

基于环形抽运光的红外超分辨显微成像方法

刘鸿吉 刘双龙 牛憨笨 陈丹妮 刘伟

A super-resolution infrared microscopy based on a doughnut pump beam

Liu Hong-Ji Liu Shuang-Long Niu Han-Ben Chen Dan-Ni Liu Wei

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 233601 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.233601

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.233601>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I23>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于取样光纤布拉格光栅的全光纤拉曼测温分光系统设计及优化

[Design and optimization of all-fiber rotational Raman spectroscope for temperature measurement based on sampled fiber Bragg grating](#)

物理学报.2016, 65(7): 073601 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.073601>

基于超连续光谱激发的时间分辨相干反斯托克斯拉曼散射方法与实验研究

[Study on the method and experiment of time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering using supercontinuum excitation](#)

物理学报.2010, 59(8): 5406-5411 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.59.5406>

辐射致折射率变化用于 MeV 级脉冲辐射探测的初步研究

[Research on MeV pulsed radiation detection based on refractive index modulation](#)

物理学报.2016, 65(15): 157801 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.157801>

Ge-As-S 硫系玻璃的结构与性能调控

[Tailoring structure and property of Ge-As-S chalcogenide glass](#)

物理学报.2016, 65(12): 127801 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.127801>

自准直法测 GdTaO₄ 晶体折射率

[Measurement of refractive indices of GdTaO₄ crystal by the auto-collimation method](#)

物理学报.2016, 65(8): 087801 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.087801>

基于环形抽运光的红外超分辨显微成像方法*

刘鸿吉 刘双龙 牛憨笨 陈丹妮† 刘伟‡

(深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 深圳 518060)

(2016年7月7日收到; 2016年9月1日收到修改稿)

本文提出一种突破衍射极限的红外显微成像方法, 该方法基于抽运-探测模式, 采用了环形而非高斯型强度分布的抽运光, 由于样品在环形光强度峰值附近区域达到吸收饱和, 因此当高斯分布的探测光随后到达样品时, 只有环形光的中心区域才能吸收探测光的能量, 而且吸收区域随着环形光的强度增加而减小. 这意味着, 如果被吸收的探测光能量作为该成像系统的信号, 本文提出的方法可以使系统的分辨率超越衍射极限的限制. 本文模拟了不同环形光能量下成像系统的空间分辨率, 结果表明: 当环形光能量为100 nJ、探测光能量为0.1 nJ时, 该方法的理论分辨率在236 nm, 比传统红外显微成像系统分辨率提高了约14倍.

关键词: 红外吸收, 超分辨成像, 衍射极限, 锁相放大器

PACS: 36.20.Ng, 78.20.Ci, 82.50.Bc, 87.64.km

DOI: 10.7498/aps.65.233601

1 引言

分子化学键的振动频率与振动模式和分子局部排列密切相关, 因此不同分子振动光谱是不同的, 这就是分子光谱的指纹特性. 红外显微成像技术是一种利用分子指纹谱的非标记显微成像技术, 由于以下几个特点而被广泛使用: 1) 非标记成像对样本影响小; 2) 不同分子键对应不同振动频率, 可以对分子化学键选择性成像; 3) 成像系统简单且易于测量^[1]. 红外显微成像面临的重大难题是由于红外波长较大而使得系统空间分辨率较低. 对于样本亚微米尺度的细节无法分辨, 因此红外显微成像研究中的关键问题之一便是在成像中突破衍射极限对分辨率的限制.

