

ELEKTRON JAKO VLNA VE VAKUU

Pohybující se elektron o energii E a hybnosti p má podle Lui de Broglieho teorie vlnovou povahu; tedy chová se jako vlna o:
frekvenci a vlnové délce

$$f = \frac{E}{h} \qquad \lambda = \frac{h}{m_e \cdot v}$$

h je Planckova konstanta

Rychlost elektronů se blíží rychlosti světla $\rightarrow$ relativistické vztahy

Pro kinetickou energii urychleného elektronu ve vakuu el. polem o napětí U platí

$$E_k = m \cdot c^2 - m_0 c^2 = -e \cdot U$$

m_0 – klidová hmotnost, c – rychlost světla ve vakuu

relativistická hmotnost $m = \frac{e \cdot U}{c^2} + m_0$

a rychlost $v = c \cdot \frac{\sqrt{\frac{e \cdot U}{m_0 \cdot c^2} \left(2 + \frac{e \cdot U}{m_0 \cdot c^2} \right)}}{\left(\frac{e \cdot U}{m_0 \cdot c^2} + 1 \right)}$

pro vlnovou délku elektronu odvodíme vztah

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 \cdot e \cdot U \left(1 + \frac{e \cdot U}{2 \cdot m_0 \cdot c^2} \right)}} \cong \frac{h}{\sqrt{2 \cdot m_0 \cdot e \cdot U}} \quad \text{přibližně} \quad \lambda = \frac{h}{\sqrt{2 \cdot m_0 \cdot e \cdot U}}$$

V praxi pro výpočet λ při známé hodnotě U [V]

$$\lambda = \frac{1,226}{\sqrt{U}} [nm]$$

Příklad:

$$U = 10 \text{ kV} \rightarrow \lambda = 0,01226 \text{ nm}$$

$$U = 100 \text{ kV} \rightarrow \lambda = 0,0037 \text{ nm}$$

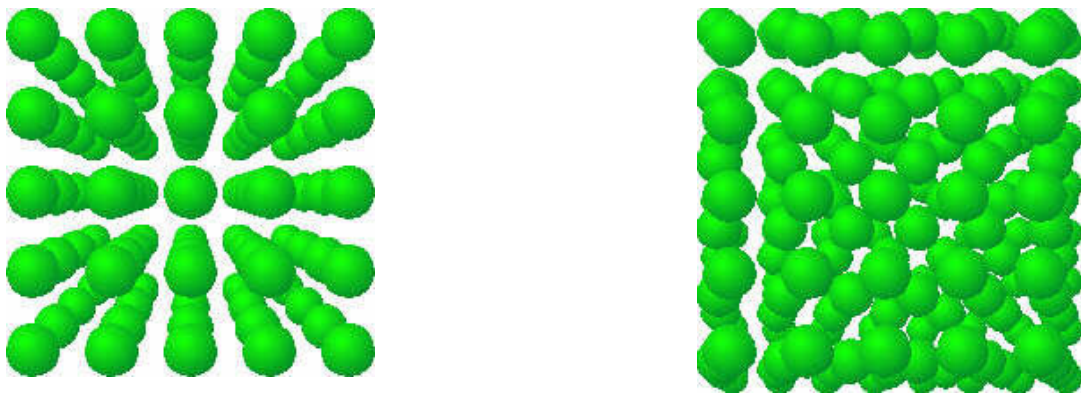
Porovnání $\lambda_e = 0,0037 \text{ nm}$ s λ viditelné oblasti spektra (cca 500 nm)

Využitím vztahu pro rozlišovací mez SM $d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$ lze

očekávat, že elektron přinese podrobnější informace o struktuře vzorku.

Teoreticky se jedná o rozdíl 5 řádů, ve skutečnosti v důsledku vad zobrazení jen 2 až 3 řády oproti SM.

ELEKTRONY PROCHÁZEJÍCÍ PREPARÁTEM



Atomy stejného krystalu různě orientovaného
(v případě levého obrázku, prochází elektrony snadněji)

Kontrast v obraze závisí mimo jiné na:

- orientaci krystalů v látce
- na průměrném protonovém čísle atomů preparátu
- na hustotě látky (počtu atomů v krystalické mříži)

Pro transmitované elektrony:

v případě obrázku vlevo bude obraz světlejší než v případě obrázku vpravo

ZVIDITELNĚNÍ OBRAZU VYTVOŘENÉHO ELEKTRONY V TEM

- přeměnou kinetické energie elektronů na světlo – pozorování
- dopadem elektronů na fotografickou emulzi – záznam

PŘEMĚNA ENERGIE ELEKTRONŮ NA SVĚTLO

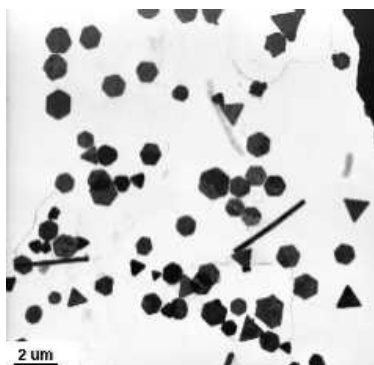
Podobně jako v klasické TV obrazovce, elektrony bombardují stínítko opatřené luminoforem (fosfor, ZnS atd.)

V komoře TEM, v její spodní části je oválné luminiscenční stínítko (fosfor – zelená fosforescence).

Fotografováním nebo snímáním obrazu CCD kamerou registrujeme změny intenzity jako ČB (šedotónový) obraz.

UŽITÍ FOTOGRAFICKÉ EMULZE

Fotografická emulze reaguje na světlo i na dopadající elektrony podobně. V TEM používáme „kinofilm“ 24 x 36mm nebo fotografické desky (100 x 80 mm).



Fotografická emulze:

vrstva fotografické emulze obsahující světlocitlivé krystalky (např. AgJ, AgBr, AgCl).

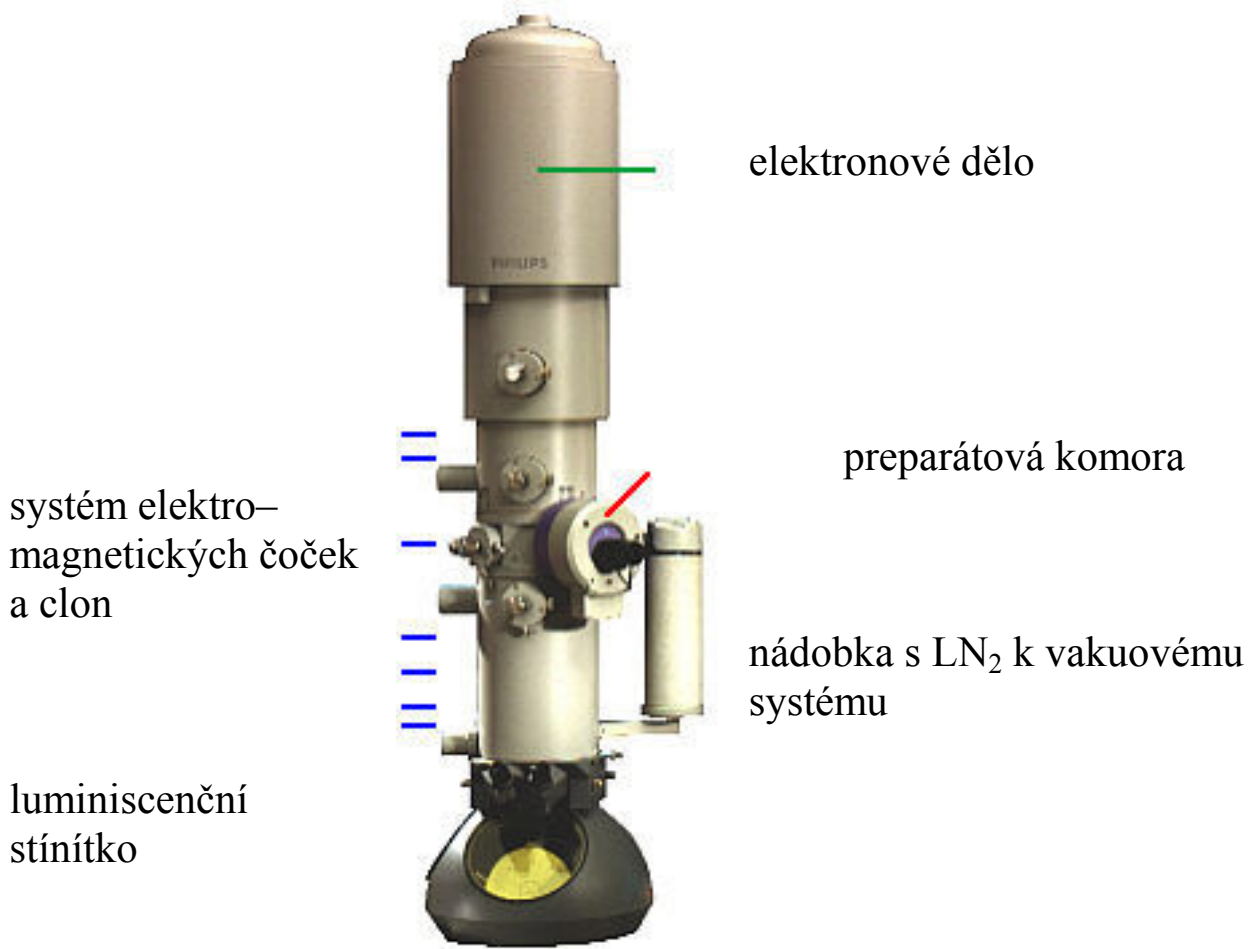
Dopadem světla nebo elektronů na emulzi dojde k fotochemické reakci a vytvoří se latentní obraz. Vyvolávacím procesem se latentní obraz přemění na viditelný. Krystalky AgJ (AgBr, AgCl) se rozdělí na stříbro a jód (brom, chlór).

Místa více osvětlená (ozářená elektrony) se na negativu jeví tmavší (více Ag), tedy na pozitivu světlejší.

KONSTRUKCE TEM

Čtyři základní stavební a funkční prvky elektronového mikroskopu:

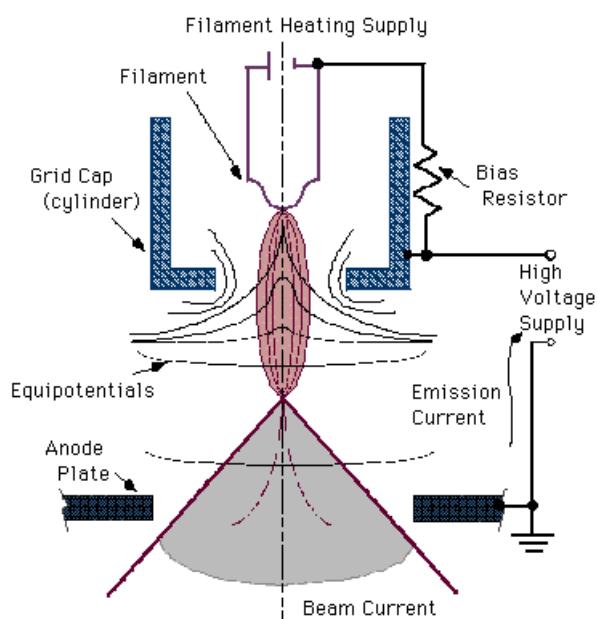
- zdroj elektronů (elektronové dělo)
- elektromagnetické čočky
- preparátový stolek (držák, goniometr)
- vakuový systém



obrázek tubusu TEM

ELEKTRONOVÉ DĚLO

Zdroj a urychlovač elektronů



zdroj elektronů:

- termoemisní zdroj
přímo (nepřímo)

žhavená katoda

(2700 °C – Wolframové vlákno –
vydrží měsíc)

- katoda LaB₆
(2100 °C – hexaborid
lanthanu – vydrží rok)

- autoemisní
(studený) zdroj (FEG) – vydrží

několik let

- Wehneltův válec (obklopuje katodu) – potenciál -100 V
- Křižiště (zdroj elektronů, podobně jako vlákno žárovky) s průměrem cca 50 μm
- Urychlovací napětí 100 až 300 kV (obvyklá hodnota TEM)

POHYB ELEKTRONŮ V MAGNETICKÉM POLI

V HOMOGENNÍM MAGNETICKÉM POLI SE ELEKTRON POHYBUJE PO
ŠROUBOVICI. **B** PŮSOBÍ NA **E** SILOU

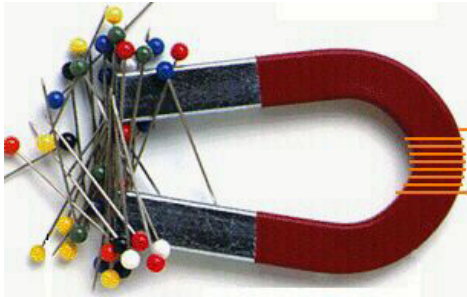
$$F = B \cdot e \cdot v \cdot \sin \alpha$$

složka $v_{\parallel}$ přispívá k rovnoměrně přímočarému pohybu

složka $v_{\perp}$ nutí elektron pohybovat se po kružnici

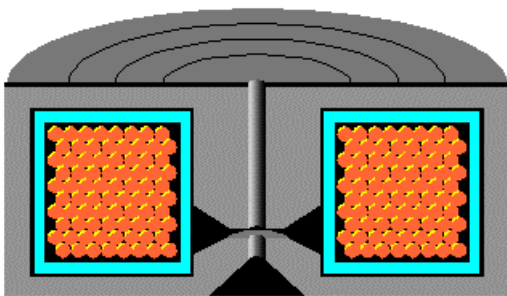
$$B \cdot e \cdot v = \frac{m \cdot v^2}{r} \Rightarrow r = \frac{m \cdot v}{B \cdot e}$$

ELEKTROMAGNETICKÉ ČOČKY

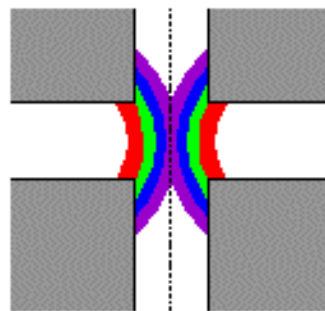


permanentní magnet ve tvaru podkovy

resp. kovová podkova s vinutím jako elektromagnet



elektromagnetická čočka
(solenoid)



průběh magnetického pole (aberrace)

Pro ohniskovou vzdálenost elektromagnetické čočky přibližně platí:

$$\frac{1}{f} = \frac{e}{8 \cdot m \cdot U} \int_{z_1}^{z_2} B_{z0}^2(z) \cdot dz$$

B_{z0} – magnetická indukce v místě z na ose

Výhoda:

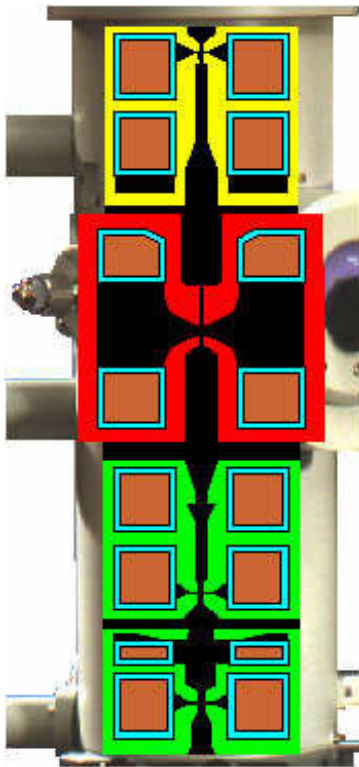
možnost měnit ohniskovou vzdálenost elmag. čočky změnou proudu ve vinutí cívky (solenoidu).

Nevýhoda:

Magnetické pole v dutině cívky (čočky) se mění (podle obrázku) a to vede k vadám zobrazení:

- sférická vada
- chromatická vada

TUBUS TEM



kondenzor

fokusuje elektronové paprsky na preparát
(promítá křižště elektronové trysky na
preparát a zajišťuje jeho homogenní a
intenzivní ozáření)

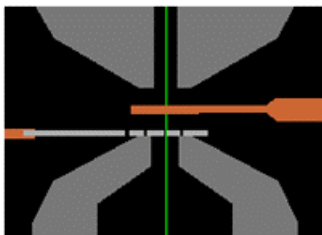
objektiv

je určen k tvorbě obrazu (faktor zvětšení 50 –
100x)

projektiv

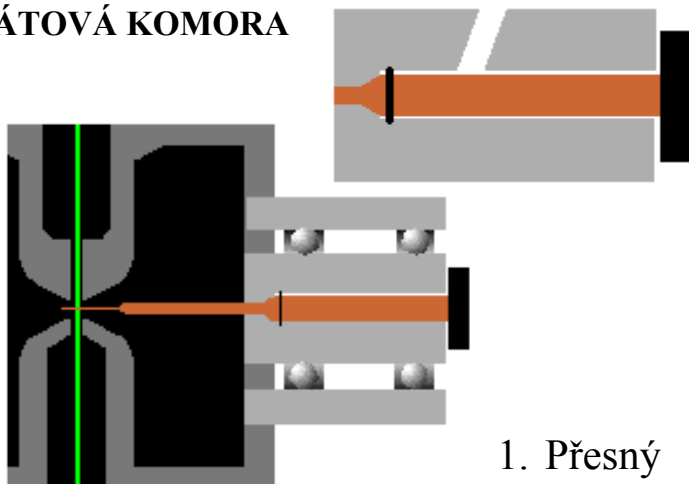
je tvořen dalšími čočkami, které určují výsledné
zvětšení TEM a „promítají“ obraz na stínítko

Součástí elektronoptického systému v tubusu jsou clony.



