اهمیت، پیشرفت و چالش‌های میکروسکوپ الکترونی نمونه در فاز مایع

المیرا رفعت‌ماه[1*]

اطلاعات مقاله:

نشریه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال پنجم، شماره ۱، ۱۴۰۰
صفحات: ۲۷-۳۱
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir
تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳
نشر آنلاین: ۱۴۰۰/۰۹/۱۸

المیرا رفعت‌ماه

چکیده

دشواری تصویربرداری از مایعات از همان آغاز توسعه میکروسکوپ الکترونی قابل تشخیص بود. این در حالی است که تصویربرداری از نمونه در فاز مایع با میکروسکوپ الکترونی، می‌تواند بینش بی‌نظیری از سیستم‌های بیولوژیکی و فرآیندهای مهم در علم مواد ارائه دهد. مسئله مهم این است که چگونه یک مایع، به ویژه یک مایع با فشار بخار بالا مانند آب را از خلاء موجود در میکروسکوپ الکترونی جدا کنیم، در حالی که هنوز هم بتوان تصاویر قابل قبولی از نمونه بدست آورد. پیشرفت‌های صورت گرفته در این زمینه راهی منحصر به فرد برای مطالعه فرآیندها و ساختارها در فاز مایع ایجاد کرده است. میکروسکوپ الکترونی سل مایع، یک تکنیک در حال توسعه است که به ما امکان می دهد تا از قابلیت‌های قدرتمند میکروسکوپ الکترونی در تصویربرداری و تجزیه و تحلیل نمونه‌ها در فاز مایع استفاده کنیم. با این روش می توان فرآیندهای مبتنی بر مایع را در علم مواد، شیمی و فیزیک بررسی کرد در حالی که به طور سنتی برای میکروسکوپ الکترونی امکان‌پذیر نیست. همچنین امکان دریافت تصاویر با وضوح بالا از ساختارهای بیولوژیکی، بدون نیاز به انجماد یا خشک شدن را فراهم کرده است. دو روش کلی برای تصویربرداری در محیط مایع ایجاد شده است: روش اول این است که مایع درون یک سل بسته مبتنی بر غشاء محصور شود و در روش دوم، از یک سل باز استفاده می‌شود که مناسب برای مایعات با فشار بخار کم است.

واژگان کلیدی: الکترون برگشتی، الکترون ثانویه، میکروسکوپ الکترونی در فاز مایع، میکروسکوپ الکترونی محیطی، سل باز و بسته میکروسکوپی

نویسندگان:

۱*. دکتری شیمی تجزیه، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

ایمیل: e.rafatmah@yahoo.com
تلفن: ۰۷۱۳۶۱۳۷۱۴۴

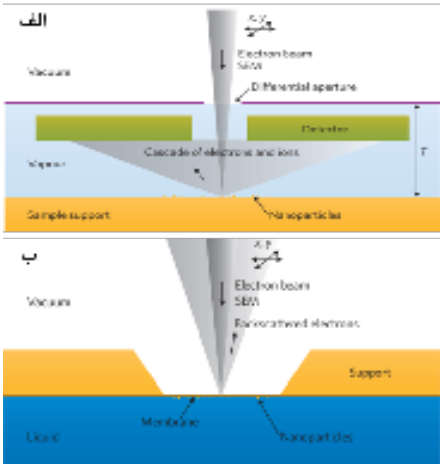
*. نویسنده مسئول

۱- مقدمه

میکروسکوپ الکترونی در فاز مایع یک روش تجزیه‌ای جدید است که در دهه گذشته جای خود را به سرعت در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف باز کرده است. بررسی فرآیندهای فاز مایع در طیف وسیعی از حوزه‌های علمی و فناوری از جمله فعالیت‌های بیولوژیکی در سلول‌ها، سنتز نانوذرات و واکنش‌های الکتروشیمیایی برای ذخیره انرژی حائز اهمیت است [۱]. به دلیل رزولوشن بالای قابل دسترسی در تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی، امکان بررسی نمونه‌ها در فاز مایع به کمک این میکروسکوپ‌ها اطلاعات منحصر به فردی درخصوص ساختارها و فرآیندهای موجود در مایعات در اختیار قرار می‌دهد [۲].

