 导致信号取决于 CARS 场的传播方向。在光学显微镜中, 光场聚焦在一个紧密的焦点上, 信号辐射在焦点附近产生, 随后传播到远场, 然后被光电探测器检测到。在这个过程中, 光场及其与物质间的相互作用具有高度的空间依赖性, 因此在描述这个过程时, 需要考虑光场的空间依赖性。

为了描述光场在三维空间中的分布并进行数值模拟, 可通过极坐标的方式在三维空间中使用散点表征出高斯光束的聚焦场^[15], 即

$$E(r, z) = E_0 \frac{w_0}{w(z)} \exp \left[-\frac{r^2}{w(z)^2} \right] \times \exp \left\{ i \left[kz - \eta(z) + \frac{kr^2}{2R(z)} \right] \right\} \quad (4)$$

$$w(z) = w_0 \left(1 + z^2/z_0^2 \right)^{1/2} \quad (5)$$

$$R(z) = z \left(1 + z_0^2/z^2 \right)^{1/2} \quad (6)$$

$$\eta(z) = \arctan \left(z/z_0 \right) \quad (7)$$

$$z_0 = kw_0^2/2 \quad (8)$$

式中, $w(z)$ 为束腰, $R(z)$ 为波面半径, $\eta(z)$ 为 Gouy 相移, z_0 为瑞利距离, r 为电场距离光束中心轴线的径向距离, k 为相位随距离的变化率, E_0 为电场振幅^[16]。将 $w_0 = 0.61\lambda / (\text{NA} \sqrt{2\ln 2})$ 和 $k = 2\pi/\lambda$ 带入瑞利距离的表达式得

$$z_0 = 0.84\lambda / \text{NA}^2 \quad (9)$$

式中, λ 为激光的波长, NA 为物镜的数值孔径大小。 E_0 与功率大小相关, 光束功率 P' 和光束中心的振幅 E_0 的关系为^[17]

$$E_0 = \frac{1}{\omega_{as}} \sqrt{\frac{4P'}{\pi n}} \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \quad (10)$$

式中, μ_0 为真空磁导率 ($4\pi \times 10^{-7} \text{ N/A}^2$), ϵ_0 为真空介电常数 ($8.854 187 817 \times 10^{-12} \text{ F/m}$), n 为折射率, 以此得出电场在三维空间中的强度分布。根据电场的计算值, 将 E 带入到光强的公式中, 计算出每束激光在三维空间中的强度分布, 即

$$I = \frac{1}{2} \epsilon |E|^2 \frac{c}{n} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} EE^* \quad (11)$$

式中, c 为光在真空中的传播速度, ϵ 为介质的介电常数, μ 为介质的磁导率。

由式(9)可知, 数值孔径 (Numerical Aperture, NA) 值是影响瑞利距离进而影响光束聚焦程度的关键因素, 因此对该要素如何影响光束聚焦程度以及 CARS 信号强度进行了仿真。仿真中各介质的折射率皆取 1.0, 而物镜折射率取 1.20; 斯托克斯光波长取 1 064 nm, 泵浦光波长取 812 nm, 对应 CARS 信号的拉曼频移为 $2 916 \text{ cm}^{-1}$; 两束激光到达样本处的功率都为 1 mW; 仿真使用 MATLAB 软件实现。

两束激光经过高倍物镜之后进行共线聚焦处理, 在物镜的焦点处的三维光场强度分布如图 1 所示。其

中图1(a)为斯托克斯光在不同物镜下的模拟结果,分别为 $NA=0.25$ 、 0.4 、 0.65 的物镜在 $z=0$ 处 xy 截面的光场分布特征以及斯托克斯光在不同物镜下 xz 截面的光场传输情况,可以看出在焦点处,物镜 NA 值越大,聚焦光斑越小,传输距离越短,强度越高。图1(b)为泵浦光在不同物镜下的模拟结果,分别包括 $NA=0.25$ 、 0.4 、 0.65 的物镜在 $z=0$ 处 xy 截面的光场分布特征以及在不同物镜下 xz 截面的光场传输情况。图1(c)和(d)为两束光在不同物镜时 x 轴一维坐标下的光场强度对比,两者的结果趋势基本一致,只是泵浦光因为波长更短,光斑能量更加集中。