- Clona kondenzoru odcloní mimoosové elektronové svazky
- Aperturní clona (součást objektivu) určuje aperturu elektronového svazku „paprsků“

DRŽÁK VZORKU, PREPARÁTOVÁ KOMORA



1. Přesný a jemný posun

- (krok nm), 2. Posun v osách x , y , z ,
3. Rychlá výměna preparátu

VAKUOVÝ SYSTÉM

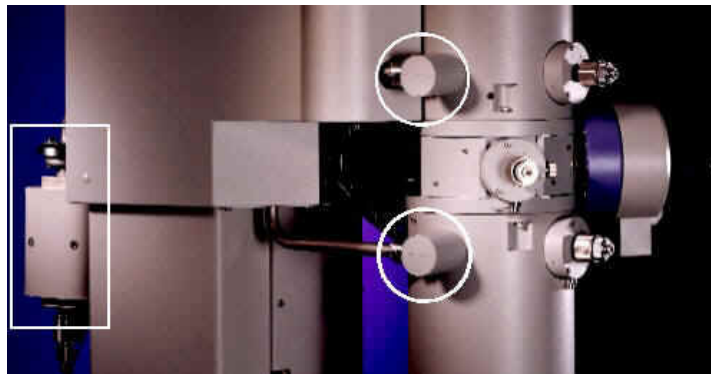
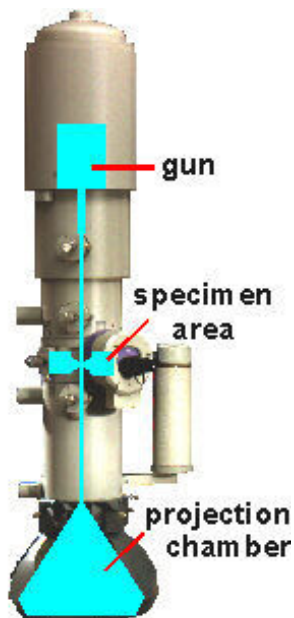
EM potřebuje vakuum:

- ve vzduchu je elektron absorbován (dosah elektronového svazku EM ve vzduchu je max. 1 m)
- elektronové dělo musí být izolováno vakuem (vzduch není dobrý izolant)
- vzduch obsahuje molekuly O_2 , N_2 , CO_2 a hydrokarbonáty, které způsobují kontaminaci tubusu a vzorku.

Běžné hodnoty tlaku

atmosférický tlak $\approx 0,1 \text{ MPa}$ (10^5 Pa)

tlak v kosmickém prostoru $\approx 10^{-7} \text{ Pa}$



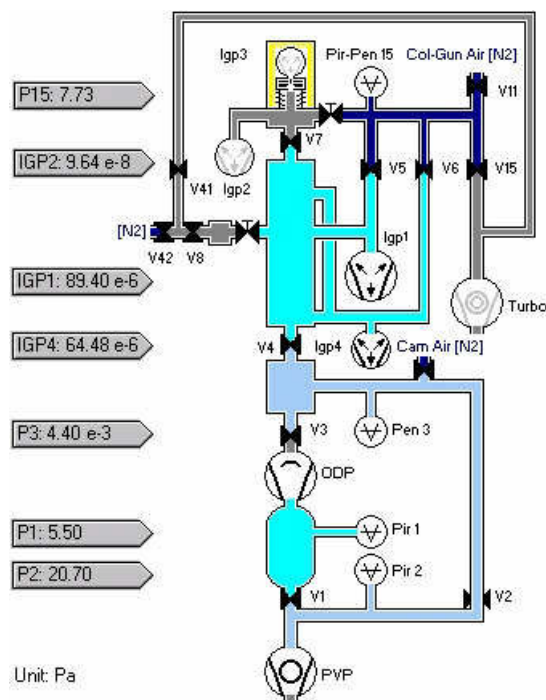
Vakuový systém EM je tvořen řadou ventilů spojených s vývěvami.

Vakuum v preparátové komůrce $\approx 10^{-5} \text{ Pa}$

Vakuum v prostoru katody $\approx 10^{-5} \text{ Pa}$ (pro LaB_6), 10^{-7} Pa (FEG)

Vakuum v prostoru stínítka $\approx 10^{-3} \text{ Pa}$ (je zde film pro záznam obrazu)

Vakuový systém TEM (ventily, vývěvy) pracuje v logickém sledu a je řízen automatikou (ovládán pneumaticky), kontrolovanou měrkami vakua.



Schema vakuového systému moderního TEM

(stupeň vakua je vyjádřen odstínem – tmavý = vysoké vakuum)

3 oddělené vakuované komory

- prostor katody
- prostor preparátu
- projekční komora

Typy vývěv:

- rotační vývěva (předvakuum)
- difúzní olejová vývěva
- iontová (Ti – sublimační, 100 litrů/s)
- turbomolekulární

Měření vakua: měrkami Piraniho typu

Cyklus vzduchem uzavíratelných ventilů (čerpání rotačními vývěvami cca 30 s.).

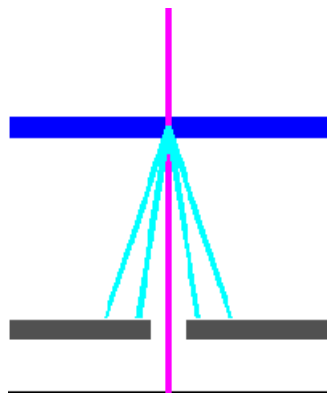
- čerpání preparátové komory s výměnou vzorku trvá několik minut

Pro kryoaplikace (biologické vzorky) je nutné odstranit usazování ledu na povrchu vzorku (kryostat s LN₂)

ZÁKLADNÍ PRACOVNÍ REŽIMY TEM

- Světlé pole
- Temné pole
- Difrakce
- TEM vysokého rozlišení
- Rentgenová mikroanalýza

Metoda světlého pole



Standardní režim zobrazení

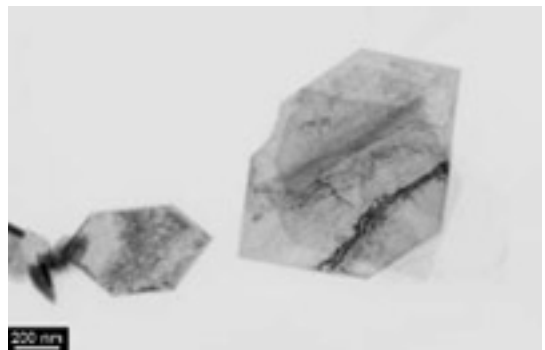
rovina preparátu

Na tvorbě obrazu se podílí paprsky přímo procházející preparátem, boční difrakční maxima jsou zachycena aperturní clonou.

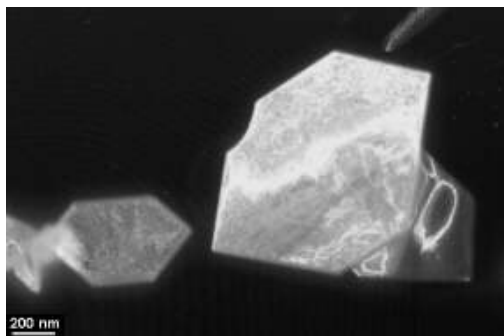
aperturní clona (v obrazové ohniskové rovině objektivu)(obvykle 4 – 8 průměrů AC)

OBRAZ SVĚTLÉHO POLE KRYSTALU MnO

(krystaly leží na tenké C vrstvě na
měděné síťce)



Metoda temného pole



vysunutím AC excentricky mimo osu, necháme procházet preparátem pouze paprsky 1. difrakčního maxima.

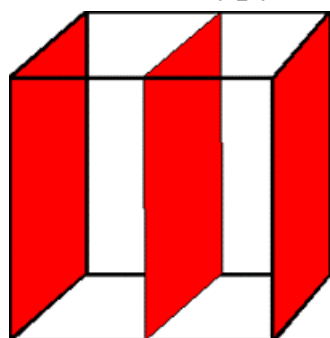
Použití pro zvýšení kontrastu
krystalických materiálů

TEM JAKO DIFRAKTOGRAF

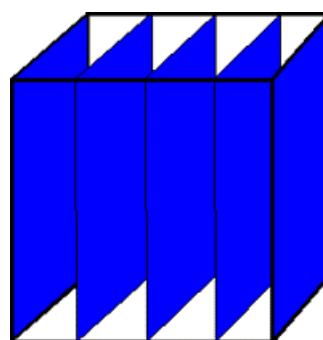
- pro identifikaci krystalů
- pro stanovení orientace krystalu

Difrakční obrazec vzniká v obrazové ohniskové rovině objektivu (podobnost se SM) – projektiv je pro sledování obrazu zaostřen na rovinu obrazu vytvořeného objektivem. Pro studium difraktogramů je nutné přeostrřit Pr na OOR.

Příklad: dva typy elementárních buněk



dvě roviny
(vzdálenost rovin 1/2 délky
elementární buňky)



čtyři roviny
(1/4 el.buňky)

Pro horizontální směr:

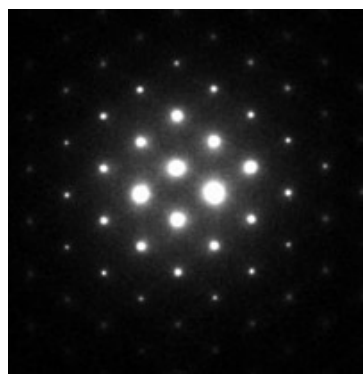
Pro dvě roviny – reciproká vzdálenost = 2 (dostaneme dva body ve dvojnásobné vzdálenosti od středu),

pro 4 roviny r.v. = 4 (čtyřnásobná vzdálenost od středu)

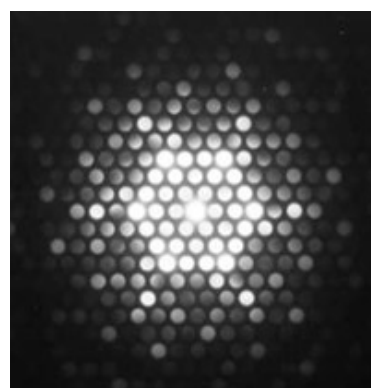


Při započítání ostatních směrů dostaneme 3D síť mřížových bodů

Difrakce v TEM –každý bod reprezentuje svazek odchýlených elektronů



difraktogram Si

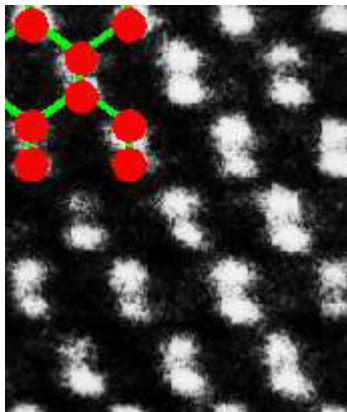


difraktogram Si₃N₄
(hexagonální symetrie)

TEM S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM

Splnění několika podmínek:

- náklon vzorku tak, aby umožnil průchod elektronového svazku podél uspořádaných atomů (viz. obrázek atomů v mřížce)
- použití apertury s velmi malým průměrem pro dosažení úzkého elektronového paprsku
- zpravidla se používá vyšší urychlovací napětí (300 kV)



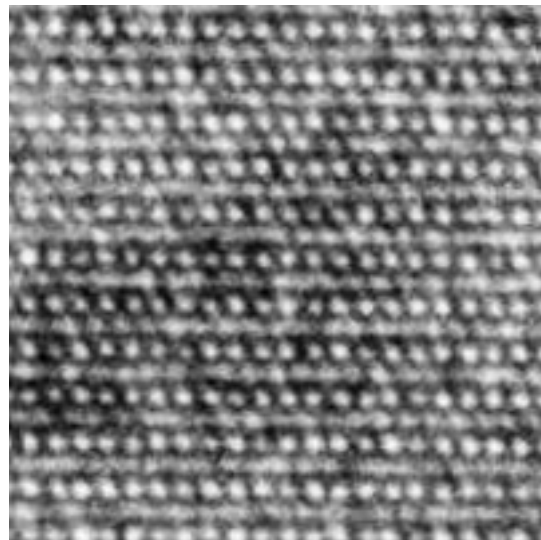
TEM obraz atomů Si s vysokým rozlišením

vzdálenost mezi atomy (bližšími) 0,14 nm

Skutečná struktura (vlevo nahoře)



Azbestová vlákna na síťce



Struktura azbestu s vysokým rozlišením

RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE – REM

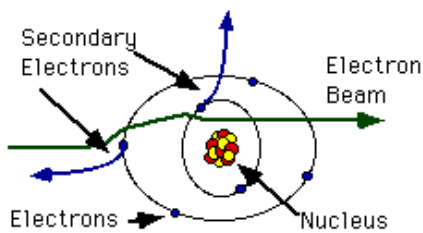
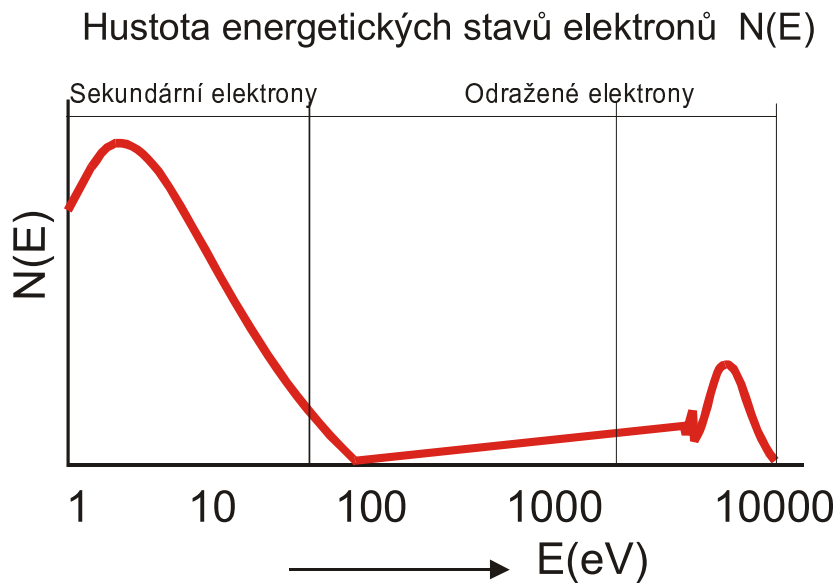
(Scanning Electron Microscopy – SEM)

Energie elektronů v primárním elektronovém svazku 10^3 až 10^5 eV.

Pružný rozptyl – PE neztrácí energii po interakci s látkou

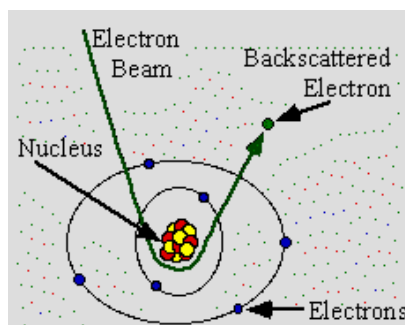
Nepružný rozptyl – PE jsou v poli atomů bržděny a jejich energie se:

- předá volným elektronům (plazmonová excitace)
- krystalové mřížce (fononová excitace)
- iontům (obalová excitace)



Sekundární elektrony (SE)

primárním svazkem excitované elektrony ve vnějších slupkách. Uvolněné elektrony mají energii do 50 eV (pravé SE)



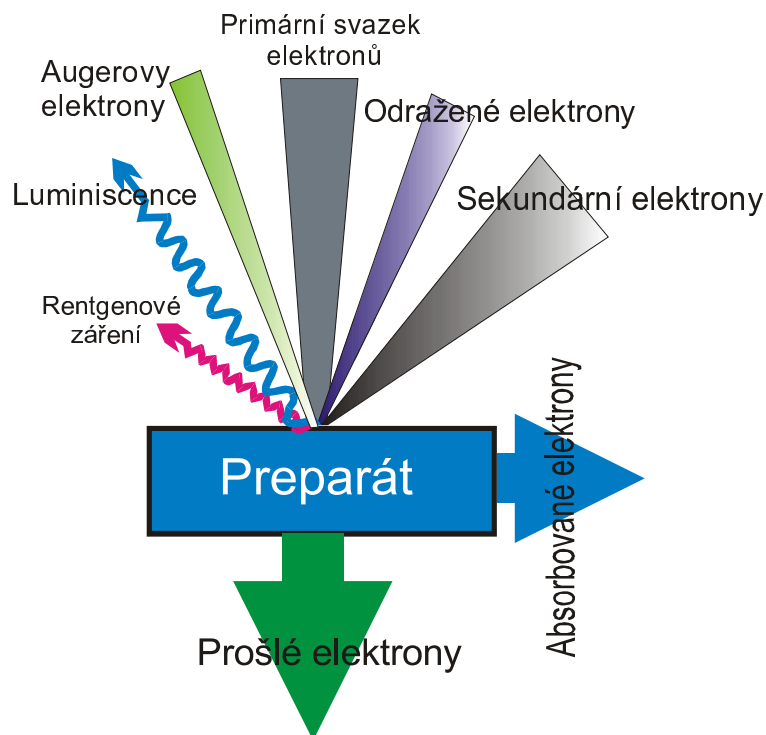
Odražené elektrony (BSE)

vrací se s energií $E = 0,8 E_0$

Augerovy elektrony (AE)

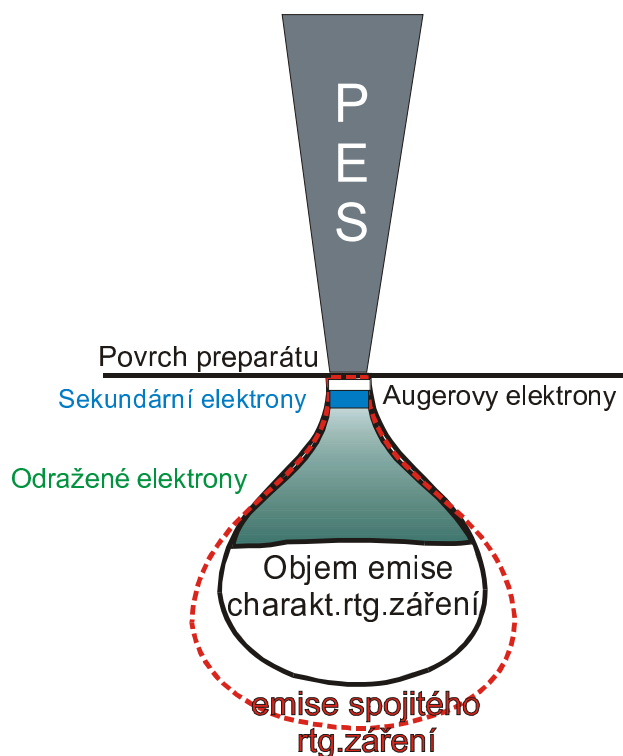
elektrony vyražené z vnitřních slupek

Interakce primárního elektronového svazku s hmotou vzorku



objem interakce

rozměr a tvar jsou funkcí lokálního chemického složení (průměrného atomového čísla), energie elektronů E_0 a úhlu, pod nímž svazek elektronů dopadá na povrch.



Elektrony se v oblasti dopadu pohybují složitým způsobem. V důsledku srážek se mění jejich energie i směr pohybu.

TVORBA OBRAZU A DRUHY KONTRASTU V REM

Obraz v režimu odražených elektronů (BSE)

Topografický kontrast – obraz povrchových nerovností je zbaven detailů v důsledku přímočarého pohybu elektronů.

