

# Мультимодальная микроспектроскопия нелинейного комбинационного рассеяния света с использованием сверхкоротких чирпированных лазерных импульсов

А. А. Ланин<sup>+\*</sup>, Е. А. Степанов<sup>+\*</sup>, Р. А. Тихонов<sup>+</sup>, Д. А. Сидоров-Бирюков<sup>+\*</sup>, А. Б. Федотов<sup>+\*</sup>,  
А. М. Желтиков<sup>+\*×<sup>o</sup>1</sup>)

<sup>+</sup> Физический факультет, Международный лазерный центр, МГУ им. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

<sup>\*</sup> Российский квантовый центр, 143025 Сколково, Россия

<sup>×</sup> Texas A&M University, College Station TX, 77843 USA

<sup>o</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, 123098 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24 марта 2015 г.

Продемонстрированы физические принципы мультимодальной нелинейно-оптической микроспектроскопии, сочетающей в рамках единой оптической схемы методы когерентного и вынужденного комбинационного рассеяния света с использованием сверхкоротких чирпированных лазерных импульсов. На основе высокоточной компенсации нелинейных искажений фазы сверхкоротких импульсов в широкой полосе частот реализована лазерная микроспектроскопия высокого спектрального разрешения, позволяющая надежно разделять группы характеристических молекулярных колебаний с близкими частотами при анализе сложных многокомпонентных систем.

DOI: 10.7868/S0370274X15090027

Методы нелинейной оптики играют центральную роль в развитии неинвазивной микроскопии высокопространственного разрешения. На протяжении последних полутора десятилетий явление когерентного антистоксова рассеяния света (КАРС) [1–3] с успехом используется для микроскопии живых систем [4, 5], обеспечивая высокую химическую селективность, внутриклеточное пространственное разрешение и высокие скорости накопления изображений [6, 7]. Благодаря этим преимуществам КАРС-микроскопия открывает уникальные возможности для регистрации внутриклеточной динамики [8], изучения липидных мембран [9] и нейрофизиологических исследований [10].

Основные физические факторы, ограничивающие использование КАРС в качестве техники микроскопии сложных биологических систем, связаны с наличием когерентного фона, обусловленного нерезонансными процессами четырехволнового взаимодействия, а также квадратичной зависимостью интенсивности сигнала КАРС от концентрации частиц, являющейся основным препятствием для КАРС-микроскопии одиночных молекул [1–3]. Обе проблемы в значительной степени решаются в схеме нели-

нейной микроскопии на основе вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР) света, которая в последние годы находит все более широкое применение при решении задач микроскопии биологических объектов [11, 12].

Использование в схемах нелинейно-оптической микроскопии сверхкоротких лазерных импульсов неизбежно приводит к ограничениям на спектральное разрешение и, как следствие, затрудняет выделение полезного сигнала в задачах микроскопии многокомпонентных биологических систем. Однако благодаря когерентной природе лазерных импульсов спектральное разрешение таких методов микроскопии может быть существенно увеличено за счет использования фазово-модулированных (чирпированных) лазерных импульсов [13–17]. Линейный чирп задает взаимно однозначное соответствие между частотой и временем задержки между импульсами  $\tau$ . Это позволяет восстановить спектр комбинационно-активной моды на основе измерения интенсивности сигнала нелинейного комбинационного рассеяния как функции  $\tau$  [13–17].

В настоящей работе демонстрируются физические принципы мультимодальной нелинейно-оптической микроспектроскопии, сочетающей в рамках единой оптической схемы методы КАРС и