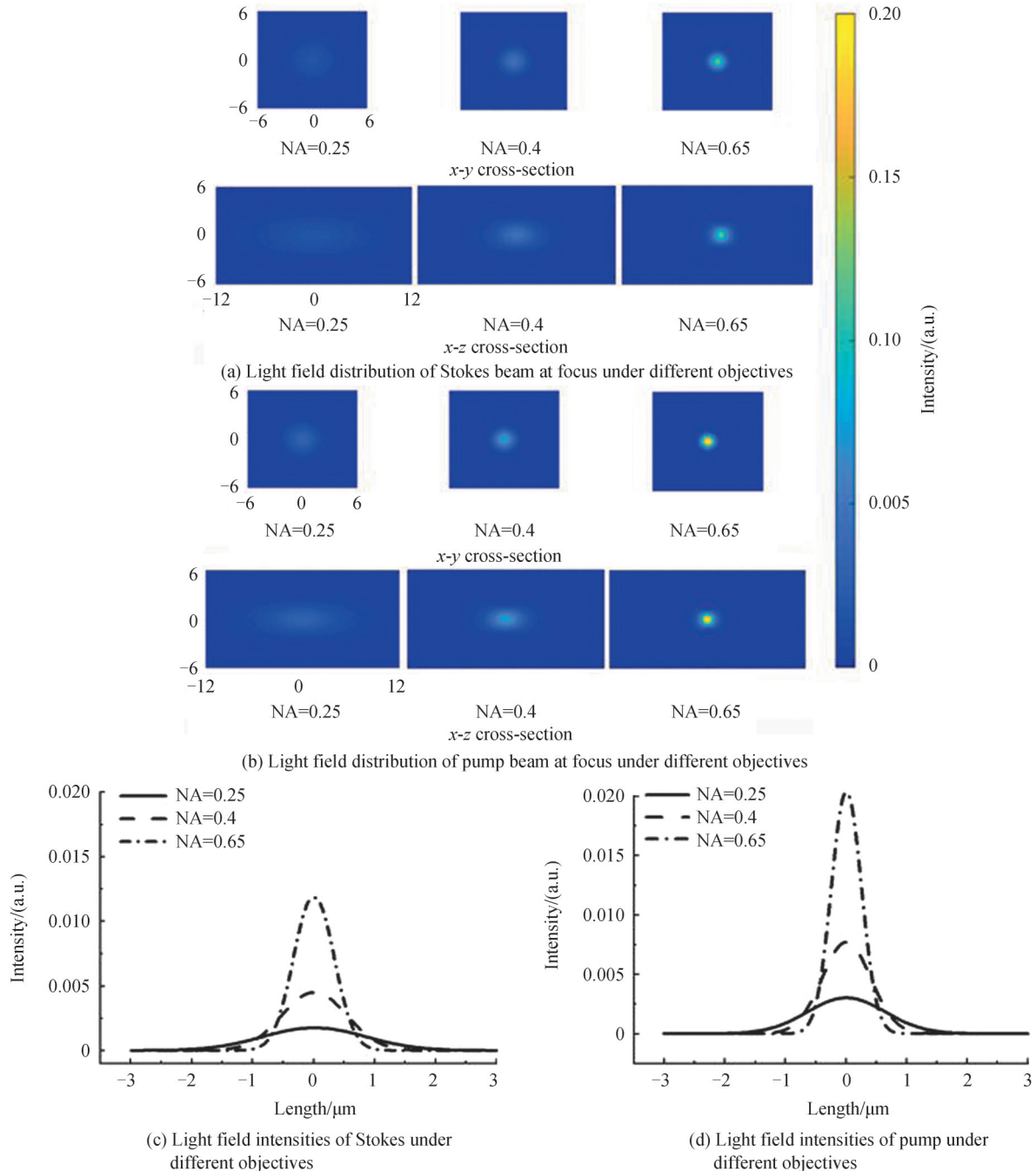


图1 不同物镜下斯托克斯光和泵浦光在焦点处的光场分布模拟结果

Fig.1 Simulation results of light field distribution of pump and Stokes beams at focus under different objectives

图2(a)~(c)分别为 $NA=0.25$ 、 0.4 、 0.65 的物镜下CARS信号在 $z=0$ 处的数值模拟结果。在焦点处,随着数值孔径的增加,聚焦的能量变高、强度变大。对其求半高宽并计算积分面积得出图2(d)的结果,可以看出,随着 NA 值的增大,CARS信号强度呈现出非线性的增高,物镜 NA 值为 0.65 时的CARS信号强度分别

是 $NA=0.25$ 和 0.4 的 45 倍和 7 倍,因此物镜参数是影响 CARS 信号的重要因素。

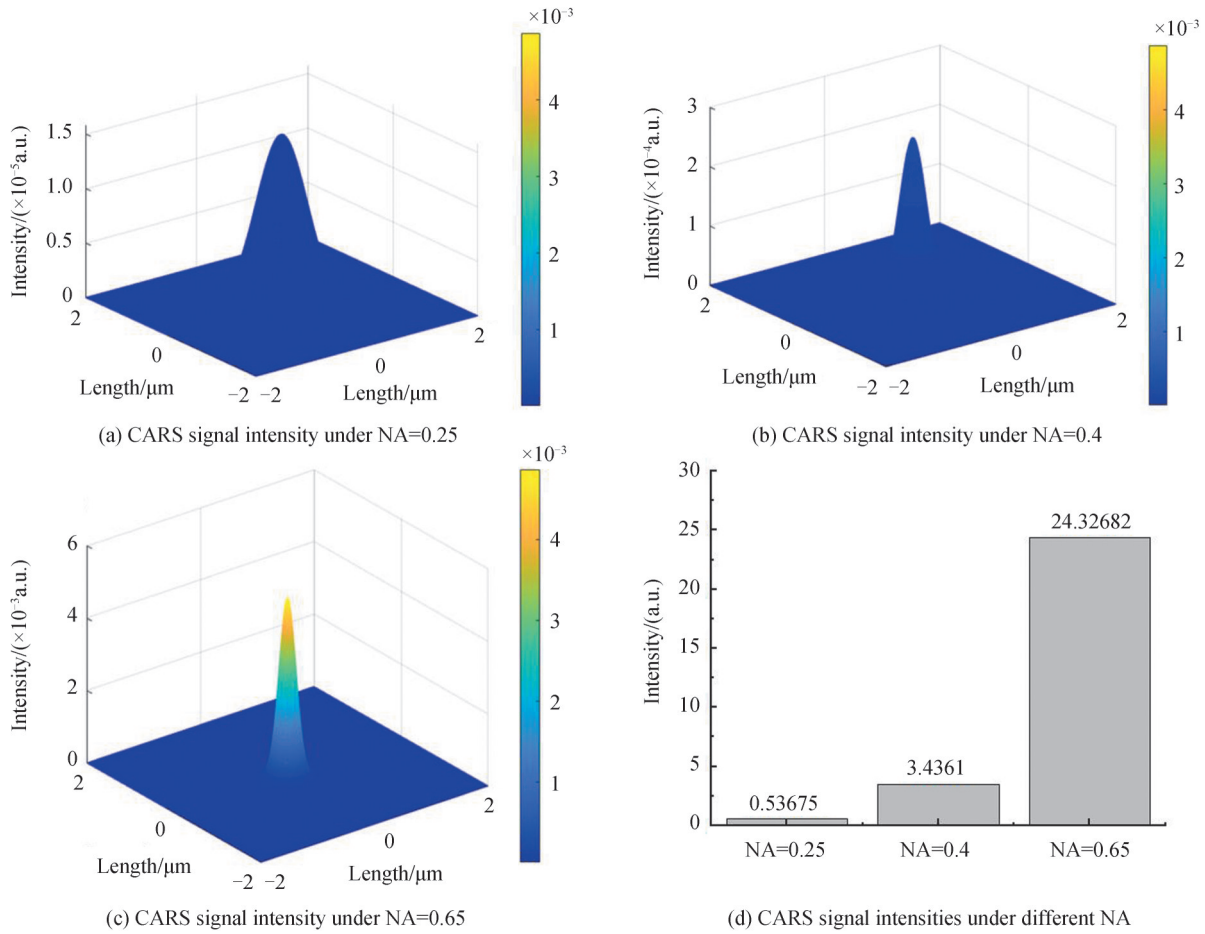


图2 不同物镜下的 CARS 信号强度模拟结果

Fig.2 Simulation results of CARS signal intensity under different objective lenses

