



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## RADIAČNÍ POŠKOZENÍ VZORKŮ V NÍZKOVOLTOVÉ TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPII

RADIATION DAMAGE OF SAMPLES IN LOW-VOLTAGE TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Václav Vykydal

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

BRNO 2019

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Student:** Bc. Václav Vykydal

**ID:** 174539

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2018/19

## NÁZEV TÉMATU:

### **Radiační poškození vzorků v nízkovoltové transmisní elektronové mikroskopii**

#### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s principem nízkovoltových transmisních elektronových mikroskopů (5-25 kV). 2) U nízkovoltových transmisních elektronových mikroskopů prostudujte a popište vliv radiačního poškození vzorku, který je ozařován primárním svazkem elektronů. 3) Popište postup přípravy vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii a popište k jakému radiačnímu poškození vzorků dochází v různých materiálech podle složení vzorku, tloušťky vzorku a v závislosti na době působení primárního elektronového svazku. 4) Připravte několik typů vzorků, u kterých bude sledována degradace materiálu při ozáření primárním svazkem elektronů. 5) U vybraných typů vzorků zjistěte degradaci materiálu při ozařování primárním svazkem elektronů. Degradaci zjistěte pomocí vhodných metod analýzy obrazů a popište. Výsledky diskutujte a srovnajte s dalšími možnými postupy ke zjištění degradace vzorků. 6) Zjistěte vhodné podmínky pro sledování a přípravu vybraných typů vzorků pro nízkovoltovou transmisní elektronovou mikroskopii a proveďte diskuzi zjištěných doporučení.

#### DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] KARLIK M., Úvod do transmisní elektronové mikroskopie. Praha ČVUT, 2011. ISBN 978-80-01-04729-3.  
[2] NIXON, M. a A. AGUADO. Feature Extraction and Image Processing, Elsevier, 2005.

**Termín zadání:** 4.2.2019

**Termín odevzdání:** 17.5.2019

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

**Konzultant:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**  
*předseda oborové rady*

#### UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Práce je zaměřena na vliv radiačního poškození vzorků v nízko napěťové transmisní elektronové mikroskopii. V práci se nachází obecný popis transmisních elektronových mikroskopů a jejich důležitých částí. Je zde popsán způsob poškození vzorků ozářených primárním svazkem elektronů, jak se připravují vzorky pro elektronovou mikroskopii a k jaké degradaci vzorků dochází z hlediska materiálu vzorku a časovému zatížení primárním elektronovým svazkem.

## **Klíčová slova**

Nízkonapěťová transmisní elektronová mikroskopie,

Radiační poškození vzorků,

Primární elektronový svazek,

Příprava vzorků pro TEM

## **Abstract**

This thesis is focused on Radiation damage of samples in low-voltage transmission electron microscopy. In thesis is general description of transmission electron microscopy and their important parts. There is described how samples are damaged by primary electron beam and how samples for transmission electron microscopy are prepared and which degradation occurs from the point of view materials of sample and time dose of electrons from primary electron beam.

## **Keywords**

Low-voltage transmission electron Microscopy,

Radiation damage of samples,

Primary electron beam,

Sample preparation for TEM

## **Bibliografická citace:**

VYKYDAL, Václav. *Radiační poškození vzorků v nízkovoltové transmisní elektronové mikroskopii* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/118354>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Radim Kolář.

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma Radiační poškození vzorků v nízkovoltové transmisní elektronové mikroskopii jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne **16. května 2019**

.....

podpis autora

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Radimovi Kolářovi, Ph.D. a odborné konzultantce Mgr. Evě Coufalové Ph.D. a také dalším kolegům z firmy Delong Instruments a.s. za skvělou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Zároveň bych chtěl poděkovat vedení Delong Instruments a.s. za poskytnutí zázemí, přístrojů a informací potřebných k vytvoření mé diplomové práce.

V Brně dne **16. května 2019**

.....

podpis autora

# Obsah

Úvod .....	1
1 Transmisní elektronové mikroskopy.....	2
1.1 Princip nízkonapětových TEM .....	2
1.2 Vakuové pumpy.....	3
1.2.1 Turbomolekulární a membránová vývěva.....	4
1.2.2 Iontové vývěvy.....	4
1.3 Elektronové trysky.....	5
1.4 Elektromagnetické, magnetostatické a elektrostatické čočky .....	6
1.4.1 Zobrazovací vady .....	6
1.4.2 Clony kondenzoru a objektivu .....	8
1.5 Detekce elektronů .....	8
2 Vliv radiačního poškození vzorku.....	9
2.1 Parametry elektronů .....	9
2.2 Interakce primárního svazku elektronů se vzorkem.....	10
2.3 Poškození vzorku v nízkonapětových elektronových mikroskopech .....	12
3 Příprava vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii.....	13
3.1 Řezání plátků.....	13
3.1.1 Řezání ultramikrotomem.....	14
3.2 Nanesení vzorku na uhlíkový film.....	15
3.3 Radiační poškození vzorku v závislosti na jeho vlastnostech .....	15
4 Praktická příprava vzorků .....	18
4.1 Pracovní postup .....	18
4.1.1 Příprava uhlíkového filmu.....	19
4.1.2 Nanesení uhlíkového filmu na síťky .....	21

4.1.3	Nanesení vzorku na uhlíkový film – síťku.....	22
5	Analýza degradace vzorků .....	24
5.1	Měření vlastností LVEM25 a katod High current FEG a Standart FEG.....	24
5.1.1	Měření katody High current FEG .....	25
5.1.2	Měření katody Standart FEG.....	30
5.2	Měření v režimu TEM.....	32
5.2.1	Měření a analýza degradace syntetické pryskyřice.....	33
5.2.2	Výsledky analýzy degradace syntetické pryskyřice .....	40
5.2.3	Měření a analýza degradace uhlíkového filmu .....	43
5.2.4	Výsledky měření degradace uhlíkového filmu .....	46
5.2.5	Měření degradace vzorku Cilium – řasinkový epitel.....	47
5.2.6	Shrnutí výsledků v režimu TEM .....	54
5.3	Měření v režimu difrakce.....	55
5.3.1	Měření a výsledky degradace polyethylenu .....	57
5.4	Další možné způsoby sledování degradace vzorků.....	59
6	Podmínky přípravy a sledování vzorků .....	61
6.1	Podmínky přípravy vzorků .....	61
6.2	Podmínky pozorování vzorků.....	62
6.3	Diskuze provedených měření .....	63
6.4	Diskuze přípravy a sledování vzorků.....	64
7	Závěr .....	65
	Literatura .....	66
	Seznam symbolů, veličin a zkratek.....	69



# ÚVOD

V této práci je popsán základní princip transmisních (prozařovacích) elektronových mikroskopů s podrobnějším zaměřením na nízkonapěťovou elektronovou mikroskopii od firmy Delong Instruments a.s., která vyrábí modely LVEM5 s urychlovacím napětím 5 kV a LVEM25 s urychlovacím napětím 25 kV. U obou modelů jsou obecně popsány jednotlivé prvky, jako jsou pumpy na čerpání vhodného pracovního tlaku, zdroje elektronů, čočky využívané v elektronové mikroskopii, zobrazovací vady a taktéž způsob detekce signálu v elektronovém mikroskopu.

Dále je v diplomové práci popsána interakce primárního svazku elektronů se vzorkem. Je zde uvedeno, co je to pružný a nepružný rozptyl a jaké signály z těchto interakcí vznikají. Práce se zabývá způsoby přípravy vzorků, a také vlivem radiačního a celkového poškození vzorků v transmisní elektronové mikroskopii. Pro účely zjištění degradace vzorků byly sítě z zlata pokryty uhlíkovým filmem metodou přímého napařování a také byl zhotoven vzorek polyethylenu (PE). Další zkoumané vzorky, připravené pomocí řezání na ultramikrotomu, byly dodány již nachystané k mikroskopování, jelikož jejich příprava vyžaduje určitou praxi a zručnost.

V další části jsou zhotoveny měření na modelu LVEM25 pro zjištění vlastností dvou katod High current FEG a Standart FEG, které jsou podstatné pro následující měření degradace vzorků pod vlivem primárního elektronového svazku. Měření a vytvoření snímků, využitých ke zpracování pomocí analýzy obrazů, jsou navrženy tak, aby vzorek dostával velkou proudovou hustotu elektronů, tak aby k radiačnímu poškození docházelo a dostatečně se projevovalo i na změně jasu obrazu neboli docházelo ke ztenčování vzorku v místě ozáření.

Provedlo se několik měření na modelu LVEM25 v režimu transmisní elektronové mikroskopie, kde byl vzorek vystavován elektronům primárního svazku. Zkoumány byly vzorky syntetické pryskyřice, uhlíkového filmu, řasinkového epitelu a polyethylenu, který byl jako jediný sledován v režimu difrakce. Z těchto měření se vybrala ta nejvhodnější a ta jsou zde zpracována pomocí analýzy obrazů a je vypočtena celková konečná dávka elektronů, kterou vzorky obdržely.

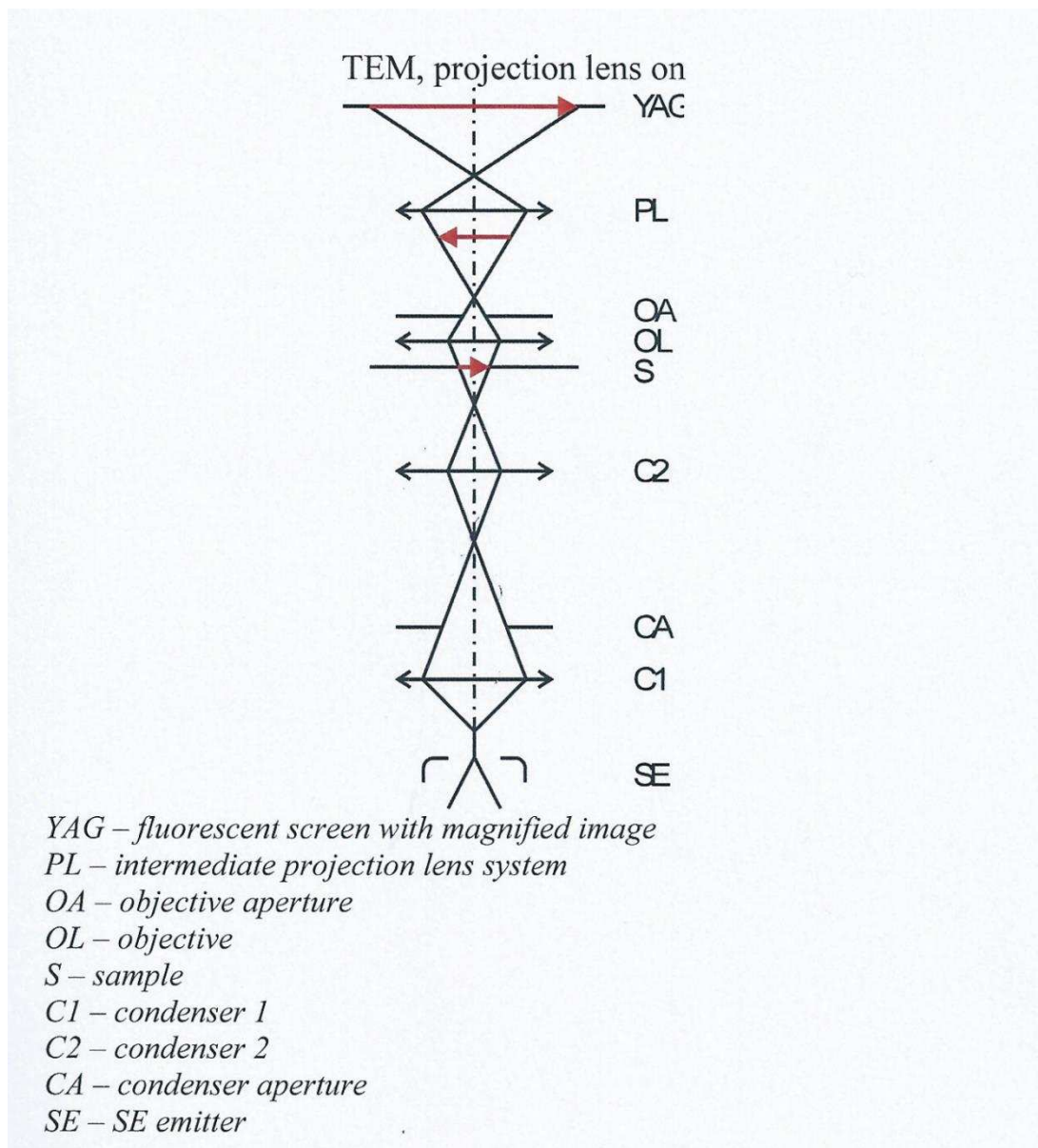
V další části je provedeno doporučení, jak vzorky připravovat a jak je v nízkonapěťové elektronové mikroskopii pozorovat. Dále je provedena diskuze měření, analýzy obrazů a také diskuze navržených vhodných doporučení.

# 1 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPY

Transmisní elektronový mikroskop (zkráceně TEM) je principiálně obdoba světelného optického mikroskopu, který využívá viditelné světlo. V TEMu se ovšem místo viditelného světla využívá paprsek (svazek) elektronů, které mají menší vlnovou délku a tím pádem, lze dosáhnout lepší rozlišovací schopnosti než u „klasických“ světelných mikroskopů. V praxi se setkáváme s mikroskopy s rozlišovací mezí v jednotkách desetin nanometrů. Čím větší je „budící“ napětí, urychlující elektronový svazek, tím je i menší vlnová délka elektronů. Většinou se urychlovací napětí pohybuje okolo 100 až 200 kV, ale v této práci se bude pracovat s transmisními elektronovými mikroskopy nízkého napětí (low voltage), které mají urychlovací napětí 5 nebo 25 kV. Firma Delong Instruments vyrábí 2 modely nízkonapětových TEM a to LVEM5 (Low Voltage Electron Microscope 5 – napětí 5 kV) a LVEM25 (Low Voltage Electron Microscope 25 – napětí 25 kV). Tyto mikroskopy mají využití v biologii, medicíně a materiálovém inženýrství (nanotechnologiích). Použitím nízkého napětí dosahují skvělého kontrastu, jelikož dochází ke zvýšení rozptylu elektronů na vzorku. Další jejich výhodou je, že dochází k menšímu radiačnímu poškození vzorků, jelikož mají elektrony mnohem menší energii, než je standardně využívaná. [1][3][4][5][25]

## 1.1 Princip nízkonapětových TEM

Na katodu je přivedeno vysoké napětí (5 kV nebo 25 kV). Tryska se kromě žhavené termoemisní katody skládá z extraktoru a supresoru. Tryska se u LVEM5 i LVEM25 nachází ve spodní části mikroskopu a elektrony tím pádem emitují vzhůru. Než dopadnou na vzorek jsou nejdříve usměrněny kondezorovou čočkou, která je v případě LVEM5 magnetostatická a v případě LVEM25 elektrostatická i magnetická. Následně dochází k interakci se vzorkem a prošlé elektrony směřují objektivem ke stínítku. Aby se vykompenzovaly zobrazovací vady jsou elektrony ovlivňovány okupóly. Mikroskop se kromě elektronové optiky skládá i ze světelné optiky, ta začíná stínítkem (YAG – Yttrium Aluminum Garnet), kde se dopadající elektrony konvertují na fotony. Schéma elektronové optiky od katody až po YAG stínítko se nachází na Obr. 1. Za stínítkem následuje světelný objektiv a CMOS kamera, která obraz snímá a v digitální podobě se zobrazí v PC. Dalšími důležitými prvky celého mikroskopu jsou samozřejmě řídicí elektronika, PC a PC software, citlivý manipulátor vzorku, který s držákem vzorku pohybuje v řádech desítek nm, a nedílnou součástí jsou vakuové pumpy, které zajišťují vhodné prostředí v tubusu mikroskopu a v části kde se vsunuje držák vzorku. [2][3][5][25]



Obr. 1 Náčrt schématu transmisního elektronového mikroskopu LVEM převzato z [5]

## 1.2 Vakuové pumpy

Jelikož při kolizi elektronového svazku a plynných částic dochází k vychylování (rozptylování) elektronů, je zapotřebí mít v tubusu elektronového mikroskopu co nejnižší tlak (tlak blízký vakuu). Z toho důvodu všechny elektronové mikroskopy pracují ve vakuu, které v tubusu dosahuje hodnot  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  Pa. Rozptyl elektronů ovšem není jediný důvod, dalším důvodem je kontaminace vzorku, který vkládáme do dráhy elektronového svazku. Vzorek je do tubusu vkládán přes vakuovou propust. [1][2][3][25]

Vakua se dosahuje pomocí vývěv. Tlak v zařízení se dělí na několik úrovní – nízké, vysoké, ultravysoké atd. viz *Tab. 1*. Ve firmě Delong Instruments se využívají pouze turbomolekulární, membránové a iontové getrovací vývěvy, proto v následujícím textu budou popsány pouze tyto druhy vývěv, avšak v jiných elektronových mikroskopech se kromě zmíněných můžeme setkat i s rotační vývěvou (olejovou či spirálovou) nebo difúzní vývěvou. [1][25]

**Tab. 1 Úrovně vakua v Pa převzato z [1]**

Úroveň vakua	Tlak [Pa]
hrubé	100-0,1
nízké	0,1-10 <sup>-4</sup>
vysoké (HV)	10 <sup>-4</sup> -10 <sup>-7</sup>
ultravysoké (UHV)	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-10</sup>
extravysoké (XHV)	<10 <sup>-10</sup>

### 1.2.1 Turbomolekulární a membránová vývěva

Pro dosažení nižšího tlaku se využívá turbomolekulární pumpy HiCube 80 Eco od firmy Pfeiffer vakuum. Elektromotor turbíny dosahuje maximálních otáček frekvence 1500 Hz (90 tisíc otáček za minutu). Dochází k pohybu šikmých lopatek (statorů a rotorů), které odčerpávají vzduch z prostředí mikroskopu. Skrz statorovou šterbinu prochází molekuly plynu a dopadají na rotor, kde získávají rychlost ve směru pohybu stěny rotoru. Statorové a rotorové lopatky jsou k sobě velmi blízko a střídavě uspořádané proti sobě s úhlem 15-40°, což zajišťuje neustálé proudění většiny molekul směrem k výstupnímu otvoru. Sériově za výstupním otvorem se nachází membránová vývěva, která pomocí otáček pohybuje s membránou a díky systému ventilů proudí molekuly plynu z turbomolekulární pumpy přes membránovou ven. Výhodou těchto pump je, že nezpůsobují žádné znečištění čerpaného prostředí. Navíc jsou schopny čerpat již atmosférický tlak a s postupným zvyšováním otáček jsou schopny dosáhnout vysokého vakua (10<sup>-5</sup> Pa). Ke stanici pumpy HiCube 80 Eco – lze připojit vakuovou měrku, s kterou se měří hodnota vakua ve vakuové propusti (předvakuum), přes kterou se do mikroskopu vkládá vzorek. [1][5][8]

### 1.2.2 Iontové vývěvy

Zatímco všechny ostatní vývěvy fungují jako turbíny a na jedné straně vzduch nasávají a na druhé vyfukují, iontové pumpy pracují na principu ionizace a adsorpce. Uvnitř iontových pump (zkráceně IP) se nachází proti sobě titanové elektrody (katody) a válec anody, mezi nimi je napětí 5 kV. Mezi titanovými elektrodami se

nachází molekuly plynů, které jsou proudícími elektrony ionizovány a získávají tak kladný náboj a následně dopadají na katody, kde odprašují atomy titanu na válec anody. Tyto atomy titanu slouží k zachytávání neutrálních molekul plynů, které se uvnitř IP nachází. K zachytávání dochází pomocí adsorpce či chemisorpce. Celá IP se nachází v magnetickém poli, které prodlužuje dráhu elektronů (od katody k anodě) a ty podstoupí více srážek s molekulami plynu, což zvyšuje účinnost ionizace. Iontové pumpy slouží zároveň i jako měrka úrovně vakua, protože čím menší proud iontů mezi elektrodami proudí, tím je vakuum lepší. V ideálním případě by vakuum bylo úplně „čisté“ a neobsahovalo by žádné molekuly, a proto by IP nemohly fungovat, jelikož by mezi elektrodami byl nulový proud. Iontové pumpy jsou schopné pracovat pouze za nižšího tlaku, proto je nutné prostor uvnitř IP nejdříve předčerpát jinou vývěvou a až od vakua  $10^{-3}$  Pa jsou IP schopny se „chytit“ (pracovat samy bez pomoci jiných vývěv). Jelikož velikost iontových pump je velice malá, dají se použít v blízkosti důležitých míst mikroskopu, jako je komora vzorku a v blízkosti elektronové trysky, kde je zapotřebí dosahovat, co nejlepších hodnot tlaků. V místě vzorku čerpá okolí jedna IP a je zde dosaženo tlaku pod  $10^{-6}$  Pa a v okolí elektronové trysky jsou dvě IP, a tudíž zde vakuum dosahuje hodnoty tlaku pod  $10^{-7}$  Pa. [1][3][7]

## 1.3 Elektronové trysky

### Autoemisní elektronové trysky

Tento druh trysek má katodu, která je zhotovena z monokrystalu wolframu, určité krystalové orientace, a má velice malý hrot (50 až 100 nm), z kterého je emitován tenký svazek elektronů. V blízkosti hrotu katody je vysoká intenzita elektrického pole ( $10^9$  V/m). K emisi elektronů se využívá tunelového jevu a katoda pracuje při pokojové teplotě. Autoemisní trysky mají vysokou směrovou proudovou hustotu, ovšem vyžadují čerpaní v okolí trysky na vysoké ultravakuum ( $<10^{-8}$  Pa), což je velmi nákladné.

Více stabilní jsou **termoemisní trysky** (trysky s tepelně stimulovanou autoemisí), které pracují při mnohem vyšší teplotě a to přibližně 1800 K, tak vysoká teplota pozitivně působí na udržení čistoty hrotu. Kromě tunelového efektu se zde využívá i Schottkyho efektu (emise), který snižuje potřebnou výstupní práci, k tomu slouží pokrytí hrotu katody ZrO (oxid zirkoničitý). Díky Schottkyho efektu se výstupní práce sníží na 2,4 eV a vzniká značný termoemisní proud. Sice nedosahuje tak dobré hodnoty směrové proudové hustoty jako autoemisní tryska, ale zase jsou emise a proud svazku daleko stabilnější. Jejich další výhodou je, že nepotřebují tak nízký tlak, jako autoemisní katody. Termoemisní trysky mají nízkou energetickou disperzi

elektronů, což znamená, že mají daleko více koherentní svazek, a to v čase i v prostoru a tím pádem nedochází k chromatické zobrazovací vadě viz dále v textu. Tento typ wolframové katody pokryté zirkoniem (SE Cathode ZrO/W) se používá v LVEM5 i LVEM25. [1][3][22][24]

## 1.4 Elektromagnetické, magnetostatické a elektrostatické čočky

Zatímco ve světelné optice se k zobrazování využívají materiály s různými indexy lomu, v elektronové mikroskopii lze využít pouze čočky elektromagnetické, magnetostatické a elektrostatické, které fokusují svazek elektronů. Magnetické čočky obsahují krátkou kruhovou cívku z měděného drátu a pólové nástavce z magneticky měkkého železa. Elektronový svazek, který prochází čočkou je fokusován silným, nehomogenním rotačně symetrickým magnetickým polem  $B$ , které se nachází mezi pólovými nástavci. Kromě lomu dráhy elektronu dochází také k rotaci kolem optické osy čočky. Fakt, že výsledný obraz je nejen převrácený, ale i pootočený, je potřeba brát na vědomí. Magnetostatické čočky mají menší zobrazovací vady, ale zase mají konstantní (neměnné) vlastnosti, proto se často používají čočky elektrostatické, kde je možné měnit pracovní napětí a tím měnit ohniskovou vzdálenost čočky, čímž lze ovlivňovat svazek elektronů. V LVEM jsou používány malé elektrostatické a magnetostatické čočky, které nepotřebují chlazení. LVEM obsahuje i stigmátory a deflektory. Stigmátory se používají k odstranění astigmatismu, k tomu slouží několik oktupólů a deflektory slouží k centrování svazku. [1][2][3][5]

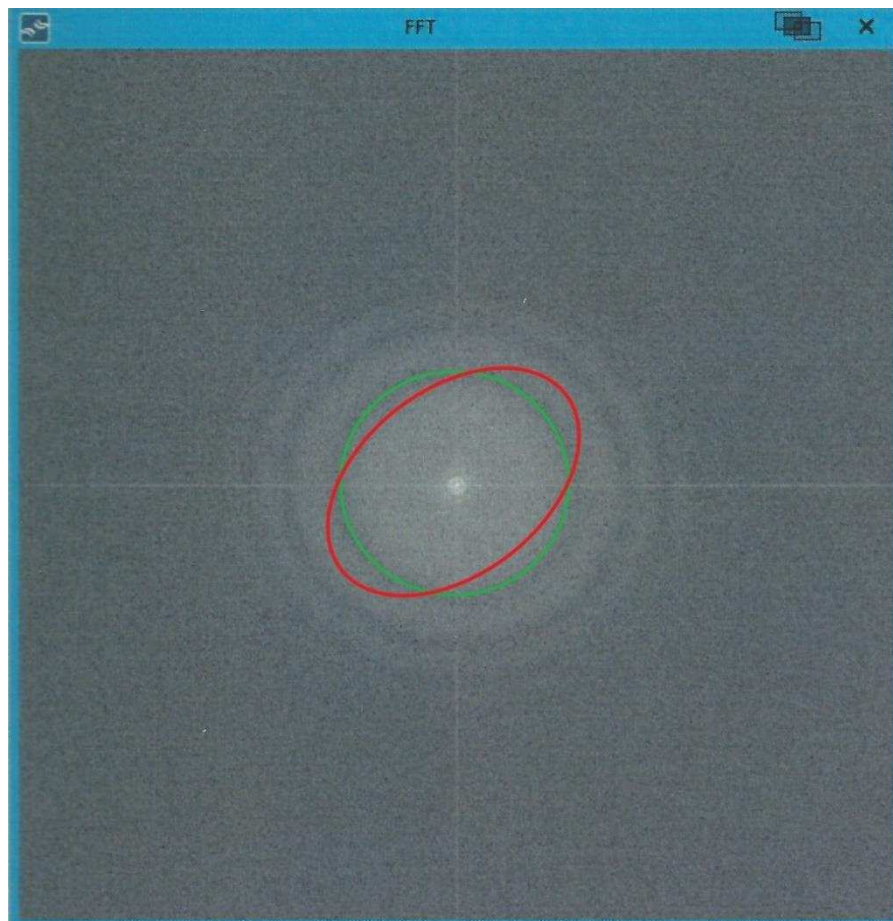
### 1.4.1 Zobrazovací vady

**Sférická vada** – vzniká tím, že elektrony na okraji svazku jsou vychylovány více k optické ose než elektrony procházející středem čočky, což způsobuje různá ohniska drah elektronů. Tato vada se podílí na rozlišovací schopnosti transmisních elektronových mikroskopů.

