

주사 전자현미경 (Scanning Electron Microscopy) 과 X선 미소 분석기 (X-ray Elementary Analyzer)

연세대학 의과대학 병리학교실
 김 정 숙

I. 주사 전자현미경

(Scanning Electron Microscopy)

1. 구조 및 원리

주사전자현미경은 1938년 (Von Ardenne)에 만들어 졌으나 그 당시에는 불과 몇개의 기계가 실험용으로 제작되었으며 1942년 (Zwory Kin et a l)에 주사전자현미경을 이용한 몇편의 논문이 나왔다. 40년대 중반 및 말기에는 주로 기계의 개발에 많은 노력을 기울였으며 그 결과 1965년 (Oatley)에 영국에서 처음으로 상품화된 주사전자현미경이 만들어져 오늘날 여러가지 형태의 주사전자현미경이 개발되어 시판되고 있다.

주사전자현미경은 secondary electron (2차 전자), back-scattered electron, X-rays, visible light, infrared energy 또는 currents from semiconductors 등의 서로 다른 전자선에 의해 유도된 signal로부터

얻은 다양한 정보를 가지므로써 모든 물체의 표면 관찰과 화학물질의 조성과 전기적 성질 및 물질의 상호관계 까지도 규명할 수 있게 되었다. 또한 주사전자현미경은 광학현미경, 형광현미경과 비교 할 수 있는 상을 맺을 수 있는데 초점심도가 매우 크기 때문에 주로 입체적인 상을 얻을 수 있으며 시료의 조작도 매우 간편하며 경우에 따라서는 화학적인 처리없이 간편한 물리적인 조작으로 생체시료를 있는 그대로 관찰할 수 있다.

주사전자현미경에 관한 전문적인 이론이나 기계적인 원리를 간단하게 요약하면 다음과 같다.

(1) 상 (Imaging System)

주사전자현미경의 근본적인 특성을 광학현미경 및 투과전자현미경 (Transmission electron microscope) 과 비교하면 그림 1 과 같다.

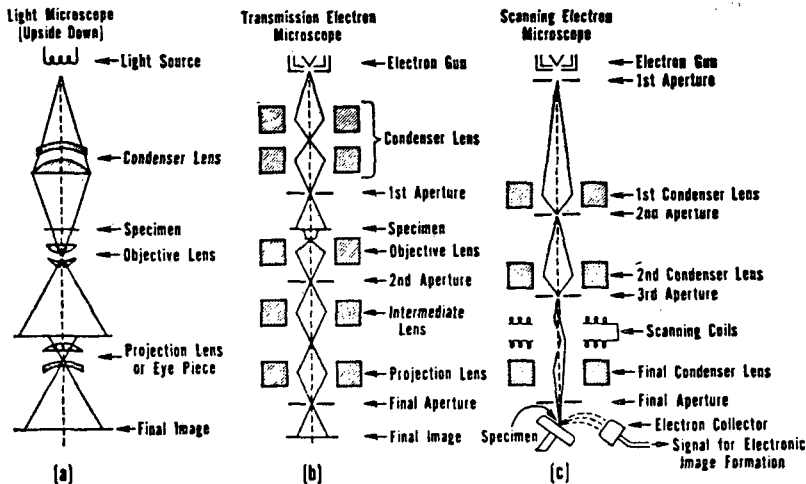


그림 1

광학현미경(그림 1. a)은 투명한 시료를 통과한 광이 광학렌즈에 의하여 확대되어 상이 맺히지며 투과 전자현미경(그림 1. b)도 광학현미경과 유사한 양상을 띄지만 전자가 투과되어 전자렌즈에 의해서 확대되어 형광관이나 사진 건판에 상을 맺는 것이 다르다. 이러한 관점에서 보면 광학현미경은 생화학적인 염색에 의하여 생체내의 화학조성 및 시료의 특성에 대한 반응을 나타내지만 배울에서 제한을 받게되고 투과전자현미경(TEM)은 해상력은 높고 확대비율이 대단히 높지만 시료자체의 화학적인 성질을 분석하거나 표면 관찰에는 문제점이 있다.

주사전자현미경(그림 1. c)은 일정한 부위에 주사한 전자선과 상을 맺는데 이용한 광선의 energy에 따라 상을 얻으며 filament로부터 나온 전자가 condenser lens에 의하여 응축된 전자선을 형성하면서 이 전자선이 시료의 표면을 두쌍의 scanning coil에 의해 반복하여 조사하면서 가로, 세로의 모양으로 전자선을 받게된다. 그와 동시에 generator의 전류가 음극관(Cathode ray tube)의 scanning coil을 통하여 시료표면에서와 동일한 확대된 선을 만들면서 확대된 상이 CRT에 맺히진다. 따라서 높은 해상력과 함께 시료에 대한 풍부한 정보를 얻을 수 있다.

주사전자현미경의 상을 만들고 작동하는 데는 electron-optical column, vacuum system, signal detection과 display system의 세가지 주된 부분으로 나눌 수 있다.

