Fluoreszenzuntersuchungen und Oberflächenmodifikation mit dem optischen Rasternahfeldmikroskop

Diplomarbeit im Fach Chemie

von

Thomas Roth

ausgeführt am Laboratorium für Organische Chemie der
Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich
Gruppe Prof. Dr. R. Zenobi

Juli 1996

There is little that is new in neoliberal programs, trickle-down theories, and the rest of the doctrinal baggage that serves the interests of privilege and power. The ideology of oppression may differ in form when applied to Third World service areas and domestic populations, but similarities are apparent, and current enthusiasms are hardly more than a recapitulation, often sordid, of earlier devices to justify the privilege of those who hold the reins. As in the early nineteenth century, we are now once more to understand that it is a violation of natural liberty and even science to deceive people into thinking that they have some rights beyond what they can gain by selling their labor power. Any effort to depart from such right thinking leads directly to the Gulag, leading thinkers soberly explain.

Noam Chomsky [1]

Dank

Diese Arbeit wurde nur möglich dank der Zusammenarbeit mit vielen Leuten, die mich im Grossen wie im Kleinen unterstützt haben und denen ich hier herzlich danken möchte.

An erster Stelle zu nennen ist *Dr. Dieter Zeisel*, der mich selbstlos und kompetent betreut hat. Seiner Mithilfe und kritischen Begleitung verdankt diese Arbeit viel.
Ueberhaupt erst ermöglicht wurde meine Diplomarbeit durch *Prof. Dr. Renato Zenobi*, der mir einen Platz in seiner Arbeitsgruppe und ein interessantes Thema zur Verfügung gestellt hat. Durch seine Flexibilität, ideale Arbeitsbedingungen und zahlreiche Anregungen hat er mich sehr unterstützt.
Des weiteren sind da *Bertrand Dutoit* und *Dr. Volker Deckert*, die mit allerlei technischem Wissen zur Verfügung standen sowie alle nicht namentlich erwähnten Mitglieder der *Arbeitsgruppe*, die eine von Hilfsbereitschaft und Freundschaft erfüllte Arbeitsatmosphäre prägten, in der ich mich sehr wohl fühlte.

Besondere Erwähnung verdient *Dr. Peter Kernen* von der Universität Zürich, der für uns die Probe mit den kovalent immobilisierten FluoSpheres präpariert hat und bei weiteren Projekten geholfen hätte.
Benennen möchte ich noch *Dr. Martin Müller*, der sich die Zeit nahm, mich am Zeiss Axioplan Lichtmikroskop einzuführen, *Martin Colussi* und *Martin Döbler*, die mich über die Charakterisierung von Polymeren informierten, *Peter Nyffeler* und *Walter Jäggi*, die mir selbst exotische Geräte aus dem PC-Keller besorgten und *Angela Hammer*, die ihre GC-MS Einführung aus der Praktikumszeit für mich wiederholte.

An dieser Stelle danke ich allen, die unerwähnt bleiben und jenen Menschen, die mir besonders am Herzen liegen.

Kurzzusammenfassung

Das optische Rasternahfeldmikroskop (Scanning Near-Field Optical Microscope, kurz SNOM) ist ein neues, dem Rastertunnel- und dem Kraftmikroskop verwandtes Instrument, welches die optische Charakterisierung von Probenoberflächen auf einer Nanometerskala erlaubt. Anwendungsgebiete liegen in der chemischen Analytik von Oberflächen durch Spektroskopie im Nahfeld (Fluoreszenz, Raman), der Ausweitung klassischer Mikroskopie auf den Submikrometerbereich und in der gezielten Veränderung der Oberflächen mittels Desorption, thermischer Modifikation oder photochemischer Reaktionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches SNOM weiterentwickelt, damit Fluoreszenzstrahlung der Probenoberfläche mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden kann und mit nach einem Aetzverfahren hergestellten Spitzen ausgestattet, um genannte Oberflächenmodifikationen durchführen zu können.

Studien zu einem besseren Verständnis der Fluoreszenz im Nahfeld wurden an Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln unternommen. Die Kugeln wurden als Monolage auf Glimmer, in eine Polyvinylalkoholmatrix eingebettet und kovalent an eine ultraflache Goldoberfläche gebunden untersucht. Die Fluoreszenz von 282 nm grossen Nilrot-markierten Latexkugeln wurde auf ~410 nm Halbwertsbreite aufgelöst (Auflösung durch Apertur der Spitze limitiert) mit einem bezüglich dem ursprünglichen Instrumentenaufbau um einen Faktor vier verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 8. Ein 50%iges Ausbleichen im Nahfeld wurde für einen gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff nach rund 10^5 Absorptionsprozessen pro Molekül beobachtet, zwei Grössenordnungen schneller als im Fernfeld.

Geätzte Spitzen wurden bezüglich ihres Temperaturprofils untersucht. Bereits bei eingekoppelten Lichtleistungen von weniger als 1 mW wurde eine Erwärmung auf über 130°C beobachtet; der Temperaturanstieg ist nicht proportional zur eingekoppelten Lichtleistung. In Spitzen eingekoppelte Laserpulse wurde benutzt, um gezielt Oberflächenmodifikationen durchzuführen. Als am besten geeignet hierfür erwiesen sich geätzte Spitzen mit grossen Kegelwinkeln. Eine Reihe von Polymeren wurde untersucht und an Polystyrol und Polyvinylbutyral Strukturen auf einer Nanometerskala geschaffen; die in Polyvinylbutyral hergestellten Löcher wiesen eine Breite von ~60 nm auf. Der Mechanismus dieser Oberflächenmodifikationen ist teils thermisch, teils thermomechanisch.

Inhaltsverzeichnis

Dank I

Kurzzusammenfassung II

Inhaltsverzeichnis III

1. Einführung 1

2. Das optische Rasternahfeldmikroskop (SNOM) 4

2.1 Prinzip 4
2.2 Aufbau des SNOM 6
2.3 Spitzenherstellung 8

3. Fluoreszenz im Nahfeld 14

3.1 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Latexkugeln als Modellsystem für das SNOM 14
3.2 Fluoreszenz von Nilrot-markierten Latexkugeln in einem Polymerfilm 16
3.3 Quantitatives Bleichexperiment im Nahfeld 33
3.4 Fluoreszenz von kovalent auf Gold gebundenen Latexkugeln 49
3.5 Zusammenfassung 52

4. Polymermodifikation mit dem SNOM 54

4.1 Motivation der Polymere als System 54
4.2 Präparation und Charakterisierung der Filme 57
4.3 Abschätzung und Messung von Temperatureffekten an den Spitzen 61
4.4 Gezielte Modifikation der Filme 65
4.5 Zusammenfassung 75

5. Schlussfolgerungen / Ausblick 76

6. Literatur 77

7. Anhang 80

7.1 Verwendete Geräte 80
7.1.1 Fluoreszenzspektrophotometer 80
7.1.2 Spektrophotometer 80
7.1.3 Spektrograph 80
7.1.4 Lichtleistungsmessgerät 81
7.1.5 Profilometer 82
7.1.6 Lichtmikroskop 82
7.2 Chemikalien 83
7.3 Aufbau 84
7.3.1 Ar-Ionenlasereinkopplung 84
7.3.2 Schema des MOPO (Master Oscillator / Power Oscillator) 85
7.3.3 Verwendete Filter 87
7.4 Fluoreszenz 88
7.4.1 Berechnung des Energietransfers zwischen einzelnen Molekülen des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes 88
7.4.2 Routinemässige Bearbeitung der SNOM-Bilder 89
7.4.3 Berechnungen zur Form und Halbwertsbreite des Fluoreszenzlinienprofils der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kugel 90
7.4.4 Chemische Charakterisierung der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln 92

7.4.5 Einflüsse auf die Fluoreszenz der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln....93
7.4.6 Vollständige Daten zum Bleichen im Nahfeld einer Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln....98
7.4.7 Stabilität der SNOM-Rastervorrichtung....104
7.4.8 Kalibrierung des Photomultipliers....106
7.4.9 Vollständige Daten zum Bleichen einer Zweierlage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln im Fernfeld....108
7.4.10 Stabilität des Ar-Ionenlasers....109
7.4.11 Vergleich der Fluoreszenz der mit Nilrot und den mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln....110
7.5 Polymermodifikation....111
7.5.1 Kalibrierung des verwendeten Spin-Coaters....111
7.5.2 Daten zur Polystyrolmodifikation....112
7.5.3 Daten zur Polyvinylbutyralmodifikation....113
7.5.4 Daten zum Temperaturprofil der Spitze....115

1. Einführung

In den achtziger Jahren wurde eine neue Generation von Instrumenten zur Oberflächenanalyse auf einer atomaren Grössenskala entwickelt, die auf der direkten Wechselwirkung zwischen einer Spitze und einer Oberfläche beruhen. Die bekanntesten Vertreter sind das Rastertunnelmikroskop, für dessen Erfindung Binnig und Rohrer 1986 mit dem Nobelpreis bedacht wurden, und das Kraftmikroskop, welche beide heute routinemässig Anwendung finden. Ausgehend von der dabei verwendeten Technologie wurde in den späten achtziger Jahren das optische Rasternahfeldmikroskop (im Englischen *Scanning Near-Field Optical Microscope* oder kurz SNOM[1]) entwickelt [2], welches zusätzlich eine spektrale Dimension besitzt.

In der klassischen Mikroskopie wird die maximal erreichbare Auflösung durch die Beugung der verwendeten Strahlung limitiert; Strukturen kleiner als eine halbe Wellenlänge können nicht mehr aufgelöst werden. Für die optische Mikroskopie mit blauem Licht liegt diese Grenze bei rund 200 nm. Diese Diffraktionsgrenze des Fernfeldes kann im optischen Nahfeld umgangen werden, d.h. in einem Abstand von der Lichtquelle, der wesentlich kleiner ist als eine Wellenlänge der verwendeten Strahlung. Dies wird im SNOM ausgenutzt, indem eine Lichtquelle mit einer Apertur im Sub-Wellenlängenbereich nahe über die Probe gerastert wird. Abb. 1.1 zeigt den schematischen Aufbau eines SNOM.

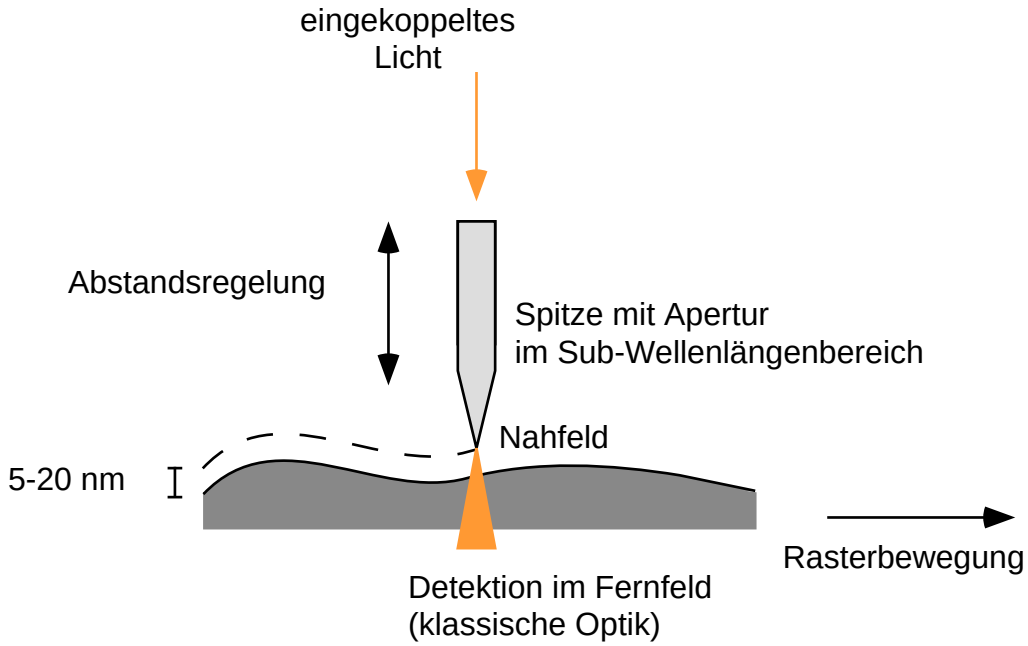


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau des SNOM

[1] im amerikanischen Sprachraum wird das Akronym Near-Field Scanning Optical Microscope (NSOM) verwendet; in älterer Literatur finden sich noch weitere Ausdrücke, die aber nicht mehr benützt werden

Als Spitze wird üblicherweise ein sich verjüngender, metallbedampfter Lichtleiter benutzt, z.B. eine Glasfaser oder Mikropipette mit einer Apertur an dessen Ende. Der Aperturdurchmesser beträgt typischerweise zwischen 20 und 100 nm und ist bestimmend für die optische Auflösung, vorausgesetzt der Abstand zur Oberfläche ist dauernd genügend klein. Dies wird durch einen Regelungskreis beruhend auf einer Scherkraftdetektion erreicht.
Eine bei ihrer mechanischen Eigenresonanz angeregte Spitze zeigt bei ihrer Annäherung an eine Oberfläche eine Dämpfung ihrer lateralen Schwingung, welche in einem Abstand von 5 bis 20 nm von der Oberfläche besonders ausgeprägt ist. Der genaue Mechanismus der Dämpfung durch Scherkräfte ist unbekannt, wird aber auf nahezu allen Oberflächen beobachtet. Diese Dämpfung kann gemessen und über einen Regelkreis durch ein vertikales Nachführen der Spitze konstant gehalten werden. Ueblicherweise wird der Setzpunkt so gewählt, dass sich die Spitze in einem Abstand von 5 bis 20 nm von der Oberfläche befindet.

Für die Herstellung der Spitzen existieren heute mehrere Verfahren. Ausgegangen wird fast immer von Glasfasern, die entweder geätzt oder unter Hitzeeinfluss mechanisch gezogen werden. Das Aetzverfahren ermöglicht es, auch Spitzen mit grossen Kegelwinkeln herzustellen. Die Spitzen werden danach mit Metall bedampft um eine Apertur an der Spitze zu bilden.

Mit dem SNOM kann eine Probe bezüglich Absorption, Kontrast, Polarisation, Fluoreszenz [3] und Raman [4] charakterisiert werden, die Detektion des Signals erfolgt im Fernfeld mittels klassischer Optik. In Transmission wurden an regelmässigen Strukturen Auflösungen von ~12 nm [5] errechnet, die Fluoreszenz einzelner Moleküle konnte auf 100 nm [6] aufgelöst werden. Nahfeldoptische Bilder sind quantitativ und qualitativ verschieden von herkömmlichen Mikroskopiebildern und müssen grundsätzlich interpretiert werden.
Durch die Scherkraftdetektion kann zudem die Topographie der Oberfläche aufgezeichnet werden. Deren Auflösung beträgt lateral etwa 20 nm und in z-Richtung einige Nanometer. Es muss beachtet werden, dass nie die Topographie selbst abgebildet wird, sondern immer nur eine Faltung zwischen der Spitze und der Oberfläche; daher fliesst die Geometrie der Spitze bei der Abbildung kleiner Strukturen in die Topographie ein.

Im Gegensatz etwa zur Rasterelektronenmikroskopie sind Proben ohne weitere Behandlung für die Untersuchung mit dem SNOM zugänglich, das Rastern selbst ist zerstörungsfrei. Einschränkungen für Proben ergeben sich durch die erforderliche Ebenheit auf einige Mikrometer sowie je nach Art der Scherkraftdetektion für die Reflektivität der Oberfläche. Viele der für die klassische Fluoreszenzmikroskopie entwickelten Methoden können bereits im SNOM angewendet werden [7]. Die Machbarkeit von nahfeldoptischen Untersuchungen in wässrigen Medien ist gezeigt worden [8], wodurch der Anwendungsbereich insbesondere in der Biologie weiter ausgedehnt werden kann.

Die Spitzen transmittieren nur einen Bruchteil des eingekoppelten Lichtes. Der grösste Teil wird zurückgestreut oder in der Metallschicht am Spitzenende absorbiert. Messungen haben gezeigt, dass die Temperatur am Spitzenende je nach eingekoppelter Lichtleistung bis 470°C beträgt [9]. Diese Erwärmung kann gezielt eingesetzt werden, um durch Lichteinkopplung in Spitzen Oberflächen zu modifizieren. Die Machbarkeit von Photodesorption und thermischer Desorption von Molekülen mit dem SNOM ist schon gezeigt worden [10, 11]. Damit ergeben sich zusätzlich zu

Fluoreszenz- und Ramansignalen neue Möglichkeiten einer chemischen Oberflächenanalyse im SNOM durch eine Probenentnahme auf einer Nanometerskala.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei voneinander unabhängige Problemstellungen behandelt. Die erste Aufgabe bestand darin, Voruntersuchungen im Hinblick auf Fluoreszenzmessungen an immobilisierten biologischen Makromolekülen durchzuführen. Wichtig ist dabei eine möglichst hohe Auflösung bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, wobei sichergestellt sein muss, dass die Moleküle weder bewegt noch ausgebleicht werden. Deshalb sollte das benutzte Messinstrument weiterentwickelt, ein besseres Verständnis der Fluoreszenzmessung gewonnen und geeignete Immobilisierungsmethoden gefunden werden.
Als Modellsystem wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Latexkugeln eingesetzt, welche aufgrund ihrer Eigenschaften für Untersuchungen im SNOM besonders gut geeignet sind (Kapitel 3.1). Sie zeigen eine starke, von der Art der Präparation unabhängige Fluoreszenz, sind gut makroskopisch charakterisierbar, helfen durch ihre Kugelform bei der Interpretation von SNOM-Bildern und können durch Oberflächenmodifikationen kovalent immobilisiert werden.
An SNOM-Untersuchungen einzelner Kugeln in einer Polymermatrix wurden Fragen der Auflösung, der Form der Fluoreszenzlinienprofile sowie Signaluntergrund und Signal-zu-Rausch-Verhältnis diskutiert (Kapitel 3.2).
Anhand von Messungen an einer Monolage der Kugeln wurde das im SNOM zumeist unerwünschte Ausbleichen von Farbstoffen quantifiziert, mit Messungen im Fernfeld verglichen und der Bleichmechanismus diskutiert (Kapitel 3.3).
Eine für das SNOM geeignete Immobilisierungsmethode durch eine kovalente Anbindung an Gold wurde am Beispiel Amino-modifizierter Latexkugeln vorgestellt und deren Visualisierbarkeit mit dem SNOM gezeigt (Kapitel 3.4).

Als zweite Aufgabe sollte die Machbarkeit und Art von Oberflächenmodifikationen von Polymeren mit dem SNOM untersucht werden. Polymere und deren Charakterisierung sind von grossem Interesse für die chemische Industrie.
Für die Modifikationen wurden geätzte Spitzen eingesetzt, welche durch eingekoppelte Laserpulse kurzfristig erhitzt wurden. Da über die Temperaturprofile von geätzten Spitzen noch keine Daten vorlagen, wurden entsprechende Messungen vorgenommen und interpretiert (Kapitel 4.3). Für die Untersuchungen wurden aufgrund praktischer Erwägungen die vier Polymere Polystyrol, Polyvinylbutyral, Polyvinylalkohol und Polymethylmethacrylat ausgewählt (siehe Kapitel 4.1) und charakterisiert (siehe 4.2). Unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wurden Modifikationen auf diesen Filmen versucht, die geschaffenenen Strukturen bezüglich ihrer Grösse und Form charakterisiert sowie ideale experimentelle Bedingungen für Oberflächenmodifikationen diskutiert (siehe Kapitel 4.4).

Entsprechend der zweiteiligen Aufgabenstellung ist diese Arbeit in die zwei grossen Kapitel “Fluoreszenz im Nahfeld” und “Polymermodifikation mit dem SNOM” aufgeteilt. Die Resultate werden jeweils in den Unterkapiteln fortlaufend diskutiert und am Ende des Kapitels zusammengefasst. Von umfangreichen Experimenten oder solchen, die nur indirekt mit dem SNOM zu tun haben sowie Berechnungen werden nur die wesentlichen Punkte aufgeführt, der Rest ist mit Verweisen im Anhang untergebracht. Ebenfalls im Anhang aufgeführt sind die verwendeten Geräte und Chemikalien sowie anderweitige Produkte.
Abkürzungen werden bei ihrem ersten Auftreten erklärt.

2. Das optische Rasternahfeldmikroskop (SNOM)

In den klassischen Mikroskopiemethoden, die Elektronenmikroskopie miteingeschlossen, wird die Auflösung durch Beugungserscheinungen begrenzt. Die maximal erreichbare Auflösung liegt in der Grössenordnung der halben Wellenlänge der verwendeten Strahlung, bei der Verwendung von blauem Licht also bei rund 0.2 μm.
In den achtziger Jahren wurde eine neue Generation von Instrumenten erfunden, die erstmals die Abbildung und Analyse von Oberflächen mit atomarer Auflösung gestattet. Dies begann 1982 mit der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops[2] durch *Gerd Binnig und Heinz Rohrer*, die dafür 1986 den Nobelpreis für Physik erhielten. Basierend auf der für das Rastertunnelmikroskop benutzten Technologie entwickelten *G. Binnig, C. F. Quate und C. Gerber* 1986 das Kraftmikroskop[3], welche diese Auflösung auch für nichtleitende Oberflächen zugänglich machte. Sowohl das Rastertunnelmikroskop wie auch das Kraftmikroskop messen kurzreichweitige Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der Oberfläche und bilden die Elektronendichteverteilung rsp. die Topographie der Oberfläche ab.

2.1 Prinzip

Eine der Folgeentwicklungen[4] des Kraftmikroskops ist das optische Rasternahfeldmikroskop, welches auf einer submikroskopischen Längenskala zusätzlich eine spektrale Dimension besitzt. Es nützt die Tatsache aus, dass die Auflösung im Nahfeld nicht wie im Fernfeld durch die Beugungslimite begrenzt wird. Als Nahfeld wird dabei der Bereich verstanden, der wesentlich näher als eine Wellenlänge der verwendeten Strahlung von der Lichtquelle entfernt ist. Als Spitze wird ein Lichtleiter mit einer Apertur im Sub-Wellenlängenbereich benutzt, wobei sich die Oberfläche stets im Nahfeld der Spitze befinden muss, damit die hohe Auflösung möglich ist. Dies wird durch eine geeignete Abstandsregulierung erreicht.

Für die Abstandsregelung wird - ähnlich wie in der dynamischen Kraftmikrosokopie - eine Scherkraftdetektion benutzt. Eine bei ihrer mechanischen Eigenresonanz angeregte Spitze zeigt bei ihrer Annäherung an eine Oberfläche eine Dämpfung ihrer lateralen Schwingung, welche in einem Abstand von 5 bis 20 nm von der Oberfläche besonders ausgeprägt ist. Diese Dämpfung wird durch Scherkräfte verursacht, welche noch nicht im Detail verstanden sind. Für die Bildung einer Regelungsschleife kann dabei sowohl das Amplituden- wie auch das Phasensignal benützt werden, wie in Abb. 2.1 qualitativ gezeigt ist.
Ein 50%-Abfall des Regelungssignal kann als Setzpunkt genommen werden, damit der Apex der Spitze immer 10 nm von der Oberfläche entfernt ist. So wird garantiert, dass sich die Oberfläche immer im Nahfeld der Spitze befindet. Die Detektion des Lichtsignals findet im Fernfeld statt.

[2] im Englischen *Scanning tunneling microscopy* (STM)
[3] im Englischen *Atomic force microscopy* (AFM)
[4] die Gesamtheit dieser Methoden, die auf einer Wechselwirkung einer Spitze mit einer Oberfläche beruhen, werden Rastersondenmikroskope (*Scanning probe microscopes* , SPM) genannt

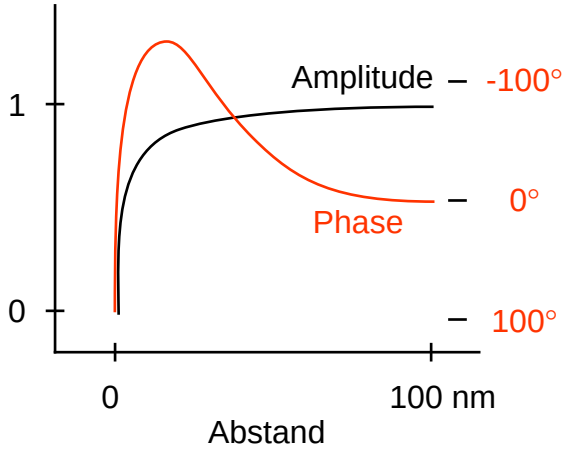


Abb. 2.1 Qualitatives Phasen- und Amplituden-verhalten bei Annäherung einer schwingenden Spitze an eine Oberfläche nach *Betzig et al.* [12]

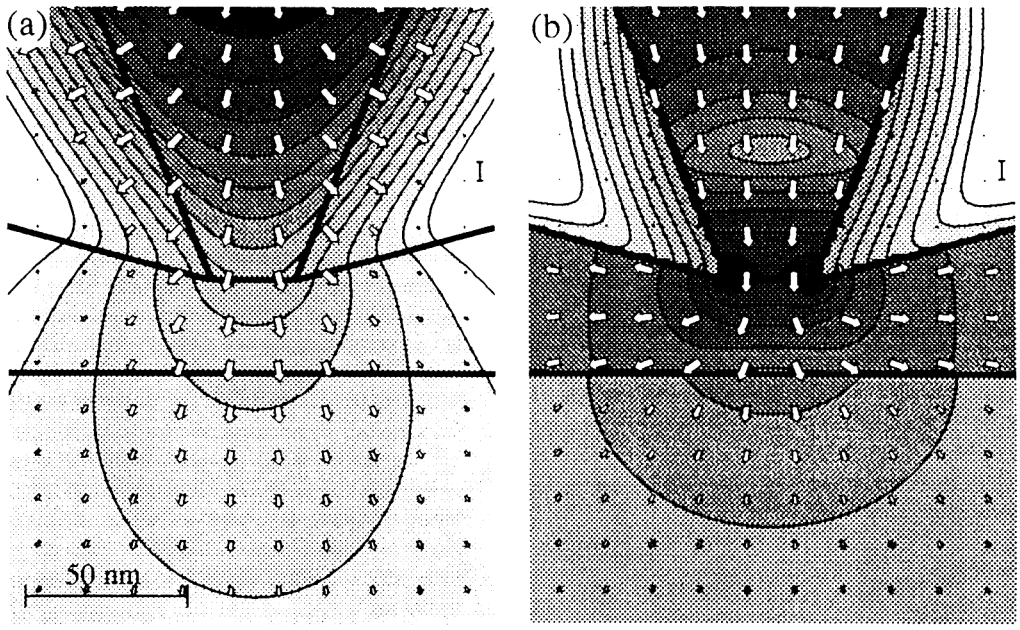


Abb. 2.2 Von *Novotny et al.* [13] berechnete Feldverteilung einer zweidimensionalen Modell-SNOM-Apertur für s- (a) und p-Polarisation (b)
Für die Berechnung wurde das Innere der Spitze und die Probe aus Glas sowie die Spitze aus Aluminium und der Zwischenraum als Vakuum betrachtet. Aufgetragen ist das Quadrat der Feldstärke mit einem Faktor 2 zwischen aufeinanderfolgenden Linien. Die Pfeile geben den Strahlungsfluss an, wobei die Pfeile der s-Polarisation bezüglich der p-Polarisation mit einem Faktor 17 skaliert wurden.

Die vertikale Position der Spitze kann während des Rasterns aufgezeichnet und dadurch die Topographie der Oberfläche aufgenommen werden. Wichtig ist die Tatsache, dass die Abbildung immer eine Faltung zwischen der Spitze und der Oberfläche darstellt. In Abb. 2.3 ist dies gezeigt.

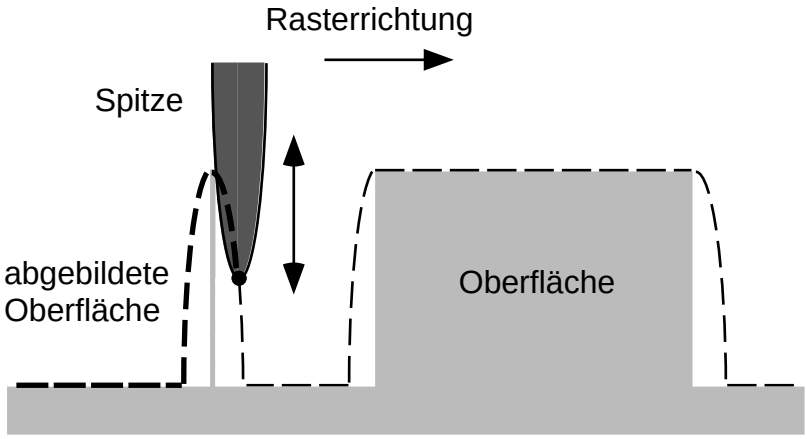


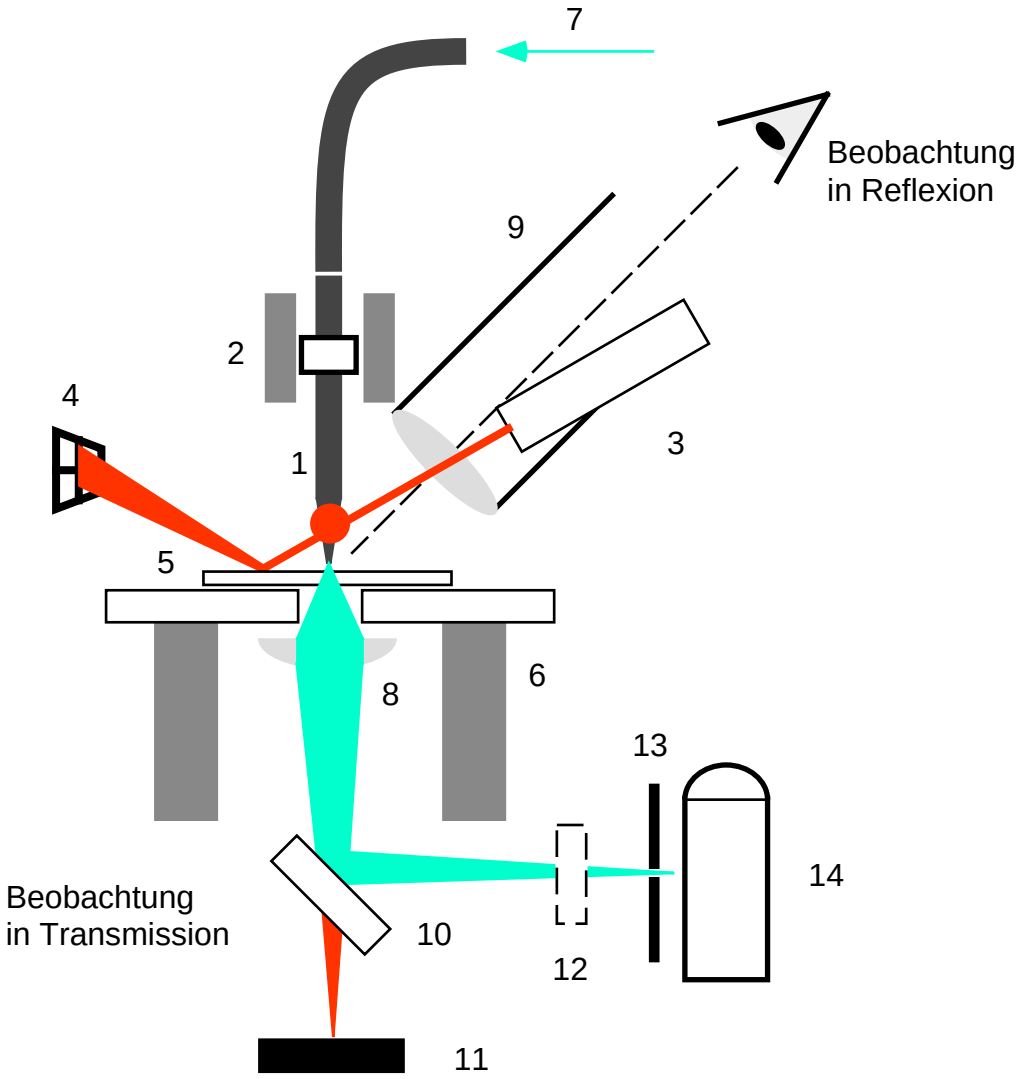
Abb. 2.3 Oberflächenabbildung mit dem SNOM als Faltung zwischen Spitze und Oberfläche

Nur Strukturen, die wesentlich grösser sind als die Spitze, werden exakt abgebildet; wesentlich kleinere Strukturen hingegen bilden in erster Linie die Spitze selber ab. Teilweise kann es vorkommen, dass Spitzen eine herausstehende, scharfe Kante besitzen und dadurch die Topographie wesentlich besser auflösen können.

Aufgrund der vom Fernfeld verschiedenen Feldverteilung (in Abb. 2.2 ist das Beispiel einer berechneten Feldverteilung von *Novotny et al.* [13] gezeigt) ergeben sich im Nahfeld durch die Nähe der Spitze zur Probe qualitativ und quantitativ andere Ergebnisse als im Fernfeld.
So haben *Trautman et al.* bei Fluoreszenzspektren im SNOM schmalere Banden als im Fernfeld beobachtet und dies der kleineren Verbreiterung durch die Molekülverteilung in der Probe zugeschrieben [14]. *Bian et al.* haben die Fluoreszenzlebenszeiten im SNOM untersucht und je nach Position der metallisierten Spitze eine leicht grössere oder wesentlich kleinere Lebensdauer der Fluoreszenz gefunden, letztere verursacht durch ein Fluoreszenzlöschen durch die Metallbedeckung der Spitze [6].

2.2 Aufbau des SNOM

Für die Arbeiten wurde das kommerzielle Aurora Near-Field Scanning Optical Microscope von Topometrix (Santa Clara, USA) benützt. In Abb. 2.4 ist sein Aufbau schematisch wiedergegeben.



1. Spitze mit Halterung
2. Schwingpiezos
3. Diodenlaser (670 nm)
4. Vierquadrantendetektor
5. Probe
6. Schrittmotoren und Piezos für x,y & z-Bewegung
7. in die Glasfaser eingekoppeltes Licht
8. 100x Mikroskopobjektiv (f = 160 mm, N.A. 1.3)
9. Objektiv
10. dichroischer Spiegel
11. CCD-Kamera
12. spektrale Filterung
13. Lochblende
14. Photomultiplier

Abb. 2.4 Aufbau des verwendeten optischen Rasternahfeldmikroskops

Für die Scherkraftdetektion wird ein Diodenlaser verwendet, welcher die oszillierende Spitze von der Seite beleuchtet und über die Reflexion auf der Probenoberfläche auf den Vierquadrantendetektor abbildet. Das Differenzsignal zwischen den beiden Detektorhälften wird durch die Schwingung der Spitze moduliert und ermöglicht so eine Messung der Dämpfung. Die Oszillation der Spitze bei ihrer Eigenresonanz,

typischerweise zwischen 20 und 120 kHz gelegen, wird durch eines von vier Piezosegmenten erzeugt.
Die Spitze ist fixiert und die Probe wird samt dem Tisch gerastert; somit bleibt der optische Lichtweg konstant. Die Grobpositionierung in den drei Raumrichtungen übernehmen Schrittmotoren, die eigentliche Rasterbewegung übernehmen drei Piezos in einer Dreibeingeometrie. Der zur Verfügung stehende Rasterbereich ist dabei horizontal 35x35 μm und vertikal 6 μm.

In die Spitze kann über einen Glasfaserspleisser eine beliebige Lichtquelle eingekoppelt werden; als solche standen ein Ar-Ionenlaser (vgl. **Ar-Ionenlasereinkopplung** S.85) und ein Nd:YAG gepumpter MOPO (vgl. **Schema des MOPO (Master Oscillator / Power Oscillator)** S.86) zur Verfügung.
An dem kontinuierlichen Ar-Ionenlaser können vier diskrete Wellenlängen (488, 496, 501 und 514 nm) eingestellt werden, während der MOPO Laserpulse einer beliebigen Wellenlänge im Bereich von 200 bis 2000 nm mit einer festen Wiederholrate von 20 Hz liefern kann.

Die Probe kann entweder in Transmission oder Reflexion auf der CCD-Kamera betrachtet werden; die Probe wird dabei von einer eingebaute Lampe beleuchtet. Die Lichtwege können über das Mikroskopobjektiv rsp. das Objektiv separat fokussiert werden, jedoch laufen beide über einen gemeinsamen Umlenkspiegel (in Abb. 2.4 nicht gezeichnet). Das interessierende Licht im Bereich[5] von 450 bis 530 nm wird von einem dichroischen Spiegel unter 45° ausgekoppelt und kann spektral und örtlich gefiltert werden. Dies geschieht durch Filter (vgl. **Verwendete Filter** S.88) rsp. durch eine 100 μm-Lochblende. Als Detektor wird ein Photomultiplier (R3788 von Hamamatsu) verwendet.

Die Detektionsgeometrie des Aurora-SNOM musste abgeändert werden, um den Bedürfnissen gerecht zu werden. Beim ursprünglichen Lichtweg wurde das Licht über einen hochreflektierenden Spiegel auf den Photomultiplier geworfen; der Aufbau bot wenig Platz für Filter.
Messungen haben gezeigt, dass das Licht des für die Scherkraftdetektion verwendeten Diodenlasers (670 nm) sehr effizient von der Optik gesammelt wird und oft eine Grössenordnung intensiver ist als das aus der Spitze austretende Anregungslicht. Selbst unter Einsatz eines holographisch hergestellten Bandpassfilters und zweier Kurzpassfilter war das Licht des Scherkraftlasers doppelt so stark wie das des durch ein holographisches Bandpassfilter abgeschwächte Anregungslicht.
Deshalb wurde das Licht über einen dichroischen Spiegel ausgekoppelt und durch eine Lochblende hindurch auf den Photomulitplier fokussiert. Da der Scherkraftlaser die Probenoberfläche nicht an der gleichen Stelle wie das Anregungslicht trifft, ist eine solche räumliche Filterung sehr effektiv. Bei gut fokussiertem Anregungslicht aus der Spitze konnte bei Gebrauch einer 50 μm-Lochblende ganz auf Filter für den Diodenlaser verzichtet werden. Der dichroische Spiegel koppelt nur Licht zwischen 450 und 600 nm aus und lässt das Licht des Diodenlasers durch; somit konnte auch die Gesamtzahl der optischen Elemente reduziert werden.

2.3 Spitzenherstellung

Die Verfügbarkeit guter Spitzen ist für das SNOM essentiell. Die Spitzen bestimmen durch ihre Wechselwirkung mit der Probe die Qualität der aufgenommenen Bilder rsp.

[5] effektiv wird das Licht bis etwa 600 nm ausgekoppelt

der damit gemachten Messungen. Abb. 2.5 gibt eine Spitze schematisch unter Angabe der in der Arbeit benützten Nomenklatur und typischer Dimensionen wieder.
Eine gute Spitze sollte eine etwa 20 - 50 nm grosse Apertur am Apex haben und eine zenralsymmetrische, gleichmässige Metallbedampfung aufweisen. Die Transmissionsrate, d.h. das Verhältnis zwischen eingekoppelter und aus der Apertur austretender Lichtleistung, soll möglichst gross sein.

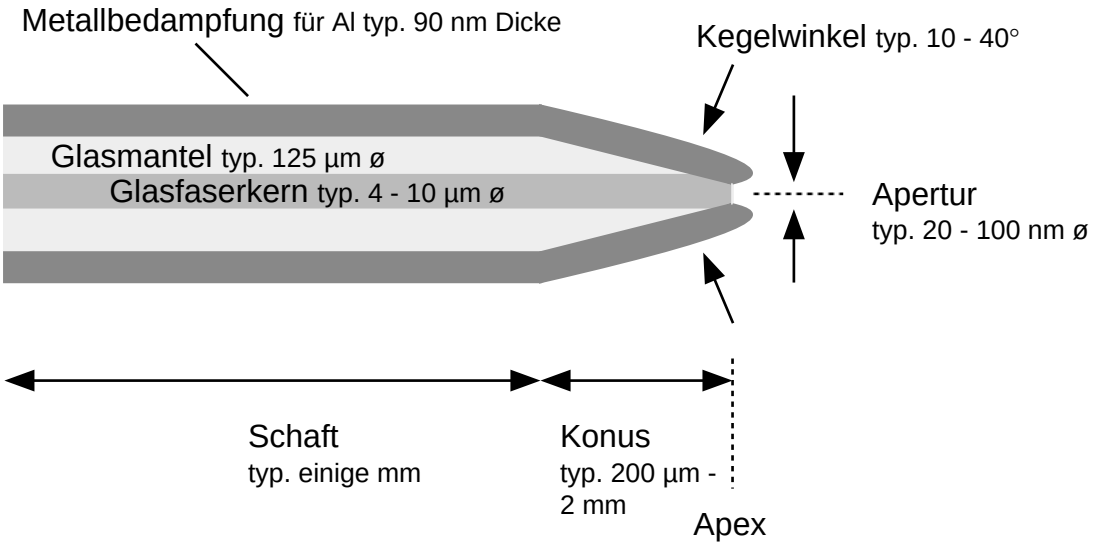


Abb. 2.5 Aufbau einer Spitze

Zusätzlich gibt es apparative Anforderungen, die eine einfache Handhabung und ein stabiles Rastern ermöglichen. Die mechanische Eigenresonanz der Spitze muss ausgeprägt und stabil sein, damit die Abstandsregelung über den Scherkraftmechanismus funktionieren kann. Dies hängt ab von der Form der Spitze und der Festigkeit der Spitzenhalterung, aber auch von der betrachteten Probe.

Ausgangspunkt für die Spitzen sind normalerweise Glasfasern oder Mikropipetten. Eine Glasfaser besteht aus einem Kern aus Glas von einigen µm Durchmesser, der von einer dicken Schicht von Glas eines niederen Brechungsindizes umgeben ist. Diese sorgt dafür, dass eingekoppeltes Licht durch Totalreflexion innerhalb des Kerns bleibt. Der Transmissionsverlust von Glasfasern liegt im Bereich von einigen dB / km und ist somit für typische SNOM-Anwendungen vernachlässigbar. Um das Glas hüllt sich ein Plastikmantel, der die Glasfaser vor mechanischer Belastung schützt und ihr Flexibiltät verleiht.

Für die Herstellung sind sowohl das Ziehen als auch das Aetzen von Glasfasern gebräuchlich.
Beim Ziehen heizt ein CO_2-Laser oder ein Filament lokal die Glasfaser, welche von kommerziellen Mikropipettenziehern auseinandergezogen und dabei immer dünner wird. Gezogene Spitzen sind üblicherweise sehr spitz und verjüngen sich ungleichmässig zum Apex hin; ein eigentlicher Konus ist nicht vorhanden rsp. erstreckt sich über mehrere Millimeter. Das Verfahren ist gut reproduzierbar, die Variationsmöglichkeiten in der Apexgeometrie sind gross, wobei auf die Konusregion wenig Einfluss genommen werden kann.

Für geätzte Spitzen hat sich die *protection layer method* von Turner [15] bewährt. Abb. 2.6 gibt sie schematisch wieder.

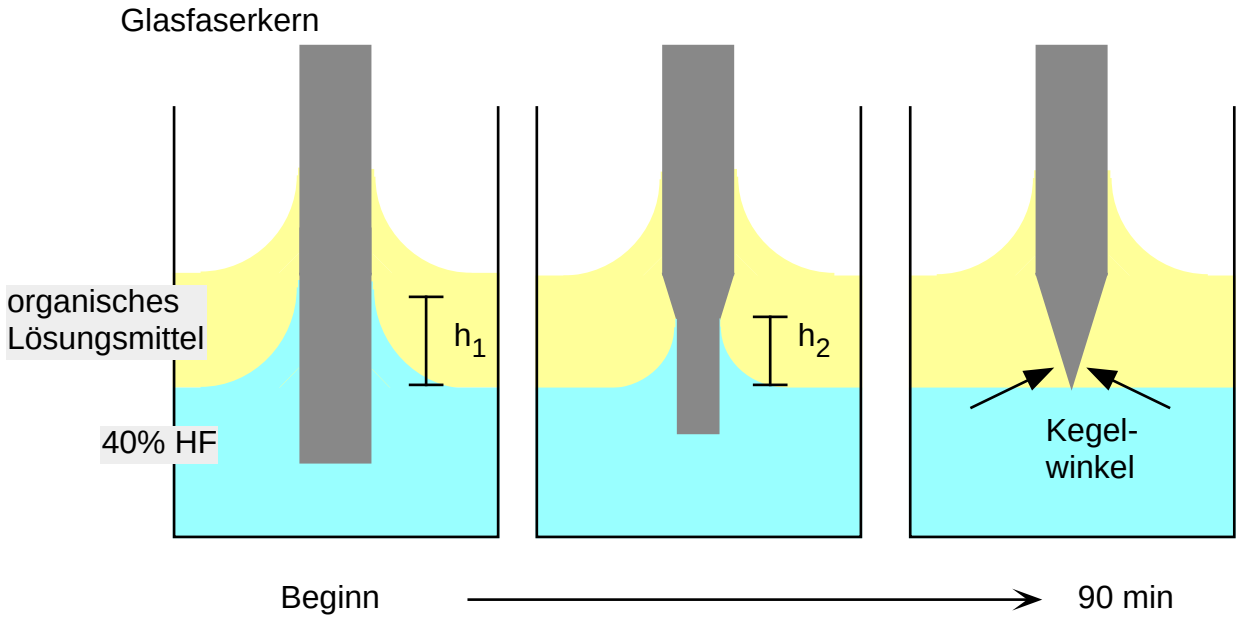


Abb. 2.6 Herstellung der Spitzen durch Aetzen

Dieses Verfahren ist in vielerlei Hinsicht elegant. Durch die Wahl des organischen Lösungsmittels über der Aetzflüssigkeit (Flussäure) lässt sich der Kegelwinkel innerhalb eines weiten Bereiches steuern [16]; zudem ist der Prozess selbstbeendend und somit praktisch für die Durchführung. Er beruht auf dem Prinzip, dass die Höhe eines Flüssigkeitsmeniskus um einen zylindrischen Körper von dessen Durchmesser abhängt. Durch das Aetzen verjüngt sich der Glasfaserkern sukzessive, wodurch die Meniskushöhe abnimmt und so die Kegelform ausgebildet wird. Der Kegelwinkel wird dabei durch die anfängliche Meniskushöhe bestimmt, welche wiederum eine Funktion des organischen Lösungsmittels ist rsp. seiner Oberflächenspannungen gegenüber der Flussäure und der Glasfaser. Das organische Lösungsmittel verhindert zudem den Angriff der Flussäuredämpfe auf den Rest der Glasfaser, daher der Name *protection layer method*.

Nach dem Aetzen rsp. Ziehen der Spitzen müssen diese mit Ausnahme des Apexes metallisiert werden, um die Apertur entstehen zu lassen und Transmissionsverluste in der Konus-Region so gering wie möglich zu halten. Der Wichtigkeit einer guten Apertur für das SNOM entsprechend ist dies ein weiterer kritischer Schritt in der Spitzenherstellung.

Die Metallisierung wird in der Regel durch Aufdampfen einer Metallschicht durchgeführt, da dies eine örtliche Differenzierung erlaubt. Ausgenutzt wird dabei ein “Schatteneffekt”, d.h. die Tatsache, dass bei Aufdampfanlagen die Atomquelle lokalisiert ist und sich die Atomdämpfe radial ausbreiten. Die Spitzen werden leicht abweichend von der Senkrechten zur Dampfausbreitungsrichtung - die Spitze zeigt von der Verdampfungsquelle weg - angeordnet und beständig um die eigene Achse gedreht.

Das Metall kann in einer stromdurchflossenen Metallwanne, die sie dabei erhitzt, rein thermisch verdampft werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Elektronenstrahlkanone, bei der thermisch erzeugte Elektronen beschleunigt und durch ein Magnetfeld auf das Metall gelenkt werden, welches sich erhitzt und verdampft. Die dabei in der Verdampfungsanlage entstehenden Ladungen müssen abgeführt werden [17]. Als Metall wird oft Aluminium benützt, da es relativ strukturlose Metallschichten bildet und eine der geringsten Eindringtiefen für Licht (~ 15 nm) aufweist.
Die Dicke der aufgedampften Schicht kann indirekt recht gut bestimmt und damit das Aufdampfen kontrolliert werden. Dies geschieht durch eine Schwingquarzwaage[6], die in der gleichen Richtung und im gleichen Abstand von der Verdampfungsquelle wie die Spitzen senkrecht zur Dampfausbreitungsrichtung positioniert wird. Die sich darauf bildende Metallschicht erhöht die Masse des Schwingquarzes und damit seine Schwingfrequenz. Durch die Massenzunahme kann dann auf die Schichtdicke zurückgerechnet werden. Für die Schichtdicke auf dem Konus der Spitzen muss dabei noch dessen Anstellwinkel zur Ausbreitungsrichtung und die Rotation der Spitzen berücksichtigt werden.
Verunreinigungen auf den Spitzen oder in der Verdampfungsanlage sowie zu schnelles oder zu heisses Aufdampfen führen zu Metallauswüchsen an den Spitzen. Spitzen werden oft auch ganz zugedampft.

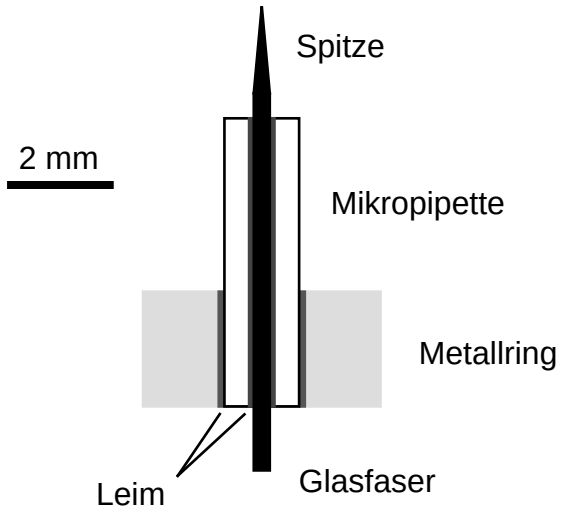


Abb. 2.7 Aufbau der Spitzenhalterung

Die weitere Bearbeitung betrifft die Spitzenhalterung (siehe Abb. 2.7), mit welcher die Spitze im SNOM eingebaut wird. Ueblicherweise geschieht dies durch einen kleinen Metallring, der durch einen Magneten gehalten wird. Als Führung für die Glasfaser dient ein darin eingeleimtes Stück einer Mikropipette. Das Einleimen der Glasfaser in die Mikropipette entscheidet oft über die Güte der mechanischen Resonanz.

