



Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, AVČR v.v.i.  
Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

## Mikroskopie rastrovací sondou II optické/analytické metody

**Pavel Janda**

*Laboratoř mikroskopie rastrovací sondou*

**Odd. elektrochemických materiálů**

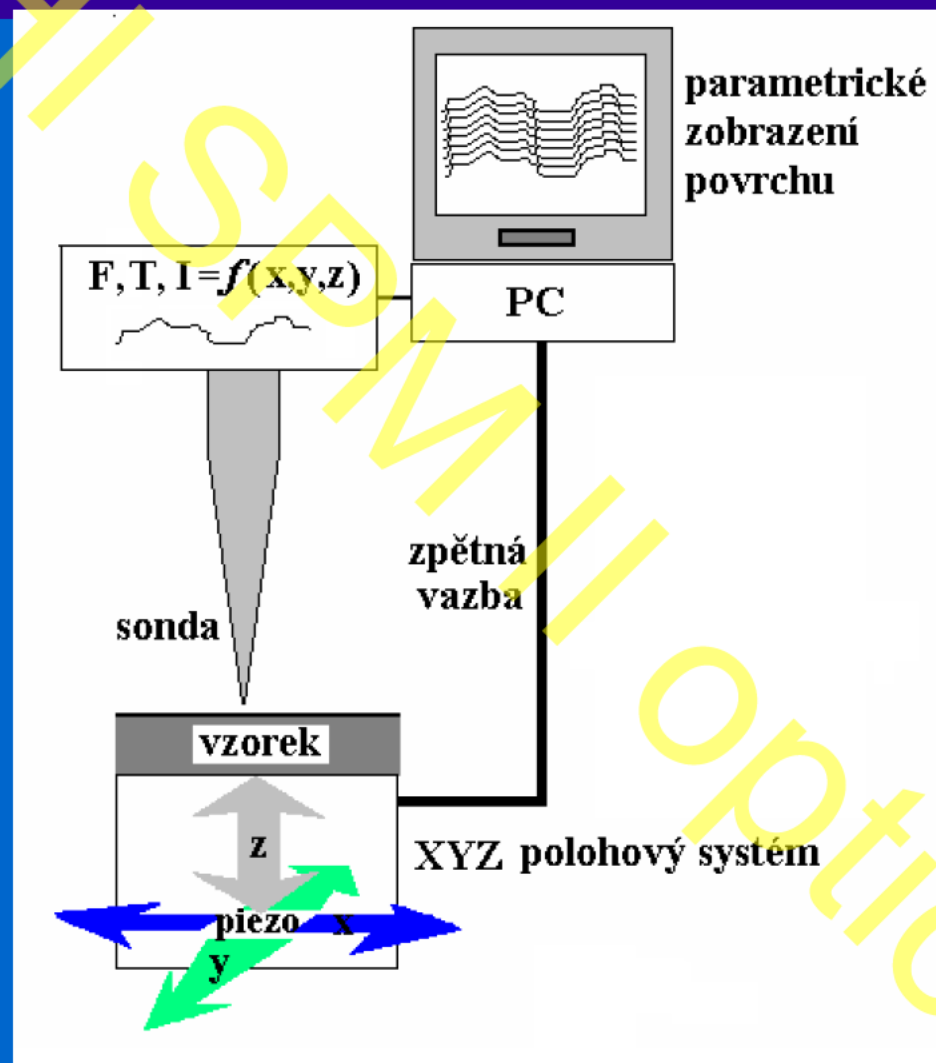
<http://www.jh-inst.cas.cz/>

<http://www.jh-inst.cas.cz/~janda>

[pavel.janda@jh-inst.cas.cz](mailto:pavel.janda@jh-inst.cas.cz)

# Mikroskopie rastrovací sondou

## Scanning Probe Microscopy



## Rozdělení SPM podle druhu přenášené informace

### Přenos náboje

Elektrony - tunelová mikroskopie (STM)

Ionty - elektrochemická mikroskopie (ECM)

**Silové interakce** - mikroskopie atomárních sil (AFM)

Dlouhého dosahu: magnetické, kulombické

Středního dosahu: van der Waals (dipol-dipol, indukce dipol-nepolar., kapilární síly: kapalina-sonda...)

Krátkého dosahu: vazebné interakce (atraktivní)  
repulzivní (deformační)

### Přenos elektromagnetického záření

UV/Vis/IR - optická mikroskopie/spektroskopie blízkého pole

**Scanning Near-Field Optical Microscopy (SNOM/NSOM)**

(IR - Thermal Microscopy (ThM))

Hrotem zesílená optická mikroskopie/spektroskopie

**Tip-Enhanced Near-Field Optical Microscopy (TENOM)**

**Raman Spectroscopy (TERS)**

**Fluorescence Microscopy/Spectroscopy (TEFM/S)**

## Rozdělení mikroskopických metod podle rozlišení

**OPT:** optická mikroskopie vzdáleného pole

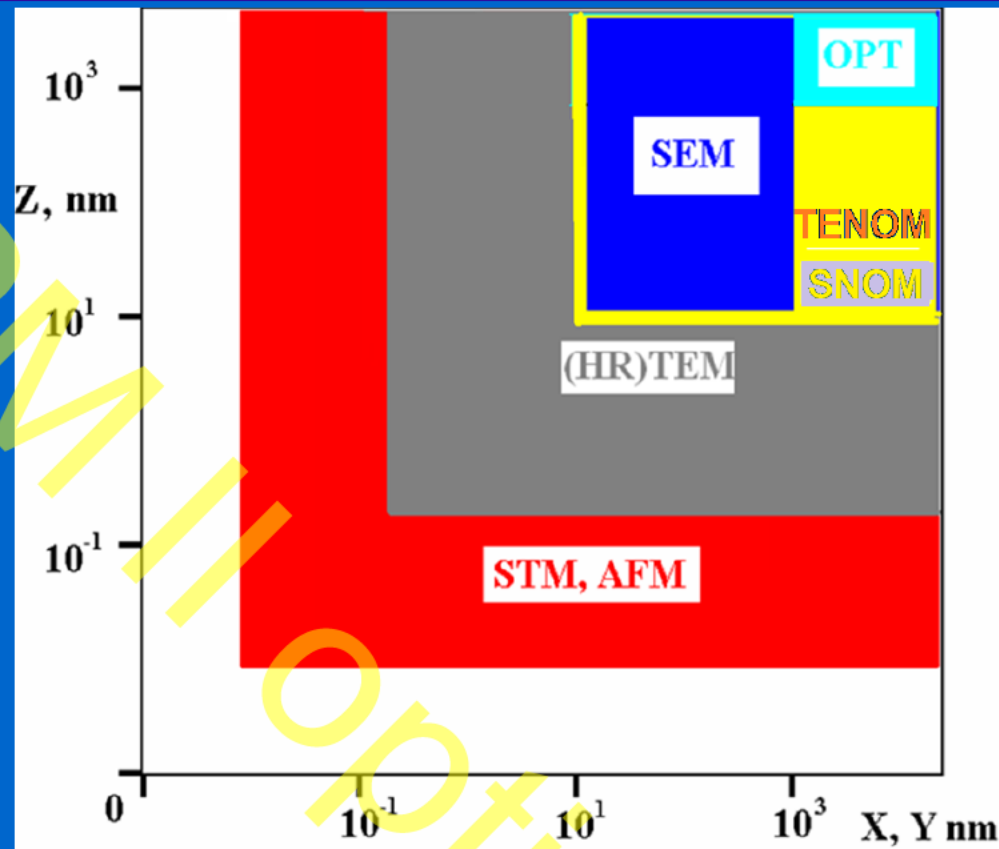
**SNOM:** Mikroskopie blízkého pole

**TENOM:** Hrotem zesílená mikroskopie/spektroskopie blízkého pole

**SEM:** Skenovací elektronová mikroskopie

**HRTEM:** Transmisní elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením

**STM, AFM:** Tunelová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil



•  
•  
•

**Optická mikroskopie a spektroskopie  
v mikroskopii rastrovací sondou**

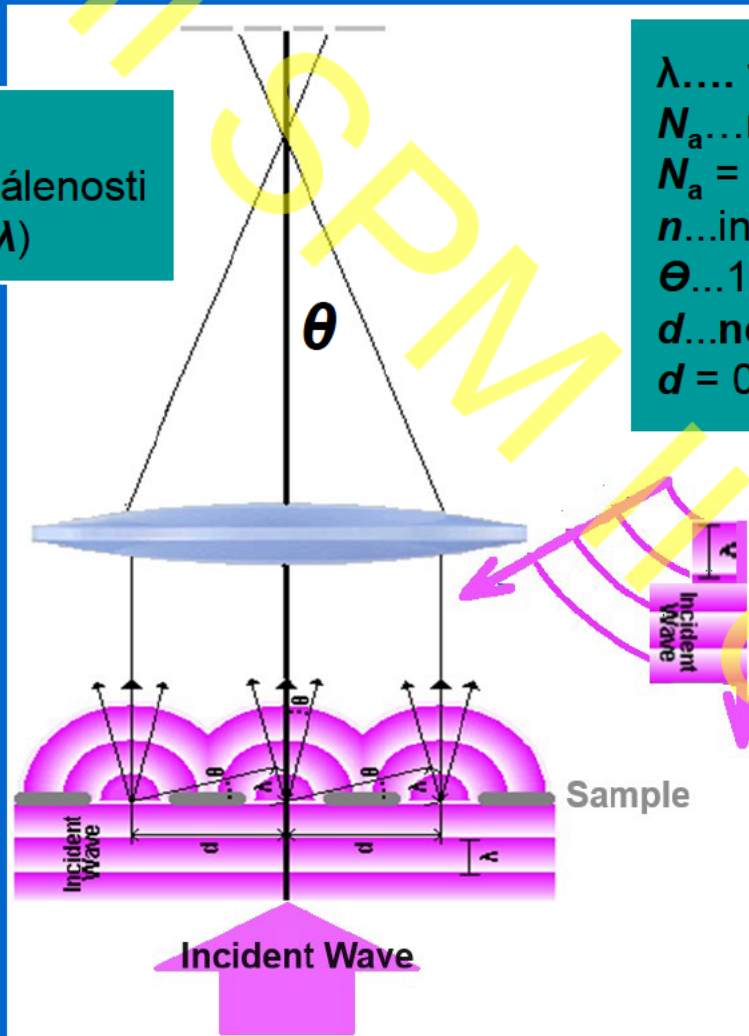
Optic

•  
•  
•  
•  
•  
•  
•  
•

# Mikroskopie vzdáleného pole

## Far field

snímací prvek ve vzdálenosti  $z \gg \lambda$  (typicky  $z \gg k\lambda$ )



$\lambda$ ... vlnová délka

$N_a$ ... numer. Apertura ( $\Rightarrow$  rozliš. schopnost)

$$N_a = n \sin \Theta$$

$n$ ... index lomu (vzduch 1)

$\Theta$ ... 1/2 max. úhlu paprsku k ose

$d$ ... nejmenší rozlišená vzdálenost

$$d = 0.61\lambda/N_a$$

Pro  $\lambda = 500$  nm (vis)

$$N_a = 0.9$$

$$\Rightarrow d \geq \sim 340$$
 nm

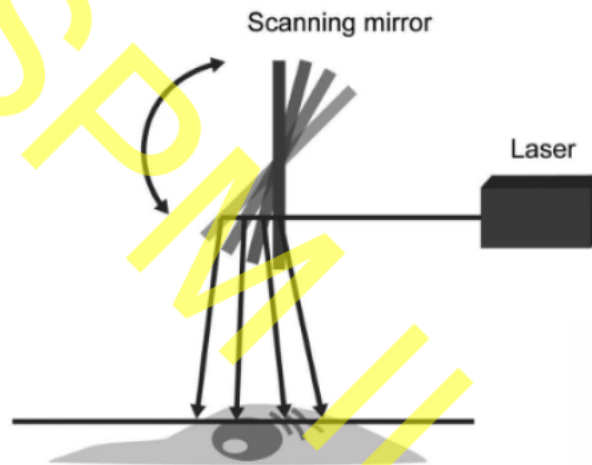
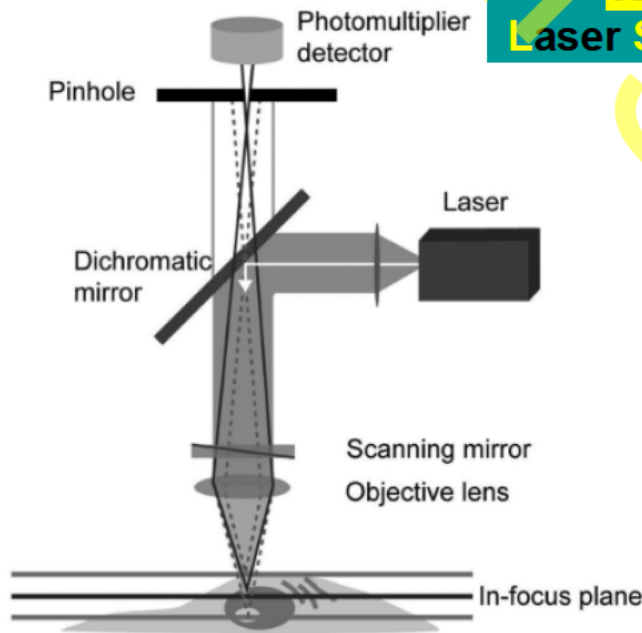
Roz řešení – kvalita optiky

