

# 光-电镜联用技术在拉曼选区分析中的应用

戴玉洁, 常林, 赵复庆

(1. 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 综合分析测试中心, 重庆 400714, 中国)

**摘要:** 光学显微镜和扫描电子显微镜联用结合了光学与电子显微分析技术, 可获得样品同一位置的光学图像和高分辨电子图像, 以实现更全面准确的样品表征, 因而被广泛应用于材料科学、光学工程等学科。相较于传统非联用技术, 光-电联用可快速获取同一区域样品对应的光学图像、电子图像以及光谱信息等样品特征。为此, 本研究通过微纳加工技术制备了带有快速定位功能的光电联用样品台, 结合能谱定位、原子力显微镜实现了特定区域样品的多维度、跨尺度表征及拉曼选区分析, 对相关科研工作具有重要意义。

**关键词:** 光电联用显微分析; 扫描电子显微镜; 光学显微镜; 拉曼光谱; 原子力显微镜

## Application of correlative light and scanning electron microscopy in

### Raman selection analysis

Dai Yujie, Chang Lin, Zhao Fuqing

**Abstract:** Correlative light and scanning electron microscopy combine optical and electronic microanalysis to obtain optical and high-resolution electronic images of the same sample location could achieve more comprehensive and accurate sample characterization is widely used in multiple disciplines including materials science and optical engineering. Compared to the non-associative instruments, it could acquire the optical images, electronic images, spectral information of the sample in the same region rapidly. To this end, this study prepared an optoelectronic coupled sample stage with fast localization by micro-nanofabrication technology, combined with energy spectral localization and atomic force microscopy, we realized multi-dimensional and cross-scale characterization along with Raman selection analysis of samples in specific regions, which is significant to related research.

**Keywords:** correlative light and scanning electron microscopy; scanning electron microscopy; optical microscopy; Raman spectroscopy; atomic force microscopy.

# 1 引言

光镜-扫描电镜联用技术 (correlative light and scanning electron microscopy, CLSEM) 可将样品同一区域光学显微图像和电子显微图像联动, 从而实现跨尺度 (毫米尺度光学成像到微纳尺度电子成像) 样品表面形貌研究, 以及同一区域电子图像与光学图像的嵌合, 以更全面的获取样品表面形貌特征。这种技术同时结合了光镜大视野和电镜高分辨大景深的技术优势, 并能实现诸多光学显微镜下工作仪器如原子力显微镜、显微拉曼光谱等的联用, 因而在众多学科领域有广泛应用<sup>[1]</sup>。

拉曼光谱广泛应用于二维材料层数的表征及半导体器件及材料性能的研究。目标区域半导体材料的快速定位对于半导体器件的表征及制备有重要意义, 目前工作流程仍停留在肉眼判定和大范围筛查上。研究人员在拉曼光谱下定位到目标样品后较难在扫描电镜、激光直写、原子力显微镜等仪器定位至同一位置, 大大影响了样品表征的效率以及半导体器件电极的制备效率。此外, 表面增强拉曼光谱 (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) 可以快速、无损地检测目标分析物<sup>[2]</sup>, 但在实际应用中仍面临重复性差、灵敏度低等问题。常见的 SERS 基底包括芯片型<sup>[3-5]</sup>、纳米颗粒溶胶<sup>[6-10]</sup>型, 其中芯片型基底具有较高的一致性和稳定型, 表面增强区域分布均一, 但其灵敏度仍有一定限制。纳米颗粒溶胶基底具有强烈的局域表面等离子共振效应和密集的热点, 灵敏度较高, 但由于纳米颗粒溶胶的团聚过程不可控, 该类型的基底稳定性和一致性较低。为实现高性能的 SERS 分析, 纳米颗粒溶胶在基底设计中不可或缺, 而如何提升其稳定性和一致性, 以及如何选取合适的区域进行 SERS 检测至关重要。而对于该区域的光学图像、电子图像、元素分布图像的原位嵌合以及跨尺度形貌表征是探明其增强机制和优化基底设计策略的前提。

为此, 我们开发了分区带标记的光学标尺及配套定制样品台, 将其坐标与电子显微镜坐标相对应, 通过扫描电镜-能谱仪大面积拼接功能获得样品不同区域元素分布情况, 实现了大面积电子图像及能谱图像的拼接及与光学图像的同步, 从而实现了 SERS 基底目标区域的多维度、跨尺度信息获取, 为其相关机制研究提供了有力支撑。