超分辨红外显微成像技术可以分为近场和远场两类. 近场方法结合了原子力显微镜技术, 通过原子力显微镜的悬臂尖端感知不同厚度样本对于红外脉冲的吸收差异, 并用一束激光配合四象限探测器来将这个差异放大, 通过计算不同位置的红外

吸收差异来还原样本的表面形貌, 红外近场超分辨方法的空间分辨率可以达到100 nm^[2-5]. 其空间分辨率主要取决于原子力显微镜悬臂尖端的尺寸, 但是实验系统昂贵, 并且只能测量样本的表面形貌, 这使其在生物学上的应用受到了极大限制. 远场方法主要有两种: 一种是通过改变抽运光种类, 即分别用高斯型脉冲和环形脉冲做抽运光, 通过对比在不同抽运光作用下探测光被样本吸收的能量差异来改造点扩散函数^[6,7], 这两种方法目前还处于理论阶段, 由于需要变换抽运光种类, 因此每次成像需要进行两次点扫描过程, 这对于成像系统的稳定性是一个极大的考验; 另一种是通过和频效应, 用红外脉冲激发样品, 然后用一个可见光脉冲作用于样本, 当满足相位匹配条件后, 会产生一个蓝移的信号光, 通过探测产生的和频信号进行成像^[8,9]. 通过该方法目前只能使分辨率理论上达到可见光的衍射极限水平, 并不是真正意义上的突破衍射极限, 相对于其他显微成像方法, 如荧光标记成像^[10], 相干反斯托克斯拉曼成像^[11,12]、受激拉

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB825802, 2015CB352005)、国家自然科学基金(批准号: 61335001, 61235012)、国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2012YQ15009203)和深圳市科技计划(批准号: JCY20160308104404452)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: danny@szu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: liuwe16029@163.com

曼成像 [13] 等, 在成像分辨率上并没有一个本质的提高.

为此, 本文提出一种通过环形光做抽运光来改造点扩散函数的超分辨红外显微成像方法, 在理论分析基础上, 通过建立样本模型, 数值模拟了超分辨红外吸收成像方法的空间分辨率. 并对红外超分辨显微成像的探测方式进行了讨论.

2 理论基础及模拟

2.1 红外饱和吸收理论

一个红外脉冲作用于样本, 当脉冲频率满足样本分子键的振动频率时, 样本会吸收一部分脉冲能量, 并从基态跃迁到激发态 [14]. 在抽运-探测模式中 [15,16], 当抽运光脉冲能够使样本达到饱和吸收时, 样本是不会吸收探测光能量的. 红外饱和吸收计算过程如下:

$$-dN_2/dt = N_2A - BI(N_1 - N_2), \quad (1)$$

$$N_1 + N_2 = N, \quad (2)$$

其中 N_2 是处于激发态的粒子数, t 是脉冲作用时间; 当 $t = 0$ 时, $N_2 = 0$; A 是自发辐射系数, B 是受激吸收系数; N_1 是处于基态的粒子数, N 是粒子总数, 这里令 $N = 1$. I 是入射功率密度, 是一个随时间和空间位置变化的高斯型函数:

$$I = I_0 e^{(-4(\ln 2)r^2/\omega^2)} e^{(-4(\ln 2)t^2/t_w^2)}, \quad (3)$$

I_0 是光斑中心的功率密度; r 是与光斑中心的距离, 在光斑中心时 $r = 0$; t_w 是脉宽; ω 是光斑的半高全宽. 通过求解 (1) 式—(3) 式, 得到样品粒子数变化曲线, 如图 1 所示. 横坐标表示时间, 纵坐标表示处于激发态的粒子数. 爱因斯坦吸收系数 B 赋值为 $1.4 \text{ nm}^2/\text{fJ}$, 自发辐射系数 A 赋值为 0.1 , 抽运脉冲的脉宽为 1 ps . 黑色、绿色、红色和蓝色四条曲线分别表示 $1, 10, 100$ 和 1000 nJ 脉冲能量下的粒子数变化情况. 由图 1 可知, 当红外吸收达到充分饱和时, 激发态粒子数近似于 0.5 , 即系统粒子总数的一半. 此时样品处于饱和吸收状态, 无法吸收探测脉冲的能量. 在引入探测脉冲时, 激发态粒子数会有一个非常小的衰减, 在计算中是忽略不计的.

