

Schlussbericht zum Verbundprojekt: Laseroptische Verfahren zur differenzierten Charakterisierung von Biosystemen, Teilvorhaben: Nahfeldmikroskopie für organische und biologische Oberflächen

Zuwendungsempfänger: Universität Oldenburg, Prof. Dr. Gerd Kaupp, Org. Chem.I

Förderzeitraum: 1.07.1999 - 30.12.2002

Förderkennzeichen: 13N7519

Bearbeiter: G. Kaupp, A. Herrmann, M. R. Naimi-Jamal, S. Stepanenko, V. Stepanenko

I. Kurze Darstellung zu

1. Problemstellung

Organische, biologische, medizinische Oberflächen sind regelmäßig rau. Sie müssen so wie sie sind mit AFM und SNOM (Nahfeldmikroskopie, scanning near-field optical microcopy) zerstörungsfrei vermessen werden, um die wirklich relevanten Informationen zu erhalten. Es war zu prüfen, ob ein bisher wenig beachtetes aperturloses Messprinzip (Rasterscope SNOM von DME, Kopenhagen; Partner FHR GmbH) mit Reflexion in die unbeschichtete sehr scharfe (Radius < 20 nm) Lichtleiterspitze in konstantem Scherkraftabstand hierzu geeignet ist. Es gilt die neue Methode für Biokompatibilitätsfragen, submikroskopische Histologie (Organellenstruktur), pathologische Veränderungen von Geweben (Krebsfrüherkennung an frischem Gewebe), Implantatveränderungen (auch Zahnersatzmaterialien), Blutbeutelveränderungen, usw. verfügbar zu machen und auf all diesen Gebieten neue Erkenntnisse zu gewinnen, die mit anderen Methoden nicht erreichbar sind. Ergänzend sind weitere lokale Methoden submikroskopisch einzusetzen. Dies betrifft Fluoreszenz und Raman SNOM, SERS. Die Tauglichkeit ist für harte und weiche, bearbeitete und unbearbeitete Gewebe nachzuweisen.

2. Voraussetzungen/vorhandene Techniken

Für raue Oberflächen eignet sich nur das aperturlose SNOM mit Rückreflexion des Lichts in sehr scharfe (Endradius 10-20 nm) unbedampfte Lichtleiterspitzen die dauernd im Shear Force Abstand gehalten werden, aber nicht herkömmliches SNOM mit breiten und heißen Aperturen, weil letztere mit der Topographie nicht klarkommen und Interferenzeffekte aufbauen. Das robuste kommerzielle Gerät nach Abb.1 (RASTERSCOPE SNOM 4000 von DME) mit scharfen Spitzen (Abb. 2, rechts) liefert simultane AFM und SNOM Bilder. Die Spitze folgt der Topographie in konstantem Scherkraftabstand (die Shear Force Empfindlichkeit ist Teil des Materialkontrasts) und gibt keine Störung durch Interferenzen oder Temperaturgradienten. Somit ist das optische Bild, außer bei extremen Steigungswinkeln, frei von Topographie Artefakten und liefert nur chemischen Kontrast. Die unter suboptimalen Messbedingungen auftretenden Artefakte (Abweichung vom chemischen Kontrast) sind leicht erkennbar. Sie wurden detailliert beschrieben und katalogisiert [1]. Die

Unterschiede von metallbedampften und scharfen Tips werden bezüglich Tipgeometrie und 5-10 nm Abstand in maßstäblichen Bildern deutlich (Abb. 2).

