Archive of SID

مروری بر نکات عملی در تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری

نویسندگان
داود قرایلو[۱و۳*]
مجتبی حسین‌پور[۲و۳]
* davoud.Gharailou@gmail.com

چکیده
در این مقاله تلاش شده است تا برخی نکات مهم عملی در آماده‌سازی و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری تشریح شود. تثبیت شرایط محیطی اتاق میکروسکوپ الکترونی عبوری، اطمینان از کالیبره بودن دستگاه، تثبیت خلاء پیش از شروع کار، ممانعت از بروز آلودگی محیطی، رعایت نکات مهم در شستشوی نمونه‌ها، استفاده از روش‌هایی با کمترین آسیب ساختاری برای خشک کردن نمونه، استفاده صحیح از اولتراسونیک و به کارگیری زمان بهینه برای اعمال امواج فراصوت، انتخاب گرید مناسب با نمونه، بهره‌گیری از نیتروژن مایع، جلوگیری از گرم شدن نمونه و دقت در تعیین بزرگنمایی از جمله این نکات هستند.

واژه‌های کلیدی
میکروسکوپ الکترونی عبوری، نمونه سازی کاربری میکروسکوپ الکترونی عبوری

مقدمه

از زمان ساخت لنز، دانشمندان همیشه به دنبال بهبود توانایی مطالعه اجسام پیرامون با استفاده از میکروسکوپ بودند تا این که در اوایل قرن بیستم با طراحی و ساخت میکروسکوپ الکترونی عبوری[۴] فصل تازه‌ای در تحقیقات در علوم مختلف آغاز شد به طوری که ساخت میکروسکوپ الکترونی عبوری را می‌توان سرفصل جدیدی در حوزه میکروسکوپی دانست، چرا که با ساخت این نوع میکروسکوپ، انسان توانست قدم در فضایی بگذارد که تا پیش از آن اطلاعات اندکی از این مقیاس وجود داشت.

با توسعه فناوری‌نانو، اهمیت و اثرگذاری TEM بیشتر شد به طوری که در حال حاضر این میکروسکوپ به یکی از مهمترین تجهیزات تصویربرداری و مطالعات ساختارها در مقیاس اتمی و مولکولی تبدیل شده‌است. با این حال، به دلیل پیچیدگی‌ها و شرایط ویژه کار با TEM، مهارت و تجربه باید چاشنی کار شود و کاربر دستگاه باید نسبت به شرایط نمونه و دستگاه اطلاعات کافی داشته باشد؛ در غیر این صورت، هر نوع خطایی در طی فرآیند کار می‌تواند تاثیر شگرفی بر نتیجه نهایی داشته باشد.

www.SID.ir

rchive of SID

اهمیت نکات عملی در تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری

در این مقاله تلاش شده تا برخی نکات مهم و کاربردی درباره آماده‌سازی و تصویربرداری TEM تشریح شود، نکاتی که به‌طور معمول در کتاب‌ها و گزارش‌ها به ندرت به آن پرداخته می‌شود که دلیل آن کاربر محوری این نکات است. در واقع برخی مسائل در حوزه میکروسکوپ الکترونی عبوری وجود دارند که در طول زمان و در حین استمرار در کار آماده‌سازی و تصویربرداری به‌دست می‌آیند و این نکات با رسوب تجربه و انباشت دانش، به مرور زمان حاصل می‌شوند و از آنجایی که این موارد از نظر محققان و پژوهشگران نکات جزئی محسوب می‌شوند به‌طور معمول در انتشارات علمی به آن اشاره نمی‌شود، در حالی که این موارد می‌توانند بر نتیجه نهایی کار تاثیرگذار باشند. این مقاله به سه بخش پیش‌شرط‌های کار با TEM، آماده‌سازی و تصویربرداری، تقسیم‌بندی شده که در هر بخش به نکات ویژه هر سرفصل پرداخته می‌شود.

