

## Рамановская микроскопия, связанные с ней понятия и определения

В настоящей статье мы рассмотрим совокупность терминов и понятий, возникающих при объединении в одном оптическом инструменте возможностей рамановского спектрометра и оптического микроскопа.

Многие современные профессиональные рамановские спектрометры производитель по умолчанию стыкует с оптическим микроскопом. Такие приборы, называемые рамановскими микроскопами или *микроспектрометрами*, обладают рядом важных преимуществ относительно обычного спектрометра. Поскольку в таком приборе возбуждающий лазер фокусируется в малой области вблизи фокуса объектива микроскопа размером порядка длины волны излучения, то из этой же области идет и спектральный рамановский сигнал. Тем самым мы обеспечиваем локализацию измерений с возможностью привязки спектров к различным точкам поверхности образца.

Если же в микроскопе дополнительно используется трехмерная пространственная оптическая фильтрация, то есть микроскоп оказывается конфокальным, то прибор именуется *конфокальным микроспектрометром*. Важно знать, что использование конфокальной схемы с достаточно малой апертурой позволяет обеспечить трехмерную локализацию измерения спектра. Можно исследовать оптически прозрачный объемный образец послойно, причем каждый слой образца (толщиной ~ 1 мкм) можно изучать отдельно, не разрушая образец и не изготавливая поперечных срезов, как таковых.

Заметим также, что поскольку весь световой поток лазера фокусируется в небольшой прифокальной области, а сильный объектив микроскопа собирает большую часть рассеянного света, даже малой мощности лазера (~1 мВт) оказывается достаточной для эффективной работы прибора. С другой стороны, трехмерная пространственная фильтрация в микроскопе благодаря конфокальной диафрагме (апертуре) позволяет вообще избавиться в приборе от входной щели, и тем самым обойти давнюю проблему оптической спектроскопии – необходимость компромисса между светосилой прибора и его разрешающей способностью.

Все профессиональные рамановские приборы компании HORIBA Scientific (T64000, LabRAM HR, XploRA Plus/Inv) являются конфокальными микроспектрометрами.

Микроспектрометры как правило оснащаются высокоточными моторизованными сканирующими столиками для выполнения двумерной (а в случае конфокального микроспектрометра и трехмерной) поточечной съемки спектров из заданной области (объема) образца. Такой режим работы называется также *рамановским картированием*. Результатом измерения образца в таком режиме является *рамановский атлас* или *рамановское изображение* образца.

Получение рамановских спектральных изображений - это мощная методика для создания подробных химических изображений, основанных на рамановских спектрах образца. В каждой точке образца снимается полный спектр, затем на основе массива спектров создается псевдо цветное изображение, содержащее информацию о составе и структуре материала:

- Интенсивность рамановского пика позволяет визуализировать концентрацию и распределение вещества
- Положение рамановского пика дает изображение молекулярной структуры и фазы, внутренних напряжений
- Ширина рамановского пика выявляет кристаллическую структуру и фазу

Рамановские спектральные изображения предоставляют информацию об образце, которая не может быть получена с помощью традиционной оптической микроскопии. В частности они могут использоваться для определения:

- Распределения компонент и определения размеров зерен или частиц.
- Изменений кристаллической структуры или фазы в образце
- Размера и формы частиц примесей
- Взаимодействия и смешивания компонент на границе фаз
- Распределения внутренних напряжений и деформаций по образцу

Таким образом, на основе одного набора данных могут быть созданы различные спектральные рамановские изображения, которые позволяют исследователю существенно продвинуться за пределы того, что может видеть обычный микроскоп (пример на Рис. 1).

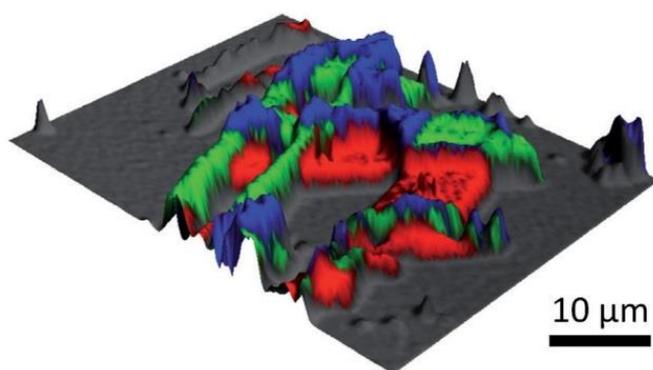


Рис. 1. Слои графена на кремниевой подложке. Распределение по высоте отвечает интенсивности G-линии углерода; также разными цветами выделены области **моно-слоя**, **двойного слоя** и **тройного слоя** графена.