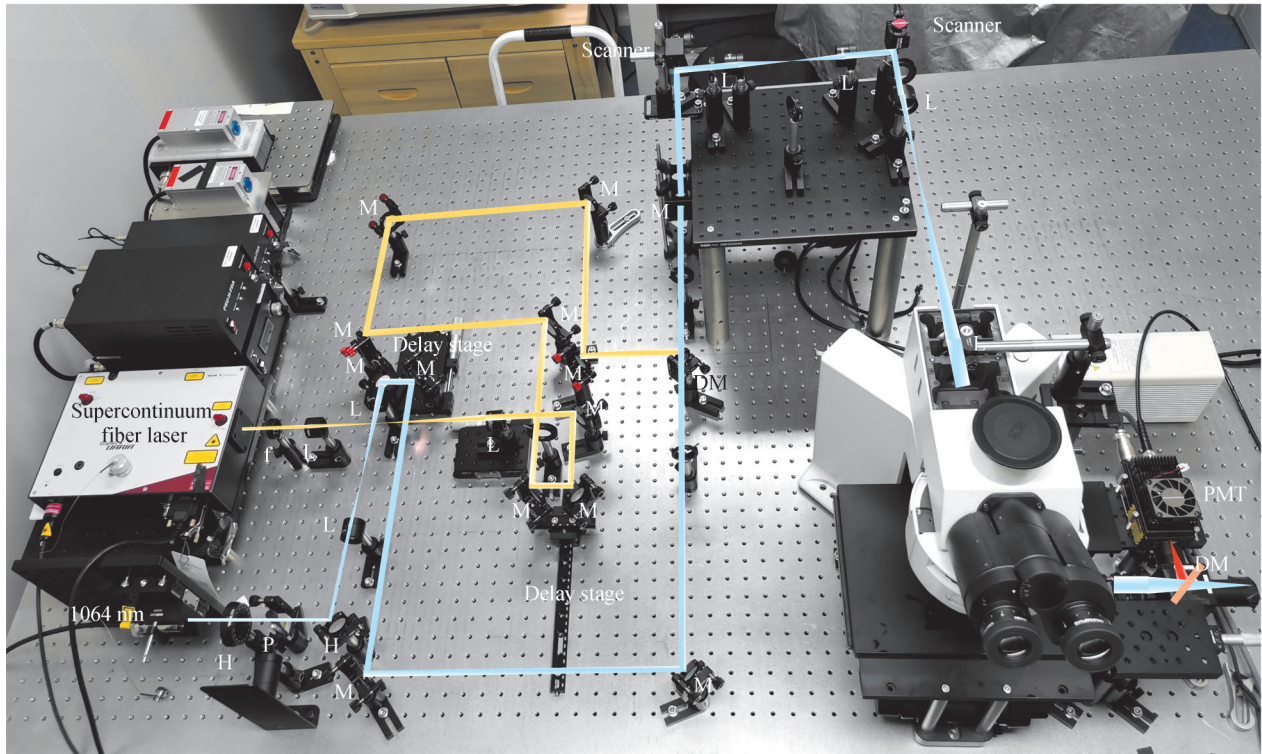
2 实验结果与分析

2.1 超连续谱光源 CARS 成像系统

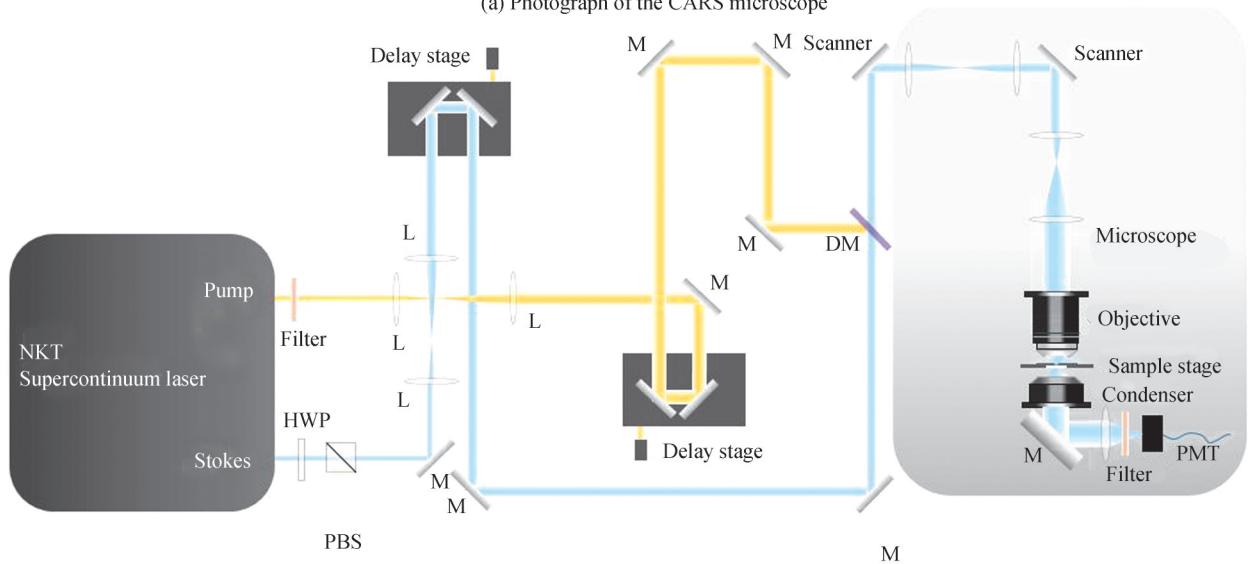
图 3 为实验室自主搭建的超连续谱光源 CARS 成像系统实物和示意图,其中超连续谱光纤激光器 (ALP-1060-SC, NKT Photonics) 作为 CARS 成像系统的激发光源。为了能够提供 CARS 成像所需的泵浦光和斯托克斯光,该超连续谱光纤激光器进行了特殊的定制,能够输出两束时间趋于同步的、40 MHz 的脉冲光。其中,固定波长为 1 064 nm 的输出通道作为斯托克斯光,脉冲宽度为 186 fs,可输出功率为 1.17 W;可在 400~2 400 nm 范围内宽谱连续输出通道作为泵浦光,脉冲宽度为 58 ps,680~1 000 nm 范围内单线宽输出功率为 4.4 mW。具体实验应用中,采用超连续谱光纤激光器配备的可调谐滤波器选定输出光束的中心波长(在 680~1 000 nm 范围内)和线宽,即可输出 CARS 成像所需的泵浦光,对应可测量的 CARS 信号的范围是 $601.5\sim 5\ 307.39\text{ cm}^{-1}$ 拉曼频移。由于超连续谱光纤激光器配备可调谐滤波器可选定一个纳米线宽输出,理论上可以提供 15 cm^{-1} 的光谱分辨率。

泵浦光和斯托克斯光分别经过相应的透镜组进行光束的扩束和质量优化,并通过相应的光学延时单元,以调节两束光到达样本位置时能够实现时间上的同步。经光学延时单元后,两束光再经过二向色镜 (Dichroic Mirror, DM; DMLP1000, 索雷博) 实现空间上的合束,最后通过振镜模块实现二维扫描后进入显微镜照射样本上;随后由聚光镜 (BB2-E03, 索雷博) 收集的信号经过二向色镜和滤光片滤掉激发光束,由光电倍增管 (Photomultiplier, PMT; H7422-20, 滨松) 收集并传输至电脑进行成像显示。在后续的实验中,共使用了三款物镜产生照射样本的聚焦光束,包括 1.2 数值孔径的 60 倍物镜 (UplanSApo 60X, 奥林巴斯)、

