

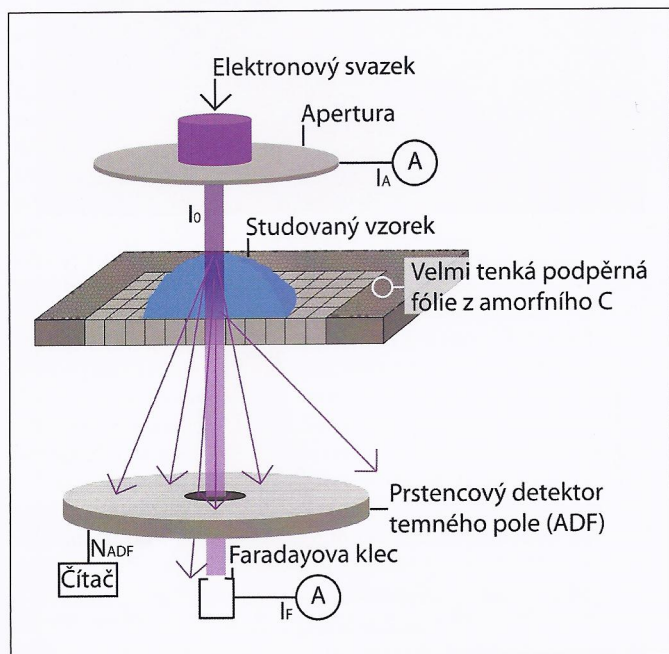
Měření hmotnosti pomocí elektronového mikroskopu

Rastrovací elektronový mikroskop (REM) je známý zejména pro zobrazování a studium povrchů vzorků, ale po vhodné kalibraci lze jeho funkce rozšířit o kvantitativní měření, kterému se věnuje tento článek. Přidané využití REMu je demonstrováno na měření lokální tloušťky velmi tenkých vzorků pomocí prstencového detektoru temného pole. Vhodnými objekty v tomto případě jsou např. tenké filmy, nanočástice, makromolekulární komplexy, u kterých se tímto způsobem dá měřit celková hmotnost, rozložení hmotnosti na jednotku délky v případě vláken, či na jednotku plochy v případě již zmíněných tenkých vrstevnatých preparátů. Kromě toho se dá tato metoda aplikovat absolutně, tj. bez nutnosti použití jakýchkoliv standardů tlouštěk, respektive hmotnosti.

Klíčová slova: REM, SEM, RTEM, STEM, kvantitativní zobrazování, temné pole

1. ÚVOD

Elektronové mikroskopy lze rozdělit do tří kategorií: rastrovací elektronové mikroskopy (REM) pracující s elektronovým svazkem o energiích ≤ 30 keV, transmisní elektronové mikroskopy (TEM) a rastrovací transmisní elektronové mikroskopy (RTEM) pracující typicky na vyšších energiích. V posledních letech se často vyskytuje transmisní mód také v REMech, kde se nižších energií využívá např. pro zobrazování vzorků s významným podílem atomů s nízkým atomovým číslem, bez potřeby jakéhokoliv kontrastování, typického např. v klasických biologických aplikacích pro TEM. Tím se „nízkoenergový RTEM“, umožňující pozorovat biologické materiály blíže přirozenému stavu, stává v současné době velmi důležitým. Transmisní detektory bývají často segmentovány do několika částí se specifickým snímáním různých typů elektronů, jako jsou nerozptýlené elektrony a nepružně rozptýlené elektrony (detekovány středovou částí detektoru pro světlé pole) a pružně rozptýlené elektrony (detekovány prstencovým detektorem temného pole (anglicky annular dark-field, ADF), viz obr. 1).



Obr. 1 Princip kvantitativního zobrazování pomocí ADF detektoru

Při vhodné kalibraci lze TEM/RTEM využít rovněž pro kvantitativní měření tlouštěk, jež bylo navrženo Zeitzlerem a Bahrem [1]. Počet pružně rozptýlených elektronů je dán vztahem

$$N = N_0 \left(1 - \exp \left(- \frac{n \langle \sigma_{el} \rangle}{A} \right) \right),$$

kde $\langle \sigma_{el} \rangle$ je střední hodnota účinného průřezu pružného rozptylu atomů, které tvoří část vzorku ozářeného elektronovým svazkem o ploše A , n je počet atomů ozářeného vzorku a N_0 je počet elektronů dopadajících na plochu A . Jestliže je svazek v REMu zfokusován tak, že ozářuje plochu jednoho pixelu obrazové matice, pak za plochu A můžeme dosadit právě velikost pixelu. Pro proud svazku I_0 platí známý vztah

