

Электронная микроскопия: сканирующий электронный микроскоп (часть 2)

Другим видом электронного микроскопа является сканирующий или растровый электронный микроскоп (SEM, СЭМ рус.). С помощью сканирующего электронного микроскопа SEM можно получать изображения образца путем сканирования поверхности сфокусированным пучком электронов. При этом электроны взаимодействуют с атомами в образце, производя различные сигналы, которые содержат информацию о поверхностной топографии и составе образца.

Электронный пучок сканируется в растровой развертке шаблона, и положение луча в сочетании с интенсивностью детектируемого сигнала используется для получения изображения. В наиболее общем режиме, вторичные электроны, испускаемые атомами, возбуждаемых электронным пучком обнаружены с помощью детектора вторичных электронов (Эверхарт-Торнл детектор). Число вторичных электронов, которые могут быть обнаружены, и интенсивность сигнала, зависит от образца топографии. С помощью SEM может достичь разрешения порядка 1 нм.

Образцы наблюдаются в условиях высокого вакуума в обычном SEM, или в низком вакууме или в условиях повышенной влажности или переменного давления окружающей среды SEM, а также в широком диапазоне криогенных или повышенных температуры со специализированными инструментами.

В 1935 Max Knoll построил первый SEM. Однако патент на SEM был получен в 1941 г. Manfred Von Ardenne and Bod.

Сигналы, используемые сканирующим электронным микроскопом, образуются в результате взаимодействия пучка электронов с атомами на разных глубинах в образце. Производятся различные типы сигналов, в том числе от вторичных электронов (SE) и отраженных или обратно-рассеянных электронов (BSE).

Электронный пучок, который обычно имеет энергию в диапазоне от 0,2 кэВ до 40 кэВ, фокусируется одной или двумя конденсаторными линзами в пятно около 0,4 нм до 5 нм в диаметре. Луч проходит через пару катушек сканирования или пару отклоняющих пластин в колонне, которые отклоняют луч таким образом, что он сканируется.

Вторичные электроны (SE) имеют очень низкую энергию, порядка 50 эВ, что ограничивает длину свободного пробега в твердом веществе. Сигнал от вторичных электронов, как правило, очень локализован в точке удара

первичного электронного пучка, что делает возможным получить изображения образца поверхности с разрешением не менее 1 нм.

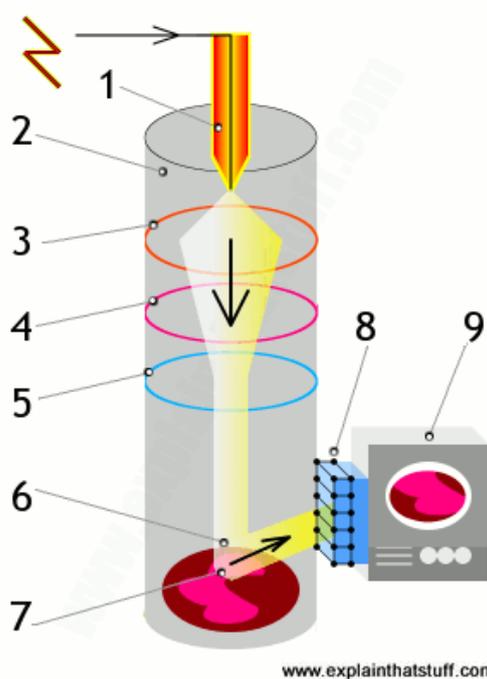


Рисунок 1- Принципиальная схема SEM:

1- электронная пушка; 2- вакуумная камера; 3- анод; 4,5 – электромагнитные катушки; 6- электронный луч; 7 – обратные электроны; 8- детектор; 9- экран для вывода изображения

Обратно-рассеянные электроны (BSE) являются электронами, которые отражаются из более глубоких мест внутри образца и, следовательно, разрешение изображений BSE меньше, чем SE изображений. Однако, BSE часто используется в аналитической SEM, наряду с рентгеновскими спектрами, так как интенсивность сигнала BSE тесно связана с атомным номером (Z) образца. BSE изображение может предоставить информацию о распределении различных элементов в образце.