Materiálový kontrast – signál odražených elektronů závisí na průměrném atomovém (protonovém) čísle Z . Pro větší Z je intenzivnější. Užití: k „mapování“ prvků ve spojení s elektronovou mikroanalýzou.

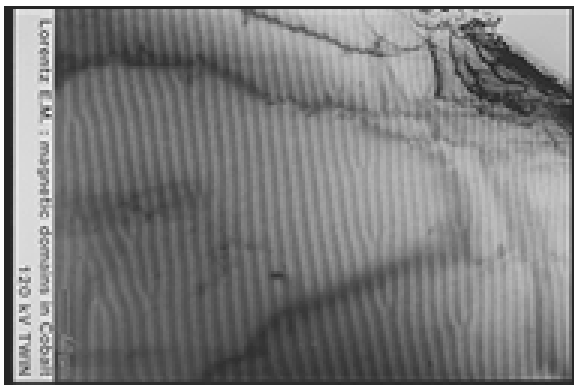


Obraz v režimu BSE
slitina Al-Cu

Al ($Z = 13$) – tmavší oblasti
Cu ($Z = 29$) – světlejší oblasti

MAGNETICKÝ KONTRAST – MOŽNOST POZOROVAT KONTRAST NA DOMÉNOVÝCH STĚNÁCH KUBICKÝCH A JEDNOOŚÝCH FEROMAGNETIK.

Účinek Lorentzovy síly vyvolané magnetickým polem uvnitř domén (elektrony stočené dovnitř vzorku x elektrony usměrněné k povrchu)



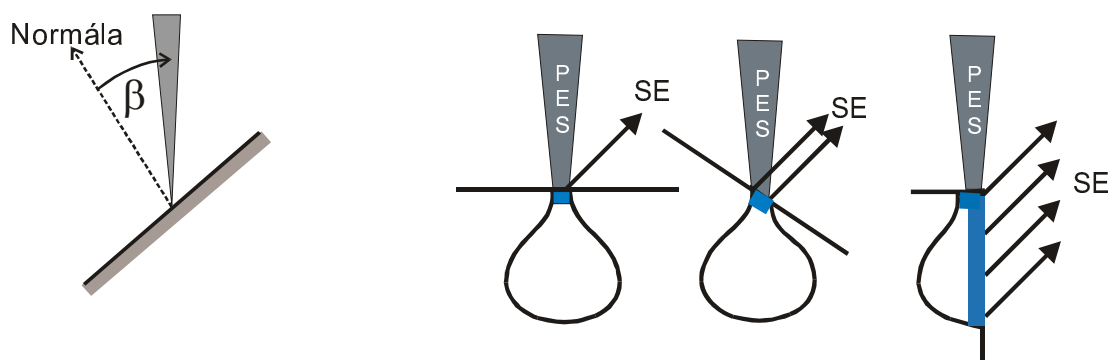
Magnetické domény v kobaltu

Obraz vytvořený sekundárními elektrony (SE)

SE – energie do 50 eV, emise z povrchové vrstvy o tloušťce do 50 nm
Detekovány jsou SE generované primárními elektrony (tzv. pravé SE)
i nízkoenergetické SE generované odraženými elektrony.
Dráhu SE je možné upravit účinkem elektrického pole.

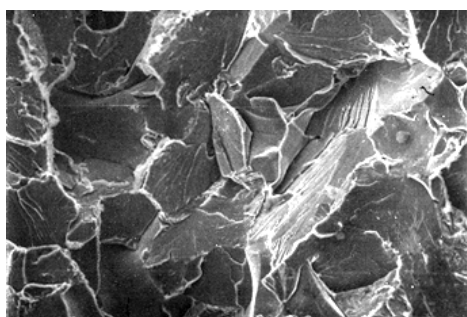
TOPOGRAFICKÝ KONTRAST V REŽIMU SE

Emise SE je citlivá na úhel dopadu PES



Výtěžek emise $\delta = \frac{\text{konst.}}{\cos \beta}$

závislost β (náklonu) na emisi SE



vliv sklonu lomových ploch na
emisi sekundárních elektronů



zrnko pylu

Napěťový kontrast – zobrazuje potenciálové rozdíly na povrchu
preparátu (polovodiče)



$V_{cd} = 0 \text{ V}$



$V_{cd} = 0.5 \text{ V}$

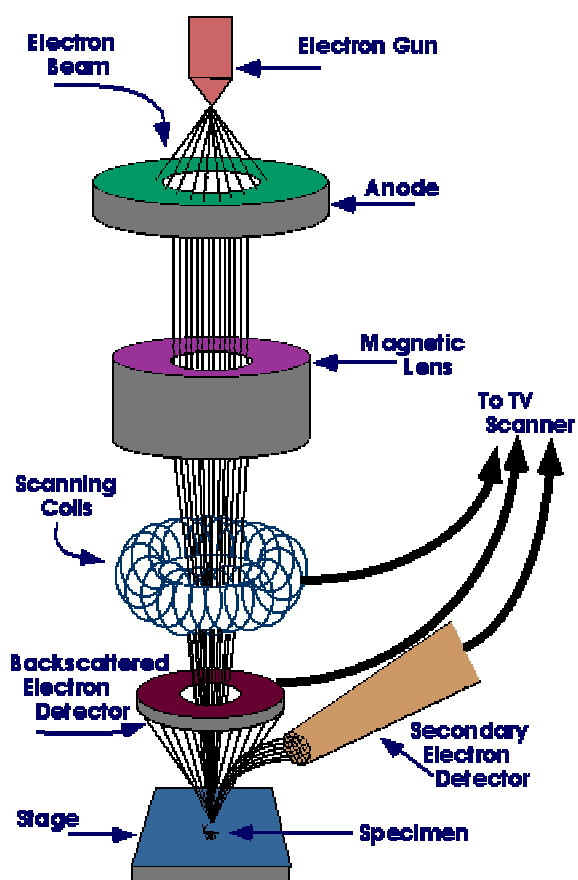


$V_{cd} = 2 \text{ V}$



$50 \mu\text{m}$

FUNKČNÍ PRVKY A KONSTRUKČNÍ PROVEDENÍ REM

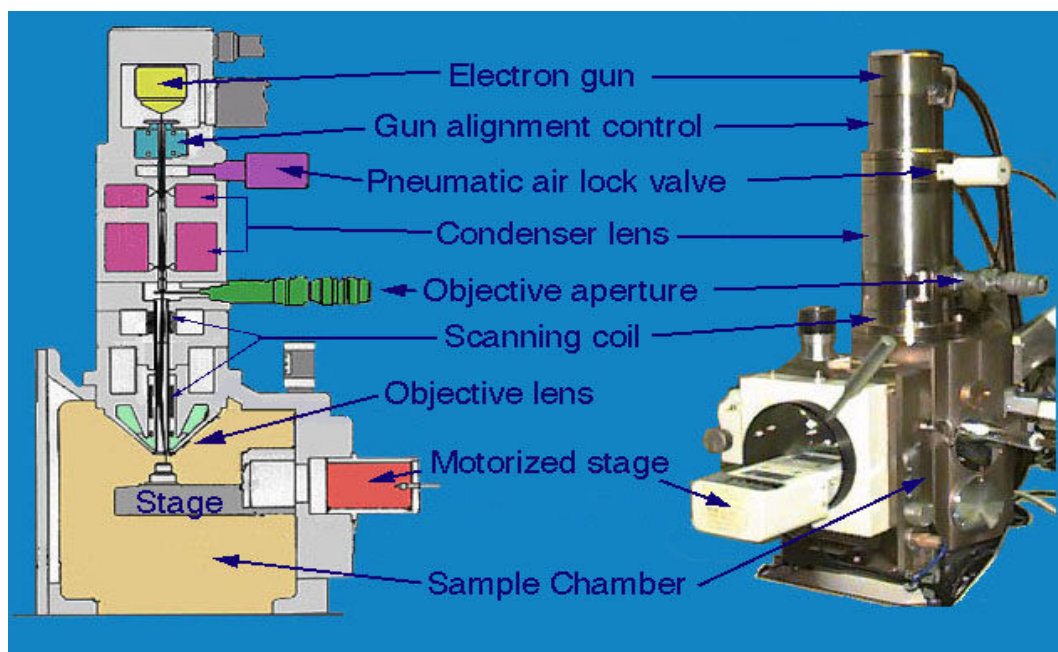


PŘÍMO ŽHAVENÁ KATODA (W)

Typické parametry REM:

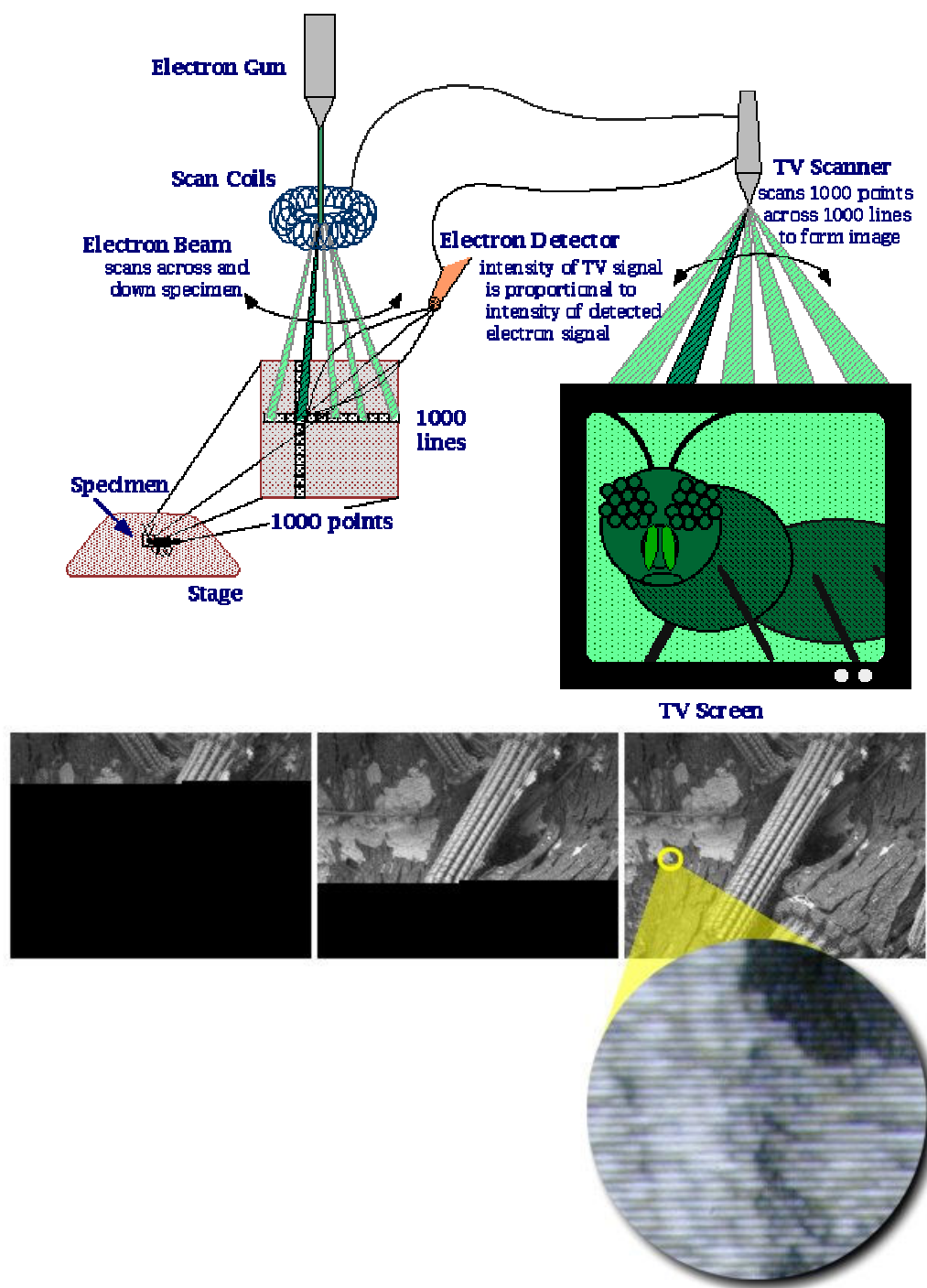
- RS 5 až 10 nm při UN 30kV
- zvětšení 5 až 200 000x
- UN volitelné od 1 do 50 kV
- Elektron–optický systém
2 kondenzory se spol. buzením
1 objektiv
elektromagnetický stigmátor
(osmipólový)
- vychylovací (rastrovací) systém
- Detektor SE a BSE

- Vakuový systém (10^{-5} Pa)



Schematický řez REM a rozmístění funkčních prvků v reálném REM

TVORBA OBRAZU A PARAMETRY ZOBRAZENÍ REM



OBRAZ VZNIKÁ BOD PO BODU, RASTROVÁNÍM POVRCHU

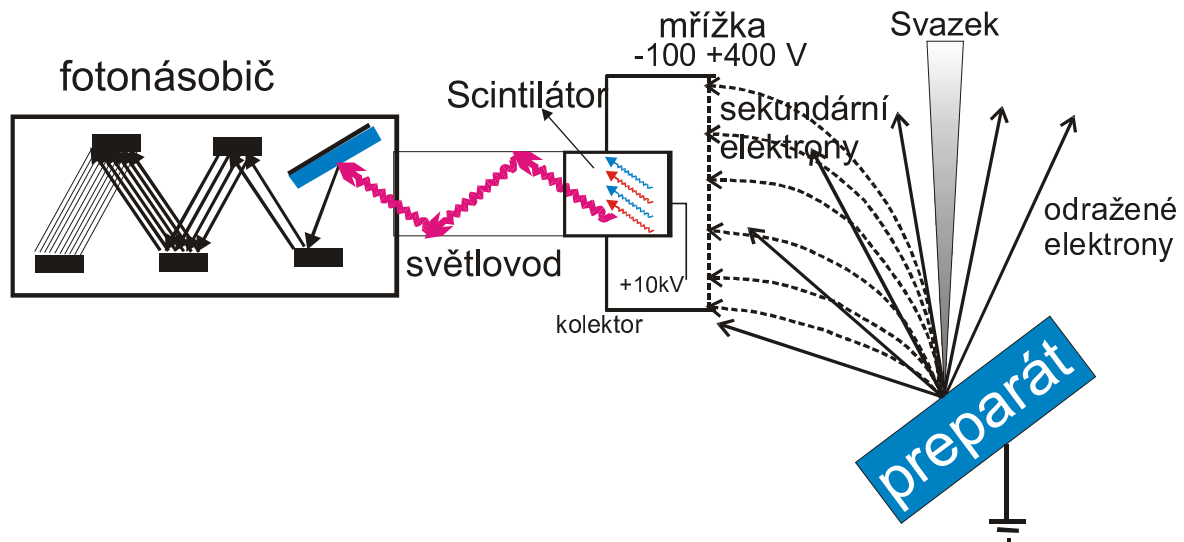
Zvětšení obrazu $Z = \frac{L}{L'}$

L – hrana obrazovky

L' – interval zobrazeného povrchu vzorku

Detektor sekundárních a odražených elektronů

(Everhart – Thornleyova konstrukce)



Elektrony dopadají na **scintilátor** v němž vyvolávají luminiscenci, světelná kvanta (fotony) o nízké intenzitě jsou snímána **fotonásobičem** (optoelektronicky).

Detekce sekundárních elektronů ($E \cong 50$ eV)

- „odsátí“ SE z povrchu vzorku elektrickým polem do + 400 V
- urychlení napětím +10 kV přivedeným na Al vrstvu na scintilátoru

Detekce odražených elektronů ($E \cong 20$ keV)

- na kolektor se přivede záporné napětí (do – 100 V) z důvodu zabrzdění rychlých BSE



Umístění detektoru SE (BSE)
v komoře REM

HLOUBKA OSTROSTI A ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOST REM

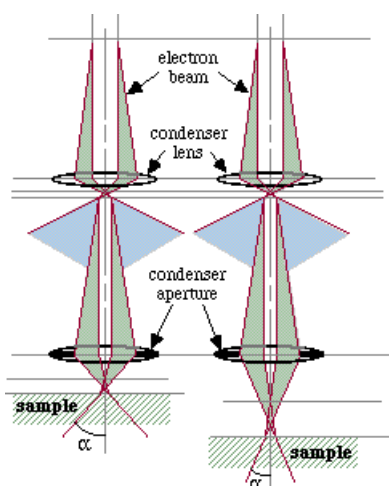
Minimální rozlišení REM souvisí s nejmenším dosažitelným průměrem fokusovaného svazku na preparátu d_p .

Pro přibližné určení (podobně jako v SM)

$$d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad \lambda - \text{vlnová délka elektronového paprsku } (\approx 10^{-11} \text{ m})$$

α – aperturní úhel

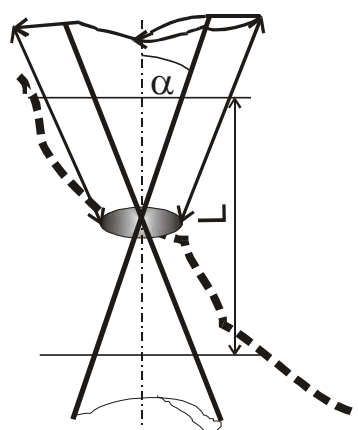
teoretická hodnota $d_{\min} \approx 0,1$ až 1 nm. Ve skutečnosti omezena vadami zobrazení (vnější elektromagnetické pole, vibrace, vady čoček-sférická vada, chromatická vada, astigmatismus atd.)



k objasnění vztahu
rozlišovací meze a
hloubky ostrosti
REM

$$L = \frac{d_0}{Z \cdot \alpha}$$

d_0 – rozlišení oka,
 Z – zvětšení

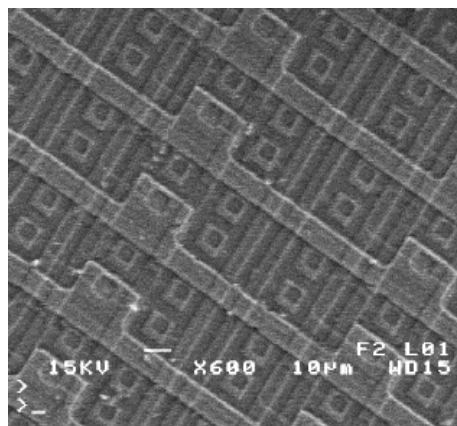


Závěr: operátor musí volit kompromis pro dosažení optimální hloubky ostrosti při dostatečném vykreslení detailů povrchu preparátu

Příklad:

mravenec

integrováný obvod



Parametry různých mikroskopických technik

Zvětšení	Rozlišovací schopnost	Zorné pole	Hloubka ostrosti	
			SM	REM
10⁰ 10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ SM REM TEM	0,2 mm	100x100 mm	0,1 mm	10 mm
	0,02 mm	10x10 mm	10 μm	1 mm
	20 μm	1 x 1 mm	1 μm	100 μm
	0,2 μm	0,1x0,1 mm		10 μm
	20 nm	10x10 μm		1 μm
	2 nm	1 x 1 μm		0,1 μm
	0,25 nm	0,1x0,1 μm		

ÚPRAVA OBRAZU V REM

Přehled chyby a poruch snižujících kvalitu výsledného obrazu

NEOSTROST

- špatná volba urychlovacího napětí,
- nestabilita zdroje elektronového svazku, způsobená nedostatečným žhavením katody,
- chybné seřízení primárního elektronového svazku,
- nedokonalé vycentrování aparatury objektivu,
- nedostatečná korekce astigmatismu,
- příliš velké zvětšení,
- špatně fokusovaný svazek elektronů (nezaostřeno),
- značná plošná hustota náboje na povrchu vzorku,
- (nezaostřený fotoaparát nebo CCD kamera).