**Chromatická vada** – Souvisí s různou rychlostí elektronů ve svazku. Rychlejší elektrony jsou čočkou ovlivňovány (ohýbány) méně a dochází ke změně ohniskové vzdálenosti. Dnešní zdroje elektronů jsou velmi stabilní, avšak při velkých zvětšeních a v případě větší tloušťky vzorku dochází k velkému rozptylu elektronů a chromatická vada se značně projeví. Ve světelném mikroskopu se tato vada dá korigovat sériově zařazenou rozptylkou těsně za spojkou, ovšem v případě elektronových mikroskopů jsme schopni zhotovit pouze spojky nikoli rozptylky.

Korigovat tuto vadu elektronových mikroskopů lze energiovým filtrem viz zdroj [6] nebo [10], avšak to je velice nákladné a v LVEM se nepoužívá.

**Osový astigmatismus** – Ohnisková vzdálenost je různá pro dva svazky, které se šíří ve dvou navzájem kolmých rovinách (svazky nejsou symetrické kolem optické osy). Ke korekci rozdílu v ohniskových rovinách se používá stigmátor kondezoru a stigmátor objektivu (oktupóly). Jelikož se objektivový astigmatismus projevuje i ve spektrální oblasti, tak s využitím algoritmu FFT (Fast Fourier Transform) je zapotřebí docílit kruhové symetrické oblasti ve středu spektra (astigmatismus je korigován). To odpovídá zeleně vyznačenému kruhu na Obr. 2, pokud má spektrum tvar eliptický (v obrázku červeně) znamená to, že dochází k osovému astigmatismu. Korekce astigmatismu se provádí nejlépe při pozorování homogenního uhlíkového filmu. [1][5][25]

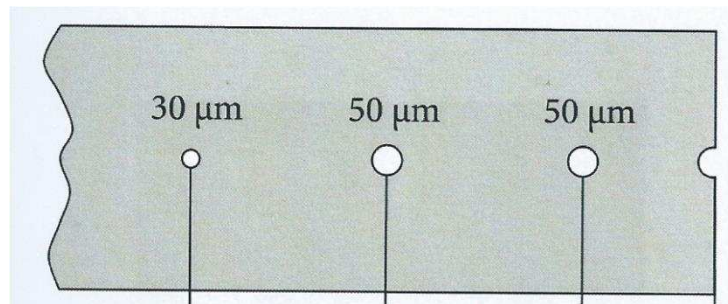


Obr. 2 Spektrum tlusté uhlíkové fólie – vypočteno FFT převzato z [5]



## 1.4.2 Clony kondenzoru a objektivu

V systému všech elektronových mikroskopů se používají clony. Používají se pevné, ale i měnitelné. V případě LVEM se setkáváme s manipulátorem clon kondenzoru a objektivu. Tři kruhové clony kondenzoru se nachází na obdélníkové destičce sériově za sebou viz Obr. 3. První a druhá clona (zprava) má průměr  $50\ \mu\text{m}$  a poslední  $30\ \mu\text{m}$ , totéž platí i pro clony objektivu. Objektivová clona slouží ke zlepšení kontrastu. Kondenzorová clona omezuje velikost primárního svazku elektronů, tedy proudové zatížení vzorku. [1][5]



Obr. 3 Náčrt obdélníkové destičky s kruhovými clonami převzato z [5]

## 1.5 Detekce elektronů

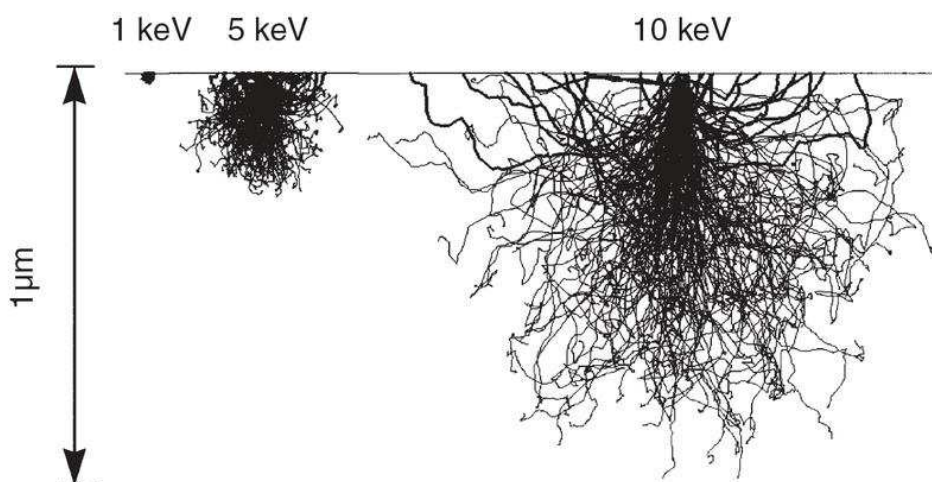
Protože elektrony mají malou vlnovou délku, kterou již není lidské oko schopno rozeznat, je nutné dopadající elektrony převést na fotony (obraz ve viditelném spektru). K pozorování obrazu se dříve využívaly fluorescenční stínítka a jakmile uživatel našel oblast zájmu, stínítka bylo z dráhy elektronů odebráno a elektrony dopadly na detektor – fotografické negativy. Později se začaly používat CCD kamery a digitální desky (imaging plates viz [1]). V případě LVEM je ovšem elektronový svazek přeměněn na stínítka YAG (Yttrium Aluminum Garnet) na světelný svazek (fotony) a ten už lze detekovat daleko snadněji např. CMOS kamerou. V LVEM je používána CMOS kamera s velikostí senzoru  $2560 \times 2160$  pixelů a velikostí jednoho pixelu  $6,5\ \mu\text{m}$ . Použité vzorkování kamery je 16 nebo 12 bitů a je chlazená pomocí Peltierova článku. [1][3][25]

Některé techniky místo prošlého svazku elektronů (TE – transmission electron) detekují jiné signály např. zpětně odražené elektrony (Back Scattered Electron – BSE), sekundární elektrony (SE), charakteristické rentgenovo záření (EDS), katodoluminiscence (CL). Vyjmenované techniky využívají speciálních detektorů vyrobených k detekci konkrétního signálu. [1]



## 2 VLIV RADIAČNÍHO POŠKOZENÍ VZORKU

Jak již bylo uvedeno dříve, elektrony v transmisním elektronovém mikroskopu prochází skrz vzorek, který je ve formě tenké fólie. Při interakci primárního svazku elektronů s atomy vzorku dochází k rozptylování elektronů a taky k postupné degradaci (poškození) vzorku. Energie primárních elektronů ovlivňuje velikost oblasti pod povrchem vzorku, kde dochází k interakcím elektronů se vzorkem – tato oblast se nazývá excitační objem. Excitační objem lze simulovat pomocí speciální statistické metody Monte Carlo viz Obr. 4. Dopadající elektrony jsou rozptylovány hlavně ve směru rovnoběžném se směrem dopadajícího svazku, avšak jak lze vidět na obrázku, excitační oblast je mělkčí pro menší energie. Elektrony, které prochází skrz, jsou v TEM využity k tvorbě výsledného obrazu, avšak pro jiné techniky lze využít i jiné typy interakce (sekundární elektrony, zpětně odražené elektrony, Augerovy elektrony atd.). [1][9]



Obr. 4 Simulace drah elektronů metodou Monte Carlo převzato z [10]

### 2.1 Parametry elektronů

Elektrony stejně jako fotony dle kvantové teorie podléhají vlnově částicovému dualismu, proto lze elektronům přiřadit vlnovou délku. Vlnová délka je závislá na hmotnosti elektronu  $m_e$ , náboji  $-e$  a kinetické energii elektronu, která je rovna práci vykonané při urychlování elektronu (elektrickým potenciálem). Kinetickou energii lze vypočítat dle vzorce 2.2 a substitucí  $p$  do vzorce 2.1[1], dostáváme rovnici 2.3 pro výpočet teoretické rozlišovací schopnosti mikroskopu.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m \cdot v}, \quad (2.1)$$

Kde  $\lambda$  je vlnová délka urychleného elektronu,  $h$  je Planckova konstanta,  $p$  je hybnost elektronu, která je rovna jeho hmotnosti  $m$  krát jeho rychlost  $v$ .

$$E_k = \frac{p^2}{2m} = e \cdot U, \quad (2.2)$$

Kde  $E_k$  je kinetická energie,  $p$  je hybnost elektronu,  $m$  je jeho hmotnost,  $e$  je náboj elektronu a  $U$  je urychlovací napětí.

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2 \cdot m \cdot e \cdot U}}, \quad (2.3)$$

Kde  $\lambda$  je vlnová délka urychleného elektronu,  $h$  je Planckova konstanta,  $m$  je hmotnost elektronu,  $e$  je náboj elektronu a  $U$  je urychlovací napětí.

Jestliže urychlovací napětí je větší než 40 kV je potřeba počítat s relativistickou korekcí, avšak v této práci se pracuje pouze s nízkonapěťovými EM s napětím 5 kV a 25 kV. Teoretická rozlišovací schopnost se shoduje s vlnovou délkou elektronu a lze ji vypočítat dosazením do vztahu 2.3. Pro napětí 5 kV je rovna 17,35 pm a pro napětí 25 kV je 7,57 pm, ovšem takové rozlišovací schopnosti reálné mikroskopy nikdy nedosáhnou, kvůli zobrazovacím vadám a technickým nedostatkům. [1][13]

**Tab. 2 Vlastnosti elektronů dle elektronového mikroskopu**

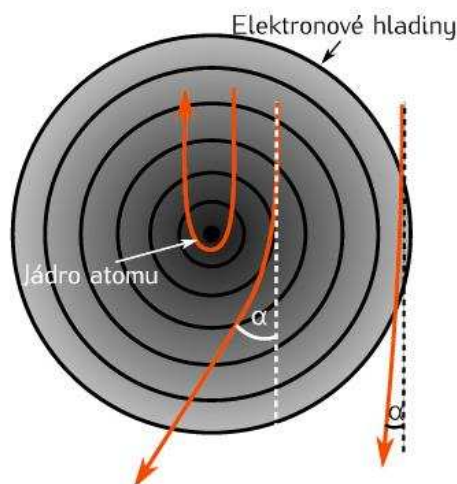
Mikroskop	Energie [keV]	$v$ [m/s]	$v/c$ [-]	[pm]
LVEM 5	5	$4,19 \cdot 10^7$	0,14	17,35
LVEM 25	25	$9,38 \cdot 10^7$	0,313	7,57

Pomocí úpravy rovnice 2.1 lze získat rychlost elektronu vypočtenou z jeho vlnové délky viz Tab. 2. V poměru k rychlosti světla se elektron v LVEM5 pohybuje rychlostí 0,14  $c$  a elektron v LVEM25 rychlostí 0,3  $c$ . Energie elektronů je závislá na urychlovacím napětí, takže pro LVEM5 odpovídá 5 keV a pro LVEM25 je energie rovna 25 keV.

## 2.2 Interakce primárního svazku elektronů se vzorkem

Dopadající elektrony se při interakci se vzorkem chovají velmi „chaoticky“, což způsobuje pružný a nepružný rozptyl (elektronové excitace) při srážkách elektronů s atomy vzorku. U pružného rozptylu dochází k zanedbatelné výměně kinetické energie. Elektrony interagují Coulombovsky s elektrostatickým potenciálem jader atomů, které jsou částečně stíněny elektronovým obalem. Během toho dochází k změně hybnosti a energie elektronů, ale i atomů samotných. Jelikož je hmotnost elektronu oproti hmotnosti atomu velmi malá, dochází k velmi malé relativní změně

energie rozptýlených elektronů oproti elektronům primárním. Primární elektrony dopadající na vzorek jsou vychylovány atomy a vychylují se více, čím blíže kolem jádra atomu proletí a čím vyšší je elektrický náboj jádra. V tomto případě může nastat situace, kdy se elektron jeví jako zpětně odražený – BSE (úhel rozptylu je větší než  $100^\circ$ ). Dráha elektronů ovlivněných pružným rozptylem je na Obr. 5. [1][9][13]



**Obr. 5 Dráhy pružně rozptýlených elektronů převzato z [9]**

U nepružného rozptylu elektron proniká elektronovým obalem atomu a jeho energie je předávána elektronům v některé elektronové vrstvě atomů nebo krystalu jako celku. Nepružný rozptyl lze rozdělit do 3 kategorií.

- Procesy generující sekundární elektrony (SE)
- Procesy generující rentgenové (RTG) záření
- Procesy vyplývající z interakcí s mnoha atomy

Energie dopadajících elektronů může způsobit excitaci vázaných elektronů v obalu atomu, volných elektronů nebo rozvibrování krystalové mřížky. Tento přenos energie vede ke zvýšení teploty vzorku a může vést i k jeho radiačnímu poškození. Čím víc se elektron blíží k atomovému jádru, tím více ztrácí energie při kolizi s elektronem z vnitřní hladiny. Sekundární elektron (vyražený primárním elektronem) vytvoří díru, kterou zaplní elektron z vyšší elektronové hladiny a dojde k vyzáření charakteristického rentgenova záření, určité vlnové délky (energie). V některých případech nemusí být energie vyzářena, ale může být předána jinému elektronu z vyšší vrstvy a ten opustí elektronový obal, takovému elektronu se říká Augerův Elektron (AE) a jeho energie je velmi nízká. Také může dojít k případu, kdy elektron z valenčního pásu přechází přes zakázaný pás do vodivostního, poté dojde k poruše krystalové mřížky a rekombinací elektronu dojde k vyzáření fotonu ve viditelné oblasti, tento jev se jmenuje katodoluminiscence (CL).

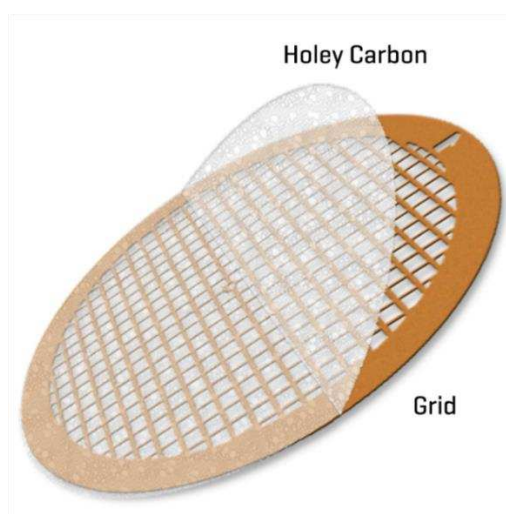
Radiační poškození vzorků je spojeno hlavně s rentgonovým zářením, které má silné ionizační účinky. K vyražení elektronu z hladiny blízké jádru atomu může dojít pouze v situaci, kdy je předaná energie větší než tzv. kritická energie pro danou hladinu. Díky rozdílné energii v závislosti na atomovém čísle  $Z$  a jedinečnosti hodnoty energií hladin (K, L, M, N) každého prvku periodické tabulky je možno provést chemickou analýzu vzorku pomocí detektoru EDX (EDS). [1][9][13][30]

## **2.3 Poškození vzorku v nízkonapětových elektronových mikroskopech**

Vysokonapětové elektronové mikroskopy sice umožňují vidět detailní strukturu zkoumaného vzorku, díky velké rozlišovací schopnosti, ale kvůli vysoké energii elektronů dochází k výrazné interakci se vzorkem, k ionizaci a vzorek velmi rychle degraduje. Pro zkoumání organických struktur (lehkých prvků) je proto daleko vhodnější využití nízkonapětových elektronových mikroskopů. Tepelně stabilní organické polymery jsou odolnější vůči poškození primárním svazkem elektronů. Odolnost vůči elektronům se většinou určuje z hlediska celkové dávky elektronů ( $C/cm^2$ ). Ve studii [14] byla celková konečná dávka zkoumána na organickém polovodiči pentacenu (sloučenina 5 benzemových jader), kde pro napětí 5 kV byla dávka  $0.035 \pm 0.015 C/cm^2$ , zatímco pro vysoké napětí 400 kV byla dávka cca 7x vyšší a to  $0.25 \pm 0.05 C/cm^2$ . Důvod, proč je dávka na vyšším napětí sedminásobná souvisí se střední volnou dráhou elektronů. Elektrony se sráží s molekulami vzorku a u vysokého urychlovacího napětí prochází rychlé elektrony vzorkem s menším počtem srážek (interakcí). Z tohoto důvodu dochází k rozpadu struktur ve vzorku pomaleji a vzorek obdrží větší celkovou dávku elektronů. Počet srážek samozřejmě souvisí i s tloušťkou vzorku, tedy na dráze, kterou urychlený elektron skrz vzorek urazí. [14][15][26]

### 3 PŘÍPRAVA VZORKU PRO TRANSMISNÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII

Využití LVEM je převážně v oblasti biologických vzorků, které obsahují lehké prvky (malé atomové číslo) nebo ke sledování polymerů. V transmisní elektronové mikroskopii se pozorovaný objekt nachází na kulaté síťce (terčíku) většinou standartního rozměru ( $\emptyset$ ) 3,05 mm. Na výrobu sítěk se nejčastěji používá měď, ale existují i síťky z niklu či zlata. Existuje několik typů sítěk, ať už dané tloušťkou nebo tvarem jednotlivých otvorů (ok) síťky. Aby se zabránilo propadnutí vzorku skrz oko síťky, tak bývá síťka potažena tenkým filmem většinou z uhlíku viz Obr. 6. Biologické preparáty bývají většinou umístěny v zalévacích hmotách např. polymerní pryskyřice. Zalévací hmota musí být složena z lehkých prvků, aby nedocházelo k rozptylu elektronů na těžkých částicích a také, aby nezastínila předměty zájmu. Existuje několik způsobů přípravy vzorku, avšak většinou se používají k tvorbě vzorků z minerálů, kovů a polovodičů, které je vhodné pozorovat v EM s vyšším urychlovacím napětím. V následujícím textu budou popsány metody používané převážně pro lehké prvky. [1][9][13][23][26]



Obr. 6 Síťka pro TEM pokrytá uhlíkovým filmem převzato z [11]

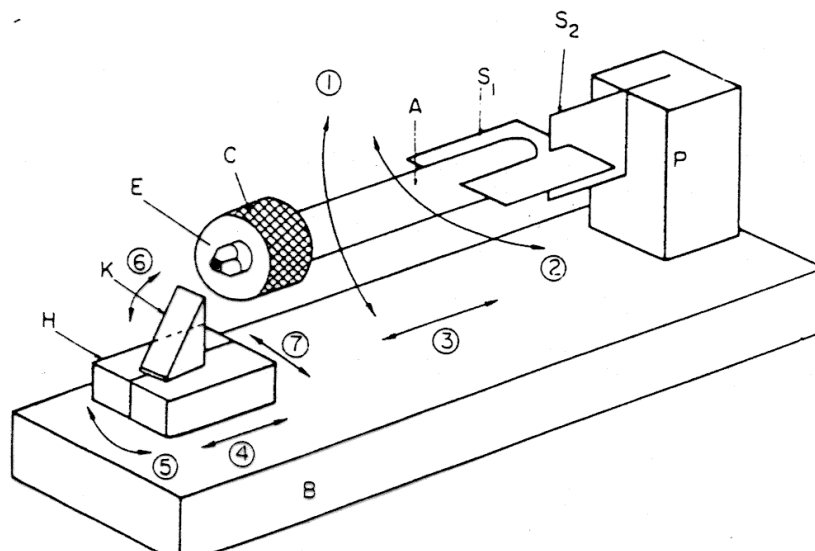
#### 3.1 Řezání plátků

U biologických preparátů zalitých v polymerní pryskyřici se používá metoda řezání plátků. Existuje několik způsobů řezání a u většiny je možné tloušťku nastavit pomocí mikrometrického šroubu. Vzorky pro nízkonapěťový TEM by měli mít tloušťku kolem 40-70 nm, maximálně však 100 nm. [1][23]

### 3.1.1 Řezání ultramikrotomem

Touto technikou jsme schopni získat ultra tenké řezy, které jsou tlusté 30-90 nm. K řezání slouží speciální přístroj ultramikrotom, který má skleněný nebo diamantový nůž. Skleněné nože jsou levné a vyrábí se štípáním, pomocí speciálních kleští („knife maker“), z tabulek skla, ale jejich břit se rychle ztupí. Oproti nim jsou diamantové nože drahé, ale k jejich ztupení dochází pomaleji. U výrobce je lze za poplatek, nechat znovu nabrousit. Vzorek může být biologický i polymerní, nejlépe se řezy dělají na homogenních vzorcích a v případě heterogenních nesmí být jednotlivé složky příliš odlišné svou tvrdostí a kompaktností, jinak by mohlo dojít k rozdrčení.

Před samotným řezáním na ultramikrotomu se vytvrzené vzorky upravují, aby se zmenšila plocha řezu, do tvaru komolé pyramidy. Řezání se většinou provádí při pokojové teplotě a někdy se využívá oscilujícího nože, který vibruje s ultrazvukovou frekvencí 25-45 kHz. Pokud je materiál při pokojových teplotách příliš měkký, tak se provádí jeho chlazení a řezání se pak provádí pod bodem mrazu při teplotách 0 až -120 °C. V tomto případě metodu nazýváme kryo-ultramikrotomie. Schéma mechanického ultramikrotomu je na Obr. 7



Obr. 7 Schéma ultramikrotomu s mechanickým pohybem převzato z [13]

Kde *E* – bloček vzorku ve tvaru komolé pyramidy, *C* – držák objektu (bločku), *A* – rameno, *S<sub>1</sub>* a *S<sub>2</sub>* – pružinový závěs, *P* – podpěra ramena, *B* – základní deska, *K* – nůž, *H* – křížový stolek

Výhodou ultramikrotomie je, že provádí stejně tlustý řez po celé ploše vzorku. A nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady a složitost celého procesu. Obsluha musí být zaškolená, a i tak může vzniknout relativně velké množství artefaktů, proto se v této práci bude pracovat s již zhotovenými vzorky touto metodou.[1][13][25]

## **3.2 Nanesení vzorku na uhlíkový film**

Dalším způsobem, jak připravit vzorek vhodný pro transmisní elektronovou mikroskopii (včetně LV TEM) je nanesení roztoku na síťku pokrytou uhlíkovou fólií. Metodou přímého napařování uhlíku lze připravit vzorky velmi tenké uhlíkové fólie. Nejdříve se podélně nařízne slída, aby vytvořila 2 plochy, na ty se pak napaří uhlíková vrstva a tato uhlíková folie je posléze použita k pokrytí několik sítěk (terčků). Na tyto síťky je po vyschnutí nakápnut roztok zkoumaného materiálu např. nanočástice titanu. Podrobný postup této metody je popsán v kapitole 4. [16]

## **3.3 Radiační poškození vzorku v závislosti na jeho vlastnostech**

Radiační poškození vzorku je velmi závislé na materiálu vzorku, jeho tloušťce a na radiačním zatížení závislejícím na velikosti proudu svazkem a délce expozice. Odolnost vůči dopadajícím elektronům silně závisí na atomovém čísle ( $Z$ ) prvků, z kterých se vzorek skládá. Například uhlíkové nanotrubičky nebo krystalický silikon může být delší dobu vystaven elektronům urychleným 100 kV, ale u urychlovacího napětí 200 kV už dochází ke značnému poškození. Z toho vyplývá, že je nutné brát v úvahu určité prahové urychlovací napětí a taky snížit celkovou dávku dopadajících elektronů, tedy ozařovat vzorek primárním svazkem s nižší proudovou hustotou. U prvků s malým a středně velkým atomovým číslem dochází u urychlovacího napětí 200 kV ke značnému ionizačnímu poškození (rozprášení). Oproti tomu prvky s vysokým atomovým číslem (tantal  $Z=73$ , wolfram  $Z=74$ ) mají práh energie dopadajících elektronů, kdy dochází k ionizačnímu rozprašování, vyšší než 400 keV viz Obr. 8. U anorganických struktur dochází k degradaci materiálu pomaleji a dochází k rozpadu krystalové mřížky nebo ke ztrátě hmotnosti. Organické sloučeniny jsou oproti anorganickým často vázány pouze slabou vazbou (Van Der Waalsovou silou) a často nedochází k deexcitaci excitovaného elektronu, chemické vazby se rozpadají a mění se původní tvar molekuly. Ve většině případů dochází k poškození vazebných částí obsahujících lehké atomy vodíku, kyslíku a sodíku. Aromatické molekuly jsou patrně stabilnější díky stálosti benzenového jádra. Přestože uhlík má nízké atomové číslo, patří k velmi stabilním prvkům, a proto se používá, ve formě uhlíkového filmu, jako podpěra pro ostatní zkoumané prvky a molekuly. Zlato patří mezi vysoce stabilní prvky, a proto bývá používáno

k pokovení (zvýraznění kontrastu) u některých preparátů. V Tab. 3 lze vidět, že zlato začíná být rozprašováno až při bombardování elektronů s energií vyšší než 1 320 keV, avšak tato hodnota je pouze teoretická. Tab. 3 obsahuje teoreticky vypočtené prahy i pro jiné materiály.[14][15][26][30]

