

几种橡胶和弹性体的冷冻超薄切片技术研究

张晓敏¹, 徐 颖¹, 王 华¹, 刘宏治², 洪 健^{1*}

(1. 浙江大学 分析测试中心, 杭州 310058; 2. 浙大宁波理工学院 生物与化学工程学院, 宁波 315100)

摘要:本文应用冷冻超薄切片技术对 5 种不同的纳米改性橡胶和弹性体以及 1 种共混弹性体进行了透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察, 探究了不同软硬程度纳米改性聚合物所采用的冷冻超薄切片温度及相关技术参数的差异, 分析了冷冻超薄切片温度与玻璃化转变温度之间的关系。同时还对二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化聚乙烯的共混物进行了电子染色方法试验, 为不同性质高分子材料超微结构研究选取合适的冷冻超薄切片温度及电子染色方法提供了参考。

关键词: 纳米改性; 聚合物; 冷冻超薄切片; 透射电子显微镜; 扫描电子显微镜

电子显微镜是表征材料和生物微结构的重要手段。在 高分子材料领域, 通过在聚合物中添加不同的纳米粒子, 得到的纳米改性聚合物综合了无机纳米材料和聚合物材料的优良特性, 具有良好的机械、光、电、磁等功能特性, 在微电子、化工、国防、核技术、航天、医学和生物工程等领域有着十分广泛的应用^[1~6]。纳米改性聚合物中的无机纳米材料通常以多种形式存在于聚合物中, 如单个分散的粒子、几十纳米的粒子团聚体以及较大的几百纳米的粒子团聚体。纳米粒子的尺度、分散性以及 与高分子基体的相容性对改性聚合物材料的性能影响很大, 其表征手段主要依靠透射电镜观察, 需要将纳米粒子与聚合物共混体样品切成 100nm 以下的超薄切片^[7,8], 在几十万倍的高放大倍数下观察纳米粒子的形态及其在聚合物中的分散状况, 并结合其他理化实验参数, 对其超微结构和性能作出综合评价, 这对分析聚合物材料的性能、优化聚合物材料的配方和制备工艺等具有重要的指导作用。

超薄切片技术是生物样品制备的常规手段, 但应用于高分子材料领域还存在不少问题, 并不是所有的高分子材料都可以进行超薄切片。样品自身的均一性、切片刀质量、切片速度、切片温度、切面的面积和切片的厚度等都会影响切片的质量。理想的切片应厚度均匀、切面完整, 没有污染、皱褶、空洞、刀痕和颤痕等^[9]。高分子材料种类繁多, 不同的高分子聚合物由于其玻璃化转变温度(T_g)不同, 在常温下具有不同的硬度, 如聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯(有机玻璃)的 T_g 在 100℃ 以上, 可以直接在室温下进行超薄切片。而一些橡胶和弹性体的 T_g 大都在 -45~ -70℃ 之间, 常温下很软, 且富有弹性, 需要通过液氮冷冻至 T_g 温度以下, 使其充分变硬后才能进行冷冻超薄切片^[10]。当填加了不同纳米粒子后, 高分子材料性状发生了改变, 样品的差异变大, 切片难度也相应增大, 需要针对不同样品调整超薄切片的各项参数, 探索最佳切片实验条件。对于电子散射能力相近, 透射电镜下反差较弱的共混聚合物还需要探索染色条件, 如 Hernández 等将聚碳酸酯/聚己内酯(PC/PCL)共混物样块经四氧化钼染色 1 周后制成 40nm 的超薄切片, 用透射电镜研究了共混物等温结晶后的结晶与相分离情况^[11]; Kong 等将植物油基聚氨酯(PU)和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的互穿聚合物网络(IPN)制成了超薄切片, 用四氧化钼蒸汽对切片中蓖麻油基 PU 的双键基团进行了染色, 然后用透射电镜研究了 IPN 中的 PU 和 PMMA 两相分布^[12]。本文针对 6 种不同的纳米改性橡胶和弹性体共混物, 报道了所采用的冷冻超薄切片实验方法和电镜观察结果, 以期对相关研究者和电镜工作者提供参考。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2022.08.007

