

# КОМБИНАЦИЯ ВЗАИМОДОПОЛНЯЮЩИХ ТЕХНОЛОГИЙ В МИКРОСКОПИИ

Х.Фишер  
Harald.Fischer@WITec.de

В биологии, химико-фармацевтическом анализе, современных отраслях материаловедения первостепенную роль играют неразрушающие методы анализа, без которых невозможно представить углубленные исследования и разработки. К числу таких методов относится комбинационное (рамановское) рассеяние (КР), которое позволяет, в частности, исследовать структурные и химические трехмерные изображения образцов с разрешением в субмикронном диапазоне. Комбинация данной техники с атомной силовой микроскопией (АСМ) дает возможность получить обширнейшую информацию о структуре и химических свойствах изучаемых объектов.

## Получение трехмерных изображений в химии с помощью КР

Эффектом Рамана называют неупругое взаимодействие электромагнитного излучения (света) с материей, при котором падающий фотон изменяет колебательное состояние молекулы вещества. В результате происходит испускание фотона со смещенной энергией. Такой сдвиг энергии характерен для конкретного вида и типа взаимодействия исследуемых молекул, причем каждая из них оставляет свой специфичный след. Следовательно, рамановская спектроскопия является неразрушающим и неинвазивным методом, позволяющим получить детальную химическую информацию об образце без его длительной подготовки, в том числе с использованием методик окрашивания.

При исследовании неомогенных образцов большой интерес может представить пространственное распределе-

ние в них различных компонентов, поэтому возникает необходимость комбинации методов спектроскопии и микроскопии. Распространенной техникой в оптической микроскопии является получение конфокального изображения, при котором в плоскости изображения применяется небольшая апертура и регистрируется только проходящий через нее свет. Тем са-

мым в конфокальной микроскопии удается получать информацию только с фокальной плоскости, что делает возможным создание глубинного профиля и даже трехмерного изображения. При этом обеспечивается сильное подавление рассеяния света из областей, находящихся вне этой плоскости.

Получение изображения осуществляется затем растривова-

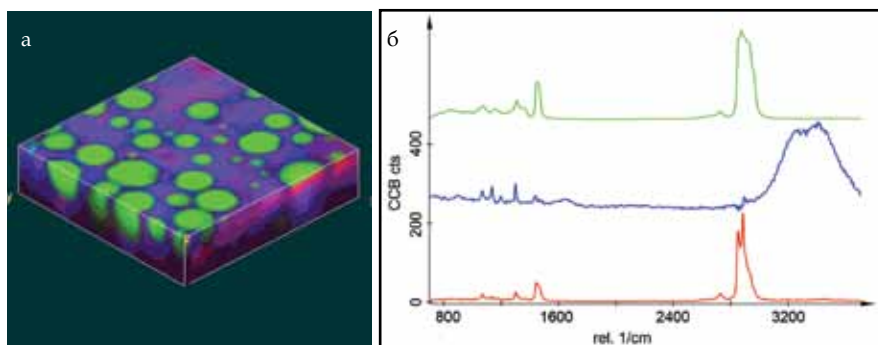


Рис.1. Рамановское 3D-изображение (реконструкция) распределения масла, алкана и воды в эмульсии. Зеленый – масло, красный – алкан, синий – вода. (размеры образца – 30×30×11,5 мкм) (а); соответствующие спектры (без смешивания) масла, алкана и воды (б)



нием образца (лазера возбуждения) точка за точкой и строка за строкой. Преимущества данного метода – высокие контрастность изображения и соотношение сигнал/шум.

Комбинация конфокального микроскопа высокого разрешения со сверхчувствительным рамановским спектрометром, как, например, в приборе KP WITec alpha300 R, позволяет получить не только рамановские спектры мельчайших объектов (вплоть до 0,02 мкм<sup>3</sup>), но и рамановские изображения высокого разрешения. При этом в каждой точке регистрируется полный рамановский спектр. Результатом для стандартного изображения размером в 256 строк по 256 пикселей станут 65 536 спектров. Из мультиспектрового файла с помощью специального программного обеспечения (ПО), например, интеграцией по определенным областям, в спектре можно также получить изображение распределения определенных химических веществ в изучаемом объекте. Наличие полного спектра каждого участка образца позволяет без повторных измерений использовать и сравнивать разнообразные методы анализа.

