

## Zur Deutung der „Granulation“ elektronenmikroskopischer Bilder hoher Vergrößerung

M. H. HAHN

Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie  
der Medizinischen Akademie Düsseldorf

(Z. Naturforschg. **20 a**, 487—488 [1965]; eingegangen am 20. Januar 1965)

Hochvergrößerte elektronenmikroskopische Bilder zeigen fast ausnahmslos eine typische „Granulation“, deren Kontrast vom Grade der Defokussierung des Objektivs abhängt und bei sehr genauer Stigmatisierung in der Nähe der optimalen Fokussierung nahezu verschwindet<sup>1</sup>. Es handelt sich also um „Phasenkontrast“<sup>2</sup>. Sowohl für die Erkennung und Zuordnung in der Größenordnung des Auflösungsvermögens liegen der Objektstrukturen, wie auch für die Verwendung der Granulation als Auflösungs-Testobjekt<sup>3</sup>, ist es wichtig zu wissen, welche ortsabhängigen Eigenschaften der verwendeten Objekte (meist sehr dünne C-Folien) diesen Phasenkontrast veranlassen. VON BORRIES und LENZ<sup>4</sup> zeigten, daß örtliche Schwankungen  $\Delta U_0$  des inneren Potentials

$$U_0 = \frac{N e \Theta}{6 \epsilon_0} \quad (1)$$

( $N$  = Atomzahldichte,  $\Theta = \int_0^\infty \varrho(r) 4\pi r^4 dr$ , eine aus der Elektronendichteverteilung  $\varrho(r)$  der Objektatome gebildete Größe<sup>5</sup>) der Periodizität  $\lambda$  bei einer hinreichend großen<sup>6</sup> Defokussierung

$$\Delta z = \lambda^2 / 2 \lambda \quad (2)$$

durch Phasenkontrast maximal hervorgehoben werden und hinter dem Objekt zu einer relativen Stromdichteschwankung

$$\frac{\Delta j}{j} = \frac{4\pi d}{\lambda} \cdot \frac{\Delta U_0}{U} \quad (3)$$

führen, wobei  $d$  die hier als konstant angenommene Dicke des Objektes in Strahlrichtung,  $\lambda$  die Wellenlänge und  $U$  die Beschleunigungsspannung des Elektronenstrahls bedeuten.

Als mögliche Ursache für die Potentialschwankungen  $\Delta U_0$  werden in<sup>4</sup> allgemein Schwankungen der Atomzahldichte und der Konzentration von Fremdstoffen genannt. Biologische Objekte und die organischen Trägerfolien bestehen nach kurzer Bestrahlung im Elektronenmikroskop weitgehend aus amorphem Kohlenstoff, dessen Dichte mit ca.  $1 \text{ g cm}^{-3}$  nur etwa halb so groß wie die des Graphits ( $2,25 \text{ g cm}^{-3}$ ) ist.

Speziell ergibt sich aus dem bei RUSKA<sup>1</sup> angegebenen Kontrast  $K=3\%$  nach LIPPERT<sup>7</sup> die Massendicke des C-Films in Abb. 8 zu  $x=5 \cdot 10^{-7} \text{ g cm}^{-2}$ , aus der angegebenen Dicke  $d=5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$  folgt die Dichte  $\varrho=1 \text{ g cm}^{-3}$ .

Die Zahl der Fehlstellen ist hier also von gleicher Größenordnung wie die Atomzahl. Man macht daher wohl keinen großen Fehler, wenn man die Verteilung der Atome als ideal amorph annimmt, d. h. den Ort jedes Atoms als unabhängig von den Orten aller übrigen Atome ansieht. Daraus folgt eine mittlere statistische Schwankung  $\Delta N$  der Atomzahldichte in dem durch Phasenkontrast bei der Defokussierung  $\Delta z$  hervorgehobenen Volumen  $\lambda^2 \pi d / 4$  zu

$$\Delta N = \sqrt{\frac{2 \varrho}{\pi A m_H \lambda d \Delta z}} \quad (4)$$

( $A m_H$  ist die Masse eines Objektatoms vom Atomgewicht  $A$ ).

Führt man die in (3) vorausgesetzte Schwankung des inneren Potentials  $\Delta U_0$  ganz auf diese statistischen Schwankungen der Atomzahldichte zurück, so erhält man mit  $\varrho d = x$  die relative Stromdichteschwankung durch Phasenkontrast

$$\frac{\Delta j}{j} (\text{Ph}) = \frac{2 e \Theta}{3 \lambda U \epsilon_0} \sqrt{\frac{2 \pi x}{A m_H \lambda \Delta z}} \quad (5)$$

Mit den für Abb. 8 oben bei RUSKA<sup>1</sup> geltenden Werten

$$\begin{aligned} A m_H &= 2 \cdot 10^{-23} \text{ g (Kohlenstoff)}, \\ \epsilon_0 &= 8,86 \cdot 10^{-14} \text{ A sec/V cm}, \\ e &= 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ A sec}, \\ \lambda &= 4,87 \cdot 10^{-10} \text{ cm}, \\ U &= 6 \cdot 10^4 \text{ V}, \\ \Theta &= 2 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ (l. c. } ^5, ^8), \\ x &= 5 \cdot 10^{-7} \text{ g cm}^{-2}, \\ \Delta z &= 3,96 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \end{aligned}$$

wird  $\Delta U_0 = 0,11 \text{ Volt}$  und  $[\Delta j/j] (\text{Ph}) = 2,35 \cdot 10^{-2}$ .