CELKOVĚ NÍZKÁ KVALITA OBRAZU

- špatná volba urychlovacího napětí,
- chybné nastavení velikosti proudu primárního svazku elektronů,
- zřetelný šum vyvolaný nadměrným zesílením fotonásobiče,
- chybné nastavení jas a kontrast pro fotografování,
- nevhodná vzájemná poloha vzorku a detektoru,
- nedokonale připravený vzorek,
- (chybná expozice nebo špatně zpracovaný snímek).

FAKTORY ZPŮSOBUJÍCÍ LOKÁLNÍ PORUCHY OBRAZU

- nestabilita emise elektronového děla,
- značná plošná hustota náboje na povrchu vzorku,
- mechanické vibrace,
- vnější elektromagnetické pole,
- nečistoty na vzorku.

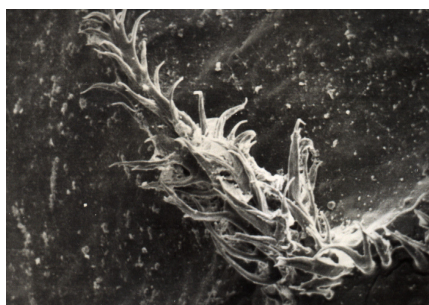
DEFORMACE VZORKU

- termické poškození primárním elektronovým svazkem,
- změna teplotního gradientu vzorku,
- zkreslení způsobené náklonem preparátu,
- velký plošný náboj na povrchu vzorku,
- poškození vzniklé při přípravě vzorku.

Možnosti korekce ovládacími prvky REM
ZMĚNA PROUDU ČOČEK A URYCHLOVACÍHO NAPĚTÍ
SVAZKU ELEKTRONŮ – MINIMÁLNÍ HODNOTA PROUDU
SVAZKU 10^{-12} A (MÉNĚ – FLUKTUACE ŠUMU)

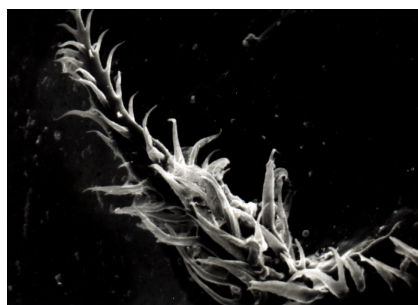
Pro stanovení změny signálu (zrakem) vlivem vlastností vzorku (ne šumem), musí být odstup signál/šum = 5.

Při nízkých hodnotách proudu je třeba signál zesílit fotonásobičem, což povede k „falešnému šumu“.

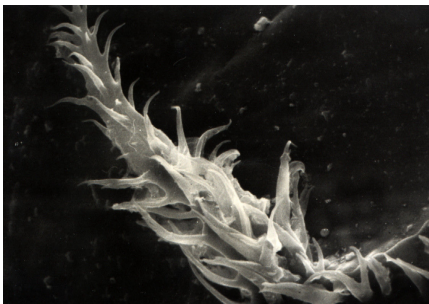


struktura zřetelná UN 5 kV

Změna UN



malý povrchový náboj UN 15 kV



nevýrazná struktura UN 30 kV

velký
povrchový
náboj



nevýrazná struktura UN 45 kV

KOREKCE ASTIGMATISMU

Reálná elektromagnetická čočka nemá dokonale osově symetrické pole. Asymetrie způsobená nepřesnostmi ve výrobě (vrtání a soustružení s přesností 0,001 mm), nehomogenitami feromagnetického materiálu pólových nástavců, atd.

Stigmátor – soustava cívek (8) vytvářejících slabé magnetické pole, umístěná v poslední čočce elektronoptické soustavy (objektivu).

GAMMA KOREKCE

Nelineární zesílení obrazového signálu (dovoluje potlačit silnější signály a zesílit slabší) = elektronické vyrovnávání velkých rozdílů v kontrastu (zvláště u biologických preparátů).

Vztah mezi amplitudou vst. a výst. signálu $A_{výst} = C \cdot A_{vst.}^{\frac{1}{\Gamma}}$

PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO TEM

Hlavní cíl:

Získat morfologickou informaci (reprodukovatelným způsobem) se snahou potlačit jakékoliv artefakty preparátu.

Tenká transparentní fólie – pro zachycení ultratenkých řezů tkání nebo suspenze částic.

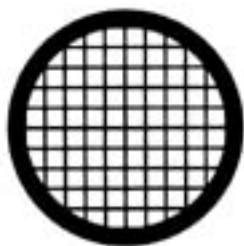
uhlíková fólie – 20 až 50 nm,

plastická fólie (Formvar ředěný v etylendichloridu <0,5%) – 20 nm

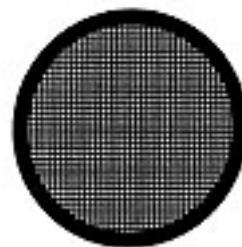
Podmínka: stabilita při prozařování elektrony, nízká zrnitost, kontrast porovnatelný se vzorkem.

Příprava plastické fólie je snadnější než čisté C vrstvy

Sítka pro TEM – pevná podpora pro fólie (řezy), vyrobená z Cu (anti feromagnetikum)



MESH 100 (ČAR/PALEC)
MESH 400



(procenta otevřené plochy)

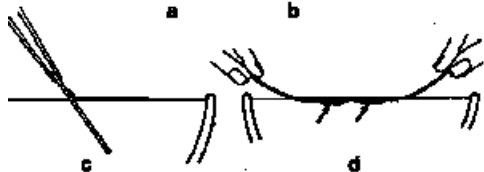
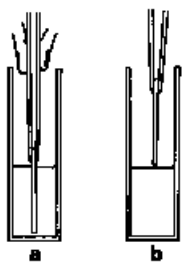
Postup nanesení fólie na síťku

a – sklíčko ponořit do roztoku s Formvarem

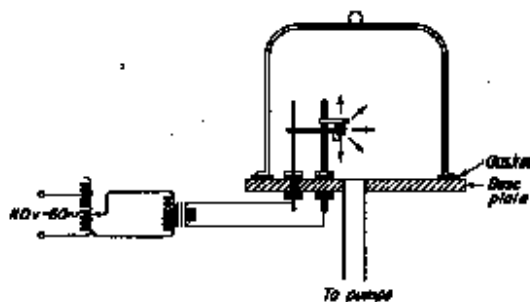
b – vysušení v bezprašném prostředí

c – fólie splavená na hladinu vody

d – síťka na proužku papíru pod fólií



Příprava uhlíkové



fólie

ULTRATENKÉ ŘEZY

vrstvou o tloušťce 100 nm (biologický preparát o $\rho = 1 \text{ g.cm}^{-3}$) prochází 50 % elektronů při UN = 50kV → není možné pozorovat celé buňky.

Obvyklá tloušťka tenkého řezu 50 nm.

Pro řezání musí být tkáň speciálně připravena:

- **odběr** tkáně (krájení v kapce fixáže na polyetylenu) nebo buněk (přímo do fixativa)
- **fixace**
- **odvodnění**
- **kontrastování**
- **zalití do bločků**

Fixace (chemická)

Nutnost zachování původního stavu vzorku až na molekulární úroveň.

Zpevnění proteinů, uchování prostorového rozložení buněčných organel... Fixace musí poskytnout dostatečný kontrast pro TEM.

Doba penetrace fixativa závisí na velikosti fixovaného vzorku ($\approx 1 \text{ mm}^3$)

1. Fixační roztoky

Osmium tetroxid (OsO_4)

Dobře reaguje s lipidy a fosfolipidy, stabilizuje buněčné proteiny formující cytoplasmu.

Špatně fixuje karbohydráty (glykogen) a nukleové kyseliny.

Doba fixace: od 30 do 90 minut. (krátký čas vede k nedostatečné fixaci, dlouhý čas může vést až k rozpadnutí tkáně). OsO_4 penetruje do tkáně pomaleji z důvodu pomalé difúze velkých molekul.

pH: pufrý udržují roztoky při pH blízkém 7

Teplota: vyšší teplota obvykle urychluje fixaci

Aldehydy

Formaldehyd a glutaraldehyd jsou nepoužívanější pro EM.

Dobře fixují bílkoviny, cytoplasmu a lysosomy.

Špatně stabilizují v buňkách lipidy (nutná osmiová postfixace).

Glutaraldehyd má relativně malou viskozitu ($M_m=100,12$ g/mol). V koncentracích 1 – 6% se mísí s kakodylátovým pufrům o pH 7,2.

Rychle penetruje do tkání a buněk. Mírná deformace buněk se dá odstranit manganistanovou fixací.

Manganistanové fixace

Používají se zejména pro fixaci rostlinných pletiv a buněk.

Dobře fixují chlorofyl, výborně fixují cytoplasmatické membrány a struktury obsahující lipidy a lipoproteiny.

Špatně – po manganistanové fixaci mizí ribosomy, rušivě působí granulace (zrnitost se odstraňuje předfixací GA, případně použitím acetonu místo etanolu při odvodnění)

Doba fixace 15 až 50 minut,

Teplota ani pufr nejsou rozhodující. Podle některých autorů pufrované i nepufrované roztoky dávají stejné výsledky.

Příklady fixází pro rostlinná pletiva:

Sabatiniho GA fixace:

4% roztok v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,2 (doba 30 min. až 2 hod.)

Manganová fixace podle Tahmisiana

Nepufrovaný roztok $KMnO_4$ – 0,13 g, NaCl – 0,45 g, dest.vodou doplnit na 10 ml.

Odvodnění

Úkolem je nahrazení volné vody ve vzorku odvodňujícím činidlem (etylalkohol, metylalkohol, isopropylalkohol, aceton).

Etylalkohol je nejrozšířenější (nevytvrzuje tkáň)

Aceton se používá ve spojení se zalévací hmotou *Vestopal*

Odvodňující řada 70% – 95% (10 min), 100% (1 hod.)

Přesun do roztoku odvodňujícího činidla a zalévací hmoty (EPP – epoxypropan)

Pozor: Pokud není aplikována fixace OsO_4 , je nutné odvodnění zkrátit na co nejkratší dobu, aby nedošlo k rozpuštění lipidů.

Kontrastování

uranylacetát, kyselina fosfowolframová, $KMnO_4$

Zalévání do bločků

Zalévání do parafínu neumožňuje pořídit řezy pod 1 μm (je měkký)

Vlastnosti ideální zalévací hmoty:

- rozpustnost v etanolu nebo acetonu před polymerizací
- neovlivňuje chemicky vzorek
- nezpůsobuje pnutí ve vzorku
- homogenně tuhá, ale dostatečně plastická
- stabilní při ozařování elektronovým paprskem

Zalévací hmoty

Metakryláty

Rychlá penetrace do tkáně a snadné pořizování řezů 50–100 nm. Správná tuhost je dosažena vhodnou směsí metylmetakrylátu a n-butyl metakrylátového monomeru.

Nevýhody: až o 20% se sníží objem při polymerizaci (vznik artefaktů) nestabilita řezů po ozáření elektrony.

Hmoty rozpustné ve vodě

se používají bezprostředně po fixaci.

Glykol metakrylát (2-hydroxyetyl metakrylát) má tendenci se rozpínat pod vlivem elektronů.

Durcupan patrně nejpoužívanější

Polyesterové pryskyřice

Vestopal W dobrá stabilita v elektronovém svazku, nevýhoda je vysoká viskozita a mísitelnost s etanolem.

Epoxidové pryskyřice

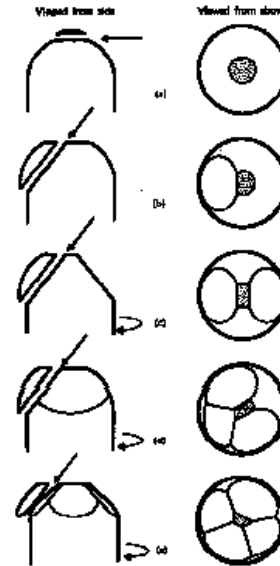
VYTVRZUJÍ SE TEPEM 60⁰ (TERMOSET) PO DOBU 48 HOD. JSOU ODOLNÉ PROTI TEPLU A ROZPOUŠTĚDLŮM. NEJSOU PATRNÁ ŽÁDNÁ POŠKOZENÍ PO POLYMERIZACI.

Řezací vlastnosti jsou závislé na poměru složek směsi pryskyřicového monomeru (epoxidová pryskyřice, tužidlo, katalyzátor, změkčovaadlo)

Araldit, Epon 812 (velmi často užívaný), DER–334.

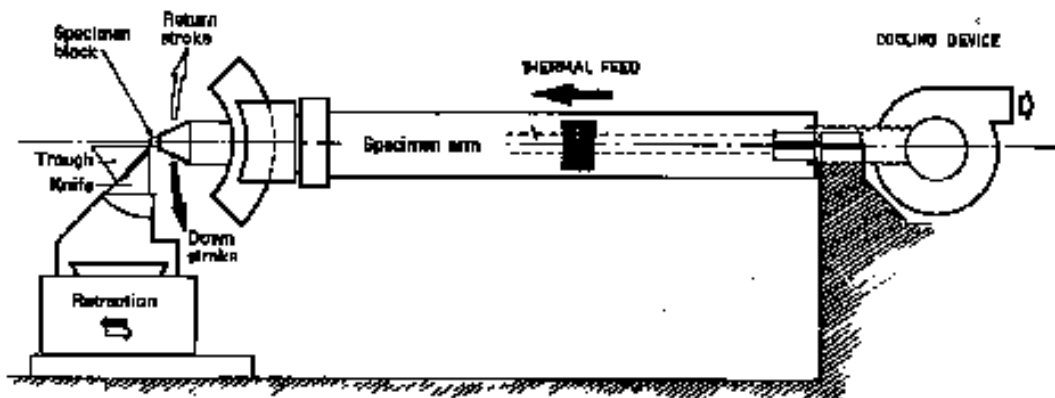
Zalévání do bločků

- Dehydratační činidlo z posledním kroku odvodnění je nahrazeno směsí (50:50) dehydratačního činidla a epoxidové pryskyřice.
- Infiltrace ve 100% roztoku pryskyřice.
- Bloček tkáně je párátkem přenesen na dno želatinové kapsle a zalit zalévací hmotou.
- Ořezání bločku do tvaru komolého jehlanu.



ploška by měla mít velikost 0,5 mm

Ultramikrotomie



Nůž je umístěn proti bločku ve

výkyvném držáku.

Tloušťka řezů je dána teplotní dilatací tyče, na níž je držák umístěn.

Pro reprodukovatelnost řezů je nutné splnit podmínky:

1. všechny pohyby musí být bez vibrací,
2. příslušné mechanismy musí mít minimální tření,
3. schopnost posuvu tyče s držákem vzorku k hodnotě 10 nm,
4. po provedení řezu musí blok utlumit rázy způsobené řezáním.

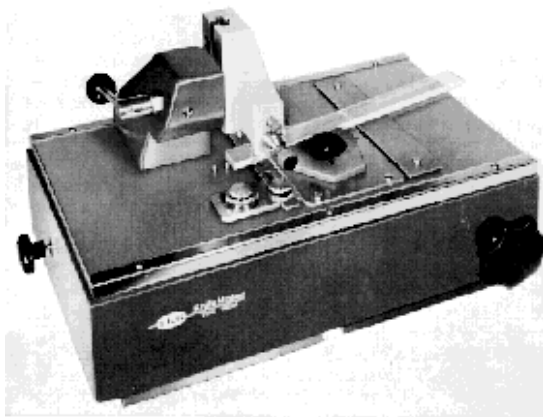
Nože

Nutné vlastnosti nožů pro dosažení kvalitních řezů:

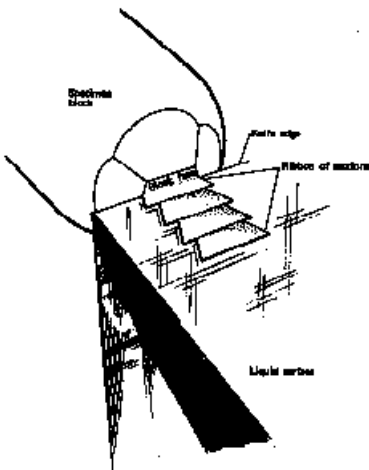
- poloměr křivosti hrany nože musí být menší než je nejmenší požadovaná tloušťka řezu
- tvrdost a tuhost nože musí odolávat nárazům bločku se vzorkem
- odolnost vůči chemickému rozkladu
- homogenita materiálu nože podél jeho hrany
- fyzikální stabilita při pokojové teplotě

Diamantové nože jsou odolné, ale drahé

Skleněné nože jsou křehké (pro tvrdé tkáně – kosti), ale levné.



