

Chemisches 3D und strukturelles Oberflächen-Imaging mit einer Raman AFM Kombination

Harald Fischer

WITec GmbH, Germany, www.WITec.de

In den Life Sciences und in der bio-medizinischen Forschung ist die zerstörungsfreie Charakterisierung und Lokalisierung von chemischen Bestandteilen in Zellen oder Geweben eine zentrale Aufgabe. Auch bei der Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen und Trägersystemen (Drug Delivery Coatings, Tabletten, Kapseln, ...) ist ein fundiertes Wissen über den strukturellen und chemischen Aufbau erforderlich. Dies gilt auch für die Nanotechnologie und die Materialwissenschaften, bei denen es vor allem auf die Charakterisierung der Oberflächenmorphologie im Nanometerbereich ankommt. Hierfür kommen bisher überwiegend nano-analytische Methoden wie die Fluoreszenzmikroskopie, die Elektronenmikroskopie in Kombination mit EDX oder Elektronenmikrosonden zum Einsatz. Meist sind diese Techniken jedoch nicht zerstörungsfrei und erfordern eine intensive und aufwändige Probenvorbereitung, da im Vakuum oder Hochvakuum gearbeitet werden muss. Zum einen können wässrige Proben oder Proben, die zum Entgasen neigen, nicht untersucht werden, zum anderen können strukturelle Veränderungen induziert werden. Mit der Raman- und/oder der Rasterkraftmikroskopie, die bei natürlichen Umgebungsbedingungen angewandt wird, lassen sich diese Schwierigkeiten überwinden. Die konfokale Ramanmikroskopie stellt dabei ein Instrument dar, mit der die chemische Zusammensetzung einer Probe mit einer Ortsauflösung im sub-Mikrometerbereich untersucht werden kann. Kombiniert man diese Technik noch mit der Rasterkraftmikroskopie, erhält man umfangreiche Informationen über die Struktur und die chemischen Eigenschaften einer Probe, so dass diese beiden zerstörungsfreien Techniken den oben beschriebenen invasiven Techniken vorgeschaltet werden können.

Konfokale Raman Mikroskopie – Chemisches Imaging in 3D

Als Raman-Effekt bezeichnet man die inelastische Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung (Licht) mit Materie. Dabei ändert das einfallende Photon den Schwingungszustand des Moleküls und ein Photon mit verschobener Energie wird emittiert. Die Energieverschiebung zwischen einfallendem und gestreutem Photon ist charakteristisch für die Art und Koordination der beteiligten Moleküle, so dass jedes Molekül einen charakteristischen Fingerabdruck liefert. Die Raman Spektroskopie ist daher eine zerstörungsfreie und nichtinvasive Methode, die detaillierte chemische Information einer Probe ohne aufwändige Probenpräparation oder Färbetechniken liefert.

Bei der Untersuchung inhomogener Proben kann die räumliche Verteilung der verschiedenen Materialien von großem Interesse sein. Es liegt daher nahe, die Spektroskopie mit der Mikroskopie

zu kombinieren. Eine gängige Technik in der optischen Mikroskopie ist dabei die konfokale Abbildung, bei der eine kleine Apertur in der Bildebene plziert und nur das durch diese Apertur tretende Licht detektiert wird. Bei der konfokalen Mikroskopie erhält man dadurch nur Informationen aus der Fokusebene, so dass auch Aufnahmen eines Tiefenprofils und sogar eines dreidimensionalen Bildes möglich sind. Außerdem wird Streulicht (Fluoreszenz) aus Bereichen außerhalb der Fokusebene stark unterdrückt. Die Aufnahme des Bildes erfolgt dann durch Rastern der Probe oder des Anregungslasers Punkt für Punkt und Zeile für Zeile. Vorteil dieser Methode ist ein sehr großer Bildkontrast und ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis. Durch die Kombination eines hochauflösenden konfokalen Mikroskops mit einem extrem empfindlichen Raman-Spektrometer, wie im konfokalen Raman Mikroskop WITec alpha300 R ist es nicht nur möglich, Raman Spektren von kleinsten Probenvolumina (bis hinunter zu $0,02 \mu\text{m}^3$) zu erhalten, sondern es lassen sich auch hochaufgelöste Raman Bilder gewinnen: An jedem Bildpunkt wird dabei ein komplettes Raman-Spektrum aufgenommen. Eine typische Bildgröße von 256 Zeilen mit 256 Pixel resultiert in 65.536 Spektren. Aus dieser Multi-Spektrum-Datei lassen sich nun mit einer speziellen Software zum Beispiel durch Integration über bestimmte Bereiche im Spektrum ebenfalls Bilder der Verteilung verschiedener Spezies in der Probe gewinnen. Da von jedem Probenbereich ein komplettes Spektrum vorliegt, lassen sich nach der Messung vielfältige Analysemethoden anwenden und vergleichen, ohne dass die Messung wiederholt werden muss.