پیش‌شرط‌های کار با TEM

یکی از مهمترین پیش‌شرط‌ها در کار با دستگاه TEM، کالیبراسیون و تضمین کالیبره بودن آن است. با توجه به نقش دستگاه TEM در فرآیند مشخصه‌یابی می‌توان این دستگاه را به مثابه یک خط‌کش دید که اعداد و ارقام خروجی از آن به‌عنوان راهنمای محقق در مسیر پژوهش تلقی می‌شود؛ بنابراین، هر گونه خطایی در اندازه‌گیری می‌تواند در دقت و صحت کار مشخصه‌یابی تردید ایجاد کند. کالیبراسیون به فرآیندی گفته می‌شود که در آن کاربر با استفاده از نمونه مرجع گواهی‌دار[5] اندازه‌های ارائه شده در دستگاه را تایید می‌کند و درصورت وجود خطا، بخشی از این خطا با استفاده از تغییر در عوامل موجود در دستگاه اصلاح شده و بخش دیگر در قالب عدم قطعیت[6] گزارش می‌شود. فقدان کالیبراسیون به معنای اطمینان ناکافی از اعداد گزارش شده خواهد بود.

از جمله پیش‌شرط‌های کار با TEM، تثبیت شرایط محیطی در محدوده استاندارد است. دما و رطوبت به دلیل تاثیری که در نتیجه کار دارند، باید کنترل شوند. شاید در مقیاس‌های بزرگ تغییر یک درجه دما چندان مهم به نظر نرسد اما با کاهش ابعاد و رسیدن به مقیاس نانومتری، حتی تغییرات کمتر از یک درجه نیز می‌تواند روی خواص فیزیکی، شیمیایی و نوری نمونه تاثیرگذار باشد. لرزش، از عوامل موثر پنهان در TEM است؛ عبور وسایل نقلیه در اطراف اتاق TEM موجب لرزش‌هایی می‌شود و این لرزش‌های هر چند خفیف می‌تواند موجب مات شدن تصویر شود. حتی قدم زدن نیز می‌تواند لرزش‌های ناخواسته ایجاد کند. بنابراین، بتون‌ریزی در کف اتاق TEM و رعایت نکات مهم از قبیل پرهیز از حرکت‌های غیرضروری در حین تصویربرداری می‌تواند این اثرات ناخواسته را به حداقل برساند.

به‌طور معمول، خلاء دستگاه TEM یکی از بخش‌های آسیب‌پذیر این میکروسکوپ محسوب می‌شود، فقدان یک خلاء پایدار می‌تواند موجب بروز مشکلاتی در تصویربرداری شود. از این رو، لازم است پیش از شروع کار، دستگاه روشن مانده تا کاربر از تثبیت خلاء مطمئن شود. رهایش ذرات از سطح نمونه گاهی موجب بروز جرقه یا خلل در پایداری دستگاه می‌شود؛ این امر در نهایت می‌تواند روی پرتو الکترونی تابش تاثیرگذار باشد.

زمانی که در مقیاس نانومتری کار می‌شود، وجود گرد و غبار می‌تواند منجر به بروز آلودگی روی نمونه شود؛ بنابراین، اطمینان از تهویه صحیح در اتاق آماده‌سازی و تصویربرداری ضروری است. هر ذره غبار روی سطح نمونه منجر به خطای آلودگی می‌شود، از آنجایی که ذرات غبار به سختی با چشم غیرمسلح دیده می‌شوند، لازم است پایش مستمر دستگاه تهویه و شرایط اتاق از منظر نشست غبار روی سطح میز انجام شود.

