

单微发光体光学超分辨成像技术在催化领域的应用

周小春* 席少波 田磊 顾俊南 李飞飞 李浩源

(中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 先进材料部, 苏州 215123)

国家自然科学基金 (21373264)、中组部“青年千人计划”、中科院百人计划

*通讯联系人。E-mail: xczhou2013@sinano.ac.cn Phone: 0512-62872840

摘要: 普通光学显微镜的分辨率极限只有~200 nm, 在应用方面显得越来越不足。为了突破这一限制, 发展了单微发光体光学超分辨成像技术, 其原理是通过精确地得到众多单个微小发光体(如单个荧光分子)的位置来进行成像, 分辨率约几十 nm, 甚至可小于 1 nm。当有荧光分子参与催化反应的时候, 即可采用该技术研究催化活性在纳米粒子上的分布, 以及动力学相关的问题。目前, 该技术已经在金属纳米粒子的催化、分子筛催化、光催化等领域得到应用, 且已经展现出优越的特性。

关键词: 超分辨成像; 单分子; 催化; 显微技术; 纳米粒子

Application of single tiny emitter optical super-resolution imaging technology in catalysis field

ZHOU Xiao-Chun* XI Shao-Bo TIAN Lei GU Jun-Nan LI Fei-Fei LI Hao-Yuan

(Division of Advanced Materials, Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123)

Abstract: The resolution of traditional optical microscopy is only ~200 nm, which seems less and less efficient in applications. In order to break this limitation, single tiny emitter optical super-resolution imaging technology (STEOSRIT) was developed to achieve a resolution of tens nm, or even small than 1 nm. The principle of STEOSRIT is to accumulate the positions of many tiny emitters (e.g. single fluorescence molecule), then make up the image of object by these positions. When fluorescence molecule takes part in catalytic reaction, the activity distribution of the nanoparticle and the kinetic information could be obtained by STEOSRIT. Currently, STEOSRIT has been applied in several catalysis fields, such as metal nanoparticles catalysis, molecular sieve catalysis and photocatalysis etc, and exhibits outstanding advantages.

Key words: super-resolution imaging; single molecule; catalysis; microscopy; nanoparticle

0 引言:

17 世纪中叶, 英国的 Robert Hooke 和荷兰的 Antonie van Leeuwenhoek 分别独立发明了现代意义上的光学显微镜(下面将统一简称“显微镜”), 他们引入的粗动和微动调焦机构、照明系统和承载标本片的工作台等部件至今仍然是显微镜的重要组成部分。在显微镜发明至今的 300 多年间, 人们一直在对其进行着改进和技术革新, 直到最近的单分子显微镜。由于光学显微镜具有造价较低、易于操作、对样品无损伤等显著优点, 所以一直以来是生物学、医学、材料学等学科的重要研究工具, 并推动了这些学科的发展。

显微镜的主要作用是放大微小物体, 使其能被人眼所观察到。因此, 人们总是希望可以尽可能的提高放大倍率, 但是显微镜的分辨率是有极限的, 分辨率的这一极限限制了放大倍率的无限提高。当达到显微镜的分辨率极限的时候, 即使放大倍率进一步提高, 得到的也只能是一个轮廓虽大但细节不清的图像。这一现象背后的原理被德国科学家 E.Abbe 在 1873 年所揭示, 他指出, 传统光学显微镜由于光的衍射效应和物镜的有限数值孔径, 因此产生了分辨率的极限。根据这一原理, 可以得到显微镜的分辨率表达式:

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1)$$

其中 d 为物镜的分辨率, λ 为照明光线波长, NA 为物镜的数值孔径。如果物镜的数值孔径为 1.20, 照明光线的波长为 532 nm 的绿光, 那么 $d \approx 270$ nm。因此, 显微镜极限分辨率大约为 200 nm。

虽然 200 nm 的分辨率相对于宏观的物体来说已经很小, 但是对于很多场合仍然不够。为了突破这一光学衍射限制, 获取更高的分辨率, 人们开发了一些新的技术, 比如近场扫描光学显微镜 (NSOM)^[1], 多光子荧光技术^[2], 受激发射减损显微镜 (STED)^[3], 饱和结构光学显微镜 (SSIM)^[4]等。虽然这些技术已经获得了几十纳米的分辨率, 可以突破衍射极限的限制, 但是它们都有各自的局限性。比如说 NSOM 很难做到非损伤的探测模式, 并且探测的深度比较浅; 而多光子荧光技术、STED 和 SSIM 是一类基于非线性光学的技术, 一般需要用到高强度的脉冲激光, 而这些高强度激光往往会造成样品的损伤。因此, 人们一直希望能够开发一种新的高分辨成像技术, 而单分子技术的发展为这种技术的开发提供了可能。

1 单个微小发光体(单微发光体)光学超分辨成像技术的原理

单微发光体光学超分辨成像技术(以下简称“超分辨技术”)并不是一种单一的方法, 而

是一类方法的总称，它包括 Selvin 研究组开发的 1 nm 精度的荧光成像技术 (FIONA) [5-6]，Hell 和 Qu 研究组开发的名叫纳米尺度定位的多个单分子荧光显微技术 (NALMS) [7-8]，Betzig 研究组开发的光活化的定位显微技术 (PALM) [9]，以及 Zhuang 研究组开发的随机光学重构显微技术 (STORM) [10] 等。这些技术一般可以提供高达 20 nm 左右的分辨率，甚至有些情况下可以小于 2 nm，相对于普通的显微镜来说，这是一个巨大的进步。

虽然这些方法的名字各异，技术细节也有较大差别，但是他们的原理基本相同，都是通过得到众多尺寸极小的发光体 (如单个荧光分子) 的位置来进行成像。下面将举例解释这一原理，如果存在一个四角星形的物体，如图 1A 所示，它具有清晰的边界和四个锐利角，但是在普通的显微镜下观察的时候，由于分辨率的限制，只能看到一个模糊的图像，如图 1B 所示。在这个图像中，很多的细节被掩盖，对于很多问题的研究会造成一定的困难。这一现象可以通过 E. Abbe 提出的分辨率的极限原理来理解，但是这一原理的背后还隐藏着一个容易被人忽视的前提，那就是整个物体是同一时间被照亮的，只有在这种情况下，两个靠近的亮点才会互相干扰。

然而，单分子方法的出现为我们提供了一个与传统光学完全不同的情景，此时，物体的各个部分并不是同时发光，而是物体中某个足够小的部分在不同的时间分别发光，如图 1C 所示。在该图中，四角星的一个部位 (如只包含一个荧光分子) 发射出一定数目的光子，这些光子的分布服从衍射规律，从而就可以看到衍射光斑，这个光斑的中心位置就是光线发出的位置，也就是发光体所在的位置，如图 1C 和 D 所示的十字中心的位置，在图 1D 中同时用一个白点表示。这个衍射光斑的亮度在二维空间内服从点扩散函数 (point spread function, 简称 PSF)，这个函数比较复杂，一般情况下可以用一个二维的高斯方程近似：

$$I(x, y) = B + I_0 \int_{x-\delta}^{x+\delta} dX \int_{y-\delta}^{y+\delta} dY \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{X - x_0}{\sigma_x} \right)^2 - \frac{1}{2} \left(\frac{Y - y_0}{\sigma_y} \right)^2 \right] \quad (2)$$

