

冲技术比较容易,而获得三波长运转的飞秒激光器技术难度很大,要求高精机械光学加工.当多波长飞秒激光器运转时,各脉冲在腔内来回传播,都交叉通过钛宝石晶体,脉冲之间都有相互作用,进行增益竞争.不论是腔外分束,还是腔内狭缝调谐分光,稍有增益分配不适当,将会导致较低增益的光脉冲消失在自己的传播通道中,成为单波长或双波长激光器运转状态.我们采用定向分束技术,平衡各波长脉冲增益,控制增益竞争,就是采用腔外分束,控制各泵浦光的功率、强度、模式及偏振态的变化,并且严格定向各泵浦光之间的夹角,这样做获得了很好的效果.为了获得双波长或三波长激光稳定输出,我们利用量子理论优化激光器动力学参数,研究双色脉冲成形动力学,进行增益分配,成功地解决了多波长飞秒激光器稳定运转的理论问题.

2.5 实验结果

当激光器运转在双波长输出状态,脉冲的持续期可短到 25fs,双波长脉冲调谐在 755—848nm 之间,双色脉冲间同步精度约 10fs.当激光器运转在三波长输出状态时,脉冲的持续期小于 100fs,中心波长分别为 755nm,800nm 和 830nm.我们对双波长、三波长、多波长钛宝石飞秒激光器的研究见参考文献 [3—7].

3 结束语

我们介绍了多波长钛宝石飞秒激光技术研究的基本情况,有关增益竞争动力学研究最近将有量子理论报道.多波长钛宝石飞秒激光器的锁模机理是很复杂的,交叉锁模基本上概括了该类飞秒激光器成形光脉冲的动力学过程.因而进行各路光脉冲持续期测量可以采用自相关函数法,但在测量各波长脉冲间的同步精度时,我们采用了强度相干自相关-互相关函数法.为了进一步扩展多波长钛宝石飞秒激光脉冲的应用领域,对多波长飞秒激光脉冲放大是很必要的.当各列脉冲能量能达到 μ 级时,预料将会在物理、化学及其相关交叉学科研究中,获得更多的信息,发现更多的新现象.

参 考 文 献

- [1] J. M. Evans, D. E. Spence, D. Burns et al., *Optics Letters*, **18**(1993), 1074.
- [2] M. R. X. de Barros, P. C. Becker, *SPIE*, **2116**(1994), 37.
- [3] 王水才、肖东、杨建军等,中国激光, **A23**(1996), 295.
- [4] 王水才、肖东、杨建军等,激光技术, **20**(1996), 321.
- [5] Dong Xiao, Shuicai Wang, Jianjun Yang et al., *SPIE*, **2869**(1997), 533.
- [6] Shuicai Wang, Dong Xiao, Jianjun Yang et al., *SPIE*, **2869**(1997), 527.
- [7] 朱长军、王水才、肖东,光子学报, **27**(1998), 100.

X 射线显微术*

徐向东 付绍军 张允武

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室,合肥 230029)

摘 要 综述了 X 射线显微术的基本原理、成像模式和技术及其在生命科学、材料科学等方面应用的新进展,同时简述了 X 射线显微术应用过程中应注意的几个问题.

关键词 X 射线显微术,水窗口,辐射损伤

* 国家同步辐射实验室开放课题

1998 - 05 - 04 收到初稿,1998 - 06 - 29 修回

X-RAY MICROSCOPY

Xu Xiangdong Fu Shaojun Zhang Yunwu

(National Synchrotron Radiation Laboratory of USTC, Hefei 230029)

Abstract The basic principles and imaging techniques of X-ray microscopy (XRM) and its applications in the life sciences and materials science are reviewed. Various aspects to be taken note of in the application of XRM are also mentioned.