收稿: 2021-12-02; 修回: 2022-02-16;

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No 51573169);

作者简介: 张晓敏(1992-), 女, 硕士, 研究方向为纳米改性高分子聚合物表征;

* 通讯联系人: 洪健, E-mail: jhong@zju.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 实验材料

氧化锌改性天然橡胶共混物,炭黑改性天然橡胶,二氧化硅改性乙丙橡胶-无规聚丙烯共混物,二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化聚乙烯共混物,蒙脱土-热塑性生物降解塑料(PBAT)-聚乳酸共混物,聚乳酸-聚酰胺弹性体共混物分别由华南理工大学、浙江大学、浙大宁波理工学院及浙江工业大学相关课题组提供。各聚合物的高分子组分玻璃化转变温度^[13~15]见表 1。

表 1 六种橡胶和弹性体主要成分的玻璃化转变温度(T_g)
Table 1 Glass transition temperatures (T_g) of six main components of rubber and elastomer

聚合物名称	高分子组分	T_g (°C)
氧化锌改性天然橡胶共混物	天然橡胶	-72
	炭黑改性天然橡胶	-72
二氧化硅改性乙丙橡胶-无规聚丙烯共混物	乙丙橡胶	-50~-60
	无规聚丙烯	-20
二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化聚乙烯共混物	顺丁橡胶	-110
	聚氯乙烯	87
	氯化聚乙烯	-8~-10
蒙脱土-PBAT-聚乳酸共混物	PBAT	-30
	聚乳酸	60~65
聚乳酸-聚酰胺弹性体	聚乳酸	60~65
	聚酰胺	40~57

1.2 仪器

Leica EM UC 7/FC7 型冷冻超薄切片机(德国徕卡公司),Leica EM KMR2 玻璃制刀机(德国徕卡公司);JEM-1230 型透射电子显微镜(日本电子株式会社),Morada 侧插式 CCD 相机(德国 SIS 公司);ZEISS Gemini 300 型扫描电子显微镜(德国蔡司公司)。

1.3 实验方法

- 1.3.1 氧化锌改性天然橡胶共混物 预先对氧化锌改性天然橡胶共混物样品进行手工修块。根据天然橡胶的 T_g 设置-90、-120、-140、-160℃四个切片温度。在徕卡冷冻超薄切片机上加注液氮,制冷 30min,待切片机腔室、玻璃刀及样品块温度达到设定值后,用玻璃刀分别进行超薄切片和厚切片。超薄切片厚度为 80nm,用覆芳华膜铜网正面沾取无水乙醇后,滤纸吸掉表面部分无水乙醇,然后快速捞取切片。厚切片的厚度为 6~7μm,将切好的厚切片转移至滴有饱和蔗糖溶液的硅片上,待切片展平后用双蒸水将蔗糖溶液清洗掉。超薄切片在透射电镜下观察,加速电压 80kV(以下同)。厚切片硅片样品在扫描电镜下用背散射电子模式观察,加速电压 20kV。
- 1.3.2 炭黑改性天然橡胶 炭黑改性天然橡胶样品在徕卡冷冻超薄切片机上用玻璃刀进行超薄切片,针对炭黑不同含量设置-90、-120、-140、-160℃四个切片温度,切片厚度为 75nm,用覆芳华膜铜网捞取切片,置于透射电镜下观察。
- 1.3.3 二氧化硅改性乙丙橡胶-无规聚丙烯共混物 二氧化硅改性乙丙橡胶-无规聚丙烯共混物样品在徕卡冷冻超薄切片机上用玻璃刀进行超薄切片,根据乙丙橡胶的 T_g 和无规聚丙烯的 T_g ,设置-90、-120、-140℃三个切片温度,切片厚度为 75nm,用覆芳华膜铜网捞取切片后置于透射电镜下观察。
- 1.3.4 二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化聚乙烯共混物 二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化