Um trotz kurzer Integrationszeiten gute Raman-Spektren zu gewinnen, wurde beim Aufbau des alpha300 R Systems spezielle Aufmerksamkeit auf hohen optischen Durchsatz und optimale Empfindlichkeit gelegt. Die Integrationszeiten pro Spektrum liegen dabei bei ca. 10 Millisekunden bei Verwendung einer herkömmlichen CCD-Kamera als Detektor und bei 0,7 Millisekunden bei Verwendung einer EMCCD Kamera (Ultrafast Raman Imaging Option). Bilder mit 250×250 Bildpunkten können so in weniger als einer Minute aufgenommen werden.

Ein weiterer großer Vorteil der hohen Empfindlichkeit ist die Reduktion der Laserleistung auf ein Minimum, um auch sensibelste Proben zerstörungsfrei zu untersuchen. Ferner bietet sich die Möglichkeit, kleinste Materialkonzentrationen oder Materialien, die schlechte Raman-Streueigenschaften aufweisen, doch noch der Raman Spektroskopie zugänglich zu machen.

Abbildung 1a zeigt ein konfokales 3D Raman Bild einer Öl-Wasser-Alkan Emulsion, aufgenommen mit dem konfokalen Raman Mikroskop alpha300 R. In einem Probenvolumen von $30 \times 30 \times 11,5 \mu\text{m}$ wurden in z-Richtung 23 einzelne Raman Bilder aufgenommen. Jedes dieser Bilder besteht aus 150×150 Bildpunkten und somit aus 22.500 Spektren. Die Aufnahmezeit für jedes Bild betrug lediglich 60 Sekunden, so dass der gesamte Stack in 23 Minuten aufgenommen werden konnte. Mit einer speziellen Software für die 3D Rekonstruktion wurden die Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt, welches die Verteilung von Öl (grün), Alkan (rot) und Wasser (blau) dreidimensional darstellt. In Abbildung 1b sind die zugehörigen Spektren (entmischt) mit entsprechender Farbkodierung dargestellt.

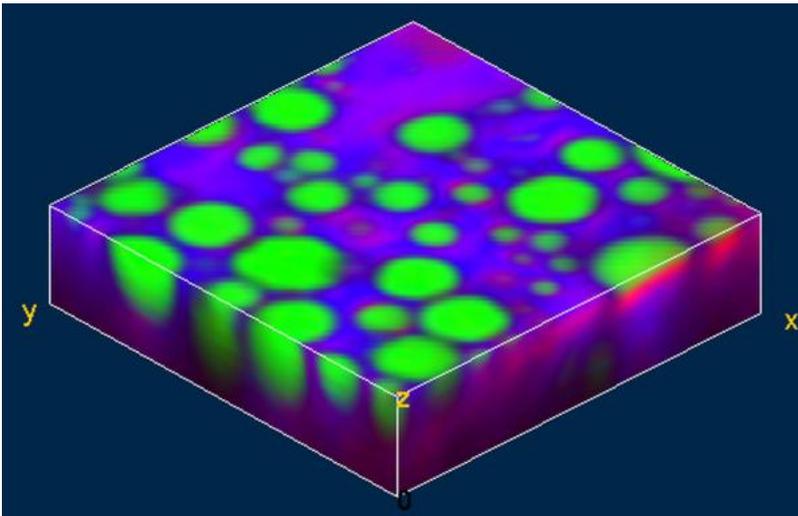


Abbildung 1a: 3D-Raman Bild (Rekonstruktion) der Verteilung von Öl, Alkan und Wasser in einer Emulsion. Grün: Öl; Rot: Alkan; Blau: Wasser; 30 x 30 x 11.5 µm, 150 x 150 x 23 Pixel, 517 500 Raman Spektren; Aufnahmezeit für den gesamten Stack: 23 min.