شرایط سخت ذاتی میکروسکوپ الکترونی مانند خلا درون محفظه نمونه و اثر تخریبی پرتو الکترون با ولتاژ و شتاب بالا باعث ایجاد محدودیت در نوع و فاز ترکیبات قابل بررسی می‌شود [۳]. به طور سنتی، برای بررسی با میکروسکوپ‌های الکترونی، نمونه‌های در فاز مایع باید منجمد یا خشک شوند. با تغییر فاز یا حذف حلال به طور معمول ماهیت آنالیت و پویایی آن تغییر می‌کند. این مساله به طور قابل توجهی بازده تصویربرداری را در بسیاری از بررسی‌ها کاهش می‌دهد. البته فشار کم درون محفظه میکروسکوپ الکترونی تنها محدودیت در مطالعه مایعات نیست. فعل و انفعالات بین مایع و پرتو الکترون اثرات قابل توجهی بر عملکرد تصویربرداری و همچنین شیمی محلول دارد [۳].

در میکروسکوپ‌های الکترونی محیطی، تا حدودی از این مشکلات کاسته شده است. در این تجهیزات از نمونه‌های با رطوب نسبی و یا نارسانا نیز می‌توان تصویربرداری انجام داد. شیوه کار این میکروسکوپ‌ها به این صورت است که گاز یا بخار آب به محفظه نمونه تزریق می‌شود. پرتوی الکترون با انرژی بالا به بخارآب نفوذ می‌کند و با عبور از آن به نمونه برخورد و با آن برهمکنش می‌کند. الکترون‌های ثانویه والکترون‌های برگشتی حاصل از نمونه به مولکول‌های آب برخورد می‌کنند و الکترون‌های ثانویه بیشتری تولید می‌شود. با تعامل الکترون‌ها با مولکول‌های آب، آن‌ها به یون‌های مثبت تبدیل می‌شوند. یون‌های مثبت ایجاد شده برروی مناطق دارای بار منفی روی نمونه قرار می‌گیرند و آن‌ها را تعدیل می‌کنند [٤]. در بررسی نمونه‌های در فاز مایع، راه‌حل کلی برای عبور از محدودیت‌های میکروسکوپ الکترونی، ایزوله کردن نمونه مایع از خلا دستگاه می‌باشد. دو روش برای ورود آب به میکروسکوپ الکترونی و در عین حال حفظ خلا کافی برای کارکرد منبع الکترون توسعه یافته است. روش «سل باز» که در آن، محفظه با فشار بخار بالا با پمپاژ دیفرانسیلی چند مرحله‌ای از طریق روزنه‌های کوچک از خلا زیاد میکروسکوپ و دتکتورها جدا می‌شوند (شکل ۱ (الف)). روش دوم را «سل بسته» نام‌گذاری کرده‌اند از آن جهت که از سل‌های مایع با پنجره‌های نازک اما قوی و شفاف نسبت به الکترون استفاده شده است (شکل ۱(ب)) [۵].



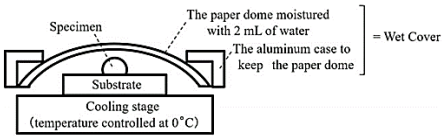
شکل ۱: تنظیمات میکروسکوپ الکترونی روبشی در زمان استفاده از نمونه مایع. (الف) شماتیک سل باز، (ب) شماتیک سل بسته [۱].

۲- روش سل باز در بررسی نمونه‌ها در فاز مایع

سیستمی است که در آن می توان نمونه‌های بیولوژیکی و مواد بدون پوشش را با یک پرتو الکترون در فضای فشار بالای محفظه نمونه بررسی کرد. نمونه‌ها را می‌توان بدون اثر تخریبی و روش‌های اضافی آماده‌سازی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. در محفظه نمونه به علت برهمکنش‌های مختلف الکترون و گاز، یون‌های مثبت ایجاد می‌شوند که در حضورشان امکان تصویربرداری از نمونه‌های عایق بدون پوشش رسانا به وجود می‌آید [٦].

در میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری، پرتوی الکترونی با انرژی ٦٠ تا ٣٠٠ کیلو الکترون ولت به نمونه به ضخامت کمتر از ۰/۵ میکرومتر تابانده می‌شود و سپس الکترون‌های عبور کرده بررسی می‌گردد. روش سل باز در این میکروسکوپ‌ها خیلی مناسب نیست زیرا کنترل بسیار کمی برروی ضخامت نمونه مایع وجود دارد [۱]. در تجهیزات میکروسکوپ الکترونی روبشی، برای روش سل باز رطوبت نسبی درون محفظه را می‌توان با تنظیم درجه حرارت استیج نمونه و فشار بخار کنترل کرد. به عنوان مثال، به کمک استیج‌های سرد کننده و با ترکیبی از دمای پایین و فشار بخار آب زیاد می‌توان رطوبت نسبی ۱۰۰٪ را بدست آورد , به این ترتیب از خروج رطوبت از نمونه در حین تصویربرداری جلوگیری می‌شود [۷].

با وجود این شرایط، در ابتدای ایجاد خلا نسبی در محفظه نمونه، مقداری از رطوبت نمونه خارج می‌شود. برای حل این مشکل در سال ۲۰۱۸، تکنیک «پوشش مرطوب» معرفی شد. در این روش، یک پوشش کاغذی مرطوب حاوی مقدار قابل توجهی آب در نزدیکی نمونه قرار می‌گیرد. با تبخیر آب از پوشش و به جای نمونه، میتوان از تغییر شکل ابتدایی آن جلوگیری کرد. پس از رسیدن به فشار بخار مورد نظر در محفظه این پوشش از روی نمونه برداشته می‌شود [۸].



شکل ۲: شماتیک پوشش مرطوب که شامل کاغذ حاوی آب و قاب نگهدارنده آن است [۸].

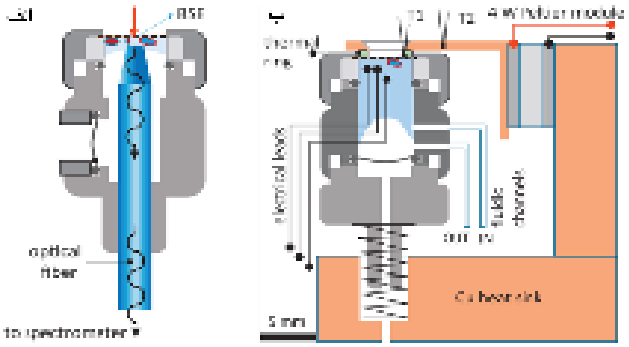
۲- روش سل بسته در بررسی نمونه‌ها در فاز مایع

با محصور کردن مایع بین دو پنجره شفاف نسبت به عبور الکترون، می‌توان محدودیت فشار حداکثری قابل استفاده در روش سل باز را دور زد. هنگامی که یک پرتوی الکترون با انرژی زیاد با سل حاوی نمونه برخورد می‌کند، بایستی از غشا و مایع نگهدارنده نمونه عبور کند. در طول این مسیر، انرژی پرتو الکترون پراکنده شده و جهت آن طی فرآیندهای الاستیک و غیر الاستیک تغییر می‌کند. در نتیجه این فرآیند، مجموعه‌ای از الکترون‌ها، یون‌ها، رادیکال‌ها و تهییج‌های الکترونیکی در یک حجم برهمکنش توزیع می‌شوند. برای کاهش پراکندگی و افزایش عبور پرتو الکترون توسط غشا، بایستی تا جای ممکن غشا نازک باشد و در ساخت آن از مواد با عدد اتمی کم استفاده شود [۹].