Key words X-ray microscopy, water window, radiation damage

1 引言

建造一台 X 射线显微镜的梦想起始于伦琴发现 X 射线的 1895 年^[1]. 随着人们对 X 射线性质认识的不断深入, 如 X 射线为波长较短的电磁波, 由瑞利判据推断 X 射线显微镜的极限分辨率较光学显微镜高; X 射线与物质的作用取决于 X 射线波长和原子序数, 它对样品的元素组成敏感而提供独特的衬度机制; X 射线穿透能力强, 可以允许使用较厚的样品, 且能在空气和湿的环境中工作等, 使人们对 X 射线显微术的兴趣逐渐增大, 1945—1961 年间达到了顶峰. 之后不久, 因 X 射线光学元件制作上的困难和记录材料分辨率低等问题, X 射线显微镜的分辨率始终没有超过光学显微镜, 而此时电子显微镜及其显微分析技术也已相当完善, 所有这些都导致 X 射线显微术研究工作处于停滞不前状态.

80 年代以来, 高亮度 X 射线光源的出现, X 射线光学元件和高灵敏度、高分辨率记录介质的发展, 使 X 射线显微术的分辨率有了很大提高 (5 至几十纳米), 成像时间也大大缩短, 使 X 射线显微术在不需切片、脱水和染色即在自然状态下就可对生物等样品进行观测的特色得以实现, 所以 X 射线显微术的研究又重新活跃起来. 尽管电子显微镜分辨率很高, 但其对生物等样品的观测需要进行一系列诸如切片、染色、脱水等样品准备和真空环境, 无疑将破坏生物样品的自然状态, 新近发展起来的原子力显微镜和近场光学显微镜分辨率很高, 但本质上属

表面分析技术.

本文简要介绍了 X 射线显微术的基本原理、成像模式和技术及其在生命科学、材料科学等方面应用的新进展.

2 X 射线显微术原理

X 射线显微术的基本原理就是根据 X 射线与物质间的相互作用, 会产生一些不同于可见光与物质相互作用的信号, 如光电子、俄歇电子、弹性散射 X 射线、非弹性散射 X 射线、荧光标识 X 射线等. 通过测定发生在样品中的这些信号的位置, 并对信号进行处理即可得到反映有关样品信息的图像^[2]. X 射线显微术中的几种主要成像衬度机制简述如下:

2.1 光电吸收

在低能的 X 射线波段, 吸收截面远远大于弹性散射和非弹性散射截面, 所以光电吸收占主导作用. 光电吸收的第一个结果就是入射方向上光子数的减少. 样品中相邻区域原子序数或厚度、密度的不同, 引起对 X 射线吸收分布的不同, 导致它们产生的透射 X 射线光子数的不同. 利用透射束成像, 由此产生的衬度称为光电吸收衬度. 在碳和氧的 K 吸收边波长范围 (2.3—4.4nm) 内, 水相对透明, 故这一波段的软 X 射线称之为“水窗口”, 它提供了天然的衬度机制.

2.2 吸收近边结构

X 射线吸收近边结构 (XANES) 指吸收边上 50eV 之内的振荡结构, 它能提供原子的局部化学和电子结构的信息. 不同的化学键由于

物理

浓度和周围环境的不同而引起的吸收峰强度变化对应于不同的能量,通过选择适宜的 X 射线能量对样品成像即可获得某一组分的分布,分辨率只取决于微束直径大小.因此,这种振荡结构对特定化学键的 X 射线成像提供了很好的衬度机制.220—750eV 范围的 C,N,O,Cl 和 F 的 K 吸收边的振荡结构均可用来成像,不过,目前主要还是用 C 的吸收近边结构获得图像,这种利用吸收近边结构产生的衬度又称为化学衬度^[3].很显然,这种衬度机制只能用于波长连续可调的同步辐射光源.