0.65数值孔径的40倍物镜(Plan N 40X, 奥林巴斯)和0.4数值孔径的20倍物镜(Plan N 20X, 奥林巴斯)。



(a) Photograph of the CARS microscope



(b) Diagram of the CARS microscope

图3 超连续谱光源 CARS 成像系统

Fig.3 Setup of supercontinuum fiber laser-based CARS microscope

2.2 超连续谱光源 CARS 成像系统的性能测试

2.2.1 CARS 信号的确认

泵浦光和斯托克斯光在样本激发处达到空间和时间上的完全重合是 CARS 信号产生的必要条件。在空间方面,两束激光通过二向色镜合束后经高倍物镜进行聚焦,二向色镜前通过调整反射镜组保证两束光基本合束,从而在样本处两束光斑合束的面积非常小;在时间方面,首先使用示波器观测两束光的波形,通过调整光学时延单元,尽可能保证两束激光的脉冲波峰在同一个时刻,以粗调两束光的时间重合;在此基础上,继续微调光学时延单元的平移台,改变其中一束激光的光程,进而改变两束激光的光程差,通过标准样

品的成像信号反馈确定两束激光的时间同步,即标准样本的CARS信号最强点表示两束激光已经实现时间重合。选用二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)作为样本来确认CARS信号的产生,图4为使用型号为ATP5020的奥谱天成光谱仪所测得的DMSO样品的拉曼光谱。

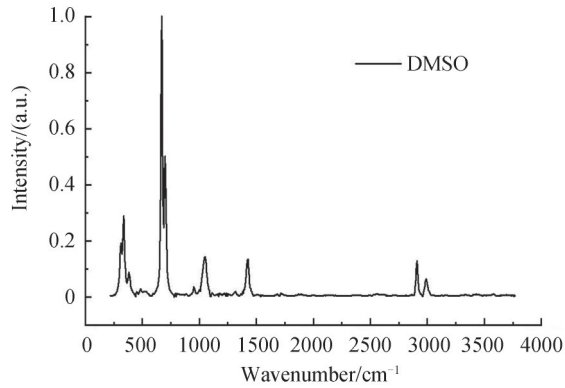


图4 DMSO的拉曼光谱
Fig. 4 Raman spectra of DMSO

二甲基亚砜是一种无色无味的透明液体,具有较高的稳定性,其在 2916 cm^{-1} 处由于 CH_2 键的振动具有较强的拉曼信号,由于该波数位于非指纹区,不会受到水的影响;附近没有复杂的峰影响,较为适合进行检测。而此时CARS信号的产生要求泵浦光和斯托克斯光的频率差与样品本身某个化学键的振动频率完全匹配才能激发。该实验在制备好DMSO样本之后,仅打开一束激发光(Stokes or pump)时,并没有发现CARS信号,如图5(a)、(b)所示;而当调整信号激发为 2916 cm^{-1} 时,可发现在DMSO液体成像区域具有强

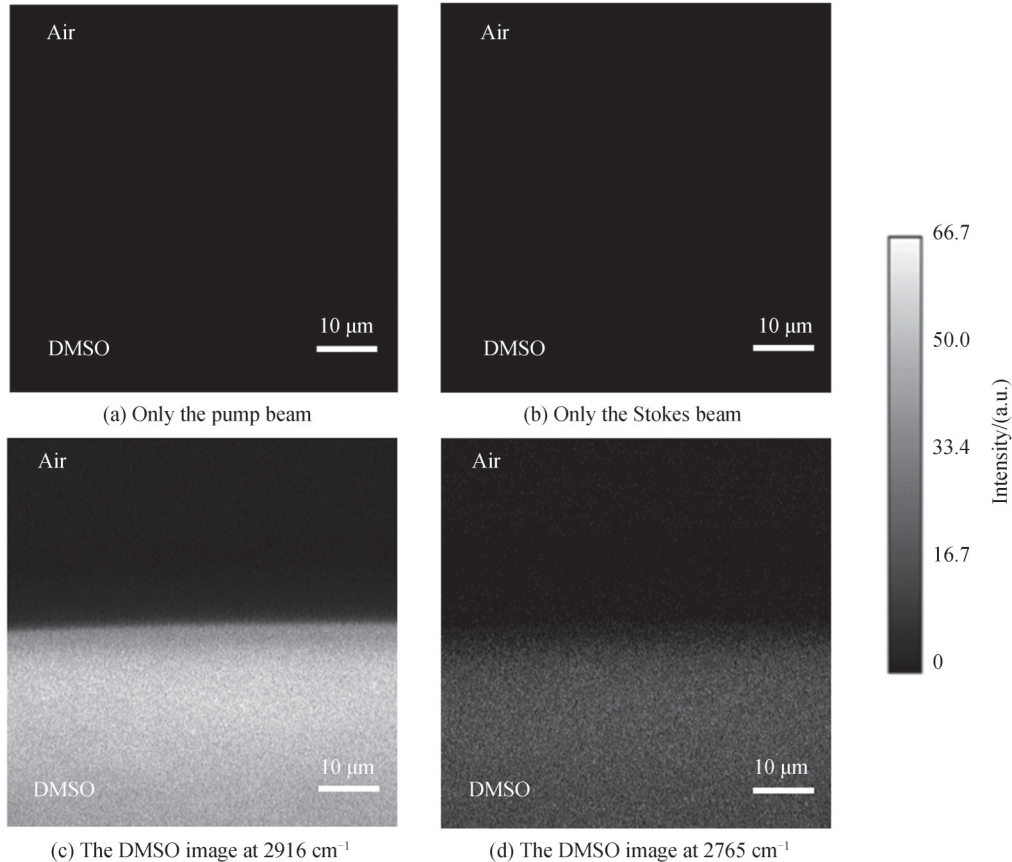


图5 DMSO的CARS图像
Fig. 5 The CARS image of DMSO

烈的 CARS 信号,如图 5(c)所示。图 5(d)为 DMSO 样本在 2765 cm^{-1} 的非共振图像,由于两束激光的频差与 DMSO 的 CH_2 键没有形成共振,因此其信号十分微弱,趋于消失。由此可认为搭建的系统可以进行信号的有效激发。