探测光的能量变化可以用 (4) 式—(6) 式来计算. 当探测光在样本中传输时, 其能量是随着传播

距离不断衰减的. 满足

$$\frac{dF}{dz} = -\frac{\hbar c}{\lambda} BPF(N_1 - N_2), \quad (4)$$

其中 \hbar 是普朗克常数; c 是光在真空中的传播速度, 忽略传输介质对光速的影响; P 是振子密度; λ 是入射光波长; F 是能流密度, $F = t_w I$; z 是探测光在样品中传输距离. 求解 (4) 式, 可得

$$F = F_0 e^{-[\frac{\hbar c}{\lambda} BPI(N_1 - N_2)z]}, \quad (5)$$

式中 F_0 是探测光与样品作用之前的能流密度, $F_0 = t_w I_0$. 因此可以得到在单位面积内探测光在通过厚度为 z 的样本后被吸收的能量, 如 (6) 式所示:

$$\Delta F = F_0(1 - e^{-[\frac{\hbar c}{\lambda} BPI(N_1 - N_2)z]}), \quad (6)$$

ΔF 是探测光作用样品前后的能量改变量. 当抽运光为高斯脉冲时, 聚焦范围内的样品达到饱和吸收状态, 探测光能量不发生改变, 即 $\Delta F = 0$.

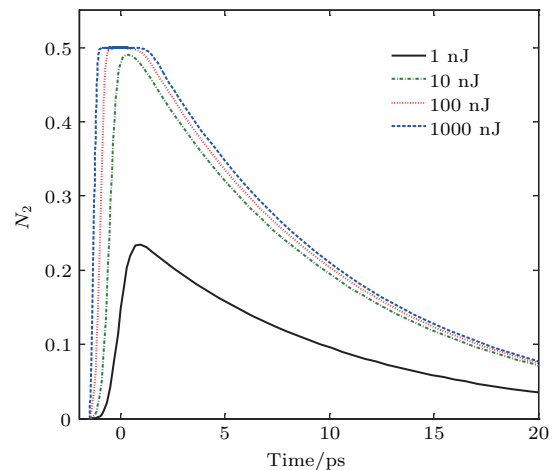


图 1 (网刊彩色) 不同脉冲能量下激发态粒子数变化曲线
Fig. 1. (color online) Curves of the population of excited state.

2.2 红外超分辨成像方法

我们用改造点扩散函数的方法来突破红外的衍射极限. 高斯型抽运光经过螺旋相位片产生一个空心的环形光束 [17], 环形光的功率密度函数如 (7) 式所示:

$$I_v = I_0 r^2 e^{[-4(\ln 2)r^2/\omega^2]} e^{[-4(\ln 2)t^2/t_w^2]}. \quad (7)$$

用环形光代替高斯型抽运光, 并且增加环形光能量使样本在环形光点扩散函数周围达到饱和吸收, 因此样品被环形光覆盖的区域无法吸收探测光能量,

只有在环形光中心位置处样本才能够吸收探测光能量. 随着环形光能量增加, 点扩散函数被逐渐压缩减小, 从而达到了突破衍射极限的目的.

模拟的成像系统如图2所示, BS是分束片, Modulator是调制器, M是反射镜, SPP是螺旋相位片, Time delay是时间延迟系统, SPL是待测样本, L是聚焦物镜, X-Y PS是二维位移台, Lock-in Amplifier是锁相放大探测系统. 对应于碳氢键伸缩振动频率, 中心波长为3500 nm的红外脉冲经分束片BS被分成两束, 一束作为抽运光, 一束作为探测光, 抽运光强度远大于探测光. 高斯型抽运光经过一个螺旋相位片产生环形抽运光, 为实现饱和和吸收, 抽运光功率密度大于样品饱和吸收阈值. 抽运光经物镜聚焦于样品后, 被调制器调制的探测光经过一个时间延迟到达样品, 探测样品被抽运光作用后的吸收信息. 为提高信号强度, 减小信号采集难度, 我们采用透射式的探测方式, 抽运光与探测光共线并且共焦. 最后, 携带有样品吸收信息的探测光被锁相放大探测系统收集, 根据探测光的调制信息, 对信号进行放大, 从而分析出探测光微小的能量变化.