Der Lichtfleck auf der Probenoberfläche hat typischerweise einen Durchmesser von 1 μm . Die submikroskopische laterale Auflösung bis unter 15 nm beruht auf erheblicher Nahfeld-Verstärkung der Reflexion, wenn sich die scharfe Spitze im Scherkrabstabsand (bei 30% - 60% Damping) befindet, wie das die Annäherungskurve in Abb. 3 verdeutlicht [1- 4]. Beim „surface point“ wird die Spitze für die vorsichtige Annäherung zurückgezogen. Die Abb. 3 zeigt den typischen Intensitätsverlauf des reflektierten Lichts bei der Annäherung einer scharfen Spitze und Abb. 4 den einer abgebrochenen Spitze. Nur das materialabhängig verstärkte Nahfeldlicht im scan-Bereich trägt zum optischen Kontrast bei. Der Fernfeldanteil bleibt konstant. Abb. 4 zeigt, dass der Nahfeldeffekt [1- 4] nicht mit stumpfen und abgebrochenen Spitzen auftritt. Ein Messinstrument kontrolliert die richtigen Messbedingungen zuverlässig. Die genauere Untersuchung unseres neuen physikalischen Nahfeldeffekts (seit 1995) schießt einen Phaseneffekt aus, wie er von Courjon [5] vermutet war und klärt die Abstandsabhängigkeit für verschiedenartige Materialien [6]. Die extreme laterale Auflösung auf glatten Oberflächen ist < 15 nm [6], wird jedoch bei (sehr) rauen Oberflächen häufig nicht benötigt.

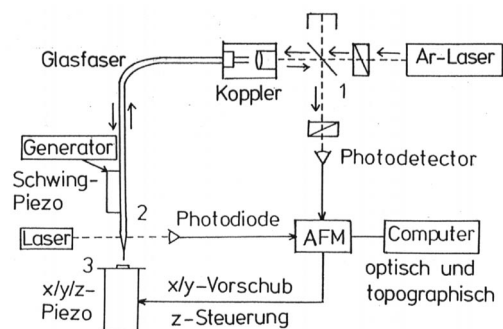


Abb.1. Aufbau des SNOM für raue Oberflächen

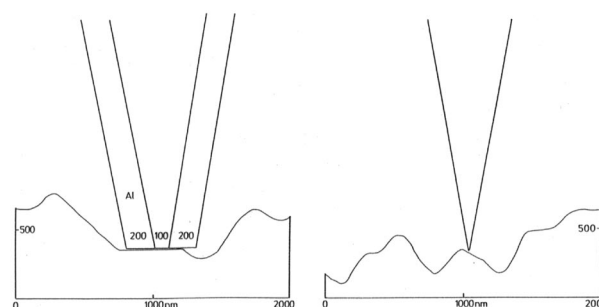


Abb.2. Vergleich von metallbedampften und scharfen Spitzen

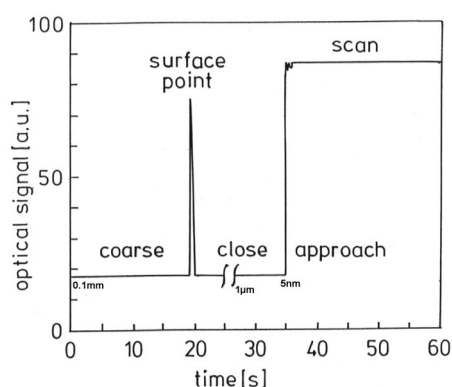


Abb.3. Annäherung mit scharfer Spitze

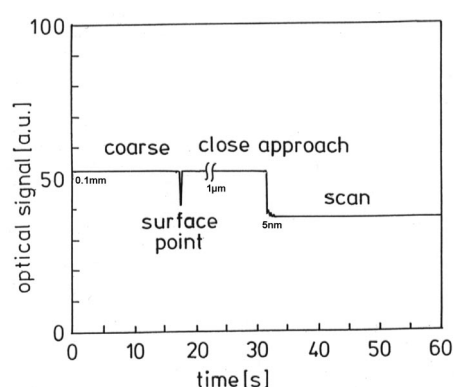


Abb.4. Annäherung mit stumpfer oder gebrochener Spitze

Die Messspitzen werden routinemäßig auf Endradien von 10–20 nm gezogen (Micropipette Puller von Sutter Instruments, Novato, CA). Geätzte Spitzen (Endradius typischerweise 60 nm) sind ungeeignet. Sie sind zu stumpf und brechen so gut wie immer ab.