2.3 相衬

相衬是利用光透过样品后光程差引起的位相变化来获取样品信息的,这一方法早在 60 年前就用于可见光波段.1987 年,G. Schmahl 和 D. Rudolph^[4]受位相波带片的启发,首次将相衬法引入软 X 射线成像显微镜,即在微波带片的后焦平面附近放置一环形铜质位相板,共同构成相衬物镜,其优点是衬度较光电吸收更高而大大降低了辐射剂量,允许较厚的样品.不过软 X 射线的穿透能力毕竟是有限的,人们自然想到了硬 X 射线.因缺乏必要的光学元件,早先主要利用 Bonse - Hart 干涉仪提供高度的单色相干光,使用受到限制.1993 年,A. Snigirev 等^[5]利用布拉格 - 菲涅耳波带片产生的亚微米 X 射线微束对几十微米大小的有机纤维和淀粉颗粒进行成像,令人惊奇地获得了在 14keV 硬 X 射线下几乎透明的样品的高衬度图像.目前,在 ESRF 等第 3 代光源提供的高度相干的 X 射线光束线中,类似于同轴全息那样,不用光学元件就可对低密度透明的物体(生物和有机材料)实施相衬成像,有关研究工作十分活跃.

3 X 射线显微镜的主要组成部分

X 射线显微镜主要由光源、光学系统和探测器三部分组成.现代 X 射线显微术是以使用高亮度 X 射线源、高分辨 X 射线光学元件和高分辨探测器为标志的.早期 X 射线显微术所用的光源就是由 X 射线管产生的、波长在 0.1 —

1nm 的较硬的 X 射线.除了 X 射线强度太低外,X 射线管的空间辐射特性也不适合一般实验装置的需要,这是 X 射线显微术发展缓慢的主要原因之一.现在可用的高亮度 X 射线源主要是同步辐射光源和激光等离子体光源等.

X 射线波段内所有材料折射率接近(略小于)1,传统的用于可见光的光学元件不适合于 X 射线波段,只能考虑其他途径解决,如菲涅耳衍射和全外反射等.目前较为实用的 X 射线光学元件是多层膜反射镜和波带片,其中微波带片是软 X 射线波段唯一达到衍射极限的成像光学元件^[6].

用于 X 射线显微术的探测器有抗蚀剂(光刻胶)、底片、微通道板、CCD、光电阴极和正比计数器等.微通道板和 CCD 的灵敏度高,但分辨率低,所以最后用来记录的高分辨率探测器大多是正性光刻胶——聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA).

4 X 射线显微术的基本类型

根据接收的 X 射线与物质相互作用的信号、成像方式等可将 X 射线显微术分为以下 5 种基本类型^[7-10].

4.1 X 射线接触显微术

X 射线接触显微术原理上类似于早期 X 射线显微照相术,是 X 射线显微术中最初采用的研究方法.其基本原理是将记录介质(光刻胶)紧贴在样品背面,X 射线垂直于二者界面对其曝光,显影后即在光刻胶上留下反映内部结构特征的浮雕图形,再通过电子显微镜或原子力显微镜读出 X 射线显微图.在分辨率要求较低或初步观测时也可用光学显微镜,图像的解释取决于对成像物理学、显微过程等的详细理解.这种方法的优点是简单方便、不需光学元件,也是迄今唯一达到瑞利分辨率极限的方法,不过接触显微术图像的最终分辨率受到有效读出程序的保真度和衍射模糊效应的限制.对使用波长为 λ 的 X 射线,离光刻胶表面距离为 d 的某一特征结构受衍射效应影响的分辨率为

$(d)^{1/2}$,所以衍射模糊效应主要是样品较厚和样品与光刻胶接触不紧密时出现的问题。

4.2 X射线成像显微术

X射线成像显微术又称X射线透射显微术,所用的显微镜称为X射线成像显微镜。其基本原理是通过X射线聚焦光学元件(微波带片)形成一放大几百倍的图像,然后用一种具有适度分辨率的探测器(胶片或光刻胶)将图像记录下来。其核心部件是微波带片,一般为位相型,以提高衍射效率,成像分辨率取决于微波带片的最外环宽度。最大的优点是不要求空间相干光且立刻照射整个样品并使之成像。德国BESSY的X射线成像显微镜及其研究成果代表当前国际先进水平,1994年开始引入低温技术,它可大大增强生物样品对X射线辐射损伤的抵抗能力。