## 2 光-电镜联用技术的开发

### 2.1 总体设计方案

通过定制带有标尺的扫描电镜样品台, 结合牛津能谱仪图像配准功能 (将扫描电镜的当前视场与外部导入的照片进行坐标关联, 利用该照片进行导航, 快速定位到所需位置), 建立光镜-电镜成像联用系统, 实现快速准确样品定位及电镜与其他仪器 (光镜、拉曼光谱仪、

原子力显微镜、激光直写) 联用定点分析功能; 同时应用大区域面分布功能进行快速定位及成分分析。项目的技术路线如图 1 所示;

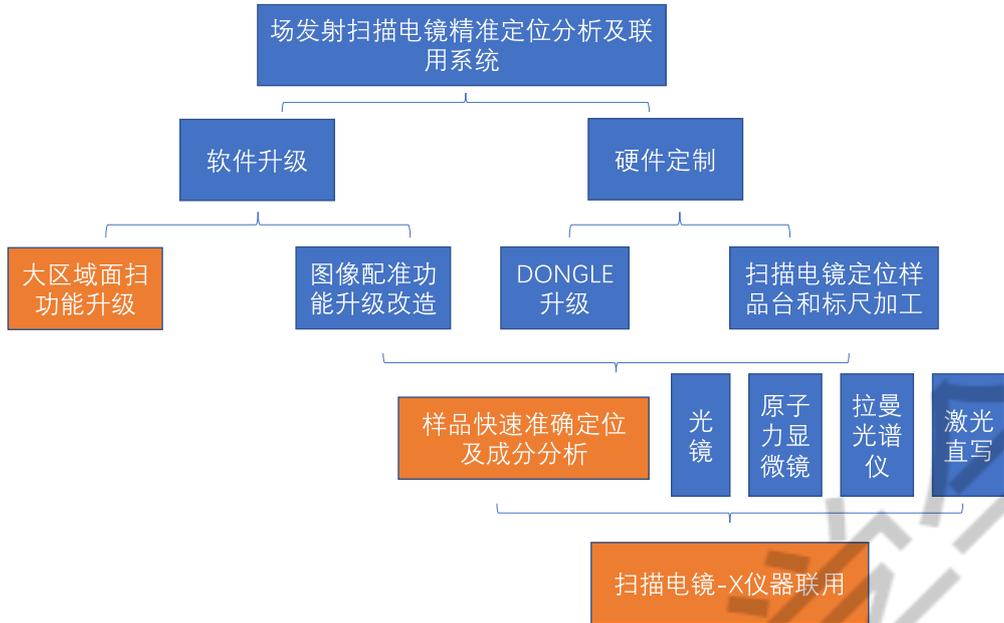


图 1 技术路线

本研究开发的光镜-扫描电镜联用技术主要由软件系统和微区标尺、定制样品台组成, 如图 2 所示。具体实现路径如下: 利用高拍仪获取覆盖有透明标尺的样品图像, 将图像导入牛津能谱处理软件 Aztec, 应用图像配准功能定位样品坐标, 在扫描电镜观察模式下进行微区形貌分析, 运用能谱大面积拼接功能对样品整个表面进行元素分布分析, 根据元素分布情况确定目标分析位点, 在图像配准模式下读出目标区域标尺坐标; 根据标尺坐标快速定位拉曼检测区域, 在目标区域进行拉曼及 SERS 测试, 获得相应光谱数据。