Die Herstellung geätzter Spitzen verlief routinemässig. Als Spitzenführung dient ein ca. 7 mm langes Stück einer Mikropipette, welches mit einem Sekundenleim (Cyanolit®, auf Cyanoacrylatbasis) in einen Metallring mit 4 mm Durchmessern eingeleimt wird; die Mikropipette ragt dabei zur Hälfte aus dem Metallring heraus. Für

[6] es können mit einem 14 Mhz AT-Quarz bei ±1°C (die Thermostatisierung ist kritisch) $4 \cdot 10^{-9}$ g·cm^{-2} bestimmt werden [18]. Somit sind Schichtdicken im Å-Bereich messbar

das weitere Vorgehen dient ein speziell für die Spitzenherstellung konzipierter zylinderförmiger Spitzenhalter aus Aluminium, der die Spitzenführung und die Glasfaser fixiert und schützt. Ein Teil des Mantels der Glasfaser (Single-mode Glasfasern von Cableoptic, mit 4 μm-Kern und Grenzwellenlänge von 300 nm oder Multi-mode Glasfasern von Telecom, mit 9 μm-Kern, 125 μm Glasmanteldurchmesser, für 1550 nm optimiert) wird in Aceton aufgeweicht und dann abgestreift. Die Glasfaser wird in die Spitzenführung eingefädelt und hinten am genannten Alukörper fixiert, so dass nur der aus der Mikropipette herausragende Teil entmantelt ist.
Die Spitzenhalter werden mit den Spitzen nach unten in eine Teflonscheibe geschraubt, welche durch Füsse in einem Abstand von 2.5 cm vom Boden gehalten wird. Eine solche Scheibe, die Platz für mehrere Spitzenhalter bietet, wird in eine mit 110 ml 40% Flussäure und 30 ml des organischen Lösungsmittels gefüllte Teflonschale von 10 cm Durchmesser gestellt. Als organische Lösungsmittel werden entweder Dibutylether und p-Xylol verwendet, je nachdem, ob ein kleiner oder ein grosser Kegelwinkel gewünscht war. Ein leichter Luftstrom über der Teflonscheibe vertreibt allfällige Flussäuredämpfe, die zum Bruch der Glasfasern führen. Erschütterungen sind während des Aetzprozesses zu vermeiden.
Nach 90 min wird die Scheibe aus der Aetzlösung herausgenommen, die Spitzen mit deionisiertem Wasser gespült und an der Luft trocknen gelassen.
Bedampft werden die Spitzen in einem BAE 370 Coating System von Balzers. Die Spitzenhalter, in einem Winkel von 10° zur Verdampfungsrichtung im Abstand von etwa 20 cm montiert, werden mittels eines Motors mit 15 Umdrehungen pro Minute rotiert. Es wird bei einem Vakuum von ca. 10^{-5} mbar kalt aufgedampft. Als Atomquelle dient dabei thermisch verdampftes Aluminium. Mittels eines Verschlusses über der Verdampfungsquelle wird verhindert, dass der erste Schwall von Aluminiumoxiden und eventuellen Oberflächenverunreinigungen die Spitzen erreichen. Aufgedampft wird eine Schicht von 300 nm mit einer Rate von 3 nm/s, gemessen mit dem in der Nähe der Spitzen positionierten Schwingquarzwaage; dies entspricht einer Schicht von etwa 90 nm auf den mit p-Xylol und Dibutylether geätzten Spitzen.

Die bedampften Spitzen werden dann mit dem gleichen Sekundenleim in die Spitzenführungen eingeleimt, ein Vorgang der mehrmals wiederholt werden muss bis die Spitzen gut in der Führung halten. Routinemässig werden die Spitzen mit eingekoppeltem Licht unter dem Lichtmikroskop charakterisiert. Am Apex sollte die Spitze gleichmässig in den Endpunkt zulaufend sein, ohne irgendwelche Strukturen in der Metallbeschichtung. Das eingekoppelte Licht sollte als kleiner Lichtpunkt am Apex mit wenig oder keinen Beugungsringen sichtbar sein und sollte den Halbraum um die Spitze möglichst strukturlos ausleuchten[7].
Die Transmissionsrate wurde durch Messungen mit dem Lichtleistungsmessgerät bestimmt. Die Leistung aus der Spitze wird mit der im Spitzenhalter fixierten Spitze gemessen, die mittels eines Adapters auf das Lichtmessgerät geschraubt werden kann. Als Referenz dient das aus der Glasfaser austretende Licht, welches über den Glasfaserspleisser in die Spitze gekoppelt wird[8].
Für eine weitergehende Charakterisierung wie z. B. die Bestimmung der Aperturgrösse oder methodische Untersuchungen für die Spitzenherstellung, können Spitzen unter dem Elektronenmikroskop betrachtet werden. Die Aperturgrösse wird von vielen Arbeitsgruppen an im SNOM gemessenen optischen Linienprofilen abgeschätzt. Hierfür werden von genügend kleinen Objekten die Halbwertsbreite oder der 10 zu 90%-Kontrast[9] angegeben.

[7] dies im Gegensatz zu einer gebrochenen Glasfaser, die einen sehr kollimierten Strahl liefert
[8] dies gibt nicht exakt die Transmissionsrate wieder, da die unterschiedlich gute Einkopplung beim Spleissen hineinfliesst (ca. ± 10%)
[9] Längenbereich, in dem das Signal bei einer Bande von 10% zu 90% des Maxima ansteigt

Die Qualität der mechanischen Eigenresonanz kann a priori nicht abgeschätzt werden; sie wird erst bei der Verwendung im SNOM erkennbar.

Die verwendeten gezogenen Spitzen (nominell 50 nm Apertur, 125 μm lange “Konusregion”) wurden bei Topometrix käuflich erworben.

In Tab. 2.1 sind die Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten Spitzen wiedergegeben.

Herstellung	Kegelwinkel / °	Transmission
geätzte Spitzen[10]:		
p-Xylol	25 - 30	10^{-4} - 10^{-2}
Dibutylether	5	10^{-5}
gezogene Spitzen:		
Topometrix	8-10°	10^{-4} - 10^{-7}

Tab. 2.1 Vergleich der verwendeten Spitzen

[10] nach *Hoffmann et al.* [16] kann mit verschiedenen Lösungsmitteln der Kegelwinkelbereich zwischen 8 und 41° abgedeckt werden, was jedoch von unserer Gruppe nicht bestätigt worden ist

3. Fluoreszenz im Nahfeld

Mit dem SNOM aufgenommene Fluoreszenz ist heute keine Novität mehr. Trotz der vielen darüber erschienenen Publikationen sind nach wie vor wichtige Aspekte der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe sowie dem Verhalten von Molekülen im Nahfeld ungeklärt. Für einen routinemässigen Einsatz des SNOM zur Oberflächenanalyse, zur Abbildung eines Kontrastes oder von Fluoreszenz im Nanometer-Bereich müssen Technik und Interpretation der Bilder durch ein tieferes Verständnis verbessert werden.
Für gezielte Untersuchungen eignen sich vor allem einfache, gut charakterisierbare Systeme. Ein wichtiger Punkt ist dabei die Möglichkeit von verschiedenen, voneinander unabhängigen Charakterisierungen. Dies ist besonders im SNOM sehr wichtig, da zum Beispiel für die optische Charakterisierung im Nanometerbereich keine Alternativmethode zur Verfügung steht. Die untersuchten Systeme sollten deshalb für andere Methoden zugänglich sein, im Falle der Fluoreszenz konkret für klassische optische Untersuchungsmethoden wie Mikroskopie, Absorptions- und Fluoreszenzspektrophotometrie.

3.1 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Latexkugeln als Modellsystem für das SNOM

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Kugeln stellen ein gut charakterisierbares System dar. Sie sind in verschiedenen Grössen mit verschiedenen (Fluoreszenz)Farbstoffen erhältlich. Einzeln sind sie im Mikroskop als leuchtende Punkte, wenn auch ohne Auflösung, zu sehen; im Verband bilden sie oft regelmässige Strukturen - z.B. Schichten - aus, die im Mikroskop gut charakterisiert werden können. Durch ihren hohen Gehalt an Fluoreszenzfarbstoffen sind sie problemlos detektierbar, wodurch auch weniger empfindliche Methoden angewandt werden können. Für die Anwendung im SNOM sehr wichtig ist die sehr genau definierte Form und Grösse der Latexkugeln. Durch die Erkennung in der Topographie kann vorhergesagt werden, wo Fluoreszenz zu erwarten ist.
Die für diese Arbeit verwendeten *FluoSpheres*, ein Produkt von Molecular Probes, sind in Abb. 3.1 schematisch wiedergegeben.

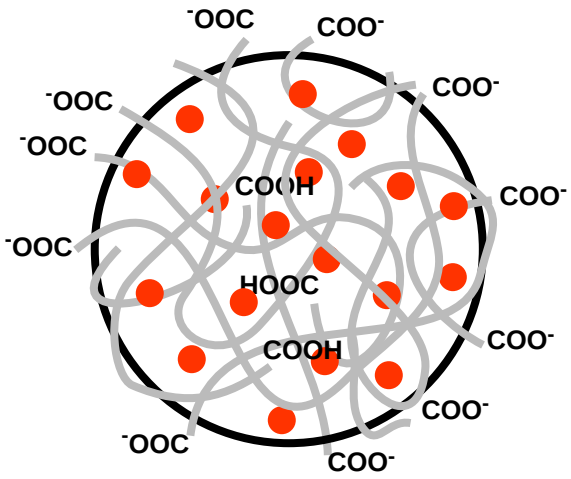


Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kugel aus carboxylat-modifiziertem Latex in wässriger Lösung

Das Schema fasst experimentelle Resultate (vgl. **Chemische Charakterisierung der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln** S.93) und Spezifikationen des Herstellers zusammen [19]. Die verwendeten Kugeln haben einen nominalen Durchmesser von 0.2 µm und bestehen aus Latex, d.h. aus Polystyrol. Während der Produktion kann der Durchmesser nach den Angaben des Herstellers auf wenige Prozent genau kontrolliert werden. Bei den Untersuchungen im SNOM haben wir nie detektierbare Abweichungen von der Kugelform festgestellt.

Die Kugeln sind mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen wie z.B. mit Sulfat-, Amino-, Carboxylat-, Aldehyd- oder im konkreten Fall Carboxylat- oder Sulfatgruppen erhältlich. Nach Angabe des Herstellers gibt es etwa 10^6 bis 10^7 funktionelle Gruppen an der Oberfläche. Durch ihren ionischen Charakter (Sulfat-, Amino- und Carboxylatgruppen) dienen diese funktionellen Gruppen an der Oberfläche dazu, die Latexkugeln in Lösung zu halten rsp. die bei den grossen hydrophoben Polymerpartikeln inhärente Neigung zur Agglomeration zu verhindern. Entsprechend müssen die *FluoSpheres* in einem pH-Bereich verwendet werden, in dem die funktionelle Gruppe eine Ladung trägt. Im Falle der Carboxylat-modifizierten Kugeln ist dies der pH-Bereich oberhalb pH 5, bei den Sulfat-modifizierten oberhalb pH 2. Trotzdem sollten die *FluoSpheres* vor jeder Anwendung ultrabeschallt werden, um evtl. vorhandene Agglomerate zu zerstören.
Die funktionellen Gruppen an der Oberfläche erlauben auch eine kovalente Anbindung von Molekülen (über die Aldeyhd-, Amino- und Carboxylatgruppen), was ein weites Feld von Anwendungen erlaubt. Durch ein Extraktionsexperiment konnte gezeigt werden, dass alle Polystyrolketten endgruppenmodifiziert sind. Dies lässt erwarten, dass sich im Innern der Kugel protonierte Carboxylatfunktionen befinden; ob diese allerdings einen Einfluss auf die Fluoreszenz haben ist unbekannt. In dieser Arbeit wurden Amin-modifizierte Latexkugeln als Modell für eine Immobilisierung von Proteinen verwendet, siehe das Kapitel “Fluoreszenz von kovalent *auf* Gold gebundenen Latexkugeln”.

Wie ebenfalls im Experiment gezeigt werden konnte, ist der Fluoreszenzfarbstoff in keiner Weise an die Polymermatrix gebunden, also in der Polymermatrix gelöst. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe apolar sind, lässt sich erwarten, dass sie innerhalb der Kugel homogen verteilt sind. Dies wird vom Hersteller auch so angegeben. Der Hersteller gibt eine Zahl[11] von $5.9 \cdot 10^4$ Fluoreszenzfarbstoffmolekülen pro Kugel für die in dieser Arbeit verwendeten *FluoSpheres* mit dem (nicht spezifizierten[12]) gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff an. Bei einem Kugeldurchmesser von 216 nm sind die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle also im Schnitt etwa 5 nm voneinander entfernt.

Dies ergibt für die Fluoreszenz vorteilhafte Bedingungen. Durch die Immobilisierung der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle in der Polymermatrix[13] fallen Fluoreszenzlöschprozesse durch Zusammenstösse oder Komplexbildung weg. Der Energietransfer zwischen einzelnen Molekülen auf eine Distanz von 5 nm ist vernachlässigbar, wie eine Berechnung nach der Theorie des Donor-Akzeptor Dipolpaares zeigt (vgl. **Berechnung des Energietransfers zwischen einzelnen Molekülen des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes** S.89). Die einzige verbleibende Möglichkeit für den Zerfall der Fluoreszenz sind Reaktionen der Moleküle über angeregte Zustände, die zur Degradation des Fluoreszenzfarbstoffes führen. Dies wird im Detail im Kapitel “Quantitatives Bleichexperiment im Nahfeld” behandelt.
Durch Experimente konnte gezeigt werden (vgl. **Einflüsse auf die Fluoreszenz der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln** S.95), dass die *FluoSpheres* durch das Trocknen nicht degradiert werden und ihre Fluoreszenz im trockenem Zustand (wie er für SNOM-Proben die Regel ist) etwa der in Lösung entspricht. Dies ist z.B. für einzelne, aufgetrocknete Moleküle nicht der Fall.

Die *FluoSpheres* bieten im SNOM also eine starke und durch herkömmliche Fluoreszenzlöschprozesse ungestörte Fluoreszenz. Präparative und technische Probleme können so im voraus minimiert werden. Mit den *FluoSpheres* präparierte Proben sind gut über makroskopische Methoden charakterisierbar und vereinfachen so die Interpretation der im SNOM erhaltenen Ergebnisse erheblich.

3.2 Fluoreszenz von Nilrot-markierten Latexkugeln in einem Polymerfilm

Die Verwendung von Nilrot [20, 21] als Fluoreszenzfarbstoff ist nicht üblich. In den achtziger Jahren wurde zwar Nilrot von *Greenspan et al.* im Fluoreszenzmikroskop zur Visualisierung von Fetttröpfchen im Cytoplasma lebender Zellen benutzt [22]; in einer ausführlichen Liste über Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Anwendungen in der Biologie und Medizin im *Organic Luminescent Materials* [23] aus dem Jahr 1988 ist Nilrot aber nicht aufgeführt, was auf seine seltene Verwendung als Fluoreszenzfarbstoff schliessen lässt.
Inzwischen haben kommerzielle Chemikalienvertreiber wie Fluka Nilrot in Kleinstmengen in ihr Sortiment aufgenommen [24], was Ausdruck einer gesteigerten Nachfrage als (Fluoreszenz)Farbstoff sein wird, da für synthetische Zwecke das rund

[11] Fluoreszenzfarbstoffdichte für alle *FluoSpheres* etwa gleich
[12] der Hersteller Molecular Probes nennt den Farbstoff *yellow-green fluorescent dye*. Eine entsprechende Anfrage wurde mit “Concerning your question about the fluorescent dye in our product L-5241, I have to inform yout that this information is trade secret, so I'm sorry I can't tell you this.” beantwortet
[13] der Hersteller verspricht, dass Verunreinigungen im Polymer durch den Herstellprozess minimiert werden

100mal billigere Nilblau zur Verfügung steht. Abb. 3.2 zeigt die Strukturformeln von Nilrot und Nilblau; anstelle von Chlorid wird in Nilblau oft auch Sulfat als Gegenion verwendet.

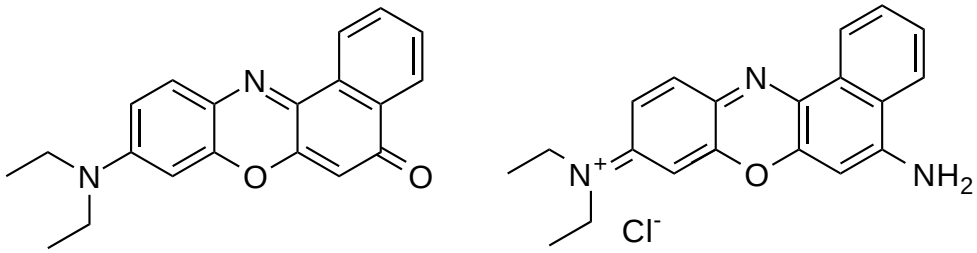


Abb. 3.2 Strukturformel des Nilrots (links) und seiner Oxazinform Nilblau (rechts)

Nilblau ist schon seit langem als kommerzieller Farbstoff gebräuchlich [21], wobei dessen Färbequalitäten offenbar zu einem Teil von der Anwesenheit des Nilrots als Verunreinigung abhängen. Nilblausulfat wird zudem auch als pH-Indikator für die Mikroskopie im pH-Bereich 10.2 - 13.0 benutzt. Nilrot ist die durch Hydrolyse entstehende Oxazonform des Nilblaus, ist allerdings nur schlecht in Wasser löslich (0.2 g / l).
Entsprechend der marginalen Verwendung als Fluorophor sind auch Literaturdaten über mit der Fluoreszenz zusammenhängenden Eigenschaften schwer zu finden. Abb. 3.3 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum des Nilrots, allerdings in verschiedenen Lösungsmitteln. Die für Nilblau entsprechende Bande bei 553 nm des Nilrots in Methanol liegt bei 638 nm in 50 %igem Ethanol. Die molaren Extinktionskoeffizienten des Nilrots betragen $4.4 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ beim Maximum von 553 nm und $3.1 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ bei der zur Anregung verwendeten Ar-Ionenlaserlinie von 514 nm.

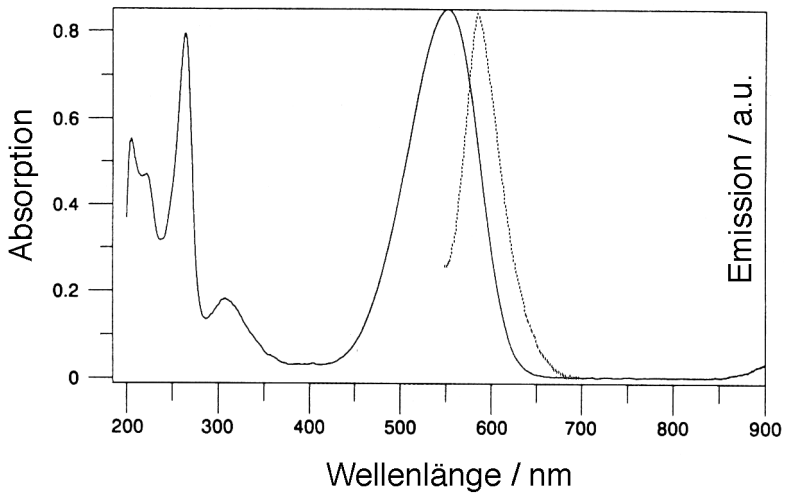


Abb. 3.3 Absorptions- und Emissionsspektrum von Nilrot
Absorptionsspektrum in Methanol aus [21] mit darin eingepasstem experimentellen Emissionsspektrum (λ_{ex} = 514 nm) in Chloroform[14]

Warum Molecular Probes für ihre *FluoSpheres* Nilrot verwenden, lässt sich nur erahnen. Wichtige Faktoren sind sicher der apolare Charakter für das Lösen im Polymer und die verglichen mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen bescheidenen Herstellkosten neben Standardkriterien wie grosse Absorption und Fluoreszenz-quantenausbeute sowie genügend hohe Lichtstabilität.

Für die Herstellung eines Filmes mit separierten Nilrot-markierten Latexkugeln wurde das Polymer Polyvinylalkohol (PVA) gewählt (vgl. Tab. 4.1 S.56). Polyvinylalkohol stabilisiert die an der Oberfläche der Latexkugeln vorhandenen Carboxylatgruppen, wodurch Clusterbildung bei der Präparation der Filme vermieden werden kann. Die meisten apolaren Polymere fielen von vornherein ausser Betracht, da zu ihrem Lösen Lösungsmittel notwendig sind, die auch Latex angreifen.
Ein Tropfen einer Lösung mit 0.0002 % der Nilrot-markierten Latexkugeln (*FluoSpheres* von Molecular Probes, Durchmesser 282 nm ± 2.6%) und 0.5 % PVA in deionisiertem Wasser wurde auf einem Deckglas für die Mikroskopie eintrocknen gelassen. Eine Charakterisierung mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass die Latexkugeln über den ganzen Film gleichmässig verteilt sind. Abb. 3.4 gibt einen Ausschnitt des Filmes nahe der im SNOM gerasterten Stelle wieder.
Eine Charakterisierung mit dem Profilometer ergab - abgesehen von dem etwa 250 µm breiten Randbereich - eine konstante Filmdicke von ~900 nm. Abb. 3.5 zeigt das Profil im Bereich der Rasterung.

[14] die Extraktion erfolgte aus einer basischen Lösung der *FluoSpheres* mit anschliessendem sauren Waschen der Chloroformphase. Ein Anregungsspektrum wäre willkürlich, weil für die Verwendung im SNOM die Fluoreszenz nicht nach der Wellenlänge diskriminiert werden kann

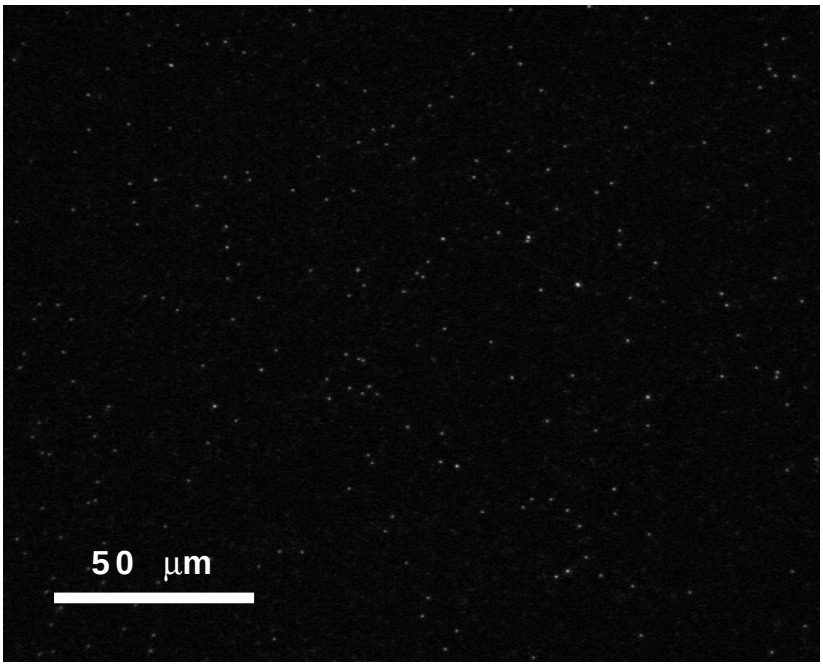


Abb. 3.4 Aufnahme des PVA-Filmes mit darin eingebetteten Nilrot-markierten Latexkugeln im Fluoreszenzmikroskop
Aufnahme[15] einer Stelle am Rand des Films in 250facher Vergrösserung in einem Zeiss Axioplan Lichtmikroskop. Das Bild entstand in Aufsicht mit 450 bis 490 nm Breitbandanregung, Sperrfilter bei 510 nm und Emission oberhalb 520 nm. Wegen der Dicke des Filmes sind nicht alle Nilrot-markierten Latexkugeln scharf abgebildet, was die Intensitäten moduliert. Insgesamt sind etwa 200 einzelne Kugeln erkennbar. Stärkere Vergrösserungen führten zu Beugungsringen.

[15] Längenmassstab aufgrund der Vergrösserung errechnet

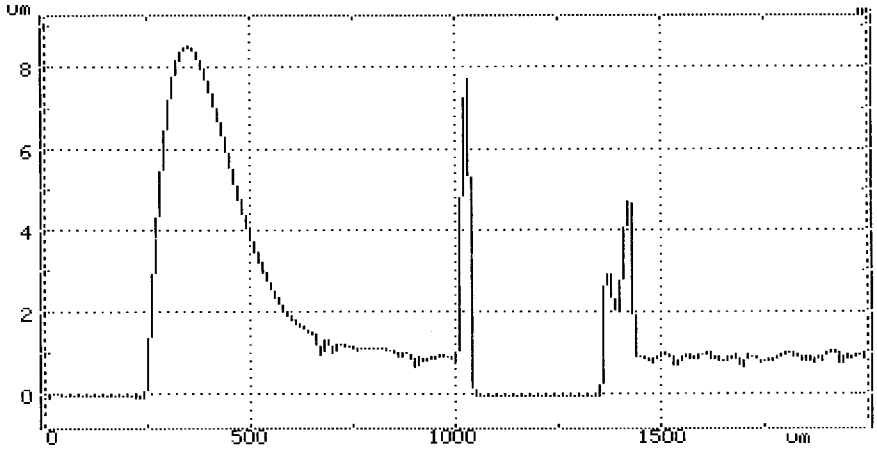


Abb. 3.5 Höhenprofil des PVA-Filmes mit darin eingebetteten Nilrot-markierten Latexkugeln
Das Profil ist im 45°-Winkel zur Peripherie des 6.5 mm im Durchmesser messenden runden Filmes aufgenommen worden; der Wulst links markiert den Beginn des Filmes. Die Rinne im Film stammt von einem Ritz zur Bestimmung der Schichtdicke.

Für die Rasterung im SNOM wurde eine gezogene Spitze von Topometrix mit einer vom Hersteller angegebenen Apertur von 50 nm verwendet. Die Lichtleistung aus der Spitze betrug im Fernfeld etwa 50 nW. Für die Filterung des Anregungslichts (514 nm-Ar-Ionenlaserlinie) wurde ein 514 nm-holographisch hergestelltes Bandpassfilter und ein 515 nm-Langpassfilter eingesetzt, die Filterung des Scherkraftlasers übernahm ein 670 nm-holographisch hergestelltes Bandpassfilter sowie ein 650 nm-Kurzpassfilter. Zusätzlich wurde eine 100 µm-Lochblende verwendet. Die Spannung am Photomultiplier betrug 1060 V.

Gerastert wurde über einen 20x20 µm-Bereich mit einer Rastergeschwindigkeit von 20 µm / s. Abb. 3.6 zeigt die erhaltenen SNOM-Bilder.

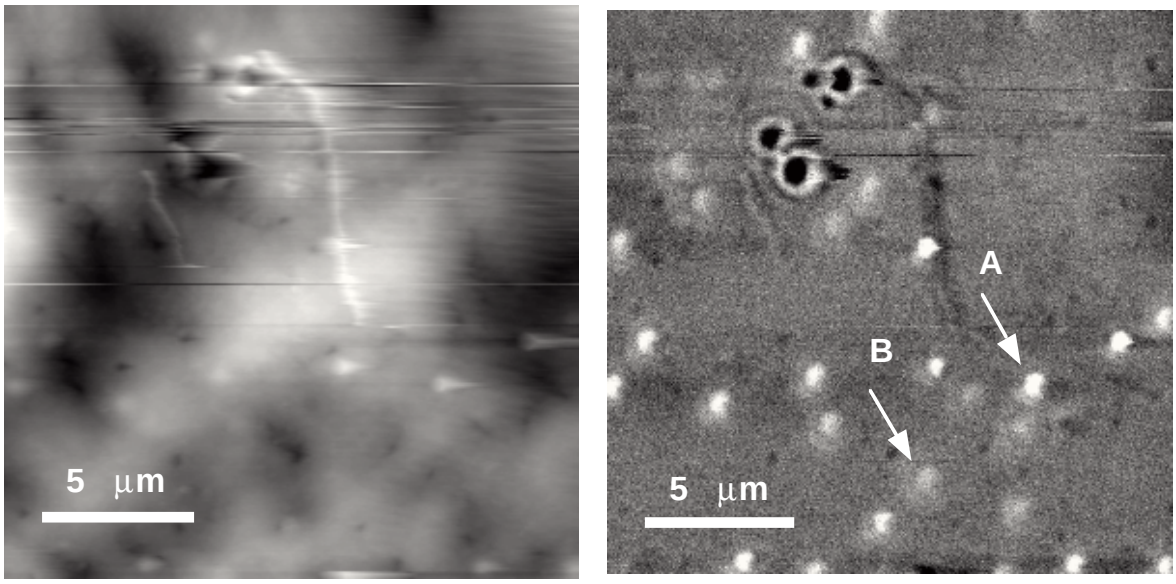


Abb. 3.6 SNOM-Bilder[16] eines ~1 μm dicken PVA-Filmes mit darin eingebetteten Nilrot-markierten Latexkugeln von 282 nm Durchmesser
a) Topographie (Schwarzweisskontrast über 110 nm), b) Fluoreszenz (Schwarzweissskala von 0.095 bis 0.169 V). Die Grossbuchstaben markieren die zwei Kugeln, durch die ein Linienprofil gelegt worden ist. Insgesamt sind etwa 32 Kugeln erkennbar. Die fünf Krater stammen von destruktiven Spitzenannäherungen bei den vorangegangenen Rasterungen, wie man sie bei Spitzen mit schwach ausgeprägten Resonanzen vorfindet[17].

Das optische Bild zeigt die Fluoreszenzsignale einzelner Nilrot-markierter Latexkugeln aus einem uniformen Untergrund. Dies entspricht qualitativ dem Bild aus dem Fluoreszenzmikroskop, was auch erwartet wird. Einzelne der Kugeln treten aus der PVA-Matrix hervor; sie entsprechen den Kugeln mit intensiverer Fluoreszenz. Andere Kugeln, welche nur im optischen Bild, nicht aber in der Topographie auszumachen sind, befinden sich im Inneren des Filmes. Wegen der drastischen Abnahme der Feldstärke mit zunehmendem Abstand zur Apertur (vgl. Abb. 2.2 S.5) zeigen diese Kugeln ein schwächeres Signal. Im Vergleich zur vorangegangenen Rasterung konnte keine Abnahme der Intensität festgestellt werden, das Nilrot wurde also nicht gebleicht. Das Topographiebild ist sonst vom optischen Bild praktisch vollständig entkoppelt. Eine Ausnahme bilden die drei Krater und die davon ausgehende längliche Erhöhung. Sie entstanden durch Annäherungen der Spitze bei schlechten Rückkopplungsbedingungen, wie sie gelegentlich bei unscharfen Eigenresonanzen auftreten.

Insgesamt sind etwa 32 Kugeln auf dem 20x20 μm-Bild sichtbar. Berechnet[18] man ausgehend von der Präparation des Filmes die zu erwartende Anzahl an Kugeln auf einer 20x20 μm-Fläche, so erhält man 15 Nilrot-markierte Latexkugeln. Auf dem Bild im Fluoreszenzmikroskop sind umgerechnet auf 20x20 μm etwa 3 - 4 Kugeln zu

[16] Routinemässige Bearbeitung der SNOM-Bilder S.90
[17] evtl. handelt es sich um ein lokales Schmelzen des Polymer, da normale destruktive Annäherungen nicht zu einer solchen Modulation des optischen Signals führen
[18] bezüglich des PVA ist 1/2500 m% PS, was 0.00048 V% PS ergibt (Dichte PVA und PS 1.27 rsp. 1.05, vgl. S.56). Das Volumen der Probe im Rasterbereich ist 20x20x0.9 μm^3

sehen. Offenbar ist dies eine Stelle mit mehr Kugeln als im Durchschnitt. Wie weit die gerade noch erkennbar fluoreszierenden Kugeln unter der Polymeroberfläche liegen, lässt sich aus dem Experiment nicht sagen.
Abb. 3.7 zeigt die Linienprofile durch zwei ausgewählte Kugeln, wovon die eine (A) am stärksten und die andere (B) schwach fluoresziert, aber doch noch als Kugel vom Untergrund unterscheidbar bleibt.

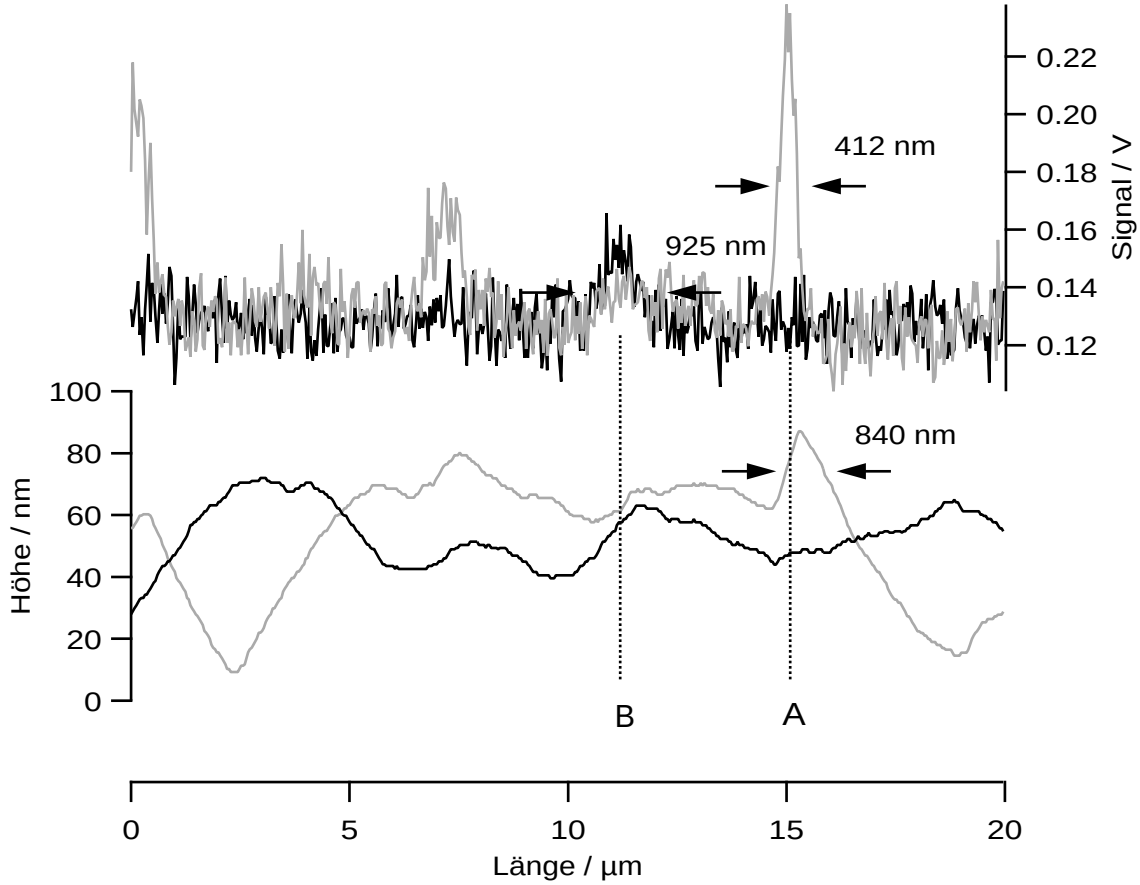


Abb. 3.7 Linienprofile durch die Kugeln A (grau) und B (schwarz)
Die Topographie ist unten, das Fluoreszenzsignal[19] oben abgebildet. Die Halbwertsbreite im Fluoreszenzliniensignal wurde über einen Gauss-Fit bestimmt.

Die am stärksten fluoreszierende Kugel (A) ergibt einen Peak mit 412 nm Halbwertsbreite, die schwach fluoreszierende Kugel (B) eine solche von 925 nm. Das Photomultipliersignal wurde für die Lichtintensität Null (additiver Untergrund von 35 mV) korrigiert, d.h. das aufgetragene Signal ist proportional zur Intensität. Demnach ist die Intensität für die Kugel A nur gerade das Doppelte des Untergrundes, aber mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 8. Für die schwach fluoreszierende Kugel ist die Intensität nur 20 % des Untergrundes mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von etwas grösser als 3. Was ist die Ursache dieses Untergrundes?

[19] korrigiert bezüglich des additiven Anteils, vgl. **Kalibrierung des Photomultipliers** S.110

Hierfür gibt es mehrere Möglichkeiten. Prinzipiell kann es sich um Scherkraftlaserlicht, Anregungslicht, Fluoreszenz oder um Rauschen handeln. Das Rauschen des Photomultipliers trug zum Untergrund bei, wurde jedoch schon berücksichtigt.
Scherkraftlaserlicht kann ausgeschlossen werden, da ohne eingekoppeltes Anregungslicht das Photomultipliersignal auf Null zusammenfiel. Das Anregungslicht wird zu einem grossen Teil zum Untergrund beigetragen haben. Ein Indiz dafür ist die teilweise Kopplung zwischen optischem Bild und der Topographie. So sind etwa die drei Krater und die davon ausgehende Erhöhung auch im optischen Bild als Stellen geringerer Intensität zu sehen (minimal 95 mV). Dabei kann es sich um die Restintensität der 514 nm-Linie rsp. den im Verhältnis dazu etwa eine Million mal schwächeren Plasmalinien handeln (vgl. Abb. 7.4 S.86)
Fluoreszenz ist als Ursache unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich um die diffuse Fluoreszenz tiefer in der Schicht gelegener Nilrot-markierter Latexkugeln handelt. Der Polymerfilm ist an der gerasterten Stelle 900 nm dick, was nur 3 Latexkugeldurchmessern entspricht. Die dafür nötige hohe Konzentration an Nilrot-markierten Latexkugeln wurde im Mikroskop aber nirgends im Film beobachtet.

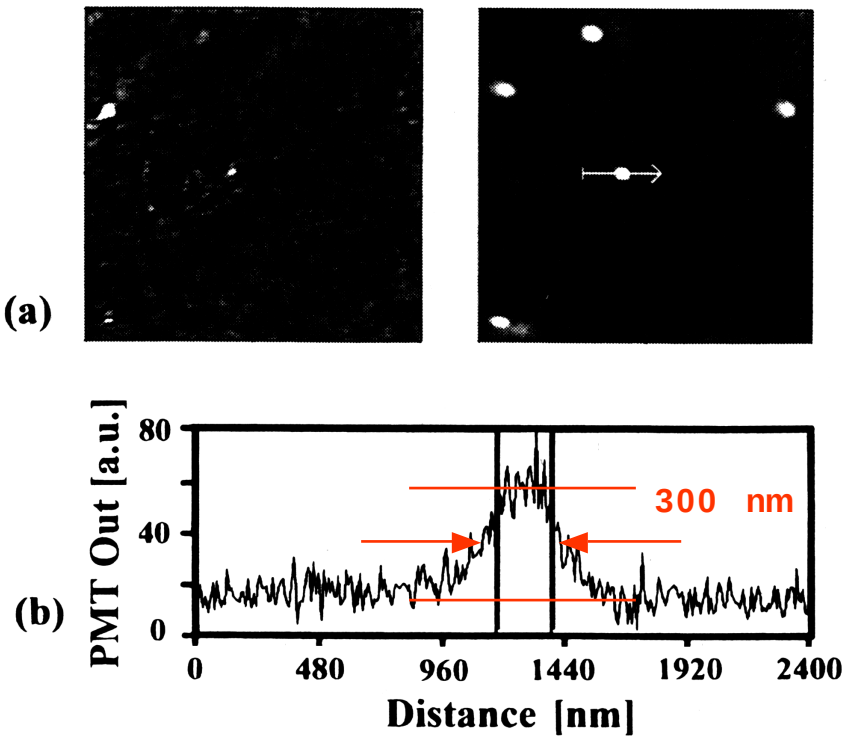


Abb. 3.8 Von *Rücker et al.* [25] aufgenommene SNOM-Bilder von Cumarin-markierten Latexkugeln (103 nm Durchmesser) in einer PVA-Matrix
a) Topographie (links) und optisches Bild (rechts), b) Linienprofil durch die mit dem Pfeil bezeichnete Kugel; die beiden senkrechten dicken Striche geben die Halbwertsbreite von ~210 nm nach den Autoren wieder, darübergelegt die einem Gauss-Fit entsprechende Halbwertsbreite von ~300 nm.

Rücker et al. haben 1995 von einem ähnlichen Experiment berichtet [25]. Sie bildeten in eine PVA-Matrix eingebettete Cumarin-markierte Latexkugeln mit einem Durchmesser von 103 nm ab. Abb. 3.8 zeigt die von ihnen aufgenommenen Bilder und ein optisches Linienprofil durch eine Kugel. Da sie ebenfalls eine gezogene Spitze von Topometrix mit einer nominellen Apertur von 50 nm benutzt haben, lassen sich die Experimente direkt vergleichen.
Die von ihnen angegebene Halbwertsbreite von ~210 nm ist geschönt, da nicht vom unverauschten Peak ausgegangen wurde. Dadurch liegt ihre Halbwertsbreite höher und ist dementsprechend kleiner. Wird der verrauschte Peak durch eine Gausskurve approximiert (zu deren Bestimmung in dieser Arbeit vgl. Abb. 3.9), so erhält man eine Halbwertsbreite von ~300 nm. Ihr Signal-zu-Untergrund-Verhältnis wird zu 5 angegeben. Aus dem Linienprofil lässt sich ihr Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu abschätzen.

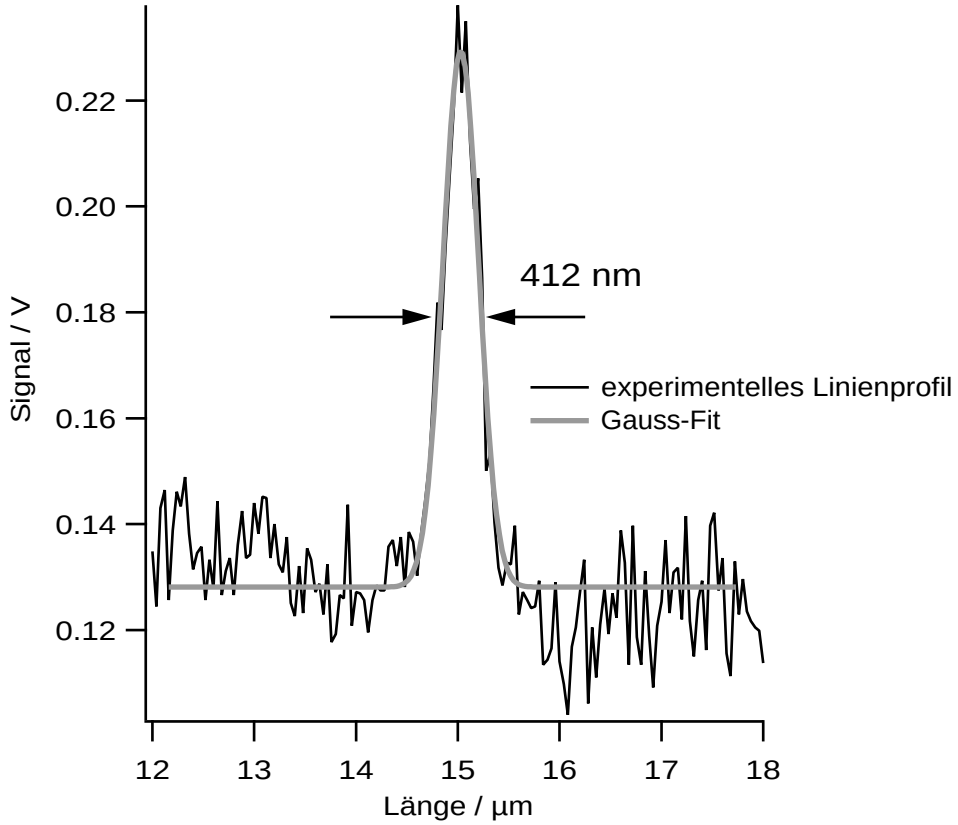


Abb. 3.9 Experimentelles Linienprofil durch die Nilrot-markierte Latexkugel mit dem intensivsten Fluoreszenzsignal (A)
Der für die weiteren Berechnungen gebrauchte Gauss-Fit ist grau eingezeichnet. Eine Lorentzfunktion gab das Experiment schlecht wieder, da sie oben zu schmal und unten zu breit war.

Einer der oft hervorgehobenen Vorzüge des SNOM ist die hohe erreichbare optische Auflösung. In vielen Experimenten wurde schon gezeigt, dass Auflösung unterhalb der Beugungslimite machbar ist. *Bian et al.* haben 1995 die Fluoreszenz von einzelnen Sulforhodamin 101-Molekülen auf Glas aufgenommen [6]. Die Halbwerts-

breite ihrer Peaks betrug ~100 nm, was die in der Literatur zu findende untere Limite für Fluoreszenzauflösung einzelner Moleküle ist.
Die Quantifizierung der optischen Auflösung im SNOM wird sehr verschieden gehandhabt; üblicherweise wird in der Literatur so vorgegangen, dass die Auflösung möglichst klein angegeben werden kann. Verwendet wird die Halbwertsbreite oder der 10 zu 90%-Kontrast von Peaks in Linienprofilen.
Die Angabe einer Halbwertsbreite als Mass für die Auflösung ist bei einzelnen Molekülen sinnvoll. Schwierig wird die Interpretation allerdings, wenn die beobachteten Objekte selber eine Ausdehnung haben wie im Fall der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln.

Wie soll jetzt eine ~300 nm Halbwertsbreite des Fluoreszenzsignals für eine 103 nm grosse Fluoreszenzfarbstoff-markierte Kugel mit einer ~410 nm Halbwertsbreite für eine 282 nm grosse Kugel verglichen werden? Geht man davon aus, dass die Halbwertsbreite des Linienprofils in etwa der Näherungsformel[20]

$$FWHM_{Linienprofil} = \sqrt{FWHM^2_{Fluoreszenz} + FWHM^2_{Kugel}}$$

gehorcht (gültig für Gaussprofile), und nimmt man als intrinsische Halbwertsbreite der Fluoreszenz im SNOM die von *Bian et al.* gemessene Halbwertsbreite von 100 nm, so werden Halbwertsbreiten von 134 rsp. 264 nm erhalten. Diese sind aber etwa 165 rsp. 145 nm kleiner als die experimentellen Halbwertsbreiten und offenbar nicht geeignet, diese wiederzugeben.

Herkömmliche Vorstellungen für das Fernfeld können diese Beobachtungen nicht erklären. In Abb. 3.10 ist ein solch einfaches Modell für das Fernfeld gezeigt.

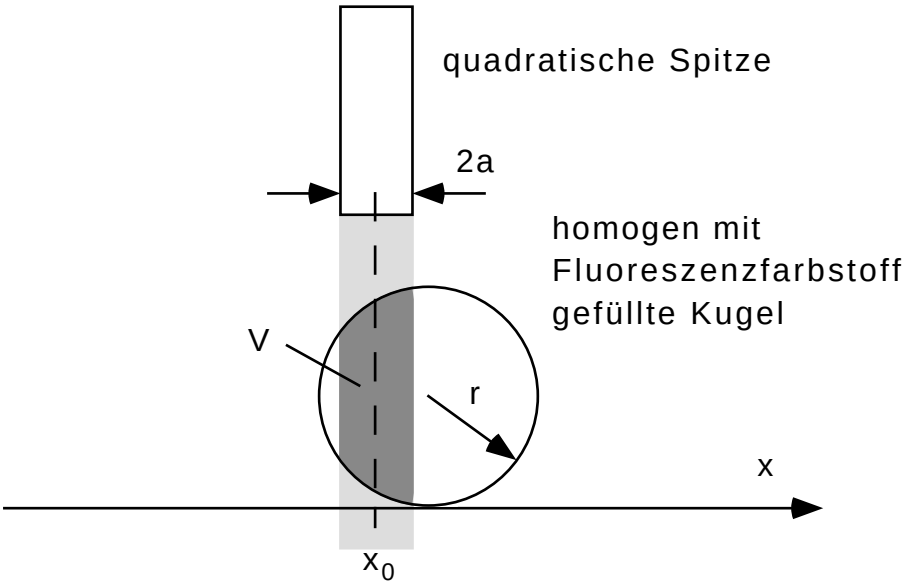


Abb. 3.10 Vereinfachtes Modell für die Berechnung des optischen Linienprofils im Fernfeld

[20] FWHM (Halbwertsbreite): englisches Akronym für *full width at half maximum*

Der homogen in der Kugel verteilte Fluoreszenzfarbstoff[21] wird von einem quadratischen, kollimierten Lichtstrahl der Seitenlänge 2a (entspräche in diesem Bild einer Aperturgrösse) angeregt. Die isotrope Emission der Fluoreszenz wird in Strahlrichtung detektiert, wobei keine Selbstabsorption[22] auftritt. Das in Transmission beobachtete Fluoreszenzsignal an der Stelle x_0 ist also proportional zum aus der Kugel herausgeschnittenen Volumen von x_0-a bis x_0+a und senkrecht dazu von y_0-a bis y_0+a.

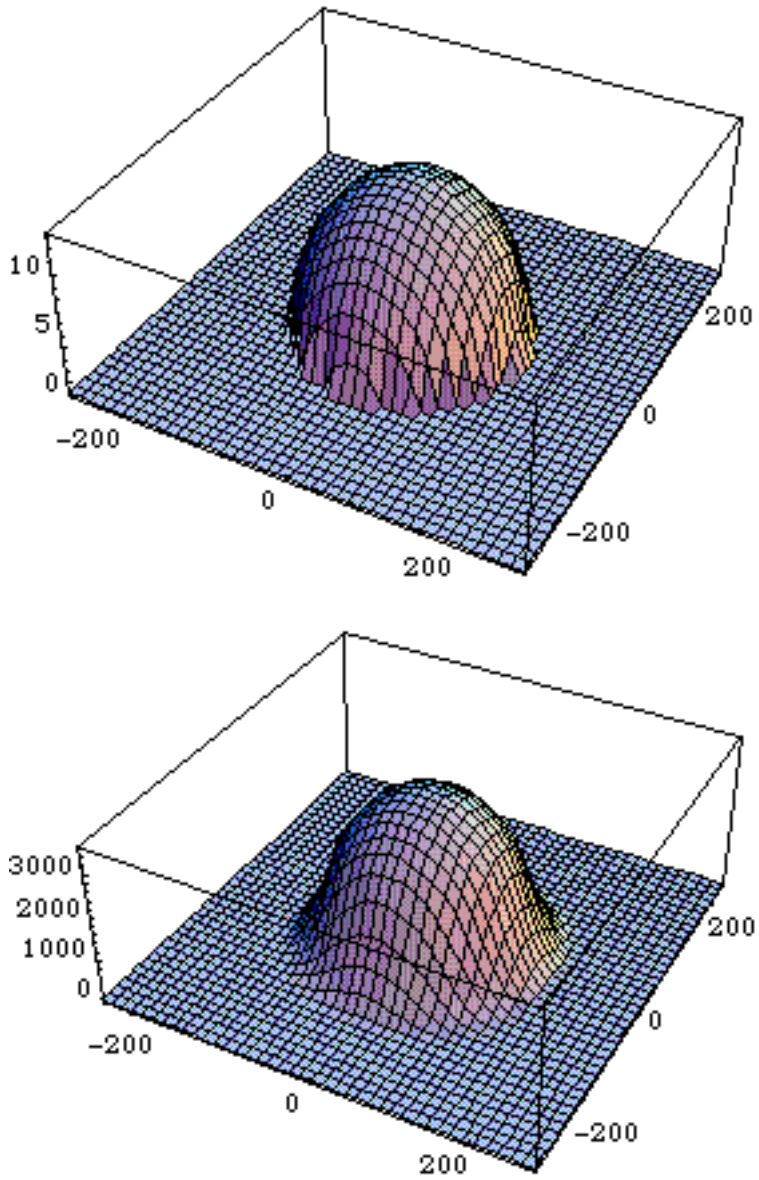


Abb. 3.11 Theoretisch berechnetes Fluoreszenzbild (unten) einer Kugel mit 282 nm Durchmesser (oben) für das Modell im Fernfeld mit 2a = 60 nm. Die Einheiten in der z-Achse sind willkürlich, die Ausdehnung in der x- und y-Achse entspricht 2 Durchmessern der Kugel.

