

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Химический факультет

кафедра высокомолекулярных соединений

А.В. Большакова, Е.С. Трофимчук

**СПЕЦПРАКТИКУМ ПО ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ СОЕДИНЕНИЯМ
«Исследование структуры полимеров электронно-микроскопическими
методами»**

**Методическое пособие для студентов и аспирантов химического
факультета МГУ, обучающихся по специальности «Высокомолекулярные
соединения»**

Москва 2022 г.

УДК 539.2+544.777

Большакова А.В., Трофимчук Е.С. Спецпрактикум по высокомолекулярным соединениям «Исследование структуры полимеров электронно-микроскопическими методами». Методическое пособие для студентов и аспирантов химического факультета МГУ, обучающихся по специальности «Высокомолекулярные соединения». Москва, 2022, 36 с.

Утверждено методической комиссией кафедры высокомолекулярные соединения.

Учебное пособие предназначено к спецпрактикуму по использованию электронно-микроскопического метода в исследовании структуры полимеров (по специальности 040501 "Фундаментальная и прикладная химия" и направлению подготовки в аспирантуре 040601 "Химические науки", направленность "Высокомолекулярные соединения"). Изложены физические основы метода электронной микроскопии и области его применения, рассмотрены основные виды электронных микроскопов и их конструкционные особенности. Особое внимание уделено специальным возможностям метода, а именно, получению трехмерных изображений, *in situ* исследованиям и определению химического состава исследуемых объектов. Подробно описаны методики подготовки, препарирования и контрастирования полимерных образцов для исследования методом электронной микроскопии. На конкретных примерах показаны особенности и основные ошибки при интерпретации электронно-микроскопических изображений полимерных объектов. В конце приведены примеры практических задач для спецпрактикума.

Оглавление

Введение	4
1. Электронная микроскопия. Основные понятия	5
2. Устройство электронного микроскопа.....	9
2.1 Формирование изображения в просвечивающем электронном микроскопе.....	11
2.2. Формирование изображения в растровом (сканирующем) электронном микроскопе	12
2.3. Погрешности, aberrации в электронной микроскопии.....	15
3. Специальные возможности методик электронной микроскопии	16
3.1 Просвечивающая электронная микроскопия.....	16
3.2 Сканирующая электронная микроскопия.	21
4. Методики препарирования образцов для электронной микроскопии	25
4.1. Методики препарирования для просвечивающей электронной микроскопии	26
4.2. Методы контрастирования	30
4.3. Методики препарирования для сканирующей электронной микроскопии.....	32
5. Интерпретация электронно-микроскопических микрофотографий	33
6. Области применения электронной микроскопии для полимеров	36
7. Примеры практических задач для практикума.	37
Рекомендуемая литература.....	38
Интернет-ресурсы	38
Список сокращений.....	39

Введение

Исследование структуры полимеров микроскопическими методами является интересной и непростой задачей. Поиск взаимосвязи между структурой и свойствами полимерных материалов до сих пор остается актуальной проблемой полимерной науки и не имеет универсального решения. Электронная микроскопия среди разнообразных микроскопических методов исследования занимает одно из важнейших мест среди всего спектра методов исследования материалов, благодаря прежде всего своему высокому пространственному разрешению. Применение методик электронной микроскопии открывает новые пути контроля и управления структурой и, следовательно, свойствами тел и позволяет более эффективно решать проблему получения материалов с заданными характеристиками. В последние десятилетия электронная микроскопия стала важнейшим методом исследования структуры и морфологии полимерных материалов. Общий процесс в развитии прикладной электронной микроскопии тесно связан с совершенствованием как самого электронного микроскопа, так и методов препарирования образцов.

В пособии изложены основные понятия электронной микроскопии, дано описание принципиального устройства, просвечивающего и сканирующего электронных микроскопов (ПЭМ и СЭМ) и их возможностей, в том числе специальных, достаточно подробно рассмотрены методики препарирования полимерных образцов. Особое внимание уделено интерпретации данных, которые могут быть получены из электронно-микроскопических микрофотографий, а также возможным артефактам. В конце пособия приведены примеры практических заданий для спецпрактикума по электронной микроскопии.

Для успешного усвоения материала методического пособия студенты должны быть знакомы с курсом "Оптика", в частности, с разделами геометрической оптики и дифракционных явлений. Более подробные сведения как по теории электронно-микроскопического метода и устройству микроскопов, так и по методикам препарирования студенты могут получить из специализированной литературы, приведенной в списке Рекомендуемой литературы.

1. Электронная микроскопия. Основные понятия

Наиболее часто микроскопы и электронные микрофотографии характеризуют предельным разрешением. Однако этот параметр не всегда достаточен, чтобы определить ценность полученного электронно-микроскопического изображения. Во многих случаях паспортное предельное разрешение прибора играет менее важную роль, чем величина поля зрения. При исследовании очень неровных объектов основным критерием качества изображения становится глубина резкости. Наконец, все остальные свойства электронного микроскопа можно использовать в полной мере только тогда, когда изображение объекта достаточно контрастно. Таким образом, наиболее существенными параметрами электронно-микроскопических изображений являются:

- 1) контраст – отношение яркостей самой светлой и самой тёмной частей изображения;
- 2) дифракционный предел (разрешающая способность микроскопа) – это минимальное расстояние между двумя точками объекта, которые можно видеть на изображении отдельно;
- 3) поле зрения – часть пространства (плоскости), изображаемая оптической системой;
- 4) глубина резкости – расстояние вдоль оптической оси микроскопа, в пределах которого обеспечивается возможность наблюдения резкого изображения объемного объекта.

Более подробно остановимся на одном из основных параметров оптических приборов, каким является разрешающая способность или предельное разрешение. Светящаяся точка в результате дифракции видна в микроскопе в виде светлого кружка, окруженного темными и светлыми кольцами (круг рассеяния). Если объект состоит из двух светящихся точек, то они создают на изображении два дифракционных пятна. При сближении точек дифракционные кольца также сближаются, яркость пространства между ними постепенно увеличивается, и, наконец, при некотором расстоянии два дифракционных пятна сливаются в одно. Наименьшее расстояние, при котором две точки наблюдаются отдельно, определяется следующим соотношением:

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha} \quad (1)$$

где d – разрешаемое расстояние между точками, n – показатель преломления среды, λ – длина волны, α – угол, который образует дифрагированный луч первого порядка с первичным лучом и равен максимальному углу диафрагмы (апертурный угол).

Величина $n \sin \alpha = A$ носит название числовой апертурной диафрагмы. Тогда

$$d = \frac{0.61\lambda}{A} \quad (2)$$

Предельное разрешение имеет размерность длины и для светового микроскопа составляет доли микрона, а для электронного микроскопа - несколько ангстрем. Современные просвечивающие электронные микроскопы имеют предельное разрешение до 1.5 Å.

Как видно из формулы (1), наибольшее разрешение (наименьшее значение d) может быть достигнуто при минимальной длине волны и при максимальных n и α . Объективы современных световых микроскопов имеют апертурный угол, близкий к 90°; величина $\sin\alpha=0.95$. Следовательно, разрешаемое расстояние при показателе преломления $n=1$, составляет 200-300 нм.

Использование иммерсионных жидкостей, обладающих большими показателями преломления, позволяет достигнуть предельное разрешение в 1.5 раза большее. (Например, для бромнафталина $n=1.66$, $d\approx\lambda/3$). Так как числовая апертура не может быть значительно увеличена, то единственным способом увеличения разрешающей способности микроскопа является переход к более коротким волнам. Однако применение УФ-лучей требует изготовление специальной оптики микроскопа из кварца и ограничено длинами волн 200–250 нм, поскольку большинство веществ сильно поглощает в коротковолновой ультрафиолетовой области.

Для дальнейшего повышения разрешающей способности микроскопа следовало бы перейти к рентгеновским лучам. Трудности обнаружения волновых свойств рентгеновских лучей связаны с чрезвычайно малой их длиной волны, т.е. в тысячу раз меньшей, чем длина волны видимых лучей. Характеристические лучи разных элементов также имеют длины волн того же порядка. Если сравнить между собой наиболее жесткие характеристические лучи, то, например, для Mg будем иметь длину волны 9.5 Å для Fe – 1.7 Å, для Ag – 0.50 Å, W – 0.18 Å и для самого тяжелого элемента U – 0.1 Å. Столь короткая длина волны и, соответственно, огромная частота приводят к тому, что на первый план выступает корпускулярный характер рентгеновских лучей. Поэтому требуются специальные, трудно осуществимые условия, при которых волновой характер рентгеновских частиц проявляется отчетливо.

Двойственная природа света (частица и волна) позволяет рассматривать распространение любых материальных частиц, как обладающими определенными волновыми свойствами. Это дало возможность использовать катодные лучи (поток электронов) в качестве источника излучения в электронном микроскопе. Первый электронный микроскоп был сконструирован Эрнстом Руска и Максом Кноллем в 1931 г. в Берлине. На рис. 1 представлен авторский эскиз электронно-лучевой трубки. Позднее в 1986 г. за изобретение просвечивающего электронного микроскопа Эрнст

Руска получил Нобелевскую премию по физике.

Согласно соотношению де Бройля,

$$\lambda_0 = \frac{h}{m_0 v} = \frac{h}{p_0} \quad (3)$$

где m – масса покоя электрона и равна $0.9 \cdot 10^{-27}$ г, h – постоянная Планка, равная $6.624 \cdot 10^{-27}$ эрг·с, v_0 – скорость движения электрона.

Любому излучению электрона, обладающему импульсом p_0 , в пространстве, где отсутствует внешнее поле, соответствуют колебания с длиной волны λ_0 . В случае, когда поток электронов движется под действием некоторого ускоряющего напряжения U , ему соответствуют колебания с длиной волны λ , вычисляемой по формуле (4):

$$\lambda = \frac{12.25}{\sqrt{U}} \text{ (Å)} \quad (4)$$

Из уравнения (4) видно, что чем больше ускоряющее напряжение U , тем меньше λ .

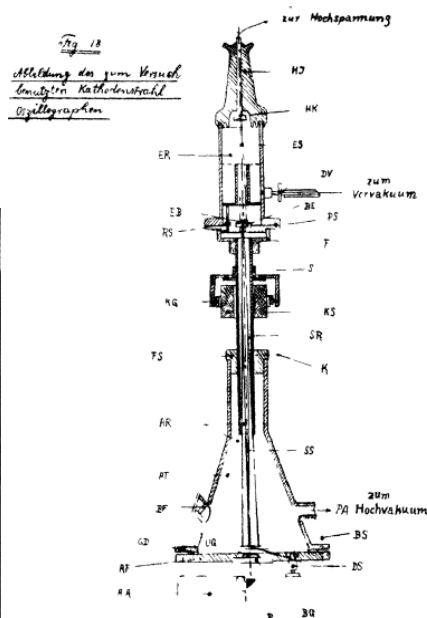


Рисунок 1. Макс Кнолл и Эрнст Руска за работой (Берлин 1933 г.) и авторский эскиз электронно-лучевой трубки¹.

Электронные лучи с энергией около 100 кэВ обладают длиной волны 0.037 Å , которая значительно меньше межатомных расстояний в кристалле. На электронно-микроскопических объектах эти лучи преимущественно рассеиваются и дифрагируют. Теоретически (см. уравнение (1)) при $\sin \alpha = 1$ и $n=1$ пучок электронов с длиной волны 0.04 Å мог бы обеспечить разрешение 0.02 Å . Однако, электромагнитные линзы, при помощи которых в электронном микроскопе производится увеличение изображения, сильно его искажают, что особенно заметно

¹ Источник http://ernst.ruska.de/daten_e/library/documents/999.nobellecture/lecture.html

при больших апертурных углах. Наилучшее разрешение электронного микроскопа соответствует апертурному углу, равному 10^{-2} – 10^{-3} радиан. В этих условиях теоретический предел разрешения составляет $\sim 0.4 \text{ \AA}$. При решении практических задач обычно не удастся реализовать предельного разрешения прибора.