2.2.2 CARS 信号的优化

在微弱探测领域,探测器的优劣直接决定着信号的成像质量。选用日本滨松公司的两款 PMT 作为探测器进行 CARS 成像测试,型号分别为 H10721-20 和 H7422-40,两者相关参数对比如表 1 所示。

表 1 两种 PMT 的相关参数^[18]
Table 1 Corresponding parameters of two types of PMTs^[18]

Parameter	H10721-20	H7422-40
Active area	$\phi 8$	$\phi 5$
Peak sensitivity wavelength/nm	630	580
Cathode radiation sensitivity/($\text{mA}\cdot\text{W}^{-1}$)	78	176 (550 nm)
Anodic radiation sensitivity/($\text{A}\cdot\text{W}^{-1}$)	1.5×10^5	8.8×10^4
Dark current/nA	10	0.4
Rise time/ns	0.57	1
Ripple noise/mV	0.3	0.6

相比光电管,PMT 增加了电子光学系统和电子倍增极,因此极大地提高了灵敏度。PMT 的光阴极和入射窗口的材料性质决定了其阴极辐射灵敏度的高低,阴极辐射灵敏度的大小通过光阴极产生的光电流与入射到它表面的光通量之比计算,其数值的高低是衡量 PMT 探测响应能力的重要指标,因此 PMT 在特定波长下的阴极辐射灵敏度是很重要的参考依据。图 6(a)为 H7422-40 探测器的灵敏度曲线(黑色实线),图 6(b)为 H10721-20 探测器的灵敏度曲线(黑色虚线)。搭建系统接收的 CARS 信号波长为 655 nm 左右,在该信号波长下 H7422-40 探测器的阴极辐射灵敏度接近该探测器的最大值(176 mA/W),H10721-20 探测器在该信号波长下的阴极辐射灵敏度为该探测器的最大值(78 mA/W)。

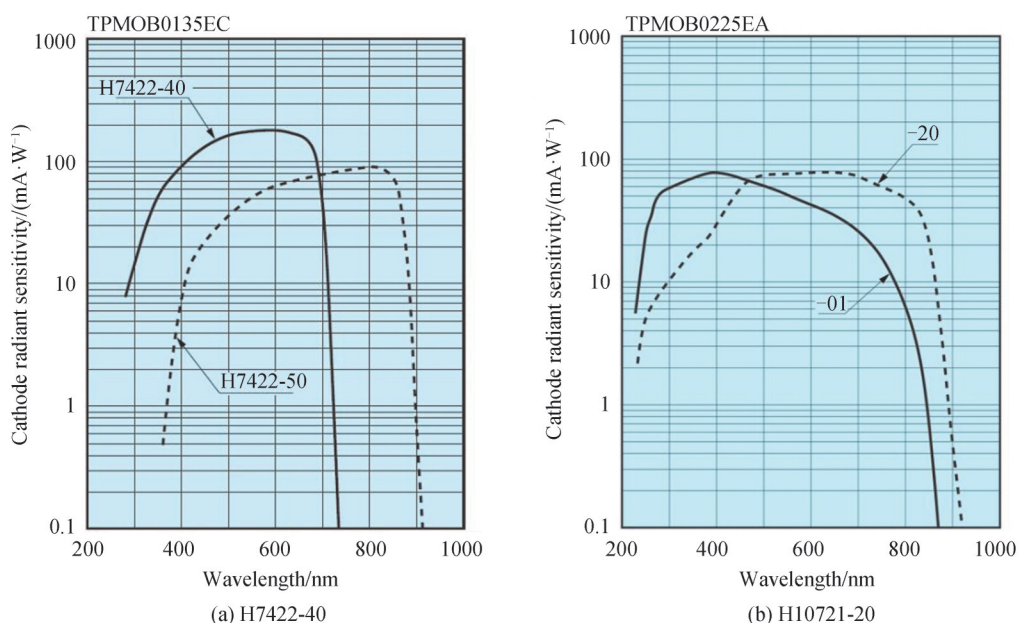


图 6 两种 PMT 的阴极灵敏度曲线^[18]
Fig. 6 Cathode sensitivity curves of two types of PMTs^[18]

根据对两种PMT的介绍和分析,在相同的实验环境下,使用这两种不同的探测器进行DMSO样品实验,如图7所示。图7(a)与(b)分别为不同探测器在同一成像参数下的样本成像结果,可以看出H7422-40探测器较H10721-20探测器的成像效果明显更好;图7(c)为所述两种探测器检测样本信号强度和信噪比的对比结果,H7422-40探测器相比于H10721-20探测器信号强度提升了大约4倍,信噪比提升了大约3.5倍。因此对于本系统,使用H7422-40探测器相比于H10721-20探测器,不论是信号强度还是信噪比,都有巨大的优势。

