基于点扫描的同步辐射红外三维谱学显微研究

林乐诚1,4, 佟亚军2, 吉特1,3, 彭蔚蔚1,3, 肖体乔1,3, 朱化春1,3*, 陈敏1,3**

1中国科学院上海应用物理研究所,上海 201800;

²上海科技大学,上海 201210;

³中国科学院上海高等研究院上海光源,上海 201204;

4中国科学院大学,北京 100049

摘要 同步辐射红外(SRIR)光具有光谱范围宽、发散角小、亮度高以及信噪比高等优点,结合传统红外谱学技术,采用 SRIR 谱学显微技术对样品进行红外谱学显微,可以获得样品微米级别的空间光谱信息。利用 MiTeGen 聚亚酰胺小环作为样品,以上海光源 BL01B1 线站的 SRIR 光为光源,通过点扫描采样方式进行同步辐射红外三维谱学显微实验研究。通过获得聚亚酰胺小环在不同角度下的 SRIR 二维显微光谱信息,选取波数范围为 1495~1485 cm⁻¹的显微光谱信息处理,用代数迭代算法对聚亚酰胺小环的化学组分酰胺 II 进行 SRIR 三维显微重构,获得了完整的三维重构图。实验表明本文方法能够以较高的信噪比重构出样品化学组分的三维红外显微结构。
 关键词 X射线光学;同步辐射;三维谱学显微;高分辨率光谱学;断层图像处理
 中图分类号 O433.1 文献标志码 A

Synchrotron Radiation Infrared Three-Dimensional Microspectroscopy Based on Point Scanning Method

Lin Yuecheng^{1,4}, Tong Yajun², Ji Te^{1,3}, Peng Weiwei^{1,3}, Xiao Tiqiao^{1,3}, Zhu Huachun^{1,3*}, Chen Min^{1,3**}

¹ Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; ² Shanghai Tech University, Shanghai 201210, China;

³ Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Shanghai Advanced Research Institute,

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201204, China;

⁴ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Synchrotron radiation infrared (SRIR) light has the advantages of wide spectral range, small divergence angle, high brightness, and high signal-to-noise ratio. Combined with traditional infrared spectroscopy technology, SRIR microspectroscopy technology is used in infrared spectroscopy microscopy for samples, and the micron-level spatial spectral information of samples can be obtained. By taking an MiTeGen polyimide loop as the sample and using SRIR light from line station BL01B1 of Shanghai synchrotron radiation facility as the light source, we perform the synchrotron radiation infrared three-dimensional (3D) microspectroscopy experiments based on point scanning method. The two-dimensional microspectral information of the MiTeGen polyimide loop under different angles is collected based on point scanning method. The microspectral information in the wavenumber range of 1495–1485 cm⁻¹ is selected, SRIR 3D microscopic reconstruction is performed by using algebraic iteration algorithm for the amide II chemical component of the polyimide ring, and a whole 3D reconstruction image is obtained. The research shows that this method can reconstruct the 3D infrared microscopic structure of the sample's chemical components with a high signal-to-noise ratio.

Key words X-ray optics; synchrotron radiation; three-dimensional microscopy; high-resolution spectroscopy; tomographic image processing

OCIS codes 340.6720; 180.6900; 300.6320; 100.6950

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(11605281)、国家自然科学基金(11475252)