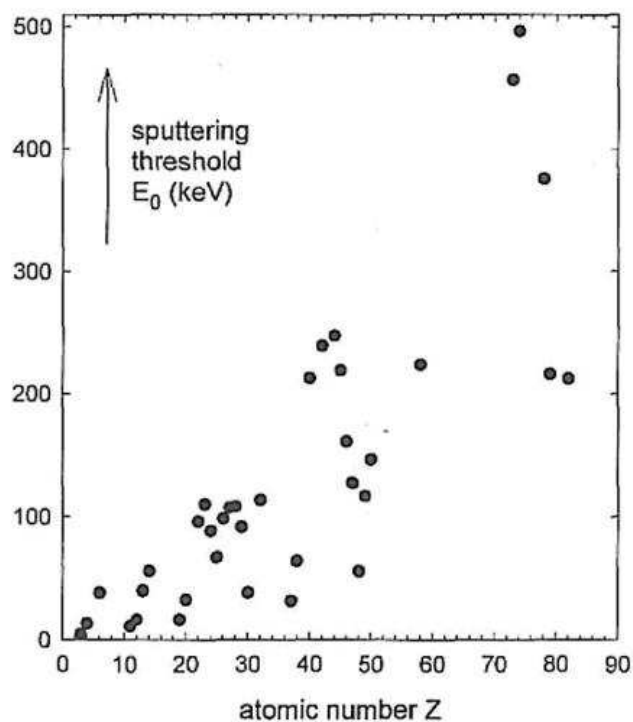
**Tab. 3 Teoreticky vypočtené prahy ionizačního poškození určitých materiálů převzato z [15]**

<b>Materiál</b>	<b>Práh [keV]</b>
Grafit	140
Diamant	330
Hliník	180
Měď	420
Zlato	1 320

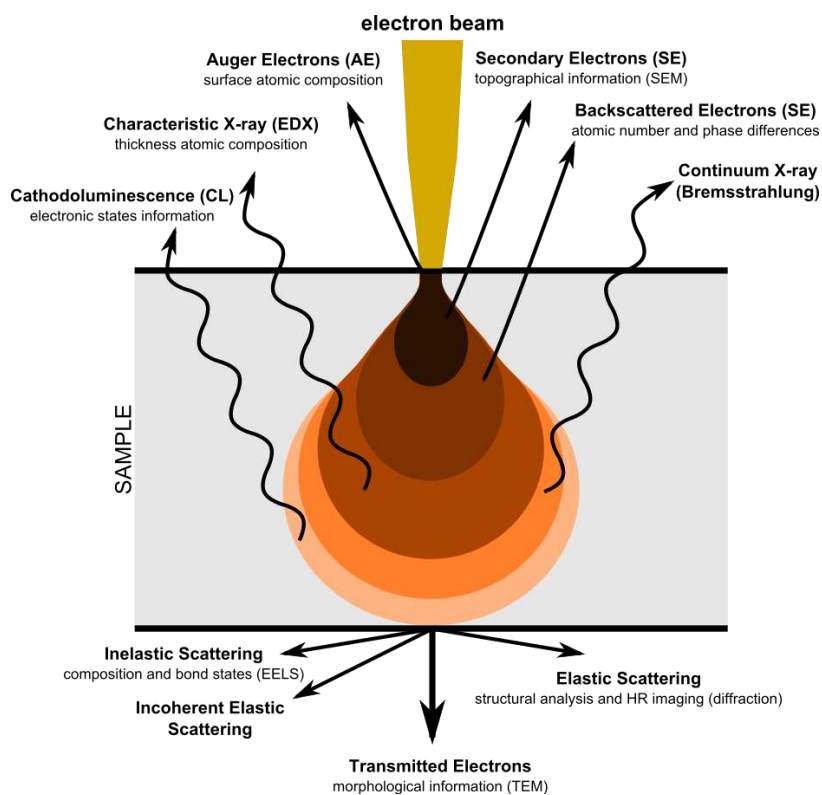
Tloušťka vzorku nerozhoduje pouze o radiačním poškození vzorku, ale také o tepelném zahřívání a taktéž souvisí s elektrostatickým nabíjením vzorku. Jelikož zahřívání vzorků zvyšuje pravděpodobnost ionizace vzorků, některé elektronové mikroskopy vzorek záměrně chladí. U LVEM však k žádnému procesu chlazení nedochází. Vzorky jsou připravovány co nejtenčí v rozsahu 20-70 nm. U tenkých vzorků nedochází k tak rozsáhlému nepružnému rozptylu jako u tlustších vzorků, v kterých zároveň vzniká i větší množství pružně rozptýlených elektronů, které mohou opětovně interagovat se vzorkem. Jak primární elektronový svazek interaguje se vzorkem a jaké signály při tom vznikají je zobrazeno na Obr. 9.

Radiační poškození taktéž závisí na průměru (velikosti) elektronové stopy primárního svazku. Fokusuje-li stopu do menšího průměru zvyšujeme proudovou hustotu, a tak zvyšujeme celkovou dávku elektronů, které dopadají na vzorek. Stejný vliv má i doba ozařování primárním svazkem elektronů (expoziční čas). Čím déle je vzorek vystaven elektronům tím více je zatěžován, zvyšuje se pravděpodobnost ionizace a dochází k radiačnímu poškození, což může vést až k úplnému zničení atomů a molekul. [14][15][30]





Obr. 8 Práh energie elektronů, kde dochází k ionizačnímu rozprašování prvků v závislosti na jejich atomovém čísle ( $Z$ ) převzato z [15]



Obr. 9 Interakce primárního elektronového svazku se vzorkem převzato z [17]

## 4 PRAKTICKÁ PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro tuto práci bylo vyrobeno několik testovacích vzorků, pomocí metody přímého napařování uhlíku, která je podrobně s fotografiemi popsána v [16]. Po napaření a nanesení uhlíku na sítky následuje nakápnutí připraveného roztoku zkoumaného materiálu na vytvořený uhlíkový film.

### 4.1 Pracovní postup

Seznam použitých přípravků a nástrojů:

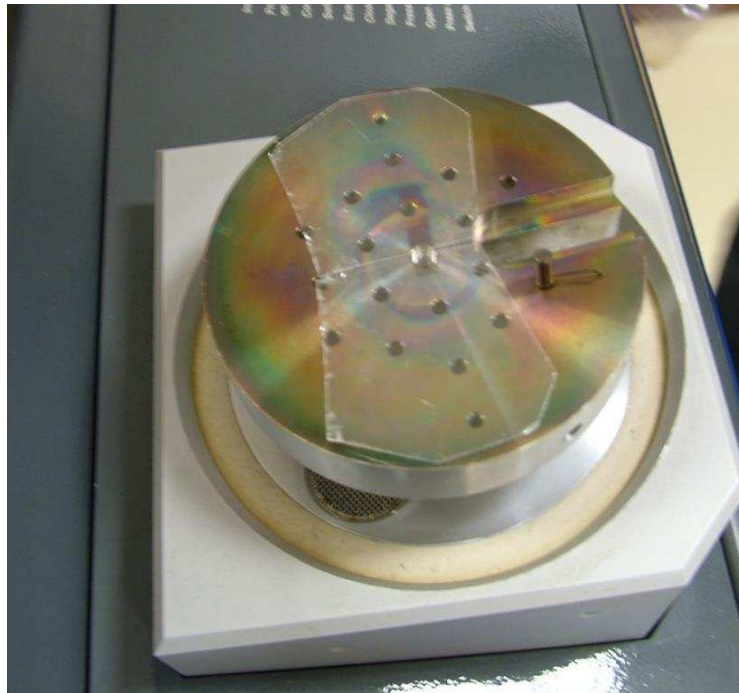
- Nůžky
- Rukavice
- Napařovačka
- Žiletka
- Pinzeta a obrácená pinzeta
- Uhlíková páska (nit), průměr 3,5 mm
- Slída
- Filtrační papír
- Sítky – Au průměr 3 mm, hexagonální oka, balení po 100 ks, viz Obr. 10
- Zdroj světla
- Chemické nádobí – Filtrační nálevka, tlačka, kádinky, zkumavka
- Roztok nebo prášek zkoumaného materiálu
- Mikropipeta
- Technický perchlorethylen



Obr. 10 Balení 100 sítěk ze zlata

### 4.1.1 Příprava uhlíkového filmu

- 1) Nejdříve se ze slídové desky odštípne kus slídy. V rukavicích menší slídovou destičku pomocí žiletky rozdělíme podélně na 2 tenčí destičky. Tím dosáhneme 100% čistoty v místě, kde jsme 2 vrstvy slídy od sebe oddělily, kam je napařen uhlík. Položíme nachystané slídové plátky do středu napařovačky čistou stranou nahoru viz Obr. 11.



**Obr. 11 Dvě tenké slídové vrstvy ve středu komory napařovačky**

- 2) Vezmeme uhlíkovou nit a ustříhneme z ní 1 svazek dlouhý cca 1,5 cm. Tento svazek připevníme mezi elektrody v horním krytu napařovačky. Následně přikryjeme (zavřeme) komoru napařovačky (Obr. 12) a připojíme k ní turbomolekulární pumpu.



**Obr. 12 Napařovačka se zavřenou komorou**

- 3) Zapneme napařovačku a turbomolekulární pumpu a otevřeme napouštěcí ventil, aby došlo k čerpání napařovačky. Jakmile ukazatel tlaku na napařovačce zezelená je přístroj připraven k použití viz Obr. 13.



**Obr. 13 Ukazatel tlaku v komoře napařovačky**

- 4) Provedeme žhání uhlíkové nitě. Nejprve přidáváme tlačítkem UP proud, až dojde k viditelnému nažhavení vlákna. Následně pomocí tlačítka DOWN sjedeme zpátky na nulu a zmáčkneme tlačítko RESET. Otevřeme clonu, která doposud byla mezi slídou a uhlíkovou nití. Poté podržíme tlačítko HIGH CURRENT, kdy skrz nit mezi elektrodami prochází vysoký proud a dojde

k vypaření uhlíku. Tlačítko držíme, dokud světlo vycházející z nitě nepřestane blikat, což trvá přibližně jednu až pět vteřin.

- 5) Uvolněný uhlík z nitě se náhodně rozprostře po komoře napařovačky a dopadá mimo stěnu komory i na destičky slídy, na kterých vytvoří uhlíkovou vrstvu přibližně 10-20 nm. Následuje vypnutí turbomolekulární pumpy a zavzdušnění komory napařovačky. Slídu pomocí pinzety vyjmeme a vložíme do čisté Petriho misky a přesuneme se do chemické laboratoře.

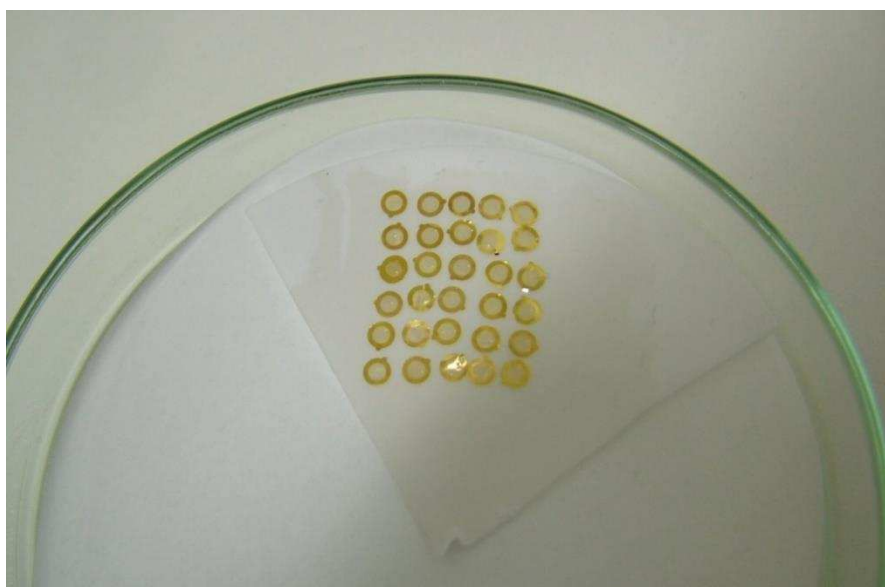
#### 4.1.2 Nanesení uhlíkového filmu na síťky

- 1) Vezmeme větší kádinku a vypláchneme ji demineralizovanou (DEMI) vodou. Do čisté kádinky nabereme demineralizovanou vodu, kterou vypláchneme filtrační nálevku a uzavřeme tlačku.
- 2) Z kulatého filtračního papíru si odstříhneme čtvrtku (kruhovou výseč) a vložíme ji do filtrační nálevky a zatížíme ji. Poté do nálevky přidáme malou kádinku sloužící k podepření slídy. Celou filtrační nálevku zalejeme DEMI vodou.
- 3) Do čisté Petriho misky si odsypeme 20–30 sítěk. Poté je pinzetou po jedné těsně vedle sebe vyskládáme na filtrační papír. Skládáme je do útvaru podobného destičce slídy, na které je uhlíkový film viz Obr. 14.



Obr. 14 Síťky ze zlata vyskládané na filtračním papíru v nálevce zalité DEMI vodou

- 4) Slídu pomalu vnoříme do filtrační nálevky pod úhlem cca 45°. Poté slídu opatrně opřeme mezi kraj nálevky a malou kádinku. Jelikož je uhlík hydrofobní, uhlíková fólie se oddělí od slídy a zůstane plavat na vodní hladině. Pomocí světelného zdroje posvítíme na hladinu a můžeme tak uhlíkový film pozorovat. S pomocí pinzety uhlíkovou fólii přesuneme nad síťky.
- 5) Následně otevřeme tlačku filtrační nálevky a hladina vody začne pomalu klesat. Současně korigujeme pozici uhlíkového filmu, aby byl stále nad síťkami.
- 6) Po vypuštění vody zůstane uhlíkový film na síťkách a současně na filtračním papíru. Nachystáme si Petriho misku vyloženou filtračním papírem a opatrně přesuneme filtrační papír se síťkami do misky viz Obr. 15.
- 7) Poklidíme pracoviště a necháme síťky 1-2 dny schnout.



Obr. 15 Síťky již pokryty uhlíkovou fólií, připravené k vyschnutí

### 4.1.3 Nanesení vzorku na uhlíkový film – síťku

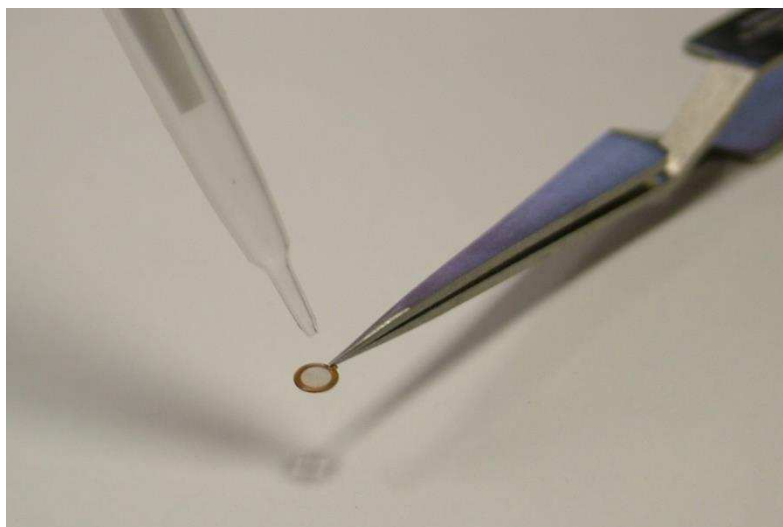
- 1) Připravíme si roztok zkoumaného materiálu např. uhlíkové nanotrubky, které jsou v podobě prášku. Prášek smícháme ve zkumavce s alkoholem (Aceton, Ethanol), který se dobře odpařuje a necháme pár (5-10) minut působit v ultrazvukové myčce (vaně). Díky ultrazvuku se roztok promíchá. Jinou možností je koupit od výrobce místo prášku vzorek, již ve formě připraveného roztoku.
- 2) Terčík s uhlíkovou fólií vložíme do obrácené pinzety, která slouží jako svěrák viz Obr. 16.



- 3) Pomocí mikropipety následuje nakápnutí roztoku na síťku (viz Obr. 17), kde uhlíkový film slouží jako podpěra v jednotlivých otvorech síťky. Terčík se pak nechá 1-2 dny vyschnout a dojde k částečnému odpaření alkoholu. Někdy je vhodné odsát přebytečný roztok filtračním papírem, pak síťka schne kratší dobu. Před prvním vložením je vhodné nechat vzorek déle ve vakuové propusti, kde pořádně vyschne. Poté je vzorek připraven pro mikroskopování.



**Obr. 16 Obrácená pinzeta pro uchycení síťky**



**Obr. 17 Nakápnutí roztoku na síťku**

## 5 ANALÝZA DEGRADACE VZORKŮ

V této kapitole budou zhodnoceny vlastnosti mikroskopu LVEM25 a dvou typů katod s různými proudovými hustotami – **High current FEG** a **Standart FEG**. Dále je zde uvedeno, jak byly získány jednotlivé obrazy, jak bylo provedeno jejich měření a zpracování pro následnou analýzu. Veškeré snímky pocházejí z LVEM25 a jsou nasnímány kamerou ANDOR Zyla CMOS s 16bitovou hloubkou v režimu TEM a v režimu difrakce je natočeno video s 12bitovou hloubkou. Uvedené parametry zvětšení udávají kolikrát je vzorek zvětšen elektronovou optickou soustavou. Všechny snímky byly pořízeny se světelným objektivem, který scénu dále zvětšuje 4x na čip kamery a se sumací kamery 1.

Při měření bylo zapotřebí spustit vždy elektronový mikroskop LVEM25 přibližně hodinu před samotným snímáním obrazů, aby byl elektronový svazek stabilní a proud procházející stínítkem odpovídal, co nejpřesněji měřené hodnotě. V LVEM25 je mnoho částí, na které je přivedeno napětí, a to by mělo být v ideálním případě konstantní. Tyto technické prvky mohou ovlivňovat vlastnosti elektronového svazku např. napětí přiváděné na katodu a taktéž elektronová optika skládající se z jednotlivých magnetostatických a elektrostatických čoček, které jsou neustále pod napětím. Urychlovací napětí přiváděné na katodu je ve všech měřeních vždy 25 kV.

Celková dávka elektronů (total dose), která je v práci počítána viz rovnice 5.1, je závislá na velikosti plochy  $S$  a elektrickém náboji  $Q$ , který je definován jako množství elektrického proudu (Ampérů) přenesených za jednotku času (Sekund). Odpovídá tedy elektrickému proudu dopadající na stínítko za určitý čas a v určité kulové ploše (plocha stopy primárního elektronového svazku). Jednotka celkové dávky je  $[C/cm^2]$ . [14][30]

$$D = \frac{Q}{S} = \frac{i \cdot t}{\pi \cdot r^2} \quad (5.1)$$

Kde  $D$  je celková dávka elektronů,  $Q$  elektrický náboj,  $S$  plocha,  $i$  okamžitý proud,  $t$  čas a  $r$  je poloměr stopy

### 5.1 Měření vlastností LVEM25 a katod High current FEG a Standart FEG

Celková dávka dopadajících elektronů, respektive proud procházející odizolovaným stínítkem, který je v této práci měřen, je závislý na několika parametrech. A to na proudové hustotě z katody, která je dána nastavením extrakčního napětí a u **High**



**current FEG** také napětím na supresoru (značeno  $U_{SUP}$ ) a na velikosti stopy, tedy napětí na kondenzorové čočce (značeno  $U_{CL}$ ), která stopu fokusuje. Z tohoto důvodu bylo provedeno měření závislosti napětí supresoru na proudu procházejícím stínítkem u katody **High current FEG**. Kromě zmíněných veličin byl měřen i celkový emisní proud a proud svazkem ( $I_{eh}$ ).

Jelikož změna napětí na supresoru může způsobit poškození katody, u měření katody **standart FEG** nebylo toto napětí vůbec měněno a celé měření proběhlo za konstantního  $U_{SUP} = 1\ 000\ V$ , což je standartně používaná hodnota a zákazník ji nemá možnost měnit.

Měření vlastností obou katod bylo prováděno na síťce pokryté uhlíkovým filmem bez dalších materiálů, a to jak v otvorech (okách) bez uhlíkového filmu, kde měřený proud na stínítku odpovídá skutečnému proudu elektronů v primárním svazku, tak na okách s uhlíkovým filmem, na kterém dochází k rozptýlení elektronů.

### 5.1.1 Měření katody High current FEG

První měření bylo provedeno pro nejnižší proudové zatížení vzorku, tedy při nejvyšším možném napětí na kondenzorové čočce ( $U_{CL}=13\ kV$ ), což má za následek největší průměr stopy, kterého lze dosáhnout. Z tohoto důvodu bylo použité zvětšení nejmenší (40) a muselo se využít nejmenší kondenzorové clony, která má průměr  $30\ \mu m$ , díky které byla stopa primárního svazku omezena na průměr  $22\ \mu m$ , který byl změřen při napětí supresoru  $400\ V$ . V Tab. 4 jsou naměřené hodnoty. Při měření se měnilo napětí na supresoru o  $200\ V$ , poté se mikroskop nechal hodinu stabilizovat a odečetla se okamžitá hodnota proudu na stínítku, poté se opět zvýšilo napětí na supresoru o  $200\ V$ . Po hodině zastabilizování byla hodnota proudu konstantní.

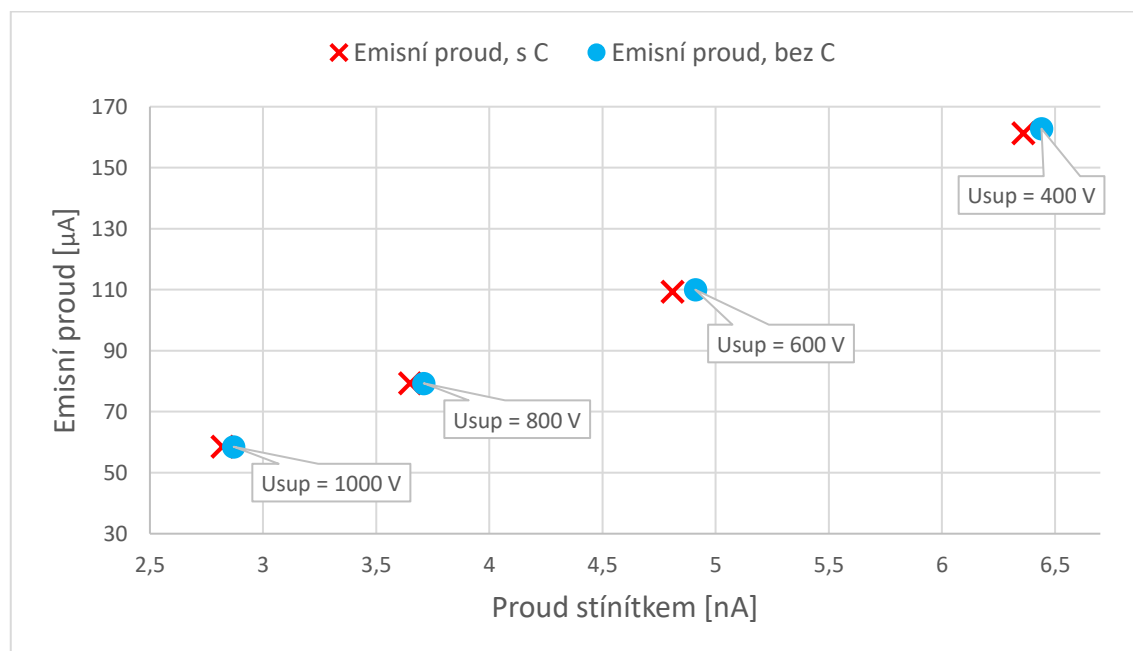
**Tab. 4 Oko bez uhlíku, průměr stopy =  $22\ \mu m$ , zvětšení 40,  $U_{CL} = 13\ kV$ , nejmenší kondenzorová clona**

$U_{SUP}\ [V]$	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu A$ ]	$I_{eh}\ [\mu A]$
400	6,44	162,8	95,5
600	4,91	110	56,59
800	3,71	79,3	33,28
1000	2,87	58,5	19,21

Stejné měření bylo provedeno i s přítomností uhlíkového filmu viz Tab. 5. Ze všech tabulek měření katody High current FEG (Tab. 4 až Tab. 11) je patrné, že čím menší napětí na supresoru je, tím větší proud elektronů dopadá na stínítko a stejně tak se zvyšuje celkový emisní proud. Záporné napětí na supresoru omezuje elektrony vycházející z katody pod velkými úhly a čím je menší, tím více elektronů projde a stane se tak součástí primárního elektronového svazku. Dále je z tabulek patrné, že na uhlíkovém filmu došlo k rozptylu elektronů, a proto je proud procházející stínítkem menší než bez přítomnosti uhlíkového filmu. Závislost celkového emisního proudu na proudu stínítkem s uhlíkovým filmem i bez něj je zobrazena na Obr. 18, kde je poznamenána i hodnota napětí na supresoru.

**Tab. 5 Oko s uhlíkovým filmem, velikost stopy = 22  $\mu\text{m}$ , zvětšení 40,  $U_{\text{CL}} = 13 \text{ kV}$ , nejmenší kondenzorová clona**

$U_{\text{SUP}} [\text{V}]$	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{eh}} [\mu\text{A}]$
400	6,36	161,3	96,1
600	4,81	109,3	56,34
800	3,65	79,3	33,53
1000	2,82	58,5	19,31



**Obr. 18 Závislost celkového emisního proudu na proudu stínítkem při velikosti stopy 22  $\mu\text{m}$ , zvětšení 40,  $U_{\text{CL}} = 13 \text{ kV}$  a nejmenší kondenzorovou clonou, S uhlíkovým filmem i bez**

Napětí na kondenzorové čočce rovnající se 13 kV je velmi vysoká, a ne příliš používaná hodnota, proto bylo provedeno další měření při běžně používaném napětí na kondenzoru a to ~7,5 kV. Taktéž se využilo větší kondenzorové clony, která má průměr 50  $\mu\text{m}$ . Z těchto důvodů bylo dosaženo stejného průměru stopy 22  $\mu\text{m}$ , jako v předchozím měření. Zvětšení bylo použito stejné a to 40. Jak již bylo zmíněno při nižším záporném napětí na kondenzoru je více elektronů soustředěno do stopy primárního svazku. I přestože je velikost stopy stejná, je proud procházející stínítkem větší, tedy i proudová zátěž vzorku je vyšší viz Tab. 6 a Tab. 7.