*Kriteria Abbe/Rayleigh*

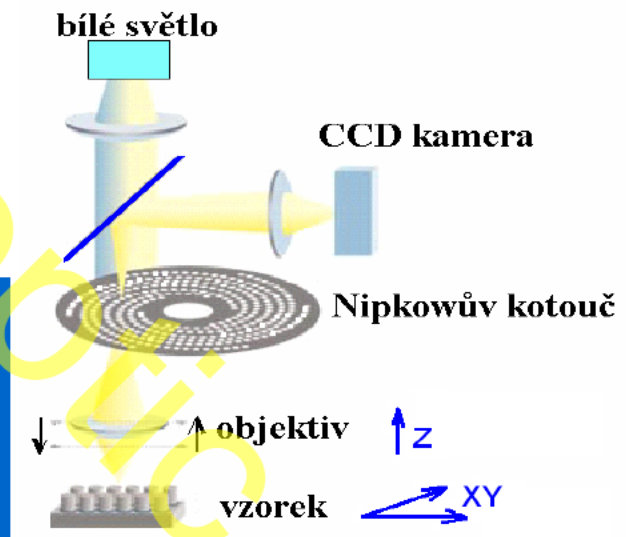
- barevná disperze
- difrakční limit
- index lomu
- vstupní úhel

# Rastrovací princip v mikroskopii vzdáleného pole

## 3D konfokální rastrovací mikroskop Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM)



## Spinning Disk Confocal Microscopy (SDCM)

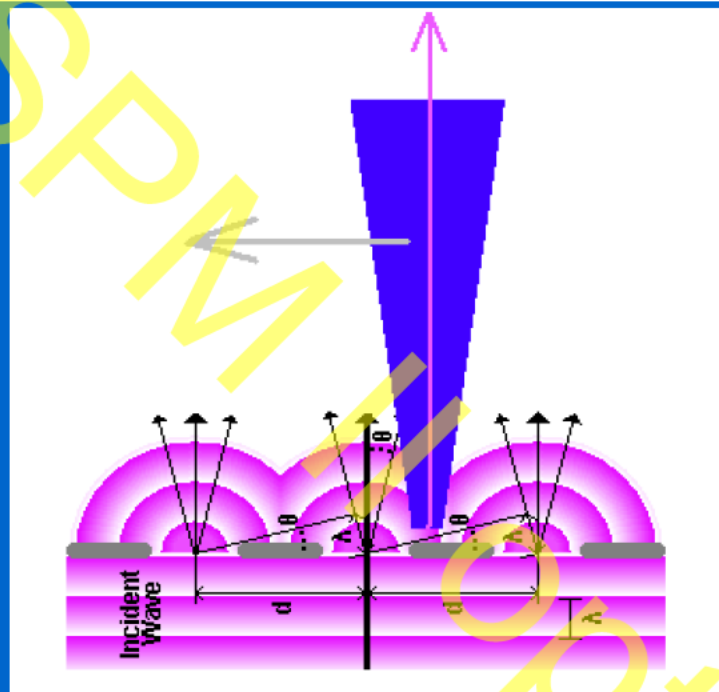


- 1) Snímá obraz povrchu fokusací na jediný bod v úzkém rozmezí hloubky fokusace – bod po bodu.
- 2) Úzká apertura (clona) zabraňuje nefokusevaným (*out-of-focus*) paprskům účastnit se tvorby obrazu
- 3) Snímání více 2D obrazů v různé hloubce vzorku  
=> Rekonstrukce 3D struktur (*optical sectioning*)  
=> **Dosahuje vyššího rozlišení a kontrastu**

# Mikroskopie a spektroskopie blízkého pole

## Scanning Nearfield Optical Microscopy (SNOM/NSOM)

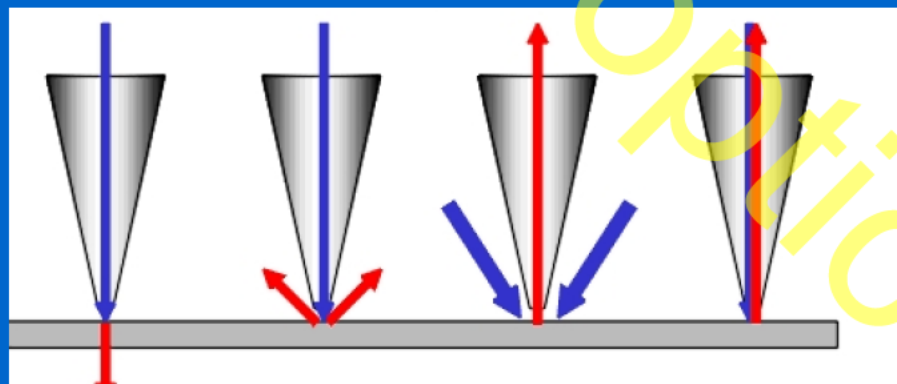
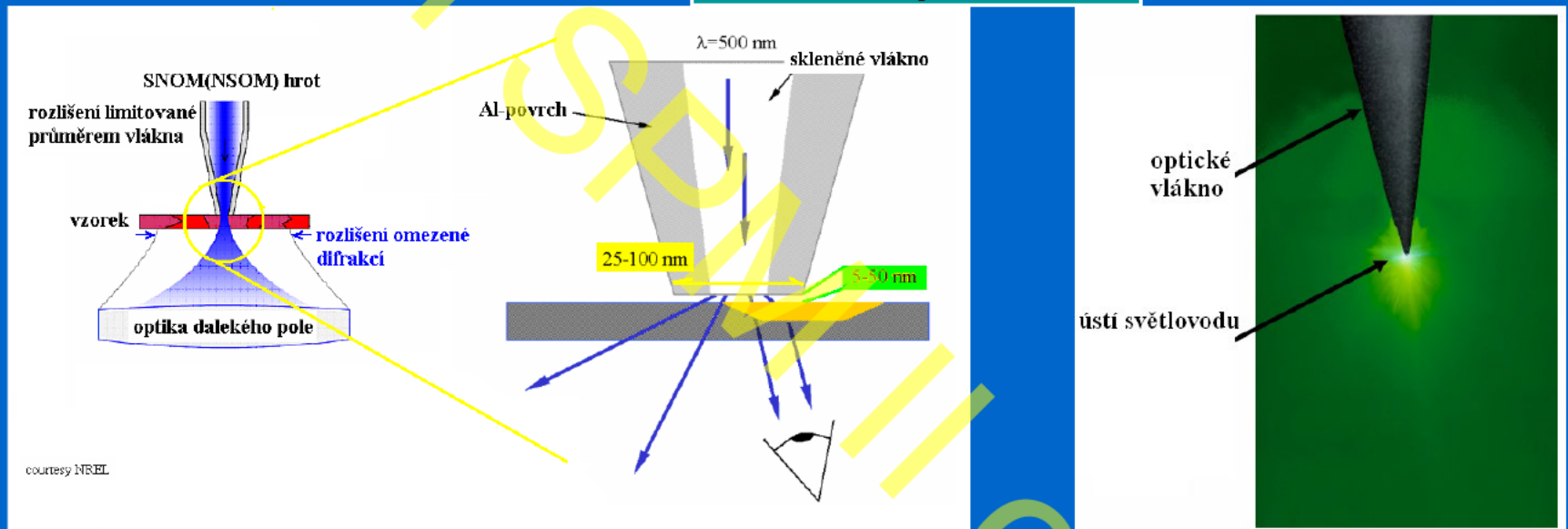
**Near field** –  
snímací prvek ve vzdálenosti  
 $z < \lambda$



Rekonstrukce obrazu snímaného bod po bodu  
z malého fragmentu vlnoplochy  
Nejmenší rozlišená vzdálenost  $d \sim$   
 $\Rightarrow$  **apertura sondy  $N_a$** ,  
 $\Rightarrow$  vzdálenost od povrchu vzorku  $z$

# Mikroskopie a spektroskopie blízkého pole

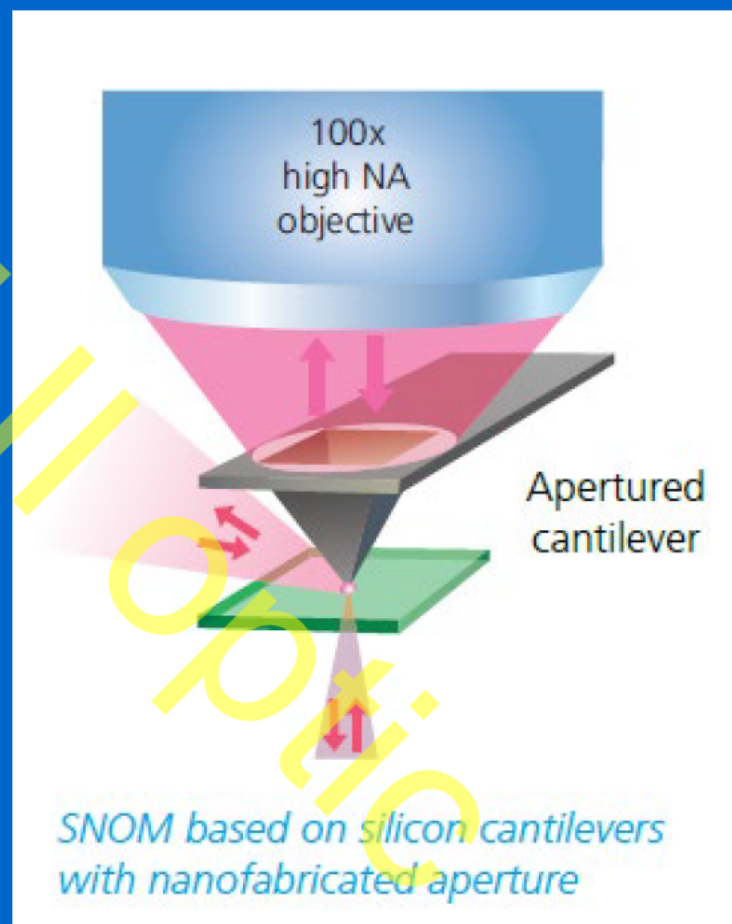
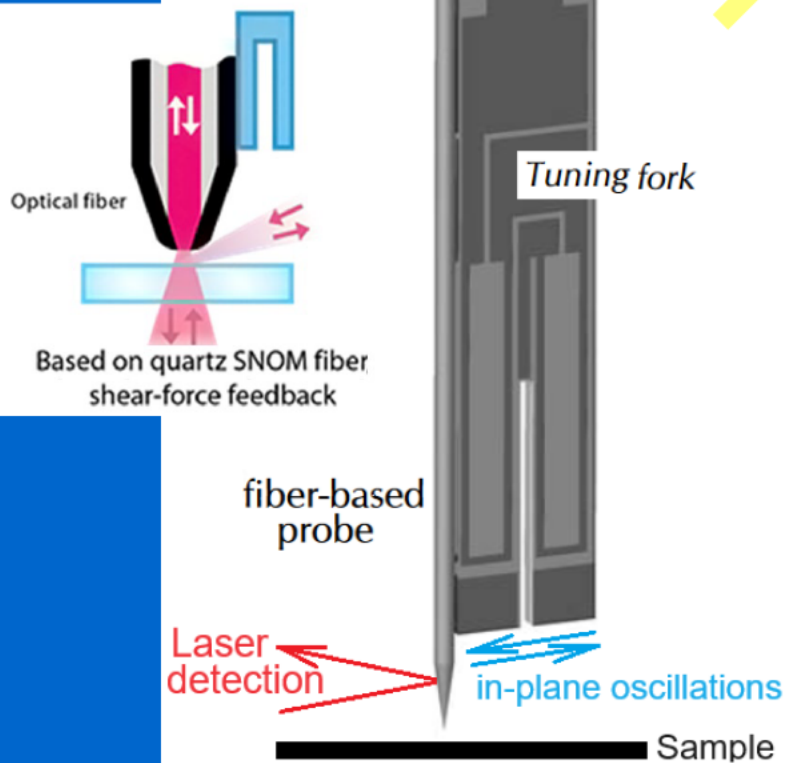
## SNOM s aperturou