При взаимодействии первичного пучка электронов с образцом, электроны теряют энергию путем многократного случайного рассеяния и поглощения в каплевидном объеме образца, который называется объемом взаимодействия. Его размер составляет примерно 100 нм в глубине образца до 5 мкм на поверхности. Размер объема взаимодействия зависит от энергии электрона, атомного номера образца и плотности. Обмен энергии между электронным пучком и образцом приводит к отражению электронов высоких энергий с помощью упругого рассеяния, эмиссии вторичных электронов неупругого рассеяния и электромагнитного излучения. Для усиления сигналов используются электронные усилители различных типов. Сигналы отображаются как изменения яркости на мониторе компьютера, каждый

пиксель видеопамати компьютера синхронизирован с положением пучка на образце под микроскопом. Таким образом, полученное изображение является картой распределение интенсивности сигнала, излучаемого из сканируемой области образца.

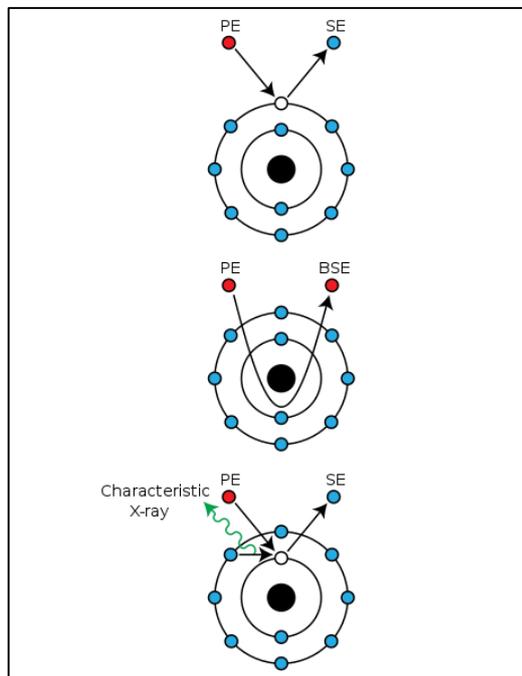


Рисунок 2 - Механизмы эмиссии вторичных электронов, обратное рассеяние электронов и характеристических рентгеновских лучей от атомов образца

Из - за очень узкого электронного пучка, микрофотография SEM имеет большую глубину резкости, дающую характерный трехмерный вид, что крайне удобно для понимания структуры поверхности образца.



Рисунок 3 - Типичные изображения SEM: the bacteria Escherichia coli (E.coli).

SEM образцы должны быть достаточно малы, чтобы поместиться на предметном столике и нуждаются в специальной подготовке, чтобы увеличить их электропроводность и стабилизировать их, так чтобы они могли

выдерживать условия глубокого вакуума и высокую энергию пучка электронов. Образцы, как правило, жестко устанавливаются на держателе образца или заглушке с помощью проводящего адгезива. Многие модели SEM имеют держатели, которые могут наклоняться до 45° и обеспечивают непрерывное вращение на 360° .

Непроводящие образцы накапливают заряд при сканировании электронного пучка, особенно в режиме вторичной электронной визуализации, что приводит к сканированию дефектов и других артефактов изображения. Для обычного изображения в SEM, образцы должны быть электропроводными, по крайней мере, на поверхности, и заземлены, чтобы предотвратить накопление электростатического заряда. Непроводящие материалы, как правило, покрываются ультратонким покрытием из электропроводящего материала. Покрытие получают либо осаждением на образце, либо низко вакуумным распылением, либо покрытия или с помощью испарения.

Проводящие материалы, используемые в настоящее время для покрытий включают золото, золото - палладиевый сплав, платину, иридий, вольфрам, хром, осмий или графит. Покрытие с тяжелыми металлами может увеличить соотношение сигнал / шум для образцов с низким атомным номером (Z). Улучшение возникает из-за вторичной электронной эмиссии для материалов с высоким Z .

Альтернативой покрытия для некоторых биологических образцов является увеличение объемной проводимости материала путем пропитки с использованием осмий - содержащих материалов.

Непроводящие образцы могут быть отображены без покрытия с использованием режима низкого напряжения работы SEM. Низковольтное СЭМ обычно проводят в приборе с автоэлектронной эмиссией пушек, который способен производить высокую первичную яркость электронов и небольшой размер пятна даже при низких потенциалах ускорения.