(2) Electron optical column

Electron-optical system의 구성은 electron gun(전자총), 2~4개의 전자 lens, aperture, astigmator 및 scanning coil (beam modulating coil)로 구성되어 있으며 일반적인 electron gun은 3극 진공관 형태로 설계되어 있으며 높은 전류밀도(high-current density)의 교차가 일어나게 된다. (Thornton, 1968) Electron gun은 직경 2mm 정도의 aperture가 있는 원통형 덮개 속에 머리핀 모양의 텅스텐 필라멘트(tungsten filament)가 들어있는 음극 및 같은 축의 aperture를 가진 원통형의 양극으로 이루어져 있다. 높은 전압(electron gun accelerating voltage)에 의해서 filament가 가열되면 전자가 튀어나와서 음극인 aperture를 통과하면서 전자원의 교차점을 형성하여 전자 확산을 방지하여 모든 전자가 통과하도록 되어있다. 양극은 접지(earth potential)에 의해 작동되며 전자

장의 가속화에 관여하고 electron lens는 자기성이거나 정전기성으로 electron gun에서 나온 전자선의 반경을 줄이는 역할을 한다. 반경 50 μ m의 electron gun으로부터 나온 전자선이 lens를 통하여 시료표면에 도달할 때에는 5~10nm로 줄어들게 되며 lens체제의 마지막 부위인 scanning coil이 시료 표면의 일정한 부위를 선으로 조사하는 작용을 하게 된다.

Aperture는 두가지 기능이 있는데 하나는 전자선과 시료표면 사이에 전자선을 이루게 하는 기능이고 다른 하나는 흩어진 전자를 모음으로 상의 흐트러짐을 방지하는 작용이다.

Astigmator는 네개의 자기 코일로 전류를 조절해서 렌즈 수차에 의한 상의 일그러짐을 조정하는 장치이며 scanning coil은 전자선을 시료표면의 일정한 부위를 반복 주사하는 장치인데 주사속도는 10nsec. 이하이다.

(3) Vacuum System

현미경이 작동중일 때는 electron-optical column뿐만 아니라 specimen stage가 들어 있는 specimen chamber도 고진공 상태를 유지해야 하며 rotary pump와 oil diffusion pump를 이용하여 column과 chamber 내의 진공을 유지하며 항상 10^{-4} torr 이하의 진공을 유지해야 한다.

(4) Mechanism of contrast formation and signal detection

시료 다른 전자선에 의해 유도된 signal을 얻을 수 있기 때문에 시료에 대한 여러가지 자료를 얻을 수 있다. (그림. 2). 전자선과 시료의 작용으로 secondary electron, reflected electron, X-ray, cathode luminescence 및 conduction(transmitted electron)과 같은 signal을 얻게 되며 생화학적인 염색을 한 생물 시료도 가시광선이나 적외선 부위의 광을 분석함으로써 관찰할 수 있으나 광량이 적고 광자를 모으는데 효율이 낮기 때문에 사진상을 얻기 위해서는 적어도 30분 정도의 노출이 필요하다. (Hayes and Pease, 1968).

외부의 bias를 이용하여 전자선에 의해 유도된 전류와 그 전류에 의해 생긴 전압을 측정할 수 있다. 그 전류는 CRT상의 강도나 line scan으로 나타낼 수 있고 일차전자와 전도된 전류를 추적하여 시료의 성질을 알 수 있다.

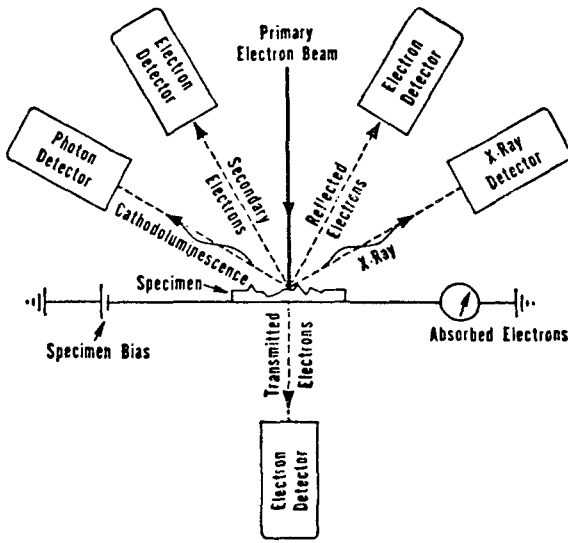


그림 2.

Diagram of the electron products from interaction of the primary electron beam with a specimen

(4) Visual and record display

일반적으로 관찰용과 기록용 두개의 CRT가 있다. 관찰용 CRT는 전자적으로 초점이 조절되며 분해능은 500line정도이다. CRT는 지속성의 황-청 인으로 구성되며 경우에 따라서는 contrast를 높이기 위해 황색 filter를 부착하는 수도 있다. 기록용 CRT도 역시 전자적으로 초점이 조절되며 12.5KV 정도에서 작동하며 분해능은 800line 정도로 사진 촬영에는 단색성의 청색인을 사용하게 된다. 카메라는 polaroid 또는 roll film형을 사용하며 기록용 CRT에 부착되어 있다. 사진의 질은 CRT의 scan 속도, 밝기, contrast 및 사용한 film에 따라서 달라진다. 상기요인의 적절한 조합에 의해서 노출 시간이 결정된다.

(5) Lens aberrations (렌즈 수차)

주사 광학 체계에 있어서 상의 질이나 해상력에 크게 영향을 미치는 몇가지 중요한 수차가 있다. 이러한 수차는 구면수차, 색수차, 굴절수차 및 astigmatism으로 나뉘어 지는데 구면수차는 렌즈축 부근의 강한 자기장 부위를 전자가 통과하면서 굴절에 의해 일어나게 되며 이것은 전자선 전압과 렌즈전류의 불안정 및 전자의 초점이 한점에 맺어질 수 없는데서 일어난다. 굴절은 상을 맺게하는 광의 파장과 시료 표면에 집중되는 일차전자의 각과 직접 관련이 있다.

Astigmatism은 electron-optical column의 비대칭성 때문에 일어나며 최종상을 일그러뜨리는 원인이 되며 전자장을 조절함으로써 교정할 수 있지만 외부 입자의 오염이 있을 경우에는 전자적인 조절이 불가능한 경우가 생긴다. 따라서 column 특히 aperture의 청결이 중요하며 주기적인 청소가 요망된다.