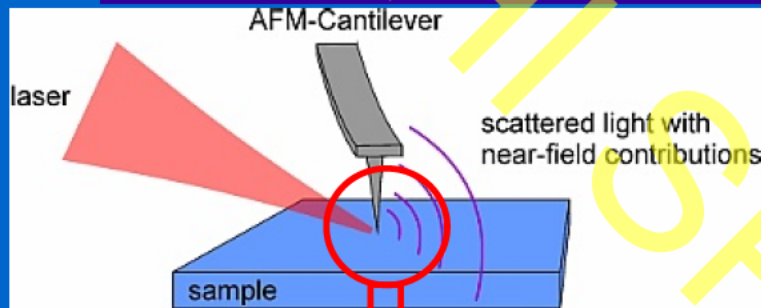
# Mikroskopie a spektroskopie blízkého pole

## SNOM s aperturou

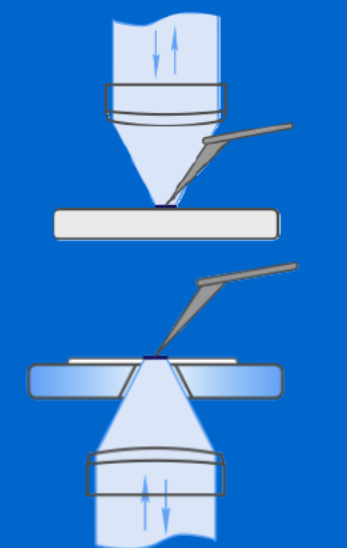
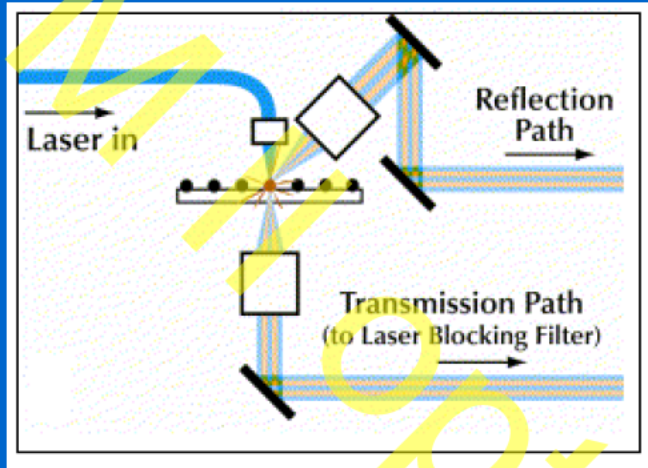
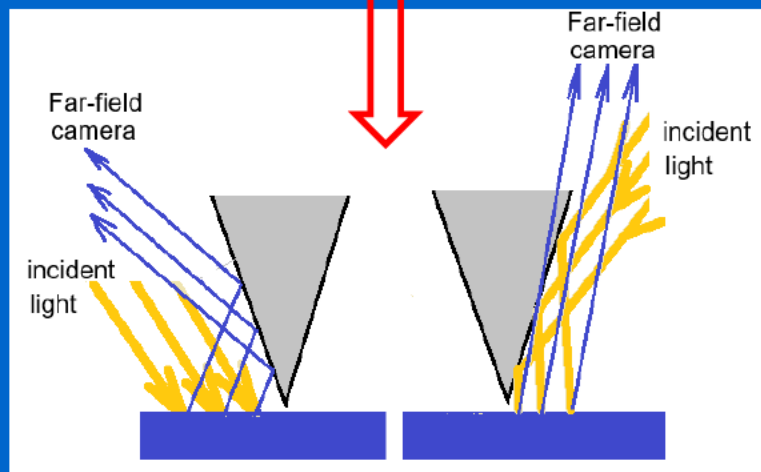
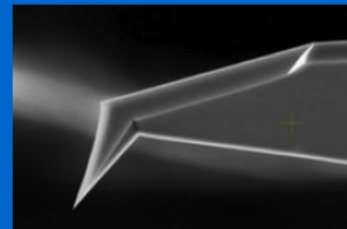
Shear force (piezo) detection  
Optical fiber (Self-sensing)



# Mikroskopie a spektroskopie blízkého pole



SNOM bez apertury -  
**Scattering SNOM (s-SNOM)**

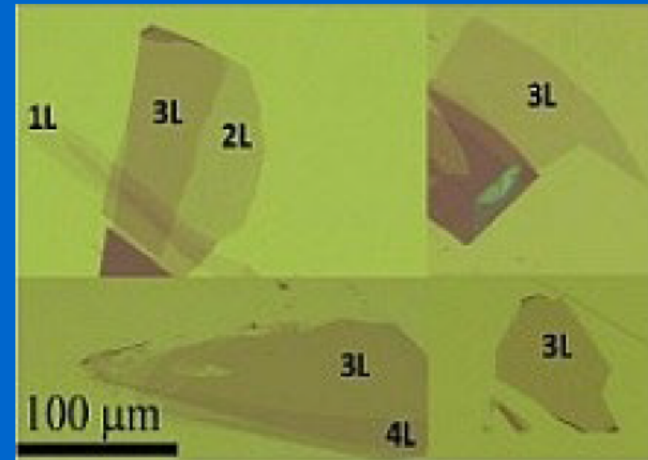
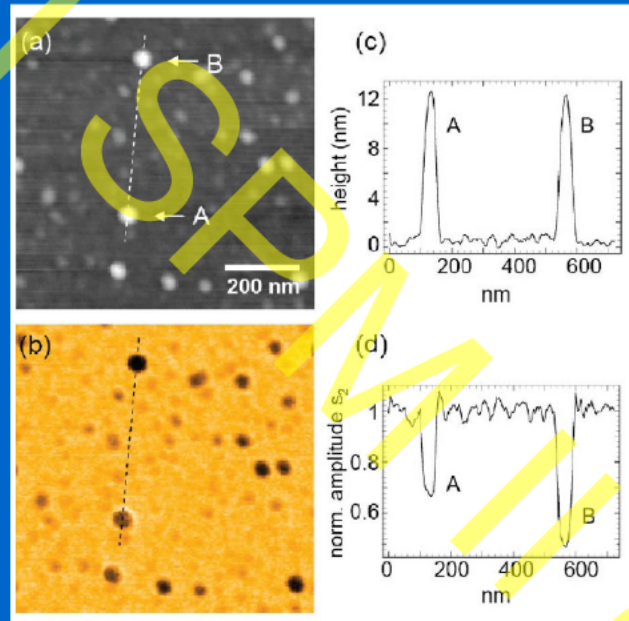
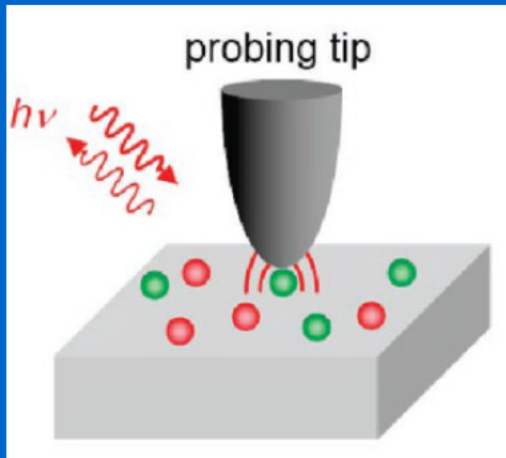


Pracuje se světlem odraženým  
(dispergovaným) zrcadlovým povrchem  
vrchlíku hrotu SPM

A. Bek, R. Vogelgesang, K. Kern: Apertureless scanning near field optical microscope with sub-10nm Resolution, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS 77, 043703 (2006)

# SNOM – materiálový kontrast

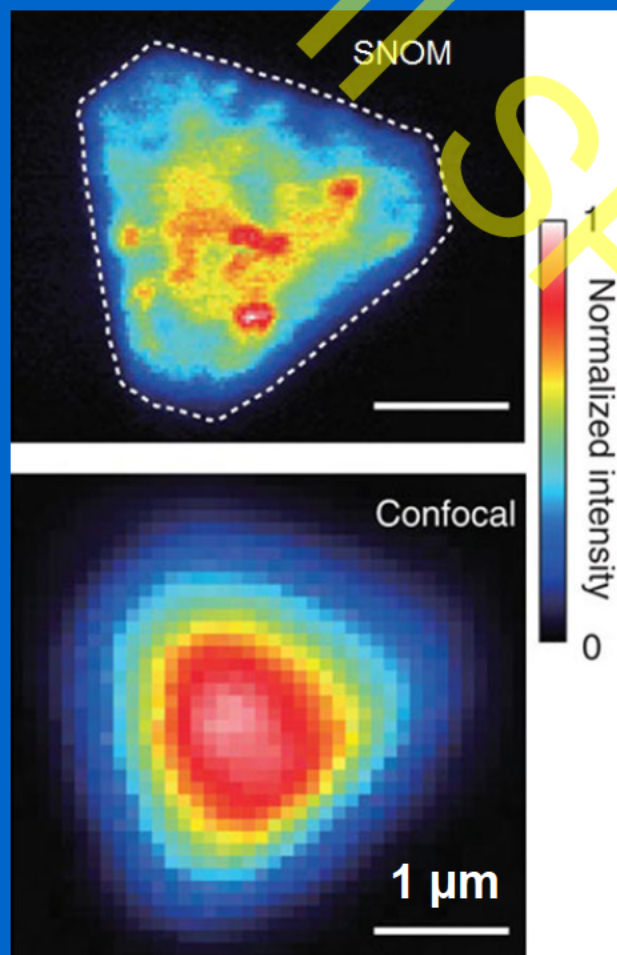
## Reflexní (s-)SNOM bez apertury



s-SNOM  
rozlišení ~10 nm Au, PS  
nanočástic v binární směsi  
immobilizované na Si substrátu.  
( $\lambda = 10.6 \mu\text{m}$ )

Materiálový kontrast dovoluje  
optické odlišení 1, 2, 3, 4  
grafénových vrstev (na  $\text{SiO}_2$ )  
s rozdíly v tloušťce ~0.6 nm

# Luminiscenční SNOM

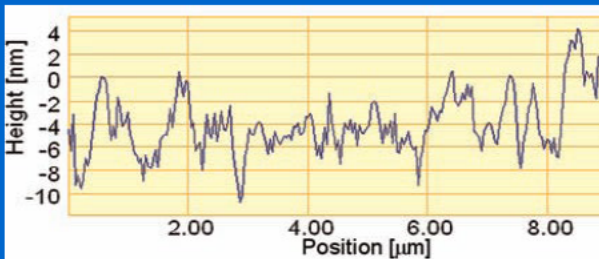
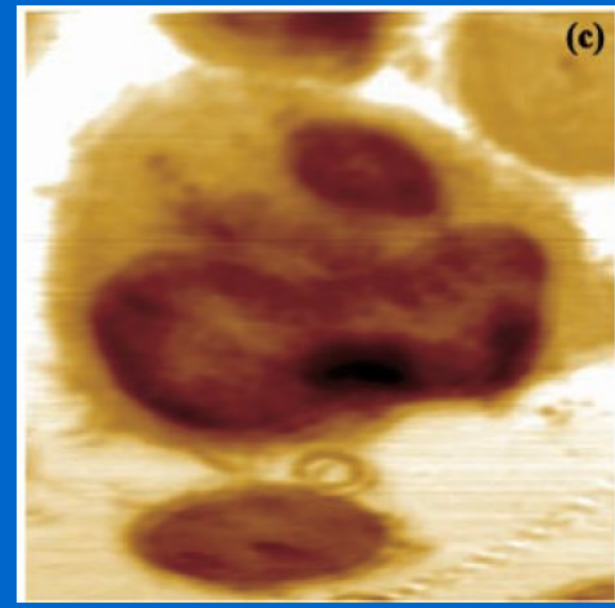
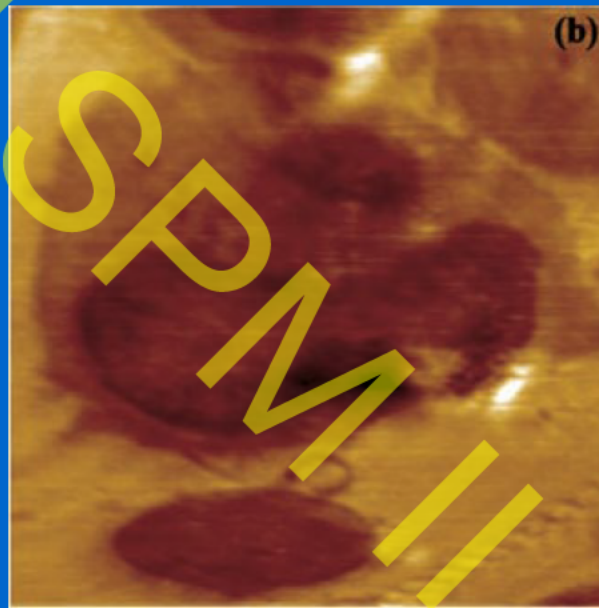
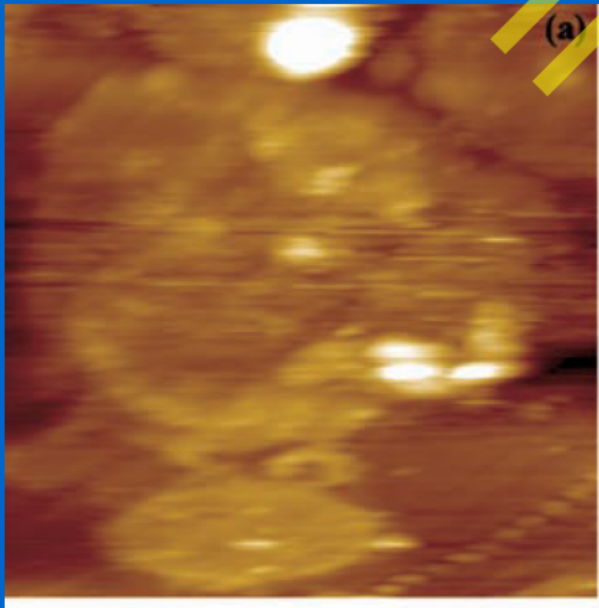