<sup>1</sup>) e-mail: zheltikov@physics.msu.ru

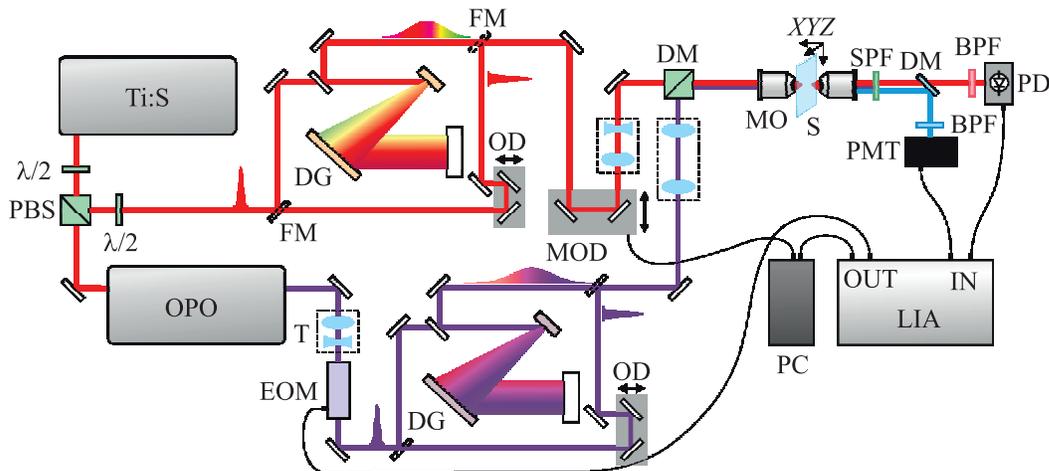


Рис. 1. (Цветной онлайн) Лазерный генератор на кристалле Ti:S: OPO – параметрический генератор света (ПГС); PBS – поляризационный делитель;  $\lambda/2$  – полуволновая пластина; DG – дифракционная решетка; FM – откидывающееся зеркало; EOM – электрооптический модулятор; Т – телескоп; OD – линия оптической задержки; MOD – моторизованная линия оптической задержки; DM – дихроичное зеркало; SPF – фильтр высоких частот; BPF – оптический полосовой фильтр; МО – микроскопный объектив; PD – кремниевый фотодетектор; PMT – фотоэлектронный умножитель (ФЭУ); Lock-in – синхронный детектор; PC – компьютер

ВКР с использованием сверхкоротких chirпированных лазерных импульсов. На основе высокоточной компенсации нелинейных искажений фазы сверхкоротких импульсов в широкой полосе частот реализована лазерная микроспектроскопия высокого спектрального разрешения, позволяющая надежно разделять группы характеристических молекулярных колебаний с близкими частотами при анализе сложных многокомпонентных физических, химических и биологических систем.

Реализованная в настоящей работе схема нелинейно-оптической микроспектроскопии основана на использовании пары сверхкоротких лазерных импульсов с идентичным линейным chirпом, играющих роль полей накачки и Стокса в процессах когерентного и вынужденного рассеяния света. Мгновенные частоты этих импульсов,  $\omega_{pu}$  и  $\omega_{st}$ , изменяются во времени как  $\omega_{pu}(\eta_1) = \omega_1 + \alpha\eta_1$ ,  $\omega_{st}(\eta_2) = \omega_2 + \alpha\eta_2$ , где  $\omega_1$  и  $\omega_2$  – центральные частоты лазерных импульсов,  $\alpha$  – параметр chirпа,  $\eta_1$  и  $\eta_2 = \eta_1 + \tau$  – время в бегущей системе отсчета, связанной с импульсом накачки,  $\tau$  – время задержки между импульсами. Спектр комбинационного возбуждения, обеспечиваемого такой парой импульсов, содержит компоненты на разностной частоте  $\Omega_m(\tau) = (\omega_1 - \omega_2) - \alpha\tau$ . Измерение спектра комбинационного рассеяния производится путем сканирования частоты  $\Omega_m(\tau)$  в окрестности частоты исследуемого молекулярного колебания  $\Omega_R$  путем изменения задержки  $\tau$ . Предельное спектральное разрешение таких измерений определяет-

ся длительностями растянутых устройством формирования chirпа (стретчером) импульсов накачки и Стокса,  $T_{pu}$  и  $T_{st}$ :  $\Delta\Omega_m(\tau) = 4 \ln 2 \sqrt{T_{st}^2 + T_{pu}^2} / T_{st} T_{pu}$ . Так как длительности  $T_{pu}$  и  $T_{st}$  растянутых импульсов могут на порядки превышать длительности спектрально ограниченных импульсов, поддерживаемых полной шириной спектра полей накачки и Стокса, использование chirпированных импульсов в такой схеме нелинейно-оптических взаимодействий не только удобно с практической точки зрения, но и позволяет существенно увеличить спектральное разрешение нелинейной микроспектроскопии. Однако для реализации этой возможности требуется решить ключевую задачу подавления нелинейных искажений фазы сверхкоротких лазерных импульсов во всей полосе частот, необходимой для регистрации характеристических молекулярных колебаний.

