

P13-2013-108

Г. М. Арзуманян, В. Вартик, И. А. Крячко,  
С. И. Тютюнников, А. В. Филиппов

**КАРС-МИКРОСКОП:  
ВОЗМОЖНОСТИ, ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ,  
ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

Арзуманян Г. М. др.

P13-2013-108

КАРС-микроскоп: возможности, первые результаты,  
проблемы и перспективы

В работе описываются функциональные возможности и первые тестовые измерения, проведенные на КАРС-микроскопе, запущенном в Объединенном институте ядерных исследований (ОИЯИ) в 2012 г. Также указываются некоторые проблемы, которые требуют своего решения, и перспективы дальнейших экспериментов.

Работа выполнена в Лаборатории физики высоких энергий им. В. И. Векслера и А. М. Балдина ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2013

Arzumanyan G. M. et al.

P13-2013-108

CARS Microscope: Possibilities, the First Results,  
Problems and Prospects

This paper describes the features and the first test measurements carried out at the CARS microscope, launched at the Joint Institute for Nuclear Research (JINR) in 2012. It also identifies some problems that need to be solved and the prospects for further experiments.

The investigation has been performed at the Veksler and Baldin Laboratory of High Energy Physics, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2013

## ВВЕДЕНИЕ

Многофункциональный КАРС-микроскоп, созданный фирмой SOLAR ТП (Белоруссия), — это лазерный сканирующий конфокальный микроскоп, который имеет широкий спектр исследовательских возможностей по рамановской спектроскопии и микроскопии, спектральному картированию, построению 3D-изображений субмикронного масштаба и др. При этом предусмотрено, что рамановское рассеяние в зависимости от используемого лазера осуществляется в двух режимах — в спонтанном и вынужденном, известном под названием КАРС (когерентное антистоксово рассеяние света) [1–3]. Для регистрации рассеянного излучения с исследуемого образца используются: видеокамера, спектрометр с интегрированной ПЗС (CCD) линейкой и несколько фотоумножителей (PMT) для различных каналов (отраженный свет, проходящее излучение, люминесцентный канал). Подробное описание этого прибора приведено в [4].

Одна из особенностей такого микроскопа — возможность выявления локального распределения объектов разного химического состава в исследуемом образце. При этом, в отличие от других видов микроскопии, в частности электронной, образцы здесь не требуют сложной процедуры подготовки, которая в некоторых случаях может приводить к потерям информации (особенно это важно для биологических образцов).

В большинстве тестовых экспериментов, результаты которых приводятся в данной работе, использовался 60-кратный водно-иммерсионный объектив фирмы «Olympus» UPLSAPO 60xW и тонкая стеклянная подложка (слайд), отделяющая его от образцов. Ограничением для данного объектива является время высыхания водяной капли между объективом и подложкой, которое зависит от внешних условий в лаборатории (температуры, влажности) и от используемых источников лазерного излучения. Типичная длительность экспериментов со стабильными результатами составляет примерно 1,5–2 ч.

Приведенные в статье примеры экспериментов связаны с задачами, решаемыми в рамках темы ОИЯИ под номером 04-1-1111-2013/2014 [5], а именно:

1) полномасштабное функционирование многомодальной оптической платформы ОИЯИ как комплементарного инструментария в области физики конденсированных сред для лабораторий Института и заинтересованных стран-участниц;

2) тестовые испытания, набор и обработка полученных данных;

3) исследование оптических свойств и структурных характеристик апконверсионно люминесцирующих стекол и наностеклокерамики, выработка практических рекомендаций для их инновационного применения в оптоэлектронике, лазерной технике и т. д.

4) исследование структурных модификаций поверхности кремниевых пластин под действием ионизирующего излучения;

5) разработка концептуального плана и создание инфраструктуры для начала работ с биологическими и биосовместимыми образцами.

## 1. ОБРАЗЦЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

**1.1. Твердые образцы.** Вещества в твердой фазе являются наиболее удобными объектами для исследования в силу неизменности их пространственного положения. Благодаря этой стабильности, CCD-детектор в сочетании с гальваносканером и автоматизированным координатным столиком позволяет проводить не только измерения спектров в выбранной точке, но и полное рамановское «картирование» поверхности образца заданного размера с высокой точностью [6]. Минусом же при работе с твердыми образцами является в большинстве случаев их непрозрачность, что не позволяет регистрировать КАРС-спектры и изображения в проходящем свете (F-CARS), в которых проявляется большая интенсивность сигнала по сравнению с обратным сигналом E-CARS.

