



Title	水溶液中観察の高空間分解能化を目的としたグラフェンベース液体セルの開発
Author(s)	屋嶋, 悠河
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第16250号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16250
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95333
Type	doctoral thesis
File Information	Yuga_Yashima.pdf



博士学位論文

水溶液中観察の高空間分解能化
を目的とした
グラフェンベース液体セルの開発

屋嶋 悠河

北海道大学大学院理学院
宇宙理学専攻

令和7年3月

要 旨

液中における化学反応や結晶化等の物理現象は、よりミクロな領域に関心が集まるようになってきている。例えば、冷却により液体が凍結する場合、溶質や溶媒がナノスケールで核形成することが結晶化の起点となる。このような微小領域でのダイナミクスを可視化する方法として、液体セルを用いた透過型電子顕微鏡（TEM; Transmission Electron Microscope）による“その場”観察が注目されている。従来型の TEM 液体セルは、アモルファス窒化ケイ素膜を隔膜として用いる。観察対象の液体を 2 枚の隔膜の間にトラップすることで、真空状態にある TEM 鏡筒内での液中試料の観察を実現している。従来型液体セルの高空間分解能化には技術的制約があり、特に軽元素で構成されるナノスケールの結晶核を捉えることは難しい。その解決策として、グラフェン液体セル（GLC; Graphene Liquid Cell）が検討されている。窒化ケイ素膜の代替として、グラフェン膜を隔膜に用いた液体セルである。液体セル自体の厚みが抑制されることから、従来型セルに比べて高空間分解能観察が期待される。加えて、グラフェンにはラジカルの捕捉能があり、液体試料の電子線損傷を効果的に抑制できる利点もある。本研究は従来の GLC を参考として、グラフェンをベース素材に用いた独自の液体セルの開発を行い、希薄水溶液あるいは純水中におけるミクロ現象の“その場”観察を最終的な目標とした。

純水を用いて先行研究の再現を試みた結果、そもそも GLC に純水がトラップされる確率は著しく低いことが判明した。観察試料が液体であるならば、意図的に電子線照射量を上げた際に放射線分解が起こることで泡が発生し、それが動き回ることが期待される。本研究で行った追実験の大半において、液体のトラップを示唆するような TEM 像のコントラストは得られず、泡の発生も観察されなかった。GLC の作製方法を変更、あるいは、アモルファス窒化ケイ素膜を組み合わせたグラフェンベース液体セルを開発しても結果は同様であった。一方で、先行研究の報告例に類似する現象を観察できる GLC が稀に形成した。そこで、当該 GLC を冷却しながら TEM 観察を行った。氷結晶が形成するという予測に反し、硫酸アンモニウム結晶に対応する電子回折図形が得られた。硫酸アンモニウムは、グラフェン膜を剥離する際に用いるエッチング液に由来する成分である。つまり、GLC にトラップされた液体はエッチング液のコンタミが主成分であり、少なくとも純水あるいは希薄水溶液ではないことを示している。実は、数十件ある GLC 先行研究の大半において、溶液濃度はトラップ前後で大きく変化する可能性は検討されてこなかった。希薄水溶液を GLC にトラップすると溶液濃度が顕著に上昇する問題が最近になって報告されており、本研究における冷却実験の結果と合致している。

一方、エッチング液を直接トラップすると、多数のグラフェンベース液体セルが TEM グリッド全体に形成することを発見した。個々の液体セルはナノ～ミクロンスケールであり、電子線照射により発生させた気泡がセル内を動き回る様子も捉えられた。エッチング液が高濃度の過硫酸アンモニウム水溶液であることから類推し、高濃度の硫酸アンモニウム水溶液を直接トラップしたところ同様の結果が得られた。高濃度塩水溶液のグラフェンベース液体セ

ルが高い再現性で形成することにより、微小領域における気泡や分散粒子の運動を液中観察することに成功した。

純水あるいは希薄水溶液のトラップ確率を上げるために、高濃度塩水溶液の場合にトラップ確率が高い要因を考察した。まず、隔膜でトラップせず真空環境にオープンな状態で、高濃度塩水溶液を TEM 観察した。真空下にある液体試料は、当然のことながら最終的に蒸発した。一方、その過程で、電子線照射により発生させた気泡同士が、合体する様子が観察された。高濃度塩水溶液は、真空に対して開放状態であっても水の蒸発を一定程度抑制する効果があることが示唆される。裏返せば、GLC やグラフェンベース液体セル中で泡の運動が捉えられたとしても、意図した組成を保った液体試料が観察されているとは限らないということである。すなわち、それら液体セルの密閉性には慎重な議論が必要であることを意味する。高濃度硫酸アンモニウム水溶液をトラップした場合、液体セル中の気泡面積は電子線照射下で緩やかに減少した。またエッチピット法を用いて、セル作製に通常用いられるグラフェンに欠陥が点在することを確認した。液中観察を行うまでには、常圧下での液体セル作製・TEM 真空鏡筒へのセル挿入による減圧・真空下での保持という段階を踏む必要がある。気泡面積の減少とグラフェン欠陥の確認により、これらの段階において水分子が液体セルからリークしている可能性が判明した。

本研究は、先行研究で報告されてきた GLC の再現性検証を足掛かりとして、実用的に液中観察が可能となるような液体セルの形成条件を解明した。純水と高濃度塩水溶液それぞれのトラップ確率が大きく異なることに焦点を当て、現状の GLC 及びグラフェンベース液体セルからは水がリークしてしまうという問題を提起した。また、グラフェン欠陥を被覆することによって水のリークを抑制する試みを行っている。グラフェンベース液体セルの密閉性が向上すれば、純水中または濃度制御した希薄水溶液中におけるミクロ現象の“その場”観察が最終的に実現すると期待される。

目 次

第 1 章 序論

- 1-1. 透過型電子顕微鏡を用いた液中観察の重要性
- 1-2. アモルファス窒化ケイ素液体セルによる TEM 液中観察
- 1-3. グラフェン液体セルによる TEM 液中観察
- 1-4. 先行研究の問題点と本論文の位置づけ
- 1-5. 第 1 章の参考文献

第 2 章 純水を包摂するグラフェン液体セルの開発

- 2-1. 従来法による純水 GLC 作製の試み
- 2-2. ‘Free-standing’ 法によるグラフェン液体セルの作製
- 2-3. ‘Free-standing’ 法によるグラフェンベース液体セルの作製
- 2-4. 第 2 章の参考文献

第 3 章 GLC の形成条件と課題

- 3-1. 高い再現性を伴う高濃度塩水溶液 GLC 形成
- 3-2. 電子線照射下における高濃度塩水溶液の発泡挙動
- 3-3. GLC からの内包液体のリーク
- 3-4. グラフェン上に存在する欠陥
- 3-5. 第 3 章の参考文献

第 4 章 結論

- 4-1. 総括・今後の展望

第1章 序論

1-1. 透過型電子顕微鏡を用いた液中観察の重要性

透過型電子顕微鏡 (TEM; Transmission Electron Microscope) は、電子をプローブに用いる顕微鏡である。加速電子を観察試料に入射することで、透過電子のコントラスト (透過像) を得ることができる。電子の波長が十分に短いことから、高空間分解能での実空間観察が可能である。重金属原子の観察など特定の条件下では、原子分解能にも達する。カメラの性能が向上したことにより、連続写真によるダイナミクスの追跡が可能になっている。また、規則正しく配列した原子の集まりに電子が入射すると、透過電子は干渉する。結果として透過像に格子縞が現れ、観察試料の結晶性の評価に用いることができる。また、回折電子を結像すると電子回折図形が得られる。試料が結晶性の場合は、結晶面の情報を反映した電子回折パターンが得られる。試料が非晶質 (アモルファス) の場合は、ハローパターンが得られる。既知の結晶に対応する電子回折図形の情報はオンラインで共有されているため、観察試料から電子回折図形が得られたら、これらのデータベースと照合して結晶の同定を試みるのが一般的である。さらに、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS; Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) を用いると試料の元素分析を行うことができる。TEM 鏡筒に EDS 専用の検出器をつけることにより、試料への電子線入射により発生した X 線を検出する。発生する X 線には、元素に特有の特性 X 線が含まれているため元素同定が可能になる。TEM には、電子線を細かく絞って観察試料上を走査できる走査透過電子顕微鏡法 (STEM; Scanning Transmission Electron Microscopy) のモードが搭載されている場合がある。この STEM モードを用いて、試料の各点から発生した特性 X 線を検出して画像処理を行うことで元素マッピング (STEM-EDS) ができる。

TEM による液体試料の直接観察は、核生成、結晶化、溶解、粒子の移動、泡立ちなど、結晶成長分野におけるさまざまな現象を理解するための強力な方法である。多くの研究者が、ナノメートルのスケールで起こるこれらの現象の微視的ダイナミクスに関心を示している¹⁻³。

1-2. アモルファス窒化ケイ素液体セルによる TEM 液中観察

TEM で液中観察を行うには、液体セルを用いる必要がある。TEM はプローブとして電子ビームを使用するため、TEM 鏡筒は真空中に保たれている。観察したい液体試料をそのまま鏡筒内に挿入すると、蒸発してしまうため観察ができない (蒸気圧の低いイオン液体等は除く)。液体試料の蒸発を防ぐために、隔膜を用いて液体を保護する必要がある。

隔膜には従来、アモルファス窒化ケイ素 (SiNx) 膜が用いられてきた。これが SiNx 膜液体セルと呼ばれる従来法であり、2 枚の SiNx 膜の間に液体をトラップする (図 1-1)。液体試料は、上下の SiNx 膜及び、その間に挟み込む O リングによって真空環境から隔離される。観察窓に電子線を入射することで液中観察が可能である。この従来法を用いて、液中で金属ナノ

粒子が配向しながら成長する様子や、炭酸カルシウムのアモルファス相から結晶相への相転移などが直接観察されてきた⁴⁻⁷。

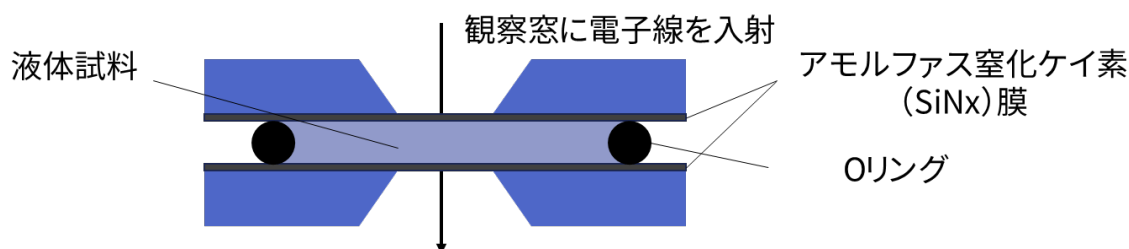


図 1-1. SiNx 膜液体セルの概要

この従来法は 2 つ課題を抱えている。一つ目の課題として、高真空中に保たれている TEM 鏡筒との圧力差により、液体セルが膨らむ傾向がある。観察窓の中心ではセル内部が μm の厚みに達することもあり、観察可能な領域は観察窓の端に限定されてしまう⁸。コントラストの低下を防ぐためには、圧力差を緩和して液体セルの膨張を抑制する必要がある。例えば、追加の減圧装置を導入して圧力差を緩和する必要がある^{9,10}。

二つ目は、SiNx 膜が破れやすいことである。液体試料のコントラストを妨げないためには、隔膜として用いる SiNx 膜はできるだけ薄くすることが望ましい。コントラストの低下を防ぐに、より薄い SiNx 膜 ($\sim 10\text{ nm}$) を用いた SiNx 膜液体セルの開発が進められている¹¹。従来法に用いられる SiNx 膜の一般的な厚さは約 50 nm である。この厚みであっても、セル作製時に SiNx 膜が破れやすく、作業者の経験と勘に頼って成功率を上げているのが現状である。後述の通り、従来法では一つの TEM グリッドに液体セルは一つのみ存在する。言い換えれば、一か所でも SiNx 膜が破れてしまうと、その穴を経由して液体セル全体から液体試料がリークしてしまう。

1-3. グラフェン液体セルによる TEM 液中観察

前節で紹介した SiNx 膜の代替材料として、グラフェンが注目されている。グラフェンは炭素原子がヘキサゴナルな網目を形成する 2 次元材料である。2012 年、Yuk らは従来の SiNx 液体セルに代わるものとして、グラフェン液体セル (GLC; Graphene Liquid Cell) を提案した¹² (図 1-2)。有機液体をグラフェンの間に閉じ込め、作製した GLC の TEM 観察を行った (図 1-2A)。周囲よりもコントラストの強い、直径約 100 nm の円状の領域が認められる。この領域にターゲットの有機液体がトラップされたと考えられる。この GLC を TEM グリッドに水平な方向から見ると、上下のグラフェンがたわむことで液体のトラップ空間が確保されていると考えられている (図 1-2B)。

GLC は、2 枚のグラフェンの間、あるいは 1 枚のグラフェンと SiNx 膜などの別の基板の間に液体を封入することで作製できる¹³⁻¹⁵。2023 年時点で、有機液体をトラップしたとの報告が 7 件、さらに、純水及び水溶液をトラップしたとの報告がそれぞれ 6 件、13 件以上存在する。

TEM 液中観察のポイントとして、電子線照射による試料の損傷は避けることができない。その点、グラフェンは電子に対して高い透過性を持つだけでなく、電子線照射による放射線分解によって生成したラジカルを吸収することができる。そのため、特に電子線に弱いソフトマターについて、電子線損傷を抑えつつ高い格子分解能を確保するという要請に応えることが可能になる。実際、GLC 中でソフトマターの観察を試みた例が報告されている^{17,18}。

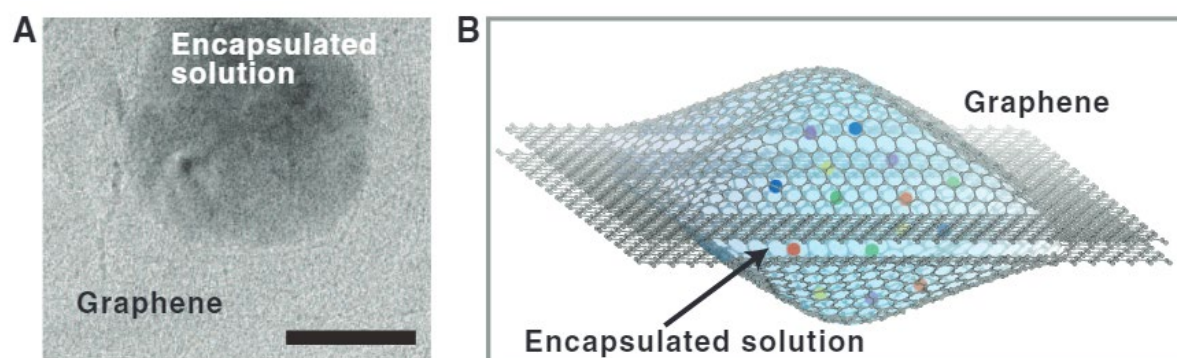


図 1-2. GLC の最初の報告例¹²（スケールバーは 50 nm）

従来の SiNx 膜液体セルと比較すると、GLC には二つのアドバンテージがある。一つは、隔膜と液体試料の厚みの減少である。従来法における SiNx 隔膜が通常 50 nm 程度の厚みであるのに対し、GLC におけるグラフェンの厚みは炭素原子レベルとなる。加えて、グラフェン間の強い分子間力により GLC が形成することから、液体試料自体の厚みも減少する。これらの要因により、従来法よりも高空間分解能を達成することができる¹⁶。言い換えれば、従来法と同じ空間分解能を、より低い電子線照射量で得ることができる。先述のラジカル吸収能と合わせて、電子線損傷の抑制が可能になる。

二つ目のアドバンテージは、液体セルサイズの減少である。ここでいうサイズとは、照射電子線に垂直な方向の液体セルの広がりの意味する。従来法と GLC のセルサイズ、及び、TEM 観察時の見え方の違いを比較した（図 1-3）。2 枚の SiNx 膜の間にターゲット液体をトラップすることが、従来法の基本的な考え方である（図 1-3 上段左）。ただし、ここでは 0 リング等は省略した。セルサイズは通常 50 μm よりも大きく、これは TEM の観察視野よりも十分に大きいことを意味する（図 1-3 上段右）。純水をトラップした液体セルを冷却する場合、円で示した TEM の観察視野の外側から凍結する。そのため、過冷却水中での氷の結晶成長ダイナミクスが TEM 観察できる。一方、その初期プロセスである氷核生成は、冷却効率の高い液体セルのエッジで起こると考えられる。この領域は観察視野の外側であり、従来型の SiNx 膜液体セルは氷核生成の観察には適していない。

この点、新しく提唱された GLC のセルサイズは小さいもので 10 nm である（図 1-3 下段左）。一つの TEM グリッド上には多数の GLC が同時に形成する。TEM グリッドのサイズは TEM 観察視野よりも十分大きいため、観察視野内外に多数の GLC が分布することが期待される（図 1-3 下段右）。TEM グリッドを冷却すると個々の GLC 内で凍結が進むため、氷核生成プロセスを捉えることが可能である。

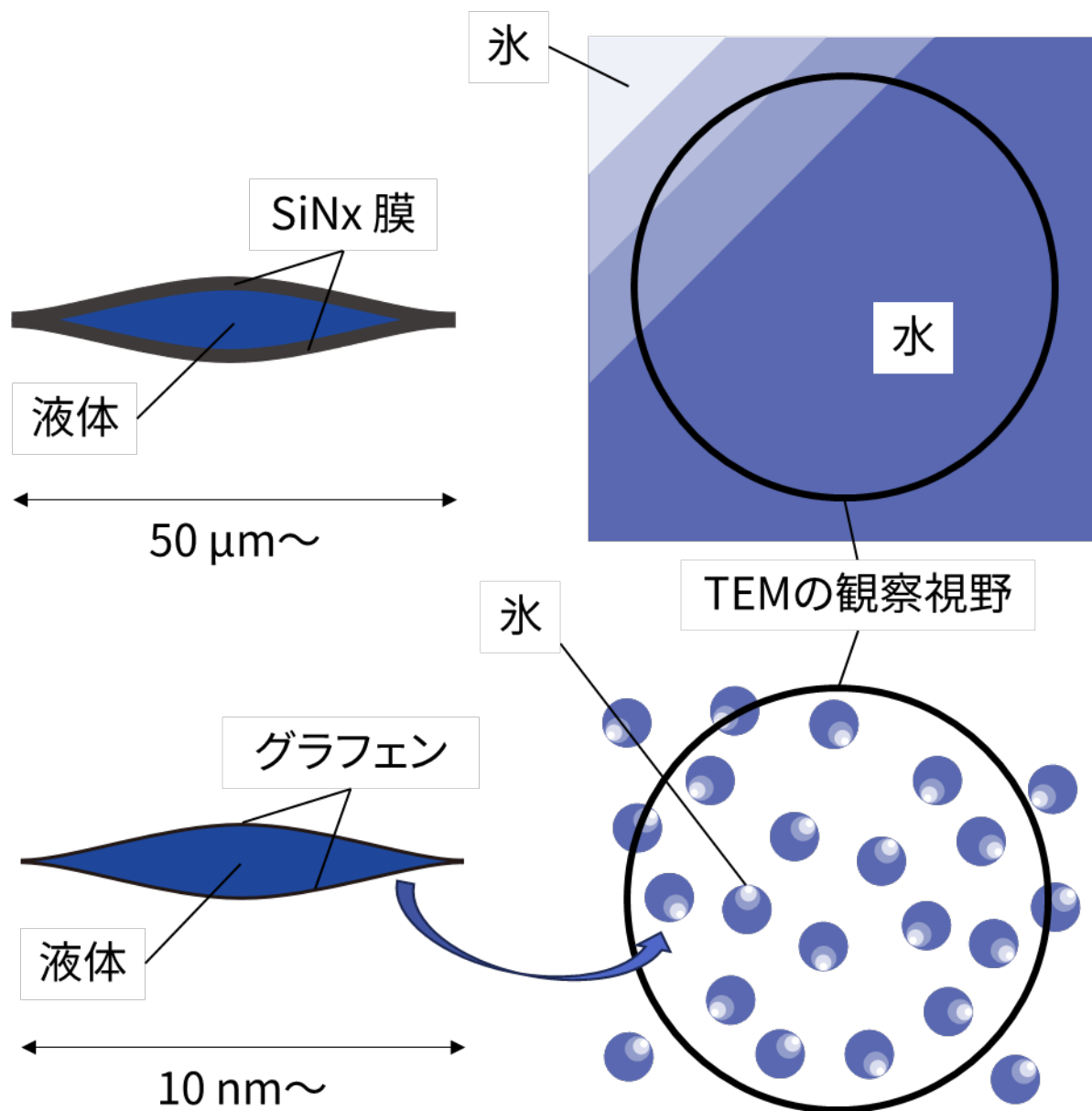


図 1-3. SiNx 膜液体セル（従来法、上段）と GLC（下段）の比較

1-4. 先行研究の問題点と本論文の位置づけ

このように GLC は理論上、従来型の SiNx 膜液体セルと比較して、より高空間分解能で液中現象の初期プロセスを可視化できると期待される。次に考えるべきは、GLC を作製して実際に純水あるいは希薄水溶液をトラップすることができるか、である。実は第 2 章で言及するように、純水 GLC（純水を内部にトラップする GLC）の再現性は著しく低かった。純水を内部にトラップできているか検証する手段の一つに、GLC 自体を冷却して氷の形成を捉えることが挙げられる。GLC 内で立方晶の氷が形成したことが報告されているが²¹、Zhou らはコンタミの塩化ナトリウム結晶ではないかと指摘している²²。最近、GLC 中の TiO₂ 結晶上に立方晶

の氷が形成されることが示された。この場合、 TiO_2 結晶は生成ラジカルのスキャベンジャーとして働く²³。EELS の酸素ピークから氷 Ih 相のフラクションが捕捉されたことはあるが²⁴、これまで GLC で氷 Ih 相が形成されたという報告はない。

GLC に純水や希薄水溶液がトラップできているのかという疑問は、視点を変えれば、GLC へのトラップ前後で液体濃度は保たれているのかという疑問につながる。GLC 中の水の存在を確認する最も信頼性の高い方法は、電子エネルギー損失分光法 (EELS; Electron Energy Loss Spectroscopy) によって水の励起ピークの存在を確認することである¹⁹。高いエネルギー分解能が求められるため、水の励起ピークから水の濃度を定量するのは汎用的な手段ではない。近しい手段として、EELS で得られた酸素原子 (水由来) のコアロスピークと溶質原子のコアロスピークの比をとることで濃縮倍率を求める方法がある。Crook らはこの方法を用いて、GLC にトラップされることで液体濃度が顕著に上昇することを発見した²⁰。彼らはグラフェン間に塩化セリウムの希薄水溶液をトラップして GLC を作製した。作製した GLC の EELS スペクトルを取得したところ、得られたセリウム対酸素比は水和塩 ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) の濃度に相当した。

本研究では、従来法と独自の作製方法の両方について、純水 GLC の再現性の低さを示した。また、GLC 中の液体濃度が著しく上昇することを、冷却実験により確認した。純水 GLC の場合とは対照的に、高濃度塩水溶液 GLC は高い再現性で形成することを発見した。冷却実験やエッチピット法により、グラフェンの内在的な欠陥等の複数の経路を経由して水がリークしていることを示した。

1-5. 第1章の参考文献

- (1) de Jonge, N.; Houben, L.; Dunin-Borkowski, R. E.; Ross, F. M. Resolution and Aberration Correction in Liquid Cell Transmission Electron Microscopy. *Nat. Rev. Mater.* 2019, 4 (1), 61–78.
- (2) Kashin, A. S.; Ananikov, V. P. Monitoring Chemical Reactions in Liquid Media Using Electron Microscopy. *Nat. Rev. Chem* 2019, 3 (11), 624–637.
- (3) De Yoreo, J. J.; Gilbert, P. U. P. A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Penn, R. L.; Whitelam, S.; Joester, D.; Zhang, H.; Rimer, J. D.; Navrotsky, A.; Banfield, J. F.; Wallace, A. F.; Michel, F. M.; Meldrum, F. C.; Cölfen, H.; Dove, P. M. Crystallization by Particle Attachment in Synthetic, Biogenic, and Geologic Environments. *Science* 2015, 349 (6247), aaa6760.
- (4) Zheng, H.; Smith, R. K.; Jun, Y.; Kisielowski, C.; Dahmen, U.; Alivisatos, A. P. Observation of Single Colloidal Platinum Nanocrystal Growth Trajectories. *Science* 2009, 324 (5932), 1309–1312.
- (5) Li, D.; Nielsen, M. H.; Lee, J. R. I.; Frandsen, C.; Banfield, J. F.; De Yoreo, J. J. Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment. *Science* 2012, 336 (6084), 1014–1018.
- (6) Nielsen, M. H.; Aloni, S.; De Yoreo, J. J. In Situ TEM Imaging of CaCO_3 Nucleation Reveals Coexistence of Direct and Indirect Pathways. *Science* 2014, 345 (6201), 1158–1162.
- (7) Yamazaki, T.; Kimura, Y.; Vekilov, P. G.; Furukawa, E.; Shirai, M.; Matsumoto, H.; Van Driessche, A. E. S.; Tsukamoto, K. Two Types of Amorphous Protein Particles Facilitate Crystal Nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017, 114 (9), 2154–2159.
- (8) Holtz, M. E.; Yu, Y.; Gao, J.; Abruña, H. D.; Muller, D. A. In Situ Electron Energy-Loss Spectroscopy in Liquids. *Microsc. Microanal.* 2013, 19 (4), 1027–1035.
- (9) Keskin, S.; Kunnas, P.; de Jonge, N. Liquid-Phase Electron Microscopy with Controllable Liquid Thickness. *Nano Lett.* 2019, 19 (7), 4608–4613.
- (10) Wu, H.; Su, H.; Joosten, R. R. M.; Keizer, A. D. A.; van Hazendonk, L. S.; Wirix, M. J. M.; Patterson, J. P.; Laven, J.; de With, G.; Friedrich, H. Mapping and Controlling Liquid Layer Thickness in Liquid-Phase (Scanning) Transmission Electron Microscopy. *Small Methods* 2021, 5 (6), No. e2001287.
- (11) Koo, K.; Li, Z.; Liu, Y.; Ribet, S. M.; Fu, X.; Jia, Y.; Chen, X.; Shekhawat, G.; Smeets, P. J. M.; dos Reis, R.; Park, J.; Yuk, J. M.; Hu, X.; Dravid, V. P. Ultrathin Silicon Nitride Microchip for in Situ/Operando Microscopy with High Spatial Resolution and Spectral Visibility. *Sci. Adv.* 2024, 10 (3), No. eadj6417.
- (12) Yuk, J. M.; Park, J.; Ercius, P.; Kim, K.; Hellebusch, D. J.; Crommie, M. F.; Lee, J. Y.; Zettl, A.; Alivisatos, A. P. High-Resolution EM of Colloidal Nanocrystal Growth Using Graphene Liquid Cells. *Science* 2012, 336 (6077), 61–64.
- (13) Park, J.; Koo, K.; Noh, N.; Chang, J. H.; Cheong, J. Y.; Dae, K. S.; Park, J. S.; Ji, S.; Kim, I.-D.; Yuk, J. M. Graphene Liquid Cell Electron Microscopy: Progress, Applications, and Perspectives. *ACS Nano* 2021, 15 (1), 288–308.

