



КОНФОКАЛЬНАЯ РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕТЕРОГЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Х.Фишер, У.Шмит, Ч.Диннг, О.Холрихер
harald.fischer@witec.de

В нанотехнологии и материаловедении важно получение подробной информации о морфологии поверхности образца на субмикронном уровне. Это особенно критично при анализе химических соединений внутри клеток и тканей при биологических и медицинских исследованиях. Развитие фармацевтики, в частности, совершенствование оболочек таблеток или капсул, также требует максимального объема информации о химических свойствах и структуре используемых материалов.

Для получения изображения наночастиц и анализа структуры и свойств их компонентов используются различные методы, включая флуоресцентную и электронную микроскопии в сочетании с энергодисперсионным рентгеноспектральным анализом и электронным микрозондированием.

Часто это разрушающие методы анализа, которые требуют значительных трудозатрат по подготовке образца. Важно и то, что для реализации упомянутых методов, как правило, необходим вакуум, в том числе глубокий, что накладывает серьезные ограничения при исследовании, например, влажных или дегазированных образцов.

Иногда эти методы вызывают также структурные изменения.

Методы конфокальной рамановской (КР) и/или атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяют выполнять измерения при обычных условиях и дают возможность преодолеть вышеназванные недостатки и провести структурный и композиционный анализ образца перед возможным применением разрушающих аналитических методов.

Рамановский эффект и его применение в микроскопии

В рамановской спектроскопии происходит возбуждение молекулы и переход из ее основного квантового состояния в колебательное квантовое с последующим возвращением в исходное. При этом возникает энергетический сдвиг между падающим и рассеянным светом, являющийся уникальной характеристикой каждой молекулы, что дает возможность производить химическую идентификацию соединений в образце. Совмещение рамановского спектрометра с современным конфокальным микроскопом позволяет добиться пространственного разрешения до 200 нм в поперечном направлении и до 500 нм по вертикали. Следует отметить, что в данном методе для возбуждения молекул используется видимый свет.

Важно, что детектора достигает только свет из фокальной плоскости изображения. Это позволяет значительно увеличить контраст и повысить разрешение. Для устранения влияния отраженного лазерного излучения используются специальные фильтры, а рассеянное рамановское излучение ре-

гистрируется спектрометром сочлененным с ПЗС-фотодетектором. В таком сочетании время, затрачиваемое на получение рамановского спектра для каждого пикселя изображения, варьируется от 760 мкс до 100 мс. При объединении отдельных спектров на выходе формируется рамановское изображение, состоящее из десятков тысяч отдельных спектров.

Изображение, генерируемое из мультиспектрального файла, получается совмещением отдельных спектров по одной выбранной рамановской линии или при анализе различных свойств пика, например, полуширины минимумов/максимумов или его положения. Конфокальная регулировка для прозрачных образцов позволяет осуществлять глубинный анализ и генерировать 3D-модели.

Сверхбыстрое получение изображения

Главный фактор, обуславливающий снижение времени получения изображения для единичного рамановского спектра до 760 мкс, – совмещение спектроскопических ПЗС-детекторов с высокопроизводительным конфокальным микроскопом. Использование такой вы-