(6) 배율, 해상력 및 초점심도

주사전자현미경은 20~100,000배 정도의 넓은 영역에서의 확대가 가능하다. 그러나 생물 시료인 경우는 50,000배 이상에서 선명한 상을 얻기 힘들다. 주사전자현미경의 배율조정 장치는 attenuator(감쇠기)와 astigmator의 전류조절로 구성되어 있으며 attenuator는 가속 전압과 배율 변화를 자동으로 보정하는 역할을 하며 실제 배율은 최종 aperture와 시료 표면간의 거리(working distance)에 의해 결정되게 된다.

해상력은 기본적으로 최종 spot size가 전자선과 시료간의 작용의 두가지 요인에 의해 결정되는데 대부분의 시판되는 기계는 최종 전자선의 반경이 5~10nm 정도으로써 이차 전자는 10nm 정도의 해상력을 얻을 수 있다.

초점심도는 최종상의 단면에서 고·저 두점의 거리를 실측하여 얻을 수 있다. 주사전자현미경의 깊은 초점 심도는 최종 aperture의 반경에 의해 결정되므로 aperture 반경이 작아지면 초점심도는 커진다.

2. 시료 제작

주사전자현미경은 시료의 표면 구조나 형태를 관찰하는데 혁신적인 기계이나 관찰하는 시료는 생물 시료의 경우 될수 있는대로 살아있는 상태의 원형 손상없이 제작되어야 한다. 광학 현미경이나 투과전자현미경에 비해 주사전자 현미경의 시료제작은 비교적 간편하다. 그러나 좋은 결과를 얻기 위해서는 세심한 주의가 필요하며 일반적인 시료 제작과정은 고정, 탈수, coating의 3단계만 거치면 관찰이 가능하지만 현재는 시료제작의 여러가지 기술이 개발되어 표면구조 뿐만 아니라 세포내의 구조 및 세포소기관까지도 관찰 할 수 있게 되었다.

본편에서는 일반적인 생물시료의 표면 관찰을 하는데 필요한 제작방법을 기술하고 지금까지 개발된 몇가지 특수한 제작방법을 소개 하려고 한다.

(1) 시료의 크기

투과전자현미경이나 광학 현미경에 비해 상당히 큰 조직까지도 관찰이 가능하지만 시료가 너무 크면 고정하는데 시간이 많이 걸리며 완전한 고정이 힘들고 탈수와 건조 과정에서 변화가 올 가능성이 크다. 또 전기 전도체로 coating을 한 후에도 방전 현상을 제거하기가 힘들다. 그러므로 관찰하려는 시료는 가능한 한 작게 잘라서 가장 넓은 면을 시료대 (specimen stub)에 부착시키는 것이 좋다.

(2) 시료의 세척

연조직이나 경조직에 관계없이 대부분의 시료표면은 점액, 혈액, 림프액, 세포액, 세포의 파편, gum, wax 등의 물질이 덮여있다. 이러한 물질이 주사전자현미경으로 관찰하는데 오염 요인이 되기 때문에 시료를 제작하는 동안에 제거하지 않고 고정, 탈수를 하게 되면 이러한 물질들이 고정되어 정확한 표면관찰을 불가능하게 하고 경우에 따라서는 표면을 이루고 있는 물질과 반응하기도 한다. 그래서 이러한 물질들은 고정하기 전에 제거해야 한다.

대부분의 세포의 물질들은 등장액 (buffered saline solution)이나 증류수로 세척하면 제거된다. 세척은 고정하기 전에 하므로 시료의 수축이나 팽창을 방지하고 또 다른 변형을 막기 위해서 가능하면 생체와 비슷한 생리적 조건에서 세척을 하는 것이 이상적이다. 예를 들면 증류수는 단단한 조직 세척에 이용되며 뼈와 나무의 잎, 줄기 등은 압축공기로 세척하기도 하며 점액질은 이러한 단순한 세척으로 제거되지 않기 때문에 1~4% HCl이나 0.2M sucrose sol.에 부드럽게 흔들어 세척하거나 O₂O₂로 짧게 고정한 후 음과충격에 의해 제거하기도 한다. (Kawabara, 1969 1970) 세척제나 물리적인 세척방법에 의하여 제거할 수 없는 물질들은 적당한 효소를 사용하여 제거하기도 한다. Papain이나 다른 효소들은 여러가지 오염물을 제거하는데 사용되며 (Boyd and Wood, 1969), 장 표면에서는 chymotrypsin이나 trypsin등을 사용한 보고가 있다. (Kanazawa et al 1972, Lee 1972) 이러한 방법 외에도 조직에 따라 특수한 세척방법이 개발되어 있는데 이런 모든 세척법을 행하는 데는 본래 시료표면이 변하지 않도록 세심한 주의를 기울여야 한다.

(3) 고정(Fixation)

조직시료는 생체로부터 절취해서 세척한 후 가능

한 한 빨리 고정하는 것이 좋으며 온도와 pH등의 생리적 조건이 다른 환경에서는 필요한 영양분이나 산소의 결핍때문에 급속한 자가분해가 일어나기 쉽기 때문에 고정까지의 시간을 줄이는 것이 인위적인 변형을 최소로 줄일 수 있는 방법이다.

