

基于同步辐射的快速扫描 X 射线微束荧光成像方法*

闫芬 张继超 李爱国 杨科 王华 毛成文 梁东旭 闫帅 李炯 余笑寒[†]

(中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201204)

(2010 年 10 月 29 日收到; 2010 年 12 月 1 日收到修改稿)

在上海光源硬 X 射线微聚焦光束线站(BL15U1)上, 基于 EPICS 软件平台, 集成运动控制, 光强探测, 荧光探测等功能, 实现了“飞行”模式(on-the-fly) X 射线扫描微束荧光成像方法. 用“飞行”扫描 X 射线荧光成像法获得了标准镍网, 以及微量元素 Cu, Zn, K, Fe 在样品老鼠脾内的分布图像, 结果显示该方法不但在速度上有了极大的提高, 而且获得的元素分布图像具有高质量.

关键词: 快速扫描 X 射线微束荧光成像 同步辐射 微量元素分布

PACS: 07. 79. - v, 07. 85. Qe, 87. 59. - e, 92. 20. Wx

1. 引言

随着对物质物理化学性质分析的不断深入, 人们了解物质特性随微区变化的需求越来越强烈. 元素在微米及亚微米尺度如何分布, 受到了生物、环境、考古、材料等众多前沿领域的广泛关注. 各个领域的科研工作者利用多种技术去寻求微区分布^[1,2]. 如采用光学显微镜, 荧光染色使得个别感兴趣的金属元素可视化; 采用电子枪产生高能电子束激发的电子 X 荧光分析 (EPXMA) 测量样品处荧光强度^[3]; 采用高能质子束激发的 X 荧光分析 (PIXE) 进行血液中元素分析^[4]; 利用基于同步辐射光源的 X 荧光分析 (XFM) 对细胞进行微量元素分析^[5]等. 而在众多方法中, XFM 有独特优势. 已经证实 XFM 探测元素的能力比 EPXMA 高两个数量级. EPXMA 必须要求样品置于真空中, 切片到 100nm, 而 XFM 的样品不需要分段就可以探测到样品本身固有的物质. 另外, XFM 不需要引入人造染料, 就可以用低温方法达到水合物状态. 硬 X 射线荧光可以被激发贯穿整个细胞, 能够用来量化细胞中元素的含量. PIXE 的元素敏感性介于 EPXMA 和

XFM 之间, 也要求样品必须置于真空中. EPXMA 和 PIXE 的辐射损伤都远远大于 XFM.

基于第三代同步辐射光源的 XFM 是探测元素微区分布以及量化元素含量的强有力工具, 而且是唯一能定量分析亚微米级细胞元素分布的技术^[6-9]. 上海光源硬 X 射线微聚焦光束线站是国内第一条基于第三代同步辐射光源的硬 X 微探针装置. 它利用高通量, 能量可调的单色 X 射线微束, 采用 X 射线荧光分析, 荧光成像, 达到元素识别和探测微区元素分布的能力. 由于扫描 X 射线荧光成像方法需要逐个像素点进行数据采集, 所以如果在同样的条件下(时间和荧光强度), 扫描方式决定了荧光图像的像素点数. 扫描方式大体分为“走停”(step by step)模式和“飞行”(on the fly)模式; 电机“走停”式应用于常规扫描模式, 即电机运动一个步长进行一次数据采集; 电机“飞行”式属于快速扫描模式, 即电机直接从始点运动到终点, 中途不停留. 目前, 国际上开展扫描 X 射线荧光成像方法的线站多数在采用电机“走停”式, 为了提高采集效率, 很多线站都在研究“飞行”式. 由于“飞行”式涉及到多维样品台与多个探测器联动, 所以难点是在合适的时间和位置获取恰当的数据. 目前,

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB934501), 国家重大研究计划项目(批准号: 2007CB936003)和国家自然科学基金(批准号: 10805071)资助的课题.