收稿日期: 2019-08-30; 修回日期: 2019-09-23; 录用日期: 2019-10-12

^{*} E-mail: zhuhuachun@zjlab.org.cn; ** E-mail: chenmin@zjlab.org.cn

1 引 言

红外光谱是科学研究分析手段之一,被广泛地 应用于材料科学、化学、考古学及表面科学等研究领 域[1-2]。该项技术基于样品的分子键对红外光进行 特殊吸收,通过这种特殊吸收获得样品组分的空间 信息^[3]。1993年美国的国家同步辐射光源(NSLS) 建成了世界上第一条同步辐射红外(SRIR)光谱学 显微线站[4-6],目前在许多同步辐射装置上建设了数 十条红外光束线站。同步辐射红外光具有发散角 小、亮度高、波长范围广以及信噪比高等优点[7-8],基 于同步辐射红外光源的红外谱学显微技术能够达到 衍射极限的空间分辨率,可观测微米级别的精细结 构^[9-14]。当被测样品厚度非常薄时,二维红外谱学 显微技术能够显示样品组分的二维空间分布,但对 于不能切片或者本身非常珍贵的样品,二维红外谱 学显微技术则不适合他们。因此若能获得样品化学 组分的三维空间显微信息,即样品内部空间任意一 点的光谱信息,将有助于研究者更深入理解样品的 微观物理、化学机制等信息[15-17]。此外三维红外谱 学显微技术是一种非破坏性的技术,可节省大量的 切片加工过程,更可节省人力、物力[18-19]。

红外环境成像线站(IRENI)是美国同步辐射中 心(SRC)的一条同步辐射红外显微线站,它将多束 同步辐射红外光和红外焦平面阵列(FPA)探测器结 合来收集样品的光谱信息,然后通过断层扫描谱学 显微重构样品组分的空间信息,其重构了百日草细 胞、人类的头发等样品组分的三维空间分布[20-24]。 由于该光束线在设计上采用了超大接收角,建造 IRENI 线站的成本非常昂贵,且在前端区需要非常 大的空间,该光束线难以被其他同步辐射光源复制。 Quaroni 等^[25-26]将传统的热光源红外光和 FPA 探 测器结合用于洋葱单细胞的断层扫描谱学显微,获 得了洋葱单细胞的亚细胞结构的空间分布,但是,由 于传统的热光源亮度低、信噪比低等限制,该方法的 使用限于对红外光吸收非常弱的样品如洋葱单细 胞,对于较强吸收的样品如普通的动物细胞,信噪比 会变得非常差。由于同步辐射红外光源的小光斑的 特性,除了 SRC 光源的 IRENI 线站,其他同步辐射 的红外光线站尚无法充分利用 FPA 探测器的优点 对同步辐射光源开展红外三维谱学显微研究。因 此,为了充分利用同步辐射红外光高亮度、高空间分 辨的优点,将同步辐射红外光作为光源,采用点扫描 方式开展三维谱学显微的研究,用代数迭代算法对 聚亚酰胺小环的化学组分酰胺Ⅱ进行同步辐射红外 三维显微重构,获得完整的三维重构图。

2 实验原理

为了充分利用同步辐射红外光的高亮度、极限 空间分辨率以及高信噪比等优点,采用同步辐射红 外光作为光源,以点扫描方式逐点采集样品不同角 度下的二维显微光谱信息。通过代数迭代算法处理 不同角度下的二维显微光谱信息,重构出样品的红 外三维显微光谱信息。代数迭代是一种不完全投影 的断层扫描重构算法,可将图像重构过程转换为求 解线性方程组。即使实验采集到的样品的投影数据 是不完全角度投影的数据,也依然可以重构样品的 红外三维显微光谱信息,原理为^[27-28]

$$p = \mathbf{R}\mathbf{x} + \mathbf{e} \,, \tag{1}$$

式中:x 为图像矢量;p 为测量矢量;R 为投影矢量; e 为误差因子。

代数迭代算法的重构步骤:1)选择基本图像;2) 选择最优准则;3)求解相应的方程,得到合适的最优 图像。采用代数迭代算法处理实验采集的投影数 据,将所有的投影数据从不同的角度重新整合成平 行光线投影数据,然后用平行光下的代数迭代算法 进行重构^[29-30]。

实验在上海光源(SSRF)的 BL01B1 红外谱学 显微线站上进行,BL01B1 的性能描述见文献 [31-34]。实验装置如图 1 所示,其由聚光镜、载物 台、 $32 \times$ 目镜(NA = 0.65)等组成,红外光谱仪的型 号为 Thermo scientific Nicolet 6700 型,采用的红 外探测器为碲镉汞(MCT)红外探测器。