آماده‌سازی نمونه

در نمونه‌سازی برای تصویربرداری TEM عوامل متعددی نقش دارند [۱] که این عوامل می‌توانند تاثیر مستقیم در نتیجه آزمون داشته باشند. برخی نمونه‌های پودری به دلیل شرایط سنتز یا نگهداری آنها، آلوده هستند که بخشی از این آلودگی‌ها با شستشو قابل رفع است. البته هر نوع شستشوی نمونه باید از پیش مورد بررسی قرار گیرد تا نوع حلال مناسب برای رفع آلودگی مشخص شود. یکی از ساده‌ترین شستشوها، استفاده از استون برای رفع آلودگی‌های آلی در نمونه‌های پودر فلزی است که با افزودن اندکی استن و به هم زدن نمونه و در نهایت سرریز کردن استن، می‌توان به رفع بخشی از آلودگی‌های آلی در نمونه کمک کرد. وجود آلودگی‌های آلی در حین تصویربرداری می‌تواند مشکل‌ساز شود به طوری که برخی از مواد آلی روی ساختار مورد نظر در نمونه تجمع کرده و موجب مات شدن ساختار می‌شود. گاهی برای شستشو نیاز به فرآیندهای پیچیده‌تر است [۲] که متناسب با شرایط نمونه و دستورالعمل‌های موجود در مقالات و گزارش‌ها باید مراحل شستشو مشخص شود. انتخاب دیسپرسانت مناسب که با نمونه برهم‌کنش ناخواسته نداشته باشد از اولین پیش‌شرط‌ها در شستشو است.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از شستشو، نمونه لازم است که خشک شود. در برخی نمونه‌ها از حرارت ملایم برای خشک کردن استفاده می‌شود. یکی از نکات مهمی که در فرآیند خشک کردن باید مدنظر گرفت این است که حرارت ممکن است موجب تغییراتی در ساختار نمونه شود؛ بنابراین، کاربر باید در موارد غیر ضروری از حرارت دادن نمونه خودداری کند تا عملیات حرارتی روی نمونه صورت نگیرد. متبلور شدن، تغییر ساختار بلوری و تغییر فاز از جمله نتایج ناخواسته حرارت روی نمونه است. پیشنهاد می‌شود در حین شستشو از دیسپرسانت‌های فرار نظیر اتانول و استون استفاده شود تا بتوان بعد از اتمام شستشو، تنها با قرار دادن نمونه در معرض هوا آن را خشک کرد. با این کار نیاز به حرارت نبوده و از اثرات ناخواسته حرارتی پرهیز می‌شود.

نمونه‌های پودری و سوسپانسون گاهی نیاز به اولتراسونیک[۷] دارند. دستگاه اولتراسونیک با ایجاد امواج فراصوت موجب متفرق شدن و جدا شدن ذرات از هم می‌شود. با اعمال فراصوت در محلول، حباب‌های بسیار ریزی در محلول شکل گرفته و منفجر می‌شود. در واقع اولتراسونیک دستگاهی گاززدا بوده که با ایجاد حباب در محلول و انفجار آنها می‌توان نقاط داغ در محلول را به‌وجود آورد. این نقاط داغ محل‌هایی هستند که در آنجا فشار و دمای بالایی اعمال شده و این شرایط موجب متفرق شدن ذرات و جدا شدن آنها از هم می‌شود. یکی از اثرات اعمال اولتراسونیک به مدت طولانی، از بین بردن دو لایه الکتریکی اطراف ذره است. با این کار پتانسیل زتای ذرات به سمت صفر متمایل شده و در نتیجه احتمال دوباره چسبیدن ذرات افزایش می‌یابد. بنابراین، نباید امواج فراصوت به مدت طولانی روی نمونه اعمال شود. در واقع با آغاز اعمال امواج فراصوت و ترکیدن حباب‌ها، جدا شدن ذرات از یکدیگر شروع می‌شود اما پس از گذشتن از یک زمان بحرانی، اثر از بین رفتن دو لایه الکتریکی نمایان می‌شود، این اثر موجب دوباره چسبیدن ذرات می‌شود که عکس فرآیند اولیه، یعنی جدا شدن ذرات از هم عمل می‌کند. با افزایش زمان اثر از بین رفتن دو لایه الکتریک غالب شده و ذرات به سرعت به هم می‌چسبند. در نتیجه می‌توان گفت که با شروع اعمال امواج فراصوت، ذرات شروع به دیسپرس و جدا شدن از هم می‌کنند اما با گذشت زمان از حد بحرانی، دوباره ذرات به هم می‌چسبند. پیشنهاد می‌شود با توجه به شرایط نمونه و بررسی مقالات مرتبط، زمانی بهینه برای اعمال امواج فراصوت در نظر گرفته شود و از افزایش زمان فراصوت و رسیدن به حد بحرانی پرهیز شود.

پس از آماده‌سازی اولیه نمونه‌های پودری و سوسپانسیون، این نمونه‌ها باید روی زیرلایه‌ای ریخته شوند که به آن گرید[۸] گفته می‌شود. گرید در واقع شبکه‌ای از جنس مس یا فلزات دیگر است که نمونه روی آن قرار گرفته و سپس داخل دستگاه TEM قرار داده می‌شود. این زیرلایه‌ها به‌طور معمول، به دلیل ضخامتی که دارند در تصویربرداری با قدرت تفکیک بالا مشکلاتی ایجاد می‌کنند. برای حل این مشکل، شرکت‌ها گریدهایی می‌سازند که دارای حفره باشند و لایه‌ای نیز روی سطح گرید قرار می‌گیرد. گریدها از جنس مس، نیکل و یا طلا هستند که هم می‌توانند حاوی پوشش باشند و یا با فیلم‌های هولی[۹] یا لیسی[۱۰] پوشانده شوند. گریدها بسیار صاف و گاهی دارای حفره‌های از پیش تعیین شده هستند که شکل و توزیع مشخصی دارند. در برخی از گریدها، یک لایه پلیمری یا کربنی نیز روی بستر قرار داده می‌شود (شکل (۱))؛ از آنجایی که این لایه به‌صورت مکانیزه روی سطح قرار داده می‌شود، در نتیجه آلودگی آن به حداقل رسیده و نیاز به مواد پاک‌کننده و دستکاری اضافی ندارد که این موضوع یک مزیت برای گریدهای میکروسکوپی قلمداد می‌شود.

