

Abstand, in den Atomverteilungskurven nicht abzeichnen, ist es zweifellos unrichtig, die Struktur der oben genannten einatomaren Metallschmelzen als eine *verwackelte Gitterstruktur* oder als eine *aufgelockerte dichteste Kugelpackung* anzusehen.

In Tab. 3 sind für 10 Elemente die kürzesten Abstandswerte  $r_1$  bzw. die Atomradien  $a_k$  zusammengestellt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Atomradien  $a_{12}$  der 12er-Koordination mit angegeben. Weiter sind in den letzten beiden Spalten die prozentualen Abweichungen zwischen  $a_{12}$  und  $a_k$  sowie zwischen  $r_2$  und  $2r_1$  aufgeführt. Die letzte Spalte zeigt die Äquidistanz der beiden ersten Hauptmaxima in den Atomverteilungskurven besonders deutlich. Aus der zweitletzten Spalte geht nochmals die gute Übereinstimmung der experimentell erhaltenen Atomradien mit denen der 12er-Koordination hervor.

Die bisherigen Strukturmodelle von Metallschmelzen stehen mit einem oder mehreren der obigen 4 Punkte im Widerspruch und bedürfen daher einer Korrektur. Die oben postulierte kettenförmige Lage- rung der Atome liefert einen ersten Ansatz für eine Modell-Vorstellung. Es dürfte jedoch nicht leicht sein, hieraus ein endgültiges Modell für die Anordnung der Atome in den Metallschmelzen abzuleiten, solange man an der Voraussetzung festhält, daß sämtliche Atome in der Schmelze als gleichberech- tigte Bezugsatome anzusehen sind.

Herrn Prof. Dr. H. RICHTER sei für die weitgehende Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit herzlich gedankt, ebenso danke ich der Deutschen For- schungsgemeinschaft für apparative Unter- stützung.

<sup>30</sup> F. H. TRIMBLE u. N. S. GINGRICH, Phys. Rev. **53**, 278 [1938].

<sup>31</sup> O. PFANNENSCHEID, Dissertation, Stuttgart 1959.

<sup>32</sup> A. EISENSTEIN u. N. S. GINGRICH, Phys. Rev. **58**, 307 [1940].

## Über thermisch bedingte Veränderungen an dünnen Folien im Elektronenmikroskop

Von WERNER LIPPERT

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M., Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. B. RAJEWSKY  
(Z. Naturforsch. **15 a**, 612—615 [1960]; eingegangen am 2. März 1960)

Bei hohen Objektstromdichten sind an Vestopal- und Plexiglasfolien Erscheinungen zu beobachten, die sich von denen bei schwachen Stromdichten unterscheiden. Bei der benutzten Anordnung (Elmiskop I, Objekträger aus gewalztem Phosphorbronzenetz mit einer Maschenweite von  $50 \mu$  und gleicher Drahtstärke) treten diese Abweichungen bei üblicher „Großflächen“bestrahlung bei Plexiglas ungefähr ab  $1 \cdot 10^{-4} \text{ A/cm}^2$ , bei Vestopal ab  $3 \cdot 10^{-4} \text{ A/cm}^2$  auf. Ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen wird bei entsprechend starker Bestrahlung die Foliensubstanz praktisch vollkommen abgebaut. Eine Stabilisierung der Folien gegen so starke Subanzverluste läßt sich durch stärkere Bestrahlung bei möglichst geringer Temperaturerhöhung, z. B. durch eine „Kleinfeld“bestrahlung mit Hilfe des Doppelkondensors, erreichen. Die erforderlichen Objektstromdichten liegen mit 0,3 bis 0,5 C/cm<sup>2</sup> für Vestopal und 0,1 bis 0,2 C/cm<sup>2</sup> für Plexiglas in der gleichen Größenordnung, die von anderer Seite<sup>2</sup> für die Stabilisierung von Polystyrollatex-Kügelchen als notwendig gefunden wurde.

