КОМБИНАЦИЯ КОНФОКАЛЬНОЙ РАМАНОВСКОЙ И РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

RISE MICROSCOPY: CORRELATIVE RAMAN-SEM IMAGING

О.Холлрихтер*, У.Шмидт*, С.Бройнингер* / sonja.breuninger@witec.de
O.Hollricher*, U.Schmidt*, S.Breuninger*

Хорошо отработанный и широко используемый способ исследования поверхности в нанометровом диапазоне – растровая электронная микроскопия (РЭМ). Однако аналитические возможности РЭМ ограничены изучением структуры поверхности образцов. Для их расширения РЭМ комбинируется с другими измерительными методами, что позволяет получить больше информации об исследуемом объекте. Например, РЭМ может дополняться энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС), которая позволяет выполнять элементный анализ материала образца. Также все более широкое применение в исследованиях находит комбинация РЭМ и рамановской спектроскопии (РС). Последняя дает возможность изучать молекулярную структуру вещества.

Scanning Electron Microscopy (SEM) is a well-established and common method for the analysis of sample surfaces in the nanometer range. However, the analyzing capabilities of SEM are limited to the surface structure. To overcome these limits, SEM is often combined with other analyzing techniques that are suitable for the detection of additional sample characteristics. An example of such an SEM attachment is EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy), which provides information about the elemental composition of a sample. Although not as frequently used as the well-established EDX-SEM combination, Raman-SEM is becoming increasingly popular for comprehensive sample analysis. Raman spectroscopy can detect the molecular composition.

Обычное сочетание РС и РЭМ позволяет получать по одному рамановскому спектру для каждого положения образца без создания конфокальных рамановских изображений. Новая корреляционная технология RISE (Raman imaging and scanning electron – получение рамановских изображений и сканирование электронным пучком) впервые позволила сочетать в одном приборе (рис.1) РЭМ и конфокальную рамановскую микроскопию (КРМ). Ниже рассмотрены основные особенности новой комбинированной технологии и примеры ее практического применения.

ТЕХНОЛОГИИ И ОБОРУДОВАНИЕ

РЭМ характеризуется высоким разрешением, позволяя исследовать топографию и морфологию материалов. Для получения изображения поверхность образца сканируется сфокусированным

высокоэнергетическим пучком электронов с фиксацией датчиком отраженных и вторичных электронов. Вторичные электроны дают информацию о морфологии и топографии образца, обратноотраженные электроны – об однородности структуры. Разрешение РЭМ составляет около 1 нм [1].

КРМ базируется на спектроскопическом анализе молекулярной структуры образца. РС может применяться для исследования твердых, жидких и газообразных объектов. Эффект комбинационного рассеяния проявляется при взаимодействии света с химическими связями в материале. Колебания в химических связях вызывают изменение частоты энергии отраженного излучения, которое определяется специфическим для каждого химического вещества рамановским спектром. Комбинационное рассеяние, как правило, имеет низкую интенсивность, поэтому для

* WITec GmbH (Германия)

получения рамановского спектра требуются высокочувствительные приборы. Помимо идентификации химических компонентов образца, РС позволяет измерять их количество, определять характеристики напряженно-деформированного состояния и кристалличности. В частности, по пиковой интенсивности комбинационного рассеяния можно оценивать относительное количество конкретного химического соединения, сдвиг пика указывает на напряженно-деформированное состояние, а ширина пика свидетельствует о степени кристалличности или аморфности вещества [2, 3, 4].

КРМ объединяет РС с конфокальной оптической микроскопией. В режиме КРМ образец сканируется последовательно, точка за точкой и линия за линией, причем датчик получает информацию только из фокальной плоскости оптической системы. Благодаря этому для каждой сканированной точки собирается спектроскопическая информация о химических компонентах. Конфокальные рамановские микроскопы обеспечивают пространственное разрешение, ограниченное только дифракционным пределом световых волн, и характеризуются хорошим разрешением по глубине, что позволяет

Until now Raman-SEM microscopes enabled the acquisition of single Raman spectra at defined sample positions but did not facilitate the generation of confocal Raman images. By contrast the newly developed correlative RISE (Raman imaging and scanning electron) microscope enables for the first time the acquisition of SEM and confocal Raman images within a single instrument (fig.1). This article gives an overview of this new correlative imaging technique and provides two example applications.