Для получения качественных рамановских спектров при малом времени интегрирования при разработке alpha300 R Systems особое внимание было уделено достижению высокой оптической пропускной способности и оптимальной чувствительности прибора. При использовании в качестве детектора традиционной ПЗС-камеры периоды интегрирования на каждый спектр составляли около 10 и 0,7 мс для камеры EMCCD (Ultrafast Raman Imaging Option). Это позволяет получать изображения 250×250 точек менее чем за 1 мин.

Другое существенное преимущество высокой чувствительности – снижение до минимума мощности используемого лазера при неразрушающем исследовании даже самых

чувствительных образцов. Кроме того, появляется возможность сделать доступными для рамановской спектроскопии мельчайшие концентрации материалов, характеристики рассеяния которых не позволяют проводить рамановскую спектроскопию иным способом.

На рис.1а показано 3D-изображение эмульсии воды, масла и алкана, полученное с помощью конфокального рамановского микроскопа alpha300 R. В объеме образца в направлении оси z сформировано 23 отдельных рамановских изображения. Каждое из них состоит из 150×150 точек, т.е. из 22 500 спектров (всего 517 500 рамановских спектров). Время съемки каждого изображения ~60 с. Таким образом, съемка всего комплекса изображений заняла 23 мин. С помощью специально ПО для трехмерной реконструкции из отдельных изображений составлена общая карта, представляющая собой распределение компонентов в трех измерениях.

На рис.1б показаны относящиеся к ним спектры (без смешивания) с соответствующей цветовой кодировкой.

### Кластерный анализ для интерпретации данных

Информация, извлекаемая из комплекса данных рамановского изображения, чрезвычайно многогранна. В зависимости от образца можно, например, сделать заключение о степени кристалличности или о напряжениях в материале. Для подобных оценок необходимо располагать подходящим и простым ПО, которое в идеале позволяет делать объективные заключения или автоматически обнаруживать в полученных результатах скрытые структуры.

Пакет программ WITec Project Software предоставляет пользователю мощный инструмент, благодаря которому такая обработка может производиться просто и быстро. При использовании для интерпретации методов мультивариан-

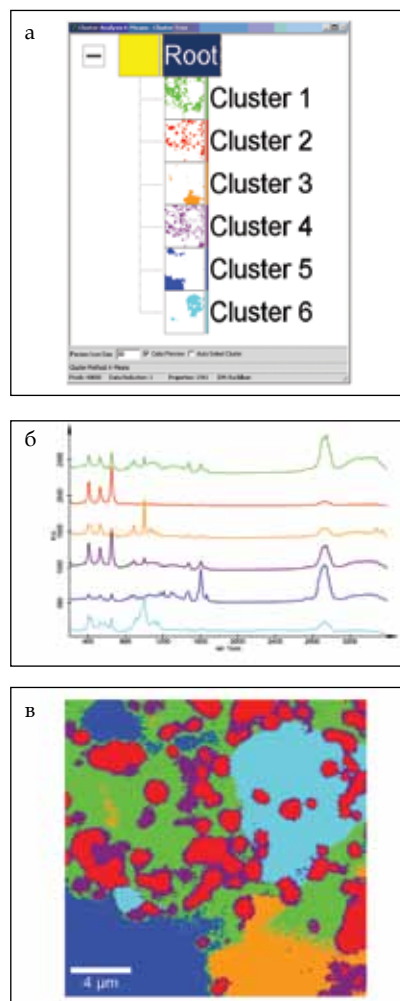


Рис.2. Скриншот WITec Project Plus: кластерное дерево – результат анализа изображения образца зубной пасты (а); усредненные спектры шести компонентов зубной пасты согласно кластерному анализу (б); рамановское изображение латерального распределения компонентов зубной пасты (в)

тного анализа, таких, например, как кластерный, существует возможность локализации и изображения химически и спектрально схожих областей. Следовательно, пользователю не обязательно априори владеть информацией об образце. Достаточно оценить число компонентов. Тем самым обеспечивается объективная, быстрая и непротиворечивая интер-

претация данных. Кластерному анализу, например, были подвергнуты данные рамановского изображения образца зубной пасты. Проводилось сканирование зоны образца 20×20 мкм с 200×200 пикселей (40 000 спектров). Время съемки каждого спектра составило 0,76 мс, т.е. полное изображение было получено за 42 с. Кластерное дерево, выданное программой WITec Project Plus Software с распределением шести избранных компонентов, показано на рис.2а, а соответствующие усредненные спектры – на рис.2б. Комбинация шести кластеров — компонентов в одном изображении позволяет получить картину латерального распределения компонентов зубной пасты (рис.2в).