در ابتدا از غشاهای سیلیکونی (SiO_x ,SiN_2) در ساخت سل‌های بسته استفاده می‌شد. کمترین ضخامت قابل ساخت برای این جنس از غشا ۱۰ میکرومتر یا بالاتر است و غشاهای نازکتر در محفظه دستگاه دچار جمع‌شدگی مکانیکی می‌شوند. دسته دوم غشاهای بکار رفته از جنس گرافن یا گرافن‌اکساید است. مقاومت در برابر شکستگی بسیار زیاد آن‌ها باعث می‌شود که پنجره‌های گرافنی شفاف نسبت به الکترون با ضخامتی در ابعاد اتمی ساخته شوند. برای الکترون‌های ثانویه با انرژی کم، این غشاها می توانند تقریباً به طور کامل شفاف عمل کنند[۱۰ و ۱].

سل‌های بسته میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی از دو قسمت تشکیل شده است: یک محفظه نمونه با غشای شفاف الکترونی و یک پایه نگهدارنده. محفظه نمونه را می توان با ۱۵ میکرو لیتر مایع پر کرد. کمپانی QuantnomiX سل‌های بسته با طراحی های مختلفی برای تصویربرداری از مواد مرطوب و نمونه‌های بیولوژیکی مختلف، مانند نمونه‌های مایع (غذاها، مواد آرایشی، روغن، رنگ و غیره)، ذرات موجود در محلول‌ها، سلول‌های انسانی و حیوانی و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌کند. به کمک این سل‌های استریل و یکبارمصرف می‌توان نمونه‌ها را بصورت مستقیم یا با پیروی از روش‌های مناسب رنگ‌آمیزی برای افزایش کنتراست، در میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد.

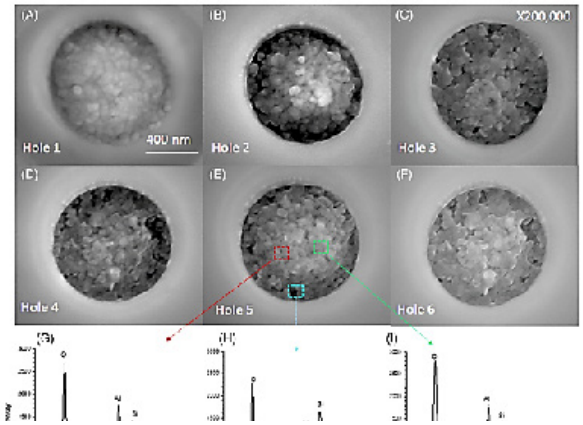
تاکنون مدل‌های مختلف از طراحی بدنه سل پیشنهاد شده است. به عنوان مثال در یکی از این طراحی‌ها، فیبر نوری، برای ادغام میکروسکوپی و تصویربرداری کاتدولومینسانس از نمونه‌های هیدراته، در سل جای گذاری شده است (شکل ۳) [۱۱]. سل‌های بسته تجاری میکروسکوپی عمدتا توسط جامعه تحقیقات پزشکی استفاده می شود و کمتر گزارشی از کاربرد آن‌ها برای تحقیقات مواد وجود دارد. این تا حدودی به دلیل توانایی محدود این سل‌ها در تغییر دما یا محیط شیمیایی و الکتریکی (الکتروشیمیایی) نمونه است. توسعه چنین توانایی‌هایی در سل‌ها باعث افزایش کاربرد میکروسکوپی در فاز مایع برای کاربردهای علوم مواد می شود. در سال ۲۰۱۵، این امکانات توسط افزودن سیم پیچ‌های الکتریکی و لوله‌های انتقال گاز یا مایعات به بخش مرکزی سل اضافه شد (شکل ۳) [۱۲].



شکل۳: (الف) میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نوری همزمان در سل مایع از طریق ورود فیبر نوری، (ب) سل بسته میکروسکوپی تجاری با قابلیت گرمایش/ سرمایش، کنترل الکتریکی و ورود سیالات [۹].