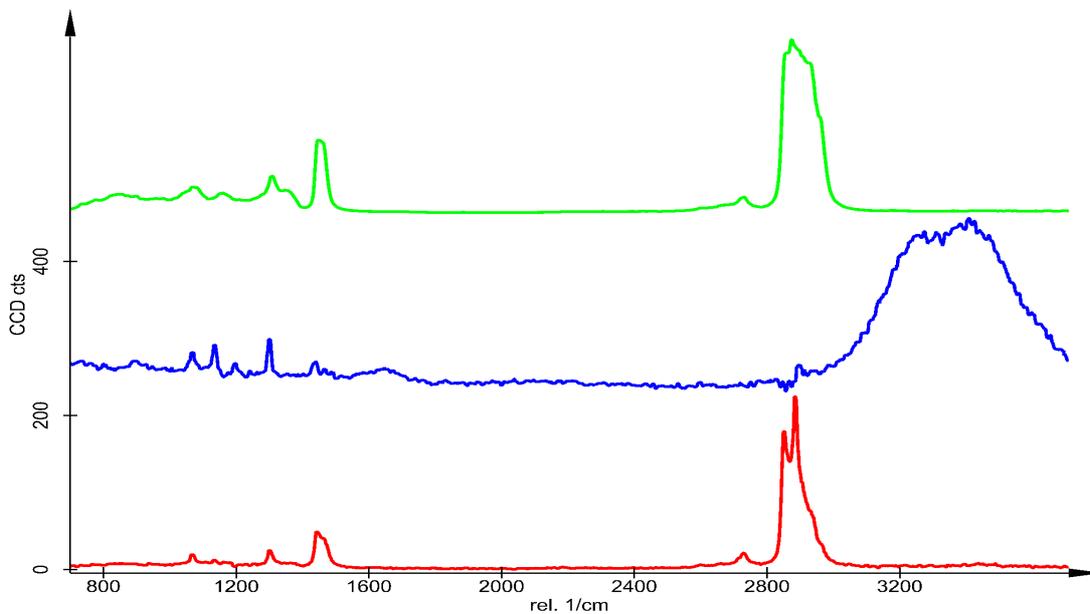


Abbildung 1b: Korrespondierende Spektren (entmischt); Grün: Öl; Rot: Alkan; Blau: Wasser

Datenauswertung per Cluster Analyse

Die Informationen, die sich aus einem Raman Imaging Datensatz extrahieren lassen, können äußerst vielschichtig sein. In Abhängigkeit von der Probe lassen sich so beispielsweise Aussagen über das Maß der Kristallinität machen oder Spannungen in Materialien aufzeigen. Für diese Auswertungen muss eine geeignete, einfach zu bedienende Software zur Verfügung stehen, die im Idealfall eine objektive Beurteilung der Daten zulässt oder verborgene Strukturen in den Daten automatisch sichtbar macht. Mit dem WITec Project Software Paket steht ein leistungsfähiges Tool zur Verfügung, mit dem diese Art von Datenverarbeitung einfach und schnell von statten gehen

kann. Zieht man beispielsweise Methoden der multivariaten Datenanalyse wie die Cluster Analyse zur Auswertung heran, lassen sich chemisch beziehungsweise spektral ähnliche Bereiche örtlich gruppieren und darstellen. Der Nutzer benötigt dann für diese Auswertung keine Kenntnisse über die Probe, sondern es reicht aus, die Anzahl der Komponenten zu schätzen. Eine objektive, schnelle und konsistente Interpretation der Daten ist damit gewährleistet. Im folgenden Beispiel wurden die Raman Imaging Daten, welche an einer Zahnpasta Probe aufgenommen wurden, der Cluster Analyse unterzogen. Auf der Probe wurden 20 x 20 µm mit 200 x 200 Pixel (40.000 Spektren) gescannt. Die Aufnahmezeit pro Spektrum betrug 0,76 ms und damit 42 s für das gesamte Bild. Abbildung 2a zeigt den Cluster-Baum wie ihn die WITec Project Plus Software ausgibt mit der Verteilung von sechs ausgewählten Komponenten. Die zugehörigen gemittelten Spektren sind in Abbildung 2b dargestellt. Kombiniert man nun die sechs Bildkomponenten-Cluster in einem Bild erhält man die laterale Verteilung der Zahnpasta-Phasen wie sie Abbildung 2c zeigt.

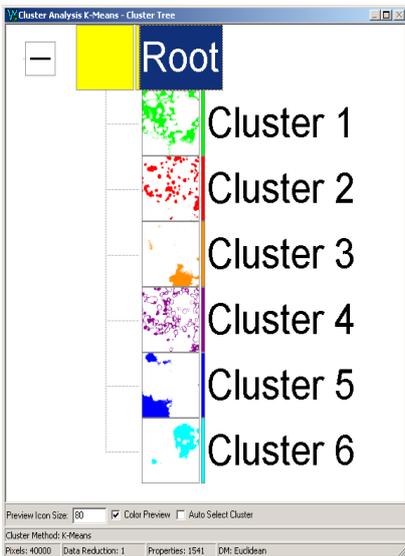


Abbildung 2a: Der WITec Project Plus Screenshot zeigt den Cluster Baum als Ergebnis einer Cluster Analyse von Bilddaten, die von einer Zahnpasta-Probe gewonnen wurden.