شکل (۱): نمایی از یک گرید مسی که روی آن لایه کربنی قرار داده شده‌است.

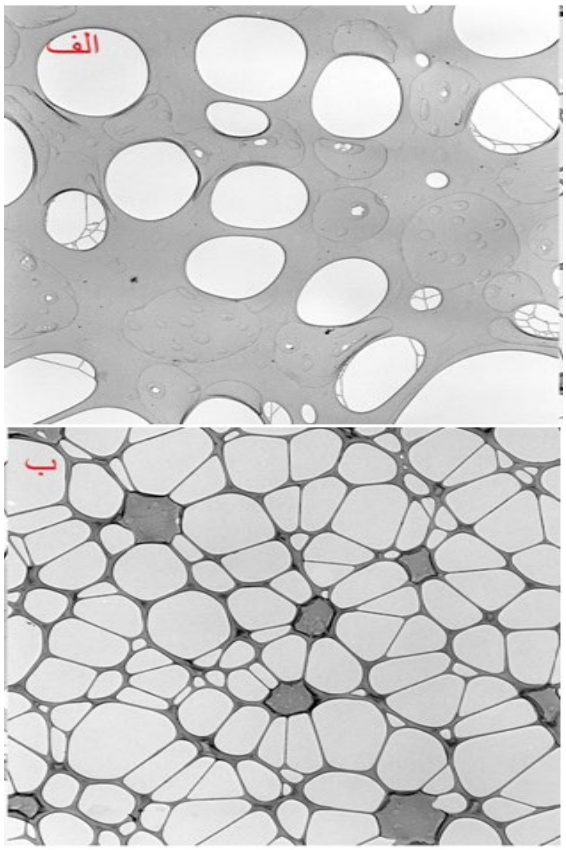
در حال حاضر، انواع مختلفی از گریدهای تجاری در بازار وجود دارند که باید براساس نیاز کاربر انتخاب شوند. گریدهای دارای فیلم هولی، سوراخ‌های کوچک و یکنواختی دارند (شکل (۲-الف)) در حالی که گریدهای لیسی دارای حفره‌های بسیار بزرگ و نامنظمی هستند (شکل (۲-ب)).

مزیت گریدهای هولی در این است که به دلیل داشتن سطح حفره‌های کمتر، فضای زیادی برای به دام افتادن ذرات دارند؛ در نتیجه، گیراندازی و مطالعه نانوذرات در گریدهای هولی ساده‌تر از گریدهای لیسی است؛ این در حالی است که در گریدهای لیسی به دلیل ساختار تار عنکبوتی، نمونه درصورت گیر افتادن در میان رشته‌های گرید، فاقد زیرلایه بوده که این امر در تصویربرداری‌های با قدرت تفکیک بالا[۱۱] اهمیت زیادی دارد. در تصویربرداری با مودهای قدرت تفکیک بالا، اگر نمونه روی زیرلایه قرار گرفته باشد، اثر زیرلایه ممکن است در تصویر دیده شود؛ بنابراین، بهتر است نمونه در نقطه‌ای ثابت شده باشد و زیرلایه‌ای برای آن استفاده نشود. این شرایط در گریدهای لیسی نیز وجود دارد. نوع دیگری از گریدها وجود دارند که کاملا عاری از حفره هستند. این گریدها برای تصویربرداری از نانوذرات بسیار ایده‌آل بوده و درصورت داشتن پوششی از جنس کربن، شانس به دام افتادن ذرات میان ساختار کربن موجود روی گرید افزایش می‌یابد. بنابراین، کاربر

www.SID.ir

rchive of SID

باید براساس شرایط نمونه و نیاز مطالعاتی خود نسبت به انتخاب گرید مناسب اقدام کند.