MATERIALS AND METHODS

SEM is a high-resolution surface imaging technique that can determine a sample's topography and morphology. In order to generate an image, a focused beam of high-energy electrons scans the sample. Through electron-sample interactions, backscattered and secondary electrons emerge and are detected. These electron signals are commonly used for imaging samples regarding their morphology and topography (secondary electrons) and their contrasts in composition (backscattered electrons). The lateral resolution can be down to about 1 nm [1].

Confocal Raman imaging is a spectroscopic technique for the

analysis of molecular compounds within a sample. Raman spectroscopy can be used to study solid, liquid, and gaseous samples. The Raman effect is exhibited when light interacts with the chemical bonds in a sample. Vibrations in the chemical bonds cause a specific energy shift in the back-scattered light. Those frequency shifts produce a material-specific Raman spectrum. Raman scattering is typically very weak, therefore optimized instrument components for maximum light transmission are essential to obtain high-quality Raman spectra. Besides the chemical components, Raman spectroscopy can measure additional sample characteristics such as the relative amount of a specific component, stress and strain states, or crystallinity. The Raman peak intensity provides information about the relative amount of a specific compound, a peak shift indicates stress and strain states, and the peak width indicates the degree of crystallinity and allows the microscopist to distinguish between crystalline and amorphous materials [2, 3, 4].

The confocal Raman imaging technique combines Raman spectroscopy with a confocal microscope. In confocal Raman imaging mode the sample is scanned

point-by-point and line-by-line, and only information from the focal plane reaches the detector. In this way information about the spatial distribution of the chemical components within the sample is gathered and imaged. High-resolution confocal Raman microscopes acquire the information of a complete Raman spectrum at every image pixel and achieve a lateral resolution at the diffraction limit of the light employed. A confocal Raman microscope setup is further characterized by a good depth resolution, which facilitates 3D Raman images and depth profiles [5].

Correlative Raman-SEM imaging (RISE microscopy, WITec, Ulm, Germany and Tescan Orsay Holding, Brno, Czech Republic) combines an SEM and a confocal Raman microscope. The confocal Raman microscope is integrated into the vacuum chamber of the electron microscope. Non-destructive Raman and SEM measurements are consecutively performed at two different positions inside this chamber using an automatic transfer stage. Calibration of the sample position ensures scanning of the same sample area in both SEM and Raman modes. In Raman imaging mode a $100\times/\text{NA}=0.75$

Рис.1. В новом RISE-микроскопе совмещены растровый электронный микроскоп и конфокальный рамановский микроскоп (фото компании Tescan)

Fig.1. The newly developed RISE microscope integrates a SEM and a confocal Raman imaging microscope within a single instrument (image courtesy of Tescan)

получать трехмерные изображения и глубинные профили [5].

Корреляционная технология RISE, объединяющая КРМ и РЭМ, разработана немецкой компанией WITec и чешским холдингом Tescan Orsay. В приборах, реализующих эту технологию, конфокальный рамановский микроскоп интегрирован в вакуумную камеру электронного микроскопа. Измерения выполняются последовательно в двух различных позициях с автоматическим перемещением образца. Калибровка его позиции позволяет сканировать одну и ту же область в обоих режимах. В режиме КРМ используется объектив 100×/0.75 фирмы Zeiss. Специальное программное обеспечение RISE служит для управления настройкой прибора и обработки результатов, включая корреляционный анализ и наложение изображений КРМ и РЭМ.

ПОДГОТОВКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Первый исследуемый объект – графеновая пленка, нанесенная на кремниевую пластину методом химического осаждения из паровой фазы, – был установлен в камеру прибора для измерения в режиме высокого вакуума без дополнительной пробоподготовки (в частности, без нанесения дополнительного проводящего углеродного или золотого покрытия). Графеновая пленка состояла из нескольких слоев, каждый толщиной в один атом. Для исследования настолько тонких покрытий целесообразно использовать режим вторичных электронов, так как они характеризуются

Zeiss objective is employed. With this objective the sample area is scanned during Raman image acquisition. Instrument control is carried out through the RISE software interface. Image post-processing as well as the correlation and overlay of SEM and Raman images are performed with the same software.

SAMPLE PREPARATION

A CVD (chemical vapor deposition) graphene film on a silicon wafer was mounted on a SEM stub and inserted in the SEM chamber for further examination in high-vacuum mode without

any further preparation (no conductive carbon or gold coating was applied). Multi-layer graphene films have a thickness of only a few atomic layers of carbon. Such thin films can be imaged best in secondary electron SEM mode because secondary electrons have a low penetration depth resulting in a stronger detectable image contrast.

In a second sample, polymer solutions were prepared from poly-methyl metacrylate (PMMA) and poly-styrene (PS) by dissolving 10 mg of the polymer in 1 ml toluene. Blends were prepared by mixing 2 ml of the PMMA toluene

solution and 1 ml of PS toluene solution. A droplet of the solution was placed on a clean glass cover slide and dried in ambient conditions. A blend film with a thickness of several hundred nm is formed on the glass substrate after the evaporation of the solvent. The glass substrate with the blend film was mounted on a SEM stub and inserted in the SEM chamber without any further sample preparation or coating. To allow uncoated specimens for Raman analysis it is beneficial to measure the samples in low voltage SEM mode or gas atmosphere such as nitrogen. This is

Рис.2. Исследование методом RISE графеновой пленки в высоком вакууме: а – дефекты графеновой структуры на РЭМ-изображении; б – основные спектры комбинационного рассеяния различаются шириной и высотой пиков; на КРМ-изображении синим обозначены области однослойного графена, зеленым и красным – многослойного графена, желтым – кремниевая основа
Fig.2. RISE microscopy of a graphene film in high vacuum: а – SEM image of the graphene film revealing defects in the surface structure; б – main Raman spectra identified by differences in the peak width and intensity; с – Corresponding color-coded, confocal Raman image. Blue indicates a single layer, green and red areas are multi-layer, the silicon substrate is shown in yellow

малой глубиной проникания, что обеспечивает лучший контраст изображения.

Второй исследуемый объект – раствор полимеров – был получен из полиметилметакрилата (ПММА) и полистирола (ПС), растворенных в толуоле (10 мг полимера в 1 мл толуола). При приготовлении образца 2 мл раствора ПММА было смешано с 1 мл раствора ПС. Капля раствора была помещена на стекло и высушена при комнатной температуре. После испарения растворителя на поверхности стекла образовалась полимерная

пленка толщиной в несколько сотен нанометров, и образец был помещен в вакуумную камеру прибора. Исследовать такой образец без нанесения специальных покрытий целесообразно при низком ускоряющем напряжении и в специальной атмосфере, например в азоте. Это еще одно отличие комбинации РЭМ-КРМ от РЭМ-ЭДС, так как для эмиссии рентгеновского излучения требуются высокие ускоряющие напряжения. РЭМ-исследование выполняется в режиме вторичных электронов, которые рассеиваются преимущественно упруго,

another difference to EDX analysis that needs relatively high voltage to excite the X-rays. The SEM analysis was performed by detecting the backscattered electrons. Backscattered electrons are largely elastically scattered, and heavier atoms deflect more electrons producing a stronger signal.