Im Vergleich zu Kohlefolien, die sich in der benutzten Apparatur im wesentlichen völlig indifferent gegen Bestrahlungen zeigten, weisen die mit geringer Objektstromdichte bis zur Massendickenkonstanz bestrahlten Plexiglas- und auch Vestopalfolien charakteristische Unterschiede auf, die eine Deutung der in dem genannten Stadium befindlichen Folien als Kohlefolien nicht erlaubt.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen bewirkt bekanntlich die Elektronenbestrahlung gewisse Veränderungen an den Objekten. Sie wirken sich aus in einer nach der Stoffzusammensetzung verschiedenen Erhöhung der elektronenmikroskopischen Durchlässigkeit, die ihrerseits durch eine Verringerung der Massendicke bedingt ist. Von großem praktischem Interesse sind die Veränderungen an den Einbettungsmaterialien für biologische Objekte, Plexiglas und Vestopal. W. Erwünscht sind hier die

Subanzverluste, weil dann die in den allermeisten Fällen resistenteren biologischen Strukturen besser hervortreten, nicht erwünscht sind die bei manchen Einbettungsmitteln mit dem Subanzverlust gleichzeitig auftretenden Verformungen, die zu Verzerrungen an den biologischen Strukturen führen können.

Durch physikalische Messungen schon recht gut bekannt sind die bei geringen Objektstromdichten auftretenden, von der Ladungsdichte bzw. der Dosis abhängigen Effekte<sup>1—5</sup>. Bei Plexiglas wurde gefun-

<sup>1</sup> H. KÖNIG, Z. Physik **129**, 483 [1951].

<sup>2</sup> A. BROCKES, M. KNOCH u. H. KÖNIG, Z. wiss. Mikr. **62**, 450 [1955].

<sup>3</sup> W. LIPPERT, Optik **15**, 293 [1958].

<sup>4</sup> W. LIPPERT, Z. Naturforsch. **13 a**, 1089 [1958].

<sup>5</sup> L. REIMER, Z. Naturforsch. **14 b**, 566 [1959].



den, daß der maximale Substanzverlust von ungefähr 40 – 50% schon nach etwa  $0,02 \text{ C}/\text{cm}^2$  erreicht ist. Bei Vestopal muß man für maximal 30% ungefähr  $0,08 \text{ C}/\text{cm}^2$  aufwenden.

In biologisch orientierten Arbeiten<sup>6</sup> wird berichtet, daß die biologischen Strukturen bei Vestopal nicht so gut hervortreten wie bei Plexiglas. Diese und andere auf visuellen Schätzungen beruhenden Aussagen können die Vermutung aufkommen lassen, daß sich bei den bei biologischen Untersuchungen notwendigen Objektstromdichten Vestopal in geringerem Maße „verflüchtigt“ als Plexiglas, von dem man glaubt annehmen zu dürfen, daß es mehr oder weniger vollständig durch die Bestrahlung entfernt wird.

Es erschien uns daher notwendig, die physikalischen Untersuchungen auf den Bereich höherer Objektstromdichten oder auch Objekttemperaturen auszudehnen. Im einzelnen interessierten folgende Fragen:

1. Wie verhalten sich die genannten Stoffe im anderen Grenzfall rein thermischer Behandlung? Dazu schienen uns Untersuchungen im Vakuumofen besonders geeignet.

2. Lassen sich die bei Behandlung der ersten Frage gewonnenen Ergebnisse wenigstens im Prinzip auch bei Elektronenbestrahlung wiederfinden?

3. Lassen sich die Materialien durch eine geeignete Elektronenbestrahlung so weitgehend in „Kohle“ umwandeln, daß sie ähnlich wie Kohle gegen Wärmebehandlungen unempfindlich werden?