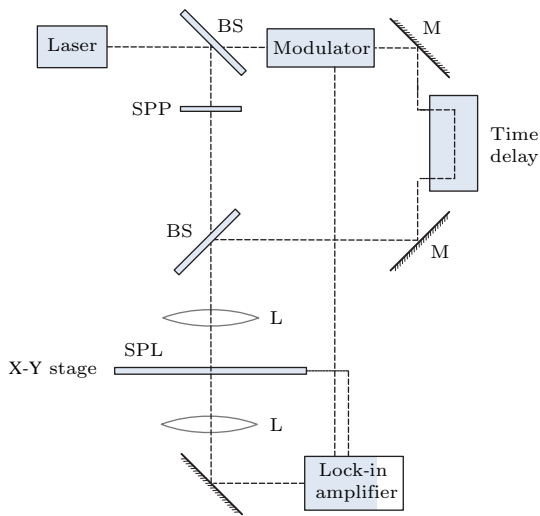


图2 (网刊彩色) 超分辨红外显微成像系统图
Fig. 2. (color online) The system for super-resolution microscopy.

2.3 数值模拟

首先建立一个样本模型. 我们模拟一个均匀的聚苯乙烯薄膜作为样本, 膜厚度为1000 nm, 对其CH₂化学键的3500 nm的吸收峰进行红外吸收成像. 将振子密度 P 赋值为 21 nm^{-3} . 红外显微成像

的物镜一般为反射式物镜, 其数值孔径 NA 一般在0.3—0.6的范围内^[18], 在这里把 NA 设置为0.65, 这是目前所能买到数值孔径最大的红外物镜, 根据分辨率的表达式 $0.61\lambda/NA$ 得到聚焦光斑的半高全宽为2500 nm. 令探测光在抽运光后经过1 ps的时间延迟到达样本. 由(1)式、(2)式和(7)式可以计算出引入环形抽运光后激发态粒子数 N_2 随位置 r 的变化, 进而求出 $N_1 - N_2$ 的值, 由前面讨论可知这就是探测光到达样品时 $N_1 - N_2$ 的值. 如图3所示, 横坐标是光斑位置 r , 随着环形光能量增加, 能够作用于探测光的样品区域被不断压缩. 将图3的结果代入(6)式, 探测光能量取0.1 nJ, 可计算出系

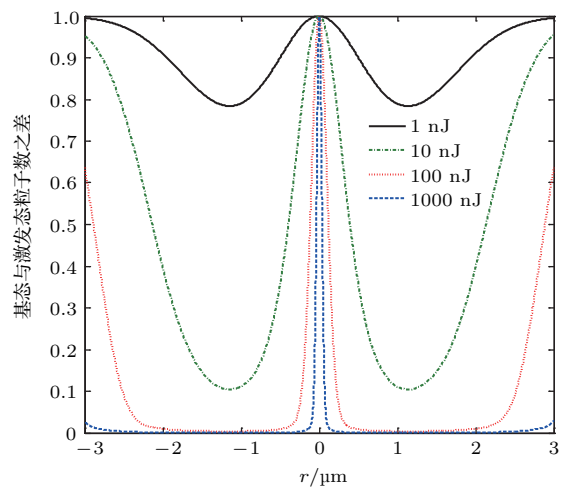


图3 (网刊彩色) 探测光到达样本时, 样本不同位置激发态与基态粒子数差
Fig. 3. (color online) The value of $N_1 - N_2$ before the probe pulse arrives the sample.

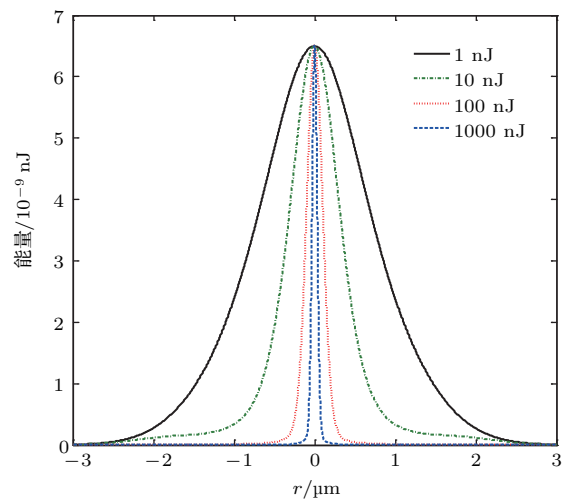


图4 (网刊彩色) 不同环形光能量条件下, 数值模拟得到的点扩散函数
Fig. 4. (color online) The simulation of PSF on different pump energy.