*Пластины кремния, облученные ионами различных газов.* Одним из этапов выполняемой темы является исследование структурных модификаций поверхности кремниевых пластин под действием ионизирующего излучения и изучение их спектроскопических характеристик. В рамках этого этапа были начаты тестовые исследования кремниевых пластин, облученных ионами H, D, He в Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ, до и после их отжига [7–11].

На рис. 1 представлены изображения поверхности кремния как в исходном состоянии (а), так и в результате облучения ионами водорода с энергией 12,5 кэВ и плотностью  $5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$  и термообработки в течение 30 мин при температуре 500 °С (б). Светлые точки — газовые полости или так называемые блистеры, темные — вскрывшиеся в результате внутреннего давления полости или флекинги.

Как видно из рис. 2, блистеры уменьшают плотность кремния в приповерхностном слое и, соответственно, интенсивность рамановской линии. В то же время интенсивность на флекинге близка к интенсивности исходного кремния. Вероятно, это вызвано тем, что излучение рассеяния получается из более глубокой области образца с большей плотностью кремния и с меньшей степенью окисления по сравнению с первоначальной поверхностью.

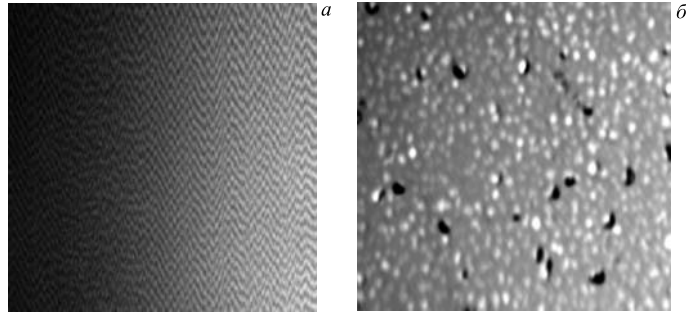


Рис. 1. Кремниевые пластины (сканируемая область размером  $50 \times 50$  мкм): *a* — исходная пластина; *b* — облученная ионами водорода (с энергией 12,5 кэВ и плотностью  $5 \cdot 10^{16}$  см $^{-2}$ ) и после термообработки в течение 30 мин при температуре 500 °С

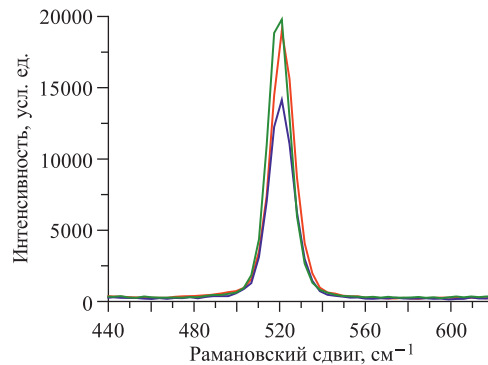


Рис. 2. Интенсивности рамановской линии кремния до и после облучения ионами водорода и термообработки: зеленым цветом показан спектр с исходной пластины; синим — области с блистерами; красным — на флекинге

Более ярко изменения спектра проявились в образце, облученном пучком ионов водорода большей плотности —  $5 \cdot 10^{17}$  см $^{-2}$  — с той же энергией (12,5 кэВ) и при таких же параметрах термообработки: 500 °С в течение 30 мин (рис. 3). Помимо разницы в интенсивностях, наблюдается небольшое смещение линии кремния по частоте, что может быть следствием механических напряжений в пластине, которые вызваны образованием газовых полостей.

Рамановскую линию молекулярного водорода вблизи 4100 см $^{-1}$  зафиксировать не удалось, возможно, ввиду его малой плотности в образце. Однако существует определенная надежда, что КАРС-измерения на этой частоте позволят в будущем ее зафиксировать и составить карту плотности распределения водорода в подобных образцах. Поэтому был специально заказан дополнительный комплект ноч-светофильтров для этой спектральной области.