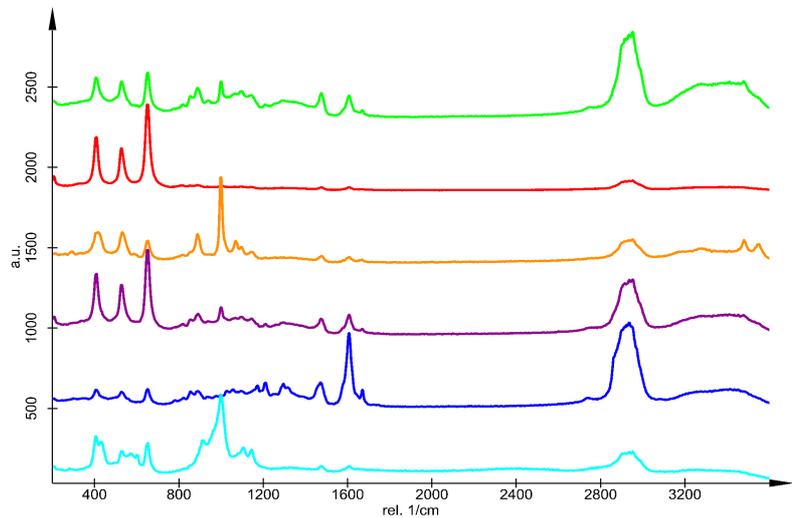


Abbildung 2b: Zugehörige gemittelte Spektren der sechs Zahnpasta-Komponenten aus der Cluster Analyse

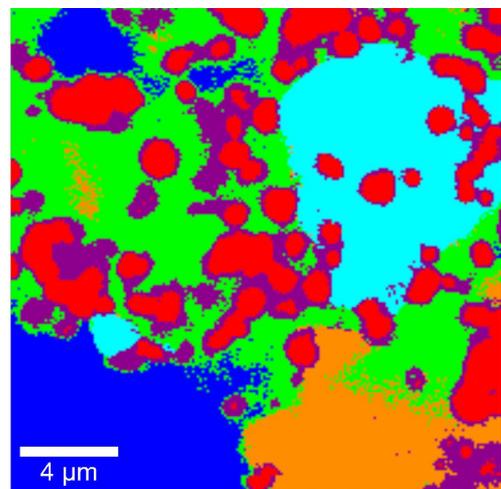


Abbildung 2c: Raman Bild der lateralen Verteilung der Zahnpasta-Komponenten

Neben diesen Untersuchungen von Emulsionen können weitere Einsatzgebiete des konfokalen Raman Imagings die Untersuchung von Polymergemischen, das Aufspüren von Verunreinigungen oder Spannungen in verschiedensten Materialien, das Abbilden von lebenden Zellen ohne Anfärben oder die Analyse der Verteilung von chemischen Substanzen in diversen Substraten sein. Müssen Proben untersucht werden, bei denen es neben der chemischen Analyse auch auf die Struktur- und Oberflächenanalyse ankommt, kann die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung dieser Eigenschaften leisten. Durch das modulare Design der WITec Mikroskopiesysteme lässt sich das alpha300 R zu einem AFM aufrüsten, so dass sowohl konfokale Raman- als auch Rasterkraftmikroskopie mit einem Gerät an derselben Probenstelle durchgeführt werden kann.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird mit einer äußerst feinen, mikroskopisch kleinen Nadelspitze die Probenoberfläche zeilenweise abgerastert. Die Kraft, mit der die Spitze auf die Probe einwirkt, wird mit einem speziellen Verfahren gemessen und über einen Regelkreis konstant gehalten. Topographieunterschiede werden dabei durch Senken oder Heben der Spitze (oder der Probe) ausgeglichen. Diese Senk- und Hebebewegungen werden aufgezeichnet und mit einer speziellen Software in hochaufgelöste Bilder der Oberflächenstrukturen übersetzt. Neben diesem Kontakt-Modus gibt es noch weitere Abbildungsmodi, die unterschiedlichen Probenbeschaffenheiten oder Struktureigenschaften Rechnung tragen. Zum Beispiel lassen sich neben der Topographie auch Oberflächeneigenschaften wie die Adhäsion oder die Steifigkeit abbilden. Ein großer Vorteil aller AFM Techniken ist, dass der Aufwand für die Probenvorbereitung minimal ist.