统新的点扩散函数,如图4所示,横坐标是光斑位置,纵坐标是探测光被吸收的能量.四条曲线黑色、绿色、红色和蓝色分别表示环形光能量为1, 10, 100和1000 nJ,脉宽为1 ps时,系统点扩散函数的半高全宽分别为1604, 721, 236和85 nm.这表明,随着环形光脉冲能量的增加,系统的分辨率突破了衍射极限限制且逐渐提高.

2.4 讨 论

本文提出的基于环形探测光的红外超分辨显微成像方法中,环形抽运光取代了高斯抽运光,由于样品在环形光强度峰值附近区域达到吸收饱和,因此当高斯型分布的探测光随后到达样品时,只有在环形光中心区域的样品可以吸收探测光能量,而且这个中心区域的面积随着环形抽运光的强度增加而减小.所以通过将吸收的探测光能量作为信号,本文提出的方法可以使系统的分辨率超越衍射极限的限制,并且该方法的分辨率在理论上没有限制.对比以往的抽运探测实验数据^[16],1 ps, 1000 nJ的抽运光能量是不会超过样品损伤阈值的.然而在提高分辨率的同时,是以牺牲信号强度为代价的.从图4可知,每单位面积内的红外吸收约为 6×10^{-9} nJ,当环形光能量为100 nJ时,点扩散函数的半高全宽为236 nm,因此探测脉冲被样品吸收的能量约为 1.05×10^{-3} nJ, $\Delta F/F_0 > 10^{-3}$,当环形光能量为1000 nJ时,点扩散函数的半高全宽为85 nm,探测脉冲被吸收的能量约为 1.36×10^{-4} nJ, $\Delta F/F_0 > 10^{-4}$.本方法最大的优势是只需要探测一次就可以计算出能量的变化,这样避免了激光器自身能量抖动的干扰.由于抽运光和探测光波长相同,可以用锁相放大器来测量探测光能量的改变,通过锁相放大器可以探测 $\Delta F/F_0 < 10^{-7}$ 的信号改变量^[19].

3 结 论

本文提出一种超分辨红外显微成像方法,即在抽运-探测模式下,利用环形光代替高斯型抽运光来改造红外显微成像系统的点扩散函数,使其分辨率突破衍射极限的限制.随后的数值分析表明,当波长为3500 nm,环形光能量为100 nJ,脉宽为

1 ps,数值孔径为0.65时,系统横向分辨率达到了约236 nm.而理论上,由于系统的空间分辨率随环形光能量的增加而逐渐提高,本方法的空间分辨率理论上是没有限制的.本方法可以实现甚至超越传统荧光成像和非标记成像的衍射极限,为发展超分辨红外显微成像技术的进一步发展提供了重要的技术支持.