同步辐射红外光经聚光镜变为聚焦光,透过样 品后传输到 MCT 探测器,如图 2(a)所示。步进电 机的末端连接在不锈钢销上的 MiTeGen 小环上, MiTeGen 小环由聚酰亚胺薄膜组成。聚酰亚胺薄 膜是一种聚合物,其化学链为酰亚胺环,化学式如 图 2(b)所示。实验使用软件 Motion Manager 控制 步进电机的旋转角度,设置参数以固定角度旋转步 进电机。

3 实验结果与讨论

在实验中,以点扫描方式采样,每次扫描的样品 范围为 80 μ m×120 μ m,扫描步长为 5 μ m,光谱扫 描次数为 8,光谱分辨率为 16 cm⁻¹。步进电机控制 MiTeGen 小环以每次 4.6°的角度从 0°旋转至 179.4°,每张图扫描需要 15 min,最终采集到 39 张



图 1 SSRF 的 BL01B1 实验装置 Fig. 1 Experimental setup of BL01B in SSRF



- 图 2 SRIR 光透射示意图及酰亚胺环化学式。(a)同步辐射 红外光透射示意图;(b)酰亚胺环的化学式
- Fig. 2 SRIR light transmission schematic and chemical structure of imide ring. (a) Schematic of SRIR light transmission; (b) chemical structure of imide loop

MiTeGen小环的二维同步辐射红外显微光谱图,总 采集时间约需 9.5 h。需要指出的是,由于红外谱学 显微的空间分辨率在数微米量级,39 张投影图数不 会成为制约重构空间分辨率的主要因素。在波数为 1900~1000 cm⁻¹的范围内,MiTeGen小环的主要 特征红外吸收峰及其对应的组分如表1所示。选择 波数范围为 1538~1452 cm⁻¹的吸收峰,其由化学 键 N—H 与化学键 C—N 之间的耦合振动造成,对 应组分为酰胺 II,吸收峰位于 1490 cm⁻¹处,如图 3 所示。利用同样的方法也可以得到其他吸收峰所对 应的三维重构图。

对 MiTeGen 小环可见光正视图进行研究,如 图 4(a)所示。图 4(a)显示 MiTeGen 小环的直径约 为 93 μm,其上面及下面的环结构非对称,整体结构 不是均匀光滑分布的。图 4(b)为 MiTeGen 小环于 波数为1490 cm⁻¹时的同步辐射红外显微吸收光谱 图,即为酰胺 II 的同步辐射红外显微吸收谱。 图 4(b)显示酰胺 II 小环的中间部分对红外光吸收 表 1 MiTeGen 小环于波数范围 1900~1000 cm⁻¹的主要成分 Table 1 Main components of MiTeGen loop in wavenumber range of 1900-1000 cm⁻¹

Wavenumber	Component	Chemical bond
$1664 - 1538 \text{ cm}^{-1}$	Amide I	N—H bend
$1538 - 1452 \text{ cm}^{-1}$	Amide []	Coupling between N—H
		and C—N
$1476 - 1372 \text{ cm}^{-1}$	Amide	C-N stretch
1381-1223 cm ⁻¹	Amide Ш	Coupling between $N-H$
		and C—N



图 3 MiTeGen 小环于波数范围 1900~1000 cm⁻¹的 IR 光谱 Fig. 3 IR spectrum of MiTeGen loop in wavenumber range of 1900-1000 cm⁻¹

强烈,并且吸收强度朝向其两个边缘逐渐减弱,这是 由 MiTeGen 小环内对波数 1490 cm⁻¹吸收的酰胺 Ⅱ 的空间结构为中间部分较厚而在两侧部分较薄引 起的。

对采集到的 39 张同步辐射红外显微吸收光谱 抽取目标光谱对应的原始扫描图像,利用开源 CT 复原软件 Tomopy^[35],在基于 Python 开发的 Spyder软件的界面下,通过代数迭代算法处理,获