INVESTIGATION OF A GRAPHENE FILM

Graphene films are stable, thermally and electrically conductive molecules. These characteristics account for the great interest in graphene for many applications in electronics, photovoltaics, and

the development of new materials. An area of $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ was first imaged in SEM mode. The graphene surface was analyzed, and defects such as wrinkles and stratifications were detected (fig.2a). Further characterization of the film defects by EDX would not be beneficial because the detectable carbon X-ray signal from such thin films is not sufficient. The graphene film was analyzed instead in Raman imaging mode. A hyperspectral data set was generated containing the information of thousands of Raman spectra. The main spectral components of the data set

were identified by the RISE software. The resulting Raman spectra provide information for a more detailed characterization of the graphene film: differences in the peak width and peak intensity can be observed among the spectra. Those spectral differences arise from the defects in the graphene film. On the basis of the differences in the D'-peak intensities of fig.2b, several graphene layers can be distinguished from each other. In the corresponding color-coded Raman image, these layers are represented by different colors revealing areas with single-layered

Рис.3. Исследование методом RISE смеси ПММА и ПС: а – на РЭМ-изображении видны различия топографии поверхности; б – спектры комбинационного рассеяния ПС (зеленый) и ПММА (красный); в – КРМ-изображение наглядно показывает распределение полимеров в смеси; д – совмещение РЭМ- и КРМ-изображений демонстрирует связь между структурой и химическим составом поверхности

Fig.3. RISE microscopy of a PMMA-PS polymer blend: a – the SEM image of the polymer blend shows different surface topography within the sample; b – Raman spectra for PS (green spectrum) and PMMA (red spectrum); c – the color-coded confocal Raman image reveals the distribution of the two polymers within the blend; d – Raman-SEM image overlay demonstrating the correlation between surface structure and the appearance of the two different polymers

graphene (shown in blue) and areas with multi-layered graphene (shown in green and red). The silicon substrate is shown in yellow. The Raman image consists of 90×90 pixels yielding 8,100 Raman spectra, and the total acquisition time of the complete Raman image was less than 7 minutes. By overlaying the SEM and Raman images, information from both imaging techniques can be correlated (fig.2c).

ANALYSIS OF A PMMA-PS-POLYMER BLEND

For the investigation of the polymer blend, some measurement

parameters were adjusted to the sample's requirements. For the SEM analysis a small working distance to the sample (~8 mm), a pressure of nitrogen of 20 Pa, and an accelerating voltage of 10 kV were chosen. The SEM image reveals two separate areas distinguished by their topographical differences: parts of the blend had a smooth surface, whereas other parts exhibited a fine two-phase structure (fig.3a). However, from the SEM image alone it was not possible to make a clear statement about the identity of the blend components. An EDX analysis would

причем тяжелые атомы отклоняют больше электронов, что обеспечивает более сильный сигнал.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГРАФЕНОВОЙ ПЛЕНКИ

Графеновые пленки состоят из стабильных молекул с высокой тепло- и электропроводностью. Эти свойства графена обуславливают высокий интерес к его использованию в электронике, фотовольтаике и разработке новых материалов.

РЭМ-исследование участка размером 12×12 мкм выявило дефекты графеновой структуры, в частности, морщины и наслоения (рис.2а). Дальнейшее исследование дефектов проводилось методом КРМ, так как применение ЭДС нецелесообразно из-за малой толщины пленки, не обеспечивающей эмиссию рентгеновского излучения достаточной силы. Гиперспектральные данные, содержащие информацию о тысячах спектров комбинационного рассеяния, были проанализированы с помощью ПО RISE, которое выявило основные спектральные компоненты. Полученные спектры комбинационного рассеяния предоставили дополнительную информацию об исследуемой графеновой пленке, в частности, различия в ширине и высоте пиков спектров характеризовали дефекты структуры. Например, разная высота пика D' на рис.2б свидетельствует о различии свойств нескольких графеновых слоев. Изображение размером 90×90 точек (8,1 тыс. спектров комбинационного рассеяния) было получено менее чем за 7 мин. На рис.2с представлен

not distinguish the different phases because the same elements are present in each phase. However, when analyzed in confocal Raman imaging mode, the two polymers can be identified by their specific Raman "fingerprint". Thus two distinct spectra identify PMMA and PS (shown in red and green in fig.3b, respectively). The hyperspectral Raman image with the same color-coding reveals the distribution of the two components within the sample (fig.3c). In some parts of the Raman image a mixture of the colors of the two polymers is apparent,

результат объединения полученной информации путем совмещения РЭМ- и КРМ-изображений.