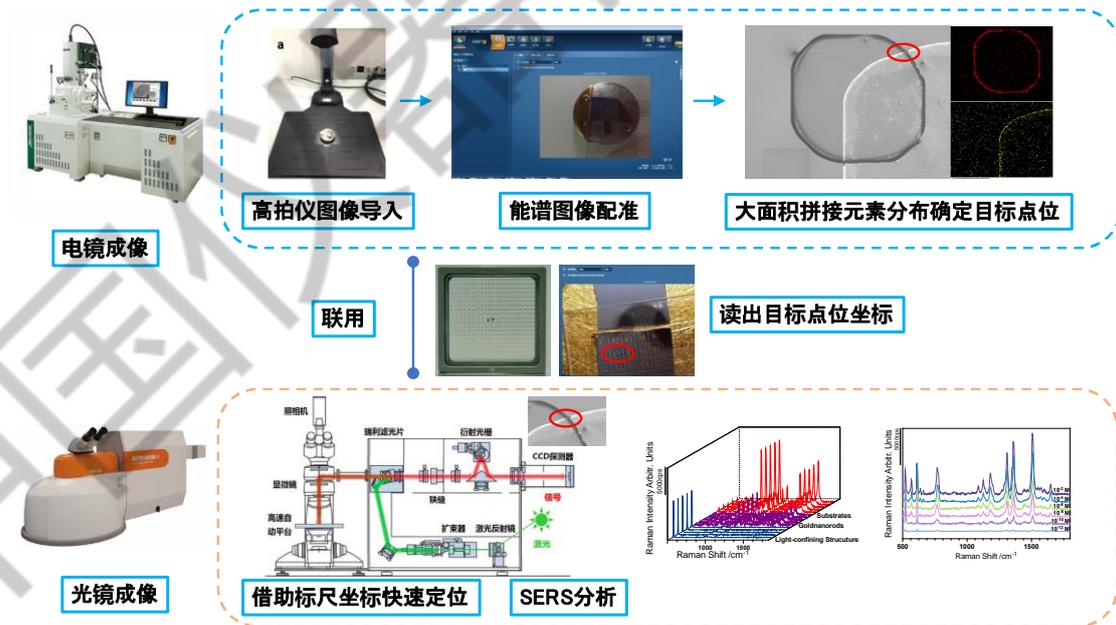


图 2 光-电镜联用系统用于拉曼选区分析

## 2.2 联用样品台的开发

本研究中定制的扫描电镜样品台分为上下两个部分（见图 3），其中下部分主要起样品承载作用以及与扫描电镜样品台卡扣的结合，上部分为镂空框架用以搭载标尺。上下两部分通过卡扣结合，可赋予样品上任意点位特定的坐标值，记录该坐标值，结合能谱仪图像配准功能即可实现样品的精准快速定位；另外，通过在不同仪器的导航模式下定位样品坐标，即可快速实现样品同一点位多尺度、多维度信息的采集。

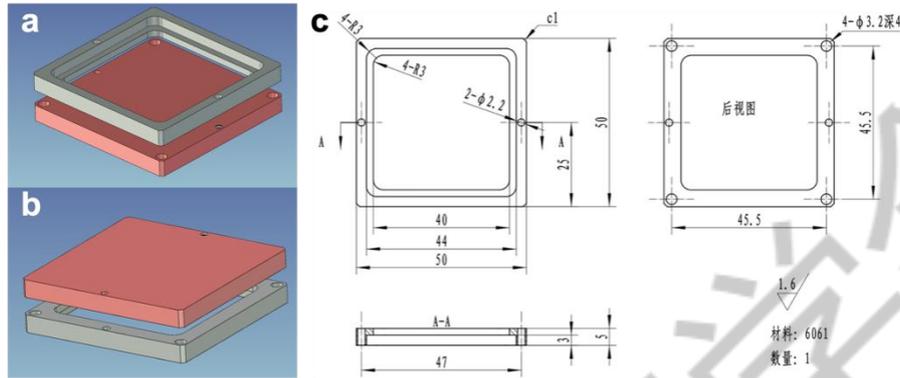


图 3 扫描电镜样品台设计图

## 2.3 联用标尺的制备

在完成上述扫描电镜样品台的定制加工后，定制加工一块可以配备该样品台使用的标尺，用来确定样品的坐标值。选择 2 mm 厚的透明石英片作为标尺的基底，通过微纳加工的方式在石英片的一面标记坐标，具体加工流程如下（见图 4a）：