图 4 MiTeGen 小环图。(a) MiTeGen 小环可见光正视 图;(b)波数为 1490 cm⁻¹的酰胺 II 的 SRIR 显微光 谱图

- Fig. 4 MiTeGen loop. (a) Front view of visible image of MiTeGen loop; (b) SRIR microscopic spectrum of amide II at wavenumber of 1490 cm⁻¹
- 得一系列有效的 MiTeGen 小环的断层扫描图像。 这些数据包含了波数范围1495~1485 cm⁻¹即酰胺

Ⅱ 的三维红外显微吸收光谱信息,利用这些断层扫 描图像获得了样品中酰胺Ⅱ 的三维红外显微重构 图,如图 5 所示。其中,图 5(a)~(c)分别是 0°侧视 图、45°侧视图及 135°侧视图下酰胺Ⅱ 的同步辐射红 外三维显微重构图。图 5 显示酰胺Ⅱ的同步辐射红 外三维显微重构图的上面及下面环结构不是很对称, 表明酰胺Ⅱ的三维结构不是一个非常均匀的结构。

图 6 为酰胺 II 在不同深度下的同步辐射红外三 维显微重构剖面图。图 6(a)是酰胺 II 的同步辐射 红外三维显微重构结构的侧视图,其深度为 44 μm, 对其自下而上地切割可以得到不同深度的剖面。 图 6(b)~(j)为保留的酰胺 II 的同步辐射红外三维 显微重构图,深度分别为 7.5、10、12.5、15、17.5、22、 25、27.5 和 32.5 μm,这些图像表明酰胺 II 的三维空 间分布是不均匀的。



图 5 酰胺 II 的 SRIR 三维显微重构图。(a) 0°侧视图;(b) 45°侧视图;(c) 135°侧视图 Fig. 5 SRIR 3D microscopic reconstruction of amide II. (a) 0° side view; (b) 45° side view; (c) 135° side view



图 6 不同深度下,酰胺 [[重构结构图。(a)完整的酰胺 [] 的重构图像;(b) 7.5 μm;(c) 10 μm;(d) 12.5 μm;(e) 15 μm; (f) 17.5 μm;(g) 22 μm;(h) 25 μm;(i) 27.5 μm;(j) 32.5 μm

Fig. 6 Reconstruction images of amide II at different depths. (a) Whole reconstruction image of amide II; (b) 7.5 μ m; (c) 10 μ m; (d) 12.5 μ m; (e) 15 μ m; (f) 17.5 μ m; (g) 22 μ m; (h) 25 μ m; (i) 27.5 μ m; (j) 32.5 μ m

将酰胺Ⅱ的有效同步辐射红外断层扫描图像排 列整齐,如图7(a)所示。图7(a)中的断层扫描图 像8是酰胺Ⅱ的红外三维显微重构中最中间部分的 同步辐射红外显微吸收断层扫描图像。断层扫描图 像 8的红外吸收强度分布如图 7(b)所示。将左吸收 峰的一半吸收强度和右吸收峰的一半强度之间的距 离定义为 MiTeGen 小环的酰胺 II 小环的直径,酰 胺 II 小环的直径为 94 μm,与 MiTeGen 小环在可见 光下的直径吻合良好。图 7 表明利用同步辐射红外 三维显微光谱方法是可行的,可用于重构样品化学 成分的红外空间三维结构。



图 7 有效断层扫描图像的排列及断层扫描图像 8 的强度曲线图。(a) 酰胺 II 的 15 张有效同步辐射吸收断层扫描图像的 有序排列图;(b)断层扫描图像 8 的同步辐射红外显微吸收强度分布曲线图

Fig. 7 Arrangement of effective tomography images and intensity curve of tomography slice 8. (a) Ordered arrangement of 15 effective synchrotron radiation absorption tomography images of amide II; (b) synchrotron radiation infrared microspectroscopy intensity profile of tomography slice 8

