

Komplementäre Mikroskopie-Techniken intelligent kombiniert

Strukturelles und chemisches 3D-Imaging mit AFM und Raman

• In Life Science, der chemisch-pharmazeutischen Analytik und in den modernen Materialwissenschaften spielen zerstörungsfreie Analysemethoden eine elementare Rolle und sind in Forschung und Entwicklung nicht mehr wegzudenken. Die konfokale Raman Mikroskopie stellt dabei ein Instrument dar, mit der die chemische Zusammensetzung einer Probe mit einer Ortsauflösung im sub-Mikrometerbereich untersucht werden kann. Durch eine Kombination dieser Technik mit der Rasterkraftmikroskopie ist der Erhalt umfangreicher Informationen über die Struktur und die chemischen Eigenschaften der Probe möglich.

Konfokale Raman Mikroskopie – Chemisches Imaging in 3D

Als Raman-Effekt bezeichnet man die inelastische Wechselwirkung von 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 Mo-

lekül 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 plaziert 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 die Aufnahme eines Tiefenprofils und sogar eines dreidimensionalen Bildes möglich ist. 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

DER AUTOR

HARALD FISCHER

Harald Fischer ist Marketing Direktor bei der WITec GmbH. Er studierte Chemie und Biologie an der Universität Hohenheim/ Stuttgart und war danach mehrere Jahre im Marketing und Produktmanagement in der Informationstechnologie tätig. Seit 2002 ist er bei WITec für die weltweiten Marketingaktivitäten verantwortlich.



Harald Fischer
WITec GmbH
Lise-Meitner-Str. 6, 89081 Ulm
Tel: +49 (0) 731 140 700
Fax: +49 (0) 731 140 70200
E-Mail: Harald.Fischer@WITec.de
Website: www.WITec.de

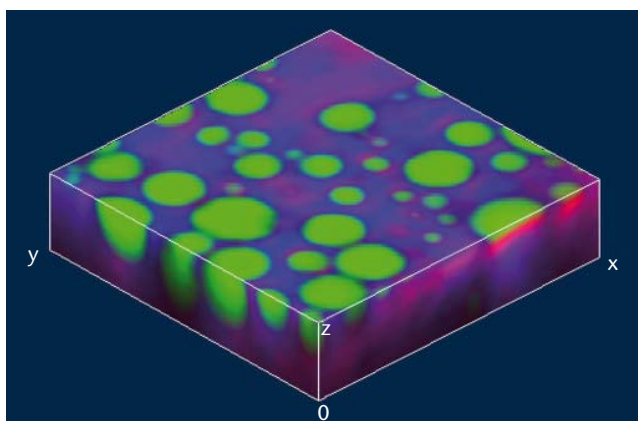


ABB. 1A: 3D-Raman Bild (Rekonstruktion) der Verteilung von Öl (grün), Alkan (rot) und Wasser (blau) in einer Emulsion. Dimension: 30x30x11.5 µm, 150x150x23 Pixel, 517 500 Raman Spektren; Aufnahmezeit für den gesamten Stack: 23 min.

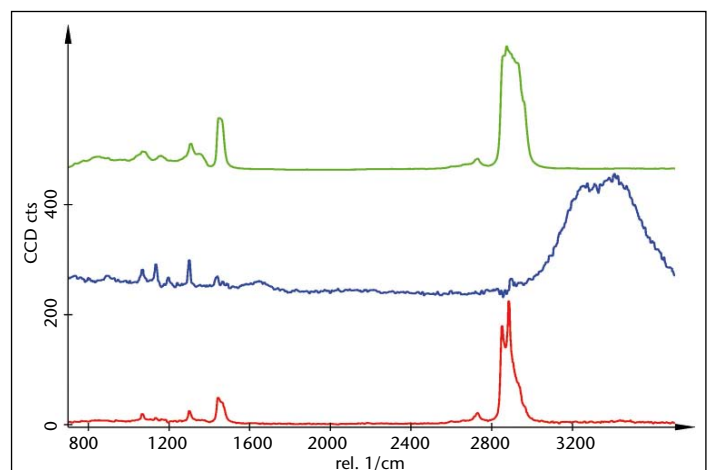


ABB. 1B: Korrespondierende Spektren (entmischt); Öl (grün), Alkan (rot) und Wasser (blau).

einem extrem empfindlichen Raman-Spektrometer 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 z.B. 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 konfokalen Raman Mikroskops spezielle Aufmerksamkeit auf einen hohen optischen Durchsatz und eine 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 1 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.