### Experimentelle Einzelheiten

Untersucht wurden Folien aus Plexiglas (80% Methacrylsäure-Butylester und 20% Methacrylsäure-Methylester, dazu 2% Lucidol-Paste) und Vestopal W mit einer Massendicke zwischen 8 und  $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Die Bestimmung der Massendicke geschah über die Messung der elektronenmikroskopischen Durchlässigkeit, einem heute schon recht gut geprüften, in seiner Genauigkeit ausreichenden Verfahren. Die Messung der Stromstärke in der Endbildecke erfolgte mit Hilfe eines Auffangkäfigs und einer Elektrometeranordnung. Als Objekträger für die zu untersuchenden Folien haben wir übliche Netze aus Phosphorbronzedraht von  $50 \mu$  Durchmesser mit quadratischen Öffnungen von  $50 \mu$  Seitenlänge benutzt. Die Wirkungen des Elektronenstrahls hängen bis zu einem gewissen Grade von der Form des Objekträgers ab, da die Temperatur der untersuchten Folien durch die Wärmeentwicklung und -ableitung im Objekträger mitbestimmt wird.

Eine Objektverschmutzung bei der Elektronenbestrahlung, die sich bei früheren Untersuchungen sehr störend bemerkbar gemacht hatte, war bei dem jetzt benutzten Elektronenmikroskop neuester Bauart nicht zu bemerken.

Alle Untersuchungen wurden mit einer Strahlspannung von 60 kV durchgeführt.

### Die Untersuchungen im Vakuumofen

Die Substanzen wurden in zwei verschiedenen geometrischen Formen im Vakuumofen untersucht: Zylinder von 0,56 mm Durchmesser und 10 mm Höhe, und Folien von 0,3 mm Dicke. Die Proben wurden jeweils eine Stunde auf der interessierenden Temperatur gehalten. Durch Wägungen auf einer normalen Mikrowaage wurden die Gewichtsverluste ermittelt. Wie Abb. 1 zeigt,

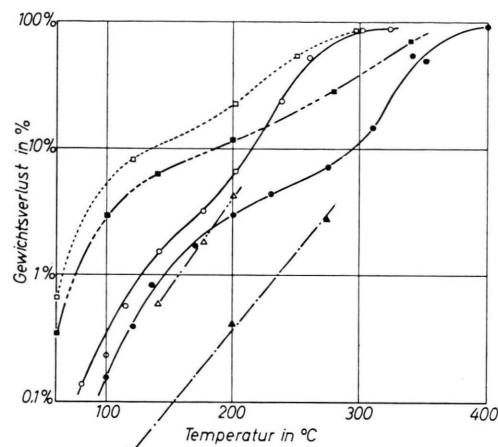


Abb. 1. Gewichtsverlust von Vestopal- und Polymethacrylatproben nach Erwärmung während einer Stunde im Hochvakuum als Funktion der Temperatur. Zylindrische Proben ( $\phi 0,56 \text{ cm}$ , Höhe 1,0 cm):

● — ●	Vestopal	} Gewichtsverlust in
○ — ○	Polymethacryl.	
▲ — — ▲	Vestopal	} Gewichtsverlust in
△ — — △	Polymethacryl.	
■ — ■	Vestopal	} Gewichtsverlust in
□ — □	Polymethacryl.	

0,3 mm starke Folien:

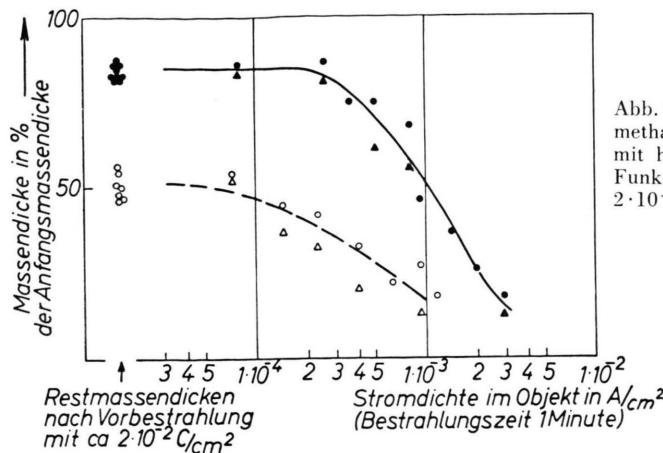


Abb. 2. Änderung der Massendicke von Vestopal- und Polymethacrylatfolien im Elektronenmikroskop nach Bestrahlung mit höheren Objektstromdichten während einer Minute als Funktion der Objektstromdichte. Die Folien waren mit ca.  $2 \cdot 10^{-2} \text{ C/cm}^2$  mit geringer Objektstromdichte vorbestrahlten.

● Vestopal, nicht abgedeckt  
 ▲ Vestopal, abgedeckt  
 ○ Polymethacrylat, nicht abgedeckt  
 △ Polymethacrylat, abgedeckt

siehe Text.

wird bei  $160 - 180^\circ$  plastisch und bekommt Blasen. Ab ungefähr  $200^\circ$  schmiegen sich die Proben der Gefäßwand vollkommen an. Eine Verfärbung tritt nicht auf. Kondensate an kälteren Stellen der Apparatur sind nicht zu beobachten. Vestopalproben behalten dagegen bei allen Temperaturen ihre Form im wesentlichen bei. Die Zylinder schrumpfen allerdings ab ungefähr  $200$  bis  $250^\circ$  und bekommen Risse, aber auch nach Erwärmung auf  $400^\circ$  ist noch ein deutlich sichtbares zylindrisches Körperchen von ungefähr  $1/4 \text{ cm}$  Länge und  $1 \text{ mm}$  Durchmesser vorhanden. Bei  $140^\circ$  setzt eine zunächst gelbliche, bei steigender Temperatur bräunliche und schließlich schwärzliche Verfärbung ein. Bei Vestopal schlagen sich an kälteren Stellen der Apparatur wenigstens zwei Kondensationsprodukte nieder: eine oder mehrere ölartige Komponenten von heller bis dunkelgelber Farbe und ein weiße, kristalline.

### Temperatureffekte bei Elektronenbestrahlung

Um auch im Elektronenmikroskop mehr oder weniger reine Temperatureffekte beobachten zu können, haben wir auf den mit der zu untersuchenden Folie belegten Objektträger („Trägernetz“) ein zweites Netz („Abdecknetz“) gelegt und diese Kombination so in das Elektronenmikroskop eingeführt, daß der Elektronenstrahl zuerst das Abdecknetz, dann das Trägernetz passierte. Die unter dem Abdecknetz liegenden Teile der Folie waren dadurch vor Elektronenbestrahlung geschützt, den Wirkungen der auftretenden Temperaturerhöhung dagegen mehr oder weniger ähnlich den nicht abgedeckten Teilen ausgesetzt. Nach Entfernung des Abdecknetzes konnte die Massendicke der bisher abgedeckten Stellen elektronenmikroskopisch mit geringen Objektstromdichten bestimmt werden.

Die Bestrahlung geschah in folgender Weise: Alle Folien wurden im allgemeinen mit  $2 \cdot 10^{-2} \text{ C/cm}^2$  mit geringer Objektstromdichte „vor“bestrahl. Bei