고정용액이나 방법은 투과전자현미경과 별 차이가 없지만 투과전자현미경 시료제작에서와 같이 시간에는 절대적인 제약을 받지 아니하는데 이것은 관찰하는 부위가 표면이기 때문이다. 주사전자 현미경의 경우 이상적인 고정액 상태는 등장액 (buffered saline solution)이다. 일반적으로 주사전자현미경의 고정시약으로는 glutaraldehyde, paraformaldehyde 등의 aldehyde계통의 시약과 O₂O₂등을 사용하지만 광학현미경용 고정시약을 사용하여도 큰 변화는 없다. 만족할 만한 고정시약을 얻기 위해서는 온도(5℃) pH(7.4)등도 중요하다. 특히 고정액 자체의 pH 변화는 세포내 단백질 모양의 변화를 가져오기 때문에 생체내 pH를 유지해야 한다.

고정을 행하는 동안 가능한 한 생체와 비슷한 모양을 유지하기 위해서 여러가지 고정 방법이 고안되었다. 일반적으로 많이 사용되는 방법으로는 ① vascular perfusion ② immersion ③ dipping ④ injection등이 있다. Vascular perfusion은 살아있는 상태에서 행하기 때문에 변화가 제일 적고 고정이 모든 조직에 균일하게 되며 약한 조직을 손으로 다루기 전에 충분히 고정할 수 있으므로 가장 이상적인 방법 이기는 하지만 사람의 조직 관찰로는 불가능하다. 가장 일반적으로 행하는 방법은 immersion fixation 인데 간편하게 행할 수 있는 이점이 있지만 조직을 절단하므로 압이 떨어져 부피의 변화가 오고 사후조직의 변화가 필연적으로 수반되는 결함이 있다. Dipping method는 전고정 동안은 조직이 동물에 붙어 있으며 정상적인 생리 현상이 진행되기 때문에 변형이 적은 이점이 있으나 고정액의 깊은 침투가 불가하기 때문에 투과전자현미경 보다는 표면을 관찰하는 주사전자현미경의 경우 권장할 만한 방법이다. Injection method도 살아있는 상태에서 행하기 때문에 기관의 내부구조의 특정한 부위를 볼 때 이용하게 된다.

(4) 건조(Drying)

일련의 방법으로 고정을 하고 탈수한 조직은 고진공 하에서 관찰하기 위해 건조를 시켜야 한다. 건조

과정에서도 시료의 변형을 최소로 줄여야 하며 시료의 성질에 따라서 ① air drying ② vacuum freeze drying ③ critical point drying 등의 방법을 선택하여 시행하는 것이 좋다.

Air drying(공기건조)은 bacteria의 포자나 뼈, 치아 같이 단단한 조직을 건조시키는데 이용되며 vacuum freeze drying(냉동진공건조)은 조직을 동결시킨 상태에서 높은 진공으로 건조하는 방법인데 일반적인 연조직을 관찰하는데 사용되지만 동결과정에서 결정체 때문에 조직표면의 손상이 오는 경우가 있으며 시료를 건조하는데 많은 시간을 요하게 된다. Critical point drying(임계점 건조)은 액체에 담겨 있는 조직을 기체와 액체상태의 임계점으로 처리하므로 신속히 건조시키는 방법으로 Anderson(1952)에 의해 고안되었다. 임계점을 얻기 위해서 액체 CO₂, freon, nitrous oxide 등을 사용하는데 액체 CO₂를 사용할 경우 alcohol이나 acetone이 CO₂액과 혼합이 일어나지 않으므로 isoamylacetate로 치환한 후에 사용해야 한다. Critical point drying의 이점은 처리과정 동안 시료의 변형을 최소로 줄일 수 있기 때문에 주사전자현미경 시료제작에 가장 많이 사용되고 있다.

(5) Specimen mounting

조직을 시료대(specimen stub)에 고정(mounting)시킬 때에는 접착제를 이용한다. 접착제로는 아교, 양면 tape 등을 사용하는데 전기전도성을 높이기 위해 금속을 혼합한 silver paste나 aluminium 양면 tape 등을 사용하며 bacteria나 virus 같은 미세한 시료는 cover glass에 도말해서 부착시키기도 하고 membrane filter를 이용해서 붙인다.

(6) Specimen surface coating

대부분의 생물조직은 비전도체이기 때문에 관찰시에는 표면에 음전기를 가지게 되며 이의 전도성을 높이기 위해 10~15nm 정도의 전도물질로 얇게 입히게 된다. 전도물질로는 탄소, aluminium, 금, 은, 백금 등을 사용하며 경우에 따라서는 탄소와 금속의 이중 coating도 한다. 생체 표본에 가장 많이 이용되는 효율적인 전도 물질은 금과 백금의 합금이다. 그러나 coating을 얇고 관찰해야 하는 경우는 대전현상을 피하기 위해 가속전압을 낮게 해서 관찰하는데 이럴 경우에는 해상력이 많은 제한을 받게 된다. Coating은

고진공 상태에서 행해지는데 coating 두께가 10nm 정도로 균일하게 하는 것이 이상적이다. 그러나 실제 생체표면의 굴곡 때문에 균일한 coating은 상당한 기술을 요한다.

3. 주사전자현미경의 응용

처음 주사전자현미경이 개발되었을 때는 주로 동식물의 조직 관찰에 이용되었지만 곧 bacteria, fungus 및 virus의 관찰에도 이용되었다. 그리고 여러가지 시료제작 방법이 개발되어 표면구조 뿐만 아니라 세포의 횡단면, 세포내 여러가지 소기관의 표면 및 내부구조 까지도 관찰이 용이하게 되었으며 최근에는 세포 성장 과정 및 분열과정의 표면, 혈액세포(blood), 근육(muscle) 신경세포(nervous tissue) 소화기(digestive system) 및 피부(skin) 표면 까지도 관찰이 가능케 되어 많은 연구가 이루어지고 있다.