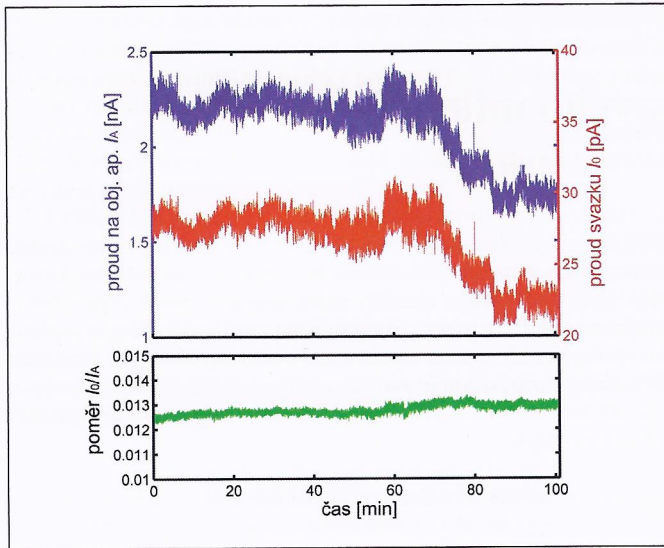
$$N_0 = \frac{I_0 \Delta t}{e},$$

kde Δt je časový interval (v REM tzv. pixel time) a $e = 1,6 \times 10^{-19}$ C je elementární náboj elektronu.

2. MODIFIKACE REM

Pro dosažení přesných měření na vzorcích v nanometrové škále je potřeba použít vysokorozlišovací REM, v našich experimentech je to REM S-5000 (Hitachi Ltd., Japonsko). Tento REM je vybavený studeným autoemisním zdrojem elektronů a imerzní objektivovou čočkou, což umožňuje rozlišení kolem 0,5 nm v transmisním módu při energii elektronů 30 keV, která je v níže popsaných experimentech standardně používána.

REM je vybaven citlivým ADF detektorem schopným počítat jednotlivé elektrony (obr. 1), aby jej bylo možné použít i při velmi nízkých dávkách elektronů pro studium sensitivních materiálů. Tento nekomerční ADF detektor se skládá z velmi rychlého plastického scintilátoru (BC-404, Saint Gobain Crystal & Detectors, USA; doba dozrívání 1,8 ns, pološíře pulsu 2,2 ns). Tyto pulzy jsou zesíleny pomocí fotonásobiče s vysokým ziskem (XP2020UR, Photonis, Francie; zisk 3×10^7 , doba náběhu 1,6 ns), který pracuje v pulzním režimu. Signál na výstupu z fotonásobiče je následně zesílen, zbaven šumu pomocí diskriminátoru a binární pulzy, které reprezentují jednotlivé elektrony dopadající na plochu scintilátoru, jsou počítány pomocí rychlého čítače. To umožňuje zobrazování a zároveň kvantitativní měření při nízkých dávkách, čímž se minimalizují artefakty způsobené elektronovým svazkem, jako jsou např. úbytek hmoty a kontaminace vzorku.



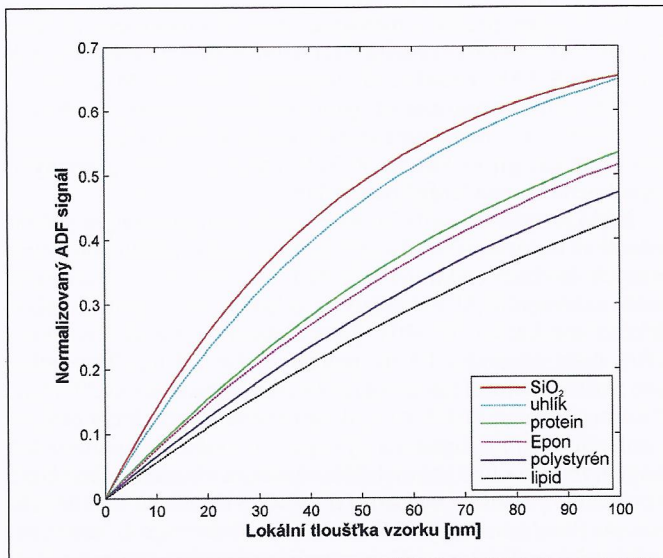
Obr. 2 Simultánní měření proudů svazku I_0 Faradayovou klecí I_F (červená křivka) a proudů na objektivové apertuře I_A (modrá křivka). Zelená křivka znázorňuje poměr R_1 mezi oběma proudy