Near Field

Fotoluminiscenční mapa MoS<sub>2</sub>

Far Field

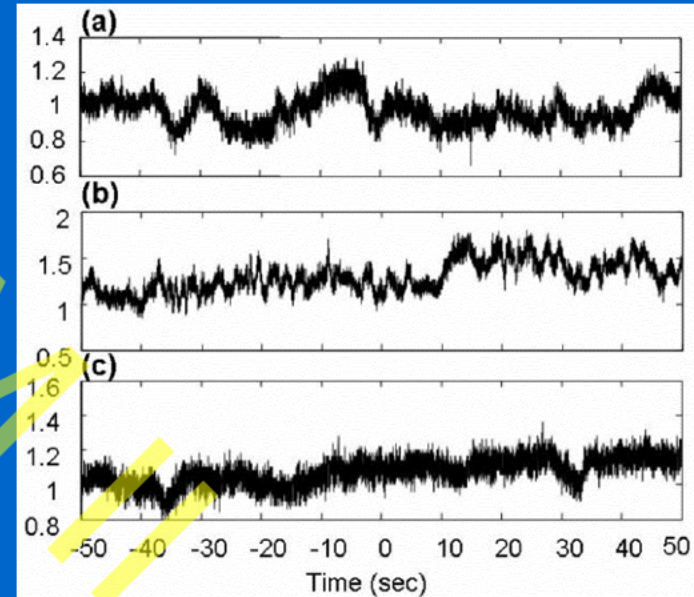
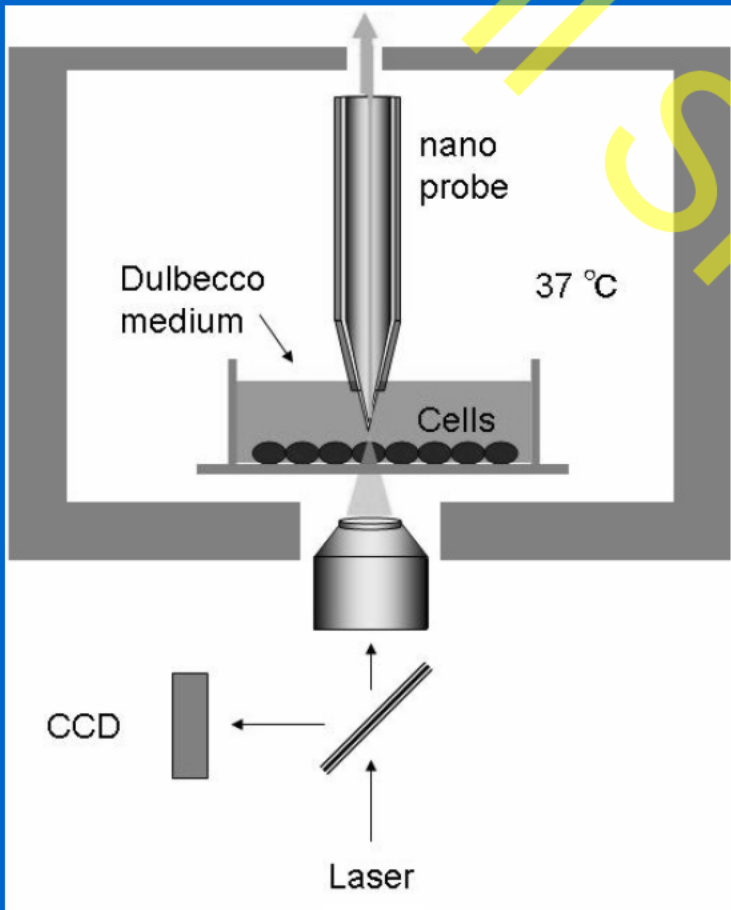
## Zobrazení technikou SNOM



AFM topography (a), SNOM (b,c) images on ultrathin sections of apoptotic Jurkat cells embedded in araldite resin; SNOM optical reflection (b) transmission (c). Scan area 25  $\times$  25  $\mu\text{m}$ .

## AFM/SNOM

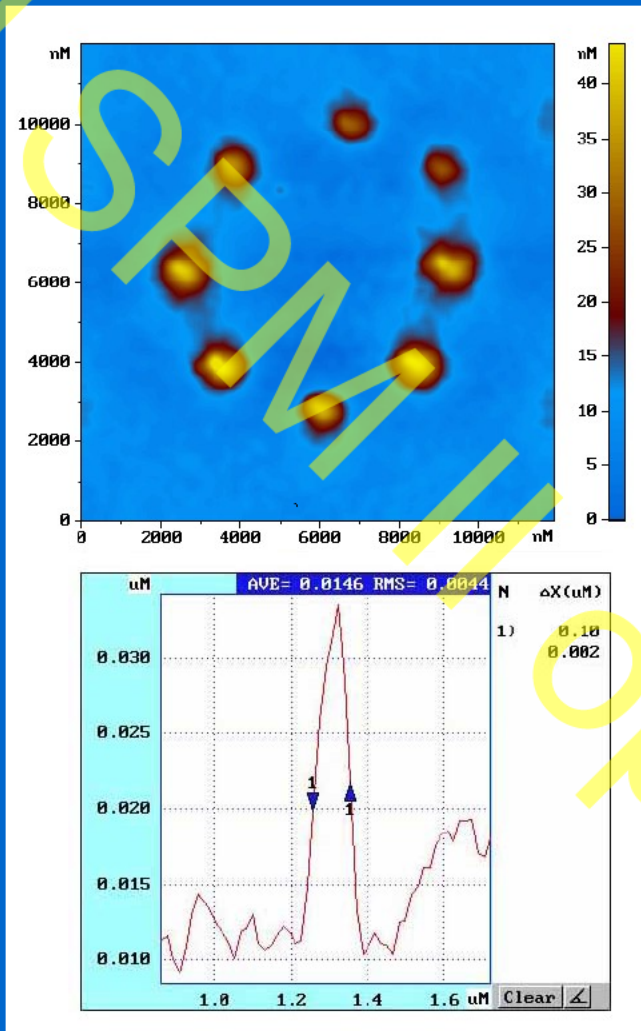
### bezkontaktní snímání vibrací buněčných membrán



Time profile of neuroendocrine tumor cell recordings: Normal conditions (a)  
With Nerve Growth Factor 24h (b)  
Necrosis - 4h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c)  
Time frame 100 sec for each recording

Pohyby buněčné membrány indikují fyziologický stav buňky

# SNOM litografie



# Nanočásticový zesilovač světla

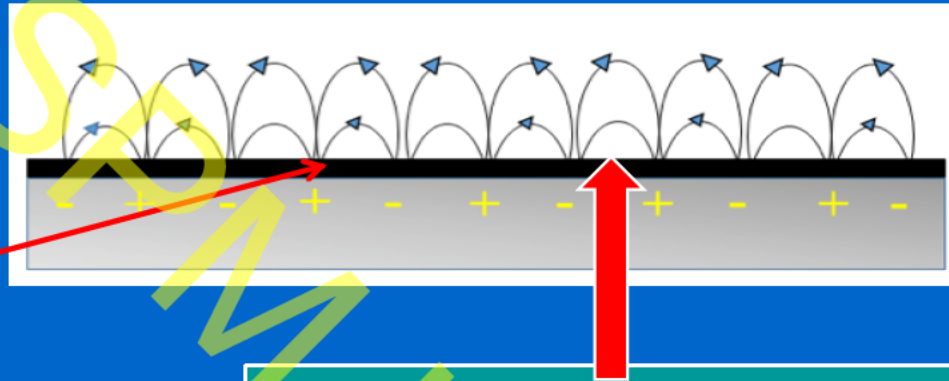
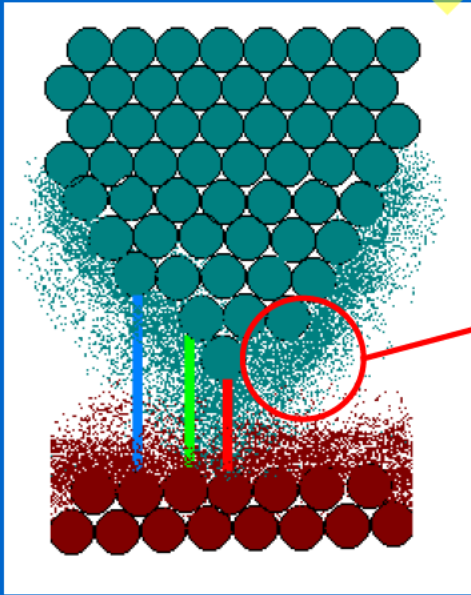
## Plasmonové rezonanční zesílení světla

**Povrchové zesílení**  
**Surface Enhanced (SE)**



**Zesílení hrotem**  
**Tip Enhanced (TE)**

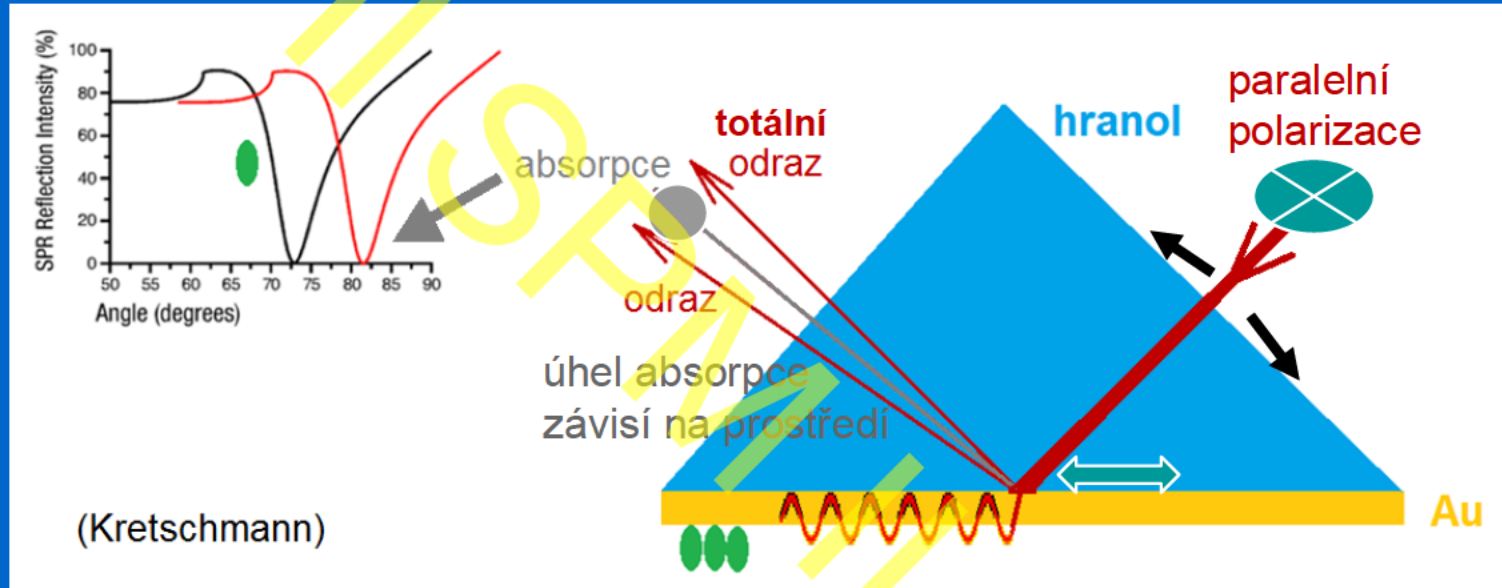
## Elektronová hustota na mezifází vodič/dielektrikum



Vlna elektronové hustoty postupující podél mezifází kov–dielektrikum (elektronová „kapalina/plasma“ [Maxwell]). Oscilace nábojové hustoty a elmag. pole = povrchová vlna => **Plasmon (polariton)**.