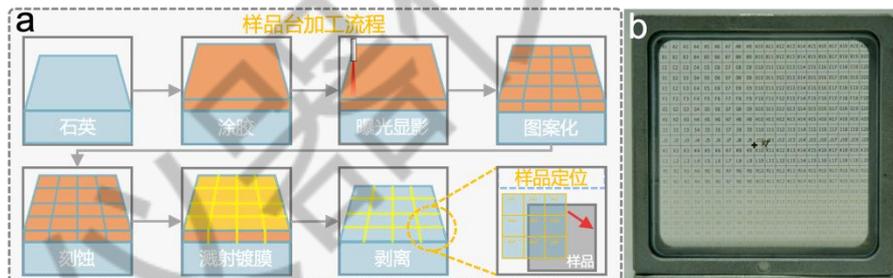


图 4 a, 标尺加工流程；b, 标尺实物图

首先，在石英片上旋涂一层 S1805 光刻胶并进行前烘程序，使用激光直写将预先设计好的标尺图形曝光到涂有光刻胶的石英片上；之后对曝光的基片进行显影处理，并用 N<sub>2</sub> 枪吹干。显影后的基片采用溅射镀膜仪先后进行 20 nm Cr 及 100 nm Au 的溅射，之后以丙酮超声清洗 5 min 对剩余光刻胶进行剥离。最后以异丙醇、去离子水分别清洗基片并以 N<sub>2</sub> 枪吹干，即可获得覆有坐标的标尺（图 4b）。其中标尺的尺寸为 4 cm × 4 cm，每个微区大小为 2 mm × 2 mm，每个微区分别以字母 A 至 T 代表行数，以数字 1 至 20 代表列数进行标记。

在标尺使用时，首先以微区对目标区域进行粗定位，之后以目视判断的方法对微区内的光学特征与电子显微特征进行对照，以实现简便的原位图像嵌合。

### 3 光-电镜联用大面积拼接技术在拉曼选区分析中的应用

#### 3.1 光-电镜联用技术表征二维材料

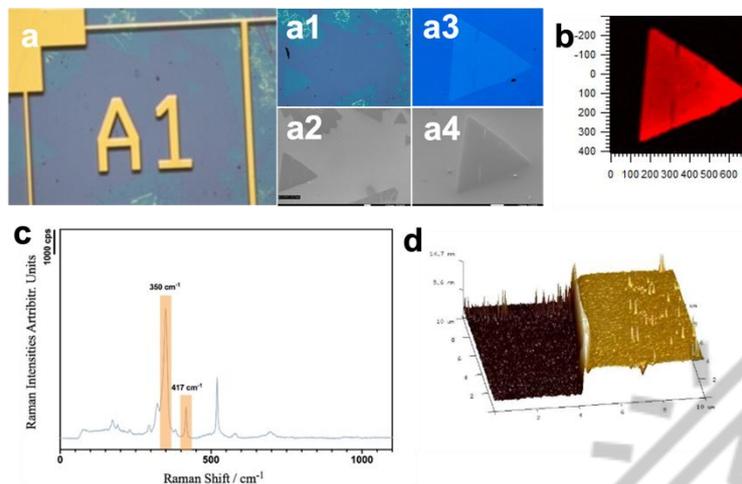


图5 A1区域左侧WS2样品光学显微图像(a、a1、a3)及电子显微图像(a2、a4); b, 拉曼mapping; c, 拉曼谱图; d, AFM厚度测定。

定制扫描电镜样品台，用微纳加工的方法制备透明的带坐标的定位分析标尺，将样品放置于扫描电镜样品台上，并放置于分析卡尺下方，用高拍仪拍摄图片，导入AZtec软件，在电镜快速扫描模式下寻找样品具体位置，标定样品所在位置的坐标，将样品台放置于其他仪器（原子力显微镜、拉曼光谱仪、光学显微镜和激光直写等），根据预知的坐标位置，将写头或者光源移动至相应位置，进行测试分析，实现光镜-电镜快速同一位点多设备的联用分析。图5为同一WS2样品点在光镜、扫描电镜、拉曼光谱仪、AFM观测时获得的材料信息。其中，高拍仪能够实现扫描电镜的粗定位和导航，在进行扫描电子图像拍摄时，其对应区域的图像信息可与光学显微镜图像进行对照。如图5a中所示WS2片层结构，其对应的光学图像如图5a1及图5a3所示。根据其粗坐标和对应的光学和电子显微图像可进行单个WS2纳米片的快速定位，其嵌套精度可达微米尺度，对应的扫描电子图像如图5a2及图5a4。同时利用光学导航定位，实现了AFM中单个WS2片的快速定位，如图5b所示，其特征结构与光学显微图像及电子显微图像吻合，证明了该方法的优越性。利用该技术实现了单个WS2片的成分快速分析（图5c）及层厚分析（图5d）。