[†] 通讯联系人. E-mail: yuxh@sinap.ac.cn

BL15U1 也采用“走停”式,但是很多时间都浪费在电机启动,加速,停止,停稳,以及数据以 0.1 s 间隔实时采集等过程中.现在的系统以最快的速度采集 100×100 像素点数的样品需要 96 min. 为了提高采集效率,使有效时间在总扫描时间中的比重增大,本文工作基于 EPICS 软件平台,集成运动控制,光强探测,荧光探测等功能,实现了“飞行”模式扫描荧光成像方法,达到了高效获取高质量荧光图像的目的.用该方法扫描了标准镍网,以及微量元素 Cu, K, Fe, Zn 在样品老鼠脾内的分布,获得了高质量的元素分布图像.

2. 方法实现

2.1. 实验原理

荧光分析就是利用物质的分子或原子受外来光源辐照后,分子或原子受激发,当它们退激后发出荧光,荧光的波长与分子或原子的能级结构有关,因此测量荧光的波长和强度就可用来确定发出该荧光的元素种类和含量,确定样品组成^[10].对于单色光激发,元素 Z 在时间 t 内到达探测器的计数 N_z 用公式表示为^[5]

$$N_z = N_0 t K C_z \int_0^T \exp[-x \rho_s (\mu_s(E_0) / \sin\alpha + \mu_s(E_{z_{K/L}}) \sin\beta)] dx, \quad (1)$$

其中 $K = \sigma_F(E_0, Z) \exp[-\mu_{\text{air}}(E_{z_{K/L}}) \rho_{\text{air}} d] \epsilon(E_{z_{K/L}}) \Omega / (4\pi \sin\alpha)$, C_z 是元素 Z 的相对浓度, T 是样品厚度, N_0 是能量 E_0 处的光子强度, $\mu_s(E_0)$ 是质量吸收系数, $\mu_s(E_{z_{K/L}})$, $\mu_{\text{air}}(E_{z_{K/L}})$ 和 $\epsilon(E_{z_{K/L}})$ 分别是样品,空气以及 X 射线光子 $K_{\alpha/\beta}$ 或 $L_{\alpha/\beta}$ 的探测系数, ρ_s 是样品质量密度, d 是样品到探测器的距离, Ω 是探测器固体角, $\sigma_F(E_0 Z)$ 是荧光截面.依据文献[5],当样品厚度 $T_{\rho_s \mu_{K/L}} < 0.1 \ll 1$ 时, (1) 式可以近似为

$$N_z = N_0 t K C_z \rho_s T. \quad (2)$$

由该式可知,在样品很薄的情况下, N_z 与时间 t , 样品密度 ρ_s , 样品厚度 T 成正比.

扫描样品荧光成像,需要运动 X 和 Y 方向的电机,探测器逐点收集荧光计数,得到二维荧光图像.对于常规扫描模式, X 方向的电机移动一个扫描点的距离,电机停稳后采集该点处的前置电离室光强和荧光计数,数据获取后,电机运动到下一个

扫描点,重复如上动作;对于飞行扫描模式, X 方向的电机不是逐点停顿,而是从始点运动到终点, X 方向运动一行, Y 方向向前移动一个步长,重复如上动作,以这种方式完成样品扫描.在 X 运动一行时,准确的计数是最重要的,当电机运动时,引出控制电机运动的脉冲信号,用该信号同时触发高速计数器和探测器,高速计数器记录扫描过程中样品前置电离室的光强以及电机脉冲数,探测器采集荧光计数同时记录探测器计数的有效时间.由于电机运动有加速和减速过程,所以需要探测器有效时间进行采集时间归一化处理.控制每隔多少个脉冲触发探测器,就控制了扫描的步长.探测器每点数据采集采用两种方式,一是采集感兴趣区荧光计数,另外是采集荧光全谱.两者都可以在实验之前根据样品中特征荧光谱线的能量,圈定一个或多个感兴趣区的能量范围.在扫描完成后得到不同元素在样品中的微区分布,当然,不同的采集方式采用不同的算法实现;但是对于内存容量有限的探测器数据采集卡,前者数据量少,单位时间内能够采集的像素数就会比后者大一个量级.这两种方式需依据用户的实验目的以及样品复杂情况决定.