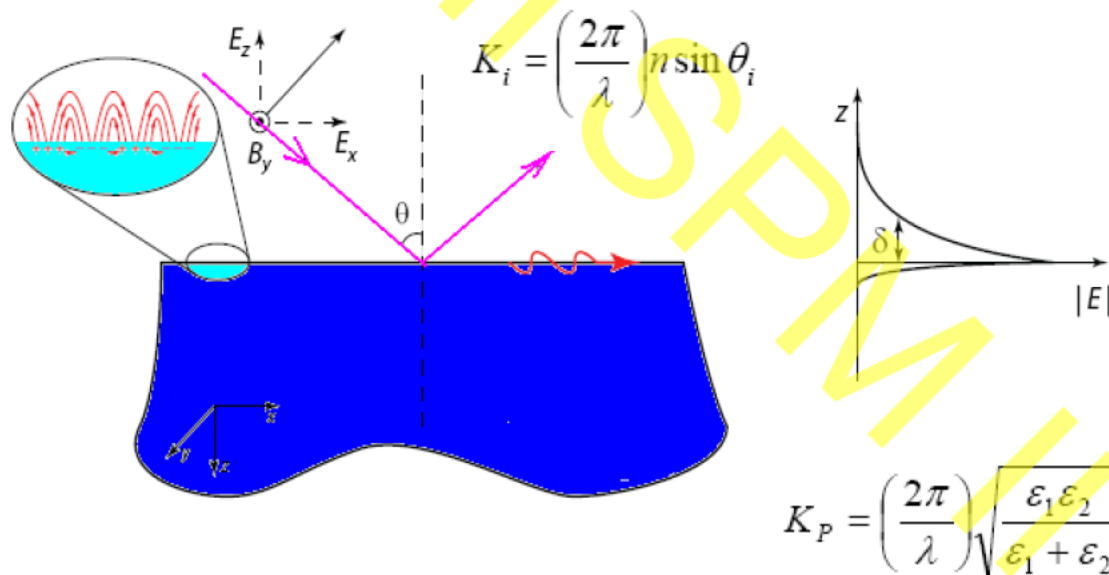
$I_T \sim V_B f_{mTS}(V_B) \exp[-2z\sqrt{(2m\Phi_{ST}/\hbar^2)}]$   
 $\hbar = h/2\pi$ ,  $f_{mTS}(V_B)$ ...redukovaná Planck.  
konst.  
 $z$ ...vzdálenost hrot-vzorek ( $\sim 10^{-1}$  nm)

## Povrchový plasmon neradiační – povrchová vlna



**Povrchový plasmon (*polariton*):** Neradiační (nevyzařující) elektromagnetická povrchová vlna, šíří se podél mezifází materiálů s negativní permitivitou (vodič) a dielektrikem (prostředí - plyn, kapalina, vakuum) => její parametry jsou citlivé na změny mezifází – např. adsorpce, vazebné interakce na vodiv. povrchu

# Povrchový plasmon a povrchová plasmonová resonance (SPR) neradiační – povrchová vlna



## Teor. modely:

R. Ritchie 1957

Drude-Lorentz-Sommerfeld,  
Novotny,

kvant. teorie...

$E_p$  elmg. pole: el. složka polarizovaná paralelně s mezifázím,

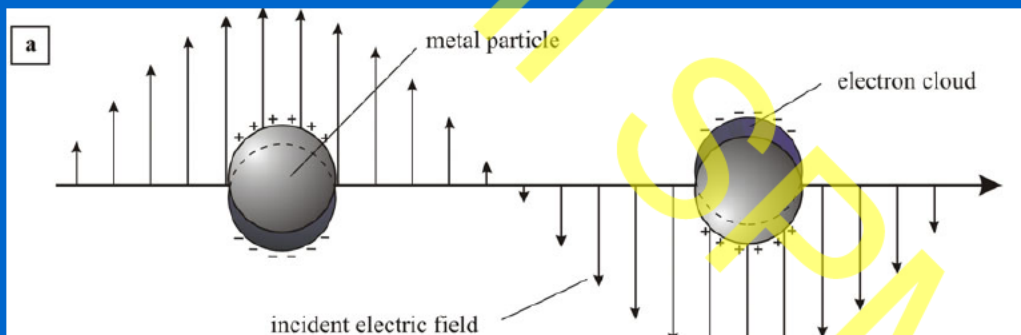
$K_i, K_p$  vlnové vektory dopadajícího elmg. pole a plasmonu,

v resonanci  $K_i = K_p$

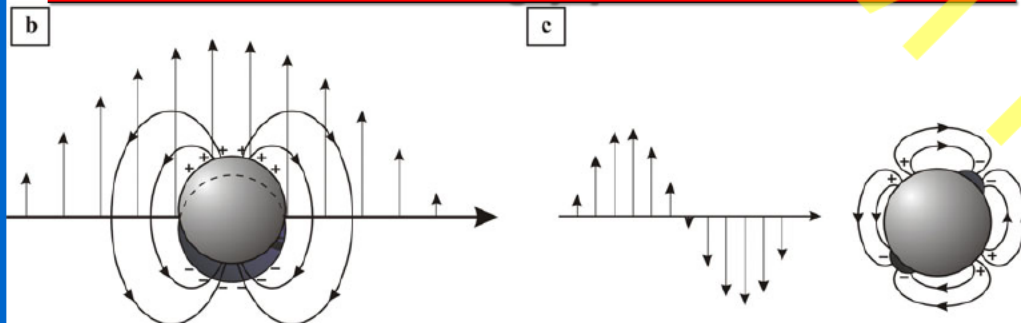
$\epsilon_{1,2}$  dielektr. konstanty kovu a prostředí ,

$\Theta_i$  úhel dopadu elmg. záření (paralelní polarizace) a max. absorpce

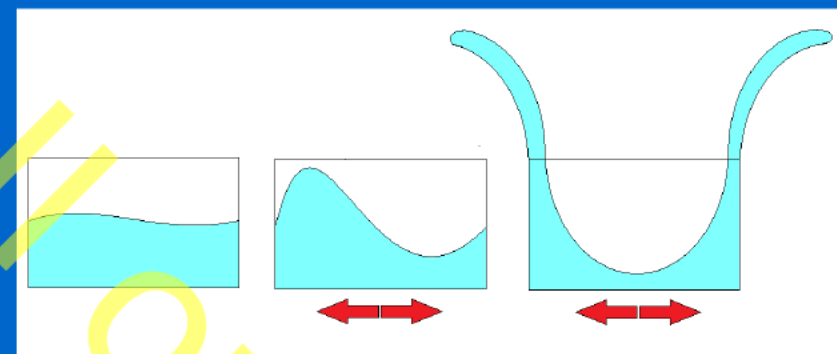
# Kovová nanočástice = plasmonový rezonátor radiální vlna (vyzařující) - zesilovač světla



**kovová nanostruktura funguje jako rezonátor a anténa.**



**Nanočásticový plasmon:**  
Min. rozměr částic: > 2 nm  
=> neexistují lokalizované energetické hladiny (pás/oblak)

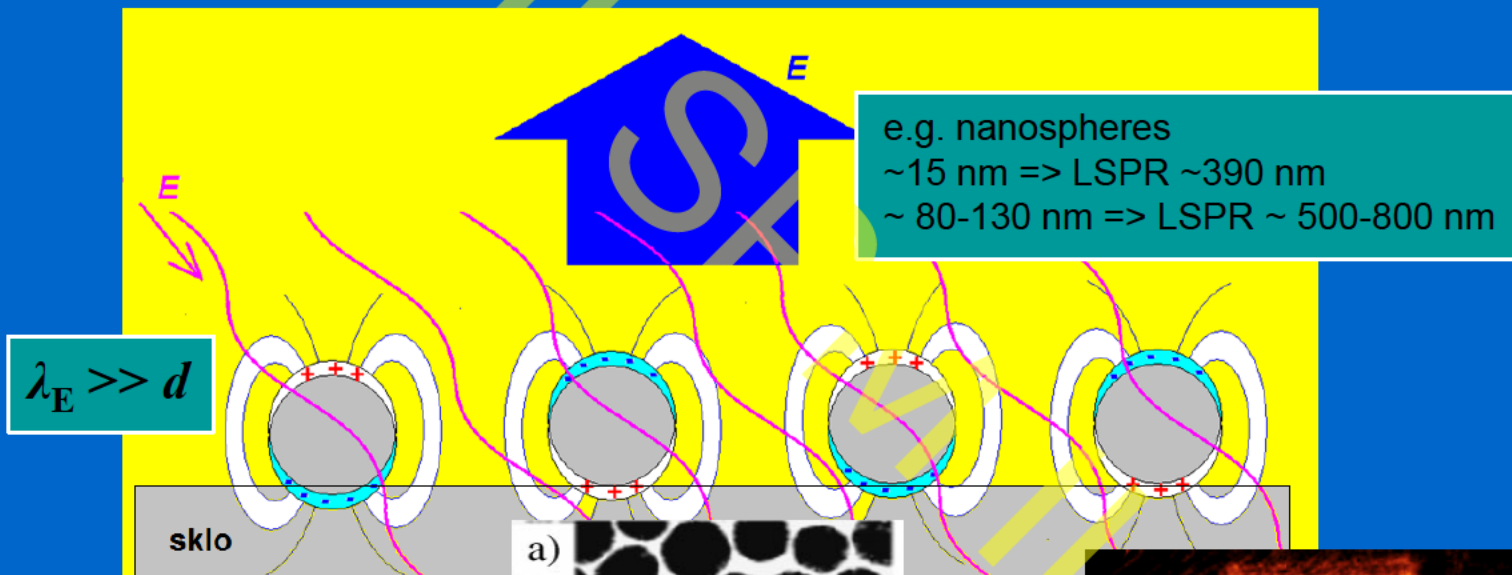


Interakce se světlem => excitace oscilací e<sup>-</sup> oblaku  
Malé částice: dipólová radiace (a, b) => emise dipólu  
Velké částice: kvadru-/n-pólová radiace => povrchová vlna => potlačená emise (c)

$$\omega_p \sim \sqrt{(ne^2/\epsilon_0 m^*)}$$

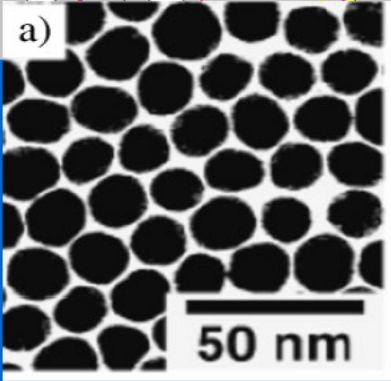
$\omega_p$  plasmon. frekvence  
 $m^*$  ef. hmot. vodiv. e<sup>-</sup>  
 $\epsilon_0$  permitivita prostředí

# Realizace povrchové plasmonové resonance - povrchové zesílení elmg. energie (Surface-Enhanced)

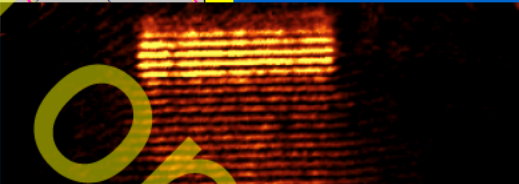


e.g. nanospheres  
~15 nm => LSPR ~390 nm  
~ 80-130 nm => LSPR ~ 500-800 nm

$\lambda_E \gg d$



Au nanočástice pro SE zesílení  
(zobrazeno TEM)



SNOM zobrazení povrchového plasmonového zesílení (plasmon-polariton wave) na nanostrukturované metalické mřížce - Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR)

## Využití povrchové plasmonové resonance

### Zvětšení citlivosti spektroskopických technik -

fluorescence, reflexní spektroskopie, zvláště Ramanovy spektroskopie (**SERS**),

- povrchové zesílení Ramanovy spektroskopie  $\sim 10^{14} - 10^{15} \times$

=> umožňuje identifikaci jediné molekuly

**Posun plasmonové resonance adsorpcí molekul na mezifázi** (posun  $\epsilon$ )

=> měření tloušťky adsorbovaných vrstev, vazebné konstanty ligandů...