При взаимодействии пучка электронов с веществом могут происходить самые разнообразные процессы, основные из которых представлены на рис. 2. В первую очередь, это явления, характерные для взаимодействия излучения любой природы с веществом: отражение и преломление (рассеяние). Кроме того, возникают явления, связанные с взаимодействием электронов как частиц высокой энергии с атомами исследуемого вещества – это выход вторичных электронов, Оже-электронов, а также возникающие при этом излучения (рентгеновское, катодолуминесцентное). Каждый такой процесс лежит в основе разновидностей электронной микроскопии.

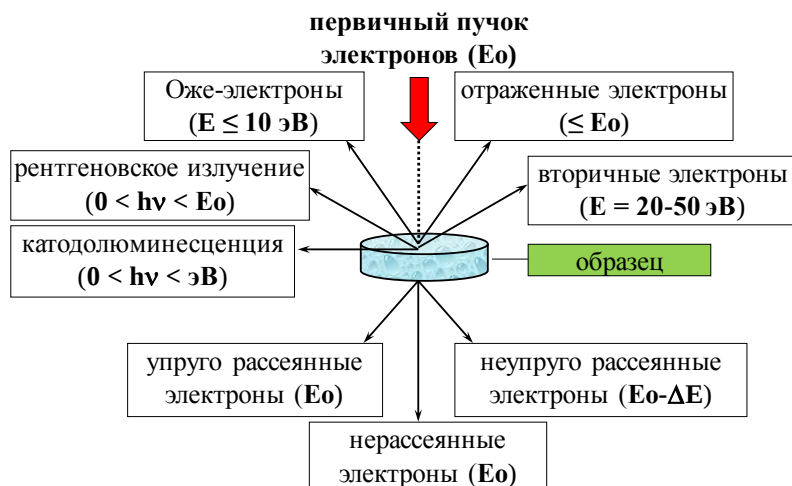


Рисунок 2. Схема взаимодействия первичного электронного пучка с веществом образца.

По типу исследования объектов электронные микроскопы можно разделить на следующие виды:

1. Просвечивающие или, как их еще называют, трансмиссионные электронные микроскопы (**ПЭМ** или **ТЭМ**), в которых через объект проходит пучок электронов, рассеивается и рассеянный свет регистрируется затем на экране или фотопластинке.
2. Отражательные микроскопы, в которых изображение получается за счет потока электронов, отраженных от поверхности рассматриваемого объекта. К таким относятся растровые или сканирующие электронные микроскопы (**РЭМ** или **СЭМ**).
3. Эмиссионные электронные микроскопы, где изображение формируется электронами, испускаемыми раскаленной поверхностью самого исследуемого объекта.

В настоящем описании будет рассмотрено формирование изображения в электронных микроскопах, работающих на просвет и отражение.

2. Устройство электронного микроскопа

Совокупность электрических или магнитных полей, в которых должен двигаться электрон для получения изображения, представляют собой "электромагнитные линзы", играющие в электронной оптике такую же роль, как обычные линзы в геометрической оптике. Их можно описать определенными параметрами, например, фокусным расстоянием, апертурой, константой aberrации и т.д. Изображение можно фотографировать (если электроны попадают на фотопластинку) или наблюдать непосредственно глазом (если электроны попадают на флюоресцирующий экран, светящийся под их ударами). На этом принципе построены многочисленные электронно-оптические системы. Одной из таких систем является и электронный микроскоп, схематически изображенный на рис. 3 (б – для просвечивающего и в – для сканирующего микроскопов). Для сравнения показана схема оптического микроскопа (рис. 3а).

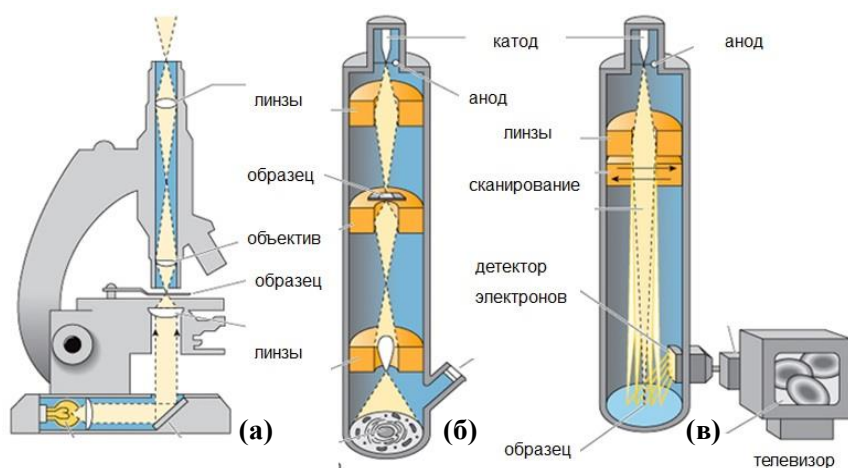


Рисунок 3. Схемы оптического (а), просвечивающего электронного (б) и сканирующего электронного (в) микроскопов².

Принципиальная схема электронного микроскопа аналогична схеме светового микроскопа, в которой все оптические элементы, например, стеклянные линзы, заменены соответствующими электромагнитными и электростатическими элементами, а в качестве источника света используется поток электронов.



Рисунок 4. Фотографии катодов из вольфрама (слева) и LaB₆ (справа).

² Адаптация из Gartner L.P, Hiatt J.M. Color Textbook of Histology, 3th ed., The McGraw-Hill Companies, 2006, 592 стр.



Рисунок 5. Фотографии катода для СЭМ в собранном виде (слева), готовом к размещению в электронной пушке, а также в разобранном виде (справа), где можно отдельно увидеть устройство цилиндра Венельта и катод из вольфрама.

Источником электронов является электронная пушка, состоящая из катода (рис. 4, 5), фокусирующего электрода и анода. В качестве источника электронов наиболее широко применим катод из вольфрама, однако для достижения наилучшего качества изображения используются и другие материалы, например монокристаллы из гексаборида лантана LaB_6 , обладающие высокой интенсивностью потока электронов. И вольфрамовая нить, и монокристаллы гексаборида лантана являются источником электронов, работающие на принципе термоэлектронной эмиссии. Существуют источники электронов, работающие на принципе полевой эмиссии. Для этих целей, например, используют монокристалл вольфрама с заостренным кончиком с ориентацией $\langle 310 \rangle$. Время службы автоэмиссионных катодов в несколько десятков, а то и сотни раз больше, чем у катодов на термоэмиссии. Электронная пушка создает пучок электронов, который с помощью конденсорных линз формируется и направляется на исследуемый объект. Пучок электронов, пройдя сквозь объект, попадает в объективную линзу, которая формирует увеличенное изображение объекта. После объективной линзы электроны попадают в промежуточную линзу, которая предназначена для плавного изменения увеличения микроскопа и получения дифракции с участков исследуемых образцов (электронная микродифракция, см. раздел 3). Проекционная линза создает конечное увеличенное изображение объектов на флюоресцирующем экране. Увеличение изображения зависит от увеличения объективной, промежуточной и проекционной линз. Принципиальное ограничение разрешающей силы электронного микроскопа заключается в дифракционных явлениях, обуславливаемых волновой природой электронов. Можно наблюдать дифракцию непосредственно, если подобрать условия опыта так, чтобы линейные размеры неоднородностей среды были сравнимы с длиной волны электрона.

Несмотря на некоторую общность оптической схемы, условия формирования изображения в световом и электронном микроскопах принципиально различны.

В световом микроскопе изображение получается, главным образом, вследствие различной поглощающей способности световых лучей отдельными элементами объекта. В просвечивающем электронном микроскопе объект не должен заметно поглощать электроны, иначе будет выделяться большое количество тепла, что может привести к его разогреву и разрушению. Поэтому объект выбирают малой толщины, чтобы он был прозрачным для электронного луча. Формирование изображения в просвечивающем электронном микроскопе связано в основном с различной степенью рассеяния электронов разными участками объектов. Электронный пучок, проходя через объект, не поглощается последним, а только отклоняется на некоторый угол, зависящий от произведения толщины объема на плотность. При этом, чем больше толщина объекта, тем на большие углы рассеиваются электроны и, следовательно, тем меньше электронов проходит через отверстие апертурной диафрагмы и тем меньше их достигает флюоресцирующего экрана. В этом месте интенсивность свечения экрана мала. Таким образом, на флюоресцирующем экране создается контрастное изображение, так как толстые и плотные участки объекта будут выглядеть на нем более темными по сравнению с тонкими или менее плотными.

В сканирующем электронном микроскопе толщина исследуемого образца не имеет значения, поскольку в этом случае проводится исследование только его поверхностного слоя. Образец крепится на предметном столике, который может перемещаться в трех взаимно перпендикулярных направлениях, допускает наклон образца до 90° к электронно-оптической оси и вращение вокруг оси от 0 до 360° . С помощью отклоняющих катушек осуществляется сканирование тонко сфокусированного зонда по поверхности образца вдоль линий. Совокупность параллельных линий (растр) дает представление о площади объекта. При этом обеспечивается синхронность передвижения электронного зонда по образцу и электронного луча по экрану. Благодаря этому каждая точка на образце соответствует определенной точке на экране. Электронный пучок, сфокусированный на поверхности образца, вызывает появление отраженных, вторичных и поглощенных электронов, которые используются для получения изображения поверхности образца. Эти сигналы улавливаются специальными детекторами Эверхарта-Торнли. В детекторе поток электронов преобразуется в электрический сигнал (ток), который после усиления служит для модулирования яркости точек на экране. В современных сканирующих микроскопах используется одновременно несколько детекторов, позволяющих разделить композиционный и топографический контрасты.

2.1 Формирование изображения в просвечивающем электронном микроскопе

Все просвечивающие микроскопы (световые и электронные) сходны в том смысле, что исследуемый объект освещается пространственно когерентным волновым излучением. В просвечивающем объекте в зависимости от изменения

свойств от одной его точки к другой более или менее сильно адсорбируются и дифрагируют. Лучи, исходящие из различных точек объекта, отклонены от исходного направления в результате рассеяния или дифракции и, благодаря своей когерентности, могут интерферировать. Таким образом, позади объекта возникает модифицированное волновое поле, которое содержит всю информацию об объекте, отвечающую специальным экспериментальным условиям. Распределение энергии излучения, обусловленное дифракцией и интерференцией, регистрируется соответствующим образом (например, фотопластинкой, помещенной в плоскость перпендикулярно оптической оси). Полученное изображение называется дифракционной картиной объекта. Задача состоит в том, чтобы найти метод определения дифракционной картины и интерпретировать ее так, чтобы извлечь как можно больше информации об объекте. С этой целью в микроскопе за исследуемым объектом размещают увеличительные линзы. Таким образом, в плоскости изображения возникает вторичное действительное изображение объекта, как результат интерференции лучей, испущенных первичным изображением.

Согласно правилу Льюммера, если оптическая система формирует изображение без искажения и улавливает весь дифрагированный объектом свет, то изображение правильно передает распределение амплитуд и фаз излучения, рассеянного объектом.

В случае световой оптики для формирования действительного изображения объекта (т.е. вторичного изображения) необходимо по меньшей мере два дифракционных максимума (правило Аббе).

Для формирования изображения в электронном микроскопе используется только центральный пучок (т.е. дифракционный максимум нулевого порядка). Вследствие большой сферической аберрации электронных линз приосевой угол лучей, формирующих изображение, должен быть малым, что обеспечивается апертурной диафрагмой. Все дифракционные эффекты, благодаря малой длине волны электрона, содержатся в центральном пучке. Следовательно, электронограмма дает сведения о структуре образца, а электронная микрофотография - сведения о размерах и форме.

Метод просвечивающей электронной микроскопии позволяет исследовать объекты на просвет в широком диапазоне увеличений (до 200000).

2.2. Формирование изображения в растровом (сканирующем) электронном микроскопе

Эффективным дополнением к просвечивающему электронному микроскопу может служить растровый микроскоп. Образцы не требуют сложного препарирования, и можно непосредственно наблюдать топографию поверхности массивного материала с достаточно большой площади (поле зрения составляет 6×6 мм²). В основе растровой (сканирующей) электронной микроскопии лежит сканирование поверхности образца тонко сфокусированным пучком электронов

(электронным зондом) и детектирование (распознавание) возникающего при этом широкого спектра излучений. В результате взаимодействия электронов с веществом возникает измененный поток электронов, состоящий из отраженных, вторичных, поглощенных, прошедших через образец и Оже-электронов, а также катодолуминесцентное и рентгеновское излучения. Сигналами для получения изображения в сканирующем микроскопе служат вторичные, отраженные и поглощённые электроны. Рассмотрим особенности различных типов электронов, составляющих детектируемое излучение.