Увеличение в SEM можно регулировать в пределах от 10 до 3 000 000 раз. В отличие от оптических и трансмиссионных электронных микроскопов, увеличение изображения в SEM не является функцией мощности линзы объектива. SEM может иметь конденсатор и объективы, но их функция - сфокусировать луч на месте, а не изображение образца. В SEM, как и в сканирующей зондовой микроскопии, результаты увеличения зависят от соотношения размеров раstra на образце и раstra на устройстве отображения. Предполагая, что экран имеет фиксированный размер, более высокие результаты увеличения получаются от уменьшения размера раstra на образце, и наоборот. Таким образом, увеличение в SEM контролируется либо током,

подаваемый на катушки сканирования, или напряжением, подаваемым на дефлекторы, но не с помощью силы линз.

С помощью SEM возможно проводить рентгеновский микроанализ. Характерные рентгеновские лучи, которые получаются в результате взаимодействия электронов с образцом, могут быть обнаружены в SEM, если он оборудован для энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Анализ рентгеновских сигналов может быть использован для картирования распределения и оценки численности элементов в образце.

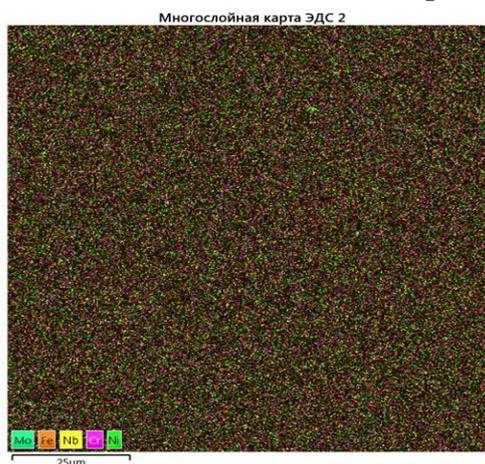


Рисунок 4- Карта распределения элементов, полученная с помощью MPCA SEM

Пространственное разрешение сканирующего электронного микроскопа зависит от размера электронного пятна, которое, в свою очередь, зависит как от длины волны электронов, так и от электронно-оптической системы, которая производит сканирующий луч. Разрешение ограничено размером объема взаимодействия, т.е. объемом образца материала, который взаимодействует с электронным пучком. Так как размер пятна и объем взаимодействия являются большими по сравнению с расстоянием между атомами, то разрешение SEM недостаточно высокое, чтобы получить изображение отдельных атомов, как это возможно с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ТЕМ).

Однако SEM имеет преимущество:

- способность к изображению сравнительно большой площади образца;
- способность к изображению сыпучих материалов (не только тонкие пленки или пленки);

- разнообразие аналитических режимов, доступных для измерения состава и свойств образца. В зависимости от инструмента, разрешение может составлять от 1 нм до 20 нм. В 2009 году самое высокое разрешение в мире обычных (≤ 30 кВ) SEM составило 0,4 нм с использованием детектора вторичных электронов.

Электронный микроскоп не может производить цветные изображения. SEM производит одно значение на пиксель, это значение соответствует числу электронов, полученных с помощью детектора в течение небольшого периода времени сканирования, когда луч нацелен на плоскости (x, y) местоположения пикселя. Это единственное число обычно представляется, для каждого пикселя, по уровню серого, образуя «черно-белое» изображение. Тем не менее, существует несколько способов для получения цветных изображений электронной микроскопии.

Первый способ – ложный цвет. Самый простой способ получить цвет, - использовать цветовую таблицу соответствия (т.е. каждый уровень серого заменяется выбранным цветом). На BSE изображения, ложные цвета могут быть выполнены, чтобы лучше различать различные фазы образца.



Рисунок 5 – пример использования цвета в SEM: Salmonella typhimurium (красное)

Второй способ - цвет построен с использованием нескольких детекторов электронов. В некоторых конфигурациях SEM возможно получить больше информации на пиксель за счет использования нескольких детекторов. Например, детекторы вторичных электронов и детекторы электронов обратного рассеяния накладываются друг на друга, цвет назначается каждому изображению, полученному с помощью каждого детектора. В результате получается конечное комбинированное цветное изображение, где цвета связаны с плотностью компонентов. Этот метод известен, как плотность в зависимости от цвета SEM (DDC-SEM).