В настоящей работе указаны пути решения этих задач. В экспериментах используется схема мультимодальной микроскопии нелинейного комбинационного рассеяния, реализованная на базе лазерной системы (рис. 1), состоящей из задающего генератора сверхкоротких импульсов на кристалле сапфира, легированного титаном, и параметрического генератора света (ПГС). Задающий генератор формирует лазерные импульсы длительностью 100–150 фс с энергией до 40 нДж, перестраиваемые в диапазоне длин волн от 700 до 920 нм. Эти импульсы используются для накачки ПГС (рис. 1), который служит источником сверхкоротких импульсов, перестраива-

емых в диапазоне длин волн от 1000 до 1500 нм. Импульсы, формируемые титан-сапфировым лазером и ПГС, используются в качестве полей накачки и Стокса в схеме нелинейного комбинационного рассеяния света. В представленных ниже экспериментах центральная длина волны поля накачки составляла 824 нм, а центральная длина волны стоксова излучения перестраивалась в диапазоне от 1040 до 1200 нм.

С помощью телескопов и регулируемых линий оптической задержки, установленных в каждом из оптических плеч схемы (рис. 1), осуществляется высокоточное совмещение импульсов во времени и пространстве. Управление фазой импульсов проводится при помощи стретчеров, состоящих из пары дифракционных решеток (1200 штрихов на миллиметр). Предусмотренные в схеме откидывающиеся зеркала (FM на рис. 1) обеспечивают возможность направлять лазерные пучки по альтернативному пути, в обход стретчеров. Такая конфигурация пучков используется в экспериментах со спектрально ограниченными импульсами. Спектральные измерения производятся путем автоматического сканирования оптической линии задержки, установленной на прецизионной механической подаче, управляемой шаговым двигателем (MOD на рис. 1).

Фокусировка излучения в образец и коллимация сигнала нелинейно-оптического отклика производятся при помощи микроскопных объективов с увеличением  $\times 10$  и числовой апертурой  $NA = 0.25$ . Нелинейный сигнал пропускается через фильтр высоких частот, обеспечивающий подавление стоксовой волны, и отделяется от накачки с помощью дихроичного зеркала, а также набора фильтров высоких частот и полосовых фильтров в спектральном окне 600–700 нм. Отфильтрованный нелинейный сигнал регистрируется фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Импульсы поля накачки регистрируются кремниевым фотодетектором. Для подавления низкочастотных электрических шумов стоксово излучение модулируется по амплитуде электрооптическим модулятором (ЕОМ на рис. 1) с частотой 9.8 МГц или механическим прерывателем с частотой 1.4 кГц. Кремниевый фотодетектор и ФЭУ подключены к высокочастотному синхронному усилителю, осуществляющему демодуляцию сигнала.

На рис. 2а представлены результаты экспериментов на образцах полистирола, толуола и воды, выполненных в схеме ВКР-микроспектроскопии с использованием спектрально ограниченных импульсов длительностью около 160 фс со сканированием частоты стоксова поля. В области полосы комбинацион-

