



# ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ И 3D СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ HARDWARE COMBINATION OF CONFOCAL MICROSPECTROSCOPY AND 3D SCANNING PROBE NANO-TOMOGRAPHY

УДК 543.07, ВАК 05.11.13

К.Мочалов<sup>1,2</sup>, А.Чистяков<sup>1,2</sup>, Д.Соловьева<sup>1,2</sup>, А.Мезин<sup>1</sup>, В.Олейников<sup>1,2</sup>, И.Набиев<sup>2,3</sup>, И. Агапов<sup>4</sup>, А.Ефимов<sup>4,5</sup> /  
mochalov@mail.ru

K.Mochalov<sup>1,2</sup>, A.Chistyakov<sup>1,2</sup>, D.Solovyeva<sup>1,2</sup>, A.Mezin<sup>1</sup>, V.Oleinikov<sup>1,2</sup>, I.Nabiev<sup>2,3</sup>, I.Agapov<sup>4</sup>, A.Efimov<sup>4,5</sup>

Разработан инструментальный подход к объединению конфокальной микроспектроскопии и 3D сканирующей зондовой нанотомографии в одном устройстве. Такой подход сохраняет все преимущества сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) и оптической микроспектроскопии, позволяя получать многопараметрическую 3D-характеристику с использованием обоих методов. С помощью разработанной системы выполнено коррелятивное исследование 3D-морфологии и флуоресцентных характеристик гибридных фотонных структур с управляемыми флуоресцентными свойствами на основе полимерной сети, легированной полупроводниковыми квантовыми точками. Результаты этой работы могут быть использованы для эффективного преобразования 2D в 3D для большинства методов оптической зондовой наноскопии с высоким разрешением (СБОМ, TERS, АСМ-ИК и др.). Такое преобразование приведет к появлению уникальных методов, способных объединить преимущества СЗМ (наномасштабное измерение морфологии и широкого спектра физических параметров) и оптической микроспектроскопии с пространственным разрешением СЗМ (наномасштабное химическое картирование и определение оптических свойств) при реализации 3D-измерений.

Instrumental approach to combination of confocal microspectroscopy and the 3D scanning probe nano-tomography in a single device is developed. This approach retains all the advantages of scanning probe microscopy (SPM) and optical microspectroscopy, allowing to obtain multi-parametric 3D characteristic using both methods. Using the developed system a correlation study of 3D morphology and fluorescence of hybrid photonic structures with controlled fluorescent properties based on polymer networks, alloyed by semiconductor quantum dots is executed. The results of this project can be used for effective 2D to 3D conversion for most of the methods of optical probe high resolution nanoscopy (SNOM, TERS, AFM-IR etc.). Such a transformation will lead to the development of unique methods that can combine the advantages of SPM (nano-scale measurement of the morphology and a wide range of physical parameters) and optical microspectroscopy with a spatial resolution of SPM (nano-scale chemical mapping and determining the optical properties) in 3D measurements.

**Т**рехмерный наномасштабный корреляционный анализ оптических, спектральных и морфологических свойств объектов эффективен при

исследовании внутренней структуры и элементного анализа различных наноконструкций, полупроводниковых наноматериалов и устройств на их основе,

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН / Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS.

<sup>2</sup> Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ" / National Research Nuclear University MEPhI.

<sup>3</sup> Университет города Реймс / University of Reims Champagne-Ardenne.

<sup>4</sup> Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И.Шумакова Минздрава России / Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of Ministry of Health of the Russian Federation.

<sup>5</sup> ООО "СНОТРА" / SNOTRA.



а также широкого круга биологических материалов. Суть корреляционной микроскопии – совместное применение различного типа микро- и спектроскопий, дающих качественно различную и взаимодополняющую информацию на одном и том же участке исследуемого образца. Данный подход открывает возможность наномасштабного определения объемной морфологии, физических параметров и химического состава, а также взаимной корреляции получаемых характеристик образца [1-3].

Круг задач, решаемых с помощью корреляционной микроскопии, весьма широк. В качестве примера целесообразно привести два наиболее популярных направления: исследования в области наук о материалах, направленные на характеризацию и контроль качества наногибридных композитов [4], и биологические исследования, например, для определения объемного распределения флуоресцентных маркеров в живых тканях с измерением наномасштабной топографии исследуемых объектов [1].

Корреляционная микроскопия является комплексным объединением различных методов микроскопии и/или спектроскопии, дающих качественно различную информацию об исследуемом объекте. При этом чаще всего используется объединение электронной микроскопии (ЭМ) и оптической микроспектроскопии (ОМ), а также различных подходов для получения 3D-информации этими методами [1, 2, 5, 6]. Однако, низкий контраст на биологических и полимерных образцах, повреждения образцов электронным пучком и необходимость использовать двумерные проекции ограничивают возможности

ЭМ и ее применимость для анализа ряда биологических объектов и мягких материалов [7-9]. Во многих случаях предпочтительным оказывается использование сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), поскольку она имеет неразрушающий характер и является в первую очередь методом характеристики поверхности. СЗМ дает информацию о расположении, архитектуре и различных свойствах (механических, электрических, магнитных) наноструктур непосредственно с поверхности образца, что делает этот метод чрезвычайно полезным для исследования ультраструктуры самых различных объектов [10]. Объединение зондовой и оптической микроскопии широко применяется в настоящее время для различных биологических приложений [3, 11], однако главным недостатком данного коррелятивного метода остается невозможность исследования наномасштабных трехмерных структур.