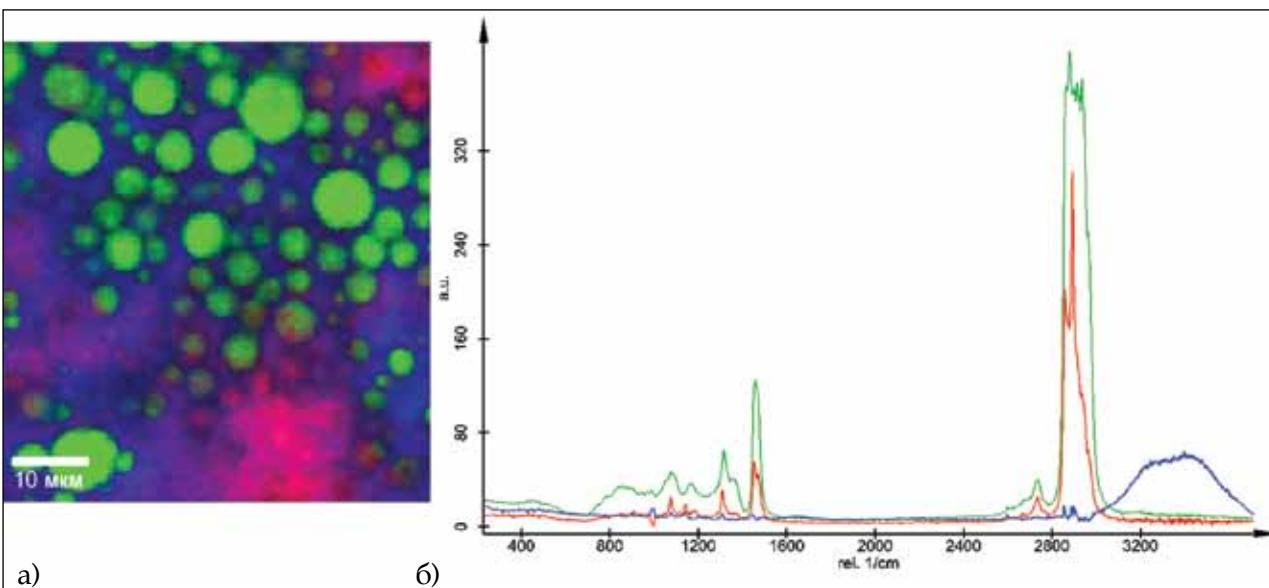


Рис.1. Рамановское изображение смеси масло — вода — парафин. Зона сканирования: 60x60 мкм, 200x200 пикселей, 40 тыс. спектров, время получения изображения 760 мкс на единичный спектр и 42 с на полное изображение (зеленый цвет — масло, красный — парафин, синий — вода) (а); рамановский спектр эмульсии масло — вода — парафин (б)

сокочувствительной установки обеспечивает преимущество при измерениях особо чувствительных и ценных образцов, требующих низких уровней энергии возбуждения. При исследовании быстрых динамических процессов, когда время анализа — важный фактор, быстрое получение изображения также дает существенное преимущество по сравнению с другими методами.

Для демонстрации возможности предлагаемого способа с использованием режима «сверхбыстрого получения рамановского изображения» на конфокальном рамановском микроскопе Alpha300 R компании WITec был проведен анализ эмульсии.

Как известно, эмульсии играют важную роль в различных технологических процессах, например, в пищевой и фармацевтической промышленности.

На рис.1а представлено рамановское изображение смеси масла, воды и парафинового углеводорода, выведенное с использованием цветового кода. Соответствующий рамановский спектр показан на рис.1б.

Автоматизированное исследование больших образцов

Систематические и рутинные исследовательские задачи, связанные с многократно повторяющимися измерениями или большим количеством исследуемых точек, а также высокуюровневый контроль качества, в значительной мере выигрывают от использования автоматизированного и быстроизмерительного инструмента, который при меньших временных затратах обеспечивает высокую чувствительность. По сравнению с другими методами, конфокальная рамановская спектроскопия дает возможность за один и тот же промежуток времени измерить большее количество образцов или снизить суммарную продолжительность эксперимента, что позволяет в ускоренном темпе выполнять циклы исследований.

Следует отметить, что использование автоматизированной системы получения изображения формирует потребность в автоматизированном отборе образцов, дающем возможность получать для произвольных точек спектры и ра-

мановские изображения, в том числе для точек, расположенных внутри образца. При этом число точек задается заранее, и сам процесс измерения в режиме «онлайн» не нуждается в контроле.