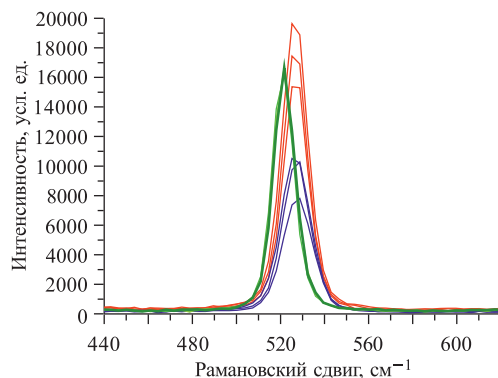


Рис. 3. Интенсивности рамановской линии кремния до и после облучения ионами водорода (с энергией 12,5 кэВ и плотностью  $5 \cdot 10^{17} \text{ см}^{-2}$ ) и термообработки (30 мин, 500 °С): зеленым цветом показан спектр до обработки; синим — области с блистерами; красным — на флекингах

**Пластины GaSe с добавлением Cd с разным временем термообработки.** Были исследованы два образца. Первый образец подвергался термообработке при температуре 500 °С в течение 6 ч. Он продемонстрировал рамановский спектр, практически однородный по всему полю образца (рис. 4).

Второй образец подвергался термообработке при температуре 550 °С в течение 24 ч. Его спектр продемонстрировал люминесцентный характер, с большой разницей интенсивностей по поверхности (рис. 5, 6). Из-за большой интенсивности в некоторых областях данный образец пришлось изучать, ослабив на порядок мощность лазерного излучения и уменьшив в 200 раз время измерения из-за опасности насыщения CCD-детектора. Чтобы понять, каково распределение люминесценции на поверхности образца и ее связь с

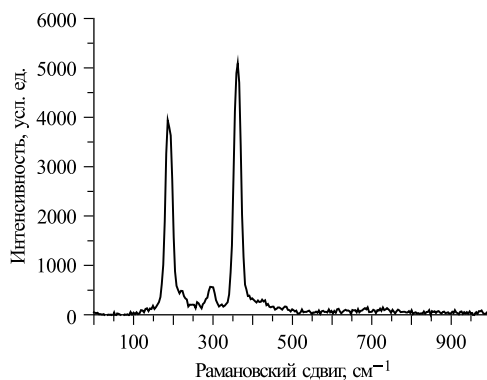


Рис. 4. Рамановский спектр образца GaSe–Cd после термообработки при температуре 500 °С в течение 6 ч. Время измерения 1 с

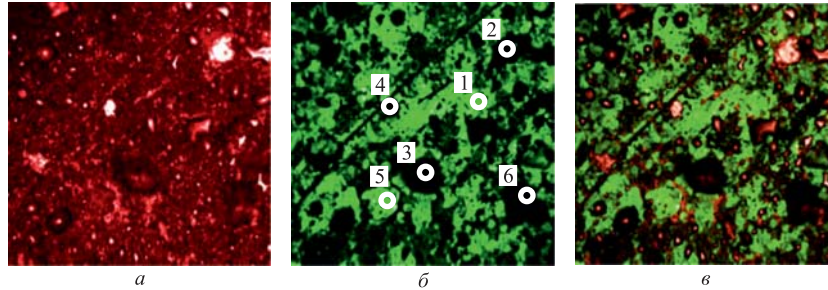


Рис. 5. Изображения поверхности GaSe–Cd после термообработки при 550 °С в течение 24 ч: *а* — изображение с канала отраженного света с наложением красного цветового фильтра; *б* — изображение с люминесцентного канала с наложением зеленого цветового фильтра, охватываемый люминесцентным каналом диапазон  $\sim 688 \pm 10$  нм или 678–698 нм; *в* — наложение изображений *а* и *б*. Размер области сканирования  $193 \times 193$  мкм

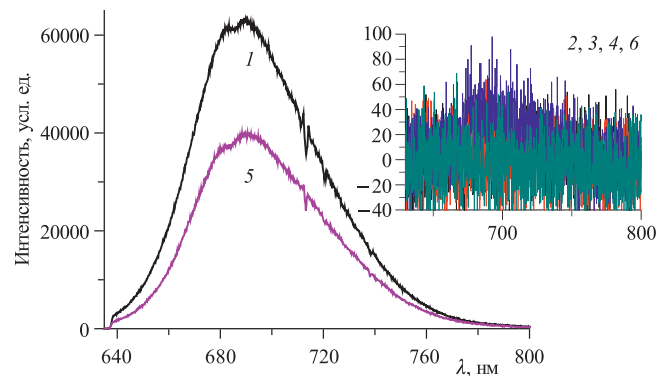


Рис. 6. Спектры люминесценции с различных областей образца GaSe–Cd после термообработки при температуре 550 °С в течение 24 ч. Время измерения 50 мс

отражающими и поглощающими лазерный свет участками, были получены соответствующие изображения (рис. 5).

На рис. 6 показаны спектры, полученные с точек 1–6, отмеченных на рис. 5.