其中， $I(x, y)$ 为二维高斯方程在 (x, y) 位置的强度， B 为背景，可随着研究体系的不同而变化， I_0 为高斯方程的强度， δ 为像素尺寸的一半， (x_0, y_0) 是高斯方程的中心位置， σ_x ， σ_y 分别为高斯方程在 x 和 y 方向的标准偏差。通过利用这个二维的高斯方程来拟合衍射光斑，就可以精确地得到这个光斑的位置。在实际的研究体系中，这个位置可能是一个纳米粒子、或者一个量子点、或者一个荧光蛋白、或者一个荧光分子等。

当有越来越多的发光点被探测到之后，整个物体的图像就会越来越清晰，如图 1E 到 H 所示。该图像的清晰度并不取决于发光点的光线的波长，而是取决于发光中心的位置 (白点) 所

能达到的精度。这一精度值可以通过以下公式得到：

$$Er_i = \sqrt{\frac{\sigma_i^2}{N} + \frac{a^2}{12N} + \frac{8\pi\sigma_i^4 b^2}{a^2 N^2}} \quad (3)$$

其中， Er_i 是在 i 方向（一般为 x , y 方向）上的误差， σ 为高斯分布的标准偏差， a 为相机感光元件的像素点的尺寸， b 为背景的标准偏差， N 为收集到的光子的数目。第一项 (σ_i^2/N) 是光子的噪声，第二项 ($a^2/12N$) 是探测器像素尺寸的影响，第三项 ($8\pi\sigma_i^4 b^2/a^2 N^2$) 是背景的影响。该公式中的每一项都与光子数（或者光子数的平方）成反比，因此收集到的光子数对定位精度的影响尤为明显，当收集的光子数足够大的时候，定位精度可达到 1 nm 以下。

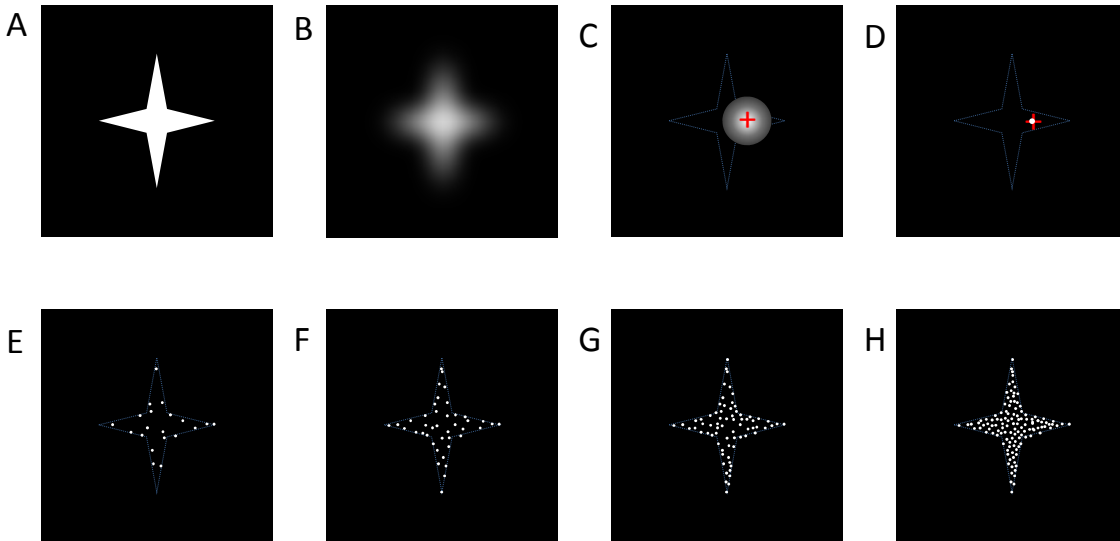


图 1 超分辨成像的原理。(A) 给定的一个几何体；(B) 该几何体在普通显微镜中的成像；(C) 在超分辨成像中，物体的某个部分含有的单个发光体发出的衍射光斑，十字的中心光斑的中心，通过二维高斯方程拟合得到；(D) 一个发光点的位置；(E) ~20 个发光点的位置；(F) ~40 个发光点的位置；(G) ~70 个发光点的位置；(H) ~120 个发光点的位置。

Fig. 1. The principle of single molecule super resolution imaging. (A) a given geometric object, (B) image of this geometric object in ordinary optic microscopy, (C) a diffraction spot of a small size emitter on the object in single molecule microscopy, the center of cross is the center of the diffraction spot, which is obtained by 2D Gaussian fitting, (D) location of one emitter, (E) locations of ~20 emitters, (F) locations of ~40 emitters, (G) locations of ~70 emitters, (H) locations of ~120 emitters.

2 超分辨技术在催化领域的应用

催化领域一直以来有两个重要的问题，一个是探索更高性能的催化剂，另一个是研究催化反应的过程和机理。对于第一个问题的研究，往往涉及到纳米粒子催化剂的筛选问题。传统的方法只能检测众多催化剂的群体行为，即使其中含有少数性能优异的纳米粒子，也将被掩盖，从而使我们失去了很多发现高性能催化剂的机会。而且，对于不同形状，不同组成的纳米催化剂，它们的不同部位的催化活性也会有较大的差别，这些差别很难被传统的检测方法所检测。对于第二个问题，传统的方法往往只是检测众多催化剂表面上发生的众多反应的平均结果，而对单个纳米催化剂、单个纳米催化的不同部位、以及单个的催化反应的反应过程和机理很难表征。

单分子技术，尤其是超分辨技术的出现为上述两个问题的解答提供了有效的途径。由第二部分所述的原理可知，该技术的分辨率普遍可以达到 20 nm 的水平，可以有效地分辨出尺寸为几十到数百纳米的纳米粒子上的催化活性的分布。又由于超分辨技术具有至少毫秒级别的时间分辨率，所以可以研究纳米粒子各个部位的催化动力学特性，可以实时、现场的研究纳米粒子各个部位的催化反应过程和机理。如果再结合其他的结构和/或组成的表征技术，如 TEM、SEM、XPS、XRD 等，即可以研究纳米催化剂的“构-效”关系，这将为纳米催化剂的研究开辟一个新的道路。