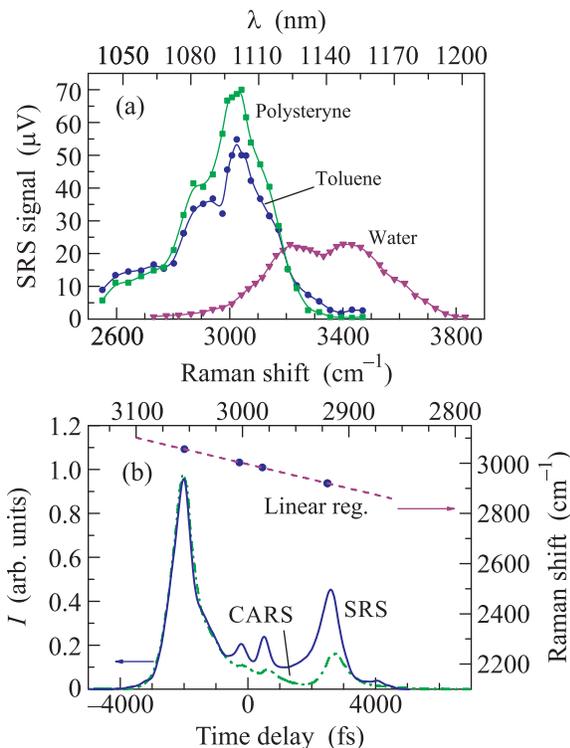


Рис. 2. (Цветной онлайн) (а) – Спектры ВКР-ослабления, записанные с помощью спектрально ограниченных фемтосекундных импульсов для полистирола (квадраты), толуола (кружки) и воды (треугольники). (б) – Зависимости сигналов ВКР-ослабления (синяя сплошная линия) и КАРС (зеленая пунктирная линия) для толуола от времени задержки между лазерными импульсами. Верхняя шкала соответствует комбинационной отстройке

ного рассеяния на исследуемых молекулярных колебаниях в области комбинационных частот в окрестности  $3000 \text{ см}^{-1}$  наблюдается ВКР-ослабление поля накачки. Спектры ВКР-ослабления имеют вид широких полос, соответствующих комбинационно-активным колебаниям СН- и ОН-групп исследуемых молекул. Как видно из результатов, представленных на рис. 2а, низкое спектральное разрешение (на уровне  $100 \text{ см}^{-1}$ ), характерное для этого варианта нелинейно-оптической микроспектроскопии, не позволяет разрешать структуру регистрируемых полос в спектре ВКР-ослабления. Это ограничивает возможности использования метода для точного определения химического состава сложных объектов и химически селективной микроскопии биологических систем.

Использование линейно chirпированных лазерных импульсов позволяет существенно повысить спектральное разрешение микроспектроскопии