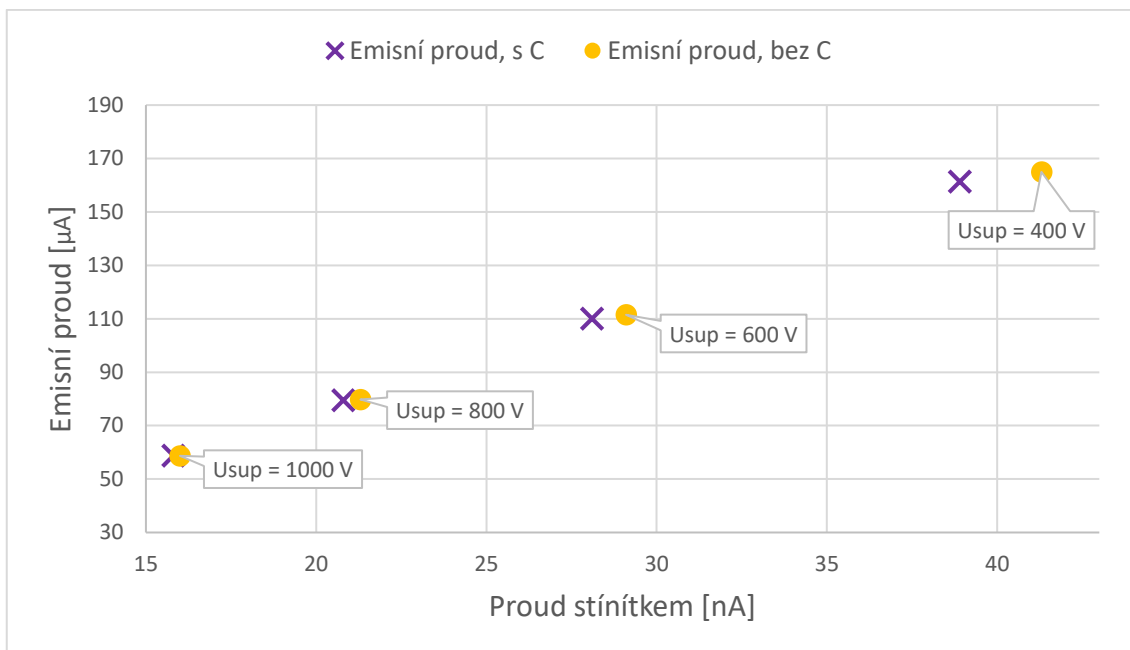
**Tab. 6 Oko bez uhlíku, průměr stopy = 22  $\mu\text{m}$ , zvětšení 40,  $U_{\text{CL}} = 7,45 \text{ kV}$ , kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$**

$U_{\text{SUP}} [\text{V}]$	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{eh}} [\mu\text{A}]$
400	41,3	165	95,85
600	29,1	111,5	58,37
800	21,3	79,8	34,07
1000	16	58,7	20,1

**Tab. 7 Oko s uhlíkovým filmem, velikost stopy = 22  $\mu\text{m}$ , zvětšení 40,  $U_{\text{CL}} = 7,45 \text{ kV}$ , kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$**

$U_{\text{SUP}} [\text{V}]$	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{eh}} [\mu\text{A}]$
400	38,9	161,3	95,65
600	28,1	110	58,22
800	20,8	79,5	34,52
1000	15,8	58,7	20

Zatímco v předchozím měření je rozdíl proudů, procházející stínítkem, s uhlíkovým filmem a bez něj pouze v řádu maximálně desetin nA (0,05-0,1 nA), u nižšího napětí na kondenzoru je rozdíl o dost větší (od 0,2 do 2,4 nA). U napětí na supresoru rovnající se 400 V je rozdíl největší a to 2,4 nA viz rozdíl mezi Tab. 6 a Tab. 7, který je vyobrazen v grafu na Obr. 19. Z toho vyplývá, že dochází k většímu rozptylu elektronů na uhlíkovém filmu.



**Obr. 19 Závislost celkového emisního proudu na proudu stínítkem při velikosti stopy 22  $\mu\text{m}$ , zvětšení 40,  $U_{\text{CL}} = 7,5 \text{ kV}$ , s kondenzorovou clonou 50  $\mu\text{m}$**

V následujícím měření byl svazek primárních elektronů fokusován velmi malým napětím na kondenzoru, které bylo v průběhu měření  $U_{\text{SUP}}$  upravováno tak, aby se neměnil průměr stopy svazku a zůstal po celou dobu měření stejný a to 18,85  $\mu\text{m}$ . Jak je uvedeno v Tab. 8 napětí na kondenzoru ( $U_{\text{CL}}$ ) se muselo měnit i v řádech stovek Voltů. Použité zvětšení bylo 120.

Opět byla použita větší kondenzorová clona, která má průměr 50  $\mu\text{m}$ . Při nízkém napětí na kondenzorové čočce je paprsek hodně fokusován a proud stínítkem se již pohybuje v řádu stovek nA, což je přibližně 10x více, než v předchozím měření s  $U_{\text{CL}}=7,45$ .

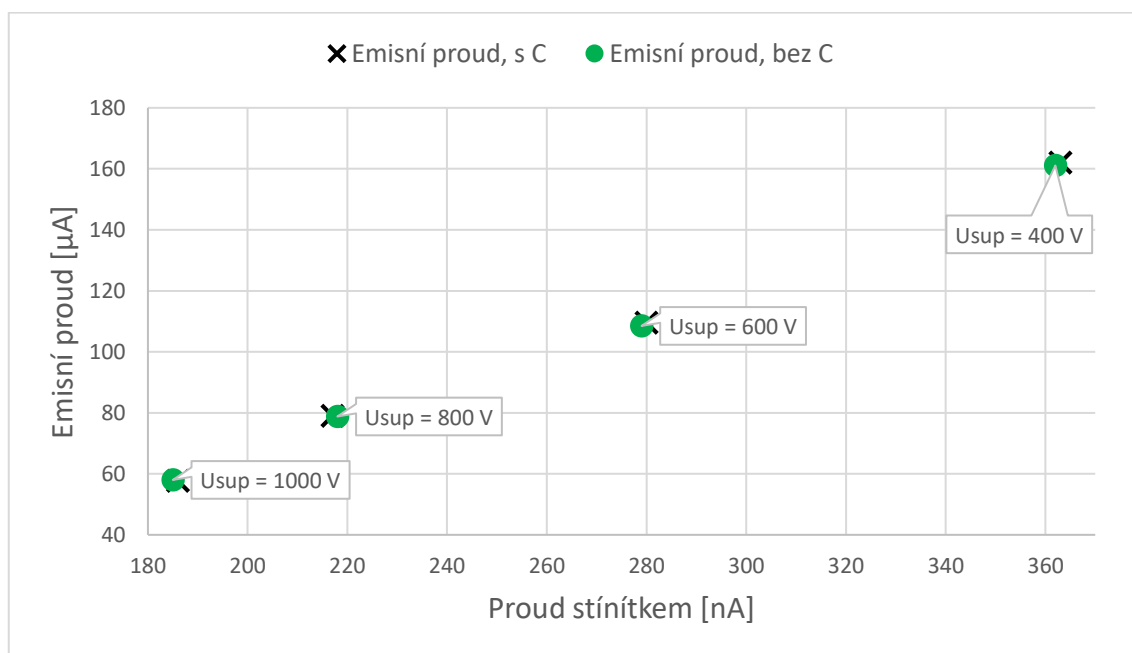
**Tab. 8 Oko bez uhlíku, konstantní průměr stopy = 18,85  $\mu\text{m}$ , zvětšení 120, kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$**

$U_{\text{SUP}}$ [V]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{eh}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$U_{\text{CL}}$ [kV]
400	362	161,1	96,69	1,711
600	279	108,5	57,58	1,532
800	218	78,8	34,47	1,364
1000	185	58	20	1,217

Při změně napětí na kondenzoru nedocházelo k rozdílu proudů stínítkem mezi oky s uhlíkovým filmem a bez nich. Hodnoty jsou téměř stejné viz Tab. 8 a Tab. 9 a viz graf Obr. 20. Je to způsobeno tím, že průměr stopy svazku je malý a elektrony jsou tak blízko optické osy. Rozptylovací úhly proto nejsou moc velké, a tak jsou elektrony elektronovou optickou soustavou vztaženy zpět do svazku a proud stínítkem zůstává stejný. Také možná hraje roli vliv, že zde byla stopa korigována kondenzorem na stejný průměr.

**Tab. 9 Oko s uhlíkovým filmem, konstantní průměr stopy = 18,85  $\mu\text{m}$ , zvětšení 120, kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$**

$U_{\text{SUP}}$ [V]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{eh}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$U_{\text{CL}}$ [kV]
400	363	162	96	1,77
600	280	109,5	58,22	1,511
800	217	79	34,37	1,35
1000	186	57,7	19,51	1,216



**Obr. 20 Závislost celkového emisního proudu na proudu stínítkem při velikosti stopy 18,85  $\mu\text{m}$ , zvětšení 120,  $U_{\text{CL}}$  měněno a s kondenzorovou clonou 50  $\mu\text{m}$**

Při použití objektivové clony, která omezí průnik rozptýlených elektronů na uhlíkovém filmu se naměřené hodnoty proudů stínítkem změny viz Tab. 10. Rozdíl naměřených proudů pouze s kondenzorovou clonou a oběma clonami (kondenzorová i objektivová 50  $\mu\text{m}$ ) je zaznamenán v posledním sloupci v Tab. 11.

**Tab. 10 Oko s uhlíkovým filmem, průměr stopy = 18,85  $\mu\text{m}$ , zvětšení 120, obě clony 50  $\mu\text{m}$**

$U_{\text{SUP}}$ [V]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{eh}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$U_{\text{CL}}$ [kV]
400	345	159,8	91,75	1,848
600	266	109,8	56,89	1,58
800	206	79,3	33,68	1,403
1000	176	58,7	19,55	1,196

**Tab. 11 Oko s uhlíkovým filmem, průměr stopy = 18,85  $\mu\text{m}$ , zvětšení 120, rozdíl měření pouze s kondenzorovou a s oběma clonami**

	jen kondenzorová clona	obě clony	
$U_{\text{SUP}}$ [V]	proud stínítkem [nA]	proud stínítkem [nA]	rozdíl proudu [nA]
400	363	345	18
600	280	266	14
800	217	206	11
1000	186	176	10

### 5.1.2 Měření katody Standart FEG

U katody Standart FEG byl proud procházející odizolovaným stínítkem měřen stejně, ale proud svazkem byl měněn pouze velikostí (průměru) stopy pomocí napětí na kondenzoru nebo pomocí kondenzorové clony. Protože se neměnilo  $U_{\text{SUP}}$  nebylo potřeba čekat hodinu na ustálení svazku a okamžitý proud stínítkem byl zaznamenán po 5 až 10 minutách, kdy byla jeho hodnota konstantní. Zároveň nemá význam měřit ani proud svazkem ( $I_{\text{eh}}$ ), protože je také konstantní. Při tomto měření bohužel došlo ke vzniku svodového proudu na pikoampérmetru, který měří proud procházejících elektronů odizolovaným stínítkem a jeho velikost byla kolem 0,25-0,3 nA, proto je odchylka měřených hodnot cca  $\pm 0,3$  nA. V Tab. 12 je provedené měření na oku bez přítomnosti uhlíku a s kondenzorovou clonou 50  $\mu\text{m}$ . Při napětí na kondenzoru 7,45 kV začne být stopa příliš velká a je zapotřebí ji omezit menší kondenzorovou clonou 30  $\mu\text{m}$ . I z tohoto důvodu je proud stínítkem menší, protože na něj nedopadají všechny elektrony primárního svazku. Naměřené hodnoty s vyšším napětím na kondenzoru a s menší kondenzorovou clonou jsou v Tab. 13. Při běžném mikroskopování se používají hodnoty  $U_{\text{CL}} \sim 7,5$  kV a vyšší a na vzorek tak dopadá hodně rozbíhavý svazek a také díky použití kondenzorové clony není vzorek tolik namáhán vyšším množstvím elektronů.

**Tab. 12 Oko bez uhlíku – závislost proudu stínítkem na velikosti  $U_{Cl}$ , respektive na velikosti stopy, kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$**

$U_{Cl}$ [kV]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$\varnothing$ stopy [ $\mu\text{m}$ ]
2,59	133 $\pm$ 0,3	110,8	4,5
3	134 $\pm$ 0,3	110,8	7,4
4,4	139 $\pm$ 0,3	110,8	18,85
4,75	139 $\pm$ 0,3	110,3	22
6,06	145 $\pm$ 0,3	110,3	35
7,45	75,7 $\pm$ 0,3	110,8	36,5

**Tab. 13 Oko bez uhlíku – závislost proudu stínítkem na velikosti  $U_{Cl}$ , respektive na velikosti stopy, kondenzorová clona 30  $\mu\text{m}$**

$U_{Cl}$ [kV]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$\varnothing$ stopy [ $\mu\text{m}$ ]
7,45	31,1 $\pm$ 0,3	111	23
9	15,8 $\pm$ 0,3	111	23
13	3,96 $\pm$ 0,3	110,5	22,5

Stejné měření bylo opět provedeno i na oku s uhlíkovým filmem. Zde se naměřené proudy lehce zvýšily oproti předchozímu měření. Možná docházelo k rozptylu elektronů ve vzorku obsažených, které získaly z primárního svazku energii, a pak se touto energií účastnili vzniku proudu na stínítku. Ale spíše je to způsobeno zvýšením celkového emisního proudu. Mikroskop se v průběhu měření ohříval a stejně tak i vzorek, a i další technické prvky mohli trochu měnit své parametry. Chyba mohla nastat taky v dlouhodobějším užívání pikoampérmetru, jehož svodový proud se mohl zvýšit.

V Tab. 14 je jako **1. proud stínítkem** označen naměřený proud stínítkem, kdy primární svazek procházel kondenzorovou clonou 50  $\mu\text{m}$ . Jako **2. proud stínítkem** je zde označen proud naměřený při použití i objektivové clony 50  $\mu\text{m}$ , která zachytí rozptýlené elektrony a ty se poté nepodílí na výsledném proudu na stínítku. V tabulce je i rozdíl těchto proudů, který je v rozsahu 3-7 nA. Stejně značení proudů má i Tab. 15, akorát pro vyšší napětí na kondenzorové čočce bylo nutné použít menší clonu s průměrem 30  $\mu\text{m}$ . Hodnoty proudů při vysokém napětí na kondenzoru a malé cloně se pohybují pod 32 nA a i rozdíly vzniklé rozptýlením elektronů jsou kvůli divergentnímu svazku menší. Všechny následující měření degradace vzorku pod primárním elektronovým svazkem v režimu TEM i difrakci byly provedeny s katodou **Standart FEG** při urychlovacím napětí 25 kV.

**Tab. 14 Oko s uhlíkovým filmem – závislost proudu stínítkem na velikosti  $U_{CL}$ , respektive na velikosti stopy, 1. proud = kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$ , 2. proud obě clony 50  $\mu\text{m}$**

$U_{CL}$ [kV]	1. proud stínítkem [nA]	2. proud stínítkem [nA]	rozdíl proudů [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$\varnothing$ stopy [ $\mu\text{m}$ ]
2,59	135 $\pm$ 0,3	132 $\pm$ 0,3	3	112	4,5
3	135 $\pm$ 0,3	130 $\pm$ 0,3	5	112	7,4
4,4	140 $\pm$ 0,3	133 $\pm$ 0,3	7	112	18,85
4,75	141 $\pm$ 0,3	134 $\pm$ 0,3	7	111,2	22
6,06	145 $\pm$ 0,3	138 $\pm$ 0,3	7	111,5	35,5
7,45	76,5 $\pm$ 0,3	72,8 $\pm$ 0,3	3,7	111,7	36,75

**Tab. 15 Oko s uhlíkovým filmem – závislost proudu stínítkem na velikosti  $U_{CL}$ , respektive na velikosti stopy, 1. proud = kondenzorová clona 30  $\mu\text{m}$ , 2. proud obě clony 30  $\mu\text{m}$**

$U_{CL}$ [kV]	1. proud stínítkem [nA]	2. proud stínítkem [nA]	rozdíl proudů [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	$\varnothing$ stopy [ $\mu\text{m}$ ]
7,45	31,1 $\pm$ 0,3	29,3 $\pm$ 0,3	1,8	111,7	23
9	16 $\pm$ 0,3	14,9 $\pm$ 0,3	1,1	111,7	23
13	3,98 $\pm$ 0,3	3,73 $\pm$ 0,3	0,25	111,7	22,5

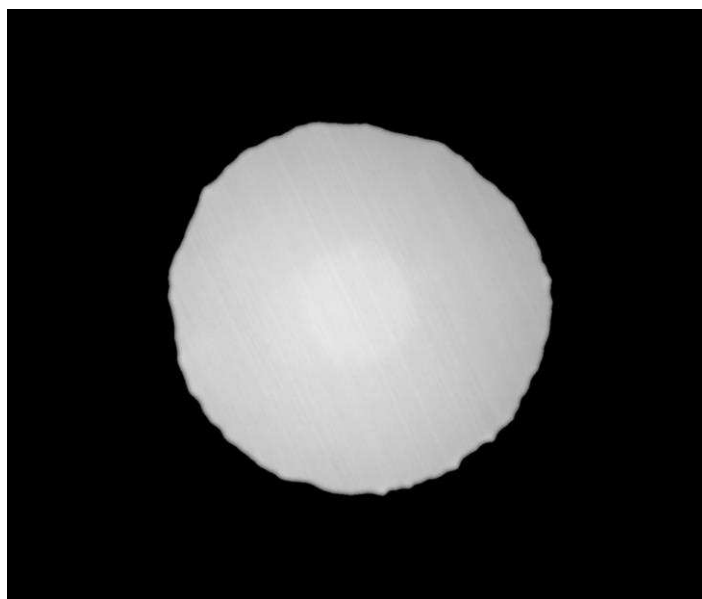
## 5.2 Měření v režimu TEM

Měření v režimu TEM bylo vždy prováděno s katodou **Standart FEG** a následujícím způsobem: Primární elektronový svazek byl fokusován pomocí kondenzorové čočky do velmi malé stopy. Rozhodující je v tomto případě průměr stopy a také proudová zátěž, tedy kolik elektronů dopadá na vzorek a doba expozice. Všechna měření byla prováděna při použití kondenzorové clony o velikosti 50  $\mu\text{m}$ . Clonou kondenzoru prochází na vzorek pouze správně fokusovaná část primárního svazku. Po několika minutách (např. 10, 20 či 60), kdy byla exponována pouze malá stopa, byl zapsán proud procházející odizolovaným stínítkem a poté byla stopa rozšířena zvýšením kondenzoru. Také bylo změněno zvětšení, aby se celá oblast (stopa) vlezla do zorného pole. Na tomto zvětšení byl zhotoven snímek, který se použil k následné analýze. [5]



### 5.2.1 Měření a analýza degradace syntetické pryskyřice

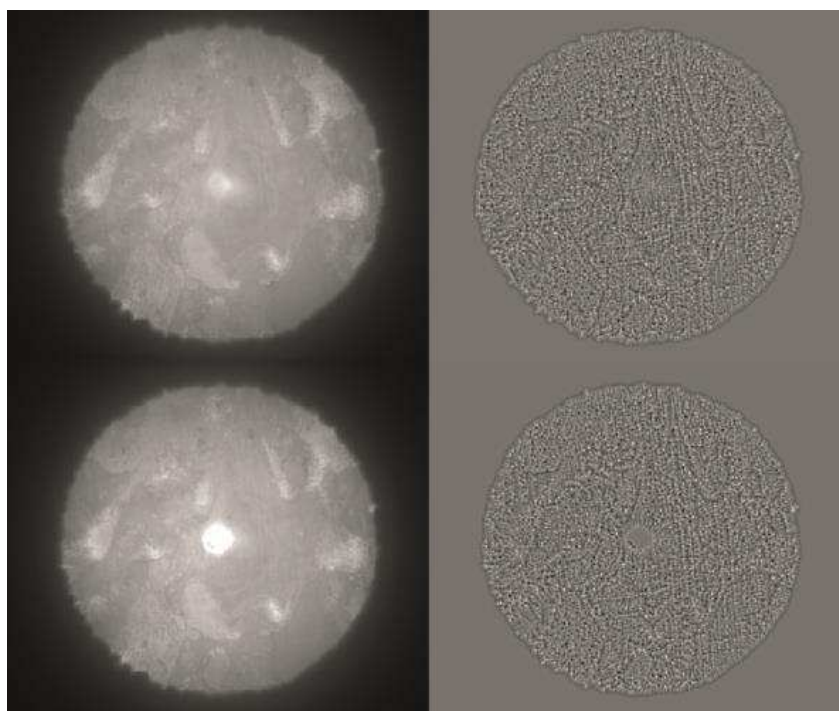
V tomto měření byl zkoumán vzorek polymerní syntetické pryskyřice EPON 812, která se často používá, jako zalévací médium. Na Obr. 21 je snímek syntetické pryskyřice, který je již předzpracováním převeden na šedotónový. Průměr stopy na tomto snímku je 16,75  $\mu\text{m}$ . Tento snímek byl následně analyzován ke zjištění změny průměrné hodnoty jasu v průběhu měření. Prvním krokem byla detekce kruhové stopy, která je v jasovém profilu vyznačena modrými čarami viz Obr. 25 a odpovídá obrazu stopy. Vše ostatní je clona, která je v obraze černá (žádné elektrony skrz ni neprojdou). [13]



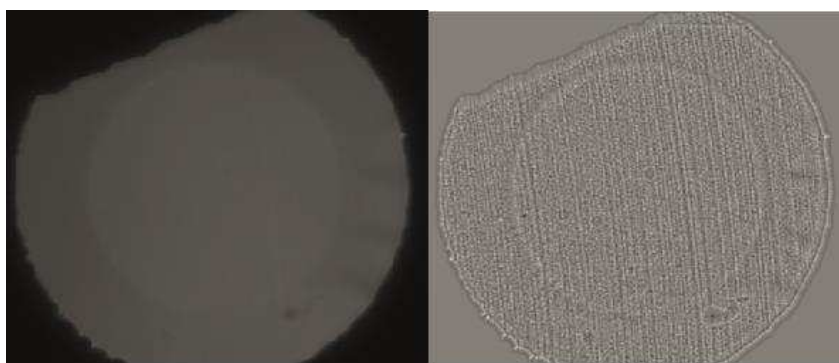
Obr. 21 Snímek pryskyřice v čase  $t = 40$  min, expozice kamery = 5 ms, zvětšení 120,  $U_{cl} = 3$  kV

Na snímku je však důležitá malá kruhová stopa, která je „vypálená“ uprostřed. Ta je ovšem jen s nepatrným rozdílem jasu oproti okolí. Což lze vidět i v jasovém profilu (na Obr. 25), malý schod se zde nachází, avšak na hranovou detekci to nestačí. Z těchto důvodů nelze využít automatickou kruhovou detekci pomocí Houghovy transformace (HT), kterou sice lze nalézt otvor clony, ale ne menší exponovanou stopu. V práci byla snaha i o využití Fast Radial Symmetry Transform (dále jen FRST) viz [21], avšak ani tato metoda není schopna detekovat menší stopu ve všech případech. Na Obr. 22 je provedená FRST na vzorku řasinkového epitelu a je zde vidět, že v menších časech, kdy měla vypálená stopa oproti okolí nízký kontrast metoda selhává. V čase 220 minut, kdy je ve středu vzorek degradován úplně, už kruh po provedení FRST vidět lze. A v testovacím snímku pryskyřice (Obr. 23), který v práci nakonec nebyl vůbec použit si FRST vedla velmi dobře, zde je menší vypálená stopa velmi zřetelná. Ve všech uvedených případech byl vstupem metody FRST

obraz a parametry: průměr prohledávaného kruhového okolí 1 a 5 px a druhý vstupní parametr 1 určuje, jak moc symetrický objekt v obraze předpokládáme (1 je pro kruhový objekt). Jelikož HT i FRST metody selhávaly byl v práci kladen důraz na pečlivě provedené měření. V měření lze stopu centrovat pomocí oktupólů a tím pádem lze střed obrazu zcentrovat blízko středu menší (i větší) stopy, tak aby stopa byla uprostřed obrazu. [18][19][20][21]



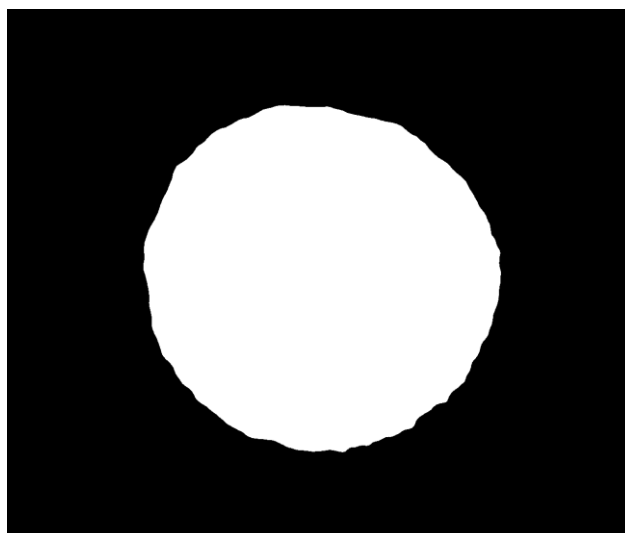
**Obr. 22 Snímek řasinkového epitelu ve 120 minutě (vlevo nahoře) a 220 minutě (vlevo dole) a provedená FRST těchto snímků (vpravo)**