飞行扫描模式的数据采集是该方法实现的关键. X 方向的电机从始点运动到终点停止,我们依据脉冲数来判断是否采集数据, X 方向采样点之间的步长对应一定数目的脉冲数 N ,在 N 的各个整数倍处进行前置电离室光强与探测器荧光谱的采集,这样就保证了采样点之间的步长是一致的.由于电机在起步和到达目的地时有加速和减速过程,所以需要同时记录探测器荧光谱采集的有效时间,在数据处理过程中进行采谱时间归一化处理.步长的大小根据实际用户需求以及光斑大小决定.由于不同样品需要的采样时间不同,所以电机的运动速度要与之匹配,电机在匀速运动阶段速度是步长与单点采谱时间的比值.由于步长被严格控制,所以图像重建和常规扫描方法的图像重建类似.

2.2. 系统结构

如图 1 所示是 BL15U1 光路示意图.图中列出关键光学部件,单色器能量可调范围 4.9—20.1 keV,能量分辨率 $\Delta E/E(@ 10 \text{ keV}) < 1.37 \times 10^{-4}$,样品处最小光斑尺寸 $1.6 \mu\text{m} \times 1.8 \mu\text{m}$,最小光斑下样品处光通量密度 $1.8 \times 10^{11} \text{ phs} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2} @ 10 \text{ keV}$.

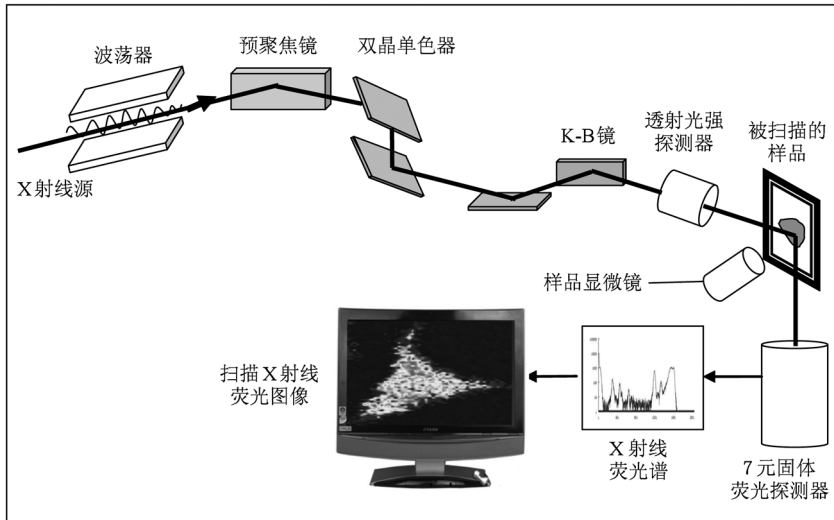


图1 硬 X 微聚焦及应用光束线站(BL15U1)光路示意图. 采用波荡器光源, 预聚焦镜进行水平方向聚焦, 焦点在单色器下游 8.5 m 处, 垂直方向平行化; 经过单色器后, K-B 镜先垂直方向聚焦, 然后水平方向聚焦, 焦点在样品处. 透射光强探测器探测样品处光强, 样品显微镜用于辅助确定光斑位置及观测样品, 固体探测器进行荧光谱采集, 最终得到扫描图像.

如图 2 所示为飞行式快速荧光成像系统结构示意图, 整个系统采用分布式控制系统结构, 涉及到运动控制, 光强探测, 荧光探测的功能. 运动控制系统实现对 KOHZU 样品台水平和垂直电机的运动控制, 由 VME 机箱插件电机控制器 MAXv8000, 电机驱动器 SLS2015, 水平和垂直台电机组成. 光强探测系统探测样品处入射光强度, 由 OKEN 的 S-1194A1 电离室, 前置放大器 DLPCA-200, 电压频率转换器, VME 机箱插件 SIS3820 计数器组成. 荧光

探测系统实现对样品荧光信号的获取, 数据经过 7 元固体荧光探测器, 前置放大器, 进入数据采集卡 XMAP, 通过光纤到达驱动计算机. MAXV8000 控制样品台电机运动同时发信号给计数器, 计数器立刻响应, 采集光强信号的同时发控制信号给 XMAP, 2 块 XMAP 接到信号后同步采集荧光信号. 所以该系统做到严格物理层面的同步, 保证了多路数据的同时性.