Von erheblicher Bedeutung ist die bereits publizierte [1] erschöpfende Klassifizierung von Artefaktmöglichkeiten, die sofort echten SNOM Kontrast von fehlerhaften Bildern unterscheidet.

Das aperturlose SNOM ist auch zur lokalen Nahfeldspektroskopie geeignet. Ein optoakustisches Spektrometer der IFU GmbH mit Faseroptik und single electron counting ermöglicht submikroskopische Nahfeldspektroskopie (Fluoreszenz und Raman).

3. Planung und Ablauf

Das aperturlose SNOM (immer simultan zur Topographie aus kontaktlosem Scherkraft AFM) für raue Oberflächen wird an möglichst verschiedenen für die Biologie und Medizin relevanten Oberflächen erprobt. Dies betrifft Bio-Gewebe (Submikrostruktur, Histologie/Pathologie, Krebsfrüherkennung), harte Bio-Strukturen (Zähne, Knochen), Prähistorische Biomaterie (fossile Bakterien, Pyritisierung), biokompatible Materialien (Zahnlegierungen, Blutbeutel, Implantate), Biomolekülnachweis (SERS). Nachweise und Analytik sind mittels chemischem Kontrast und lokaler Fluoreszenz sowie lokaler Ramanspektroskopie zu führen. Dies beinhaltet auch Wellenlängenvariation bei SNOM. Die Messobjekte waren von den Projektpartnern oder durch weitergehende Kooperationen mit befreundeten Kollegen zu beziehen, denen die Vorteile von SNOM auf rauen Oberflächen nahezubringen waren. Der Nachweis der Tauglichkeit von SNOM in allen Teilgebieten war zu erbringen. Die Interpretation des chemischen Kontrasts war im Zusammenhang mit den Projektpartnern zu führen (Organellen Identifizierungen: z.B. Zellkerne, Mitochondrien). Das Messverfahren war möglichst zu vereinfachen für breitere routinemäßige Anwendungen, um den preisgünstigsten Spitzen die breite Anwendung zu sichern. Die Möglichkeit akustischer und mechanischer Abstandsregelung war zu testen.

4. Wissenschaftlich/technischer Stand an den angeknüpft wurde

Unser Arbeitskreis beschäftigt sich seit 1995 [2] mit chemischem Kontrast im optischen Nahfeld unter Nutzung der direkt am Instrument ablesbaren sprunghaft verstärkten Reflexion in die unbedampfte kalte scharfe SNOM Spitze im Scherkraftabstand. Er betreibt ein lichtgesteuertes RASTERSCOPE 4000 SNOM von DME. Die Kreuzpolarisation zur Empfindlichkeitssteigerung (Abb. 1) und eine schonende Annäherungstechnik (Grobannäherung mit Rückzug der Spitze sobald Scherkraft eintritt; anschließend wird aus ca. 1 μm Abstand langsam angenähert; Abb. 3) sowie lichtgesteuerte Abstandsregelung, die dem Bruch der Spitzen entgegenwirken, waren Stand der Technik und hatten sich bewährt. Es war gelungen, verschiedene Typen hydrophiler und hydrophober Oberflächen in hydratisiertem und hydrolysiertem Zustand mit SNOM zu unterscheiden [7]. Die bereits ermöglichten [8] technischen Anwendungen mit rauen industriellen Proben umfassen u.a. lokale Fluoreszenz und RAMAN Spektroskopie, submikroskopische Messung von Diffusionskoeffizienten, Ausbleichkinetik von Farbstoffen. Es wurde hundertfach bewiesen, dass trotz Topographie dann kein optischer Kontrast erhalten wird, wenn auf einer Oberfläche keine chemischen oder physikalischen Unterschiede bestehen und man kann auch chemisch verschiedene Topographie vergleichbarer Höhe in ein und demselben Bild mittels chemischem Kontrast unterscheiden. Bei diesem aperturlosen SNOM Verfahren ist die für die lokale Spektroskopie zwingende Bedingung der

genauen Übereinstimmung des chemisch-physikalisch bedingten optischen Kontrasts mit der Lage des von seiner Umgebung verschiedenen meist topographischen Gebildes erfüllt.