聚乙烯共混物样品在徕卡冷冻超薄切片机上用玻璃刀进行超薄切片,根据顺丁橡胶的 T_g 、聚氯乙烯的 T_g 和无规聚丙烯的 T_g ,设置 -120°C 和 -140°C 两个切片温度,切片厚度为 75nm,用覆芳华膜铜网捞取切片,再分别用四氧化钼蒸汽进行熏染 15h 和不熏染处理,然后置于透射电镜下观察。

1.3.5 蒙脱土-PBAT-聚乳酸共混物 蒙脱土-PBAT-聚乳酸共混物样品在徕卡冷冻超薄切片机上用玻璃刀进行超薄切片,根据 PBAT 的 T_g 和聚乳酸的 T_g ,切片温度设置在远低于 PBAT 的 T_g 的 -120°C ,切片厚度为 80nm,然后用覆芳华膜铜网捞取切片,置于透射电镜下观察。

1.3.6 聚乳酸-聚酰胺弹性体共混物 聚乳酸-聚酰胺弹性体共混物样品在徕卡冷冻超薄切片机上用玻璃刀进行超薄切片,虽然聚酰胺的 T_g 和聚乳酸的 T_g 都在室温以上,考虑到聚酰胺的韧性及吸水性,将切片温度设置在远低于 T_g 的 -140°C ,切片厚度分别设置为 80 和 200nm,然后用覆芳华膜铜网捞取切片,再用四氧化钼蒸汽进行熏染处理 1h,置于透射电镜下观察。

2 结果与分析

2.1 氧化锌改性天然橡胶共混物

通过不同温度的切片试验,发现氧化锌改性天然橡胶共混物在 -160°C 的超薄切片质量最好,随着温度升高,不易切出超薄切片,在 -120°C 下超薄切片仍会发生严重褶皱。但在 -90°C 以下的温度可以切出平整的厚切片, -90°C 下 $7\mu\text{m}$ 厚切片的扫描电镜背散射电子成像效果与在 -160°C 下的厚切片观察效果差异不明显,说明对于微米尺寸相结构的天然橡胶类共混物更适合选择厚切片,切片温度在低于 T_g 至 -160°C 左右都可以。在常规冷冻超薄切片技术中,一般将样品切片端面修小并将切片厚度设置为 $70\sim 90\text{nm}$,但由于两种天然橡胶是微米级相结构,通常的超薄切片在透射电镜下达不到观测相畴整体分布的效果,并且超薄切片容易发生褶皱(图 1a)。因此可以切取较大面积的厚切片,贴在硅片上用扫描电镜背散射电子模式观察。从图 1(b)中可以看到扫描电镜低倍大视野下观察微米级天然橡胶相结构的效果较好,图中浅色部分和深色部分为两种不同的天然橡胶,两相混合良好,相畴尺寸在 $3\sim 30\mu\text{m}$ 左右,图中黑色小颗粒为氧化锌纳米粒子。

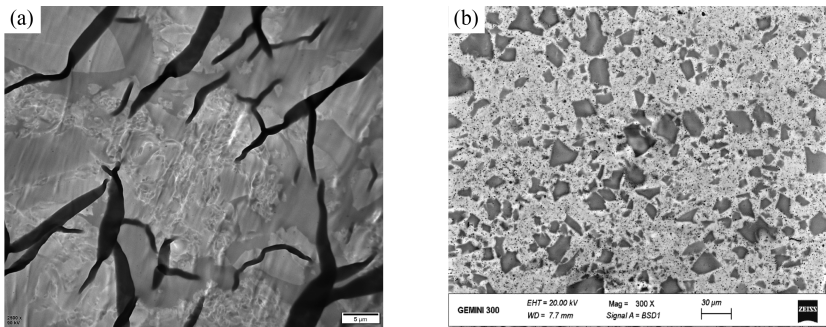


图 1 氧化锌改性天然橡胶共混物:(a) 透射电镜像;(b) 扫描电镜背散射电子像

Figure 1 Zinc oxide modified natural rubber polymer: (a) TEM micrograph;
(b) SEM backscattered electron micrograph