Отраженные электроны образуются при рассеивании первичных электронов на большие (до 90°) углы в результате однократного упругого рассеивания или в результате многократного рассеивания на малые углы. В результате первичные электроны, испытав ряд взаимодействий с ядрами атомов образца, теряют энергию, изменяют траекторию своего движения и покидают поверхность образца. Размеры области генерации отраженных электронов могут изменяться от 0.1 до 1 мкм, что существенно больше сечения зонда, и зависят от длины пробега электронов в материале образца. Протяженность области возрастает с увеличением ускоряющего напряжения и уменьшения среднего атомного номера Z элементов, входящих в состав исследуемого материала. Если атомный номер химических элементов материала в точке падения первичного пучка электронов мал (легкие атомы), то образуется меньшее количество отраженных электронов с малым запасом энергии. В областях образца, содержащих высокую концентрацию атомов с большим атомным номером (тяжелые атомы), отражается большее число электронов и на меньшей глубине в образце, поэтому потери энергии при их движении к поверхности меньше. Разрешение в режиме регистрации отраженных электронов невысокое и изменяется от десятков нанометров при работе с невысокими ускоряющими напряжениями и тяжелыми материалами до сотен нанометров при работе с большими ускоряющими напряжениями и легкими материалами.

Вторичные электроны образуются при взаимодействии первичных электронов, проникающих в образец, с электронами внешних оболочек атомов объекта, передавая им часть своей энергии. Происходит ионизация атомов образца, высвобождающиеся электроны могут покинуть образец и быть выявлены в виде вторичных электронов. Они характеризуются очень малой энергией до 50 эВ и поэтому выходят из участков образца очень близких к поверхности. Глубина слоя, дающего вторичные электроны, составляет 1-10 нм. В пределах этого слоя рассеивание электронов пренебрежимо мало, и поэтому при получении изображений во вторичных электронах разрешающая способность определяется диаметром первичного зонда. Вторичные электроны обеспечивают максимальную в сравнении с другими сигналами разрешающую способность порядка 5-10 нм. В растровой электронной микроскопии они являются

главным источником информации для получения изображения поверхности объекта. Количество образующихся вторичных электронов слабо зависит от атомного номера элемента. Основным параметром, определяющим выход вторичных электронов, является угол падения пучка первичных электронов на поверхность объекта. Этот эффект используется для получения информации о топографии поверхности. С целью увеличения эмиссии вторичных электронов образец устанавливается под углом к оси зонда. При этом будет ухудшаться резкость изображения. Для ее исправления в растровых микроскопах предусмотрена система компенсации угла наклона. Для образцов с сильно развитым рельефом полностью провести коррекцию угла наклона не удастся.

Поглощенные электроны. При воздействии электронного зонда часть генерируемых электронов остается в объеме образца. Например, при энергиях первичного пучка 10-20 кэВ примерно 50% от общего числа образующихся вторичных и отраженных электронов достигают поверхности образца и покидают ее. Оставшиеся электроны образуют ток поглощенных электронов, величина которого равна разности между током зонда и токами отраженных и вторичных электронов. Эта разность является сигналом для получения изображения, на которое оказывают влияние топографический и композиционный эффекты. Поглощенные электроны генерируются в большом объеме, поэтому их разрешающая способность имеет такой же порядок, как и для отраженных электронов. Данный метод получения изображений используется редко из-за малой разрешающей способности.

Таким образом, разрешающая способность сканирующего микроскопа определяется:

- 1) площадью сечения или диаметром зонда,
- 2) контрастом, создаваемым образцом,
- 3) детекторной системой, областью генерации сигнала в образце.

Контраст изображения определяется разностью детектируемых сигналов от соседних участков образца и зависит от топографии (шероховатости) поверхности, химического состава объекта, поверхностных локальных магнитных и электрических полей, кристаллографической ориентации элементов структуры. Уровень контраста определяется также эффективностью преобразования падающего на детектор излучения, которое создает сигнал на его выходе. Если получаемый в итоге контраст недостаточен, то его можно повысить, увеличив ток зонда. Однако большой поток электронов в силу особенностей электронной оптики не может быть хорошо сфокусирован, то есть диаметр зонда возрастет, что приведет к снижению разрешающей способности.

Ограничение разрешающей способности электронного микроскопа, связанное с размерами области генерации сигнала в образце, обусловлено тем, что она

оказывается значительно больше диаметра исходного электронного пучка. При проникновении первичных электронов в образец они рассеиваются во всех направлениях, поэтому внутри образца происходит расширение пучка электронов. Участок образца, в котором первичные электроны тормозятся до нулевой энергии, имеет грушевидную форму. Боковое расширение электронного пучка в образце в этом случае имеет величину от 1 до 2 мкм, даже когда зонд имеет диаметр 10 нм. Расхождение электронов приводит к тому, что площадь выхода на поверхность образца электронов будет больше фокуса электронного пучка.

Обычно рабочий диапазон изменения увеличений для сканирующей электронной микроскопии, обеспечивающий высокую четкость изображения поверхности, составляет 10–50000.

2.3. Погрешности, аберрации в электронной микроскопии

Главная задача электронного микроскопа состоит в формировании правильного изображения объекта, что требует соблюдения следующих условий:

- 1) каждая точка плоскости должна изображаться стигматически;
- 2) все точки изображения должны лежать в плоскости, перпендикулярной к оси системы;
- 3) масштаб увеличения должен быть постоянен на всем изображении.

Нарушение условий 1) и 2) ведет к уменьшению резкости изображения, нарушение условий 2) и 3) деформирует изображение. Своеобразная трудность возникает в связи с тем, что изображаемые объекты обычно бывают пространственными, а не плоскими, как получаемое изображение.

Главным требованием к электронным микроскопам является малая сферическая аберрация. Она определяет предел разрешающей способности, который может быть достигнут на данном приборе. Суть сферической аберрации заключается в том, что приосевые лучи и лучи, входящие в объектив под большим углом, пересекаются не в одной плоскости (рис. 6а).

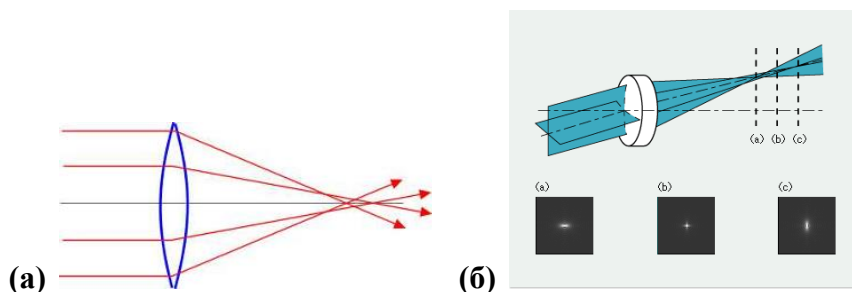


Рисунок 6. Схемы формирования изображения при (а) сферической аберрации и (б) астигматизме.

При минимальной диафрагме объектива можно сферической аберрацией пренебречь,

но разрешение будет значительно снижаться (см. формулу (2)). С увеличением диафрагмы все сильнее будет играть роль сферической аберрации. Таким образом, следует подбирать при работе оптимальную диафрагму.

К числу существенных погрешностей относятся также астигматизм объектива (рис. 6б), обусловленный асимметрией самой системы, хроматическая аберрация и ряд других.

3. Специальные возможности методик электронной микроскопии

3.1 Просвечивающая электронная микроскопия

Трехмерная ПЭМ, 3D-томография. Существует два основных способа получения объемных изображений объектов, используя метод просвечивающей электронной микроскопии. Первый заключается в наложении и совмещении изображений тонких срезов, сделанных с исследуемого объекта под различными углами. Этот метод является очень длительным, трудоемким и имеет ряд ограничений, например, связанных с толщиной срезов. Поэтому большее распространение получил метод томографии, который заключается в восстановлении вида трехмерного объекта по набору проекций с различными координатами³ (схема метода представлена на рис. 7).

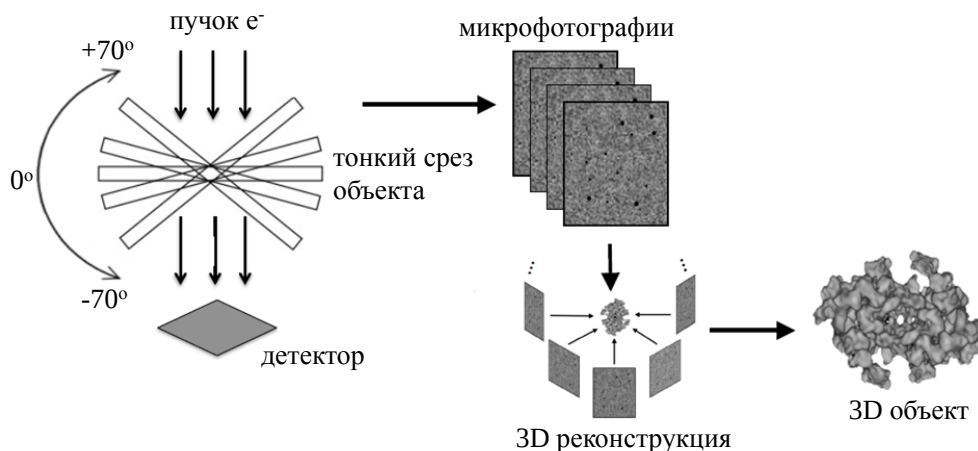


Рисунок 7. Схема получения трехмерного изображения методом томографии.

Электронная микрофотография представляет собой двумерную проекцию трехмерного объекта. Для того, чтобы реконструировать 3D структуру по двумерным проекциям, необходимо собрать несколько тысяч его индивидуальных изображений с нескольких десятков микрофотографий. Сбор данных в томографии состоит в получении изображений, повернутых на различные углы относительно одной или нескольких осей образца. Как правило, используют наклон $\pm 70^\circ$ если образец не очень

³ Electron Tomography. Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell, Ed. J. Frank. New York: Springer-Verlag, 2006

толстый. Следует заметить, что при повороте на 60° образец оказывается в два раза толще, чем при 0° , а при повороте на 70° – почти в 3 раза толще. Далее, используя специализированные компьютерные алгоритмы, методом обратной проекции реконструируется изображение оригинального трехмерного объекта.

Метод томографии получил свое активное развитие для исследования макромолекул белков, их комплексов из нескольких субъединиц, органелл клетки и клеток в целом.

Криоэлектронная микроскопия. Криоэлектронная микроскопия – это вид ПЭМ, в котором образец исследуется при криогенных температурах (обычно в жидком азоте). Достоинство этого метода в том, что он позволяет наблюдать за образцами, в том числе биологического происхождения (например, макромолекулы белков, мембраны), в нативном виде. Для этого образец помещают в воду или физраствор и охлаждают сжиженным этаном таким образом, чтобы вода затвердела в виде аморфного, так называемого витрифицированного, льда. Образцы, помещенные в подобную ледяную матрицу, при просмотре в электронном микроскопе контрастно выделяются в виде темных объектов на сером фоне. Разрешение изображений, получаемых криоэлектронной микроскопией, в настоящее время может составлять менее 0.3 нм, что сопоставимо с традиционными методами рентгеновской кристаллографии. В 2017 году за разработку основ этого метода Жаку Дебуши, Йоахиму Франку и Ричарду Хендерсону была присуждена Нобелевская премия.