ИССЛЕДОВАНИЕ СМЕСИ ПММА И ПС

Исследование смеси полимеров методом РЭМ проводилось при рабочем расстоянии около 8 мм, давлении азота 20 Па и ускоряющем напряжении 10 кВ. На полученном изображении отчетливо различимы два типа областей: с гладкой поверхностью и двухфазной структурой (рис.3а), однако РЭМ не позволяет идентифицировать компоненты этих областей. Возможностей ЭДС также недостаточно, так как этот метод не различает фазы химических соединений. КРМ позволила определить химический состав элементов структуры образца по их спектрам (рис.3б). КРМ-изображение, показывающее распределение полимеров по площади образца, представлено на рис.3с. Хотя известно, что данные полимеры не смешиваются, на некоторых участках цвета накладываются друг на друга, что можно объяснить слишком малым для КРМ размером элементов. Экспериментальные данные свидетельствуют, что латеральное разрешение конфокального рамановского микроскопа составляет около 360 нм, а разрешение по глубине – около 1,5 мкм. Как следствие, области, содержащие частицы меньших размеров, чем может распознать микроскоп, имеют на изображении смешанный цвет.

Размер исследованного участка образца составляет 50×50 мкм. Рамановское изображение содержит 300×300 точек (90 тыс. спектров комбинационного рассеяния), каждая из которых измерялась за 50 мс.

Совмещение РЭМ- и КРМ-изображений (рис.3д) позволяет связать информацию о топологии исследуемой смеси полимеров и ее химическом составе.

ВЫВОДЫ

Технология RISE, объединяющая КРМ и РЭМ, – новый метод комплексного исследования структурных и химических характеристик материалов. Сопоставление информации, полученной с использованием двух проверенных практикой технологий измерения, открывает перед исследователями новые возможности. Рассмотренные примеры исследования образцов графена и смеси полимеров подтвердили, что RISE-микроскопия удачно дополняет другие корреляционные методики. RISE-микроскопия может эффективно использоваться в материаловедении, нанотехнологиях, геологии, биологии, фармацевтике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goldstein J. et al., Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. – Third Edition, Springer, New York, 2003.
2. Balss K. et al., J Biomed Mater Res A 85. – 2008, 258–70.
3. Wermelinger T. et al. Acta Materialia 55. – 2007, 4657–65.
4. Schmidt U. et al. Vibrational Spectroscopy 42. – 2006, 93–97.
5. Dieing T. et al. (eds.) Confocal Raman Microscopy, Springer Series in Optical Sciences. – Springer, Berlin Heidelberg, 2010.

although it is known that the polymers do not mingle. A reason for this could be that those areas contain relatively small polymer phases, which cannot be spatially resolved by the Raman imaging system. The confocal Raman microscope as part of the RISE microscope provides an experimentally proven lateral resolution around 360 nm and a depth resolution around 1.5 μm . As a consequence, the colors of the areas that contain particles much smaller than the spatial resolution appear mingled in the Raman image. The Raman image shows an area

of $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ and consists of 300×300 pixels resulting in 90,000 Raman spectra. The integration time was 50 ms per spectrum. The overlay of the SEM and the Raman images links the structural characteristics of the polymer blend with the appearance of PMMA and PS (fig.3d).

CONCLUSION

This article describes the RISE microscopy technique, a new imaging method for comprehensive analyses of structural and chemical sample characteristics. Though well-established as stand-alone techniques,

combined Raman-SEM analysis provides a novel capability by correlating the information from both measurements. Two example applications of RISE microscopy were demonstrated: graphene layers and a two-phase polymer. RISE microscopy provides new sample information and complements other well-established correlative SEM imaging techniques. Thus RISE microscopy is suited to applications in surface science, materials science, nanotechnology, polymer science, geo science, life science, and pharmaceutical research. ■