Plexiglas reicht das aus, um den Konstanzbereich bei schwacher Bestrahlung zu erreichen. Vestopal hat bei dieser Ladungsdichte erst einen Massendickenverlust von ca. 15% aufzuweisen. Anschließend wurde eine Minute lang mit einer definierten, höheren Objektstromdichte bestrahlt. Das Resultat ist in Abb. 2 dargestellt. Man sieht, daß bei Plexiglas ungefähr von Objektstromdichten von  $1 \cdot 10^{-4} \text{ A/cm}^2$  ab ein zusätzlicher Substanzerlust auftritt, bei Vestopal dagegen erst ab ungefähr  $3 \cdot 10^{-4} \text{ A/cm}^2$ . Die abgedeckten Stellen zeigen bei der gleichen Folie stets einen stärkeren Substanzerlust als die nicht abgedeckten Stellen, jedoch geht auch hier die Massendicke praktisch auf ganz geringe Beträge zurück. Eine Messung dieser sehr dünn gewordenen Folien scheitert schließlich daran, daß sie bei der Bestrahlung reißen. Die stärkere „Resistenz“ gegen die Elektronenbestrahlung bei den nicht abgedeckten Teilen der Folien ist, wie wir durch zusätzliche Experimente und Überlegungen zeigen konnten, in diesem Falle aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Umwandlung der Kunststoffe durch die Bestrahlung und nicht durch eine Massenanlagerung von außen her zu erklären. In gleicher Weise untersuchte Kohlefolien zeigten in diesem Sinne keinen Substanzerlust.

### Stabilisierung von Folien durch Bestrahlung

Die beobachteten sehr hohen Substanzerluste der Einbettungsmittel können sich auf den Erhaltungszustand eingebetteter biologischer Strukturen sehr ungünstig auswirken. Es erscheint daher der Versuch von Interesse, durch „Vor“bestrahlung mit noch höheren Ladungsdichten eine Stabilisierung der Folien gegen Bestrahlungen zu erreichen. Da sich die Be-

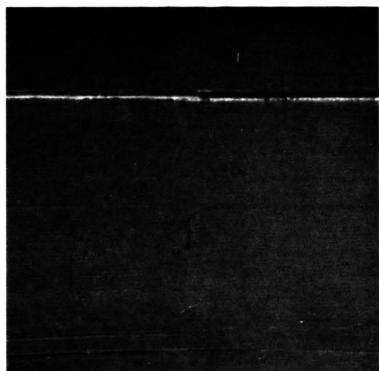


Abb. 3 a.

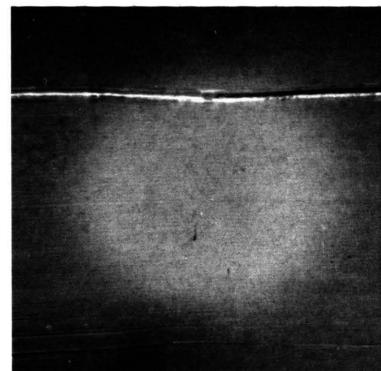


Abb. 3 b.

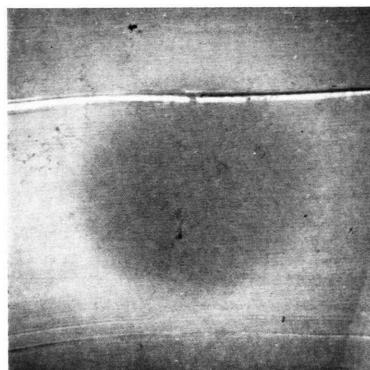


Abb. 3 c.

Abb. 3. Stabilisierung von Vestopalfolien mittels Kleinfeldbestrahlung. a) Unbestrahlte Folie. b) Aufhellung einer Kreisfläche durch Kleinfeldbestrahlung. c) Aufhellung des übrigen Teils der Folie durch starke Allgemeinbestrahlung, die Massendicke im Kreis ändert sich dabei praktisch nicht. Zur besseren Demonstration wurden die Aufnahmen sehr hart kopiert.



strahlungszeiten aus praktischen Gründen schließlich nicht mehr verlängern lassen, mußte versucht werden, die durch die Bestrahlung bewirkte Temperaturerhöhung herabzusetzen und die Stromdichte zu erhöhen. Der einfachste Weg dazu ist der, die Größe der bestrahlten Fläche mit Hilfe des Doppelkondensors herabzusetzen. Wir haben daher Versuchsreihen mit „Kleinfeld“bestrahlung (K) durchgeführt, bei denen Felder von nur  $15 \mu$  Durchmesser in der Mitte einer Öffnung des Trägernetzes bestrahlt wurden. Anschließend wurde die erreichte Stabilisierung mit Hilfe der normalen „Großflächen“bestrahlung (G) getestet.