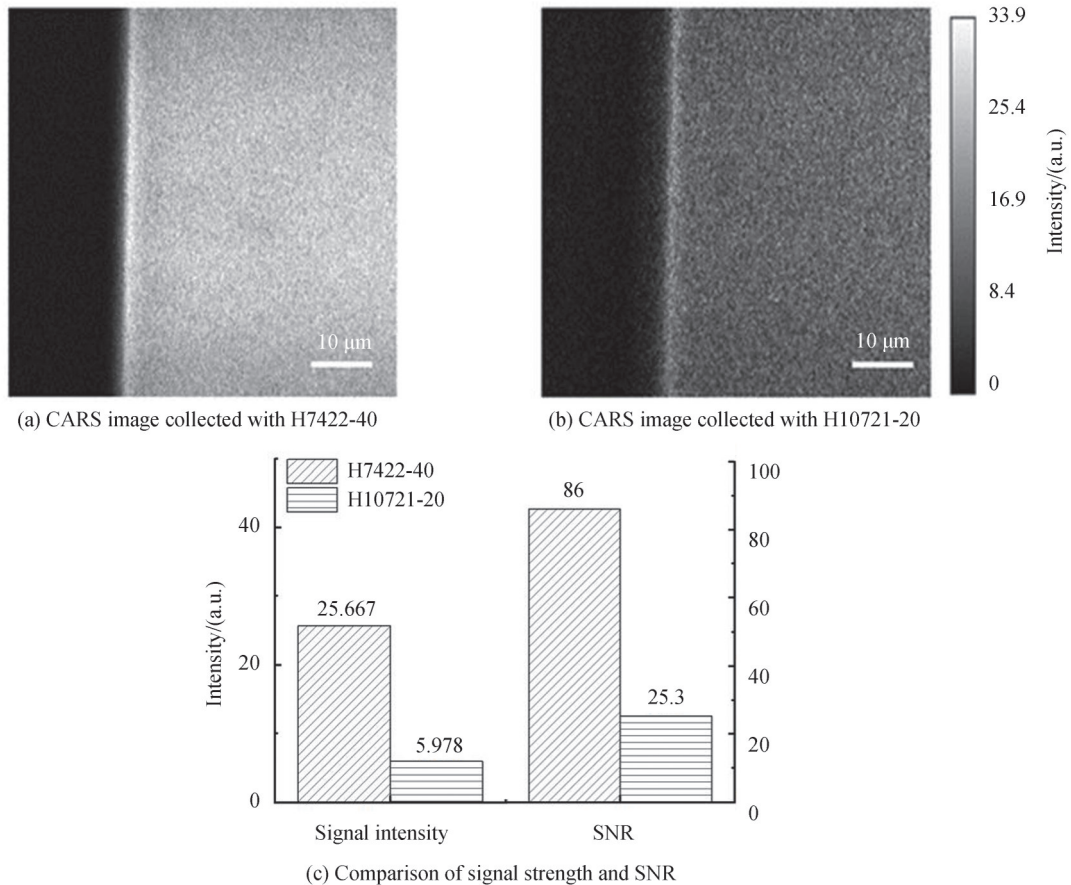


图7 不同探测器的成像效果

Fig. 7 Images acquired with different detectors

2.3 CARS成像结果与数值模拟的对比和分析

2.3.1 信号强度与物镜数值孔径的关系

物镜是显微镜最重要的光学元件,其性能的优劣直接影响成像的质量和各项光学技术参数。针对不同的样本、视场、分辨率等信息,需要选择合适的物镜进行成像。使用标准样本DMSO进行不同物镜CARS信号成像实验,物镜参数分别为 $NA=0.4$ 、 $NA=0.65$ 、 $NA=1.2$ 。

图8(a)~(c)分别为使用三种物镜对同一样本信号检测的成像结果,图8(d)为三种物镜的信号强度和信噪比对比。可以发现,相比于 $NA=0.4$ 的物镜, $NA=0.65$ 和 $NA=1.2$ 的物镜在信号强度方面分别提高了2.2倍和16.3倍,在信噪比方面分别提高了2.88倍和17.6倍,提高比例基本一致。

基于CARS信号的产生理论,进一步对 NA 值分别为0.4、0.65、1.2的物镜下CARS信号进行数值模拟,得到其在焦点附近的信号强度分布,进而对其进行积分计算求焦点处的强度值,并与实验结果进行了对比。如图8(e)所示,随着 NA 值的增大,信号强度提高明显。归一化处理之后, $NA=1.2$ 和 $NA=0.65$ 物镜的实验结果与仿真结果基本一致;使用 $NA=0.4$ 物镜的实验结果较仿真结果有所提升,其主要与探测器本身的波纹电压噪声、暗电流等因素有关,即在 $NA=0.4$ 的情况下,信号本身的强度和信噪比较低,受到噪声的影响较大,由于数值模拟结果不存在噪声干扰,所以实验测到的CARS信号强度有所偏高。