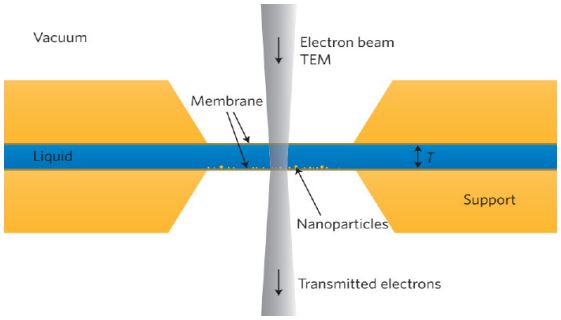
غشاهای گرافنی به دلیل قابلیت انتقال الکترون فوق‌العاده بالای الکترون در محدوده وسیعی از انرژی، نفوذناپذیری مولکولی، رسانایی الکتریکی بالا و سختی مکانیکی عالی، تقریباً یک غشا ایده‌آل برای میکروسکوپ الکترونی در محدوده نانو و میکرو است. برای ساخت سل با غشای گرافنی، یک صفحه فلزی یا غشا سیلیکونی توسط لیزر یا پرتو یون متمرکز سوراخ می‌شود و سپس این منفذ توسط یک یا چند لایه گرافنی پوشش داده می شود. از این لایه به عنوان غشا شفاف نسبت به الکترون در ساخت سل های بسته بکار گرفته می شود [۱۳].

به طور کلی، از سل‌های مایع کاملا محصور برای ورود نمونه مایع به میکروسکوپ الکترونی استفاده شده است. محققان در سال ۲۰۱۹، موفق به ابداع تکنیک میکروسیال سازگار با خلا شدند. در این سیستم می‌توان بدون حضور غشا و در مرز سیال-خلا، سطح مایع را به طور مستقیم به کمک پرتو الکترونی مورد کاوش و آنالیز قرار داد. بنابراین تصویربرداری الکترونی ثانویه، تصویربرداری الکترون‌های برگشتی و تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی اشعه ایکس به خوبی با این روش انجام‌پذیر هست (شکل٤). برای ساخت این نوع سل، به کمک لیتوگرافی، کانالی به عمق ۳۰۰ میکرومتر و عرض ۲۰۰ میکرومتر ساخته و سپس برروی آن غشای سیلیکونی با ۲۱ حفره به قطر ۱ میکرومتر ایجاد شده است. قطر کم این حفره‌ها مانع از تبخیر آب تحت خلا بالای دستگاه می‌شود [١٤].



شکل ٤: تصاویر الکترون ثانویه و نتایج طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس گرفته شده به کمک تکنیک میکروسیال سازگار با خلا، در بزرگنمایی ۲۰۰ هزار برابر از ذرات بوهمیت در آب [١٤].

در میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری اکثر سل‌های بسته بکارگرفته از جنس سیلیکون نیترید می‌باشد (شکل ٥). شیوه ساخت آن‌ها به این صورت است که فیلم نازکی از سیلیکون نیترید برروی ویفر سیلیکونی نشانده می شود و سپس سیلیکون از پشت اچ می‌شود تا پنجره‌ای با قطر حدود ۱۰۰ میکرومتر ایجاد شود. دو تراشه به این صورت آماده و به کمک لایه جدا کننده روبه روی هم متصل می‌شوند. به این ترتیب لایه‌ای بسیار نازک و با دیواره‌ای از جنس سیلیکون نیترید برای نگهداری نمونه ایجاد می‌گردد [١٥].



شکل ٥: تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات در مایع کاملاً محصور بین پنجره‌های شفاف الکترون [١٤].

٣-نتیجه گیری

دشواری تصویربرداری مایعات از ابتدای توسعه میکروسکوپ الکترونی مورد توجه قرار گرفته است. کاربرد گسترده میکروسکوپ الکترونی در فاز مایع باعث ایجاد موجی از علاقه به ایجاد روش‌هایی جدید برای حل این مشکل شده است. قابلیت تصویربرداری از مایعات امکاناتی جالب را برای حل چالش‌های بزرگ در علوم مواد، زمین‌شناسی، زیست‌شناسی، فیزیک مایعات و بسیاری از زمینه‌های دیگر فراهم می‌کند. دو روش کلی برای تصویربرداری مایعات در میکروسکوپ الکترونی روبشی ایجاد شده است، روش سل بسته و سل باز. عدم وجود غشا در تکنیک آنالیز با سل باز می‌تواند وضوح تصویربرداری را بهبود بخشد. از طرف دیگر، با توسعه سل‌های بسته مایع، تصویربرداری مایعات در میکروسکوپ الکترونی به روشی معمول تبدیل شده است و این زمینه تا جایی پیشرفت کرده است که می‌توان اطلاعات کمّی را نیز از نمونه‌های درون مایع به دست آورد.