7 元固体荧光探测器的数据存取也很重要. 如

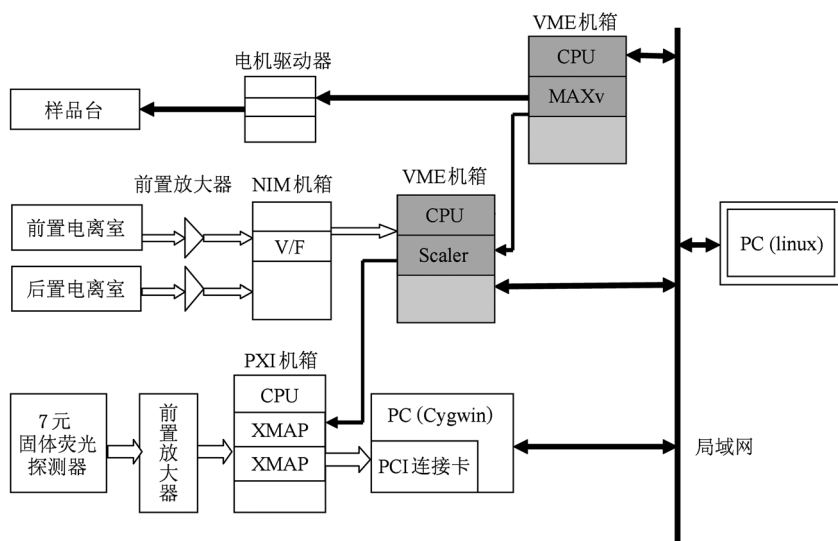


图2 快速荧光成像系统结构示意图

图3所示为探测器电子学部分数据获取示意图,图3(a)为正常单光谱数据获取模式,(b)为快速成像实验时数据获取模式,在正常模式中对速度没有要求,4M的内存卡A和B同时写入和读取;在快速模式下,对速度要求严格,从2M的内存卡A中读取数据的同时向2M的B中写入数据,用这种方式,对于我们实验站同时记录7元探测器的全谱的情况下,每秒最多可以记录500个像素的荧光谱,即从探测器数据存储角度考虑每个像素采集时间可以达到0.002s.

荧光扫描成像方法的采集速度不仅取决于实验系统的移动速度,更主要取决于探测器在每一个点所需的采集时间.每一个采样点需累积到一定数

量的光子,才能将统计误差抑制到一定限度内.对于单色光激发,样品的某种元素在一定时间内到达探测器的计数如(1)式所示,受多种因素的影响.但是对于薄样品如(2)式所示,样品中元素被探测器探测到的光子数与样品处光子强度,样品痕量元素含量,探测器的接收立体角,探测器的计数率,采集时间,样品厚度成正比. BL15U1 聚焦光斑处光通量密度达到 $1.8 \times 10^{11} \text{ phs} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ @ 10 keV,探测器的最大计数率达到 7000000 s^{-1} ,最好能测到含量为 1×10^{-6} 的痕量元素. 所以对于薄样品,光通量密度、探测器的接收立体角、探测器的计数率一定,并且得到能将统计误差抑制到一定限度的光子数的条件下,样品痕量元素含量越大,所需采

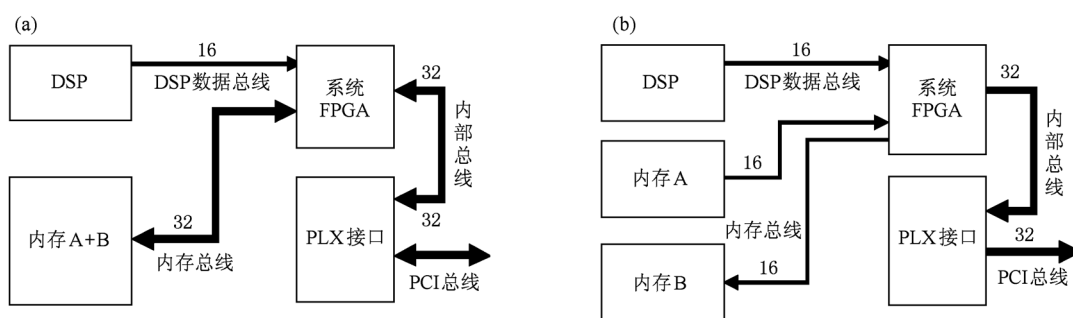


图3 7元固体荧光探测器电子学部分数据流示意图 (a)正常单光谱模式;(b)快速成像模式

集时间就越短.