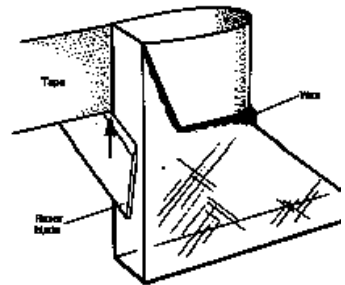
Skleněné nože se připravují lomem ze čtvercové destičky speciálními lámacími kleštěmi nebo pomocí zařízení, které dává reprodukovatelné výsledky (délka, pozice hrany, působiště ohybové síly a její velikost)



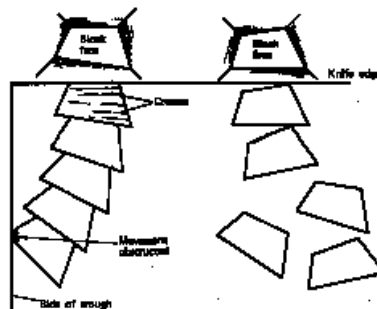
řezání bločku



působení hrotu



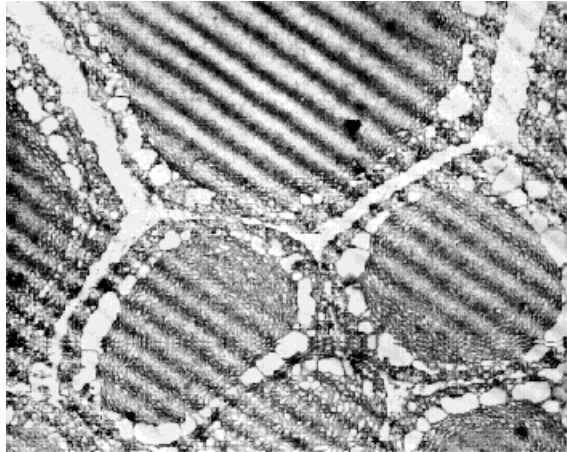
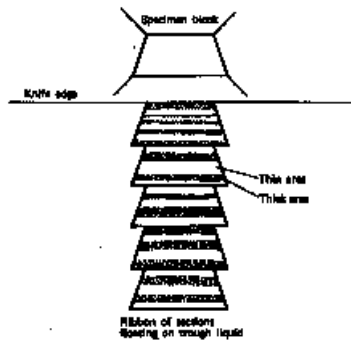
vanička na řezy



chybný sklon ořezaného bločku

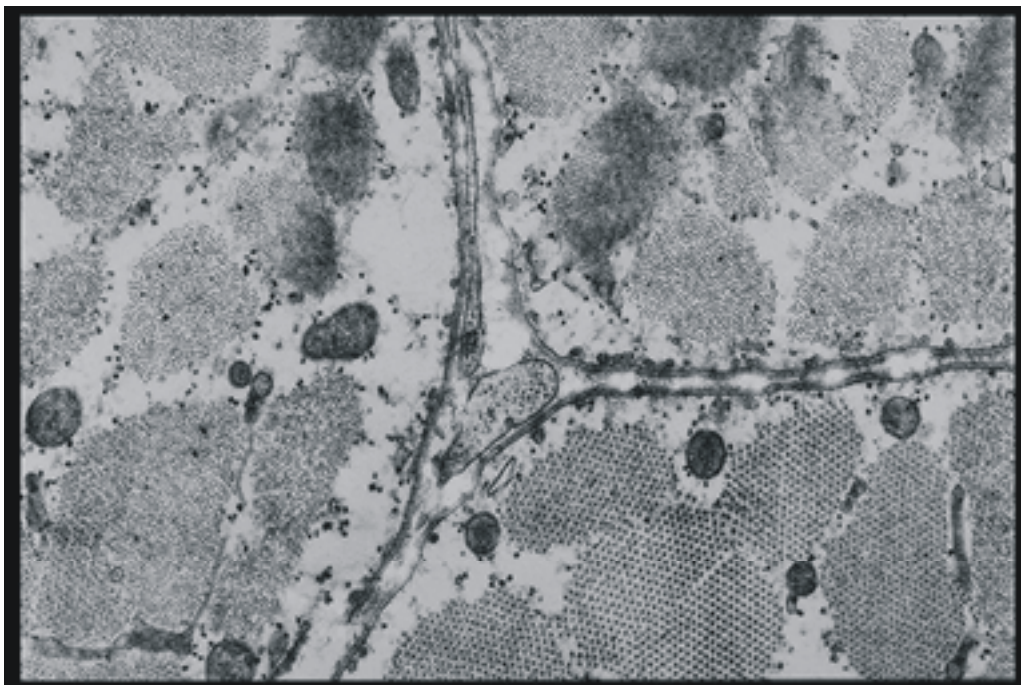
Kvalita řezu

závisí na kvalitě nože (ostrosti), dobře připraveném bločku (sklon ořezání), na kvalitě ultramikrotomu (viz. obr. vliv vibrací na kvalitu řezu) atd.



Vliv vibrací na tloušťku ultratenkého řezu

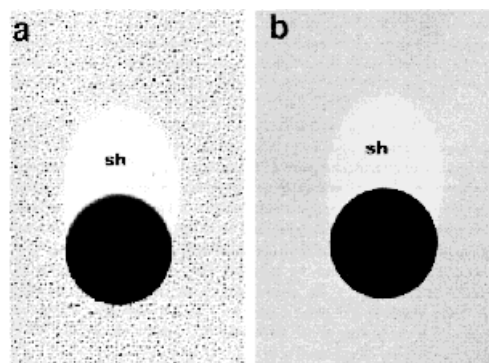
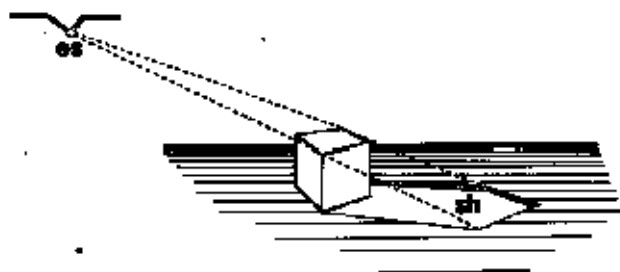
Imunohistochemické metody



Značení koloidním zlatem

STÍNOVÁNÍ TĚŽKÝMI KOVY

Zvýraznění povrchové topografie odpařováním kovu ze strany



latexové kuličky ($0,3\ \mu\text{m}$)
stínované a) Au b) Au-Pd

Kovy používané na stínování:

- vysoká hustota
- intertnost vzhledem k chemickým vlivům a teplotě

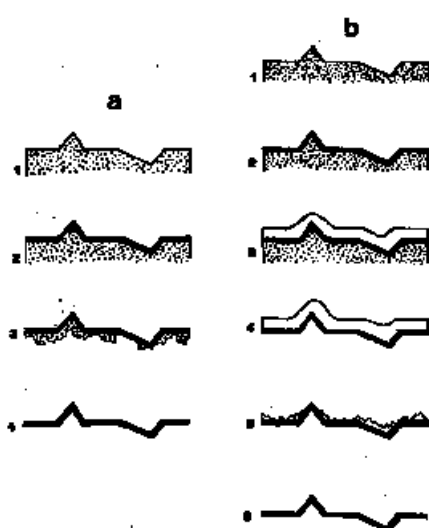
Au, Pd, Cr, Ni, Ge, Pt, U.

Cr pod 5 nm vykazuje granularitu.

Slitina Pt-Pd (3:1) je vhodnější než čistá platina. Slitina dává tloušťku 0,3–1,5 nm.

REPLIKA POVRCHU

Vzorky silnější než $0,1\ \mu\text{m}$ nemohou být studovány v TEM (rozptyl, absorpce).



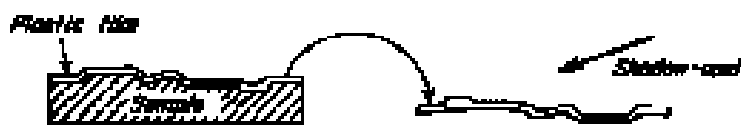
Metoda povrchových replik spočívá v otisku povrchu do tenkého filmu transparentního pro elektrony (C, Formvar atd.).

Tloušťka repliky je cca 20 nm. Z důvodu malého kontrastu je dodatečně stínována.

Způsob vytváření replik:

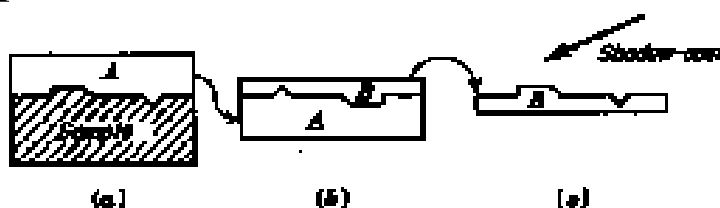
- a) rozpuštěním vzorku
- b) odtržením z povrchu a odstraněním pásky

Negativní replika



Nanesení plastického (nebo C) filmu, sloupnutí (obtížné), stínování

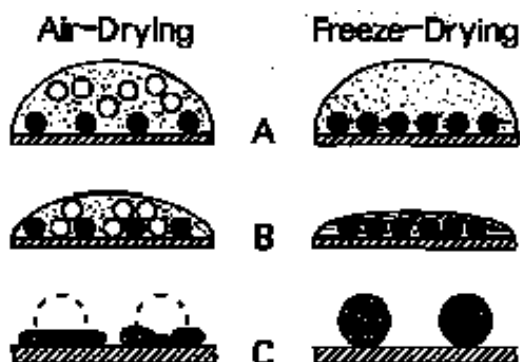
Pozitivní replika



postup přípravy pozitivní repliky

Metody mrazového sušení, lomu a odpařování (Freeze Drying/ Fracturing/ Etching)

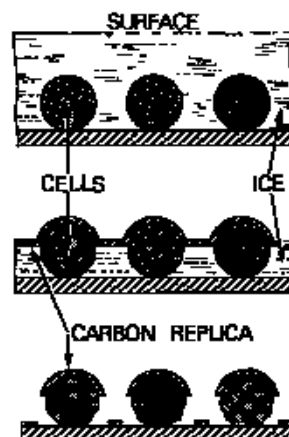
Freeze drying



1. zmražení v LN_2
2. sublimace ledu ve vakuu

porovnání sušení na vzduchu a
metodou Freeze-Drying
(zabrání se agregaci částic)

Při mrazovém sušení buněk může být jako
mezistupeň zařazeno nanesení uhlíkového filmu
dosažení lepšího kontrastu



pro

Freeze – fracturing, freeze – etching

Metody umožňují zkoumání objektů ve zmraženém stavu. Odpadá fixace chemickými činidly (a tedy možných chemických reakcí se vzorkem). Rozlišení je dáno zrnitostí nanášeného kovu, z něhož je vyrobena replika.

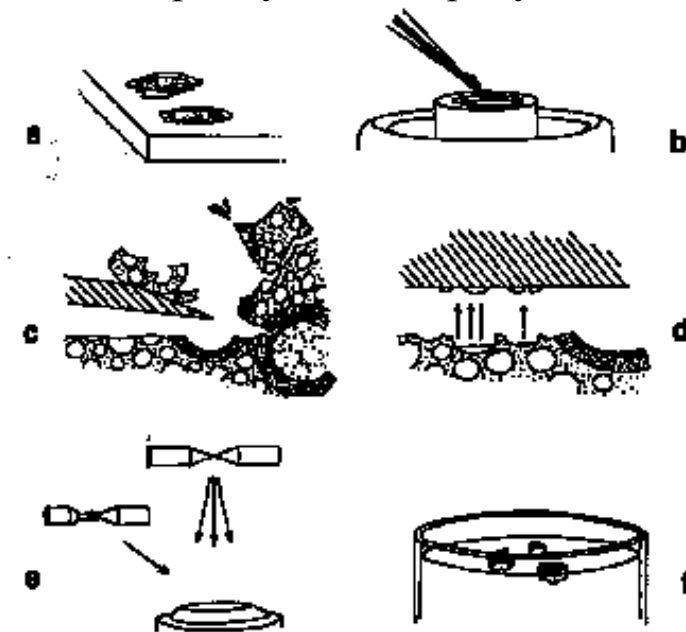
1. Freezing

Kousek tkáně (buněčné suspenze) je rychle zmražen (LN_2) a přenesen do vakuovaného prostoru s nízkou teplotou.

2. Fracturing

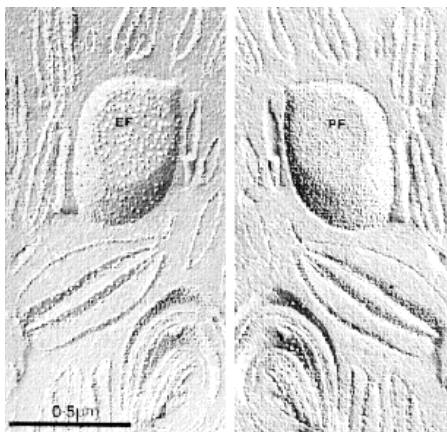
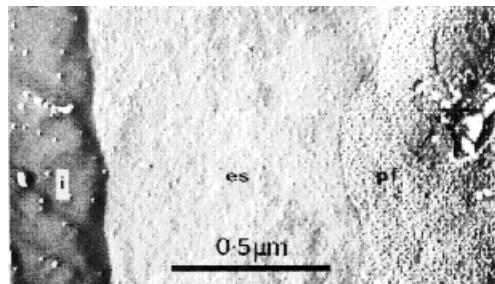
Zmrzlá tkáň je zchlazeným nožem obnažena (zlomena) a dochází k sublimaci ledu z povrchu (-90°C) do hloubky 10 – 30 nm.

Vytvoří se reliéf povrchu. Povrchová topografie kopíruje buněčné membrány a organely. Povrch se bezprostředně stínuje kovem a nanáší se C film pro vytvoření repliky.



Postup:

- izolace tkáně
- zmražení
- mrazový lom
- sublimace ledu
- stínování a příprava repliky
- čištění repliky



Repliky izolovaných thylakoidních membrán chloroplastů

PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO REM

REM má uplatnění v řadě vědních a průmyslových oborů:

v biologii – lékařské vědy (anatomie, histologie, patologie,...), botanika, zoologie,

v geologii, metalografii, mikroelektronice, strojírenství, gumárenském průmyslu apod.

- v REM je možné pozorovat objemné preparáty (limitované velikostí preparátové komory)
- vodivé materiály (kovy, polovodiče) není třeba zvlášť připravovat
- biologické preparáty vyžadují speciální přípravu, (neuvažujeme-li environmentální REM)

PŘÍPRAVA BIOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ

- *tvrdé tkáně* (kosti, vlasy, zuby, kutikulární vrstvy u hmyzu) – pouze zajištění vodivosti povrchu
- *měkké tkáně* – postup složitější: fixace, odvodnění, vysušení, pokovení.

Zvláštnosti pozorování biologických preparátů v REM

biologický materiál = materiál dielektrický, náchylný k poškození elektronovým paprskem

„Nabíjení“ povrchu – špatné odvádění elektronů z povrchu → vznik oblastí s velkou hustotou plošného náboje → snížená kvalita obrazu, viz



obrázek

dielektrické krystaly bez efektu a s efektem nabíjení povrchu

ŘEŠENÍ:

- snížení UN k hodnotám 1 kV (snížená kvalita obrazu)
- použití REM s volitelným vakuem (environmentální REM)
- nanesení vodivé vrstvy

Nanesení vodivé vrstvy – naprašování (Cu, Al, Ag, Au, Pd, Pt)
nejčastěji Au nebo slitina Au-Pd o tloušťce, která nenaruší
ultrastrukturu povrchu (10 nm).

Metody katodového naprašování:

- iontovým svazkem,
- diodové naprašování stejnosměrným proudem,
- diodové naprašování s regulací teploty držáku vzorku.



Podmínky pro vznik doutnavého výboje v plynu:

- Vzorek je umístěn do komory, kde je *vakuum* (1Pa).
- V komoře je *inertní plyn* (Argon)
- *Katodu* tvoří naprašovaný kov
- *Anodou* je stolek se vzorkem
- *Zvyšováním napětí* vyvoláme výboj ve zředěném plynu

Sputtering Coater Device (SCD)

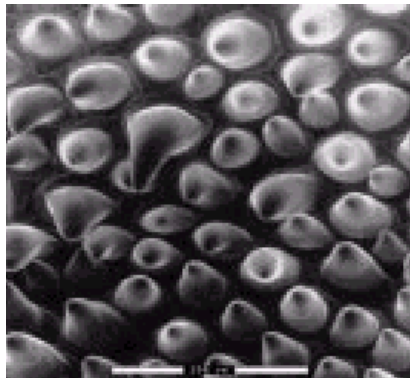
Argonové ionty jsou přitahovány záporným nábojem katody, vyráží atomy kovu (záporné ionty), které ve formě plazmy obklopují preparát (+) a zajišťují jeho rovnoměrné naprašování. Magnetické pole hlavy (katody) soustřeďuje ionty směrem na stolek.