Значительным прорывом в области 3D-анализа с использованием СЗМ было создание уникальной аппаратной комбинации [12-14], объединяющей технику СЗМ и ультрамикротомии (УМТ), что позволило многократно выполнять сверхтонкие (до 20 нм) срезы с поверхности образца с последующим получением СЗМ-изображений, восстанавливая, таким образом, 3D-морфологию образца (подход "срез и вид"). Данная методика, названная сканирующей зондовой нанотомографией (СЗНТ), может быть использована для исследования 3D-распределения таких физических параметров, как модуль упругости, вязкость, магнитные свойства и электропроводность [13], при комнатной температуре или в криокамере микротомы [14].

**T**hree-dimensional nanoscale correlation analysis of the optical, spectral and morphological properties is effective in the study of the internal structure and elemental analysis of various nanocomposites, semiconductor nanomaterials and devices based on them, as well as of a wide range of biological materials. The essence of correlative microscopy is combined use of various types of micro- and spectroscopy, giving qualitatively different and complementary information on the same area of the test specimen. This approach opens the possibility of nanoscale

determination of the volumetric morphology, physical parameters and chemical composition, as well as of the mutual correlations of the obtained characteristics of the sample [1-3].

The range of tasks of correlation microscopy is very broad. As an example, it is reasonable to note two most popular areas: research in the field of materials science aimed at the characterization and quality control of nano-hybrid composites [4], and biological studies, e.g. to determine the spatial distribution of fluorescent markers in living tissue with measurement of

nanoscale topography of investigated objects [1].

Correlative microscopy is a complementary combination of different methods of microscopy and/or spectroscopy, which gives qualitatively different information about the object. Combination of electron microscopy (EM) and optical microspectroscopy (OM), as well as different approaches to obtain 3D information by these methods is most often used [1, 2, 5, 6]. However, low contrast of biological and polymer samples, damage of samples by the electron beam and the need to



В отличие от электронной томографии, эта технология не имеет принципиальных ограничений по толщине анализируемого объекта.

Тем не менее, СЗНТ обладает существенным недостатком – отсутствием возможности наномасштабного анализа химического состава исследуемых наноструктур. Ранее авторами была предпринята попытка создания экспериментальной процедуры, предусматривающей попеременное использование установок СЗНТ и СЗМ/ОМ с согласованием полей зрения приборов через получение референсного СЗМ-изображения [15]. Недостатком указанной методики является отсутствие единой экспериментальной установки, позволяющей одновременно получать СЗМ- и ОМ-данные с последующим микротомированием образца и прецизионным приведением его в исходное положение, не вынимая из прибора. Создание такой установки требует существенной переработки всей разработанной ранее системы СЗНТ и создания специализированного конфокального блока.

### СЗНТ/ОМ-УСТРОЙСТВО

В данной работе мы представляем объединенную систему СЗНТ/ОМ. Основой системы СЗНТ является ультрамикротом Reichert-Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Австрия), адаптированный под использование специально разработанной СЗМ-головы. Подобной адаптации может быть подвергнут практически любой коммерчески доступный микротом. Для решения двух существенных проблем, препятствующих созданию комбинированной методики СЗНТ/ОМ – отсутствия оптического

доступа для высокоапертурных объективов и высокого уровня шума, – была разработана специализированная сканирующая СЗМ-система, изображенная на рис.1.

Данная система (рис.1, слева) состоит из сканирующего устройства и устройства подвода с дефлектором (СЗМ-голова). Сканирующее устройство состоит из плоско-параллельного быстродействующего XYZ-пьезопозиционера с диапазоном сканирования  $50 \times 50 \times 5$  мкм, снабженного оптическим сенсором для удержания и контроля перемещения в режиме линеаризации (close-loop). Пьезосканер позволяет использовать скорости сканирования до 5 Гц, так как имеет достаточно высокие резонансные частоты: 5 Гц по XY и 50 Гц по Z. Пьезопозиционер жестко закреплен на подвижной консоли УМТ и перемещается вместе с ней в процессе работы УМТ. В центре пьезосканера находится система жесткого крепления образца, не позволяющая ему смещаться в процессе среза УМТ. Подвижная консоль УМТ с образцом перемещается из верхней точки, где она фиксируется для проведения СЗМ/ОМ-измерений, в нижнюю точку, срезая образец алмазным ножом Ultra AFM 35 (Diatome, Швейцария). Таким образом, Z-координата XY-плоскости образца, являющейся как фокальной плоскостью ОМ-объектива, так и плоскостью СЗМ-сканирования, после среза полностью определяется положением ножа УМТ, что обуславливает необходимость разработки специализированного держателя для регулирования XY-плоскости образца. Ось Z в данной системе соосна подвижной консоли УМТ и в верхней точке совпадает с осью оптического тракта.

use two-dimensional projections limit the ability of EM and its applicability for analysis of several biological objects and soft materials [7–9]. In many cases preferable is use of scanning probe microscopy (SPM) because it is non-destructive in nature, and is primarily a method of characterization of the surface. SPM provides information on the location, architecture and various properties (mechanical, electrical, magnetic) of nanostructures directly from the surface of the sample, which makes this method extremely useful for the study of the ultrastructure of a

wide variety of objects [10]. The combination of scanning probe and optical microscopy is widely used at present for various biological applications [3, 11], however, the main drawback of this correlation method is the inability to study nanoscale three-dimensional structures.