Для исследований используется система автоматизированного управления, позволяющая проводить рамановские исследования больших образцов. Возможны также анализ множества точек и сканирование больших площадей. От оператора требуется лишь предварительно ввести последовательность измерений, которые прибор выполнит автоматически.

В самом деле, если необходимо измерить вручную 50 точек на образце, оператор должен был бы вручную перемещать микроскоп в каждую из этих рассматриваемых позиций. Система автоматизированного управления позволяет заранее выбрать 50 точек, которые будут измерены без его участия. Координаты представляющих интерес точек на образце могут вводиться оператором или загружаться с использованием программного обеспечения (ПО). Чтобы получить общее представление о распре-



делении химических соединений по образцу, на первом этапе можно провести сканирование большой площади с последующим, подробным сканированием представляющих интерес точек при более высоком разрешении.

Ниже приведены данные по анализу таблетки ацетилсалicyловой кислоты (аспирина). Чтобы записать спектры с истинным конфокальным (ограниченным дифракцией) разрешением, для каждого пикселя изображения использован прибор Alpha500 (WITec). Диапазон сканирования разбит на 200x100 пикселей, суммарная площадь сканирования

18x9 мм. На рис.2а аспирин показан красным цветом, наполнитель — зеленым. Синие участки могут обозначать другую конфигурацию аспирина. Соответствующий спектр показан на рис.2г.

После получения общего изображения сканируемой площади Alpha500 позволяет произвести измерение произвольного количества точек на таблетке с наибольшим разрешением. На рис.2б, в приведены примеры увеличенных изображений отмеченных зон. На рис.2б площадь сканирования составляла 1x1 мм, на рис.2в — 80x80 мкм при числе пикселей 150x150.

Совмещение рамановской и атомно-силовой микроскопии

При использовании модульной конфигурации прибора для исследования рельефа поверхности с очень высоким разрешением и одновременного получения сведений о химическом составе образцов (по рамановским спектрам) конфокальный рамановский микроскоп простым вращением турали можно переключить в режим ACM, суть которого — регистрация сил взаимодействия между поверхностью и острой иглой, закрепленной в кантеле. Сканирование образца посредством иглы осуществляя