Ein Gerät – zwei Techniken

Eine sehr interessante Topographie (Abbildung 3) zeigt zum Beispiel ein Zwei-Komponenten-Polymergemisch aus Polymethylmetacrylat (PMMA) und Polystyrol (PS). Es sind netzartige Strukturen erkennbar, wobei eine genaue Zuordnung der beiden Polymere zu den im AFM beobachteten Strukturen nur schwierig möglich ist.

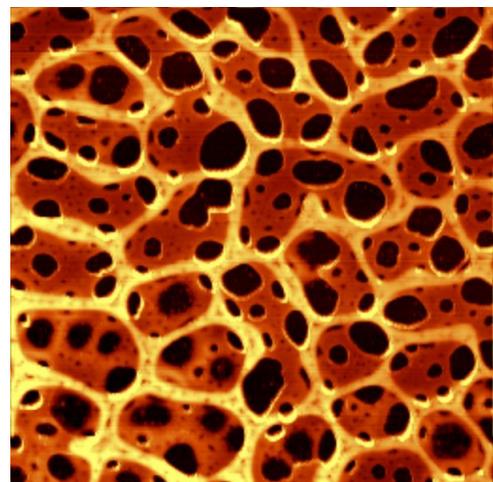


Abbildung 3: Topographie einer Zwei-komponenten-Polymermischung (PMMA/PS), Scanbereich: 20x20x0,2µm

Nimmt man nun aber mit dem Raman Imaging Mode des kombinierten Gerätes ein Raman Bild auf, gelingt die Zuordnung sehr einfach: Die Spektren von reinem PMMA und PS unterscheiden sich in definierten Peaks. Zieht man nun genau diese Peaks durch Integration über die jeweilige Peakfläche zur Bildgebung heran, erhält man ein Raman Bild von der chemischen Verteilung der Komponenten (Abbildung 4). Man erkennt sofort, dass die beiden Polymere keine homogene Schicht bilden, vielmehr bildet PS (grün) die Netzstruktur aus, welche dem PMMA (rot) aufgelagert ist. Die PMMA-Schicht weist zudem Lücken auf, in denen das Glassubstrat (blau) erkennbar ist. An diesem Beispiel lässt sich auch die überlegene Empfindlichkeit des Systems veranschaulichen: Trotz der geringen Schichtdicke betrug die Integrationszeit pro Spektrum nur 50 ms.

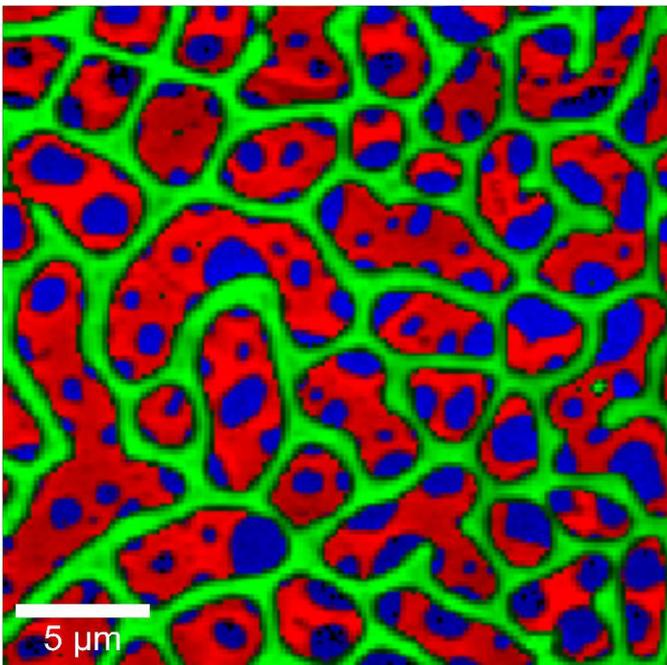


Abbildung 4: Raman-Bild als Resultat der Integration über die nur für PMMA oder PS charakteristischen Raman-Peaks. (Grün: PS; Rot: PMMA, Blau: Glas-Substrat); Scannbereich: 20x20 µm

Leistungsfähige Materialanalyse-Systeme

Die Kombination von konfokaler Raman Mikroskopie mit der Rasterkraftmikroskopie liefert ein überaus interessantes Werkzeug für die Materialanalyse im Mikro- und Nanometerbereich, da sich beide Techniken hervorragend ergänzen. Mit den modularen Mikroskopiesystemen von WITec stehen dabei universelle Tools für solche Materialanalysen zur Verfügung.