**Obr. 23 Snímek syntetické pryskyřice ve 30 minutě (vlevo) a provedená FRST tohoto snímku (vpravo)**

Zpracování nasnímaných obrazů začalo vytvořením **binární masky**, která kopíruje okraj clony neboli prošlou elektronovou stopu viz Obr. 24. Díky vytvoření binární masky a vynásobení s původním obrazem se odstranily okrajové pixely (s jasmem

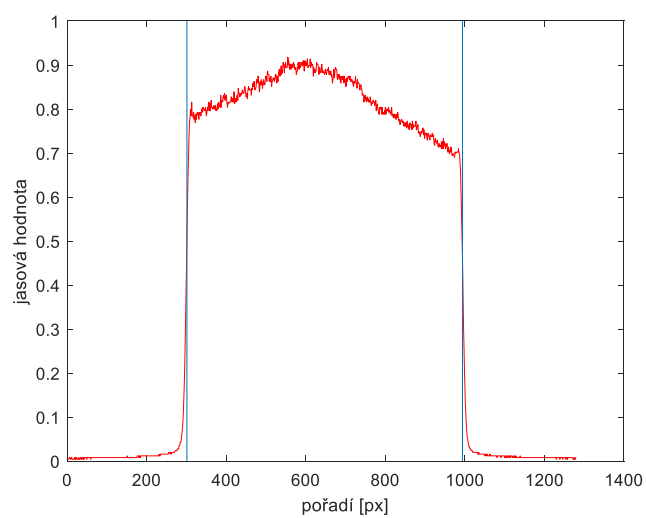
menším než  $\sim 0.45$ ), které měly odstín tmavě šedé a odpovídají elektronům, které se objektivovou a projekční soustavou vychýlily od kolmice optické osy, až za hranu clony. Po vynásobení původního snímku s binární maskou byla provedena 2D konvoluce snímku a průměrující masky (3x3), která je typu dolní propust a redukuje Gaussovský šum. [18][19][20]



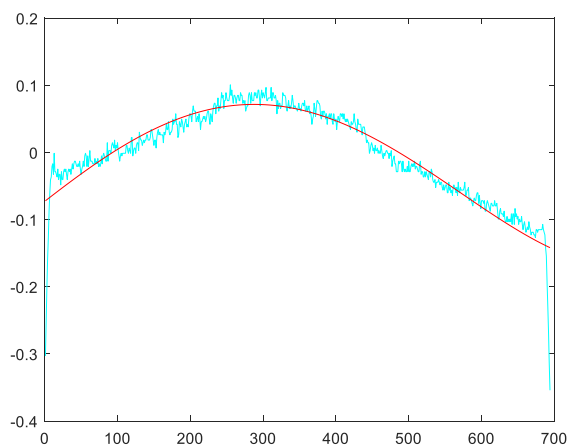
Obr. 24 Binární maska stopy (clony)

Vytvořenou binární masku lze použít k detekci hran, a tedy i k následné automatické detekci kruhu pomocí Houghovy transformace, ovšem opět pouze k získání celé (větší) stopy. Místo toho byla využita pouze k přibližnému určení průměru celé stopy, a to díky počtu jedniček v řádku i sloupci a zprůměrováním těchto dvou hodnot. Také je možné tyto binární masky, které se vytváří pro všechny časově posunuté snímky, použít pro lícování obrazů a zjistit jak se celá stopa (a její střed) v průběhů měření pohybuje. Aby to platilo i o menší (vypálené) stopě musí být přesně ve středu větší stopy. Lícování obrazů nakonec využito nebylo. [18][19]

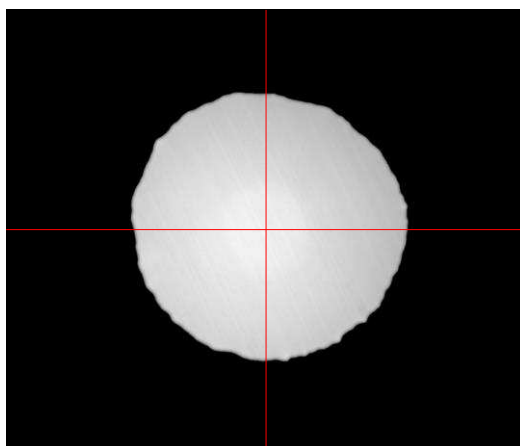
Při získání snímků, které byly nasnímány z homogenního vzorku pryskyřice, došlo ke světelným vadám objektivu jako je vinětace, což má za následek nehomogenitu jasu v obrazu, která je viditelná na jasovém profilu viz Obr. 25. Z důvodu zkreslení výsledků bylo nutné vytvořit korekční masku, která odpovídá nehomogennímu dopadu elektronů a tuto masku od původního obrazu odečíst k tomu slouží funkce **inhomogeneity**, kde vstupem je obraz a binární maska. Pro korekci jasu byla zvolena polynomická funkce 4. řádu, která je červeně vyobrazena na Obr. 26 a kopíruje průběh původních, ale upravených, jasových hodnot, které se nacházejí mezi modrými čarami na Obr. 25. Tato funkce byla vypočítána ve svislé i vodorovné ose, procházející středem snímku viz červený kříž na Obr. 27, a zprůměrováním jednotlivých prvků obou funkcí byla vytvořena čtvercová matice viz Obr. 28.



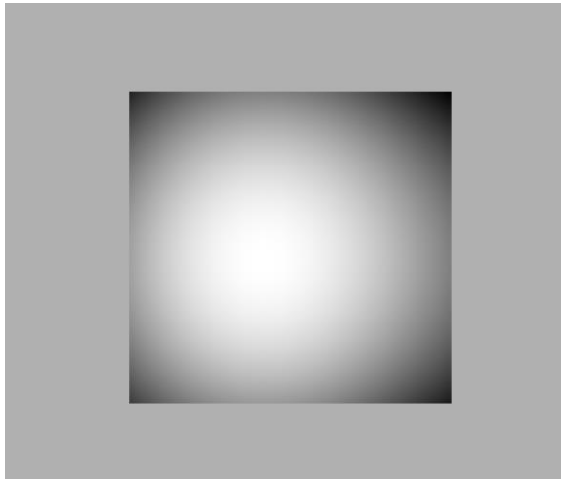
**Obr. 25** Jasový profil procházející středem nasnímaného obrazu



**Obr. 26** Upravený jasový profil s průměrem kolem 0 a červeně korekční polynom

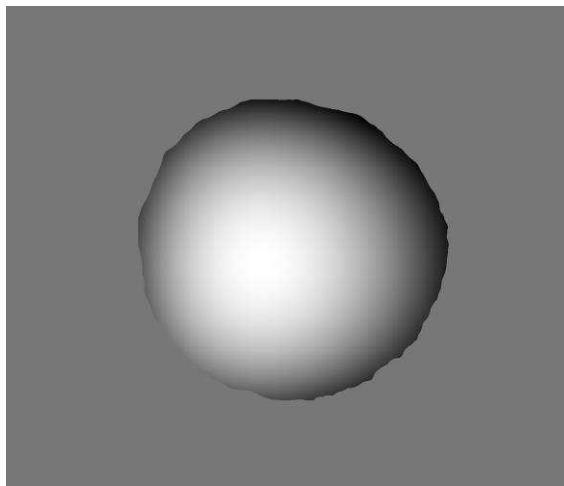


**Obr. 27** Pro korekci byl zvolen jasový profil skrz středový pixel (540, 640) ve svislém i vodorovném směru

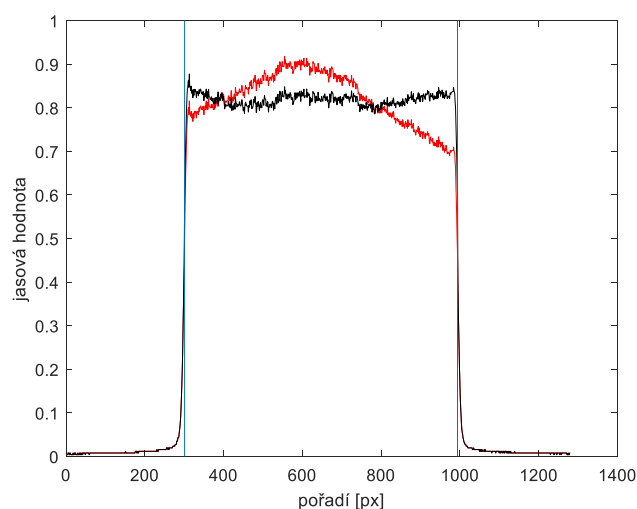


**Obr. 28 matice zprůměrovaných hodnot ze svislého a vodorovného korekčního polynomu (jasové hodnoty jsou normalizovány)**

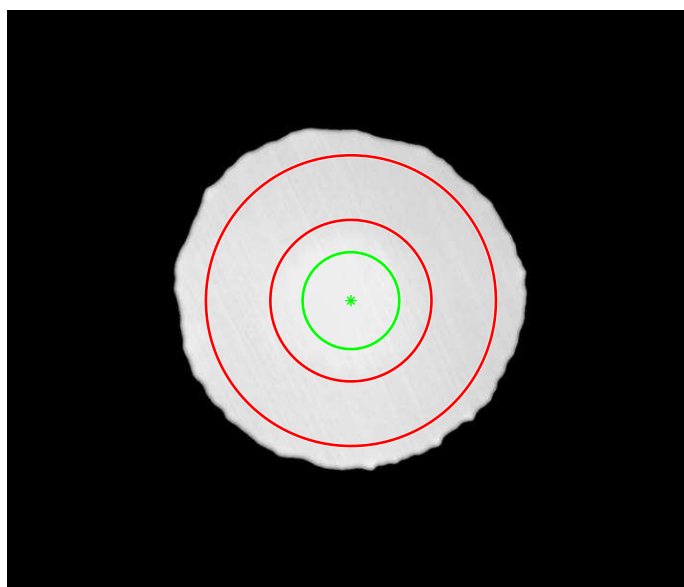
Matice byla následně ořezána **binární maskou** z prvního kroku zpracování a tím vznikl Obr. 29 a takto upravené nehomogenní pozadí bylo odečteno od původního obrazu. Toto pozadí má rozsah hodnot přibližně  $\pm 0.07$ , na obrázku je však normalizováno, aby byl viditelný kontrast. Po odečtení byl získán výstupní obraz funkce **inhomogeneity**, kromě něj je výstupem i průměrná velikost celé stopy. Jasový profil výstupního (nově vzniklého) obrazu je černě na Obr. 30.



**Obr. 29 Korekční matice vynásobená s binární maskou (jasové hodnoty jsou normalizovány)**



**Obr. 30 Nově vzniklý jasový profil (černě) a původní nehomogenní jasový profil (červeně)**

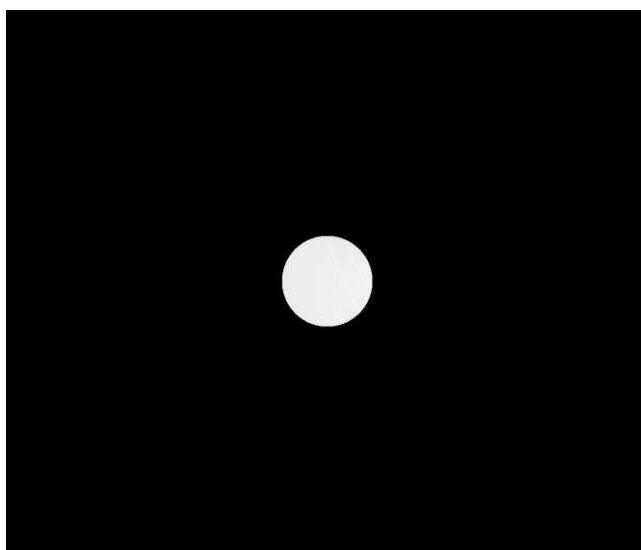


**Obr. 31 Původní snímek pryskyřice v čase  $t = 90$  min, zvětšení 120, zeleně je vyříznutý střed a červeně mezikruží okolí**

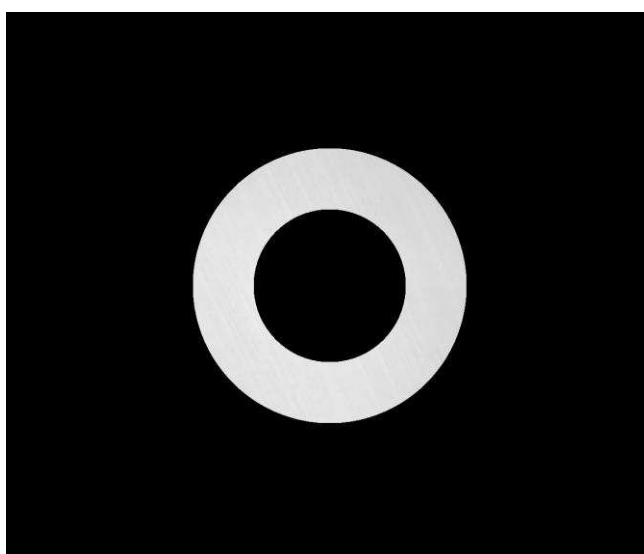
Následně byla vytvořena funkce **cutting** (inspirována z [27]), jejíž vstupem je výstupní obraz s upravenou homogenitou z předchozí funkce a dále souřadnice středu (viz zelená hvězdička \* v Obr. 31) a průměr menší stopy a menší z kružnice v mezikruží. Jako souřadnice středu byl vždy zvolen středový pixel obrazu samotného. Pomocí této funkce se ze snímku vyřízla (vynásobením s kruhovou maskou) menší stopa viz zelený kruh v Obr. 31. Tato stopa odpovídá povrchu vzorku, který byl primárním svazkem elektronů ozařován po celou dobu měření. Stopa byla vyříznuta se značnou rezervou, aby okrajové pixely neovlivňovaly výsledek, jelikož okrajová část vnitřního kruhu nemusela být exponována po celou

dobu, protože se primární elektronový svazek mohl kvůli nestabilitě lehce pohybovat. Vyříznutá stopa se nachází na Obr. 32. Ze všech snímků stop v čase byla vypočtena průměrná jasová hodnota pixelů a zaznamenána do vektoru.

Taktéž bylo vyříznuto okolí malé stopy (mezikruží), které bylo exponováno minimálně – pouze při pořizování snímků. Mezikruží se vyříznulo také s rezervou, aby nebylo ovlivněno okrajovými pixely ani z jedné strany viz červené mezikruží v Obr. 31. Pro vytvoření mezikruží se použila 2D konvoluce s dvěma kruhovými maskami, kdy se od větší (průměr 400 px) odečetla menší (průměr 270 px) a vznikl tak Obr. 33. I z tohoto mezikruží byla vypočtena průměrná jasová hodnota a zaznamenána do vektoru.



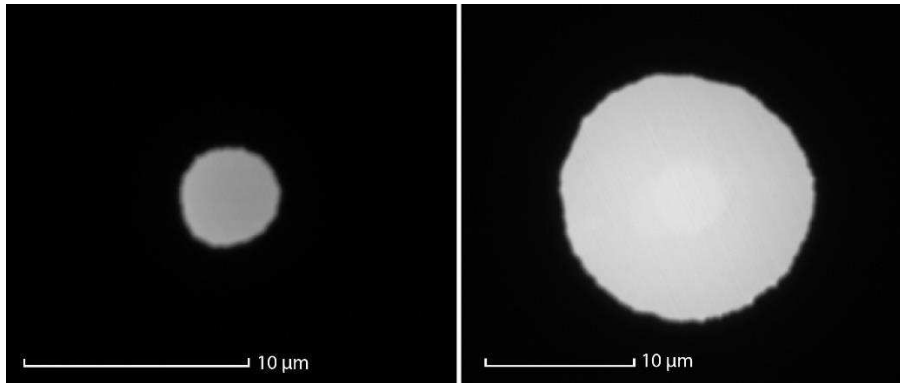
**Obr. 32 Vyříznutý střed v čase  $t = 90$  min**



**Obr. 33 Mezikruží okolí v čase  $t = 90$  min**

## 5.2.2 Výsledky analýzy degradace syntetické pryskyřice

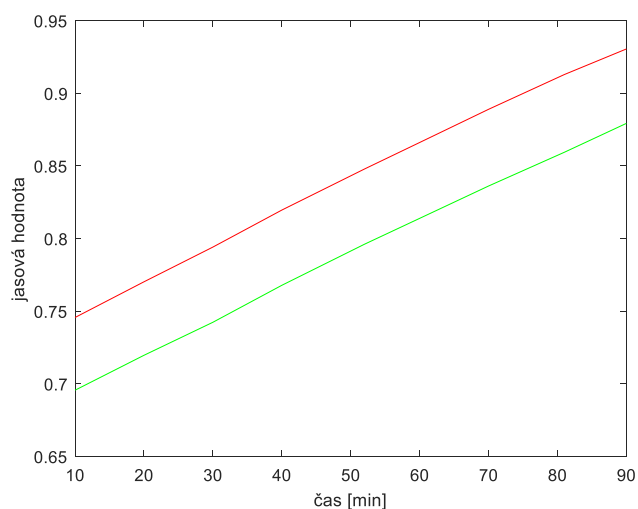
Menší exponovaná stopa měla průměr 4,5  $\mu\text{m}$ , použité  $U_{\text{CL}}$  bylo 2,59 kV. Snímky byly pořízeny s parametry: zvětšení 180 se zorným polem – Field of View (dále jen FoV) 20,1  $\mu\text{m}$ , expozice kamery 0,5 ms. Po změně zvětšení a vytvoření snímků, které byly zpracovávány, byly parametry následující: zvětšení 120 s FoV 30,1  $\mu\text{m}$ ,  $U_{\text{CL}} = 3,5$  kV a expozice kamery 5 ms. Na Obr. 34 jsou zhotovené snímky obou stop po 20 minutách od začátku měření.



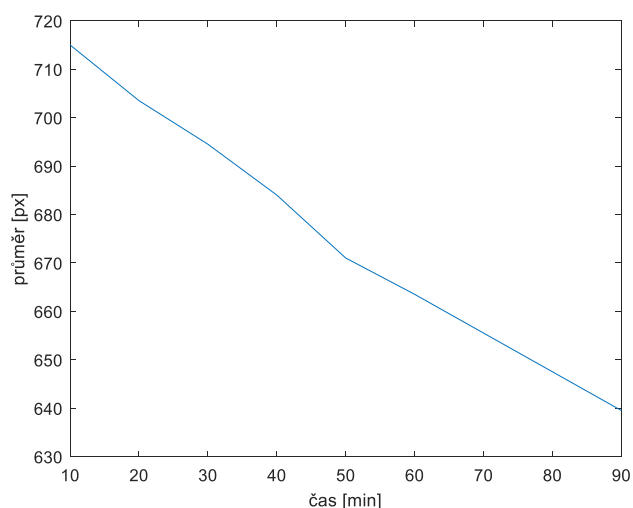
**Obr. 34 Menší exponovaná stopa s průměrem 4,5  $\mu\text{m}$ , zvětšení 180 a FoV 20,1  $\mu\text{m}$  (vlevo) a stopa po změně zvětšení na 120 a FoV 30,1  $\mu\text{m}$  (vpravo) obě stopy jsou v čase 20 minut od začátku měření**

Výsledné průměrné jasové hodnoty středu (menší stopy) a okolí byly vyneseny do grafu, kde na ose x je čas v minutách. V tomto měření byla syntetická pryskyřice pod vlivem elektronového svazku po dobu 90 minut. Červeně je vyobrazena křivka (trend) změny průměrné hodnoty jasu menší exponované stopy (středu) a zeleně je pak křivka změny průměru jasu okolí. Je zde patrné, že v čase docházelo k lineárnímu zvyšování těchto průměrných jasových hodnot, avšak zvedaly se hodnoty obou stop viz Obr. 35. Spíše se dalo očekávat, že se bude zvyšovat jas pouze v menší stopě, jelikož dochází k úbytku pryskyřice. Oproti tomu jas okolí by měl zůstat konstantní nebo se zvyšovat jen nepatrně. Kromě změny jasu došlo i ke změně průměru stopy a to z 720 px na 639 px viz Obr. 36, což je způsobeno nestabilitou stopy, a i z tohoto důvodu se mohl jas v obrazech zvyšovat.





**Obr. 35 Změna průměrné jasové hodnoty v čase, menší středová stopa (červeně) a okolí - vnější mezikruží (zeleně) u vzorku syntetické pryskyřice**



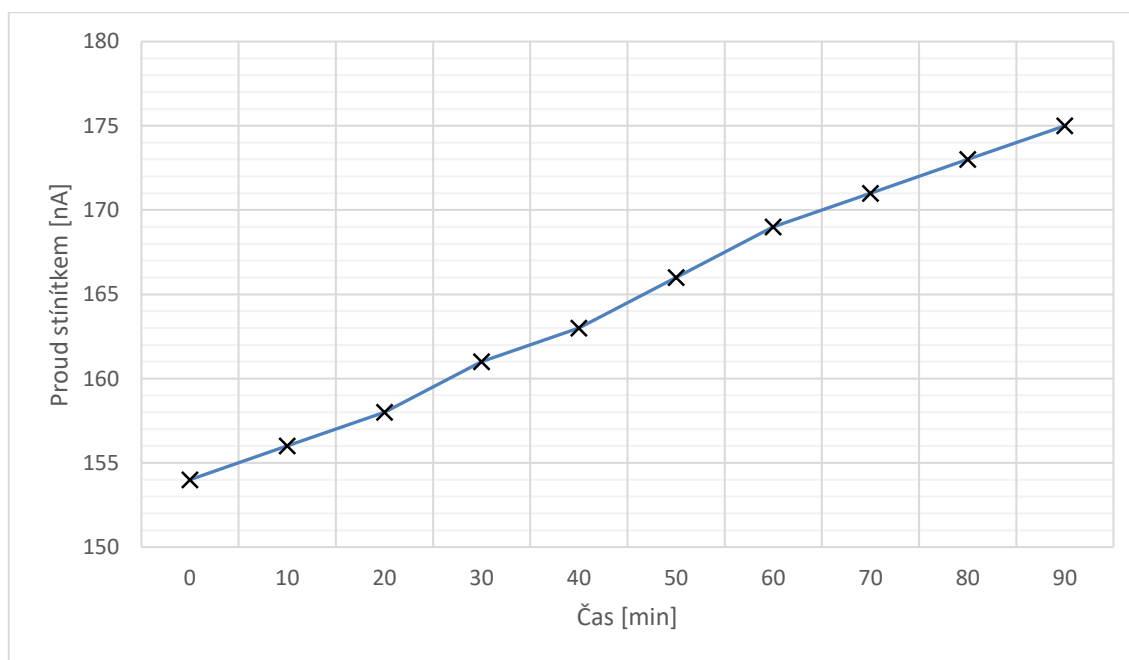
**Obr. 36 Průměr velké stopy změna v čase u syntetické pryskyřice**

Po celou dobu měření byl zaznamenáván proud odizolovaným stínítkem. Kromě zvýšení jasu v průběhu měření se úměrně zvyšoval i proud procházející stínítkem viz Tab. 16 a graf na Obr. 37. Ovšem mohlo to být způsobeno již zmíněnou změnou průměru stopy. Při tomto měření bylo zvoleno  $U_{SUP} = 600 \text{ V}$ , což není běžně používaná hodnota a proudy na stínítku jsou díky tomu vyšší. Napětí na supresoru bylo sníženo, jelikož při napětí 1000 V nedocházelo ani po 60 minutách k žádné viditelné změně jasu v malé exponované stopě ve středu snímku, tedy nebyla pozorovatelná žádná degradace pryskyřice. Druhou možností bylo více zmenšit průměr stopy pomocí  $U_{CL}$ , takové měření bylo provedeno u vzorku řasinkového

epitelu níže. Zvyšoval se i emisní proud, jak docházelo ke stabilizování katody a celého mikroskopu, což mohlo mít na zvyšování proudu stínítkem vliv.

Tab. 16 Proud procházející stínítkem v závislosti na čase u syntetické pryskyřice

čas [min]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu$ A]	celková dávka [C/cm <sup>2</sup> ]
0	154	122,4	0
10	156	122,6	588,5
20	158	122,9	1184,6
30	161	123,1	1792,0
40	163	123,4	2406,9
50	166	123,6	3033,1
60	169	123,6	3670,7
70	171	123,9	4315,8
80	173	124,1	4968,5
90	175	124,4	5628,7



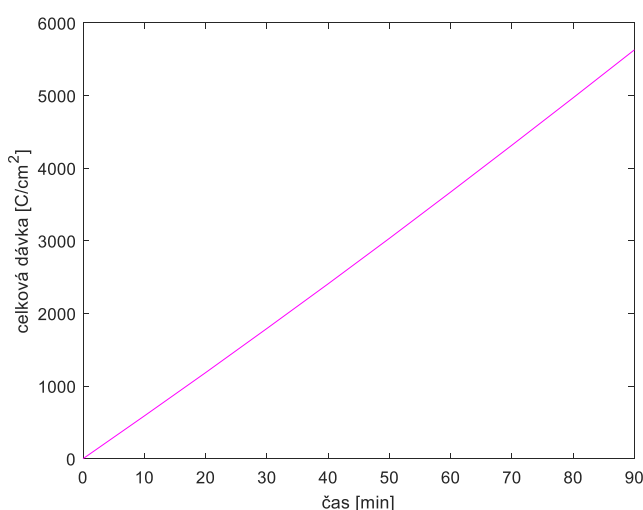
Obr. 37 Časový vývoj proudu procházející stínítkem u vzorku syntetické pryskyřice

V Tab. 16 je uvedena i vypočtená celková dávka elektronů, kterou byl vzorek ozářen. Dávka je vypočtena dle rovnice 5.1 respektive 5.2 a odpovídá konečné dávce elektronů v menší exponované stopě v daném čase. Průběh je lineární a nachází se na Obr. 38. Jelikož se v průběhu měření měnil elektrický náboj (měnil se okamžitý proud) je celková dávka  $D(n+1)$  vypočítána vždy jako přírůstek z předchozího intervalu. Časový interval  $n$  odpovídá  $\Delta t$  minutám (vždy záleží na daném měření).