Podtlak, proud a doba naprašování jsou zobrazovány na displeji. (Krytalový detektor umožňuje měřit tloušťku naprašované vrstvy)

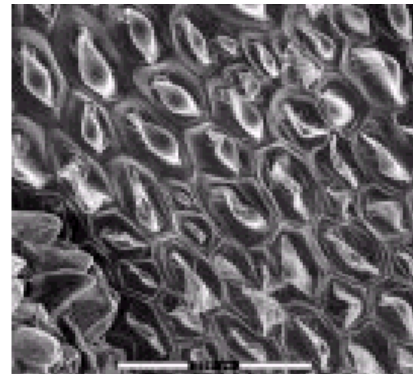
Čím má naprašovaný kov vyšší Z (protonové číslo), tím lepší kontrast v režimu SE poskytuje

Měkké tkáně: rostlinná pletiva a buňky, živočišné tkáně a buňky

Ve vakuu dochází k jejich rychlému vysušování a deformaci, viz, obr.



vysušení
rostlinného
pletiva ve vakuu



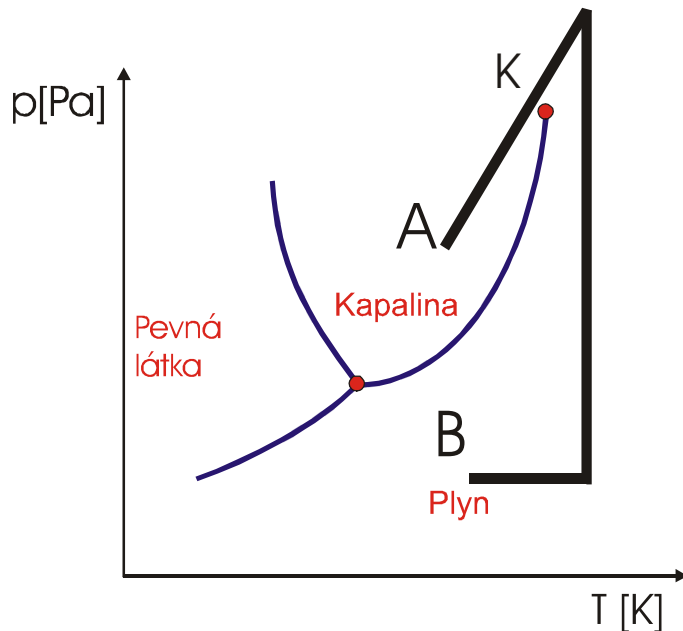
Řešení:

- použití REM s volitelným vakuem (environmentální REM)
- volba standardního postupu: fixace, odvodnění, sušení + pokovení

Fixace a odvodnění postupy jsou podobné jako u TEM

Vysoušení dehydratačního činidla:

- nejpoužívanější je „metoda obejití kritického bodu“



Metoda je založena na jevu, že nad kritickým bodem (K), daným p_K a T_K mizí fázové rozhraní mezi kapalnou a plynou fází.

pro vodu:

$$p_K = 21,8 \text{ MPa}$$

$$T_K = 647 \text{ K (374 } ^\circ\text{C)}$$

pro CO_2 :

$$p_K = 7,3 \text{ MPa}$$

$$T_K = 304 \text{ K (31 } ^\circ\text{C)}$$

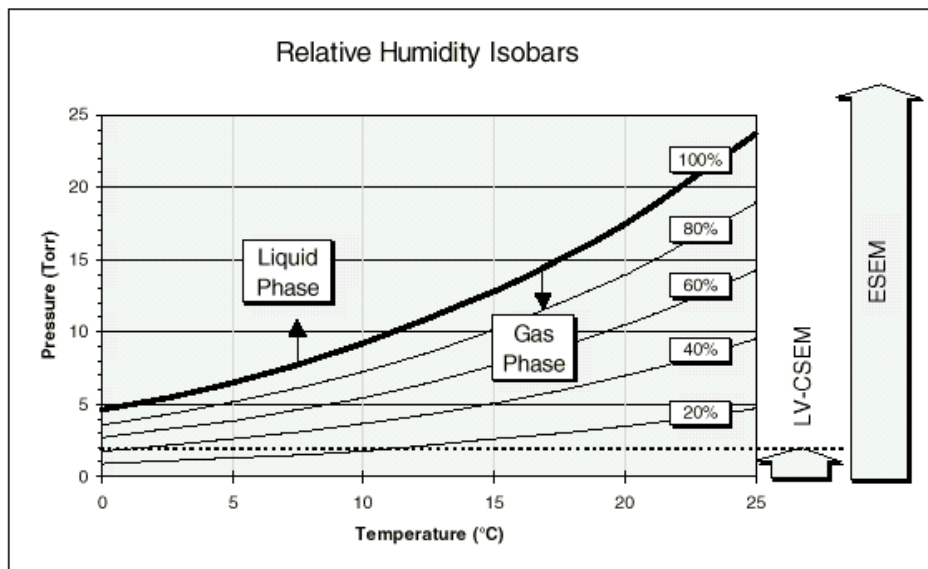
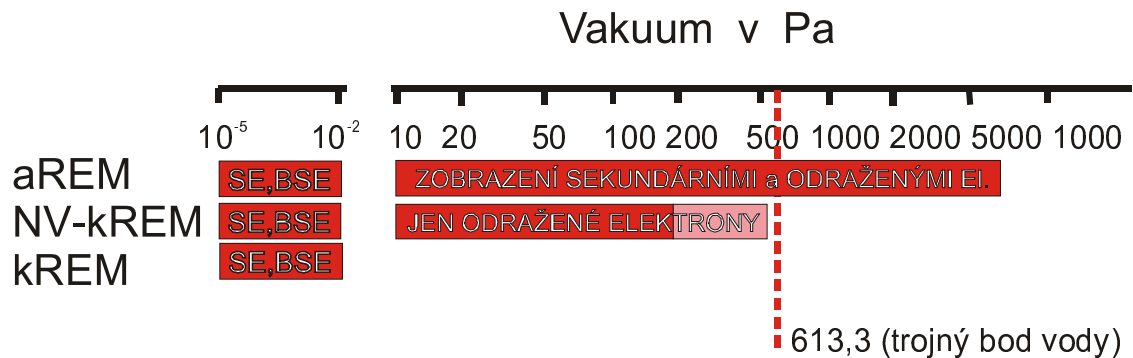
A – výchozí stav; B – konečný stav

Jako vysoušecí činidlo se volí CO_2 . Proces je automatizován v zařízeních Critical Point Dryer (CPD)

Pokovení: probíhá podle dříve popsaného způsobu

REM S VOLITELNÝM VAKUEM – ENVIRONMENTÁLNÍ REM

PRACOVNÍ PODMÍNKY ZÁKLADNÍCH TYPŮ REM

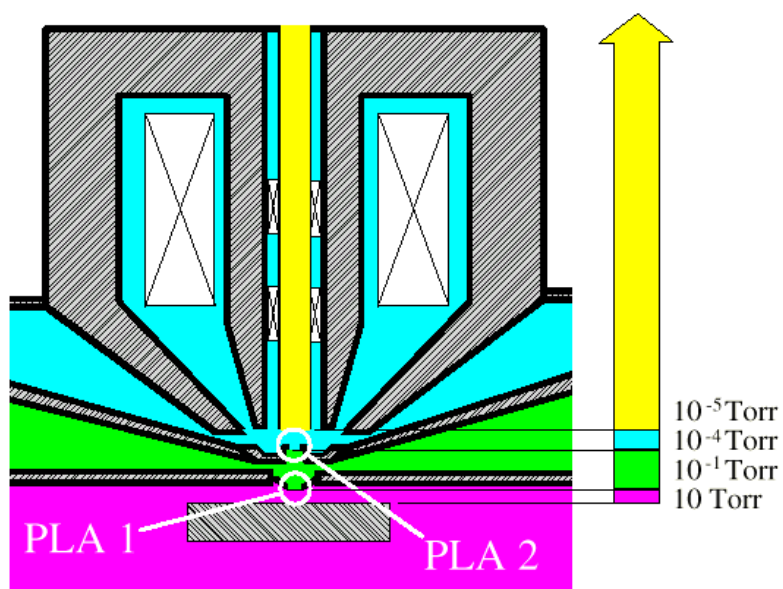
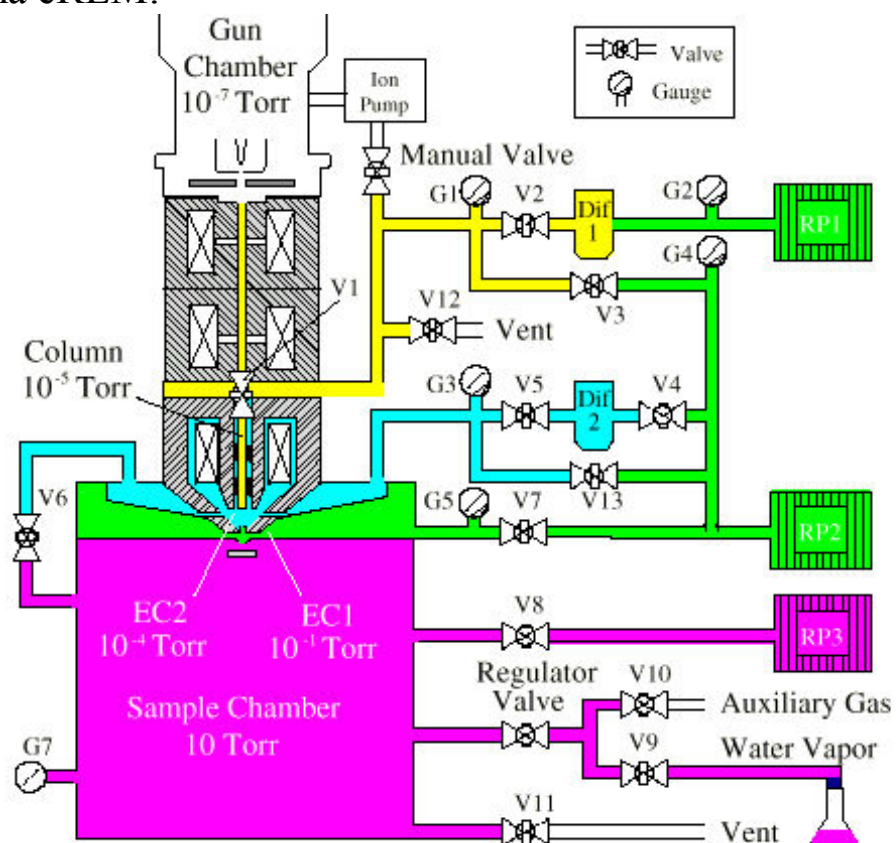


Izobary relativní vlhkosti

PŘEDNOSTI ENVIRONMENTÁLNÍCH REM

- pozorování nevodivých preparátů
- možnost pozorování vlhkých preparátů (bez přípravy, často vedoucí ke vzniku artefaktů u jemných struktur)
- pracovní podmínky (zejména tlak) umožňují pozorování „živých mikroorganismů“ a dynamických procesů (tah, ohřev, růst buněčných kultur, fázové přeměny – tání, tuhnutí, sublimace apod.)
- detekce elektronů – detektor není citlivý na světlo ani teplo (pozorování rozžhavených kovů, luminiscenčních materiálů)
- detekce rtg. záření – přístroje EREM získávají data z povrchu nepokovených vzorků (eliminace vlivu kovové vrstvy)

Schéma eREM:

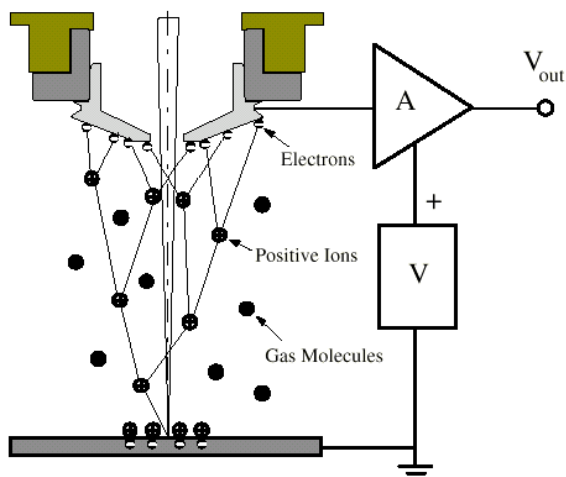


Speciální „tlakové clony“ oddělující prostory s různým vakuem

DETEKTORY TOLERUJÍCÍ PŘIROZENÉ PROSTŘEDÍ PREPARÁTU

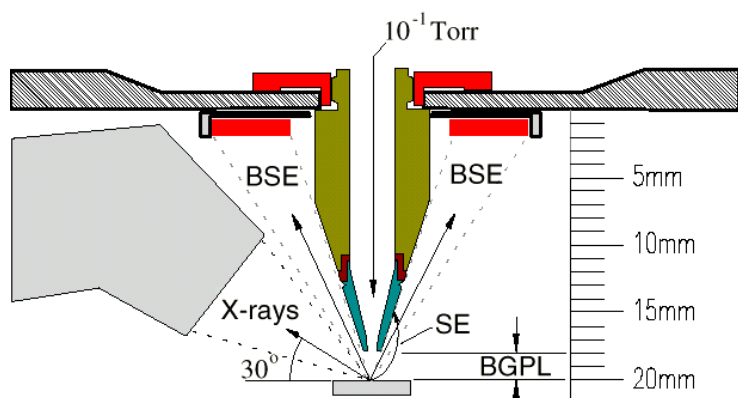
(environmentální detektory)

Přednosti:

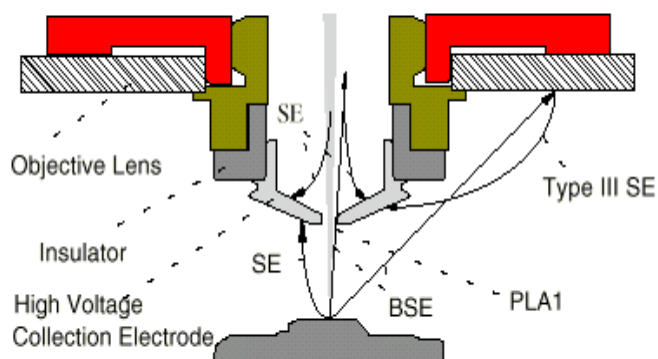


- ionizovaný plyn potlačuje „nabíjení“ preparátu
- ionizace plynu uvolněnými elektrony ze vzorku zvyšuje účinnost detekce
- detektory nejsou citlivé na světlo a teplo

detektor sekundárních a
odražených elektronů

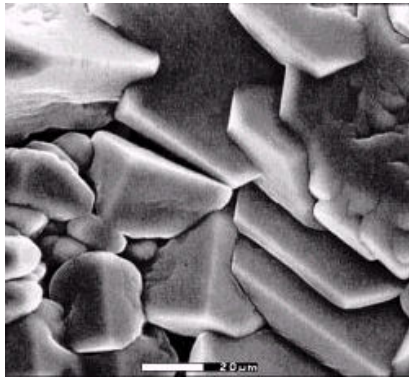


ESD

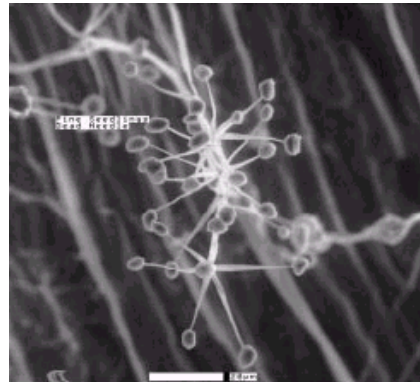


detektor rentgenového záření

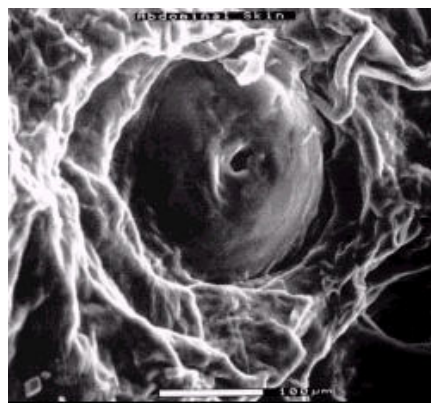
Příklady použití eREM



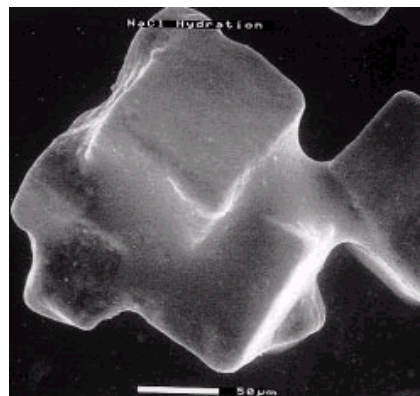
krystalky ledu z páry vytvořené v komoře eREM



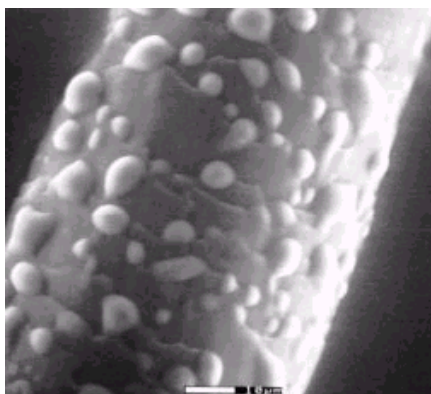
plíseň na jehlici



kožní pór



solvatace NaCl



vlas s kapkami vody



živá mšice

ELEKTRONOVÁ MIKROANALÝZA

(Elektronová resp. rentgenová mikrosonda)

(Electronprobe microanalysis EPMA, Electron microprobe analysis EMPA, X-ray Microanalysis)

R. Castaing r. 1940 (Univerzita v Paříži) – první teorie WDS

r. 1968 první pevnolátkový detektor pro EDS

Informaci chemickém složení (případně struktuře) vzorku poskytují při interakci s elektrony:

- **rentgenové záření**,
- zpětně rozptýlené elektrony,
- katodoluminiscence.

EMA – zahrnuje dva způsoby jak získat informaci o složení a struktuře vzorku prostřednictvím rtg. záření

- **WDS** (Wavelength Dispersive Spectrometr) – rozklad záření podle vlnových délek.
- **EDS** (Energy Dispersive Spectrometer) – rozklad podle energie rtg. záření.