A major breakthrough in the field of 3D analysis using SPM was the creation of unique hardware combination [12–14] which integrates SPM and ultramicrotome (UMT) techniques that allowed to repeatedly perform ultrafine (down to 20 nm) slices of the sample surface with the

subsequent SPM study, restoring, thus, the 3D morphology of the sample (Slice and View). This novel scanning probe nanotomography (SPNT) can be used to study the 3D distribution of such physical parameters as elastic modulus, viscosity, magnetic properties and electrical conductivity [13], at room temperature or in cryochamber of microtome [14]. In contrast to electronic tomography, this technology has no restrictions on the thickness of the analyzed object.

However, SPNT has a significant drawback – the lack of opportunities for nanoscale analysis of

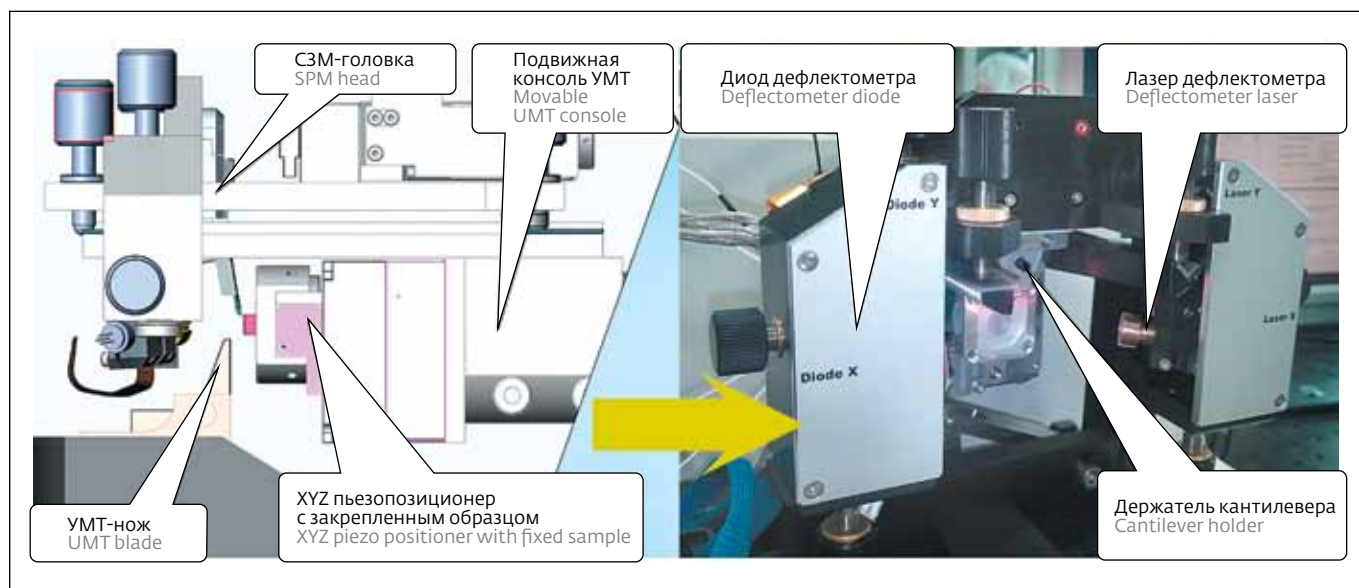


Рис.1. Схема разработанной СЗНТ-системы. Слева – схематический вид сбоку комбинированного устройства сканирования с подвижной консолью УМТ и ножом, а также СЗМ-головкой. Справа – фронтальное фото устройства УМТ/СЗМ  
 Fig.1. Scheme of designed SPNT system. At left is a schematic side view of combined scanning device with movable UMT console, blade and SPM head. On right is frontal photo of UMT/SPM device

СЗМ-голова (рис.1, справа) представляет собой съемный держатель СЗМ-зонда и дефлектометр, состоящий из полупроводникового лазера и четырехсекционного фотодиода, разнесенные таким образом, чтобы дать возможность приблизить и сфокусировать на образце объектив (50X Mitutoyo Plan Apo Infinity Corrected Long WD Objective, Mitutoyo, Япония) с рабочим расстоянием 13 мм. Таким образом, решается

первая из вышеуказанных проблем. С целью шумоподавления СЗМ-голова в момент СЗМ/ОМ-измерений закреплена непосредственно на подвижной консоли УМТ и находится в верхней "рабочей" точке. Для очередного УМТ-среза СЗМ-голова отводится, отсоединяется от консоли УМТ, оставаясь на опорах, а последняя, продолжая движение вниз, производит следующий срез образца. Такой подход обеспечивает

chemical composition of the studied nanostructures. Earlier, the authors have attempted to create an experimental procedure with, involving the alternate use of SPNT and SPM/OM devices with the coordination of the fields of view of the instruments through the reference SPM image [15]. The disadvantage of this method is the lack of a single experimental device, allowing to receive at the same time both SPM and OM data with the subsequent slicing of sample in microtome and precise moving to its original position, without removing it from the device. Such device requires

substantial redesign of all previously developed SPNT system and the creation of a specialized confocal unit.

#### SPNT/OM DEVICE

In this paper, we present an integrated SPNT/OM system. The base for SPNT system is the ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Austria), adapted to the use of a specially designed SPM head. Similar adaptation is possible for virtually any commercially available microtome. To address two significant problems that hinder the creation of a combined SPNT/

OM method, which are the lack of optical access for high-aperture lenses and high noise level, we have developed specialized SPM scanning system depicted in Fig.1.