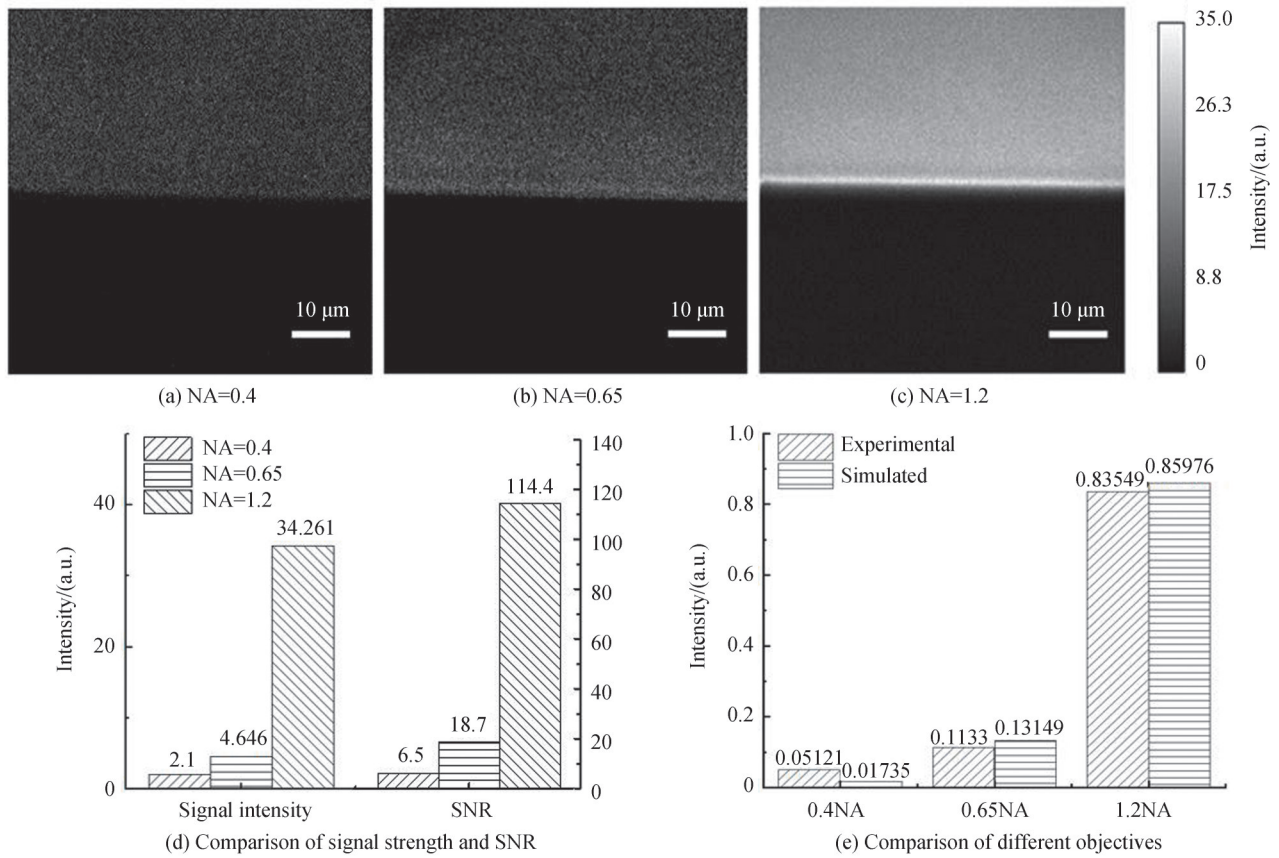


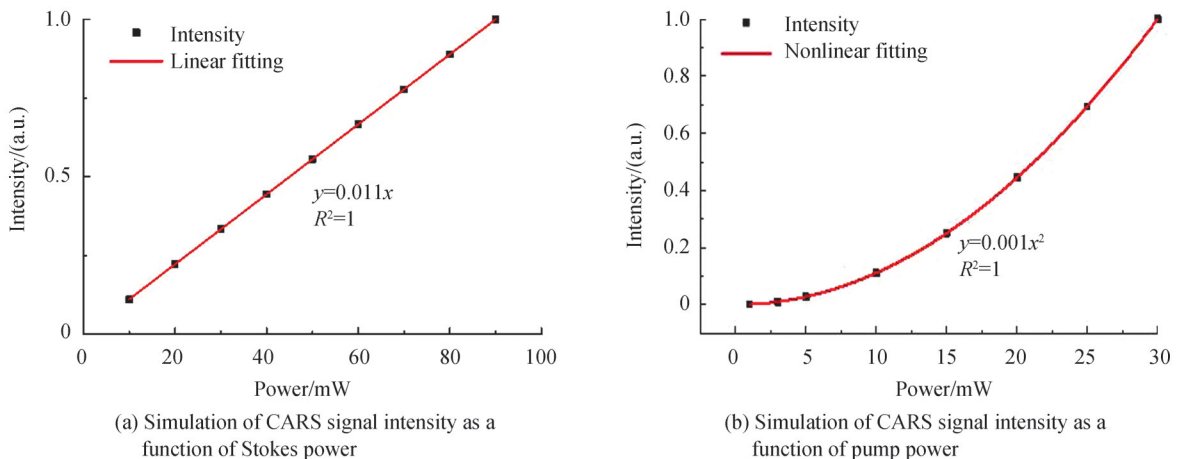
图8 不同物镜的成像结果及其与数值模拟对比

Fig.8 Imaging results with different objectives and their comparisons with numerical simulations

2.3.2 CARS信号强度与功率的关系

根据理论分析可知,两束光的功率是影响CARS信号强度的关键因素之一,因此对不同功率的CARS信号进行数值模拟和分析,图9为CARS信号强度随不同激发功率的变化和拟合图。图9(a)仿真了保持斯托克斯光的功率不变,CARS信号强度随着泵浦光功率增加的变化情况;图9(b)仿真了保持泵浦光功率不变,CARS信号强度随着斯托克斯光功率增加的变化情况。由此可发现CARS的信号强度与斯托克斯光功率呈线性变化关系、与泵浦光的功率呈平方变化关系,该结果与理论保持了良好的一致性。

使用60×(NA=1.2)的物镜,分别增加斯托克斯光和泵浦光的功率,进行CARS信号强度与功率关系的实验研究。同样使用标准样品DMSO进行成像测试,图9(c)对所采集的样本CARS信号强度与斯托克斯光功率的变化关系进行拟合,拟合结果为 $y=0.01x+0.084$, R^2 值为0.9982,与数值模拟结果 $y=0.011x$ 基本一



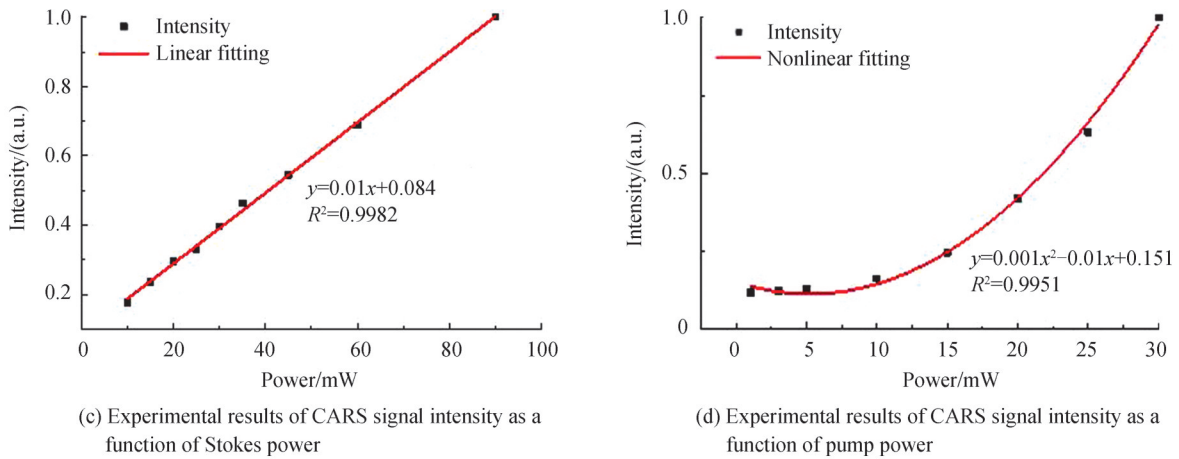


图9 CARS信号强度随着激光功率的变化关系

Fig.9 Relationship between CARS signal intensity and laser power

致,表明所采集样本CARS信号的强度与斯托克斯光功率成线性关系。图9(d)为CARS信号强度与泵浦光功率的变化关系,拟合公式为 $y=0.001x^2-0.01x+0.151$, R^2 值为0.9951,与数值模拟结果 $y=0.001x^2$ 基本一致,且与泵浦光功率呈平方关系。因此实验中的激发光功率和CARS信号强度关系与数值模拟的结果基本一致,并与理论吻合。

2.3.3 CARS信号强度与样本浓度的关系

式(3)推导出CARS信号与非线性磁化率的平方幅度成正比,又因为 $\chi_{\text{CARS}}^{(3)}$ 与散射分子的密度成正比,据此在CARS成像实验中,仅改变样本的浓度,理论上会得到信号强度与样本浓度平方成正比的结果。而对成像系统进行样品浓度测试,可以有效衡量系统成像信号的优劣情况,并且通过对不同浓度样本的研究可加深对整个系统构造的理解和优化。

使用本文搭建的CARS系统,进行不同浓度的DMSO成像实验。将不同比例的DMSO和蒸馏水混和,根据DMSO的摩尔体积为71.0 mL/mol,计算得到浓度分别为1400~77 mmol/L的10组DMSO溶液,并对以上不同浓度的DMSO样本进行CARS成像。结果发现在样品浓度降低至140 mmol/L之后,信号强度出现平稳波动现象。浓度较大时,信号强度下降较为明显,因此选择浓度在77~380 mmol/L区间进行分析,并对该区间进行浓度与信号强度的数值模拟研究。图10(a)为模拟结果,随着样本浓度的降低,信号强度也在降低,并且成平方关系($y=6.9x^2$)。如图10(b)所示,实验所采集的样本拉曼信号随着浓度的下降,信号强度也逐渐降低,对结果进行多项式拟合可以得出,CARS信号强度与DMSO浓度呈二次曲线关系($y=5.7x^2-0.89x+0.5$), R^2 值为0.99,与数值模拟结果相近,也与理论吻合。因此可以认定该系统在使用DMSO做样品