[21] die homogene Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes wird vom Hersteller angegeben

[22] dies ist zumindest im Fernfeld gerechtfertigt. Der Absorptionsquerschnitt eines Nilrotmoleküls (ε = $3.1 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$) bei 514 nm entspricht 0.009 nm^2, d.h. der Absorptionsquerschnitt aller in der Latexkugel enthaltener Nilrotmoleküle entspricht weniger als einem Promille der Kugelquerschnittsfläche

Ein berechnetes[23], dreidimensionales Fluoreszenzbild für eine Kugel mit 282 nm Durchmesser (entspricht dem der im Experiment verwendeten Latexkugeln) ist in Abb. 3.11 gezeigt, die berechneten Linienprofile sind in Abb. 3.12 wiedergegeben.

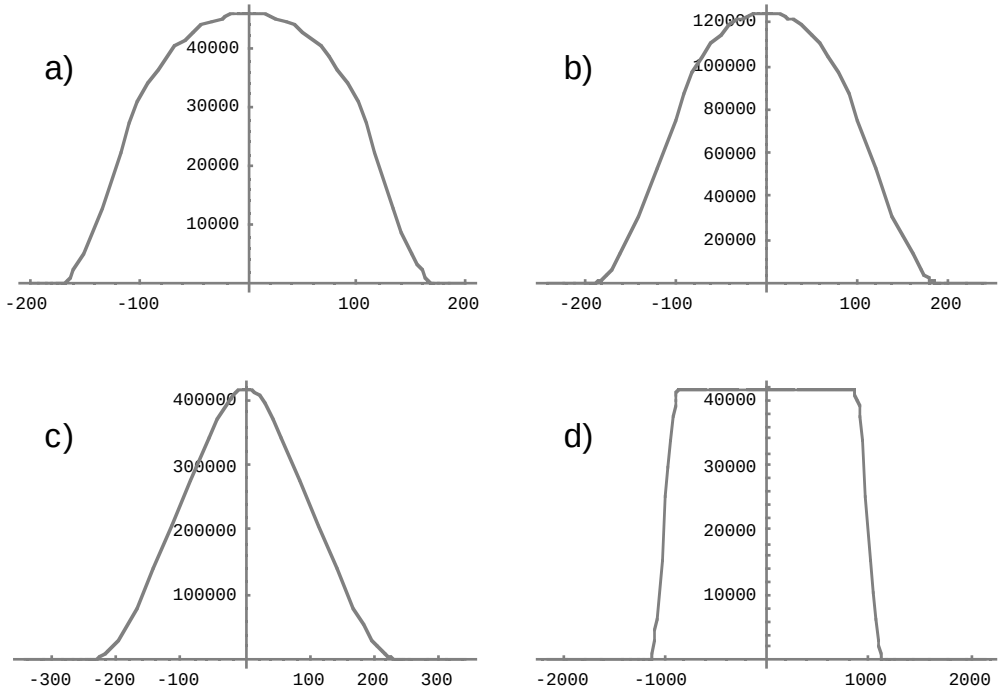


Abb. 3.12 Theoretisch berechnete Fluoreszenzlinienprofile einer Kugel mit 282 nm Durchmesser für das Modell im Fernfeld
2a = 60 (a), 100 (b), 200 nm (c) und 2000 (d). Die Einheiten in der y-Achse sind willkürlich.

Die Linienprofile für die Verteilung der Fluoreszenz zeigen mit zunehmender Apertur eine Veränderung der Form von einer Halbkugelverteilung über ein gaussförmiges Profil hin zur einer Rechteckverteilung. Die Halbwertsbreite für a), b) und c) ist etwa 240 nm (was ungefähr der Halbwertsbreite der Kugel von 244 nm entspricht) und nimmt nur unmerklich zu. Dies liegt daran, dass die Spitze kleiner ist als das Objekt, welches sie abbildet. Betrachtet man den Extremfall von 2a = 2000 nm, bei der die Spitze wesentlich grösser ist als das Objekt, so wird das Profil (Halbwertsbreite 2000 nm) praktisch vollständig durch die Apertur bestimmt

Ein besseres Modell muss das Experiment miteinbeziehen. So könnte das experimentelle Linienprofil als Faltung einer Spitzenfunktion mit der Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes betrachtet werden. Abb. 3.13 gibt diesen Ansatz schematisch wieder.

[23] siehe Berechnungen zur Form und Halbwertsbreite des Fluoreszenzlinienprofils der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kugel S.91

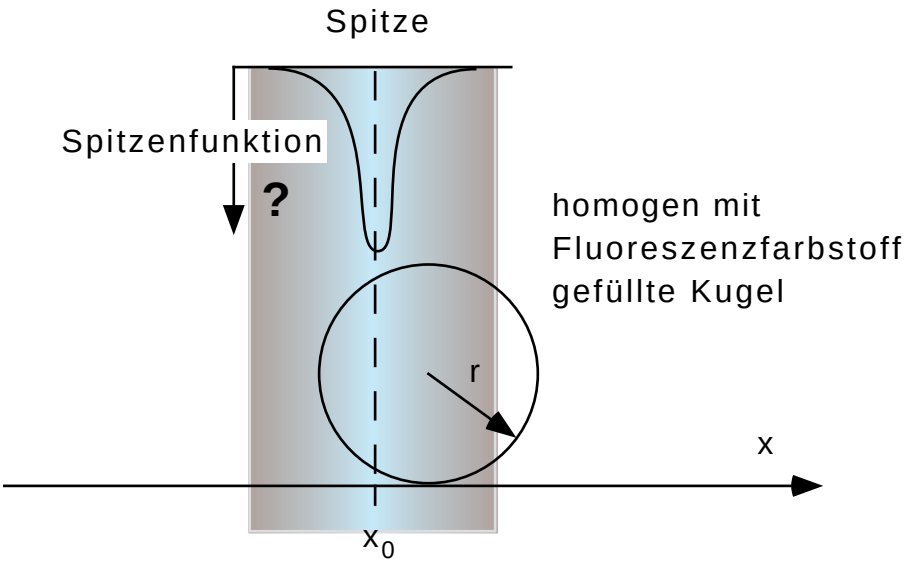


Abb. 3.13 Modell für die Berechnung des Linienprofils durch Faltung einer Spitzenfunktion mit der Kugelverteilung des Fluoreszenzfarbstoffes

Diese Spitzenfunktion lässt sich somit aus der Entfaltung der experimentellen Fluoreszenzsignalfläche mit der Kugelverteilung[24] des Fluoreszenzfarbstoffes erhalten. Ueber die Spitzenfunktion werden a priori keine Annahmen getroffen. Eine Entfaltung ist mathematisch sehr anspruchsvoll; die Spitzenfunktion kann aber auch auf andere Weise erhalten werden. Allfällige Kenntnisse über die Spitzenfunktion können in eine Versuchsfunktion einfliessen, welche mit der Kugelfunktion gefaltet wird. Das Resultat wird verglichen mit dem experimentellen Linienprofil und die Versuchsfunktion so lange verändert, bis das berechnete und das experimentelle Linienprofil zusammenfallen; die Versuchsfunktion entspricht dann der Spitzenfunktion, da die Faltung eineindeutig ist.
Die Rechnung wurde wegen der vorhandenen rechnerischen Möglichkeiten auf eine Dimension beschränkt, d.h. das entsprechende Modell wäre das eines mit Fluoreszenzfarbstoff-gefüllten Zylinders, der von einem SNOM-Spalt abgebildet wird.

Ideen für eine derartige Versuchsfunktion sind in der Literatur zu finden. *Novotny et al.* haben für eine Spaltapertur von 30 nm senkrecht zum Spalt eine gaussförmige Verteilung des Quadrates der Feldstärke (proportional zur Intensität) der s-Polarisation berechnet [13].
Die Annahme der Versuchsfunktion als Gaussfunktion lieferte die optimale Spitzenfunktion. Andere Funktionen (Polynome, Sinus, höhere Exponentialfunktionen) zeigen einen zu schnellen Abfall an den Seiten. In Abb. 3.14 ist die Faltung für die optimale Spitzenfunktion gezeigt, bei der das experimentelle und das berechnete Linienprofil in Form und Halbwertsbreite übereinstimmen.

[24] eine Kugelverteilung als Resultat erhält man mit einer Delta-Funktion als Spitzenfunktion

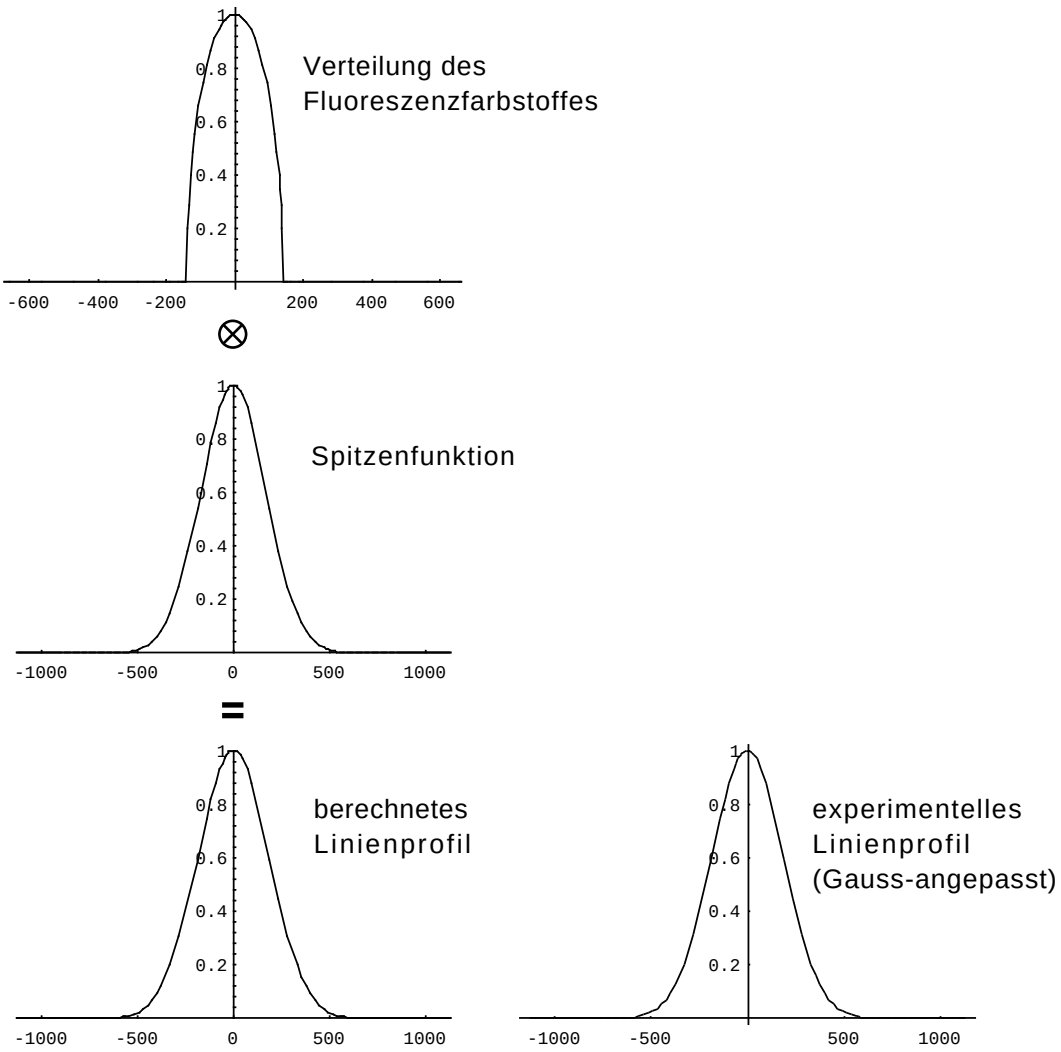


Abb. 3.14 Vergleich des mit Mathematica berechneten[25] Linenprofils mit dem experimentellen Linienprofil
Das berechnete Linienprofil ist das Resultat einer Faltung der optimierten Spitzenfunktion (Gaussfunktion mit Halbwertsbreite 398 nm) mit einer Halbkugelfunktion der Fluoreszenzfarbstoffverteilung (Durchmesser von 282 nm entspricht dem der Kugeln im Experiment). Als Halbwertsbreite des Gauss-Fits des experimentellen Linienprofils wurde 435 nm verwendet; die auf 410 nm korrigierte Halbwertsbreite der Spitzenfunktion ist 377 nm.

Die Halbwertsbreite der Spitzenfunktion liegt mit 377 nm nur wenig unter den 410 nm der Halbwertsbreite des experimentellen Linienprofils; sowohl bezüglich Form wie auch der Halbwertsbreite scheint die Spitzenfunktion bestimmend zu sein. Es wird erwartet, dass fluoreszierende Objekte, die wesentlich breiter als die Spitzenfunktion sind, die Halbwertsbreite des experimentellen Linienprofils bestimmen und

[25] siehe Berechnungen zur Form und Halbwertsbreite des Fluoreszenzlinienprofils der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kugel S.91

umgekehrt. Bei gegebener gaussförmiger Spitzenfunktion lässt sich die Abhängigkeit der Halbwertsbreite des Linienprofils von der Halbwertsbreite der Kugelfunktion für beliebige Kugelgrössen durch Faltung berechnen; die Funktion ist in Abb. 3.15 dargestellt.

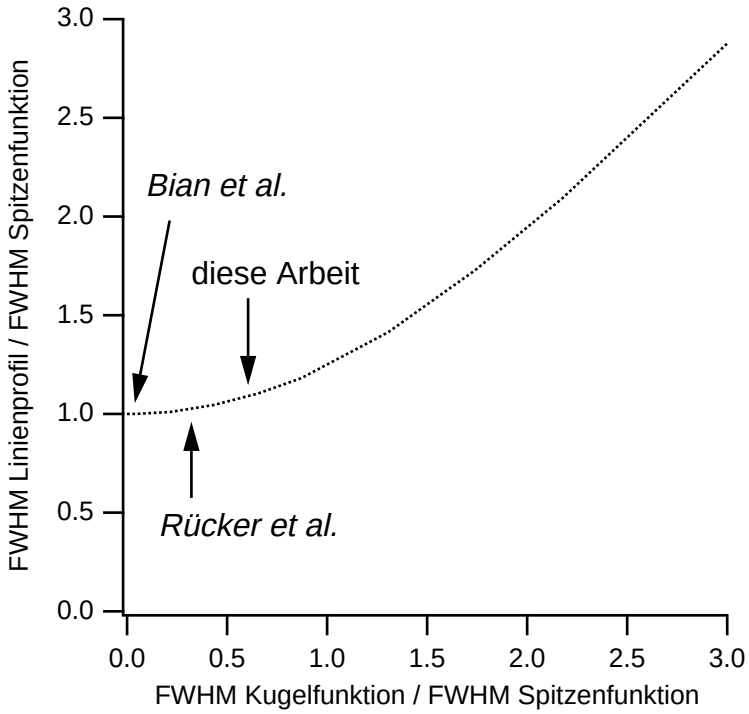


Abb. 3.15 Abhängigkeit der Halbwertsbreite des Linienprofils von der Kugelgrösse und der Spitzenfunktion
Bei bekannter Kugelgrösse und Halbwertsbreite des Linienprofils kann die Halbwertsbreite der Spitzenfunktion berechnet werden[26], dies wurde für die Messung von *Rücker et al.* getan. Das Verhältnis $FWHM_{Linienprofil}$ / $FWHM_{Spitzenfunktion}$ beträgt 1.02 für *Rücker et al.* und 1.09 für diese Arbeit.

Das Ergebnis zeigt, dass sich die Messung dieser Arbeit und die von *Rücker et al.* in einem Bereich befinden, wo die Halbwertsbreite des aufgenommenen Linienprofils fast ausschliesslich durch die Spitzenfunktion bestimmt wird; nur ein kleiner additiver Anteil von 8 rsp. 2 % der Halbwertsbreite trägt den verschiedenen Grössen der Kugeln Rechnung.

Interessant ist der Zusammenhang der berechneten Spitzenfunktionen mit der nur aufwendig bestimmbaren[27] Aperturgrösse. Es kann davon ausgegangen werden,

[26] eine Gerade mit der Steigung Linienprofilhalbwertsbreite/Kugelhalbwertsbreite wird mit der berechneten Kurve geschnitten und über das an den Achsen abgelesene Verhältnis die Halbwertsbreite der Spitzenfunktion berechnet

dass sie der wichtigste Parameter für die Auflösung und damit auch für die Spitzenfunktion darstellt. Die gezogenen Spitzen von Topometrix werden mit einer nominellen Apertur von 50 nm verkauft, können aber auch Aperturen bis bis 150 nm aufweisen. Dementsprechend kann eine grössere Halbwertsbreite des Fluoreszenz-linienprofils einfach das Resultat einer Spitze mit grosser oder schlecht definierter Apertur sein.

Das Modell lässt allerdings einen wichtigen Faktor ausser acht. Es geht zwar von einer lateralen Verteilung der Intensität aus, nimmt aber implizit an, dass diese abstandsunabhängig ist. Dass dies nicht stimmt, zeigt schon das Experiment. Die Halbwertsbreite der Kugel B im Fluoreszenzbild ist etwa doppelt so gross wie die von Kugel A, dementsprechend würde die Halbwertsbreite der Spitzenfunktion wachsen. Die Kugel B kann höchstens 600 nm von der Oberfläche entfernt sein (wegen der Dicke des Filmes); somit tritt eine Verbreiterung der Spitzenfunktion um einen Faktor 2 innerhalb von höchstens zwei Kugeldurchmessern auf. Dadurch ist die Homogenität der Spitzenfunktion nicht mehr gegeben, eine Grundvoraussetzung für das Modell.

Aus Berechnungen und Messungen lässt sich zeigen, dass die Intensität auch eine Winkelverteilung besitzt.
Novotny et al. haben dies (Abb. 3.16) für ihr Modell-SNOM[28] in Glas berechnet [13]. Aehnliche Ergebnisse (Abb. 3.17) haben *Obermüller et al.* für Fernfeldmessungen der Lichtintensitätsverteilung an einer gezogenen Spitze gefunden [26].

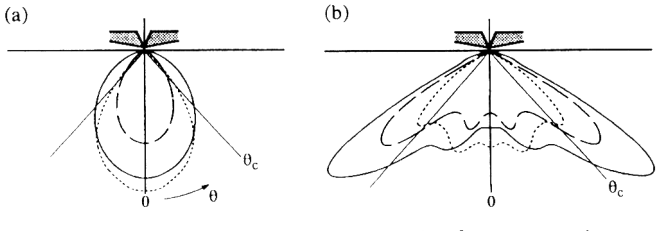


Abb. 3.16 Durch variable Spaltgrössen transmittierte Strahlungsmuster in Glas im Nahfeld, Berechnungen nach *Novotny et al.* [13]
a) s-Polarisation, b) p-Polarisation; Spaltgrössen: 33 nm (feste Linie), 103 nm (gestrichelte Linie) und 203 nm (gepunktete Linie). θ_c markiert den kritischen Winkel von 41.8° in Glas. Für kleine Spaltgrössen ergibt dies auch über dem kritischen Winkel im Glas Intensität, was nach der klassischen Optik verboten ist (Totalreflexion)!

[27] dies geschieht über eine Frontalansicht der Apexregion im Elektronenmikroskop, bei der die Apertur - sofern gut sichtbar - vermessen wird. Für die routinemässige Anwendung des SNOMs ist es viel zu aufwendig, die Apertur für jede Spitze im Elektronenmikroskop zu bestimmen. Dies wurde weder in dieser Arbeit noch in den Arbeiten von *Bian et al.* oder *Rücker et al.* getan.
[28] vgl. Abb. 2.2 S. 5

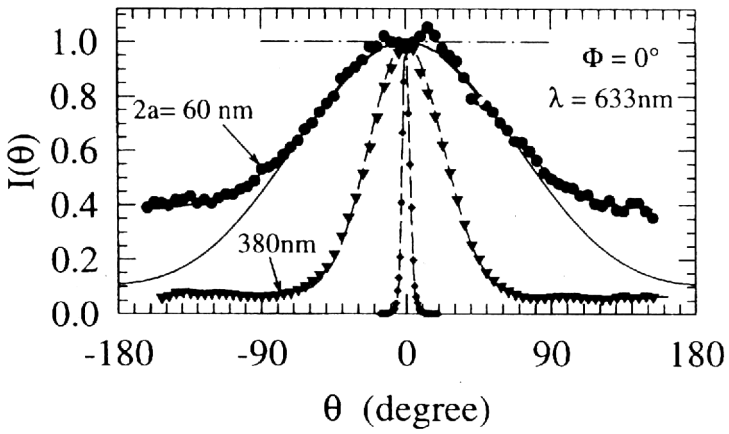


Abb. 3.17 Messung der Winkelverteilung der Lichtintensität im Fernfeld aus einer gezogenen Spitze nach *Obermüller et al.* [26]
Die Winkelverteilungen für die verschiedenen Aperturdurchmesser (2a) sind normalisiert. Die gestrich-punktete Linie gibt an, was nach klassischer Optik für einen Strahl erwartet werden würde. Für die 60 nm grosse Apertur wird eine endliche Intensität im Rückstreubereich gemessen!

Solche Befunde können erklären, warum sich das Signal der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln in einer grösseren Tiefe verbreitert und in einen diffusen Hintergrund übergehen kann.

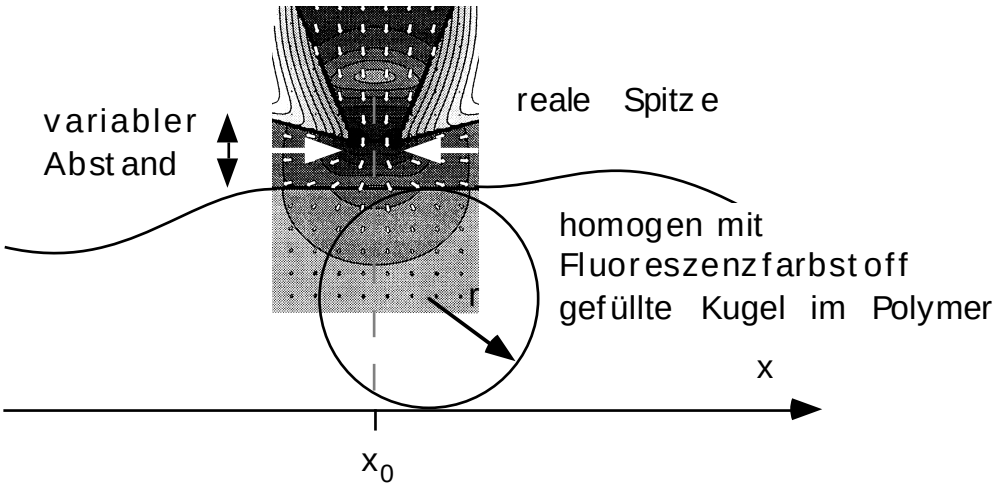


Abb. 3.18 Reale Situation für die Berechnung der Fluoreszenz-linienprofile

Für eine wirklich gute Modellierung muss der Komplexität des Nahfeldes Rechnung getragen werden, wie dies in Abb. 3.18 gezeigt ist. Solche Berechnungen übersteigen die Möglichkeiten dieser Arbeit bei weitem.
Doch selbst mit einem perfekten Modell ergeben sich Unsicherheiten aus dem Experiment. Wie das Linienprofil in der Topographie durch die Kugel A (vgl. Abb. 3.7 S.22) mit der Halbwertsbreite[29] von 840 nm zeigt, ist aus der Topographie selbst wenig Information darüber zu gewinnen, wie tief genau sich die Kugel im Polymer befindet. Dies ist aber für Berechnungen sehr wichtig. *Rücker et al.* haben bei ihren Latexkugeln gefunden, dass diese mit nur wenig PVA-Bedeckung darauf zwischen 120 und 180 nm aus der glatten, ~25 nm dicken PVA-Matrix hervorstehen, also wesentlich mehr als der Durchmesser der Kugeln (103 nm). Sie haben spekuliert, dass die Scherkraft auf den Latexkugeln grösser sein müsse als auf dem PVA und deshalb die Spitze stärker zurückgezogen wird. Solche Effekte, falls sie vorhanden sind, hätten zur Folge, dass entsprechende Berechnungen mit einem grossen experimentellen Unsicherheitsfaktor behaftet wären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit einfachen Modellen zur Berechnung von Fluoreszenzlinienprofilen qualitative Aspekte richtig wiedergeben lassen. Bei den Grössenverhältnissen zwischen Objekt und Spitze, wie sie im Experiment auftraten, ist die Auflösung im wesentlichen durch die Spitze gegeben. Für eine Verbesserung der Auflösung sind bessere Spitzen, d.h. Spitzen mit einer kleineren Apertur notwendig. Zur Beurteilung quantitativer Aspekte müssen komplexere Modelle herangezogen werden.

3.3 Quantitatives Bleichexperiment im Nahfeld

Das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen im SNOM ist als qualitatives Phänomen schon lange bekannt [14, 25, 27]; eine gründlichere Untersuchung wurde aber selten vorgenommen. Das Verständnis von Bleichphänomenen ist sehr wichtig im Hinblick auf die Untersuchung von empfindlichen und schwach fluoreszierenden - z.B. biologischen - Proben.

Als System wurde eine Monolage von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln gewählt. Eine solches System bietet verschiedene Vorteile für das experimentelle Vorgehen und die Interpretation der Resultate.
Durch die Kugelform wird die Fluoreszenz mit der Topographie moduliert, was die Interpretation der optischen Signale erleichtert. Am Ort einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kugel erwartet man mehr Fluoreszenz als zwischen den Kugeln; ist dies nicht der Fall, so handelt es sich beim Signal um transmittiertes Licht. Mit den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln ist über die ganze Monolage stets die gleiche Menge an Fluoreszenzfarbstoff unter gleichen Umgebungsbedingungen zu finden, so dass Inhomogenitäten innerhalb der Probe nicht auftreten.
Ueber die Struktur der Monolage lassen sich anhand von Topographiemerkmalen abgerasterte Bereiche wiederfinden und Rasterungenauigkeiten kontrollieren; zudem sind die Monolagen auch gut makroskopisch sichtbar und z.B. im Fluoreszenz-mikroskop charakterisierbar.

[29] künstlich verbreitert wird die Kugel durch die Faltung mit der Spitze - sowie in diesem Experiment - durch die relativ grosse Rastergeschwindigkeit von 20 µm/s

Für die Herstellung der Monolage wurden die mit einem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln (*FluoSpheres* von Molecular Probes, Sulfat-modifiziert, Durchmesser 227 nm ± 3.8%) verwendet. Die Identität des gelb-grünen Fluoreszenz-Farbstoffes wird vom Hersteller geheimgehalten. Unter gleichen Bedingungen zeigt der gelb-grüne Fluoreszenzfarbstoff eine um eine Grössenordnung intensivere Fluoreszenz als das Nilrot (vgl. **Vergleich der Fluoreszenz der mit Nilrot und den mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln** S.115), was ihn als guten Fluoreszenzfarbstoff ausweist. Ein Spektrenvergleich mit bekannten Fluoreszenzfarbstoffen führte zu keinem Ergebnis. Aus einigen Experimenten (vgl. **Chemische Charakterisierung der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln** S. 93) lässt sich schliessen, dass es sich um einen apolaren, wahrscheinlich hochmolekularen Farbstoff handelt. In Abb. 3.19 sind experimentelle Absorptions-, Emissions- und Anregungsspektren in Chloroform (dem Extraktionsmittel) gezeigt.
Das Absorptionsspektrum und das Anregungsspektrum für 520 nm stimmen praktisch überein. Dies heisst, dass das ganze im sichtbaren Bereich absorbierte Licht vom Farbstoff in Fluoreszenz umgewandelt werden kann, ein Indiz für seine Effizienz. Anregungs- und Emissionsspektrum sind spektral relativ gut voneinander getrennt (allerdings kleine Stokes-Shift von 8 nm), so dass die Selbstabsorption gering wird. Für die Anregungswellenlänge von 488 nm liess sich nach den Spezifikationen des Herstellers aus dem Spektrum ein molarer Extinktionskoeffizient von $3.5 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ berechnen[30].

[30] also unwesentlich höher als der des Nilrots bei seiner Anregungswellenlänge ($3.1 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$)

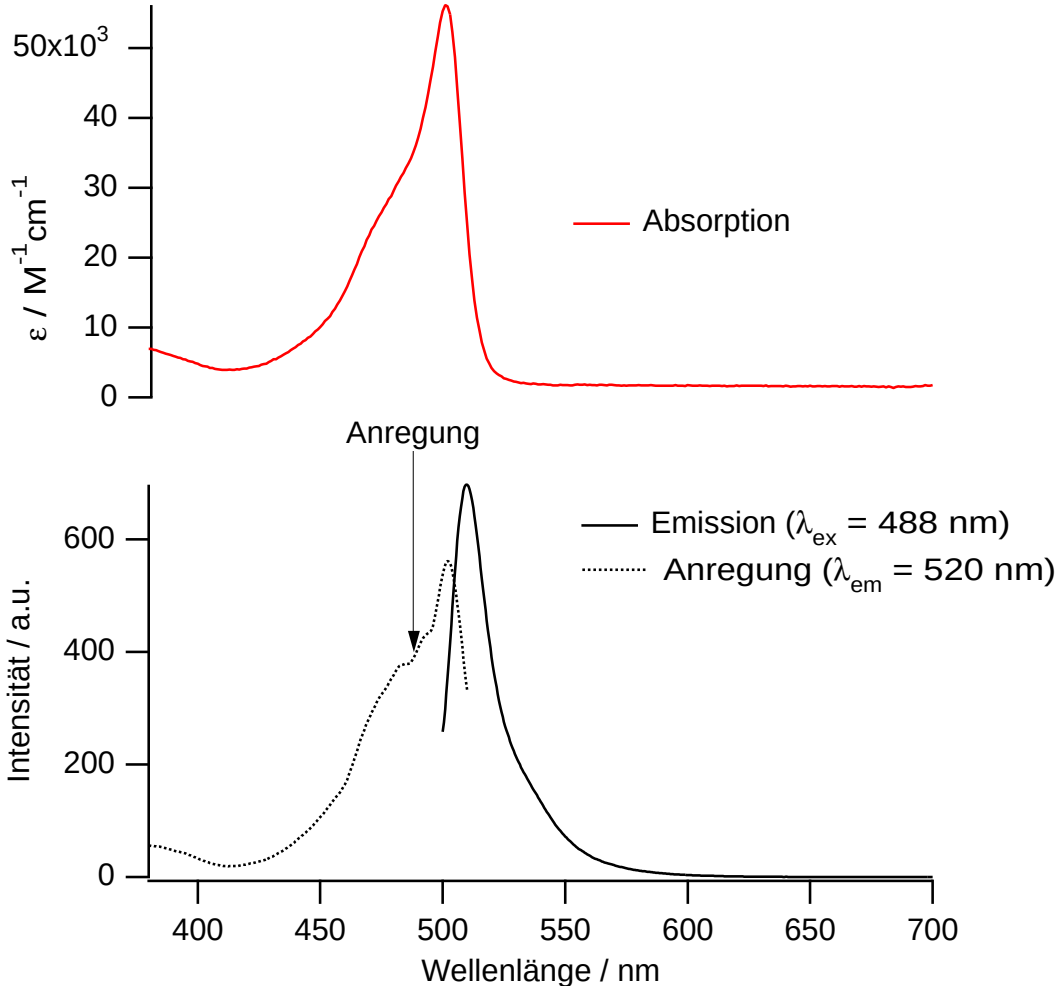


Abb. 3.19 Absorptions[31]-, Emissions[32]- und Anregungsspektren für den gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff in Chloroform

Die Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln wurde auf Glimmer präpariert [28, 29]. Hierzu wurde ein Tropfen einer frisch Ultraschall behandelten 0.2% Lösung der *FluoSpheres* auf einem etwa 3 cm^2 grossen Stück frisch gespaltenen Glimmers mit einer Pipette verstrichen und eintrocknen gelassen. Wurde die Lösung verdünnter gewählt, bildeten sich nur sehr kleine Bereiche mit Monolagen aus; bei konzentrierteren Lösungen gab es fast nur Bereiche mit mehreren Lagen.

[31] die Extinktionskoeffizientenskala wurde aufgrund der von Molecular Probes angegebenen Konzentration der Latexkugeln in Lösung und Anzahl der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle pro Latexkugel sowie der Verdünnung im Chloroformextrakt (unter Annahme der vollständigen Extraktion) aus der Extinktion berechnet. Die Extraktion erfolgte aus einer basischen Lösung der *FluoSpheres* mit anschliessendem sauren Waschen der Chloroformphase. Evtl. könnten im Absorptionsspektrum extrahierte Polymeradditive zu sehen sein, was sich aber wegen der grossen Aehnlichkeit mit dem Anregungsspektrum ausschliessen lässt

[32] Emissions- und Anregungsspektrum mit 2.5 nm Bandbreite aufgenommen

Die Stelle für die Rasterung wurde unter dem Lichtmikroskop ausgewählt, wobei die Stufen der einzelnen Lagen gut erkennbar waren, darunter auch der Uebergang zur Glimmeroberfläche. In Abb. 3.20 ist der im SNOM gerasterte Ausschnitt der Monolage dargestellt. Zuerst wurde 10mal auf einem 5x5 µm-Bereich, dann 4mal auf einem konzentrisch darum gelegenen 20x20 µm-Bereich mit 3.5 µm/s gerastert. Sämtliche Parameter wurden dabei konstant gehalten. Verwendet wurde eine gezogene Spitze von Topometrix mit einer vom Hersteller angegebenen Apertur von 50 nm.

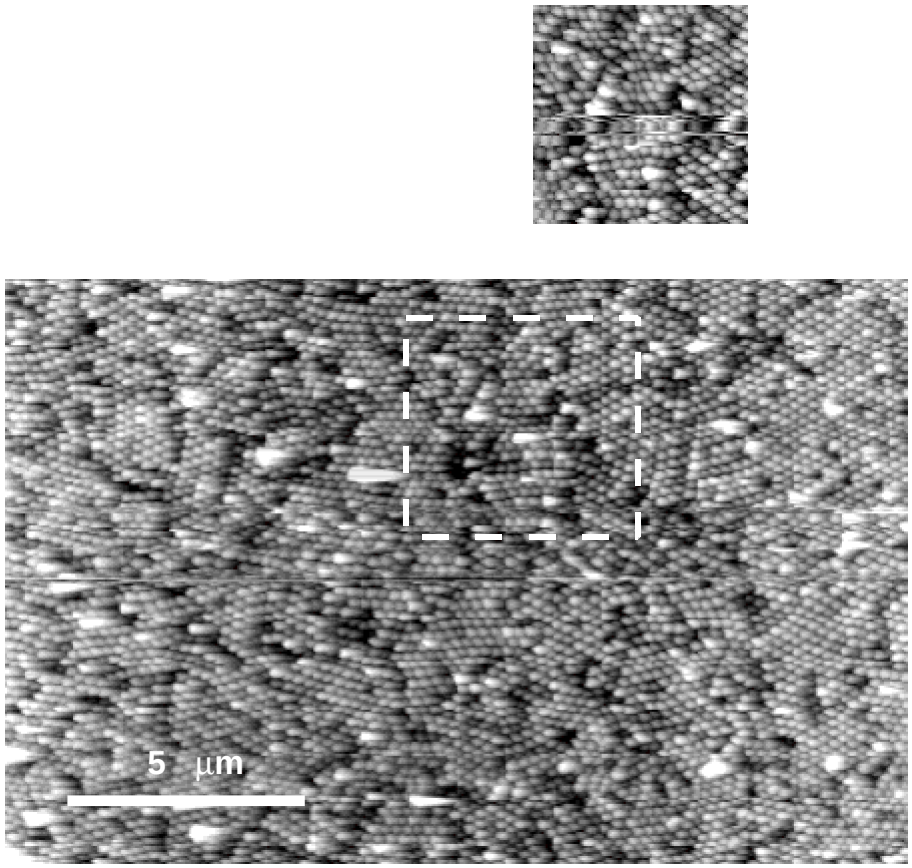


Abb. 3.20 Mit dem SNOM aufgenommene Topographie der Monolage der Latexkugeln
Das kleine Quadrat oben zeigt den ursprünglichen 5x5 µm-Rasterbereich, das grosse Rechteck einen Teil des 20x20 µm-Rasterbereichs. Beide Bilder zeigen einen Schwarzweisskontrast über 110 nm. Das gestrichelt gezeichnete weisse Quadrat gibt gut erkennbar die Lage des 5x5 µm innerhalb des 20x20 µm-Rasterbereichs an. Zwischen den beiden Rasterungen liegen 11 Rasterungen über 6.5 h hinweg, während denen sich die Topographie(abbildung) praktisch nicht verändert hat.

Die Monolage besteht überall nur aus einer Schicht der Latexkugeln und zeigt in der Grössenordnung von 2x2 µm regelmässig geordnete Bereiche. Das Rastern erfolgte zerstörungsfrei, wie ein Vergleich der beiden Rasterbereiche zeigt.

Für die Detektion des optischen Signals wurden die beiden holographisch hergestellten Bandpassfilter für 488 nm und der Langpassfilter für 515 nm zur Filterung des Anregungslichtes sowie das holographisch hergestellte Bandpassfilter für 670 nm und der Kurzpassfilter für 650 für die Filterung des Scherkraftlaserlichts eingesetzt[33]. Die Photomultiplierspannung war konstant bei 497 V. Aus der Spitze traten im Fernfeld etwa 100 nW aus.

In Abb. 3.21 sind zwei der 14 Rasterungen wiedergegeben (vgl. **Vollständige Daten zum Bleichen im Nahfeld einer Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln** S. 101). Gut erkennbar sind die einzelnen Kugeln im Fluoreszenzbild, die in der Position mit den Kugeln in der Topographie übereinstimmen. Da die Modulation der Fluoreszenz durch die Kugeln relativ zur Signalintensität klein ist, sind sie im Fluoreszenzbild des 20x20 µm-Bereiches wegen des grossen dargestellten Signalbereiches nicht erkennbar (im Linienprofil in Abb. 3.24 S.41 sind sie zu sehen). Die Fluoreszenz im 5x5 µm-Bereich war nach den ersten paar Rasterungen in der Mitte weniger intensiv als oben und unten an den Rändern[34]. Dies könnte ein Hinweis für ein leicht stärkeres Bleichen in der Mitte sein, d.h. für eine seitliche Intensitätsverteilung aus der Spitze. Innerhalb der Rasterungen nahm die Intensität monoton ab.

Auf der ersten Rasterung im 20x20 µm-Bereich hebt sich der ursprüngliche Rasterbereich im Fluoreszenzbild als rechteckiger Fleck geringerer Intensität deutlich ab; somit kann hier auf einer grösseren Längenskala das Bleichen nachgewiesen werden. Ueber die einzelnen Rasterungen nimmt auch hier das Signal monoton ab.
Die Grösse des gebleichten Bereiches beträgt im Schnitt 6.0x9.2 µm. Dies ist beträchtlich grösser als der 5x5 µm-Ausschnitt. Hierzu müssen allerdings zwei Eigenheiten der Rasterungen berücksichtigt werden. Die Rastervorrichtung rastert immer eine gewisse Distanz über eine Linie hinaus bevor sie umkehrt. Im Falle des 5x5 µm-Ausschnittes sind dies etwa 1 µm über jedes Ende hinaus. Zudem ist die Rastervorrichtung nie ganz stabil. Durch Verfolgen der Topographie innerhalb des 5x5 µm-Rasterbereichs kann die maximale Verschiebung in beiden Richtungen gemessen werden (vgl. **Stabilität der SNOM-Rastervorrichtung** S.108); in Rasterrichtung betrug sie 1.3 µm und senkrecht dazu 1.1 µm. Aufaddiert ergibt dies einen Bereich von 6.1x8.3 µm, was in etwa der gemessenen Grösse entspricht[35].

[33] diese grosse Anzahl Filter wurde gewählt, damit - auch bei fortgeschrittenem Bleichen - das beobachtete Signal Fluoreszenzlicht und nicht Licht anderen Ursprungs ist
[34] links und rechts am Rand rastert das SNOM noch etwa je 0.6 µm über den Rand hinaus, weshalb wir den Effekt dort nicht sehen können
[35] die Definition der Ausdehnung des gebleichten Bereichs in Rasterrichtung ist nicht klar, vgl. Linienprofil C in Abb. 3.24 S.41

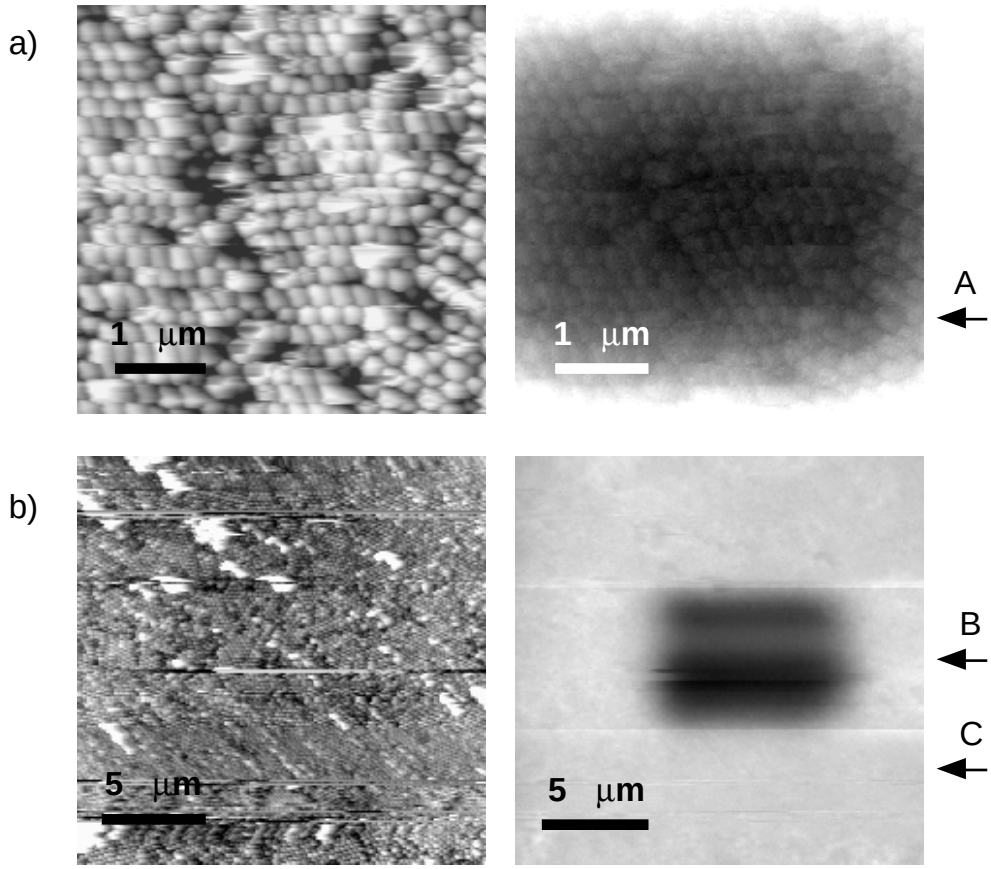
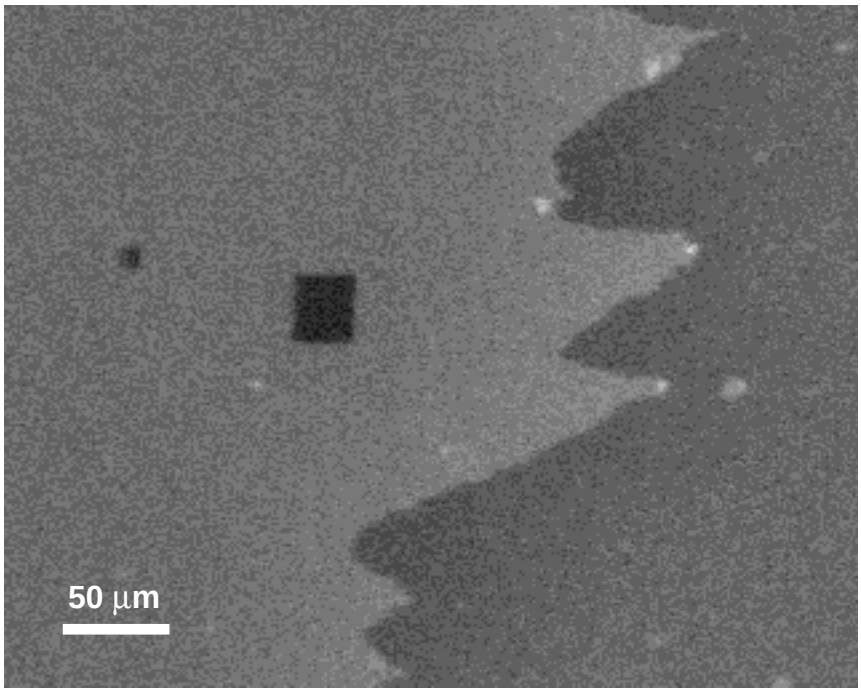


Abb. 3.21 Bleichen durch Lichteinwirkung im SNOM an einer Monolage der mit dem gelb-grünem Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln
Links ist die Topographie, rechts das optische Bild (Fluoreszenz in Transmission) wiedergegeben. a) Dritte von 10 5x5 μm-Rasterungen mit Topographiekontrast über 89 nm und optischem Kontrast[36] von -10 bis -9.975 V, b) Erste von 4 20x20 μm-Rasterungen konzentrisch um die 5x5 μm-Rasterung. Deutlich erkennbar ist das bei den 5x5 μm-Rasterungen gebleichte Rechteck. Der Topographiekontrast geht über 129 nm und der optische Kontrast von 0.036 bis 0.117 V. Die schrägverschobenen Linien in der Topographie sind Rasterartefakte während die hellen Linien gerade oberhalb und unterhalb des schwarzen Flecks sowie (teilweise) der dunklere Bereich des dunklen Flecks im Fluoreszenzbild *advanced leveling*-Artefakte sind. Die Grossbuchstaben bezeichnen die für Linienprofile ausgewählten Linien.

[36] Rohdaten für das optische Bild, da nach *leveling* die Intensitätszunahme gegen den Rand hin nicht mehr erkennbar ist

a)



b)

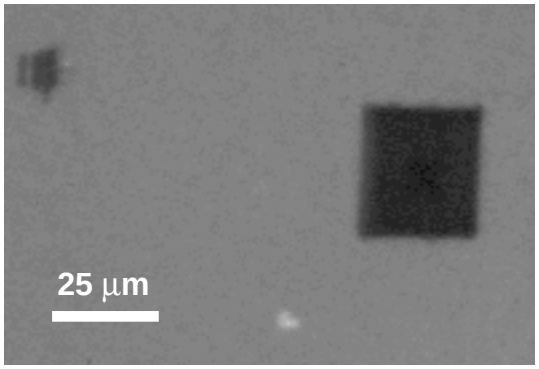


Abb. 3.22 Aufnahme der gebleichten Stelle im Fluoreszenzmikroskop
a) Aufnahme[37] der Stelle in 125facher Vergrösserung in einem Zeiss Axioplan Lichtmikroskop. Das Bild entstand in Aufsicht mit 450 bis 490 nm Breitbandanregung, Sperrfilter bei 510 nm und Emission oberhalb 520 nm. Deutlich erkennbar ist die Monolage (links) mit der quadratisch gebleichten Stelle sowie einer weiteren gebleichten Stelle von einer früheren Linienrasterung. Der gebleichte Bereich erscheint dunkler als die Glimmeroberfläche (rechts), da letztere mehr Licht zurückstreut.
b) obige Stelle unter gleichen Bedingungen in 250facher Vergrösserung. Innerhalb des gebleichten Quadrates lässt sich konzentrisch ein kleineres, leicht dunkleres Quadrat ausmachen; bei dem Bereich der früheren Rasterung links oben hebt sich klar eine einzelne Linie ab.

[37] Längenmassstab aufgrund der Vergrösserung errechnet

Durch die Grösse des gebleichten Bereichs ist dieser auch für andere Charakterisierungen zugänglich. Abb. 3.22 zeigt ein im Fluoreszenzmikroskop aufgenommenes Bild der Monolage mit dem gebleichten Bereich, der sich klar als dunkles Rechteck von seiner Umgebung abhebt. Die Probe auf dem Objektträger wurde dabei gleich orientiert wie im SNOM; die Seiten des dunklen Rechtecks sind deshalb parallel zum Bildrand rsp. senkrecht zur ursprünglichen Rasterrichtung (vgl. die einzelne Rasterlinie in der Ausschnittsvergrösserung). Innerhalb des Rechtecks lässt sich schwach der ursprüngliche 5x5 µm-Rasterbereich als noch dunkleres Quadrat erkennen. Da der angegebene Grössenmassstab nicht kalibriert ist, können die genauen Dimensionen des Fleckes nicht berechnet werden.

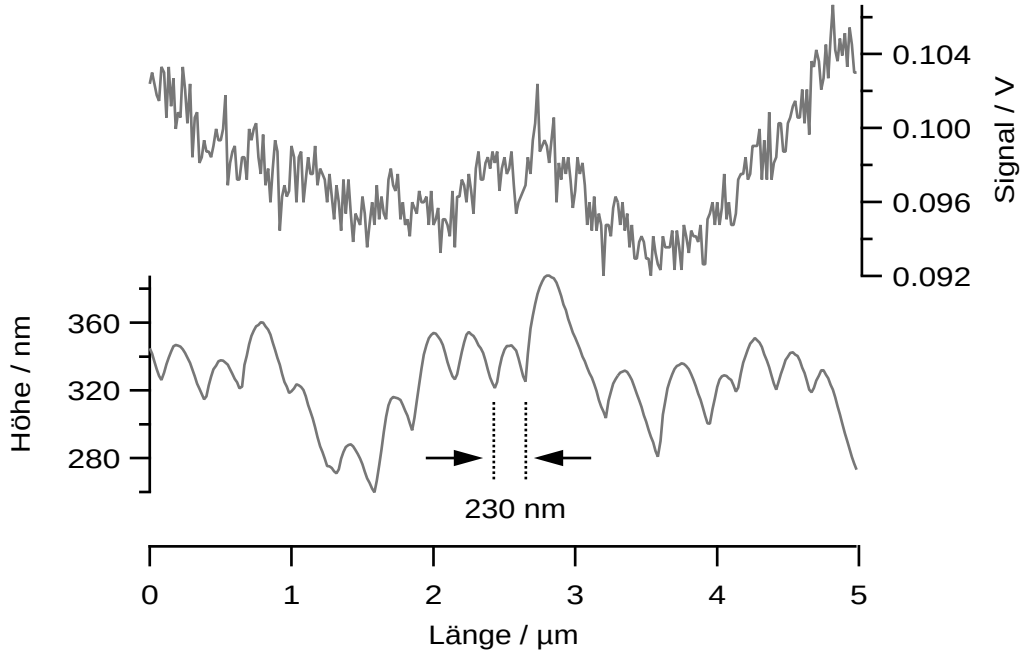


Abb. 3.23 Linienprofil A (aus Abb. 3.21) mit dem Fluoreszenzsignal (oben) und der Topographie (unten)
Die Kugeln sind im Fluoreszenzlinienprofil nur schlecht erkennbar, da die Modulation des Signals durch die Kugeln nur wenige Prozent beträgt. In der Topographie findet man die für die dicht gepackten Kugeln erwarteten Abstände von 230 nm.