**Кремниевая пластина с микрочипом.** Для отработки методики рамановского картографирования были исследованы образцы на основе кремниевых пластин с нанесением на поверхности различных веществ.

Первым таким образцом стала обычная пластина с микрочипами.

На рис. 7, *а* показан участок поверхности образца размером  $32 \times 32$  мкм в отраженном свете (светлые полосы — металлическое напыление). На рис. 7, *б*

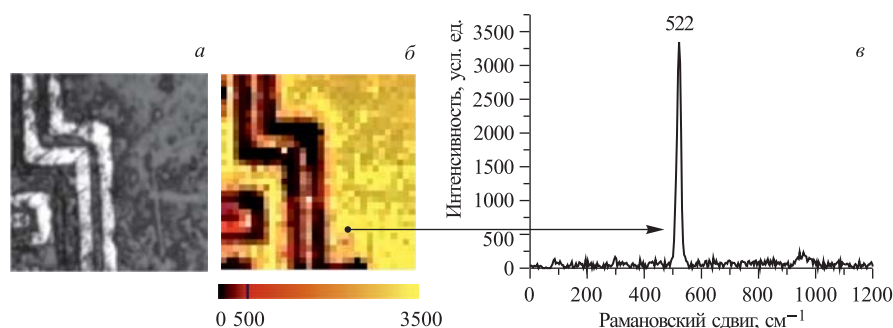


Рис. 7. Участок кремниевой пластины размером  $32 \times 32$  мкм с металлическим напылением — «дорожками»: *а* — изображение в отраженном свете; *б* — рамановская карта поверхности, основанная на интенсивности рамановской линии кремния со смещением  $522 \text{ см}^{-1}$ ; *в* — рамановский спектр для указанной на карте точки

дана карта интегральной интенсивности в спектральном интервале от  $500$  до  $540 \text{ см}^{-1}$  (максимум линии кремния —  $522 \text{ см}^{-1}$ ), построенная при помощи CCD-детектора и гальваносканера. Разрешение карты  $32 \times 32$  пикселя, т. е. 1 пиксель соответствует области  $1 \times 1$  мкм. Каждая точка содержит полные данные о рамановском спектре. Под картой указано примерное соответствие интенсивности максимума линии кремния цветовой гамме. На рис. 7, *в* приведен спектр кремния в точке, указанной стрелкой на рис. 7, *б*. На металлизированных участках никаких дополнительных рамановских пиков, помимо слабого от кремния, зафиксировано не было.

**Массив углеродных нанотрубок на кремниевой пластине.** На рис. 8 показано изображение неупорядоченного массива углеродных нанотрубок в

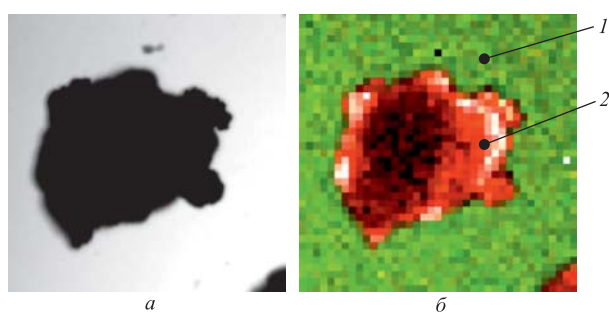


Рис. 8. Неупорядоченный массив углеродных нанотрубок на кремниевой подложке (область сканирования  $390 \times 390$  мкм): *а* — изображение в отраженном свете; *б* — рамановская карта, основанная на интенсивности линии кремния с величиной смещения  $520 \text{ см}^{-1}$  (отображено зеленым цветом) и линии нанотрубок  $1327 \text{ см}^{-1}$  (отображено красным цветом). 1 и 2 — точки, спектры которых показаны на рис. 9



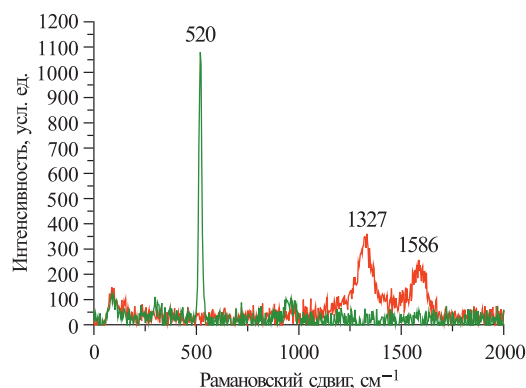


Рис. 9. Рамановский спектр кремниевой подложки (зеленый цвет) и нанотрубок (красный цвет). Время измерения 1 с

отраженном свете и в виде рамановской карты. Использовался сухой 10-кратный объектив. Центр массива нанотрубок имеет меньшую интенсивность из-за того, что он выходит из фокуса микроскопа по вертикальной оси.