٤- منابع

[1]. N. De Jonge and F. M. Ross, Nat. Nanotechnol. 6, 695 (2011).

[2]. H. Wu, H. Friedrich, J. P. Patterson, N. A. J. M. Sommerdijk, and N. de Jonge, Adv. Mater. 32, 25 (2020).

[3]. A. S. Kashin and V. P. Ananikov, Nat. Rev. Chem. 3, 624 (2019).

[4]. A. Ul-Hamid, A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy, Springer Nature Switzerland AG (2018).

[5]. N. de Jonge and F. M. Ross, Past, Present, and Future Electron Microscopy of Liquid Specimens 3 (2016).

[6]. A. Bogner, G. Thollet, D. Basset, P. H. Jouneau, and C. Gauthier, Ultramicroscopy 104, 290 (2005).

[7]. V. Neděla, J. Microsc. 237, 7 (2010).

[8].. N. Inoue, Y. Takashima, M. Suga, T. Suzuki, Y. Nemoto, and O. Takai, Microscopy 67, 356 (2018).

[9]. A. Kolmakov, Membrane-Based Environmental Cells for SEM in Liquids 78 (2016).

[10]. H. G. Liao and H. Zheng, Annu. Rev. Phys. Chem. 67, 719 (2016).

[11]. S. Thiberge, A. Nechushtan, D. Sprinzak, O. Gileadi, V. Behar, O. Zik, Y. Chowers, S. Michaeli, J. Schlessinger, and E. Moses, Am. J. Med. Sci. 260, 78 (2004).

[12]. A. S. Al-Asadi, J. Zhang, J. Li, R. A. Potyrailo, and A. Kolmakov, Microsc. Microanal. 21, 765 (2015).

[13]. J. D. Stoll and A. Kolmakov, Nanotechnology 23, 50 (2012).

[14]. X. Y. Yu, B. Arey, S. Chatterjee, and J. Chun, Surf. Interface Anal. 51, 1325 (2019).

[15]. F. M. Ross, Science 18, 350 (2015).

University of Maragheh

Journal of New Approaches in Iranian Scientific Laboratories

ILRS
Iranian Laboratory Research Society

Importance, Advances and Challenges of Electron Microscopy in the Liquid Phase

Elmira Rafatmah[1*]

Article Info:

NAISL
Volume 5, Number 1, 2021
Pages: 27-31
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir
Date Received: 2021/05/04
Acceptance date: 2021/09/04
Online publishing: 2021/12/09

Elmira Rafatmah

Abstract

The difficulty in liquid sample imaging in electron microscopy has been recognized from the beginning. The ability to analyze the liquid phase by electron microscopy gives an exciting vision of biological systems and materials science processes. The main challenge is getting acceptable images from the liquid samples with high vapor pressure. It can be possible by the separation of them from the vacuum of the electron microscope. Today, advances in this field have created a unique way to study processes and structures in the liquid phase. Liquid cell electron microscopy is an evolving technique that allows us to use the powerful capabilities of electron microscopy in imaging and analyzing liquid samples. With this method, liquid-based processes can be studied in materials science, chemistry, and physics, while traditionally, it is not possible for electron microscopy. It also provides high-resolution images of biological structures without the need for freezing or drying. Two general methods have been developed for liquid imaging: the first method is to enclose the liquid inside a closed-cell, and the second method uses an open cell that is suitable for liquid samples with low vapor pressure.

Key Words: **Back-scattered electrons, Secondary electrons, Liquid-phase electron microscopy, Enviromental electron microscopy, Open and closed cells of microscopy.**

Authors:
1*. Ph.D of Analytical Chemistry, Shiraz University, Shiraz, Iran.
E-mail: e.rafatmah@yahoo.com
Tel: 07136137144

*.Corresponding author