2.3. 软件结构

快速荧光成像系统采用 EPICS 软件平台, EPICS 是美国洛斯阿拉莫斯国家实验室 (LANL) 和阿贡国家实验室 (ANL) 等为大型实验物理装置联合开发的控制系统软件工具集,具有结构灵活、开放性好、可扩展性好等优点. 飞行式快速荧光成像方法的客户端采用 Linux 操作系统管理下的 PC 机,使用 EPICS 的 edm 软件工具,结合 python 脚本语言来设计用户操作界面,实现人机对话. 该方法涉及到的所有硬件,都在 EPICS 平台下运行,关于 EPICS 平台在 BL15U1 的应用,见文献[11].

3. 实验结果

将飞行式快速荧光成像实验方法应用于上海光源 BL15U1 硬 X 微聚焦实验站,得到了理想的结果,下面具体介绍.

我们对标准镍网在束流能量为 10.00 keV 下进

行快速荧光成像,光斑尺寸 $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$,得到实验结果如图4所示,镍的荧光能量选择为镍的 $K\alpha$ (7.478 keV),镍网的规格是1000目/英寸,即每个网格包括金属部分与空心部分总宽为 $25.4 \mu\text{m}$. 扫

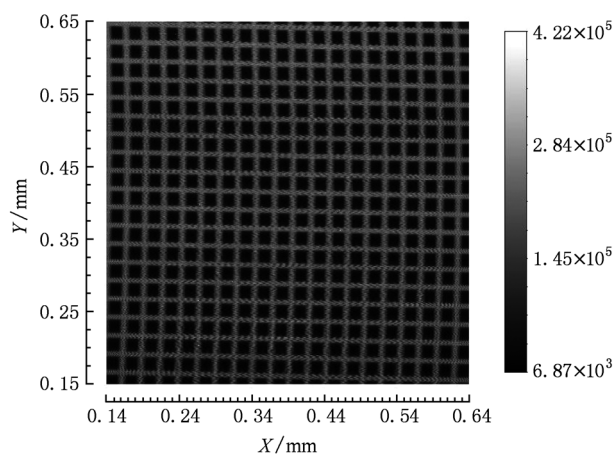


图4 Ni的边在10.00 keV束流能量下的快速荧光扫描图像,各个像素的像素值为7元固体探测器的7个探头在该像素处的荧光计数和

描设置总点数 500×500 , 对于如此大范围的扫描只用了 38 min, 如果采用常规电机走停式, 100×100 需要 96 min, 该样品需扫描 40 h.

金属元素在生物样品中都是微量元素, 所以生物样品中金属元素的荧光信号要比其他样品中弱很多, 对生物样品进行快速荧光成像难度要比其他材料大很多. 我们对样品小鼠脾的切片在束流能量 10.00 keV 下进行飞行式荧光成像, 光斑尺寸 $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, Cu, Zn, K, Fe 在鼠脾内的含量分别为 $4.3 \pm 1.49 \mu\text{g/g}$, $105.6 \pm 7.5 \mu\text{g/g}$, $130.2 \pm 22.9 \mu\text{g/g}$, $210.6 \pm 78.1 \mu\text{g/g}$, 见文献[12], 得到的结果由图 5 所示, 扫描点数 530×647 , 全部扫描完成只用了 2 h 20 min. 荧光能量选择为 Cu 的 $K\alpha$

(8.05 keV), Zn 的 $K\alpha$ (8.64 keV), K 的 $K\alpha$ (3.31 keV), Fe 的 $K\alpha$ (6.40 keV). 从图中可以看出, 我们得到了正常鼠脾内 Cu, Zn, K, Fe 的分布, 这些图片都来自于原始数据, 没进行过任何平滑处理. Cu, Zn, K, Fe 在样品中的含量依次增加, 在相同采集时间内, 得到的荧光图像也依次清晰, 与(2)式符合. Fe 元素在样品内的含量高于 Cu 元素, 从图中可以看出该实验设置的采集速度对 Fe, K, Zn 元素的荧光成像非常合适, 如果要得到 Cu 元素的高质量扫描荧光成像, 需要降低采集速度, 增加单点采集时间. 结果显示飞行式快速荧光成像方法在保证高质量的获取荧光数据的前提下, 在采集速度上有了质的飞跃.