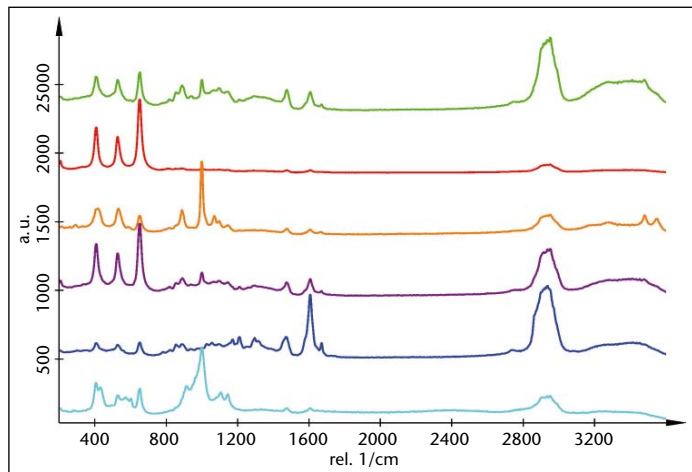


ABB. 2B: Zugehörige gemittelte Spektren der sechs Zahnpasta-Komponenten aus der Cluster Analyse.

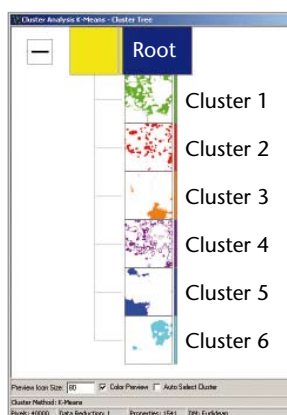


ABB. 2A: Cluster Baum: Ergebnis einer Cluster Analyse von Bilddaten, die von einer Zahnpasta-Probe gewonnen wurden.

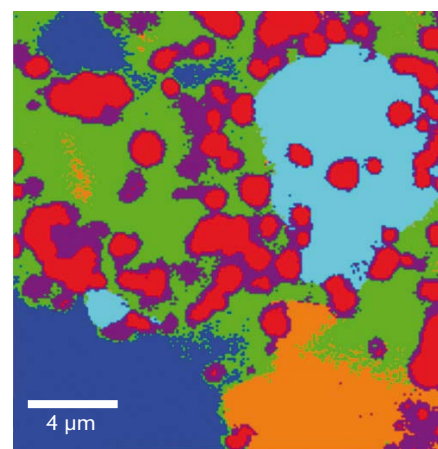


ABB. 2C: Raman Bild von der lateralen Verteilung der Zahnpasta-Komponenten.

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 speziellen Software Paketen lässt sich diese Art von Datenverarbeitung einfach und schnell umsetzen. Zieht man beispielsweise Methoden der multivariaten Datenanalyse wie die Cluster Analyse zur Auswertung heran, lassen sich chemisch bzw. spektral ähnliche Bereiche örtlich gruppieren und darstellen. Der Nutzer benötigt dann für diese Auswertung keine a priori Kenntnisse über die Probe sondern es reicht aus, die Anzahl der Komponenten zu schätzen. Eine objektive, schnelle und konsistente Interpretation der Daten ist damit ge-

währleistet. Im folgenden Beispiel wurden die Raman Imaging Daten, welche an einer Zahnpaste Probe aufgenommen wurden, der Cluster Analyse unterzogen. Auf der Probe wurden $20 \times 20 \mu\text{m}$ mit 200×200 Pixel (40.000 Spektren) gescannt. Die Aufnahmezeit pro Spektrum betrug $0,76 \text{ ms}$ und damit 42 s für das gesamte Bild. Abbildung 2a zeigt den Cluster-Baum hinsichtlich der Verteilung von sechs ausgewählten Komponenten wie ihn ein Software Paket von WITec ausgibt. Die zugehörigen gemittelten Spektren sind in Abbildung 2b dargestellt. Kombiniert man nun die 6 Bildkomponente-Cluster in einem Bild erhält man die laterale Verteilung der Zahnpasta-Phasen wie sie Abbildung 2c zeigt.

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.