- (14) Dunn, G. ; Adiga, V. P. ; Pham, T. ; Bryant, C. ; Horton-Bailey, D. J. ; Belling, J. N. ; LaFrance, B. ; Jackson, J. A. ; Barzegar, H. R. ; Yuk, J. M. ; Aloni, S. ; Crommie, M. F. ; Zettl, A. Graphene-Sealed Flow Cells for In Situ Transmission Electron Microscopy of Liquid Samples. *ACS Nano* 2020, 14 (8), 9637–9643.
- (15) Hutzler, A. ; Schmutzler, T. ; Jank, M. P. M. ; Branscheid, R. ; Unruh, T. ; Spiecker, E. ; Frey, L. Unravelling the Mechanisms of Gold–Silver Core–Shell Nanostructure Formation by in Situ TEM Using an Advanced Liquid Cell Design. *Nano Lett.* 2018, 18 (11), 7222–7229.
- (16) Koo, K. ; Park, J. ; Ji, S. ; Toleukhanova, S. ; Yuk, J. M. Liquid-Flowing Graphene Chip-Based High-Resolution Electron Microscopy. *Adv. Mater.* 2021, 33 (2), 2005468.
- (17) Mohanty, N. ; Fahrenholtz, M. ; Nagaraja, A. ; Boyle, D. ; Berry, V. Impermeable Graphenic Encasement of Bacteria. *Nano Lett.* 2011, 11 (3), 1270–1275.
- (18) Wang, C. ; Qiao, Q. ; Shokuhfar, T. ; Klie, R. F. High-Resolution Electron Microscopy and Spectroscopy of Ferritin in Biocompatible Graphene Liquid Cells and Graphene Sandwiches. *Adv. Mater.* 2014, 26 (21), 3410–3414.
- (19) Keskin, S. ; Pawell, C. ; de Jonge, N. Verification of Water Presence in Graphene Liquid Cells. *Micron* 2021, 149, 103109.
- (20) Crook, M. F. ; Moreno-Hernandez, I. A. ; Ondry, J. C. ; Ciston, J. ; Bustillo, K. C. ; Vargas, A. ; Alivisatos, A. P. EELS Studies of Cerium Electrolyte Reveal Substantial Solute Concentration Effects in Graphene Liquid Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2023, 145 (12), 6648–6657.
- (21) Algara-Siller, G. ; Lehtinen, O. ; Wang, F. C. ; Nair, R. R. ; Kaiser, U. ; Wu, H. A. ; Geim, A. K. ; Grigorieva, I. V. Square Ice in Graphene Nanocapillaries. *Nature* 2015, 519 (7544), 443–445.
- (22) Zhou, W. ; Yin, K. ; Wang, C. ; Zhang, Y. ; Xu, T. ; Borisevich, A. ; Sun, L. ; Idrobo, J. C. ; Chisholm, M. F. ; Pantelides, S. T. ; Klie, R. F. ; Lupini, A. R. The Observation of Square Ice in Graphene Questioned. *Nature* 2015, 528 (7583), E1–E2.
- (23) Phakatkar, A. H. ; Megaridis, C. M. ; Shokuhfar, T. ; Shahbazian-Yassar, R. Real-Time TEM Observations of Ice Formation in Graphene Liquid Cell. *Nanoscale* 2023, 15, 7006–7013.
- (24) Ghodsi, S. M. ; Anand, S. ; Shahbazian-Yassar, R. ; Shokuhfar, T. ; Megaridis, C. M. In Situ Study of Molecular Structure of Water and Ice Entrapped in Graphene Nanovessels. *ACS Nano* 2019, 13 (4), 4677–4685.

第2章 純水を包摂するグラフェン液体セルの開発

2-1. 従来法による純水 GLC 作製の試み

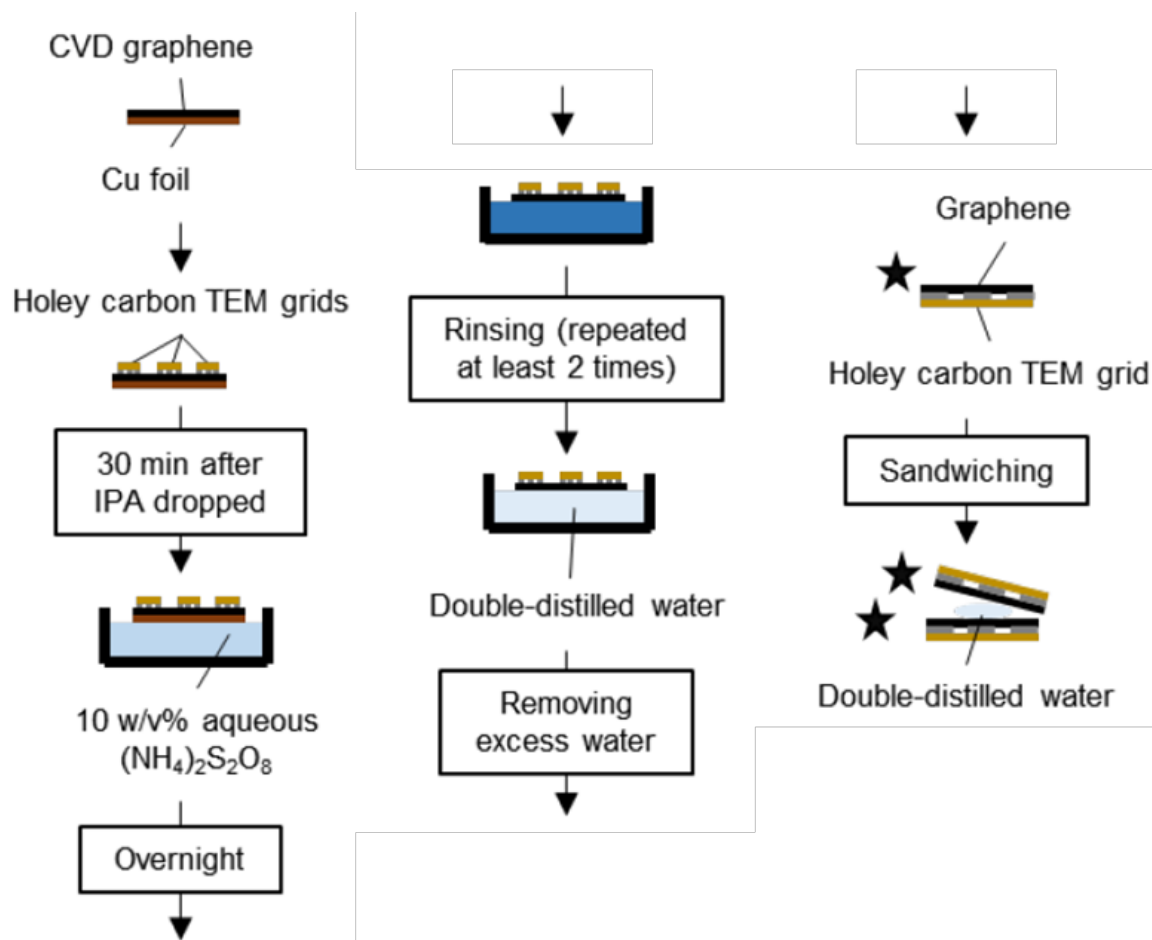


図 2-1. 従来法による純水 GLC の作製方法⁵⁰。2つのグラフェン転写ホーリーカーボン TEM グリッドを使用した。最終的に得られたグリッドは、図 2-2d-f に対応する。

先行研究では、2枚のグラフェンの間に液体を封入することで GLC を作製する例が多い²⁵。従来法では、まず TEM グリッドにグラフェンを転写する。グラフェンの転写とは、予め蒸着されている基板や薄膜からグラフェンを剥離し、目的物質表面へと貼りかえることを意味する。2枚のグラフェン転写済み TEM グリッドの間に液体をトラップすることで、GLC を作製する。先行研究の再現性を検証するため、従来法を用いて純水 GLC (純水をトラップした GLC) の作製を試みた (図 2-1)。

隔膜となるグラフェンには、市販物 (ACS Material, LLC、カリフォルニア州パサデナ) を用いた。銅薄膜表面に化学気相蒸着 (CVD) 法により形成させたものであり、グラフェン層の厚みにバリエーション (単層、3~5 層、6~8 層) がある。グラフェンからの液体のリークを最大限抑制することを意図して、本論文では基本的に 6~8 層の CVD グラフェンを用いた。A6 サイズ程度のグラフェン蒸着済み銅薄膜が、タッパー内に仮止めされている。グラフェンの酸化を防止するため、タッパーごと真空容器に入れ、ダイヤフラム式真空ポンプを用いて減

圧した状態で保管した。真空容器から取り出した後にカッターナイフを用いて、グラフェン蒸着済み銅薄膜を約 1cm 四方に切り出した。銅薄膜がよれてしまわないように、カッターナイフをできるだけ寝かせて切り出した。仮止めされている状態ではグラフェンの蒸着面が上になっており、その状態を保つように注意して作業した。スライドガラスの上に薬包紙を寝かせておき、その上にピンセットを用いて銅切片を静置した。その上に、薬包紙、スライドガラスを順に重ねた。スライドガラスを指で静かに押して、銅切片を平らにした。上に被せていたスライドガラスと薬包紙を取り除けた。フレームが Au 製のホーリーカーボン TEM グリッド (Quantifoil Micro Tools GmbH, Großlobdichau, ドイツ) を、銅薄膜グラフェンがカーボンコーティングされた面を向くように Cu 箔の上に置いた。グラフェンへのカーボンシートの接着を促進するために、イソプロピルアルコール (IPA) を Cu 箔に滴下した⁴⁷。IPA が 30 分間蒸発した後、TEM グリッド付きの Cu 箔を、10% w/v の $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液 (GLC の製造に一般的に使用されるエッチング溶液) に浮かべ、Cu 箔がエッチング溶液の表面に接触するようにした。一晩接触させた後、Cu 箔が完全にエッチングされ、TEM グリッドがエッチング液に浮かぶグラフェンシートに保持されたまま残っていることが確認された。グラフェンは正方形の形状を保っていた。次に、各 TEM グリッドを蒸留水の表面に慎重に移した。このプロセスは、グリッドがエッチング液で汚染されるのを防ぐために、少なくとも 2 回繰り返した。余分な水分を濾紙で取り除いた後、TEM グリッドをピンセットでグラフェンが転写された面を上にして保持した。蒸留水を一滴、グリッド上に慎重に垂らし、すぐに同じ方法でグラフェンを転写し、下部の TEM グリッドとの接触を容易にするために半円形にカットした 2 枚目の TEM グリッドで封をした。余分な水分は濾紙で取り除いた。作製した TEM グリッドは TEM チャンバーに設置するための装置にセットし、30 分以内に TEM チャンバー内に設置した。得られたグリッドは、図 2-2 に示されているものと同じである。

作製した GLC の TEM 観察には、JEM-2100F (日本電子株式会社、東京) を使用した。本研究では、一部の低温実験を除いて加速電圧 200 kV を使用した。TEM 画像は CMOS カメラ (OneView IS; Gatan, Inc., Pleasanton, CA) を使用して取得した。80 K における TEM 観察は、液体ヘリウム冷却式 TEM ホルダー (Gatan, Inc., プレザントン、カリフォルニア州) を使用し、液体窒素を用いて GLC を 80 K まで冷却した。253.8 K への徐冷実験では、ペルチェ冷却式 TEM ホルダー (メルビル社、福岡) を用いた。照射電子線の線量率は、ビデオの最初のフレームでの各ピクセルにおける電子密度をヒストグラム化し、最もカウント値の多い電子密度を使用して計算した。EDS スペクトルおよび元素マッピング画像は JED-2300T 装置 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を使用して取得した。制限視野電子回折 (SAED; Selected Area Electron Diffraction) の分析には *Recipro* ソフトウェア⁴⁸ を使用した。標準回折データは、米国鉱物学者結晶構造データベース (AMCSD; American Mineralogist Crystal Structure Database) から取得した。気泡の分析には、*Image J* ソフトウェア⁴⁹ を使用した。

まず Au 製ホーリーカーボン TEM グリッドにグラフェンを転写したものを観察した (図 2-2a)。円状にコントラストが弱く明るい領域は、ホーリーカーボン支持膜の穴に対応する。円の外側のコントラストが強い領域にはカーボン支持膜が存在する。TEM 像にはグラフェンの

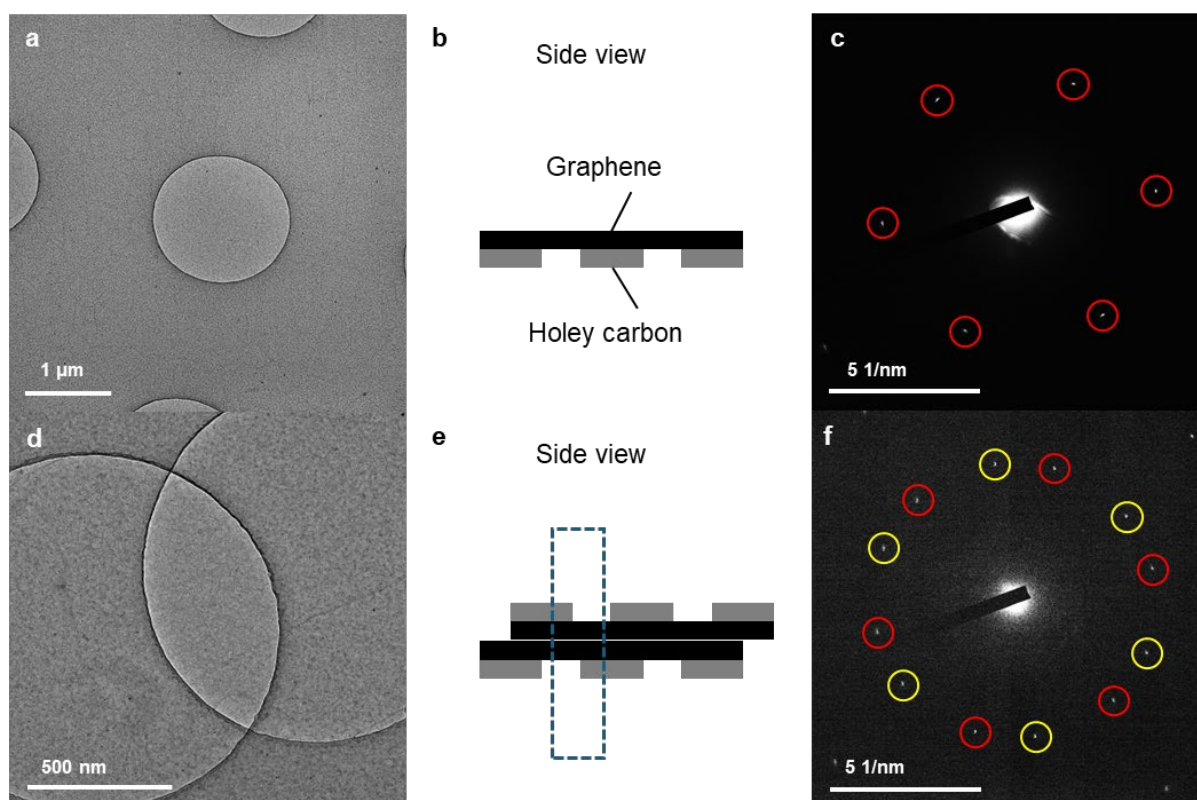


図 2-2. 従来手法で GLC を形成する試み⁵⁰。a. グラフェンが転写されたホーリーカーボングリッドの明視野 TEM 像。b. (a) の側面図の概略図。c. (a) のホーリー領域から取得した SAED パターン：6 回対称パターンは赤丸で強調されている。d. 従来の方法で製造された水を含まない GLC の明視野 TEM 画像。グリッドは、2 枚のグラフェンシートを向かい合わせに配置し、純水の液滴を挟み込むようにして作製した（図 2-1 参照）。e. (d) の側面図の概略図。青い点線で囲まれた領域は、(d) の撮影領域に対応する。f. (d) の交差領域から取得した SAED パターン：2 組の 6 回対称パターンが赤と黄色の円で強調されている。

折れやたわみを示唆するようなコントラストは認められなかった。照射電子線に垂直な方向から見ると、グラフェンが平面的にホーリーカーボン膜に転写されたと考えられる（図 2-2b）。カーボン支持膜の穴に対応する領域から電子回折図形を取得した。その結果、SAED パターンに 6 回対称性の存在が確認された（図 2-2c）。グラフェンがマイクロメートルオーダーで折れ曲がったりしわが寄ったりせず、TEM グリッド上へ平面的に転写されたことが確認できた。

グラフェン転写 TEM グリッドを 2 つ用意し、純水 GLC の作製を試みた。片方の TEM グリッドのグラフェン上に超純水を滴下した。グラフェンとグラフェンを向い合わせるように、もう一つの TEM グリッドを乗せた。余分な水分をろ紙の先端で除去した後、まず低倍率で TEM 観察を行った（図 2-3）。画像端の暗い領域は TEM グリッドの金格子に対応する。上下に合わさった 2 つの金格子が見えている。その中に、2 枚のホーリーカーボン膜が向かい合っていて領域が存在した（領域 A）。この領域 A を拡大し、上下のカーボン膜の穴が交差している

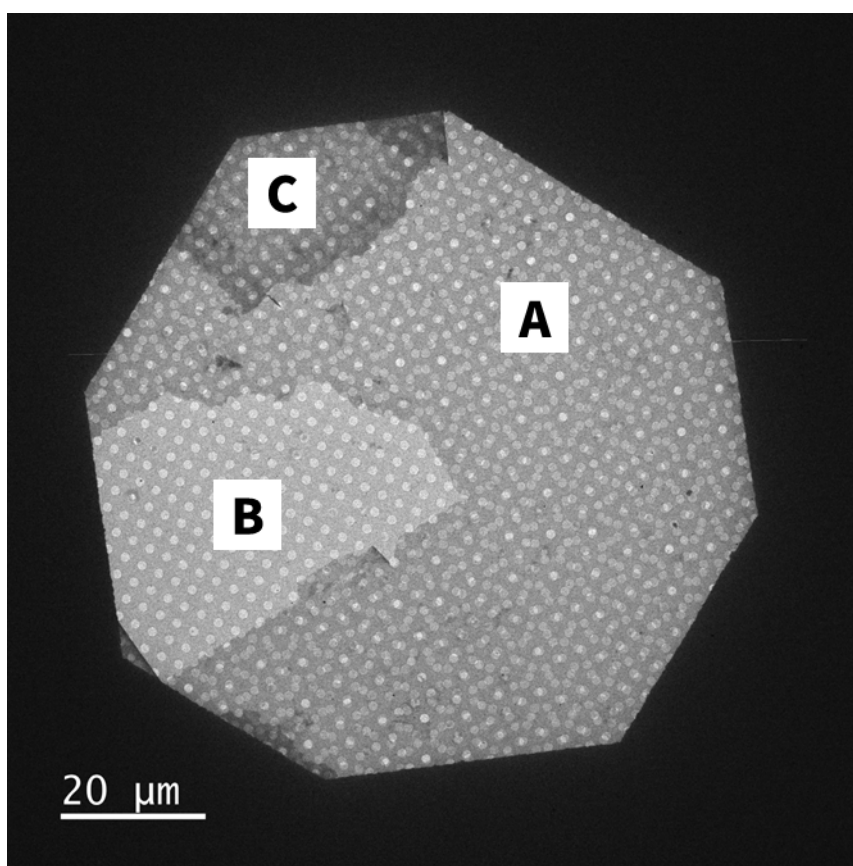


図 2-3. 従来の方法で GLC の作製を試みた TEM グリッドの一部の低倍率明視野 TEM 像⁵⁰。2 枚の TEM グリッドで、グラフェンを向かい合わせにして超純水の液滴を挟み込むようにしてグリッドを製造した (図 2-1)。2 枚の、グラフェン転写されたホーリーカーボン膜が向かい合っている (領域 A)。一部のカーボン膜は破損しており、領域 A よりも明るいコントラストを示した (領域 B)。暗いコントラストの領域 C では、2 枚のカーボン膜の上に、領域 B で破損したカーボン膜が付着したと考えられる。視野全体にわたってコントラストのグラデーションや気泡の発生は観察されず、カーボン膜の枚数によるコントラストの変化と汚染によるコントラストのみが観察された。

領域に着目して TEM 観察を行った (図 2-2d)。水は電子線照射により容易に放射線分解を起こし、水和電子 (e_h^-)、H、OH、 H_3O^+ 、 HO_2 などの化学種を生成し、結果として水素分子と酸素分子を生成することがよく知られている²⁶。生成した気体の圧力が飽和蒸気圧を超えれば、液体中にバブルとして現れる。つまり、電子線を十分に照射した際にバブルが生成し、そのバブルが自由に動き回る様子が捉えられれば、液体 (特に、水) がトラップされていることを簡易的に検証することができる。領域 A は、グラフェン転写済みのカーボン膜がグラフェンを向かい合わせる形で接した領域であり、先行研究の純水 GLC で報告されてきた通りのジオメトリである。領域 A にて、グラフェン間に封入された水に由来する強いコントラストが現れると期待されたが、実際にはそのようなコントラストは観察されなかった (図 2-2d)。電子線を十分に照射した状態でも、気泡の形成や運動は確認されなかった。グラフェン自体の存在を確認するため、図 2-2d で 2 つの円が交差している部分から SAED パターン (図 2-

2f) を撮影した。図 2-2d の 2 つの円はそれぞれ、TEM グリッド上のホーリーカーボン膜の穴のあいた領域に対応する。つまり、グラフェンの層だけが存在すると予想される。実際、SAED パターンは、1 組の特徴的な 6 回対称性パターン（図 2-2f の赤丸と黄丸）を明瞭に示した。よって、2 枚のグラフェンが水を内包することなく平面的に向かい合っていると考えられる。先行研究の純水 GLC が再現できなかった要因として、本論文の実験ではグラフェンを TEM グリッドに転写した際の平面性が高かったことが考えられる。TEM グリッドに転写したグラフェン同士を向かい合わせるようにして、その間に純水をトラップすることを意図した。しかし、ホーリーカーボン膜にグラフェンが平面的に転写されたため、グラフェンがたわんだり折りたたむことが許されなかった。そのため、液体をトラップできるような空間を確保できなかったと考察した。次節では、液体をトラップするための空間を確保するために、自由にたわんだり折りたたむことを許容する ‘Free-standing’ 状態のグラフェンを導入して純水 GLC 作製を試みた。

2-2. ‘Free-standing’ 法によるグラフェン液体セルの作製

GLC への水の封入を容易にするために、GLC の作製方法を改良した。‘Free-standing’ 状態で水の表面に浮遊するグラフェンを用意した。ここでいう ‘Free-standing’ 状態とは、封止前にグラフェンがカーボン TEM グリッドなどの基板に支持されていないことを意味する。ここでは、‘Free-standing’ 状態によってグラフェンが曲がり、皺を寄せて水を包み込むことを期待した。水上に浮遊している ‘Free-standing’ 状態のグラフェンを、すでにグラフェンが転写されたホーリーカーボン TEM グリッド上に直接すくい取った (図 2-4)。

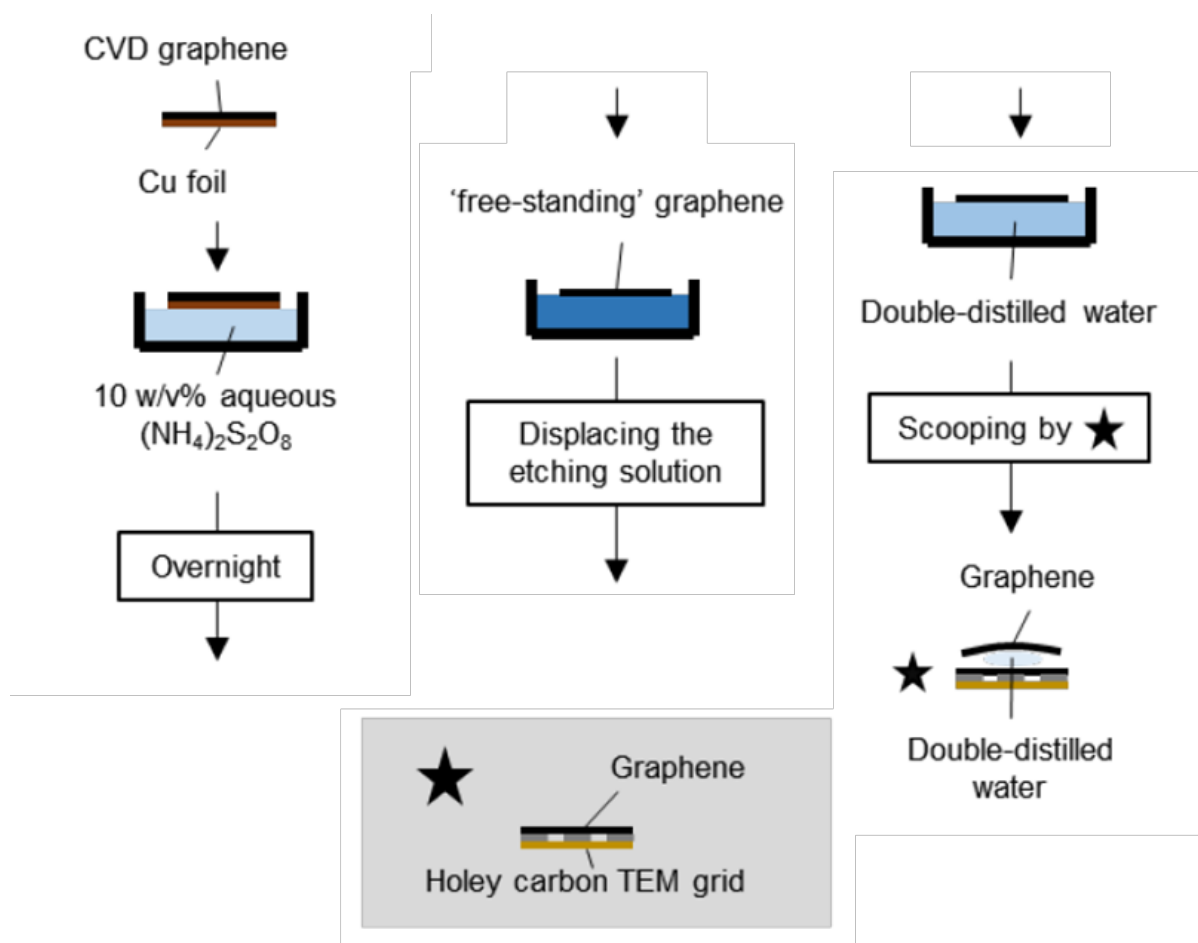


図 2-4. ‘Free-standing’ 法による液体セルの作製方法⁵⁰。自由なたわみや折りたたみを許容する ‘Free-standing’ 状態のグラフェンを用いて液体トラップ空間を確保し、純水 GLC 作製を試みた (図 2-5)。

GLC を冷却すると、凍結により氷の形成が期待される。氷の回折コントラストから、水のトラップ可否を判断することができる。また、放射線分解によって発生する気体分子の水への溶解度は、温度が低いほど高くなるため、気泡の形成を抑制する効果も期待できる。そこで ‘Free-standing’ グラフェンを用いて純水 GLC を作製後、80 K に冷却した状態でグリッドを観察した (図 2-5a)。グラフェン膜の折れ曲がりやたわみ、折り畳みを示唆するコントラストがホーリーカーボン膜全体に広がっていた。グラフェン転写済み TEM グリッド同士を