In Abb. 3.23 ist das Linienprofil A im 5x5 µm-Rasterbereich, in Abb. 3.24 sind die Linienprofile B und C (durch den gebleichten Bereich) im 20x20 µm-Rasterbereich wiedergegeben. Wie die Ausschnittsvergrösserung aus dem Linienprofil C zeigt, kann selbst im gebleichten Bereich die Fluoreszenz einzelner Kugeln aufgelöst werden; die absolute Variation des Fluoreszenzsignals innerhalb einer Linie liegt aber nur im Prozentbereich.

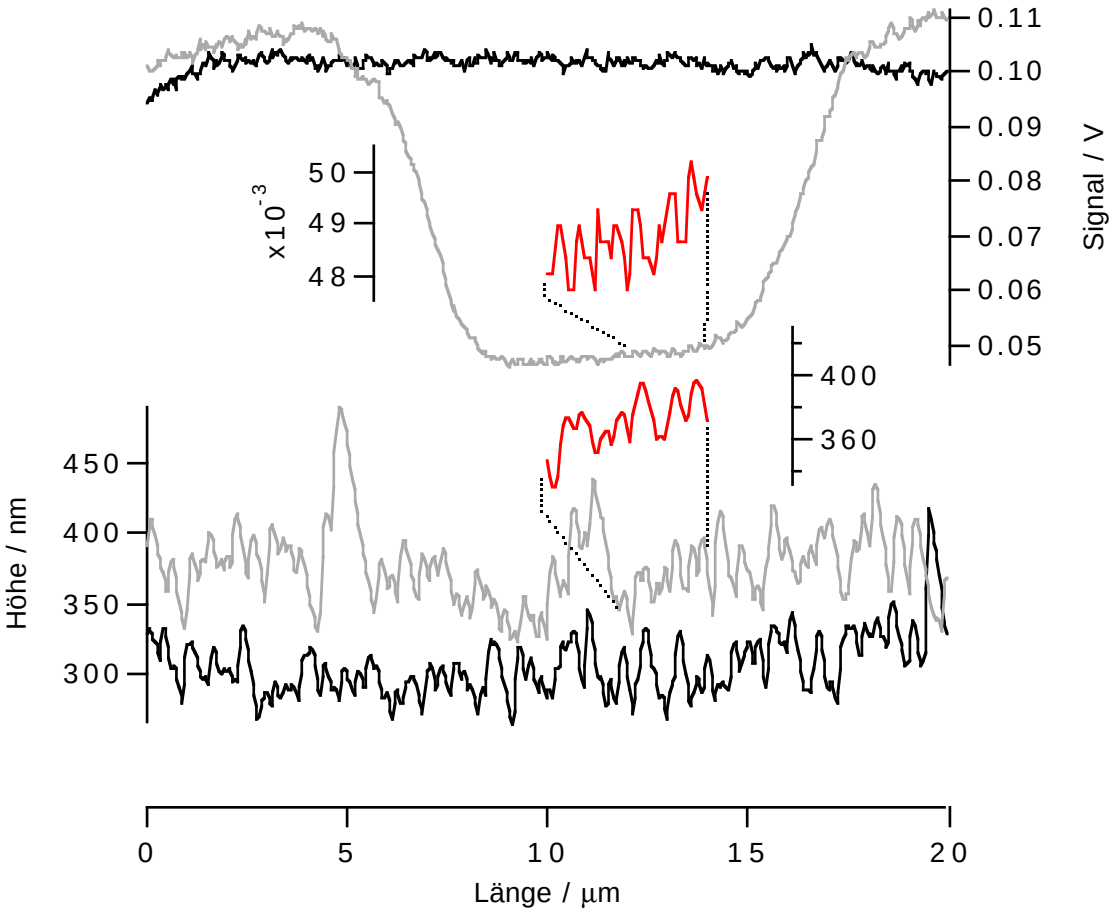


Abb. 3.24 Linienprofile B (grau) und C (schwarz) mit dem Fluoreszenzsignal (oben) und der Topographie (unten) aus Abb. 3.21
Gut sichtbar ist der massive Einbruch der Fluoreszenz innerhalb des gebleichten Bereiches; der Uebergang[38] zum ungebleichten Bereich erstreckt sich beidseitig über 3 µm. Die Ausschnittsvergrösserung zeigt, dass die Maxima in dem optischen Signal mit der Topographie der Kugeln übereinstimmen, somit handelt es sich beim Signal im gebleichten Bereich immer noch um Fluoreszenz.

Aus den Fluoreszenzbildern kann das Abklingverhalten der Fluoreszenz erhalten werden (vgl. **Vollständige Daten zum Bleichen im Nahfeld einer Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln** S.101). Hierzu wird das Signal in den Fluoreszenzbildern über einen gewissen Bereich gemittelt (konkret über den gesamten Bereich der 5x5 µm-Rasterungen, der Bereich innerhalb und ausserhalb des dunklen Flecks sowie den gesamten Bereich der 20x20 µm-Rasterung) und als Funktion der Anzahl Rasterungen aufgetragen. Hierbei muss beachtet werden, dass im 5x5 µm-Bereich 300 Linien, im 20x20 µm-

[38] der Photomultiplier ist nur bedingt geeignet, grosse Intensitätsänderungen bei grossen Intensitäten wiederzugeben

Bereich aber 500 Linien gerastert wurden; die Spitze hielt sich beim Rastern des 5x5 µm-Bereiches also 2.4mal länger[39] auf pro Fläche als im 20x20 µm-Bereich.
Das Signal des Photomultipliers lässt sich für bekannte Detektionsparameter kalibrieren, so dass die effektiven Fluoreszenzintensitäten erhalten werden (siehe Kalibrierung des Photomultipliers S.110). In Abb. 3.25 ist die Fluoreszenzintensität[40] gegen die pro Fläche eingestrahlte Lichtenergie aufgetragen.

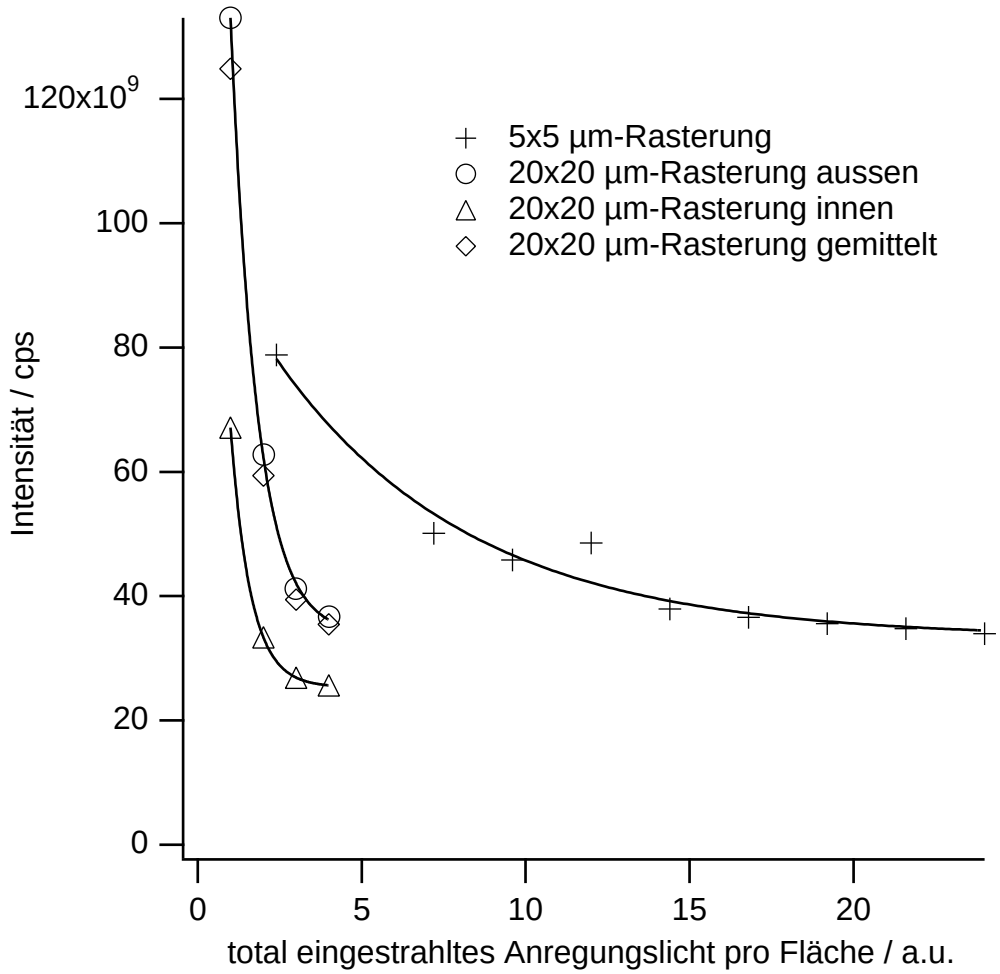


Abb. 3.25 Abnahme der Fluoreszenz durch Bleichen der Monolage
Auf der x-Achse ist die Anzahl der Rasterungen (für den 5x5 µm-Bereich mit 2.4 multipliziert) aufgetragen, was dem total eingestrahlten Anregungslicht pro Fläche entspricht; an die Datenpunkte wurden Exponentialfunktionen angepasst. Eine willkürliche Einheit (a.u.) entspricht etwa 140 J/cm^2 (siehe Text).

[39] 2.4 = 20*300/5*500. Es muss beachtet werden, dass diese Annahme nur Sinn macht, wenn sich die laterale Bleichwirkung der Spitze auf mindestens 60 nm - der Abstand zweier Rasterlinien im 20x20 µm-Bereich - erstreckt
[40] in counts per second angegeben

Geht man davon aus, dass die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Farbstoffmoleküle und das Verschwinden der Farbstoffmoleküle proportional zur eingestrahlten Lichtmenge[41] ist, so wird ein exponentielles Abklingen der Fluoreszenz erwartet. Dies wird auch gefunden.
Allerdings ergeben sich aus den Daten einige Unstimmigkeiten mit den Erwartungen. Für den inneren (gebleichten) Bereich der 20x20 µm-Rasterung wird erwartet, dass sich die Intensitäten nahtlos an die des 5x5 µm-Bereichs anfügen; die Werte sind anfangs aber gut doppelt so gross und fallen erst gegen Ende auf das erwartete Niveau. Das gleiche gilt für die äusseren, anfangs ungebleichten Bereiche der 20x20 µm-Rasterung. Sie haben zu Beginn wesentlich grössere Werte als die der 5x5 µm-Rasterung, nähern sich gegen Ende aber ebenfalls diesen an. Hierbei muss beachtet werden, dass der Abfall der Fluoreszenz *zwischen* zwei Rasterungen ohne Annahmen über die örtliche Wirkung des Bleichens mit der eingestrahlten Energie korreliert werden kann. Für die Messung eines Wertes ist dies aber nicht gegeben. Es ist offensichtlich, dass die Fluoreszenzmessung das System massiv stört - durch Bleichen des Farbstoffes. Bei der Rasterung im 5x5 µm-Bereich lagen die Rasterlinien nur 15 nm, im 20x20 µm-Bereich hingegen 60 nm auseinander. Es ist angesichts der Dimensionen der Spitze auszuschliessen, dass die Bleichwirkung auf einen 15 nm breiten Streifen lokalisiert wäre. Dementsprechend ist die an einem Rasterpunkt ausgelesene Fluoreszenz durch Rastern der Nachbarlinien bereits vermindert worden. Dieser unvermeidliche Effekt ist bei einem grösseren Abstand der Rasterlinien sicher kleiner mit entsprechend grösseren Anfangsintensitäten.

Die Auswertung der an die Daten angepassten Exponentialkurven der Form

$$\text{Intensität} = k \cdot e^{-a \cdot \left(\frac{\text{eingestrahlte Energie}}{\text{Fläche}} \right)} + b$$

sind in Tab. 3.1 wiedergegeben.

Daten	a / (a.u.)$^{-1}$	b / cps
5x5 µm-Rasterung	0.169	$3.33 \cdot 10^{10}$
20x20 µm-Rasterung innen	1.65	$2.53 \cdot 10^{10}$
20x20 µm-Rasterung aussen	1.243	$3.38 \cdot 10^{10}$
20x20 µm-Rasterung gemittelt	1.255	$3.28 \cdot 10^{10}$

Tab. 3.1 Koeffizienten der an die Daten angepassten Exponentialfunktionen
Die über den ganzen 20x20 µm-Bereich gemittelten Daten geben erwartungsgemäss v. a. das Verhalten des (grossen) äusseren Bereichs wieder.

Aus den oben erwähnten Ueberlegungen macht es keinen Sinn, den Koeffizienten k auszuwerten[42]. Die additive Konstante, die nicht stark variiert und zwischen 2.5 -

[41] die Lichtquelle - der Ar-Ionenlaser - ist nach 2h stabil, vgl. Stabilität des Ar-Ionenlasers S.114. Ueber diesen Zeitraum lief der Laser bereits bei allen Experimenten.
[42] eine Verschiebung entlang der Energieskala (deren Nullpunkt nicht bekannt ist) fliesst in k ein; sonst könnte man die Anfangsintensität der Fluoreszenz berechnen

$3.3 \cdot 10^{10}$ cps beträgt, kann als Untergrund aufgefasst werden. Mit der massiven Unterdrückung des Anregungslichts durch die Filterung bei einer relativ tiefen Photomultiplierspannung ist dies damit nur schwer zu erklären. Es widerspricht auch der Beobachtung, dass selbst im gebleichten Bereich nach wie vor das optische Signal intensiver am Ort der Kugeln ist. Die wahrscheinlichere Erklärung ist, dass das Abklingen der Fluoreszenz nur näherungsweise exponentiell ist rsp. die Zerfallskonstante a sich mit der Zeit ändert. Dies spiegeln die Zerfallskonstanten wider, wenn man berücksichtigt, dass die Daten aus dem 5x5 µm-Bereich (a = 0.169) wegen der grossen total eingestrahlten Energien der Fortsetzung der Messungen im 20x20 µm-Bereich (a = 1.255) entsprechen[43]. Allerdings stimmt dies nicht mit dem Wert des gebleichten Bereichs der 20x20 µm-Rasterung (a = 1.65) überein, der viel zu gross ist. Die verwendete Detektion mit Photomultiplier ist sicher nicht ideal[44] und setzt damit der Interpretation der Daten Grenzen.

Die willkürliche Einheit (a.u.) der eingestrahlten Energie kann berechnet werden. Ueber die Bildgrösse (20x20 µm), die Rastergeschwindigkeit (3.5 µm/s), die Anzahl der Rasterlinien (500, hin und zurück) und die Lichtleistung aus der Spitze (etwa[45] 1 µW) lässt sich die a.u. zu etwa 1.4 kJ/cm^2 abschätzen. Dies berücksichtigt nur das grüne Anregungslicht. Die Probe wurde aber während den Rasterungen auch vom Scherkraftlaser (670 nm, 3 mW Leistung) beleuchtet, allerdings nur indirekt[46]. Eine Bleichwirkung ist unwahrscheinlich, da der Farbstoff in diesem Bereich gar nicht absorbiert (vgl. Absorptionsspektrum in Abb. 3.19). Ein Bleichexperiment mit einem HeNe-Laser (630 nm, 1.6 mW) wurde durchgeführt, ergab aber keine schlüssigen Ergebnisse[47].

Die Beurteilung dieser Resultate ist sehr schwierig. Da die Identität des Farbstoffes nicht bekannt ist, kann nicht in der Literatur gesucht werden. Eine Idee über die Stabilität von Farbstoffen gibt deren Verwendung in Farbstofflasern. *Antonov et al.* haben eine Reihe von Laserfarbstoffen mit einem XeCl-Laser (308 nm) gepumpt und untersucht, wann die Farbstofflaserleistung auf die Hälfte abfällt [30]. . Für die Laserfarbstoffe werden 50 - 1000 Absorptionsprozesse pro Molekül gefunden, bevor die Laserleistung auf die Hälfte abnimmt. Dies wird durch die Zerstörung des Farbstoffes *wie auch* durch die Absorption der Photoprodukte bedingt[48], deren relative Anteile sich von Farbstoff zu Farbstoff stark ändern. Da die zum Pumpen verwendeten

[43] die über das ganze Bild gemittelte Daten sind am robustesten bezüglich der Bildbearbeitung

[44] wie gross der Fehler durch die Signalverarbeitung des Aurora-SNOM ist, ist schwer abzuschätzen. Es ist auf jeden Fall schwierig, einen Versatz des optischen Signals von einer Rasterlinie zur nächsten zu erklären, wie sie in den optischen Bildern regelmässig auftraten und korrigiert (Einfluss auf Absolutwerte?) werden mussten. Vgl. auch Ausreisser der 5x5 µm-Rasterwerte in Abb. 3.25

[45] vgl. auch Bemerkungen über die Lichtleistung in Vollständige Daten zum Bleichen im Nahfeld einer Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln S.101. Die zu Beginn der Rasterung gemessene Fluoreszenzlichtleistung entspricht 0.3 nW. Geht man von der (früher) bestimmten Sammeleffizienz der Optik (ohne Filter) von 12% aus, korrigiert bezüglich aller Filter (ca. 20%), so ergibt dies total etwa 10 nW an Fluoreszenz der Probe, was 1/100 der eingestrahlten Lichtleistung entspricht

[46] bei den gezogenen Spitzen kann der Laser gut auf einen Punkt etliche 10 µm vom Apex entfernt gerichtet werden; auf die gerade gerasterte Stelle trifft nur reflektiertes Licht. Der Scherkraftlaser beleuchtet einen ellipsenförmigen Teil (Achsen etwa 500 rsp. 200 µm) der Probe

[47] 5-10 Lagen der gleichen *FluoSpheres* auf einem 2x2 mm Glimmerstück (auf Glas geklebt) wurde mit dem Laser bestrahlt und im Fluoreszenzspektrophotometer vermessen (grosser Untergrund des Glases). Es zeigte sich eine Abnahme der Fluoreszenz, bevor sie nach zwei Stunden Bestrahlung anzusteigen begann

[48] teilweise fällt die Farbstofflaserleistung auf die Hälfte, obwohl nur 10-20% der Farbstoffmoleküle gebleicht sind

Photonen zudem wesentlich energiereicher sind, können diese Werte als untere Grenze für die Stabilität des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes interpretiert werden.

Die Fluoreszenz nimmt nach Einstrahlung einer a.u. auch etwa auf die Hälfte ab (für die 20x20 µm-Bereiche). Die eingestrahlte Energie von 1.4 kJ/cm^2 entspricht $3.4 \cdot 10^{21}$ Photonen/cm^2 oder etwa 10^{12} Photonen pro Kugelquerschnitt. Im Fernfeld würde etwa 1% der Moleküle des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes in der Kugel absorbieren (ausgehend vom experimentell bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten von $3.5 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ bei 488 nm). Somit verblieben $2 \cdot 10^5$ Absorptionsprozesse pro Molekül[49], die zu einem 50%-Bleichen führen können. Dies ist aber nur eine grössenordnungsmässige Schätzung.

Um das Bleichverhalten besser abzusichern, wurde ein Bleichexperiment im Fernfeld unternommen. Abb. 3.26 gibt schematisch den Aufbau mit den experimentellen Parametern wieder.

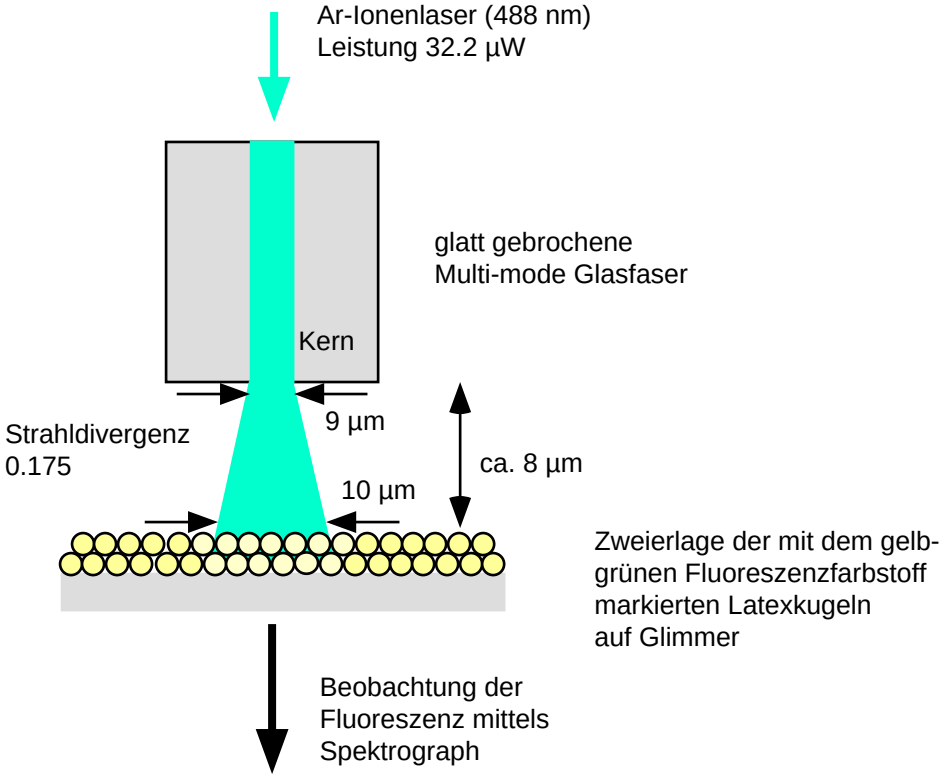


Abb. 3.26 Prinzip des Bleichexperiments im Fernfeld

Im Aurora-SNOM wurde anstelle einer Spitze eine glatt gebrochene Multi-mode Glasfaser benutzt und etwa 8 µm oberhalb einer analog der Monolage präparierte Zweierlage der *FluoSpheres* positioniert. Ueber die SNOM-Optik wurde das Licht gesammelt und auf eine 50 µm-Glasfaser fokussiert, die das Licht über einen Adapter in den Spektrographen leitete. Im Spektrographen diente ein holographisch hergestelltes Bandpassfilter für 488 nm zur Unterdrückung des Anregungslichtes. Mit

[49] bei $5.9 \cdot 10^4$ Molekülen

diesem Aufbau war es möglich zu bleichen *und*[50] in situ das Fluoreszenzspektrum als Funktion der Zeit zu verfolgen. Ueber 9 h hinweg wurde alle 20 min ein Spektrum während 5 s aufgenommen (vgl. **Vollständige Daten zum Bleichen einer Zweierlage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln im Fernfeld** S.113). Abb. 3.27 zeigt die aufgenommenen Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit der Zeit.

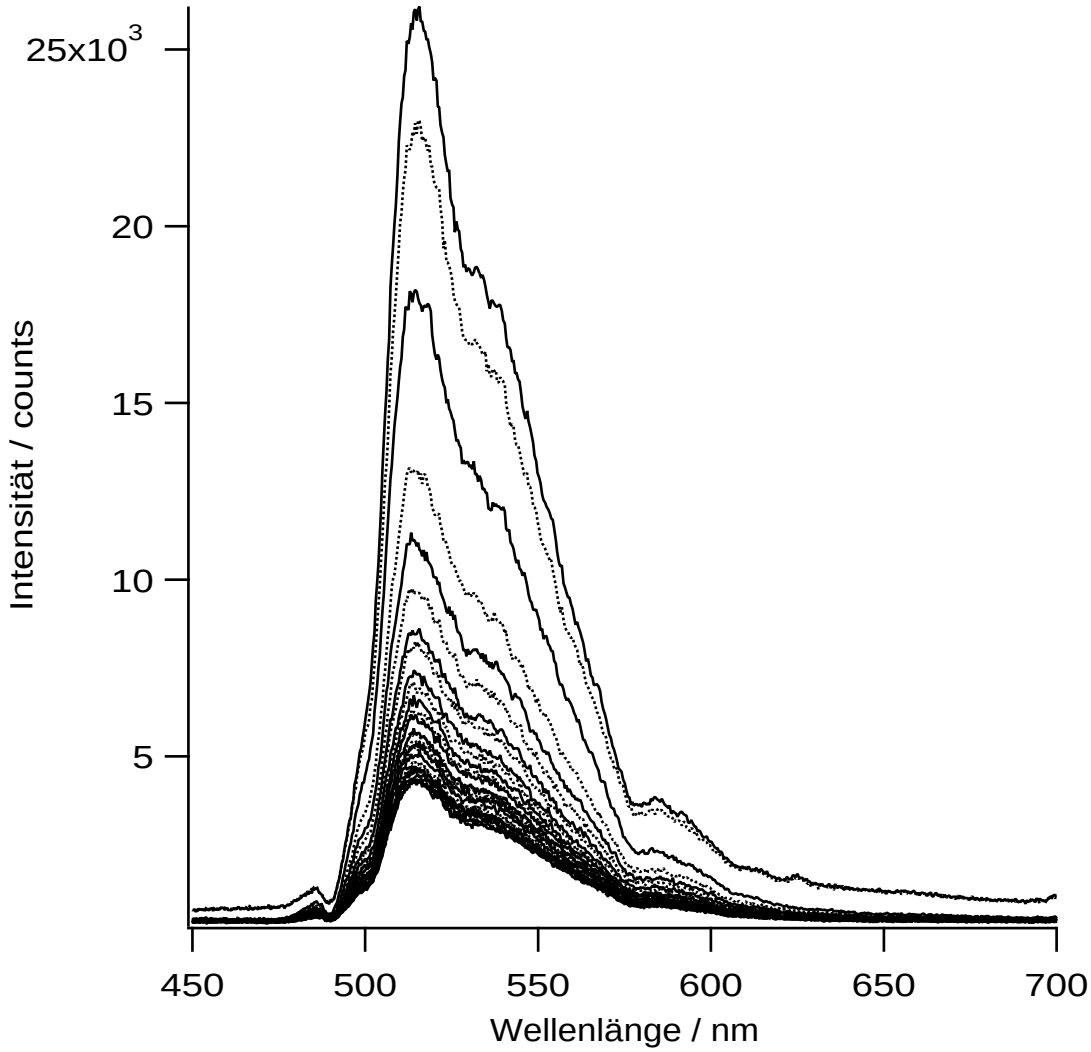


Abb. 3.27 Abnahme der Fluoreszenz beim Bleichen im Fernfeld
Zwischen den einzelnen im Spektrograph aufgenommenen Spektren liegen jeweils 20 min. Die Form des Spektrums verändert sich durch das ganze Experiment hindurch nicht.

Die Intensität der Fluoreszenz nimmt monoton ab, wobei sich die Form der Spektren nicht verändert. Im Gegensatz zur Messung mit dem Photomultiplier besteht Gewissheit, dass es sich beim Signal um ein Fluoreszenzsignal handelt. Aus dem

[50] dies war das Hauptproblem der obenerwähnten Bleichversuchs mit dem HeNe-Laser gewesen. Bei diesem Aufbau musste - einmal gestartet - nichts mehr berührt werden

Aufbau ergibt sich die Lichtleistung pro Fläche zu 41 W/cm^2 berechnen[51], und über die Zeit die eingestrahlte Lichtenergie pro Fläche berechnen. Abb. 3.28 zeigt die Abnahme des Fluoreszenzintensitätsmaximums bei 515 nm in Abhängigkeit der eingestrahlten Energie pro Fläche.

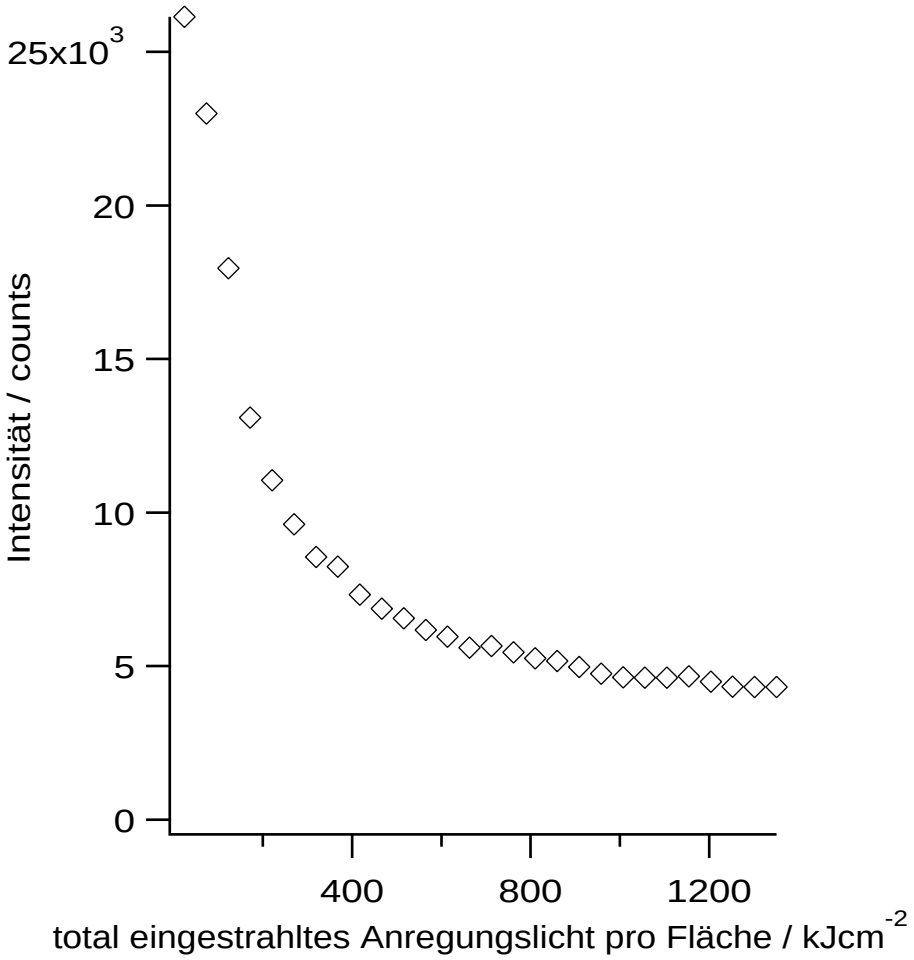


Abb. 3.28 Abnahme der Fluoreszenz beim Bleichen im Fernfeld
Die Intensitäten sind für das Maximum der Fluoreszenz bei 515 nm angegeben. Das Abklingen der Fluoreszenz ist nicht rein exponentiell.

Das experimentell gefundene Abklingen ist nicht exponentiell, sondern entspricht einem exponentiellen Zerfall mit stetig abnehmender Zerfallskonstante. Teilt man die Abklingkurve in zwei Teile ein (kleiner und grösser 400 kJ/cm^2), so erhält man für eine exponentielle Kurvenanpassung der Form

$$\text{Intensität} = k \cdot e^{-a \cdot \left(\frac{\text{eingestrahlte Energie}}{\text{Fläche}} \right)} + b$$

[51] gemessene Lichtleistung pro Kernquerschnittsfläche, welche bezüglich der (experimentell bestimmten) Strahldivergenz auf den Abstand korrigiert wurde. Durch die kleine Divergenz des Strahles ist die Rechnung sehr tolerant gegenüber Fehlern in der Abstandsabschätzung (± 3 µm)

die in Tab. 3.2 dargestellten Koeffizienten.

Daten	a / $(kJ/cm^2)^{-1}$	b / counts	k / counts
< 400 kJ/cm^2	0.0089	6730	31700
> 400 kJ/cm^2	0.0026	4030	9450

Tab. 3.2 Koeffizienten der an die Daten angepassten Exponentialfunktionen

Diese Daten entsprechen qualitativ dem, was auch im Nahfeld gefunden wird. Das Abnehmen der additiven Konstante (b = 6730 rsp. 4030 counts) und der Zerfallskonstante (a = 0.0089 rsp. 0.0026 $(kJ/cm^2)^{-1}$) im Verlauf der Messung zeigen deutlich, dass die Bleichwirkung mit fortgeschrittenem Bleichen immer kleiner wird. Nach dem Ausbleichen von 80% des Fluoreszenzfarbstoffes hatte sich das Bleichen um einen Faktor 3.4 verlangsamt.
Analog der Messung im Nahfeld kann die Anzahl Absorptionsprozesse pro Molekül, die zu einem Bleichen von 50 % des Fluoreszenzfarbstoffes führt, abgeschätzt werden. Die dazu notwendige eingestrahlte Energie von etwa 80 kJ/cm^2 entspricht $2 \cdot 10^{23}$ Photonen/cm^2 oder $8 \cdot 10^{13}$ Photonen pro Kugelquerschnitt. Geht man davon aus, dass zweimal (da eine Zweierlage) 1% des Lichtes von den Molekülen des gelbgrünen Fluoreszenzfarbstoffes absorbiert wird, so erhält man maximal $3 \cdot 10^7$ Absorptionsprozesse pro Molekül die zum Bleicheffekt führen.

Die Zerfallskonstante kann bei Verwendung der abgeschätzten willkürlichen Einheit mit der der Nahfeldmessung verglichen werden. Unter Berücksichtigung der Minimal- und Maximalwerte erhält man ein 15 bis 500mal schnelleres Bleichen im Nahfeld als im Fernfeld. Dies stimmt mit dem Vergleich der zum Bleichen notwendigen Anzahl Absorptionsprozesse pro Molekül überein, die ein etwa 150mal schnelleres Bleichen im Nahfeld ergeben. Einer der Gründe wird sicher die viel höhere Leistungsdichte der Spitze (für eine 100 nm Apertur wäre sie etwa 13'000 W/cm^2) als beim Fernfeldbleichen (41 W/cm^2) sein.

In *Color Chemistry* [31] findet sich eine Liste von Faktoren, die die Photostabilität von Farbstoffen in Polymeren beeinflussen. Dazu gehören neben der inhärenten Photostabilität des Farbstoffes:

a) Farbstoffkonzentration
b) Aggregationsgrad und Partikelgrösse des Farbstoffes
c) Chemische und physikalische Struktur des Substrats
d) Diffusion flüchtiger Substanzen in das Polymer
e) Energietransfer durch Farbstoff-Substrat-Bindung und Assoziierung
f) Wellenlängenverteilung der einfallenden Strahlung
g) Zusammensetzung der Atmosphäre, v.a. Luftfeuchtigkeit und Anwesenheit von Verunreinigungen (SO_2, NO/NO_2, O_3 etc.)

Die für den konkreten Fall relevante Punkte sind sicher die Farbstoffkonzentration, die Diffusion flüchtiger Substanzen in das Polymer und die Zusammensetzung der Atmosphäre. Der Energietransfer zum umgebenden Polymer ist unwahrscheinlich, da

das Polystyrol im sichtbaren Bereich nicht absorbiert. Sehr relevant ist die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration, da sich diese während des Bleichens ändert. Unklar ist allerdings, wie sich dessen Photoabbauprodukte verhalten.
Als wesentliche Abbauwege von Farbstoffen in Polymeren wurden die Dealkylierung (Photoreduktion mit thermischer Oxidation), die direkte Reaktion mit Singulett-Sauerstoff (benötigt UV-Strahlung zur Bildung) oder die Reaktion des Farbstoffes über angeregte Zustände, unter anderem mit Sauerstoff angegeben. Somit wird die Zusammensetzung der Atmosphäre und die Diffusion ihrer Bestandteile in das Polystyrol wichtig. Ueber den kurzen Zeitraum (halber Tag) der intensiven Bestrahlung dürften die nur marginal vorkommende Spezies wie Ozon, Stickoxide etc. vernachlässigt werden. Der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Polymethylmetacylat beträgt $5 \cdot 10^{7}$ cm^2/s (25°C, 0.21 bar Sauerstoff) [32]; für Polystyrol dürfte er in der gleichen Grössenordnung liegen. Bei einem solchen Diffusionskoeffizienten kann für eine 227 nm grosse Polystyrolkugel die Sauerstoffdiffussion nicht limitierend sein. Somit ergeben sich keine Indizien für eine bevorzugte Bleichung an der Oberfläche der Latexkugeln, wie sie ein Abfallen der Zerfallskonstante während dem Bleichen hätte erklären können.

Trautman et al. [14] haben für einzelne Moleküle von dil[52] eingebettet in Polymethylmetacrylat im SNOM eine Bleichwahrscheinlichkeit von 10^{-6} bis 10^{-7} zu Beginn und eine von 10^{-8} pro Absorptionsprozess nach Ausbleichen von 80-90% des Fluoreszenzfarbstoffes gefunden. Dies liegt in der Grössenordnung des für diese Arbeit abgeschätzten Bereiches.

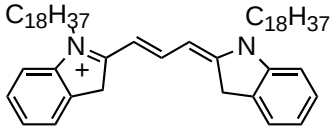
3.4 Fluoreszenz von kovalent auf Gold gebundenen Latexkugeln

Für eine Anwendung mit dem SNOM müssen biologische Makromoleküle immobilisiert werden. Prinzipiell kann dies durch Adsorption, ionische Bindung, Matrixeinhüllung oder kovalente Bindung geschehen [33]. Für Proteine haben *Wagner, Kernen et al.* über eine Methode berichtet [34], die atomar flache Oberflächen liefert, was die Rasterung im SNOM erleichtert.

Ausgegangen wird von Glimmer, der als Schablone für eine sehr flache, aufgedampfte Goldschicht von etwa 200 nm dient. Die Goldschicht wird mit der dem Glimmer abgewandten Seite mit einem Epoxykleber auf einen Siliziumwafer geklebt; anschliessend wird der Glimmer von der Goldoberfläche abgelöst. Auf dieser kann eine *self-assembly* Dithiobis(succinimidylundekanoat)-Monoschicht ausgebildet werden, wobei die Succinimidgruppen die Carbonäuren aktivieren. Somit können Moleküle mit Aminogruppen durch blosses Hinzufügen in Lösung immobilisiert werden. Abb. 3.29 zeigt den Aufbau einer solchen Probe.

Im konkreten Fall wurden Amin-modifizierte *FluoSpheres* (Durchmesser 0.2 μm) mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff immobilisiert. Dazu wurden die *FluoSpheres* mit einem Phosphatpuffer (pH 8) auf 0.02% verdünnt, ultrabeschallt und 2 h lang mit der frisch ausgebildeten Dithiobis(succinimidylundekanoat)-Monoschicht reagieren gelassen.

[52] 1,1'-Dioctadekyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin



Wie eine Charakterisierung im Profilometer zeigte (in Abb. 3.30), ist die Oberfläche wirklich sehr flach. Eine Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop zeigte eine wesentlich dichtere Bedeckung als der PVA-Film mit den darin eingebetteten Nilrot-markierten Latexkugeln.

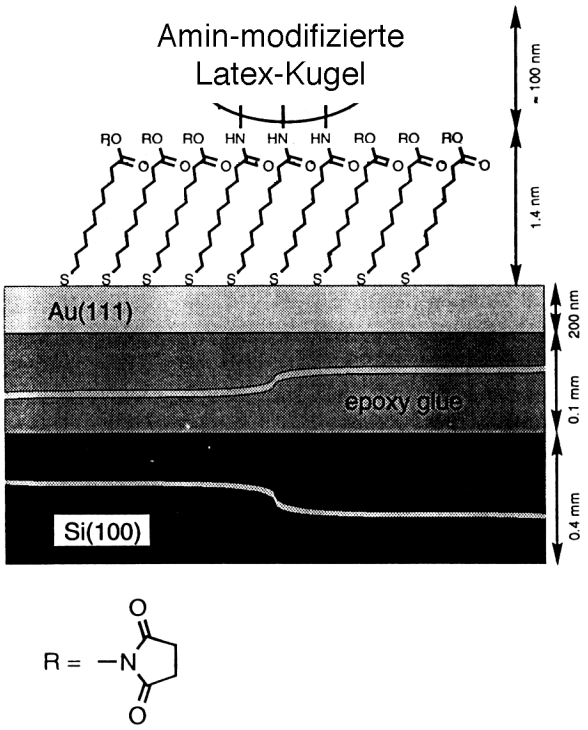


Abb. 3.29 Schematische Darstellung der verwendeten Immobilisierungsmethode nach *Wagner et al.* [34, 35]

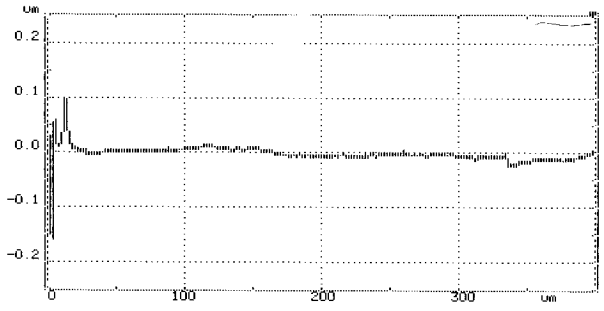


Abb. 3.30 Profil der Goldoberfläche mit darauf immobilisierten *FluoSpheres*
Die Oberfläche ist auf ± 5 nm eben.

Für die Rasterung wurde ein Randbereich mit wenig Bedeckung ausgewählt. Verwendet wurde eine gezogene Spitze von Topometrix mit einer nominellen Apertur von 50 nm. Das optische Signal wurde in Reflexion durch eine 50 µm-Lochblende aufgenommen mit einer Photomultiplierspannung von 1030 V; bei Unterbruch des Anregungslichtes verschwand das Signal. Für die Filterung wurden beide 488 nm-holographisch hergestellte Bandpassfilter, das 670 nm-holographisch hergestellte Bandpassfilter und das 650 Kurzpassfilter benützt. Die erhaltenen SNOM-Bilder sind in Abb. 3.31 gezeigt.

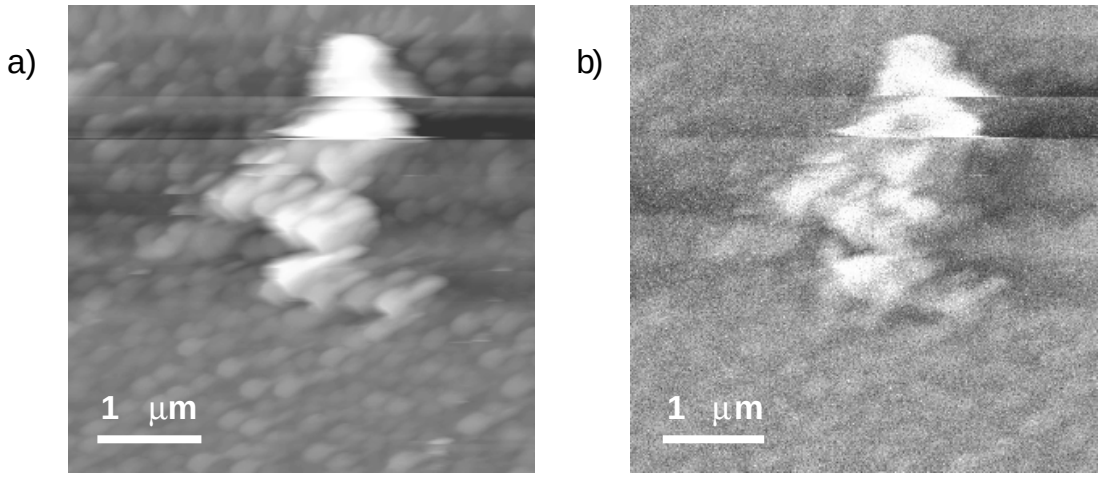


Abb. 3.31 SNOM-Bilder von kovalent auf Gold immobilisierten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln
a) Topographie (Schwarzweisskontrast über 241 nm) und b) Fluoreszenz (Schwarzweissskala von 0.054 bis 0.236 V), in Reflexion aufgenommen. Erkennbar sind einzelne Kugeln und ein Kugelcluster in der Bildmitte. Im Fluoreszenzbild sind die einzelnen Kugeln schwach erkennbar, gut sichtbar ist hingegen der Cluster.

Die Fluoreszenz der einzelnen Kugeln ist sichtbar, wenn auch schlecht vom Untergrund aufgelöst. Dies dürfte an der schlechten Auflösung[53] der verwendeten Spitze gelegen haben. Derart immobilisierte Moleküle können aber grundsätzlich im SNOM gerastert und ihr Fluoreszenzsignal aufgezeichnet werden.

[53] die gemessene Transmission im %-Bereich ist ein Indiz für eine Aperturgrösse von mehr als 50 nm

3.5 Zusammenfassung

Anhand von ~200 Nanometer grossen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln wurden für die optische Rasternahfeldmikroskopie (SNOM) wichtige Fragestellungen behandelt. An einzelnen Kugeln in einer Polymermatrix wurden die Auflösung der Fluoreszenz und ihre bestimmenden Faktoren diskutiert, an einer Monolage der Kugeln wurden Bleichphänomene studiert und kovalent immobilisierte Amino-modifizierte Kugeln als Modell für einzelne Moleküle mit dem SNOM abgebildet.

Berechnungen zeigen, dass ein Energietransfer zwischen den Fluoreszenzfarb-stoffmolekülen in den Latexkugeln zu vernachlässigen ist; aufgrund der Struktur der Kugeln können andere Fluoreszenzlöschprozesse ausgeschlossen werden. Zudem konnte im trockenen Zustand kein Fluoreszenzintensitätsverlust der Kugeln nachge-wiesen werden. Somit bieten die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Latexkugeln eine von der Präparation unabhängige Fluoreszenz und eignen sich deshalb gut für Untersuchungen im SNOM. Durch ihre Grösse und Form erleichtern sie die Charakterisierung der Proben und die Interpretation der mit dem SNOM aufgenom-menen Bilder.

Einzelne in Polyvinylalkohol eingebettete Nilrot-markierte Latexkugeln von 282 ± 7 nm Grösse wurden mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 8 auf ~410 nm Halb-wertsbreite im Linienprofil aufgelöst; die Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um eine Faktor 4 wurde durch die Verbesserung des Instrumenten-aufbaus erreicht. Die Verteilung der Kugeln wurde mittels einer Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop verifiziert. Anhand einfacher Modelle wurde versucht, Form und Auflösung von Fluoreszenzlinienprofilen zu diskutieren. Wird das experimentelle gaussförmige Linienprofil als Resultat der Faltung einer Spitzenfunktion mit der Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes (einer Kugelfunktion) betrachtet, so kann diese Spitzenfunktion durch Entfaltung erhalten werden. Berechnungen zeigen, dass bei den im Experiment vorhandenen Grössenverhältnissen zwischen Spitze und Kugel die Auflösung des Objektes im wesentlichen durch die Spitze gegeben wird.

Eine präparierte Monolage der mit einem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln wurde mit dem SNOM in Abhängigkeit der Zeit untersucht und das beobachtete Bleichen durch die 488 nm-Linie des Ar-Ionenlasers quantitativ ausge-wertet. Die Topographie der Monolage erfuhr durch das Rastern keine Veränderung. Die Bleichwirkung konnte sowohl mit dem SNOM im Nahfeld wie auch mit einem Fluoreszenzmikroskop im Fernfeld bestätigt und die laterale Beschränkung des Bleichens auf den gerasterten Bereich gezeigt werden. Selbst nach dem Ausbleichen von 80% des Farbstoffes konnte sichergestellt werden, dass das beobachtete Signal Fluoreszenz herrührt. Die Abnahme der Fluoreszenz durch das Bleichen entsprach einem exponentiellen Zerfall mit monoton abnehmender Zerfallskonstante; nachdem 80% der Moleküle ausgebleicht worden waren, war die Zerfallskonstante um eine Grössenordnung kleiner als zu Beginn. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von *Trautman et al.* [14], die dies für einen anderen fluoreszierenden Farbstoff im SNOM beobachtet haben. Für ein 50%iges Bleichen des Farbstoffes wurden bei einer Leistung von 1 µW aus der Spitze etwa 10^5 Absorptionsprozesse pro Molekül gefunden.
Ein unter ähnlichen Bedingungen durchgeführtes Bleichexperiment an den Kugeln im Fernfeld zeigte ein qualitativ gleiches Bleichverhalten, allerdings im Bereich von 15 bis 500mal langsamer bei gleicher eingestrahlter Energie. Dies liegt in der Grössen-ordnung des Verhältnis der abgeschätzten Leistungsdichten im Nahfeld zu der im

Fernfeld (ungefähr 300). Somit wird das schnellere Bleichen im Nahfeld durch die wesentlich höhere Leistungsdichte bedingt sein.

Amino-modifizierte Fluoreszenzfarbstoff-markierte Latexkugeln konnten mit Hilfe der Immobilisierungsmethode von *Wagner et al.* [34, 35] an einer ultraflachen Goldschicht kovalent gebunden werden. Eine Immobilisierung einzelner, auch empfindlicher Moleküle ist schon gezeigt worden. Die Glattheit der Goldoberfläche wird durch den Templateffekt einer Glimmeroberfläche gegeben, die Ankopplung erfolgt über aktivierte Carbonsäuren einer *self-assembly* Monolage von Thiolen. Mit dem SNOM konnte die Goldoberfläche gerastert und die einzelnen Kugeln in der Topographie und der Fluoreszenz aufgelöst werden. Diese Immobilisierungsmethode ist einfach, unter sanften Reaktionsbedingungen durchführbar und eignet sich durch die Glattheit der hergestellten Proben besonders gut für SNOM-Zwecke.

4. Polymermodifikation mit dem SNOM

Die Möglichkeiten des SNOM beschränken sich nicht nur auf die blosse Abbildung oder chemische Oberflächenanalyse durch Fluoreszenz- oder Ramansignale, sondern die Spitze kann auch als Werkzeug zur Veränderung der Oberfläche eingesetzt werden. Eine Möglichkeit, wie dies geschehen kann, ist über eine kurzzeitige Erhitzung der Spitze durch eingekoppeltes Licht. Geeignete Oberflächen können so durch Hitzeeinwirkung modifiziert oder bei grösseren Energien Teile dieser Oberfläche desorbiert werden.
Für die chemische Analyse ergibt sich durch Desorption die Möglichkeit eines *nano-sampling*, einer Probenentnahme aus einem Gebiet von ~100 nm Durchmesser, vorausgesetzt eine empfindliche Detektionstechnik steht zur Verfügung (Massenspektrometrie, Kapillarzonenelektrophorese, Fluoreszenz). Die Machbarkeit von Desorption mit dem SNOM ist bisher in einigen wenigen Arbeiten gezeigt worden. *Shchemelinin et al.* haben mit Spitzen aus Mikropipetten [10] eine Laserablation eines Photolackes durchgeführt. Im Gegensatz dazu haben *Zeisel et al.* mit einer geätzte Spitze Anthracenmoleküle von einer Kristalloberfläche thermisch desorbiert [11].