4 结 论

提出一种利用同步辐射红外光作为光源,以点 扫描方式进行同步辐射红外三维谱学显微的方法。 该方法是一种非破坏性的三维显微方法,相比传统 的热光源结合 FPA 探测器的实验技术,具有更高的 信噪比。以 MiTeGen 小环为测试样品,采集不同 角度下的红外谱学显微光谱,通过代数迭代处理,重 构出 MiTeGen 小环的其中一种化学成分即酰胺Ⅱ 的红外三维显微空间结构。实验结果显示,该同步 辐射红外三维显微光谱方法可以对样品进行红外三 维显微结构重构,获得样品内部空间中任何一点的 红外显微光谱信息。与 IRENI 光束线相比,该方法 无需对束线进行改造即可用于同类的同步辐射红外 线站,因此,其可能具有更大的可扩展性和一定的应 用潜力。然而由于采用了点扫描方式,该方法的最 主要缺点是收集红外显微光谱数据的工作效率很 低,实验采集数据所需时间很长,制约了该方法的应 用领域。

在后续的研究中,考虑采用 FPA 探测器缩短信 息采集时间,但是 FPA 探测器需要一个大且均匀的 光斑,对同步辐射红外光源而言需要进行光学均匀 化的设计;此外,在不影响空间信息完整采集的情况 下,通过适当降低扫描次数、扫描样品范围等参数可 部分提高数据采集的效率。

参考文献

[1] Martin M C, Schade U, Lerch P, et al. Recent applications and current trends in analytical chemistry using synchrotron-based Fourier-transform infrared microspectroscopy [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010, 29(6): 453-463.

- [2] Nasse M J, Bellehumeur B, Ratti S, et al. Opportunities for multiple-beam synchrotron-based mid-infrared imaging at IRENI [J]. Vibrational Spectroscopy, 2012, 60: 10-15.
- [3] Marcelli A, Cricenti A, Kwiatek W M, et al. Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1390-1404.
- [4] Reffner J A, Martoglio P A, Williams G P. Fourier transform infrared microscopical analysis with synchrotron radiation: the microscope optics and system performance (invited) [J]. Review of Scientific Instruments, 1995, 66(2): 1298-1302.
- [5] Carr G L, Hanfland M, Williams G P. Midinfrared beamline at the national synchrotron light source port U2B[J]. Review of Scientific Instruments, 1995, 66
 (2): 1643-1645.
- [6] Carr G L, Reffner J A, Williams G P. Performance of an infrared microspectrometer at the NSLS [J]. Review of Scientific Instruments, 1995, 66 (2): 1490-1492.
- [7] Duncan W D, Williams G P. Infrared synchrotron radiation from electron storage rings [J]. Applied Optics, 1983, 22(18): 2914-2923.
- [8] Miller L M, Smith R J. Synchrotrons versus globars, point-detectors versus focal plane arrays: selecting the best source and detector for specific infrared microspectroscopy and imaging applications [J]. Vibrational Spectroscopy, 2005, 38(1/2): 237-240.

- [9] Miller L M, Dumas P. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light [J].
 Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2006, 1758(7): 846-857.
- [10] Levenson E, Lerch P, Martin M C. Spatial resolution limits for synchrotron-based spectromicroscopy in the mid- and near-infrared [J]. Journal of Synchrotron Radiation, 2008, 15(4): 323-328.
- [11] Carr G L, Williams G P. Infrared microspectroscopy with synchrotron radiation[J]. Proceedings of SPIE, 1997, 3153: 51-58.
- [12] Dong A C, Messerschmidt R G, Reffner J A, et al. Infrared spectroscopy of a single cell: the human erythrocyte [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988, 156(2): 752-756.
- [13] Levenson E, Lerch P, Martin M C. Spatial resolution limits for synchrotron-based infrared spectromicroscopy [J]. Infrared Physics & Technology, 2008, 51(5): 413-416.
- [14] Christie F, Mathieson E, Williams P. Fourier transform spectroscopy [J]. Physics Education, 1974, 9(5): 324-330.
- [15] Vogel C, Wessel E, Siesler H W. FT-IR imaging spectroscopy of phase separation in blends of poly(3hydroxybutyrate) with poly(L-lactic acid) and poly((caprolactone)[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(2): 523-527.
- Unger M, Sedlmair J, Siesler H W, et al. 3D FT-IR imaging spectroscopy of phase-separation in a poly(3hydroxybutyrate)/poly (L-lactic acid) blend [J].
 Vibrational Spectroscopy, 2014, 75: 169-172.
- [17] Yesiltas M, Sedlmair J, Peale R E, et al. Synchrotron-based three-dimensional Fouriertransform infrared spectro-microtomography of Murchison meteorite grain [J]. Applied Spectroscopy, 2017, 71(6): 1198-1208.
- [18] Holman H Y N, Martin M C, McKinney W R. Synchrotron-based FTIR spectromicroscopy: cytotoxicity and heating considerations[J]. Journal of Biological Physics, 2003, 29(2/3): 275-286.
- [19] von Aulock F W, Kennedy B M, Schipper C I, et al. Advances in Fourier transform infrared spectroscopy of natural glasses: from sample preparation to data analysis[J]. Lithos, 2014, 206/207: 52-64.
- [20] Martin M C, Dabat-Blondeau C, Unger M, et al. 3D spectral imaging with synchrotron Fourier transform infrared spectro-microtomography [J]. Nature Methods, 2013, 10(9): 861-864.
- [21] Nasse M J, Mattson E C, Reininger R, et al. Multibeam synchrotron infrared chemical imaging with