II. X선 미소분속기

(X-Ray Elementary Analyzer)

1. 전자 probe X선의 역사

조직 내에 들어있는 물질을 확인하는데 전자선을 쓰게 된 것은 1913년 Moseley가 원자 번호와 그 원소에 특유한 특성 X선 파장과의 어떤 관계가 있을 것을 시사한 이래 60여년이 된다. 이러한 사실은 특성 파장을 잡을 수 있으면 특정 원소의 검출이 가능하다는 것을 보여 주었다.

1920년 영국의 Van Hevesy 등, 1923년의 Coster와 Van Hevesy에 의한 hafnium 원소의 발견 등은 이 분야 발전에 큰 계기가 되었다.

그 후 Hamos(1938)에 의해 조직 내에 존재하고 있는 화학적 물질을 검출하기 위해서 micro-analyzer의 원형이 처음으로 계획되었으며, 이것은 廣範한 1차 X-ray beam을 그 원소의 특성 X-ray의 파장에 대하여 특성 X선의 초점을 서로 연결하도록 설계된 X선 분광기를 통해서 얻었다. 이러한 시료로부터의 특성 X선에 의해 얻어진 X선상은 50 μ m의 "point to point"의 분해능을 갖은 것이었다.

그 후 Hiller는 1943년 처음으로 1 μ m 이하의 초점을 결합할 수 있는 전자선 probe를 써서 특성 X선을 시료로부터 나오는 것을 시도하여 1947년 미국의 특허를 얻게 되었다. 그러나 당시에는 이러한 생각이 적극적인 지지를 얻지 못하다가 1949년에 Castaing

과 Guinier는 전자 beam을 시료상에서 초점을 맞추어 발생한 X선의 분석을 위한 X선분광기를 잘 디자인해서 시료를 구성하는 원소군을 정량적으로 분석하는 장치를 최초로 만들어 냈다. 그들은 더 나아가서 X線微少部分分析의 원리를 명확하게 제시하고 또 장치의 성능을 보완할 목적으로 순수한 표준 원소의 sample을 사용할 수 있는 방법을 보여 주었다.

이후 최근 약 10년간에 전자 probe X선 분석법과 주사전자현미경의 조합을 포함해서 많은 X선분석에 의한 원소 분석법의 연구가 나오게 될 것이다.

1963년에는 분석시료의 분석부위를 광학적으로 확대해서 보기 위해 광학현미경이 Electronic-lens나 시료 holder의 사이에 사용되기도 하였다. (Briks, 1963) 그 후 장치는 더욱 발전하여 전자선 beam을 시료상에 대고 성능이 좋은 분석을 얻기 위하여 전자 beam으로 시료 面上을 走査(Scan)하여 2차전자상을 얻을 수 있는 방법이 취해졌다. (Cosslete and Duncum 1956) 전자선 probe 조사에 의해 시료표면으로부터는 2차전자선, 특성 X선 외에도 Cathod luminescence와 시료전류, 흡수전류 등의 측정과 검출이 가능하여 지고 보다 더 많은 정보를 기록하는 것이 가능해졌다. (Melford and Whittington, 1966) 그 후 1971년의 X-ray energy spectrometry (Russ 1971)의 등장으로 더욱 획기적인 발전이 전개 되었다. 그리하여 파장을 이용한 특성X선 분광기(검출기)에 의해서 특성X선 energy를 잡을 수 있게 되었다.

이 X선 분광기(검출기)는 前者가 파장분산형(Wave length dispersive type)이라 불리우는데 대해 비분산형(Non-dispersive type) 혹은 X-ray energy dispersive type이라고 불리고 있으며 前者가 몇種의 결정면을 쓰는 것에 대해, Silicon 반도체를 사용하는 고로 NDS(Non dispersive type silicon diode) detector라고 부르는 사람도 있다. 그러나 X선 energy를 對象으로 하고 있으므로 "energy dispersive type XED"라고 불러야 한다는 견해가 많다.

개개의 원소를 검출 할때마다 검출특성 X선의 파장에 각도를 맞추지 않으면 안되고 수동이진 자동이진 간에 무척 긴 시간을 필요로 한다. 그러나 XED형의 경우는 Na부터 U까지 원소의 검출이 switch하나로 수초 내지 수백초 사이에 모든것을 검출, 기록하게 되어 그 우수성을 인정하나 low energy 원소 즉 Na 등은 검출기에 부착하기 쉬워 전량을 검출하기 어려운 점도 있다. 최근에는 XED type의 검출기 증폭

기계에 다시 Computer를 연결조작 하는 것으로 室内 원소의 정성적 검출로부터 정량적 검출까지도 가능하게 되어 모든 원소의 분석이 가능하게 되었다.

2. 생물시료의 원소 분석법(element analysis)의 응용

생물시료에서 원소를 분석했다는 보고는 Brooks에 (1962)의하여 처음으로 보고 되었다. 그는 연골의 절편을 水晶板에 붙이고 시료 표면을 보호하고 전기 전도도를 잘하기 위해 얇게 알루미늄을 진공증착 하여 연골 内에서 수개의 원소를 찾게 되었다고 보고 하였고 Tousimis 등 (Hagerty 1968, Tousimis 1969, 1972)은 소장의 동결절편을 써서 glutaraldehyde와 Omic tetraoxide acid 고정제의 절편을 써서 비교하고 (1969, 1970), 개구리 피부의 상피조직의 동결 건조 절편에서 Na, Cl 및 K의 α_2 의 특성 X선 상을 얻게 되었다.

특히 그의 보고는 腸上皮로부터 DL-Se 메치오닌의 흡수를 원소분석 법으로 추적한 것은 이 분야 발전에 큰 공헌이라고 할 수 있다. 이후 부터 생물시료 内의 정량의 가능성이 모색되기 시작했다.