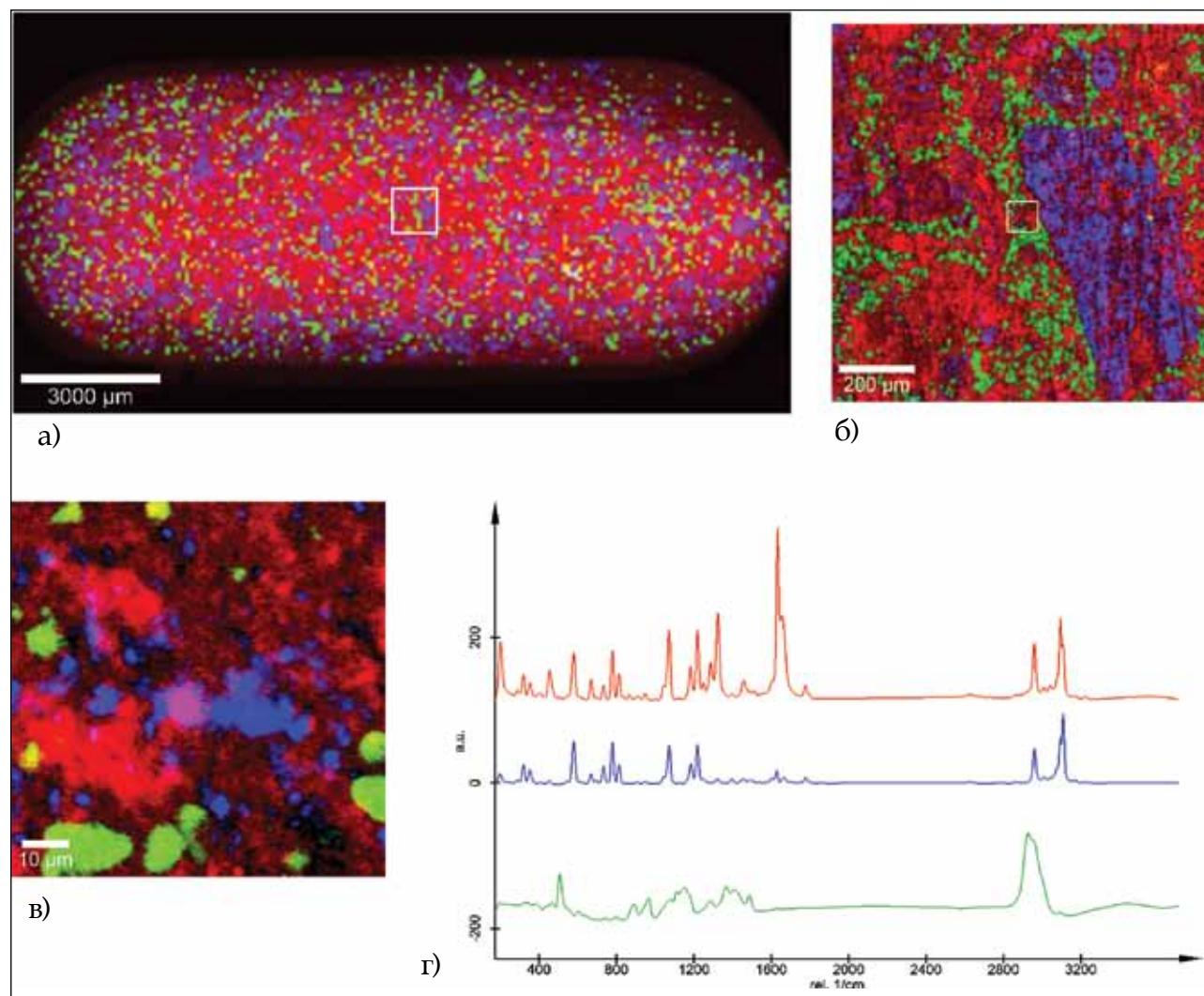


Рис.2. Рамановское сканирование большой площади для таблетки аспирина. Зона сканирования: 19x9 мм, 200x100 пикселей (а); подробное сканирование зоны, отмеченной на рис. 2а, 1x1 мм, 150x150 пикселей (б); более подробное сканирование зоны, отмеченной на рис. 2б, 80x80 мкм, 150x150 пикселей (в); соответствующий рамановский спектр (г)

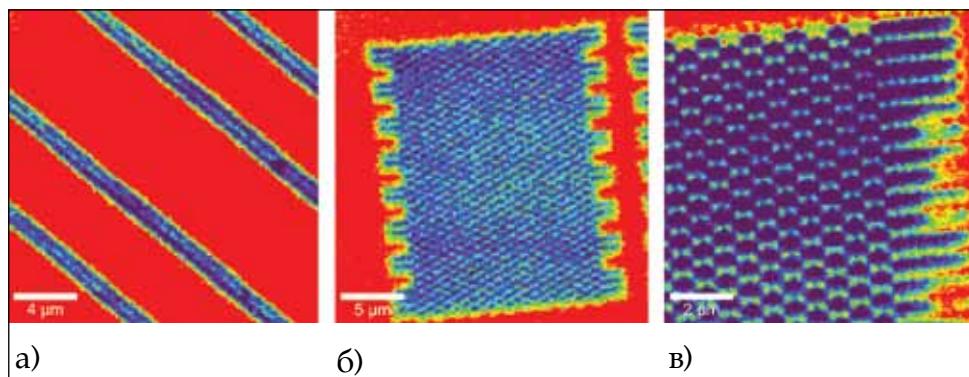


Рис.3. Рамановское изображение, визуализирующее механические напряжения и записанное в автоматическом режиме для трех различных зон чипа динамического ОЗУ (синий цвет — напряжение растяжения, желтый — напряжение сжатия); 150x150 пикселей, 22,5 тыс. отдельных спектров

ется с использованием специального модуля, приводимого в движение пьезоэлементом. Для получения информации о рельефе используется специальное ПО, переводящее данные в визуальную форму, причем метод позволяет визуализировать структуры с размерами меньше дифракционного предела.