Der "chemische Kontrast" oder "Materialkontrast" (Rayleigh, Raman, Fluoreszenz, Absorption, Polarisierung, spezifische Shear Force Einflüsse) steht im Gegensatz zum von Schimmel beschriebenen "Kantenkontrast" [9]. Es gelang auch, im Shear Force Gap verstärktes Fluoreszenz- und Raman-Licht einzusammeln und mittels Kantenfilter von der Primärstrahlung abzutrennen, bzw. optoakustisch spektral aufzulösen. Ersteres betraf durchgefärbte und randgefärbte Fasern in rauen Mikrotom Schnitten. Es ließen sich bereits Diffusionskoeffizienten mit unserer SNOM messen und lokales Photobleichen im μm -Maßstab nutzen. Fluoreszierende 100 nm Farbpartikel, die in 1 μm Polyvidon Harz eingebettet waren und isoliert sowie aggregiert vorlagen, ließen sich mit bemerkenswert vielseitigen Beobachtungen charakterisieren. Durch Vergleich der 10 nm stärkeren topographischen Gebilde ($R_{\text{ms}} = 15.3 \text{ nm}$; Höhen der Aggregate bis 67 nm) mit den optischen (Nahfeldfluoreszenz) Abbildungen (Einzelteilchen in der Sollgröße von 100 - 200 nm) konnte die Dicke der transparenten Harzschicht zu 5 nm abgeschätzt werden [8]. Drei verschiedene färbetechnisch interessante Arten der Aggregation (linear, dicht, gewinkelt) wurden nur durch SNOM mit diesen Partikeln gefunden. Im gewinkelten Fall waren die nicht von Farbpartikeln besetzten Stellen laut AFM offensichtlich mit Harz gefüllt. Die lokale Raman-spektroskopie wurde durch Kombination mit einem optoakustischen Spektrometer demonstriert. So ließ sich das lokale Raman Spektrum von Silicium unter einer SiO_2 Deckschicht von ca. 5 nm Dicke (ellipsometrisch bestimmt) auflösen. Wir erhielten nicht nur das Signal von Si bei 519.7 cm^{-1} sondern auch das der SiO_2 Deckschicht (500 cm^{-1}) [8], welches bei Apertur-SNOM Fernfeld-Raman (bei 150 nm lateraler Auflösung) nicht erhalten wurde [10]. Im Gegensatz zu [10] war das Si-Signal auch über frisch geritztem Silicium zu sehen. Entsprechend wurde der Raman Peak von GaN bei 570 cm^{-1} aufgelöst. Es funktionieren also resonante und nicht resonante lokale Ramanspektroskopie. Die SNOM Technik nutzt Nahfeldeffekte bei der Detektion.

Referenzen

- [1] G. Kaupp, A. Herrmann, M. Haak, Artifacts in topography and scanning near-field optical microscopy (SNOM) due to deficient tips, *J. Phys. Org. Chem.* **1999**, *12*, 797-807.
- [2] G. Kaupp, Supermicroscopy in Supramolecular Chemistry: AFM, SNOM, and SXM, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 8, 381-423 + 21 color plates, ed. J. E. D. Davies, Elsevier, Oxford, **1996**.
- [3] G. Kaupp, A. Herrmann, M. Haak, Near-Field Optical Microscopy with Uncoated Tips: Calibration, Chemical Contrast on Organic Crystals, and Photolithography, *J. Vac. Sci. Technol. B.* **1997**, *15*, 1521-1526.
- [4] G. Kaupp, A. Herrmann, Chemical Contrast in Scanning Near-Field Optical Microscopy, *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 675-679; G. Kaupp, A. Herrmann, SNOM by Near-Field Reflectance Enhancement: A Versatile and Valid Technique, *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 141-143.
- [5] M. Spajer, D. Courjon, K. Sarayedine, A. Jalocha, J.-M. Vigoureux, *J. Phys. (Paris) Ser. III* **1991**, *1*, 1.
- [6] G. Kaupp, Jens Schmeyers, M. Reza Naimi-Jamal, Vladimir Stepanenko, Optische Nahfeldmikroskopie auf rauen Oberflächen mit Glasfaserspitzen in Kreuzpolarisation, *Forschungsbericht des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF)*, FKZ 13N7640/3, 25.3.2003, S. 1-22.