그 후 Lehren(1972)는 젤라틴 内에 10~15% 정도로 여러가지의 원소를 혼합해서 동결건조 절편을 만들어 원소분석상 10^{-12} 의 정량적 가능성을 보고하였고 Ingram(1972)은 연골의 동결 건조로 微少部分分析의 가능성을 검사하고 Lane(1969) 및 Tandler(1970)는 안티몬산칼륨을 고정제로서 쓰면서 안티몬산과 Na, Mg, K등과 생겨난 침전을 분석검사 했다. 일본의 水平氏(1971)은 안티몬산 칼륨과 Osmium산의 혼합액으로 고정하면 Na가 침전한다고 만든 생각할 수 없고 핵의 Chromatin이 核小体部에서 특히 Ca와 특이적으로 결합 한다는 것을 보여 주었다.

Zagon(1970)은 原虫을 프로테인銀으로 염색 하여 0.4(Cu) : 1 (Ag) : 6.1 (Au)의 비를 가지고 있음을 보고 하였고 Langer(1972)는 肺아스베스도에서 폐조직의 微少部X線分析을 행하여 새로운 원소등을 검출하여 공해 연구의 중요성을 주장하기도 하였다.

Coleman(1972)은 세포의 생리 기능과 칼슘 대사의 상관을 원소분석적으로 명백히 하려고 시도 하였고 일본의 須賀氏는(1968, 1971)치아의 원소 분석을 포함해서 충치時의 원소분포의 변동의 연구를 하였고 또 화석의 치아의 변화에 관해서도 조사한 것 등은 높이 평가되고 있다.

그러나 이상으로 보여준 업적은 모두 광학현미경 수준에서의 X선 분석에 의한 Data 일 뿐만 아니라 파장 분산형 X선 검출기를 사용한 연구이다. 오늘날 최고의 분해능과 확대상 및 투과상 등을 얻은 전자현미경 수준에서 微少部の 원소 분석의 가능성이 충분히 얻어져 1970년 전후에 걸쳐 England의 AEI사로부터 “분석전자 현미경”(analytical electron microscope)EMMA-4가 생물용으로 개발되었다. AEI의 투과전자 현미경의 대물 lens와 집광 lens 사이에 특별히 설계된 집광 lens로써 “mini-lens”가 등장하여 시료실에는 2-channel의 파장분산형 X선 분광기와 1-channel의 XED-X선 검출기를 갖춘 것들이 나오게 되었다.

일본에서도 학자와 maker가 협력해서 우선 주사 전자현미경(水平 1971, 1973)에 파장분산형 X선 검출기를, 그리고 XED-X선 검출기의 개발에 따라 이것을 부착해서 行하고 다음으로 생물적 투과형 전자현미경에 XED-X선 검출기를 장치하여 나아가서는 주사상 장치(ASID)와 조합해서 사용이 용이하고 성능좋은 분석전자 현미경이 나오게 되었다(水平 1973 1976)

3. 분석장치와 사용방법의 기초

(1) 파장분산형 X선 검출기를 장치한 주사형 전자현미경 :

고성능 주사형 전자 현미경에 파장분산형 X선 검출기를 부착하여 X선 분석장치(XMA)의 우수한 성능을 동시에 이용할 수가 있는데 이것은 주사형 전자현미경이기 때문에 像이 2차적으로 얻어지는 반사 전자

상이며 주로 시료 표면의 구성 원소를 확인하는 목적에 응용하게 된다. 만약에 투과전자상을 희망하는 경우에는 투과주사 전자상 장치를 Adapter(加減장치)로 해서 부착하면 가속전압 50KeV 정도까지 투과주사상의 관찰과 撮影이 가능한 것이다.

파장분산형의 X선 검출기 X-Ray Spectrometer는 대각 1A°부터 130A°정도까지의 크기를 관찰할 수 있는 것으로 즉 베륨(Be)부터 우라늄(U)까지도 검출될 수 있는데 이것은 불화리튬(LiF) 石英(SiO₂) 스테아레이트(STE) 등의 결정 분광기와 X선 검출기가 항상 일정한 円周上에 위치할 수 있도록 설계되었기 때문에 각각의 원소에 특유의 특성 X선의 파장에 의해 결정면의 입사각도가 고정되므로써 비교적 고르게 파장이 유지된다. (표 1) 우리들의 일상 필요한 원소와 그들의 특성 X선의 파장, 분광 결정의 파장은 표 2와 같다. 파장분산형 XMA는 주로 고형시료에 적합하고 2차 전자상을 관찰하고 기록한 후 검출 원소의 X선의 종류(K, L, M)을 따라서 그 파장의 검출에 적합한 분광 결정을 정하게 되며 그 검출파장에 맞춰서 결정각도를 조정하여 X선에 의한 검출과 동시에 표준시료를 써서 비교하는 것이 이상적이다.