2.2 炭黑改性天然橡胶

炭黑改性天然橡胶中,无论炭黑重量份数低于 40 或高于 40,在 -120°C 左右的超薄切片都会发生褶皱并且切片比仪器设置的厚度偏厚,在透射电镜下观察不到清晰的炭黑形貌,因此对于含有炭黑等比较坚硬的纳米颗粒天然橡胶类共混物,要根据添加纳米颗粒不同的重量份数选择不同的切片温度。炭黑重量份数低于 40 份时,切片温度设置为 -160°C ,重量份数高于 40 份时,会使橡胶整体硬度增大,可以将切片温度适当升高至为 -140°C 左右。图 2 为炭黑改性天然橡胶的透射电镜照片,其中深色颗粒为填料炭黑,浅色部分是天然橡胶基体。当填料含量较少时,炭黑团聚不是很明显,多以 $2\sim 3$ 个原始粒子组成的

聚集体状态分散,颗粒呈现近圆球形,尺寸范围在 20~50nm 之间(图 2a)。当填料含量较多时,冷冻切片温度提升到-140℃时,切片也较为平整,但是炭黑团聚现象较为明显(图 2b)。

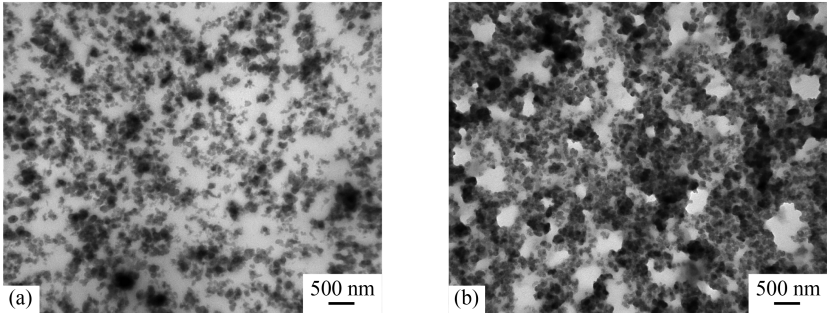


图 2 炭黑改性天然橡胶透射电镜像;(a)炭黑重量份数<40;(b)炭黑重量份数>40

Figure 2 TEM micrographs of carbon black modified natural rubber with weight ratio of carbon black (a)<40; (b)>40

2.3 二氧化硅改性乙丙橡胶-无规聚丙烯共混物

一般含有橡胶组分的样品超薄切片温度设定在-160℃时,切片容易卷片,因此可以将温度适当提高以减少卷片现象。该共混物在-120℃下的超薄切片褶皱较少,但稍有颤痕,并且切片厚度比仪器设置的厚度偏厚,在透射电镜下达不到理想的观察效果,因此对于乙丙橡胶共混物的切片温度设置在-140℃即低于 T_g 的 80~90℃为宜。由于二氧化硅颗粒较小,为了提高透射电镜图像的分辨率,将切片厚度设置为 75nm。从图 3 可以观察出切片平整,深色部分为无规聚丙烯,浅色部分为乙丙橡胶,可以清楚地观察到二氧化硅颗粒大部分团聚在无规聚丙烯的边缘,少部分较为均匀地分散在乙丙橡胶内。

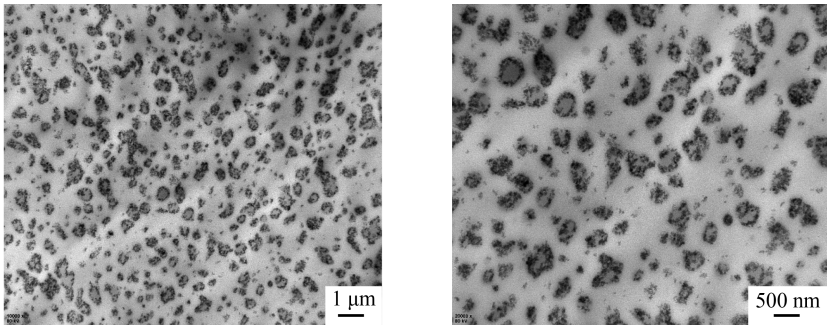


图 3 二氧化硅改性乙丙橡胶-无规聚丙烯共混物透射电镜像

Figure 3 TEM micrographs of ethylene propylene rubber-random polypropylene blend modified by silica