In situ исследования. В *in situ* исследованиях электронный микроскоп используется для наблюдения за динамическими процессами при реакции образца на раздражитель (нагрев, деформация, воздействие электронного луча, др.) в реальном времени. В этом методе получают совокупность последовательно записанных изображений вида образца при его изменении со скоростью порядка 30 кадров в секунду, что при правильной интерпретации и внимательном отношении к артефактам позволяет количественно описать изучаемый процесс. Для корректного проведения *in situ* исследований необходимо осуществлять контролируемое изменение окружающей среды образца, которое коррелирует с трансформациями его структуры, фиксируемые с использованием различных методов визуализации, анализа или дифракции, либо путем измерения электронных или механических свойств, также определяемых в реальном времени⁴. Наиболее часто визуализируют процессы, связанные с фазовыми превращениями (плавление, кристаллизация и рост кристаллов, полиморфные превращения, образование новых фаз), с протеканием химических реакций (катализ, окисление, радиолиз, термическая деструкция), при одноосной и двухосной деформации (крейзинг, сдвиг, охрупчивание, релаксация).

⁴ Ross F.M. In Situ Transmission Electron Microscopy. Science of Microscopy, 445–534.

Например, проводился *in situ* эксперимент по изучению воздействия лазерного луча на композит фторопласта с алюминием⁵ (рис. 8), результатом которого стало образование метастабильной кристаллической фазы η -AlF₃.

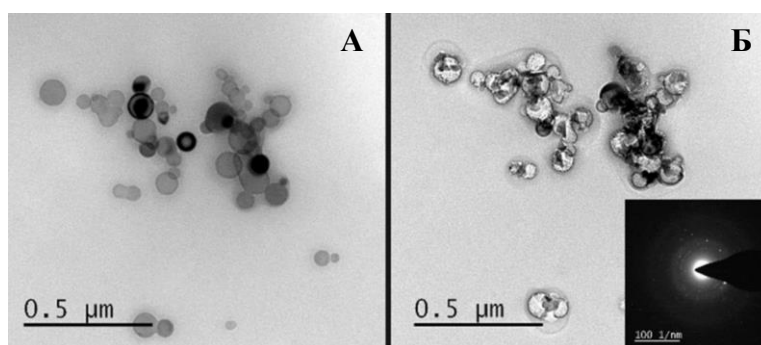


Рисунок 8. ПЭМ-микрофотографии композита на основе фторопласта и частиц алюминия (А) до и (Б) после действия лазерного луча в процессе *in situ* исследования в электронном микроскопе.

Электроннография. Вместо микроскопического изображения объекта просвечивающая электронная микроскопия позволяет получать дифракционные картины от ускоренных рассеянных электронов, прошедших через образец. Такой метод получил название электроннография или метод микродифракции электронов. Он часто применяется для изучения тонкодисперсных порошков, материалов с низкой степенью кристалличности и многокомпонентных композитов, которые трудно исследовать и интерпретировать классическими методами рентгеноструктурного анализа. Преимуществами электроннографии являются более сильное по сравнению с рентгеновским излучением взаимодействие электронов с веществом, меньшая длина волны и возможность получения дифракционных картин от отдельных монокристаллов размером до 100 нм.

2D картины рассеяния электронов (электроннограммы) похожи на картины рассеяния рентгеновского излучения (рис. 9). Для аморфных веществ наблюдается аморфное гало (а), при дифракции от единичных монокристаллов получается картина с точечными рефлексами (б) и для изотропных поликристаллических материалов формируются кольцевые рефлексы (в). При этом от кристаллических полимеров часто получается картина рассеяния в виде гало, что обусловлено плавлением полимерных кристаллов под действием пучка электронов.

⁵ Isik T., Xu X., Son S.F., Gundu, I.E., Ortalan V. (2019). Investigation of Polymer Matrix Nano- Aluminum Composites with Pulsed Laser Heating by In- Situ TEM. Propellants, Explosives, Pyrotechnics. doi:10.1002/prep.201900134

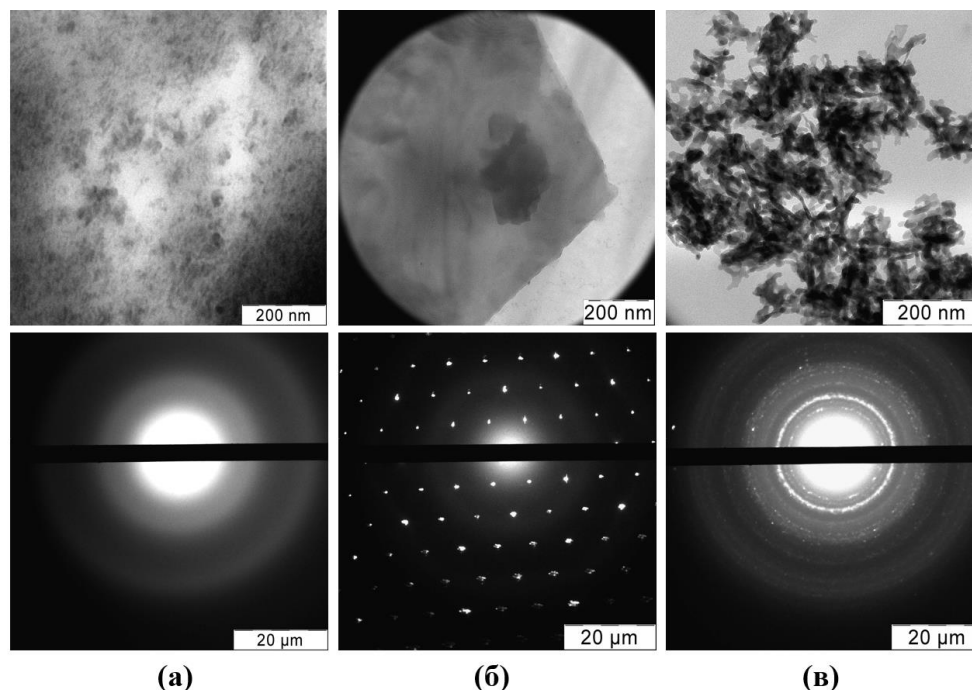


Рисунок 9. ПЭМ-микрофотографии (сверху) и электронограммы (снизу) для (а) композита полипропилен – аморфный SiO_2 , (б) и (в) порошков гидроксиапатита, полученных в различных условиях.

Анализ кольцевых рефлексов позволяет идентифицировать кристаллические фазы в материале. Для этого межплоскостные расстояния можно определить, используя соотношение:

$$Dd = 2B = 2 \lambda L,$$

где D – диаметр кольца на электронограмме, d – межплоскостное расстояние, B – постоянная прибора, λ – длина волны электронов, L – эффективная длина камеры.

Однако значения приборных параметров и длина волны электронов не всегда известны. Существует более простой способ определения межплоскостных расстояний, используя стандартные образцы – наиболее часто это образец поликристаллического золота. В этом случае электронограмму стандартного образца получают в тех же условиях, что и для исследуемого материала. Поскольку соответствие рефлексов на электронограмме и кристаллических плоскостей для стандартных образцов известно (например, для золота на рис. 10), определить неизвестную величину межплоскостного расстояния можно из соотношения: $D_{\text{ст}}d_{\text{ст}} = D_{\text{м}}d_{\text{м}}$, где $D_{\text{ст}}$ и $D_{\text{м}}$ – диаметр кольца на электронограмме стандарта и исследуемого материала, соответственно; $d_{\text{ст}}$ и $d_{\text{м}}$ – межплоскостное расстояние для известной плоскости стандарта и исследуемого материала, соответственно.

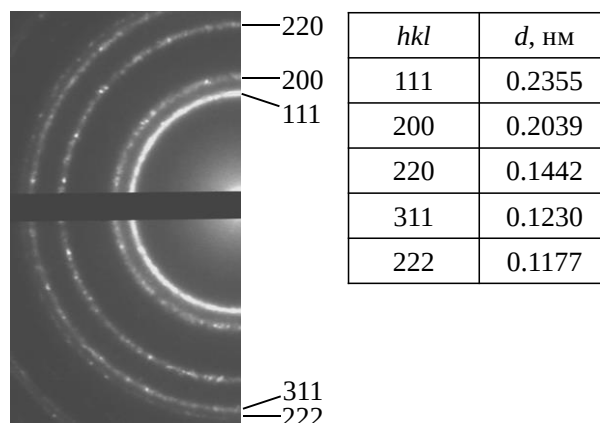


Рисунок 10. Электронограмма стандартного образца золота с указанием индексов hkl кристаллических плоскостей для рефлексов. В таблице приведены межплоскостные расстояния для указанных плоскостей, определенных методом рентгеновской дифракции.

Аналитическая ПЭМ. С развитием вакуумной техники и микроэлектроники в 1990-х годах появился метод электронной спектроскопии под названием «спектроскопия характеристических потерь энергии электронами» (СХПЭЭ) (англ. electron energy loss spectroscopy (EELS)). С помощью данного метода существует возможность построения элементно-селективных изображений от неупруго-рассеянных электронов, используя фильтры характеристических потерь энергии электронами; пример такого спектра представлен на рис. 11. Коллекционируя изображения с одной области в различном диапазоне энергий, можно построить карту распределения элементов в образце (рис. 11).

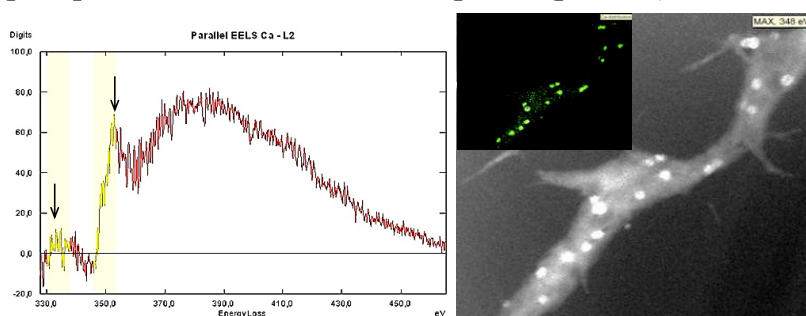


Рисунок 11. Спектр СХПЭЭ, изображение и карта распределения атомов кальция в волокне.

С конструктивной точки зрения фильтры характеристических потерь энергии электронами бывают двух типов: внутри колонный, и постколонный фильтр.

На рис. 12 показана схема **постколонного фильтра энергетических потерь энергии электронами**. После колонны микроскопа расположена дополнительная электромагнитная линза, которая разделяет прошедшие через образец электроны по спектрам энергетических потерь. За электромагнитной линзой расположена узкая щелевая диафрагма, позволяющая выбрать из всего спектра, электроны с определенными энергетическими потерями, которые и являются характеристикой определенных химических элементов в составе исследуемого образца.

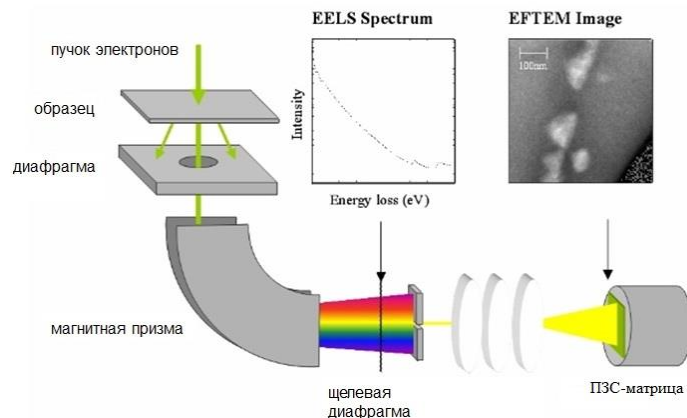


Рисунок 12. Схема постколонного фильтра характеристических потерь энергии электронами.

На рис. 13 представлена схема **внутриколонного фильтра энергетических потерь энергии электронами**. Фильтр состоит из системы четырех электромагнитных линз, и расположен внутри колонны микроскопа сразу после диафрагмы объектива. Фильтр похож на греческую букву Омега, и поэтому иногда его называют Омега-фильтром. В случае внутри колонного фильтра пучок электронов всегда проходит через фильтр энергетических потерь энергии электронами. Конструкция внутриколонного фильтра позволяет практически полностью устранить хроматическую aberrацию и улучшить контраст изображений.