**Biosensory založené na barevných změnách**

Senzory typu „lab-on-a-chip“

Label-free senzory, nanoplasmonika

# Aspekty použití povrchového zesílení v Ramanově spektroskopii

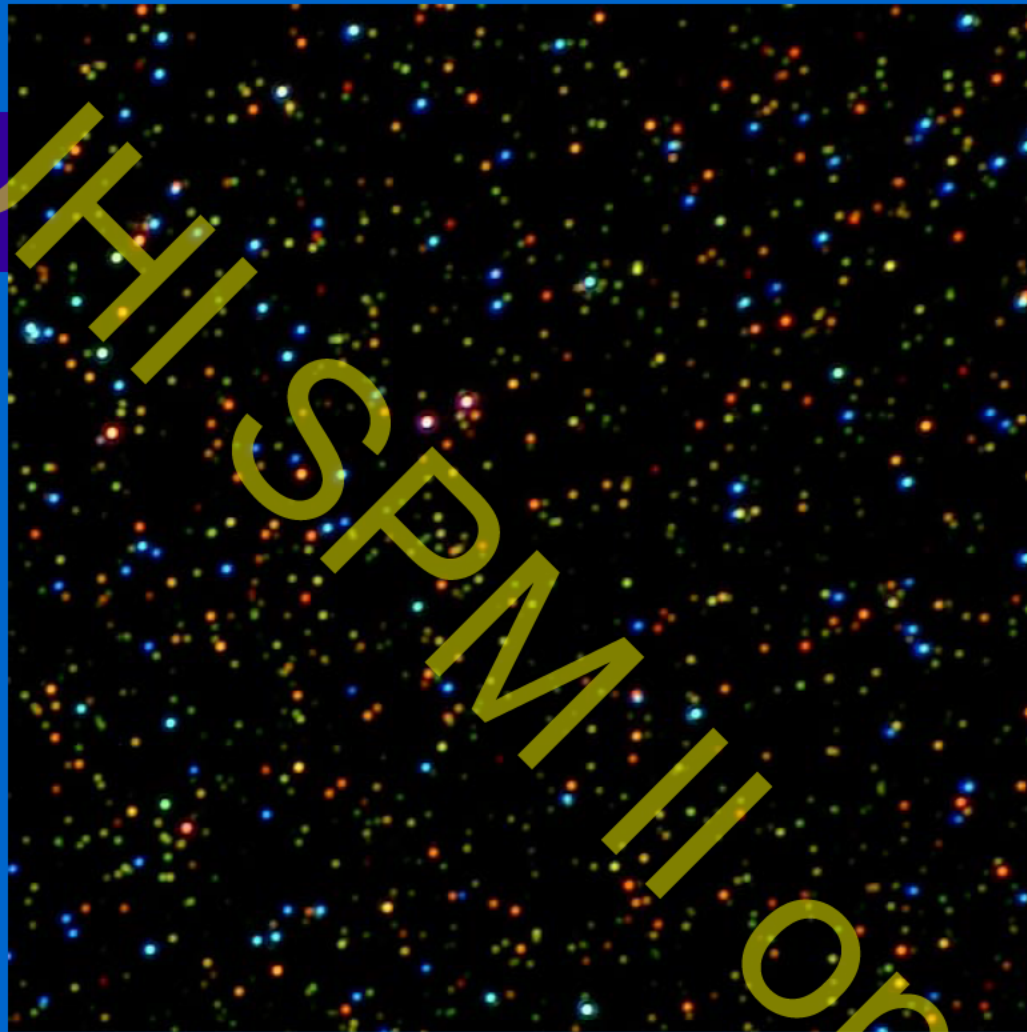
## Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

### Výhody

- Vysoký světelný zisk  
Max. zesílení – pro dopadající a/nebo rozptýlené světlo  
(ale jen pro frekvence s minimálním posunem – Raman,  
velmi posunutá nemohou být obě v rezonanci => menší zesílení)
- Strukturní informace

### Nevýhody

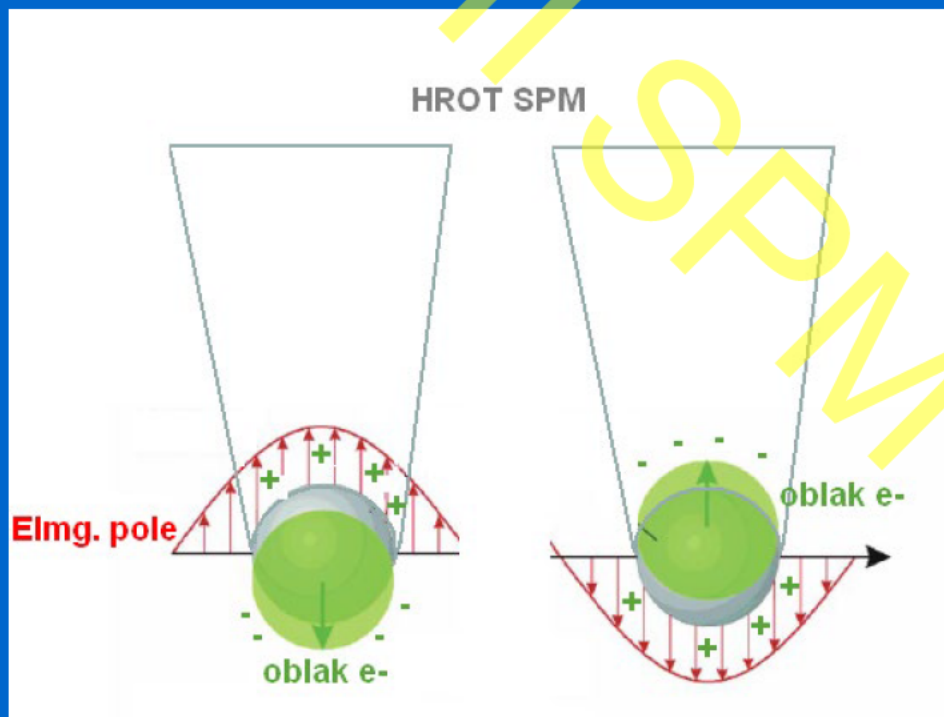
- Nutnost vytvoření nanostrukturovaného metalického povrchu  
Zesílení jen na kovových nanostrukturách - nanočástice, nanodráty..  
Vis: Au, Ag (elektrochemicky zdrsňené Ag: (Fleischman M., 1974)  
NIR: Cu =>
- Nehomogenní pokrytí nanostrukturami - agregace nanočástic,  
vznik „Hot-Spots“ (signál není reprezentativní na celém povrchu)



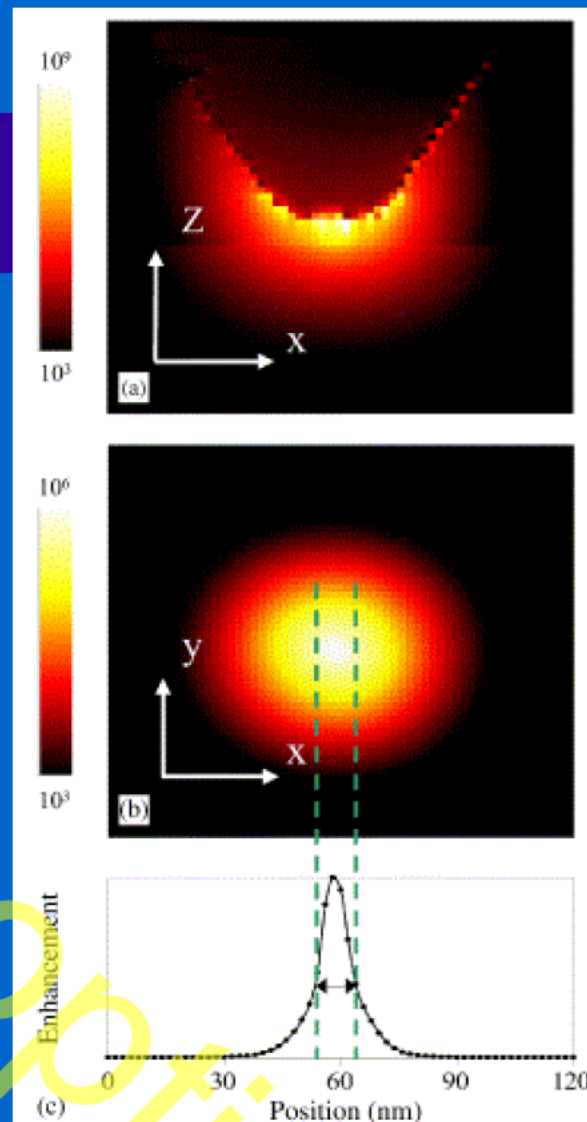
Optický mikroskopický snímek (temné pole) světla rozptýleného nanočásticemi

Ag (nanosféry) Au (nanosféry) nanotyčky

# Plasmonová resonance hrotem zesílená (Tip-Enhanced)

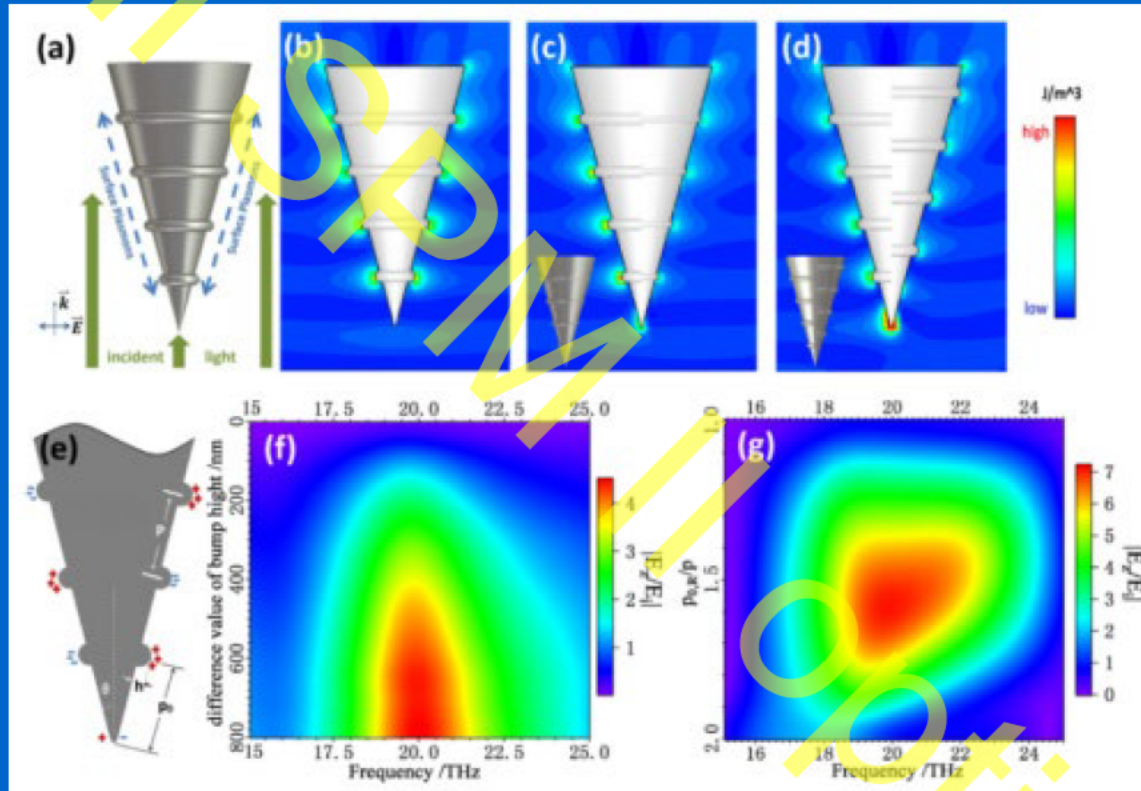


Od plasmonové resonance na povrchově imobilizovaných nanočásticích (Surface-Enhanced, SE) k hrotovému zesílení (Tip-Enhanced, TE)