شکل (۲): تصویر دو نوع گرید (الف) هولی و (ب) لیسی.

تصویربرداری

در تصویربرداری از نمونه‌ها، استفاده از سیستم خنک‌کننده نیتروژن مایع اهمیت زیادی دارد. این سامانه، نقش مهمی را در فرآیند دارد:

- اولین کارکرد نیتروژن مایع، خنک کردن نمونه است. با تابش پرتو الکترونی، نمونه داغ شده و ممکن است دچار مشکل ساختاری شود، از این رو خنک کردن نمونه ضروری است.
- دومین نقش نیتروژن مایع، کمک به جذب آلودگی‌های ستون TEM است. بنابراین، زمانی که نمونه به‌گونه‌ای است که با قرار گرفتن در دستگاه، ذرات ممکن است در ستون پخش شود، استفاده از نیتروژن مایع بسیار به رفع آلودگی کمک می‌کند. همین کار موجب تثبیت خلاء ستون می‌شود.
- نقش سوم نیتروژن مایع این است که با کاهش آلودگی ستون به تثبیت خلاء کمک می‌کند.

همان طوری که ذکر شد، در حین تصویربرداری تابش پرتو الکترونی می‌تواند منجر به گرم شدن نمونه و آسیب ساختاری شود. از این رو، لازم است که کاربر در حین تصویربرداری، اگر با تغییراتی در شکل ذرات یا ساختار نمونه مواجه شد، شدت پرتو را کم کند تا فرآیند گرم شدن نمونه به آهستگی انجام شود. این کار گاهی به جلوگیری از آسیب نمونه کمک می‌کند.

یکی از موضوعاتی که گاهی در مقالات به آن پرداخته می‌شود، بزرگنمایی تصاویر است. در واقع در برخی از مقالات، نویسندگان، بزرگنمایی تصویر را نیز در مقاله ذکر می‌کنند. لازم به ذکر است که اگر دستگاه TEM به دوربین دیجیتال مجهز باشد، این دوربین نیز خود یک بزرگنمایی دارد که باید این بزرگنمایی با بزرگنمایی دستگاه ترکیب شود تا در نهایت بزرگنمایی واقعی گزارش شود. هر چند با وجود مقیاس در پایین عکس‌های TEM نیاز مبرم به ذکر بزرگنمایی در تصاویر وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

تصویربرداری با میکروسکوپ TEM نیازمند نکات عملی متعددی است که این نکات می‌تواند به بهبود کار کمک کند. تثبیت شرایط محیطی اتاق TEM، اطمینان از کالیبره بودن دستگاه، تثبیت خلاء پیش از شروع کار، ممانعت از بروز آلودگی محیطی، رعایت نکات مهم در شستشوی نمونه‌ها، استفاده از روش‌هایی با کمترین آسیب ساختاری برای خشک کردن نمونه، استفاده صحیح از اولتراسونیک و به کارگیری زمان بهینه برای اعمال امواج فراصوت، انتخاب گرید مناسب با نمونه، بهره‌گیری از نیتروژن مایع، جلوگیری از گرم شدن نمونه و دقت در تعیین بزرگنمایی از جمله نکات عملی بودند که در این مقاله به آن اشاره شد.

www.SID.ir

Archive of SID

پی‌نوشت

۱. کارشناسی ارشد فناوری‌نانو، مرکز خدمات آزمایشگاهی دانشگاه شریف
۲. کارشناسی ارشد مکانیک، دانشگاه خواجه نصیر طوسی
۳. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی عبوری

4. Transmission electron microscopy (TEM)
5. CRM
6. Uncertainty measurement
7. Ultrasonic
8. Grid
9. Holey
10. Lacey
11. high resolution

مراجع

[1] Joachim Mayer, Lucille A. Giannuzzi, Takeo Kamino and Joseph Michael, TEM Sample Preparation and FIB-Induced Damage, Volume 32, Issue 5 (Focused Ion Beam Microscopy and Micromachining),May 2007 , pp. 400-407

[2] Ruggero Vigliaturo, Silvana Capella, Caterina Rinaudo & Elena Belluso, Rinse and trickle: a protocol for TEM preparation and investigation of inorganic fibers from biological material. Journal Inhalation Toxicology, Volume 28, 2016 - Issue 8

www.SID.ir