4.3 X射线扫描显微术

X射线扫描显微术所用的显微镜称为X射线扫描显微镜,由单色仪、微波带片、扫描台和探测器组成。单色仪一般为聚焦波带片和针孔组成的直线型单色仪,微波带片将准单色X光聚焦成微束,扫描台使样品在微波带片的焦平面作光栅式扫描,置于样品后的探测器如正比计数器记录透过每一点的光子数。整个操作均由计算机控制,所得图像在计算机中存储和处理,能实时成像。X射线扫描显微镜的成像只有空间相干光起作用,成像分辨率取决于照射到样品上的光斑大小,目前最好为30nm。因放在样品前面的微波带片可以降低样品的辐射剂量,所以这种方法特别适用于生物样品观测。在众多的X射线扫描显微镜中,美国NSLS的X射线扫描显微镜及其研究成果代表当前国际先进水平。

X射线扫描显微术是目前最为活跃的一种X射线显微术,其装置的配制也十分灵活。80年代,X射线扫描显微镜都是记录透过样品的X光子数,所以又称X射线扫描透射显微镜。进入90年代,实验方法有了很大的改进,可利用不同的信号,如光电子、X射线荧光、X射线诱导的可见光等成像,相应地称之为X射线

扫描光电显微镜、X射线扫描荧光显微镜和X射线扫描发光显微镜。

4.4 X射线全息术

全息术是Gabor为消除电子透镜的像差于1948年提出的,仅4年之后,A. V. Baez就提出了X射线全息术的构想。由于缺乏相干的X射线源和高分辨的X射线记录材料,X射线全息术的发展十分缓慢。80年代初,人们基于同步辐射和X射线激光能提供高亮度的相干X射线,又掀起了X射线全息术的研究高潮。近来,由波荡器(undulator)引出的高相干X射线,使得X射线全息术成为高分辨X射线显微术的一种实用方法。目前,X射线全息术的记录方式仅局限于同轴全息和无透镜傅里叶变换全息,探测器为CCD或PMMA,全息图再现以数字再现为主。对PMMA记录的全息图可用TEM或AFM读出并数值化,再现的空间分辨率最好可达40—60nm。

尽管X射线全息术的目标是对含水样品成像,目前实验中的样品大多还是干的。S. Lindaa^[11]等对复杂生物样品NIL8仓鼠神经中枢成纤维细胞进行了X射线同轴全息术和光学显微镜、透射电镜观测结果的比较研究,结果在其再现图中可以看到一些在透射电镜中可以看到而在光学显微镜中看不到的亚细胞结构,从而证实了X射线全息术的有效性。从目前的X射线全息术来看,所获得的纵向分辨率一般都大于样品的典型厚度(2—3 μm),如文献[12]中的为4.0 μm 左右,因而重现图像本质上仍是二维的。为了获得真正的三维重现图像,最简单的途径就是采用多重视场,即从很多方向照射,物体散射波必须在大立体角范围内被记录,这种设想目前还很难实现。

除了上述的主要用于生物样品成像的X射线全息术外,近来T. Gog等^[13]提出一种原子分辨率的多能量X射线全息术(multiple-energy X-ray holography),它使用单色、能量可调的硬X射线对块状晶体中特定的直接邻近的原子成像,有望用于固体表面特别是大多数电子不能进入的埋层界面、缺陷位置等研究。现

已完成的工作有天然的赤铁矿晶体中包含在(100)晶面内的铁离子的全息成像,完美的锗晶体中各种取向和位置的原子层的全息成像.缺点是测量时间极长,达50h,所以离“实用”还有一定的距离.