This system (Fig.1, at the left) consists of a scanning device and a supply device with deflector (SPM head). The scanning device consists of a plane-parallel high-speed XYZ piezo positioner with a scan range of  $50 \times 50 \times 5 \mu\text{m}$ , which is equipped with an optical sensor to hold and control movement in the close-loop mode. The piezoscaner allows to use a scanning speed of up to 5 Hz, as it has a



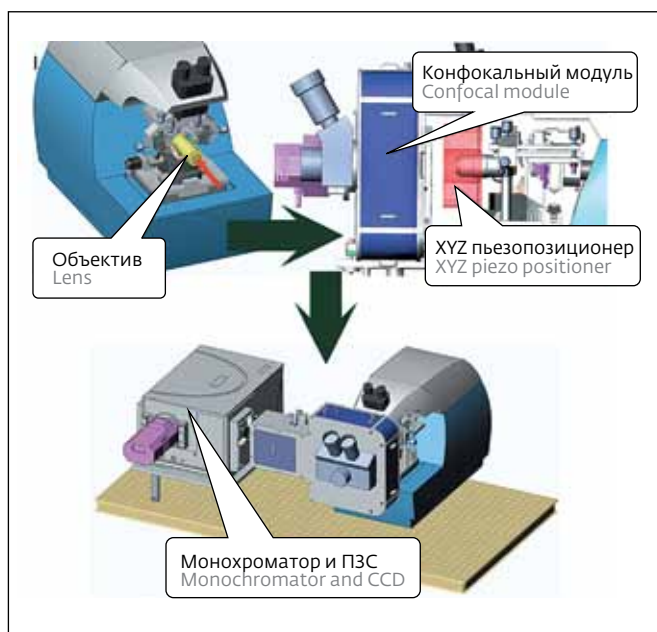


Рис.2. Схема СЗНТ/ОМ-системы. Слева – эскиз основной идеи системы СЗНТ/ОМ. Справа – схема комбинации конфокального устройства, объектива и СЗНТ. Внизу – общий схематический вид системы СЗНТ/ОМ

Fig.2. Scheme of SPNT/OM system. At left is sketch of basic idea of SPNT/OM system. On right is scheme of combination of confocal device, lens and SPNT. Below is overall schematic view of SPNT/OM system

значительное снижение веса механизма УМТ в процессе срезов и необходимую пространственную развязку между держателем кантилевера и ножом УМТ

в момент среза. Разработанная нами система позволяет осуществлять XY-позиционирование СЗМ-головы с точностью менее 1 мкм между циклами срезов УМТ.

Схема объединения модернизированной СЗНТ-установки и оптической части разработанного устройства приведена на рис.2. Объединение заключается в добавлении к описанной схеме высокоапертурного объектива (рис.2, левая панель). Для удовлетворения всех требований к позиционированию, объектив устанавливается на плоскопараллельный XYZ-пьезопозиционер с отверстием в центре и специально разработанным переходником для горизонтального крепления, чтобы центр масс объектива находился в районе верхней плоскости сканера. Использовался сканер с диапазоном сканирования  $100 \times 100 \times 50$  мкм, снабженный емкостными датчиками для удержания и контроля перемещения. Таким образом, мы получили возможность прецизионного (0,1 нм) позиционирования центра поля зрения объектива и положения острия зонда СЗМ на участке  $100 \times 100$  мкм. Диапазон Z-позиционирования объектива составляет 50 мкм с шагом 0,1 нм. Пьезопозиционер установлен на моторизированный 1D линейный ретранслятор 8MT177-100 (Standa, Литва) с диапазоном движения 100 мм и разрешением 1 мкм/шаг для возможности отводить его в автоматическом режиме и подводить обратно, не выходя из рабочей области прецизионной фокусировки объектива (50 мкм). Объектив совмещен с конфокальным модулем, входящим в состав флуоресцентной / рамановской / конфокальной системы (рис.2, справа). Как показано в нижней части рис.2, данная конфокальная часть объединена

high enough resonant frequencies: 5 Hz for XY and 50 Hz for Z. Piezo positioner is rigidly fixed on the movable console of UMT and moves with it during UMT. In the center of the piezoscanner is system for rigid mounting of the sample, which does not allow it to be displaced in the process of UMT slice. The movable UMT console with the sample is moved from the upper point where it is fixed for SPM/OM measurement, to the bottom, cutting the sample with a diamond blade Ultra AFM 35 (Diatome, Switzerland). Thus, the Z coordinate of the XY-plane of the sample, which is the focal

plane of the OM lens and the plane of the SPM scan, after the cut is completely determined by the position of the UMT blade, which necessitated development of a specialized holder to control the XY-plane of the sample. The Z-axis in this system is coaxial to movable UMT console, and coincides in upper point with the axis of the optical path.