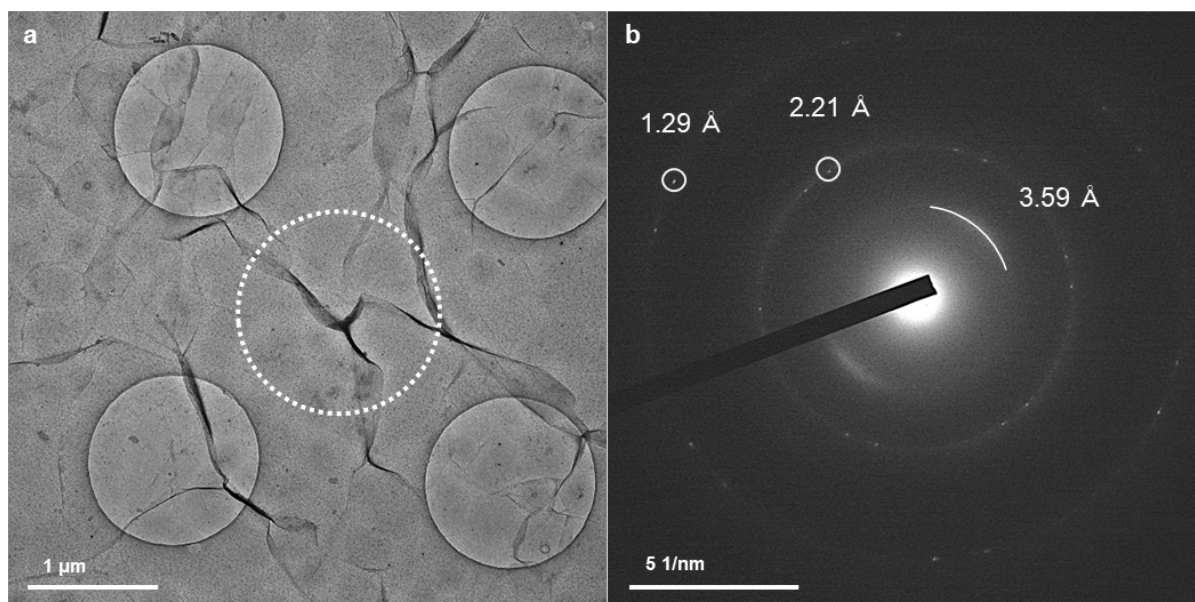


図 2-5. ‘Free-standing’ 法により純水 GLC 作製を試みた結果⁵⁰。a. 80K で観察した、グラフェンを保持したホーリーカーボングリッドの明視野 TEM 像。b. (a) の点線円領域から取得した SAED パターン。

向い合せて作製した場合（図 2-2d）とはグラフェンのコントラストが明確に異なり、‘Free-standing’ グラフェンを経由することでグラフェンの変形を促すことが可能になった。一方、結晶性の回折コントラストは確認できなかった。

強いコントラスト領域における水のトラップを確認するため、図 2-5a の点線領域から SAED パターン（図 2-5b）を取得した。このパターンは、グラフェン由来の 1.29Å と 2.21Å の 6 回対称パターンと、3.59Å の回折リングから構成されていた。2～4 層グラフェンのファンデルワールス厚みは 3.70Å であり、グラファイトの (0 0 2) 間隔は 3.36Å に収縮することが以前に示されている²⁷。これは今回の結果とよく一致している。というのも、今回 ‘Free-standing’ 法によって GLC を作製する際に、6～8 層という厚みのグラフェンを用いたからである。一方、結晶や非晶質の水に由来する回折は観測されなかった。試料を室温に温めても、TEM コントラストに大きな変化はなく、電子ビーム強度を上げて気泡の発生は観察されなかったことから、この部分に水は封入されていないことが示唆された。図 2-5a には斑点状のコントラストが分散している。これらのコントラストは、GLC 作製過程でエッチング液面で一晩放置処理したことによるグラフェンの汚染や酸化の可能性があり、さらなる元素分析が必要である。これらの斑点状のコントラストについても、回折コントラストや氷由来の回折パターン、発泡等、水のトラップを示唆するシグナルは得られなかった。

純水 GLC の再現実験のほとんどは、平滑な転写グラフェン（図 2-2d）やグラフェンの折れ曲がり（図 2-5a）という結果に留まり、液体のトラップを示唆するようなシグナルは得られなかった。一方で、稀に先行研究に類似の GLC が形成した（図 2-6）。この GLC は ‘Free-standing’ グラフェンをグラフェン転写済みホーリーカーボン TEM グリッドですくい取って

作製したものである(図 2-4)。グラフェン転写済みのホーリーカーボン膜は、‘Free-standing’グラフェンをすくいあげる過程で機械的に破れてしまうことがある。その結果、グラフェンは複雑に何重にも折り畳まれ、液体を偶発的にトラップすることに成功した。

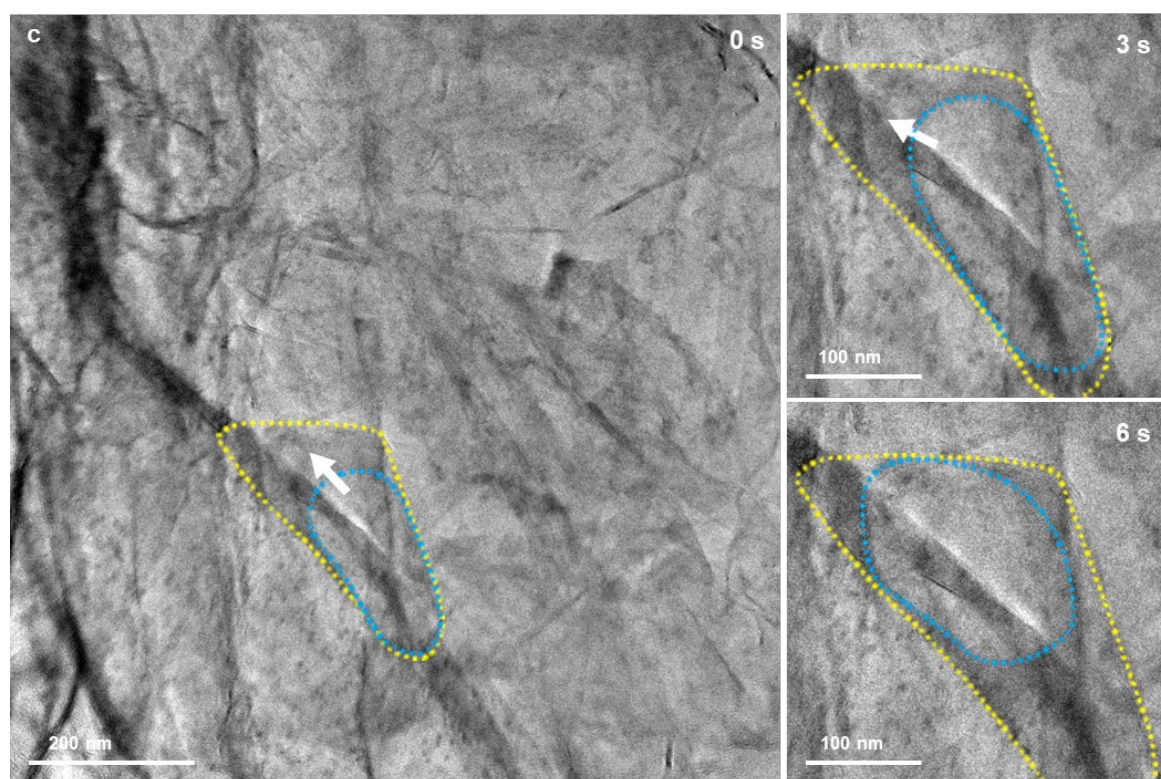


図 2-6. GLC の再現に偶発的に成功した例⁵⁰。明視野 TEM 像のスナップショット (0、3、6 秒)。複雑に折りたたまれたグラフェンに液体がトラップされている。黄点線は GLC、青点線は GLC 内部の気泡のガイドである。気泡の移動方向を白い矢印で示した。

図 2-6 の黄点線で示した帯状の GLC の内側には、より明るいコントラストを持つ気泡 (青点線) が存在していた。気泡は、GLC 内にトラップされた液体の放射線分解か、溶存ガスの析出によって生じた可能性がある。電子線照射下で、気泡は 0-6 秒の間に GLC 内を上方に移動し、26 秒時点で電子線量率を上昇させたことに伴い 28 秒後から下方にゆっくりと戻っていった。この間、気液界面は滑らかに変形し続け、気泡の周囲に液体が存在することが示唆された。図 2-5 では水を氷として検出しやすくするために冷却実験を行ったが、冷却しない室温での気泡の動きから、GLC の形成を確認することができた。偶発的なグラフェンの折りたたみによって、エッチング液から置換された水がトラップされたと考えられる。しかし、図 2-6 に示した GLC にトラップされた液体の組成については議論の余地がある。実験操作を振り返れば、‘Free-standing’ 状態のグラフェンを浮遊させたエッチング液を超純水に置換した後で、グラフェン転写済み TEM グリッドですくっている。そのため、GLC にトラップされたのが純水であると考えるのは自然な発想である。しかし先述の通り、発泡を伴う GLC の再現性は著しく低く、冷却して氷の電子回折が得られたことはない。次節では、形成した GLC を冷却した際に、氷以外の結晶が形成した結果について議論する。

2-3. ‘Free-standing’ 法によるグラフェンベース液体セルの作製

先行研究では、GLC としてトラップする空間を確保するために 2 枚のグラフェン間にスパーサーを導入したり^{28,29}、マイクロウェルグリッドで形状を制御する試みも行われてきている^{15,30}。その例に倣い、SiNx マイクロウェル TEM グリッド (Norcada Inc.、Edmonton、図 2-7) を用意した。SiNx マイクロウェル TEM グリッドには、4 つの正形状のウインドウがある (図 2-7a)。各ウインドウには、3 種類の異なる直径 (1、2、3 μm) の 81 個のマイクロウェル (9 $\times$ 9) が含まれている (図 2-7b)。各マイクロウェルの深さは 60 nm であり、マイクロウェルの外側の厚さは 100 nm、マイクロウェルの底の厚さは 40 nm である。ウインドウ内部の SiNx 膜は全て非晶質構造であり、その SAED パターンはハローパターンを示す (図 2-7c)。

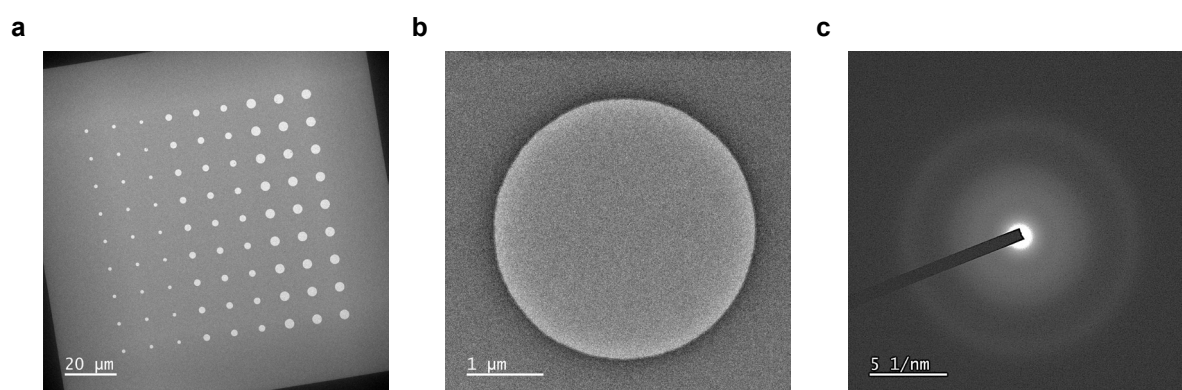


図 2-7. グラフェンベース液体セルの作製に用いた SiNx マイクロウェル TEM グリッド⁵⁰。a、SiNx マイクロウェル TEM グリッドのウインドウの明視野 TEM 画像。各ウインドウには、3 種類の異なる直径 (1、2、および 3 μm) を持つ 81 個のマイクロウェル (9 $\times$ 9) がある。各マイクロウェルは、厚さ 100 nm と 40 nm の SiNx 膜の間にあり、深さは 60 nm である。b、直径 3 μm のマイクロウェルの拡大図。明るい円形領域の厚さは 40 nm、周囲の領域の厚さは 100 nm である。c、b の円形領域から取得した SAED パターン。

SiNx マイクロウェル TEM グリッドを用いて、グラフェンベース液体セル (GSLC; graphene-SiNx liquid cell) を設計した (図 2-8)。GSLC は、SiNx マイクロウェル TEM グリッドとグラフェンにより液体をトラップする形の液体セルである。一つ目のねらいとして、マイクロウェルの高低差を利用することを意図した。マイクロウェルの深さは 60 nm であり、その壁沿いに液体のトラップ空間を確保できると期待される。二つ目の狙いとして、パッキングの成功率を高めることを意図した。前節で言及したように、両面にグラフェンを用いて GLC を作製した場合その再現性は著しく低かった。そこで、グラフェンを経由して水がリークしている可能性を検討し始めた。そこで、グラフェンの割合を両側から片側に削減することで純水 GLC の再現性が高まることを期待した。なお今後 GSLC についても、特に区別する必要性がない場合は、まとめて GLC と呼称する。

マイクロウェル TEM グリッドは、SiNx 膜上での液体の広がり促進のために、プラズマイオンボンバーダーによる親水性処理を施した。グラフェンを蒸着してある銅切片をエッチング液面に終夜浮かした。銅薄膜がエッチングされ、グラフェンが ‘Free-standing’ 状態でエッチング液面に浮遊した。そこで、エッチング液を静かに超純水に置換した。置換した水の上に浮遊する ‘Free-standing’ グラフェンを、SiNx マイクロウェル TEM グリッドですくい上げた（図 2-8）。

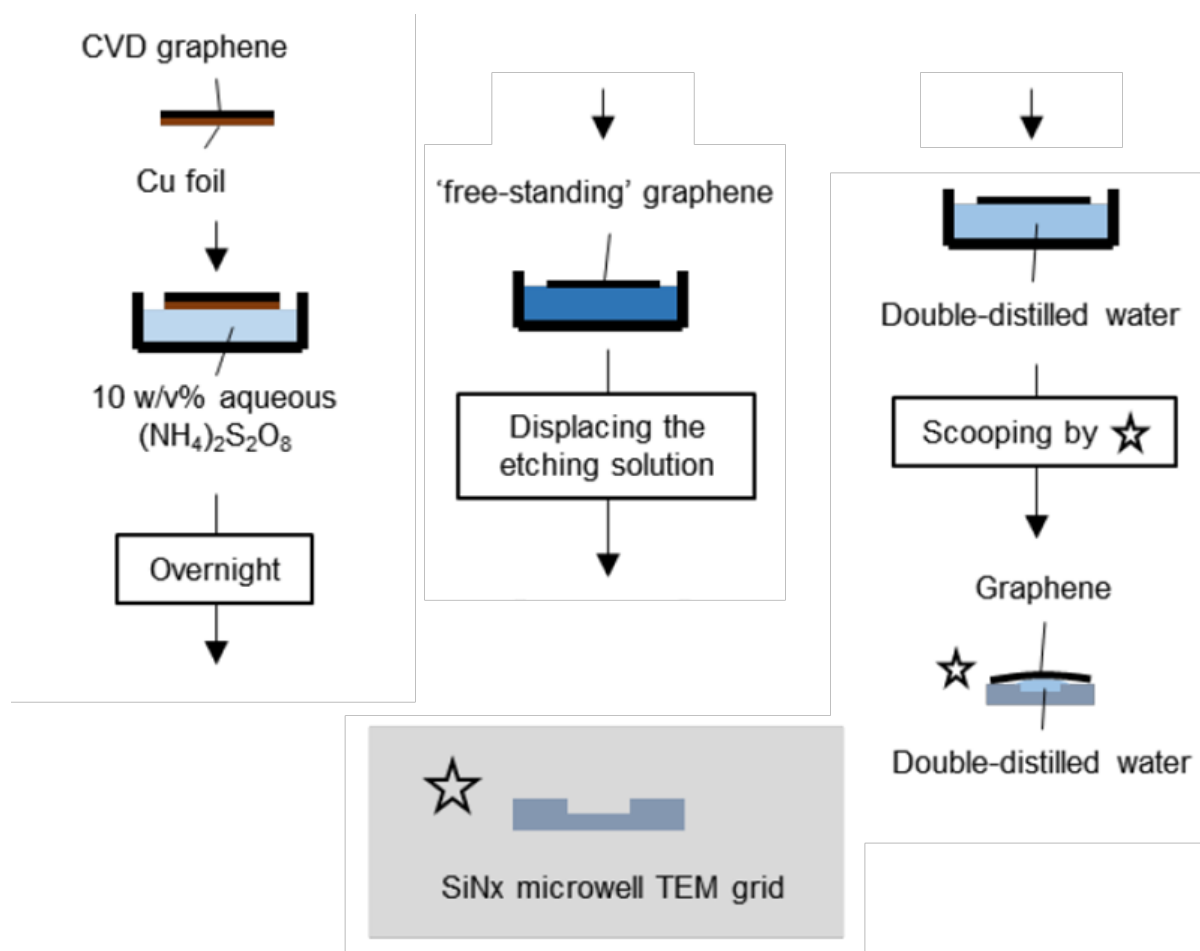


図 2-8. 純水 GSLC の作製方法⁵⁰。‘Free-standing’ グラフェンと SiNx マイクロウェル TEM グリッドを用いた。液面上に自立グラフェンシートを配置する。その結果得られたグリッドは、図 2-9 に対応する。

作製した GLC を TEM 観察したところ、水の存在を示唆するような気泡の形成は観察されず、画像を横切るグラフェンのしわのみが観察された（図 2-9a）。電子ビームの強度を上げて、これらの様相は変化せず、気泡は観察されなかった。この結果は、従来法と ‘Free-standing’ 法を用いて得られた前節の結果と同様である。井戸領域（図 2-9a、青色）から得られた SAED パターン（図 2-9c）は、グラフェンの回折パターンとマイクロウェルグリッドの底にある SiNx 膜からのハローパターンを示した（図 2-7c）。GSLC を導入した狙いの一つとしてパッキング

の成功率を上げるためと言及したが、グラフェンの使用を片側に減らしても、グラフェン-SiNx 膜間あるいはグラフェン内部を通して水がリークしてしまうことが明らかになった。

GSLC の繰り返し実験の多くは図 2-9a と同様に水のトラップが確認できない結果に終始した。一方、9 回の同様の実験で 1 度のみ、GSLC の形成が確認された (図 2-9d-f)。放射線分解の結果生じた気泡は、マイクロウェルに沿って移動し、合体した。GSLC についてこのような実験を繰り返した後、マイクロウェルの壁に沿って 2 つ目の GSLC を作製することに成功した (図 2-9g)。ペルチェ冷却 TEM ホルダーで GSLC を 253.8K に冷却して実験を行った³¹。

強いコントラスト (図 2-9g の黄色部分) により、高さ 60 nm のマイクロウェルの壁 (図 2-9g の赤色部分) に沿って GSLC が分布していることが確認された。黄色の領域から得られた SAED パターン (図 2-9h) は、水の氷には対応せず、硫酸アンモニウム結晶 (AMCSD コード: 0012987) の SAED パターンと帰属された。放射線分解による気泡の生成は、冷却によるガス分子の溶解度の上昇によって抑制された。それにより、EDS-STEM による元素マッピングが可能になった。酸素だけでなく硫黄もマイクロウェルの壁に沿って広く分布していることが判明した (図 2-9i; 完全な EDS マッピングと対応するスペクトルについては、図 2-10 を参照)。冷却実験のどの段階でも、氷に帰属されるような SAED は取得されなかった。ただし、253.8K より低い温度で氷が結晶化する可能性は残されている。つまり、薄膜の間に閉じ込められた水の熱力学的特性により、253.8 K という低温環境下であっても液体状態の水の存在が許容される可能性があると考えられる。GSLC 中の水の存在についてより正確に議論するためには、より低温での冷却実験が期待される。とはいえ、本結果から、GSLC にトラップされた液体は純水ではなく硫黄成分を含んだ水溶液であったという事実が判明した。加えて、ペルチェホルダーで徐冷した際に氷結晶ではなく硫酸アンモニウムがまず形成したことより、水溶液中の硫黄濃度が顕著に上昇していると考えられる。

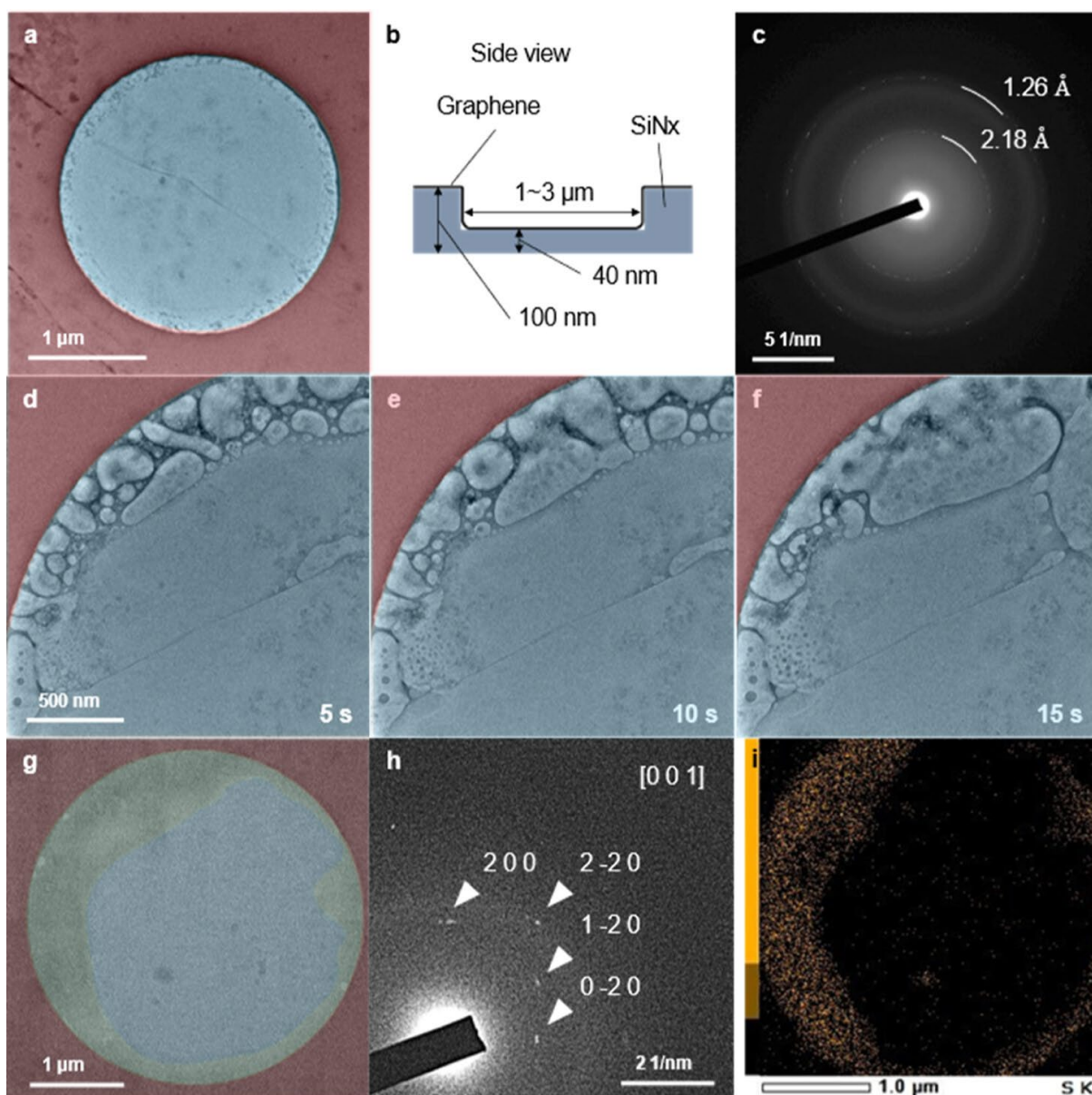


図 2-9. 純水 GSLC 作製の試み⁵⁰。グリッドは図 2-8 に示した方法で作成した。a. エッチング溶液から置換した純水のトラップを試みた際の明視野 TEM 画像。円形の領域（青）と周囲の領域（赤）の厚さはそれぞれ 40 nm と 100 nm である。b. (a) を側面から見たときの概略図。c. (a) の青い領域から取得した SAED パターン。d-f. 稀に作製に成功した GSLC の明視野 TEM 像のスナップショット。5、10、15 秒時点の気泡の形成と移動を示している。g. 253.8 K に冷却した GSLC の明視野 TEM 像。凍結した GSLC は黄色で強調表示されている。h. (g) で黄色で示した GSLC 領域から取得した SAED パターン。白い矢印で示したのは、硫酸アンモニウム結晶（AMCSD コード：0012987）に起因するスポット。i. (g) に対応する硫黄の STEM-EDS マッピング。マッピングは (g) に対して反時計回りに 20° 回転している。EDS 画像とスペクトルの全体像については、図 2-10 を参照のこと。

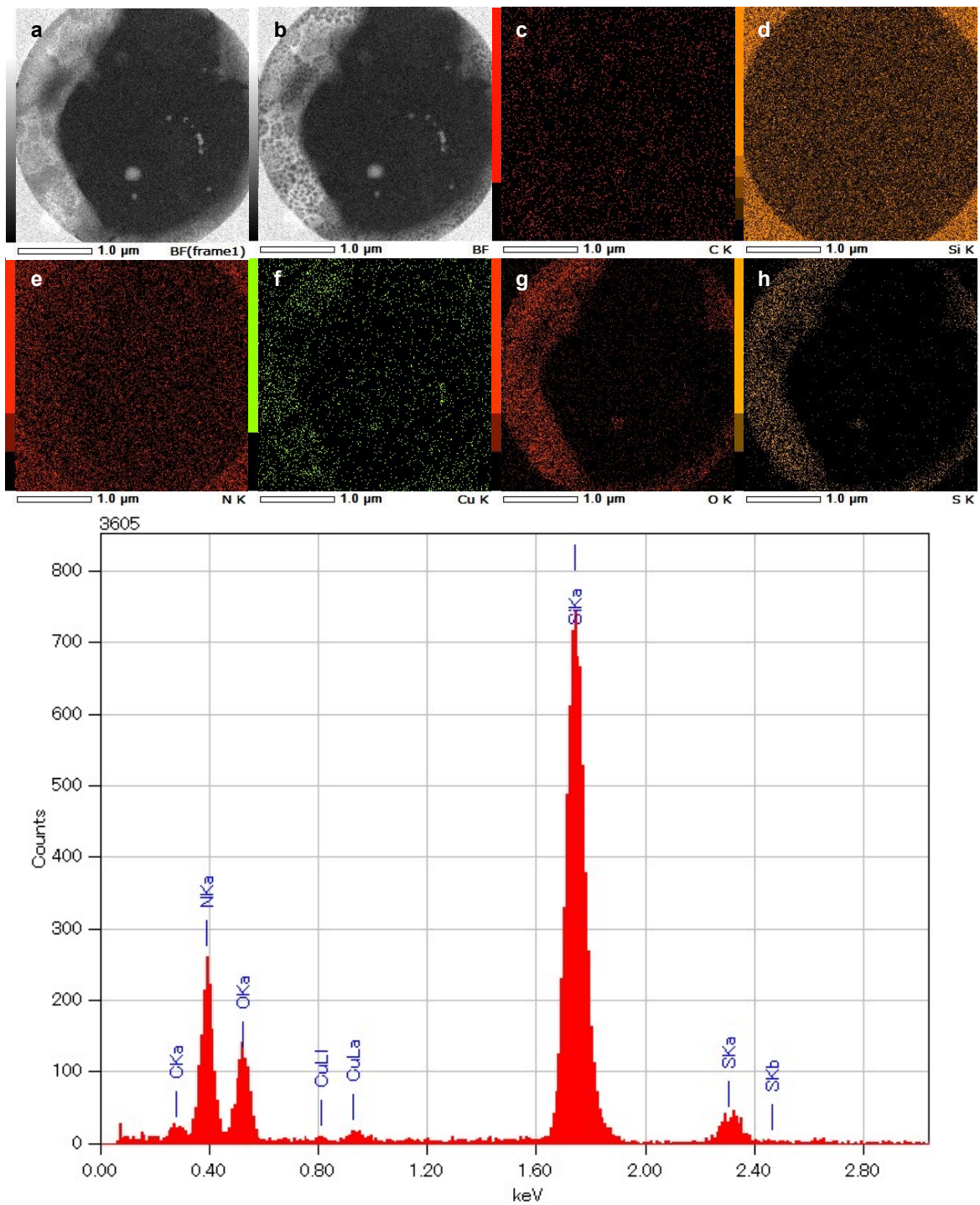


図 2-10. 図 2-9g に示した GSLC に対応する、STEM-EDS による元素マッピングとスペクトル⁵⁰。各パネルは、高角度環状暗視野走査型透過電子顕微鏡（HAADF-STEM; high-angle annular dark-field scanning TEM）像であり、a はデータ蓄積前、b はデータ蓄積後、c は炭素、d はケイ素、e は窒素、f は銅、g は酸素、h は硫黄の元素マッピングである。各マッピングは、図 2-9g に対して反時計回りに 20° 回転している。