Помимо изучения эмульсий конфокальные рамановские изображения могут использоваться для исследования полимерных смесей, обнаружения примесей или напряжений в материалах, получения изображений живых клеток без окрашивания или анализа распределения химических субстанций в различных субстратах.

Когда при исследовании образцов помимо химического анализа требуется также проведение анализа структуры поверхности, существенным подспорьем может стать АСМ, при которой происходит сканирование поверхности образца строка за строкой с помощью тончайшего, микроскопически малого острия иглы.

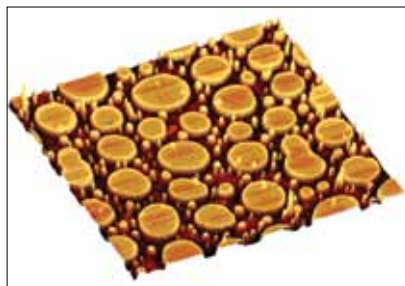


Рис.3. Топография двух-компонентной смеси полимеров (ПММА/SBR) (область сканирования 20×20×3 мкм)

Сила, с которой острие воздействует на образец, измеряется с использованием специальной технологии и поддерживается регулирующей системой на постоянном уровне. При этом топографические отличия компенсируются за счет поднятия или опускания острия (образца). Эти движения фиксируются при помощи специального ПО и преобразуются в изображения структуры поверхности с высоким разрешением. Помимо контактного существуют другие режимы получения изображения, учитывающие различные характеристики образца или свойства поверхности. Например, кроме топографии отображению поддаются такие характеристики поверхности, как адгезия и жесткость. Существенное преимущество всех методик АСМ – минимальная подготовка образца.

Благодаря принципу модульного дизайна продукции WITec конструкция микроскопа alpha300 R может быть дополнена АСМ, что позволит проводить одним прибором на одном и том же участке образца конфокальную рамановскую микроскопию и АСМ.

**Один прибор — две технологии**  
Интересную топографию (рис. 3) демонстрирует, например, полимерная смесь из двух компонентов — полиметилметакрилата (ПММА) и стиролбутадиеновой (SBR) резины. В этой смеси различимы небольшие структуры высотой в 20–30 нм, образующие «островки» диаметром от 150 нм до 4 мкм, однако точно соотносить оба полимера со структурами, наблюдаемыми посредством АСМ, крайне сложно.

При фиксации рамановского изображения в режиме Raman Imaging Mode в комбинации с прибором соотно-

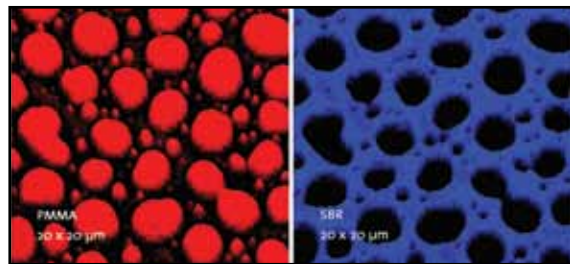


Рис.4. Рамановские изображения — результат интеграции по рамановским пикам, характерным только для ПММА или SBR

сение становится очень простым: спектры чистого ПММА и SBR отличаются в определенных пиках. При использовании этих пиков для построения изображения посредством интеграции по всей их площади получаются два различных изображения (рис.4).

По результатам анализа можно определить, что полимеры не образуют гомогенного слоя, а SBR окружает «островки» ПММА. Этот пример также иллюстрирует превосходство данной измерительной системы в плане чувствительности: несмотря на малую толщину слоя (<50 нм) время интегрирования для каждого спектра составило всего 70 мс.

### Высокопроизводительные системы для анализа материалов

В целом комбинация конфокальной микроскопии КР (рамановской микроскопии) и АСМ позволяет создать весьма интересное оборудование для анализа материалов в микро- и нанометровом диапазоне, так как эти технологии превосходно дополняют друг друга, а модульные системы микроскопов WITec представляют собой универсальные инструменты для подобного анализа.

**Подробная информация:**  
WITec GmbH, Lise-Meitner-Str.  
6, 89081 Ulm  
(Лизе-Майтнер-Штрассе, 6,  
89081, Ульм, Германия)  
Тел.: +49 (0) 731 140 700,  
Факс: +49 (0) 7140 70200  
Web: www.WITec.de,  
e-mail: info@WITec.de