SPM head (Fig.1, right) is a removable holder of SPM probe and a deflectometer consisting of a semiconductor laser and a four-section photodiode, which are spaced in such a way as to give the possibility to zoom in

and focus on the sample the lens (50X Mitutoyo Plan Apo Infinity Corrected Long WD Objective, Mitutoyo, Japan) with a working distance of 13 mm. Thus, we solve the first of the above problems. For the purpose of noise reduction, SPM head is mounted during SPM/OM measurements directly on the movable UMT console in the upper "working" point. For the next UMT-cut the SPM-head is taken away, disconnected from the UMT console, remaining on support, and the latter, continuing the downward movement makes the next slice of the sample. This approach



с монохроматором Andor Shamrock 750 с CCD-камерой Andor DU971P-BV (Andor Technology), а также с лазером (488 нм) GN-519M Ar<sup>+</sup> (Plazma, Россия), который фильтруется краевым фильтром Semrock 488-nm RazorEdge (Rochester, США). Для возбуждения флуоресценции образца интенсивность лазерного излучения составляла 200 мкВт, что фиксировалось измерителем интенсивности LaserMate-Q (Coherent, США).

При исследовании СЗМ-топографии использовалась скорость сканирования 1 Гц при площади сканирования 512×512 точек, а для конфокальных флуоресцентных измерений площадь сканирования составляла 50×50 точек при времени накопления 0,3 с на точку.

Используемая конфигурация позволяет реализовать на данной установке практически все методики СЗМ: контактную и полуконтактную АСМ, латеральную силовую микроскопию (ЛСМ), магнитную силовую микроскопию (МСМ), фазовую визуализацию, электрические измерительные техники и др. [10]. Восстановление 3D-морфологии и распределения физических параметров в виде воксельных 3D-изображений проводилось с помощью программного обеспечения ImagePro Plus 6.0 с функцией построения 3D-изображений (Media Cybernetics, США).

### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данной работе исследовались морфологические и оптические свойства наногибридного материала, основанного на внедрении флуоресцентных полупроводниковых квантовых точек (КТ) в полимерную

сетку с эффектом памяти, которая образована путем фотополимеризации мономеров (diacrylate RM257, monoacrylate A4CB) и фотоинициатора (Irgacure 651) в присутствии смеси нематических жидких кристаллов (ЖК) E48 и хирального допанта HexSorb. Таким образом, создаются фотонные структуры КТ/полимерная сеть (КТ/ПС), где флуоресцентные КТ в концентрации до нескольких весовых процентов находятся в своеобразной брегговской решетке с шагом 200 нм. Пик брегговского селективного отражения света находится на 580 нм. В данной работе использовались флуоресцентные КТ с пиком флуоресценции 575 нм. Подробное описание синтеза данных структур приведено в работе [16].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Система СЗНТ/ОМ была использована для исследования гибридных систем КТ/ПС. Целью данного исследования являлось установление корреляции между особенностями морфологии образцов и пространственным распределением полупроводниковых флуоресцирующих КТ в этих структурах. В ходе исследований были получены 2D- и 3D-данные АСМ (рис.3а, 3б), а также конфокальные флуоресцентные изображения на выбранных 2D АСМ-сканах.

На рис.3б приведено наиболее типичное из этих конфокальных флуоресцентных изображений, соответствующее 2D АСМ-скану, представленному на рис.3а. Из сравнения рис.3а и 3б явственно следует, что распределение флуоресцентной интенсивности далеко не во всех случаях соответствует топографическим особенностям. Общая неравномерность флу-

provides a significant weight reduction of the UMT mechanism during slicing and the spatial separation between the cantilever holder and UMT blade at the time of the slice. The developed system allows XY positioning of the SPM head with an accuracy of less than 1  $\mu\text{m}$  between cycles of UMT slices.

Join scheme of the upgraded SPNT system and optical parts of the developed device is shown in Fig.2. The integration consists in addition to the described scheme of a high-aperture lens (Fig.2, at the left). To meet all requirements for positioning, the

lens is mounted on plane-parallel XYZ piezo positioner with a hole in the center and a specially designed adapter for horizontal mounting so that the center of mass of the lens was located in the upper plane of the scanner. The scanner with a scan range of  $100 \times 100 \times 50 \mu\text{m}$  and capacitive sensors for the retention and control of movement was used. Thus, we have the opportunity of precise (0.1 nm) positioning of the center of the field of view of the lens and the position of the tip of the SPM probe on an area of  $100 \times 100 \mu\text{m}$ . The range of Z-positioning of the lens is 50  $\mu\text{m}$

with a step of 0.1 nm. Piezo positioner is mounted on a motorized 1D linear repeater 8MT177-100 (Standa, Lithuania) with the range of motion of 100 mm and a resolution of 1  $\mu\text{m}/\text{step}$  to be able to move him away in automatic mode and to bring back without leaving the working area of the precise focusing of the lens (50  $\mu\text{m}$ ). The lens is combined with confocal module, which is a part of the fluorescent/Raman/confo- cal system (Fig.2, on the right). As shown in the lower part of Fig.2, this confocal part is combined with Andor Shamrock 750 mono- chromator with Andor DU971P-BV