2-4. 第2章の参考文献

- (25) Hauwiler, M. R.; Ondry, J. C.; Alivisatos, A. P. Using Graphene Liquid Cell Transmission Electron Microscopy to Study in Situ Nanocrystal Etching. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 2018, No. 135, 57665.
- (26) Schneider, N. M.; Norton, M. M.; Mendel, B. J.; Grogan, J. M.; Ross, F. M.; Bau, H. H. Electron-Water Interactions and Implications for Liquid Cell Electron Microscopy. *J. Phys. Chem. C* 2014, 118 (38), 22373–22382.
- (27) Johra, F. T.; Lee, J.-W.; Jung, W.-G. Facile and Safe Graphene Preparation on Solution Based Platform. *J. Ind. Eng. Chem.* 2014, 20 (5), 2883–2887.
- (28) Lim, K.; Bae, Y.; Jeon, S.; Kim, K.; Kim, B. H.; Kim, J.; Kang, S.; Heo, T.; Park, J.; Lee, W. C. A Large-Scale Array of Ordered Graphene- Sandwiched Chambers for Quantitative Liquid-Phase Transmission Electron Microscopy. *Adv. Mater.* 2020, 32 (39), 2002889.
- (29) Kelly, D. J.; Zhou, M.; Clark, N.; Hamer, M. J.; Lewis, E. A.; Rakowski, A. M.; Haigh, S. J.; Gorbachev, R. V. Nanometer Resolution Elemental Mapping in Graphene-Based TEM Liquid Cells. *Nano Lett.* 2018, 18 (2), 1168–1174.
- (30) Rasool, H.; Dunn, G.; Fathalizadeh, A.; Zettl, A. Graphene-sealed Si/SiN Cavities for High-resolution in Situ Electron Microscopy of Nano-confined Solutions. *Phys. Status Solidi B* 2016, 253 (12), 2351–2354.
- (31) Yamazaki, T.; Yashima, Y.; Katsuno, H.; Miyazaki, H.; Gondo, T.; Kimura, Y. In Situ Transmission Electron Microscopy Study of Bubble Behavior Near the Surface of Ice Crystals by Using a Liquid Cell With a Peltier Cooling Holder. *Microsc. Microanal.* 2023, 29, 1940–1949.
- (47) Hauwiler, M. R.; Frechette, L. B.; Jones, M. R.; Ondry, J. C.; Rotskoff, G. M.; Geissler, P.; Alivisatos, A. P. Unraveling Kinetically-Driven Mechanisms of Gold Nanocrystal Shape Transformations Using Graphene Liquid Cell Electron Microscopy. *Nano Lett.* 2018, 18 (9), 5731 - 5737, DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b02337.
- (48) Seto, Y.; Ohtsuka, M. ReciPro: Free and Open-source Multipurpose Crystallographic Software Integrating a Crystal Model Database and Viewer, Diffraction and Microscopy Simulators, and Diffraction Data Analysis Tools. *J Appl Crystallogr* 2022, 55 (2), 397–410, DOI: 10.1107/s1600576722000139.
- (49) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* 2012, 9 (7), 671–675, DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- (50) Yashima, Y.; Yamazaki, T.; Kimura, Y. Micrometer-Scale Graphene-Based Liquid Cells of Highly Concentrated Salt Solutions for In Situ Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy. *ACS Omega* 2024, 9, 39914–39924.

第3章 GLC の形成条件と課題

3-1. 高い再現性を伴う高濃度塩水溶液 GLC 形成

ここでは、SiNx マイクロウェル TEM グリッドによりエッチング液面上の ‘Free-standing’ グラフェンを直接すくい取り、エッチング液 GSLC を作製した結果について示す（図 3-1）。TEM 観察の結果、エッチング液 GSLC は高い再現性で形成することが分かった（図 3-2a）。

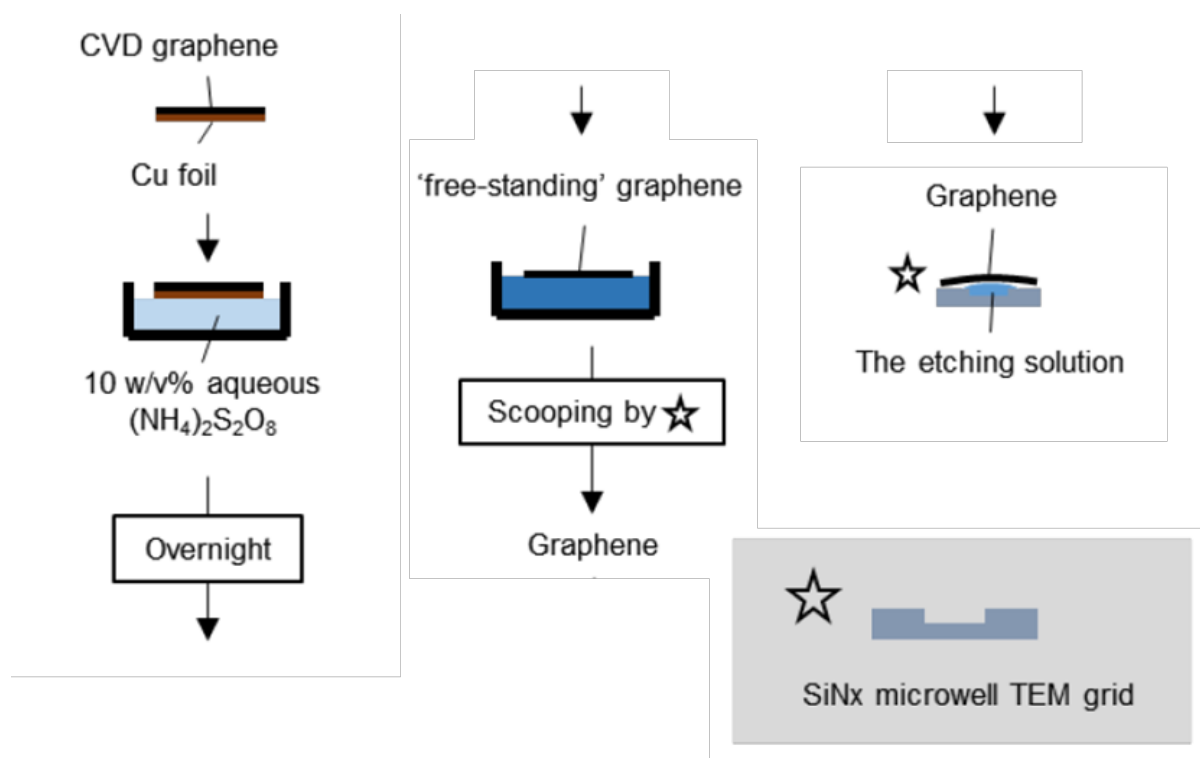


図 3-1. ‘Free-standing’ グラフェンを用いたエッチング液 GSLC の作製方法⁵⁰。得られたグリッドは、図 3-2 のグリッドに対応する。

GSLC はマイクロウェル内部のみならず、厚さ 100 nm の SiNx 膜の領域にまで広がっていることが観察された。当初は SiNx 膜の厚みが薄い（40 nm）、明るいコントラストを示している円形のマイクロウェル（図 3-2a の白矢印）内にエッチング溶液を封入するつもりであった。0 秒、10 秒、20 秒の GSLC のスナップショットから、GSLC の面積が $10\mu\text{m}^2$ よりかなり大きいことが容易に確認された。面積は、泡が動き回る範囲でおおまかに評価した。

これらの気泡は、電子ビームの照射による水の放射線分解により発生し、移動したと考えられる。ミクロンスケールの GSLC は TEM グリッド全体に分布していることが、追加実験によって確認された。これは、純水の封入実験（図 2-2 および 2-5）で GLC が形成されなかったことや、TEM グリッドのごく一部に確率的に稀に GLC が形成されたこととは対照的である。

また、エッチング液と同程度の組成と濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 [10 w/v % (0.43 M) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$] でも、高い再現性で GSLC の幅広い分布が確認された。まず、‘Free-standing’ グラフェン下のエッチング溶液を、0.4 M の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液に慎重に置き換えた（図 3-3）。置き換え後

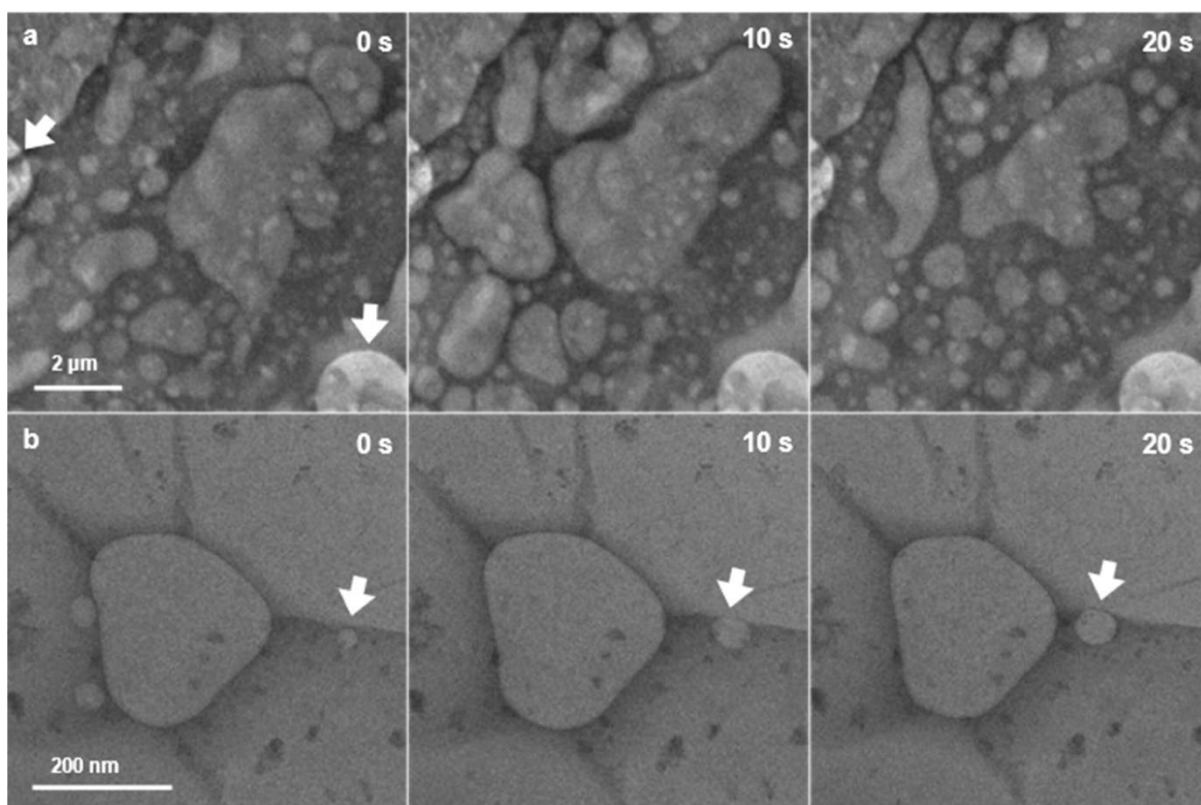


図 3-2. マイクロメートルからサブマイクロメートルスケールにおよぶ GSLC の観察⁵⁰。
 a、エッチング溶液 GSLC の明視野 TEM 像のスナップショット (0、10、20 秒)。深さ 60 nm のマイクロウェルは白い矢印で示されている。グリッドは図 3-1 に示した方法で作製した。
 b、0.4M(NH₄)₂SO₄ 水溶液 GSLC の明視野 TEM 像のスナップショット (0、10、20 秒)。図 3-4c で追跡した気泡は白い矢印で示されている。グリッドは図 3-3 に示した方法で作製した。

のグラフェンの高い安定性により、‘Free-standing’ グラフェンが浮遊した状態の 0.4 M (NH₄)₂SO₄ 水溶液を SiNx マイクロウェル TEM グリッドにすくい取ることができた。作製した GSLC は、図 3-2a のエッチング溶液 GSLC の場合と同様に、TEM グリッド全体に分布していた。SiNx マイクロウェル TEM グリッドに存在する GSLC の 1 つは樹枝状であった (図 3-2b)。20 秒間のスナップショットから、周囲の気泡が連続的に移動と合体を繰り返すことにより、樹枝状の GSLC の中心に大きな気泡が形成されることが確認できた。マイクロメートルからサブマイクロメートルスケールの GSLC が形成されたことで、トラップされた液体セル中に存在する気泡の分析が可能となり、その移動速度は 2 桁以上の範囲があることが示された (図 3-4~3-7)。図 3-2 の封入液体の 0.4M と高濃度であり、これが再現性の高い GSLC の形成を促した可能性がある。

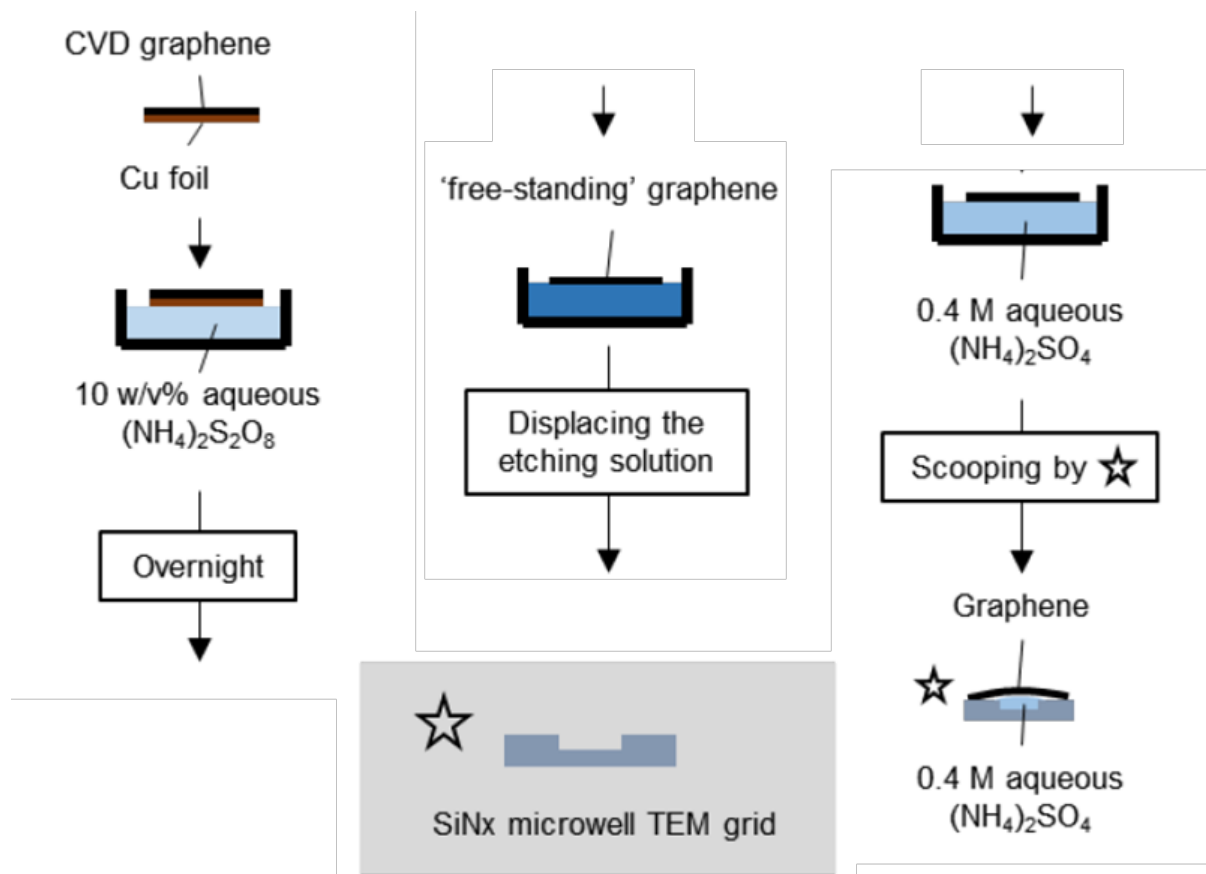


図 3-3. 0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GSLC の作製方法⁵⁰。得られたグリッドは、図 3-2b および図 3-11a に対応する。

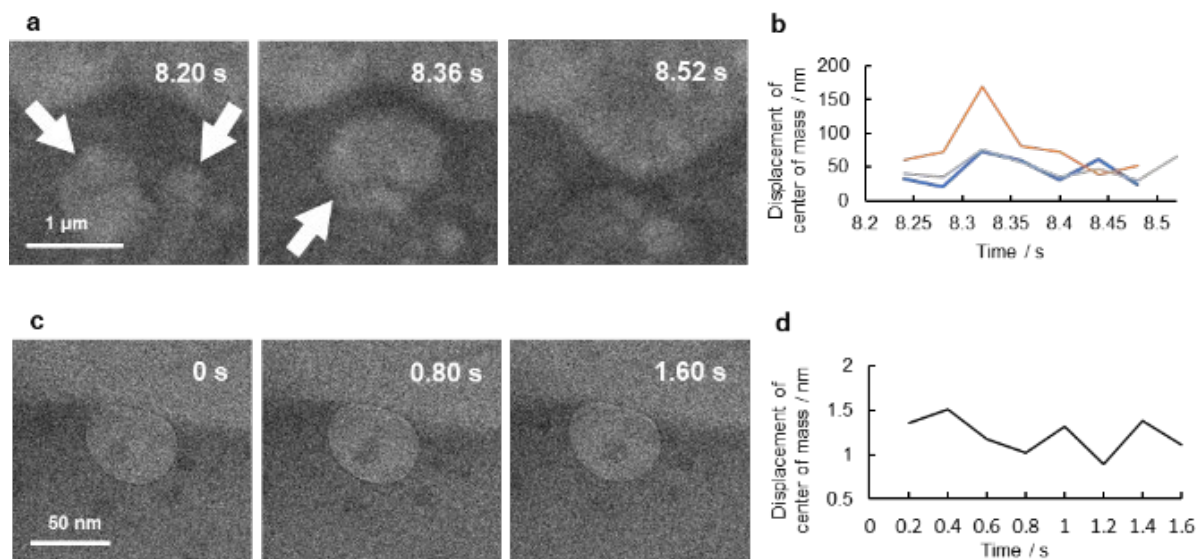


図 3-4. GSCL 内部で発生した気泡の動き⁵⁰。a. エッチング液 GSCL の中央に発生した気泡の明視野 TEM 像のスナップショット。8.20 秒の気泡（白矢印）は 8.36 秒までに合体し（白矢印）、8.52 秒には上の大きな気泡に合流した。このスナップショットは、図 3-2a に対応している。詳細なスナップショットは図 3-5 に示されている。b. (a) の気泡の重心の変位の時間発展（0.04 秒間隔）（青線）。オレンジ色と灰色の線は、図 3-6 と図 3-7 に示されている他の 2 つの気泡である。重心の移動速度は、青、オレンジ、灰色の線でそれぞれ 1.08 、 1.96 、 $1.21 \mu\text{m s}^{-1}$ であった。3 つの気泡の平均速度は $1.42 \mu\text{m s}^{-1}$ であった。c. $0.4 \text{ M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GSCL に発生した気泡の明視野 TEM 像のスナップショット（0.00、0.80、1.60 秒後）；同じ気泡は図 3-2b の白矢印で示されている。d. (c) の気泡の重心の変位の時間発展（0.20 秒間隔）。気泡の重心の速度は 6.10 nm s^{-1} と計算された。これは (a) の場合よりも大幅に小さい値であった。気泡の速度の 2 桁以上の差は、GSCL の形状の違いやトラップ液体の厚さの違いなどの要因によるものと考えられる。特に中央部分では、(a) のような大きな GSCL では、放射線分解とそれに伴う気泡の発生がより多く起こるため、グラフェンのより大きな屈曲が促進されるであろう。これにより、気泡自体の形状がより柔軟になり、(b) と比較してよりダイナミックな気泡の動きが可能になった可能性が考えられる。

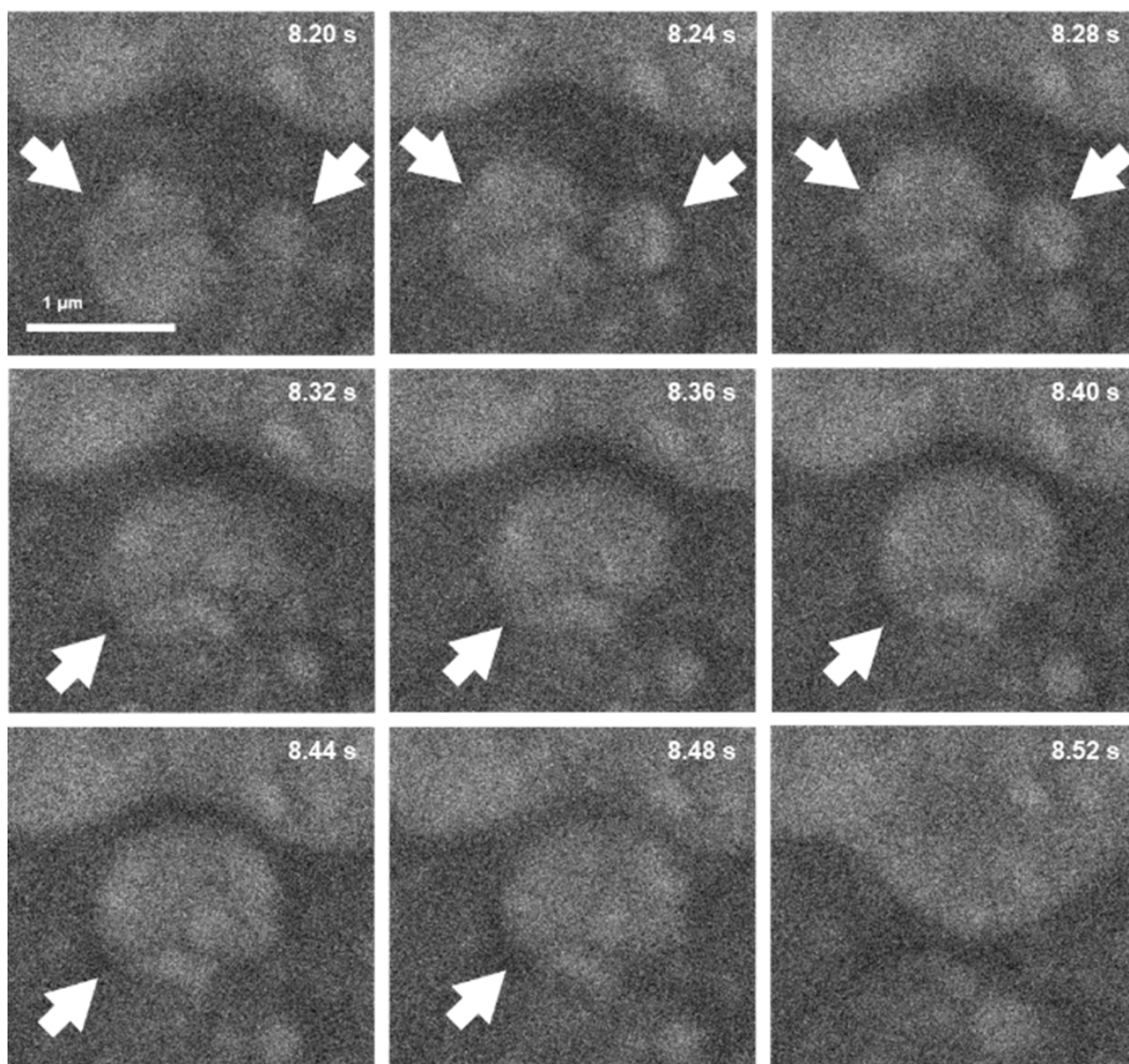


図 3-5. エッチング液 GSLC 中の気泡のスナップショットの拡大図⁵⁰。図 3-4b の青線で示される重心の変位の計算に使用された気泡は、白い矢印で示されている。8. 20、8. 24、8. 28 秒の各スナップショットには 2 つの気泡があった。合体する前は、2 つの気泡それぞれの重心を追跡に使用した。

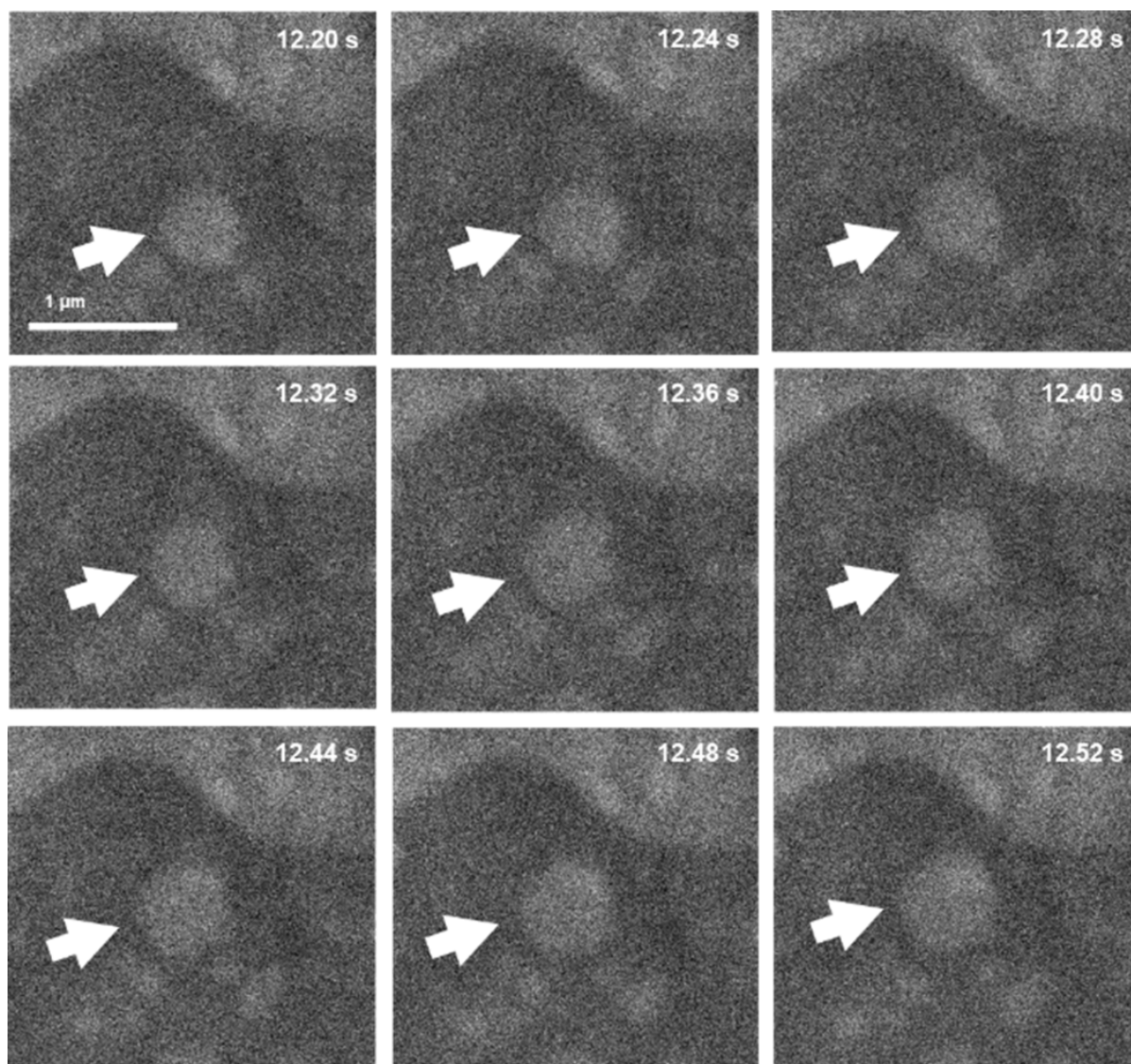


図 3-6. エッチング液 GSLC 中の気泡の拡大スナップショット⁵⁰。重心の変位の計算に用いた気泡は白い矢印で示されており、図 3-4b のオレンジ色の線に対応している。