- [7] G. Kaupp, A. Herrmann, J. Schmeyers, J. Boy, SNOM a new photophysical tool, *J. of Photochem. & Photobiol. A: Chemistry* **2001**, 139, 93-96; G. Kaupp, A. Herrmann, M. Haak, SNOM (scanning near-field optical microscopy), a genuine photochemical technique, *Internet Photochem. Photobiol*, **1998**;
<http://www.photobiology.com/IUPAC98/page2.htm>
- [8] G. Kaupp, A. Herrmann, G. Wagenblast, Scanning near-field optical microscopy (SNOM) with uncoated tips, *Proceedings of SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1999**, 3607, 16-25.
- [9] Ch. Adelman, J. Hetzler, Th. Schimmel, M. Wegener, H.B. Weber, H.v. Löhneysen, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, 74, 179.
- [10] S. Webster, D. N. Batchelder, D. A. Smith, *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 72, 1478.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Der Förderverbund umfasste die Einzelprojekte von
 Prof. Dr. P. Andresen, Dr. R. Böttner, Universität Bielefeld
 Prof. Dr. G. Müller, Dr. M. Meinke, LMT Berlin
 Prof. Dr. Dr. R.-P. Franke, Dr. Sommer, Universität Ulm
 Dr. K. Liefelth, Dipl.-Ing. G. Hildebrand, IBA Heiligenstadt
 Prof. Dr. G. Kaupp, Universität Oldenburg
 Dr. habil. K. Kneipp, Technische Universität Berlin
 Weitere Kooperationen mit
 Fa. FHR GmbH, 01458 Ottendorf Okrilla
 Fa. IFU GmbH, 09557 Flöha
 Prof. Dr. P. Jaros, Universität Oldenburg
 Dr. Th. Schöberl, Erich-Schmid Institut Leoben, Österreich
 Prof. Dr. M. Kessler, Universität Erlangen
 Prof. Dr. F. Galembeck, University of Sao Paulo

II. Eingehende Darstellung zu

1. Erzielte Ergebnisse

Messungen auf organischen, anorganischen und biologischen Oberflächen; Gütekriterium ist der Verstärkungsfaktor

Die Vorteile der aperturlosen Scherkraft SNOM (bei simultaner AFM) mit verstärkter Nahfeldreflexion in die sehr scharfe kalte Lichtleiter-Spitze sind in Bezug auf Vielseitigkeit, Auflösung (axial 1 nm, lateral bis 15 nm) für glatte rauhe und sehr rauhe Oberflächen unerreicht. Apertur-NSOM kann nicht in konstantem Scherkraftabstand über rauhe oder schwach geneigte Oberflächen rastern und hat immer Fernfeld-Detektion mit erheblichem Auflösungsverlust z.B. bei constant-height Messungen. Lichttunneln über dem Grenzwinkel der Totalreflexion ist auf dünne Schichten ohne signifikante Rauigkeit beschränkt. Andere aperturlose SNOM-Verfahren (z.B. an metallischen Streuzentren nahe an der Oberfläche) sind ebenfalls auf sehr geringe Topographie beschränkt.

Die konfokale Mikroskopie kennt keinen chemischen Kontrast und erreicht die Möglichkeiten von SNOM auf rauhen Oberflächen auch in der 4-Pi-Konfiguration nicht, kann aber zu Vorklärungen und Positionierungen genutzt werden. Das Point-Spread-Function-Engineering könnte für flache Oberflächen eine ähnliche laterale