Da die Apertur  $\lambda/\Delta z$  von der Größenordnung der Objektapertur ist, erscheint ein Vergleich mit dem nach LIPPERT<sup>9</sup> definierten „Amplitudenkontrast“ sinnvoll.

Die der statistischen Schwankung der Atomzahldichte entsprechende Massendichteschwankung des hervorgehobenen Bereiches

$$\Delta x = \sqrt{\frac{2 x A m_H}{\pi \lambda \Delta z}} \quad (6)$$

beträgt mit den hier gewählten Werten

$$\Delta x = 1,8 \cdot 10^{-8} \text{ g cm}^{-2}$$

und führt mit der Kontrastdicke nach LIPPERT und FRIESE<sup>7</sup> (für Kohlenstoff und eine Objektapertur von  $9 \cdot 10^{-3}$ )

$$x_K = 1,7 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-2}$$

<sup>1</sup> E. RUSKA, Naturw. Rundschau **17**, 125 [1964].

<sup>2</sup> F. LENZ u. W. SCHEFFELS, Z. Naturforschg. **13 a**, 226 [1958].

<sup>3</sup> F. THON, Proc. 3rd European Regional Conf. Electron Microscopy, Prague 1964, Vol. A, S. 127.

<sup>4</sup> B. v. BORRIES u. F. LENZ, Proc. Stockholm Conf. Electron Microscopy 1956, S. 60.

<sup>5</sup> F. LENZ, Z. Naturforschg. **9 a**, 185 [1954].

<sup>6</sup> F. THON, Z. Naturforschg. **20 a**, 154 [1965].

<sup>7</sup> W. LIPPERT u. W. FRIESE, Proc. 5th Intern. Congr. Electron Microscopy, Philadelphia 1962, Vol. 1, S. AA-1.

<sup>8</sup> W. LIPPERT, Proc. 3rd European Regional Conf. Electron Microscopy, Prague 1964, Vol. A, S. 19.

<sup>9</sup> W. LIPPERT, Z. Naturforschg. **13 a**, 274 [1958].



auf den weit unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegenden Amplitudenkontrast

$$\frac{\Delta j}{j} (\text{Am}) \approx \frac{\Delta x}{x_K} = 10^{-3}.$$

Die im betrachteten Fall mehr als 20-fache Verstärkung durch Phasenkontrast bildet also die relativen Dichteschwankungen  $\Delta x/x$  von 3,6% mit einem Kontrast von 78% des Amplitudenkontrastes der ganzen Folie ( $x/x_K = 3 \cdot 10^{-2}$ ) ab!

(Zur Bedeutung der Bezeichnungen Phasenkontrast und Amplitudenkontrast siehe LENZ<sup>10</sup>.)

Von RUSKA (briefl. Mitt.) beobachtete kleine Verschiebungen der „Granula“ beim Durchfokussieren sind durch die von  $\Delta z$  abhängige Zuordnung der statistischen Schwankungen zu den Auswahlbereichen  $\Delta^2 \pi/4$  erklärlich. Das von VAN DORSTEN (Vortrag Bonn,

<sup>10</sup> F. LENZ, 4. Intern. Kongr. Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, Verh. Bd. I, S. 306, Springer 1960.

9. 11. 64) berichtete Verschwinden und Neuentstehen solcher Granula kann außer durch Fokusverschiebungen und örtliche, zeitlich schwankende Aufladungen auch durch Platzwechselvorgänge, die die statistische Dichteverteilung örtlich verändern, gedeutet werden.

Wie schon oben angedeutet, ist (5) eine nur für große  $|\Delta z|$  gültige Näherung. Für kleine  $|\Delta z|$ , d. h. große Aperturen  $\Delta/\Delta z$  verkürzt sich der optische Weg des gebeugten Strahls durch die öffnungsfehlerbedingte Wellenaberration nennenswert, so daß die Fläche des hervorgehobenen Bereichs für  $|\Delta z| \rightarrow 0$  einem endlichen Wert zustrebt<sup>6</sup>. Außerdem verliert die Überlegung von LENZ und SCHEFFELS<sup>2</sup> natürlich ihren Sinn, wenn  $\Delta/\Delta z$  größer als die durch eine materielle Blende begrenzte Objektivapertur wird. Deshalb nimmt der Phasenkontrast, wie auf Abb. 8 in<sup>1</sup> ersichtlich, für kleine Defokussierungen mit dieser ab.