Vzhledem ke studené autoemisi, která je známá typickým šumem a proudovými nestabilitami, je proud svazku v době snímání ADF signálu monitorován pomocí měření proudů na objektivové apertuře (obr. 1). Jak ukazuje obr. 2, je poměr mezi proudem svazku I_0 a proudem na objektivové apertuře I_A stabilní, a tudíž jej lze použít jako faktor pro přepočítání obou proudů. Pro kvantitativní zobrazování tedy lze ADF signál normalizovat k proudem svazku, tj. hodnota pixelu nabývá hodnoty

$$X_{ADF} = \frac{N_{ADF}}{N_0} = \frac{N_{ADF}}{I_A R_1},$$

kde $R_1 = I_0/I_A$.

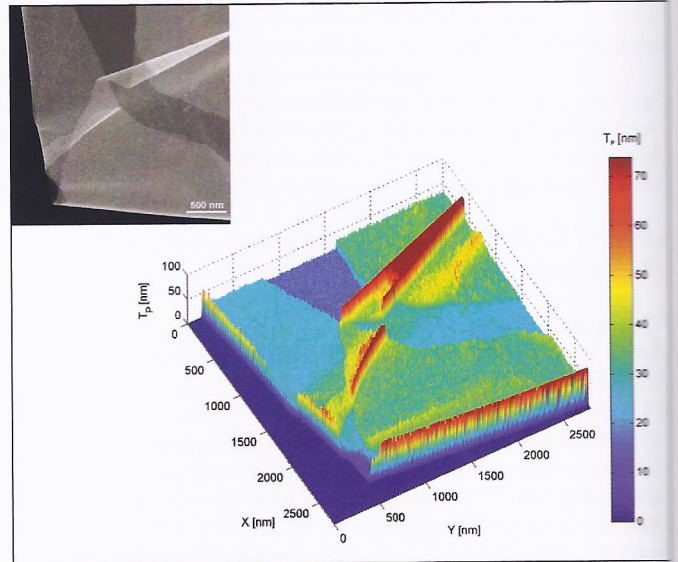
Výhodou normalizace je také poměrně jednoduchý teoretický popis pomocí stochastických metod. Za tímto účelem byl vyvinutý program MONCA [2], jenž pomocí Monte Carlo simulací rozptylu elektronů v tenké látce poskytuje odhad jejich chování v lokální oblasti vzorku. ADF signál je závislý na studovaném vzorku (složení materiálu, tloušťka), parametrech detektoru a elektronového svazku dopadajícího na vzorek. Obr. 3 ukazuje závislost ADF signálu na tloušťce pro různé materiály.



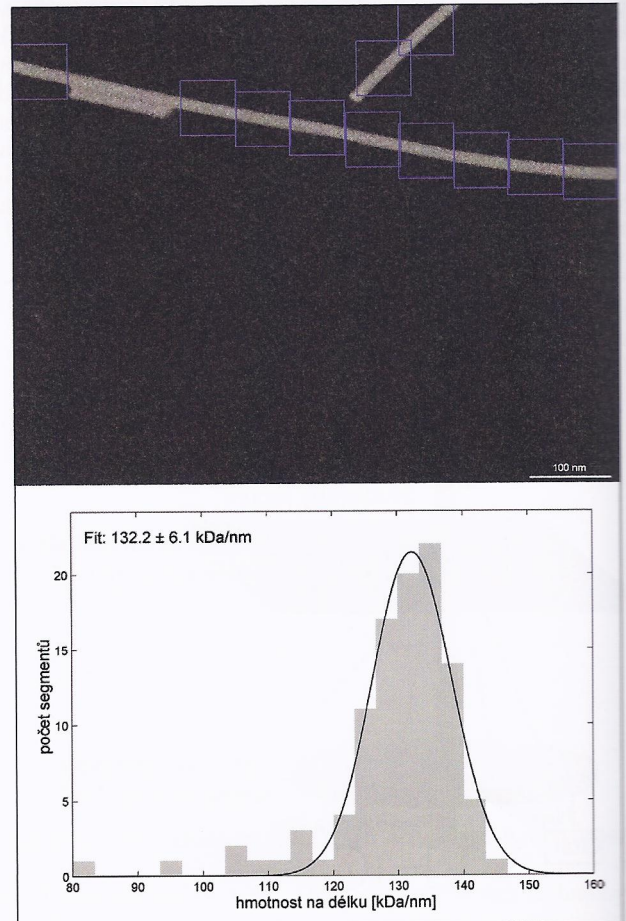
Obr. 3 Závislost normalizovaného ADF signálu X_{ADF} na tloušťce pro různé materiály pro mikroskop S-5000, 30 keV