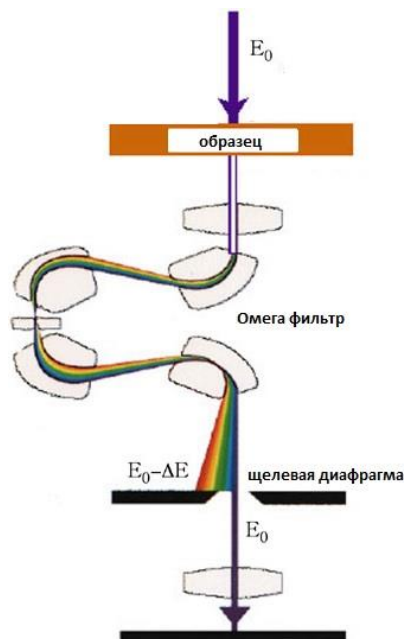


Рисунок 13. Внутриколонный фильтр энергетических потерь энергии электронами или Омега-фильтр.

3.2 Сканирующая электронная микроскопия

Низковакуумная СЭМ, *in situ* исследования. В методе электронной микроскопии для достижения высокой разрешающей способности обычно используют высокий вакуум порядка 10^{-5} мм рт.ст. Это приводит к жестким требованиям для образцов – они должны быть сухими, не выделять газообразных

веществ и иметь электропроводящий слой, который обычно для непроводящих материалов наносят путем вакуумного напыления. Это резко сокращает типы исследуемых объектов, которые содержат летучие жидкости, например, полимерные гидрогели, биологические объекты, и требуют их предварительной лиофильной или сверхкритической сушки.

Некоторые современные сканирующие электронные микроскопы, работающие на катоде с полевой эмиссией, оборудованы вакуумной системой, способной поддерживать высокий (и сверхвысокий) 10^{-3} – 10^{-9} Па вакуум в колонне микроскопа, и относительно низкий вакуум до 5-2000 Па в камере для образцов. В результате образец находится в разреженной, но достаточно плотной атмосфере (обычно состоящей из паров воды или азота). Атмосфера в камере с образцом позволяет нейтрализовать поверхностный заряд: молекулы газов ионизируются под воздействием электронов, испускаемых катодом, образовавшиеся положительные ионы взаимодействуют с электронами, которые накапливаются на образце и таким образом нейтрализуют поверхностный заряд. В этом случае дополнительное напыление проводящего слоя на поверхность образца не требуется, образцы сразу готовы к просмотру в СЭМ. Более того, если микроскоп оборудован охлаждающим держателем образцов, то появляется возможность работы с влажными образцами и даже с водой.

В низковакуумном режиме СЭМ часто проводят *in situ* исследования, связанные с изучением механизмов деформационного поведения, кристаллизации, усадки и др. На рис. 14 представлены микрофотографии развития пластической деформации в пленке изотактического полипропилена (А) и кристаллизации латексных частиц (Б), которые наблюдали в режиме *in situ* методом низковакуумной СЭМ.

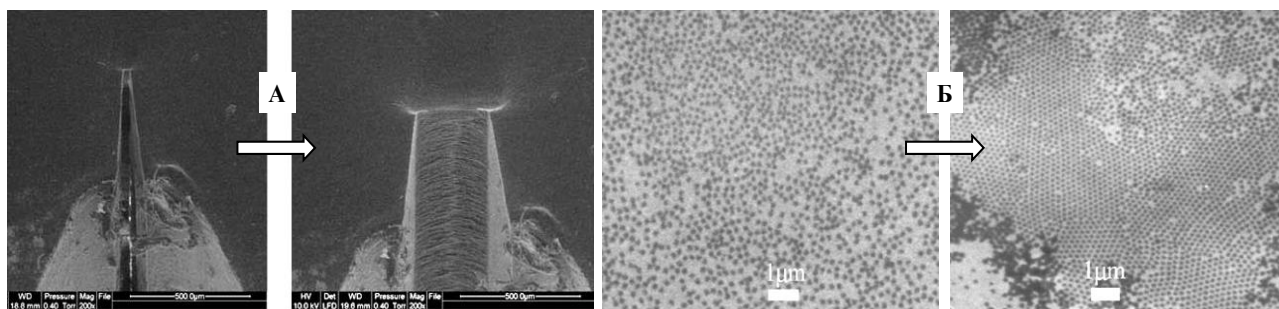


Рисунок 14. Микрофотографии, полученные *in situ* методом низковакуумной СЭМ, (А) пленки ПП с надрезом в процессе одноосного растяжения⁶ и (Б) частиц латекса в процессе кристаллизации при удалении растворителя⁷.

⁶ C. He, A.M. Donald, Morphology of a deformed rubber toughened poly(methyl methacrylate) film under tensile strain. Journal of Materials Science, 1997, 32, 5661–5667

⁷ C. He, A.M. Donald, Morphology of Core-Shell Polymer Latices during Drying. Langmuir, 1996, 12(26), 6250–6256

Трёхмерная СЭМ, 3D-томография. Для получения объёмного (стереоскопического) изображения методом СЭМ необходимо иметь, по крайней мере, две микрофотографии, полученные с одного и того же участка образца, но снятых под разными углами обзора. На основе анализа этой стереопары изображений, используя специальное программное обеспечение, осуществляют трёхмерную реконструкцию исследуемого участка поверхности и определяют высоту выступов (пиков) или глубину кратеров (углублений).

Существует также возможность проведения 3D-томографии. Для этого электронный микроскоп совмещают с ионной колонной – этот прибор называют дулучевым сканирующим электронно-ионным микроскопом (англ. focused ion beam-scanning electron microscope (FIB-SEM)). В этом методе ионная колонна создаёт сфокусированный пучок высокоэнергетических ионов (чаще всего ионов галлия), который сканирует поверхность образца также, как это делает электронный пучок. Ионный пучок обладает более разрушительным воздействием, что приводит к травлению материала образца. Проведение послойного травления поверхности с последующим получением СЭМ-микрофотографий образующихся сечений позволяет затем реконструировать трёхмерное изображение приповерхностного слоя образца толщиной от 10-15 нм до 1 мкм.

Основы рентгеноспектрального микроанализа. Кроме получения фотографического изображения структуры и морфологии образца сканирующая электронная микроскопия позволяет получать информацию о химическом составе материала. Для этого анализируется характеристическое рентгеновское излучение, которое возникает при взаимодействии пучка первичных электронов с атомами образца. Этот метод исследования называется рентгеноспектральный микроанализ (РСМА).

Возбуждаемое рентгеновское излучение можно разделить на тормозное и характеристическое. Тормозное рентгеновское излучение возникает вследствие торможения первичных электронов в электрическом (кулоновском) поле атомов анализируемого материала. Кинетическая энергия первичных электронов в этом случае частично или полностью преобразуется в энергию рентгеновского излучения. Соответственно излучение имеет непрерывный спектр с энергией от нуля до энергии падающего электрона. При рентгеноспектральном микроанализе тормозное излучение нежелательно, так как вносит основной вклад в увеличение уровня фона.

Характеристическое рентгеновское излучение возникает при столкновении атомов материала с электронами зонда. В результате этого первичные электроны могут выбивать электроны с внутренних К-, L- или М-оболочек, оставляя атом образца в энергетически возбужденном состоянии. Образующиеся вакансии заполняются переходами электронов с более высоких энергетических уровней. Атом переходит в основное состояние, избыточная энергия выделяется в виде кванта

рентгеновского излучения. Поскольку энергия возникающего кванта зависит только от энергии участвующих в процессе электронных уровней, а они являются характерными для каждого элемента, возникающее рентгеновское излучение является характеристическим. Так как каждый атом имеет вполне определенное конечное число уровней, между которыми возможны переходы только определенного типа, характеристическое рентгеновское излучение дает дискретный линейчатый спектр, позволяющий определять элементный состав образца. Рентгеновское излучение можно охарактеризовать в терминах энергий или волн. Для рентгеноспектрального анализа можно использовать энергодисперсионный спектрометр (ЭДС) (англ. energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)), который сортирует фотоны по их энергии, либо волнодисперсионный спектрометр (ВДС) (англ. wavelength-dispersive X-ray spectroscopy (WDX)), использующий принцип разделения рентгеновского излучения по длинам волн. По закону Мозли, для рентгеновских линий внутри одной серии существует прямая зависимость энергии излучения и атомного номера химического элемента:

$E = p (Z - q)^2$, где E – энергия, Z – атомный номер эмитирующего атома (q – константы).

На рис. 15 представлены энергодисперсионный спектр характеристического рентгеновского излучения поливинилиденфторида (ПВДФ), содержащего диоксид кремния, и карты распределения атомов фтора (элемент полимерной матрицы) и кремния (элемент наполнителя) в объеме образца.

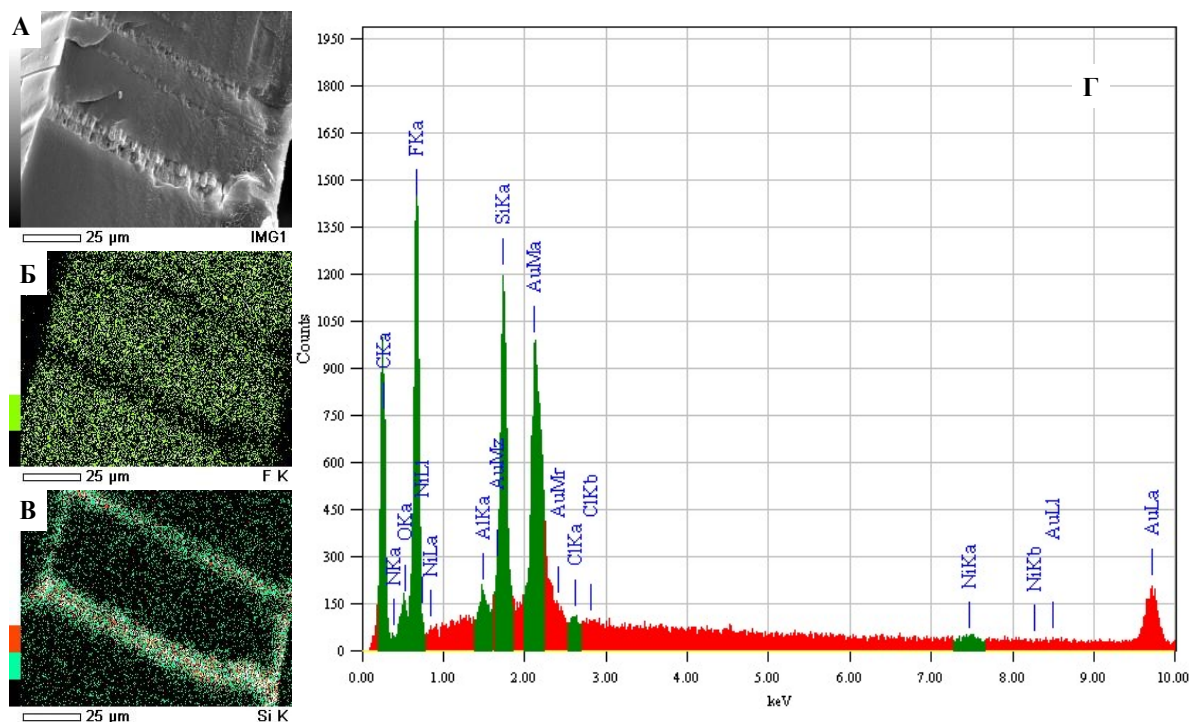


Рисунок. 15. (А) СЭМ-микрофотография скола, карты распределения атомов (Б) F и (В) Si, (Г) спектр характеристического рентгеновского излучения композита ПВДФ-SiO₂, напыленного слоем золота.