Uvedeme si příklad: Vypočtená celková dávka v čase 40 minut je vypočtena za interval 10 ( $\Delta t$ ) minut (600 sekund), kdy byl proud 163 nA a k ní připočtena předchozí dávka do 30. minuty. Kdyby se celková dávka počítala od času 0 nevyšla by skutečná dávka, kterou byl vzorek ozářen, protože v čase 0 nebyl proud na stínítku roven 163 nA, ale pouze 156 nA. Elektrický proud, a tedy i náboj se postupně vyvíjel (zvyšoval).

$$D(n) = D(n - 1) + \frac{i(n) \cdot \Delta t \cdot 60}{\pi r^2} \quad (5.2)$$

Kde  $D(n)$  je počítaná celková dávka,  $D(n-1)$  je dosavadní (předchozí) dávka,  $i(n)$  je proud stínítkem v aktuálním časovém intervalu o době trvání  $\Delta t$  a  $r$  je poloměr stopy

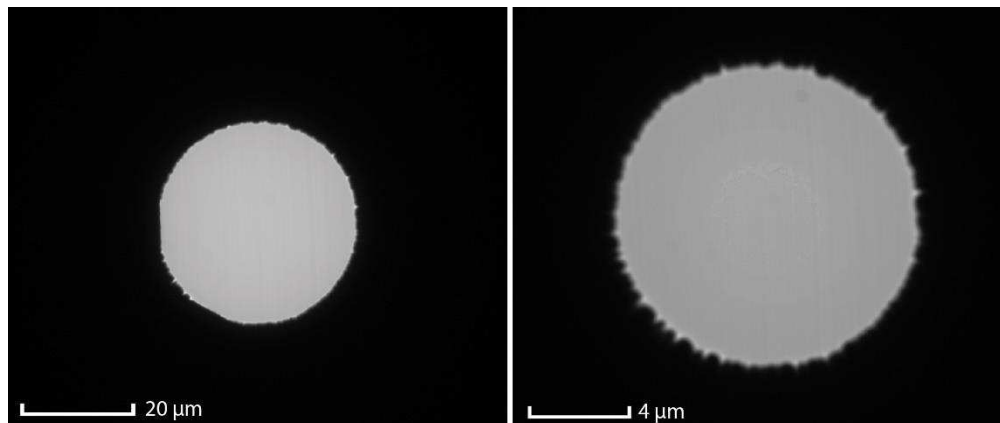


Obr. 38 Konečná celková dávka elektronů v čase u syntetické pryskyřice

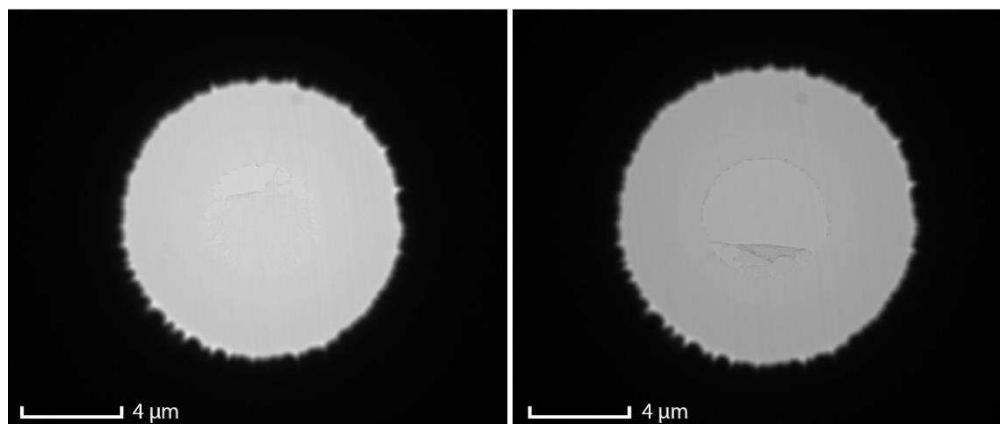
### 5.2.3 Měření a analýza degradace uhlíkového filmu

V průběhu měření vlastností katody Standart FEG (viz 5.1.2) došlo při měření proudu skrz uhlíkový film k jeho degradaci. Při tomto měření byly měřeny parametry katody, a nikoliv dělány snímky pro následnou analýzu. Avšak jeden snímek na začátku měření proveden byl a jakmile se začala cca po 45 minutách měření objevovat degradace (došlo k významným ionizačním účinkům) bylo provedeno několik snímků, které degradaci zachycují. Snímky nejsou provedeny s jednotnými parametry, mají různé  $U_{Cl}$ , odlišnou expozici i různou velikost stopy a FoV. Proud stínítkem měřen nebyl a pohyboval se v celém rozsahu viz Tab. 14 a Tab. 15, tím pádem i zatížení vzorku bylo různé. Napětí na supresoru bylo po celou dobu 1000 V.

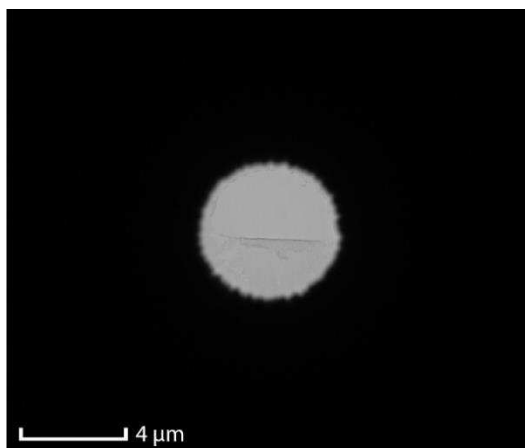
Na Obr. 39 je zobrazen uhlíkový film na začátku měření vlastností katody Standart FEG (vlevo) a vedle něj se nachází snímek, kdy začalo docházet k viditelnému poškození uhlíkového filmu. Vypálená díra měla po 65 minutách rozměr 4,7  $\mu\text{m}$  a je zobrazena na Obr. 40 vpravo. Uhlíkový film se protrhal a kolem 60 minuty se zvlnil viz Obr. 41.



**Obr. 39 Uhlíkový film na začátku měření (vlevo) a začínající degradace uhlíkového filmu po 45 minutách (vpravo)**

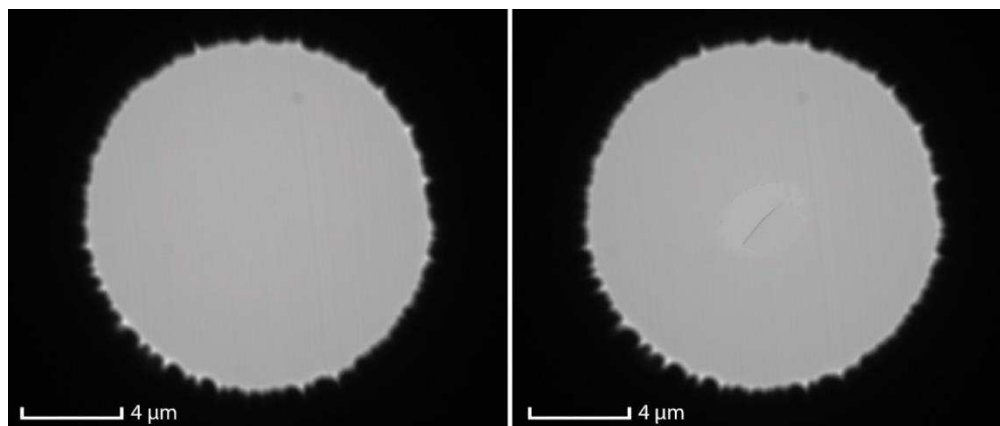


**Obr. 40 Vznikající otvor v uhlíkovém filmu po 55 minutách (vlevo) a úplná degradace uhlíkového filmu po 65 minutách (vpravo)**

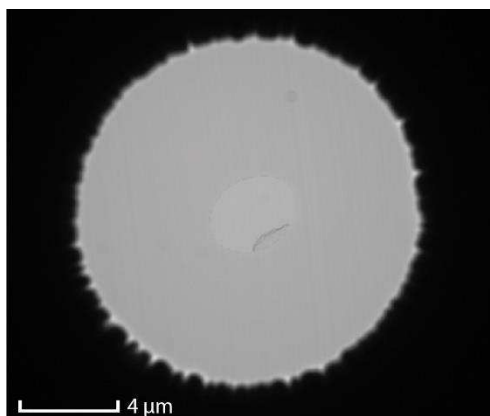


**Obr. 41 Vznikající otvor v uhlíkovém filmu po 60 minutách**

Na základě pozorování degradace uhlíkového filmu bylo zhotoveno měření, při kterém se již měřil proud procházející stínítkem. Bylo zvoleno  $U_{CL} = 2,35$  kV, takže stopa dosahovala průměru  $3 \mu\text{m}$  a na uhlíkový film dopadal proud elektronů 128 nA, který se v průběhu měření a propálení uhlíkového filmu zvýšil na 132 nA. Jelikož byla stopa menší došlo k propálení filmu již po 15 minutách. Možná zde byl uhlíkový film tenčí než na předchozím oku sítky, ale spíše za to může větší množství elektronů fokusovaných do menší stopy. Po 20 minutách již byl uhlíkový film „srolován“ úplně viz Obr. 43.



**Obr. 42 Snímek před začátkem měření (vlevo) a snímek po 15 minutách (vpravo)  $U_{CL} = 4$  kV, zvětšení 120, FoV  $19,5 \mu\text{m}$  a expozice kamery 15 ms**



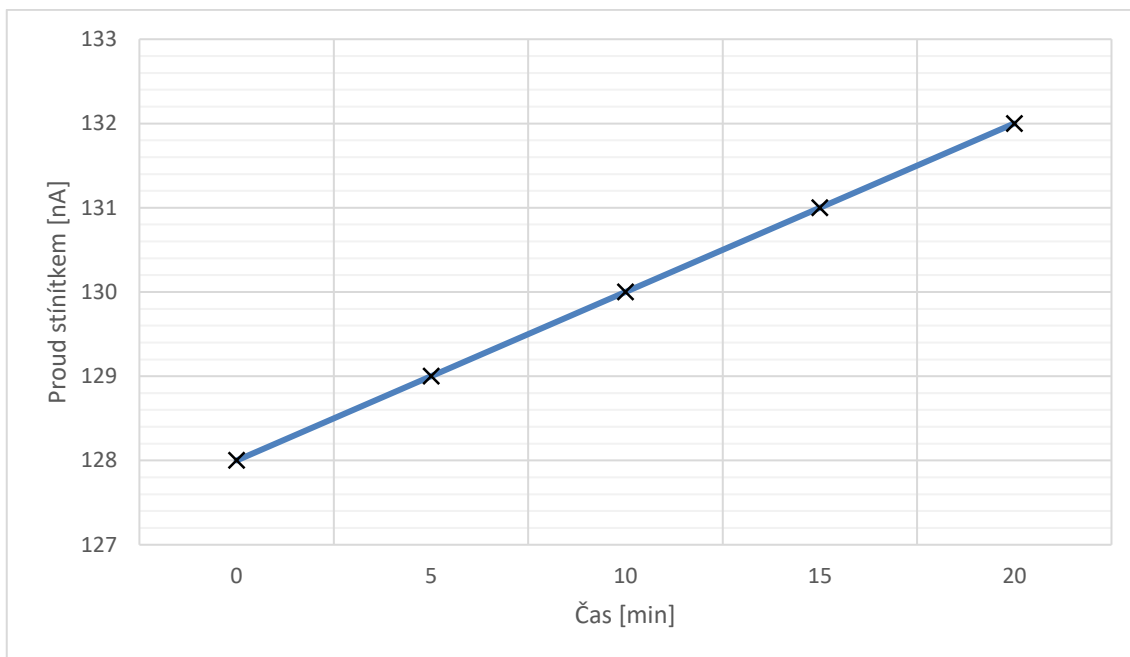
Obr. 43 Snímek propáleného uhlíkového filmu po 20 minutách,  $U_{CL} = 4$  kV, zvětšení 120, FoV 19,5  $\mu\text{m}$  a expozice kamery 15 ms

## 5.2.4 Výsledky měření degradace uhlíkového filmu

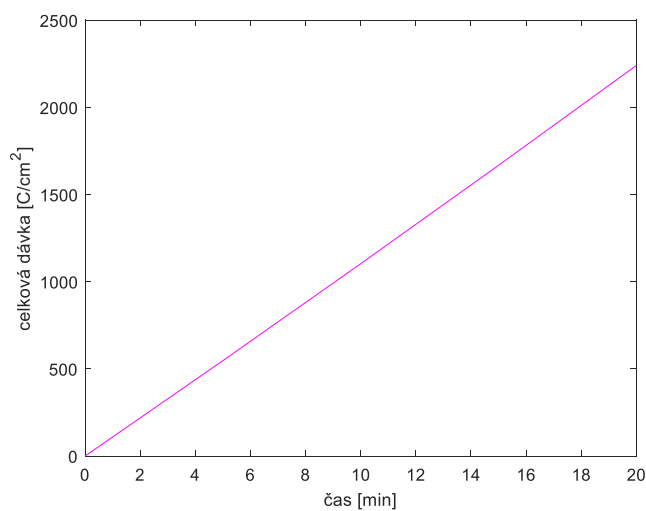
Jelikož k degradaci došlo nejprve při měření vlastností katody Standart FEG a poté již po 15 minutách nelze provést stejnou analýzu, jako u vzorku syntetické pryskyřice, z důvodu nedostatku naměřených snímků. Zaznamenaný proud stínítkem v intervalech po 5 minutách se nachází v Tab. 17 a tyto hodnoty jsou také vyneseny do grafu viz Obr. 44. Bohužel i při tomto měření byl na odizolovaném stínítku svodový proud o velikost  $\pm 0,3$  nA. Jak docházelo k prozáření filmu, tak se proud procházející stínítkem lineárně zvyšoval a stejně tak se lineárně zvyšovala (viz Obr. 45) i vypočtená celková dávka elektronů pomocí rovnice 5.1 respektive 5.2. Kvůli svodu na stínítku je celková dávka taky ovlivněna a odchylky jsou uvedeny v tabulce a oproti vypočteným hodnotám je rozdíl cca  $\pm 0,23$  %.

Tab. 17 Proud procházející stínítkem v závislosti na čase u uhlíkového filmu

čas [min]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	celková dávka [ $\text{C}/\text{cm}^2$ ]
0	128 $\pm 0,3$	111	0
5	129 $\pm 0,3$	111	547,5 $\pm 1,27$
10	130 $\pm 0,3$	111	1099,2 $\pm 2,5$
15	131 $\pm 0,3$	111	1655,2 $\pm 3,8$
20	132 $\pm 0,3$	111	2215,4 $\pm 5,1$



**Obr. 44 Časový vývoj proudu procházející stínítkem u uhlíkového filmu**

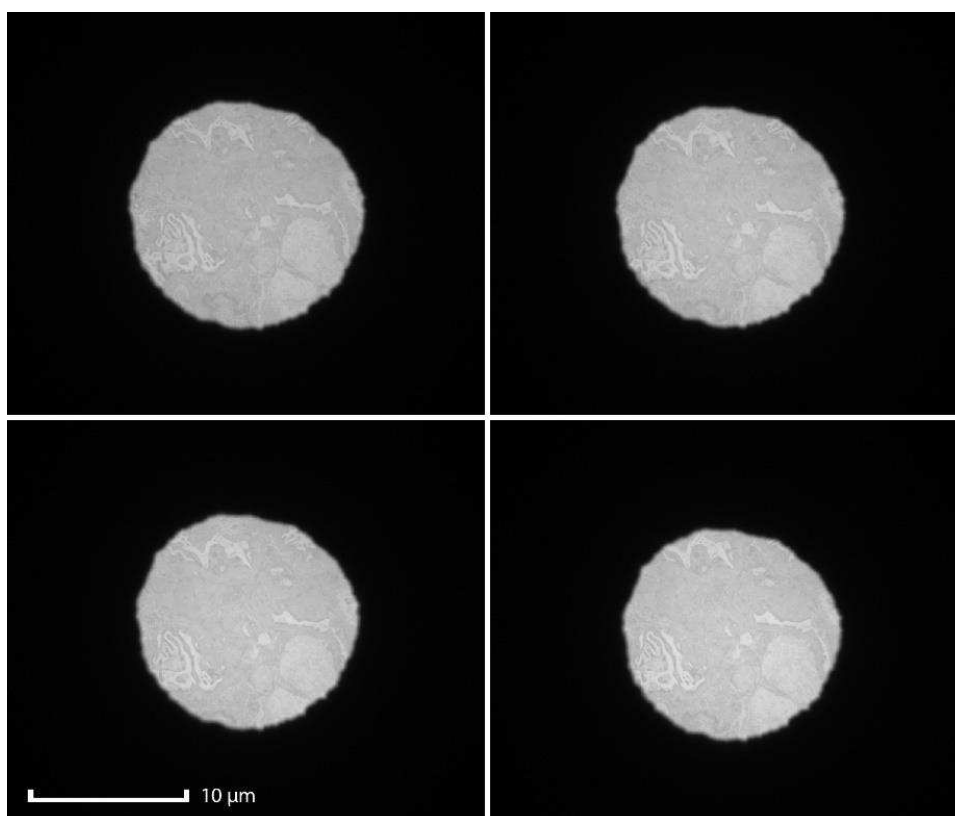


**Obr. 45 Konečná celková dávka elektronů v čase u uhlíkového filmu**

### 5.2.5 Měření degradace vzorku Cilium – řasinkový epitel

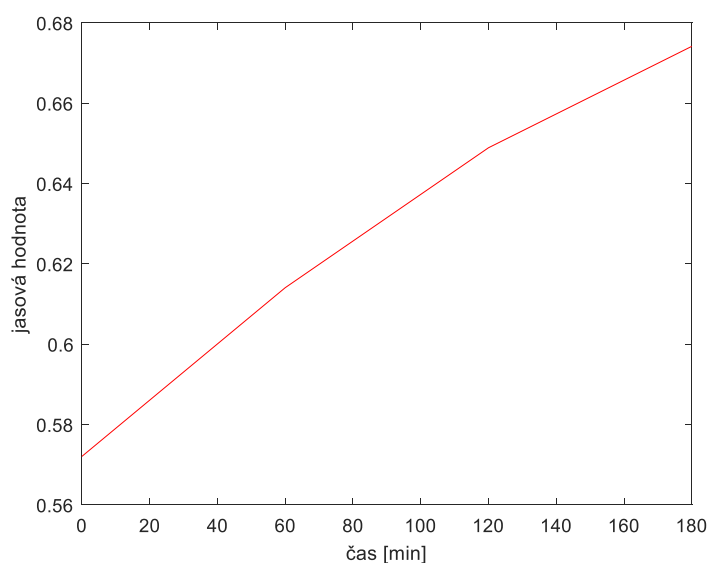
V práci byl testován organický vzorek Cilium – řasinkový epitel, a to celkově ve dvou měřeních. Tento vzorek byl zalit v syntetické pryskyřici Epon 812 a nařezán na velmi tenké plátky pomocí ultramikrotomu. Protože se jedná o organický vzorek, který je nehomogenní nebylo možné použít totožnou analýzu obrazů jako pro analýzu syntetické pryskyřice.

**V prvním měření** měla menší exponovaná stopa průměr 4,5  $\mu\text{m}$ , použité  $U_{\text{CL}}$  bylo 2,59 kV. Snímky byly pořízeny s parametry: zvětšení 120,  $U_{\text{CL}} = 3,4$  kV a expozice kamery 10 ms. Protože tento biologický preparát degradoval pomalu byly snímku pořizovány jednou za hodinu až do konečných 3 hodin pod vlivem primárního elektronového svazku. Na Obr. 46 se nachází všechny 4 pořízené snímky. Z obrázku je patrné, že docházelo ke zvyšování jasu. Jehož průměrná hodnota se lineárně zvedala a v závislosti na čase se nachází v Obr. 47. Průměrná jasová hodnota je v tomto případě vypočítána z celé stopy kvůli nehomogenitě vzorku a taky z důvodu nepřítomnosti vypálené menší stopy na středu. Díky tomu mohlo dojít k chybě, protože ne na všech snímcích se nachází úplně stejná část vzorku, avšak průměrování tuto chybu redukuje. Snímky byly předtím předzpracovány vynásobením s **binární maskou** a následnou filtrací dolní propustí. Kromě změny jasu došlo kvůli nestabilitě svazku ke zmenšení průměru stopy, lze si toho povšimnout i v Obr. 46, a velikost stopy v závislosti na čase je vynesena v Obr. 48. Za 3 hodiny došlo ke zmenšení průměru stopy o cca 43 px, což může být důvod i zvýšení celkového jasu v průběhu měření. U tohoto měření nebyl připojen pikoampérmetr a tudíž nejsou zaznamenány žádné hodnoty proudu na odizolovaném stínítku.

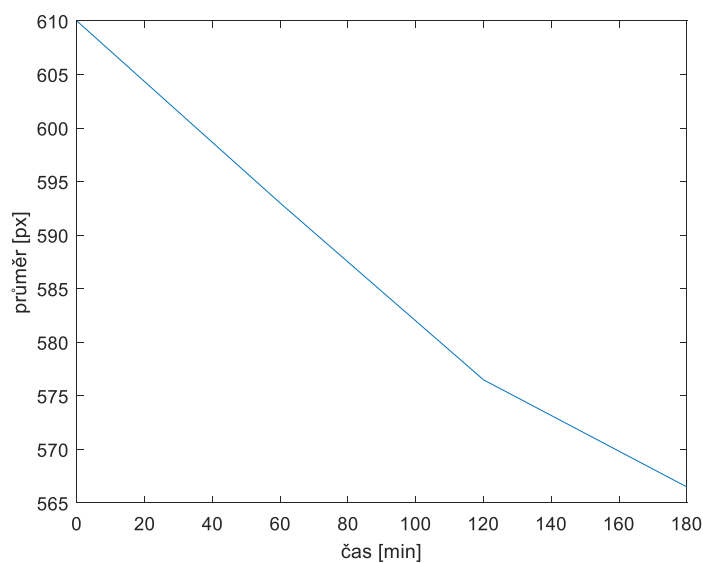


**Obr. 46 První měření - Pořízené snímky řasinkového epitelu v časech  $t = 0$  (vlevo nahoře),  $t = 60$  min (vpravo nahoře),  $t = 120$  minut (vlevo dole) a  $t = 180$  minut (vpravo dole), všechny snímky jsou nasnímány s  $U_{\text{CL}} = 3,4$  kV, zvětšení 120, FoV 30,1  $\mu\text{m}$  a expozicí 10 ms**





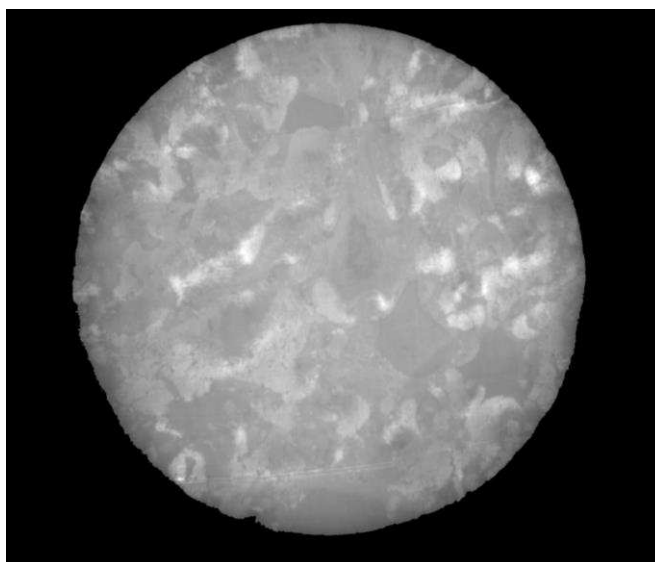
**Obr. 47 První měření - Změna průměrné jasové hodnoty celého obrazu v čase u řasinkového epitelu**



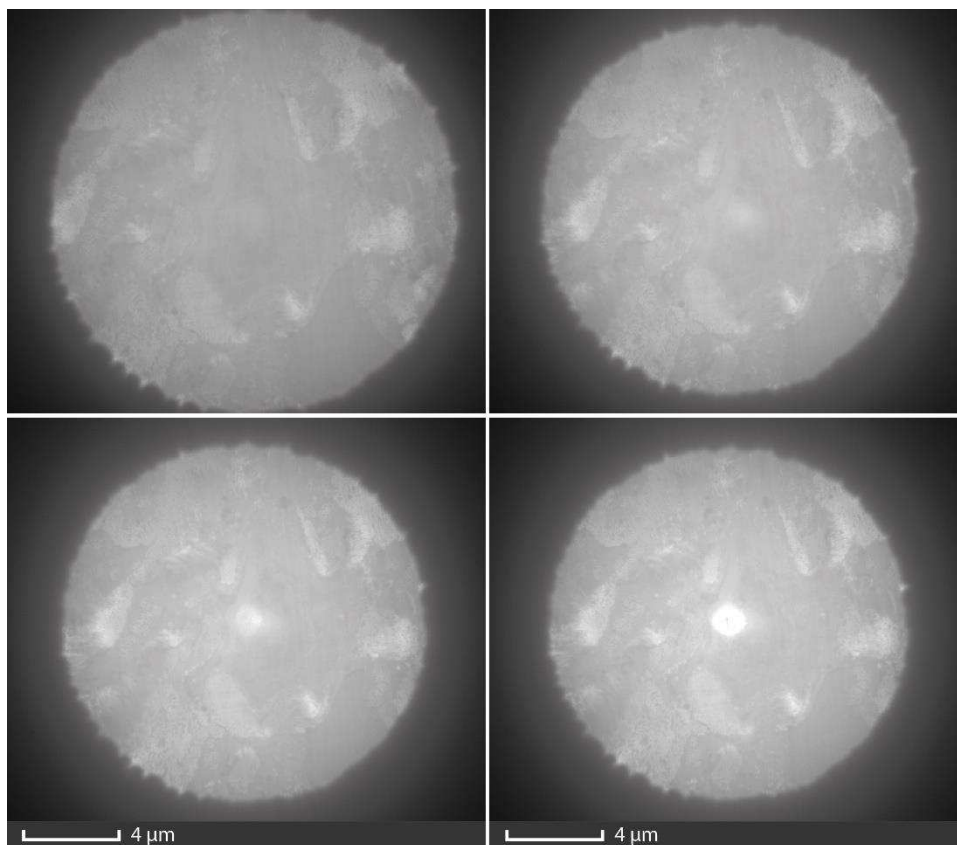
**Obr. 48 První měření - Průměr velké stopy změna v čase u řasinkového epitelu**

**V druhém měření** řasinkového epitelu probíhalo zaznamenávání snímků častěji, každých 20 minut a již byl měřen i proud stínítkem. Zároveň bylo zvoleno nízké  $U_{CL} = 1,68$  kV (menší stopy), kdy byla stopa fokusována do blízkosti křížště, a tak měla průměr jen  $1 \mu\text{m}$  a vzorek dostával v tomto místě vysokou celkovou dávku elektronů. Proto byla použita stejná analýza, jako pro syntetickou pryskyřici, ale nebyla odečítána nehomogenita pozadí. Několik pořízených snímků, od dvacáté minuty dále v intervalu po 1 hodině, jsou zobrazeny na Obr. 50. Zde lze spatřit, že u posledního snímku, je do vzorku vypálená díra, jejíž velikost je přibližně  $1 \mu\text{m}$ .