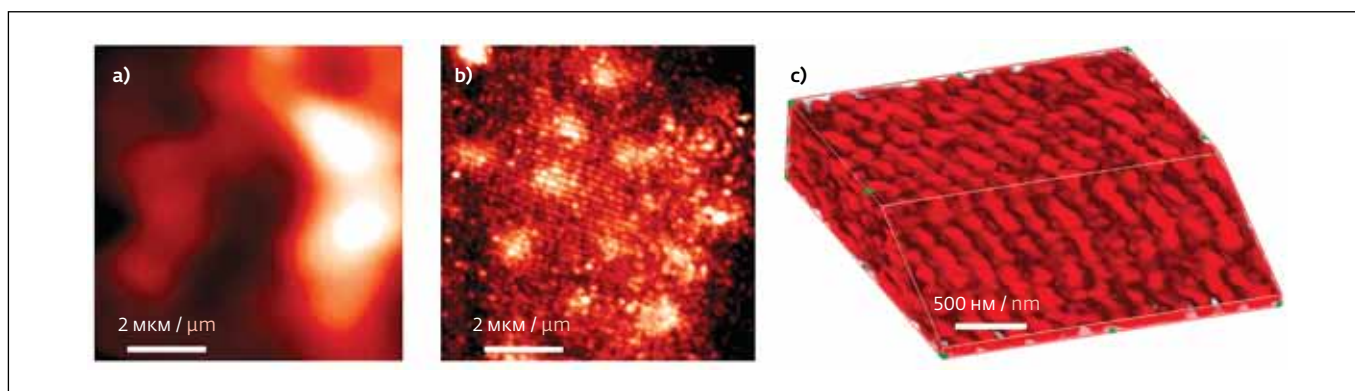


Рис.3. Данные СЗНТ/ОМ: а – СЗМ (АСМ) топография; б – конфокальное флуоресцентное изображение; в – 3D-СЗМ (АСМ) морфология

Fig.3. SPNT/OM images: a – SPM (AFM) topography; b – confocal fluorescent image; c – 3D SPM (AFM) morphology

оресцентной интенсивности, усредненная по пяти флуоресцентным 2D-изображениям, составила около 500%. При этом важно, что образуемая ПС периодическая структура практически не имеет серьезных дефектов во всем объеме образца (рис.3с). Таким образом, для создания эффективных фотонных устройств на базе гибридных систем КТ/ПС, в которых реализуется эффективная модуляция флуоресценции КТ периодической решеткой на основе ПС [16], необходимо существенно улучшать стадию внедрения КТ в полимерную матрицу для обеспечения равномерного ее заполнения и равномерной пространственной светимости фотонных устройств.

Основным результатом данной работы является разработка и апробация в реальных исследова-

ниях единого аппарата для реализации методики СЗНТ/ОМ. Многообразие возможностей СЗНТ/ОМ обусловлено эффектом сложения всего спектра возможностей СЗМ и оптической микроспектроскопии. Многообещающей выглядит потенциальная возможность адаптации разработанной системы для сочетания методов СЗНТ/ОМ и оптической микроскопии для преодоления дифракционного предела. Данное направление можно считать наиболее актуальным, поскольку основным недостатком современной реализации СЗНТ/ОМ является чрезвычайно низкое, по сравнению с СЗМ, пространственное разрешение ОМ, не позволяющее устанавливать точную корреляцию между морфологией и данными ОМ. Уже сейчас в разработанной системе без существенных модифика-

CCD-camera (Andor Technology) and with GN-519M Ar<sup>+</sup> 488 nm laser (Plazma, Russia), which is filtered by Semrock 488-nm RazorEdge filter (Rochester, USA). For fluorescence excitation, the intensity of the laser radiation was 200 μW, which was recorded by LaserMate-Q intensity meter (Coherent, USA).

SPM topography was investigated at a scanning speed of 1 Hz with a scan area size of 512×512 points, and during confocal fluorescence measurements the scanning area was 50×50 points at accumulation time of 0.3 seconds per point.

The mentioned configuration allows to implement at this facility almost all SPM modes: contact and tapping AFM, lateral force microscopy (LFM), magnetic force microscopy (MFM), phase imaging, electric measuring modes, etc. [10]. Modeling of the 3D morphology and distribution of the physical parameters in the voxel 3D images was performed using the ImagePro Plus 6.0 software with the 3D imaging function (Media Cybernetics, USA).

#### SAMPLE PREPARATION

In this project, we investigated the morphological and optical

properties of nano-hybrid material based on the introduction of fluorescent semiconductor quantum dots (QD) into a polymer mesh with shape memory effect, which is formed by photo-polymerization of monomers (RM257 diacrylate, A4CB monoacrylate) and photoinitiator (Irgacure 651) in the presence of a mixture of nematic liquid crystals (LC) E48 and the chiral dopant HexSorb. Thus, a photonic structure QD/polymer network (QD/PN) is created, where fluorescent QD in a concentration of several weight percent are in a kind of Bragg grating







ций ключевых блоков могут быть использованы такие прогрессивные методики высокоразрешающей ОМ, как стохастическая оптическая реконструкционная микроскопия (STORM) [17], фотоактивирующая локализационная микроскопия (PALM) [18] и микроскопия на основе подавления спонтанного испускания (STED) [19].

Нынешняя версия разработанной системы позволяет реализовать 3D-версии таких зондово-оптических методов как спектроскопия комбинационного рассеяния с усилением наконечника (TERS) [20] и рассеивающая ближнепольная оптическая микроскопия (s-SNOM) [21]. Незначительные изменения, связанные с системой лазерного возбуждения, потребуются для использования 3D-версии новейшей методики фотоиндуцированной силовой микроскопии (PiFM) [22]. Значительно более серьезные, но вполне реализуемые изменения потребуются в случае преобразования 2D в 3D АСМ-ИК [23].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и опробован в практических исследованиях единый комплексный аппарат для реализации методики СЗНТ/ОМ. Данная методика открывает широкие перспективы в области многопараметрического корреляционного объемного анализа композитных наноструктурированных материалов (включая биоматериалы) и объединяет в себе технику СЗМ, ОМ и УМТ. Такое объединение позволяет многократно производить сверхтонкие (до 20 нм) срезы с поверхности образца с последующим получением последовательного набора 2D-данных практически во всех

режимах СЗМ и в большинстве режимов конфокальной микроспектроскопии (подход "срез и вид"). Объединение полученных данных в единый массив позволяет провести 3D-характеризацию морфологии, химического состава, межкомпонентных взаимодействий, механических, электрических, магнитных и других свойств в объеме многокомпонентных материалов.