4.5 X射线显微层析术

计算机断层扫描(简称CT)是一种强有力的非侵入性的诊断技术,其理论基础是拉冬变换(Radon transform)和傅里叶变换(Fourier transform),即借助一系列沿不同方向投影的X射线显微像,通过数学方法合成,便得到反映物体内部结构的三维图像.因微束X射线层析术(XTM)能提供高分辨率的三维成像,引起人们的极大兴趣.DORIS,SSRL和NSLS等同步辐射装置上均装有专门的实验装置.由于下列原因,传统的X射线层析是不适合于生物样品的微结构研究的:(1)考虑到衬度、穿透性及在最大程度上降低衍射,它所选择的X射线能量太高即硬X射线,以致不能利用“水窗”X射线的天然衬度;(2)需要大量的二维投影图形成三维图像,将导致大的X射线剂量,那么在获得图像之前就已破坏了生物样品;(3)投影过程中X射线的散射限制了取得高分辨的能力.

为了探索软X射线显微层析术在生物微结构研究中的可能性,I. McNulty等^[14]在美国布鲁克海文国家同步辐射光源实验室(NSLS)对现有的X射线扫描透射显微镜的样品台稍加改动,使其具有旋转功能后,用波长3.6nm的软X射线得到测试物体的若干二维图像(样品旋转不同角度时的投影),通过代数重构技术(ART),获得了分辨率达100nm的高分辨三维结构重现像.

在上述5种基本类型的X射线显微术中,目前的前沿方向是发展相衬成像技术、吸收近边结构成像技术、低温技术以及融谱的测量和显微技术于一体的X射线谱学显微成像技术.

5 X射线显微术的应用

从80年代至今,X射线显微术作为同步辐

射应用的重要领域之一,研究十分活跃,其应用领域也在不断地扩展.除了用于生物、医学和材料科学外,近年也被用于研究胶体、矿物学和微电子学等.

软X射线显微术在细胞生物学中的应用特色是在尽可能不改变活体的原始状态下进行观察.早期已用X射线接触术进行多种动、植物细胞的成像研究,其中较为典型的是1985年R. Feder等^[15]利用激光等离子体光源获得的未染色活体状态下血小板的软X射线显微图像.在染色体结构研究方面,G. Schmahl等^[16]用X射线成像显微镜获得来自chironomus thummi幼虫唾腺的多线染色体的图像,可以清楚地看出条带之间的纤维状结构,这些纤维直径在60—120nm,因而光学显微镜分辨不出.其他还有传染疟疾的红细胞生命周期的研究和PTK培养细胞的细胞周期研究等.

在聚合物材料科学研究中,电子显微术是其高分辨成像的标准技术,而经常用来获得化学信息的是以降低空间分辨率和严重的辐射损伤为代价的电子能量损失谱(EELS).艾德(H. Ade)等^[17]利用X射线吸收近边结构显微术对聚苯乙烯、聚丙烯晴、聚丙烯及其混合物进行了系统研究,结果表明,其对聚合物材料研究的重要性在于:它们是用特定的化学成分、化学键获得的,样品没有辐射损伤或侵入性的染色技术(较电子能量损失谱低3个量级),因而为聚合物材料和其他分相材料研究提供了新的研究手段.J. H. Kinney等^[18]将高分辨的X射线层析术用于陶瓷复合材料的化学汽化渗透(CVI)工艺过程的研究,结果表明,这一直接的、非侵入性的观测技术非常适用于测定表面积扩展和微孔体积等与工艺模式有关的重要参数.

新近发展起来的融谱的测量和显微术于一体的X射线光电扫描显微镜^[19],能在亚微米尺度上给出元素成分及其化学状态的信息,不仅对研究随空间位置变化的物理或化学过程有重要意义,而且对推动高新技术的发展也会产生直接影响.例如,对线宽已达亚微米的微电子器件来说,X射线光电扫描显微镜不论对器件物

理研究还是工艺过程分析,都是十分有用的.