2.4 二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化聚乙烯共混物

由于顺丁橡胶的 T_g 很低(-110℃),此类共混物的切片温度在-140℃和-160℃即低于 T_g 的 30~50℃都可以。该共混物在四氧化钼熏染后,电镜下可以观察到聚氯乙烯和氯化聚乙烯的相结构,但是二氧化硅颗粒较小,可能被熏染后的聚氯乙烯和氯化聚乙烯的结构覆盖掉,观察不到二氧化硅颗粒的分布(图 4a)。不进行四氧化钼熏染的情况下观测不到聚氯乙烯和氯化聚乙烯的相结构,但是可以观察到二氧化硅颗粒较均匀地分布在顺丁橡胶基体中(图 4b)。

2.5 蒙脱土-PBAT-聚乳酸共混物

聚乳酸中加入蒙脱土可以改善聚乳酸的结晶性能,加入 PBAT 可以在不改变降解性能的前提下提高聚乳酸的韧性。此类共混物的切片温度在-120℃即低于主要成分 T_g 的 90~100℃之间较好。图 5 中深色部分为聚乳酸,浅色部分为 PBAT,黑色片状物为蒙脱土片层,蒙脱土与 PBAT 都均匀分布于聚乳酸基体内。

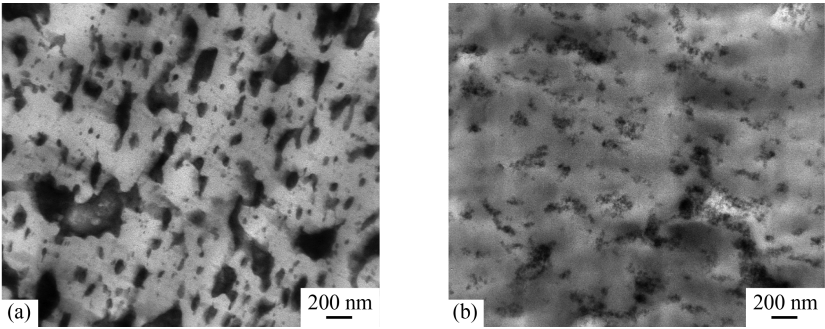


图 4 二氧化硅改性顺丁橡胶-聚氯乙烯-氯化聚乙烯共混物透射电镜像：(a) 四氧化锇熏染；(b) 未熏染

Figure 4 TEM micrographs of silica-modified butadiene rubber-polyvinyl chloride-chlorinated polyethylene blend stained (a) with OsO_4 and (b) without OsO_4