4.1 Motivation der Polymere als System

Polymere sind heute eine der wichtigsten Produkte der chemischen Industrie und fast überall anzutreffen. Die vielfältigen makroskopischen Eigenschaften von Polymeren hängen stark von den in ihnen enthaltenen Additiven wie Pigmenten, Weichmachern oder Stabilisatoren ab. Um deren Wirksamkeit besser verstehen zu können, muss die mikroskopische Struktur der Polymere und die Verteilung der Additive auf einer Submikrometerskala untersucht werden. Da Polymere Isolatoren sind, kann die Rastertunnelmikroskopie nur für speziell präparierte Polymere eingesetzt werden; die Anwendung der Kraftmikroskopie ist auf die härteren Polymere beschränkt. Für das SNOM gelten diese Beschränkungen nicht.
So besteht Interesse von seiten der Industrie zur Untersuchung der Verteilung von Pigmenten in Polymeren [36]. Mit dem SNOM wurde z.B. die Struktur eines Polystyrol-Poly(2-Vinylpyridin)-Blockcopolymers[54] durch optischen Kontrast im Submikrometerbereich aufgelöst [37].

Für die Untersuchungen mit dem SNOM wurden verschiedene Polymere ausgewählt, die sich strukturell sehr ähnlich sind, aber eine grosse Eigenschafts- und Anwendungsvielfalt besitzen. Es sind dies Polystyrol (PS), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylbutyral (PVB). Die zur praktischen Durchführung nötigen Vorraussetzungen beschränken sich darauf, dass sich alle Polymere für die Herstellung eines Filmes gut lösen lassen. Die Eigenschaften der Polymere sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.
Ausgangsbasis für alle diese Polymere sind radikalisch polymerisierte Ethenderivate. PVA entsteht indirekt durch die Hydrolyse aus Polyvinylacetat, PVB wird aus PVA durch die Acetalbildung mit Butanal hergestellt. Für das PVB ist es dabei aus statistischen Gründen nicht möglich, dass mehr als 81.6% der Alkoholgruppen in der Acetalform vorliegen.

[54] Blockcopolymere sind Polymeren aus 2 verschiedenen Monomeren, die je nach ihrem relativen Anteilen zwei Phasen mit Kugel-, Zylinder- oder Lamellenstrukturen in der Grössenordnung von 100 nm bis 100 µm ausbilden können

Das technisch wichtigste der ausgewählten Polymere ist Polystyrol, das als Verpackungsmaterial vom Yoghurtbecher bis zu Styropor breite Anwendung findet. Polymethylmethacrylat wird überwiegend für die Herstellung künstlicher Gläser (z.B. Plexiglas) verwendet. Polyvinylalkohol findet wegen seiner Wasserlöslichkeit als Verdickungsmittel in Klebern, pharmazeutischen Emulsionen und Salben Einsatz und wird in Fasern und Textilien verwendet. Vom industriellen Standpunkt her ist Polyvinylbutyral dagegen ein Nischenprodukt. In den vierziger Jahren wurde es als Schutzfolie für Windschutzscheiben entwickelt, was auch heute noch sein Hauptverwendungszweck ist.

4.2 Präparation und Charakterisierung der Filme

Für die Verwendung von Polymerfilmen im SNOM ist es sehr wichtig, homogene und glatte Filme zu haben. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Interpretation von mit dem SNOM durchgeführten Oberflächenmodifikationen. Für die Präparation der Filme wird ausgegangen von einer Lösung des Polymers in einem geeigneten Lösungsmittel, welches auf einen Träger aufgebracht wird; durch das Verdunsten des Lösungsmittel bildet sich der Polymerfilm aus. Sehr geeignet dafür ist die Technik des *spin coating*. Hierbei wird der Träger in schnelle Rotation versetzt und die Polymerlösung aufgetropft. Durch die auf die Lösung wirkende Zentrifugalkraft breitet sie sich gleichmässig, radial aus und überzieht den Träger mit einem dünnen Lösungsfilm. Das Lösungsmittel kann so schnell verdunsten und hinterlässt dabei einen glatten, sehr homogenen Polymerfilm.

In dieser Arbeit wurden sämtliche Polymerfilme auf 18x18 mm-Deckgläser für die Mikroskopie präpariert. Diese sind sehr geeignet für die Probenpräparation, da auf 1 μm die Oberflächenrauhigkeit nur etwa 1 nm beträgt [28]. Abb. 4.1 zeigt im SNOM aufgenommene Topographien von auf unbehandelten Glasoberflächen präparierten Filmen aus 1‰ Chloroformlösungen.

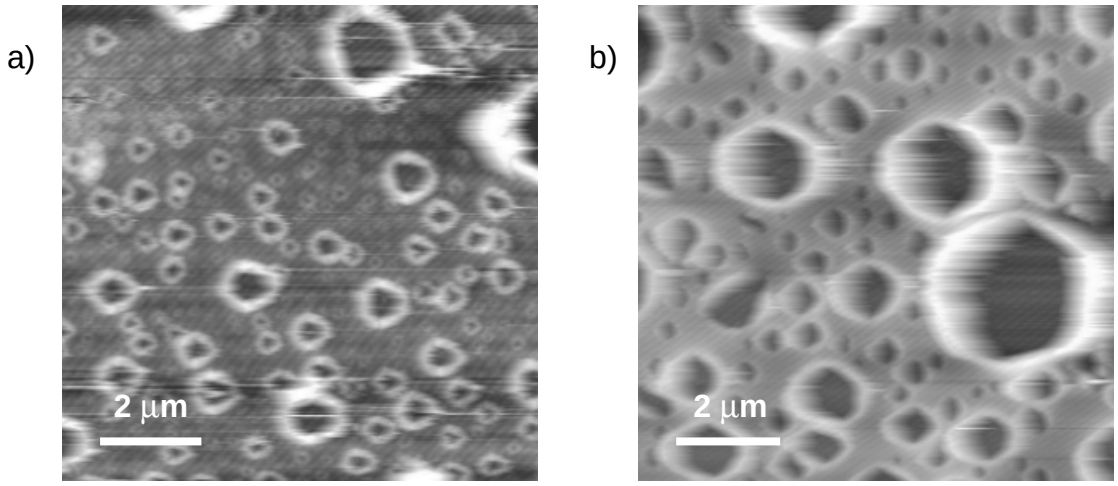


Abb. 4.1 Ohne spezielle Vorkehrungen präparierte Polymerfilme
Mit dem SNOM aufgenommene Topographiebilder von a) Polymethylmetacrylat, b) Polystyrol. Die Filme wurden durch *spin coating* der entsprechenden 1‰ Chloroformlösungen hergestellt. Der Topographiekontrast geht über 129 (a) rsp. 260 nm (b).

Diese Polymeroberflächen zeigen zahlreiche Krater verschiedener Grösse von bis zu 2 μm. Solche Krater können verschiedene Ursachen haben [42]:

1) in warmer, feuchter Luft kann es durch eine schnelle Chloroformverdampfung zu einem Kühleffekt kommen, der Luftfeuchtigkeit kondensieren lässt. Die dabei entstehenden Wassertröpfchen hinterlassen Krater

2) Benetzungsprobleme zwischen Polymerfilm und Glasoberfläche, zum Teil durch Oberflächenverunreinigungen verursacht
3) Clusterbildung durch van-der-Waals-Kräfte in verdünnten Polymerlösungen, wobei allerdings unregelmässig geformte Strukturen gebildet werden

Die wahrscheinlichen Ursachen für die Kraterbildung sind 1) und 2). Für die Reinigung der Deckgläser wurde deshalb eine Reinigungsprozedur entwickelt. Die Deckgläser wurden 15' in Aceton und darauf 15' in konzentrierte Salzsäure (rauchende Salzsäure, 1:1 verdünnt) getaucht, mit Wasser gewaschen und bis zu ihrer Verwendung in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Als Spin-Coater wurde ein Gleichstrommotor verwendet, auf dessen vertikal gelagerte Achse die Deckgläser durch doppelseitiges Klebband befestigt wurden; über die am Motor angelegte Spannung konnte die Umdrehungszahl geregelt werden (vgl. **Kalibrierung des verwendeten Spin-Coaters** S.117). Für das *spin coating* wurden 1% Lösungen[55] der Polymere Polystyrol, Polyvinylbutyral und Polymethylmethacyrlat in Chloroform verwendet. Die frisch aus dem destillierten Wasser entnommenen Deckgläser wurden bei 12'000 $U \cdot min^{-1}$ mit einigen Tropfen Chloroform gespült. Bei 3000 $U \cdot min^{-1}$ wurden 2 Tropfen der Polymerlösung im Zentrum des rotierenden Deckglases aufgebracht, die Drehzahl auf 12'000 $U \cdot min^{-1}$ erhöht und während zwei Minuten beibehalten. Die so erhaltenen Filme waren zwischen 85 und 120 nm dick.
Zur Bestimmung der Filmdicke wurde ein Profilometer benutzt. Das Kernstück des Gerätes bildet eine kleine Diamantnadel, die über die Oberfläche gezogen wird. Die Diamantnadel wird dabei bei konstanter Auflegekraft vertikal der Oberfläche nachgeführt, wodurch ein Längsprofil der Oberfläche aufgezeichnet werden kann. Durch Beibringen einer Rinne oder einer Stufe im Film besteht die Möglichkeit, den Höhenunterschied zwischen Polymeroberfläche und Deckglas zu messen, d.h. die Dicke des Filmes zu bestimmen. Wichtig für das Aufnehmen von Polymerprofilen ist eine möglichst geringe Auflegekraft, da die vergleichsweise weichen Polymere sonst geritzt werden können, wodurch das Profil verfälscht werden würde. In Abb. 4.2 sind die mit dem Profilometer aufgenommenen Längsprofile zu sehen. Da die Dicke der Polymerfilme gegen den Rand des Deckglases hin rasch abnimmt, wurde die für die Schichtdickenbestimmung nötige Ritzung in der Mitte des Deckglases vorgenommen.

Weitere Möglichkeiten für die Charakterisierungen von Polymerfilmen sind die Ellipsometrie und die IR-Spektroskopie. Die Ellipsometrie dient ebenfalls dazu, die Dicke von Polymerfilmen zu bestimmen. Sie basiert auf dem Unterschied des Brechungsindizes an der Grenzfläche zwischen Polymer und Träger. Für die verwendeten Polymere auf Glas ist dieser Unterschied sehr klein, wodurch das Profilometer besser geeignet war. Die IR-Spektroskopie kann qualitative Informationen über die Schichtdicke und die Struktur der Schicht liefern, konnte aber wegen des IR-undurchlässigen Glases[56] nicht benützt werden.

[55] mit 1‰ Lösungen wurden mit 10 Tropfen nur sehr dünne Filme (< 25 nm) erhalten, die im Profilometer nicht charakterisiert werden konnten
[56] Saphirglas ist bis etwa 1600 cm^{-1} transparent, mit 20% Transmission bei 1800 cm^{-1} und 80% Transmission oberhalb 2300 cm^{-1}. Somit könnten einige charakteristische Banden der Polymere aufgelöst werden, wobei der grosse Untergrund die Möglichkeiten einer Analyse limitiert

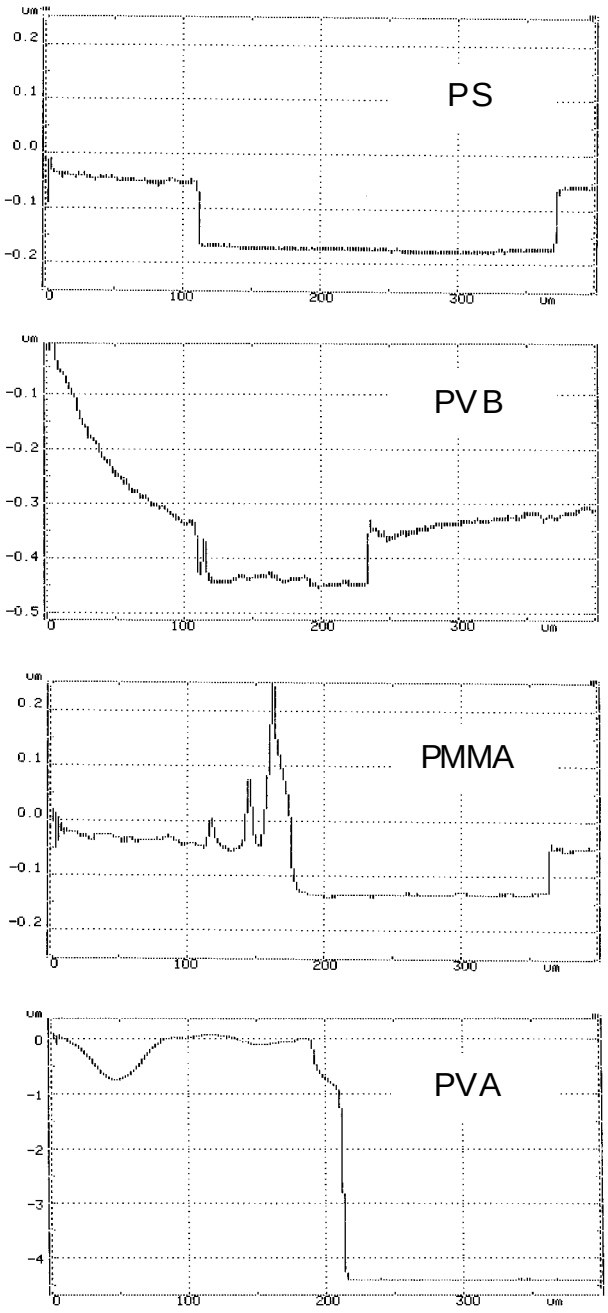


Abb. 4.2 Profile der verwendeten Polymerfilme
Die rechteckigen Vertiefungen sind bis auf das Glas gehende Kratzer, die für die Bestimmung der Schichtdicke angebracht wurden; Aufwerfungen an deren Ränder (siehe PMMA) sind durch das Ritzen bedingt.

Ein Spezialfall für die Präparation und Charakterisierung war Polyvinylalkohol. Industriell wird dieses durch die Hydrolyse von Polyvinylacetat hergestellt, wobei jeweils der Hydrolysegrad spezifiziert wird. Liegt dieser über 99%, so ist Polyvinyl-alkohol wegen seiner kristallinen Struktur praktisch wasserunlöslich. Erst bei

Hydrolysegraden von unter 97% ist er gut wasserlöslich [40], wie an der Schaumbildung der Lösung gut erkennbar ist.
Die Charakterisierung von analog wie oben durch *spin* hergestellten Polyvinylalkoholfilmen gelang mittels den zur Verfügung stehenden Methoden nicht. Auf Glas waren die gebildeten Filme wegen des praktisch identischen Brechungsindizes nicht auszumachen. Die Filme waren zudem sehr hart und hafteten sehr gut auf Glas, so dass dünnere Filme nicht geritzt werden konnten, ohne auch das Glas mitzuritzen. Dickere Filme hingegen lassen sich gut ritzen, wobei sich der Film oft teilweise ablöst. Die Präparation orientierte sich deshalb danach, einen Film mit bestimmbarer Dicke zu erhalten. Ein Tropfen der 1% Polyvinylalkohollösung in Wasser wurde auf ein Deckglas gegeben und am Hausvakuum (erleichtert das Abziehen des Wassers) eintrocknen gelassen. Dies ergab einen kreisförmigen Film von etwa 7 mm Durchmessern und einer Dicke zwischen 2 und 4 μm.

In Abb. 4.3 sind von drei der vier benutzten Polymerfilme mit dem SNOM aufgenommene Topographiebilder gezeigt. Die Rasterbereiche wurden jeweils unweit der Ritzung im Zentrum des Deckglases gewählt, um die Gewissheit einer Polymerbedeckung zu haben. Alle Polymeroberflächen sind hinreichend eben um darauf vorgenommene Oberflächenmodifikationen zu erkennen. In Transmissionsbildern können zusätzliche Details zu sehen sein; die Variation des Kontrastes durch Dichteunterschiede ist allerdings sehr gering. Teilweise waren ringförmige Strukturen auszumachen, die in der Topographie nicht zu sehen waren und vielleicht vom Eintrocknen herrühren.

Als Alternative zu den präparierten Polymerfilmen wurde versucht, kommerziell erhältliche Polymerfolien (pigmentierte und klare Polyethylenfolien) im SNOM zu rastern. Durch die diffuse Reflektion des Scherkraftlasers auf den Folien wurde ein stabiles Rastern extrem erschwert, da sich bei der Annäherung der Spitze die Phase des Rückkopplungssignals änderte und deshalb ein stabile Rückkopplung nicht gegeben war.

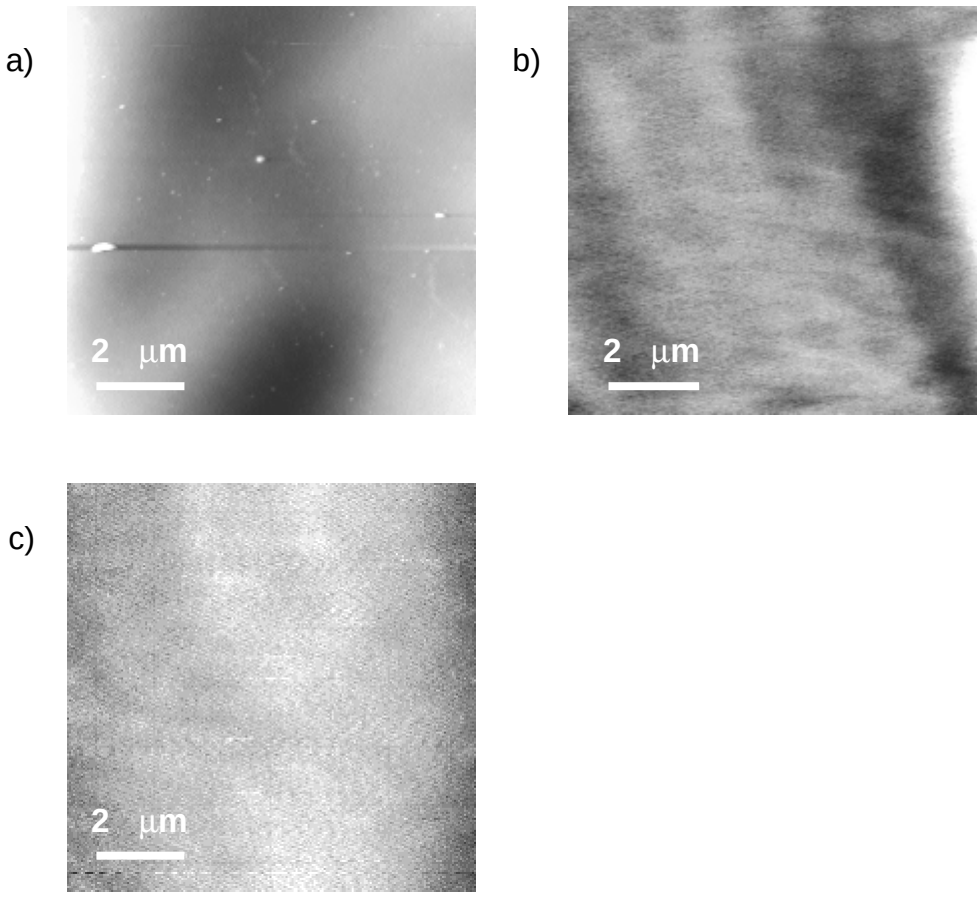


Abb. 4.3 Topographie der für die Modifikationsexperimente verwendeten Polymerfilme, aufgenommen mit einer geätzten Spitze (Kegelwinkel 5°)
a) Polyvinylbutyral (120 nm dick), b) Polystyrol (120 nm dick), c) Polyvinylalkohol (4 μm dick). Der Topographiekontrast erstreckt sich über 35, 30 rsp.14 nm.

4.3 Abschätzung und Messung von Temperatureffekten an den Spitzen

Eine der inhärenten, aber nicht offensichtlichen Begleiterscheinungen des Gebrauchs von metallbedampften Spitzen im SNOM ist deren Erwärmung durch das eingekoppelte Licht. Nur ein kleiner Teil (die Transmissionskoeffizienten liegen im Bereich zwischen 10^{-2} und 10^{-7}) der eingekoppelten Lichtleistung tritt aus der Spitze aus. Sämtliches Licht, das nicht transmittiert wird, wird entweder zurückgestreut oder in der Spitze selbst absorbiert und damit in Wärme umgewandelt. Für viele Anwendungen ist es wichtig, zumindest die Grössenordnung dieser Temperatur zu kennen.
Um ein möglichst gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Fluoreszenz- oder Ramansignale zu erhalten, wird gerne die eingekoppelte Lichtleistung maximiert. Dadurch steigt die Temperatur der Spitze, die Einfluss auf die Messung nehmen kann.

Für die Fluoreszenz z.B. sind die Quantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauer temperaturabhängig und somit auch das aufgenommene Fluoreszenzsignal. Bei Spitzen mit kleiner Transmission wurde zudem während den Rasterungen oft eine Zunahme der Transmission beobachtet, was auf Veränderungen der Metallschicht im Bereich des Apex schliessen lässt. Derartige Effekte, die schlussendlich die Qualität der Spitzen beeinträchtigen, sind durch den mechanischen Kontakt bedingt und dürften bei höherer Temperatur - also bei mehr eingekoppeltem Licht - grösser sein.
Besonders wichtig ist die Temperatur der Spitze auf Proben, die thermoplastisch verformt werden können oder deren Oberflächenbestandteile flüchtig sind. Hier muss die Lichtintensität so gewählt werden, dass eine Veränderung der Oberfläche ausgeschlossen werden kann.

Ein sehr einfaches Verfahren zur Bestimmung eines Temperaturprofils bietet der Einsatz von Wachsen verschiedener Schmelzpunkte. In Abb. 4.4 ist dies schematisch wiedergegeben.

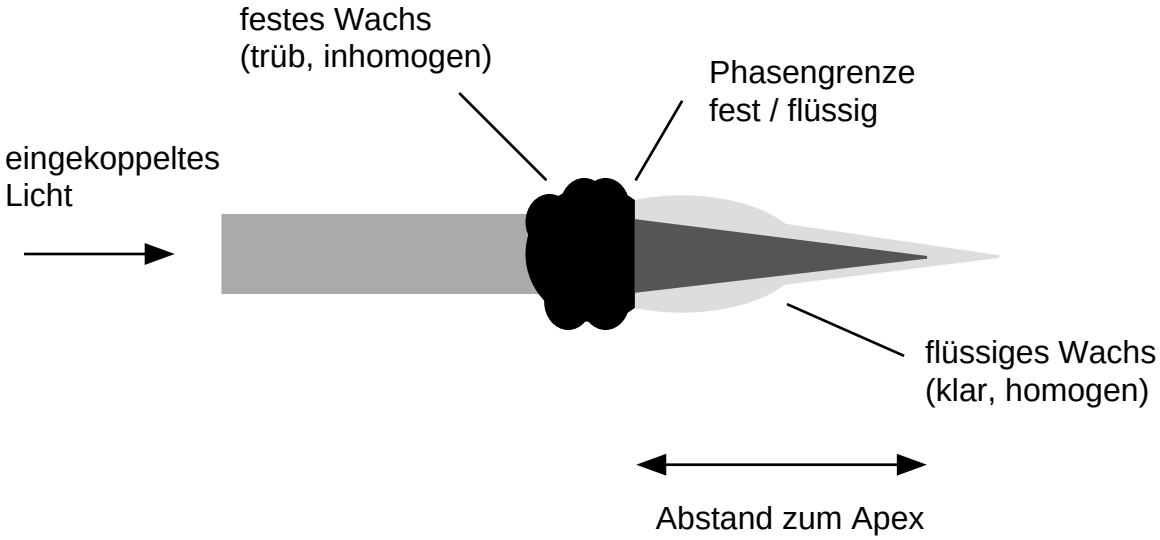


Abb. 4.4 Prinzip der Temperaturmessung mit einem Wachs bekannten Schmelzpunktes
Die Temperatur wird über die gut sichtbare Phasengrenze zwischen festem und flüssigem Wachs bestimmt.

Die Spitze wird vorgängig entweder in das flüssige Wachs getaucht oder ein kleines Korn des festen Wachses an der Spitze geschmolzen. Kopppelt man Lichtleistungen im mW-Bereich in die Spitze ein, so schmilzt das Wachs ausgehend vom Apex bis zu einem Bereich entlang der Spitze, wo sich eine gut sichtbare Phasengrenze zwischen festem und flüssigem Wachs ausbildet. Die sonst gleichmässige Wachsschicht auf der Spitze schnürt sich an dieser Stelle ein, auf der kälteren Seite ist das erstarrte Wachs trüb, während es auf der wärmeren Seite klar und homogen bleibt. Verändert man die Lichtleistung, so lässt sich die Phasengrenze reversibel - je nachdem, ob weniger oder mehr Leistung eingekoppelt wird - zum Apex hin oder wegbewegen. Somit kann man auf einfache Weise mit einer Serie von Wachsen verschiedener Schmelzpunkte ein Temperaturprofil entlang der Spitze aufnehmen. Dies wurde für eine geätzte Spitze (aluminiumbeschichtete Multi-mode Glasfaser) mit einem Kegelwinkel von 23°

und kleiner Transmission von $6 \cdot 10^{-4}$ getan (vgl. **Daten zum Temperaturprofil der Spitze** S.122). Abb. 4.5 zeigt die Position der Phasengrenze entlang der Spitze in Abhängigkeit der eingekoppelten Lichtleistung.

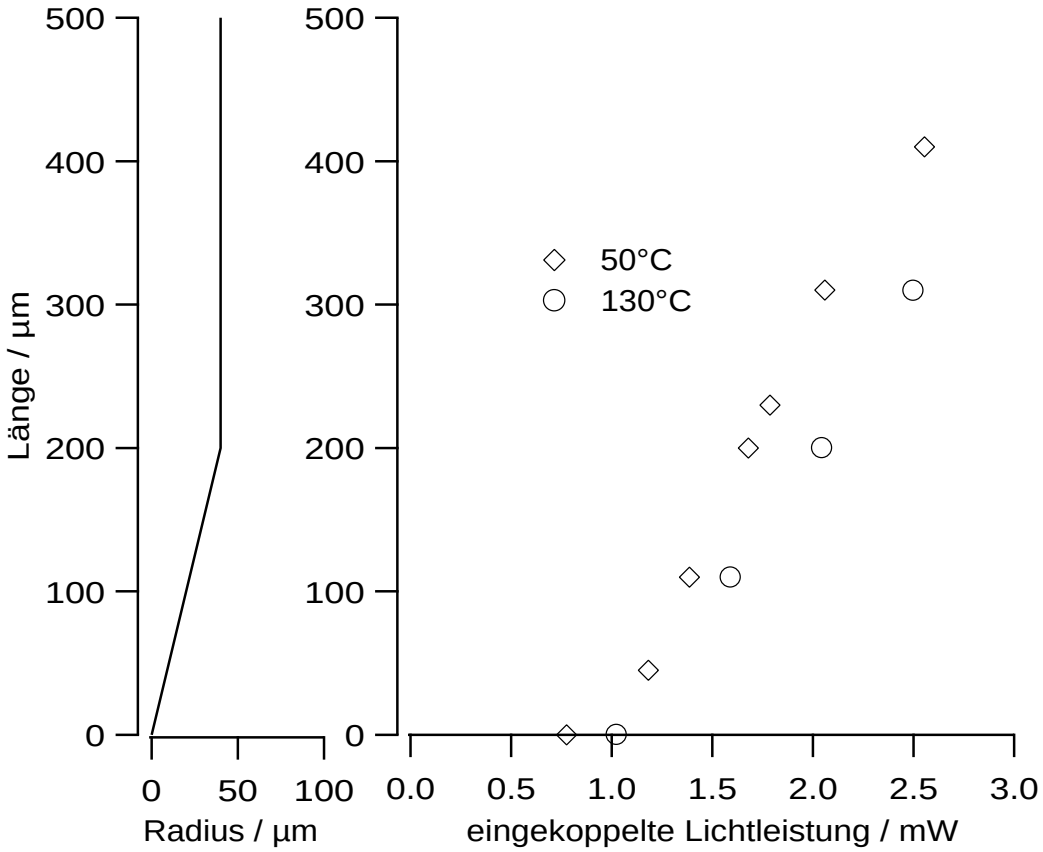


Abb. 4.5 Abhängigkeit zwischen Temperatur und eingekoppelter Lichtleistung für eine geätzte Spitze mit einem Kegelwinkel von 22° und einer Transmission von 0.06%
Die Temperaturen wurden nach der in Abb. 4.4 gezeigten Methode bestimmt.

Für die Messung wurden nur die bei 50°C und 130°C schmelzenden Wachse (Signotherm von Merck) benützt; da der Unterschied in der benötigten Lichtleistung für diese beiden Temperaturen gering war, wurde auf die Anwendung der weiteren zur Verfügung stehenden Temperaturindikatoren (in 10°C-Schritten von 40° bis 130°C) verzichtet. Die Messung zeigte klar, dass bei eingekoppelten Lichtleistungen von 0.7 mW die Temperatur am Apex bereits 50°C, für 1 mW bereits 130°C betrug.
Wurde das eingekoppelte Licht unterbrochen, so erstarrte das 50°C-Wachs am Apex augenblicklich; nach der Wiedereinkopplung vergingen aber etwa 10 s, bis das Wachs am Apex wieder schmolz. Während der Messung wurde beobachtet, dass bei maximaler Lichtleistung (2.5 mW) ein kleiner Luftzug genügte, um das 50°C-Wachs auf der Spitze zum Erstarren zu bringen.

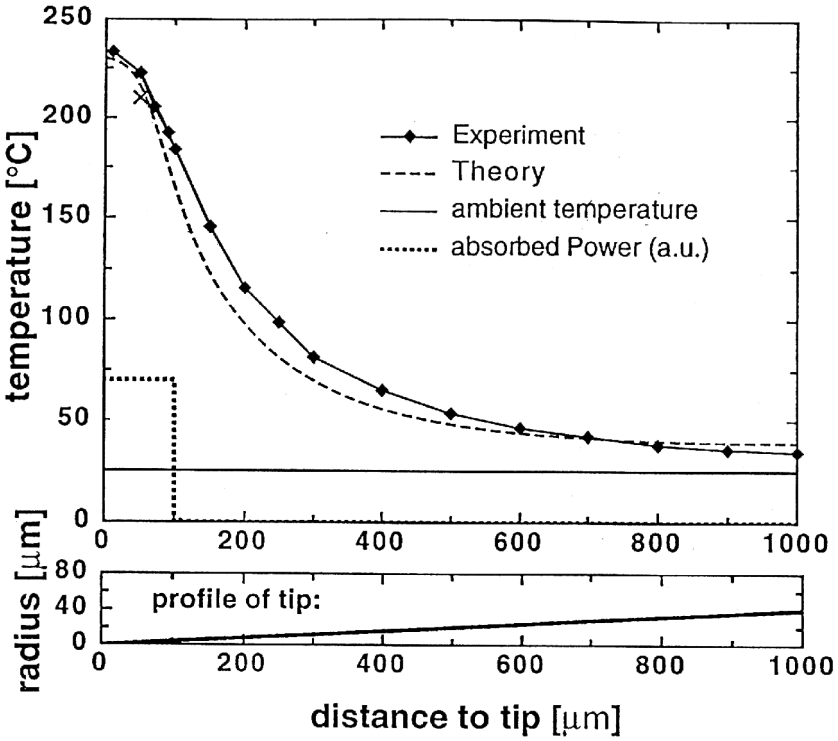


Abb. 4.6 Temperaturmessung (ausgezogene Linie) und Berechnung (gestrichelte Linie) entlang einer Spitze (Profil der Spitze unten) für 3.3 mW eingekoppelte Lichtleistung nach *Stähelin et al.*[9]
Die Temperatur wurde thermochemisch mit einer Chromel™-Mikrospitze gemessen; der mit X bezeichnete Punkt gibt eine Messung mit einem thermochromischen Wachs an. Für die Berechnung des Temperaturprofils wurde ein rechteckiges Erwärmungsprofil angenommen (gepunktete Linie) an der Stelle, wo die Spitze nur noch durch den Kern gebildet wird.

Das gleiche Experiment wurde auch mit einer geätzten Spitze mit einem kleinen Kegelwinkel (5°) durchgeführt. Die Methode stiess hier allerdings an ihre Grenzen. Es wurde beobachtet, dass weniger als 0.6 mW nötig waren, um die Apexregion auf 50°C zu erwärmen. Spitzen mit kleinen Kegelwinkeln erwärmen sich also stärker am Apex als solche mit grossen Kegelwinkeln. Das Problem war, überhaupt genügend Wachs auf die Spitze zu bringen, um den Phasenübergang beobachten zu können; bei Wachsen höherer Schmelzpunkte und Spitzen mit kleineren Kegelwinkeln wird dies immer schwieriger. Inwieweit das Wachs auf der Spitze die Temperaturverteilung stört, ist unklar; die benützte Menge Wachs muss aber gering sein im Vergleich mit dem Volumen der Spitze.

Stähelin et al. haben das Temperaturprofil für eine gezogene Spitze bei 3.3 mW eingekoppelter Lichtleistung thermochemisch gemessen [9]. Ihr gemessenes (und berechnetes) Temperaturprofil ist in Abb. 4.6 gezeigt. Aus der Graphik lässt sich der Kegelwinkel zu 5° berechnen, die Dicke der Aluminiumschicht beträgt nach ihren Angaben 65 nm, also etwa zwei Drittel der hier benützten. Qualitativ entsprechen sich

die beiden Profile. *Stähelin et al.* finden 25 µm vom Apex entfernt einen linearen Zusammenhang zwischen eingekoppelter Lichtleistung und Temperatur mit einem Temperaturkoeffizienten von 60 K/mW in der gezeigten Messung. Für einen nicht genau bestimmten "grösseren"[57] Kegelwinkel fanden sie an der gleichen Stelle einen Temperaturkoeffizienten von 20 K/mW.
Interpoliert man bei der durchgeführten Messung die Daten für den 25 µm Abstand vom Apex, so erhält man für den Bereich von 20°C (Raumtemperatur) bis 50°C einen Temperaturkoeffizienten von 25 - 30 K/mW; für den Bereich von 50°C bis 130°C erhielte man allerdings 300 - 400 K/mW. Somit ist das Ansteigen der Temperatur der geätzten Spitze nicht linear zur eingekoppelten Lichtleistung. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass an dieser Stelle die geätzte Spitze einen gut 25mal so grossen Querschnitt wie die gezogene Spitze hat und somit nicht direkt verglichen werden können.

Extrapoliert man die vorgenommene Messung linear auf 3.3 mW eingekoppelte Lichtleistung, so läge die Temperatur in einer Entfernung von 550 µm vom Apex bei 50°C rsp. bei 130°C in einer Entfernung von 450 µm. Bei der Messung von *Stähelin et al.* beträgt die Temperatur in einer Entfernung von 600 µm vom Apex 50°C, aber nur 130°C bei 180 µm Entfernung.
Wahrscheinlich ist der Unterschied vor allem auf den wesentlich grösseren Kegelwinkel der von uns vermessenen Spitze zurückzuführen, bei der pro Querschnitt mehr schlecht wärmeleitendes Glas und weniger gut wärmeleitendes Aluminium vorhanden ist[58]. Durch die schlechtere Wärmeabführung wird also ein steilerer Temperaturgradient entlang der Spitze[59] erwartet, was auch gefunden wird.

Stähelin et al. haben für ihre Spitze mit dem 5°-Kegelwinkel bei einer eingekoppelten Lichtleistung von 9.5 mW 70 µm vom Apex entfernt Temperaturen bis zu 470°C (Zerstörungsschwelle) gemessen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Spitzen sind für grössere eingekoppelte Lichtleistungen auch wesentlich grössere Temperaturen zu erwarten als die 130°C bei 1 mW.

4.4 Gezielte Modifikation der Filme

Die Erwärmung der Spitze durch die Lichteinkopplung kann dazu benutzt werden, gezielt thermolabile oder thermoplastische Oberflächen mit dem SNOM zu verändern. Die Spitze kann dabei sowohl zur Modifikation der Oberfläche als auch zur anschliessenden Visualisierung der Oberflächenveränderungen eingesetzt werden. Die Temperaturmessung an der Spitze hat gezeigt, dass die Erwärmung der Spitze mit einem kontinuierlich arbeitenden Laser innerhalb von einigen 10 s stattfindet. Dies ist sehr langsam verglichen mit den im SNOM üblichen Rastergeschwindigkeiten von 1 bis 20 µm/s und ergibt eine schwierig zu kontrollierende Zeitabhängigkeit. Geeigneter sind gepulste Laser, die zu einer schnellen und reproduzierbaren Erwärmung der Spitze führen. Bei kurzen Pulsen können auch Energien eingekoppelt werden, die bei einem kontinuierlichen Betrieb zu einer starken Erhitzung und damit zu einer Zerstörung der Spitze führen würden.
Als gepulster Laser wurde ein MOPO-730 D20 von Spectra-Physics benützt, vgl. **Schema des MOPO (Master Oscillator / Power Oscillator)** S.86. Dies ist eine gepulste Laserquelle, die über einen weiten Wellenlängenbereich (200 bis 2000 nm)

[57] "...*measurements on tips with considerably larger cone angle*..."
[58] die Wärmeleitfähigkeit von Aluminium ist 275 mal grösser als jene von Glas (nach [9])
[59] hierbei muss berücksichtigt werden, dass der überwiegende Teil des Konus der gezogenen Spitze dem Schaft der geätzten Spitze entspricht

abgestimmt werden kann. Das benutzte System lieferte Pulse von 5 bis 10 ns Länge bei einer Wiederholrate von 20 Hz. Zur Einkopplung wurde ein 10fach Mikroskop-objektiv verwendet, welches den Laserstrahl auf eine Multi-mode Glasfaser fokussierte. Die Multi-mode Glasfasern wurden wegen ihres grösseren Kernes benützt, bei dem die Lichteinkopplung leichter zu optimieren ist. Die dabei auftretenden Energiedichten sind kleiner und verringern so die Wahrscheinlichkeit der Zerstörung der Glasfaser. Um eine effiziente Einkopplung beim Spleissen zu gewährleisten, wurden die Spitzen entsprechend auch aus Multi-mode Glasfasern hergestellt.

Typischerweise wurden in die Spitzen Pulsenergien von 1 bis 20 µJ eingekoppelt. Benutzt wurden geätzte Spitzen mit einem Kegelwinkel von 5° und 25°, teils aluminium- rsp. goldbeschichtet, teils aus Single-mode rsp. Multi-mode Glasfasern. Die Spitzen waren jeweils vollständig mit Metall bedeckt, d.h. die Transmissions-koeffizienten waren stets kleiner als 10^{-4}. Die Zerstörungsschwellen der Spitzen mit dem kleinen Kegelwinkel lagen bei einigen µJ, die mit dem grossen Kegelwinkel bei etwa 20 µJ. Es wurden verschiedene Wellenlängen aus dem MOPO (380, 410, 450, 480 und 534 nm) benützt mit verschiedenen Pulsenergien. Gearbeitet wurde mit den oben charakterisierten Polymerfilmen aus Polystrol (PS), Polyvinylbutryal (PVB), Polyvinylalkohol (PVA) und Polymethylmethacrylat (PMMA), v.a. aber mit PS und PVB, da hier die grössten Effekte erwartet wurden[60].

Aufgrund der Möglichkeiten der benutzten Version des Aurora-SNOM wurde die Lichteinkopplung mit und ohne Rastern vorgenommen, jedoch immer mit der Spitze im Rückkopplungsmodus. Eine Modifikation mit einer ruhenden Spitze an einer Polystyroloberfläche ist in Abb. 4.7 gezeigt (vgl. **Daten zur Polystyrolmodifikation** S.118).

[60] vgl. in Tab. 4.1 S.56 Wärmeleitfähigkeit und spez. Wärmekapazität

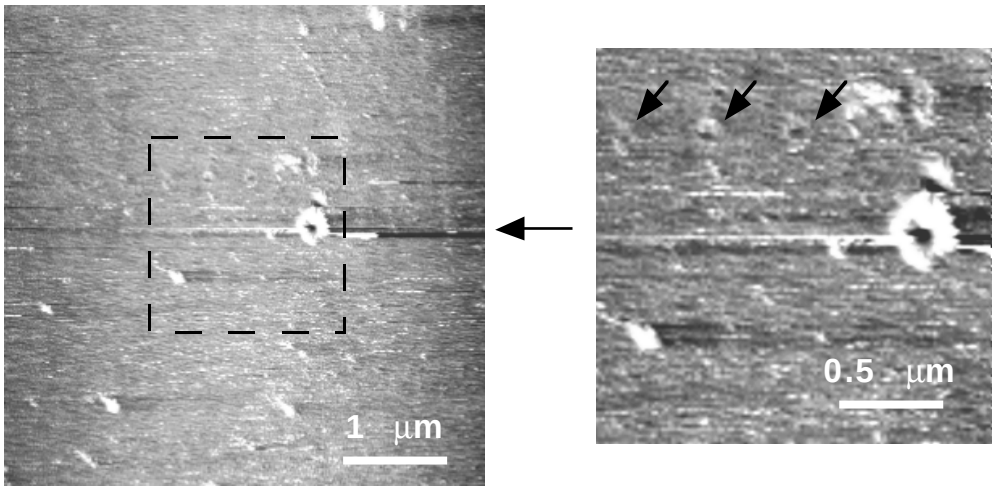


Abb. 4.7 Modifikationen an einem etwa ~120 nm dicken Polystryolfilm mit einer geätzten Spitze (5° Kegelwinkel, goldbeschichtet)
Das gestrichelte Quadrat markiert die Ausschnittsvergrösserung (rechts), der Pfeil das in Abb. 4.8 gezeigte Linienprofil. Der Krater entstand durch Lichteinkopplung während 10 s (410 nm vom MOPO, 20 Hz Pulsrate), in denen sich die Spitze in Ruhe befand; die anschliessende Rasterung erfolgte mit der gleichen Spitze. Die drei Pfeile in dem Ausschnitt bezeichnen eine während der vorangegangenen Rasterung mit 10 μm/s geschaffene Kraterreihe. Der Topographiekontrast erstreckt sich über 18 nm rsp. 14 nm für die Vergrösserung.

In die geätzte Spitze mit einem Kegelwinkel von 5° war während 10 s Licht vom MOPO mit Pulsenergien von < 1 μJ eingekoppelt worden; die Spitze wurde dabei bis auf einige Nanometer der Oberfläche genähert. Der so gebildete Krater ist gut auf dem Bild erkennbar.
Die Spitze wurde hierbei nicht beschädigt. Dies zeigen die vorangegangenen und nachfolgenden Rasterungen an anderen Stellen, bei denen während des Rasterns Licht eingekoppelt worden war. Eine solche Reihe von kleinen Kratern ist in der Ausschnittsvergrösserung (durch drei Pfeile markiert) dargestellt; der Abstand zwischen den Kratern beträgt etwa 0.5 μm, was man auch für eine Rastergeschwindigkeit von 10 μm/s und eine Laserrepetitionsrate von 20 Hz erwartet. An einer anderen Stelle wurden in gleicher Weise regelmässig separierte Aufhäufungen von einigen Nanometern Höhe geschaffen. Offenbar hat die Spitze ihre Fähigkeit zur Oberflächenmodifikation beibehalten, was an den geringen eingekoppelten Energien gelegen haben dürfte.
Unter gleichen Bedingungen der Lichteinkopplung[61] war vorher auf dem gleichen Film versucht worden, Oberflächenmodifikationen mit einer Spitze mit einem Kegelwinkel von 25° zu erzielen, was jedoch nicht gelang. Dies wird in erster Linie an den unterschiedlichen Erwärmungscharakteristika der Spitzen gelegen haben, wie sie bei der Temperaturmessung festgestellt worden waren. Bei gleicher eingekoppelter

[61] diese waren durch die die Instabilität des MOPO und geänderte Parameter sonst selten gegeben

Energie weisen die Spitzen mit grossem Kegelwinkel offenbar eine kleinere Temperatur am Apex auf.

In Abb. 4.8 ist das Linienprofil durch den geschaffenen Krater gezeigt. Der Krater erstreckt sich über 350 nm mit einem Innendurchmesser von 120 nm. Es muss beachtet werden, dass die Spitze Löcher, die kleiner als die Spitze selbst sind, nicht abbilden kann; das geschaffene Loch kann deshalb einiges tiefer als 15 nm sein.

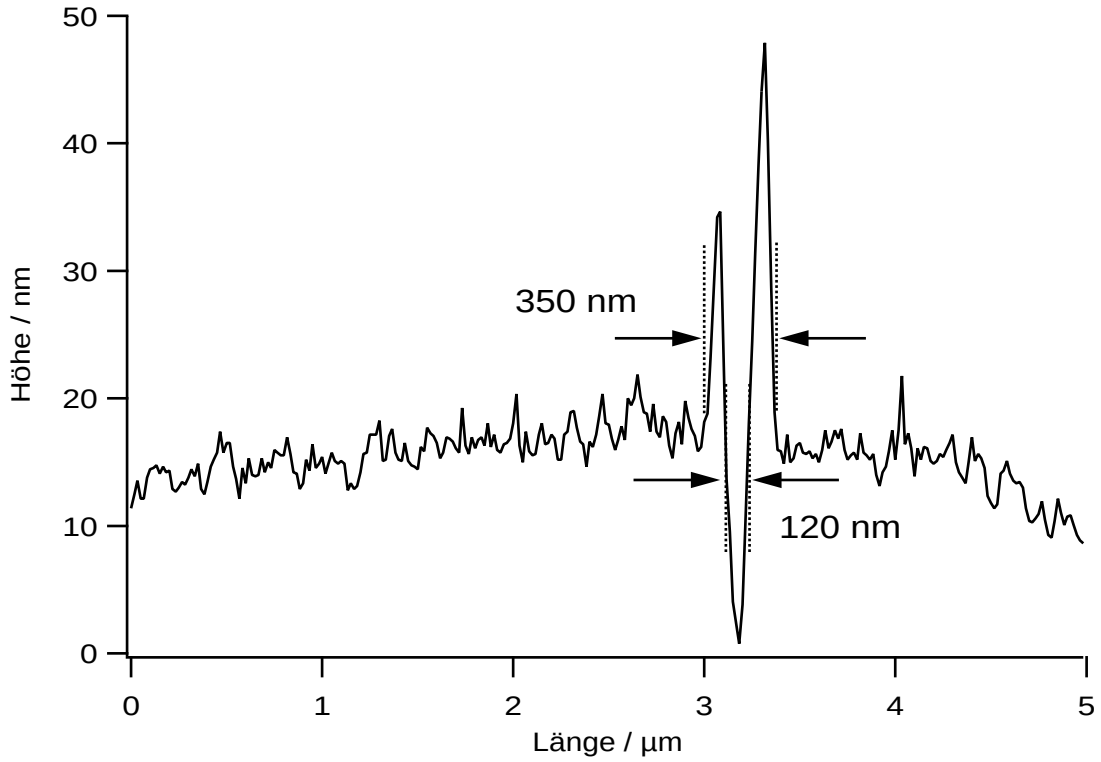


Abb. 4.8 Linienprofil durch den im Polystyrolfilm (vgl. Abb. 4.7) thermisch geschaffenen Krater

In einem anderen Experiment wurde ein Polyvinylbutyralfilm während des Rasterns modifiziert (vgl. **Daten zur Polyvinylbutyralmodifikation** S.119). Das Resultat ist in Abb. 4.9 dargestellt. Zur Modifikation wurde eine geätzte Spitze mit einem Kegelwinkel von 25° benützt, in die Energien von einigen µJ pro Puls eingekoppelt worden waren. Gut erkennbar sind die dadurch in regelmässigen Abständen entstandenen Krater entlang der Rasterlinien. Wichtig ist dabei eine gute Kontrolle der Lichteinkopplung. Wird über mehr als eine Linie (in Hin- oder Rückrichtung) Licht eingekoppelt, so überlappen sich die geschaffenen Strukturen mehrerer Durchgänge und sind schwieriger interpretierbar. Dies lässt sich bei den obersten beiden Reihen gut sehen, in denen sich viele Krater überlagern. Die weiteren Reihen, bei denen nur in der Hinrasterrichtung Licht eingekoppelt wurde, zeigen einzelne, gut aufgelöste Krater.

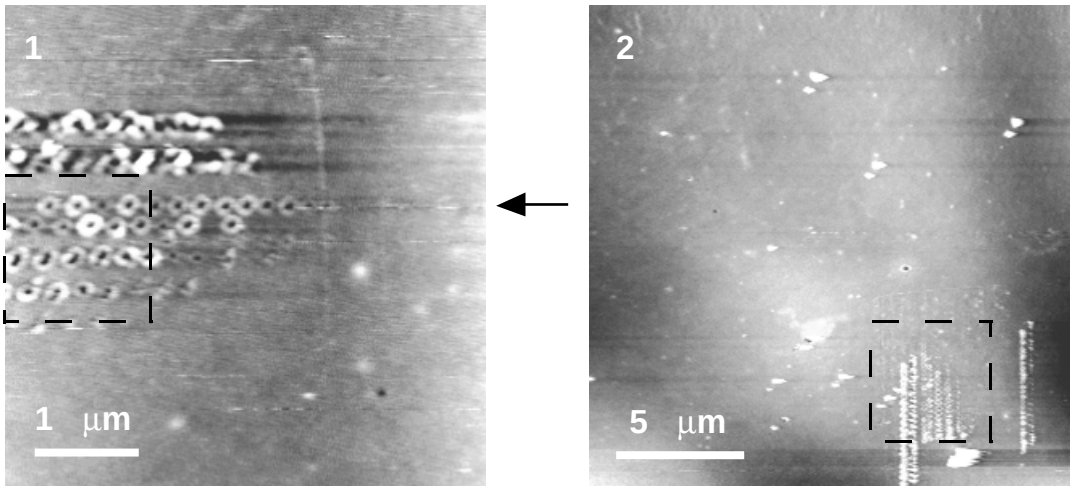


Abb. 4.9 Modifikationen an einem etwa 120 nm dicken Polyvinylbutyralfilm mit einer geätzten Spitze (25° Kegelwinkel, aluminiumbeschichtet)
1) Die Kraterreihen entstanden durch Lichteinkopplung (480 nm vom MOPO, 20 Hz Pulsrate) während des Rasterns mit 5 µm/s, das Bild zeigt die 5x5 µm-Rasterung danach (Topographiekontrast über 10 nm). Das gestrichelte Quadrat markiert den Ausschnitt für die in Abb. 4.10 gezeigte dreidimensionale Darstellung; der Pfeil gibt das Linienprofil in Abb. 4.11 an. Die beiden obersten Reihen entstanden durch Lichteinkopplung über je zwei Linien hinweg.
2) 20x20 µm-Rasterung danach (Topographiekontrast über 15 nm) mit um 90° gedrehter Rasterrichtung. Das gestrichelte Quadrat markiert den ursprünglichen 5x5 µm-Ausschnitt.