2.1. 在金属纳米催化领域的应用

金属纳米催化剂是一类极为重要的催化剂，在石油、化工、食品等领域有着广泛的应用，因此这类催化剂的研究有着重要的价值。传统的方法往往是研究众多金属纳米催化剂粒子的平均行为，测量的结果是一个统计意义上的结果，这类方法已经相对比较成熟，测量过程较为简单易行。但是这类方法可能会失去找到高活性金属纳米催化剂的机会，因为即使有个别高活性的催化剂粒子也会被众多性能较低且相近的催化剂所掩盖，另外，传统方法在催化剂的纳米和分子级机理的研究方面存在不足。而单分子方法却可以克服传统方法所面临的上述困难，在纳米和分子级的层次研究催化的过程^[11]。而且，由于超分辨光学成像技术的出现，光学单分子技术已经不再局限于单个纳米粒子的催化性能的研究，而是可以分辨出单个纳米粒子的各个部分的催化性能。

美国的 Chen 研究组采用超分辨成像的方法研究了金纳米棒和金纳米片的催化特性^[12-13]。在研究之前，这些金纳米粒子被包裹上了一层介孔的 SiO₂，这层介孔的 SiO₂ 可以稳定纳米粒子，使得纳米粒子在去除表面活性剂的时候仍然保持原有的形状。而且介孔的 SiO₂ 还具有短

时间捕获荧光分子的能力，从而可以方便荧光信号的检测。这些金纳米棒和金纳米片在包裹 SiO₂ 后的 TEM 照片如图 2A 和 B 所示，从图中可以看出两者在除去表面活性剂之后仍然保持着原有的棒状和三角形。通过超分辨成像的研究可以得到催化活性在整个纳米粒子上的分布，对照这些粒子的 SEM 图像可以比较粒子的不同部位的活性，如图 2C 和 D。经过仔细的分析之后发现，整个纳米粒子都有催化活性，但是活性分布的密度并不均匀。对于金纳米棒来说，两端的活性较高，而中间棒身的活性较低，如图 2E 所示；而对于金纳米片来说，三个端的面积比活性较高，三个边的面积比活性次之，中间的面积比活性最低，如图 2F 所示。由于催化剂表面的低配位原子往往具有比较高的催化活性，而纳米粒子的棱角或者边缘处恰恰包含较高比例的低配位原子，这些因素可能是金纳米棒和金纳米片的棱角处或者边缘处表现出较高活性的原因。

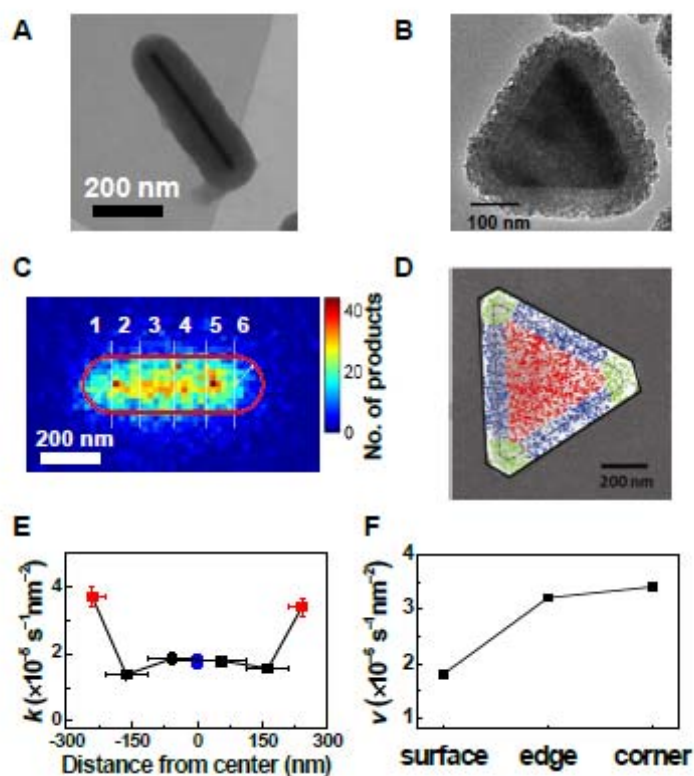


图 2 单个纳米粒子上的不同部位的催化活性。(A, B) 包裹在介孔 SiO₂ 中的金纳米棒和纳米片的 TEM 图像；(C) 单个 Au@mSiO₂ 纳米棒上的催化产物的 2 维分布；(D) 单个 Au@mSiO₂ 纳米片上的催化产物的 2 维分布；(E) 图 (C) 中的每个片段的催化反应速率常数；(F) 图 (D) 中的三个部分的反应速度。A, C, and E 来自文献 Zhou *et al.*^[12]. B, D, and F 来自文献 Andoy *et al.*^[13]. Copyright 2013 American Chemical Society.

Fig. 2. Site-specific catalytic activity on single shaped nanocrystals. (A, B) TEM images of a Au

nanorod and nanoplate encapsulated in mesoporous silica. (C) 2-D histogram of catalytic product locations on a single Au@mSiO₂ nanorod. (D) Locations of catalytic products mapped onto the SEM image of a single Au@mSiO₂ nanoplate. (E) Specific catalytic rate constant k of each segment of the nanorod in C. (F) Specific catalytic turnover rate ν for the three types of regions of the nanoplate in D. A, C, and E adapted from Zhou *et al.*^[12]. B, D, and F adapted from Andoy *et al.*^[13]; Copyright 2013 American Chemical Society.

由于超分辨技术在金属纳米催化领域具有大约 20~40 nm 的精度^[12, 14]，而所研究的金纳米粒子在某些方向上具有数百纳米的尺度，因此可以解析出这些纳米粒子各个部分的活性分布。比如说，进一步的研究发现金纳米棒的棒身（不包括两端）的催化活性并不均一，而是呈现出中间活性高，向两端活性越来越低的特性，如图 3A, B 所示^[12]。这是一个不同寻常的现象，因为从以往的研究知道，金纳米棒的棒身都是由同一种晶面（(100)或者(110)）所组成，催化活性应该非常接近。经过深入的研究终于了解到，这一反常现象可能与金纳米棒生长的过程有关，因为金纳米棒的生长是一个减速的过程，初期生长较快，后期生长较慢，而生长速度的较快的晶面的完整性较低，表面原子的配位数也较低，因此催化活性较高。该研究中的金纳米棒是采用“种子法”从中心往两头生长起来的，所以纳米棒的中心位置将会有较高的活性，而两端的活性相对较低。总结以上的分析可以建立一个简单的数学模型来描述这个结果：

$$k_L(x) = -2\beta_L x + k_{c,L} \quad (4)$$

其中 x 为纳米棒上的位置到中心的距离， $k_L(x)$ 为 x 处的催化反应活性， β_L 是活性的梯度， $k_{c,L}$ 为棒的中心位置的活性。虽然这个模型是一个简单的一维模型，但是可以很好的拟合实验结果，如图 3B 所示。通过进一步的研究还发现，不同长度的纳米棒的活性从中心到两端的下降速度并不相同，而是呈现出短棒下降较快，而长棒下降较慢的趋势，如图 3C 所示，这就反映了短棒在生长的时候很快停止，而长棒在生长的时候缓慢的终止生长^[12]。