На рис. 9 приведены рамановские спектры кремниевой подложки (зеленым цветом) и нанотрубок (красным).

**Пленка сложного органического состава на кремниевой пластине.** На рис. 10 показано изображение кремниевой пластины, снятое с видеокамеры микроскопа, с нанесенной на нее пленкой — следом от маркера «Black «edding 140 S» ohp marker permanent» [12] (в составе присутствуют: этанол, 1-метокси-2-пропанол, пропан-2-ол).

Для участка образца размером  $64 \times 64$  мкм были получены изображение в отраженном свете и рамановская карта поверхности (рис. 11). Время



Рис. 10. Изображение следа от маркера на кремниевой пластине с видеокамеры микроскопа (объектив  $\times 60$ ). Вверху слева — след маркера, внизу справа — чистый кремний

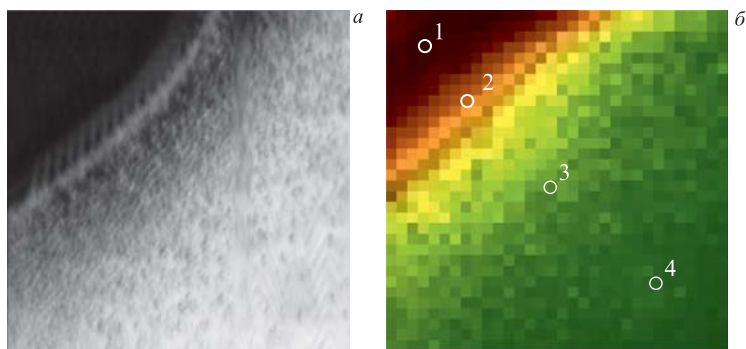


Рис. 11. Участок на границе перехода от пленки к кремнию размером  $64 \times 64$  мкм: *a* — изображение в отраженном свете; *b* — рамановская карта (разрешение 2 мкм)

картографирования участка такого размера с разрешением в 2 мкм составило 40 мин. На рис. 11, *b* кремний отображается зеленым цветом (цвет произвольный) и соответствует спектральному интервалу 653,6–655,6 нм ( $504$ – $550,4$  см $^{-1}$ ), а вещество пленки — красным и соответствует интервалу 687,1–694,6 нм ( $1249,6$ – $1406,5$  см $^{-1}$ ).

На рис. 12 приводятся спектры, полученные в точках 1–4 (рис. 11, *b*). Видно, что в точке 2 в районе границы раздела интенсивность спектра маркера сильнее, чем вдали от границы. Это может быть объяснено вытеснением вещества маркера от центра следа к краям из-за давления, оказываемого стержнем маркера, и образования на краю «валика».

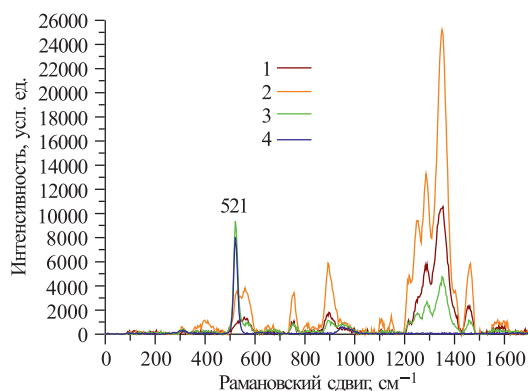


Рис. 12. Рамановские спектры, полученные в точках 1–4 (рис. 11, *b*) на образце кремниевой пластины со следом от маркера

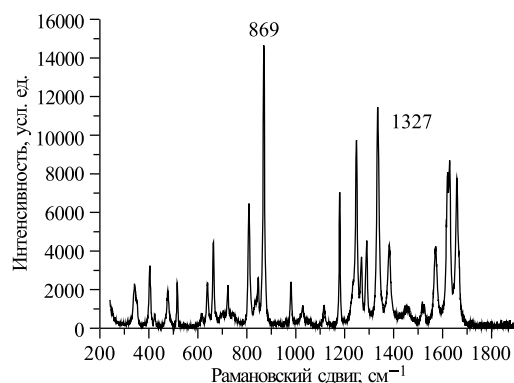


Рис. 13. Рамановский спектр парацетамола

Как уже упоминалось во введении, эксперимент ограничен временем высыхания водно-иммерсионного объектива. Это обстоятельство несколько препятствует улучшению точности измерений (за счет увеличения времени измерения в отдельной точке), а также увеличению площади картографирования. Поэтому рассматриваются возможности использования более стабильного масляного или даже сухого объектива со схожими характеристиками.