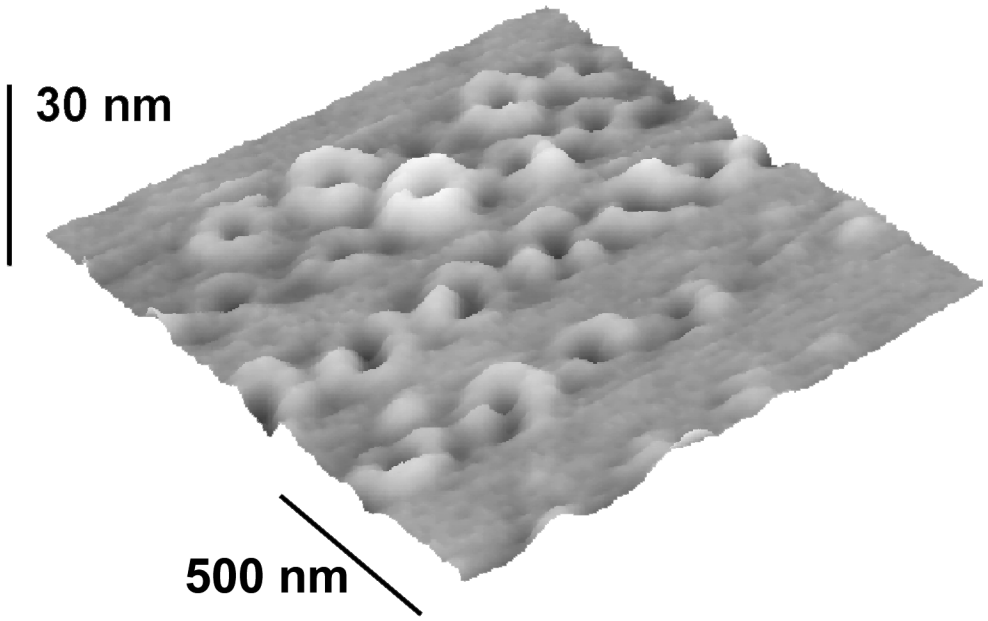


Abb. 4.10 Ausschnittsvergrösserung der in Abb. 4.9 gezeigten Kraterreihen

Eine Vergrösserung dieser Krater in dreidimensionaler Darstellung ist in Abb. 4.10 gezeigt.

Wie es das Linienprofil durch eine Kraterreihe in Abb. 4.11 zeigt, handelt es sich bei den Kratern um Löcher mit kleinen Aufwerfungen an deren Rändern. Die Löcher haben eine Halbwertsbreite von ~70 nm und eine Tiefe von etwa 5 nm. Auch hier gilt, dass die Löcher - besonders bei einer kleinen Halbwertsbreite - von der Spitze nicht erfasst werden können; die Löcher können also wesentlich tiefer sein als in der Topographie dargestellt. Der Abstand der Krater sinkt innerhalb einer Reihe monoton von etwa 300 auf 220 nm. Aus der Rastergeschwindigkeit von 5 µm/s würde man einen Abstand von 250 nm erwarten, also leicht grösser als der gefundene mittlere Abstand von 235 nm. Ein Vergleich mit den anderen Kraterreihen in Abb. 4.11 zeigt, dass auch dort die Abstände innerhalb einer Reihe abnehmen. Dies könnte an der Arbeitsweise der Rastervorrichtung liegen. Der in Abb. 4.11 dargestellte 5x5 µm-Abschnitt ist bezüglich des Abschnitts, der zur Schaffung der Strukturen verwendet wurde, nach rechts verschoben. Somit wird im Linienprofil auch der ursprüngliche Ueberhangbereich erfasst, der von der benutzten Version des Aurora-SNOM zwar gerastert, aber nicht aufgezeichnet wird. In diesem Bereich findet der Richtungswechsel des Rasterns statt, der offenbar von einer graduellen Abnahme der Rastergeschwindigkeit begleitet ist.

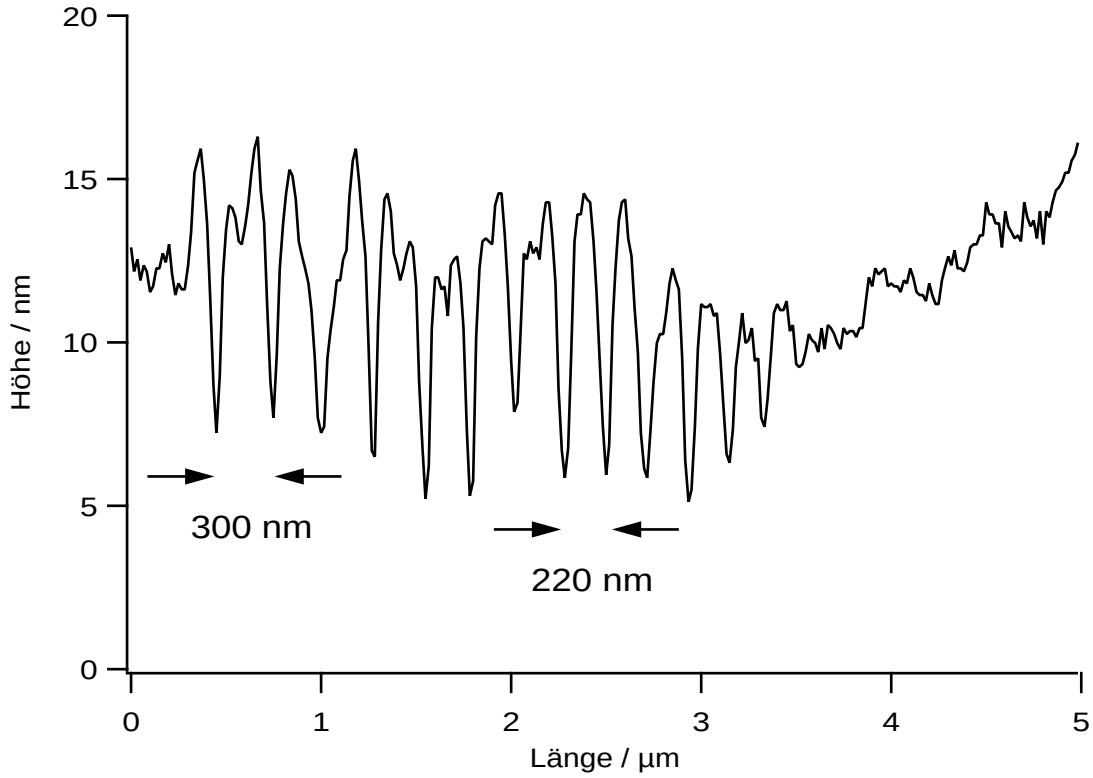


Abb. 4.11 Linienprofil durch die im Polyvinylbutyralfilm (vgl. Abb. 4.9) geschaffene Kraterreihe
Der durchschnittliche Abstand der Krater beträgt 235 nm, wobei die Krater gegen Ende der Linie hin kleiner werden. Die Halbwertsbreite der geschaffenen Löcher beträgt 73 ± 15 nm.

Zum Verständnis der Arbeitsweise der Rastervorrichtung können andere Interpretationsprobleme hinzukommen. Das Konzept sieht vor, dass die Modifikation *und* deren Visualisierung mit der gleichen Spitze vorgenommen werden. Die Lichteinkopplung kann aber nicht nur die Polymeroberfläche, sondern auch die Spitze selbst verändern. In Abb. 4.12 ist dies anhand eines Beispiels gezeigt.

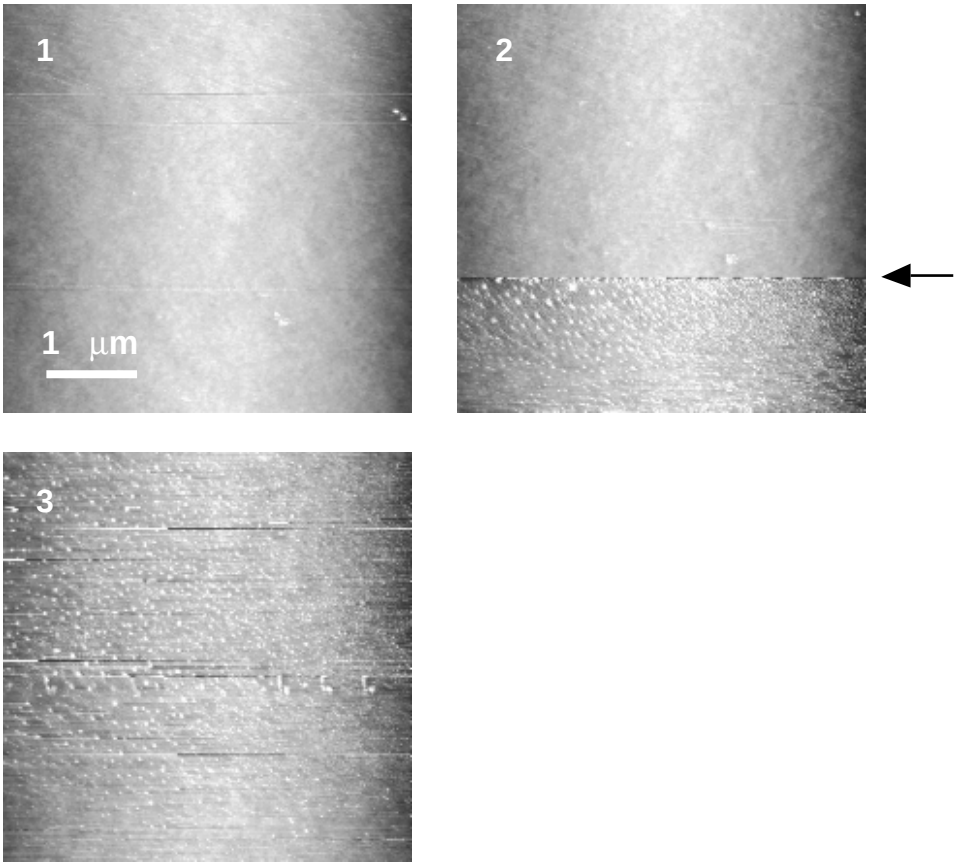


Abb. 4.12 Interpretationsprobleme bei Oberflächenmodifikationen mit dem SNOM
1) gibt die Rasterung vor, 2) die Rasterung während und 3) die Rasterung nach dem Einkoppeln von Licht in eine geätzte Spitze (5° Kegelwinkel, aluminiumbeschichtet); der Pfeil in 2) markiert den Ort der kurzfristigen Einkopplung. Der Topographiekontrast aller Bilder erstreckt sich über 17 nm.

Unmittelbar nach der Lichteinkopplung ändert sich die Topographie abrupt. Auf der vorher glatten Oberfläche erscheinen zahlreiche kleine Partikel in der Grössenordnung von einigen 10 nm; in unmittelbarer Nähe zum Ort der Lichteinkopplung scheinen sie grösser. Wegen der zum Teil sehr grossen Entfernung kann ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Modifikation der Oberfläche als eine direkte Folge der Lichteinkopplung handelt. Aus diesem Grund lässt sich dies nur mit einer Veränderung der Spitze erklären.
Eine Möglichkeit hierfür ist eine Formänderung des Apex und einer daraus resultierenden unterschiedlichen Abbildung durch die Spitze. Abgebrochene Spitzen

liefern über eine Kante am Apex oft eine viel besser aufgelöste Topographie als Spitzen mit einer glatten Metallschicht am Apex. Die Partikel auf der Oberfläche wären somit schon vor der Lichteinkopplung vorhanden gewesen, konnten von der Spitze aber nicht aufgelöst werden. Mit anderen Spitzen wurde auf demselben Film nie eine derartige Oberfläche gesehen. Diese zwei Beobachtungen schliessen sich jedoch nicht aus, da neue Spitzen immer eine sehr glatte Struktur am Apex aufweisen.
Die andere mögliche Erklärung ist die, dass es sich bei den Partikeln um Teile der Metallbedeckung der Spitze handelt. Die Aluminiumschicht und das Glas der Spitze haben verschiedene Wärmeausdehnungskoeffizienten; eine plötzliche Erwärmung kann dazu führen, dass die Metallschicht abgesprengt wird. Die eingekoppelte Lichtleistung war offenbar nahe der Zerstörungsschwelle der Spitze. Etliche Male wurden durch kurze Lichteinkopplung die Spitzen zerstört; teilweise wurden dabei die vordersten 100 μm der Spitze einfach “weggesprengt”.

Bei keinem der Versuche konnte eine Abhängigkeit der beobachteten Effekte von der Wellenlänge des eingekoppelten Lichtes gefunden werden; dieser hing stets nur von der eingekoppelten Energie ab. Bei Spitzen mit grossen Transmissionskoeffizienten oder grossen geometrischen Abweichungen von der Kegelform wurden nie Effekte auf die Polymere beobachtet. In die Spitzen mit grösseren Kegelwinkeln kann mehr Energie eingekoppelt werden, es ist aber unklar, ob sie auch grössere Effekte zeigen.
Oberflächenmodifikationen wurden auf Polystyrol und Polyvinylbutyral beobachtet, nicht jedoch auf Polyvinylalkohol oder Polymethylmethacrylat. Hierbei muss bemerkt werden, dass mit den beiden letztgenannten Polymeren wesentlich weniger Experimente unternommen wurden; es darf deshalb nicht daraus geschlossen werden, dass PVA und PMMA nicht modifiziert werden können.

Interessant ist die Frage nach dem Mechanismus der Oberflächenmodifikationen. Prinzipiell könnte diese thermisch, thermomechanisch oder photochemisch erfolgen. Ziemlich unwahrscheinlich ist eine Veränderung als direkte Wechselwirkung der Polymere mit dem Licht. Die Effekte nahmen mit grösseren Transmissionskoeffizienten ab und nicht zu, wie man es erwarten würde. Entsprechend müssten auch die Effekte mit dem energiereicheren UV-Licht grösser sein als mit sichtbarem Licht, was ebenfalls nicht beobachtet wurde. Ausserdem absorbieren die verwendeten Polymere oberhalb der tiefsten verwendeten Wellenlänge gar nicht.

Ueber das Verhalten einer Spitze bei einem eingekoppelten Lichtpuls ist wenig bekannt. Es ist zu erwarten, dass die entstehende Wärme durch Kontakt, Strahlung und Konvektion an die Umgebung und teilweise an das Polymer abgeführt wird. Dies ist ein plausibler Mechanismus und könnte die Krater als Aufschmelzungen von Material erklären. Polystyrol etwa schmilzt bei 240°C, ist aber schon bei etwa 160°C verformbar. Ein Vergleich der Krater sowohl im PS wie auch im PVB zeigt, dass das Volumen der Aufwerfung um das Loch etwa dem Volumen des Loches entspricht.

Der eingekoppelte Lichtpuls führt zu einem Temperatursprung und damit zu einer Ausdehnung der Spitze im Nanosekundenbereich. Diese Ausdehnung dürfte grössenordnungsmässig 10 nm betragen und wird teilweise von der Abstandsregelung aufgefangen. Dies könnte eine Erklärung sein für die in Rasterrichtung abnehmende Tiefe der in Abb. 4.11 im Linienprofil gezeigten Löcher[62]. Falls die Krater durch ein schnelles Hineinstossen der Spitze in das Polymer infolge der Ausdehnung der Spitze entstehen, so müsste diese Ausdehnung mit zunehmender Wärmeakkumulation in der Spitze abnehmen, da die Temperaturdifferenz mit der zuneh-

[62] innerhalb der anderen Kraterreihen in Abb. 4.9 zeigt sich die Abnahme der Kratertiefe ebenfalls

menden Anzahl Pulsen abnimmt. Wäre dies nur ein thermischer Effekt als Folge jeden Lichtpulses, so würde man ein abruptes Ende der Lochreihe erwarten, da der zur Unterbrechung der Einkopplung verwendete Verschluss in einem Bruchteil der 50 ms (1/20 s) schliessen konnte.

Zeisel et al. konnten mit einem ähnlichen Experiment Anthracen von Kristallen desorbieren [11]. Bei Anthracen handelt es sich allerdings um ein Molekül mit einer Molmasse von 178, während die verwendeten Polymeren Makromoleküle mit Molmassen von 50'000 bis 300'000 sind. *Israelachvili* beschreibt in *Intramolecular & Surface Forces* [43], dass die van-der-Waals-Kräfte von langkettigen Alkanen, Estern, Carbonsäuren u.ä. für die CH_2-Glieder additiv sind. Theoretisch findet er einen Beitrag von 6.9 $kJmol^{-1}$ pro CH_2-Glied und experimentell einen von 6 bis 7.5 $kJmol^{-1}$. Dies mag eine untere Grenze für die Abschätzung der Desorptionsenergie liefern.
Reduziert man das verwendete Polystyrol mit der Molmasse 300'000 (ca. 2900 monomere Einheiten) auf sein Polyethylenrückgrat und nimmt man an, dass die Desorption nur durch Ueberwindung der van-der-Waals-Kräfte erfolgt, so erhält man einen Wert von 20 $MJmol^{-1}$. Diese untere Grenze liegt jedoch schon in solchen Grössenordnungen[63], dass Desorption des ganzen Moleküls auszuschliessen ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Abtragung des Polymers ist ein thermischer Abbau. *Gansepohl und Gellert* beschreiben dies für Polystyrol im Detail [38]. Die im folgenden genannten Abbaumechanismen gelten für Polystyrol im Vakuum oder unter Inertgas. Bis 250°C erfolgt ein moderater Molmassenabbau, jedoch entstehen dabei keine flüchtigen Produkte. Im Bereich zwischen 250° und 300°C setzt der statistische Kettenbruch ein, der bevorzugt bei den *weak links*[64] stattfindet. Oberhalb von 300°C nimmt dann der Abbau zu flüchtigen Produkten drastisch zu. Ein effizienter Mechanismus hierfür ist eine Depolymerisationsreaktion ("Unzipping-Mechanismus"). Ab 500°C schliesslich werden auch Abbauprodukte gebildet, die kleiner als die Monomere sind.
In Abb. 4.13 ist eine Thermogravimetriemessung aus [32] abgebildet, die die Zersetzung von Polystyrol im Vakuum zu flüchtigen Produkten zeigt.

[63] die Sublimationsenergie von Anthracen beträgt 52.5 $kJmol^{-1}$; eine C-C-Bindungsenergie liegt in der Grössenordnung von 300 $kJmol^{-1}$

[64] diese sind Einbaufehler (Kopf-Kopf-Verknüpfungen), einpolymerisierte Verunreinigungen (v.a. Sauerstoff, der zu Peroxidstrukturen führt) und thermolabile Endgruppen (z.B. Starterreste)

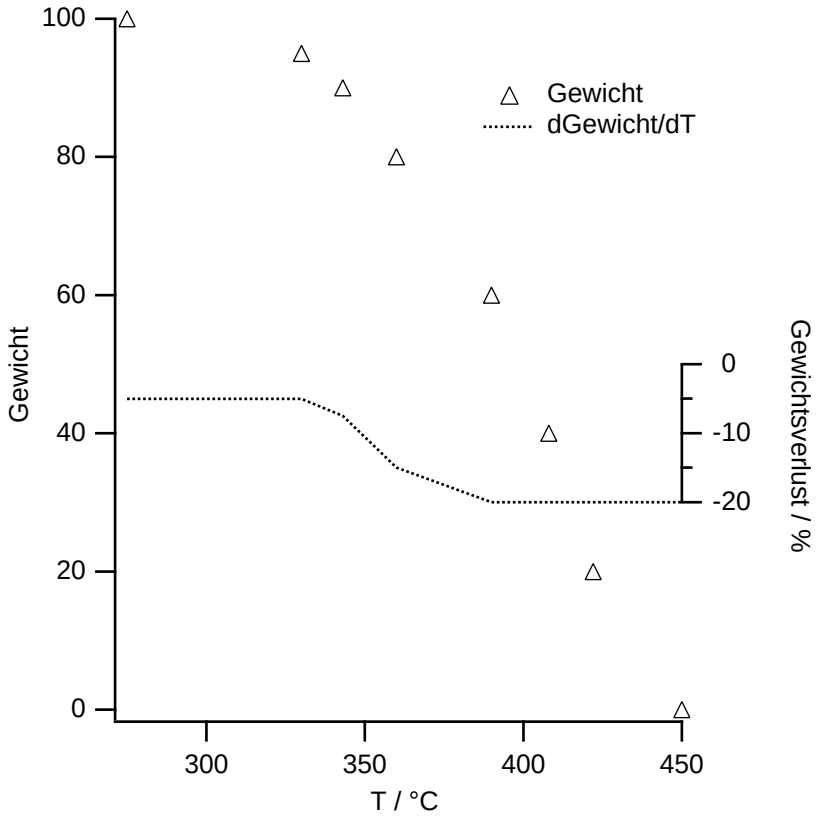


Abb. 4.13 Thermogravimetrische Analyse von Polystyrol[65] im Vakuum aus [32]
Die Aufheizrate betrug 10°C/min.

Ein Depolymerisationsreaktion ist in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre aber nicht möglich, da die radikalischen Zwischenstufen von Sauerstoff abgefangen werden [36]. Es existieren weitere, jedoch langsamere Abbaumechanismen, die hier nicht erörtert werden. Ein thermischer Abbau des Polystyrols kann allerdings nur als Erklärung der im SNOM beobachteten Modifikationen herangezogen werden, wenn er innerhalb von Sekundenbruchteilen abläuft; in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre gibt es bei den betrachteten Energien diesen schnellen Mechanismus nicht.

[65] Molmasse von $1\text{-}2\cdot10^5$ repräsentativ (nach gleicher Quelle)

4.5 Zusammenfassung

Anhand von Temperaturmessungen mit Wachsen klar definierter Schmelzpunkte wurde gezeigt, dass geätzte Spitzen mit einem 22°-Kegelwinkel und kleinen Transmissionskoeffizienten (< 10^{-3}) bereits bei eingekoppelten Lichtleistungen von ~0.8 mW Apextemperaturen von 50°C, bei Lichtleistungen von ~1 mW solche von 130°C aufweisen. Der Temperaturanstieg verläuft dabei nicht proportional zur eingekoppelten Leistung und die Einstellung eines thermischen Gleichgewichts dauert mehrere 10 s. Geätzte Spitzen mit kleineren Kegelwinkeln (5°) werden bei gleicher eingekoppelter Lichtleistung heisser als solche mit grossen Kegelwinkel, haben aber zumindest bei der Einkopplung von Laserpulsen eine um eine Grössenordnung geringere Zerstörungsschwelle. Die Messergebnisse an der geätzten Spitze mit dem 22°-Kegelwinkel entsprechen etwa dem, was von *Stähelin et al.* [9] für eine gezogene Spitze mit einem 5°-Kegelwinkel gefunden wurde, unterscheiden sich jedoch durch die Nichtproportionalität zwischen Temperatur und eingekoppelter Lichtleistung und einem schnelleren Abfall der Temperatur entlang der Spitze.

Die Erwärmung dieser Spitzen kann jedoch für die Desorption von flüchtigen Oberflächenbestandteilen [11] oder zur Oberflächenmodifikation eingesetzt werden. Für eine gut kontrollierte und reproduzierbare Erhitzung der Spitzen können Laserpulse verwendet werden; liegen die eingekoppelten Energien unterhalb der Zerstörungsschwelle der Spitzen, so kann mit der gleichen Spitze sowohl die Desorption/Modifikation als auch die Kontrolle der dadurch hervorgerufenen Oberflächenänderungen durchgeführt werden. Die Zerstörungsschwellen der benutzten Spitzen liegen bei einigen µJ/Puls für geätzte Spitzen mit einem 5°-Kegelwinkel und bei etwa 20 µJ/Puls für solche mit einem 25°-Kegelwinkel. Im Grenzbereich dieser Energieschwelle kann es zu einem teilweisen Absplittern des Apexes der Spitze und damit zu einer Veränderung der Topographieabbildung kommen, was zu Interpretationsschwierigkeiten führt.

Wie gezeigt wurde, können Polymeroberflächen gezielt mit dem SNOM modifiziert werden. In Polystyrol und Polyvinylbutyral wurden kraterähnliche Strukturen mit einer lateralen Ausdehnung von 60 bis 350 nm geschaffen. 60 nm liegen in der Grössenordnung, die von der Spitze nicht mehr gut aufgelöst werden können; hierzu bedarf es anderer Methoden wie der Kraftmikroskopie.
Die Bildung dieser Löcher dürfte teils thermisch durch die von der Spitze durch Strahlung und Konvektion übertragene Wärme, zum Teil thermomechanisch durch die mit der Laserpulseinkopplung verursachten abrupten Längenausdehnung der Spitze erfolgen. Dabei handelt es sich um ein Aufschmelzen des Polymers, nicht aber um Desorption oder thermischen Abbau, wie theoretische Ueberlegungen gezeigt haben. Aufgrund experimenteller Beobachtungen lässt sich ein photochemischer Mechanismus ausschliessen.
Die Wellenlänge des eingekoppelten Lichtes oder Spitzenparameter wie Kegelwinkel und Art der Metallbedampfung scheinen keinen direkten Einfluss auf die geschaffenen Modifikationen zu haben; wichtig sind eine spitz zulaufende Apexregion, ein kleiner Transmissionskoeffizient und ein stabiles Rastern der verwendeten Spitze. Für eine maximale Wirkung müssen die Spitzen mit Laserpulsen knapp unterhalb der Zerstörungsschwelle betrieben werden; für diesen Einsatz erwiesen sich Spitzen mit grossen Kegelwinkel als toleranter.

5. Schlussfolgerungen / Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit zur optischen Rasternahfeldmikroskopie (SNOM) wurden Ergebnisse erzielt, die ein besseres Verständnis der Fluoreszenzmessungen ermöglichen und Auskunft geben über die Art und Machbarkeit von Oberflächenmodifikationen im allgemeinen und an Polymeren im speziellen.

Das bestehende Messinstrument wurde durch eine modifizierte Auskopplung des Signals weiterentwickelt, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für Fluoreszenzmessungen auf acht erhöht werden konnte. Dies ist essentiell, da der Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die Erhöhung der eingestrahlten Lichtleistung klare Grenzen gesetzt sind, wie die quantitative Auswertung des Bleichvorganges im Nahfeld gezeigt hatte. Durch die höheren Intensitäten wurde im Nahfeld ein um zwei Grössenordnungen schnelleres Bleichen als im Fernfeld gefunden (10^5 gegenüber etwa 10^7 Absorptionsprozesse pro Molekül für ein 50% Bleichen). Um Fluoreszenzintensitätsänderungen durch Ausbleichen gering zu halten, müssen die Untersuchungen auf den Nanowatt-Bereich beschränkt werden.
Die mit dem Photomultiplier durchgeführten Messungen sind nur begrenzt quantitativ. Ein empfindlicherer, linearer Detektor mit grösserem dynamischen Bereich würde viele Anwendungen in der Fluoreszenzmikroskopie erleichtern. Gleichzeitig müssen routinemässig Spitzen mit kleineren Aperturen (10 bis 50 nm) hergestellt werden, da die Spitzen die Auflösung der beobachteten Fluoreszenz begrenzen.

Kovalent immobilisierte Latexkugeln können mit dem SNOM in Topographie und Fluoreszenz abgebildet werden; die Latexkugeln dienen dabei als Modellsystem. Die Immobilisierung ist unumgänglich für die Ausweitung von nahfeldoptischen Untersuchungen auf flüssige Medien, essentiell für die Studien vieler biologischer Proben.

Geätzte Spitzen wurden bezüglich ihres thermischen Profils untersucht und es wurden schon bei eingekoppelten Leistungen von einigen Milliwatt Temperaturen von 130°C entlang der Konusregion der Spitze gefunden. Die bereits bei kleinen Leistungen nachgewiesene Erwärmung der Spitzen kann bei Fluoreszenzmessungen und Rasterungen auf sensiblen Proben stören, weshalb zur Vermeidung von Temperatureffekten routinemässig nicht mehr als 0.5 mW in die Spitzen eingekoppelt werden sollten.

Als weiteres Ergebnis werden Modifikationen auf Polymeren auf einer Nanometerskala gezeigt; in Polyvinylbutryal wurden 60 nm breite Löcher geschaffen. Deren Entstehung beruht auf einem teils thermischen, teils thermomechanischen Mechanismus und ist somit wenig an das betreffende Material gebunden. Die Erwärmung der Spitzen durch die Einkopplung von Laserpulsen kann gezielt zur Oberflächenmodifikation eingesetzt werden. Aus den Erfahrungen mit Polymeren folgt, dass geätzte Spitzen mit grossen Kegelwinkeln für Oberflächenmodifikationen oder Desorption am geeignetsten sind, da sie intensive Laserpulse unter hoher Erwärmung am besten ohne Veränderung überstehen. Es müssen jedoch noch leistungsstabilere Spitzen entwickelt werden, damit auch die Desorption weniger flüchtiger Moleküle von Oberflächen gelingen kann.

6. Literatur

[1] N. Chomsky, *World orders, old and new*, Pluto Press, London (1994).

[2] D. W. Pohl, W. Denk und M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651-653 (1984).

[3] E. Betzig und R. J. Chichester, *Science* **262**, 1422-1425 (1993).

[4] C. L. Jahncke, M. A. Paesler und H. D. Hallen, *Appl. Phys. Lett.* **67**, 2483-2485 (1995).

[5] E. Betzig und J. K. Trautman, *Science* **257**, 189-195 (1992).

[6] R. X. Bian, R. C. Dunn, X. S. Xie und P. T. Leung, *Phys. Rev. Lett.* **75**, 4772-4775 (1995).

[7] E. Betzig, R. J. Chichester, F. Lanni und D. L. Taylor, *Bioimaging* **1**, 129-135 (1993).

[8] P. J. Moyer und S. B. Kämmer, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 3380-3382 (1996).

[9] M. Stähelin, M. A. Bopp, G. Tarrach, A. J. Meixner und I. Zschokke-Gränacher, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 2603-2605 (1996).

[10] A. Shchemelinin, M. Rudman, K. Lieberman und A. Lewis, *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 3538-3541 (1993).

[11] D. Zeisel, S. Nettesheim, B. Dutoit und R. Zenobi, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 2491-2492 (1996).

[12] E. Betzig, P. L. Finn und J. S. Weiner, *Appl. Phys. Lett.* **60**, 2484-2486 (1992).

[13] L. Novotny, D. W. Pohl und P. Regli, *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 1768-1779 (1994).

[14] J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus und E. Betzig, *Nature (London)* **369**, 40-42 (1994).

[15] D. R. Turner, *US-Patent 4'469'554* (1983).

[16] P. Hoffmann, B. Dutoit und R.-P. Salathé, *Ultramicroscopy* **1547** (1995).

[17] Datenblatt, *XTC/2 XTC/C Operator's Manual*, Leybold Inficon Inc., Zürich.

[18] H. Pulker und E. Ritter, *Vakuum-Technik* **4**, 91-96 (1965).

[19] Datenblatt, *Certificate of Analysis*, Molecular Probes, Leiden (1995).

[20] *Beilstein*, vol. 27, II, Springer, Berlin (1952).

[21] F. J. Green, *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*, Aldrich Chemical Company, Milwaukee (1990).

[22] P. Greenspan und S. D. Fowler, *J. Lipid Res.* **26**, 781 (1985).

[23] B. M. Krasovitskii und B. M. Bolotin, *Organic Luminescent Materials*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1988).

[24] *Fluka-Katalog (Chemika-BioChemika Analytika)*, Fluka Chemie AG, Buchs (1995).

[25] M. Rücker, P. Vanoppen, F. C. D. Schryver, J. J. T. Horst, J. Hotta und H. Masuhara, *Marcomolecules* **28**, 7530-7535 (1995).

[26] C. Obermüller und K. Karrai, *Appl. Phys. Lett.* **67**, 3408-3410 (1995).

[27] A. J. Meixner, D. Zeisel, M. A. Bopp und G. Tarrach, *Opt. Eng.* **34**, 2324- 2332 (1995).

[28] A. Linder, Universität Konstanz (1995).

[29] M. v. Cleef, S. A. Holt, G. S. Watson und S. Myhra, *Journal of Microscopy* **181**, 2 - 9 (1996).

[30] V. S. Antonov und K. L. Hohla, *Appl. Phys. B* **32**, 9-14 (1983).

[31] H. Zollinger, *Color Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1991).

[32] J. Bandrup und E. H. Immergut, *Polymer Handbook*, Wiley Interscience, New York (1989).

[33] W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren - Eine Einführung*, Springer, Berlin (1986).

[34] P. Wagner, P. Kernen, M. Hegner, E. Ungewickell und G. Semenza, *FEBS Letters* **356**, 267-271 (1994).

[35] P. Wagner, M. Hegner, H.-J. Güntherodt und G. Semenza, *Langmuir* (1996).

[36] Dobler, Ciba Forschungsstelle für Polymere in Marly, *persönliche Mitteilung* (1996).

[37] R. L. Wiliamson, M. J. Miles und K. D. Jandt, *SPIE Proceedings* **2535**, 82-91 (1995).

[38] H. Gansepohl und R. Gellert, *Polystyrol*, Kunststoff Handbuch 4, Hauser, München (1996).

[39] A. Echte, *Handbuch der Technischen Polymerchemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1993).

[40] C. A. Finch, *Polyvinylalcohol - Developments*, Wiley, Chichester, USA (1992).

[41] H. R. Simonds und C. Ellis, *Handbook of Plastics*, D. van Nostrand Co., New York (1943).

[42] K. Lendenmann, Swissair (ehemals Huber+Suhner), *persönliche Mitteilung* (1996).

[43] J. Israelachvili, *Intramolecular & Surface Forces*, Academic Press, San Diego (1991).

[44] D. E. Battey, J. B. Slater, R. Wludyka, H. Owen, D. M. Pallister und M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **47**, 1913-1919 (1993).

[45] D. J. Gardiner und P. R. Graves, *Practical Raman Spectroscopy*, Springer, Berlin (1989).

[46] B. C. Johnson, V. J.Newell, J. B. Clark und E. S. McPhee, *J. Opt. Soc. Am. B* **12**, 2122-2127 (1995).

[47] Datenblatt, *Handbuch für MOPO-700*, Spectra-Physics Lasers Inc., Mountain View, CA .

[48] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York (1983).

[49] I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, New York (1971).

[50] D. Zeisel, *persönliche Mitteilung* (1996).

[51] Datenblatt, *Photomultiplier Tube R3788*, Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka-ken, Japan (1994).

7. Anhang

7.1 Verwendete Geräte

7.1.1 Fluoreszenzspektrophotometer

Für sämtliche Messungen wurde das Luminescence Spectrometer LS 50 von Perkin Elmer verwendet. Der Aufbau besteht aus einer Xenonlampe als Anregungslichtquelle, einem Anregungs- und einem Emissionsmonochromator sowie einem Photomultiplier als Detektor. Anregung kann von 200 - 800 nm erfolgen, Emission von 200 bis 650 nm (nach oben durch den Photomultiplier begrenzt) mit einer Genauigkeit von ± 1nm. Der Anregungsspalt kann von 2.5 bis 15 nm, der Emissionsspalt von 2.5 bis 20 nm gewählt werden; die Scangeschwindigkeit kann auf einen Wert zwischen 10 und 1500 nm/min festgesetzt werden. Das Fluoreszenzsignal kann durch eine Reihe von Langpassfilter (für 290, 350, 390, 430 und 530 nm) sowie einen Graufilter mit optischer Dichte 2.0 manipuliert werden. Die Datenaufnahme läuft elektronisch über einen Rechner, die Manipulation erfolgt durch die dazugehörige Software FL Data Manager.
Sämtliche Spektren wurden, falls nichts gegenteiliges vermerkt ist, mit 5 nm Anregungs- und Emissionsspalt sowie 100 nm/min Scangeschwindigkeit aufgenommen; benutzt wurden immer 10 mm Quarzglasküvetten. Für Intensitäten nahe der Sättigung wurde der Abschwächer verwendet.

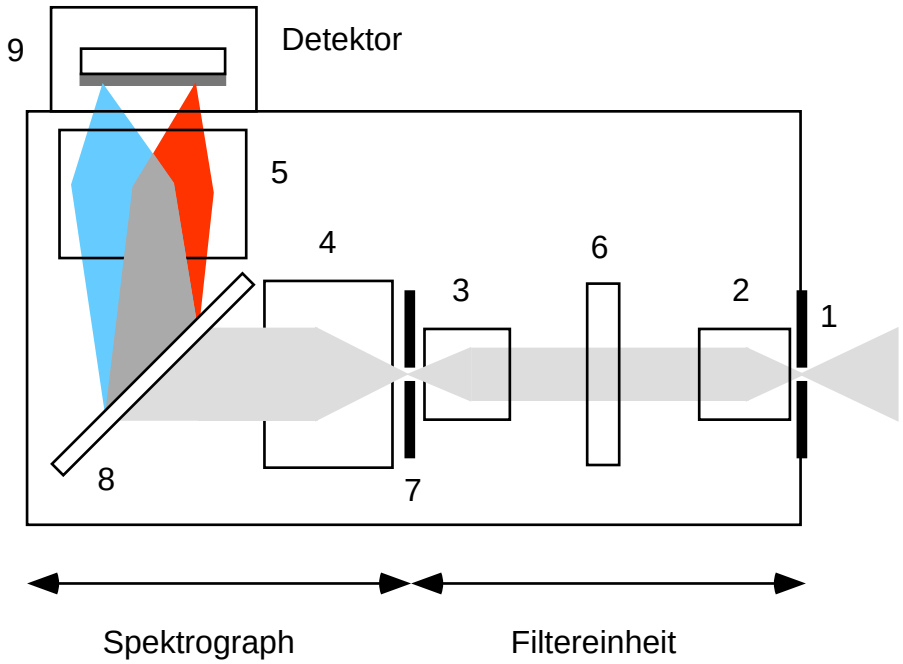
7.1.2 Spektrophotometer

Absorptionsspektren wurden auf dem Uvikon 940 Spektrophotometer von Kontron Instruments aufgenommen. Eine Deuterium- (UV) und Wolframlampe decken den Spektralbereich von 190 bis 900 nm ab mit dem Lampenwechsel bei 338 nm. Mittels eines holographischen Gitters entsteht monochromatisches Licht von 2 nm Bandbreite, welches in zwei Strahlen durch Probe und Referenz läuft und auf einen Photomultiplier als Detektor trifft.
Alle Lösungsspektren wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 200 nm/min in einer 10 mm-Quarzglasküvette gegen Luft aufgenommen. Die Referenz wurde jeweils separat aufgenommen und nachträglich von den Spektren abgezogen.
Für die Absorptionsmessungen an optischen Bauteilen wurden die Filter so gut wie möglich in den Strahlengang positioniert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Filter nicht gegenüber dem Strahl verdreht waren; Referenz hierfür war immer Luft.

7.1.3 Spektrograph

Das Schema des verwendeten HoloSpec f/1.8i-Spektrographen von Kaiser Optical Systems Inc. ist in Abb. 7.1 wiedergegeben. Es handelt sich um einen

axialen Transmissionsspektrographen mit holographisch hergestelltem Gitter und einer Filtereinheit. Im Gegensatz zu üblichen Spektrometergeometrien mit Reflexionsgittern ist der axiale Spektrograph sehr lichtstark, zeigt eine grosse Eingangswinkeltoleranz und wenig Aberration [44].
Der durch den Spektrographeneingang einfallende Strahl soll im Idealfall eine *f*/Zahl von *f*/1.8 haben, damit der kollimierte Strahl in der Filtereinheit möglichst gross und die Filterung des Anregungslichtes durch das holographische Bandpassfilter am effizientesten (O.D.[66] von 6) ist. Dies wurde durch eine Linse entsprechender *f*/Zahl gewährleistet, teilweise wurde auch ein Glasfaseradapter für eine 200 µm-Kern Glasfaser verwendet. Der Strahl wird dann auf einen Spalt (25, 50 oder 100 µm) abgebildet, durch das holographisch hergestellte Transmissionsgitter (2600 Striche / mm) spektral getrennt und auf die CCD-Kamera (AT200 CCD Camera System von Photometrix, luftgekühlt; 256x1026 Pixel *back-illuminated chip*) abgebildet.
Zur Spektrenaufnahme und -bearbeitung wurde die Maps-Software benützt. Zur Kalibration wurden eine Krypton Pen-Ray Rare Gas Lamp von Oriel, Stamford (CT), USA eingesetzt.



1. Spektrographeneingang
2-5. Fotoobjektive
6. Holographisches Bandpassfilter
7. Spalt
8. Transmissionsgitter
9. Luftgekühlte CCD-Kamera

Abb. 7.1 Schema des HoloSpec f/1.8i-Spektrographen von Kaiser mit dem AT 200 CCD Camera System von Photometrix

[66] optische Dichte

7.1.4 Lichtleistungsmessgerät

Lichtleistungen wurden jeweils mit dem Model 840-C HandHeld Optical Power Meter von Newport bestimmt. Das Kernstück des Gerätes ist eine Halbleiterphotodiode, die proportional zur total einfallenden Lichtmenge einen Strom generiert. Diese Ströme im nA bis mA-Bereich werden bezüglich der eingegebenen Lichtwellenlänge korrigiert in Lichtleistungen umgewandelt.
Mit dem Model 818-UV Detektor (Photodiode aus Silicium, 11.2 mm Durchmesser) können Lichtleistungen von 250 bis 1100 nm gemessen werden, die Kalibrationsgenauigkeit[67] beträgt ± 2 % für den UV/VIS-Bereich bis 1000 nm, darüber ist sie noch ± 3 %. Es können Lichtleistungen von 100 pW bis 0.2 W gemessen werden, wobei für den Bereich von 0.2 mW bis 0.2 W ein Abschwächer (beiliegendes aufschraubbares Graufilter, optische Dichte 3.0) verwendet werden muss. Die maximale Auflösung beträgt dabei 10 pW.
Ideal für eine Messung wäre eine möglichst vollständige Ausleuchtung des Detektors, was jedoch nur in wenigen Fällen möglich ist. Es ist sehr wichtig, dass der Strahl auf dem Detektor zentriert ist; geringfügige Abweichungen können die gemessene Lichtleistung um die Hälfte vermindern. Wo dies möglich war, wurde jeweils stets der maximale gemessene Lichtleistungswert gesucht, d.h. der Strahl durch die Messung zentriert. Bei divergenten Lichtquellen kam noch eine Abstandsabhängigkeit hinzu, weil der Wert normalerweise zunahm, wenn man den Detektor der Lichtquelle näherte. Hier wurde jeweils versucht, innerhalb gleichartiger Messungen konsistent zu verfahren und jene Messung als genauer zu betrachten, bei der möglichst der ganze Detektor ausgeleuchtet wurde.

7.1.5 Profilometer

Verwendet für die Aufnahme von Oberflächenprofilen wurde das AlphaStep 200-Profilometer[68] von Tencor Instruments Eine Diamantnadel mit 0.2 µm Durchmesser wird mit konstanter Kraft über die Oberfläche gezogen und ihre Position aufgezeichnet. Es kann horizontal über ein Bereich zwischen 80 µm und 10 mm gerastert werden, vertikal liegt der dynamische Bereich zwischen 0.5 nm und 320 µm. Die horizontale Auflösung liegt bei 40 nm, die vertikale bei 0.5 nm für Rasterungen im Nanometerbereich und 5 nm für solche im Mikrometerbereich.
Die Auflegkraft kann im Bereich zwischen 1 bis 25 mg gewählt werden. Sämtliche Polymerfilme wurden mit 2 mg Auflegkraft gerastert, d.h. mit einer möglichst kleinen Kraft, um den Film nicht zu kratzen und dadurch das Profil zu verfälschen. Um die Schichtdicke bestimmen zu können, wurden die Polymerfilme mit einer Pinzette geritzt. Skalpelle oder ähnliches sollten hierfür nicht verwendet werden, da die Deckgläser leicht brechen und zudem auch angeritzt werden. Bei der Standardvergrösserung von 120x wurde mit Hilfe des Videomonitors die so geschaffene Rinne im Polymerfilm gesucht und dann

[67] diese ist relevant, da die Umwandlung Strom - Lichtleistung (über den ganzen Spektralbereich einfallende Lichtleistung!) bei minimal ± 0.5 % Genauigkeit für kleine Leistungen erfolgt
[68] im CAB E 72.4, Einführung durch Martin Döbler CNB E 93.1

senkrecht zu ihrem Verlauf abgerastert. Die aufgenommenen Profile wurden routinemässig bezüglich des im Profil sichtbaren Teils der Glasoberfläche nivelliert.

7.1.6 Lichtmikroskop

Für die routinemässige Charakterisierung wurde das SMZ-2T Stereomikroskop von Nikkon benützt. Die Optik besteht aus einem 33x Okular, einem 1 bis 6x Zoomobjektiv und einem 2x Vorsatzobjektiv; als Lichtquelle dient eine 6 V-10 W Halogenlampe. Der Arbeitsabstand beträgt etwa 3 cm, die Proben können in Auflicht und Durchlicht betrachtet werden. Proben wurden, wenn irgend möglich, in Auflicht charakterisiert, da hierbei viel mehr Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit und allfällige (Fluoreszenz)Farbstoffe gewonnen werden. Die Fluoreszenzbilder wurden in einem Zeiss Axioplan-Lichtmikroskop[69] mit CCD-Kamera und Empic Software aufgenommen.

[69] zusammen mit der Elektronenmikroskopie im LFV A-Stock, Einführung durch Martin Müller LFV B32. Die Molekularbiologie an der ETH Hönggerberg verfügt über ein konfokales Fluzoreszenzmikroskop

7.2 Chemikalien

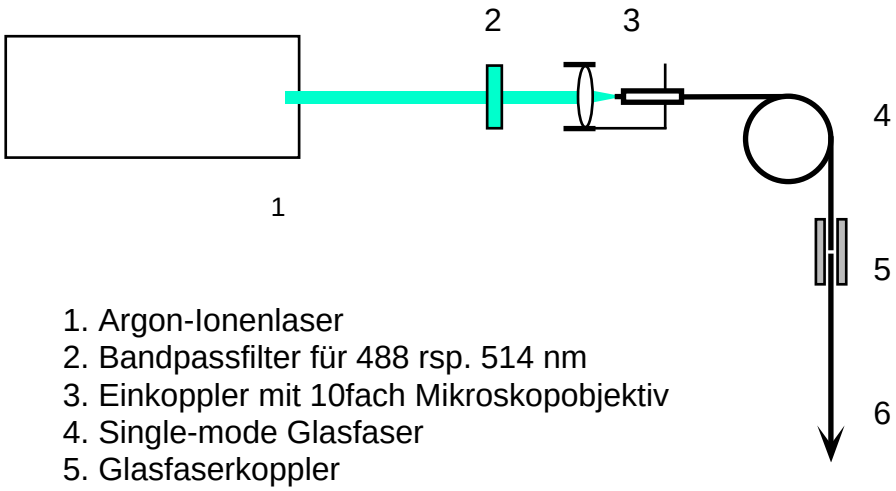
Stoff	Spezifikation	Lieferant
Aceton	techn.	Fluka
Chloroform	für Analyse	Riedel-de Haën
Dibutylether	puriss, p.a.	Fluka
Ethanol	techn.	Fluka
Fluorwasserstoffsäure	40%, puriss, p.a.	Fluka
FluoSpheres L-5248	Nilrot als Fluoreszenzfarbstoff, Carboxylat-modifiziertes Latex, Kugelgrösse 0.282 µm (± 2.6%), $1.6 \cdot 10^{12}$ Partikel / ml, 2% (± 0.1%) Festkörper in dest. Wasser, 2 mM Natriumazid[70]	Molecular Probes Europe BV, Holland
FluoSpheres L-5041	Gelb-grüner Fluoreszenzfarbstoff [nicht näher spezifiziert], Sulfat-modifiziertes Latex, Kugelgrösse 0.227 µm (± 4.6%), $3.1 \cdot 10^{12}$ Partikel / ml, $5.9 \cdot 10^{4}$ Moleküle / Kugel, 2% (± 0.1%) Festkörper in dest. Wasser, 2 mM Natriumazid	Molecular Probes Europe BV, Holland
FluoSpheres L-5241	Gelb-grüner Fluoreszenzfarbstoff [nicht näher spezifiziert], Carboxylat-modifiziertes Latex, Kugelgrösse 0.216 µm (± 3.8%), $3.6 \cdot 10^{12}$ Partikel / ml, $5.9 \cdot 10^{4}$ Moleküle / Kugel, 2% (± 0.1%) Festkörper in dest. Wasser, 2 mM Natriumazid	Molecular Probes Europe BV, Holland
p-Xylol	puriss, p.a.	Fluka
Polymethylmetacrylat	Zerreissprobe	Technische Chemie, ETHZ
Polystyrol	PS 158K, Molmasse ca. 300'000	BASF
Polyvinylalkohol	86-89% hydrolisiert, Molmasse 49'000	Fluka
Polyvinylalkohol	99% hydrolisiert, Molmasse 50'000	Aldrich
Polyvinylbutyral	80% Vinylbutyral-Gehalt	Aldrich
Salzsäure	rauchend 37%, puriss, p.a.	Fluka
Signotherm 50°C	Temperaturindikator (Wachs mit Schmelzpunkt 50°C)	Merck
Signotherm 130°C	Temperaturindikator (Wachs mit Schmelzpunkt 130°C)	Merck

Tab. 7.2 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und andere Produkte

Die Chemikalien und anderen Produkte (in Tab. 7.2 aufgeführt) wurden jeweils ohne weitere Reinigung verwendet.

7.3 Aufbau

7.3.1 Ar-Ionenlasereinkopplung



1. Argon-Ionenlaser
2. Bandpassfilter für 488 rsp. 514 nm
3. Einkoppler mit 10fach Mikroskopobjektiv
4. Single-mode Glasfaser
5. Glasfaserkoppler
6. Single-mode Glasfaser der Spitze

Abb. 7.3 Einkopplung der 488 rsp. 514 nm Laserlinie des Omnichrome Ar-Ionenlasers
Zur Eliminierung des hohen Anteils an Plasmalinien (vgl. Abb. 7.4) wurde ein 488 nm-holographisch hergestelltes Bandpassfilter (LCS10-488 A von Laser Components GmbH, Olching, Deutschland) verwendet.

Mit dem Ar-Ionenlaser von Omnichrome (Chino, CA, USA) stehen die vier Linien bei 514.532 , 501.476, 496.507 und 487.986 nm zur Verfügung. Für eine Liste der Linien zwischen 488 und 645 nm siehe z.B. *Practical Raman Spectroscopy* S.80 [45].

Für eine gute Einkopplung muss die Glasfaser glatt gebrochen (eine schlechte Bruchstelle kann die Einkopplung gut um einen Faktor 5 bis 10 verschlechtern) und mittels den Stellschrauben optimal im Fokus des Lasers positioniert sein; zudem muss die Resonatorlänge im Laser optimiert werden.