当把金纳米片从中心到边缘分割成一些区域，如图 3D 所示，并计算中间每个区域（不包括边和角）的面积比活性的时候发现，它具有和金纳米棒相似的规律，催化活性呈现出从中间到边缘递减的趋势^[13]。这一趋势同样可以采用和纳米棒相似的规律建立类似的数学模型：

$$\nu_R(r) = -\beta_R r^2 + \nu_{c,R} \quad (5)$$

其中 r 为纳米片上的位置到中心的距离， $\nu_R(r)$ 为 r 位置的催化活性， β_R 为活性的梯度， $\nu_{c,r}$ 为中心位置的活性。该模型对实验数据的拟合结果如图 3E 所示，从图中可以看出拟合的结果

较好。另外，从图 3F 还可以看出，随着金纳米片尺寸的增加，活性的梯度 β_R 呈现下降的趋势。与金纳米棒的机理类似，这些发现也可能是由于金纳米片是从中心往边缘逐渐生长的缘故。从这些研究可以看出，超分辨成像的研究可以发现很多新的现象和新的规律，为纳米催化剂的研究提供了有力的工具^[13]。

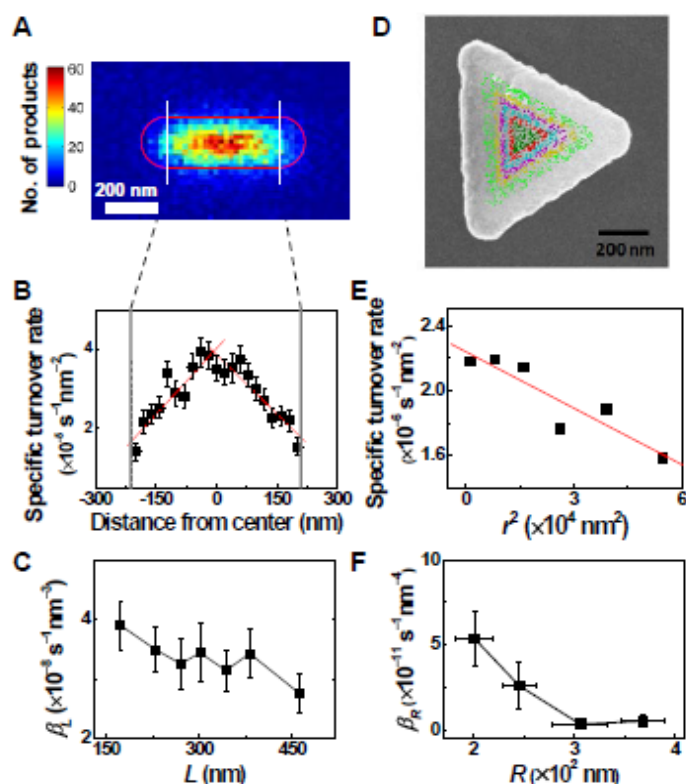


图 3 相同晶面的催化活性梯度。(A) 单个 Au@mSiO₂ 纳米棒的催化活性的 2 维分布；(B) 纳米棒上的催化活性的梯度分布；(C) 催化活性的梯度和纳米棒长度的关系；(D) 单个 Au@mSiO₂ 纳米片的催化活性的 2 维分布；(E) 纳米片的催化活性从中心向外侧的梯度分布；(F) 催化活性的梯度和纳米片半径的关系。A, B, and C 来自文献 Zhou *et al.*^[12]. D, E, and F 来自文献 Andoy *et al.*^[13]。 Copyright 2013 American Chemical Society.

Fig. 3. Catalytic activity gradients within the same facets. (A) 2-D histogram of catalytic product locations on a single Au@mSiO₂ nanorod. (B) Dependence of the specific turnover rate on location along the length of the nanorod in A. (C) Dependence of the linear activity gradient β_L on the nanorod length L . (D) Locations of product molecules overlaid on top of the SEM image of a single Au@mSiO₂ nanoplate. (E) Dependence of the specific turnover rates of radial segments on r^2 . (F) Dependence of the radial activity gradient β_R on the nanoplate radius R , which is defined along the

center-to-corner vector. A, B, and C adapted from Zhou *et al.*^[12]. D, E, and F adapted from Andoy *et al.*^[13]. Copyright 2013 American Chemical Society.

开发快速的、高通量的、并行的检测催化剂活性的方法可以大大加速高性能催化剂开发的进程。而在纳米催化剂领域，单分子、单纳米粒子方法就是这样一种非常有潜力发展成为满足上述要求的方法，因为这种方法可以同一时间对上千个不同形状的纳米粒子的活性进行检测。美国的 Chen 研究组在最近的工作中验证了这一方法，他们采用超分辨技术对整个成像的区域进行超分辨成像处理，得到了全幅的超分辨图像，如图 4A 所示^[14]。从图中可以清楚地观察到具有催化活性的纳米粒子。由于该研究体系中的超分辨技术具有数十 nm 的分辨率，所以不论是分离很好的，还是距离比较接近的纳米粒子都可以很好的分辨出来。可以通过比较每个粒子上的催化事件的空间密度很直观的了解各个纳米粒子的催化活性。而且超分辨成像技术可以得到纳米粒子的外形轮廓，当然也可以通过 SEM 得到更加精确的几何信息，如图 4B 所示，这样就可以研究纳米粒子的催化活性和粒子的外形之间的关系。当把两种不同尺寸的纳米粒子混合之后进行催化活性的检测时，可以发现两个明显的催化活性分布，如图 4C-D。另外，如果纳米粒子的尺寸比较大的话，甚至可以分辨出纳米粒子不同部位的催化性能，也就是上一个部分所述的研究。但是这里需要强调的是，通过该方法的特性是可以对催化性能进行快速的、高通量的、并行的检测和研究。

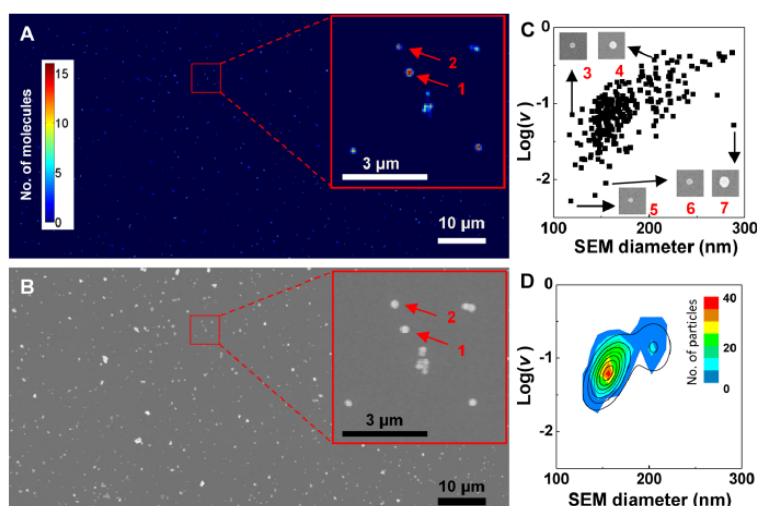


图 4 两种核壳 Au@mSiO₂ 粒子 (21@42 nm 和 102@32 nm) 的催化活性的并行扫描。(A) 约 1000 个纳米粒子的催化活性的超分辨图像；(B) 与 A 中相同位置的 SEM 图像；(C) SEM 直径和催化活性的分布图；(D) C 图的梯度分布图^[14]。Copyright 2013 American Chemical Society.