Taky si lze povšimnout, že primární svazek byl opět nestabilní a první zde viditelný snímek má větší průměr. U všech původních snímků (viz Obr. 50) je v okolí stop patrný odstín šedi, který byl, stejně jako v prvním měření, odstraněn při vynásobení **binární maskou** a taktéž proběhla filtrace Gaussovského šumu, díky 2D konvoluci obrazu a průměrující masky viz Obr. 49, kde se nachází vyfiltrovaný obraz ze začátku měření, při jehož snímání byla navíc přítomna i objektivová clona 50  $\mu\text{m}$ , a proto má lepší kontrast. Objektivová clona blokuje rozptýlené elektrony, a tak při dalším měření použita nebyla, aby proud na stínítku odpovídal proudu procházejícím vzorkem. Proud procházející stínítkem s objektivovou clonou je **61,4 nA**, zatímco bez ní se v průběhu měření pohybuje v rozmezí **125 až 132 nA**. Což poukazuje na fakt, že rozptyl elektronů na organickém vzorku řasinek je mnohem vyšší, než rozptyl na uhlíkovém filmu. A proud stínítkem je bez objektivové clony 2x vyšší.



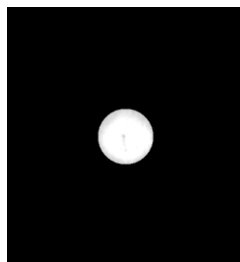
**Obr. 49 Druhé měření - Vyfiltrovaný snímek ze začátku měření,  $U_{Cl} = 4 \text{ kV}$ , zvětšení 180, FoV 19,5  $\mu\text{m}$  a expozice 25 ms obě clony 50  $\mu\text{m}$**



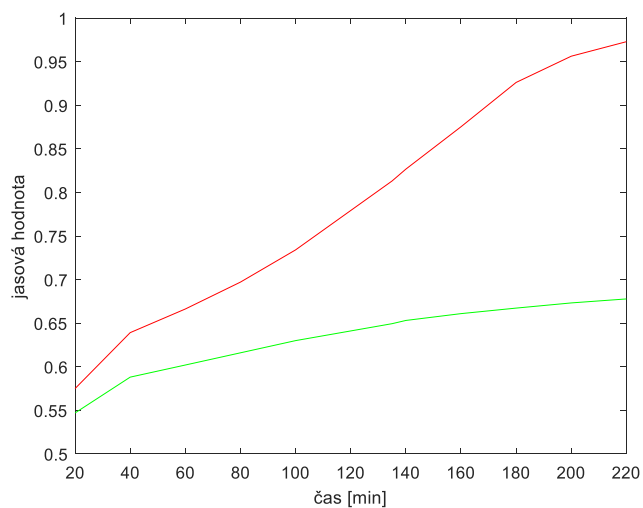
**Obr. 50 Druhé měření - Pořízené snímky řasinkového epitelu v časech  $t = 20$  (vlevo nahoře),  $t = 80$  min (vpravo nahoře),  $t = 140$  minut (vlevo dole) a  $t = 200$  minut (vpravo dole), všechny snímky jsou nasnímány s  $U_{Cl} = 4$  kV, zvětšení 180, FoV 19,5  $\mu\text{m}$  a expozice 25 ms**

Funkce **inhomogenity** použita nebyla, u této analýzy obrazů se využilo pouze funkce **cutting**. Kdy se z obrazu vyřízla menší stopa (viz Obr. 51, na kterém se nachází vyříznutý střed ve 160 minutě), a také okolí stopy v rozsahu mezikruží 130 px, stejně jako u syntetické pryskyřice. Opět byla z obou obrazů vypočítána průměrná hodnota jasu a zapsána do vektoru. Tato hodnota je vynesena v závislosti na čase v Obr. 52, kde červeně je průměrná jasová hodnota „vypálené“ menší stopy a zeleně hodnota okolí. Je nutno podotknout, že okolí není vždy úplně dokonale stejné (neobsahuje vždy totožné objekty ve scéně), a to na změnu průměrné hodnoty jasu okolí mohlo mít lehký vliv. Změna jasu menší stopy roste lineárně a deformace vzorku jde na snímcích vidět i pouhým okem. U tohoto měření se průběh jasu choval očekávaně, tedy jas okolí se příliš nezvyšoval, zatímco jas exponovaného středu ano.

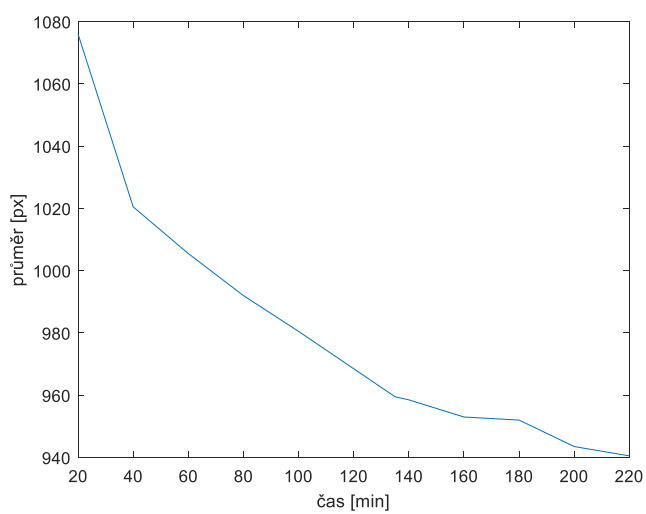
Průměr stopy byl vypočítán opět z binárních masek a při tomto měření se velká stopa zmenšila, a to dost významně, první snímek v 20 minutě je oproti následujícímu větší o 56 px, poté už byl trend pomalejší, ale i tak se stopa od 40 minuty, až do konečné 220 zmenšila o ~80 px viz průběh průměrů stop na Obr. 53.



**Obr. 51** Vyříznutý střed v čase  $t = 160$  minut



**Obr. 52** Druhé měření řasinkového epitelu – změna průměrné jasové hodnoty v čase, menší středová stopa (červeně) a okolí – vnější mezikruží (zeleně)

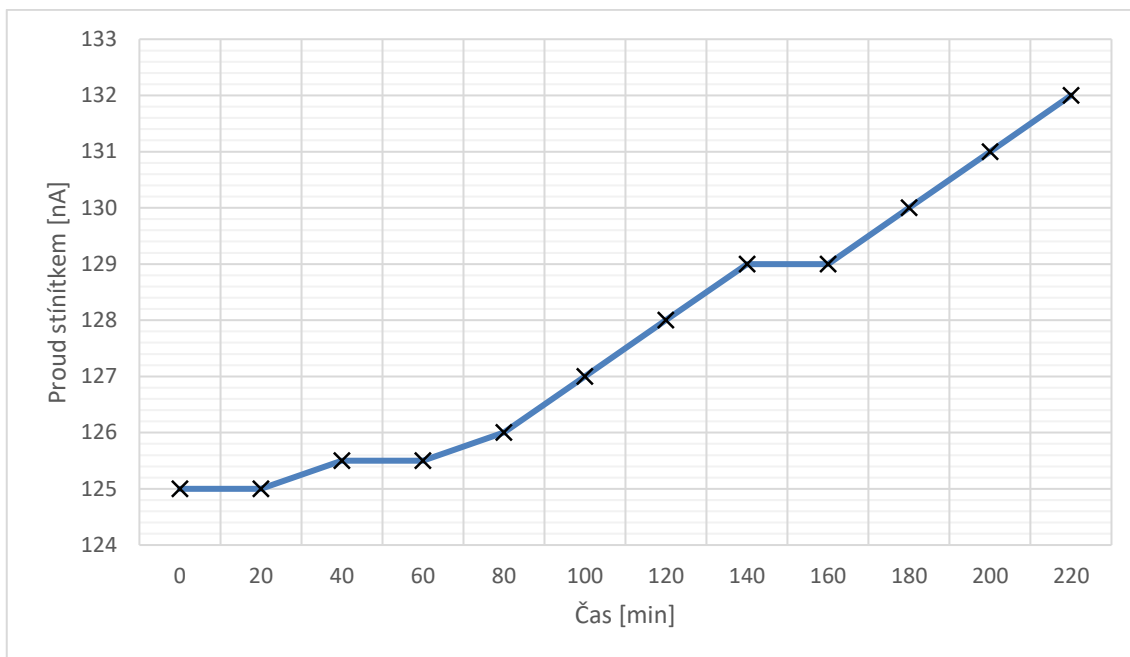


**Obr. 53** Druhé měření – Průměr velké stopy změna v čase u řasinkového epitelu

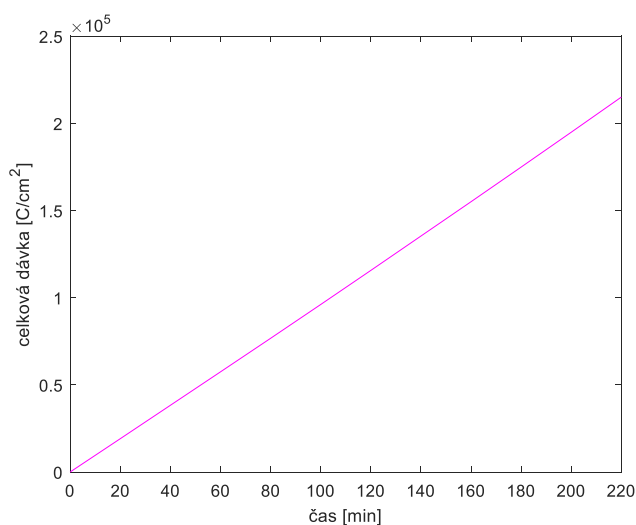
V průběhu měření byl zaznamenáván proud odizolovaným stínítkem. Postupně se v čase zvyšoval, jak docházelo k úbytku organického materiálu. Proud se nachází v Tab. 18 a vykreslen v grafu na Obr. 54. Zároveň v průběhu dlouhého měření docházelo ke zvyšování emisního proudu, protože se mikroskop pomalu stabilizuje. Taktéž byla dle rovnice 5.1 respektive 5.2 vypočtena konečná celková dávka elektronů v daných časech. Celková dávka byla při tomto měření nejvyšší ze všech. A to kvůli průměru menší fokusované stopy jen 1  $\mu\text{m}$  a také z důvodu dlouhodobého měření. Její růst je opět lineární a je vykreslen v Obr. 55.

**Tab. 18 Proud procházející stínítkem v závislosti na čase u řasinkového epitelu**

čas [min]	proud stínítkem [nA]	celkový emisní proud [ $\mu\text{A}$ ]	celková dávka [ $\text{C}/\text{cm}^2$ ]
0	125	102,1	0
20	125	102,3	19 099
40	125,5	102,6	38 274
60	125,5	102,8	57 449
80	126	103,1	76 700
100	127	103,8	96 104
120	128	104,3	115 661
140	129	104,8	135 371
160	129	105,3	155 081
180	130	106	174 943
200	131	106,8	194 958
220	132	107,3	215 127



**Obr. 54** Časový vývoj proudu procházející stínítkem u vzorku řasinkového epitelu



**Obr. 55** Konečná celková dávka elektronů v čase u řasinkového epitelu

## 5.2.6 Shrnutí výsledků v režimu TEM

U syntetické pryskyřice Epon 812, v které je zalit vzorek řasinkového epitelu byla pozorována degradace po 90 minut. Exponovaná stopa byla velká  $4,5 \mu\text{m}$  a u tohoto měření bylo sníženo napětí na kondenzoru na 600 V. Celková dávka za celých 90 minut byla přibližně  $5941,8 \text{ C/cm}^2$ . A po této dávce byl zvýšen jas středu, což ovšem mohlo být způsobeno sférickou vadou tedy tím, že v blízkosti optické osy je více elektronů než na jejím okraji, což vede právě ke zvýšení jasu uprostřed snímku.

Jelikož se průměr stopy v průběhu měření zmenšoval docházelo k tomu, že se průměrná jasová hodnota středu i okolí zvyšovala lineárně stejně a rozdíl průměrných jasových hodnot středu a jeho okolí byl také stejný a tím pádem nelze jednoznačně říct, zda u tohoto měření došlo k nějakému výraznému ztenčení syntetické pryskyřice.

U uhlíkového filmu, který by měl být velice odolný došlo při měření k velkému radiačnímu poškození a k úplné degradaci filmu již po 15 minutách, stopa byla menší a to 3  $\mu\text{m}$ , ale i tak by se od vysoce stabilního uhlíku dala čekat větší výdrž. Pravděpodobně byl uhlíkový film na tomto oku velmi tenký  $\sim 10\text{-}20$  nm. Celková dávka, při které se uhlíkový film rozpadl, byla cca 1655  $\text{C}/\text{cm}^2$  a k rozpadu došlo již po 15 minutách (viz snímek vpravo na Obr. 42).

Řasinkový epitel, který je zalit v syntetické pryskyřici, byl velmi odolný vůči radiačnímu poškození. Při stopě o průměru 4,5  $\mu\text{m}$  nedošlo ani po 3 hodinách k viditelné změně jasu na středu vzorku vůbec a při druhém měření, kdy měla stopa jen 1  $\mu\text{m}$  došlo k viditelné změně jasu přibližně po hodině ozařování primárním svazkem, větší změna kontrastu je pozorována o hodinu později a o další hodinu později už došlo k takovému radiačnímu poškození, že byl vzorek propálen skrz. Celková dávka v těchto časech byla cca 57 525  $\text{C}/\text{cm}^2$  po 1 hodině, 132 010  $\text{C}/\text{cm}^2$  po dvou a 178 763  $\text{C}/\text{cm}^2$  po třech hodinách. Vzorek byl sledován, až do 220 minuty, kde byla celková konečná dávka 221 849  $\text{C}/\text{cm}^2$ , ale to už svazek primárních elektronů prakticky procházel jen skrz díru ve vzorku a ovlivňoval tak jen molekuly v blízkosti díry.

U dlouhodobého měření na jakémkoliv elektronovém mikroskopu dochází ke stabilizování celého komplexního systému mikroskopu, což způsobuje např. změnu průměru stopy a tuto změnu je potřeba korigovat ručně. V této práci však korigována nebyla, aby byla měření zhotovena s jednotnými parametry. U delších měření syntetické pryskyřice a řasinkového epitelu se tak projevilo zmenšení průměru stopy, zvýšení jasových hodnot a celkové dávky v čase. Ale i tak si tyto dva vzorky vedly při měřeních velmi dobře a vykazovaly velmi dobrou odolnost vůči radiačnímu poškození. V případě organického řasinkového epitelu se jedná o tak složité struktury, že z těchto měření vlastně není patrné, k čemu všemu uvnitř tkáně při ozařování elektronů dochází.

### 5.3 Měření v režimu difrakce

Další možností, jak sledovat degradaci materiálu je, kromě režimu TEM, využití režimu difrakce. Pokud je zkoumaný materiál krystalický, dochází na vhodně orientovaných krystalových rovinách k difrakci elektronů (chovají se jako vlnění).

Jedná se o interferenční jev, který vzniká při dopadu elektronů na krystalovou mřížku. Každý atom pak působí jako druhotný zdroj vlnění. Toto vlnění interferuje a vznikají interferenční maxima a minima. Maxima se projevují jako světlé body na stínítku. To, jak se difrakce zobrazí na stínítku, přímo souvisí s typem a uspořádáním krystalové mřížky. Difrakce neboli ohyb vlnění za překážkou může nastat pouze, pokud jsou rozměry překážky (mezirovinné vzdálenosti) srovnatelné s vlnovou délkou urychlených elektronů. Takto vznikají sekundární kulové vlny, pro které je v určitých směrech rozdíl  $\Delta r$ , který je roven celočíselným násobkům vlnové délky ( $\Delta r = n\lambda$ ) a dle této Laueho podmínky vznikají interferencí silné difraktované svazky. Pokud dopadající svazek po splnění Laueho podmínek svírá s krystalickou rovinou (hkl) úhel  $\theta$ , pak s nimi tento úhel svírá i difraktovaný svazek, Jedná se tedy o analogii odrazu (reflexe). Úhlu  $\theta$  se říká Braggův a jeho dvojnásobku difrakční úhel. Difrakce se řídí dle Braggova zákona:

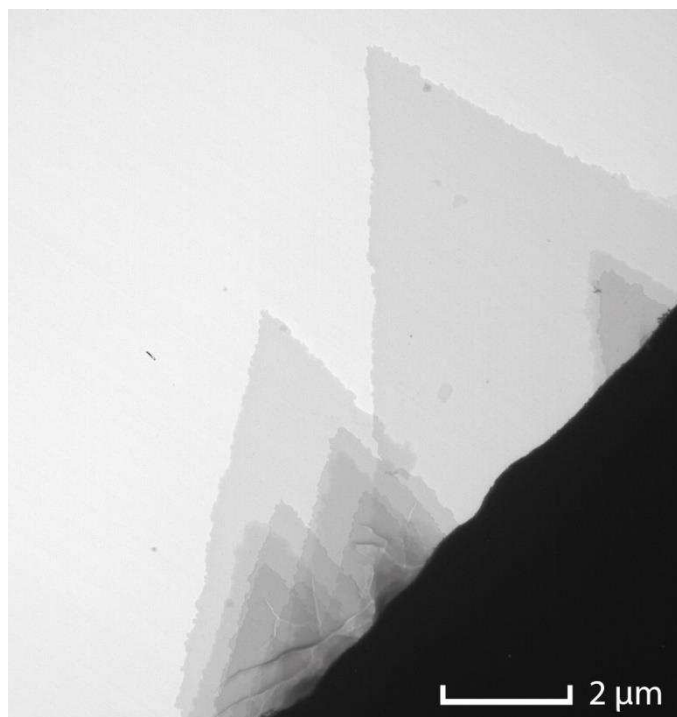
$$2d_{hkl} \sin\theta = n\lambda \quad (5.3)$$

*kde  $d_{hkl}$  je vzdálenost mezi difraktujícími rovinami v krystalové mřížce,  $\theta$  je úhel mezi směrem dopadajícího záření a difraktujícími rovinami,  $\lambda$  je vlnová délka a  $n$  je řád interference. [1][9][11]*

Více o jevu difrakce je nad rámec této diplomové práce a podrobnější matematicko-fyzikální popis najdete ve zdrojích [1] a [11].

K účelu studování degradace materiálu byl v této práci pomocí difrakce elektronů sledován polyethylen (PE) s chemickým vzorcem  $(C_2H_4)_n$ , u kterého pod vlivem primárního svazku elektronů degraduje krystalová mřížka v řádech několika málo vteřin. Polyethylen byl vytvořen dle návodu v [14] a to následujícím způsobem: shluk (v podobě bílé kuličky) polyethylenu byl umístěn do technického perchlorethylenu o objemu přibližně 30 ml, poté se roztok zahřál na teplotu  $\sim 70$  °C. Pak roztok pomalu chladnul zpět na pokojovou teplotu. Při tomto procesu vzniklo několik monovrstev polyethylenu volně se pohybujících v roztoku. Roztok byl nakápnut na zlaté síťky pokryté uhlíkovým filmem, kde se velmi rychle (do 5 minut) odpařil perchlorethylen a tím byl vzorek připraven k mikroskopování. K odstranění přebytečného roztoku lze použít filtrační papír a má to za následek nasátí i několik monovrstev PE ze sítěky. Jak vypadají jednotlivé vrstvy PE v režimu TEM lze vidět na Obr. 56. Na tomto snímku už je krystalická mřížka rozbitá, ale v režimu TEM nevidíme téměř žádnou změnu. Ovšem v režimu difrakce rozpad krystalové mřížky polyethylenu pozorovat lze.





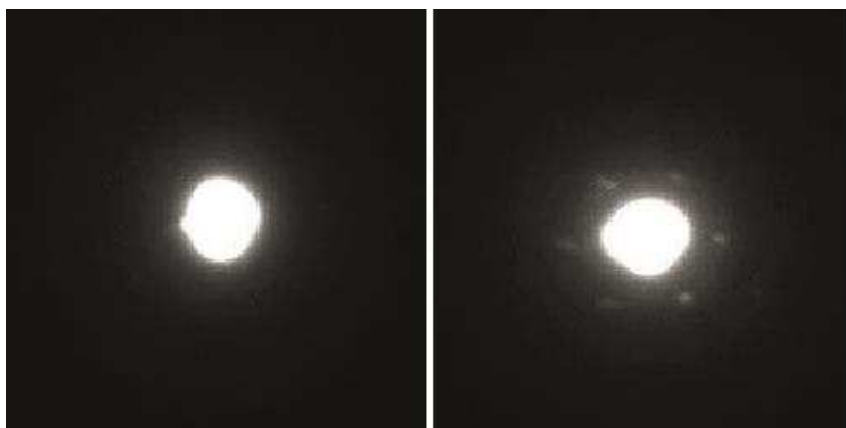
Obr. 56 Snímek vrstev polyethylenu v režimu TEM

### 5.3.1 Měření a výsledky degradace polyethylenu

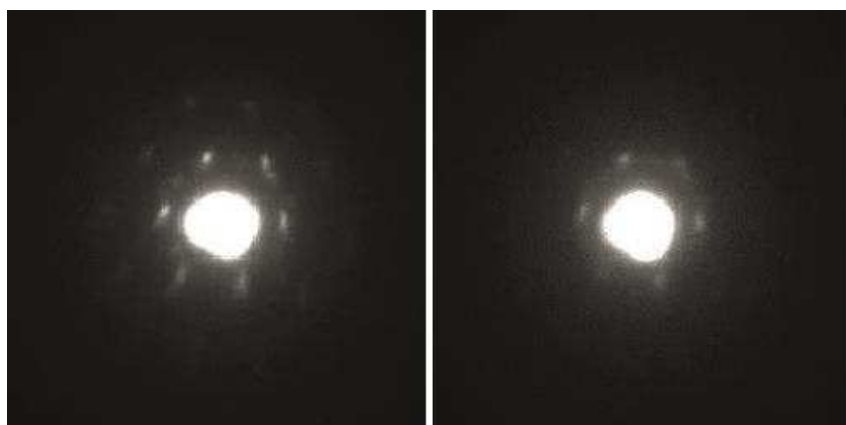
Poněvadž PE degraduje v řádu několika málo vteřin (u vysoce urychlených elektronů v řádů stovek ms) byla jeho degradace nahrávána na video s parametry 25 snímků za vteřinu a s 12bitovou hloubkou (viz přílohy na CD – videa difrakce 1-5.mp4). Z toho vyplývá, že když video rozdělíme na jednotlivé snímky, je mezi nimi časová prodleva 40 ms. Při tomto měření byl proud procházející stínítkem **8,3 nA** při úplně nejvyšším  $U_{CL} = 13$  kV. Zároveň byla použita kondenzorová clona 50  $\mu\text{m}$  a díky tomu stopa primárního elektronového svazku měla průměr 30  $\mu\text{m}$ . Celková dávka dopadajících elektronů po jedné sekundě je dle rovnice 5.1 rovna **0,00174 C/cm<sup>2</sup>**, což je přibližně 2,3x vyšší než při použití modelu LVEM5 při napětí 4,7 kV ve studii [14], kde stopa měla průměr 35  $\mu\text{m}$  a proud procházející vzorkem byl 5 nA.

V následujícím měření byl z nasnímaných videí zjištěn začátek, kdy vzorek vykazoval difrakci a konec, kdy došlo k rozpadu krystalové mřížky (difrakce vymizela). Bohužel nelze zkoumat, kde se vzorek nachází v režimu TEM, protože by došlo k rychlému rozpadu krystalové mřížky, a proto byl režim difrakce prováděn „na slepo“, kdy se pomocí manipulátoru pohybovalo vzorkem. Jakmile se objevila difrakce bylo zapotřebí se v tomto místě zastavit, což během pár stovek milisekund není v lidských silách. Z tohoto důvodu nejsou nasnímané snímky příliš ostré.