high spatial resolution: beamline realization and first reports on image restoration[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2011, 649(1): 172-176.

- [22] Mattson E C, Unger M, Manandhar B, et al. Multibeam synchrotron FTIR chemical imaging: impacts of Schwarzschild objective and spatial oversampling on spatial resolution [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2013, 425(14): 142001.
- [23] Lewis E N, Treado P J, Reeder R C, et al. Fourier transform spectroscopic imaging using an infrared focal-plane array detector [J]. Analytical Chemistry, 1995, 67(19): 3377-3381.
- [24] Nasse M J, Walsh M J, Mattson E C, et al. Highresolution Fourier-transform infrared chemical imaging with multiple synchrotron beams[J]. Nature Methods, 2011, 8(5): 413-416.
- [25] Quaroni L, Obst M, Nowak M, et al. Threedimensional mid-infrared tomographic imaging of endogenous and exogenous molecules in a single intact cell with subcellular resolution [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(1): 318-322.
- [26] Zobi F, Obst M. Two- and three-dimensional midinfrared chemical imaging[J]. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2017, 71(1): 32-37.
- [27] Andersen A H. Algebraic reconstruction in CT from limited views [J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 1989, 8(1): 50-55.
- [28] Herman G T, Lent A. Iterative reconstruction algorithms[J]. Computers in Biology and Medicine, 1976, 6(4): 273-294.
- [29] Nielsen T, Manzke R, Proksa R, et al. Cardiac conebeam CT volume reconstruction using ART [J]. Medical Physics, 2005, 32(4): 851-860.
- [30] Qiu W, Tong J R, Mitchell C N, et al. New iterative cone beam CT reconstruction software: parameter optimisation and convergence study [J]. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2010, 100 (2): 166-174.
- [31] Zhang Z Y, Chen M, Tong Y J, et al. Performance of the infrared microspectroscopy station at SSRF [J]. Infrared Physics & Technology, 2014, 67: 521-525.
- Ji T, Tong Y J, Zhu H C, et al. The status of the [32] first infrared beamline at Shanghai synchrotron radiation facility [J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section Α: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2015, 788: 116-121.
- [33] Tong Y J, Ji T, Zhang Z Y, et al. The design and

performance of infrared beamline at SSRF [J]. Proceedings of SPIE, 2013, 8910: 89101F.

[34] Zhu H C, Tong Y J, Ji T, et al. Spatial resolution measurement of synchrotron radiation infrared microspectroscopy beamline[J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(4): 0430002.
朱化春, 佟亚军, 吉特, 等. 同步辐射红外谱学显微 光束线站的空间分辨率测试[J].光学学报,2015,35(4):0430002.

[35] Gürsoy D, de Carlo F, Xiao X H, et al. TomoPy: a framework for the analysis of synchrotron tomographic data [J]. Journal of Synchrotron Radiation, 2014, 21(5): 1188-1193.