Наиболее перспективным представляется возможность использования методики СЗНТ/ОМ для преобразования 2D в 3D с реализацией таких зондово-оптических техник, как TERS, s-SNOM, АСМ-ИК и других, позволяющих повысить разрешающую способность ОМ до уровня СЗМ.

Разработанная методика опробована для исследования морфологических и оптических свойств наногибридного материала, основанного на внедрении флуоресцентных полупроводниковых КТ в полимерную сетку с эффектом памяти, полученную путем фотополимеризации мономеров в присутствии смеси нематических ЖК и хирального допанта. Данные композитные структуры имеют значительный потенциал для получения фотонных устройств с эффективной модуляцией флуоресценции КТ периодической решеткой на основе ПС, что может быть использовано для создания однофотонных источников света, систем хранения и отображения информации, а также устройств с низкопороговой лазерной генерацией.

*Исследование поддержано грантом Министерства образования и науки РФ (14.587.21.0021, RFMEFI58715X0021) и технологической платформой Nano'Mat Шампань-Арден, Франция.*

with a pitch of 200 nm. The peak of Bragg selective reflection of light is at 580 nanometers. In this project we used fluorescence QD with a fluorescence peak of 575 nm. A detailed description of the synthesis of these structures is given in [16].

## RESULTS

SPNT/OM system was used to study QD/PN hybrid systems. The aim of this study was to establish correlations between features of the morphology of the samples and the spatial distribution of the semiconductor fluorescent QD in these structures. During

the studies 2D and 3D AFM data (Fig.3a, 3b) and confocal fluorescent images on the selected 2D AFM scans were obtained.

Fig.3b presents the most typical of these confocal fluorescence images corresponding to the 2D AFM scan, shown in Fig.3a. Comparison of Fig.3a and Fig.3b show that the distribution of fluorescent intensity not in all cases corresponds to topographical features. General unevenness of the fluorescent intensity averaged over the five fluorescent 2D images was about 500%. It is important that the periodic structure of PN has virtually no

serious defects in the whole volume of the sample (Fig.3c). Thus, to create photonic devices based on hybrid systems QD/PN with effective modulation of the QD fluorescence by periodic grating based on PN [16], it is necessary to substantially improve the stage of introduction of QD in the polymer matrix to ensure uniform filling and uniform spatial luminance of photonic devices.

The main result of this project is the development and testing in real research of a single device for SPNT/OM methods. The diversity of opportunities of



## ЛИТЕРАТУРА

1. Caplan J., Niethammer M., Taylor R.M., Czymmek K.J. *Current Opinion in Structural Biology*. 2011. 21(5). 686.
2. Timmermans F.J., Otto C. *Rev. Sci. Instrum.* 2015. 86(1). 011501.
3. Lucas M., Riedo E. *Rev. Sci. Instrum.* 2012. 83. 061101.
4. Mirzaei J., Reznikov M., Hegmann T. *J. Mater. Chem.* 2012. 22. 22350.
5. Mironov A.A., Beznoussenko G.V. *Journal of microscopy*. 2009. 235(3). 308.
6. Spiegelhalter C., Tosch V., Hentsch D., Koch M., Kessler P., Schwab Y., Laporte J. *PLoS ONE*. 2010. 5(2). e9014.
7. Pilhofer M., Ladinsky M.S., McDowall A.W., Jensen G.J. *Methods Cell Biol.* 2010. 96. 21.
8. Bouchet-Marquis C., Hoenger A. *Micron*. 2011. 42. 152.
9. Al-Abboodi A., Fu J., Doran P.M., Chan P.P.Y. *Biotechnol. Bioeng.* 2013. 110. 318.
10. Mironov V.L. *Fundamentals of Scanning Probe Microscopy – The Russian academy of sciences institute for physics of microstructures: Nizhniy Novgorod*, 2004. 97 p.
11. Bhushan B., Fuchs H. (Eds.) *Applied Scanning Probe Methods XII: Characterization*, Chapter 11: Applications of Scanning Near-Field Optical Microscopy in Life Science. 2009.
12. Efimov A.E., Tonevitsky A.G., Dittrich M., Matsko N.B. *J. Microsc.* 2007. 226. 207.
13. Alekseev A., Agapova O.I., Mochalov K.E., Agapov I.I. *Advanced Materials*. 2009. 21. 48.
14. Efimov A.E., Gnaegi H., Schaller R., Grogger W., Hoferde F., Matsko N.B. *Soft Matter*. 2012. 8. 9756.
15. Mochalov K.E., Efimov A.E., Bobrovsky A., Agapov I.I., Chistyakov A.A., Oleinikov V., Sukhanova A., Nabiev I. *ACS Nano*. 2013. 7(10). 8953.
16. Bobrovsky A., Samokhvalov P., Shibaev V. *Advanced Optical Materials*. 2014. 2. 1167.
17. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. *Nature Methods*. 2006. 3. 793.
18. Betzig E.G., Patterson H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J.H., Hess F. *Science*. 2006. 313. 1642.
19. Westphal V., Rizzoli S.O., Lauterbach M.A., Kamin D., Jahn R., Hell S.W. *Science*. 2008. 320. 246.
20. Anderson N., Hartschuh A., Novotny L. *Materials Today*. 2005. 8. 50.
21. Specht M., Pedarnig J.D., Heckl W.M., Hansch T.W. *Phys.Rev.Lett.* 1992. 68. 476.
22. Jahng J., Fishman D.A., Park S., Nowak D.B., Morrison W.A., Wickramasinghe H.K., Potma E.O. *Acc. Chem. Res.* 2015. 48. 2671.
23. Dazzi A., Prater C.B., Hu Q., Chase D.B., Rabolt J.F., Marcott C. *Appl. Spectrosc.* 2012. 66. 1365.