Ниже приведен пример анализа с применением совмещенного метода рамановской и атомно-силовой микроскопии чипа динамического ОЗУ фирмы Infineon Technologies. Серии измерений выполнены для трех различных зон чипа. На первом этапе для каждого пикселя получены рамановские спектры, на основании которых создан их двухмерный массив (150x150). Время получения отдельного спектра — 10 мс. Таким образом, массив, содержащий 22,5 тыс. и

рамановских спектров, был создан менее чем за 4 мин. Оценивая положение рамановской полосы первого порядка для кремния (520/см), можно получить визуальную развертку по механическим напряжениям, что и было сделано для трех выбранных зон (рис. 3а-в).

Как уже отмечалось, простым вращением турели конфокальный рамановский микроскоп превращается в атомно-силовой. Атомно-силовые изображения с использованием программируемой функции самонаведения иглы были получены для тех же зон и точек на образце, что и рамановские спектры. На рис. 4а-в представлены изображения, сформированные методом ACM, для тех же трех зон на чипе. Линейная структура зоны состоит из параллельных борозд-

док глубиной 80 нм (рис.4а). Отверстия в зонах (рис.4б, в) имеют диаметр 300 нм и глубину 300 нм.

В целом следует отметить, что автоматизированная конфокальная рамановская и атомно-силовая микроскопии — мощный инструмент для химического и структурного анализа гетерогенных материалов.

Информация о химических составляющих и их распределении в образ-

це крайне важна как для НИ-ОКР, так и для контроля качества в научной и в промышленной сферах. Создание изображений методом конфокальной рамановской микроскопии позволяет получить неразрушающим методом данные о химических свойствах образцов с самым высоким разрешением. Совмещение этого метода с ACM дает возможность связать информацию о рельефе поверхности с данными о химических свойствах. При предварительном вводе последовательности анализа система автоматизированного управления позволяет производить измерения в автоматическом режиме для произвольного количества указываемых пользователем точек на образце. Это обеспечивает проведение комплексного, неразрушающего, оперативного анализа образца без непосредственного контроля со стороны оператора.

Все перечисленные факторы являются существенными с точки зрения быстрого возврата вложенных средств, ускоренного решения поставленных задач, публикации результатов и продвижения продуктов на рынок.

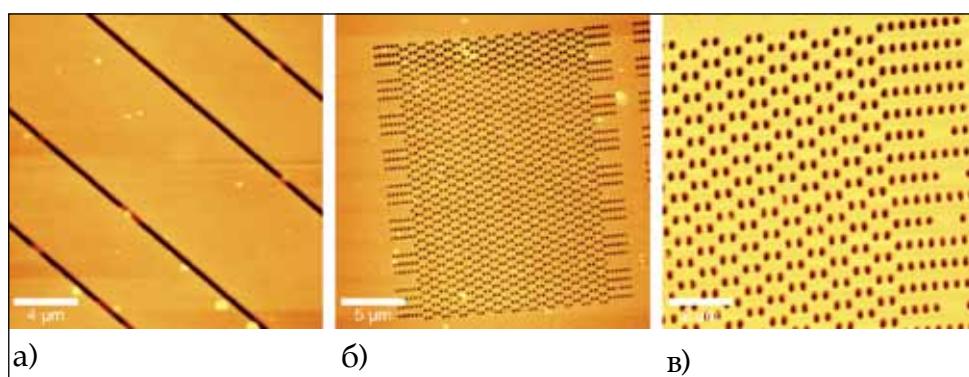


Рис.4. Рельеф поверхности чипа динамического ОЗУ для поверхностных зон, показанных на рис.3