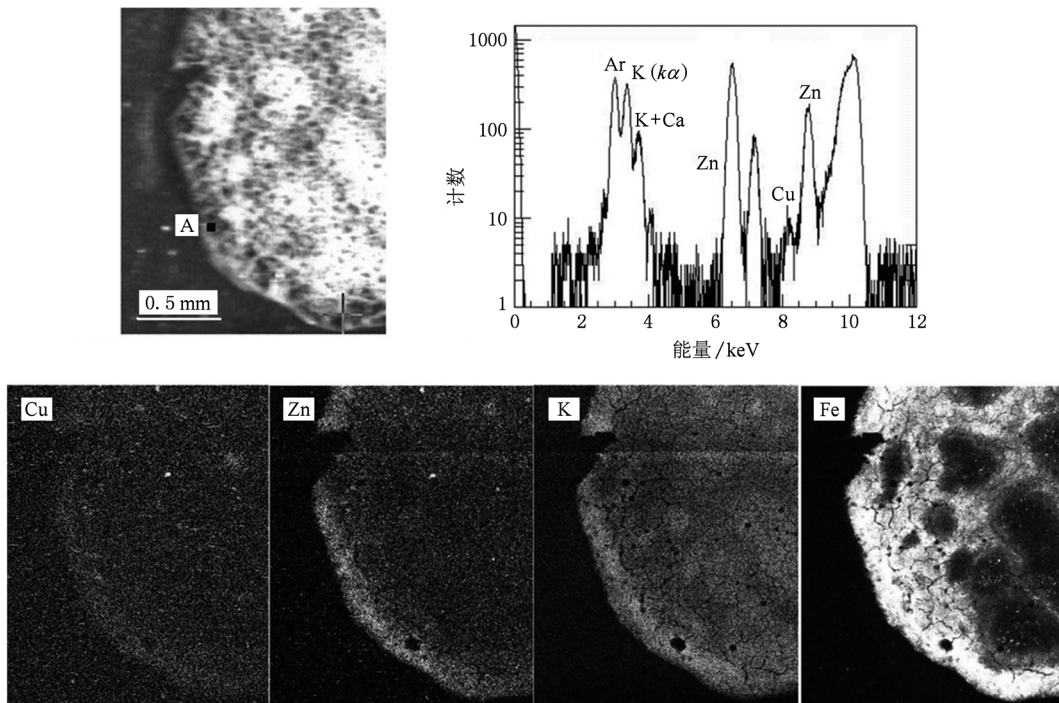


图 5 小鼠部分脾切片荧光扫描图(图片上层左边是显微镜下观测的样品图片, 右边是 $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ 范围内样品的荧光光谱, 位置是左边图片的 A 处; 下层从左到右分别为 Cu, Zn, K, Fe 元素的荧光分布图)

4. 结 论

基于同步辐射硬 X 微聚焦光束线站的飞行式快速荧光成像方法主要采用运动控制器发出的脉冲同步触发多个探测器, 以达到电机运动与探测器数据获取相协调的目的. 该实验方法基于 EPICS 软件平台, 涉及运动控制, 光强探测, 荧光探测等功能, 最终达到在大规模提高速度的前提下, 得到高质量的荧光成像结果. 快速荧光成像

与常规扫描方法相比, 极大程度的提高了效率, 常规法多数时间都浪费在电机启动, 加速然后停止, 网络通讯以及每点进行的探测器数据读取过程中. 但是走停式作为最基本的荧光成像方式, 对于某些生物样品中含量极低的元素, 比如, 探测器采集 10 s 只有十几个荧光计数, 这样的样品单点采集就要很长时间, 整个样品扫描的大部分时间都是有效计数时间, 这种情况下飞行式就没那么重要了. 但是在大多数情况下, 飞行式是一种非常实用的方法. 本文成功实现了快速荧光成像

方法, 不仅使得微聚焦线站在荧光分析方法学上有很大进展, 而且使得科研工作者在同步辐射线站进行实验的有限机时内得到更多的实验结果, 同时还为微聚焦线站开展快速荧光断层扫描方法

学提供技术前提.