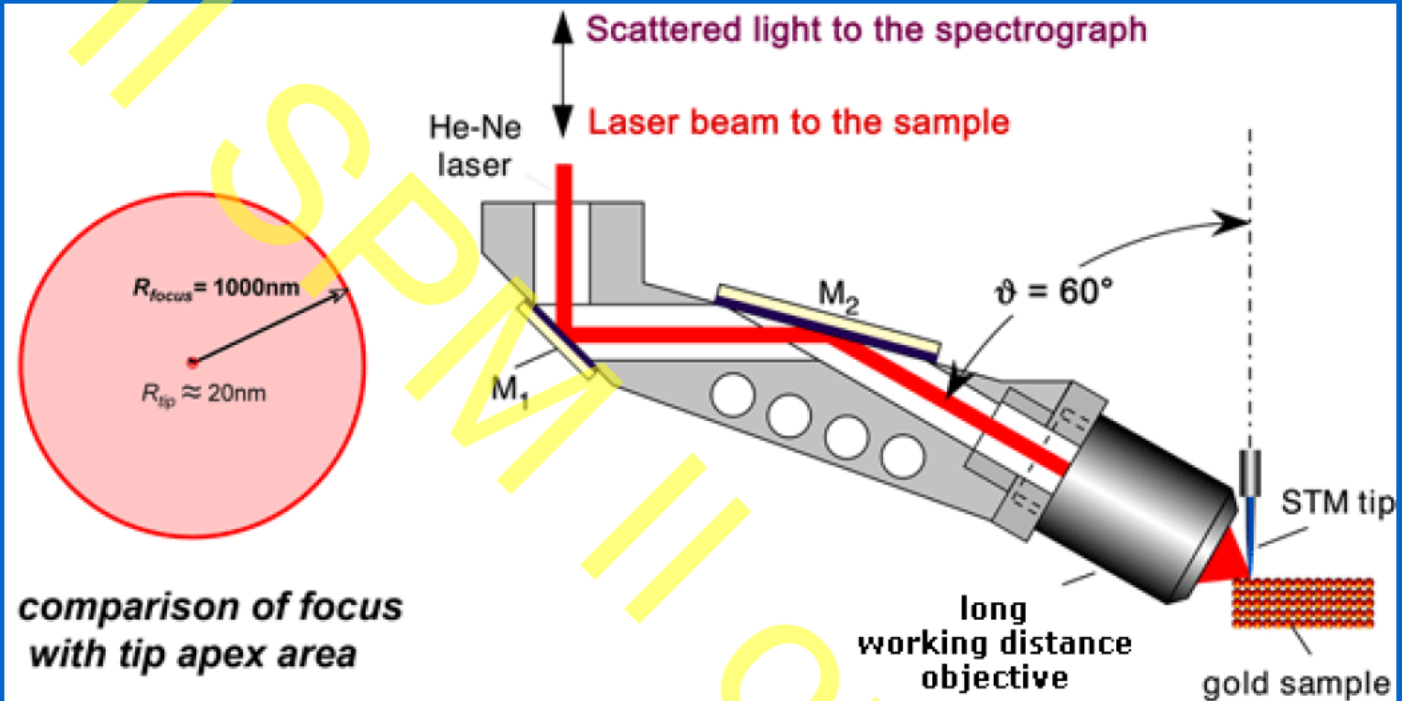
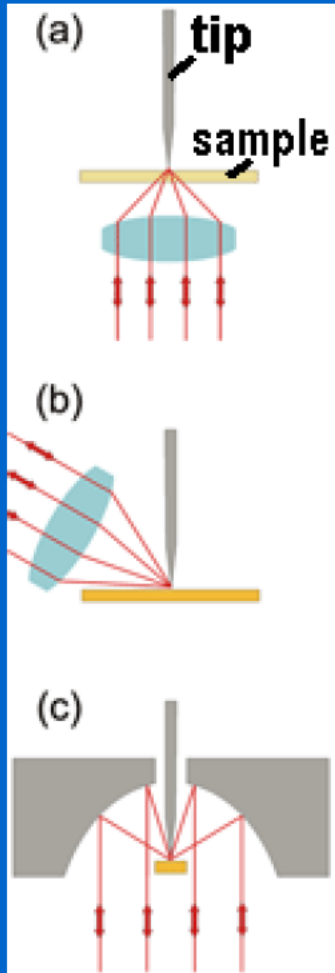
Intenzitní profily lokality hrotu  
 $(A = I_{RT}/I_{R0}) \lambda = 541 \text{ nm}, d_{T-S} = 4 \text{ nm}$

# Plasmonová rezonance hrotem zesílená (TE)



Plasmonic of SNOM tip patterned with asymmetric nanostructures

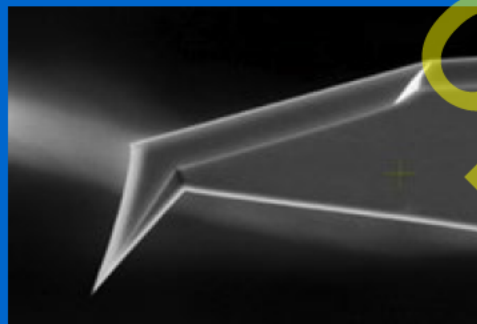
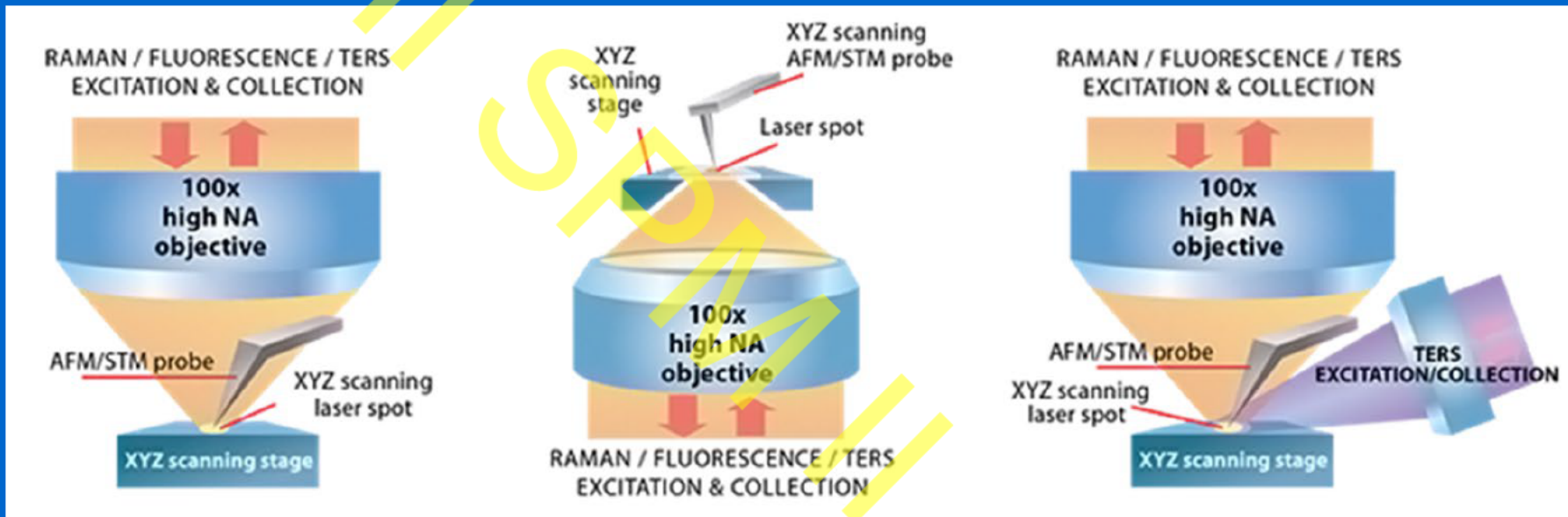
# Tip Enhanced Raman Spectroscopy (TERS) Instrumentace



Zdroj: He-Ne laser (632.8 nm) ~0.3 mW na vzorku

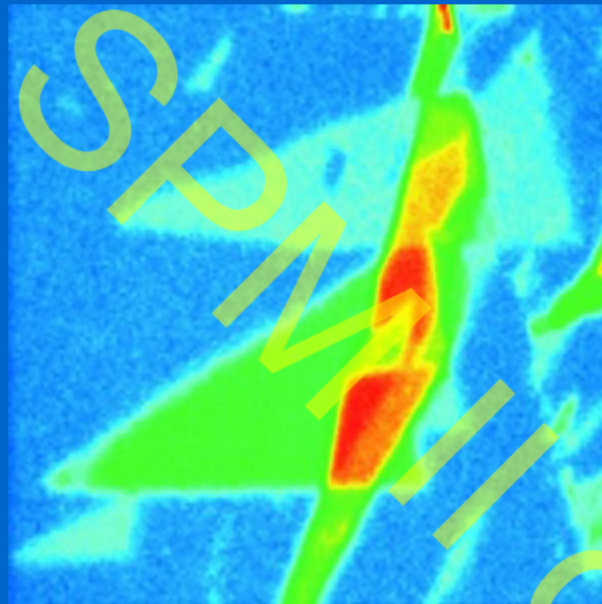
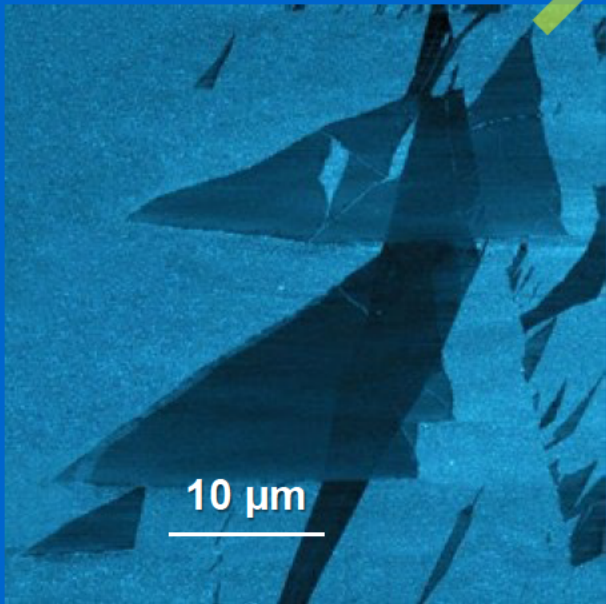
Naresh Kumar, Sandro Mignuzzi, Weitao Su, Debdulal Roy: Tip-enhanced Raman spectroscopy: principles and applications, EPJ Techniques and Instrumentation (2015) 2:9

## TE(RS) Instrumentace: Variabilita uspořádání



Optic

## AFM-TERS/SNOM: zobrazení + analýza

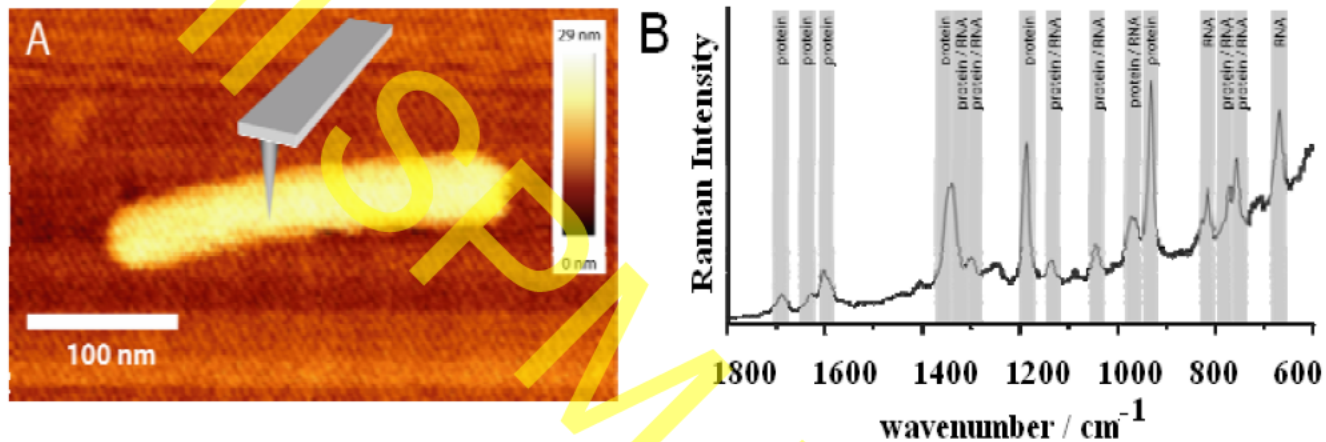


LFM

Raman G-mode

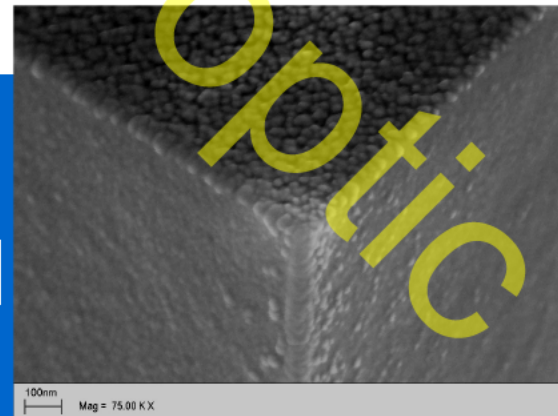
EFM

## AFM-TERS: zobrazení + analýza



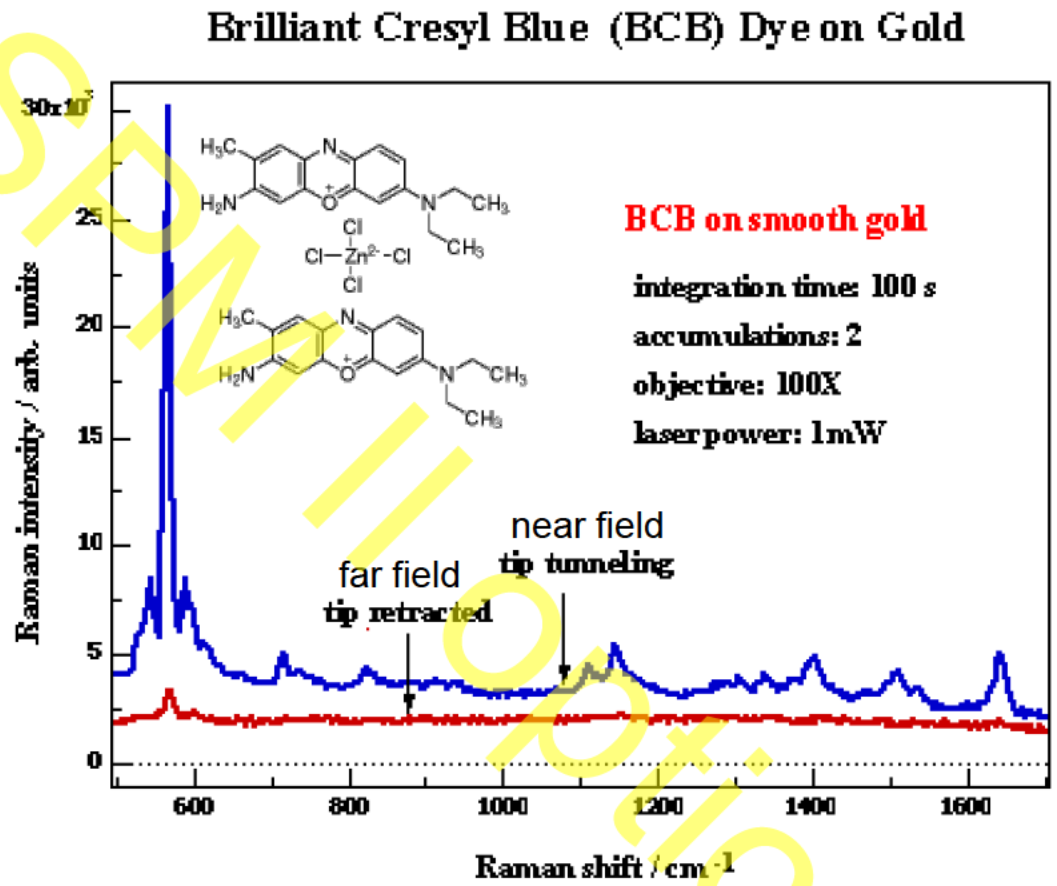
TERS spectroscopic examination of a single tobacco mosaic virus. (A) Before each TERS measurement, an AFM scan with the silver coated AFM tip is performed in order to position the AFM tip directly on a virus. (B) The TERS spectroscopic fingerprint of a tobacco mosaic virus shows that all TERS bands can be assigned protein and RNA contributions.