6 结束语

综上所述,X射线显微术的应用领域已从单纯的生命科学向众多高新技术领域扩展,并发挥着越来越重要的作用.但是,高分辨率X射线显微术的研究历史还不长,仍处于不断发展和完善阶段.人们在判断哪些应用可能(或不可能)从中获得益处时,需小心才行.除此之外,在X射线显微术的应用过程中还应注意以下几点:

(1) X射线显微术的主要特色将不是分辨率的突破,而是在非常接近被测物体自然状态的环境下,对改变极小或完全没有改变的物体进行定量测量;

(2) 同一样品的X射线显微图像和电子显微照片可能不一致,但两者都是正确的,只不过它们分别反映了样品结构的不同方面,这是因两者的成像衬度机制不一样.X射线显微成像是因C,N,O等特定元素的吸收边的存在,对它们的浓度很敏感,而电子显微图像是采用染色法来增加电子显微像的衬度;

(3) 辐射损伤问题.在分辨率相同的情况下,X射线显微术中样品所受的辐射剂量较电子显微术要低得多.低温即冷冻X射线显微术技术能保证生物材料在辐射剂量是 10^9 Gy时仍保证其结构的稳定性^[20].

(4) 软X射线成像的最终目标是实现正常生理环境下未染色的、湿的活体生物微结构的高分辨三维成像,这一目标只有在实现水窗波段的饱和X射线激光或自由电子激光,同时光

学系统、探测器、数据处理及实验技术相当完善时,才有可能达到.

参 考 文 献

- [1] M. Howells et al. , *Scientific American* , **264** - 2 (1991) , 42.
- [2] D. Sayre , H. N. Chapman , *Acta Cryst.* , **A51** (1995) , 237.
- [3] H. Ade et al. , *Science* , **258** (1992) , 972.
- [4] G. Schmahl , D. Rudolph et al. , *Rev. Sci. Instrum.* , **66** (1995) , 1282.
- [5] A. Snigirev , I. Snigireva , *Rev. Sci. Instrum.* , **66** (1995) , 5486.
- [6] 徐向东、洪义麟、付绍军、张允武, *物理* , **27** (1998) , 293.
- [7] G. Schmahl , D. Rudolph , (eds.) , *X - ray Microscopy* , Springer - Verlag , Berlin , (1984) .
- [8] D. Sayre et al. , (eds.) , *X - ray Microscopy* , Springer - Verlag , Berlin , (1988) .
- [9] A. G. Michette et al. , *X - ray Microscopy* , Springer - Verlag , Berlin , (1992) .
- [10] V. V. Aristov , A. I. Erko , (eds.) , *X - ray Microscopy* , Bogorodskii Pechatnik Pub. Co. , Chernogolovka , Russia , (1994) .
- [11] S. Lindaas , M. Howells et al. , *J. Opt. Soc. Am. A* , **13** (1996) , 1788.
- [12] I. McNulty J. Kirz et al. , *Science* , **256** (1992) , 1009.
- [13] T. Cog , R. H. Menk et al. , *Synchrotron Radiation News* , **9** - 6 (1996) , 30.
- [14] I. McNulty et al. , *Rev. Sci. Instrum.* , **66** (1995) , 1431.
- [15] R. Feder , V. Baton , D. Sayre , *Science* , **227** (1985) , 63.
- [16] G. Schmahl , D. Rudolph , B. Guttman et al. , *Optik* , **93** (1993) , 95.
- [17] H. Ade et al. , *Synchrotron Radiation News* , **9** - 5 (1996) , 31.
- [18] J. H. Kinney , T. M. Breunig , T. L. Starr , *Science* , **260** (1993) , 789.
- [19] A. K. Ray - Chaudhuri , F. Cerrina , *Necl. Instr. and Meth.* , **B87** (1994) , 104.
- [20] J. Thieme , G. Schneider et al. , in *HASYLAB Annual Report* , (1995) , 490.