Pro zpracování naměřených dat byl vyvinutý interaktivní, výsoce automatizovaný program MASDET [3], jenž na základě údajů získaných z MONCA provádí výpočet celkové hmotnosti globulárních struktur a nanočástic různého složení, rozložení hmotnosti na jednotku délky v případě vláknitých vzorků, či rozložení hmotnosti v ploše vrstevnatých preparátů a lokální tloušťky.

Popisovaná technika vyžaduje specifickou přípravu vzorků. Zatímco stabilní vzorky mohou být vysušeny na vzduchu, mnoho



Obr. 4 Mapování tloušťky náhodně přeložené velmi tenké uhlíkové fólie. Nahoře ADF obraz, dole přepočtená projekce tloušťky. Převzato z [3]



Obr. 5 Virus tabákové mozaiky (TMV). Nahoře ADF obraz, dole rozložení hmotnosti ve 104 segmentech

biologických hydratovaných vzorků, je nutno připravit pomocí kryo-metod. Pro ně byl vyvinut vitrifikací systém s možností nastavení podmínek okolního prostředí [4].

3. EXPERIMENTY

Výkonnost systému byla testována a ověřena na mnoha preparátech, jako jsou např. polystyrenové, uhlíkové či SiO₂ struktury, tloušťkou definované modely z epoxidové pryskyřice Epon (nejčastěji používaný materiál pro zalévání biologických vzorků pro TEM) nebo virus tabákové mozaiky (tobacco mosaic virus, TMV). Na obr. 4 je zobrazení mapování lokální tloušťky velmi tenké uhlíkové fólie, jež byla náhodně přeložena. Další příklad je prezentován obr. 5, kde je vidět ADF obraz TMV a graf rozložení hmotnosti na jednotku délky v modře označených segmentech. Tento druh vláknité struktury je velmi dobře prozkoumán, a tudíž často využíván jako kalibrační standard s hodnotou rozložení hmotnosti 131,5 kDa/nm. V současné době jsou testovány různé aplikace, jako např. měření hmotnosti polymerních vrstev, intermediálních filament, DNA-proteinových komplexů atd. Příkladem oválných vzorků, které vyžadují kryo-přípravu, mohou být polymerní duté kapsle, u kterých dochází k destrukci během sušení na vzduchu [5].

4. ZÁVĚR

Byla stručně představena hardwarová a softwarová rozšíření komerčního vysokorozlišovacího REMu pro měření hmotnosti nanoobjektů a lokální tloušťky tenkých vrstev. Ačkoliv existují

dva jednoúčelové RTEM systémy pro měření hmotnosti proteinů [6], zde představený systém, založený na moderním REMu, je mnohem jednodušší pro uživatele a navíc byl rozšířen o měření různých materiálů. Rozsah měřitelné tloušťky pro REM S-5000 je pro materiály z lehčích prvků přibližně sedminásobek střední volné dráhy elektronů v daném materiálu.

Literatura

- [1] E. Zeitler, G.F. Bahr, *J. Appl. Phys.* **33** (1962) 847.
- [2] V. Krzyžánek & R. Reichelt, *Microsc. Microanal.* **9** (Suppl. 3) (2003) 110.
- [3] V. Krzyžánek et al, *J. Struct. Biol.* **165** (2009) 78.
- [4] S. Tacke et al, *Proceedings of EMC2012* (2012).
- [5] V. Krzyžánek et al, *Soft Matter* **7** (2011) 7034.
- [6] *Adv. Imaging & Electron Phys.* **159** (2009) 101 & 357.

Autor děkuje Mgr. Kamile Dobranské (ÚPT) za pomoc při přípravě textu. Článek vznikl za podpory Evropské komise a MŠMT (projekt CZ.1.07/2.3.00/20.0103).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

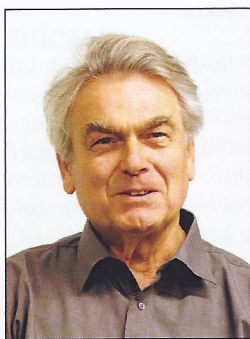
Ing. Vladislav Krzyžánek, Ph.D., Oddělení elektronové mikroskopie, Ústav přístrojové techniky Akademie věd České republiky, v. v. i., Královopolská 147, 612 64 Brno, tel.: 541 514 302, e-mail: krzyzanek@isibрно.cz

RNDr. Jiří Keprt, DrSc. osmdesátníkem

Počátkem října tohoto roku, se svou rodinou, přáteli a spolupracovnicí, RNDr. Jiří Keprt, DrSc. oslavil v plné svěžesti a pracovním nasazení osmdesáté narozeniny.