#### 3.2 光-电镜联用技术解析表面增强拉曼光谱基底机制

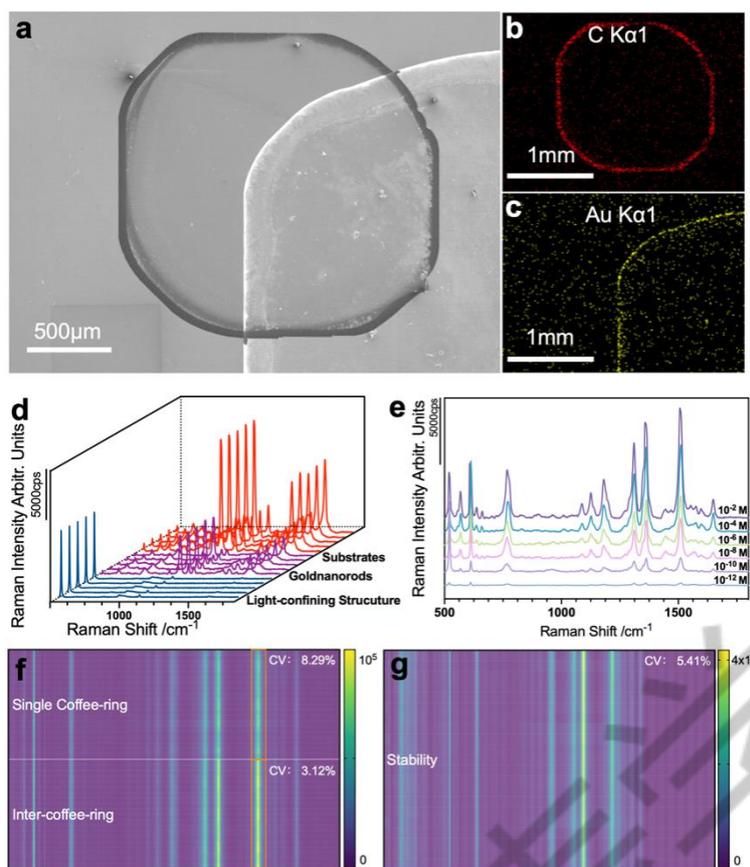


图 6 a, 双咖啡环的扫描电子图像; b, 双咖啡环中目标分析物分布; c, 双咖啡环中金纳米颗粒的分布; d, 陷光结构基底的增强性能; e, 三苯基锡 SERS 检测; f, 单、双咖啡环增强效果; g, 双咖啡环区域检测稳定性。

有机锡类化合物是一类环境内分泌干扰物，能够对环境、人体生殖系统造成危害<sup>[11]</sup>。其中，三苯基锡类化合物被广泛的应用在杀虫剂、油漆当中，对水环境和人类健康造成了巨大威胁<sup>[12]</sup>。因而，建立一种能够对三苯基锡进行快速、无损、灵敏检测的方法，对三苯基锡的环境监测和环境治理具有重要意义。为此，本文提出了一种基于双咖啡环效应的基底以提升纳米颗粒溶胶检测的稳定性和一致性。不同于传统 SERS 基底，该基底能够实现高灵敏、高一致性检测的区域仅位于双咖啡环交叉处。在显微拉曼光谱下快速选定检测区域，可实现三苯基锡的快速检测。

通过制备具有超疏水性能的陷光结构，以及具有优异 SERS 性能的金纳米棒溶胶，将两者有机结合，金纳米棒在检测环节同步自组装在陷光结构的内部，使待测物与金纳米棒充分混合、吸附。金纳米棒在咖啡环效应的作用下分布到液滴边沿并在毛细力作用下进行组装，待液滴完全挥发后，待测物完全吸附在金纳米棒的表面，形成共混的自组装体系，使待测物充分的分布在热点区域。由于咖啡环效应，该体系位于陷光结构的作用区域内，在陷光效应下其电场强度得到进一步的增强，进而提高 SERS 检测的稳定性和一致性。并且在咖啡环效

应和超疏水的双重作用下，纳米溶胶和待测物均会在咖啡环上充分富集，进一步提高基底的灵敏度。

为了研究双咖啡环效应的形成机制，验证纳米颗粒的高度自组装以及目标分析物在咖啡环区域的富集，使用定制的光-电联用样品台以及大面积拼接能谱功能对单、双咖啡环区域进行了大面积成像和元素分布分析（图 6a-c）。结合双咖啡环区域的微观形貌发现，双咖啡环交叉处的金纳米颗粒呈现高度的有序排列结构，其有序程度大大高于单个咖啡环印迹上的金纳米颗粒，这是该基底具有高度一致性的来源。此外，由于纳米颗粒的高度自组装，也形成了密度更高、增强效应更为剧烈的热点分布。因而实现了更高的灵敏度。通过联用手段在显微拉曼光谱仪下对目标检测区域快速定位，最终实现了高灵敏度、高一致性的三苯基锡检测，检测下限达到 10-12 M（图 6e）。其中双咖啡环的光谱强度显著高于单个咖啡环，且光谱强度变异系数为 3.12%，重现性较高（图 6f）。对基底进行单点连续检测，其光谱强度的变异系数为 5.41%，基底性能较为稳定（图 6g）。