V difrakci lze spatřit rozdíl mezi tím, kdy vlny difraktují na pár vrstvách a kdy je přítomno více vrstev (viz rozdíl mezi Obr. 57 a Obr. 58). Jedna vrstva PE má přibližně 5 nm. Bylo provedeno několik měření času, za jak dlouho dojde k úplné degradaci mřížky. Měření bylo provedeno pro výšku PE cca jedna až tři monovrstvy viz Tab. 19, kde je průměrný čas deformace mřížky **2,1 sekund**. A čtyři měření více monovrstev přes sebe, kdy došlo k deformaci všech vrstev o pár stovek milisekund později viz Tab. 20. Průměrná doba deformace skrz více monovrstev je **2,83 sekund**. V tabulce je vypočtena i celková dávka elektronů dle rovnice 5.1, kterou PE obdržel. Pro 1-3 monovrstvy vychází průměr **0,00247 C/cm<sup>2</sup>** a v případě více vrstev **0,00333 C/cm<sup>2</sup>**. V obou tabulkách jsou vypočtené i směrodatné odchylky. Měření radiačního poškození PE jsou ze všech měření nejvíce vypovídající díky pozorování skutečného rozpadu mřížky a také díky vyhodnocování snímků, které po sobě následují přesně po 40 ms, čas expozice velice přesně odpovídá reálnému času rozpadu molekulárních struktur.



Obr. 57 Difrakce bez přítomnosti vzorku (vlevo) a difrakce na několika málo vrstvách PE v čase 0,8 s (vpravo)



Obr. 58 Difrakce na více vrstvách v čase 0,68 s (vlevo) a postupný úbytek vrstev v čase 1,64 s (vpravo)

**Tab. 19** Měření celkové dávky, po které došlo k rozpadu krystalové mřížky polyethylenu na monovrstvách o tloušťce 1-3 vrstvy

měření	čas degradace [s]	celková dávka [C/cm]
1.	2,2	0,0026
2.	2,12	0,0025
3.	2,28	0,0027
4.	1,92	0,0023
5.	2,08	0,0024
6.	2,24	0,0026
7.	1,72	0,002
8.	2,2	0,0026
9.	2,16	0,0025
<b>průměr</b>	<b>2,10222</b>	<b>0,00247</b>
<b>směrodatná odchylka</b>	<b>0,16772</b>	<b>0,00020</b>

**Tab. 20** Měření celkové dávky, po které došlo k rozpadu krystalové mřížky polyethylenu na monovrstvách o tloušťce více než 3. monovrstev

měření	čas degradace [s]	celková dávka [C/cm]
1.	3	0,0035
2.	2,88	0,0034
3.	2,92	0,0034
4.	2,52	0,003
<b>průměr</b>	<b>2,83000</b>	<b>0,00333</b>
<b>směrodatná odchylka</b>	<b>0,18412</b>	<b>0,00019</b>

## 5.4 Další možné způsoby sledování degradace vzorků

Kromě postupů popsaných v této práci by se dalo více zaměřit na chemické složení prvků a jejich strukturu s ohledem na chemické vazby ve zkoumaném materiálu a atomová čísla prvků v nich obsažených. Další možností je využití různých simulací a teoretických výpočtů kritické dávky pro jednotlivé chemické prvky, a pak tyto kritické dávky blíže zkoumat na homogenních strukturách, popřípadě nanočásticích jednoho chemického prvku.

V práci [28] pomocí simulací a High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) zkoumaly molekuly hexagonálních monovrstev nitridu boritého. Vzorek měl jen několik málo těchto vrstev. Při experimentu zkoumali, jak silné jsou chemické vazby bóru a dusíku. V HRTEM používali různá urychlovací napětí 80 a 120 kV. Pro nepoškozenou strukturu nitridu boritého vyšla energie vazebných

sil pro bór 19,36 eV a pro dusík 23,06 eV. Takovéto experimenty zjišťování vazebných sil v molekulách by mohli být přínosem zkoumání radiačních vlivů na dané materiály. Také je možné provést mikroanalýzu zkoumaného vzorku a zjistit přesněji jejich složení (pokud ho neznáme). Mikroanalýzu lze provést pomocí x-ray spektroskopie, díky detektorům charakteristického rentgenova záření EDX (EDS). [11][28]

Další metodou, jak zkoumat jednotlivé prvky je Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS). Tato metoda využívá filtrace elektronů o dané kinetické energii, takže jsou propuštěny elektrony přibližně stejné vlnové délky. Postupně skrz energiový filtr (viz [6] nebo [10]) procházejí elektrony různé kinetické energie a elektronovým spektroskopem je detekováno celé spektrum. Díky nepružnému rozptylu při interakci se vzorkem dojde ke ztrátě energií. Tato metoda využije spektrum k analýze prvků a k zjištění ionizačních účinků (mezi ionizace). [10][11][29]

Bylo by vhodné sledovat i vývoj tlaku v komoře vzorku, jelikož při degradaci vzorku vznikají v okolí vzorku volné ionty a další plyny. Bohužel občas jsou urychlenými elektrony primárního svazku bombardovány zpět na vzorek a mění se tak celková struktura povrchu vzorku a pracovní tlaky v komoře vzorku, tak nejsou zcela vypovídající, ovšem můžou ovlivňovat měření. V měřeních v této práci se tlak v iontové pumpě v blízkosti komory vzorku téměř neměnil, a proto se na jeho hodnoty nebralo ohled.

V ideálním případě by měl být měřen proud elektronů dopadající přímo na vzorek, a ne na odizolované stínítko, jak bylo prováděno v této práci, ovšem realizace takového měření je velmi technicky a finančně náročná. Kdyby se nějakým způsobem dala zjistit tloušťka měřeného vzorku, dala by se dle doby degradace, popřípadě úplnému propálení skrz vzorek zjistit, za jak dlouho dochází k radiačnímu poškození zkoumaného materiálu daného složení a tloušťky.

## 6 PODMÍNKY PŘÍPRAVY A SLEDOVÁNÍ VZORKŮ

V této kapitole je popsáno, jak připravovat vzorky pro LVEM25 a LVEM5 pomocí metody přímého napařování, která v práci byla prakticky použita. Nachází se zde požadavky a úskalí řezání plátek na ultramikrotomu. Také jsou zde probrány ideální podmínky pro pozorování vzorků v LVEM25. A nechybí tu ani diskuze provedených měření a analýzy obrazů a možné vzniklé odchylky a chyby. Dále se zde nachází diskuze přípravy a sledování vzorků.

### 6.1 Podmínky přípravy vzorků

V praktické části této práce byl na několik sítěk zlata přímou metodou napařen uhlíkový film, který pak slouží jako nosný film pro zkoumaný materiál. Pro LVEM25 je zapotřebí vzorek o tloušťce 40-70 nm v případě LVEM5 by měl být kolem 10-20 nm. Tloušťku uhlíkového filmu lze ovlivnit při napařování v napařovačce a to délkou, jak dlouho prochází skrz uhlíkovou nit vysoký proud, tedy jak dlouho držíme tlačítko HIGH CURRENT, kterým ovlivňujeme, jaké množství uhlíků se vypaří z nitě, a ty se poté podílí na tloušťce filmu. Abychom dostali vzorek požadované tloušťky měli bychom pro LVEM5 tlačítko držet jednu až dvě vteřiny pro LVEM25 pak dvě až tři a pokud chceme tlustší vrstvu uhlíkového filmu, tak maximálně pět vteřin. V této práci bylo na několik sítěk nakápnut roztok uhlíkových nanotrubeček, které nakonec nebyly pozorovány a na několik byl nakápnut polyethylen, jehož degradace byla pozorována v režimu difrakce na LVEM25. Obě metody přípravy těchto vzorků, zde byly popsány a dle těchto pokynů lze vzorky snadno připravit. Co je ovšem důležité zmínit je, že vzorky nesmí být kontaminovány nečistotami, a tak by se ze všemi vzorky, jak při zacházení, tak při přípravě, mělo pracovat v rukavicích a v čistých prostorách, aby nebyly znehodnoceny.

Vzorky připravené na ultramikrotomu jsou řezány o dané tloušťce, kterou je možné reálně zhotovit, spodní mez je okolo 30 nm. Většinou však mají 40-60 nm a tloušťka plátek se volí podle urychlovacího napětí mikroskopu, v kterém budou pozorovány a v případě nízkonapěťových elektronových mikroskopů musí být co nejtenčí. Vzorky tohoto typu jsou většinou zality v nějakém médiu, a to by mělo být svým složením velmi podobné vzorku samotnému, aby byl vzorek dostatečně homogenní a v ultramikrotomu se nelámal. V této práci byla sledována degradace vzorku řasinkového epitelu a syntetické pryskyřice, v které byla tkáň zalita.

S veškerými vzorky se musí zacházet opatrně a nesmí docházet k mechanickým otřesům či ke kontaktu s nějakou chemikálií, proto se uchovávají v čistých Petriho miskách, speciálních plastových schránkách anebo v plastové mikroskopu.

## 6.2 Podmínky pozorování vzorků

Pokud sledujeme v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu nestabilní prvky, jako je zde studovaný polyethylen, moc možností, jak upravit způsob pozorování nemáme, jelikož se PE rozpadá v řádu několika vteřin museli bychom jej pozorovat na nižším urychlovacím napětí, kde nebude PE tolik zatížen, např. na modelu LVEM5. Abychom došlo k rozpadu PE, co nejpomaleji je nutné jej pozorovat následujícím způsobem. Svazek musí být co nejvíce divergentní, aby byl vzorek zatížen, co nejméně, tedy  $U_{CL}$  maximální a to 13 kV, taky je vhodné použít nejmenší kondenzorovou clonu velikosti 30  $\mu\text{m}$  (v práci byla použita pouze větší 50  $\mu\text{m}$  clona).

Modely LVEM5 a LVEM25 se skvěle hodí na pozorování organických materiálů, protože díky malému urychlovacímu napětí dochází pouze k nepatrnému radiačnímu poškození, tedy pokud uživatel použije následující doporučení. Opět je zřejmé, že čím rozbíhavější svazek tím lepší pro vzorek, ale u řasinkového epitelu při použití  $U_{CL} = 2,59$  kV nedocházelo ani po 3 hodinách k viditelné degradaci v exponované části. Obecně se u modelu LVEM25 nedoporučuje snižovat  $U_{CL}$  pod mez 3 kV. Avšak pokud budeme vzorek pozorovat ještě s vyšší hodnotou nad 7,5 kV a nebudeme jej vystavovat elektronům po dobu delší než 20 minut (je možné každých 20 minut pohnout se vzorkem a změnit tak oblast zájmu) je zaručené, že vzorek bude degradovat velmi pomalu a lze ho na daném místě pozorovat opakovaně. Zároveň je vhodné použít kondenzorovou clonu a samozřejmě ta menší s průměrem 30  $\mu\text{m}$ , která se využívá u větších zvětšení, omezí primární svazek dostatečně, aby nebyla ozařována zbytečně část vzorku, která ani není v zorném poli. Dále je vhodné použít i objektivovou clonu, ale ta pouze zajistí lepší kontrast. Jelikož je za vzorkem, tak nemá žádný vliv na zatížení vzorku, ale omezí elektrony rozptýlené na vzorku pod velkými úhly. Při  $U_{CL}$  větší než 9 kV bude zatížení vzorku menší a podle Tab. 13 bude oproti 7,5 kV menší skoro dvojnásobně. Proto je vhodné využívat vysoké hodnoty  $U_{CL}$ . Stejně doporučení platí i pro jakékoliv jiné vzorky například nanočástice, ovšem těžší kovy potřebují nižší  $U_{CL}$ , aby by v obraze dobrý kontrast. Pokud dojde ke kontaminaci nebo nabíjení vzorku začnou vznikat v obraze artefakty a zobrazovací vady.

### 6.3 Diskuze provedených měření

V této práci bylo provedeno několik měření, ve kterých mohlo nastat několik chyb. Zaměříme-li se na zpracování dat analýzou obrazů docházelo k těmto chybám. I přes snahu udělat měření, co nejpřesněji a vycentrovat malou exponovanou stopu na střed větší stopy, mohlo dojít při vyříznutí středového kruhu, k zahrnutí i okolních pixelů, které ovšem ozařovány nebyly. Toto je ošetřeno pomocí výřezu stopy se značnou rezervou, avšak při měření řasinkového epitelu měla stopa průměr pouze 1  $\mu\text{m}$  a bylo obtížné udělat dostatečnou rezervu. Aby menší exponovaná stopa byla vždy na středu velké stopy, záleží na zkušenostech obsluhujícího personálu, a proto ne vždy se to dokonale povedlo. V práci byla snaha o využití lícování obrazů pomocí templátu (template matching) s implementací Furierovi transformace. Jako templát byla zvolena binární maska obrazu a byla lícována s binární maskou obrazu následujícího, ovšem tato metoda se používá při hledání menšího objektu ve větším obraze, a kromě jednoho slícovaného maxima, vzniklo maxim hned několik i z důvodu binárních dat. A taky kvůli předchozí chybě, že malý střed nebyl vždy přesně ve středu větší stopy, nebyla tato metoda nakonec vůbec použita. [18]

Další podstatnou částí je, že v práci byl měřen proud odizolovaným stínítkem, který by měl odpovídat, co nejvíce proudu elektronů, které na vzorek dopadají. Ovšem při interakci se vzorkem vznikají i zpětně odražené elektrony (BSE), které se na výsledném proudu na stínítku vůbec nepodílejí. Na vzorku dochází i k rozptýlení dopadajících elektronů, ale ty jsou elektronovou optickou soustavou vztaženy zpět do svazku, takže zde by měla být chyba minimální.

Dále byla počítána celková konečná dávka elektronů v daném čase, zde je potřeba zmínit, že v čase 0, by sice měla být nulová, ale jelikož bylo při mikroskopování nutné nalézt oblast zájmu, kde bude měření prováděno, tak samozřejmě v čase 0, již nějakou dávku elektronů vzorek obdržel. Další chyba je způsobena pořizováním snímků, kdy sice byly například tvořeny každých 5 minut, to však ale neznamená, že vzorek byl pod vlivem exponované stopy přesně 300 vteřin (avšak dávka byla počítána s touto přesnou hodnotou). Nastavení vhodného zvětšení a snímání obrazu zabere určitý čas a zavádí do výpočtu chyby, které nešlo nijak eliminovat. Stejně tak měřený proud stínítkem, který sice byl měřen cca v daném časovém intervalu, avšak neodpovídá okamžitému proudu v průběhu celého měření, protože lineárně rostl a nelze tak tvrdit, že byl v daném časovém intervalu  $\Delta t$  (např. 10 minut) po celou dobu stejný (např. 128 nA).

Bohužel při měření vlastností katody Standart FEG a při měření degradace uhlíkového filmu vznikl svod na odizolovaném stínítku, který výsledky znehodnotil další chybou, která ovšem činí přibližně jen  $\pm 0,23\%$ .

## 6.4 Diskuze přípravy a sledování vzorků

Volba tloušťky vzorku je v transmisní elektronové mikroskopii velmi podstatná. Při napařování uhlíku lze tloušťku korigovat, ovšem příliš tenký uhlíkový film nemusí být přítomen na všech okách síťky, protože může dojít k jeho protrhnutí, a taky nevydrží příliš dlouhodobou zátěž elektronů. Oproti tomu vzorek tlustší než 100 nm se pro transmisní elektronovou mikroskopii nehodí. Důležité při přípravě vzorků je v některých krocích i zručnost personálu, a to se někdy týká i samotné manipulace se vzorky. Síťky mají průměr pouze 3,05 mm jedná se o drobnou práci s pinzetou a nesmí dojít k poškození vzorků (preparátů). [1][13]

Pozorovaný uhlíkový film byl připravován v prosinci a měřen na konci dubna, a přestože uhlík patří mezi stabilní prvky, již kolem celkové dávky 1655 C/cm<sup>2</sup> docházelo k velkému radiačnímu poškození. Možná to bylo důsledkem stáří filmu, ale taky v tom mohlo hrát roli nesprávné zacházení (mechanické otřesy), malá tloušťka filmu či kontaminace vzorku při jeho přípravě i manipulaci.

Poněvadž celková dávka elektronů závisí kromě elektrického náboje i na exponovaném čase a ploše, kterou vzorkem elektrony prochází viz rovnice 5.1, je žádoucí ozařovat vzorek, co nejkratší nutnou dobu a průměr stopy mít, co největší (divergentní). K elektronovému mikroskopu by tak měl každý uživatel projít určitým zaškolením a měl by brát na vědomí některé kritické úkony, které kromě vzorku mohou poškodit technické prvky samotného elektronového mikroskopu.



## 7 ZÁVĚR

V práci je popsáno, jak fungují nízkonapěťové transmisní elektronové mikroskopy od firmy Delong Instruments. Nachází se zde popis jednotlivých komponent elektronových mikroskopů a popis základních vlastností elektronů v primárním elektronovém svazku a jejich interakce se vzorkem. Co je pružný a nepružný rozptyl a k jakému radiačnímu poškození vzorků dochází. Dále je v práci popsána příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii zaměřená na organické preparáty a metodu přímého napařování, jelikož jsou to nejčastěji používané metody v nízkonapěťových elektronových mikroskopech. Díky těmto technikám se vytváří velmi tenké vzorky.

V praktické části je metodou přímého napařování připraveno několik sítěk pokrytých uhlíkovým filmem, který slouží jako nosný film pro studované prvky v následné analýze. V diplomové práci byl na sítky nanesen polyethylen a také byly měřeny sítky obsahující pouze uhlíkový film. V další části jsou zhotoveny měření pro zjištění vlastností dvou katod High current FEG a Standart FEG a také mikroskopu LVEM25, na kterém byly dělány veškerá měření a pořízeny všechny snímky. Všechny studované vzorky jsou ozařovány primárním svazkem elektronů, které emitují z katody Standart FEG s energií 25 keV. Kromě vlastních připravených preparátů je v práci zkoumán také preparát syntetické pryskyřice Epon 812, do které se zalévají prvky řezané na ultramikrotomu a dále je sledována degradace organického preparátu epitelu řasinek (cilie). Pomocí analýzy obrazů je v režimu TEM sledována změna kontrastu (jasu) v obrazech a díky pikoampérmetru je měřen proud na odizolovanému stínítku, který odpovídá proudu procházejících elektronů primárního svazku, a tedy je změřena proudová zátěž vzorku. Z proudu stínítkem je vypočtena celková dávka dopadajících elektronů v čase a probrány jsou i další možnosti studování degradace vzorků.

Po analýze vzorků následuje doporučení a diskuze, jak se vzorky pracovat v nízko napěťové elektronové mikroskopii, a to z hlediska studovaných materiálů. Je zde popsáno na co brát ohled při přípravě a pozorování vzorků a diskuze navržených doporučení.

# Literatura

- [1] KARLÍK, Miroslav. *Úvod do transmisní elektronové mikroskopie*. Praha: České vysoké učení technické, 2011. ISBN 978-80-01-04729-3.
- [2] MORNSTEIN, Vojtěch. Elektronová mikroskopie. HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Brno: Neptun, s. 256-258. ISBN 80-902896-1-4.
- [3] Delong Instrument a.s. [online]. Brno Czech Republic: Delong Instrument, [2007] [cit. 2018-09-25]. Dostupné z: <http://www.delong.cz/>
- [4] Thermo Fisher Scientific [online]. Waltham, MA USA 02451: Thermo Fisher Scientific, ©2016 [cit. 2018-09-25]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/electron-microscopy.html>
- [5] DELONG INSTRUMENTS A.S. LVEM 25: User Guide. Brno Czech Republic, [2011].
- [6] SCHAFF, R M Tromp and Y Fujikawa and J B Hannon and A W Ellis and A Berghaus and O. A simple energy filter for low energy electron microscopy/photoelectron emission microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2009, **21**(31), 314007. ISSN 0953-8984. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0953-8984/21/i=31/a=314007>
- [7] PÁTÝ, Libor. Iontové vývěvy se studenou katodou. GROSZKOWSKI, Janusz a Libor PÁTÝ. *Technika vysokého vakua*. Praha 1: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981, s. 245-246.
- [8] BELLO, Igor a Viera DUBRAVCOVÁ. Turbomolekulární vyvěvy. BELLO, Igor a Viera DUBRAVCOVÁ. *Vakuová a ultravakuová technika*. Bratislava: Slovenská vysoká škola technická, 1983, s. 238-242. ISBN 80-05-01090-7.
- [9] KUBÍNEK, Roman, Klára ŠAFÁŘOVÁ a Milan VŮJTEK. *Elektronová mikroskopie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2739-3.
- [10] HOFER, Ferdinand. Electron Energy-loss Spectrometry & Energy-Filtering TEM. Nanotechnology and Functional Materials Centre[online]. University of Belgrade: Seventh Framework Programme, ©2010 [cit. 2018-12-29]. Dostupné z: [http://www.nanotechftm.tmf.bg.ac.rs/images/stories/dokumenty/lecture\\_book\\_em\\_school/ferdinand%20hofer.pdf](http://www.nanotechftm.tmf.bg.ac.rs/images/stories/dokumenty/lecture_book_em_school/ferdinand%20hofer.pdf)
- [11] REIMER, Ludwig a H. KOHL. *Transmission electron microscopy: physics of image formation*. 5th ed. New York, NY: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-40093-8.
- [12] Products. EM Resolution Ltd.: supporting electron microscopy [online]. United Kingdom: Insight MBC, ©2014 [cit. 2018-11-29]. Dostupné z: <https://emresolutions.com/product/holey-carbon-film-on-nickel-200-mesh-100/>
- [13] *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. NebeNet. České Budějovice: Jana Nebesářová, ©2001 [cit. 2018-11-29]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/index.html>
- [14] DRUMMY, Lawrence F, Junyan YANG a David C MARTIN. Low-voltage electron microscopy of polymer and organic molecular thin films. *Ultramicroscopy* [online]. 2004, **99**(4), 247-256 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.1016/j.ultramic.2004.01.011. ISSN 03043991. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304399104000117>

- [15] EGERTON, R.F., P. LI a M. MALAC. Radiation damage in the TEM and SEM. *Micron* [online]. 2004, **35**(6), 399-409 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.1016/j.micron.2004.02.003. ISSN 09684328. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432804000381>
- [16] DELONG INSTRUMENTS A.S. Procedura příprava uhlíkových filmů: OFF-000459. Brno, 2018.
- [17] DELONG INSTRUMENTS A.S. Elektronový mikroskop – základy: OFF-000457. Brno, 2018.
- [18] NIXON, Mark S. a Alberto S AGUADO. Feature extraction and image processin. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2008. ISBN 978-0-1237-2538-7.
- [19] WALEK, Petr, Martin LAMOŠ a Jiří JAN. *Analýza biomedicínských obrazů počítačová cvičení FEKT VUT v Brně*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, ©2015. ISBN 978-80-214-4792-9.
- [20] MathWorks: Matlab [online]. United States: The MathWorks, ©1994-2019 [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/>
- [21] LOY, G. a A. ZELINSKY. Fast radial symmetry for detecting points of interest. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* [online]. 2003, **25**(8), 959-973 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1109/TPAMI.2003.1217601. ISSN 0162-8828. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1217601/>
- [22] KARLÍK, M.: Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů, *Československý časopis pro fyziku*, 55, č. 5 (2005), 457-464
- [23] DRUMMY, L, J CHEN, J YANG a D MARTIN. Low Voltage Electron Microscopy of Organic Materials. *Microscopy and Microanalysis* [online]. 2006, **12**(S02), 1434-1435 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1017/S1431927606069431. ISSN 1431-9276. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1431927606069431/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1431927606069431/type/journal_article)
- [24] KOLAŘÍK, Vladimír. *Autoemisní elektronové zdroje*. Brno, 1983. Kandidátská disertační práce. ČSAV Brno.
- [25] ŠUBRTOVÁ, Danuše. *Transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie* [online]. 1. Hradec Králové: Ústav histologie a embryologie Lékařská fakulta v Hradci Králové a Univerzita Karlova v Praze, 2012 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.lfhk.cuni.cz/Fakulta/Organizacni-struktura/Domaci-stranky/Ustav-histologie-a-embryologie/Vyzkum/Transmisni-elektronovy-mikroskop/Publikace-Transmisni-elektronova-mikroskopie.aspx/>
- [26] LIN, Chun-Yueh, Wei-Tse CHANG, Wei-Hao HSU, Mu-Tung CHANG, Yi-Sheng CHEN, En-Te HWU, Wun-Cin HUANG a Ing-Shouh HWANG. Low-voltage coherent electron microscopy based on a highly coherent electron source built from a nanoemitter. *Journal of Vacuum Science & Technology* [online]. 2018, **36**(3) [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1116/1.5024852. ISSN 2166-2746. Dostupné z: <http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.5024852>
- [27] How to do circular crop using matlab?. *Stackoverflow* [online]. New York: Stack Exchange, ©2019 [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://stackoverflow.com/questions/19992097/how-to-do-circular-crop-using-matlab>

- [28] KOTAKOSKI, J., C. H. JIN, O. LEHTINEN, K. SUENAGA a A. V. KRASHENINNIKOV. Electron knock-on damage in hexagonal boron nitride monolayers. *Physical Review B* [online]. 2010, **82**(11) [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1103/PhysRevB.82.113404. ISSN 1098-0121. Dostupné z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.82.113404>
- [29] EELS info [online]. USA: Gatan Company, [2019] [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.eels.info>
- [30] EGERTON, R.F. Radiation damage to organic and inorganic specimens in the TEM. *Micron* [online]. 2019, **119**(119), 72-87 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.micron.2019.01.005. ISSN 09684328. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432818304359>

# Seznam symbolů, veličin a zkratek

TEM – Transmisní elektronový mikroskop

EM – Elektronový mikroskop

LVEM – Low Voltage Electron Microscop

IP – Iontová(é) pumpa(y)

YAG – Yttrium Aluminum Garnet (stínítko)

FFT – Fast Furier Transform (rychlá furierova transformace)

BSE – Back Scattered electron

SE – Secondary Electrons (sekundární elektrony)

CL – Katodoluminiscence

AE – Augerovy elektrony

EDX (EDS) – Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

$U_{SUP}$  – Napětí na supresoru

$U_{CL}$  – Napětí na kondenzorové čočce

HT – Houghova Transformace

FRST – Fast Radial Symmetry Transform

FoV – Field of View (zorné pole)

PE – Polyethylen

HRTEM – High Resolution Transmission Electron Microscopy

EELS – Electron Energy-Loss Spectrometry