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. LENZ, Tübingen, für die freundliche Durchsicht des Manuskriptes.

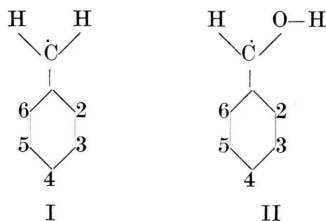
## ESR-Spektren des Benzyl- und des $\alpha$ -Hydroxybenzylradikals

HANNS FISCHER

Deutsches Kunststoff-Institut, Darmstadt

(Z. Naturforsch. **20 a**, 488—489 [1965]; eingegangen am 20. Februar 1965)

Hochaufgelöste Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektren des Benzylradikals (I) sind kürzlich von DIXON und NORMAN<sup>1</sup> während der Reaktion von Toluol mit Hydroxylradikalen beobachtet worden. Wir haben dieses Radikal und sein Derivat, das  $\alpha$ -Hydroxybenzylradikal (II), bei der Reaktion von Hydroxylradikalen mit Phenyllessigsäure bzw. Benzylalkohol erhalten. Dabei wurden einige Besonderheiten der Radikalreaktionen und der ESR-Spektren von I und II festgestellt.



Die Untersuchungen wurden mit der von DIXON und NORMAN<sup>2</sup> und auch von uns<sup>3</sup> bereits früher ausführlich beschriebenen Durchflußtechnik durchgeführt.

Bei der Reaktion von Phenyllessigsäure ( $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) in  $10^{-1}$ -mol. wäßriger Lösung mit Hydroxylradikalen werden ESR-Spektren beobachtet, deren Struktur von der Konzentration der Schwefelsäure in den Lösungen abhängt. Bei niedriger Säurekonzentration ( $c < 10^{-2}$  Mol/l) zeigen die Spektren eine Gesamtausdehnung von 75 Oe und besitzen neben kleineren, nicht völlig aufgelösten Aufspaltungen eine Dublettaufspaltung von  $a_D = (34 \pm 1)$  Oe. Sie sind deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit auf Radikale vom Cyclohexadienyltyp zurückzuführen, die durch Anlagerung von Hydroxylradikalen an die Benzolringe der Phenyllessigsäuremolekeln entstehen. Bei höherer Säurekonzentration verschwinden die Spektren mit der Dublettstruktur. Es erscheint das in Abb. 1 wieder-gegebene Spektrum, das nach seiner Linienstruktur dem Benzylradikal (I) zugeordnet werden muß.

tration ( $c < 10^{-2}$  Mol/l) zeigen die Spektren eine Gesamtausdehnung von 75 Oe und besitzen neben kleineren, nicht völlig aufgelösten Aufspaltungen eine Dublettaufspaltung von  $a_D = (34 \pm 1)$  Oe. Sie sind deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit auf Radikale vom Cyclohexadienyltyp zurückzuführen, die durch Anlagerung von Hydroxylradikalen an die Benzolringe der Phenyllessigsäuremolekeln entstehen. Bei höherer Säurekonzentration verschwinden die Spektren mit der Dublettstruktur. Es erscheint das in Abb. 1 wieder-gegebene Spektrum, das nach seiner Linienstruktur dem Benzylradikal (I) zugeordnet werden muß.

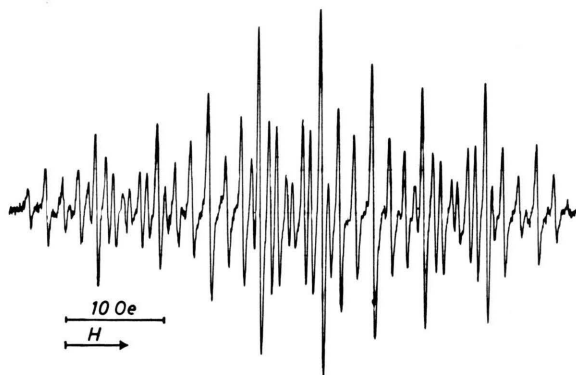


Abb. 1. ESR-Spektrum des Benzylradikals.

Aus der Analyse dieses Spektrums ergeben sich die in Tab. 1 angegebenen Aufspaltungsparameter.

Bei der Reaktion von Benzylalkohol ( $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{OH}$ ) mit Hydroxylradikalen treten bei niedriger Säurekonzentration ebenfalls Radikale vom Cyclohexadienyltyp

<sup>1</sup> W. T. DIXON u. R. O. C. NORMAN, J. Chem. Soc. **1964**, 4857.

<sup>2</sup> W. T. DIXON u. R. O. C. NORMAN, J. Chem. Soc. **1963**, 3119.

<sup>3</sup> H. FISCHER, Z. Naturforsch. **19 a**, 866 [1964].