**Порошок парацетамола на стеклянной подложке.** Для понимания сложности проблемы биомедицинских исследований на данном микроскопе был проведен эксперимент по изучению парацетамола (рис. 13). Видно, что парацетамол дает довольно «богатый» спектр и может затруднять возможность распознавания других веществ на его фоне.

**1.2. Жидкости.** Сложность экспериментов с жидкостями заключается в их испарении, особенно с учетом их нагрева лазерным излучением. Существует несколько вариантов для решения данной проблемы: во-первых, малое время измерения; во-вторых, уменьшение интенсивности лазерного излучения и, в-третьих, большой объем исследуемого образца. Два первых варианта обычно приводят к уменьшению интенсивности полезного сигнала с образца, а третий ограничен технически, так как капля исследуемой жидкости не может превышать размеров стекла, отделяющего ее от объектива. Для получения оптимальных результатов зачастую используются различные комбинации вышеперечисленных возможностей.

**$H_2O$  и  $D_2O$ .** На примере сравнения обычной и дейтерированной воды оценивалась возможность изучения изотопного состава образцов. На рис. 14 красным цветом представлен спектр обычной бидистиллированной воды, а черным — дейтерированной. Длительность измерений составляла 60 с. Хорошо видно расхождение по частотам рассеянного излучения для образцов с разным изотопным составом (характерные полосы для  $H_2O$  — 1 и 2, для  $D_2O$  — 1\* и 2\*) [13].

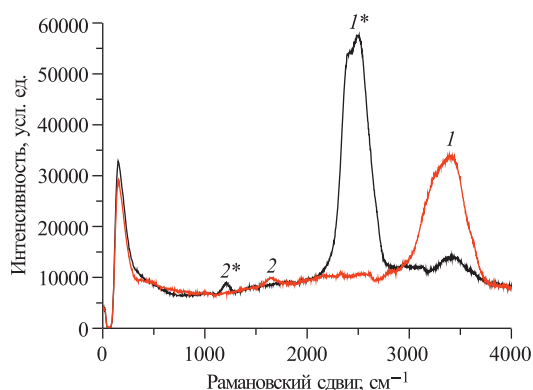


Рис. 14. Спектры воды с разным изотопным составом: красным цветом показан спектр обычной воды, прошедшей очистку (бидистилляцию), выделяются характерные полосы 1 и 2; черным цветом выделен спектр дейтерированной воды, характерные полосы 1\* и 2\*

**Этанол.** Одной из первых органических жидкостей, исследованных на микроскопе, был этанол (рис. 15).

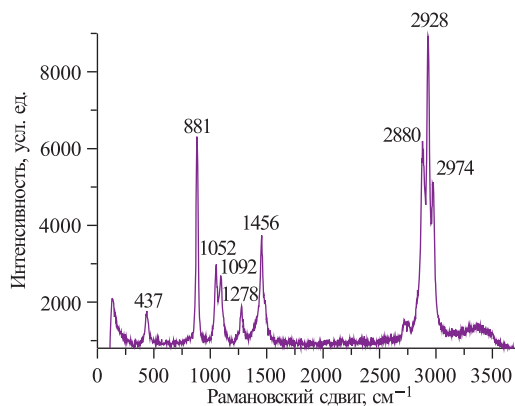


Рис. 15. Рамановский спектр этанола

**1.3. Частицы в жидкостях.** Так как в дальнейшем планируется исследование биологических образцов, были проведены предварительные исследования упрощенных «модельных» образцов микрочастиц в жидкостях. Помимо вышеуказанной проблемы с испарением жидкости, для таких образцов возникает проблема подвижности частиц за счет броуновского движения и потоков в жидкости, в том числе вызванных лазерным нагревом. Если же частица хорошо поглощает лазерное излучение, то она может усиливать нагрев вплоть до образования вокруг себя парового пузыря.