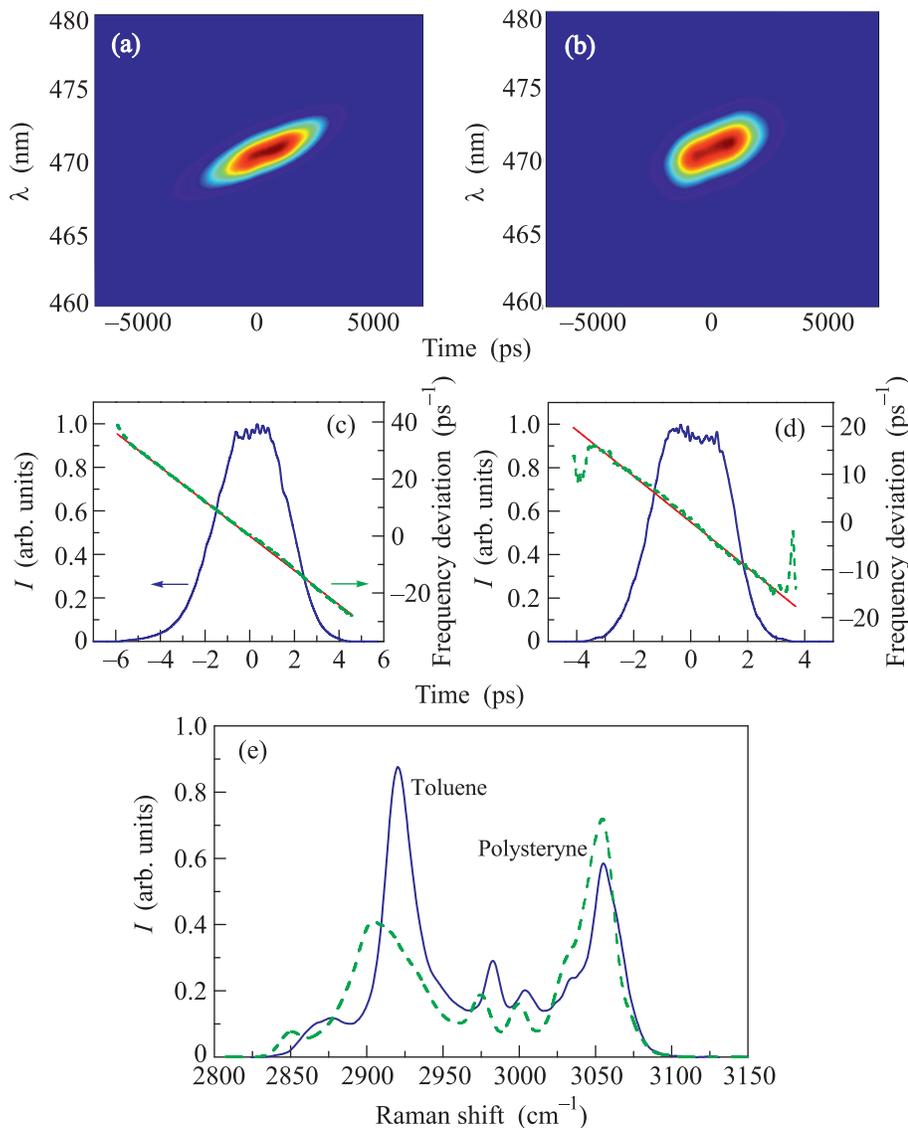


Рис. 3. (Цветной онлайн) Спектрограммы XFROG-импульсов накачки (а) и стоксова импульса (б). Временные огибающие (синие сплошные линии) и девиации мгновенной частоты от центральной (штриховые линии), восстановленные из XFROG-спектрограмм для импульсов накачки (с) и стоксова импульса (д). Красной сплошной линией показана девиация частоты, соответствующая идеальному линейному chirпу. (е) – Спектры ВКР-ослабления, записанные с помощью импульсов с линейным chirпом для молекул полистирола (зеленая линия) и толуола (синяя линия)

нелинейного комбинационного рассеяния без потери ширины спектрального диапазона комбинационного зондирования, определяемой спектральной шириной лазерных импульсов. Ключевым фактором для достижения максимального спектрального разрешения в схеме микроспектроскопии нелинейного комбинационного рассеяния является качество фазового профиля сверхкоротких лазерных импульсов с максимально высокой степенью подавления нелинейных искажений фазы. Данное условие накладывает жесткие требования на систему формирования chirпированных импульсов.

Выполненные в настоящей работе эксперименты показывают, что при условии высокоточной настройки решеточные стретчеры способны обеспечить формирование линейного chirпа с минимальными фазовыми искажениями в спектральном диапазоне, достаточном для микроспектроскопии наиболее важных характеристических молекулярных колебаний. Для высокоточного измерения характеристик chirпа сверхкоротких импульсов, формируемых в созданной лазерной системе, использовалась кросскорреляционная техника оптического стробирования с разрешением по частоте (XFROG). Для записи спектро-

граммы XFROG исследуемый chirпированный лазерный импульс смешивался с опорным спектрально ограниченным импульсом путем генерации суммарной частоты в кристалле ВВО толщиной 0.5 мм. Записанные таким образом XFROG-спектрограммы (рис. 3а и b) позволяют восстановить временную огибающую импульсов (сплошные линии на рис. 3с и d) и девиацию мгновенной частоты от центральной частоты импульса,  $\Delta\omega_{pu}(\eta_1) = \omega_{pu}(\eta_1) - \omega_1$ ,  $\Delta\omega_{st}(\eta_2) = \omega_{st}(\eta_2) - \omega_2$  (штриховые линии на рис. 3с и d). Как видно из результатов измерений, отклонение девиации частоты  $\Delta\omega_{pu}$  и  $\Delta\omega_{st}$  от линейной (сплошные красные линии на рис. 3с и d) не превышает  $0.8 \text{ ps}^{-1}$  для импульсов накачки и  $0.5 \text{ ps}^{-1}$  для стоксовых импульсов. При этом полный диапазон сканирования частоты в chirпированных импульсах составляет  $21.4 \text{ ps}^{-1}$  для импульса накачки и  $18.5 \text{ ps}^{-1}$  для стоксова импульса.