Metalizovaný (Ag) AFM tip pro TERS/AFM

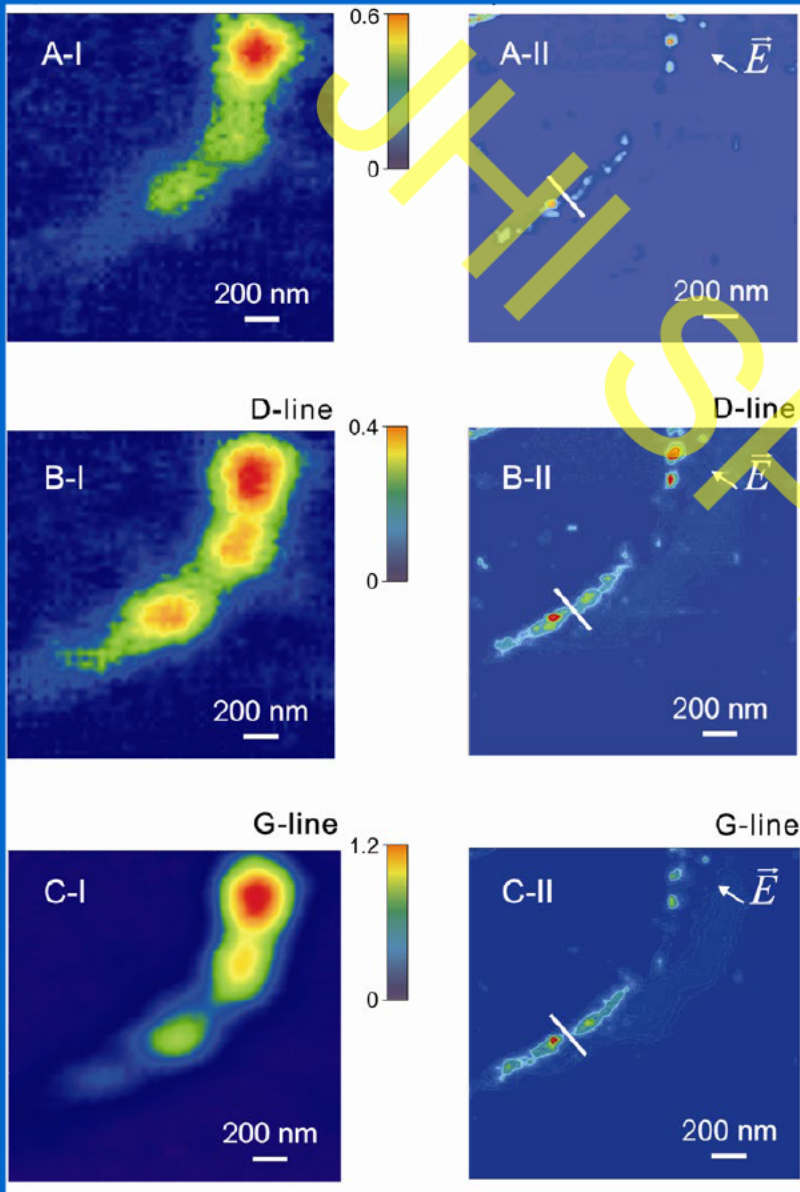


## TERS v analýze povrchu

Monovrstva BCB barviva  
adsorbovaného na Au filmu  
STM Ag-hrot

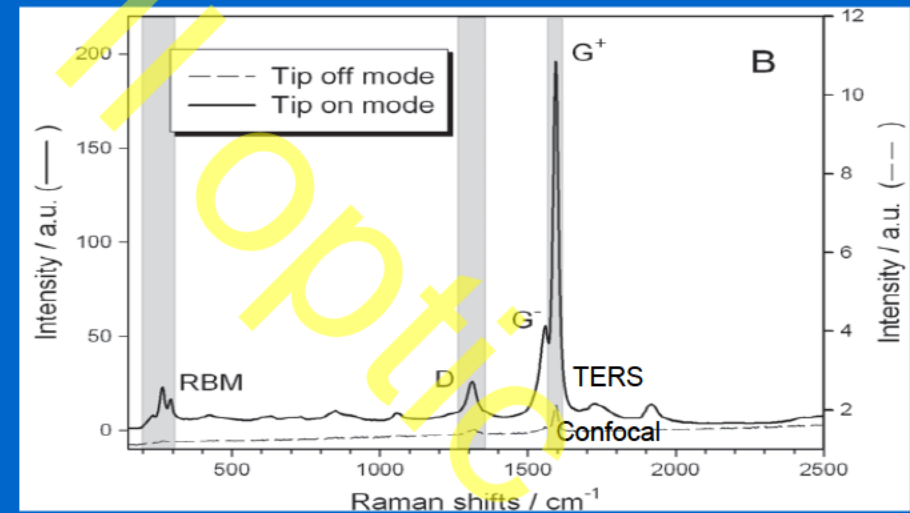


G. Picardi, K. Domke, D. Zhang, B. Ren, J. Steidtner  
B. Pettinger *Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft*

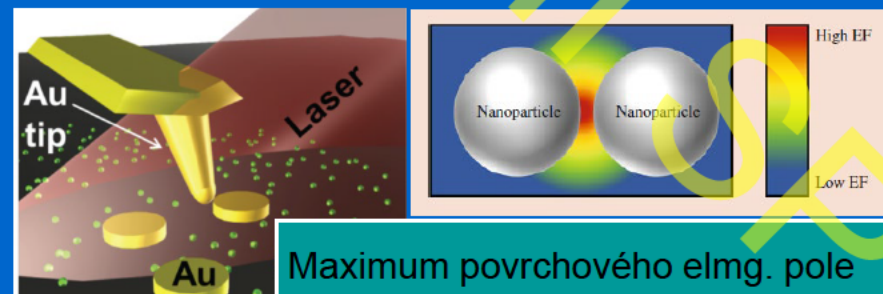


## Rozlišení zobrazení a analýzy v režimu vzdáleného pole - confocal (I) a blízkého pole - TERS (II)

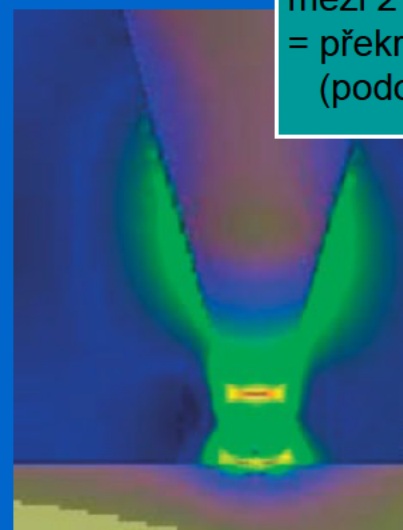
SWCNTs ve vibračních modech  
**RBM** (Radial „Breathing“)  $290\text{ cm}^{-1}$   
**D** („Disorder“)  $1300\text{ cm}^{-1}$   
**G+** tangenciální C-C stretching  $1594\text{ cm}^{-1}$   
**I** „„tip off““ (‘‘far-field‘‘ confocal)  
**II** „„tip on““ (‘‘near-field‘‘ TERS)



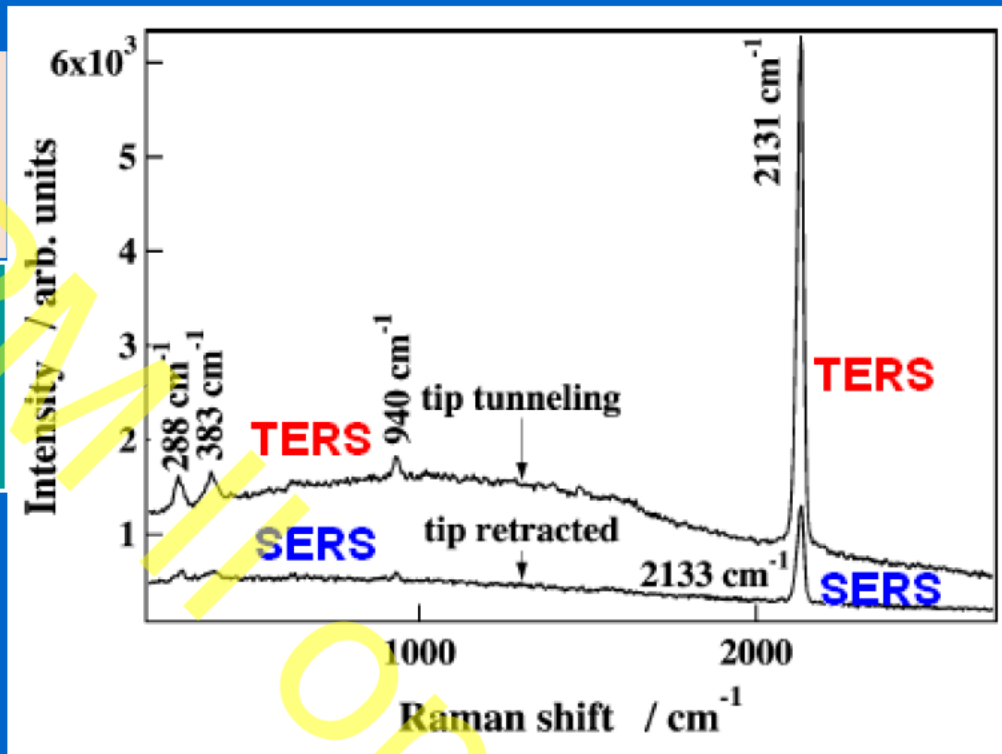
## Kombinace SERS a TERS



Maximum povrchového elmg. pole mezi 2 blízkými nanočásticemi = překryv plasmonových rezonancí (podobné rezonanční podmínky)



E-field: Au nanosféra 50 nm  
Hrot r = 20 nm, dist. 2 nm



Adsorpce CN na Au  
SERS (nanost. ukturovaný povrch Au)  
TERS (dtto + Au-tip).  
Integrační čas 1 sec, laser 5 mW

## význam TERS

### Výhody (+)

- + Plasmonová rezonance lokalizovaná na povrchu kovového hrotu (vyzařující anténa, max intenzita el.pole na hrotu) => hrot funguje jako téměř ideální bodový zdroj světla
- + Mobilní „hot spot“ – snímání reprezentativního signálu z celého povrchu vzorku
- + Proces může být laděn (z/do resonance) vkládáním napětí na hrot
- + umožňuje práci *in situ*
- + zesílení  $\sim 10^7$

### Nevýhody (-)

- nastavení definovaných podmínek
- vliv tvaru hrotu (deformace), složení povrchu hrotu/tvorba oxidu,
- složení elektrolytu, adsorpce z roztoku,
- přehřívání povrchu vzorku ve spotu (!)



## Mikroskopie rastrovací sondou

### AFM/STM Nanoscope IIIa Multimode (Bruker)

Pro práci v kapalinách a plynech, uzavřená nádobka  
Rozlišení ~ 0,1 nm

### AFM/STM TopoMetrix TMX 2010

Pro práci v kapalinách a plynech  
Rozlišení ~ 0,1 nm

### AFM Dimension Icon (Bruker)

pro práci v kapalinách a plynech

### AFM-TERS Labram/Combiscope (Horiba)

pro práci v kapalinách a plynech



JFH || SPM || optic