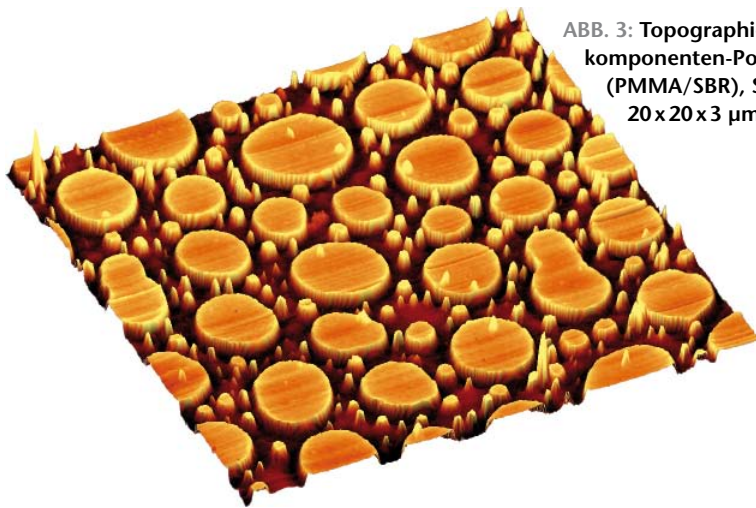
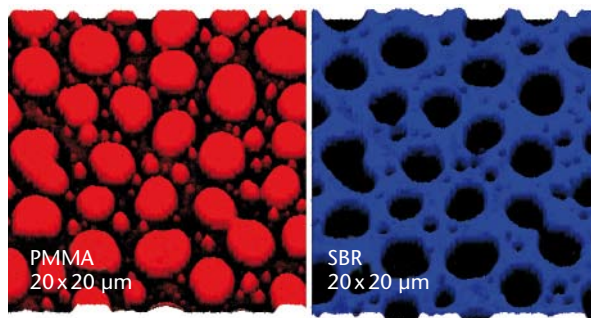


ABB. 3: Topographie einer Zwei-komponenten-Polymermischung (PMMA/SBR), Scanbereich: 20 x 20 x 3 µm.



▶ ABB. 4: Raman-Bilder als Resultat der Integration über die nur für PMMA oder SBR charakteristischen Raman-Peaks.

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. Mit einem modularen Design von Mikroskopiesystemen kann ein konfokales Raman Mikroskop mit einem AFM aufgerüstet werden, 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 (Abb. 3) zeigt zum Beispiel ein 2 Komponenten-Polymergemisch aus Polymethylmetacrylat (PMMA) und Styrolbutadienrubber (SBR). Es sind inselartige ca. 2–30 nm hohe Strukturen erkennbar, deren Durchmesser zwi-

schen 150 nm und 4 µm liegen. Eine genaue Zuordnung der beiden Polymere zu den im AFM beobachteten Strukturen ist jedoch nur schwierig möglich.

Durch die Aufnahme eines Ramanbildes mit dem kombinierten Gerät gelingt die Zuordnung sehr einfach: Die Spektren von reinem PMMA und SBR unterscheiden sich in definierten Peaks. Zieht man nun genau diese Peaks durch Integration über die jeweilige Peakfläche zur Bildgebung heran, erhält man zwei unterschiedliche Bilder (Abb. 4). Mit dieser Aufnahmetechnik ist erkennbar, dass die beiden Polymere keine homogene Schicht bilden, vielmehr umlagert SBR die Inseln aus PMMA. Dieses Beispiel spiegelt auch die Empfindlichkeit des Systems wider: Trotz der geringen Schichtdicke (<50 nm) betrug die Integrationszeit pro Spektrum nur 70 ms.

Fazit und Ausblick

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.

Neben der hier beschriebenen Kombination von Raman und AFM sind in Zukunft weitere Kombinationen dieser beiden Techniken mit oberflächenanalytischen Methoden denkbar. Auch gibt es Ansätze die Raman Mikroskopie in der medizinischen Diagnostik einzusetzen. Histopathologische Proben könnten damit ohne aufwändige Probenpräparation automatisiert untersucht werden um die Befunde schneller in die Behandlung einfließen zu lassen.



▶ DIE FIRMA

WITec GmbH

WITec ist ein weltweit operierender Hersteller von leistungsfähigen und innovativen, hochauflösenden Mikroskopen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der optischen und der Rastersonden-Mikroskopie. Eine modulare Produktlinie erlaubt die Kombination verschiedener Mikroskopietechniken wie Raman, SNOM oder AFM in einem Gerät und ermöglicht so die umfassende chemische, strukturelle und optische Analyse einer Probe. Mit Hauptsitz in Ulm, unterhält WITec eine Niederlassung in Maryville, TN, USA.

www.WITec.de