Fig. 4. Parallel activity screening of a mixture of pseudospherical 21@42 nm and 102@32 nm Au@mSiO₂ particles. (A) Subdiffraction catalysis image of ~1000 particles (B) SEM image of the same set of particles as in A. (C) Scatter plot of individual catalyst particles against their respective SEM diameters and rates of turnovers from A and B. (D) Contour plot of the 2-D histogram of C^[14]. Copyright 2013 American Chemical Society.

2.2. 在多孔材料催化领域的应用

扩散是催化过程的重要组成部分，而多孔材料中的扩散更加重要。超分辨成像技术为研究多孔材料中的分子扩散提供了强有力的工具^[15]，再结合电子显微镜等纳米结构表征的手段，就可以有效地揭示出分子在多孔材料中的扩散行为^[16]。在这一研究中，极低浓度的荧光分子被通入到多孔材料中，这些分子的荧光信号被单分子荧光技术所采集到，再对单分子信号进行超分辨成像处理，即可得到荧光分子的扩散路径和扩散行为。对照所测样品的电子显微图像即可确定分子的扩散孔道，在停留位置，改变方向的位置等细节，为研究分子在多孔材料中的扩散提供了直接的表征手段。

多孔材料（如分子筛）不仅可以做催化剂载体，同时也是一类优良的催化剂，在化学工业中有着广泛的应用。但是，从分子水平了解多孔材料内部的催化反应还具有相当大的困难，这主要是由多孔材料的不均匀性和纳米尺度的复杂特性所带来的。因此，如果要深入的了解多孔材料内部的催化反应，不仅要知道不同位置的结构和组成，而且需要知道这些位置的催化活性。超分辨技术为研究多孔材料内部的实时，现场的催化反应提供了有力的工具，再结合传统的微观结构和组成的表征手段即可以有效地研究多孔材料内部的催化反应^[17-18]。

Hofkens 研究组研究了呋喃甲醇在 ZSM 分子筛粒子上发生的催化反应，采用超分辨成像技术解析了 ZSM 分子筛粒子上的催化活性的分布和结构的关系^[17]。图 5A 所示为他们所研究的 ZSM-22 针状晶体，平均宽度为 120 nm。图 5B 所示为催化实验中所研究的单根 ZSM-22 针状晶体，在光学显微镜中的宽度为 500 nm 左右，在催化反应的研究之后，对这些催化反应的信号进行超分辨成像的处理之后，其宽度可以比较精确的确定为 100 nm 左右。更重要的是，通过超分辨成像技术可以计算一定区域内（如 20 × 20 nm²）的催化反应的个数，从而得到催化剂粒子上催化活性的纳米级分布。如果考虑催化反应随时间的变化，还可以得到很多反应动力学方面的信息。从图中还可以看出，ZSM-22 针状晶体的中间部分具有较高的催化活性，而两侧的活性较低，这可能与 ZSM-22 的生长过程有关，因为硅的前驱体首先聚集在分子模板的

周围，然后形成铝含量不连续的纳米棒。另外，他们还研究了另外一种 ZSM-5 微米晶体上的催化活性分布，发现纳米台阶处具有更高的催化活性。

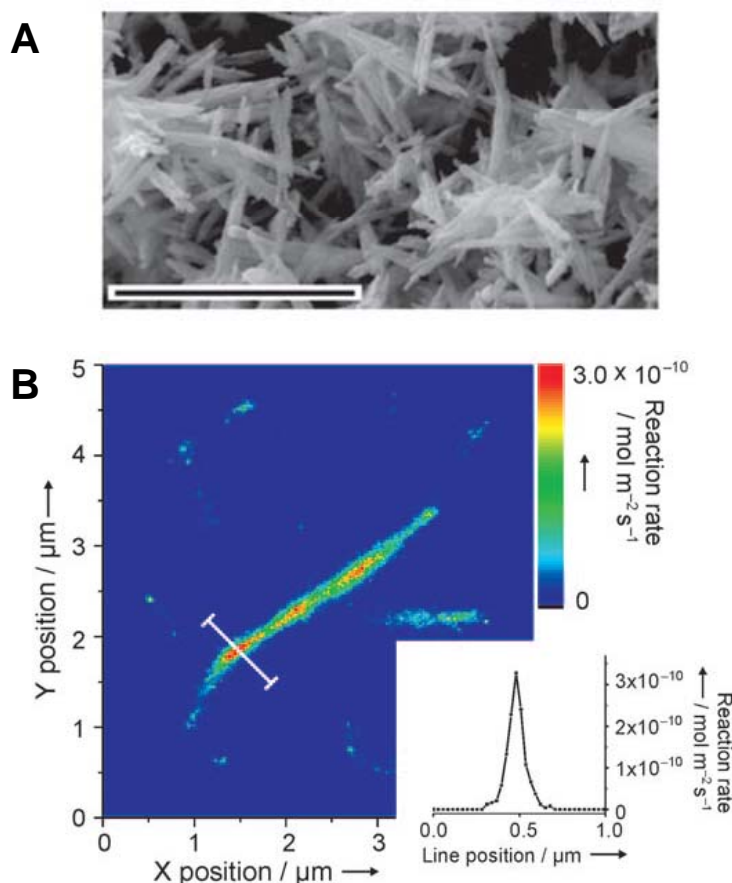


图 5 (A) 针状的 ZSM-22 晶体的 SEM 图像，标尺为 $5 \mu\text{m}$ ；(B) 超分辨活性分布图，单元格尺寸为 $20 \times 20 \text{ nm}^2$ ，内插图为白线所在截面的活性分布^[17]。Copyright 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Fig. 5. (A) SEM image of needle-like ZSM-22 crystallites. Scale bar: $5 \mu\text{m}$. (B) Reaction map calculated for $20 \times 20 \text{ nm}^2$ pixels. The inset shows the local reaction rate as measured along the white line^[17]. Copyright 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Roeflaers 和 Sels 研究组共同采用超分辨成像技术研究了 Ti-MCM-41 催化的环氧化反应^[18]。当把超分辨成像获得的反应位置叠加到催化剂的透视图像上的时候，就可以发现大多数的活性位点只能从粒子的表面深入到内部约 300 nm 的位置，而粒子的中部没有监测到催化反应发生。经过研究之后发现，并不是粒子的内部没有催化活性，而是由于反应物在粒子内部的扩散控制了反应活性分布，也就是说反应发生的时候两种反应物很难同时到达粒子的内部，因为