## 4 结论与展望

为了深入探索物质规律，揭示科学问题的本质，科研工作中通常会结合光学显微镜、扫描电子显微镜、原子力显微镜、显微拉曼光谱仪等各种仪器手段对材料、芯片等目标分析物进行多维度的数据分析，以获取其更全面、准确的特征。上述仪器已经广泛的应用于各个学科的研究当中，然而当前主流的技术手段对不同维度数据的分析呈现割裂状态，对于同一微区目标样品的原位联合分析仍缺乏有效手段。尤其是主流高端科学仪器处于国外垄断状态，市场成熟的联用产品通常造价较高，也无法实现多种科学仪器的联用。为此，本研究开发了一种通过光学导航、目视粗定位以及显微图像定位结合的样品台及配套标尺。快速实现了光学显微镜、扫描电子显微镜及其他具显微光学系统仪器如原子力显微镜及显微拉曼光谱仪的联用，大大增强了仪器联用程度以及平台的样品原位数据分析能力。该样品台及标尺广泛兼容了材料制备、分析过程中需使用到的多数仪器，大大提升了相关学科数据获取能力，对其科研工作具有重要意义。进一步，由于当前样品台的定位仍然需要目视对准，无法实现自动化微纳米尺度的定位，未来还可搭载电动位移台、电驱系统以及与各仪器厂商的样品台适配等，集成原位拉伸、原位电化学等等系统，以实现更为全面的样品分析。

### 参考文献：

[1] Razi M, Tooze S A, CORRELATIVE LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY. In Methods

in *Enzymology: Autophagy in Mammalian Systems*, Vol 452, Pt B, Klionsky, D. J., Ed. Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 2009; Vol. 452, pp 261-275.

- [2] Pinto R, Vilarinho R, Carvalho A P, et al. Raman spectroscopy applied to diatoms (microalgae, Bacillariophyta): Prospective use in the environmental diagnosis of freshwater ecosystems[J]. *Water Res*, 2021, 198 117102.
- [3] Xu R, Li R L, Jia L Y, et al. An Efficient Strategy to Prepare Ultra-High Sensitivity SERS-Active Substrate Based on Laser-Induced Selective Metallization of Polymers[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9 (14): 5038-5049.
- [4] Chang L, Jiang S, Luo J, et al. Nanowell-enhanced Raman spectroscopy enables the visualization and quantification of nanoplastics in the environment[J]. *Environmental Science-Nano*, 2022, 9 (2): 542-553.
- [5] Zhao Q, Yang H, Nie B, et al. Wafer-Scale and Cost-Effective Manufacturing of Controllable Nanogap Arrays for Highly Sensitive SERS Sensing[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14 (2): 3580-3590.
- [6] Xie L P, Zeng H, Zhu J X, et al. State of the art in flexible SERS sensors toward label-free and onsite detection: from design to applications[J]. *Nano Research*, 2022, 15 (5): 4374-4394.
- [7] He S, Xie W, Fang S, et al. Label-free identification of trace microcystin-LR with surface-enhanced Raman scattering spectra[J]. *Talanta*, 2019, 195 401-406.
- [8] Pavliuk G, Pavlov D, Mitsai E, et al. Ultrasensitive SERS-Based Plasmonic Sensor with Analyte Enrichment System Produced by Direct Laser Writing[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, 10 (1): 14.
- [9] Xu G, Cheng H, Jones R, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Facilitates the Detection of Microplastics <1 μm in the Environment[J]. *Environ Sci Technol*, 2020, 54 (24): 15594-15603.
- [10] Liu X H, Deng H, Chang L, et al. Recent Progress of SERS for Environmental Estrogen Detection[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2020, 40 (10): 3038-3047.
- [11] Garcia-Lojo D, Nunez-Sanchez S, Gomez-Grana S, et al. Plasmonic Supercrystals[J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52 (7): 1855-1864.
- [12] Langer J, Jimenez de Aberasturi D, Aizpurua J, et al. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering[J]. *ACS Nano*, 2020, 14 (1): 28-117.