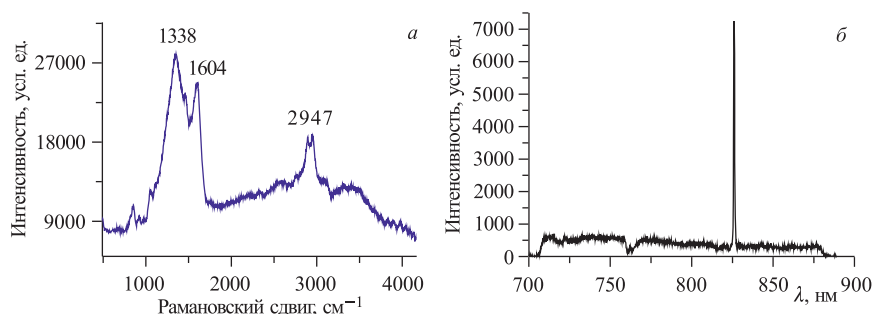


Рис. 16. Рамановский спектр (а) и КАРС-спектр (б) от углеродных микросфер на резонансной частоте  $1354 \text{ см}^{-1}$

Довольно частым объектом для экспериментов на подобных микроскопах служат полистироловые сферы [14, 15]. Мы также провели серию экспериментов с полистироловыми сферами диаметром  $2,84 \text{ мкм}$ , отдельные результаты которых представлены в [3].

Углеродные микросферы размером несколько микрон в глицерине — относительно сложный объект для исследования на данном микроскопе ввиду сильного поглощения ими лазерного излучения и, как следствие, сильного нагрева. Даже при измерениях длительностью всего в несколько секунд углеродные микросферы нагревали окружающий их глицерин до температуры кипения, образуя вокруг себя газовые пузырьки и смещаясь при этом в пространстве. Тем не менее нам удалось провести достаточно короткое по времени измерение рамановского и КАРС-спектров углеродных микрочастиц (рис. 16, а, б).

**Частицы фосфолипида (дипальмитоилфосфатидилхолин, DPPC) в глицерине.** На рис. 17 показана серия измерений на КАРС-канале микро-

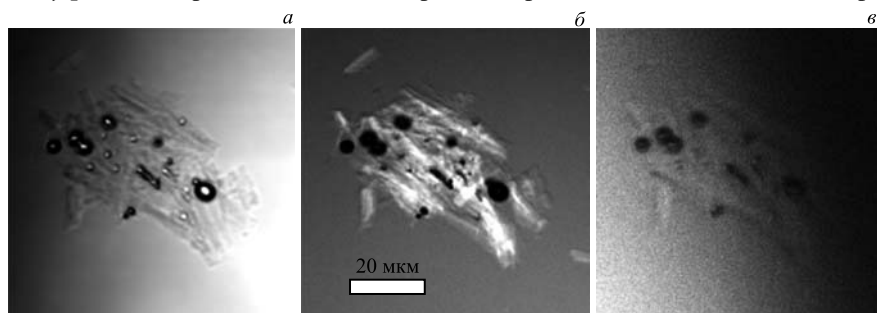


Рис. 17. Изображение скопления частиц фосфолипида в области размером  $77 \times 77 \text{ мкм}$ : а — изображение с детектора проходящего света; б — КАРС-изображение на резонансной частоте  $2852 \text{ см}^{-1}$ , темные области — пузырьки воздуха; в — изображение с КАРС-детектора при перестройке длины волны возбуждающего лазера на  $7 \text{ нм}$  от резонансной частоты фосфолипида

скопа. Исследовалась область размером  $77 \times 77$  мкм со скоплением частиц фосфолипида в глицерине. Было получено изображение в проходящем свете и прямое КАРС-изображение. Из рис. 17, *в* видно, что при небольшом смещении частоты лазера от резонансной частоты фосфолипида изображение частиц практически полностью пропадает. Объекты сферической формы на рис. 17, *а-в* — пузырьки воздуха, попавшие в образец.

## 2. АП-КОНВЕРСИОННО ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ ОКСИФТОРИДНЫЕ СТЕКЛА

Поскольку КАРС-микроскоп разработан для регистрации антистоксовых сигналов, он оказался очень удобным инструментом для исследования ап-конверсионно люминесцирующих материалов, в частности оксифторидных стекол, допированных ионами редкоземельных элементов  $\text{Er}^{3+}$  и  $\text{Yb}^{3+}$  (рис. 18).