WDS – úzké svazky rtg. paprsků dopadají na krystalový detektor a jejich λ (energie) je dána Braggovým vztahem (při známém d)

EDS – vyhodnocuje celé spektrum rtg. záření emitovaného ze vzorku. Detektor EDS je pevnolátkový (podle energie rtg. záření generuje dvojice *elektron-díra*). Signál z detektoru je veden do multikanálového analyzátoru

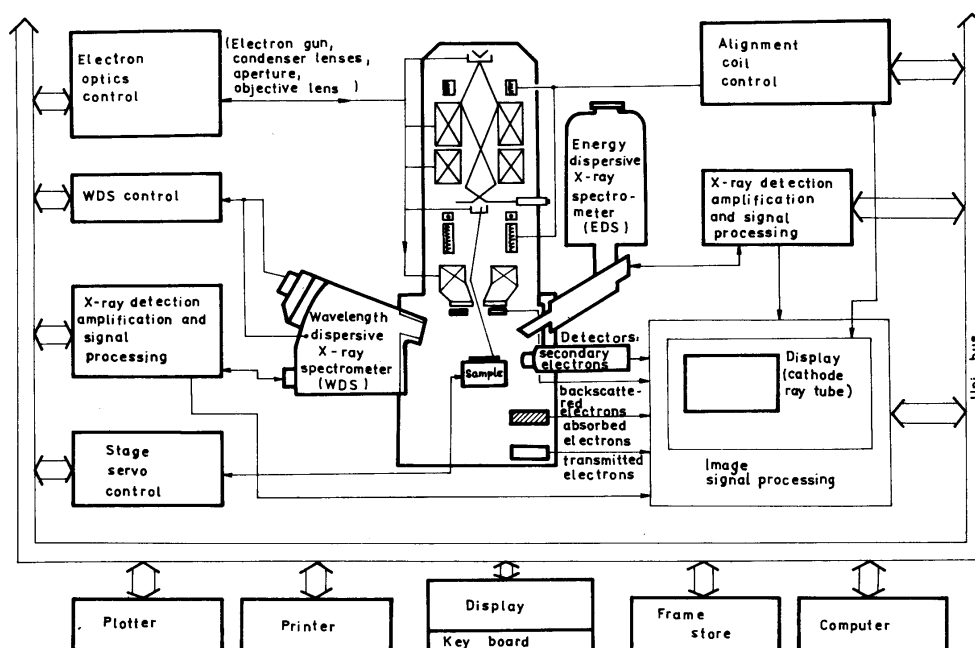
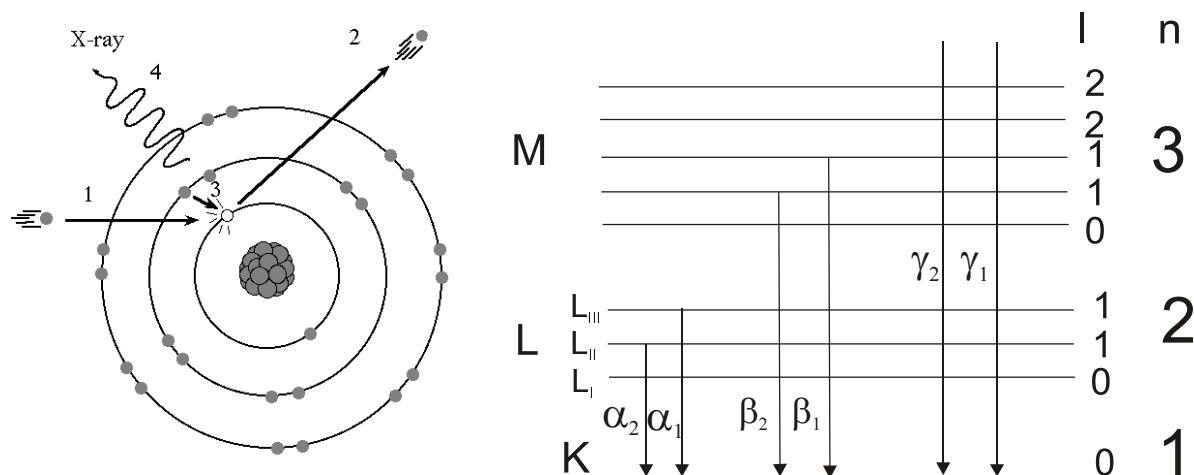


Fig.4. Schematic representation of EPMA system



Vznik *charakteristického rentgenové záření*

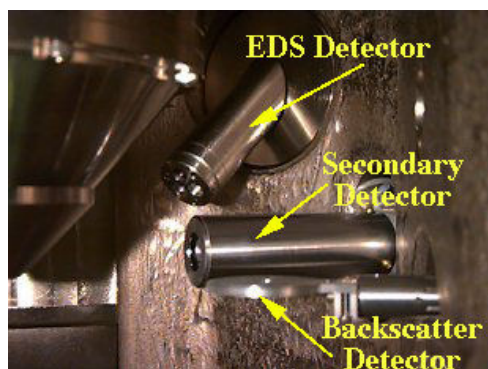
Chemická analýza v objemu několik μm^3 (proto mikroanalýza). Objem interakce je funkcí složení (Z) a UN (Monte Carlo metody–model rozptylu elektronů)

➤ **kvalitativní analýza** (zastoupení chemických prvků ve vzorku, rtg. mapování).

➤ **kvantitativní analýza** (porovnáním se standardy).

analýza lehkých a stopových prvků (pod 100 ppm), problémy s analýzou pokovených preparátů apod.

Energiově Dispersní Analýza (EDXRA, EDS)



CHARAKTERISTICKÉ RTG. ZÁŘENÍ JE
ZACHYCENO

polovodičovým, chlazeným detektorem

Princip činnosti detektoru: interakcí fotonů rtg. záření s atomy krystalu detektoru, vznikají páry *elektron-díra* – jejich množství je úměrné energii fotonu. (zesílení detektoru = 1 protože nedochází k tvorbě lavin vlivem sekundární ionizace nárazem)

PD z čistého polovodič (Si, Ge). Případné nečistoty v PD působí jako pasti pro elektrony uvolněné fotoefektem $\Rightarrow$

Detektor s příměsí Li – atomy Li nasytí akceptorovou vazbu nečistoty (stane se elektricky neutrální). Polovodič má pak jen vlastní vodivost.

počet párů *elektron-díra* je dán vztahem $n = \frac{E_x}{\varpi}$

E_x – energie fotonů rtg. záření

ϖ – průměrná energie potřebná na vytvoření 1 páru (pro Si $\varpi_{Si} = 3,6$ eV)

Amplituda napěťového impulsu

$$U = \frac{q_e \cdot \bar{n}}{C} = \frac{q_e \cdot E_x}{\varpi \cdot C}$$

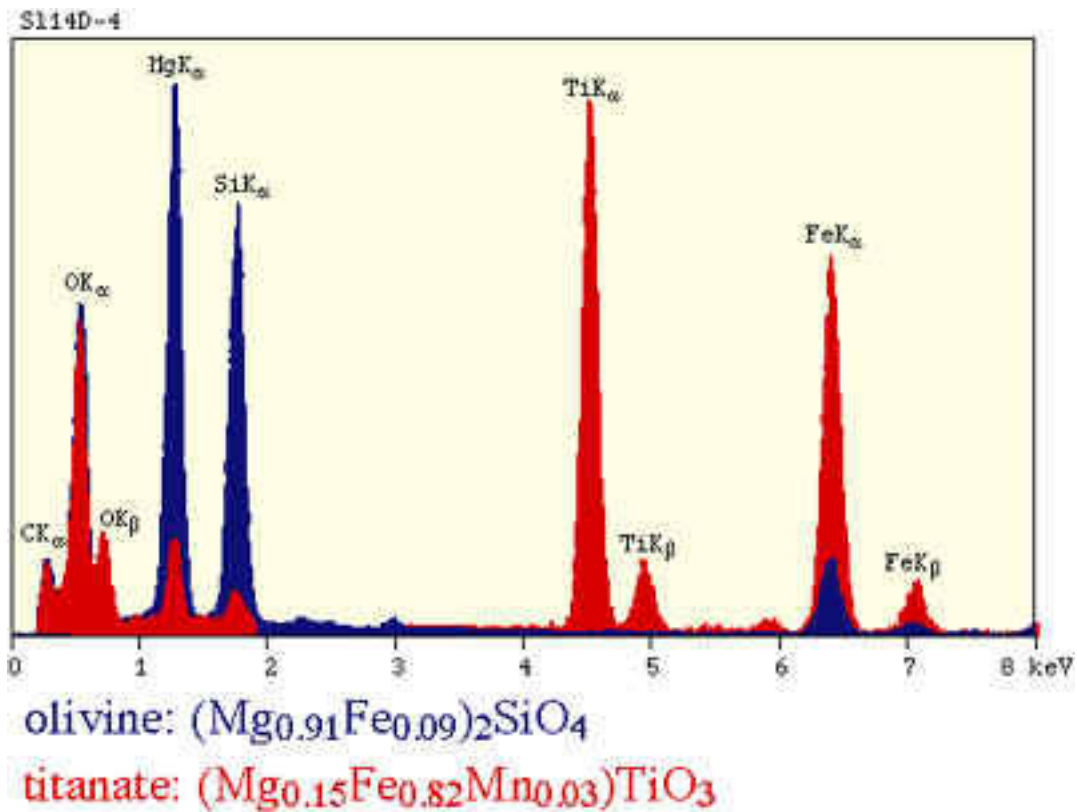
q_e – elementární náboj, C – celková kapacita systému

Pro snížení temného proudu (šumu detektoru) na 10^{-13} A – nutnost chlazení LN_2 v Dewarově nádobě.

Beriliové okénko mezi detektorem a komorou (zabránění kondenzace nečistot na detektoru). Odsunutím okénka je možno měřit na nižších energiích.

Princip činnosti spektrometru

1. zesílení signálu a přivedení napěťových impulsů na výstup předzesilovače,
2. tvarování signálu (Gaussovský tvar) v hlavním zesilovači a převedení na sled napěťových impulsů,
3. použití pásmových filtrů pro zabránění vstupu velmi nízké a velmi vysoké frekvenční složky signálu (zlepšení poměru *signál-šum*),
4. převedení signálu do analogového převodníku (např. změna vybíjecí doby kondenzátoru) a přeměna na číslo (digitalizace)
5. zaznamenání do paměti mnohokanálového analyzátoru (každý kanál má přiřazen interval amplitud – energií, obvykle 10 eV/kanál)
6. zobrazení signálu ve formě histogramu.



typické EDS spektrum

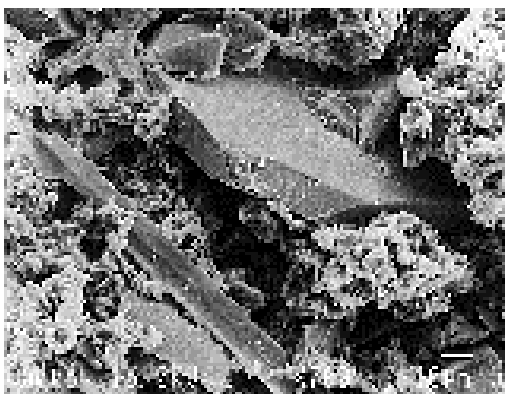
Obvykle jsou EDS vhodné pro *kvalitativní analýzu*.

Semikvantitativní analýza – porovnáním intenzit spektrálních čar (při stejné energii svazku za stejný čas)

Kvantitativní analýza – porovnáním se standardem (vysoké čistoty)

Nutnost korekce ZAF – na atomové (protonové číslo Z), Absorpci a Fluorescenci rtg. záření ve vzorku.

Mapování ve zvoleném prvku



Živec – obraz v SE



rtg. mapování (K)

Obtíže detekce rtg. záření v EDS

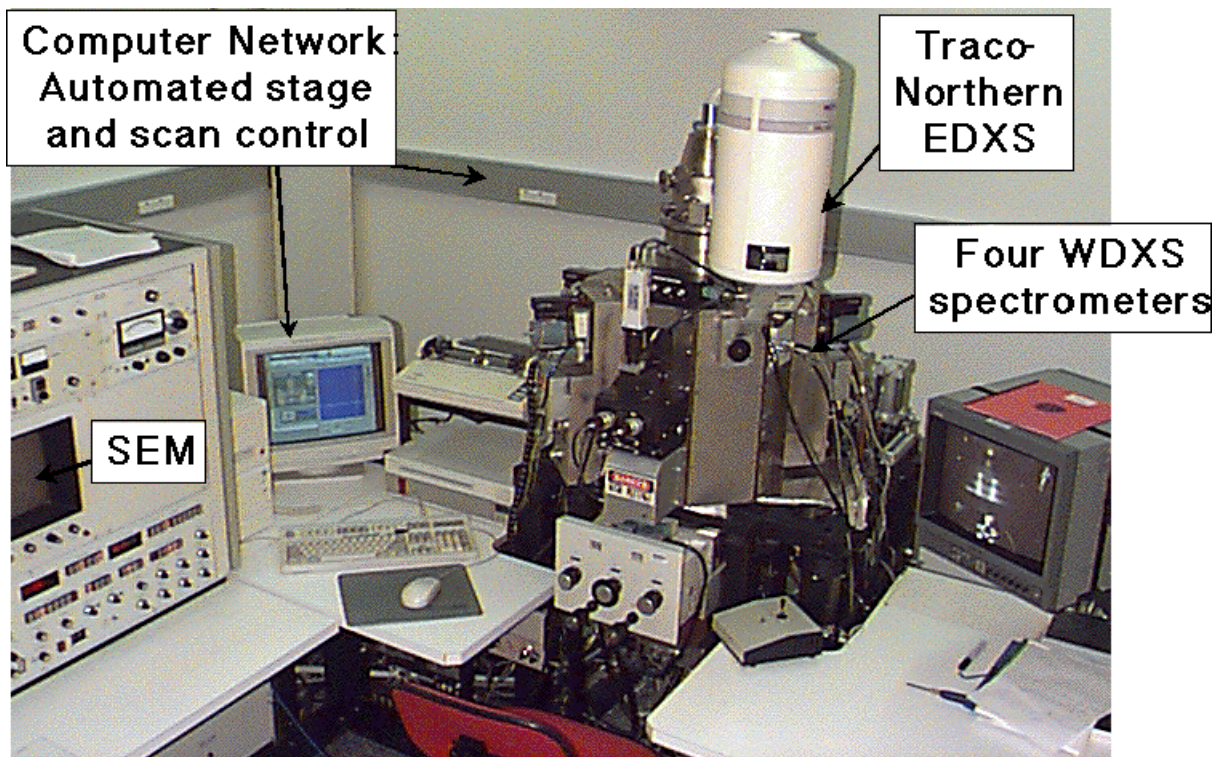
- *nastavení geometrie* – uspořádání detektoru a vzorku (možnost z – posuvu a náklonu)
- *artefakty při nabírání spektra* – nadměrná mrtvá doba detektoru, překrývání píků, „únikové píky“

„únikové píky“ – rtg. záření vyrazí v detektoru (Si) elektrony z hladiny K, jejichž energie redukuje měřenou energii (energie absorpční hrany Si = 1,84 keV; skutečná energie píku Fe $K\alpha$ = 6,40 keV; naměřená energie Fe $K\alpha$ = 4,56 keV).

Překrytí píků – spektrální rozlišení EDS je definováno hodnotou FWHM píku Mn $K\alpha \cong 150$ eV. Proto rozlišení některých píků je slabé.

Př: Mn $K\beta$ je blízko Fe $K\alpha$.

Nadměrná mrtvá doba – těsná vzdálenost detektoru a vzorku a vyšší energie svazku mohou vést k zahlcení detektoru, případně k posuvu píků.

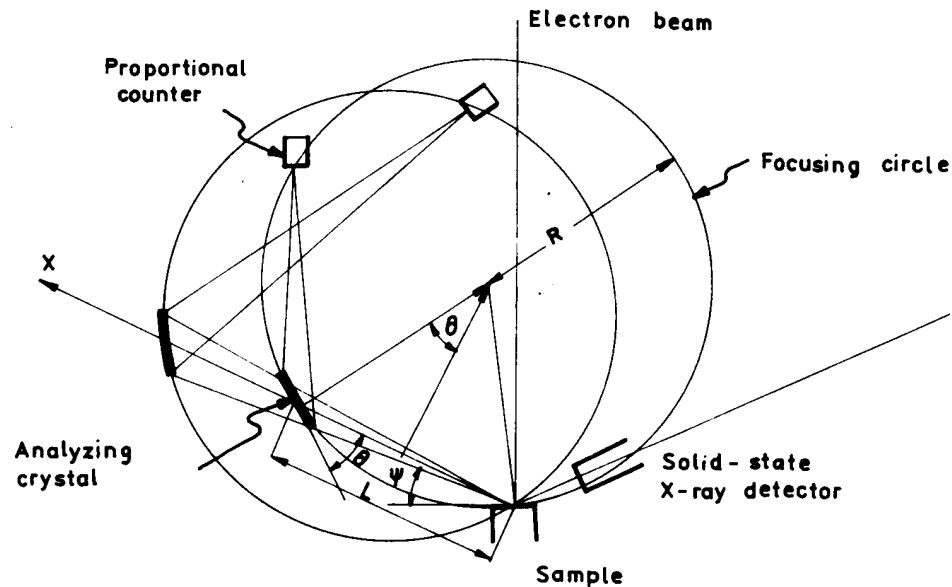


Pracoviště WDS a EDS EMPA

Vlnově disperzní spektrometrie

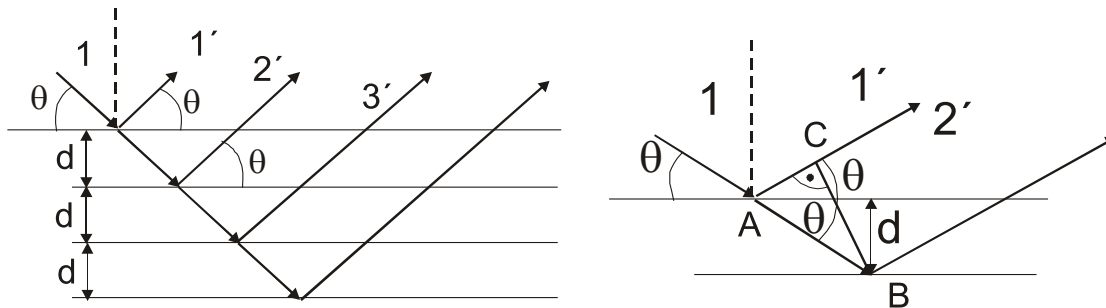
(Wavelength Dispersive Spectrometry – WDS)

Metoda určená k přesnému určení chemického složení mikroobjemů (μm^3)



Princip detekce charakteristického rtg. záření u WDS

Na základě Braggovy podmínky platí pro difrakční maxima



$2d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$ (lze při známém d , určit λ a energií rtg. záření).

Krystalový detektor se syntetickým krystalem (případně systémem krystalů) s velkou d (pro analýzu lehkých prvků – Be, B, C, O, N).

Energie dopadajícího svazu elektronů musí být 2 až 2,5 větší než je excitační energie (energie absorpční hrany) pro daný prvek.

Rozlišení energií u WDS $\cong 5$ eV (oproti 150 eV u EDS)

Artefakty ve spektrech WDS – v případě, že maxima vyšších řádů dopadají blízko čáry, která nás zajímá (lze řešit nastavením spektrometru a citlivostí detekce).

Příprava vzorků pro EMPA

Naprášená vrstva pro eliminaci povrchového náboje u nevodivých preparátů (biologické preparáty, ...) způsobuje problémy při analýze překrýváním píků naprášeného kovu (čím těžší prvek, tím více čar)

Preparáty musí být čisté, nekontaminované (hydrokarbonáty, prach...)