Если по характеристическому спектру можно определить интенсивность линий участвующих элементов (как правило, α -линий) и измерить их интенсивность, то на этой основе можно выполнить количественный анализ элементов. Поверхность образцов должна быть совершенно плоской и не иметь рельефа. Наличие дефектов приводит к снижению точности определения концентрации элементов. Чувствительность метода (предел обнаружения) оценивается, как доля элемента в массовых процентах, которая еще может быть выявлена в данной матрице. Она зависит от отношения интенсивности сигнала к уровню фона, продолжительности измерений, величины ускоряющего напряжения и от химического состава матрицы. Рентгеноспектральным микроанализом не удастся определить в составе сплава легкие элементы с порядковым номером меньше 4. Возникают такие трудности и с выявлением элементов, когда на линии К-серии одного элемента накладываются линии L- или М-серии другого элемента. Например, на линию K_L азота практически накладывается линия L_j титана. Наилучший вариант анализа, когда определяется содержание элемента с большим порядковым номером Z в матрице с малым Z . В целом можно считать, что для элементов с $Z > 10$ достигается предел обнаружения на уровне 0.01 мас.% и ниже. Для элементов с меньшим значением Z он составляет только 0.1 мас.%. При анализе неэлектропроводящих объектов на поверхность образца напыляют электропроводящие материалы: углерод, алюминий, золото. Для полимерных материалов метод РСМА полезен для исследования добавок, вводимых для улучшения качества полимеров, их качественного и количественного состава, распределения по объему полимерной матрицы и композиционных материалов на их основе.

4. Методики препарирования образцов для электронной микроскопии

Вся сложность и тонкость электронно-микроскопического метода исследования заключается в препарировании образца для просмотра в электронном микроскопе. Исследование материала методами с высокой разрешающей способностью требует тщательной предварительной подготовки образца. Эта подготовка определяется методом исследования (на просвет или на отражение), типом образца (порошок, пленка, массивный блок), целями исследователя. Поскольку поверхностный слой материала отличается по своей структуре от структуры в объеме, кроме того, он обычно оказывается загрязненным, образец необходимо подвергнуть либо травлению в парах растворителя или активным кислородом, либо делать с него ультратонкие срезы или хрупкие сколы, либо диспергировать.

Рассмотрим основные методики препарирования полимерных образцов, применяемых в просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии.

4.1. Методики препарирования для просвечивающей электронной микроскопии

Одним из ограничений электронно-микроскопического метода при исследовании на пропускание является использование тонких пленок (не более 100 нм), поскольку проникающая способность электронов в диапазоне ускоряющих напряжений (50-100 кВ) мала. Просмотр массивных блоков, толстых пленок, волокон невозможно без специального предварительного препарирования. Для этой цели используются различного рода реплики (отпечатки), ультратонкие срезы и др. Поскольку полимерные соединения состоят в основном из атомов С, Н, О, N, которые слабо рассеивают электроны, то при наблюдении в электронном микроскопе образцы выглядят мало контрастными. Для повышения контраста, а также для сохранения объекта в неизменном состоянии применяют методы оттенения. Для просмотра тонкодисперсные образцы помещают на специальные медные сеточки диаметром 3 мм (рис. 16).

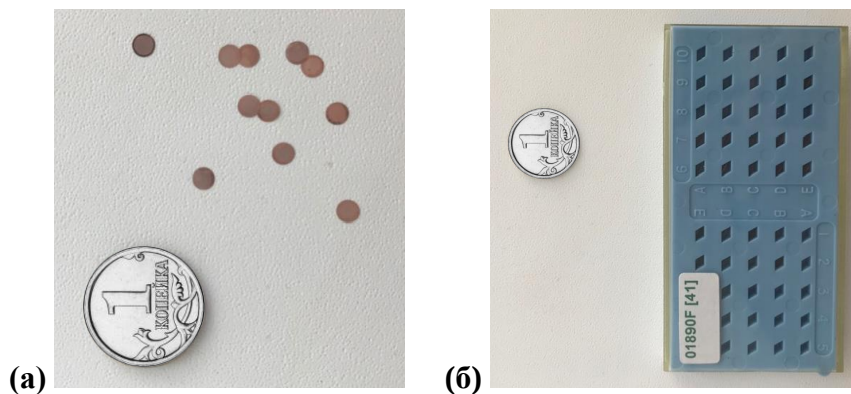


Рисунок 16. Фотографии (а) сеточек для ПЭМ и (б) футляра для их хранения. Для понимания масштаба фотографии сделаны вместе с монетой 1 копейка.

В монографии Г. Шиммеля дан подробный анализ очень большого числа методик препарирования. В данном описании остановимся лишь на некоторых, часто используемых в практике методах. Однако следует помнить, что каждый объект требует индивидуального подбора способа препарирования.

Если исходный материал представляет собой порошкообразное вещество, то в зависимости от поставленной задачи можно предложить несколько основных методов препарирования.

Метод сухого препарирования. Наиболее тонкие порошки (размеры частиц около 10 мкм и менее) можно насыпать непосредственно на сетки, покрытые пленкой-подложкой. Крупные агрегаты частиц удаляются встряхиванием или постукиванием. Частицы с размерами, пригодными для исследования, легко удерживаются коллодиевыми подложками, труднее – угольными.

Другой способ препарирования состоит в том, что сначала получают аэрозоль исследуемого вещества с помощью специального распылителя. Спустя несколько

минут, когда более тяжелые частицы оседают, мелкие частицы осаждают на пленке с подложкой. Это довольно ограниченный метод препарирования. Для исследования структуры кристаллических и аморфных полимеров практически не используется, поскольку для данных объектов характерно формирование больших агрегатов структурных элементов.

Метод влажного препарирования. При этом способе исследуемый материал сначала диспергируют в жидкости, в которой вещество образца имеет очень малую растворимость, с образованием суспензии. Если необходимо, то суспензию можно предварительно подвергнуть воздействию ультразвуком для дробления частиц.

а) *Прикапывание.* В методе влажного препарирования капля суспензии наносится на сетку с подложкой с последующим удалением жидкости (либо испарением, либо удалением фильтровальной бумагой). Это очень простой способ препарирования. Однако, в этом случае следует помнить следующее: во время высушивания могут возникнуть эффекты, которые при электронномикроскопических исследованиях могут служить источником ошибочных результатов. Во-первых, при высыхании капли поверхностное натяжение жидкости может вызвать неравномерное распределение частиц на пленке-подложке. Во-вторых, поверхностное натяжение может привести к деформации легко деформируемых частиц (например, у таких биологических объектов, как кровяные шарики).

У этого метода имеется ряд экспериментальных затруднений: пленки-подложки часто срываются с сеток, на которые они нанесены; жидкость, в которой взвешены образцы, может не смачивать подложку, что приводит к неравномерному распределению частиц по ее площади; суспензии в органических средах могут стекать с сетки, не оставляя на ней осадка образца. Подобного рода затруднения можно избежать, пользуясь различными приемами, описанными в оригинальной литературе.

б) *Способ "теплового прикрепления".* Способ "теплового прикрепления" позволяет готовить электронно-микроскопические препараты из любой суспензии. В основе данного метода – помещение сетки с пленкой-подложкой на поверхность подогретой суспензии, при этом взвешенные в ней частицы прочно прикрепляются к пленке. В зависимости от свойств суспензии и задачи исследования каплю суспензии нагревают до 45-60 °С в течение нескольких секунд или минут. После этого сетку с пленкой и прикрепленными к ней частицами опускают мокрой стороной вниз на керамический фильтр для быстрого удаления жидкой среды. Тогда исследуемые частицы остаются на чистой сухой пленке. Такой способ препарирования образцов позволяет избежать артефактов, возникающих при простом прикапывании вследствие структурирующего действия сил поверхностного натяжения. Способ "теплового прикрепления" был разработан для биологических

объектов, но может быть с успехом применен и для полимеров.

в) *Метод тонких пленок (метод растекания)*. В этом случае на поверхность жидкости-субстрата наливают раствор исследуемого вещества. Пленке, образовавшейся вследствие растекания, необходимо дать затвердеть, а затем перенести на сетку, покрытой пленкой-подложкой. Для выявления структурных элементов таких ультратонких пленок (толщина $\sim 40\text{-}60$ нм) их подвергают либо травлению активным кислородом или парами растворителя, либо контрастированию путем напыления под углом. Все определяется свойствами объекта исследования и поставленными задачами. Указанный метод отличается сложностью и большой трудоемкостью. Не для каждой системы он может быть применим, поскольку должно выполняться требование, чтобы величина поверхностного натяжения препарируемого раствора не превышала 60 % значения поверхностного натяжения субстрата. Кроме рассмотренных выше способов препарирования существует еще ряд интересных, таких как сублимационная сушка, образование тумана ультразвуком и др.

Метод реплик. Для изучения структуры вещества в конденсированном состоянии (массивные блоки, толстые пленки), а также рельефа поверхности применяют метод реплик, т.е. с исследуемого объекта снимают отпечатки-реплики, изготавливаемые из материала, отличного от материала самого объекта (рис. 17). Реплика представляет собой тонкую пленку из материала, прозрачного для электронов, которая точно соответствует рельефу образца. Толщина реплики должна быть порядка 0.01 мкм. Известны два основных метода изготовления реплик.

а) *Одноступенчатая реплика*. Реплику получают путем вакуумного испарения углерода (можно кварца, Al и др.) непосредственно на образец (рис. 17). После отделения реплика сразу может быть просмотрена в электронном микроскопе. Применение одноступенчатого метода в большинстве случаев приводит к разрушению образца или его поверхности. Метод одноступенчатой реплики более пригоден для исследования образцов в виде мелких частиц. Реплика отделяется от образца путем растворения последнего.

б) *Двухступенчатая реплика*. На поверхность образца наносят полимерный материал (раствор коллодия, формвара) в качестве предварительного отпечатка, который воспроизводит все детали рельефа. Окончательную реплику из углерода, кварца и др. снимают уже с поверхности этого отпечатка и исследуют в микроскопе. Использование этого метода позволяет сохранить поверхность образца для исследования другими методами. Этот метод более пригоден для массивных образцов или когда образец из трудно растворимого материала.

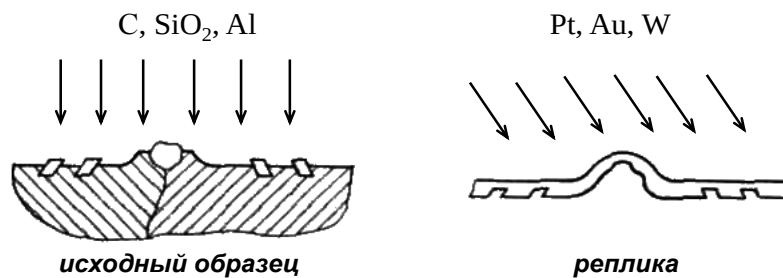


Рисунок 17. Схема получения реплики.

Известны также трех- и четырехступенчатые реплики, но они сложны. Выбор наиболее подходящего способа изготовления реплики зависит от природы и свойств исследуемого образца. Ни один из методов изготовления реплик не является универсальным; большинство разработаны для вполне определенных целей.

Ультрамикротомирование. Наиболее популярным методом приготовления образцов для просвечивающей электронной микроскопии является метод ультрамикротомирования. С помощью ультрамикротомы (рис. 18а) блочный массивный образец нарезается на тонкие срезы, которые затем размещаются на сеточки для дальнейшего изучения в микроскопе. На рис. 18б показана простая схема получения тонких срезов. Обычно нож в микротоме неподвижен, а образец закреплен в подвижный держатель, который передвигается вверх и вниз путем вращения колеса рукой или мотором. Специальный механизм выдвигает держатель объекта при каждом его поднятии на заданное расстояние (обычно 10-500 нм). Срезы один за другим сползают с ножа на поверхность инертной к образцу жидкости (обычно воды) в ванну. Угол между ножом и образцом устанавливается порядка 3-5°. В ультрамикротоме используются стеклянные или алмазные ножи. Существуют криоультрамикротомы, совмещенные с криокамерами для приготовления срезов в условиях низких температур.