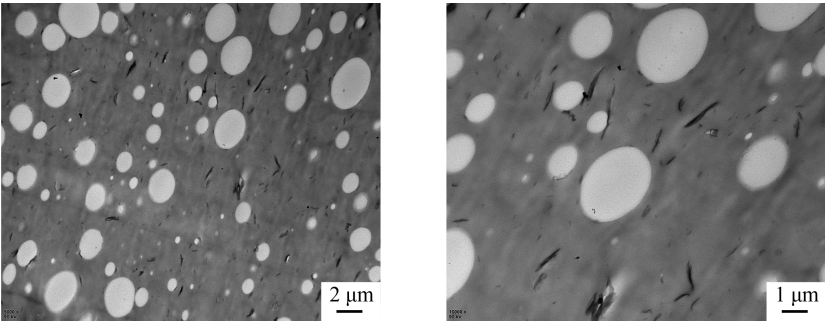


图 5 蒙脱土-PBAT-聚乳酸共混物透射电镜像

Figure 5 TEM micrographs of montmorillonite-PBAT-poly(lactic acid) blend

2.6 聚乳酸-聚酰胺弹性体共混物

聚酰胺俗称尼龙，与聚酰胺弹性体共混改性可以大大提高聚乳酸材料的韧性。由于聚酰胺在低温下也具有一定的韧性，因此这类弹性体共混物的切片温度设置在 -140°C 即远低于 T_g 的 $180\sim 200^{\circ}\text{C}$ 之间，切片性能才较好。当聚乳酸结构尺寸较大，冷冻超薄切片厚度为 80nm 时，切片容易发生皱褶，并且在电镜下的相结构反差小，拍摄效果不理想(图 6a)。适当增加修块面积和切片厚度，从图 6(b)可以看出， 200nm 厚度的冷冻切片观察效果仍然良好，黑色部分是聚酰胺，浅色部分是聚乳酸，聚酰胺相畴的尺寸大小不一，在聚乳酸中分散较为均匀。

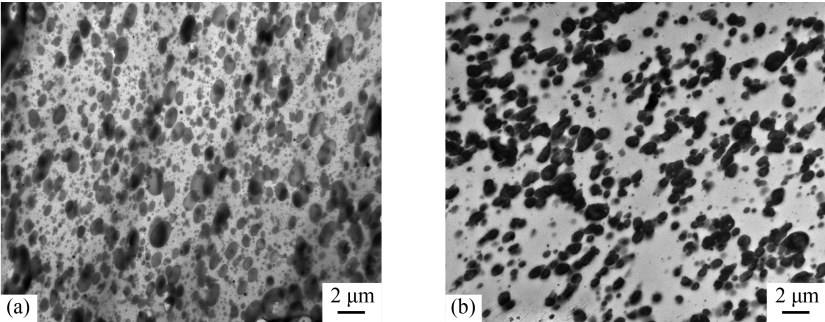


图 6 四氧化钌熏染的聚乳酸-聚酰胺弹性体共混物透射电镜像：(a) 80nm 超薄切片；(b) 200nm 薄切片

Figure 6 TEM micrographs of poly(lactic acid)-polyamide elastomer blend stained with RuO_4 : (a) 80nm ultrathin section and (b) 200nm thin section

3 讨论

上述几种纳米改性高分子聚合物应用不同的切片条件,在透射电镜和扫描电镜下均获得了理想的观察效果。由于这些材料在常温下都是较软的弹性体,无法进行常温超薄切片,因此都必须在低于聚合物的玻璃化转变温度(T_g)之下进行冷冻超薄切片。在玻璃化转变温度以下,高分子聚合物的链段运动被冻结,力学性能发生巨变,橡胶的高弹性丧失,转变为便于切片的硬质材料^[13,14]。究竟要选择低于 T_g 多少度才能获得理想的切片效果,国内外都还没有一个确切的定论,需要根据样品实际的软硬程度、共混物成分的比例来选择不同的切片温度。我们的体会是,低于 T_g 以下的温度均可以厚切片,而理想的超薄切片则应选择更低的温度。纳米改性的高聚物还要根据掺入填料的比例或种类来适当调节超薄切片的温度、厚度等技术参数。通常在生物样品冷冻超薄切片时采用的“热刀法”,即刀温略高于样品温度的方法,对于高分子聚合物切片的效果并不明显,只是在切片显得困难时适当采用“热刀”或“冷刀”方法,有助于切出理想的超薄切片。当需要观察尺度较大的相结构时,透射电镜的铜网网孔往往限制了视野,改用扫描电镜下背散射电子模式进行观察,可以方便地观察微米级大尺度的相结构,达到理想的表征效果。

高分子共混物主要由C、H、O等轻元素组成,它们对电子的散射能力相近,用透射电镜观察时反差较弱,所以必须对其切片进行重金属染色,四氧化锇可以和聚合物中的不饱和双键、羧基、氨基等基团发生反应,使重金属锇进入这些基团中,使图像形成反差。Trent等发现四氧化钨对聚氯乙烯(PVC)、PMMA、聚丙烯腈(PAN)、聚偏二氟乙烯(PVF2)和环氧树脂等几种聚合物不能染色,而对其它大部分聚合物都能染色,只不过在染色速率上有些差异。四氧化钨是一种强氧化物,可以氧化苯环、芳烃、醚类、醇基、乙烯基、烷烃等基团,含有这些基团的高聚物可以使用四氧化钨进行熏染来增强电子反差。到目前为止,国内外有关四氧化钨对聚合物的染色机理还不是特别清楚,大部分还是需要根据经验或试验来完成。