参考文献

- [1] Sakai M, Kawashima Y, Takeda A, Ohmori T, Fujii M 2007 *Chem. Phys. Lett.* **439** 171
- [2] Dazzi A, Prazeres R, Glotin F, Ortega J M 2006 *Infrared Phys. Technol.* **49** 133
- [3] Dazzi A, Prazeres R, Glotin F, Ortega J M 2007 *Ultra-microscopy* **107** 1194
- [4] Mayet C, Dazzi A, Prazeres R, Allot F, Glotin F, Ortega J M 2008 *Opt. Lett.* **33** 1611
- [5] Kennedy E, Al-Majmaie R, Al-Rubeai M, Zerulla D, Rice J H 2013 *RSC Adv.* **3** 13789
- [6] Silien C, Liu N, Hendaoui N, Tofail S A M, Peremans A 2012 *Opt. Express* **20** 29694
- [7] Pita I, Hendaoui N, Liu N, Kumbham M, Tofail S A M, Peremans A, Silien C 2013 *Opt. Express* **21** 25632
- [8] Kogure S, Inoue K, Ohmori T, Ishihara M, Kikuchi M, Fujii M, Sakai M 2010 *Opt. Express* **18** 13402
- [9] Inoue K, Fujii M, Sakai M 2010 *Appl. Spectroscopy* **64** 275
- [10] Qiu J P, Liang R F, Peng X, Li Y H, Liu L X, Yin J, Qu J L, Niu H B 2015 *Acta Phys. Sin.* **64** 048701 (in Chinese) [邱骏鹏, 梁闰富, 彭晓, 李亚晖, 刘立新, 尹君, 屈军乐, 牛憨笨 2015 物理学报 **64** 048701]
- [11] Liu S L, Liu W, Chen D N, Qu J L, Niu H B 2016 *Acta Phys. Sin.* **65** 064204 (in Chinese) [刘双龙, 刘伟, 陈丹妮, 屈军乐, 牛憨笨 2016 物理学报 **65** 064204]
- [12] Cheng J X, Xie X S 2004 *J. Phys. Chem. B* **108** 827
- [13] Fu D, Lu F K, Zhang X, Freudiger C, Pernik D R, Holtom G, Xie X S 2012 *J. Am. Chem. Soc.* **134** 3623
- [14] Loudon R 1983 *The Quantum Theory of Light Second Edition* (New York : Oxford University Press) p26
- [15] Heilweil E J, Casassa M P, Cavanagh R R, Stephenson J C 1985 *J. Chem. Phys.* **82** 5216
- [16] Heilweil E J, Casassa M P, Cavanagh R R, Stephenson J C 1986 *J. Chem. Phys.* **85** 5004
- [17] Luo D, Kuang C F, Hao X, Liu X 2012 *Opt. Laser. Eng.* **50** 944
- [18] Miller L M, Dumas P 2006 *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1758** 846
- [19] Freudiger C W, Min W, Saar B G, Lu S J, Holtom G R, He C W, Tsai J C, Kang J X, Xie X S 2008 *Science* **322** 1857

A super-resolution infrared microscopy based on a doughnut pump beam*

Liu Hong-Ji Liu Shuang-Long Niu Han-Ben Chen Dan-Ni[†] Liu Wei[‡]

(College of Opto-Electronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 7 July 2016; revised manuscript received 1 September 2016)

Abstract

An approach to breaking through the diffraction limitation in infrared microscopies is put forward in this paper. In this method, instead of Gaussian pump beam, an intensive vortex beam is first focused on the sample, leading to the saturation absorption of peripheral molecules in the point spread function (PSF). The vortex beam is followed by a Gaussian probe beam with the same wavelength. Because of the previous saturation absorption, the probe beam can only be absorbed by the molecules near the center, resulting in a shrunk PSF which means super-resolution. Furthermore, the PSF of a system based on this approach is numerically simulated. With a 100 nJ pulse energy vortex beam and a 0.1 nJ pulse energy probe beam, the theoretical resolution FWHM (full width at half maximum) is measured to be about 236 nm which is 14 times better than that of the traditional infrared microscopy.

Keywords: infrared absorption, super-resolution microscopy, diffraction limit, lock-in amplifier

PACS: 36.20.Ng, 78.20.Ci, 82.50.Bc, 87.64.km

DOI: [10.7498/aps.65.233601](https://doi.org/10.7498/aps.65.233601)

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant Nos. 2012CB825802, 2015CB352005), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61335001, 61235012), the National Key Scientific Instrument and Equipment Development Project of China (Grant No. 2012YQ15009203), and the Science and Technology Planning of Shenzhen, China (Grant No. JCY20160308104404452).

[†] Corresponding author. E-mail: danny@szu.edu.cn

[‡] Corresponding author. E-mail: liuwei616029@163.com