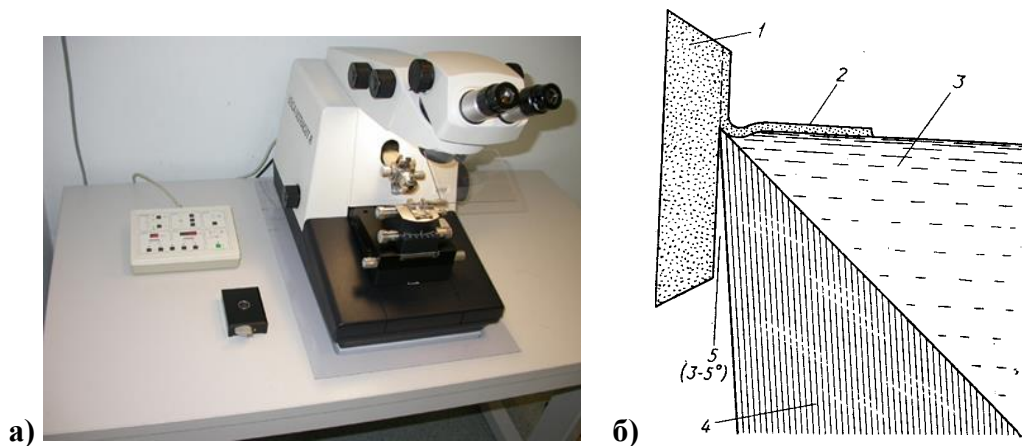


Рисунок 18. (а) Ультрамикротом и (б) его схема работы. 1 – образец, 2 – тонкий срез образца, 3 – поверхность жидкости, 4 – острый нож ультрамикротомы.

4.2. Методы контрастирования

Контраст, получаемый при исследовании изображений полимерных образцов, биологических объектов и их реплик в электронном микроскопе, обычно очень низок, и возникает необходимость увеличить его. Процесс контрастирования заключается в определенной обработке образцов для повышения общего контраста изображения или выявления элементов структуры. Выделяют физические (например, метод оттенения) и химические методы повышения контраста.

Метод оттенения. Суть метода заключается в наклонном напылении в вакууме тонкого слоя материала с высокой рассеивающей способностью для электронов на поверхность образца или реплики рис. 18б, 19. Как видно из рис. 19, области, затемненные (защищенные) от падающего потока атомов металла деталями рельефа, не покрываются осадком. Эти области остаются более прозрачными для электронов, чем области, покрытые высоко рассеивающим веществом, и напоминают тени (рис. 20а). При просмотре в электронном микроскопе они выглядят более прозрачными, чем окружающие области. После фотографирования на негативе эти тени изображаются темными областями, создавая тем самым впечатление поверхности, освещенной косым пучком света.

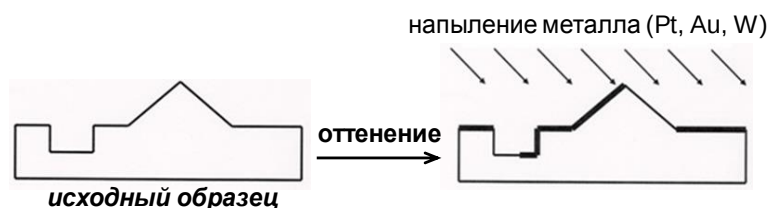


Рисунок 19. Схема проведения оттенения образца.

Оттенение улучшает контраст и в то же время обеспечивает эффект объемности, что позволяет измерить размер объекта и оценить его форму.

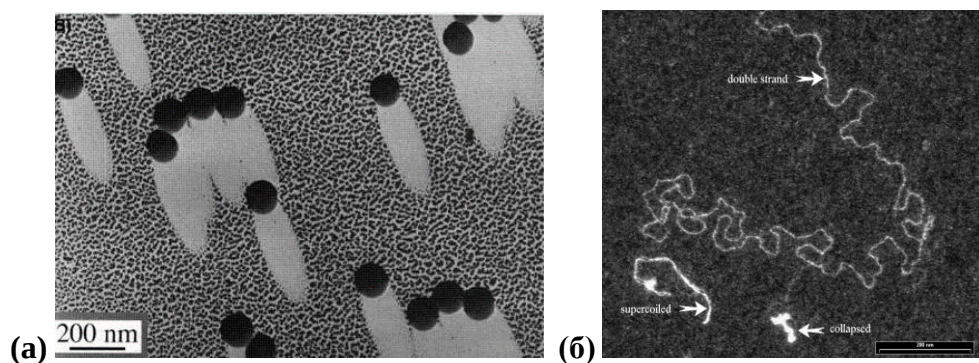


Рисунок 20. Микрофотографии (а) частиц латекса, оттененных Pt, и (б) развернутой молекулы ДНК с применением метода негативного контрастирования.

В настоящее время известно большое количество материалов, пригодных для оттенения. Материал выбирается в зависимости от требуемого разрешения и длительности операции. Почти все подходящие материалы являются металлами (Cr,

Ge, Pt, Pd, сплав Pt+Pd, Au и многие другие) и поддаются испарению с вольфрамовых корзинок или молибденовых лодочек. Некоторые металлы сплавляются с испарителем, например, Pt, Au, и полное их испарение оказывается невозможным. Легче испаряются сплав Au+Pd, Pd и т.д. Однако, если требуется высокое разрешение, то легко испаряющиеся металлы оказываются менее пригодными, т.к. они образуют агрегаты кристаллов во время бомбардировки в электронном микроскопе. Появляется структурированный фон. Наиболее подходящим оттеняющим металлом является Pt (размер зерна ~2.5 нм). При более высоких разрешениях применяют одновременное испарение Pt и Cr.

Метод негативного контрастирования. Кроме описанного метода оттенения, являющегося универсальным способом повышения контраста изображения, существуют методы негативного контрастирования, широко используемые для биологических объектов и полимеров. Способ негативного контрастирования основан на окружении частиц веществом, непрозрачным для электронов. В этом случае изображение изучаемого объекта получается светлым на фоне темного поля (рис. 20б). Вещества, используемые для негативного контрастирования, не должны вступать в реакцию с объектом, но должны иметь высокую электронную плотность, высокую точку плавления, чтобы не плавиться и не возгоняться под электронным лучом. Этим требованиям отвечают растворы уранилацетата, натриевой или калиевой солей фосфорновольфрамовой кислоты, кремневольфрамовокислого натрия, молибденацетата и некоторых других солей.

Метод позитивного контрастирования. Позитивное контрастирование заключается во введении тяжелых атомов в отдельные элементы структуры образца. Часто в основе этого метода лежат специфические химические взаимодействия между контрастирующим агентом и каким-то компонентом образца, вследствие чего появляется возможность селективного контрастирования его определенных структурных элементов. Например, присоединение тетраоксида осмия к двойной углерод-углеродной связи (контрастирование фазы полибутадиена или полиизопрена, как показано на рис. 21а), реакции комплексообразования с ионами металлов, др.

Также метод позитивного контрастирования используют для изучения структуры частично кристаллических полимеров, для которых характерно неравномерное распределение атомов тяжелых элементов (металлы, йод) в кристаллических и аморфных областях (рис. 21б), благодаря разной скорости диффузии атомов из раствора или газообразного состояния в эти области (тяжелые атомы концентрируются преимущественно в аморфных областях).

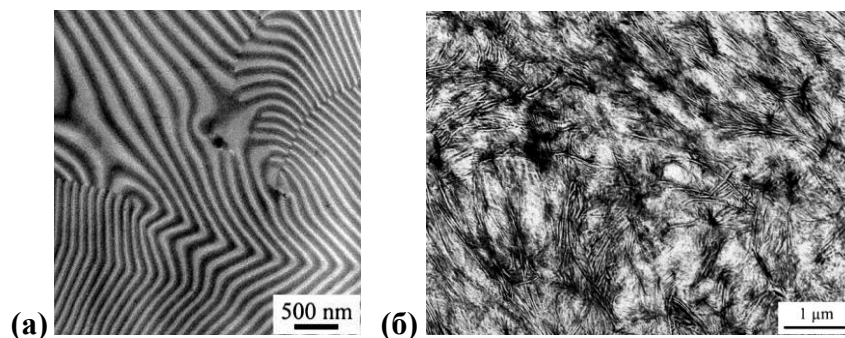


Рисунок 21. Микрофотографии тонких срезов (а) ПММА-*b*-ПБМА, контрастированный RuO₄ (фаза ПБМА темная) и (б) ПЭВП после контрастирования OsO₄.

4.3. Методики препарирования для сканирующей электронной микроскопии

Препарирование образцов для исследования в режиме отражения является не сложной процедурой. Если необходимо исследовать поверхность материала, ее необходимо предварительно очистить. Если необходимо исследовать структуру образца в объеме, то с него делают хрупкий скол. Обычно для увеличения хрупкости материала его охлаждают до температуры жидкого азота (-196 °C), а затем резким механическим воздействием раскалывают. Для облегчения образования и развития хрупкой трещины, обычно до охлаждения проводят ее зарождение, нанеся на поверхность образца дефект. Например, на полимерных пленках делают надрез.

Необходимо особо отметить, что очень важен выбор механического воздействия при получении скола. Например, ранее использовали ударное воздействие на образец. Однако оказалось, что возникающая в этом случае в образце ударная волна приводит к смещению отдельных структурных элементов, тем самым изменяя исходную структуру материала. В настоящее время обычно образец разрушают либо путем изгибания, либо раздира. В этом случае важно очень хорошо охладить образец, чтобы избежать развития пластических деформаций.

Образцы для просмотра в виде поверхности или хрупкого скола приклеивают к специальному микроскопическому столику (рис. 22) при помощи, например, углеродного двустороннего скотча. Поскольку полимеры обычно не являются проводниками электрического тока, их необходимо напылять тонким слоем (30-100 нм) электропроводящего материала (Au, Pt, Pd или их сплавами) для предотвращения накопления электрического заряда, разогревания и разрушения образца. В современных сканирующих электронных микроскопах, работающих на автоэмиссионных катодах, существует возможность работать в условиях невысокого вакуума, и даже в парах. В этом случае напыление проводящего слоя на образец не требуется.



Рисунок 22. Фотография микроскопического столика с образцами для СЭМ. Для понимания масштаба фотографии сделаны вместе с однокопеечной монетой.

В заключении, важно отметить, что в любом экспериментальном методе необходимо тщательно соблюдать «гигиену» образца. А именно, для приготовления образцов использовать свежеприготовленные растворы, чистые растворители и химическую посуду. Часто необходимо проведение так называемых контрольных экспериментов, выполненных в аналогичных условиях, что и основной эксперимент. Зачастую, несоблюдение тщательной «гигиены» эксперимента приводит к выбраковке полученного массива экспериментальных данных. Нужно помнить, что эксперимент должен быть достоверным и воспроизводимым не только в условиях конкретной экспериментальной лаборатории, но и в других научных группах по всему миру.

5. Интерпретация электронно-микроскопических микрофотографий

Методика электронной микроскопии является наглядным и эффективным методом исследования. С её помощью можно получить информацию не только о размерах исследуемых объектов, но и о его химическом и фазовом составе. Современные электронные микроскопы, оснащенные мощным программным обеспечением, позволяют делать трехмерную реконструкцию изображения с высоким пространственным разрешением, недоступным оптическим методикам. Несмотря на массу достоинств прямых микроскопических методик, экспериментатору необходимо подходить с аккуратностью к интерпретации любых экспериментальных данных. Метод электронной микроскопии не является исключением. Ниже приведены некоторые особенности интерпретации данных, полученных на электронном микроскопе.

Муаровый узор. Иногда на микроскопических изображениях кристаллических веществ появляется узор в виде полос, обычно формирующих периодический рисунок (рис. 23А). Особенно четко этот рисунок виден на темнопольном изображении. Муаровый узор возникает при наложении с небольшим сдвигом двух систем равноудаленных параллельных линий (трансляционный муар, рис. 23Б) или в результате их поворота на небольшой угол (поворотный муар, рис. 23В).

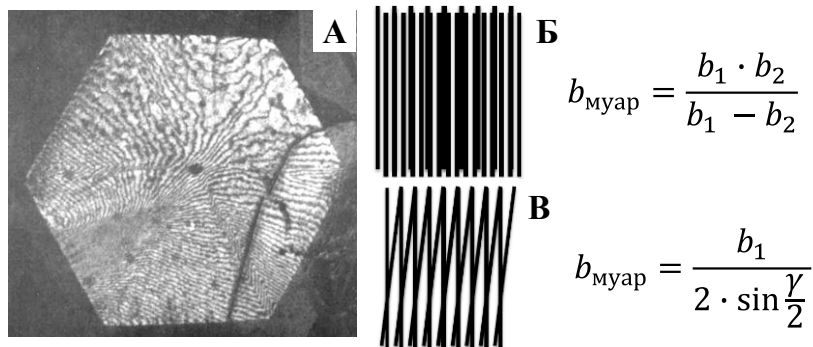


Рисунок 23. (А) Темнопольная ПЭМ-микрофотография кристалла полиоксиметилена с муаровым узором⁸. Схемы формирования и формулы расчета периода для (Б) трансляционного и (В) поворотного муара, b_1 и b_2 – периоды исходных решеток, γ – угол поворота.