Narodil se 3. října 1932 v České Třebové v rodině průvodčího vlaku ČSD. Po maturitě na gymnáziu absolvoval v roce 1955 pedagogickou fakultu v Brně a od téhož roku pracoval jako učitel matematiky a fyziky na osmileté střední škole a o rok později na průmyslové škole pro pracující v České Třebové. Současně dálkově vystudoval (1959) přírodovědeckou fakultu Univerzity Palackého v Olomouci, kde si jeho talenty povšiml prof. RNDr. Bedřich Havelka, DrSc., a bylo jen logické, že Jiří Keprt v roce 1963 nastoupil jako odborný, později vědecký pracovník tehdejší nově zakládané Laboratoře optiky UP, nyní Společná laboratoř optiky Univerzity Palackého a Fyzikálního ústavu AV ČR, kde působí jako vedoucí vědecký pracovník dodnes. V roce 1967 obhájil rigorózní (RNDr.) a v roce 1968 kandidátskou (CSc.) práci z oboru optika – spektroskopie a v roce 1992 doktorskou disertační práci (DrSc.). V roce 1978 absolvoval půlroční velice odborně inspirující stáž v USA u prof. Leitha (Nobelova cena za holografii) na michiganské univerzitě v Ann Arbor, stát Michigan.

Zpočátku své vědecké kariéry se dr. Jiří Keprt věnoval problematice optických vad vyšších řádů (jeho tehdejší práce byly hojně citovány), od roku 1970 je jeho odbornou doménou holografie, optické měřicí metody a stavba nestandardních unikátních přístrojů a zařízení na bázi optiky. Je dlouholetým a velice aktivním odborníkem ve jmenovaném oboru, byl řešitelem, respektive koordinátorem řady vědeckých projektů, dříve tzv. státního plánu výzkumu v oboru optika, později členem řešitelských týmů grantových projektů a velice úspěšným propagátorem a realizátorem smluvního vý-



zkumu už od sedmdesátých let. Je autorem poměrně velkého množství vědeckých a odborných publikací, příspěvků ve sbornících z prestižních mezinárodních konferencí a tvůrcem několika unikátních přístrojů a zařízení uplatněných v průmyslu, medicíně a jiných oborech; je stěžejním autorem řady patentů a užitných vzorů. Dlouhá léta je vyhledávaným odborníkem aplikační sférou v ČR, i v zahraničí. Dlouhá léta také přednášel na PřF UP ve studijním oboru optika a optoelektronika, vychoval řadu doktorandů, vědeckých a odborných pracovníků především v oboru holografie.

I přes svůj pokročilý věk je stále velice vědecky a odborně aktivní, včetně konzultací studentů Bc.,

Mgr. a Ph.D. studijních oborů programu fyzika na PřF UP, ale také na jiných VŠ a vědeckých pracovištích. Je inspirující osobností minulého i současného dění v oboru optika v Olomouci.

Dr. Jiří Keprt byl u zrodu Laboratoře optiky (1965) na UP a později Společné laboratoře optiky UP FZÚ AV ČR (1983), byl velice blízkým spolupracovníkem a žákem zakladatelů optiky na půdě UP prof. RNDr. Bedřicha Havelky, DrSc. a prof. RNDr. Engelberta Keprta, lze říci, že se podílel na vzniku a úspěšném rozvoji uznávané olomoucké optické školy. Při příležitosti osmdesátých narozenin a vzhledem k dlouhodobé angažovanosti RNDr. Jiřího Keprta, DrSc. na půdě a v zájmu Univerzity Palackého jej rektor UP v Olomouci prof. RNDr. Miroslav Mašláň, CSc. ocenil zlatou medailí UP.

S radostí a velkým vděkem osobním i ostatních spolupracovníků Společné laboratoře optiky UP a FZÚ AV ČR, ale i přátel a jeho žáků přeji jubilantovi pohodu, dobré zdraví a jemu vlastní optimismus do dalších let.

prof. RNDr. Miroslav Hrabovský, DrSc.
vedoucí SLO UP a FZÚ AV ČR