感谢美国 APS 光源 Mark Rivers 在 EPICS 环境下驱动固体荧光探测器给予的帮助.

- [1] Xu Y S, Yang X R, Wang H Y, Tang L, Liu C C, Wei X, Tan D Z 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 4 (in Chinese) [徐岳生、杨新荣、王海云、唐蕾、刘彩池、魏欣、覃道志 2005 物理学报 **54** 4]
- [2] Cheng L, Ding X L, Liu Z G, Pan Q L, Chu X L, Feng S L 2007 *Acta Phys. Sin.* **56** 12 (in Chinese) [程琳、丁训良、刘志国、潘秋丽、初学莲、冯松林 2007 物理学报 **56** 12]
- [3] Ingram P, Shelburne J, Roggli V, LeFurgey A 1999 *Biomedical Applications of Microprobe Analysis* (San Diego: Academic Press) pp31—41
- [4] Bearse R C, Close D A, Malanify J J, Umbarger C J 1974 *Anal. Chem.* **46** 4
- [5] Bohic S, Simionovici A, Snigirev A, Ortega R, Devès G, Heymann D, Schroer C G 2001 *Appl. Phys. Lett.* **78** 22
- [6] Ortega R, Cloetens P, Devès G, Carmona A, Bohic S 2007 *PLoS ONE* **2** 9 e925
- [7] Kemner K M, Kelly S D, Lai B, Maser J, O' Loughlin E J, Sholto-Douglas D, Cai Z, Schneegurt M A, Kulpa C F, Jr., Neelson K H 2004 *Science* **306** 5696
- [8] Yang L, McRae R, Henery M M, Patel R, Lai B, Vogt S, Fahrni C J 2005 *PNAS* **102** 32
- [9] Fahrni C J 2007 *Current Opinion in Chemical Biology* **11** 2
- [10] Ma L D, Yang F J 2005 *The application of synchrotron radiation* (Shanghai: Fudan University Press) pp202—215 [马礼敦、杨福家 2005 同步辐射应用概论 (上海: 复旦大学出版社) 第 202—215 页]
- [11] Yan F, Li A G, Yang K, Wang H, Yu X H 2009 *Nuclear Techniques* **32** 11 (in Chinese) [闫芬、李爱国、杨科、王华、余笑寒 2009 核技术 **32** 11]
- [12] Ceng L, Cui Y H, Fu X L, Jia S Y 1998 *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica* **6** 2 (in Chinese) [曾林、崔海银、付兴伦、贾世玉 1998 中国实验动物学报 **6** 2]

Fast scanning X-ray microprobe fluorescence imaging based on synchrotron radiation^{*}

Yan Fen Zhang Ji-Chao Li Ai-Guo Yang Ke Wang Hua Mao Cheng-Wen
Liang Dong-Xu Yan Shuai Li Jiong Yu Xiao-Han[†]

(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201204, China)

(Received 29 October 2010; revised manuscript received 1 December 2010)

Abstract

A method of fast scanning X-ray microprobe fluorescence imaging, on-the-fly scan, has been recently accomplished in BL15U1 hard X-ray micro-focus beamline of Shanghai Synchrotron Radiation Facility, based on the software platform of EPICS; the high technology of precise motion control, the X-ray flux detection and the X-ray fluorescence spectrum detection are integrated into this system. By the method of X-ray microprobe fluorescence imaging, the images of standard nickel mask and the elemental distribution of copper, zinc, kalium and iron in specimen of mouse spleen are obtained. The results demonstrate that this method not only enhances the efficiency on a large scale, but also achieves high quality fluorescence mapping.

Keywords: fast scanning X-ray microprobe fluorescence imaging, synchrotron radiation, trace elemental distribution

PACS: 07.79.-v, 07.85.Qe, 87.59.-e, 92.20.Wx

^{*} Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2010CB934501), the National Key Research Project (Grant No. 2007CB936003), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 10805071).

[†] Corresponding author. E-mail: yuxh@sinap.ac.cn