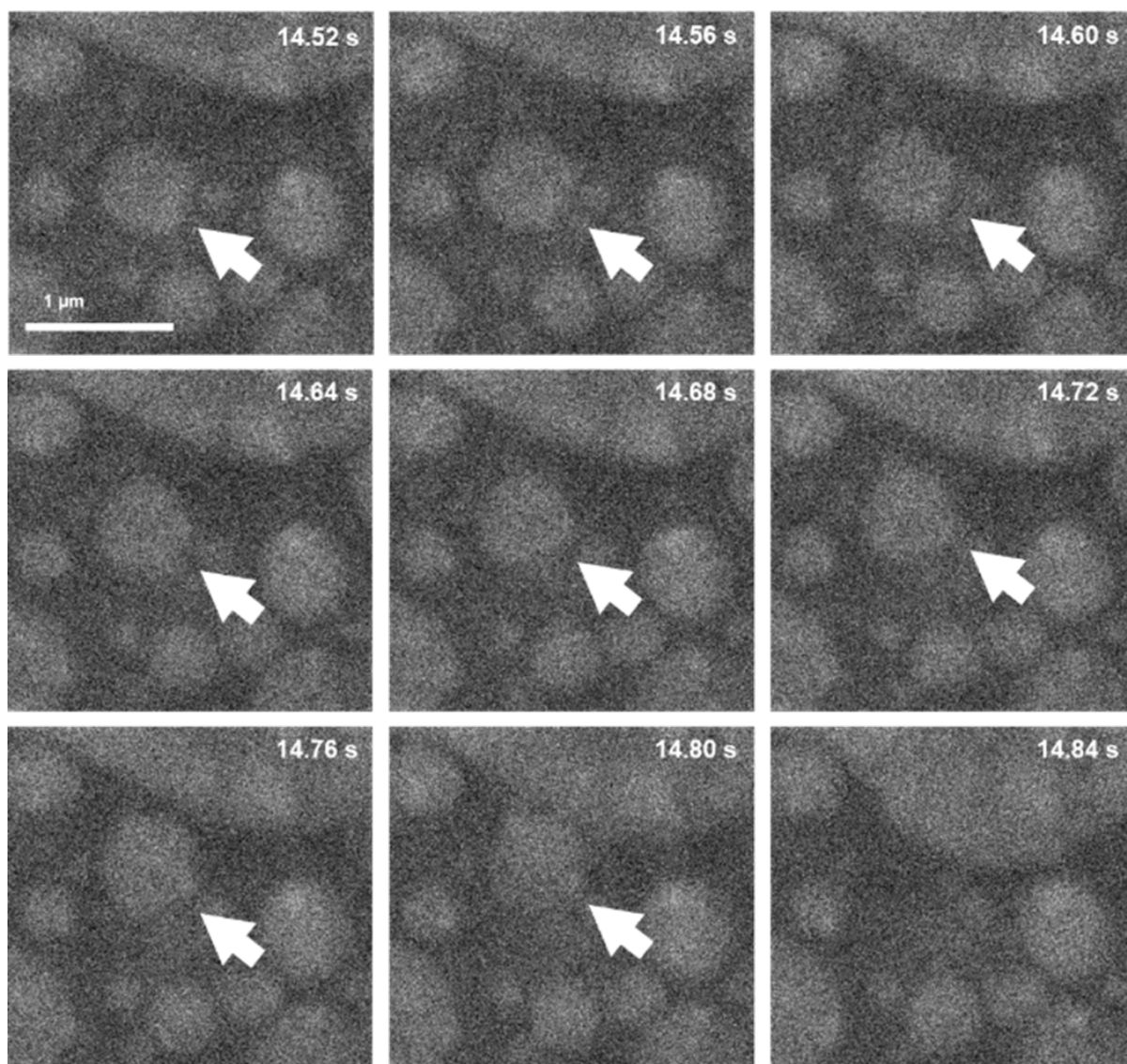


図 3-7. エッチング液 GSLC 中の気泡の拡大スナップショット⁵⁰。重心の変位の計算に用いた気泡は白い矢印で示されており、図 3-4b の灰色の線に対応している。

3-2. 電子線照射下における高濃度塩水溶液の発泡挙動

純水のトラップを試みた際に稀に形成する GSLC (図 2-9d~f) は、マイクロウェル内にエッチング液が残留していることが原因である可能性がある。エッチング液は蒸気圧が低いいため、TEM グリッド上に残留しやすいと考えられる。エッチング液の残留しやすさを確認するため、エッチング液を 10 倍に希釈し、SiNx マイクロウェル TEM グリッド上に滴下した。‘Free-standing’ グラフェンを用いてトラップすることはせず、エッチング液を載せた TEM グリッドをそのまま TEM 鏡筒に挿入した。

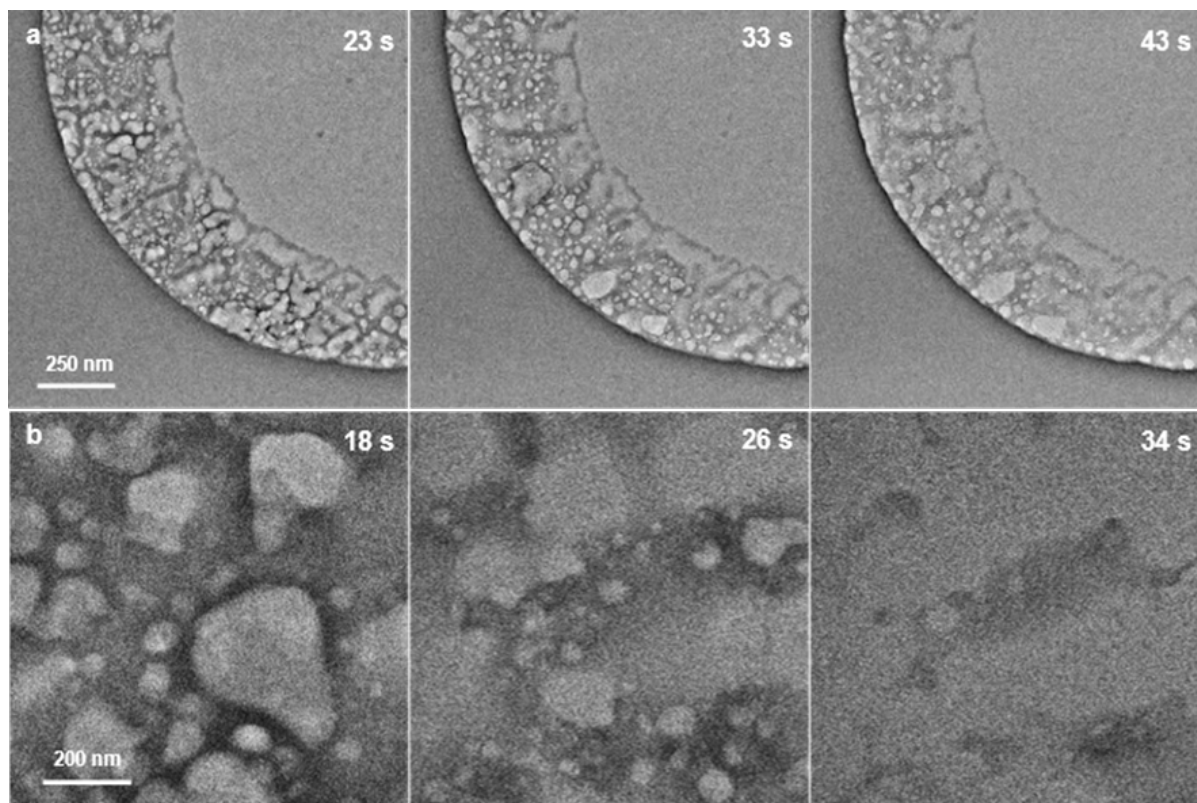


図 3-8. 開放系の水溶液中における、気泡の発生と液体のような挙動⁵⁰。a. 10 倍に希釈したエッチング溶液の明視野 TEM 像のスナップショット。b. 0.4 M 水溶液 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の明視野 TEM 像のスナップショット。それぞれの水溶液は、グラフェンによってトラップせずに、SiNx マイクロウェル TEM グリッド上に直接滴下して TEM 観察を行った。

乾燥したエッチング溶液の残留物は、マイクロウェルの壁に沿って残っていた(図 3-8a)。これは先行研究で報告されている SiNx 膜上のリング型 GSLC³² に類似していた。残留物は電子線照射による放射線分解に伴い発砲し、それらの気泡は隣接する気泡と合体した。協調すべき点は、グラフェンを用いて真空環境から隔離していないにもかかわらず、合体による連続的な変形の過程で、気泡がわずかに動く様子が捉えられた点である。TEM 観察直後に、図 3-8a と同じマイクロウェルについて、EDS による元素マッピングを行った(図 3-9)。図 3-9 の HAADF 像それぞれについて、左下の領域はおおよそ図 3-8a の領域に対応する。これによ

り、グラフェン用 CVD 基板由来の銅、およびエッチング液に由来する酸素と硫黄の存在が確認された。

エッチング液に類似する組成である $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液についても、同様に乾燥下での TEM 観察を行った。0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液を、 SiN_x マイクロウェル TEM グリッド上に滴下し、グラフェンを用いて真空環境から隔離することなく、直接 TEM 鏡筒に挿入した。乾燥後の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の残留物は電子線照射による放射線分解に伴い発砲し、気泡は次々と合体した (図 3-8b)。これらの TEM 像のコントラストは、TEM 観察された $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ エアロゾル粒子の例³³と同様、発砲と昇華により徐々に減少した。最終的に、電子ビームの強度を高めて照射すると、残留物は完全に消失した。電子線を照射したエリアは照射していない部分と比較して明るいコントラストを示し、電子ビームの照射による溶液残留物の蒸発が明らかとなった (図 3-10)。図 3-8a のエッチング液と図 3-8b の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液は、どちらも最終的には完全に乾燥したが、発生した気泡の寿命は、図 3-2 に示した GLC と同様の時間範囲であった。電子線照射した際に高濃度塩が示す液体のような挙動は、乾燥したリン酸ナトリウム緩衝液で報告された例がある³⁴。本研究で観察された液体に類似の挙動を見ると、気泡に関連する物理現象のみに基づいて GLC (または GSLC) を用いた研究を論じることは注意が必要である。EELS による水シグナルの検出は、GLC や GSLC 中の水の存在を検証する有効な手段として知られているが¹⁹、この手法は他の多くの検証方法と同様に、薄膜間に分子が存在することを保証するものではない。つまり、バブルの運動は、そのバブル及び周囲の液体が閉鎖空間に存在しているかを視覚的に確認する方法として、依然としてメリットがある。GLC として観察されている液体やバブルが本当に閉鎖された空間にトラップされているかどうかは、観察中に液体が蒸発しないかどうか (例えば、グラフェンがない場合の蒸発、図 3-8) や、液体中に発生した気泡が立体的な制約を反映した動きをしているかどうか (例えば、グラフェンと基板との接着面の境界に沿って動く気泡、図 2-9d-f) から総合的に判断する必要がある。

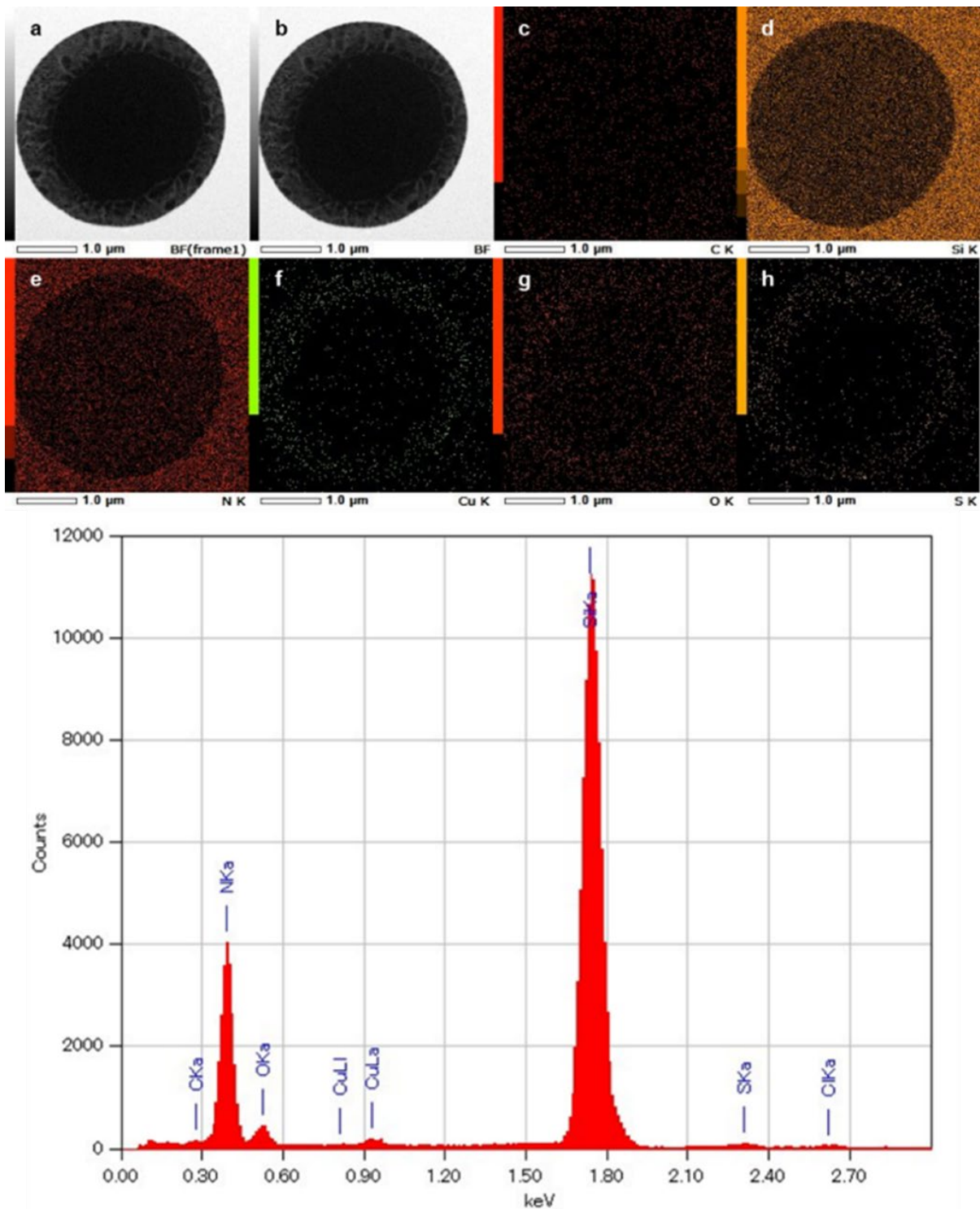


図 3-9. 開放系におけるエッチング溶液の STEM-EDS による元素マッピングと、対応するスペクトル⁵⁰。1% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液を SiNx マイクロウェル TEM グリッド上に滴下した。拡大したスナップショットは図 3-8a に示す。マッピングと対応するスペクトルは、図 3-8a の記録直後に取得した。それぞれの HAADF-STEM 画像は、a がデータ蓄積前、b がデータ蓄積後、c が炭素、d がケイ素、e が窒素、f が銅、g が酸素、h が硫黄の元素マッピングである。

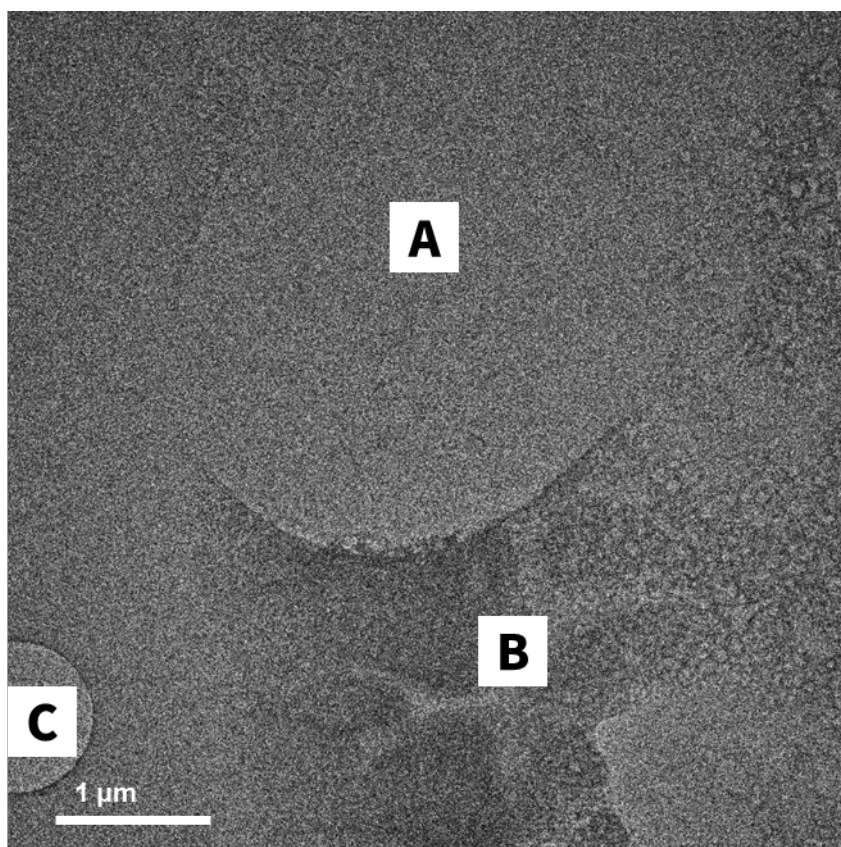


図 3-10. 開放系における 0.4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の蒸発を示す明視野 TEM 画像⁵⁰。0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液を SiNx マイクロウェル TEM グリッド上に滴下し、直接 TEM 観察を行った。領域 A における気泡の発生と液体のような挙動は、図 3-8b にスナップショットで示されている。溶液は最終的に蒸発し、領域 A は電子線照射の少ない領域 B と比較して明るいコントラストを示した。領域 C は SiNx マイクロウェルに対応している。

3-3. GLC からの内包液体のリーク

純水や希薄溶液をトラップできる GLC を開発するためには、水分子とコンタミまたは水分子と溶質の比率に注意することが重要である。例えば、作製された GLC に封入された液体（図 2-6 および 2-9d-f）は、希薄水溶液（望ましくは純水）である可能性と、エッチング溶液のコンタミを主成分とする高濃度水溶液である可能性の 2 つがある。もし、作製から TEM 観察の過程で GLC からの水のリークが顕著でなければ、液体は希薄水溶液となる。一方、水のリークが著しい場合には、液体は高濃度水溶液である可能性が高い。GLC（または GSLC）内の希薄水溶液の存在を検証するには、低温での氷の形成を確認するのが分かりやすい方法である。253.8 K での冷却実験（図 2-9g）では、氷結晶に由来する特徴的な SAED パターンが確認できず、コンタミ（エッチング液由来の硫酸アンモニウム）の高濃度溶液の存在が検証された。これは、GSLC からの水のリークが作製過程から TEM 観察に至るまでのいずれかの段階で発生していたことを示唆している。

TEM 観察下でトラップ液体のリークを、0.4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GSLC のケースで確認した（図 3-11a）。0 秒の時点でマイクロウエルの中心に、デンドライト状の GSLC が形成している。この GSLC の中央（図 3-11a の青点線）には観察開始時から大きな気泡が存在しており、GSLC の縁から小さな気泡が次々と発生し、それが大きな気泡に向かって移動していることが観察された。TEM 観察下では連続的に放射線分解が起こっているにもかかわらず、GSLC 内の大きな気泡（青点線）の横方向の長さ（黒点線）が徐々に減少することが分かった（図 3-11b）。図 3-11a の黒点線で示した線プロファイルから、ビデオ撮影開始から 60 秒間で横方向の長さが約 200 nm 減少していることが分かった。画像解析により、気泡の面積が $0.3 \mu\text{m}^2$ 以上減少していることが示された（図 3-11c）。これは、放射線分解により生成したガス分子が GSLC から TEM の真空チャンバー内にリークしたことを示唆している。ビデオ撮影後、GSLC 周辺のグラフェンの存在を確認するために、すぐに SAED パターンを取得した（図 3-12）。GSLC 近傍の領域からの SAED パターンとは異なり、GSLC の中央部からはグラフェンのシグナルは観察されなかった。中央部の大きな気泡上のグラフェンが、気泡の成長に伴って膨らみ、結果として SAED のシグナルが弱まった可能性がある。また、気泡領域内には、円形の強いコントラストが存在することが確認された（図 3-13）。これらのコントラストは、気泡中に独立して SiNx 膜上に存在する 0.4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の液滴であると考えられる。観察中に変形しながら融合していく様子から、大きな気泡の中心部ではグラフェンが基板と接触していないと推察される。この動きは約 1 分間観察された。孤立して存在する GSLC 内の液滴がすぐに蒸発しないことが分かり、GSLC 内の気泡は真空環境へは完全に開放されておらず GSLC として一定程度の密閉環境を維持できていると考えられる。

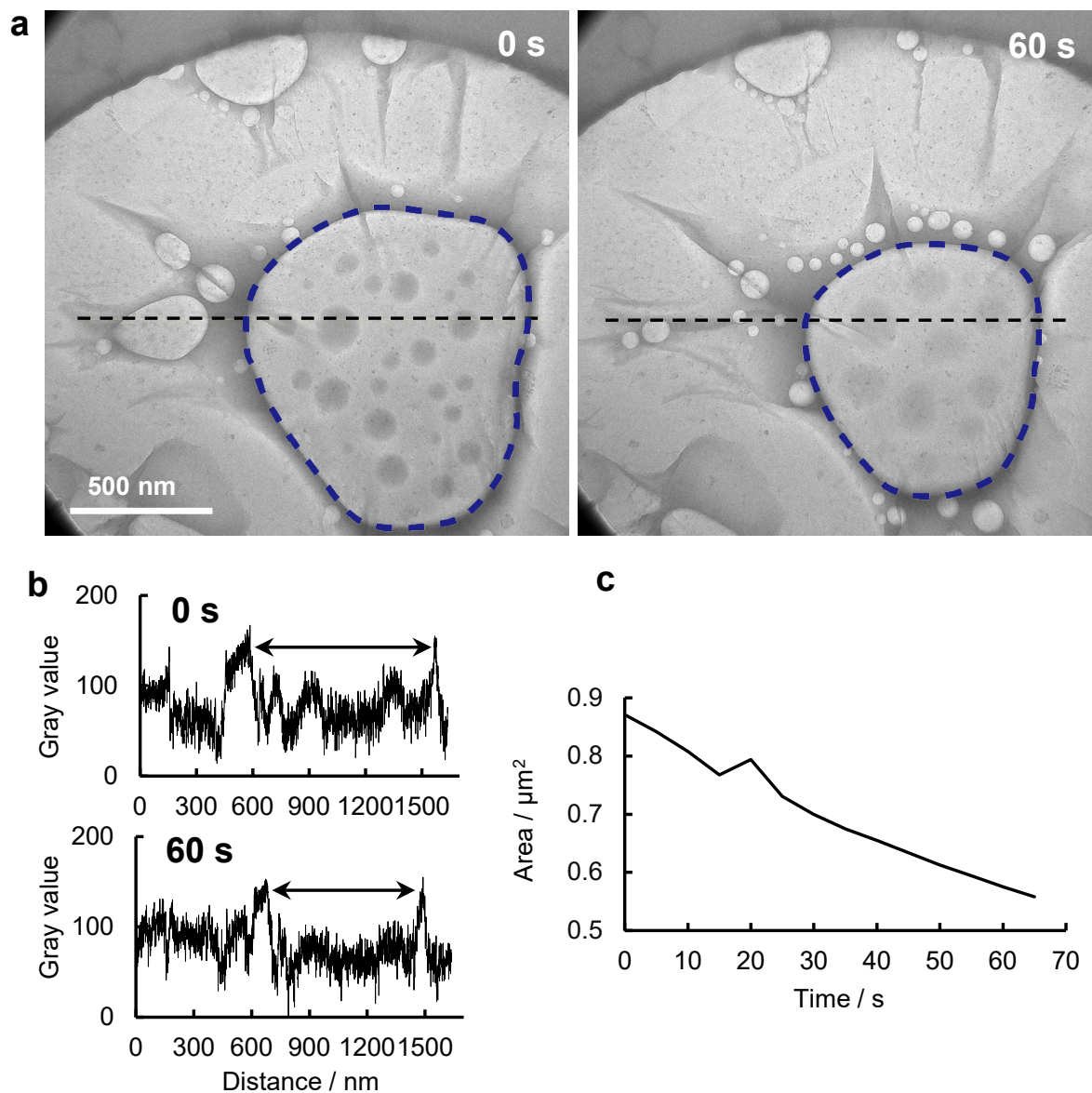


図 3-11. GSLC からのリークの評価⁵⁰。a. 0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GSLC の明視野 TEM 画像 (0 秒と 60 秒)。b. (a) における黒い点線領域の輝度プロファイル。c. 大きな気泡 (a の青い破線) の面積の時間変化。

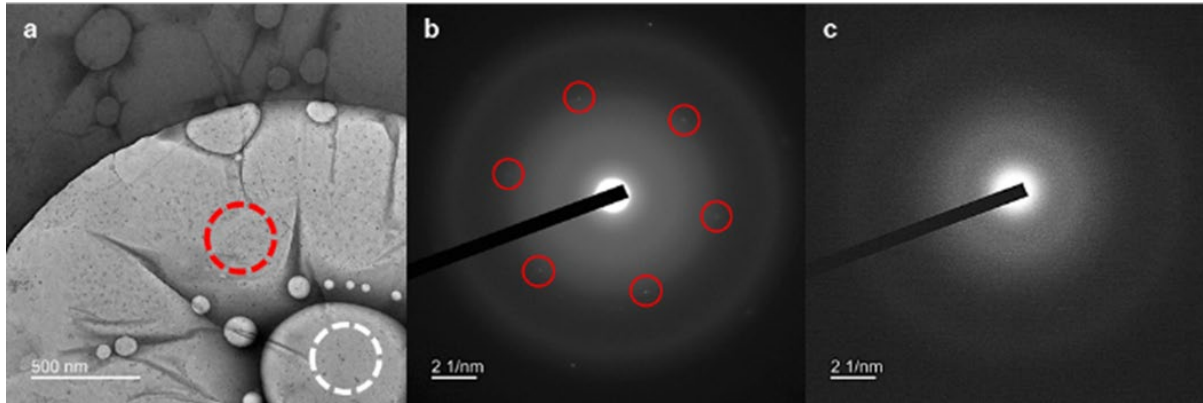


図 3-12. GSLC の周囲および表面におけるグラフェンの存在⁵⁰。a. 0.4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GSLC の明視野 TEM 画像。b. (a) の赤い点線円内の領域から得られた SAED パターン。6 回対称パターンは赤丸で強調されている。c. GSLC の中心 (a の白い点線円) から得られた SAED パターン。