XPS 的测试显示, 对于催化反应有活性的 Ti 元素在粒子中的分布是均匀的, 而且吸附实验显示粒子内部的孔道是连续的。研究还得到了分子在粒子内部扩散的有效扩散系数为 $10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 。从上述的这一系列研究可知, 超分辨成像技术在分子筛催化的研究方面的有着许多独到之处。

2.3. 在光催化领域的应用

光催化反应是一种把光能转化成化学能的过程, 也可以是一种降解有机物的过程, 在能源和环境领域都有重要的地位。而光催化反应往往受到界面电子转移的控制, 如果能够理解电子转移过程的机理, 那么将会为设计制备高活性的光催化剂提供有价值的信息。为了能够研究异相催化剂的界面电子转移, 日本的 Majima 研究组设计并合成了一种名叫 3,4-dinitrophenyl-BODIPY (DN-BODIPY) 氧化还原的探针^[19], 如图 6A 所示。从图中可以看出, 在紫外光的照射下, TiO_2 催化剂可以把非荧光的 DN-BODIPY 转变为高度荧光的 HN-BODIPY, DN-BODIPY 同时吸收电子, 其荧光信号可以被 EMCCD 所检测到, 如图 6B 所示。然后, 应用超分辨成像技术找到荧光分子的位置, 再把这个位置叠加到粒子的图像上, 就可以研究各种晶面对电子传递的影响。通过该研究发现, 能量较稳定的 (101) 晶面 (表面自由能为 0.44 J m^{-2}) 比能量较不稳定的 (001) 晶面 (表面自由能为 0.90 J m^{-2}) 具有更高的光催化还原活性。

在进一步的研究中, 他们发现 DN-BODIPY 在 (001) 和 (101) 晶面上的吸附平衡常数分别为 0.87 ± 0.18 and $0.93 \pm 0.19 \mu\text{M}^{-1}$ ^[20]。而且, 反应活性的空间并不均匀, 也就是说催化的活性在 TiO_2 晶体上并不是均匀的分布, 而是有一些活性热点的存在。对照这些晶体的 SEM 图片, 发现这些活性热点与表面的破损有密切的关系^[20]。后续的研究发现该现象背后的机理是由于晶体的各向异性所表现出的对光生电子的捕获能力的差异, 而这一差异依赖于捕获电子位置的数目和分布, 以及电子的能量水平。

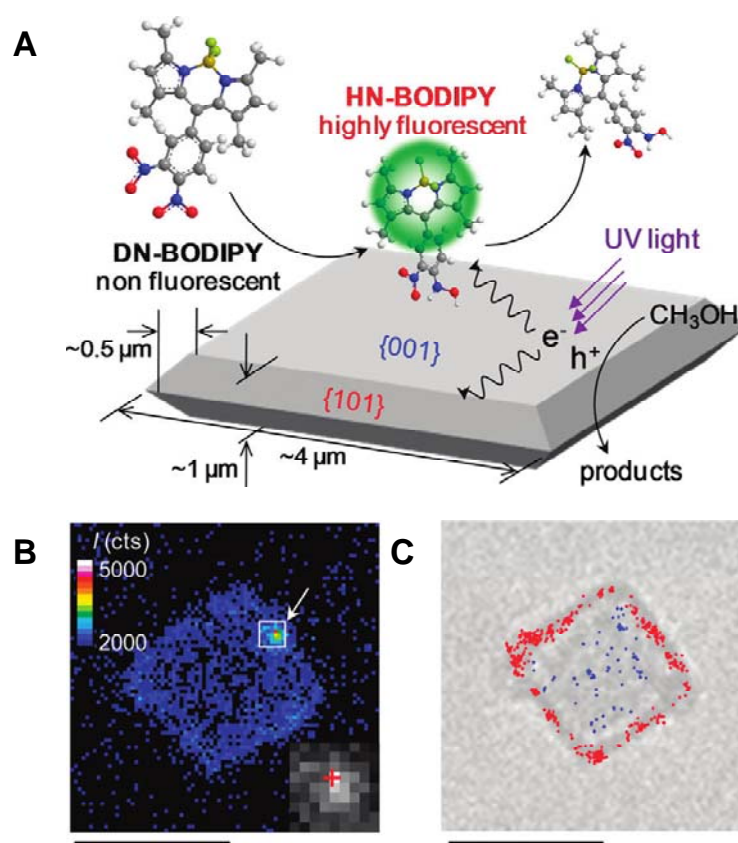


图 6 (A) 在一个 TiO_2 晶体上，经过光催化转化一个非荧光的 DN-BODIPY 到有强荧光的 HN-BODIPY；(B) 一个固定在盖玻片上的 TiO_2 晶体的荧光照片，溶液为含有 $2.0 \mu\text{M}$ DN-BODIPY 的甲醇溶液，488 nm 激光活化，紫外光激发，标尺为 $4 \mu\text{m}$ 。内插的小图为箭头所指处的放大图像，十字为超分辨成像处理得到的荧光分子的位置；(C) 同一个 TiO_2 晶体的透射照片，蓝色点代表发生在 (001) 晶面上的荧光分子，红色代表发生在 (101) 晶面上的荧光分子^[20]。Copyright 2011 American Chemical Society.

Fig. 6. (A) Photocatalytic generation of fluorescent HN-BODIPY from nonfluorescent DN-BODIPY over a TiO_2 crystal. (B) Fluorescence and (C) transmission images of the same TiO_2 crystal immobilized on a cover glass in Ar-saturated methanol solution containing DN-BODIPY ($2.0 \mu\text{M}$) under a 488 nm laser and UV irradiation. The scale bars are $4 \mu\text{m}$. The inset of panel on the left shows the expanded image, as indicated by the arrow. The cross mark shows the location of the reactive site. The blue and red dots in the transmission image indicate the location of fluorescence bursts on the (001) and (101) facets of the crystal, respectively, observed during 3 min irradiation^[20]. Copyright 2011 American Chemical Society.