Используемые в экспериментах линейно chirпированные импульсы накачки и Стокса имели длительности  $T_{pu} = 3.7 \text{ ps}$  и  $T_{st} = 3.2 \text{ ps}$ . Параметр chirпа настраивался в зависимости от требуемого в эксперименте спектрального разрешения путем изменения расстояния между дифракционными решетками стретчеров. На рис. 2b представлены зависимости сигналов КАРС и ВКР на молекулярных колебаниях толуола от времени задержки  $\tau$ , полученные с использованием импульсов накачки и Стокса с параметром chirпа  $\alpha = 2.9 \text{ ps}^{-2}$ . Взаимно однозначное соответствие между временем задержки и частотой комбинационной отстройки, задаваемое линейным chirпом лазерных импульсов (синие кружки и штрихпунктирная линия на рис. 2b), позволяет идентифицировать пики, наблюдающиеся во временных зависимостях сигналов нелинейного комбинационного рассеяния при значениях временной задержки 2480, 460, -270, -1965 фс, как комбинационные моды толуола с частотами 2920, 2983, 3003 и  $3056 \text{ cm}^{-1}$ . Важно отметить характерные отличия в форме спектров КАРС и ВКР, отражающие различия в спектрах квадрата модуля и мнимой части нелинейно-оптической восприимчивости в области исследуемого комбинационного резонанса. Полная ширина по полувысоте линии толуола на  $2983 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\Gamma \approx 10 \text{ cm}^{-1}$ , диктует минимальное спектральное разрешение, позволяющее зарегистрировать данную молекулярную моду на фоне близлежащих спектральных линий, соответствующих другим молекулярным модам. Достигнутая в наших экспериментах точность настройки решеточных стретчеров удовлетворяет данному условию. Это позволяет достичь спектрального разрешения около  $6 \text{ cm}^{-1}$ , что примерно в 17 раз выше

спектрального разрешения ( $100 \text{ cm}^{-1}$ ), обеспечиваемого схемой с использованием спектрально ограниченных импульсов. Как видно из рис. 3е, реализованная схема микроспектроскопии с использованием линейно chirпированных импульсов позволяет надежно разрешать пики ВКР-спектров, соответствующие комбинационным модам близких по химическому строению молекул.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрированы физические принципы мультимодальной нелинейно-оптической микроспектроскопии, сочетающей в рамках единой оптической схемы методы когерентного и вынужденного комбинационного рассеяния света с использованием сверхкоротких chirпированных лазерных импульсов. На основе высокоточной компенсации нелинейных искажений фазы сверхкоротких импульсов в широкой полосе частот реализована лазерная микроспектроскопия высокого спектрального разрешения, позволяющая надежно разделять группы характеристических молекулярных колебаний с близкими частотами при анализе сложных многокомпонентных физических, химических и биологических систем.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы" (соглашение о предоставлении субсидии 14.607.21.0092 от 21 ноября 2014, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0092).

1. С. А. Ахманов, Н. И. Коротеев, *Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света*, Наука, М. (1981).
2. G. L. Eesley, *Coherent Raman Spectroscopy*, Pergamon, Oxford (1981).
3. А. М. Желтиков, Н. И. Коротеев, УФН **169**, 385 (1999).
4. A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, Phys. Rev. Lett. **82**, 4142 (1999).
5. C. L. Evans and X. S. Xie, Annu. Rev. Anal. Chem. **1**, 883 (2008).
6. J. P. Pezacki, J. A. Blake, D. C. Danielson, D. C. Kennedy, R. K. Lyn, and R. Singaravelu, Nat. Chem. Biol. **7**, 137 (2011).
7. C. H. Camp, Jr., Y. J. Lee, J. M. Heddleston, C. M. Hartshorn, A. R. H. Walker, J. N. Rich, J. D. Lathia, and M. T. Cicerone, Nat. Photon. **8**, 627 (2014).
8. J. X. Cheng and X. S. Xie, J. Phys. Chem. B **108**, 827 (2004).

9. C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris'haag, D. Côté, C. P. Lin, and X. S. Xie, PNAS **102**, 16807 (2005).
10. A. A. Voronin, I. V. Fedotov, L. V. Doronina-Amitonova, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov, Opt. Lett. **36**, 508 (2011).
11. C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, and X. S. Xie, Science **322**, 1857 (2008).
12. Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, Nat. Photon. **6**, 845 (2012).
13. A. M. Zheltikov and A. N. Naumov, Quantum Electron. **30**, 606 (2000).
14. A. N. Naumov and A. M. Zheltikov, J. Raman Spectrosc. **32**, 960 (2001).
15. T. Hellerer, A. M. K. Enejder, and A. Zumbusch, Appl. Phys. Lett. **85**, 25 (2004).
16. W. Langbein, I. Rocha-Mendoza, and P. Borri, J. Raman Spectrosc. **40**, 800 (2009).
17. A. A. Lanin, I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, D. A. Sidorov-Biryukov, and A. M. Zheltikov, Sci. Rep. **3**, 3265 (2013).