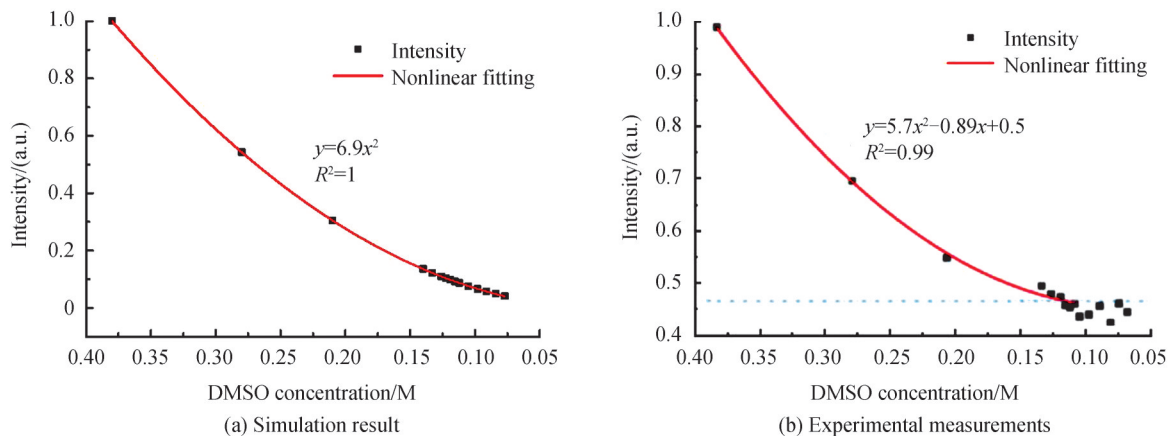


图10 CARS信号强度与样本浓度的关系

Fig.10 Relationship between the CARS signal intensity and sample concentration

时其浓度检测能力与理论推导相符。需要指出的是,由于实验中并未对DMSO浓度进行标定,因此这里给出的CARS信号强度与DMSO浓度的关系并不是严格的定量关系,只是两者之间的定性变化关系。

3 结论

本文围绕目前CARS技术存在价格昂贵、系统设计复杂、不便维护、体积庞大等问题,结合超连续谱光纤激光器可以选择近红外光源、探测生物样本荧光干扰少、探测深度深、性价比高且体积小的优点,开展基于超连续谱光源的CARS成像系统及其实验可行性研究,成功搭建了基于超连续谱光纤激光器的CARS成像系统,并对其进行了性能测试以及理论与数值仿真进行对比。随着物镜的数值孔径从0.4增大到1.2,CARS信号强度和信噪比可提高16倍左右;在信号强度与激发光功率、样本浓度的关系探究中,CARS信号强度与斯托克斯光功率呈很好的线性关系($R^2=0.9982$),与泵浦光功率呈很好的二次曲线关系($R^2=0.9951$),与样本浓度呈很好的二次曲线关系($R^2=0.99$)。实验结果与数值仿真结果高度一致,从理论和实验上证明了将超连续谱光纤激光器应用于CARS成像系统的可行性。

参考文献

- [1] CHENG Jixin, XIE Xiaoliang. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [2] HEUKE S, SIVANKUTTY S, SCOTTE C, et al. Spatial frequency modulated imaging in coherent anti-Stokes Raman microscopy[J]. *Optica*, 2020, 7(5): 417-424.
- [3] WURTHWEIN T, BRINKMANN M, HELLWIG T, et al. High-sensitivity frequency modulation CARS with a compact and fast tunable fiber-based light source[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(15): 3544-3547.
- [4] ZEYLIKOVICH I, ALFANO R R. The supercontinuum laser source[J]. *Applied Physics B*, 2006, 77(2): 265-268.
- [5] KANO H, HAMAGUCHI H O. Ultrabroadband ($>2500\text{ cm}^{-1}$) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber[J]. *Applied Physics Letters*, 2005, 86(12): 4142-4145.
- [6] OKUNO M, KANO H, LEPROUX P, et al. Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(9): 923-925.
- [7] JR C C, LRR Y J, HRDDLESTON J M, et al. High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(8): 627-634.
- [8] SHEN Yujie, WANG Jizhou, WANG Kai, et al. Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy based on picosecond supercontinuum source[J]. *Applied Physics Letters Photonics*, 2018, 3(11): 116104-116112.
- [9] LI Yan, XIAO Xiaosheng, KONG Lingjie, et al. Fiber supercontinuum source for broadband-CARS microspectroscopy based on a dissipative soliton laser[J]. *IEEE Photonics Journal*, 2017, 9(4): 1-7.
- [10] LI Yan, XIAO Xiaosheng, YANG Changxi. Spectrally-compressed fiber laser source for supercontinuum-based broadband-CARS spectroscopy [J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2017, 29(23): 2012-2015.
- [11] LI Yan, XIAO Xiaosheng, GUO Jingjing, et al. Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a supercontinuum all-fiber laser[J]. *IEEE Photonics Journal*, 2019, 11(2): 1-8.
- [12] CHENG Jixin, XIE Xiaoliang. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications[J]. *Journal of Physical Chemistry*, 2004, 108(3): 827-840.
- [13] LI Chunfei. *Nonlinear optics: principles and applications*[M]. Shanghai Jiaotong University Press, 2017.
- [14] CHENG Jixin, XIE Xiaoliang. *Coherent Raman scattering microscopy*[M]. CRC Press, 2016.
- [15] CHENG Jixin, VOLKMER A, XIE Xiaoliang. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2002, 19(6): 1363-1375.
- [16] BISHOP D M. *Molecular vibration and nonlinear optics*[M]. John Wiley & Sons, Inc. 2007.
- [17] LI Shuyi, HAN Xueyun, REN Yuzhen. Gaussian beam with the center beam power and amplitude and the electric field intensity distribution relationship[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2008, 36(1): 60-62.
李书义, 韩雪云, 任玉珍. 高斯光束中心处电场的振幅与光束功率及其强度分布的关系[J]. *河南师范大学学报(自然版)*, 2008, 36(1): 60-62.
- [18] [EB/OL]. [2021-07-16]. <http://hamamatsu.com.cn>.

Foundation item: Fundamental Research Funds for Central Universities (No. QTZX2105), Key Research and Development Program of Shaanxi (No. 2021ZDLSF04-05), National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC0910600), National Natural Science Foundation of China (No. 81871397), National Young Top-notch Talent of "Ten Thousand Talents Program", Shaanxi Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 2020JC-27), Shaanxi Young Top-notch Talent of "Special Support Program"