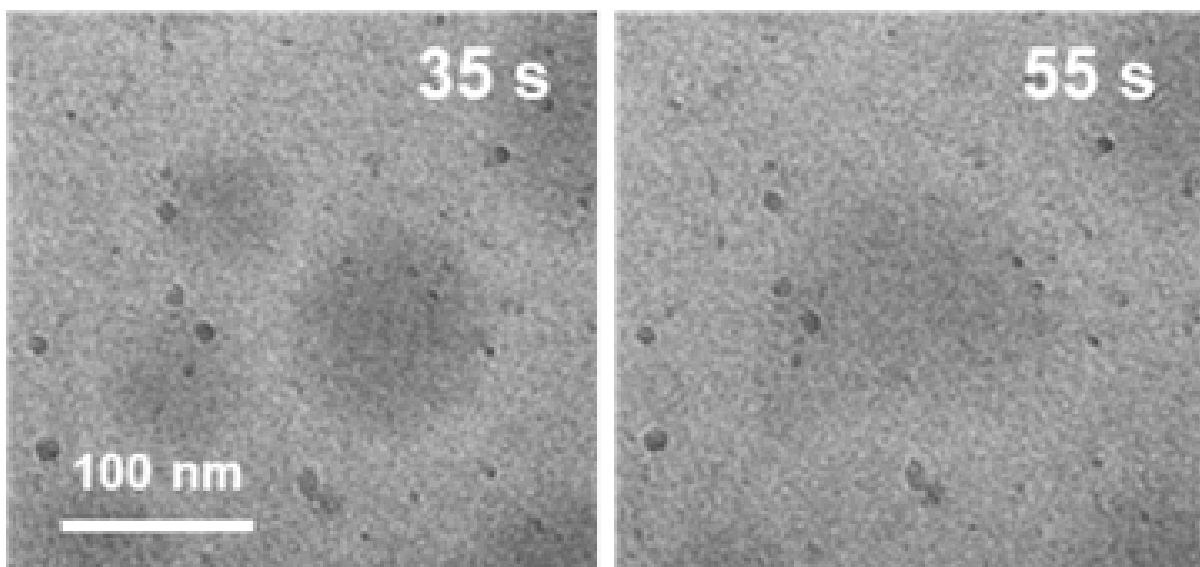


図 3-13. 図 3-11a に示した 0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GSLC 内に存在する大きな気泡 (a の青い破線) の拡大像⁵⁰。大きな気泡内に孤立して存在する液滴の融合が捉えられている。

3-4. グラフェン上に存在する欠陥

純水 GLC の再現性が著しく低いこと、また、GSLC における気泡面積の減少を結びつける可能性のある説明として、グラフェン欠陥等複数の経路を経由して、水に代表されるような揮発性の高い分子が他の分子やイオンよりも優先的にリークしたことが考えられる。ただし、グラフェンは理論的には分子のリークを許さない材料であり^{35, 36}、この事実が GLC の開発を促してきたという側面がある。一方、GLC における CaCO_3 の結晶化を直接観察した先行研究で述べられているように³⁷、実験研究においてはグラフェンの欠陥を無視することはできない。TEM 観察時におけるノックオンダメージにより生成する原子スケールでの欠陥に加え、ナノメートル以上のスケールでの内在的な欠陥がグラフェンに存在するか検証する必要がある。もしそのような欠陥が多ければ、TEM 観察の前段階であるセル作製プロセスにおいても水のような揮発性分子が容易にリークしてしまうためである。

そこで、GLC および GSLC の作製過程におけるリークを念頭に、セル作製に一般的に用いられる CVD グラフェンに内在的な欠陥が存在するか、検証した。大気条件下での GSLC からの水のリークが、光学顕微鏡で簡単に確認された（図 3-14）。まず、 -5°C の過冷却水に浮かべた ‘Free-standing’ グラフェンを、予め親水性処理した SiNx マイクロウェル TEM グリッドですくい取ってグリッドを作製した。GSLC へのトラップをより確実にするため、超純水は、粘性を高める³⁸ ために予め過冷却状態にしておいた。グリッドの作製直後に光学顕微鏡により確認したところ、グラフェンの膨らみが光の反射の変化により確認された（図 3-14a）。グリッド中央領域に過冷却水がトラップされたと考えられる。光学顕微鏡による観察をした直後、 -5°C に予冷してある冷蔵庫に TEM グリッドを静置した。一晩 -5°C で保管した後、再度光学顕微鏡による観察を行った。TEM グリッド中央部分の水または氷の大部分が消失（すなわち、グラフェンの膨らみが減少）したことが確認された（図 3-14b）。‘Free-standing’ グラフェンに内在する欠陥やより大きなスケールの亀裂を通して、あるいは、グラフェンと SiNx 膜との間の空間を通して、水がリークしたと推察される。光学顕微鏡による観察後、TEM 観察を行った。直径約 100~200 nm の円形の暗いコントラストの分布のみが示され、これは図 2-5a 全体に分布していたコントラストと類似していた（図 3-14c）。ただし電子線照射を続けても、コントラストは変化せず、気泡の発生も観察されなかった。一晩にわたりエッチング液上および過冷却水上に ‘Free-standing’ 状態で浮遊させたことにより、グラフェンの内在的な欠陥を通してグラフェンが汚染や酸化したことによりコントラストが強まったと考えた。

本研究で使用したグラフェンに内在的な欠陥が存在することを、エッチピット法³⁹で直接確認した。銅薄膜上の 6-8 層 CVD グラフェン（ACS Material, LLC; パサデナ、カリフォルニア州）表面に 10 w/v% の $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液を滴下した。30 秒後、表面を蒸留水で繰り返し洗浄した。余分な水分を除去した後、銅切片の表面を走査型電子顕微鏡（SEM; TM4000Plus、日立ハイテク、東京）で観察した。二次電子像は、加速電圧 5 kV で取得した。SEM 観察の結果、実際にエッチピットが $0.1 \text{ 個} / \mu\text{m}^2$ の密度で形成していることが確認された（図 3-15）。エッチピットから欠陥の大きさを推定することは困難であるが、この実験により、エッチング

溶液中の水分子が通過できるサイズの欠陥がグラフェン表面に多く分布していることが明らかになった。金属（銅箔に代表される）上に CVD 法で成長させたグラフェンは、GLC の先行研究のほとんどで使用されてきたが、実は欠陥が存在することが確かめられている⁴⁰。

高濃度塩水溶液 GSLC の意義は、マイクロウェルを覆うようなマイクロメートルスケールで液体がトラップできることにある。つまり、GSLC の面積（体積）が先行研究で報告されている GLC に比べて大きい。先行研究の GLC サイズ分布で最も多かったのは、液体ポケットの直径が 100~150 nm⁴¹ や、50~100 nm⁴² であった。GLC に NaCl 飽和水溶液をトラップした場合は従来型の液体セルを用いた場合と異なり、閉じ込め効果によりグラファイト様の中間相を経て六方晶の NaCl 結晶が形成することが報告されている⁴³。EELS による水のプラズモンピークの解析の結果、ナノサイズの GLC 内部圧力は 400 MPa に達することが判明している⁴⁴。原子間力顕微鏡を用いた測定でも、ナノサイズの GLC は 1~63 MPa という高い内部圧力を有することが報告されている⁴⁵。このように、ナノオーダーで閉じ込められた空間では、液体の物性はバルクとは異なる。閉じ込められた空間での挙動自体も興味深いものではあるが、それらの結果を大気圧下で通常観察されるような結晶成長ダイナミクスへと直接リンクすることは困難である。その点、マイクロメートルスケールの高濃度塩水溶液 GSLC（図 3-2）の内部圧力は、グラフェンと SiNx 膜間のファン・デル・ワールス相互作用が、グラフェン-グラフェン間よりも弱いため、緩和されていると考えられる。従来の GLC で課題となっている圧力上昇の制約を受けず、バルクの液中現象の研究に利用できる可能性がある。グラフェンの欠陥を塞ぐ技術、例えば原子層堆積法⁴⁶ と組み合わせることで水のリークを制御することが達成できれば、最終的には、希薄水溶液あるいは純水の観察にも応用されると期待される。

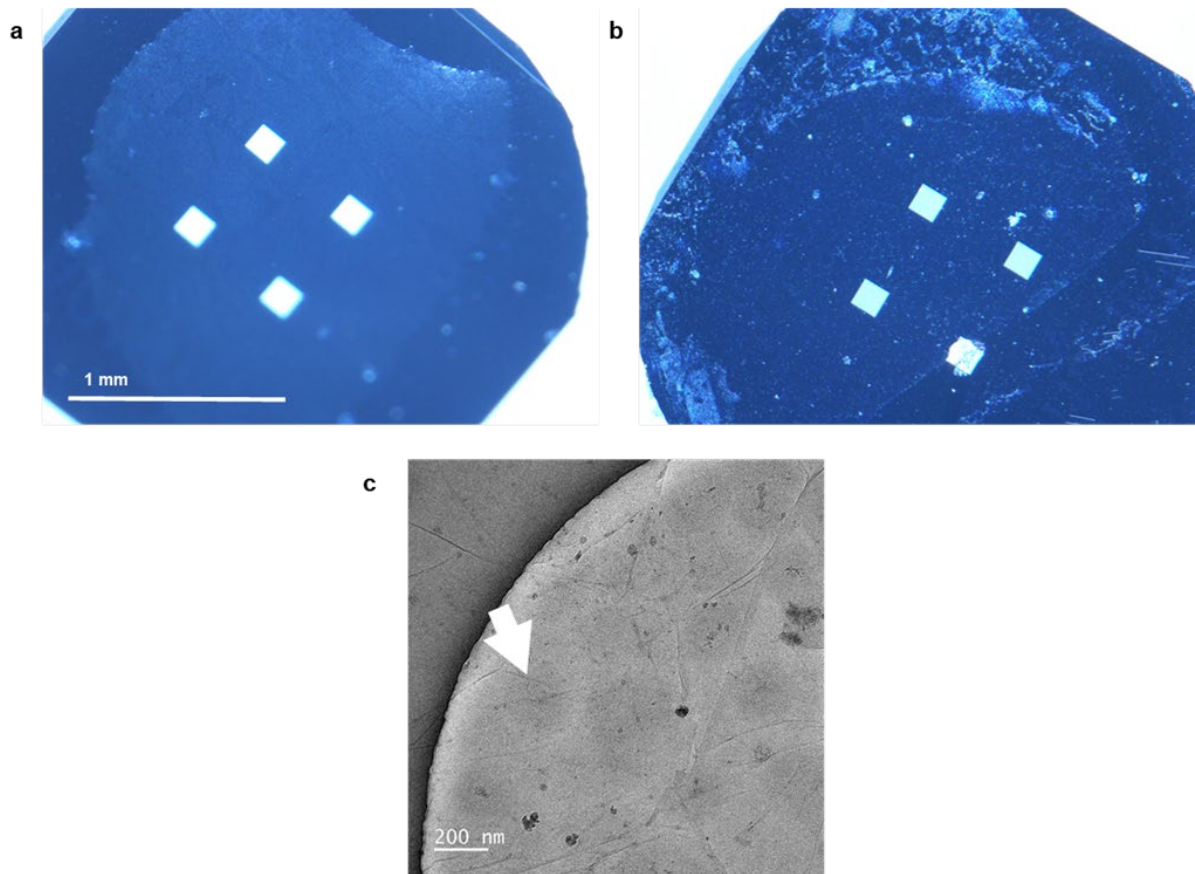


図 3-14. GSLC 作製段階における水のリーク⁵⁰。a. -5°C に過冷却した水をトラップした SiN_x マイクロウェル TEM グリッドの光学顕微鏡像。b. (a) の TEM グリッドを -5°C の冷凍庫で一晩保管した後の光学顕微鏡像。c. (b) に示した TEM グリッド中のマイクロウェルの明視野 TEM 像。円形の暗いコントラストの1つを白い矢印で示した。

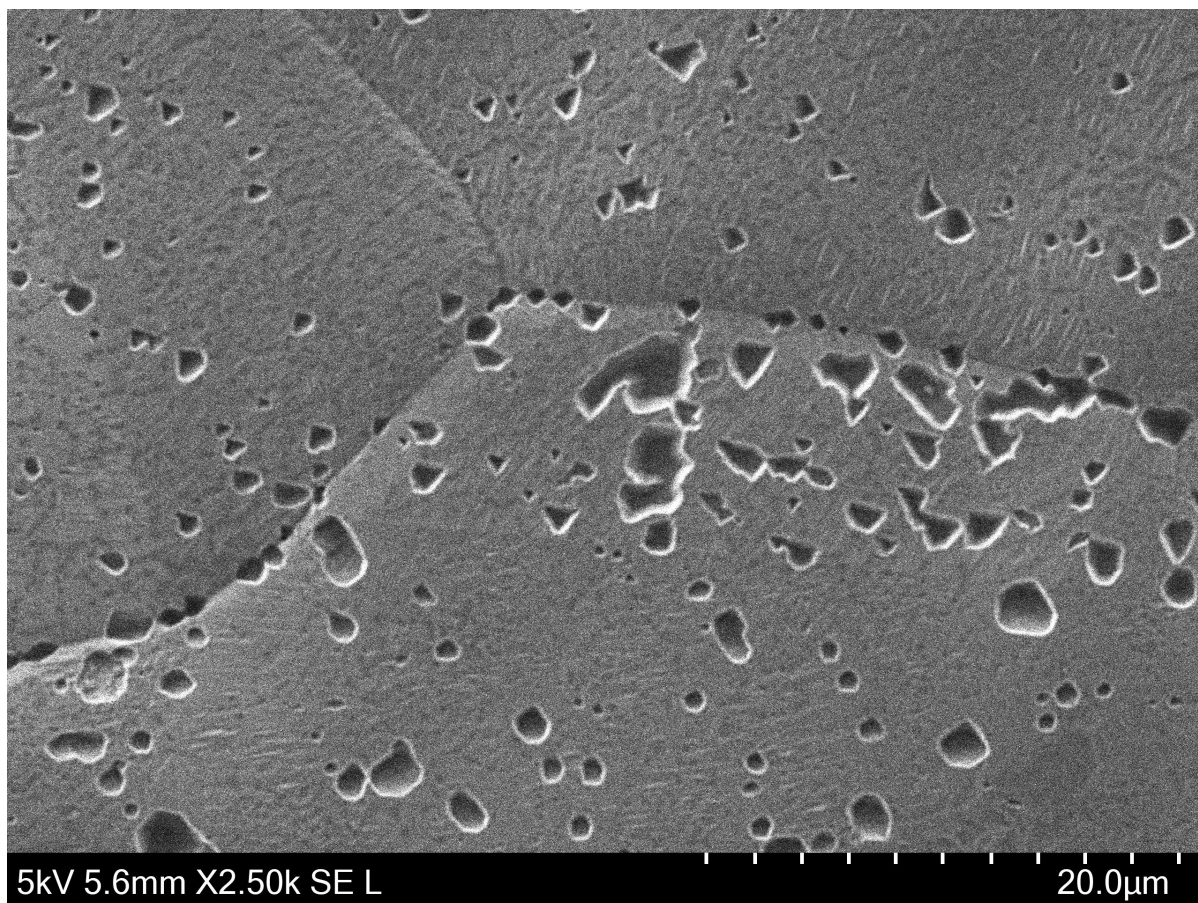


図 3-15. 銅薄膜上に形成したエッチピットの SEM 二次電子像⁵⁰。銅薄膜（グラフェンを蒸着してある側）に 10% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液を滴下後、表面を超純水で洗浄した。

3-5. 第3章の参考文献

- (19) Keskin, S.; Pawell, C.; de Jonge, N. Verification of Water Presence in Graphene Liquid Cells. *Micron* 2021, 149, 103109.
- (32) Noh, N.; Park, J.; Park, J. S.; Koo, K.; Park, J. Y.; Yuk, J. M. Lithographically Patterned Well-Type Graphene Liquid Cells with Rational Designs. *Lab Chip* 2020, 20 (15), 2796-2803, DOI: 10.1039/d0lc00440e.
- (33) Buseck, P. R.; Pósfai, M. Airborne Minerals and Related Aerosol Particles: Effects on Climate and the Environment. *Proc National Acad Sci* 1999, 96 (7), 3372-3379, DOI: 10.1073/pnas.96.7.3372.
- (34) Massover, W. H. Electron Beam-Induced Radiation Damage: The Bubbling Response in Amorphous Dried Sodium Phosphate Buffer. *Microsc Microanal* 2010, 16 (3), 346-357, DOI: 10.1017/s1431927610000140.
- (35) Bunch, J. S.; Verbridge, S. S.; Alden, J. S.; Zande, A. M. van der; Parpia, J. M.; Craighead, H. G.; McEuen, P. L. Impermeable Atomic Membranes from Graphene Sheets. *Nano Lett* 2008, 8 (8), 2458-2462, DOI: 10.1021/nl801457b.
- (36) Sun, P. Z.; Yang, Q.; Kuang, W. J.; Stebunov, Y. V.; Xiong, W. Q.; Yu, J.; Nair, R. R.; Katsnelson, M. I.; Yuan, S. J.; Grigorieva, I. V.; Lozada-Hidalgo, M.; Wang, F. C.; Geim, A. K. Limits on Gas Impermeability of Graphene. *Nature* 2020, 579 (7798), 229-232, DOI: 10.1038/s41586-020-2070-x.
- (37) Dae, K. S.; Chang, J. H.; Koo, K.; Park, J.; Kim, J. S.; Yuk, J. M. Real-Time Observation of CaCO₃ Mineralization in Highly Supersaturated Graphene Liquid Cells. *Acs Omega* 2020, 5 (24), 14619-14624, DOI: 10.1021/acsomega.0c01300.
- (38) Zwolinski, B. J.; Eicher, L. D. High-Precision Viscosity of Supercooled Water and Analysis of the Extended Range Temperature Coefficient. *J Phys Chem* 1971, 75 (13), 2016-2024, DOI: 10.1021/j100682a019.
- (39) Kwak, J.; Kim, S.; Jo, Y.; Kim, N. Y.; Kim, S. Y.; Lee, Z.; Kwon, S. Unraveling the Water Impermeability Discrepancy in CVD-Grown Graphene. *Adv. Mater.* 2018, 30 (30), 1800022, DOI: 10.1002/adma.201800022.
- (40) O' Hern, S. C.; Stewart, C. A.; Boutilier, M. S. H.; Idrobo, J.-C.; Bhaviripudi, S.; Das, S. K.; Kong, J.; Laoui, T.; Atieh, M.; Karnik, R. Selective Molecular Transport through Intrinsic Defects in a Single Layer of CVD Graphene. *Acs Nano* 2012, 6 (11), 10130-10138, DOI: 10.1021/nn303869m.
- (41) Deursen, P. M. G.; Koning, R. I.; Tudor, V.; Moradi, M.; Patterson, J. P.; Kros, A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Koster, A. J.; Schneider, G. F. Graphene Liquid Cells Assembled through Loop-Assisted Transfer Method and Located with Correlated Light-Electron Microscopy. *Adv Funct Mater* 2020, 30 (11), 1904468, DOI: 10.1002/adfm.201904468.
- (42) Yuk, J. M.; Zhou, Q.; Chang, J.; Ercius, P.; Alivisatos, A. P.; Zettl, A. Real-Time Observation of Water-Soluble Mineral Precipitation in Aqueous Solution by In Situ High-Resolution Electron Microscopy. *ACS Nano* 2016, 10 (1), 88-92, DOI: 10.1021/acsnano.5b04064.

- (43) Wang, L.; Chen, J.; Cox, S. J.; Liu, L.; Sosso, G. C.; Li, N.; Gao, P.; Michaelides, A.; Wang, E.; Bai, X. Microscopic Kinetics Pathway of Salt Crystallization in Graphene Nanocapillaries. *Phys. Rev. Lett.* 2021, 126 (13), 136001, DOI: 10.1103/physrevlett.126.136001.
- (44) Ghodsi, S. M.; Sharifi-Asl, S.; Rehak, P.; Král, P.; Megaridis, C. M.; Shahbazian-Yassar, R.; Shokuhfar, T. Assessment of Pressure and Density of Confined Water in Graphene Liquid Cells. *Adv Mater Interfaces* 2020, 7 (12), 1901727, DOI: 10.1002/admi.201901727.
- (45) Hirokawa, S.; Teshima, H.; Solís-Fernández, P.; Ago, H.; Li, Q.-Y.; Takahashi, K. Random but Limited Pressure of Graphene Liquid Cells. *Ultramicroscopy* 2023, 250, 113747, DOI: 10.1016/j.ultramicro.2023.113747.
- (46) O' Hern, S. C.; Jang, D.; Bose, S.; Idrobo, J.-C.; Song, Y.; Laoui, T.; Kong, J.; Karnik, R. Nanofiltration across Defect-Sealed Nanoporous Monolayer Graphene. *Nano Lett* 2015, 15 (5), 3254-3260, DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00456.
- (50) Yashima, Y.; Yamazaki, T.; Kimura, Y. Micrometer-Scale Graphene-Based Liquid Cells of Highly Concentrated Salt Solutions for In Situ Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy. *ACS Omega* 2024, 9, 39914-39924.

第4章 結論

4-1. 総括・今後の展望

第2章では、まず先行研究で報告されている純水 GLC の再現実験を行った。TEM グリッドにグラフェンを転写し、グラフェン同士を向かい合わせた。グラフェン間に水のトラップを意図したが、純水 GLC は形成せず先行研究の再現はできなかった。グラフェン膜の変形を促すために 'Free-standing' グラフェンを用いて GLC を作製したところ、先行研究で報告された例に類似する GLC の形成が確認された。さらに、SiNx マイクロウェル TEM グリッドを導入し、トラップ空間の形状と体積をコントロールできるようにした。しかし純水 GLC の作製を意図しても、依然として GLC の形成は確認されなかった。稀にグリッドの一部で GLC が形成したため、253.8 K への冷却実験を行った。トラップされた液体が水であれば氷が形成すると予想した。実際には、生成した結晶は硫酸アンモニウム結晶と同定された。稀に形成する GLC にトラップされている液体は、純水や希薄水溶液ではなく、エッチング液のコンタミを主成分とする高濃度塩水溶液であることが判明した。

第3章では、第2章の結果を逆にとり、高濃度塩水溶液であれば再現性高く GLC としてトラップできることを発見した。エッチング液に加え、類似組成である $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液についても、大面積 GLC の形成を確認した。GLC としての再現性及び安定性が高く、気泡の動態を数秒単位で高空間分解能観察することが可能となった。一方で、高濃度塩水溶液は乾燥状態でも局所的に発泡して液体状態に似た振舞いを見せたため、GLC として液体が本当にトラップされているかは慎重な議論が必要である。さらに、過冷却水 GLC の体積減少、及び $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 GLC における気泡面積の減少から、セルの作製過程から TEM 観察過程に至るまで複数の過程を経由して、水分子がリークしていることを確認した。エッチピット法を用いて、GLC 作製に用いられることが多い CVD グラフェンには内在的な欠陥が存在することを確認した。

本研究では、高空間分解能な液中観察環境を再現性高く実現する GLC の作製条件を発見した。高濃度塩水溶液 GLC とは対照的に、先行研究で報告されてきたような純水 GLC の再現性は著しく低く独自の冷却実験とエッチピット法により、GLC からの水のリークについて問題提起した。今後セル作製過程から TEM 観察過程に至るまでの水のリーク経路を遮断することができれば、高濃度塩水溶液環境のみならず、希薄水溶液または純水という液中環境を高空間分解能観察できるようになると期待される。

謝辞

北海道大学低温科学研究所の木村勇氣教授、山崎智也准教授には、多数の御助言、多大な御指導、御協力を頂き、本論文をまとめることができました。深く感謝の意を表します。上記の先生方に加えて、北海道大学低温科学研究所の渡部直樹教授、佐崎元教授、そして日高宏助教には御多忙の中、本論文の審査をお引き受け頂きました。篤く御礼申し上げます。木村教授、山崎准教授、渡辺教授、日高助教に加えて、北海道大学低温科学研究所の大場康弘准教授、柘植雅士助教には、日頃の研究室活動におきまして沢山の御助言を頂きました。東京工業大学（当時）の岡田哲男教授には、修士課程における研究内容の論文化に関して大変お世話になりました。心より感謝いたします。北海道大学低温科学研究所の谷口玲子氏、中村明子氏には研究遂行にあたり数多くのご支援を頂きました。北海道大学低温科学研究所（当時）の石橋篤季氏には数多くの御助言を頂きました。誠にありがとうございます。平川静氏、中埜夕希氏、酒井貫志氏には、低温ナノ物質科学グループのメンバーとして、多くの御協力を頂きました。査読論文投稿のみならず学位取得までこぎつけましたのは、木村教授、山崎准教授、平川氏、酒井氏はもとより、研究室外で長きにわたり支えてくださった M. K. 氏をはじめとし、M. T. 氏、K. M. 氏、Y. I. 氏、そして病院関係者の皆様と家族のおかげです。深く感謝申し上げます。

関連論文

Micrometer-Scale Graphene-Based Liquid Cells of Highly Concentrated Salt Solutions for In Situ Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy

Yuga Yashima, Tomoya Yamazaki, and Yuki Kimura

ACS Omega **9**, 38, 39914–39924 (2024)

Micrometer-Scale Graphene-Based Liquid Cells of Highly Concentrated Salt Solutions for In Situ Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy

Yuga Yashima, Tomoya Yamazaki, and Yuki Kimura*



Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 39914–39924



Read Online

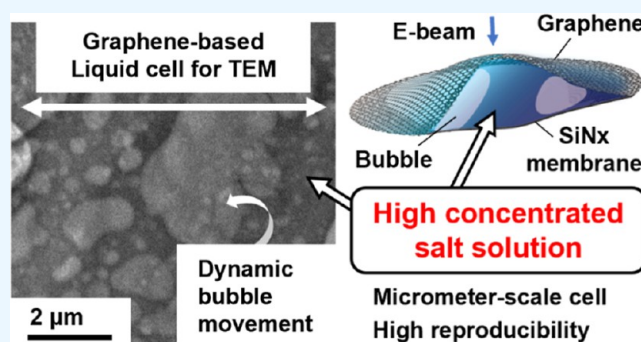
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: In situ liquid-cell transmission microscopy has attracted much attention as a method for the direct observations of the dynamics of soft matter. A graphene liquid cell (GLC) has previously been investigated as an alternative to a conventional SiN_x liquid cell. Although GLCs are capable of scavenging radicals and providing high spatial resolutions, their production is fundamentally stochastic, and a significant compositional change in liquids encapsulated in GLCs has recently been pointed out. We found that graphene-based liquid cells were formed in nano- to micrometer sizes with high reproducibility when the concentration of the encapsulated aqueous salt solution was high. In contrast, when we revisited conventional fabrication methods, water-encapsulated GLC was formed with low yield, and any electron diffraction spots from ice were not confirmed by a cooling experiment. The reason for this was the presence of intrinsic defects in the graphene, the presence of which we confirmed by the etch-pit method. The shrinkage of a water-encapsulated cell and a decrease in the bubble area in an aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution cell suggested that volatile water molecules and gas molecules can leak from the cells during the fabrication and observation processes. Further revision of the conditions for the formation of liquid cells and a reduction in the number of intrinsic graphene defects are expected to lead to the provision of graphene-based liquid cells capable of encapsulating dilute aqueous solutions or pure water.