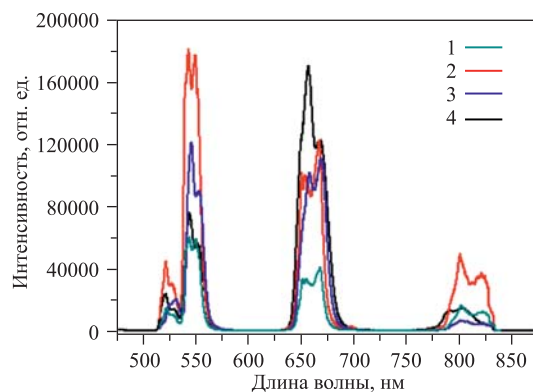


Рис. 18. Спектры ап-конверсионной люминесценции с четырех образцов оксифторидных стекол с различным матричным содержанием, допированных ионами  $\text{Er}^{3+}$  и  $\text{Yb}^{3+}$

В этих экспериментах мы использовали накачку от пикосекундного лазера с длиной волны в интервале 970–980 нм и мощностью 12 мВт. В зависимости от матричного состава стекла и режима термообработки в ап-конверсионных спектрах превалировало либо зеленое (520–540 нм), либо красное излучение (654 нм). В настоящее время интенсивно продолжают работы в этом направлении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был проведен большой объем работ по рамановской и КАРС-спектроскопии, визуализации изображений, а также по измерению люминесцентных характеристик различных оксифторидных стекол. Отработаны соответствующие методики измерений. В ближайшее время будет освоена также методика

формирования и построения трехмерных изображений, что особенно важно для биообразцов. Обозначены некоторые ограничения микроскопа и способы их устранения, а также перспективы модернизации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Begley R. F., Harvey A. B., Byer R. L.* Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy // *Appl. Phys. Lett.* 1974. V. 25, Iss. 7. P. 387.
2. *Tolles W. M. et al.* A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS) // *Applied Spectroscopy.* 1977. V. 31, No. 4. P. 253–271.
3. *Conor L. Evans, X. Sunney Xie.* Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine // *Analytical Chemistry.* 2008. V. 1. P. 883–909.
4. *Арзуманян Г. М.* Мультимодальная оптическая платформа для исследования конденсированных сред. Сообщение ОИЯИ Р13-2013-47. Дубна, 2013.
5. Тема 04-1-1111-2013/2014, ОИЯИ: <http://www.info.jinr.ru/plan/ptp-2013/r311111.htm>.
6. *Stewart S. et al.* Raman Imaging // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2012. V. 5. P. 337–360.
7. *Ревтов В. Ф., Ибрагимов Ш. Ш.* Способ изготовления тонких пластин кремния. Авторское свидетельство СССР на изобретение № 1282757, 30.12.1983 // *Изобретение. Полезные модели.* 2000. № 18. С. 499.
8. *Дмитриев С. Н. и др.* Способ радиационно-индуцированного газового скалывания хрупких кристаллических материалов (варианты). Патент № 2297691 // *Изобретение. Полезные модели.* 2007. № 11. С. 419.
9. *Ревтов В. Ф. и др.* Влияние плотности ионизационных потерь энергии высокоэнергетических ионов висмута, криптона и ксенона на развитие водородных блистеров в кремнии // *Журнал технической физики.* 2009. Т. 79, вып. 9. С. 63–70.
10. *Liang J. H. et al.* Influence of Post-Annealing Time on Blistering Evolution in Si < 100 > Implanted with High-Fluence H Ions // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* 2008. V. 266. P. 1562–1568.
11. *Bingsheng Li et al.* Annealing Effects in Silicon Implanted with Helium // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* 2008. V. 266. P. 5112–5115.
12. EC safety data sheet for edding 140 S, 141 F, 142 M, 143 B, ОНР-Marker permanent black: <http://www.gme.cz/dokumentace/746/746-001/dsh.746-001.1.pdf>.
13. *Max J.-J., Chapados C.* Isotope Effects in Liquid Water by Infrared Spectroscopy. III. H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O Spectra from 6000 to 0 cm<sup>-1</sup> // *J. Chem. Phys.* 2009. V. 131(18). 184505.
14. *Ji-Xin Cheng, Andreas Volkmer, X. Sunney Xie.* Theoretical and Experimental Characterization of Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy // *J. Opt. Soc. Am. B.* 2002. V. 19, No. 6. P. 1363–1375.
15. *Gachet D. et al.* Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy Imaging at Interfaces: Evidence of Interference Effects // *Optics Express.* 2007. V. 15, No. 16. 10408.

Получено 18 октября 2013 г.

Редактор *А. И. Петровская*

Подписано в печать 21.01.2014.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,0. Уч.-изд. л. 1,25. Тираж 245 экз. Заказ № 58164.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)