本文主要探究不同纳米改性高聚物的冷冻超薄切片方法,为广大电镜技术人员以及科研工作者提供可借鉴的经验。相对于常温超薄切片,冷冻超薄切片需要更高的技术要求以及对不同材料的性质把控。随着纳米技术的迅猛发展,越来越多的纳米改性高分子材料的形貌表征需要依靠电子显微镜,同时也增加了对冷冻超薄切片技术的需求。电镜工作者面对种类繁多的高聚物材料,需要在技术上认真探索,才能获得科研人员所要的理想研究结果。

参考文献:

- [1] 刘吉平,郝向阳. 科学出版社, 2009.
- [2] 高其标,申屠宝,卿翁志. 化工生产与技术, 2002, 8(6): 22~26.
- [3] 韩宏伟,盖东杰,朱丙清,顾尧. 现代塑料加工应用, 2015, 27(6): 42~44.
- [4] 周春华,张书香,刘威,尹衍升,师瑞霞. 工程塑料应用, 2002, 30(12): 59~62.
- [5] Bernal-Lara T E, Ranade A, Hiltner A, Baer E, in Michler G H, Balta-Calleja F J. (Eds.), Mechanical Properties of Polymers Based on Nanostructure and Morphology. Boca Raton Florida: Taylor & Francis, 2005: 629~681.
- [6] Michler G H, Balta-Calleja F J. Nano-and Micromechanics of Polymers: Structure Modification and Improvements of Properties. Munich: Carl Hanser Verlag, 2012.
- [7] Michler G H. Electron Microscopy of Polymers. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008: 199~260.
- [8] 杨慧,贾云玲,李江峰,张磊涛,吴长江,李德君,贾斌斌,薛冰,谢景林,鞠晶. 分析仪器, 2018, (3): 154~157.
- [9] 陈利. 山东科学, 2013, 26(5): 22~28.
- [10] 金桂萍,赵红,周恩乐. 电子显微学报, 1989, (1): 11~14.
- [11] Hernández M C, Laredo E, Bello A, Carrizales P, Marciano L, Balsamo V, Grima M, Mülle A J. Macromolecules, 2002, 35(19): 7301~7313.
- [12] Kong X, Narine S S. Biomacromolecules, 2008, 9(8): 2221~2229.
- [13] 吴其晔,张萍,杨文君,林润雄. 高分子物理学. 北京: 高等教育出版社, 2010: 133~175.
- [14] 王正熙. 高分子材料剖析使用手册. 北京: 化学工业出版社, 2015: 9~11.

[15] 陶永亮. 橡塑技术与装备, 2021, 47(18): 15~19.

Study on Ultrathin Cryo-section of Several Rubbers and Elastomers

ZHANG Xiao-min¹, XU Ying¹, WANG Hua¹, LIU Hong-zhi², HONG Jian^{1*}

(1. *Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;*

2. *College of Biological and Chemical Engineering, Ningbo Tech University, Ningbo 315100, China*)

Abstract: In this paper, ultrathin cryo-section of the five kinds of different modified rubbers and elastomers and one kind of blended elastomer were observed by transmission electron microscope and scanning electron microscope, to explore the suitable ultrathin cryo-section temperature and related technical parameters of different nano-modified polymers, and to analyze the relationship between ultrathin cryo-section temperature and glass transition temperature. At the same time, electron staining method was also used for the blend of silica modified butadiene rubber-polyvinyl chloride-chlorinated polyethylene. The study provides a reference for studying the ultrastructure of polymer materials with different properties and selecting suitable ultrathin cryo-section temperature and electronic staining method.

Key words: Nano-modified; Polymer; Ultrathin cryo-section; Transmission electron microscope; Scanning electron microscope