INTRODUCTION

The direct observation of liquid samples by transmission electron microscopy (TEM) is a powerful way to understand various phenomena in the field of crystal growth, such as nucleation, crystallization, dissolution, movement of particles, or bubbling. Many researchers have shown interest in the microscopic dynamics of these phenomena at scales as small as the nanometer range.^{1–3} TEM requires specimens under vacuum conditions because of the use of an electron beam as a probe. Consequently, thin films capable of transmitting an electron beam must be used to prevent the evaporation of the liquid sample into the TEM chamber.

The use of an amorphous silicon nitride (SiN_x) film permits the observation of many interesting phenomena in liquid by using TEM.^{4–7} Although it is commercially well developed, this technique has some experimental limitations in achieving sufficiently high spatial resolutions to capture microscopic phenomena. SiN_x liquid cells bulge due to the high vacuum present in the TEM chamber, and the observable area of appropriate thickness is limited to the edge of the SiN_x window.⁸ Additional pumping systems should be used to suppress the bulge by applying negative pressure at the outlet.^{9,10} Also, the general thickness of commercial SiN_x films is about 50 nm.

Decreasing the thickness requires a decrease in the observable area of the film or more-technical development to avoid film breakage.¹¹

Graphene, which consists of a planar hexagonal network of carbon atoms, is an alternative material for thin films for liquid cells. In 2012, Yuk and co-workers proposed a graphene liquid cell (GLC) as an alternative to the conventional SiN_x liquid cell.¹² A GLC can be fabricated by encapsulating a liquid between two sheets of graphene or between a sheet of graphene and another substrate such as a SiN_x membrane.^{13–15} Graphene has a high transparency to electrons and is mechanically tough; moreover, it is capable of scavenging radicals formed through radiolysis by the electron beam. The factors permit the achievement of higher spatial resolutions than those attainable with a SiN_x liquid cell.¹⁶ Furthermore, graphene has attracted

Received: June 12, 2024

Revised: August 26, 2024

Accepted: September 6, 2024

Published: September 12, 2024



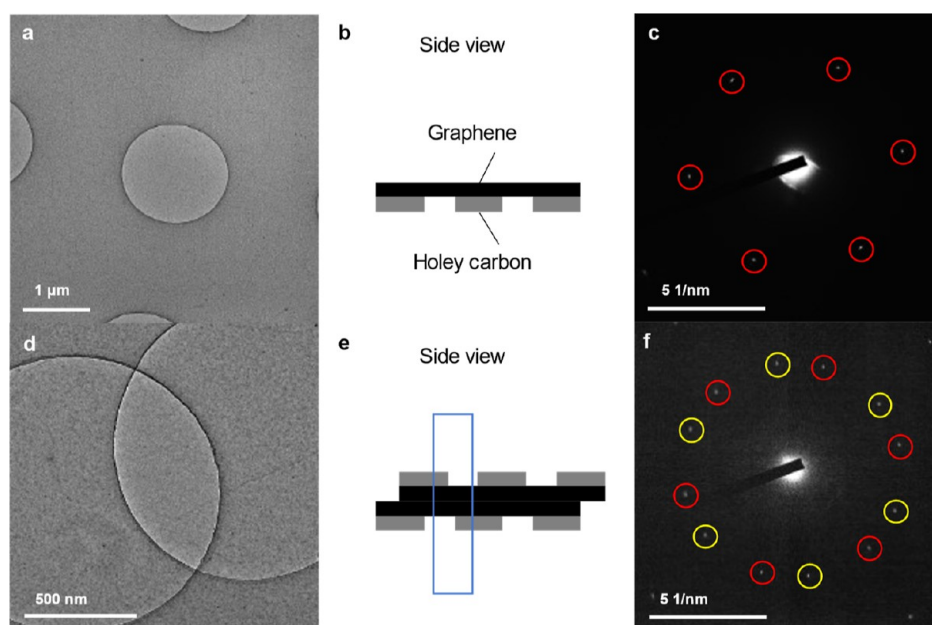


Figure 1. Attempts to form a GLC by the conventional method. (a) A bright-field TEM image of a holey carbon grid on which graphene was transferred. (b) Schematic illustration of a side view of (a). (c) SAED pattern acquired from the holey area of (a): a 6-fold symmetric pattern is highlighted by the red circles. (d) Bright-field TEM image of a GLC without water fabricated by the conventional method. The grids were fabricated by placing two graphene sheets facing each other and attempting to sandwich droplets of pure water (Supporting Information; Figure S1a). (e) Schematic illustration of a side view of (d); the region in the blue dotted square corresponds to the area of (d). (f) SAED pattern acquired from the crossing area of d: two sets of 6-fold symmetric patterns are highlighted by the red and yellow circles.

particular attention as a soft-matter encapsulation material for liquid cell-TEM (LC-TEM).^{17,18}

Although GLCs have considerable advantages for the direct observation of targets in liquids at atomic resolutions, they require a careful examination of the components of the liquid that are encapsulated in the GLC. It is necessary to take care to verify the presence of water in a GLC, and the most reliable method for doing so is to check for the presence of a water excitation peak by electron energy-loss spectroscopy (EELS).¹⁹ An EELS study recently pointed out the solute concentration effect of GLCs.²⁰ Aqueous CeCl_3 solution encapsulated in the GLC becomes significantly concentrated, with a cerium-to-oxygen ratio approaching that of the hydrated salt $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

The aim of our research was to explore the microscopic dynamics of a dilute aqueous solution by direct observation. Our representative target was to capture the nucleation and crystallization of ice from pure liquid water or from a dilute solution. Although the formation of cubic ice in a GLC has been reported,²¹ Zhou et al. have suggested that this might have been due to salt contamination.²² It has been recently shown, however, that cubic ice does form on a TiO_2 crystal in a GLC; in this case, the TiO_2 crystal acts as a scavenger for generated radicals.²³ Although an ice Ih fraction has been captured from its oxygen peak in EELS,²⁴ to the best of our knowledge there has been no report of ice Ih formation in a GLC.

In this study, we revisited the previously reported method for the fabrication of GLCs with the aim of fabricating those of pure water free of contamination originating from the etchant used in the production of the graphene sheet. Unlike the case of water, GLCs of concentrated etchant and solutions of similar composition form at a micrometer scale, which is larger than that of previously reported GLCs. The observation of a decrease in the bubble area in a GLC and an etch-pit experiment suggested to us that focusing on defects in the graphene might be

a key to exploiting GLCs in studies on the chemistry of dilute solutions and pure water.

RESULTS AND DISCUSSION

Attempting a Fabrication of GLCs with Pure Water by the Conventional Method. Most previously reported GLCs were fabricated by encapsulating liquid between two sheets of graphene.²⁵ Following this method, we transferred a sheet of graphene onto a holey carbon TEM grid (Figure 1a,b), and we confirmed the presence of a 6-fold symmetry in the selected area electron diffraction (SAED) pattern from a holey area (Figure 1c), confirming that the graphene had been successfully suspended on the TEM at a micrometer scale without any folding or wrinkling. An attempt was made to fabricate a GLC of pure water by placing a drop of pure water on the graphene sheet and sandwiching it with a second graphene sheet on a holey carbon TEM grid [Figure 1d,e, and Supporting Information Figure S1a]. We expected that a strong contrast due to the encapsulated water between the two sheets of graphene would appear but, in fact, no such contrast could be observed.

It is well-known that water readily undergoes radiolysis on electron irradiation, producing species such as hydrated electrons (e_{h}^-), H , OH , H_3O^+ , and HO_2 , resulting in the production of hydrogen and oxygen molecules.²⁶ In the present study, no bubbles were formed, even on increasing the electron dosage. To confirm the presence of graphene itself, the SAED pattern (Figure 1f) was recorded from the area where the two circles intersected in Figure 1d. Each of the two circles in Figure 1d corresponds to a holey area of one of the TEM grids, meaning that only a layer of graphene was expected to be present. The SAED pattern clearly showed two sets of 6-fold symmetries (the red and yellow circles in Figure 1f), suggesting that two sheets of graphene faced each in a planar manner without encapsulating any water. A low mag image of the TEM grid (Supporting

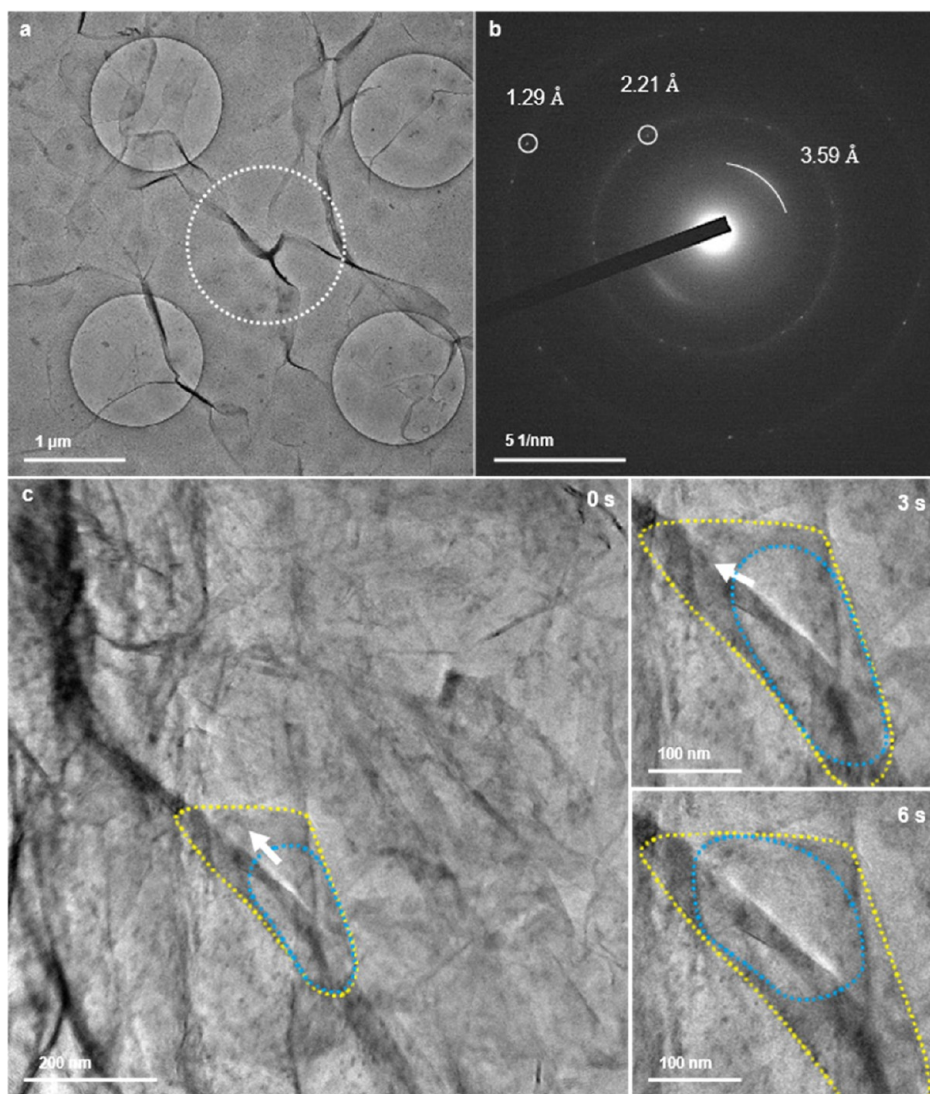


Figure 2. Attempts to form a GLC by the free-standing method. The grids were fabricated by the method shown in Supporting Information, Figure S1b. (a) Bright-field TEM image of a holey carbon grid with a free-standing graphene sheet, observed at 80 K. (b) SAED pattern acquired from the dotted circle area in (a). (c) Snapshots of the bright-field TEM images of a GLC in folded graphene encapsulating displaced water from the etching solution at 0, 3, and 6 s. The yellow and blue dotted lines are guides for the GLC and the bubble inside it, respectively. The direction of movement of the bubble is indicated by white arrows. The full video is available as Supporting Information Video S1.

Information; Figure S2) excludes a gradual change in contrast that was not significant in Figure 1d. We attempted this procedure more than ten times, each time observing the entire TEM grid, but we did not observe any encapsulation of water.

Fabrication of GLCs by the “Free-Standing” Method. To facilitate the encapsulation of water, we modified the method for fabricating the GLCs by introducing “free-standing” graphene on the surface of the water. In this context, “free-standing” means not being supported by any substrate, such as a carbon TEM grid, before encapsulation. We hoped that the “free-standing” condition would allow the graphene to bend and wrinkle to wrap around the water. In this case, the free-standing graphene floating on the water was directly scooped onto a holey-carbon TEM grid on which graphene had already been transferred (Supporting Information; Figure S1b). After fabrication, the grid was observed at 80 K in the hope of easier detection of the water from diffraction contrasts (Figure 2a). The solubility in water of gas molecules generated by radiolysis increases at lower temperatures, a process that is thought to

suppress the formation of bubbles. The darker contrasts that could be identified as bending, wrinkling, or folding of the planar sheet of graphene were spread over the whole carbon grid, unlike those in Figure 1d, in which both sheets of graphene were transferred onto the grid in advance. Circular dark contrasts of approximately 100–200 nm in diameter were also distributed across the grid.

To confirm the encapsulation of water in the strong contrast area, a SAED pattern (Figure 2b) was acquired from the area defined by the dotted circle in Figure 2a. The pattern consisted of 6-fold symmetric patterns at 1.29 and 2.21 Å from graphene, and a blurry halo-like diffraction at 3.59 Å. It has previously been shown that the van der Waals thickness of two to four layers of graphene is 3.70 Å and that the (0 0 2) spacing of graphite shrinks to 3.36 Å.²⁷ This is in good agreement with our result, because we used thicker graphene with six to eight layers for the fabrication of GLCs by our “free-standing” method. No diffractions associated with crystalline or amorphous ice were observed. Even after the specimen was warmed to room

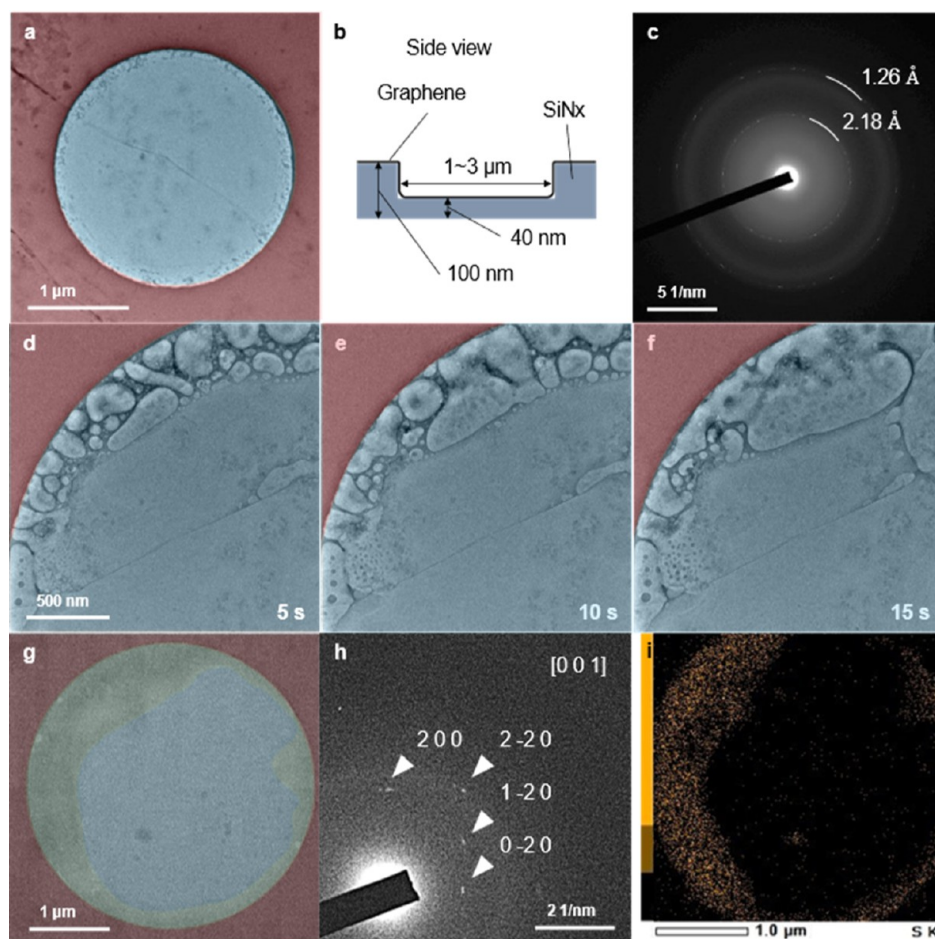


Figure 3. Attempts to form a GSLC encapsulating water. The grid was fabricated by the method shown in Supporting Information, Figure S1c. (a) Bright-field TEM image of GSLCs after attempts to encapsulate displaced water from the etching solution. The circular area (blue) and the surrounding area (red) had thicknesses of 40 and 100 nm, respectively. (b) Schematic illustration of a side view of (a). (c) SAED pattern acquired from the blue area of (a). (d–f), Snapshots of the bright-field TEM image of the GSLC showing the formation and movement of bubbles at 5, 10, and 15 s. The full video is available as Supporting Information Video S2. (g) Bright-field TEM image of a large-area GSLC on a SiN_x microwell grid cooled at 253.8 K. The frozen GSLC is highlighted in yellow. (h) the corresponding SAED pattern for the GSLC in (g). The diffraction spots (white arrowheads) were attributed to crystalline ammonium sulfate from [001] (AMCSD code: 0012987). (i) STEM–EDS mapping of sulfur corresponding to (g). The mapping is rotated 20° counterclockwise relative to (g). See Supporting Information, Figure S4 for the full EDS images and the spectrum.

temperature, the TEM contrast did not change significantly, and no emergence of bubbles was observed on increasing the electron-beam intensity, suggesting that water was not encapsulated in this area. The circular contrasts in Figure 2a could be any contamination or oxidation of the graphene due to the overnight free-standing treatment of graphene on solutions during fabrication, requiring further elemental analysis.

Although most of our experiments with pure water resulted in no crumpling of the graphene (Figure 1d) or no encapsulation of any liquid (Figure 2a), a few GLCs with bubbles that resembled those previously were found on the holey carbon TEM grid (Figure 2c). Free-standing graphene on water was scooped by the holey carbon TEM grid (Supporting Information; Figure S1b). The holey carbon sheet on which we planned to transfer the graphene transferred was partially broken for some mechanical reason during the procedure. As a result, this permitted the graphene to fold and roll up, with encapsulation of the solution. A bubble which had a brighter contrast (the blue dotted line in Figure 2c) existed inside the strip-shaped GLC shown by the yellow dotted line in Figure 2c. The bubble could have been produced by radiolysis of the liquid in the GLC or precipitation of dissolved gases. Under electron-beam irradi-

ation, the bubble moved upward inside the GLC during 0–6 s (Figure 2c), and then gradually expanded downward after 28 s, following an increase in the electron dose rate at 26 s, suggesting the presence of liquid around the bubble (Supporting Information; Video S1). Although cooling experiments were conducted for easier detection of water as ice, the presence of GLC-encapsulated water displaced from the etching solution could be confirmed from the bubble's movement at room temperature without the cooling. The displaced water was encapsulated by the accidental folding and rolling up of graphene, but this technique cannot be used for the controlled production of water-encapsulated GLCs.

Attempts to Form a Graphene–SiN_x Liquid Cell by a Free-Standing Method. Some attempts have been made to produce GLCs with a controlled geometry by introducing a spacer between two sheets of graphene^{28,29} or by obtaining a certain volume with a microwell grid.^{15,30} We designed a graphene–SiN_x liquid cell (GSLC) (Supporting Information; Figures S1c–e) with a SiN_x microwell TEM grid (Norcada Inc., Edmonton; Supporting Information Figure S3). The grid had circular microwells of diameters 1, 2, or 3 μm and a depth of 60 nm, permitting the formation of a volume for a GSLC along the

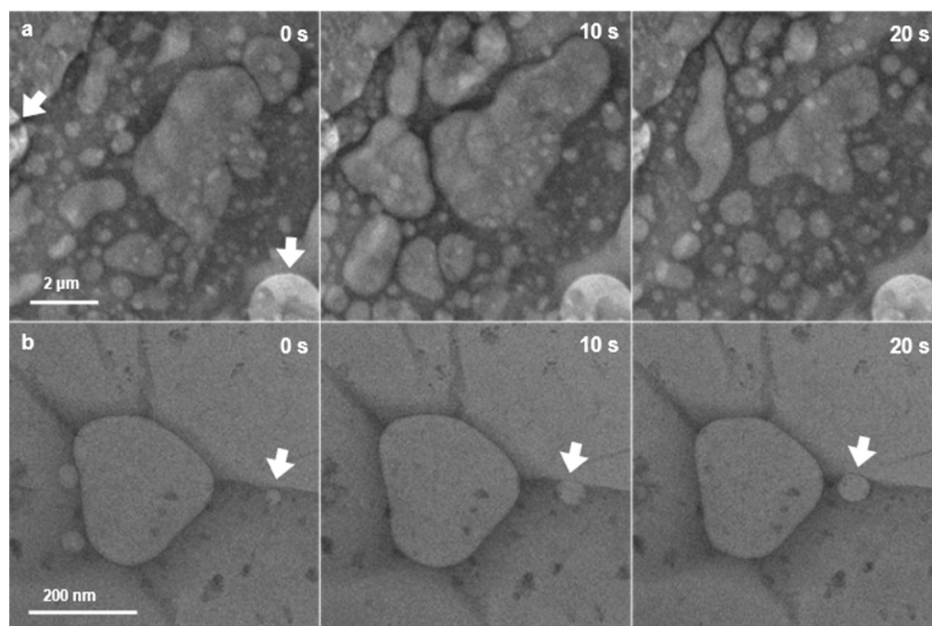


Figure 4. Fabricated GSLCs at a micrometer-to-submicrometer scale. (a) Series of bright-field TEM images of a GSLC of an etching solution on a SiN_x microwell grid at 0, 10, and 20 s. The full video is available as Supporting Information [Video S3](#). The 60 nm-deep microwells are indicated by white arrows. The grid was fabricated by the method shown in the Supporting Information, [Figure S1d](#). (b) A series of bright-field TEM images of a GSLC of a 0.4 M aqueous (NH₄)₂SO₄ solution in a SiN_x microwell at 0, 10, and 20 s. The bubble tracked in Supporting Information, [Figure S5b](#) is indicated by white arrows. The full video is available as Supporting Information [Video S4](#). The grid was fabricated by the method shown in Supporting Information, [Figure S1e](#).

wall of the microwell. Graphene was used on one side only in the GSLCs to make it easier to discuss the ability of graphene to encapsulate liquids, water-leak-proof SiN_x membrane on the other side.

Free-standing graphene floating on the water displaced from the etching solution was directly scooped up by the microwell grid ([Figure 3a,b](#) and Supporting Information, [Figure S1c](#)). No bubble formation, which indicates the presence of water, was found in the grid; only graphene wrinkles crossing the image were observed. Those signatures remained unchanged and no bubbles were observed, even on increasing the intensity of the electron beam. This result is similar to that obtained by using the conventional and the free-standing fabrication methods. SAED patterns ([Figure 3c](#)) acquired from the well area ([Figure 3a](#)) showed the diffraction pattern of graphene and a hollow pattern from the SiN_x membrane at the bottom of the microwell grid (Supporting Information; [Figure S3](#)).

Encapsulation of a liquid in a GSLC with bubbles was observed only once in nine similar experiments ([Figure 3d–f](#) and Supporting Information; [Video S2](#)). The bubbles produced as a result of radiolysis moved around and merged along the microwell. After repeating these experiments for the GSLCs, we succeeded in fabricating a second GSLC along the wall of the microwell ([Figure 3g](#)). The GSLC was cooled to 253.8 K with a Peltier-cooled TEM holder.³¹ A strong contrast (the yellow area in [Figure 3g](#)) confirmed a distribution of the GSLC along the 60 nm-high round-shape wall (the red area in [Figure 3g](#)). An acquired SAED pattern from the yellow area ([Figure 3h](#)) did not correspond to water ice but, instead, was attributed to the [0 1 0] SAED pattern of crystalline ammonium sulfate (AMCSD code: 0012987). Bubble formation due to radiolysis was suppressed by an increase in the solubility of the gas molecules due to the cooling, permitting elemental mapping by energy-dispersive X-ray spectroscopy–scanning transmission electron microscopy

(EDS–STEM). This mapping showed a broad distribution of not only oxygen, but also sulfur, along the microwell ([Figure 3i](#); see Supporting Information; [Figure S4](#) for a full EDS mapping and the corresponding spectrum). No SAED signals from ice were acquired at any stage of the cooling experiment. This does not exclude the possibility of ice crystallization at temperatures lower than 253.8 K, i.e., the presence of water could be allowed due to unique thermodynamics of water trapped between the thin films. Further cooling experiments with lower freezing temperatures are needed to discuss the presence of water in the GSLC. Although, the presence of a significant amount of crystalline ammonium sulfate, even after the etching solution had been carefully displaced by pure water, prompted us to carefully examine the compositions of the encapsulated liquids in the GLC ([Figure 2c](#)) and GSLC ([Figure 3d](#)).

Encapsulation of Highly Concentrated Aqueous Solutions in GSLCs with High Reproducibility. Next, we examined direct scooping by the SiN_x microwell TEM grid of the etching solution under free-standing graphene to fabricate GSLCs of the etching solution (Supporting Information; [Figure S1d](#)). As a result, we observed a successful encapsulation of the etching solution in the GSLCs with a high reproducibility ([Figure 4a](#)). The GSLCs even spread out over the area of a 100 nm-thick SiN_x membrane, although we initially intended to encapsulate the etching solution inside the circular SiN_x microwell (the white arrow in [Figure 4a](#)), which shows a brighter contrast due to the lower thickness (40 nm) of the SiN_x membrane. It was easily confirmed from snapshots of the GSLCs at 0, 10, and 20 s that the GSLC had an area significantly larger than 10 μm². The area was roughly assessed from the extent to which bubbles moved around (see Supporting Information, [Video S3](#) for the full time range). Those bubbles were considered to have emerged and moved as a result of irradiation by the electron beam. Those GSLCs of a micrometer scale were

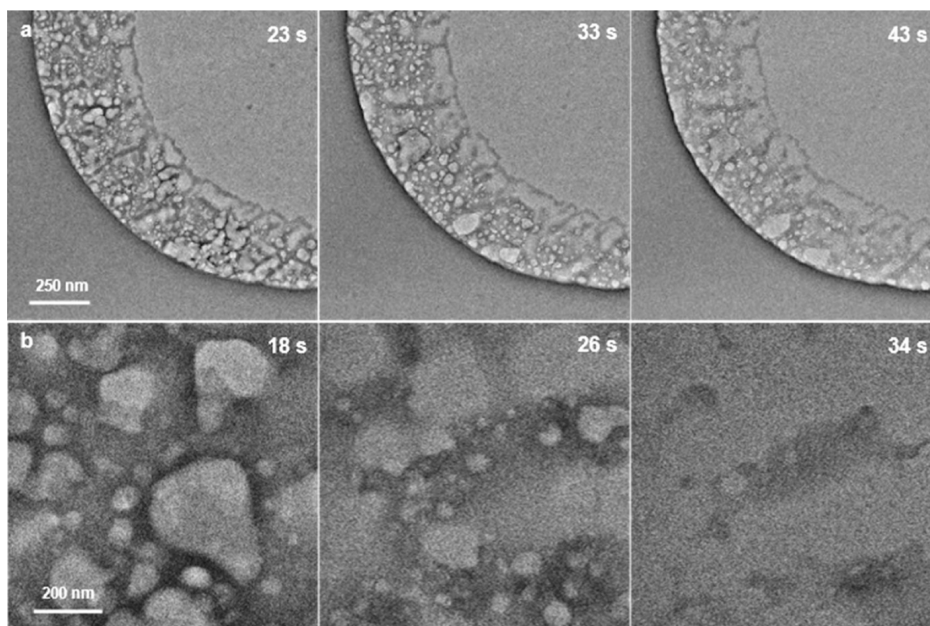


Figure 5. Bubbling and liquid-like behavior of solutions in an open system. (a) Series of bright-field TEM images of ten-times-diluted etching solution at 23, 33, and 43 s. The full video is available as Supporting Information [Video S5](#). (b) Series of bright-field TEM images of 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution at 18, 26, and 34 s. The solution was simply dropped onto a SiN_x microwell TEM grid without the encapsulation by graphene. The full video is available as Supporting Information [Video S6](#).

distributed all over the TEM grid, as was confirmed by a follow-up experiment. This is completely contrary to the results of experiments involving the encapsulation of pure water ([Figures 1 and 2](#)), which resulted in no formation of GLCs or a stochastic rare formation of GLCs in a few parts of the TEM grids.