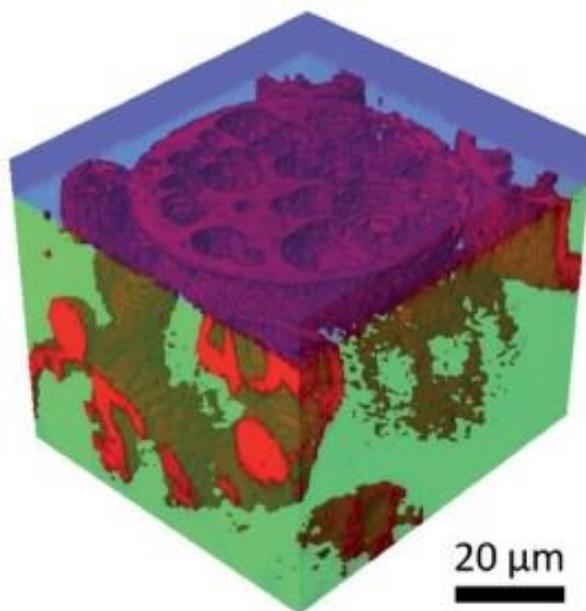
Рамановские изображения могут быть получены в одном, двух или трех измерениях:

1D: профиль по линии, профиль по глубине, по времени, температуре.

2D: XY карта, срезы в плоскостях XZ и YZ

3D: XYZ трехмерный массив спектров

Конфокальный рамановский микроскоп может использоваться для исследования особенностей расположенных ниже поверхности образца, в том случае, если материал образца прозрачен для лазера. Типичными примерами объектов для таких исследований являются включения жидкости или газа в образце, примеси в стекле и слоистые полимерные структуры (пример на Рис. 2).



*Рис. 2. 3D объемное изображение растекшейся капли полимера внутри полимерной матрицы. Также на изображении видны следы масла от использованного иммерсионного объектива.*

Время получения рамановского спектрального изображения зависит от многих параметров, в том числе от размера области изображения, количества точек (пикселей) и времени экспозиции в каждой точке (что в свою очередь зависит от интенсивности рамановского сигнала, получаемого от образца, и требуемого спектрального качества). Большее время измерения обеспечивает предельную чувствительность для работы с веществами, обладающими очень слабым рамановским откликом, и позволяет проводить измерения с высоким разрешением в большом спектральном диапазоне. Типичное рамановское спектральное изображение может содержать сотни, тысячи или даже миллионы спектров, и для его получения может потребоваться от нескольких секунд до нескольких дней, в зависимости от перечисленных выше условий.

Разработанные компанией HORIBA Scientific программно-аппаратные модули (DuoScan, SWIFT) для ультраскоростного картирования позволяют существенно снизить общее время измерения при использовании экспозиции меньше чем 1 мс на точку. При работе с такими скоростями обзорные сканы большой площади и детальные рамановские спектральные изображения могут быть выполнены за секунды или минуты (пример на Рис. 3).