电子在半导体和金属纳米粒子之间的转移是一个关系到光催化、太阳能电池和传感器等研究领域的重要问题。研究显示，载体（如 TiO_2 、 ZnO ）上的高功函金属（如 Au 、 Ag ）可以显著的提高电荷的分离效率，这是由于金属氧化物半导体的导带电子更容易传递到金属上。Majima 研究组采用一种新型的氧化还原荧光分子研究了 TiO_2 上的金纳米粒子对光催化氧化还原反应的影响。通过他们的研究发现，单个纳米粒子上的电荷转移存在时间和空间上的不均匀性，而且反应物浓度、紫外光的强度、以及金纳米粒子的尺寸都会对电子转移产生影响。在整个研究中，由于金纳米粒子极大的提高了电荷分离的效率，所以 Au/TiO_2 样品的光催化活性总是远远大于 TiO_2 样品^[21]。进一步的超分辨成像研究发现，可见光诱导的还原反应更容易发生在离金纳米粒子数十纳米远的 TiO_2 表面。这一结果可以定性的解释为由等离子共振诱导的电荷和/或能量转移而产生的效应^[22]。

分子的吸附是催化反应中的一个关键步骤，对其研究可以帮助我们深入了解催化反应的过程。然而由于探索固液表面的随机吸附和脱附的难度极大，所以纳米催化剂表面的吸附位的分布至今研究很少。Majima 研究组设计并合成了一种名叫 CA-BODIPY 的分子，当这一分子在 TiO_2 纳米粒子或者 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微米松树上吸附的时候，将形成一种荧光分子，可以通过超分辨成像技术确定荧光分子的位置，该研究中精度大约为 50 nm，这样就可以从纳米尺度上研究分子的吸附行为^[23]。

通过该研究发现，溶剂分子对有机分子的吸附有很大的影响。在 TiO_2 纳米粒子上，CA-BODIPY 分子的吸附与晶面的类型有着密切的关系，吸附的强度在水溶液中呈现出的顺序为： $(101) > (001) \approx (100)$ ，而在乙腈这类质子惰性的溶剂中却表现出相反的特性。研究还发现，CA-BODIPY 分子更易吸附在纳米尺度的 TiO_2 粒子上，而不是微米尺度的 TiO_2 粒子或者原子级平整的 TiO_2 表面，这可能是由于表面缺陷造成的。在 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微米松树上的吸附研究发现，CA-BODIPY 分子更易吸附在晶枝的顶端，而不是侧面，这可能由于顶端有更多的 Fe 粒子暴露的缘故^[23]。

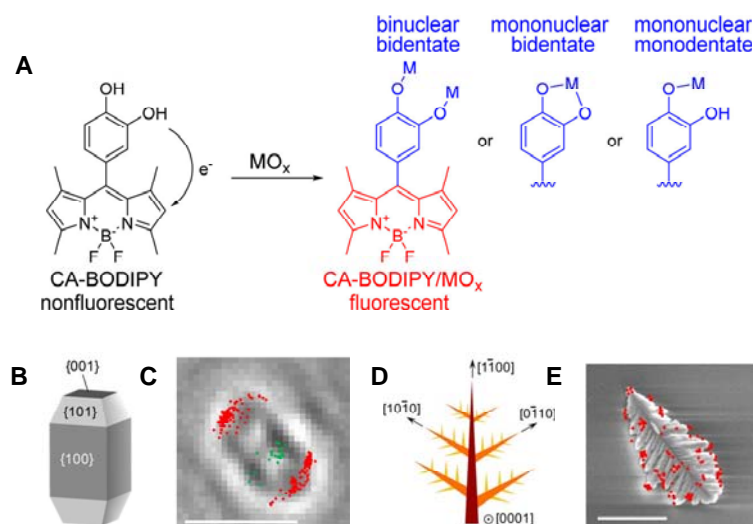


图 7 (A) 从非荧光的 CA-BODIPY 分子和金属氧化物形成荧光络合物的过程；(B) (100) 晶面占主导的 TiO_2 晶体的晶体结构；(C) (101) (红点) 和 (100) (绿点) 晶面上反应活性位的位置分布图，标尺为 $2 \mu\text{m}$ ；(D) $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微米松树的生长方向；(E) $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 上反应活性位的位置分布图，背景为该微米松树的 SEM 图像，标尺的大小为 $2 \mu\text{m}$ ^[23]。Copyright 2013 American Chemical Society.

Fig. 7. (A) Formation of fluorescent complexes from nonfluorescent CA-BODIPY and metal oxide (MO_x). (B) Crystal structure of TiO_2 crystal with dominant (100) facets. (C) Locations of the reactive sites on the (101) (red dots) and (100) (green dots) surfaces of TiO_2 crystal. The optical transmission image of the crystal analyzed is shown. The scale bar is $2 \mu\text{m}$. (D) Growth directions of $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ micropines. (E) Locations of the reactive sites on individual $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ micropines (red dots). SEM images of the crystals analyzed are shown. Scale bars are $2 \mu\text{m}$ ^[23]. Copyright 2013 American Chemical Society.

2.4. 表面增强拉曼 (SERS) 光谱超分辨成像及其在催化领域的潜在应用

在 SERS 的检测中，拉曼散射的强度往往可以被增强 $10^5 \sim 10^8$ ，因此该方法具有非常高的灵敏度，甚至可以检测到单个分子的 SERS 信号。然而，SERS 效应往往发生在纳米粒子周围的一个很小区域，普通的显微技术很难观察到这个区域的确切位置。超分辨成像技术的出现为解析纳米粒子周围具有 SERS 信号的热点区域提供了有效的方法。美国的 Willets 小组采用超分辨成像技术系统研究了 rhodamine 6G 在银纳米聚集体附近的单分子 SERS^[24-26]，探讨了纳米粒子的尺寸、形状、位置对 SERS 信号的影响，在他们的研究中，SERS 信号的定位精度可以

达到 5 nm，如图 8A-B 所示^[25]。从图中可以清楚地看到，当把 SERS 信号的位置和强度信息叠加到纳米聚集体的 SEM 图像上的时候，可以很容易的发现 SERS 信号增强最大的区域。这些工作有助于从纳米层次了解 SERS 的增强原理，对相关的应用也有很大的帮助。如果这些增强的位置发生了催化反应，而且参与催化反应的分子具有 SERS 信号，那么就可以通过 SERS 超分辨成像技术对其进行分析，得到很多催化方面的信息。SERS 的优点非常突出，比如很多具有 SERS 信号的分子并不具有荧光，可以突破必须要荧光分子参与催化反应的限制，从而拓展单分子测试的反应种类，做一些与实际应用有关的反应。因此，SERS 超分辨成像技术在催化研究方面有着独特的优势，具有较大的发展潜力。

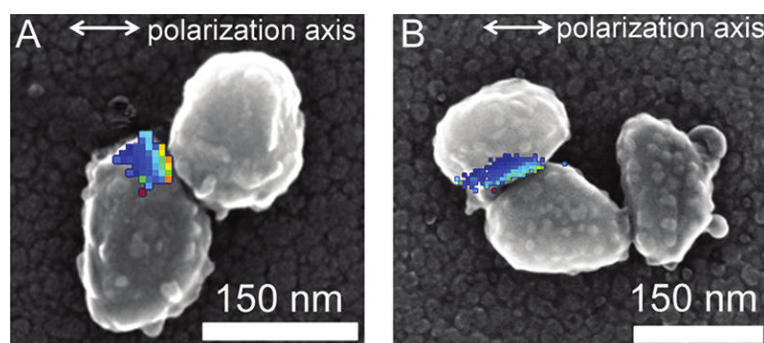


图 8 SERS 信号强度的空间分布图及其相应的 SEM 图像。(A) 单个节点；(B) 两个节点的纳米结构^[25]。Copyright 2011 American Chemical Society.