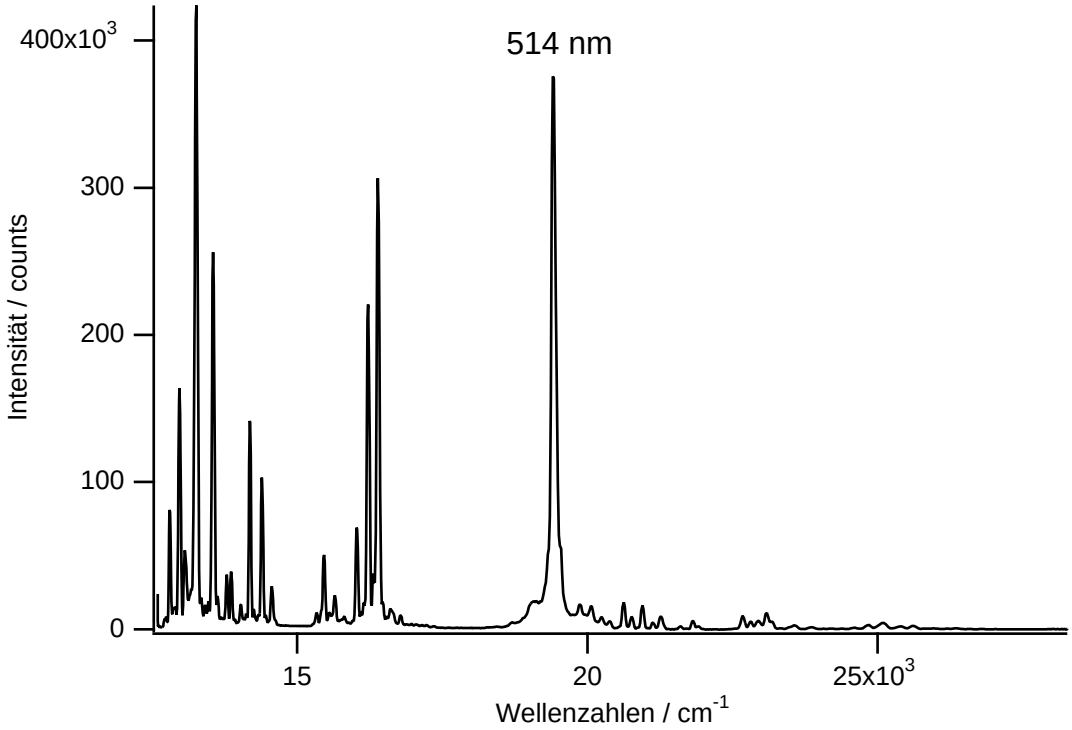


Abb. 7.4 Plasmalinien in der 514 nm-Linie des Ar-Ionenlasers
Im Spektrographen aufgenommenes Spektrum mit dem holographisch hergestelltem Bandpassfilter für 514 nm. Die durch das Bandpassfilter (O.D. 6 im kollimierten Strahl der Filtereinheit) abgeschwächte 514 nm-Linie liegt im Intensitätsbereich der Plasmalinien.

7.3.2 Schema des MOPO (Master Oscillator / Power Oscillator)

In Abb. 7.5 ist der verwendete MOPO-730 D20 von Spectra-Physics (Mountain View, CA) schematisch dargestellt [46, 47]. Bei optimaler Funktionsweise bietet er Durchstimmbarkeit der Wellenlängen von 200 nm bis 690 nm und von 735 bis 2200 nm. Die Laserpulse sind zwischen 5 und 10 ns lang mit einer Repetitionsrate von 20 Hz. Die Stabilität von Puls zu Puls beträgt ± 8% bei Pulsenergien zwischen 200 und 600 mJ.

Für eine effiziente und einfache Einkopplung wurden Muliti-mode Glasfasern (haben einen grösseren Kern als Single-mode Glasfasern) benützt; eine Blende diente zur Verbesserung des Strahlprofils. Teilweise wurde die Intensität mit Polarisatoren weiter reduziert (hier nicht gezeigt). Die Einkopplung wurde vom SNOM-Raum aus durch den Verschluss ferngesteuert.

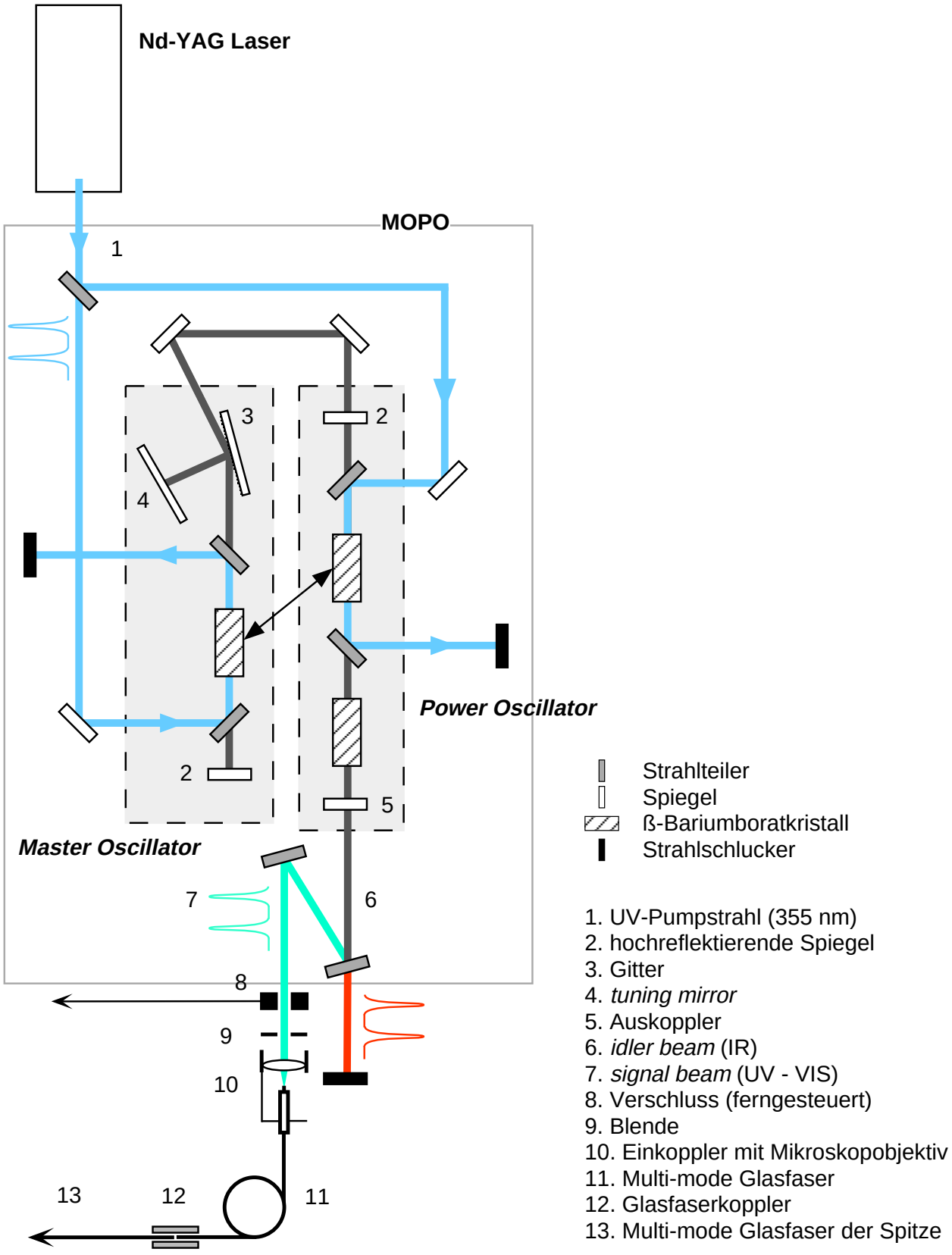


Abb. 7.5 Lichteinkopplung für die Polymermodifikation

7.3.3 Verwendete Filter

Die Absorptionsspektren der verwendeten Filter sind in Abb. 7.6 dargestellt.

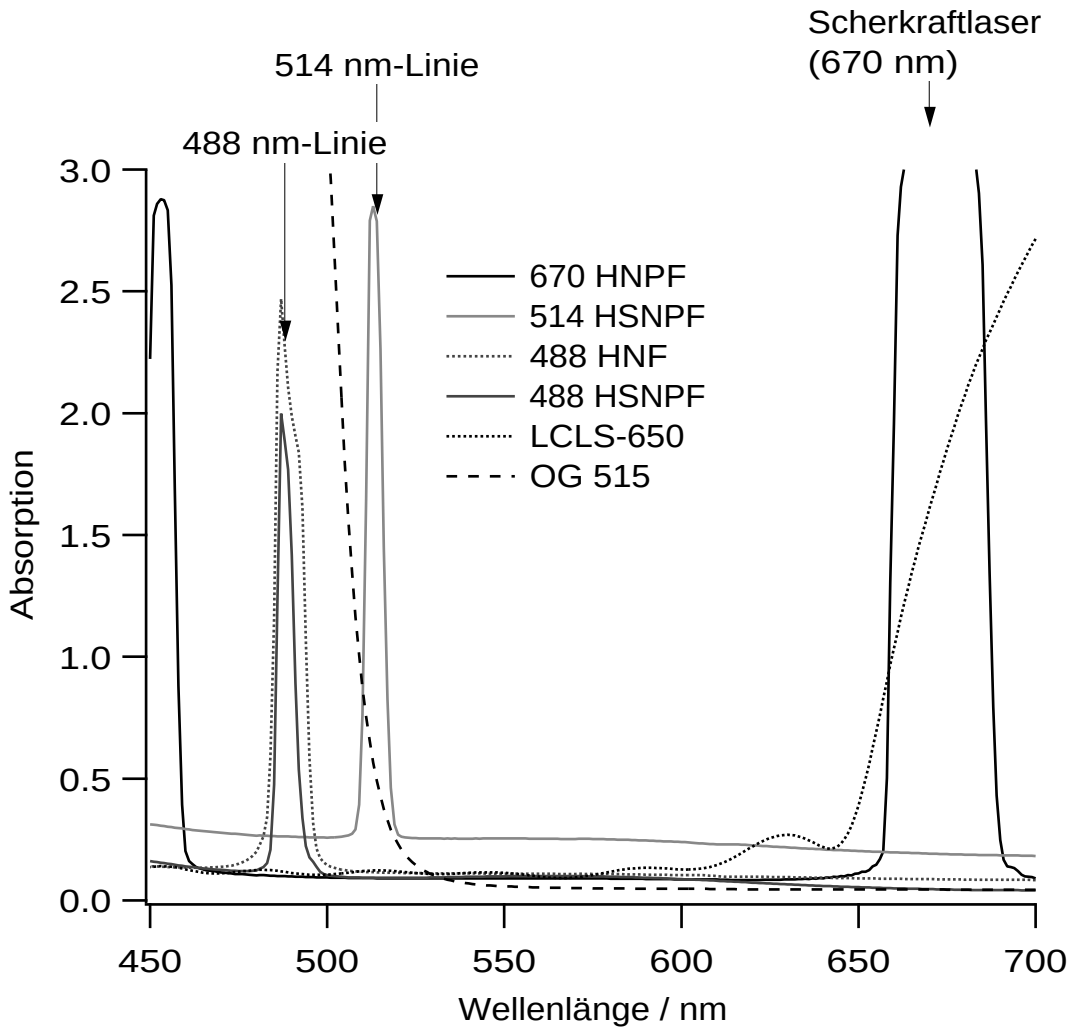


Abb. 7.6 Verwendete Filter, für die Bezeichnung im Text siehe Tab. 7.7
Das Photospektrometer ist nicht geeignet, hohe Extinktionswerte mit hoher Auflösung aufzuzeichnen; der Bereich oberhalb O.D. 2 ist deshalb qualitativ zu werten.

Bei den beiden 488 nm-holographisch hergestellten Bandpassfiltern besteht der Unterschied zwischen HNF und HSNPF in der Bandbreite, nicht aber in der optischen Dichte bei 488 nm. Aus in-situ Messungen im SNOM mit dem auf den Photomultiplier fokussierten Strahl zeigte der 488 HNF eine O.D. von 3.2 - 4.3, der 488 HSNPF eine O.D. von 2.4 - 4.1. Der kleinere Wert enstpricht der Abschwächung unmittelbar vor dem Photomulitplier, der grössere rund 4 cm

davor. Diese holograpisch hergestellten Bandpassfilter sind nur sehr effektiv in einem kollimierten Strahl; werden sie um einige Grad geneigt, nimmt die Filterwirkung um eine Grössenordnung ab.

Herstellerspezifikation	Bezeichnung (in dieser Arbeit)	Hersteller
488 HNF, 1' ø	holographisch hergestelltes Bandpassfilter für 488 nm	Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, MI
488 HSNPF, 2' ø	holographisch hergestelltes Bandpassfilter für 488 nm	Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, MI
514 HSNPF, 2' ø	holographisch hergestelltes Bandpassfilter für 514 nm	Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, MI
670 HNPF, 1' ø	holographisch hergestelltes Bandpassfilter für 670 nm	Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, MI
LCLS-650 F, 1' ø	Kurzpassfilter für 650 nm	Laser Components GmbH, Olching, Deutschland
HR 450-530/45, 1' ø	Dichroischer Spiegel mit Reflexion in 45° für 450 - 530 nm	Laser Components GmbH, Olching, Deutschland
OG 515, 50 mm, 3 mm dick	Langpassfilter für 515 nm	Schott, Mainz, Deutschland

Tab. 7.7 In dieser Arbeit verwendetete Filter und Spiegel

7.4 Fluoreszenz

7.4.1 Berechnung des Energietransfers zwischen einzelnen Molekülen des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes

Nach *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [48] berechnet sich der Energietransfer durch Dipolwechselwirkungen nach der Donor-Akzeptor-Theorie zu

$$k_T = \frac{1}{\tau_d}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

In dieser Gleichung ist k_T die Energietransferrate, τ_d die Fluoreszenzlebensdauer (1-10 ns Lebensdauer der Fluoreszenz typisch für gute Fluoreszenzfarbstoffe nach [49]), r der Abstand und R_0 die Förstersche Distanz. Sie gibt die Entfernung an, bei der 50% der Moleküle durch

Energietransfer zu anderen Molekülen in den Grundzustand zurückkehren und die restlichen 50% den Zerfallsmodi in Abwesenheit eines Energietransfers folgt. Sie berechnet sich nach

$$\left(R_0 / nm\right) = 9.79 \cdot 10^2 \left(\kappa^2 n^{-4} \phi_d J\right)^{1/6}$$

Die Grösse κ^2 gibt die relative Orientierung der Dipole an (κ^2 ~2/3 für zufällig orientierte Dipole), n ist der Brechungsindex des Lösungsmittels (hier der Polymermatrix, für Polystyrol[71] 1.60), Φ_d die Quantenausbeute des Fluoreszenzfarbstoffes (für effiziente Fluoreszenzfarbstoffe zwischen 0.4 und 1) und J (in $M^{-1}cm^3$) das Ueberlappungsintegral. Es entspricht einer Kopplungskonstante und berechnet sich aus der auf eins normierten dimensionslosen Fluoreszenz des Donors $F_d(\lambda)$ und der Absorption des Akzeptors $e_a(\lambda)$ in $M^{-1}cm^{-1}$, welche beide aus Spektren zugänglich sind.

$$J = \int_0^\infty F_d(\lambda)\varepsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda$$

Für den gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff schätzt man so für J einen Wert[72] von $3 \cdot 10^{-19}$ $M^{-1}cm^3$ ab, was mit einem Schätzwert für Φ_d = 0.8 die Förstersche Distanz von 0.5 nm ergibt. Somit würden weniger als eines von einer Million Molekülen über Energietransfer in den Grundzustand zurückkehren. Fluoreszenzlöschen durch Energietransfer kann also vernachlässigt werden.

7.4.2 Routinemässige Bearbeitung der SNOM-Bilder

Alle in dieser Arbeit gezeigten Topographiebilder sind in eine horizontale Ebene gedreht worden. An den Beziehungen der Linien untereinander oder am Mittelwert ändert sich dadurch nichts. Da die Orientierung der Proben relativ zum Rastertisch nicht kontrollierbar ist, geht dabei keine Information verloren. Zudem erleichtert es die graphische Darstellung, da mit einer linearen Farbskala Strukturen besser aufgelöst werden können, wenn die Differenz zwischen dem maximalem und dem minimalen Bildwert möglichst klein ist. Der Kontrast sämtlicher Bilder ist so gewählt, dass Minimal- und Maximalwert der Daten abgedeckt werden.
Bei der Datenaufnahme ergeben sich im SNOM sowohl für die Topographie als auch im optischen Bild Stufen zwischen aufeinanderfolgenden Linien. Diese sind nicht durch die Natur der Probe bedingt, sondern sind auf die Piezos rsp. die Signalverarbeitung zurückzuführen; in der Topographie treten sie häufiger auf.
Alle in dieser Arbeit gezeigten SNOM-Bilder sind, soweit nicht anders vermerkt, darauf korrigiert. Dies geschieht durch eine in der Software SPM Lab enthaltene Funktion *leveling*. Dabei wird zu jeder Linie ein konstanter Wert addiert, so dass aufeinanderfolgende Linien maximal übereinstimmen; die Gesamtheit der Linien folgt dabei einer Ebene. Dies ist gleichermassen nützlich wie gefährlich. Ist wirklich eine Stufe oder auch eine Krümmung senkrecht zu

der Rasterrichtung vorhanden, so wird diese dadurch verfälscht oder gar eliminiert.
Mit der ebenfalls vorhandenen Funktion *advanced leveling* lässt sich dies teilweise umgehen. Ein bestimmter Höhen- rsp. Signalbereich lässt sich für das *leveling* ausschliessen, wie z.B. in Abb. 7.16 angewandt. Wird dann auch der Komplementärbereich dieser Prozedur unterzogen, so können sich im Uebergangsbereich Verfälschungen ergeben.

Andere Bildbearbeitungsmethoden wie Löschen von Linien, nichtlineare Farbkontraste oder Bildglättungen durch Faltung wurden in dieser Arbeit nicht benutzt.

7.4.3 Berechnungen zur Form und Halbwertsbreite des Fluoreszenzlinienprofils der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kugel

Für die Berechnungen wurde das Programm Mathematica benützt. Im folgenden ist das Script in Mathematica zur Berechnung des Fluoreszenzlinienprofils für die quadratische Apertur wiedergegeben.

```
ClearAll[f1, f2, f3];
r = 141;
k = 0.046;
a = 30;

f1[x_, y_] := 2*k*Sqrt[r^2-x^2-y^2] /; x^2 + y^2 <=
r^2
f1[x_, y_] := 0 /; x^2 + y^2 > r^2

f2[o_] := f2[o] = Integrate[f1[o, p], {p, -a, +a}]
f3[l_] := Integrate[f2[q], {q, l-a, l+a}]

Plot[Evaluate[f3[m]], {m, -r-2a, r+2a}]
```

Für die dreidimensionale Darstellung der Abbildung durch eine quadratische Apertur wurde das Script leicht modifiziert.

```
ClearAll[x, y, f1, f2, f3];
r = 141;
a = 30;

f1[x_, y_] := Sqrt[r^2-x^2-y^2]/r /; x^2 + y^2 <= r^2
f1[x_, y_] := 0 /; x^2 + y^2 > r^2

f2[xs_, ys_] := f2[xs, ys] = Integrate[f1[xs, p1],
{p1, ys-a, ys+a}]
f3[xt_, yt_] := Integrate[f2[p2, yt], {p2, xt-a,
xt+a}]

Plot3D[Evaluate[f3[m,n]], {m, -2r, 2r}, {n, -2r, 2r},
PlotRange -> All, PlotPoints -> 40]
```

Das folgende Mathematica-Script berechnet die Faltung einer beliebigen Versuchsfunktion mit einer beliebigen Objektfunktion; die Objektfunktion war die bereits oben verwendete kugelförmige Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes. Die in der Auflistung enthaltene Versuchsfunktion entspricht der durch Probieren gefundenen bestmöglichen Funktion. Sämtliche Funktionen werden auf eins normiert. Die Halbwertsbreiten werden vom Programm nach dem gleichen Algorithmus sowohl für die Versuchsfunktion als auch für die experimentell gefundene Funktion berechnet.

```
Clear[Experiment, Objekt, Versuchsfu,
a, r, ResultatFaltung]
r = 141;
a = 261.3;

Experiment[x_] := Exp[-(x/a)^2]
Objekt[x_] := Sqrt[r^2-(x)^2]/r /; Abs[x] <= r
Objekt[x_] := 0 /; Abs[x] > r
Versuchsfu[x_] := Exp[-(x/239)^2]

Plot[Objekt[m], {m, -8r, 8r}]
Plot[Versuchsfu[m], {m, -8r, 8r},
PlotRange->{{-8r, 8r},{0, 1}}]

ResultatFaltung[o_] =
   NIntegrate[Versuchsfu[o-t]*Objekt[t],{t,       -10r,
10r}];

Plot[Evaluate[ResultatFaltung[m]/ResultatFaltung[0]],
   {m, -8r, 8r}, PlotRange->{{-8r, 8r},{0, 1}}]

Plot[Experiment[m], {m, -8r, 8r}]

Evaluate[FindRoot[ResultatFaltung[x]/
   ResultatFaltung[0] - 0.5,{x, {120, 200}}]]
Evaluate[FindRoot[Experiment[x]    -    0.5,{x,    {120,
200}}]]
```

Es wurde auch versucht, die Entfaltung im Raum der Fouriertransformierten durchzuführen und dann zu inversfouriertransformieren, was aber an Singularitäten der entstehenden Funktion scheiterte rsp. von Mathematica nicht bewältigt werden konnte.
In Tab. 7.1 sind die Halbwertsbreiten der mit der optimierten Versuchsfunktion (Gaussfunktion mit 398 nm Halbwertsbreite) berechneten Linienprofile für verschiedene Radien der Kugelfunktion der Fluoreszenzfarbstoffverteilung angegeben.

Radius Kugelfunktion (Verteilung des Fluoreszenz-farbstoffes) / nm	Halbwertsbreite des berechneten Linienprofil / nm
0	398
10	398
50	402
100	416
150	439
200	470
300	563
400	688
500	833
1000	1656

Tab. 7.1 Halbwertsbreiten der berechneten Linienprofile in Abhängigkeit der kugelförmigen Fluoreszenzverteilung bei gleicher Spitzen-funktion (Gaussfunktion mit Halbwertsbreite = 398 nm)

7.4.4 Chemische Charakterisierung der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln

Aus einem Milliliter der gelb-grünen *FluoSpheres* wurde mit 10 ml Chloroform der Farbstoff nicht-quantitativ extrahiert. Von dem etwa auf 100 µl eingeengten Extrakt wurden 0.3 µl on-column in einen HRGC 5160 Mega Series-Gaschromatographen von Carlos Erba mit einer Silicagelsäule injiziert. Die Säule wurde mit einem Temperaturprogramm mit 10°C/min von 40°C auf 230°C aufgeheizt, verblieb dort 60 min und wurde dann mit 1°C/min auf 250°C aufgeheizt. Als Detektor war ein 5970 Series Mass Selective Detector-Quadrupol-MS von Hewlett Packard im Einsatz. Abb. 7.8 zeigt das erhaltene Totalionenchromatogramm.

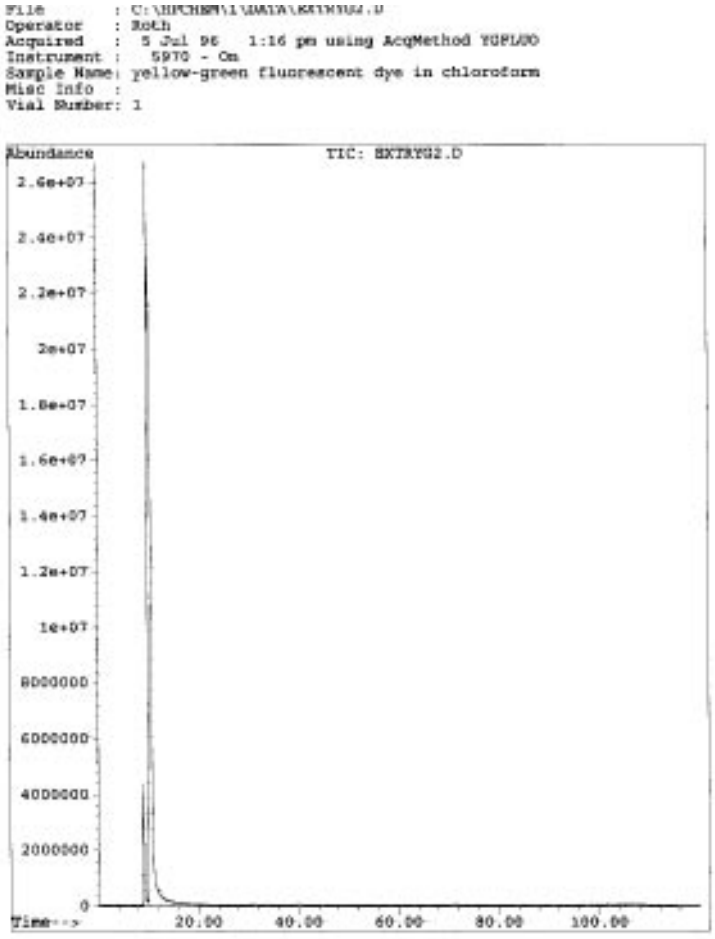


Abb. 7.8 Totalionenchromatogramm des Chloroformextraktes des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes
Die beiden Peaks wurden als Ethanol (zur Stabilisierung des Chloroforms in diesem enthalten) und Chloroform identifiziert; weitere relevante Peaks - ausser bekannten Verunreinigungen früherer Benützer - wurden nicht gefunden.

Das Fehlen signifikanter Peaks im Totalionenchromatogramm bedeutet, dass der Farbstoff nicht eluierte. Entweder liegt dies an einer Pyrolyse des Farbstoffes (allerdings keine Pyrolyseprodukte detektiert) in der Säule bei bis zu 250°C oder an einer ungenügenden Flüchtigkeit wegen einer hohen Molmasse.
Wichtig für eine Vorstellung des Verhaltens der *FluoSpheres* ist die Kenntnis über die Verteilung und evtl. Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes in den Latexkugeln. Dazu wurde eine Reihe von Extraktionsexperimenten mit Chloroform vorgenommen.

Da die benutzten Latexkugeln carboxylat-modifiziert sind, sollten sie sich beim Extrahieren je nach pH der wässrigen Phase anders verhalten. Wurde aus einer mit Salzsäure angesäuerten Lösung der *FluoSpheres* extrahiert, so löste sich die protonierte Polystyrolhülle und der Fluoreszenzfarbstoff im Chloroform (UV/VIS Spektrum der wässrigen Phase "leer"). Durch Ausschütteln mit einer basischen Lösung konnte die Polystyrolhülle wieder vollständig aus der Chloroformphase entfernt werden (das UV/VIS Spektrum der Chloroformphase enthielt nur Farbstoff, das Polystyrol koagulierte in der wässrigen Phase), d.h. offensichtlich sind sämtliche Polystyrolketten endgruppenmodifiziert.
Der Farbstoff (gut sichtbar durch sein leuchtendes Gelb) liess sich aus der Chloroformphase weder durch neutrales oder basisches, noch durch saures Ausschütteln entfernen, d.h. der gelb-grüne Fluoreszenzfarbstoff ist apolar und liegt nicht in ionischer Form vor. Da der Farbstoff sich mit Chloroform auch aus einer neutralen Lösung der *FluoSpheres* löst, bei der die Polystyrolhülle in der wässrigen Phase verbleibt, ist er offenbar in keiner Weise kovalent an seine Polystyrolmatrix gebunden.

7.4.5 Einflüsse auf die Fluoreszenz der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln

Basis für die Untersuchung der verschiedenen Einflüsse auf die Fluoreszenz war eine 0.02% Stammlösung[73] der gelb-grünen *FluoSpheres* (Carboxylat-modifiziert, 0.216 μm Durchmesser) in bidestilliertem Wasser. Die Stammlösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und jeweils vor den Untersuchungen frisch ultrabeschallt.
Der Einfluss von Sauerstoff wurde durch Einleiten von Sauerstoff in 10 ml der Stammlösung bestimmt; das Fluoreszenzspektrum wurde ohne Ultrabeschallung unmittelbar darauf aufgenommen.
Um die Frage nach der Reversibilität des Trocknungsprozesses zu klären, wurden 10 ml der Stammlösung über 5 Tage im Exsikkator am Hausvakuum (ca. 150 mbar) belassen. Die trockengefallenen Latexkugeln wurden mit 10 ml destilliertem Wasser resuspendiert, ultrabeschallt und anschliessend wurde die Fluoreszenz dieser Lösung bestimmt.
Aus 10 ml der Stammlösung wurde zweimal mit 5 ml Chloroform der gelb-grüne Fluoreszenzfarbstoff vollständig extrahiert und das Fluoreszenzspektrum des Extraktes - also gleicher Konzentration des Farbstoffes wie die Stammlösung - aufgenommen.
In Abb. 7.9 sind die erhaltenen Fluoreszenzspektren abgebildet.

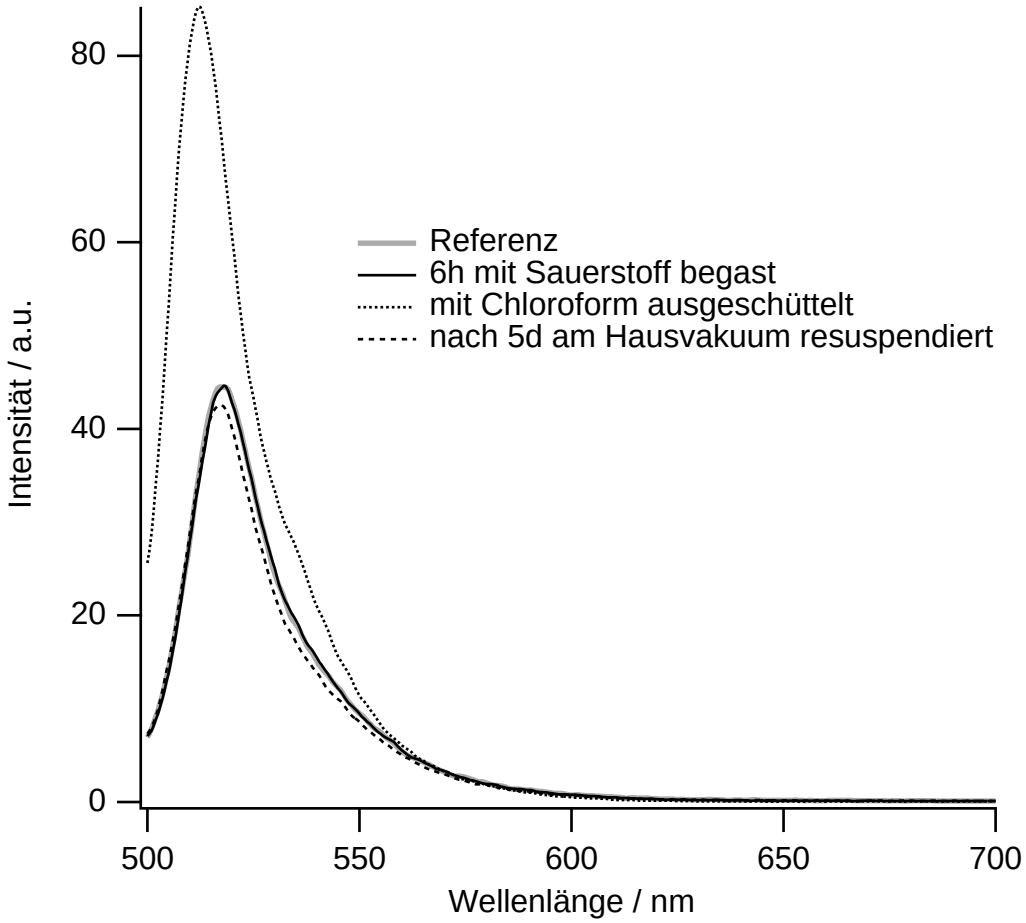


Abb. 7.9 Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren auf die Fluoreszenz der gelb-grünen *FluoSpheres*
Emissionsspektren mit Anregung bei 488 nm verschieden behandelter Lösungen im Vergleich zur unbehandelten Lösung (Referenz).

Aus den Spektren ist klar ersichtlich, dass der Trocknungsvorgang an sich reversibel ist. Sauerstoff nimmt (zumindest in wässriger Lösung) offenbar weder als Oxidationsmittel noch als Fluoreszenzlöscher einen Einfluss auf die Fluoreszenz des Farbstoffes in den Latexkugeln.
Ein Experiment mit einer gleichzeitigen Begasung mit Sauerstoff und der Bestrahlung mit Licht der trockenen *FluoSpheres* wurde nicht durchgeführt.
Das Spektrum des Chloroformextraktes entspricht qualitativ dem der Stammlösung, d.h. die chemische Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffes ändert sich von den Latexkugeln zum Chloroform nicht. Die Verdopplung der Intensität kann auf diese chemische Umgebungsänderung zurückzuführen sein, wird zum Teil aber auch auf den unterschiedlichen optischen Eigenschaften der beiden Lösungen beruhen, v.a. der starken Streuung des

Lichtes durch die Latexkugeln in Lösung. Ein Indiz dafür ist die Nichtlinearität der Fluoreszenz der *FluoSpheres* in diesem Konzentrationsbereich.

Relevant für die SNOM-Untersuchungen ist der Zustand der *FluoSpheres* in trockenem Zustand; dieser ist aber quantitativ nicht direkt zugänglich wie die Lösungen. Es gelang nicht, eine Lösung bekannten Gehaltes an *FluoSpheres* zu einer homogenen Schicht einer bekannten Fläche eintrocknen zu lassen (z.B. in einer 1 mm-Küvette), um deren Fluoreszenz zu bestimmen.
Auf der Grundlage der bereits gewonnenen Erkenntnisse - nämlich der Reversibilität des Trocknungsprozesses - wurde das umgekehrte Vorgehen gewählt. Eine homogene Schicht der *FluoSpheres* bekannter Fläche wurde in einem bekannten Volumen resuspendiert und die Fluoreszenz vorher und nachher bestimmt. Da Spektren von Festkörpern sehr anfällig gegenüber Artefakten sind, wurden 2 verschiedene Anregungs- und Detektionsgeometrien benutzt, die in Abb. 7.10 dargestellt sind.

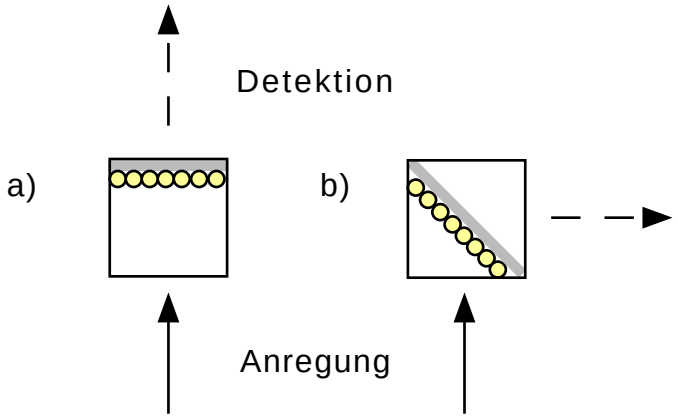


Abb. 7.10 Anregungs- und Detektionsgeometrie für die Untersuchung der Fluoreszenz der trockenen *FluoSpheres*
a) Spektrograph, b) Fluoreszenzspektrophotometer

Ein 18 mal 18 mm Deckgläschen wurde so zugeschnitten, dass es genau so breit wie die eine Innenseite (a) rsp. die Diagonale (b) einer Quarzglasküvette war. Ein Milliliter einer 0.02% Lösung der gelb-grünen *FluoSpheres* wurde in einem Pillenglas, auf dessen gewölbten Boden sich das zugeschnittene Deckgläschen befand, im Exsikkator am Hausvakuum eintrocknen gelassen. Dabei bildete sich eine für das Auge homogene Schicht der *FluoSpheres* über die ganze Fläche des Plättchens. Für die Messungen wurde die Küvette - mit dem entsprechend der Abb. 7.10 hineingestellten Plättchen - bis zur oberen Kante des Plättchens mit destilliertem Wasser aufgefüllt und ultrabeschallt, damit alle *FluoSpheres* sich lösten. So wurde garantiert, dass sich im

Strahlquerschnitt gleich viele *FluoSpheres* im trockenen wie im gelösten Zustand befanden.
Für die Messung mit dem Spektrograph wurde die Küvette in die optische Achse des Spektrographen gestellt, unmittelbar dahinter eine 50 mm-Linse (Durchmesser 1 Zoll), welche die Küvette auf den Eingangsspalt des Spektrographen abbildete. Zur Anregung wurde die 488 nm-Linie des Ar-Ionenlasers aus einer glatt gebrochenen Glasfaser benutzt, welche in 20 cm Entfernung in einem 10°-Winkel zur optischen Achse angebracht war. Dies ermöglichte eine vollständige Ausleuchtung des Glasplättchens, d.h. Inhomogenitäten können ausgeglichen werden. Im Spektrographen diente das 488 nm-holographisches Bandpassfilter zur Unterdrückung des Anregungslichtes.
Für die Messung im Fluoreszenzspektrophotometer waren keine besonderen Massnahmen nötig.
Die entsprechenden Spektren sind in Abb. 7.11 und Abb. 7.12 wiedergegeben.

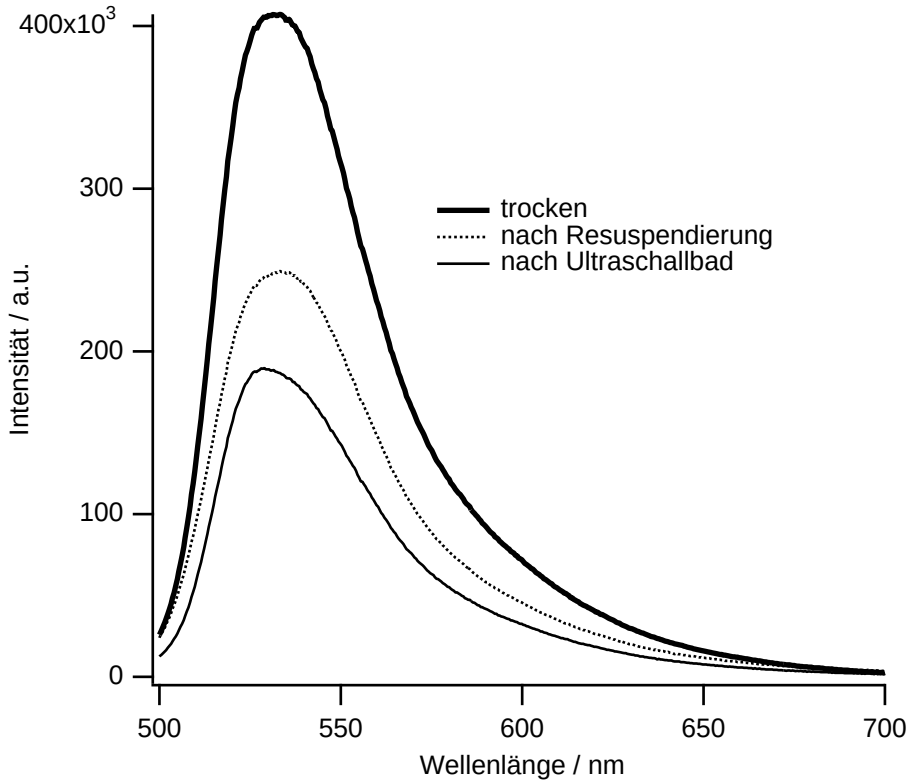


Abb. 7.11 Vergleich der Fluoreszenz der trockenen und resuspendierten *FluoSpheres*
Emissionsspektrum (λ_{ex} = 488 nm) aus Spektrograph, bezüglich Untergrund korrigiert. Das Spektrum unmittelbar nach der Resuspendierung ist nur beschränkt relevant, da die Lösung vor dem Ultraschallbad durch Schlierenbildung sehr inhomogen blieb.

Die Intensität der Fluoreszenz nimmt bei beiden Messungen auf ungefähr die Hälfte ab nach der Resuspendierung, d.h. die Fluoreszenz im trockenen Zustand ist intensiver. Qualitativ ändert sich durch die Resuspendierung an den Spektren nichts, wenn man messspezifische Artefakte subtrahiert.
Mögliche Fehler können bei der Messung im Fluoreszenzspektrophotometer durch eine nicht durch Betrachten feststellbare Inhomogenität der Schicht der *FluoSpheres* entstehen; in der verwendeten Anordnung für den Spektrographen ist der Einfluss der unterschiedlichen Distanz der *FluoSpheres* zur Linse unbekannt. Es ist zu erwarten, dass die Fluoreszenz in der Nähe der Linse besser eingesammelt wird, d.h. die Fluoreszenz im trockenen Zustand bezüglich des resuspendierten Zustandes künstlich erhöht wird. Zudem waren die entstehende Lösung für die Messung mit dem Spektrographen im Konzentrationsbereich von 0.02% an Latexkugeln, also nicht mehr im linearen Bereich (Selbstabsorption und Streuung). Dies wurde bei der Messung am Fluoreszenzspektrophotometer vermieden, indem dort dafür gesorgt wurde, dass weniger *FluoSpheres* auf dem Glasplättchen eintrocknen.
Obwohl beide Methoden übereinstimmend das gleiche Ergebnis liefern, sollte man sich in Anbetracht der genannten unbekannten Grössen mit der Aussage begnügen, dass die Fluoreszenz eines trockenen *FluoSpheres* ungefähr gleich oder leicht intensiver ist als in Lösung. Diese entspricht auch den Erfahrungen von Molecular Probes, wie auf Anfrage bestätigt wurde.

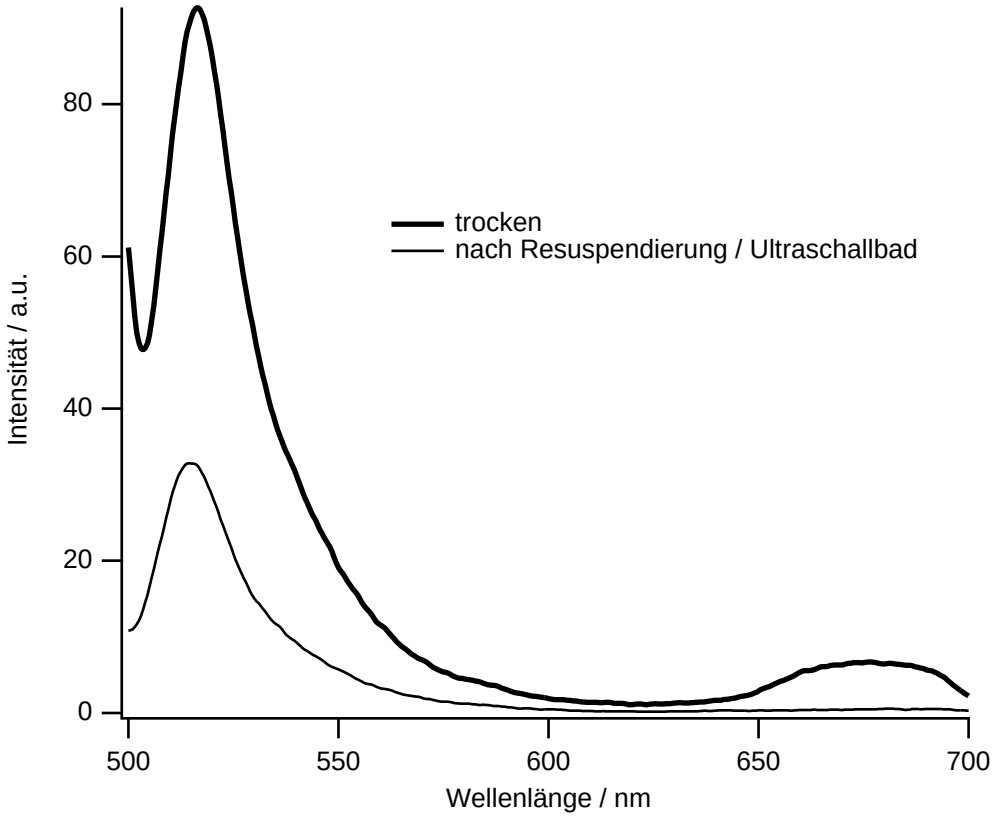


Abb. 7.12 Vergleich der Fluoreszenz der trockenen und resuspendierten *FluoSpheres*
Emissionsspektrum (λ_{ex} = 488 nm) im Fluoreszenzspektrophotometer. Beim Spektrum im trockenen Zustand sind das Ansteigen der Fluoreszenz hin zur Anregungswellenlänge und die Bande bei 680 nm Artefakte der Messung[74].

7.4.6 Vollständige Daten zum Bleichen im Nahfeld einer Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln

5x5 µm-Rasterungen	Zeit / min
0	18
1	35
2	52
3	69
4	86
5	103
6	120
7	137
8	154
9	171
20x20 µm-Rasterungen	
1	237
2	350
3	463
4	576

Tab. 7.2 Zeitliche Abfolge der Rasterungen

In Tab. 7.2 ist die zeitliche Abfolge der Rasterungen wiedergegeben. Die angebene Zeit entspricht der der halbvollendeten Rasterung; eine 5x5 µm-Rasterung dauerte 17 min, eine 20x20 µm-Rasterung 113 min. Auf den folgenden Seiten finden sich die Topographie- und die optischen Bilder der 5x5 µm-Rasterungen (Abb. 7.13 rsp. Abb. 7.14) und der 20x20 µm-Rasterungen (Abb. 7.15 rsp. Abb. 7.16).
Die Rasterung 0 der 5x5µm-Serie ist hier nicht gezeigt, da während dieser ersten Rasterung der Serie die Rastergeschwindigkeit (auf 3.5 µm / s), Rückkopplungsparameter und Photomultiplierspannung (auf 497 V, um im Mittel ein Photomultipliersignal von 0.3 zu erhalten, das im linearen Bereich des Detektors liegt) noch angepasst wurden. Interessanterweise war auf dem optischen Bild der Rasterung 0 nur Rauschen; zudem variierte die Anzeige des Photomultipliersignals viel stärker als durch das Aurora-Signal[75] wiedergegeben.

Als Spitze wurde eine kommerzielle gezogene Spitze von Topometrix mit einer vom Hersteller angegebenen Apertur von 50 nm verwendet. Die Apertur muss allerdings viel kleiner rsp. die Spitze geschlossen gewesen sein, da anfangs

kein Licht austrat. Erst nach ein paar Rasterungen auf einer Glasplatte öffnete sie sich. Normalerweise kann von einer Transmission von 10^{-4} bis 10^{-5} ausgegangen werden [50].
Die Lichtleistung aus der Spitze während den Rasterungen kann nicht mit Sicherheit angegeben werden. Wegen eines Computerfehlers versagte die Steuerung des SNOM bei der fünften 20x20 μm-Rasterung, wodurch erfahrungsgemäss die Spitzen in Mitleidenschaft gezogen werden. Wie gross der Effekt mit den Latexkugeln war, lässt sich nicht abschätzen. Unter dem Lichtmikroskop liess sich in der maximalen Vergrösserung eine knollenförmige Verdickung am Apex erahnen, die zu Beginn der Rasterungen nicht vorhanden war. Die Transmission der Spitze konnte erst danach bestimmt werden; ursprünglich dürfte es weniger gewesen sein. Je nach Güte des Spleissens wurden von den 280 μW in der Glasfaser 5 bis 10 μW aus der Spitze gemessen (Transmission $2.6 \cdot 10^{-2}$), vorher war es wahrscheinlich etwa 1 μW.
Die Laserleistung in der Glasfaser war zu Beginn der Messreihe auf 560 μW optimiert worden und betrug an deren Ende noch 280 μW. Erschütterungen im Bereich der Einkopplung können dazu führen, dass die eingekoppelte Leistung abnimmt. Der Laser lief zu Beginn der ersten Lichtleistungsmessung bereits mehrere Stunden, so dass eine Laserinstabilität nicht in Frage kommt (vgl. Anhang Stabilität des Ar-Ionenlasers S.114).