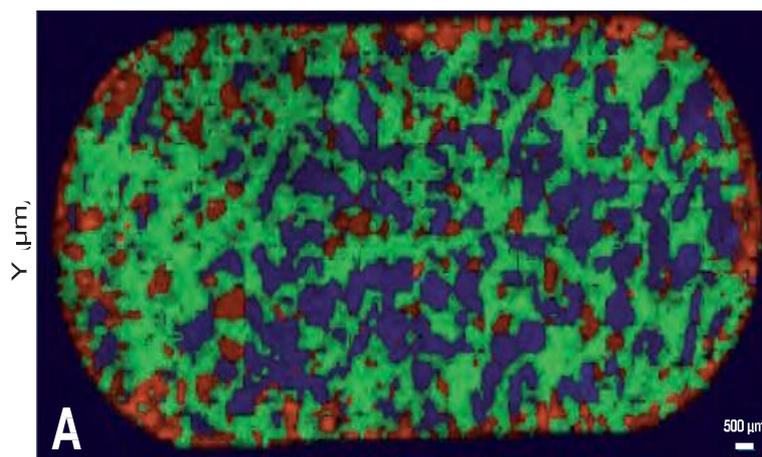


Рис. 3. Рамановская карта фармацевтической таблетки, 8240 точек, время съемки менее 400 сек.

Способы реализации ультраскоростного рамановского картирования различаются, но обычно в них осуществляется синхронизация перемещения столика образца и считывания детектора для минимизации задержек, которые возникают при проведении стандартных поточечных экспериментов.

Отметим, что ультраскоростное рамановское картирование не подходит для всех типов образцов, эффективность этого метода зависит от интенсивности рамановского сигнала образца и спектрального качества, необходимого для создания изображения.

Достижимое на рамановском микроскопе пространственное разрешение главным образом определяется длиной волны лазера и объективом микроскопа. Теоретически ограниченное дифракционным пределом пространственное разрешение в плоскости XY («латеральное») в соответствии с законами физики и оптики определяется по формуле:

Пространственное разрешение =  $0.61 \lambda / NA$ , где  $\lambda$  - это длина волны лазера, а  $NA$  - это числовая апертура объектива.

Для лазера 532 нм с объективом 0.90/100x это уравнение дает пространственное разрешение 361 нм.

Однако, в то время как это уравнение применимо к стандартной световой микроскопии, физические процессы, сопровождающие рамановское рассеяние, существенно более сложны. В частности, перерассеяние релеевских/рамановских фотонов и взаимодействие с поверхностью образца могут ухудшить разрешение.

Из вышеприведенного выражения можно видеть, что лазеры с меньшей длиной волны обеспечивают более высокое пространственное разрешение (в частности, синий лазер 488 нм будет иметь меньший размер пятна, чем инфракрасный 785 нм лазер при использовании одинаковых объективов), так же как и объективы с высокой числовой апертурой  $NA$  (в частности объектив 0.90/100x даст меньшее пятно, чем объектив 0.55/50x).

Заметим, что разрешение прибора по глубине ( $Z$ , или «аксиальное») определяется большим количеством параметров и сильно зависит от качества исполнения конфокальной схемы рамановского микроскопа, а также, разумеется, от длины волны лазера, апертуры объектива микроскопа и структуры образца.

Для профессиональных рамановских приборов компании HORIBA Scientific (T64000, LabRAM HR, XploRA Plus/Inv) производитель гарантирует пространственное разрешение на лазере возбуждения 532 нм, соответственно: 0.5 мкм латеральное и 1.5 мкм аксиальное. По этому показателю приборы HORIBA Scientific не имеют себе равных на рынке (пример на Рис. 4).

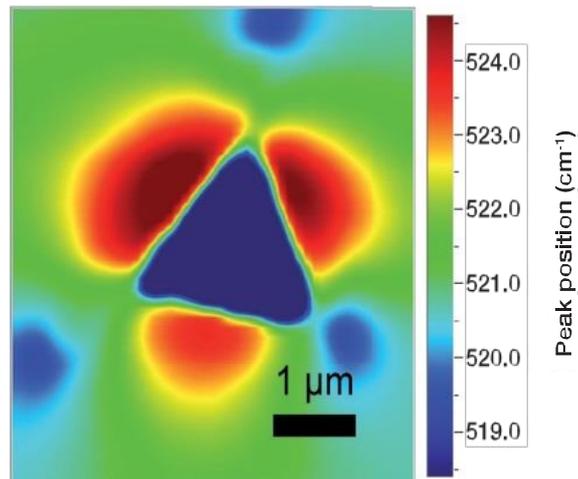


Рис. 4. Рамановская карта высокого разрешения с кремниевого образца, индентированного нано-зондом типа Берковича. Четко виден сдвиг пика кремния, вызванный локальной деформацией структуры вокруг углубления.