분광 결정과 검출기의 각도의 조정은 수동 또는 자동으로 행해지며 따라서 개개의 특정 원소의 검출에는 유리하지만 원소를 전혀 알지 못하는 경우에는 모든 원소를 조사, 정성분석 하는데는 많은 노력과 시간이 필요하다. 그러나 일반적으로 원소 밀도가 높고 단단한 즉 X선 照射에 강한 성질을 가진 금속, 광물

표 1. X 선분광용 결정과 분광파장

결 정 명	반 사 면	검 출 파장 (A)	Ka 특성 X선 검 출 원 소 域()내는 L선
KAP(Ortho-phtalate potassium hydrogen)	0 0 1	4.5~25	11~14(24~44)
RbAp(Ortho-phtalate rubidium hydrogen)	0 0 1	2~18	11~14(26~60)
Gyp(Gypsum)	0 2 0	2.6~15	11~14(28~53)
ADP(Ammonium dihydrogen phosphate)	1 0 1	1.8~10.3	12~21(32~63)
EDT(Ethylene diamine tartrate)	0 2 0	1.4~8.3	14~22(37~70)
PET(Pentaerghthritol)	0 0 1	1.4~8.3	14~22(37~70)
Ge(Germanium)	1 1 1	1.1~6.0	16~34(41~78)
Lif(Lithium fluoride)	2 0 0	1~3.8	19~35(48~80)
Nacl(Sodium chloride)	2 0 0	0.9~5.3	16~37(42~92)

表 2. 螢光X線分析을 위한 元素와 K(α)와 L(L \times 1)의 波意(A)

原子 No.	元素名	K α 1	分光結晶体	原子 No.	元素名	L α_1	L β_1	分光結晶体例	
11	Na	11,909	KAP, R6AP	34	Se	8,990	8,736	KAP	
12	Mg	9,889		42	Mo	5,406	5,177		
13	Al	8,337		47	Ag	4,154	3,934		
14	Si	7,125		48	Cd	3,956	3,738		
15	P	6,155		50	Sn	3,600	3,385		PbAP GyP
16	S	5,372		51	Sb	3,439	3,226		
17	Cl	4,728		56	Ba	2,775	2,567		EDT PET
19	K	3,741		76	Os	1,391	1,197		
20	Ca	3,358		78	Pt	1,313	1,120		
25	Mn	2,102		79	Au	1,276	1,084		
26	Fe	1,936	PET EDT	80	Hg	1,241	1,049	LiF	
27	Co	1,786		82	Pb	1,175	0,982		
29	Cu	1,54		83	Bi	1,144	0,952	NaCl	
30	Zn	1,435		92	U	0,911	0,720		
33	As	1,176		LiF Ge, NaCl					
34	Se	1,105							
35	Br	1,040							

기타의 비생물시료와 뼈, 이빨, 폐각 또는 화석등 일부의 생물시료에 대해서는 효과가 크며 앞으로 더욱 연구가 기대된다. 그러나 일반생물 시료는 주로 H, N, C, O, 와 Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca 등의 경원소가 중심으로 구성되어 있으며 원소 밀도가 좋지 않은데다가 시료가 전자의 照射에 약하고 장시간의 조사에 견디어 내지 못하는 점등이 있어 파장분산형의 X선 분광기를 쓴 원소분석에는 문제점이 있다.

즉 Computer 를 써서 자동화된 분석기기를 가진것도 미지의 구성 원소를 하나하나 분석해서 규명해가는 데는 많은 시간을 요하고 또 시료가 쉽게 손상한다든가 증발하기도 하며 특히 Na나 K는 증발하기가 쉬운것 등은 큰 난점이다.

(2) X선 energy 분산형 검출기(XED)

A: XED: 이미 전술한 것과 같이 파장분산형 X선 검출기는 시료내에 함유되어 있는 모든 원소를 분석 능력으로 본다면 Na로 부터 동시에 분석해서 표시브라운관 위에 X선 Spectrum으로서 표시하는 것은 안되며 개개의 원소의 분석에 대하여는 신뢰도는 높지만 상당한 시간이 걸리게 되며 생물 시료에서는그간에 시료가 타버린다든가 증발해 버리기도 하는 문제점 들이 있다. 그러나 energy 분산형의 X선 검출기로서의 분해능은 한계가 무한하여 단 수십초 내지는 수백초 동안에 Na부터 U까지 모든 원소가 X선 ene-

rgy spectrum으로서 표시 브라운관에 동시에 표시되며 X선 강도의 count수를 짧은 시간동안 동시에 알 수 있다.

전자현미경 内에 장치된 XED는 수 μ 의 두터운 베릴륨창(Beryllium window)으로 밀폐되어 있다. 시료를 전자선으로 조사하면 X선이 발생하며 산란X선 등은 Collimeter로 제거되고 Be창에 도달하여 Silicon 반도체의 결정内에 ion化 된다. 이때 전자는 positive와 negative layer에 이동한다. 이 방사선 검출용 Si(Li)는 높은 진공과 저온(액체질소 온도)하에서 보관될 필요가 있다. Be창을 통과해서 Si검출기에 들어간 X선은 ion化해서 "electron-hole pairs"가 생기게 되며 생긴 pairs의 수는 X선 energy와 비례하며 Si(Li) 검출기는 쌍극전자를 만드는데 대강 3.8 eV의 energy를 필요로 한다. 한개의 X선 光子로 만들어진 total charge는 전극 electrode에 집적 되어 적분되고 Si(Li) 검출기에 연결되어 있는 field effect transistor(FET)에 보내지며 FET에 나오는 신호는 X선 energy pulse의 증폭기에 보내져 multi-channel-analyzer(MCA)를 거쳐 각각의 energy 강도에 일치하는 memory-channels에 기억되어 산출된다. 이와같이 해서 얻은 기억, 적산된 X선 energy는 표시브라운관에 표시한다든가 tape에 기억되든가 teletype에 넣든가 curve로 해서 지상에 그려지든가 또는 count 수를 tape로 자동적으로 검출하게도 할 수 있고 computer와 연결해서 조작할 수도 있다.

B. XED를 장치한 시료실

작은 잡음의 발생 검출기에의 오염 및 산란전자선의 발생으로 인한 잡음을 막기 위해 시료실내는 얇은 carbon 판으로 내장하늘 것이 바람직하다. 또 X선 검출기는 가능한 한 시료에 30mm 이내로 접근시키는데 나가서는 그 사이에 collimeter를 놓아 될 수 있는 한 잡음을 막도록 설계되어야 하며 검출기와 시료와의 각도는 시료를 기울여서 검출기를 수평에 위치하는 경우와 그 반대의 경우가 있다. 그러나 경사각이 크면 화면의 상하에서 촛점이 맞지 않고 잡음을 가져올 수 있음을 주의해야 한다.