Fig. 8. SERS spatial intensity map and corresponding SEM image for a (A) single-junction and (B) two-junction nanostructure^[25]. Copyright 2011 American Chemical Society.

3 总结和展望

由于超分辨技术具有设备较简易、操作简单、分辨率高（几至几十纳米）的优点，是一种研究纳米催化剂的催化反应的有效手段，正越来越受到催化界的重视。目前已经在金属纳米粒子的催化、分子筛催化、光催化等领域得到应用，从现有的研究结果来看，光学超分辨成像技术已经在这些研究方面展现出优越的特性。该方法不仅可以得到催化活性在这些催化剂上的纳米级分布这类宝贵信息，而且由于该方法具有较高的时间分辨率（毫秒级），还可以得到与时间相关的催化反应信息，如反应动力学、扩散动力学等。另外，由于该技术还可以同时并行的扫描大量粒子的催化活性，所以该方法在催化剂的筛选方面有着巨大的应用前景。

然而，光学超分辨成像技术由于自身的不足，仍然需要进一步的发展。首先，该技术目前

主要基于荧光单分子技术，而荧光分子是成千上万分子中的很小部分，限制了催化反应的研究体系，使得很多与实际应用有关的催化反应并不能采用这种方法进行直接的研究。因此，需要进一步开发新的光学超分辨成像体系，比如文中讨论的单分子 SERS 技术。第二，荧光信号比较容易受到各种因素的影响，比如淬灭剂^[27-29]、荧光分子自身的浓度^[30-31]、光漂白^[32]、纳米粒子的作用^[33-35]等，目前的实验很少对这些未检测到的分子进行研究和讨论。第三，荧光单分子技术只能表征催化过程方面的信息，对催化剂自身的结构和组成方面的表征严重不足，因此需要跟其他的技术相结合，如 SEM、TEM、XPS 等。因此，光学超分辨成像技术还是一个处于快速发展阶段的新兴技术，虽然已经表现出了较强的优越性和生命力，但是还有许多的不足之处，有着巨大的发展空间。

4 作者简介

周小春，男，2008 年博士毕业于中科院长春应用化学研究所，毕业后来美国康乃尔大学（Cornell University）进行博士后研究，2013 年 3 月起任苏州纳米技术与纳米仿生研究所研究员。2004 年获得吉林省科技进步奖，2008 年获得洪堡奖学金，2012 年入选中央组织部“青年千人计划”。长期从事单分子单纳米粒子催化和燃料电池相关的研究。采用超高分辨成像技术研究了单个纳米粒子的活性位分布的规律，建立了并行的、大批量的筛选纳米催化剂的新方法，还研究了纳米催化剂内部催化信号的通信问题。在燃料电池相关的研究方面，发现了一种高效的，“绿色的”甲酸电氧化促进剂，还研制出一类高活性，高稳定性，抗中毒的甲酸低温分解制取高品质氢气的催化剂。相关研究成果发表在 *Nature Nanotechnology*, *JACS*, *Nano Letters*, *Chem. Commun.* 等国际顶级杂志上。

参考文献

1. Pohl D W, Denk W, Lanz M. *Appl. Phys. Lett.*, **1984**, **44** (7):651-653.
2. Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, **21** (11):1369-1377.
3. Hell S W. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, **21** (11):1347-1355.
4. Gustafsson M G L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, **102** (37):13081-13086.
5. Yildiz A, Forkey J N, McKinney S A, et al. *Science*, **2003**, **300** (5628):2061-2065.
6. Yildiz A, Selvin P R. *Acc. Chem. Res.*, **2005**, **38** (7):574-582.
7. Hell S W, Jakobs S, Kastrup L. *Appl. Phys. A-Mater.*, **2003**, **77** (7):859-860.
8. Qu X H, Wu D, Mets L, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, **101** (31):11298-11303.
9. Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. *Science*, **2006**, **313** (5793):1642-1645.
10. Rust M J, Bates M, Zhuang X. *Nat. Methods*, **2006**, **3** (10):793-795.

11. Chen P, Zhou X, Shen H, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, **39** (12):4560-4570.
12. Zhou X, Andoy N M, Liu G, et al. *Nat Nano*, **2012**, **7** (4):237-241.
13. Andoy N M, Zhou X, Choudhary E, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, **135** (5):1845-1852.
14. Zhou X, Choudhary E, Andoy N M, et al. *ACS Catal.*, **2013**, **3** (7):1448-1453.
15. Kirstein J, Platschek B, Jung C, et al. *Nat Mater*, **2007**, **6** (4):303-310.
16. Zurner A, Kirstein J, Dobliger M, et al. *Nature*, **2007**, **450** (7170):705-708.
17. Roeffaers M B J, De Cremer G, Libeert J, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, **48** (49):9285-9289.
18. De Cremer G, Roeffaers M B J, Bartholomeeusen E, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, **49** (5):908-911.
19. Tachikawa T, Wang N, Yamashita S, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, **49** (46):8593-8597.
20. Tachikawa T, Yamashita S, Majima T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, **133** (18):7197-7204.
21. Wang N, Tachikawa T, Majima T. *Chem. Sci.*, **2011**, **2** (5):891-900.
22. Tachikawa T, Yonezawa T, Majima T. *ACS Nano*, **2012**, **7** (1):263-275.
23. Tachikawa T, Ohsaka T, Bian Z, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, **117** (21):11219-11228.
24. Willets K A, Stranahan S M, Weber M L. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2012**, **3** (10):1286-1294.
25. Weber M L, Willets K A. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2011**, **2** (14):1766-1770.
26. Titus E J, Willets K A. *ACS Nano*, **2013**, **7** (9):8284-8294.
27. Andrews D L. *Chem. Phys.*, **1989**, **135** (2):195-201.
28. Roy R, Hohng S, Ha T. *Nat Meth*, **2008**, **5** (6):507-516.
29. Ha T. *Methods*, **2001**, **25** (1):78-86.
30. Chaudhuri K D. *ZPhy*, **1959**, **154** (1):34-42.
31. Barzykin A V, Razumov V F, Alfimov M V. *J. Phys. Chem.*, **1991**, **95** (12):4814-4818.
32. Soumpasis D M. *Biophys. J.*, **1983**, **41** (1):95-97.
33. Chen J, Jin Y, Fahrudin N, et al. *Langmuir*, **2013**, **29** (5):1584-1591.
34. Kühn S, Håkanson U, Rogobete L, et al. *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, **97** (1):017402.
35. Mayilo S, Kloster M A, Wunderlich M, et al. *Nano Lett.*, **2009**, **9** (12):4558-4563.