В случае кристаллов он появляется в виде полос сгущения с периодичностью $b_{\text{муар}}$, когда атомные решетки двух кристаллов наложены практически точно друг на друга. Такие узоры позволяют наблюдать больше деталей, чем можно различить на обычной электронной микрофотографии. Любой дефект (дислокация) в регулярной структуре, связанная со смещением атомов, ведет к значительным изменениям расстояния между элементами узора, что можно использовать для повышения разрешающей способности электронного микроскопа вплоть до субатомных расстояний.

Артефакты. При интерпретации электронно-микроскопических фотографий следует не забывать об артефактах. Под артефактами понимают особенности изображения, обусловленные не структурой исследуемого объекта, а методикой препарирования и погрешностями при просмотре образцов в электронном микроскопе.

Одной из распространенных причин возникновения артефактов является загрязнение пленок-подложек или самого исследуемого объекта. При изучении реплик возможно образование трещин в самой реплике, ее сморщивание. Кроме того, изображение объекта в зависимости от способа препарирования образца (хрупкий излом, ультратонкий срез и др.) может изменяться. На рис. 24 представлено изображение тонких пленок разной толщины одно и того же образца блок-сополимера. Хорошо видно, что толстая пленка неверно отражает структурно-морфологические особенности изучаемого блок-сополимера из-за наложения изображений доменов полибутадиеновой фазы, находящихся на разной глубине от поверхности пленки. Из-за этого отдельные сферические домены для более толстого образца видны как цепочечные структуры.

⁸ D. C. Bassett. On moiré patterns in the electron microscopy of polymer crystals, Philosophical Magazine, 1964, 10:106, 595-615, doi: 10.1080/14786436408228481

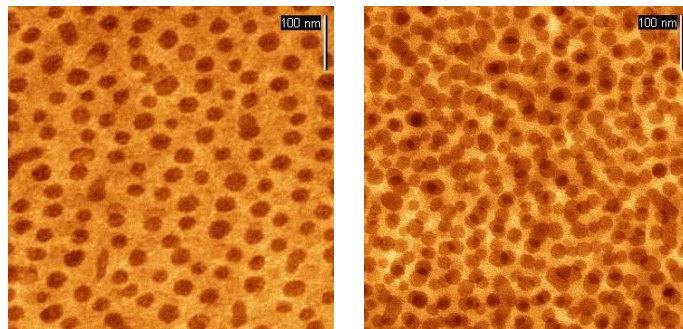


Рисунок 24. Микрофотографии тонких пленок блок-сополимера стирола-бутадиен-стирола. Бутадиеновая фаза контрастирована OsO_4 . На фотографии слева толщина пленки около 100 нм, на фотографии справа – около 200 нм.

Еще один источник искажений результатов – взаимодействие пучка электронов с образцом, что может приводить к нарушению его структуры или химического состава. Это воздействие называют радиационными повреждениями. Они обусловлены двумя главными процессами:

1. Радиолиз – процессы (главным образом ионизация), которые приводят к разрыву химических связей;
2. Выбивание – смещение атомов из узлов решетки с образованием точечного дефекта.

Полимеры весьма чувствительны к электрон-электронным взаимодействиям. Под действием электронного облучения в высоком вакууме полимерные образцы нагреваются и претерпевают химические изменения, например, возможно протекание процессов сшивания и деструкции. На рис. 25а представлены изображения пленки метилцеллюлозы, пропитанной сульфатом меди, в которой при просмотре в ПЭМ происходит *in situ* восстановление меди и формирование наночастиц. В кристаллических веществах, в том числе в частично кристаллических полимерах, может нарушаться структура, что приводит к заметному ухудшению или даже исчезновению дифракционной картины. На рис. 25б приведен пример аморфизации кристаллов $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ под воздействием пучка электронов в просвечивающем электронном микроскопе.

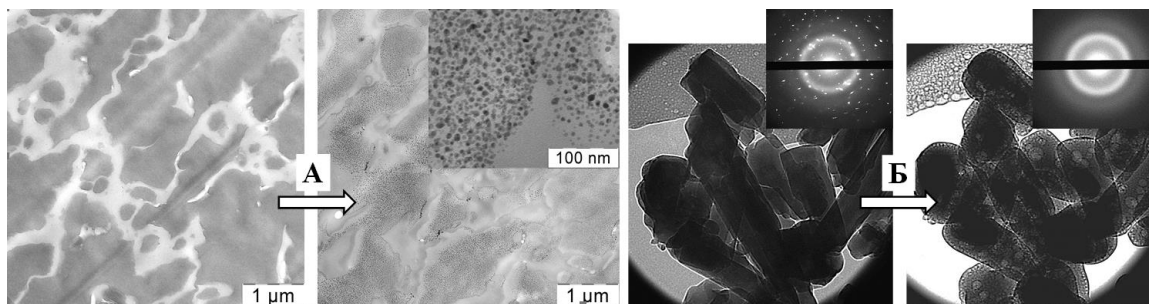


Рисунок 25. (а) Изменение вида ПЭМ-микрофотографий медьсодержащей пленки метилцеллюлозы и появление наночастиц под действием пучка электронов. (б) Микрофотографии и электронограммы кристаллов $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, полученные с одного и того же участка образца до (а) и после (б) аморфизации под действием пучка электронов.

Для минимизации радиационных повреждений в полимерах, можно использовать следующие приемы:

1. использовать по возможности низкие дозы для регистрации изображения;
2. работать при наиболее высоком напряжении;
3. охлаждать образец (например, до температуры жидкого азота);
4. наносить на поверхность слой металла.

Неверная интерпретация электронных микрофотографий может быть также обусловлена ошибками юстировки прибора. Так, астигматизм объективной линзы может привести к типичному искажению – появлению направленной бороздчатой структуры. Это происходит вследствие того, что круглые точки объекта изображаются как линии в одной из астигматических фокальных плоскостей. Направленное размытие изображения на фотографии может быть связано либо с дрейфом объекта во время экспозиции, либо с механической вибрацией колонны.

Таким образом, к интерпретации электронно-микроскопических микрофотографий следует подходить осторожно. Самым надежным и верным средством для исключения ошибок при интерпретации снимков незнакомых объектов является контроль полученных результатов с помощью различных методов препарирования и исследования, а также проведение контрольных экспериментов.

6. Области применения электронной микроскопии для полимеров

В заключение перечислим проблемы, которые можно решить с помощью электронномикроскопического метода исследования в области полимерной химии.

1. Детальная визуализация структуры (получение изображения) аморфных и кристаллических полимеров, используя специфические приемы препарирования и контрастирования.

2. Характеристика структуры (однородность; морфология и способ распределения различных структурных неоднородностей) полимеров, в том числе гелей, пористых объектов, композиционных и гибридных материалов на их основе.

3. Количественное описание: определение среднего размера и распределение по размерам структурных элементов, например кристаллитов, пор, частиц, островков.

4. Изучение процессов структурообразования в растворах полимеров, гелях и твердых полимерных телах, используя оригинальные методики препарирования.

5. Определение фазового состояния (аморфное, кристаллическое) и параметров кристаллической решетки, используя метод электронографии и получение микродифракционных картин.

6. Определение химического состава и композиционной неоднородности полимерных материалов и композитов на их основе.

Развитие электронно-микроскопического метода исследования идет как по

пути совершенствования и изобретения различного вида и назначения приспособлений, так и совершенствования методик препарирования для наблюдения объектов. Применение дополнительного специального оборудования (приставок) к стандартному оснащению электронного микроскопа позволяет расширить круг решаемых задач. Например, использование приспособления для охлаждения объекта предотвращает не только загрязнение объекта, но и расширяет круг органических объектов, которые можно наблюдать в электронный микроскоп. Использование газовой камеры, где образец находится при давлении газа (N_2 , O_2 , воздух) от 10 мм рт.ст. до атмосферного, позволяет изучать процессы структурообразования в растворах полимеров даже в достаточно летучих органических растворителях.

7. Примеры практических задач для спецпрактикума по электронной микроскопии

Задача №1.

Предложить методику подготовки, препарирования и контрастирования полимерного образца для исследования его структуры методом ПЭМ:

вариант 1: латексные частицы акриловых сополимеров;

вариант 2: массивный образец из блок-сополимера поли(4-винилпиридина) и производного поли(п-фенилен винилена).

Задача №2.

Используя ПЭМ-микрофотографии, построить кривые распределения по размерам для

вариант 1: микродоменов блок-сополимера;

вариант 2: частиц наполнителя в нанокompозите с полимерной матрицей.

Задача №3.

Определить межплоскостные расстояния кристаллического наполнителя в композите по приложенной электронограмме, используя электронограмму стандартного образца золота.

Рекомендуемая литература

1. Г.С. Ландсберг. Оптика, главы 12-14, М., 1957.
2. Г. Шиммель. Методика электронной микроскопии, главы 5, 6, 1972.
3. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: в 2-х книгах, под ред. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П. и др., М.: Мир, 1984.
3. Техника электронной микроскопии, под ред. Кзя, 1967.
4. Д.Х. Джейл. Полимерные монокристаллы, глава 2, 1968.
5. В.А. Марихин, Л.П. Мясникова. Надмолекулярная организация полимеров. М.: Химия, 1977, стр. 29-48, 86-122.
6. Справочник по микроскопии для нанотехнологии под ред. Нан Яо, Чжун Лин Ван. М.: Научный мир, 2011. 712 с. Пер. с англ. колл. переводчиков. Научный редактор русского издания И.В. Яминский.
7. Fultz B., Howe J. Transmission electron microscopy and diffractometry of materials - 2nd Ed. – Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hong Kong; London; Milan; Paris; Singapore; Tokyo: Springer, 2002.
8. Transmission electron microscopy: a textbook for materials science, Eds. D.B. Williams, C.B. Carter. New York: Springer Science+Business Media, 1996.
9. M.A. Asadabad, M.J. Eskandari. Electron Diffraction, Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences, Eds. M. Janecek, R. Kral, IntechOpen, 2016.
<https://www.intechopen.com/books/modern-electron-microscopy-in-physical-and-life-sciences/electron-diffraction>
10. Физические принципы электронной микроскопии. Введение в просвечивающую, растровую и аналитическую электронную микроскопию/ Р. Ф. Эгертон: пер. с англ. С. А. Иванова, М: Техносфера, 2010
11. Синдо Д., Оикава Т. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. – М. : Техносфера, 2006.
12. Кристаллография, рентгенография и электронная микроскопия / Я. С. Уманский [и др.]. – М. : Металлургия, 1982.
13. Спенс Дж. Экспериментальная электронная микроскопия высокого разрешения. – М. : Наука, 1986.

Интернет-ресурсы

1. Растровая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ. Аппаратура, принцип работы, применение. <http://lab.bmstu.ru/rem/index.htm>
2. http://ernst.ruska.de/daten_e/library/documents/999.nobellecture/lecture.html
3. <https://zeiss-solutions.ru/equipment/mikroskopy/elektronnie-mikroskopy/>
4. <http://jeolrus.com/product>
5. <https://www.gatan.com/>
6. <https://www.tedpella.com/>

Список сокращений

ПЭМ (ТЭМ) – просвечивающий (трансмиссионный) электронный микроскоп, просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп, сканирующая электронная микроскопия

РЭМ – растровый электронный микроскоп, растровая электронная микроскопия

СХПЭЭ – спектроскопия характеристических потерь энергии электронами (англ. electron energy loss spectroscopy (EELS))

РСМА – рентгеноспектральный микроанализ

ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (англ. energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX))

ВДС – рентгеновская спектроскопия с дисперсией по длине волны (англ. wavelength-dispersive X-ray spectroscopy (WDX))

ПВДФ – поливинилиденфторид

ПЭВП – полиэтилен высокой плотности

ПММА – полиметилметакрилат

ПБМА – полибутилметакрилат