SPNT/OM is caused by effect of composition of all range of possibilities of SPM and optical microspectroscopy. The potential possibility of adaptation of the developed system for the combination of the SPNT/OM methods and optical microscopy to overcome the diffraction limit looks promising. This trend can be considered the most relevant because the main disadvantage of modern version of SPNT/OM system is extremely low (compared to SPM) spatial resolution of the OM, which does not allow to establish the exact correlation between the morphology and the

data of the OM. Already now, without significant modifications of key blocks of the developed system such advanced high-resolution techniques of OM, as stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [17], photoactivated localization microscopy (PALM) [18] and stimulated emission depletion microscopy (STED) [19] can be used.

The current version of the developed system allows to implement a 3D versions of such probe and optical methods like tip-enhanced Raman scattering, (TERS) [20] and scattering scanning near-field optical

microscopy (s-SNOM) [21]. Minor changes associated with laser excitation are required for use of 3D version of photoinduced force microscopy (PiFM) [22]. Much more serious, but quite feasible changes will be necessary in the case of conversion of 2D to 3D AFM-IR [23].

## CONCLUSION

The single integrated device for SPNT/OM methods is developed and tested in practical researches. This technique opens wide perspectives in the field of multi-parameter correlation volumetric analysis of



Статья А.Чуприна, Р.Гаврилова, С.Генералова и С.Никифорова **"Некоторые перспективные конструкции пьезоэлектрических генераторов энергии"**, опубликованная в 2016 году в журнале "Наноиндустрия" №2 (64) на стр. 48–56, подготовлена ЗАО "НПЦ СпецЭлектронСистемы" совместно с НПК "Технологический центр" при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках соглашения № 14.579.21.0086 от 21.11.2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI579X0086).

Статья И.Васильева, С.Генералова, О.Краснобаева, А.Чуприна **"Исследование характеристик колебаний железнодорожных грузовых вагонов с целью определения технических требований к конструкции автономных пьезоэлектрических генераторов тока"**, опубликованная в 2016 году в журнале "Наноиндустрия" №3 (65) на стр. 72–77, подготовлена ЗАО "НПЦ СпецЭлектронСистемы" совместно с ОАО "НИИЖТ" и НПК "Технологический центр" при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках соглашения № 14.579.21.0086 от 21.11.2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI579X0086).

Статья И.Васильева и А.Чуприна **"Разработка автономного пьезоэлектрического генератора тока для навигационной поддержки железнодорожного транспорта"**, опубликованная в 2016 году в журнале "Наноиндустрия" №4 (66) на стр. 52–59, подготовлена ЗАО "НПЦ СпецЭлектронСистемы" при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках соглашения № 14.579.21.0086 от 21.11.2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI579X0086).

Статья И.Васильева и А.Чуприна **"Разработка пьезоэлектрического генератора тока для обеспечения автономным питанием грузовых вагонов и платформ"**, опубликованная в 2016 году в журнале "Наноиндустрия" №5 (67) на стр. 86–92, подготовлена ЗАО "НПЦ СпецЭлектронСистемы" при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках соглашения № 14.579.21.0086 от 21.11.2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI579X0086).

nanostructured composite materials (including biomaterials) and combines SPM, OM and UMT. This combination allows to repeatedly perform ultrathin (20 nm) slices from the sample surface followed by obtaining a consistent set of 2D data in all SPM modes and in most modes of confocal microspectroscopy (Slice and View). The compilation of the obtained data in a single array allows to conduct 3D characterization of morphology, chemical composition, interactions, mechanical, electrical, magnetic, and other properties in the amount of multicomponent materials.

The most promising is the ability to use the SPNT/OM methods for 2D to 3D conversion with the implementation of such probe and optical techniques, as TERS, s-SNOM, AFM-IR and others, allowing to increase resolution of OM to the level of the SPM.

The developed method was tested to study the morphological and optical properties of nano-hybrid material based on the introduction of fluorescent semiconductor QD into polymer mesh with a memory effect obtained by photopolymerization of the monomers in the presence of a mixture of nematic LC

and a chiral dopant. These composite structures have considerable potential for creation of photonic devices with efficient modulation of the QD fluorescence by periodic lattice on the basis of PN that can be used to create single-photon light sources, systems for storage and displaying information, as well as devices with low-threshold laser generation. ■

*The study was supported by a grant from the Ministry of education and science of the Russian Federation (14.587.21.0021, RFMEFI58715X0021) and by Nano'Mat technological platform (Champagne-Ardenne, France).*