C. EDX의 분해능과 X선 검출감도(sensitivity)

XED로는 그 분해능의 한도가 100eV 정도이다. 일반적으로는 그 분해능은 130~160eV 정도이나 Computer program의 사용법을 잘 이용하면 분해능이 40 eV 정도 까지도 가능하다.

검출감도는 전술한 바와 같이 우선 검출기와 시료를 가능한 한 접근시킴으로서 X선의 수집각(collection angle)을 크게 하여 X선 energy count치(count rate)를 증강하게 된다.

같은 조건으로 원소를 조사해서 생기는 $K\alpha X$ 선의 상대검출효과(relative detection efficiency)는 원소의 energy역(energy range)에 의존해서 특이한 curve를 그리는 것이 알려져 있다. 즉 Na로 부터 Ca까지는 대강 직선적으로 상승함을 보인다. 이것은 검출기의 Be창의 X선 energy의 흡수효과에 의존해서 나타나고 이것은 $C\alpha$ 의 부근에서 극한에 달하며 Cu, Mo와 대강 기선에 평행하게 횡적으로 보인후 이번에는 직선적으로 하강을 표시하게 된다. 이것은 X선 energy의 증가와 더불어 검출기를 통과하는 에너지가 강하게 되는 효과라고 생각한다.

일반적으로 생물시료 구성원소군은 1~8 eV 전후 것이 대부분으로 상대검출 효율은 약 45%로 직선적으로 상승하는 curve를 보이는 group에 속하며 단지 중금속 원소(high energy group)의 L선이나 M선이 흔히 이 1~8 eV의 영역내에 중복 peak를 형성하면서 나타날 수 있음은 주의해야 한다.

위와 같은 원리와 특징을 가진 X선 분석기의 응용은 차차 범위가 넓어져 가고 있으며 크게 나누어

- ① 생체내의 존재하는 원소의 분석과 이의 소재를 확인하는데 이용되며
- ② marker나 염색제를 이용하여 원소의 위치와 특

이한 화학적 활성의 장소를 식별하고

③ 병리학적 상태에서 수반되는 정상 또는 이상농도의 원소인지를 확인하므로써 생물체 세포내에 존재하는 원소의 식별 및 정량분석을 할 수 있어 생체 연구에 큰 역할을 하게 되었다.

References

- Anderson, Thomas F.: In "Extrait du Congres De Microscpie Electronique". Sec. 5, 567-576, 1952. Edition due Revue d'Optique, Paris
- Anderson C.A.: Microprobe Analysis; John Wiley & Sons, N.Y., 1973
- Boyde A., Wood C.: Preparation of animal tissues for surface Scanning Electron microscopy. J. Microscopy 90:221, 1969
- Chandler J.A.: X-ray micro analysis in the Electron Microscope in practical methods in Electron Microscopy; Glansrt, A.M., North Holland Pub. Comp. Amsterdam, N.Y. Oxford, 1977
- Hayat M.A.: Principles and Techniques of Electron Microscopy; Biological Applications. Van Nostrand Reinhold Company, New York and London. Vol. 1, 1970
- Hayat M.A.: Fixation for Electron Microscopy. In preparation, 1978
- Hayes T.L., Pease R.F.W.: In "Advances in Biological and Medical Physics" Vol. 12, 85-137, 1968. Academic press, New York, London.
- Kanazawa K., Hamano M., Akahori H.: Application of Scanning Electron microscope to gastro-intestinal research. Jap. J. Clin, Electron Micros. 5:307, 1972
- Kuwabara T.: The scanning electron microscopic study of the cell surface. Proceedings of the 27th Annual Meeting of EMSA, Claitor's Pub. Div., Boston Rouge, La., 1969
- Lee S.H.: Isolation of parietal cells from glutaraldehyde-fixed rabbit stomach. J. Histochem. Cytochem. 20:634, 1969
- 水平敏知: Cell 7(11):487, 1975
- Oatley C.W., Nixon W.C., Pease R.F.W.: In "Advances in Electronics and Electron Physics" (ED. L. Marton and C. Marton). Vol. 21, 181-247, 1965, Academic Press, London.

Russ J.C.: Energy dispersive X-ray Analysis; X-ray and electron analysis. Ame. Soc., Baltimore 154:168, 1971

Stintzing H.: German patent Date of application No. 485, 13 May, 1927, Granted October 1929

Thornton P.R.: "Scanning Electron Microscopy" Chapman and Hall, Ltd., London E.C. 4., 1968

Von Ardenne M.Z.: Tech. Phys., 19, 407:416, 1938

Zworykin V.K., Hillier J., Synder R.L.: ASTM Bull 117, 15:23, 1942

Figure Legends

- 1) 원소주기율표
- 2) 주사전자 현미경과 X선 미소분석기
- 3) 버드나무 꽃가루 표면의 주사전자 현미경상
- 4) Lymphocyte 표면의 주사전자현미경상
- 5) 기관점막의 표면
- 6) 폐조직의 활면도
- 7) 기관지 점막표면의 확대상
- 8) 뇌의 magendi 공(空) 표면
- 9) 뇌의 magendi 공 표면의 확대상

The periodic table of the elements

PHILIPS X-RAY ANALYTICAL EQUIPMENT																	
[Detailed periodic table with element symbols and atomic numbers]																	
[Additional periodic table information and symbols]																	