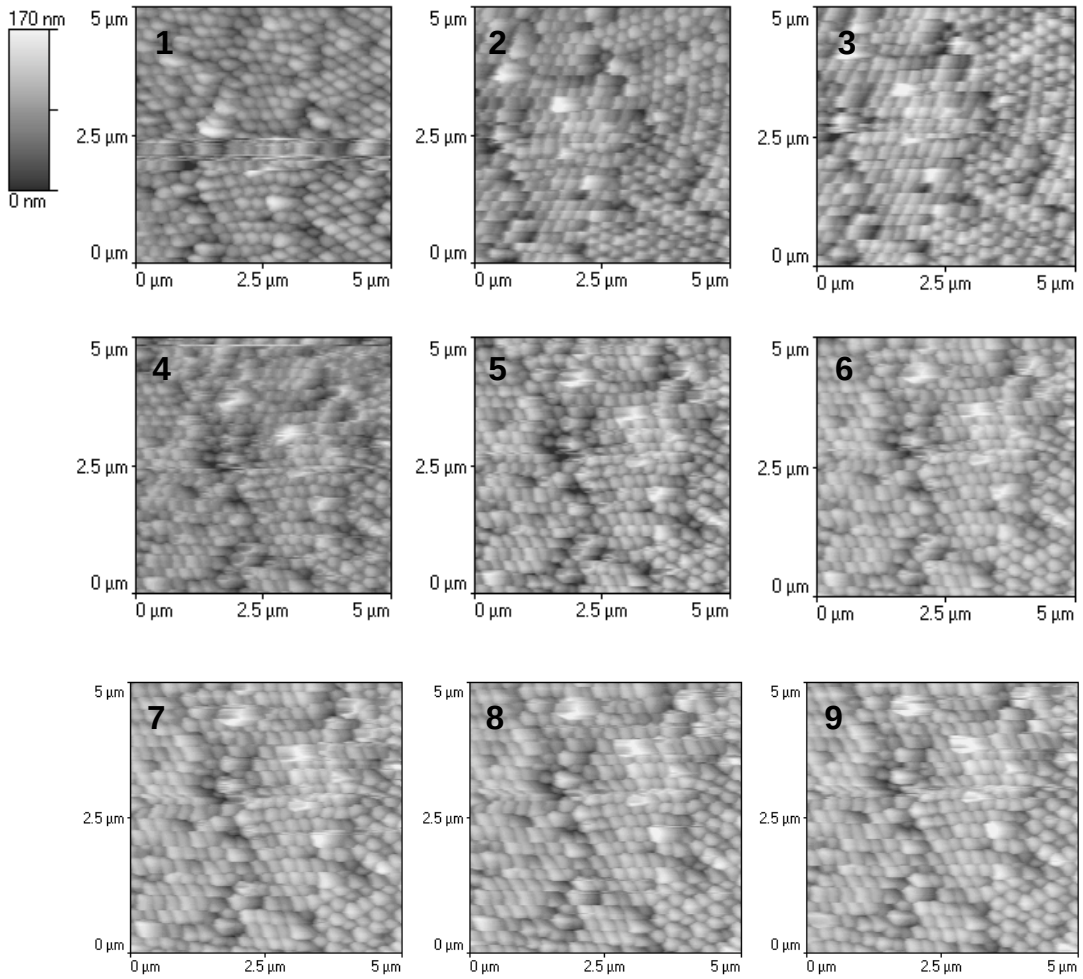


Abb. 7.13 Topographie der Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln, 5x5 µm-Rasterungen

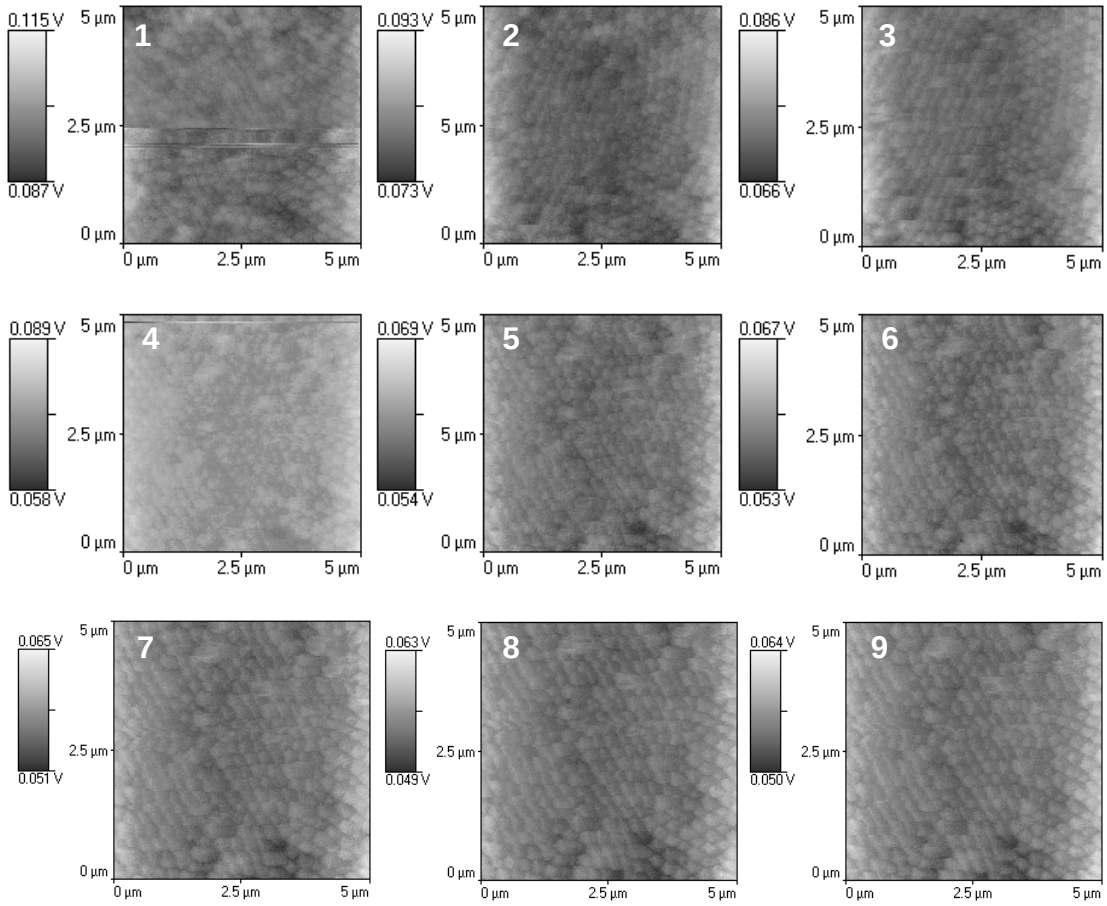


Abb. 7.14 Optische Bilder (Fluoreszenz, in Transmission) der Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln, 5x5 µm-Rasterungen

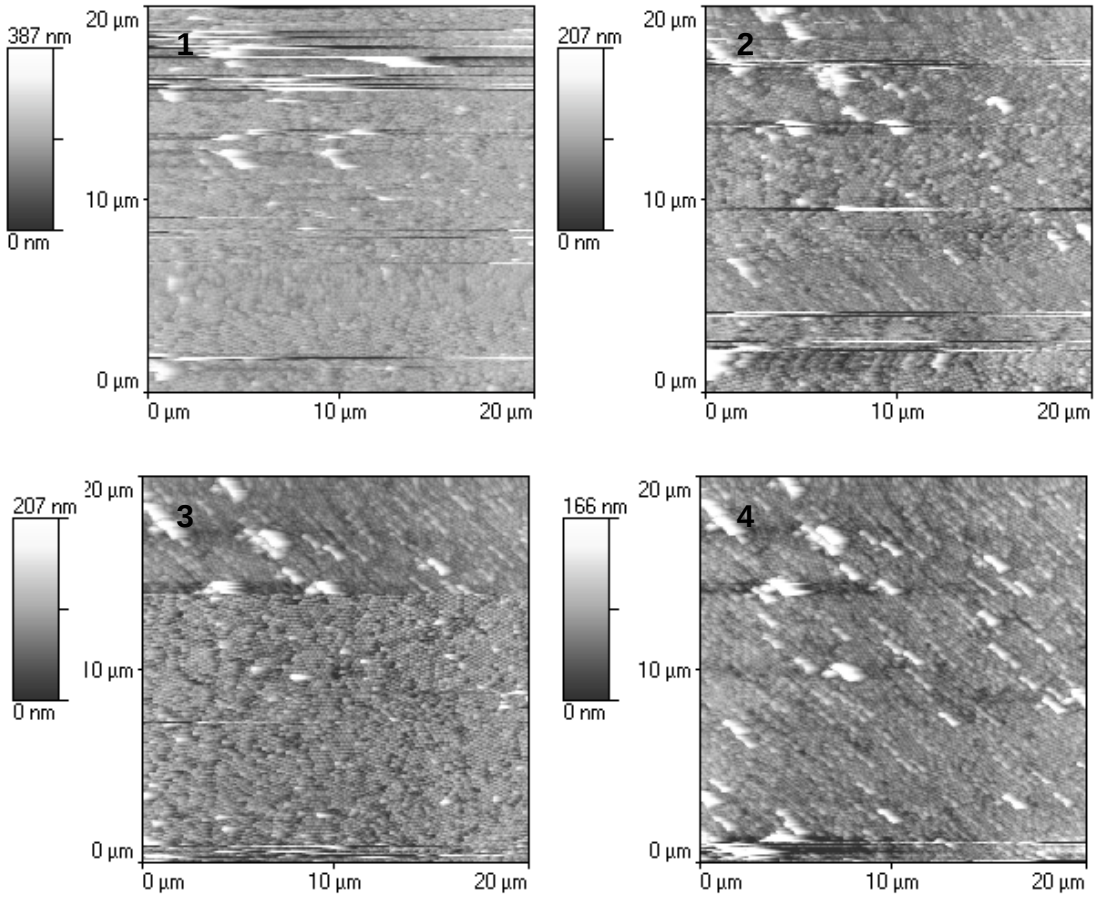


Abb. 7.15 Topographie der Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln, 20x20 µm-Rasterungen

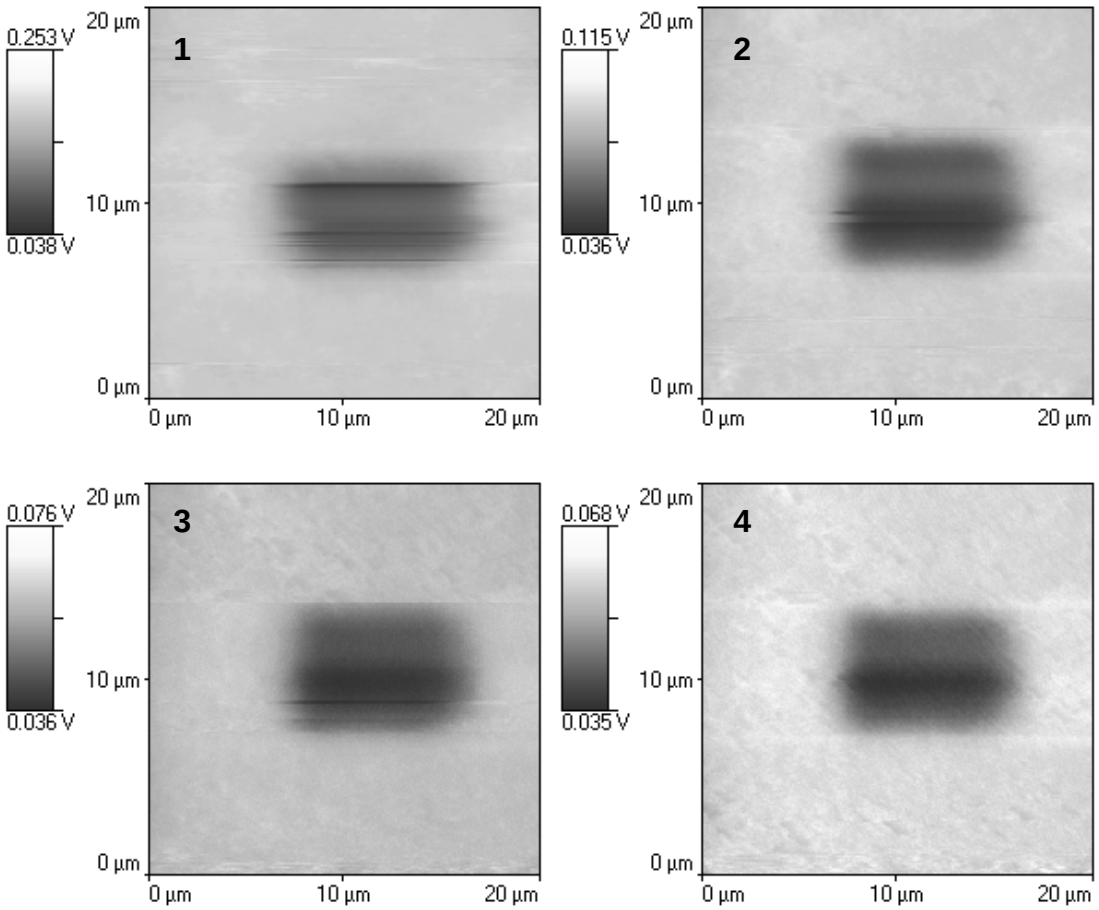


Abb. 7.16 Optische Bilder (Fluoreszenz, in Transmission) der Monolage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln, 20x20 µm-Rasterungen
Die Bereiche innerhalb und ausserhalb des schwarzen Fleckes wurden separat mit *advanced leveling* bezüglich Stufen korrigiert. Die Grösse der schwarzen Flecken (von Rasterung 1 nach 4) beträgt 5 x 9.5, 6.4 x 9.2, 6.4 x 9.4 und 6.3 x 8.7 µm, im Schnitt also 6.0 x 9.2 µm.

5x5 µm-Rasterungen	Signal innen / V
0	125.5
1	
2	79.8
3	73
4	77.3
5	60.4
6	58.3
7	56.7
8	55.4
9	54.1

20x20 µm-Rasterungen	Signal innen / V	Signal aussen / V	Signal gemittelt / V
1	106.9	211.8	198.8
2	53.2	100	94.6
3	42.8	65.6	62.8
4	40.9	58.5	56.5

Tab. 7.3 Aus den optischen SNOM-Bildern der 5x5 µm (oben) und 20x20µm-Rasterungen (unten) berechnete durchschnittliche Signalwerte
Alle Bilder wurden vorgängig mit *leveling* rsp. *advanced leveling* (für Abb. 7.16) bearbeitet. Für die Signalwerte der 5x5 µm-Rasterungen wurde der Mittelwert über das ganze Bild erfasst; für die Rasterung 0 wurde der Mittelwert über den Bereich mit der für die restliche Serie verwendeten Photomultiplierspannung genommen. Der Wert für die Rasterung 1 fehlt, da das Dokument bei einem Computerfehler beschädigt worden war. Die Signalwerte der 20x20 µm-Rasterungen wurden in *Signal innen* (dunkler Fleck in der Mitte, Mittelwert über 5x5 µm zentriertes Quadrat), *Signal aussen* (Bereich um den dunklen Fleck, Mittelwert über unteres Bilddrittel) rsp. *Signal gemittelt* (Mittelwert über das ganze Bild) aufgeteilt.

In Tab. 7.X ist die Entwicklung der Signalwerte über die Rasterungen aufgeführt; Abb. 7.17 zeigt die Entwicklung der ermittelten Signalwerte in Abhängigkeit der impliziten Variable Zeit.

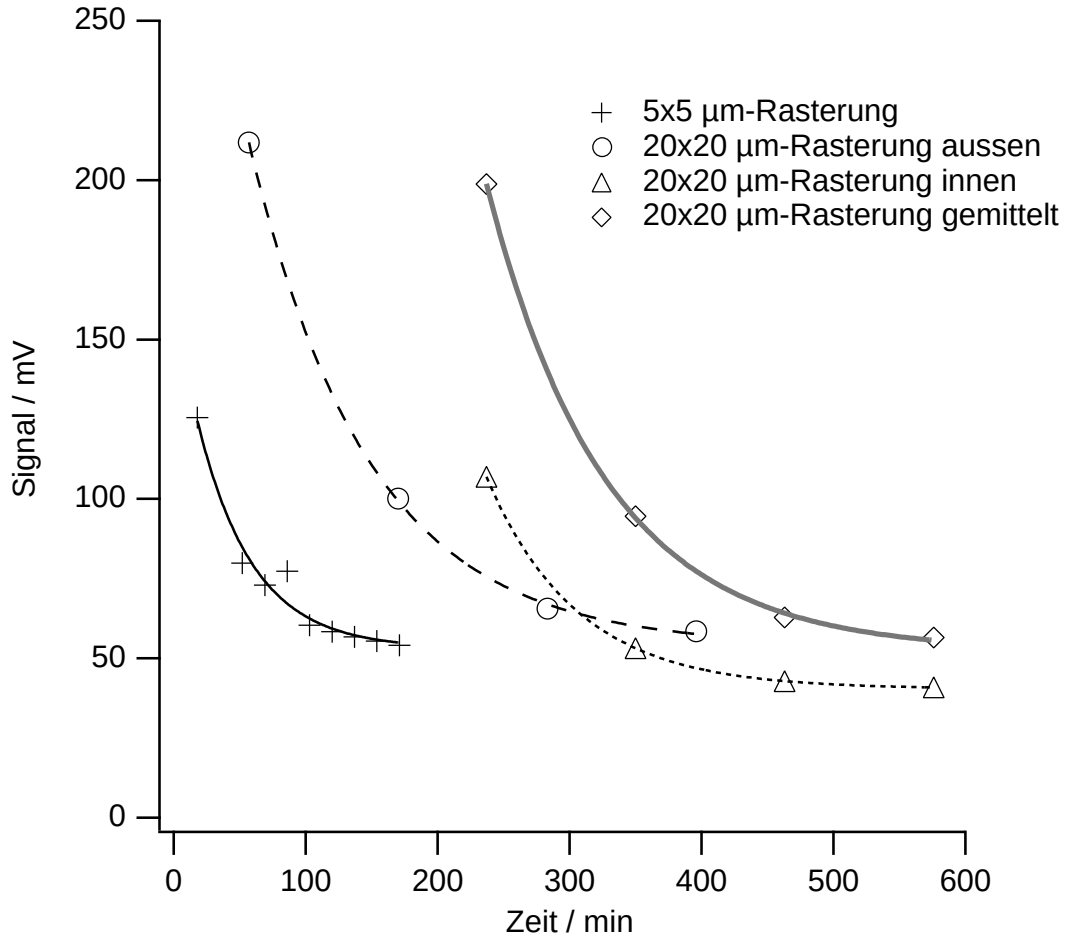


Abb. 7.17 Optisches Signal (Fluoreszenz) in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Rasterungen
Die Konstante des exponentiellen Zerfalles ist 0.0238 min^{-1} für die 5x5 µm-Rasterung, 0.0146 rsp. 0.0110 min^{-1} für die 20x20 µm-Rasterungen innen rsp. aussen.

7.4.7 Stabilität der SNOM-Rastervorrichtung

Ueber die Bilder in Abb. 7.13 wurde eine auffälliges Merkmal in der Topographie (vorstehende Kugel) über alle 5x5 µm-Rasterungen hinweg verfolgt und jeweils dessen Koordinaten in Rasterpunkten ermittelt (Tab. 7.4). So ist es möglich, die Stabilität der Rastervorrichtung zu beurteilen. Zu Beginn der Rasterungen treten zudem Verzerrungen auf, bei dem ein Teil der Topographie gestaucht oder gedehnt erscheint; diese können aber nicht systematisch erfasst werden.

5x5 µm-Rasterung	Spalte / Punkte	Zeile /
1	277	
2	247	
3	247	
4	243	
5	231	
6	228	
7	222	
8	216	
9	211	

Tab. 7.4 Koordinaten eines über mehrere Rasterungen verfolgten Merkmales in der Topographie. 300 Punkte entsprechen 5 µm.

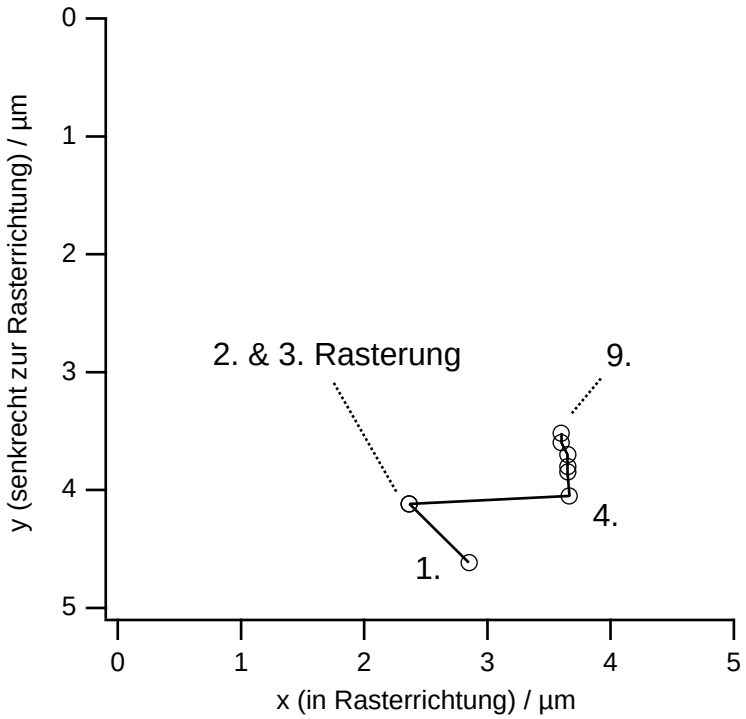


Abb. 7.18 Weg eines Topographiemerkmals über mehrere SNOM-Bilder verfolgt
Der oberste Punkt entspricht der Anfangsposition, jeder Punkt entspricht einer Rasterung. Die Distanz zwischen dem ersten und dem letzten Punkt beträgt 1.33 µm; der maximale Unterschied in x-Richtung beträgt 1.3 µm, in y-Richtung 1.1 µm. Für die letzten 5 Rasterungen ist im Schnitt $\Delta x \sim 10$ nm und $\Delta y \sim 80$ nm.

7.4.8 Kalibrierung des Photomultipliers

Für die Kalibrierung wurde die Ar-Ionenlaserlinie bei 514 nm verwendet. Sie wird in dieser Messung als Ersatz für die Fluoreszenz des gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes gebraucht. Das Maximum der schmalen Emissionsbande liegt zwischen 515 und 520 nm mit wesentlichen Beiträgen nur im Bereich zwischen 500 und 550 nm. Ueber diesen Bereich nimmt die Quanteneffizienz des Photomultipliers R3788 von 12 auf 10% ab [51], was sich etwa ausmittelt.

Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass eine Lichtstrahl bekannter Intensität durch Graufilter abgeschwächt wird, da die Intensitäten sonst nicht mehr zuverlässig gemessen werden können. In eine Spitze mit grosser Transmission wurde die 514 nm-Linie des Ar-Ionenlasers eingekoppelt. Durch

eine Lochblende vor dem Photomultiplier wurde garantiert, dass sämtliches durchtretendes Licht auch auf die Oeffnung des Photomultipliers fiel; an der Detektionsgeometrie wurde sonst nichts verändert. Die so einfallende Lichtleistung wurde mit dem Lichtleistungsmessgerät zu 283 nW bestimmt. Bei der während den Bleichexperimenten mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff eingestellten Photomultiplierspannung von 497 V wurde das Photomultipliersignal (am Gerät ausgegeben) rsp. das Aurora-Signal (für die effektive Datenaufnahme verwendet) in Abhängigkeit verschiedener Graufilterkombinationen registriert. Die Graufilter (LC-NDQSET1-25 von Laser Components, Olching, Deutschland) wurden vor dem Einkoppler in der Reihenfolge abnehmender optischer Dichte in den Laserstrahl gestellt. Die Messwerte aus Tab. 7.5 sind in Abb. 7.19 graphisch dargestellt.

Graufilter / O.D.	PM-Signal	Aurora-Signal / V	berechnete Intensität / Photonen·s^{-1}
∞ (Laser abgedeckt)	0.05	0.028	0
5	0.08	0.044	$7.32 \cdot 10^{6}$
4.5	0.12	0.067	$2.32 \cdot 10^{7}$
4.3	0.19	0.097	$3.67 \cdot 10^{7}$
4.1	0.21	0.109	$5.82 \cdot 10^{7}$
4.0	0.25	0.128	$7.32 \cdot 10^{7}$
3.8	0.42	0.214	$1.16 \cdot 10^{8}$
3.5	0.79	0.400	$2.32 \cdot 10^{8}$

Tab. 7.5 Kalibrierung des Photomultipliers R3788 mittels Graufilter mit der Ar-Ionenlaserlinie bei 514 nm und 497 V Photomultiplierspannung
Zur Verfügung standen Graufilter mit der optischen Dichte 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 und 3.0; verwendet wurde jeweils die Kombination mit möglichst wenig Filtern. Der Laserstrahl wurde kurz abgedeckt und die Werte 5 s danach abgelesen; für die grösseren Intensitäten nahmen die Signale mit der Zeit ab. Die Intensität wird in Photonen·s^{-1} (oder counts per second) angegeben (283 nW bei 514 nm entsprechen $7.32 \cdot 10^{11}$ Photonen·s^{-1}).

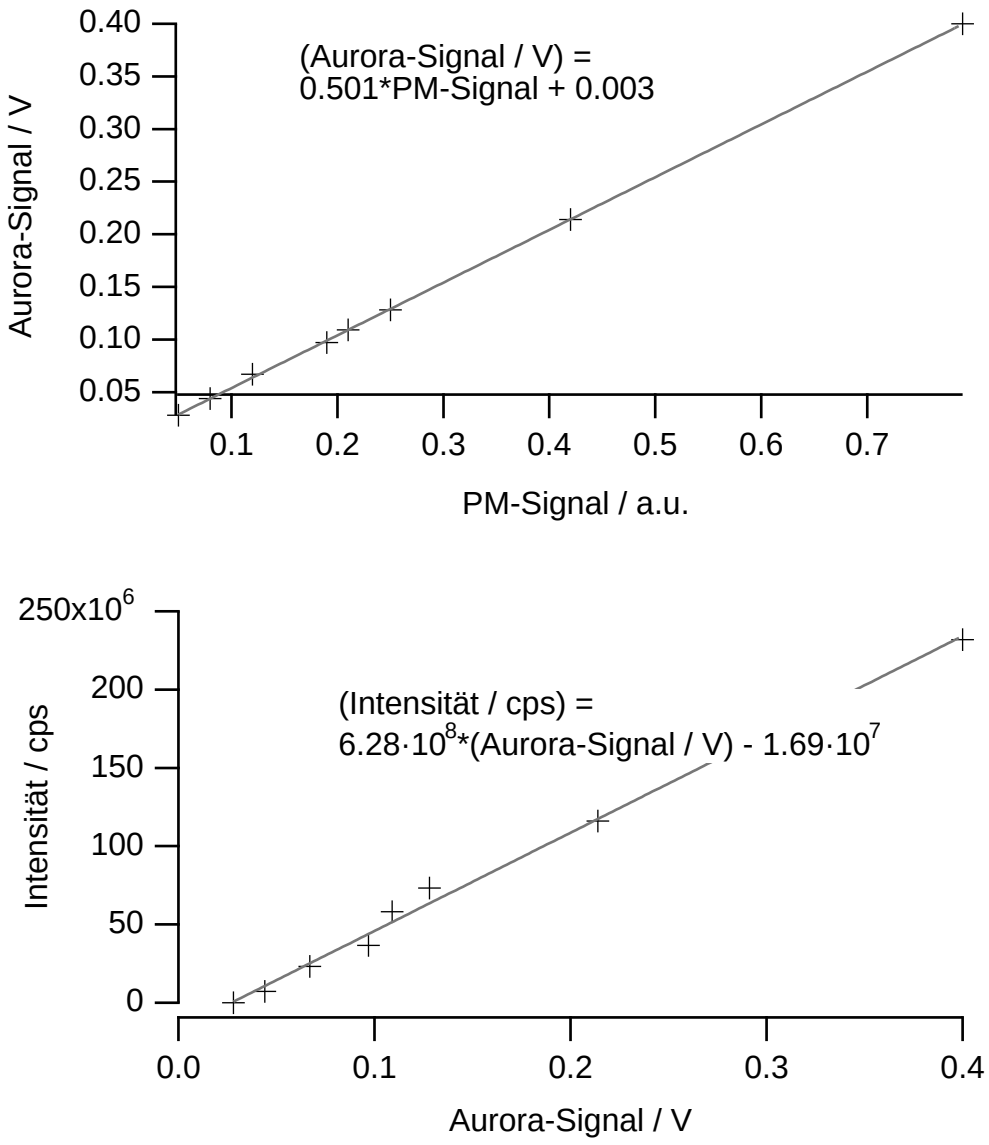


Abb. 7.19 Kalibrierung des Photomultipliersignals
Für die lineare Regression wurden die Intensitäten mit der Anzahl verwendeter Filter gewichtet (Abdecken entspricht einem Filter), um durch die Graufilter eingeführte Fehler zu korrigieren.

Das am Gerät ausgegebene Photomultipliersignal ist streng linear zum für die Datenaufnahme verwendeten Aurora-Signal mit einer kleinen additiven Konstante, wie vom Hersteller spezifiziert. Die Intensität ist im gewählten Bereich gut linear zum ausgegebenen Signal; einzelne Werte können natürlich

durch die unterschiedliche Anzahl zur Intensitätsminderung gebrauchter Graufilter verschieden genau sein. Dies wird bei der Kalibrationsgerade durch die Gewichtung mit der Anzahl Filter ausgeglichen.

7.4.9 Vollständige Daten zum Bleichen einer Zweierlage der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln im Fernfeld

Der Spektrograph war für diese Messung grob mit einer Vierpunktekalibration (Anregungslicht bei 488 nm sowie 3 Werte zwischen 600 und 650 nm) kalibriert worden. Die in Tab. 7.6 angebenen Intensitäten entsprechen dem Maximum bei 515 nm der Fluoreszenzbande.

Zeit / min	Intensität (515 nm) / counts
10	26140
30	22994
50	17953
70	13093
90	11050
110	9623
130	8552
150	8238
170	7326
190	6869
210	6562
230	6176
250	5957
270	5602
290	5661
310	5446
330	5250
350	5171
370	4975
390	4752
410	4634
430	4624
450	4621
470	4671
490	4494
510	4328
530	4316
550	4320

Tab. 7.6 Abnahme der Counts des 515 nm entsprechenden Pixels der CCD-Kamera des Spektrographen

7.4.10 Stabilität des Ar-Ionenlasers

Die Leistung des Omnichrome Ar-Ionenlasers wurde in Abhängigkeit der Zeit beobachtet (Tab. 7.7). Ueber einen hochreflektierenden Spiegel wurde der Laserstrahl (488 nm) derart auf die Mitte des fest montierten Lichtleistungsdetektors geworfen, dass die gemessene Leistung maximal war. Der Detektor wurde jeweils nur während der Messung dem Laserstrahl exponiert.

Zeit / h	Leistung (488 nm) / mW
0.17	43.1
0.60	38.8
0.95	35.8
1.58	34.4
2.45	33.9
19.53	33.4

Tab. 7.7 Stabilität des Lasers in Abhängigkeit der Zeitdauer nach dem Einschalten

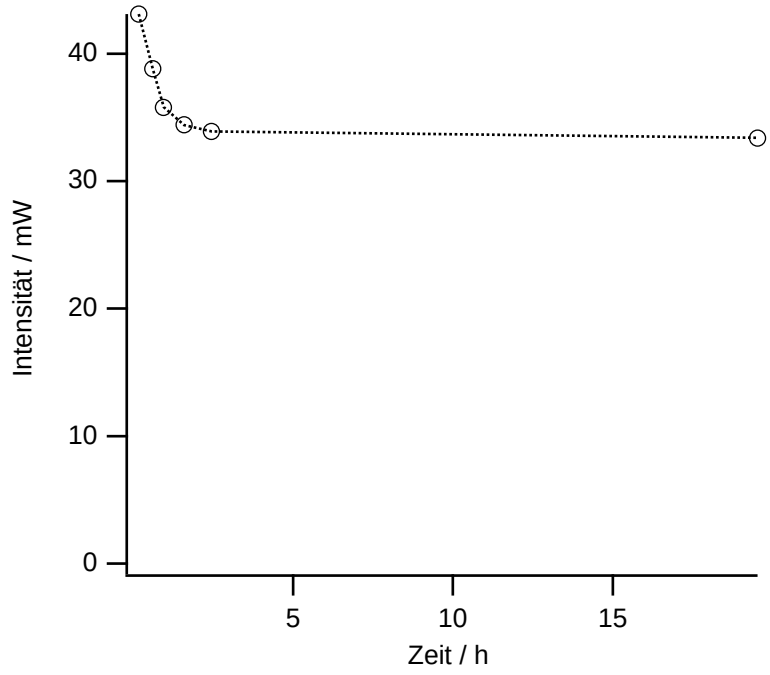


Abb. 7.20 Stabilität des Lasers

Wie Abb. 7.20 zeigt, ist der Ar-Ionenlaser gut 2 h nach Einschalten stabil. Diese Messung gibt natürlich nur die thermodynamische und thermomechanische Stabilität (Aufheizen der Laserröhre, Aenderungen der Kavität durch Ausdehnung der Stellschrauben) wieder. Die Erfahrung zeigte, dass Erschütterungen auch zu abrupten Aenderungen der in die Glasfaser eingekoppelten Lichtleistung führen kann.

7.4.11 Vergleich der Fluoreszenz der mit Nilrot und den mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Latexkugeln

Beide verwendete 2%ige *FluoSpheres*-Lösungen wurden 1 : 5000 mit Wasser verdünnt (20 µl aus Mikropipette auf 100 ml), 5 Minuten ultrabeschallt und deren Emissionsspektren aufgenommen. Abb. 7.21 zeigt die erhaltenen Spektren.

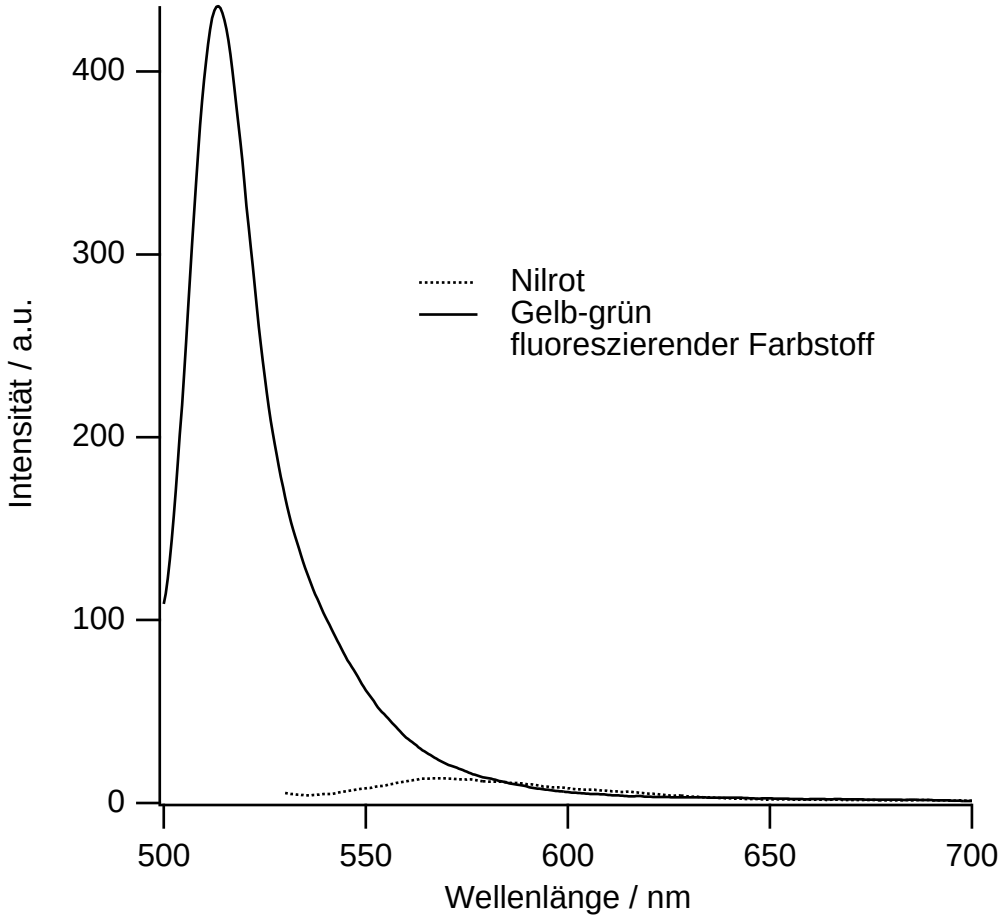


Abb. 7.21 Vergleich der Fluoreszenz der mit dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoff-markierten mit den Nilrot-markierten Latexkugeln gleicher Konzentration (2%ige käufliche Lösung, 1:5000 verdünnt)
Das Verhältnis der Maximas beträgt 32, das Verhältnis der Integrale 13.

Die gut vor einem halben Jahr gekauften *FluoSpheres* sind im Kühlschrank verschlossen aufbewahrt worden, d.h. Oxidation, Bleichen oder Verdunsten waren verhindert worden. Trotzdem zeigen die Spektren eine um eine Grössenordnung kleinere Fluoreszenz des Nilrot gegenüber dem gelb-grünen Fluoreszenzfarbstoffes. Mögliche Fehlerquellen bei der Messung waren der Volumenfehler verwendete Mikropipette und Inhomogenität der *FluoSpheres*-Lösungen, da die Lösungen in den Orginalverpackungen nur geschüttelt, nicht aber ultrabeschallt werden konnten.
Diese Fehler liegen jedoch kaum in dieser Grössenordnung. Der Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten wird deshalb auf die unterschiedlichen Eigenschaften der in den Latexkugeln enthaltenen Farbstoffe zurückzuführen sein.

7.5 Polymermodifikation

7.5.1 Kalibrierung des verwendeten Spin-Coaters

Als Spin-Coater diente ein vertikal montierter Gleichstrommotor, auf dessen Achse die 18x18 mm Deckgläser mit doppelseitigem Klebeband befestigt wurden. Durch ein stabilisiertes Netzgerät (Roline) war die Spannung stufenlos zwischen 3 und 15 V regelbar; die effektiven Umdrehungszahlen in Abhängigkeit der Spannung wurden mit einem Stroboskop (1538-A Strobotac von General Radio) ermittelt.

Spannung / V	Umdrehungszahl / $U \cdot min^{-1}$
3	2340
4	3200
5	4000
6	4700
7	5600
8	6450
9	7200
10	8000
11	8800
12	9600
13	10450
14	11300
15	12350

Tab. 7.8 Kalibrierung des Gleichstrommotors

In Tab. 7.X sind die Messwerte aufgelistet und Abb. 7.X zeigt die dazugehörige Kalibrationsgerade.

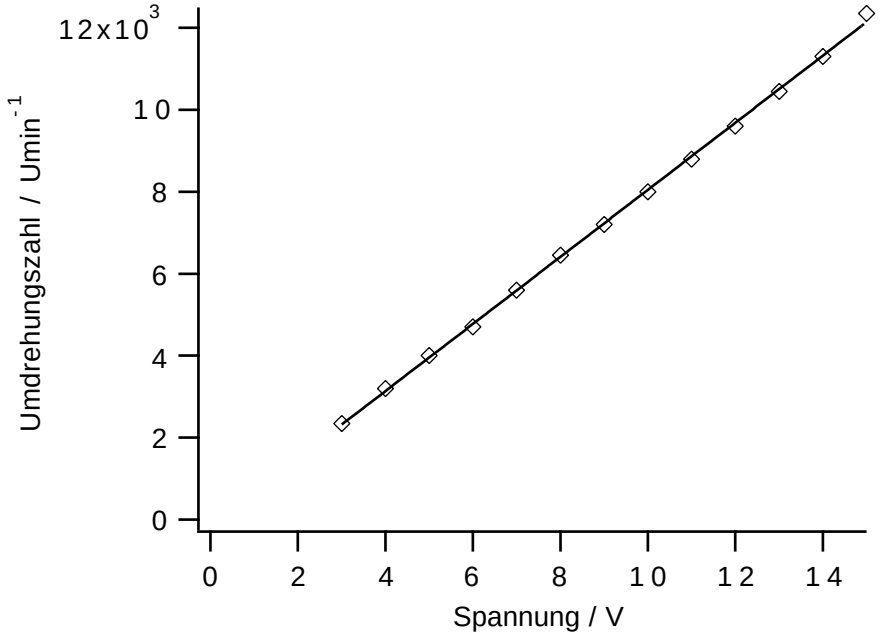


Abb. 7.22 Kalibrationsgerade des Gleichstrommotors (Umdrehungszahl / rpm) = 821·(Spannung / V) - 164

7.5.2 Daten zur Polystyrolmodifikation

Das Aurora-SNOM von Topometrix mit der verwendeten Version der Software SPM-Lab 3.06.06 kann die Piezos der Rastervorrichtung nicht beliebig ansteuern. Zur Verfügung stehen Linienrasterungen (in beliebigem Winkel) und eine *Zoom and Translate*-Funktion (Positionierung eines bis 35x35 μm grossen Rasterbereichs innerhalb von 35x35 μm) zur Verfügung. Durch die begrenzte Stabilität der Rastervorrichtung ist die *Zoom and Translate*-Funktion aber nur begrenzt einsetzbar. Für die Lichteinkopplung in der Mitte des 5x5 μm-Rasterbereichs wurde mit *Zoom and Translate* ein konzentrisches Quadrat von 1x1 μm in der Mitte des ursprünglichen Rasterbereichs gewählt, wodurch die Spitze 2 μm nach rechts und unten verschoben werden sollte. Nach erfolgter Lichteinkopplung in Ruhe wird der Rasterbereich wieder auf 5x5 μm vergrössert und normal gerastert. Dadurch kann es vorkommen, dass der Bildbereich sich massiv verschiebt (vgl. Krater in Bild 3 und Bild 4 der Abb. 7.23).

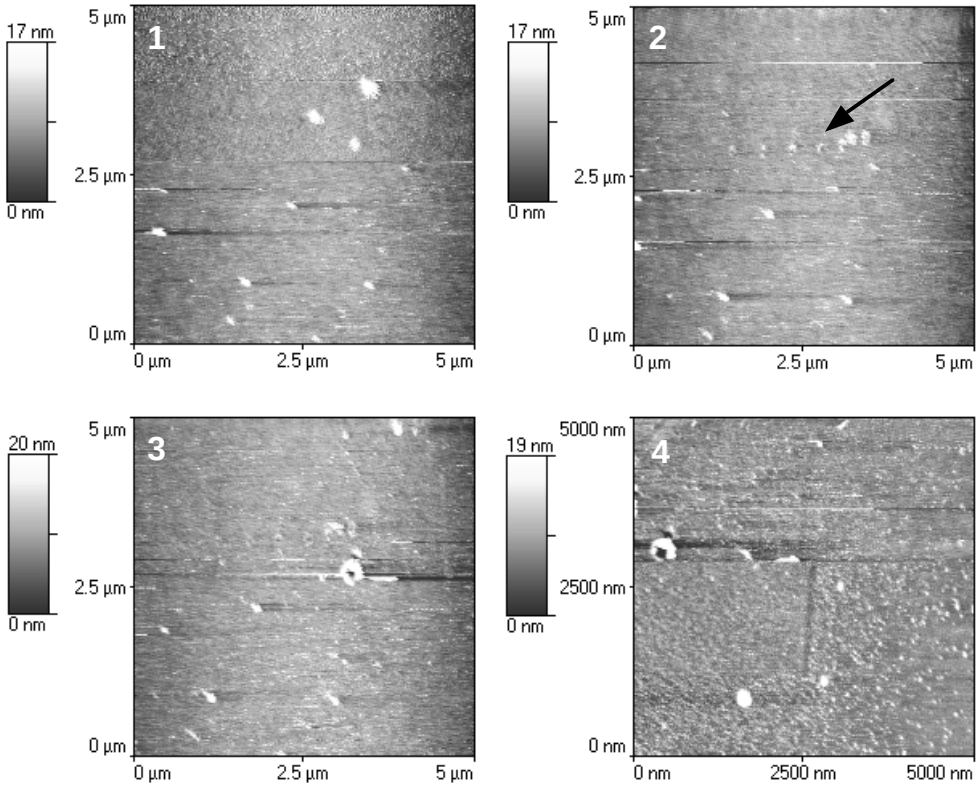


Abb. 7.23 Modifikationen an einem etwa ~120 nm dicken Polystyrolfilm mit einer geätzten Spitze (5° Kegelwinkel, goldbeschichtete Single-mode Glasfaser)
Bilder 1 - 4 sind aufeinanderfolgende Topographiebilder, während den Modifikationen mit eingekoppeltem 410nm-Licht mit 20 Hz Pulsrate vom MOPO aufgenommen. Der Pfeil in Bild 2 markiert die Linie von kleinen Aufwerfungen (etwa 5), die durch Lichteinkopplung während dem Rastern auf Teilen der 140sten Linie in Bild 1 geschaffen wurden. Bild 3 zeigt einen Krater, der durch Lichteinkopplung während 10 s in der Mitte des Bildes (Spitze in Ruhe) entstand; das gleiche Vorgehen vor Aufnahme des Bilds 4 zeigte keinen weiteren Krater wegen der Drift der Rastervorrichtung (der Krater in Bild 4 ist der gleiche wie in Bild 3).

7.5.3 Daten zur Polyvinylbutyralmodifikation

Relevant für die Modifikationen entlang einer Rasterlinie ist die Tatsache, dass das SNOM eine Linie zweimal, nämlich in Hin- und Rückrichtung abrastert. Da der MOPO nicht mit der Rastervorrichtung synchronisiert war, wurde versucht, Licht z.B. nur in der Hinrichtung einzukoppeln. Dies gelang nicht immer, so

dass ein Teil der Strukturen über den Rand zurückgefaltet wird und zu scheinbar unregelmässigen Abständen zwischen den Strukturen führt (siehe z.B. die beiden obersten Bänder in Bild 2 in Abb. 7.24).

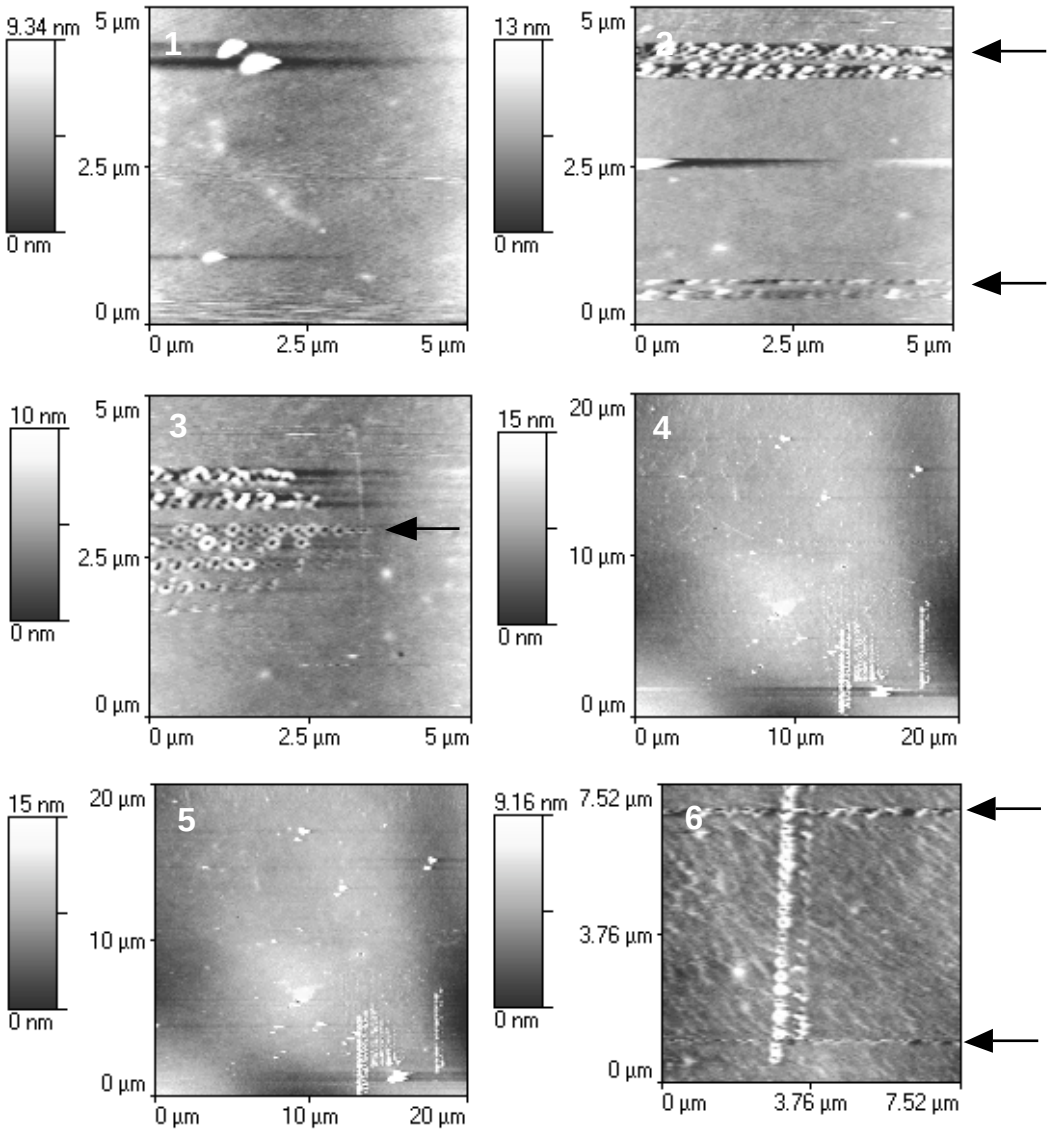


Abb. 7.24 Modifikationen an einem etwa ~120 nm dicken Polyvinylbutyralfilm mit einer geätzten Spitze (25° Kegelwinkel, aluminiumbeschichtete Multimode Glasfaser)
Bilder 1 - 6 sind aufeinanderfolgende Topographiebilder, während den Modifikationen mit eingekoppeltem 480 nm-Licht mit 20 Hz Pulsrate vom MOPO aufgenommen. Bild 1 zeigt den Film vorher, Bild 2 nachdem auf den mit Pfeilen bezeichneten Bereichen während dem Rastern (Geschwindigkeit 5 µm/s) Licht eingekoppelt worden war. Bild 3 gibt die fünf, voneinander je etwa 10 Linien entfernten Bänder (Beginn bei Pfeil) wieder, die durch Lichteinkopplung während der Rasterung vorher geschaffen wurden; die Verschiebung nach links ist eine Folge der Instabilität der Rastervorrichtung. Die Bilder 4 und 5 zeigen den um 90° gedrehten und auf 20x20 µm vergrösserten Rasterbereich. Bild 6 ist ein mit ein *Zoom and Translate* gewählter Rasterbereich (rechts unten in Bild 5), bei dem während dem Rastern (siehe Pfeile) Licht eingekoppelt wurde.

7.5.4 Daten zum Temperaturprofil der Spitze

Die in die Spitze (geätzt, organisches Lösungsmittel p-Xylol) eingekoppelte Leistung wurde indirekt bestimmt. Hierzu wurde mit einer Glasplatte unter 5° zur Strahlrichtung ein Teil des Laserlichtes ausgekoppelt um eine zur in die Spitze eingekoppelten Leistung proportionale Grösse zu erhalten. Bei 15.1 mW Laserleistung wurden 1.1 mW mit der Glasplatte ausgekoppelt und 2.5 mW in die Fiber eingekoppelt. Aus der Spitze traten so 1.6 μW aus, was einer Transmission von 0.06 % entspricht.

Abstand vom Apex / μm	nötige Laserleistung / mW für 50°C	nötige Laserleistung / mW für 130°C
410	2.554	
310	2.059	2.497
230	1.786	
200	1.680	2.043
110	1.387	1.589
45	1.183	
0	0.776	1.021

Tab. 7.9 Temperaturen an einer Spitze mit einem Kegelwinkel von 23° und 0.06% Transmission, bestimmt mit Signotherm Temperaturindikatoren von Merck

Der Abstand vom Apex konnte mit Hilfe eines mit einer Mikrometerschraube (Positioniertisch von Newport, Genauigkeit ± 1μm) positionierten Drahtes parallel zur Spitze bestimmt werden. Der Fehler durch den optischen Vergleich der Positionen mit Hilfe des Lichtmikroskops bei 200facher Vergrösserung dürfte etwa ± 2 μm betragen.

Für den 50°C-Wachs wurde die Position der Phasengrenze zwischen fest und flüssig bestimmt; für das 130°C-Wachs war dies nicht möglich, da nicht genug Wachs auf die Spitze gebracht werden konnte. Bei verschiedenen Abständen vom Apex wurde deshalb das Wachs am Ende eines Drahtes mittels Mikrometervortrieb herangefahren und schmolz an der Spitze. Der Laserleistung wurde verkleinert, wodurch der Wachs erstarrte und mit dem Draht an der Spitze haften blieb. Danach wurde die Leistung wieder langsam aufgedreht und die Laserleistung notiert, bei der sich der unter einer leichten mechanischen Spannung stehende Draht von der Spitze wieder löste.

Aehnliche Versuche wurden auch mit einer Spitze mit kleinem Kegelwinkel (geätzt, Lösungsmittel Dibutylether) gemacht, es gelang aber nie, auf die dünne Spitze eine beobachtbare Menge Wachs zu bringen. Nach dem gleichen

Verfahren wie für das 130°C-Wachs bei der Spitze mit grossem Kegelwinkel konnte immerhin festgestellt werden, dass mit weniger als 0.6 mW Laserleistung am Apex eine Temperatur von 50°C auftritt und bei 6 mW bis 400 µm vom Apex weg die Temperatur über 50°C beträgt.