Porovnání WDS a EDS mikroanalytických metod

WDS	EDS
1. Vysoké spektrální rozlišení (2-6 eV)	1. Nízké spektrální rozlišení (130-155 eV)
2. Nižší účinnost při nabírání spektra (pomalejší)	2. Vysoká účinnost při nabírání spektra (rychlejší)
3. Vyšší citlivost na změnu geometrie vzorku	3. Nižší citlivost na změnu geometrie vzorku
4. Řídké artefakty ve spektru	4. Časté artefakty ve spektru
5. Nevyžaduje LN ₂	5. Vyžaduje LN ₂
6. Dochází k pohybu mechanických částí	6. Nedochází k pohybu mechanických částí
7. Je nutná relativně vysoká energie svazku	7. Nízká energie svazku není problémem
8. Nákladné zařízení	8. Méně nákladné zařízení

Energie spektrálních čar charakteristického rentgenového záření (vybraných prvků)

Prvek	Z	Čára	Energie (keV)
Be	4	K α	0.1085
B	5	-	-
C	6	K α	0.277
TiN	-	-	-
SiO ₂	-	-	-
Mg	12	K α _{1,2}	1.25360
		K β	1.3022
Al	13	K α _{1,2}	1.48670
		K β	1.5574
Si	14	-	-
Ti	22	K α ₁	4.51084
		K α ₂	4.504486
		K β ₁	4.93181
		K β	4.93181
		L α	0.4522
Cr	24	K α ₁	5.41472
		K α ₂	5.40551
		K β	-
		K β ₁	5.94671
		L α	0.5728

Au	79	K α ₁	68.8037
		K α ₂	66.9895
		L α ₁	9.7133
		L α ₂	9.6280
		L β ₁	11.4423
		L β ₂	11.5847
		L β ₃	11.6103
		L β ₄	11.2047
		L γ ₁	13.3817
		L γ ₂	13.7095
		L γ ₃	13.8090
		L γ ₆	13.7304
		L γ ₄	14.2996
		L γ ₈	13.6260
		L γ ₅	12.9743
		L γ ₉	12.1474
		L β ₁₀	12.0617
		L β ₅	11.9163
		L β ₇	11.8106
		L β ₁₅	11.5667
		L β ₆	11.1602
		Le	10.3083
		Li	8.4939

TABULKA ENERGIÍ SPEKTRÁLNÍCH ČAR VYBRANÝCH PRVKŮ

Prvek	Z	čáry	Energie čáry (keV)
Be	4	Ka	0.1085
B	5	-	-
C	6	Ka	0.277
TiN	-	-	-
SiO2	-	-	-
Mg	12	Ka1,2	1.25360
		Kb	1.3022
Al	13	Ka1,2	1.48670
		Kb	1.5574
Si	14	-	-
Ti	22	Ka1	4.51084
		Ka2	4.504486
		Kb1	4.93181
		Kb	4.93181
		La	0.4522
Cr	24	Ka1	5.41472
		Ka2	5.40551
		Kb	-
		Kb1	5.94671
		La	0.5728
Fe	26	Ka1	6.40384
		Ka2	6.39084
		Kb1	7.05798
		Kb	-
		La	0.7050
Co	27	Ka1	6.93032
		Ka2	6.91530
		Kb1	7.6943
		La	0.7762
		Lb	-
Ni	28	Ka1	7.47815
		Ka2	7.46089
		Kb1,3	8.26466
		Kb2,5	8.3286
		La	0.8515
Cu	29	Ka1	8.04778
		Ka2	8.02783
		Kb1	8.90529
		Kb	-
		La	0.9297

		Lb	-
Zn	30	Ka1	8.63886
		Ka2	8.61578
		Kb	-
		La1,2	1.0117
		La	-
		Lb	-
Zr	40	Ka1	15.7751
		Ka2	15.6909
		La1	2.3027
		Lb1	2.1244
		Lb2,15	2.2194
		Lb3	2.2010
		Lb4	2.1873
		Lb6	2.3027
		Lg5	2.2551
		Le	1.87654
		Ll	1.79201
		Mz	0.1511
Mo	42	Ka1	17.47934
		Ka2	17.3743
		Mz	0.1926
Ag	47	Ka1	22.16292
		Ka2	21.9903
		La1	2.98431
		La2	2.97821
		Lb1	3.15094
		Lb2	-
		Lb3	3.23446
		Lb4	3.20346
		Lb6	3.25603
		Lb9	3.43917
		Lb10	3.43287
		Lg1	3.51959
		Lg2	3.7432
		Lg3	3.7498
		Lg5	3.42832
		Ll	2.6337
		Le	2.8061
Sn	50	Ka1	25.2713
		Ka2	25.0440
		Kb1	24.9424
		Kb3	28.4440
		Lb2,15	3.904876
		Lb6	3.7926
		Lg2,3	4.1605
		Ll	3.04499

		Mz	0.397
W	74	Ka1	59.31824
		Ka2	57.9817
		Kb1	67.2443
		Kb3	66.9514
		La1	8.3976
		La2	8.3352
		Lb1	9.67235
		Lg1	11. 2859
		Lb2	9.9615
		Lb3	9.8188
		Lb4	9.5252
		Ll	7.3878
		Le	8.7243
		Lg2	11.6080
		Lg3	11.6743
		Lg6	11.5387
Au	79	Ka1	68.8037
		Ka2	66.9895
		La1	9.7133
		La2	9.6280
		Lb1	11.4423
		Lb2	11.5847
		Lb3	11.6103
		Lb4	11.2047
		Lg1	13.3817
		Lg2	13.7095
		Lg3	13.8090
		Lg6	13.7304
		Lg4	14.2996
		Lg8	13.6260
		Lg5	12.9743
		Lb9	12.1474
		Lb10	12. 0617
		Lb5	11.9163
		Lb7	11.8106
		Lb15	11.5667
		Lb6	11.1602
		Le	10.3083
		Ll	8.4939

SPECIÁLNÍ METODY ELEKTRONOVÉ SPEKTROSKOPIE

Starý, V.: EXELFS a ELNES – nové metody analytické elektronové mikroskopie. In: Metody analýzy povrchů (Elektronová spektroskopie), ed. Eckertová, L. Academia Praha 1990.

EXELFS (Extended X – ray edge Electron Loss Fine Structure) – Vzdálená jemná struktura elektronových ztrát za rentgenovou absorpční hranou.

ELNES (Electron Loss Near Edge Structure) – Struktura elektronových ztrát v blízkosti absorpční hrany.

podobnost s metodami:

EXAFS (Extended X – ray Absorption Fine Structure) – Vzdálená jemná struktura rentgenové absorpce.

XANES (X–ray Absorption Near Edge Structure) – Rentgenová absorpce v blízkosti absorpční hrany.

Společný základ:

uvolnění elektronu z vnitřní hladiny atomu. **Sleduje se změna intenzity** budícího záření po průchodu vzorkem (**ne uvolněný elektron**).

u EXAFS + XANES – změna toku fotonů rtg. záření

u EXELFS + ELNES – změna proudu elektronů s určitou ztrátou energie.

K ionizaci atomu dochází dodáme-li energii stejnou nebo větší než je jeho vazební energie.

Počet ionizací (jednočásticová aproximace) nad absorpční hranou

$$I(E) \approx P(E)N(E)$$

E – kinetická energie uvolňovaného elektronu

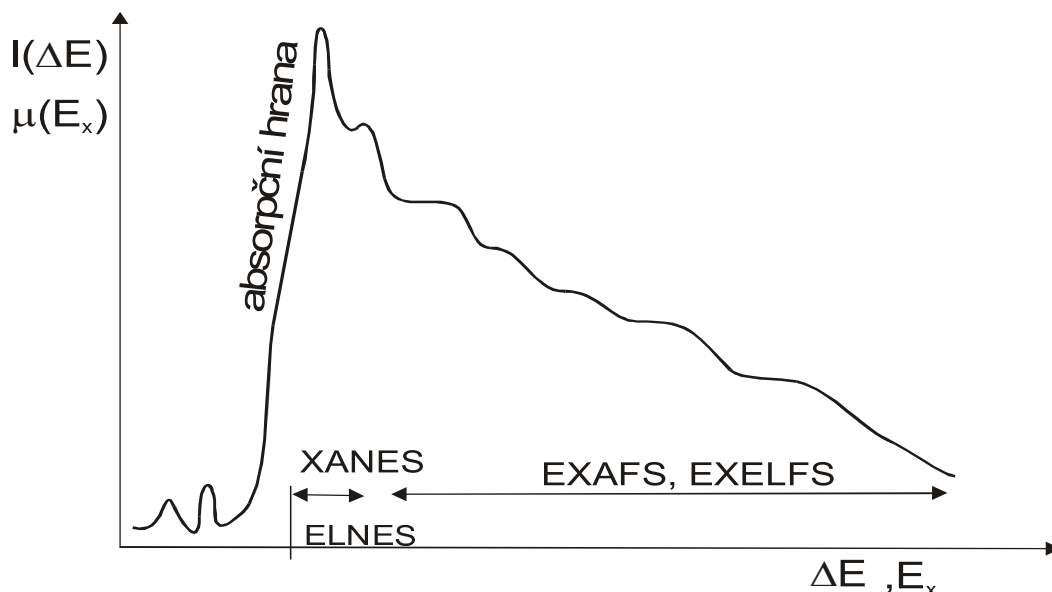
$P(E)$ – pravděpodobnost přechodu

$N(E)$ – hustota konečných stavů uvolněného elektronu

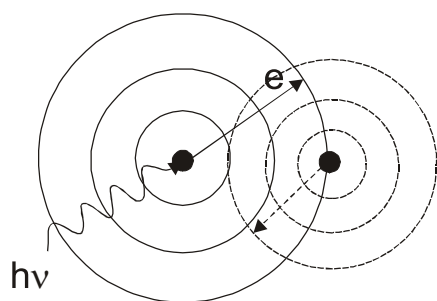
Při metodách se sleduje:

➤ EXAFS + EXELFS jemná struktura abs. hrany při energiích 50 až 500 eV

- XANES + ELNES jemná struktura absorpční hrany v oblasti 50 eV nad prahem (do 8 eV $P(E) \approx \text{konst.}$ – počet ionizací je úměrný hustotě stavů, mezi 8 až 50 eV dochází ke složitým vícečásticovým interakcím, které vedou ke změnám $P(E)$ i $N(E)$)



Průběh absorpčního koeficientu $\mu(E_x)$ (resp. Intenzity se ztrátou energie ΔE) za absorpční hranou. E je ionizační energie, E_x en. fotonů



Existence zvlnění za absorpční hranou (metoda EXAFS). Černý koužek je ionizovaný atom, soustředné kruhy – šířící se vlna uvolněného elektronu

Př.: pro dvojjatomovou molekulu

Vlnový charakter elektronu – vznikající vlna uvolněného fotoelektronu nebo sekundárního elektronu interferuje s vlastními odrazy od okolních atomů.

Popis absorpce fotonů:

$$\frac{dN}{dE} = A \left(\frac{dI}{dE} \right) \exp(-\mu d),$$

kde A je plocha vzorku, dI/dE hustota dopadajícího záření na jednotku energie, d je tloušťka vzorku, $\mu(E_x) = N\sigma_{\text{abs}}(E_x)$ je absorpční koeficient, kde N je koncentrace atomů ve vzorku, $\sigma_{\text{abs}}(E_x)$ účinný průřez absorpce.

pro dipólovou interakci platí:

$$\sigma_{\text{abs}}(E_x) = \frac{4\pi^2 e^2}{\hbar c} E \left| \langle f | \vec{E}_j \vec{r} | i \rangle \right|^2$$

$\langle f | \vec{E}_j \vec{r} | i \rangle$ maticový element přechodu ze stavu i do konečného stavu f (normalizovaný na jednotku energie, $\vec{E}_j$ – jednotkový vektor ve směru elektrického pole (polarizace fotonu), $\vec{r}$ – polohový vektor elektronu vnitřní hladiny atomu).

V metodách užívajících buzení fotony (EXAFS + XANES) se mění vlnová délka dopadajících fotonů a měří se $\mu(E_x)$,
v metodách s buzením elektronovým (EXELFS + ELNES) je energie E_0 konstantní a měří se proud elektronů, které ztratily při nepružné srážce určitou část energie ΔE .

Poznámka: Spektrum energetických ztrát elektronů se měří metodami elektronové spektroskopie (EELS – Electron Energy Loss Spectroscopy) v blízkosti absorpčních hran.

Počet elektronů, které ztratily energii ΔE :

$$\frac{dN}{d(\Delta E)} = A \cdot I \cdot N \cdot d \frac{d\sigma_e(\Delta E)}{d(\Delta E)}, \text{ kde}$$

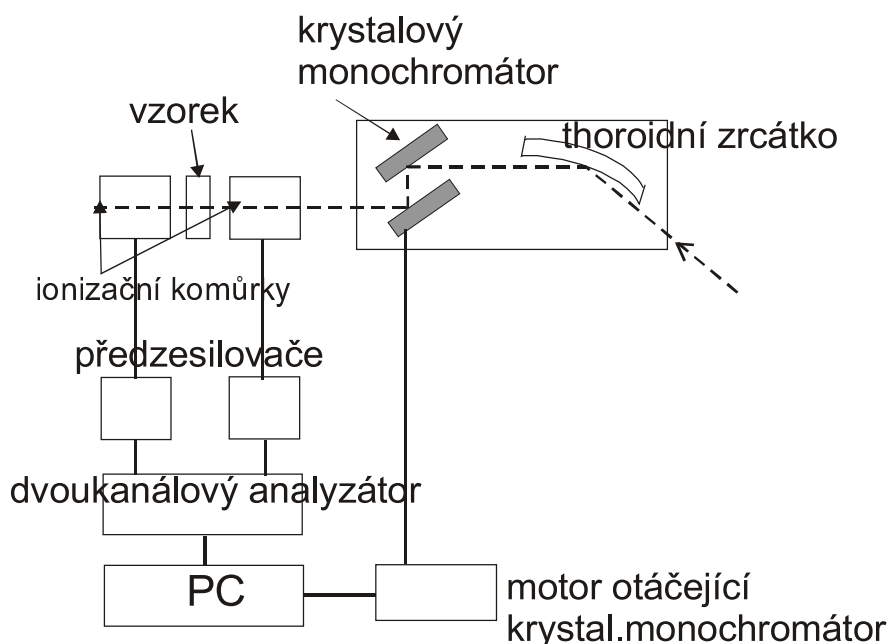
A – plocha vzorku, I – hustota proudu dopadajících elektronů,

N – koncentrace atomů ve vzorku, d – tloušťka vrstvy,

$\frac{d\sigma_e(\Delta E)}{d(\Delta E)}$ – účinný průřez na jednotku ztráty energie

Experimentální metody:

1. K měření jemné struktury absorpční hrany pro **metody EXAFS + XANES** se užívá synchrotronové záření (z důvodu dostatečné intenzity).



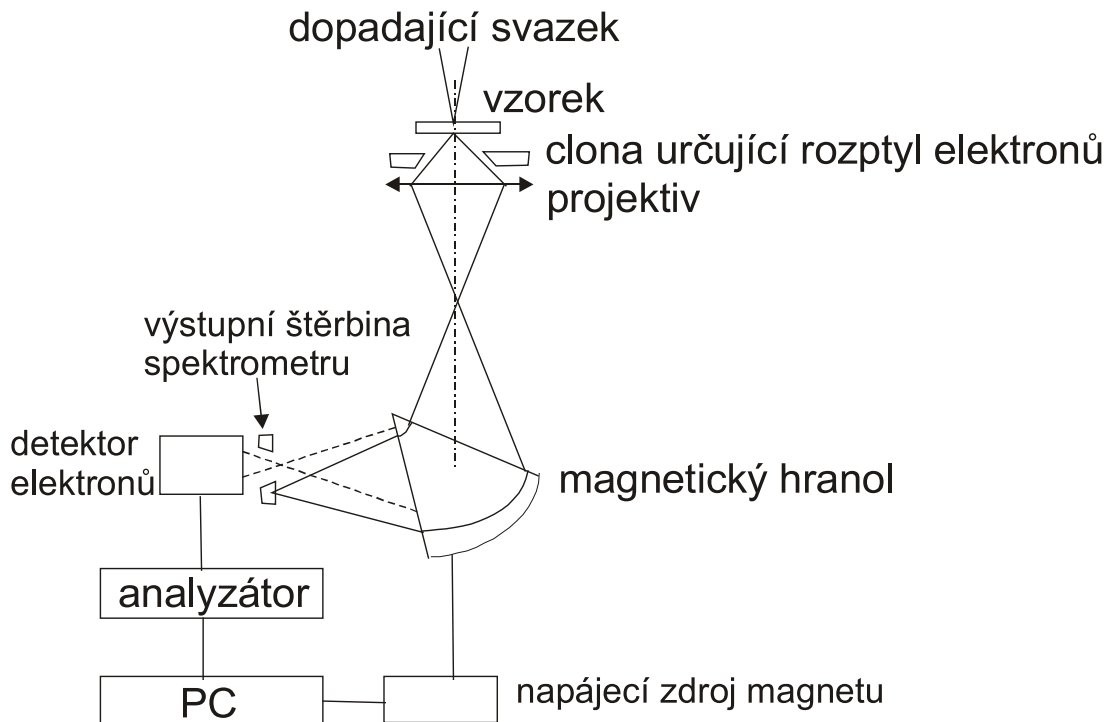
Spektrometr pro měření EXAFS + XANES v transmisním módu

- Synchrotronové záření z urychlovače je fokusováno toroidním zrcátkem d krystalového monochromátoru.
- Intenzita dopadajícího záření je měřena ionizační komůrkou 1, intenzita prošlého záření ionizační komůrkou 2.
- Energie je měněna otáčením krystalu monochromátoru vůči dopadajícímu svazku. Tloušťka vzorku musí být v celé ozářené ploše konstantní v celé ozářené ploše.

2. Jemná struktura absorpční hrany pro **metody EXELFS+ELNES**

se měří elektronovými spektrometry, nejčastěji spektrometrem s magnetickým hranolem nebo Wienovým filtrem.

Kromě speciálních aparatur pro studium energetických ztrát elektronů s ultravakuumem, energií elektronů $E_0 = 10^3$ až 10^5 eV, velikostí stopy 10 až 100 μm a spektrometrem s energetickým rozlišením $\delta E < 1$ eV je možné využít i **standardního elektronového mikroskopu**.



Obr. Schema elektronového spektrometru

V případě užití elektronového mikroskopu:

vakuum 10^{-5} Pa, energie elektronů $E_0 \approx 10^5$ eV, velikost stopy 10 až 100 nm (malá stopa umožňuje dosáhnout vysoké rozlišení), spektrometr s energetickým rozlišením $\delta E \approx 1$ až 5 eV.

Příklady použití

➤ Metody EXAFS + XANES. Určení konfigurace atomů (geometrické struktury) u amorfních látek.

Aplikace: struktura amorfních dielektrik, amorfních skel, supravodičů i složitých anorganických komplexů. určení struktury složitých biochemických komplexů (obsahujících těžké kovy).

Shrnutí a závěr:

- **EXAFS+EXELFS – studium vzdálené struktury**
- **XANES+ELNES – studium blízké struktury u absorpční hrany** (nejsou tak rozpracovány–problém s uvolněním elektronů s nízkou energií nad absorpční hranou)
- **EXAFS+XANES– rtg. metody nevyžadující vakuum kolem vzorku**
- **EXELFS+ELNES – elektronové metody vyžadující vysoké vakuum**