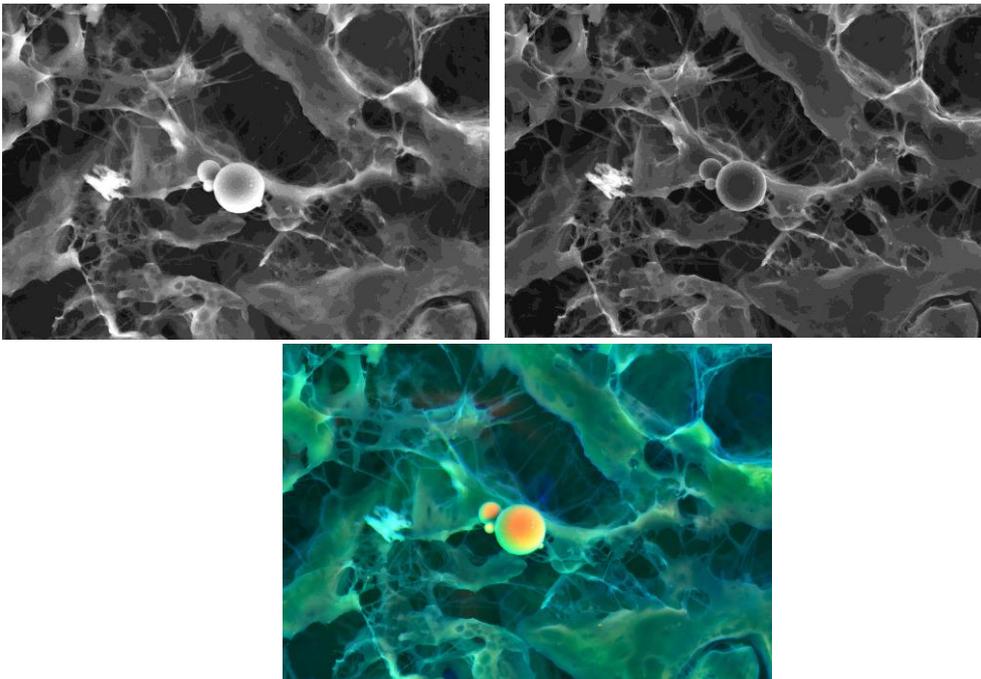


Рисунок 6 – Цветное изображение, полученное от двух предыдущих

На рисунке 6 показано цветное изображение, полученное по методу DDC-SEM. Оранжевая сферическая частица фосфата кальция (плотный материал) в зеленом, внеклеточный матрикс (менее плотный материал)

SEM не обеспечивает 3D - изображений, однако 3D - данные могут быть получены с помощью SEM различными методами следующим образом. 3D реконструкции из стереопары фотограмметрии являются наиболее точным методом получения 3D SEM изображений. Фотограмметрия вычисляет абсолютные высоты с использованием методов триангуляции. Недостатками является то, что два изображения, которые будут получены из двух разных точек зрения, что предполагает использование стадии наклона. Фотограмметрии являются операцией программного обеспечения, которое вычисляет смещение (или «несоответствий») для каждого пикселя, между левым изображением и правого изображением тех же парами. Такое несоответствие отражает местную высоту).

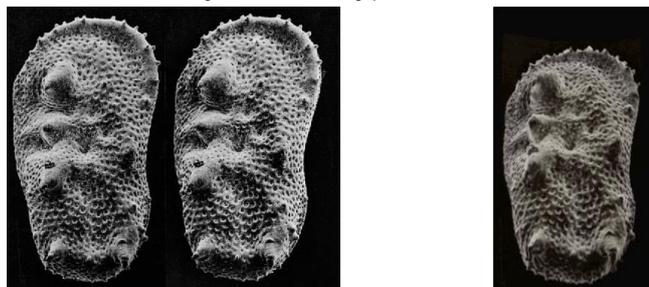


Рисунок 6 - Стереопара микрофоссилии и 3D реконструкция, полученные SEM путем наклона вдоль продольной оси