Visuell beobachtet man bei geeigneten Stromdichten folgendes (Abb. 3 \*): K bewirkt, daß das bestrahlte Feld gegenüber der unbestrahlten Umgebung sich aufhellt, d. h. für Elektronen durchlässiger wird, also an Massendicke verliert. Durch G wird dann erreicht, daß vor allem die Massendicke der Umgebung geringer wird, und zwar schließlich sogar geringer als die des zentralen Flecks. Nach K erscheint der Fleck „hell“ in dunkler Umgebung, nach G können die Intensitätsverhältnisse gerade umgekehrt sein.

Die Messungen ergaben bei Vestopal folgendes genaueres Bild: K beeinflußt die nicht bestrahlte Umgebung praktisch nicht, so daß die Wirkungen von K und G getrennt beschrieben werden können. Verwendet man bei K Ladungsdichten höher als 0,3 bis  $0,5 \text{ C/cm}^2$  (Bestrahlungszeit eine Minute), so beobachtet man im Fleck einen Substanzverlust von ziemlich genau 30%, mit einer Streuung von höchstens  $\pm 5\%$ . Durch G wird die Massendicke des Flecks dann nicht mehr geändert. Die Aufhellung der Umgebung folgt der Kurve in Abb. 2. Bei 1 bzw.  $2 \cdot 10^{-3} \text{ A/cm}^2$  erhält man Substanzverluste von 50 bzw. 25%. Zur Prüfung der Stabilität bei noch hö-

heren Stromdichten (G) haben wir unter anderem nach und nach mehr als ganze Netzöffnungen mit K behandelt, und konnten dann feststellen, daß die Folie über den behandelten Öffnungen praktisch nicht zu zerstören war.

Bei Plexiglas treten folgende Unterschiede auf: Die Stabilisierungsladungsdichte (K) liegt bei 0,1 bis  $0,2 \text{ C/cm}^2$ . Der damit gekoppelte Substanzverlust ist mit 65% wesentlich höher als bei Vestopal. Bei G (mit z. B.  $4 \cdot 10^{-4} \text{ A/cm}^2$ ) tritt dann aber wieder eine Erhöhung der Massendicke im Zentraleck um 15 – 20% der Ausgangsmassendicke ein, so daß die End-Massendicke im Zentraleck (nach G) ca. 50% beträgt. Diese Substanzanlagerung tritt nur in der Zeit auf, in der die Umgebung an Massendicke verliert. Sie ist also durch eine kurzzeitige Erhöhung des Restgasdruckes in der Nähe des Objektes zu erklären.

Verlängert man bei K die Bestrahlungszeit von 1 auf 10 Minuten, so bleiben bei Vestopal die oben genannten Werte im wesentlichen erhalten. Nur der Substanzverlust im Fleck scheint sich etwas, von 30 auf 33%, zu erhöhen. Bei Plexiglas steigt die Stabilisierungsladungsdichte auf 0,2 bis  $0,3 \text{ C/cm}^2$  an, der Substanzverlust beträgt nur noch ungefähr 60%.

Durch diese Messungen ist gezeigt, daß bei den Einbettungsmitteln Plexiglas und Vestopal W durch die Bestrahlung im Elektronenmikroskop sehr große Massenverluste auftreten können. Vestopal ist jedoch gegen die Elektronenbestrahlung wesentlich resistenter. Außerdem behält es bei höheren Temperaturen seine Form im wesentlichen bei, während Plexiglas plastisch wird. Bei bestrahlten Folien ist ein Rückschluß auf die Ausgangsmassendicke nur möglich, wenn die Art und Weise der Bestrahlung genau bekannt ist.

\* Abb. 3 auf Tafel S. 614 a.