The broad distribution of GSLCs with high reproducibility was also confirmed for an aqueous solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of similar composition and concentration to the etching solution [10 w/v % (0.43 M) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$]. Etching solution under floating graphene was carefully replaced by a 0.4 M aqueous solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The high stability of the graphene flake after the displacement enabled us to scoop the liquid with the graphene onto the SiN_x microwell TEM grid (Supporting Information; [Figure S1e](#)). Fabricated GSLCs were distributed throughout the TEM grid, as in the case of the etching solution in [Figure 4a](#). One of those GSLCs present in a SiN_x microwell had a dendritic shape ([Figure 4b](#)). From the snapshots for 20 s, we were able to confirm the movement and merging of some surrounding bubbles to form a large bubble at the center of the dendritic GSLC. A video recording showed that the GSLC was stable for up to 40 s (see Supporting Information [Video S4](#) for the full time range). The formation of micrometer-to-submicrometer-scale GSLCs enabled us to conduct an additional analysis of the encapsulated bubbles, showing more than two orders of range in the velocities (Supporting Information; [Figures S5–S9](#)). Note that the concentration of the encapsulated liquids in [Figure 4](#) was significantly higher, at about 0.4 M, and this could drive the formation of GSLCs with a high reproducibility.

Bubbling Behaviors of Dried Highly Concentrated Aqueous Solutions. The formation of the GSLCs shown in [Figure 3d–f](#) might be due to the presence of residual etching solution inside the microwell, even after five cycles of repeated displacement with pure water. It was confirmed that the etching solution tends to remain on the TEM grid due to its low vapor pressure. The etching solution was diluted ten times and

dropped onto a SiN_x microwell TEM grid. The grid was directly loaded into a TEM chamber without scooping free-standing graphene. Residues of the dried etching solution remained along the wall of the microwell ([Figure 5a](#) and Supporting Information [Video S5](#)) in a manner reminiscent of the previously reported ring-type GSLCs on SiN_x membranes.³² The residue bubbled due to radiolysis, and those bubbles coalesced with neighboring bubbles. It should be emphasized that the slight movement of bubbles during successive deformation due to the coalescence was captured even without encapsulation by graphene. Immediately after capturing the video, we conducted an elemental mapping by EDS (Supporting Information [Figure S10](#)) for the same microwell shown in [Figure 5a](#). The area roughly in the lower left half of Supporting Information [Figure S10](#) corresponds to the area shown in [Figure 5a](#). This showed the presence of copper from the CVD substrate for graphene, as well as oxygen and sulfur from the etching solution.

Because the bubbling was observed for the residue after the etching solution had dried, we also confirmed that this occurred with an aqueous solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A 0.4 M aqueous solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was simply dropped onto a SiN_x microwell TEM grid, which was then directly loaded into a TEM chamber without encapsulation with graphene. The residue from the aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution after drying also bubbled due to radiolysis, and the resulting bubbles underwent successive coalescences ([Figure 5b](#)). The contrast of those TEM images gradually decreased as a result of the bubbling and sublimation like $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aerosol particles which were observed in the vacuum by conventional TEM;³³ finally, these completely disappeared due to the focusing of the electron beam (Supporting Information; [Video S6](#)). The exposed area showed a brighter contrast compared to a less exposed area, clearly showing the evaporation of the solution due to the irradiation of the electron beam (Supporting Information; [Figure S11](#)). Although those liquids [the etching solution in [Figure 5a](#) and the aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution in [Figure 5b](#)] had completely

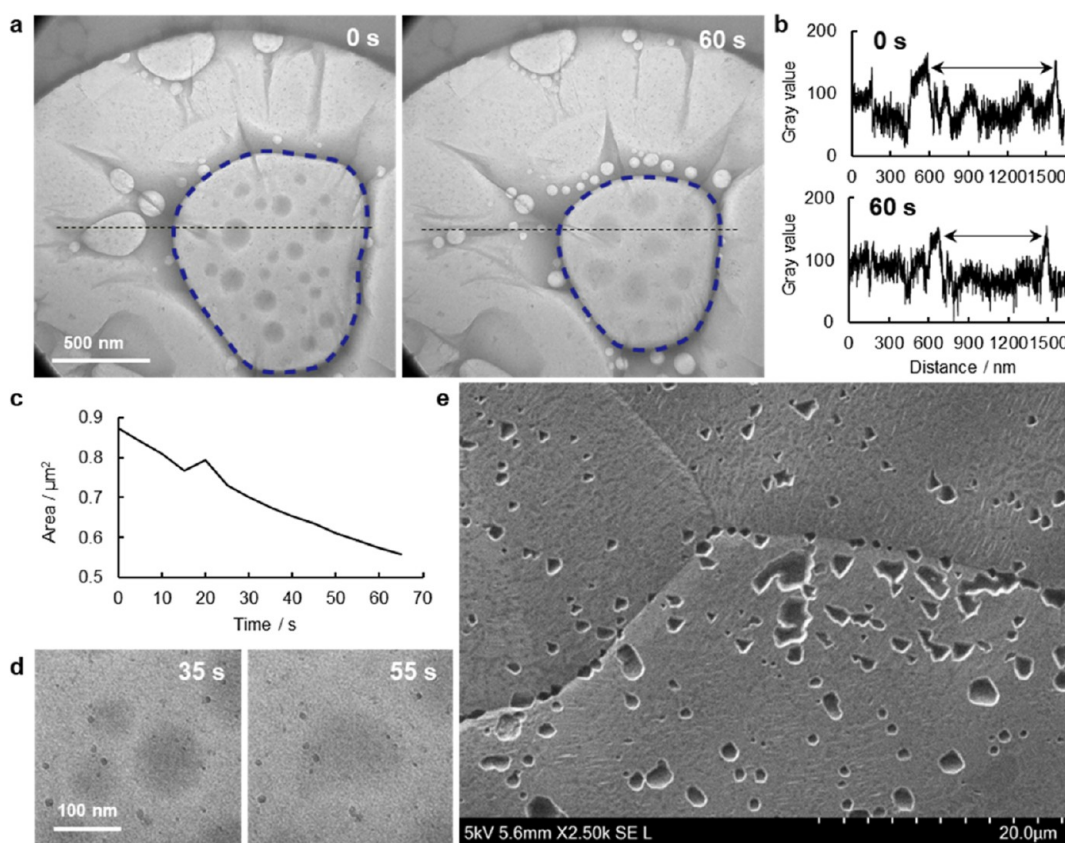


Figure 6. Leakage from a GSLC and defects in graphene. (a) Bright-field TEM images of a GSLC of 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution on a SiN_x microwell grid at 0 and 60 s. The full video is available as Supporting Information Video S7. (b) Line profiles of the gray values of the black dot lines in a at 0 and 60 s. (c) Time evolution of the area of the large bubble (the blue dashed lines in a). (d) Series of enlarged views of the fusion of the inner liquid droplets in the large bubble at 35 and 55 s. (e) Secondary electron image of etch pits on a Cu foil. A 10% w/v aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ solution was dropped onto the graphene surface on the Cu foil and then the foil was rinsed with double-distilled water.

dried at the end, the lifetime of the emerging bubbles were in time ranges similar to those for the GLCs shown in Figure 4. A similar liquid-like behavior of a beam-irradiated salt has been observed for dried sodium phosphate buffer solution.³⁴ The temporal liquid-like behavior of a dried solution due to the movement and deformation of the bubbles, as observed in the present study, suggests that caution should be exercised in discussing studies using GLCs (or GSLCs) solely on the basis of physical phenomena associated with bubbles. Although the detection of a water signal by EELS is known to be an effective way of verifying the presence of water in GLCs or GSLCs,¹⁹ this technique, like many other verification methods, does not guarantee the presence of the molecules between the thin films. Whether or not what we are observing as GLC is really present in the encapsulated space must be comprehensively determined from whether the liquid of interest does not evaporate during the observation process (e.g., the evaporation in the case without graphene, Figure 5) and whether the bubbles generated in the liquids are in motion reflecting the constraints of the geometry (e.g., the bubble motions along the boundary between graphene and substrate adhesion, Supporting Information Videos S1, S2, S3 and S4).

GLC Imperfections and Graphene Defects. For the development of GLCs of pure water and dilute solutions, it is important to carefully discuss the ratio of water molecules to contaminants or solutes. For instance, the liquid encapsulated in a successfully fabricated GLC (Figures 2c and 3d–f) could be a dilute solution (desirably pure water) or a concentrated solution

containing contaminants from the etching solution. The liquid will be a dilute solution if no leakage of water from the GLC occurs during the fabrication and observation processes. In contrast, if a significant leakage occurs, the liquids will be far-from-dilute solutions. To verify the presence of dilute solutions in GLCs (or GSLCs), an easily understood method would be to confirm the formation of ice at a low temperature. The cooling experiment at 253.8 K (Figure 3g) did not confirm the characteristic SAED patterns originating from ice crystal, indicating the presence of a highly concentrated solution of the contaminant (ammonium sulfate from the etching solution), suggesting that leakage of water from the GSLC had, indeed, occurred. Leakage of an encapsulated liquid under TEM observation was confirmed for a GSLC of a 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (Figure 6a and Supporting Information Video S7). The GSLC with a branch was formed at the center of the microwell at 0 s. A large bubble in a middle of this GSLC (shown by the blue dotted line in Figure 6a) was already present when the observation started, and it was found that small bubbles emerged from edges of the GSLC, and these continuously moved toward the large bubble (the blue dashed lines in Figure 6a).

Although radiolysis successively occurred under the TEM observation, the lateral length of the large bubble in the GSLC was found to gradually decrease (Figure 6b). From the line profiles of the black dotted lines in Figure 6a, the lateral length was found to decrease by about 200 nm in the 60 s after the start of the acquisition of the video. An image analysis showed that

the area of the bubble decreased by more than $0.3\ \mu\text{m}^2$ (Figure 6c). This suggests a leakage of gas molecules produced by radiolysis from the GSLC into the TEM vacuum chamber. After the video had been captured, SAED patterns were immediately acquired to confirm the presence of graphene around the GSLC (Supporting Information; Figure S12). Unlike the SAED pattern from the area near the GSLC, no signal of graphene was observed from the middle of the GSLC. It could be that the graphene on the large bubble in the middle bulged as a result of the increase in the circularity of the bubble. Also, the presence of round-shape strong contrasts was confirmed inside the bubble area (Figure 6d). These contrasts could arise from liquid on the SiN_x membrane. The fact that this was deformed while sticking together during the observation supports the view that the graphene was not in contact with the substrate in the central part of the big bubble. Movements on the SiN_x membrane were observed for about 1 min, suggesting that the bubble in the GSLC was not completely open to the vacuum chamber, and this allowed bubbles to move and coalesce without immediate evaporation.

A potential explanation that links the present results, the low yield of the GLCs with pure water, and the decrease in the bubble area in the GSLC, is the presence of defects in graphene through which volatile molecules preferentially permeate and evaporate in preference to other molecules or ions. Graphene is theoretically an impermeable material,^{35,36} and this fact motivated the development of GLCs. In contrast, as mentioned in the context of crystallization of CaCO_3 in GLCs,³⁷ defects in graphene cannot be ignored in experimental studies. When added to knock-on damage at the atomic scale under TEM observation, intrinsic defects at the nanometer or larger scale, through which volatile molecules can easily permeate, are important when we are considering leakages, even in the cell-fabrication process before TEM observation. Leakage of water from GSLCs under ambient conditions was simply confirmed by optical microscopy (Supporting Information; Figure S13). Free-standing graphene floating on supercooled double-distilled water at $-5\ ^\circ\text{C}$ was scooped by a hydrophilically pretreated SiN_x microwell TEM grid. The water was supercooled to increase its viscosity³⁸ for better encapsulation in GSLCs. Immediately after the cell fabrication, encapsulation of water in the middle area of the grid was confirmed by a change in the reflection of light due to bulging of the graphene. On standing overnight at $-5\ ^\circ\text{C}$, a loss of majority of water or ice (i.e., less bulging of graphene) in the middle area was confirmed. At that stage, we could not exclude the possibility that water molecules leaked, not only through intrinsic defects in the free-standing graphene, but also through spaces between the graphene and the SiN_x substrate and/or cracks in graphene caused by the scooping of free-standing graphene. The TEM image of the GSLC only showed a distribution of circular dark contrasts of approximately 100–200 nm in diameter which are similar to that of Figure 2a. The contrasts did not change and no bubble emergences were observed, suggesting any contamination or oxidation of the graphene due to the overnight free-standing treatment of graphene on etching solution and on the supercooled water. Then, the presence of intrinsic defects in the graphene used in the present study was directly confirmed by the etch-pit method.³⁹ An etching solution was dropped on the surface of graphene produced by CVD on a copper foil. If the graphene was defective, the etching solution would be able to attack the copper through the defects to form etch pits. Scanning electron microscopy (SEM) showed that etch-pits were indeed formed at

a density of $0.1\ \text{etch pit}/\mu\text{m}^2$ (Figure 6e). Although it was difficult to estimate the sizes of defects from the resulting etch pits, this experiment clearly showed that the graphene contained defects through which water molecules in the etching solution could permeate. CVD-grown graphene on a metal (as represented by copper foil), which is known to contain defects, has been used in most previous studies on GLCs.⁴⁰ Even for sizes smaller than the observed etch pits density, water–GLC yields were low and other causes of water leakage, such as reduced adhesion due to graphene surface contamination, need to be examined in the future.

The significance of the GSLCs in Figure 4 is the encapsulated area (volume) of liquid that covered the microwells on a micrometer scale. In a previous study, the highest population in the size distribution of GLCs was 100–150 nm.⁴¹ Also, round-shaped pocket GLCs with the highest count of 50–100 nm in pocket diameters have been fabricated.⁴² In such small GLCs, effects of confinement are possible. By introducing saturated aqueous NaCl into GLCs, it has been reported that, as a result of confinement, NaCl crystals with a hexagonal morphology are formed via a graphite-like intermediate phase, which differed from the result of a control experiment with a conventional SiN_x liquid cell.⁴³ The presence of an EELS plasmon peak of water indicated that the internal pressure in GLCs is as high as 400 MPa.⁴⁴ An atomic-force microscopy study also indicated a high inner pressure of 1–63 MPa.⁴⁵ Although the science with the confined geometry is itself quite intriguing, it is difficult to directly apply those results to those obtained at ambient pressures. The internal pressure of the GSLCs in Figure 4a could be lower due to the weaker van der Waals interaction between the graphene and the SiN_x substrate. The present micrometer-scale GSLCs have the potential for use in studies on bulk phenomena that are not constrained by the pressure and confined space present in conventional GLCs; when combined with techniques to seal defects in graphene, such as atomic-layer deposition,⁴⁶ GSLCs could be used for observing dilute aqueous solutions, or even water, in controllable geometries.

CONCLUSION

We have attempted to develop a graphene-based liquid cell to capture the nucleation dynamics of water to ice with a higher spatial resolution than that achievable by conventional methods. First, we followed the previously reported method for the fabrication of GLCs with pure water. A planar suspension of graphene on the TEM grids resulted in no encapsulation of water. We therefore introduced “free-standing” graphene to facilitate bending and wrinkling of the graphene sheet. Some of the fabricated strip-shaped GLCs showed movements of bubbles, as previously reported. We were able to improve the geometry and volume of the encapsulation by introducing SiN_x microwell TEM grids, although only after repeated experiments. We expected the formation of water ice on cooling to 253.8 K; however, no ice was found; instead, we found ammonium sulfate, probably from the etching solution. From this unintended crystallization of the etching solution, we found that encapsulation of the etching solution occurred in the GSLC with a high reproducibility. It is noteworthy that the area of the GSLCs sometimes reached a micrometer scale. The formation of large-area GSLC was also confirmed with an aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution of similar concentration. The high stability of the resulting GSLCs allowed us to study the bubble dynamics in seconds.

Having confirmed the bubbling of dried high-concentration aqueous salt solution, we were motivated to carefully consider whether or not water molecules of encapsulated liquids in “successfully fabricated” GLCs or GSLCs had leaked. The decrease in the bubble area in the GSLC of a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution showed that leakage of gas molecules occurred under the TEM observation conditions. This study highlighted the role of the etching solution of graphene, which has been less-well discussed or ignored as a mere contaminant in previous studies on GLCs. The high reproducibility of the GSLC of the etching solution at the micrometer scale was linked to the low yield of that of pure water due to leakage of water and gas molecules. Further experiments with different salt compositions and with lower freezing temperatures will be needed to verify the conditions of such liquids encapsulated in GLCs and GSLCs. If the leakage pathways could be blocked, GSLCs could become powerful tools for elucidating the dynamics of dilute aqueous solution, including water nucleation to ice, under more-ambient pressures.

METHODS

SiN_x Microwell TEM Grid. The SiN_x microwell TEM grid (Norcada, Inc., Edmonton; Supporting Information Figure S3) has four square windows. Each window contains 81 microwells (9×9) of three different diameters (1, 2, and 3 μm). Each microwell is 60 nm deep between the SiN_x membranes of 100 and 40 nm thickness. All grids were subjected to a hydrophilic treatment by plasma-ion bombardment to facilitate the spreading of the target liquid on the SiN_x membrane.

Fabrication of GLCs by the Conventional Method. For the fabrication of the GLCs with graphene supported by the holey carbon TEM grid (Supporting Information; Figure S1a), graphene (6–8 layers CVD on a Cu foil; ACS Material, LLC; Pasadena, CA) was cut into about 1 cm-square pieces with a box cutter. The graphene on Cu was sandwiched between two sheets of powder paper and flattened by pressing with a glass slide. A holey carbon TEM grid (Quantifoil Micro Tools GmbH, Großlobbichau, Germany) was placed on the Cu foil with the graphene facing the carbon-coated side. Isopropyl alcohol (IPA) was dropped onto the Cu foil to facilitate the adhesion of the carbon sheet to the graphene.⁴⁷ After evaporation of the IPA for 30 min, the Cu foil with the TEM grid was carefully floated on 10% w/v aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (the etching solution which is commonly used for GLC's fabrication) so that the Cu foil was in contact with the surface of the etching solution. After overnight contact, it was confirmed that the Cu foil had been completely etched, and the TEM grid remained suspended on a sheet of graphene floating on the etching solution. The graphene retained its square shape. Each TEM grid was then carefully transferred onto the surface of double-distilled water. This process was repeated at least twice to prevent contamination of the grid by the etching solution. After removing excess water with filter paper, the TEM grid was held by tweezers with the graphene-transferred side upward. A droplet of double-distilled water was carefully put on the grid and immediately sealed with a second TEM grid onto which graphene had been transferred in the same way, and which had been cut to form a semicircular shape for ease of contact with the lower TEM grid. Excess water was removed with filter paper. Within 30 min, the fabricated setup with the TEM grid was loaded into the TEM chamber. The resulting grid corresponds to that shown in Figure 1d.

Fabrication of GLCs and GSLCs by the “Free-Standing” Method. For the fabrication of GLCs and GSLCs with free-

standing graphene, the flattened graphene (6–8 layers CVD on a Cu foil; ACS Material, LLC; Pasadena, CA) was directly floated onto the etching solution, so that the Cu foil was in contact with the liquid surface. After treatment overnight, the Cu foil was completely etched, and the graphene that floated on the surface of the etching solution retained its square shape.

To fabricate the GLCs and GSLCs encapsulating pure water (Supporting Information; Figure S1b,c), the etching solution under floating graphene was carefully displaced with double-distilled water by using a pipet. This operation was repeated at least five times to minimize contamination by the etching solution. Then, the graphene floating on the double-distilled water was directly scooped with the graphene-transferred holey carbon TEM grid (Supporting Information; Figure S1b) or a SiN_x microwell TEM grid (Supporting Information; Figure S1c). After removal of excess water, the fabricated TEM grid was inserted into a TEM chamber within 30 min. The resulting holey carbon TEM grid and SiN_x microwell TEM correspond to those shown in Figures 2 and 3, respectively.

To fabricate the GSLCs encapsulating the etching solution (Supporting Information; Figure S1d), the graphene floating on the etching solution was directly scooped by the hydrophilically pretreated SiN_x microwell TEM grid, without replacement by double-distilled water. After removal of excess solution, the fabricated TEM grid was inserted into a TEM chamber within 30 min. The resulting grid corresponds to that shown in Figure 4a.

To fabricate the GSLCs encapsulating the aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (Supporting Information; Figure S1e), the etching solution under the floating graphene was carefully displaced with 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution by using a pipet. The floating graphene was then scooped by the hydrophilically pretreated SiN_x microwell TEM grid. After removal of excess solution, the fabricated TEM grid was inserted into a TEM chamber within 30 min. The resulting grid corresponds to that shown in Figures 4b and 6a.

Fabrication of Dried Highly Concentrated Aqueous Solutions. The target solution (1% w/v aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ solution or 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution) was dropped onto a hydrophilically pretreated SiN_x microwell TEM grid. Excess solution was removed with filter paper. Within 30 min, the fabricated setup with the TEM grid was loaded into the TEM chamber after pre-evacuation.

TEM Observation and Analysis. A JEM-2100F instrument (JEOL Ltd., Tokyo) was used for the TEM observations of the fabricated GLCs and GSLCs. An acceleration voltage of 200 kV was used for this study, except for the cryogenic experiment (Figure 2a,b), for which an acceleration voltage of 80 kV was selected. The TEM images were acquired by using a CMOS camera (OneView IS; Gatan, Inc., Pleasanton, CA). The highest count value of transmitted electrons in the initial frame of the video was used to calculate the dose rate of the Supporting Information Video S1. STEM–EDS spectra and images were acquired with a JED-2300T instrument (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). ReciPro software⁴⁸ was used for the SAED analysis. Standard diffraction data were taken from the American Mineralogist Crystal Structure Database (AMCSD). ImageJ software⁴⁹ was used for the analysis of the bubbles. A liquid-helium-cooled TEM holder (Gatan, Inc., Pleasanton, CA) was used for the cryogenic experiment (Figure 2a,b). Liquid nitrogen was added to the holder, and the GLCs were cooled to 80 K. A Peltier cooling TEM holder (Mel-Build Co., Fukuoka) was used for the cooling experiment at 253.8 K

(Figure 3g–i). The temperature was a calibrated value from a set value of 233.15 K. The actual value was higher than the set value due to the low heat conductivity of the holder to the GSLC assembly. Other observations of the GLCs and GSLCs were conducted at room temperature.

SEM Observation of Etch Pits. To confirm the presence of etch pits in a Cu foil, 10 w/v % aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ solution was dropped onto the surface of 6–8 layers CVD graphene on Cu foil (ACS Material, LLC; Pasadena, CA). After 30 s, the foil was rinsed repeatedly with double-distilled water from a pipet. After the removal of excess water, the surface of the Cu foil was examined by SEM (TM4000Plus; Hitachi High-Tech Co., Tokyo). The secondary electron image was acquired at an acceleration voltage of 5 kV.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.4c05477>.

Fabrication methods for GLCs and GSLCs (Figure S1); Low-magnification bright-field TEM image of part of a TEM grid in which the formation of GLC was attempted by the conventional method. (Figure S2); A SiN_x microwell TEM grid used for the fabrication of GSLCs (Figure S3); STEM–EDS elemental mappings and corresponding spectrum of the GSLC shown in Figure 3g (Figure S4); Movement of bubbles in GSLCs (Figure S5); Enlarged snapshots of the bubble in the GSLC of the etching solution (Figures S6–S8); Enlarged snapshots of the bubble in the GSLC of the 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (Figure S9); STEM–EDS elemental mappings and the corresponding spectrum of the etching solution in an open system (Figure S10); Evaporation of 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution in an open system (Figure S11); The presence of graphene around and on a GSLC (Figure S12); and Leakage of water from a GSLC in air without electron-beam irradiation (Figure S13) (PDF)

Video S1: Bubble movements in a GLC in folded graphene encapsulating displaced water from the etching solution (MP4)

Video S2: Bubble movements in a GSLC encapsulating displaced water from the etching solution (MP4)

Video S3: A micrometer-scale GSLC encapsulating the etching solution (MP4)

Video S4: A submicrometer-scale GSLC encapsulating 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (MP4)

Video S5: Sublimation of the dried ten-times-diluted etching solution with bubbling (MP4)

Video S6: Liquid-like behavior of the dried 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution with deformation and coalescence of bubbles (MP4)

Video S7: Decreasing area of a bubble in a GSLC of 0.4 M aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (MP4)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Yuki Kimura – Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan; orcid.org/0000-0002-9218-7663; Email: ykimura@lowtem.hokudai.ac.jp

Authors

Yuga Yashima – Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan
Tomoya Yamazaki – Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan;
orcid.org/0000-0001-8190-3778

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.4c05477>

Author Contributions

Y.Y. performed the experiments and analyzed the data. Y.K. supervised the project. All authors discussed the results and wrote the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by JSPS KAKENHI, grants numbers JP20H05657, JP21K18901, and JP22KJ0141.

■ REFERENCES

- (1) de Jonge, N.; Houben, L.; Dunin-Borkowski, R. E.; Ross, F. M. Resolution and Aberration Correction in Liquid Cell Transmission Electron Microscopy. *Nat. Rev. Mater.* **2019**, *4* (1), 61–78.
- (2) Kashin, A. S.; Ananikov, V. P. Monitoring Chemical Reactions in Liquid Media Using Electron Microscopy. *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3* (11), 624–637.
- (3) De Yoreo, J. J.; Gilbert, P. U. P. A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Penn, R. L.; Whitlam, S.; Joester, D.; Zhang, H.; Rimer, J. D.; Navrotsky, A.; Banfield, J. F.; Wallace, A. F.; Michel, F. M.; Meldrum, F. C.; Cölfen, H.; Dove, P. M. Crystallization by Particle Attachment in Synthetic, Biogenic, and Geologic Environments. *Science* **2015**, *349* (6247), aaa6760.
- (4) Zheng, H.; Smith, R. K.; Jun, Y.; Kisielowski, C.; Dahmen, U.; Alivisatos, A. P. Observation of Single Colloidal Platinum Nanocrystal Growth Trajectories. *Science* **2009**, *324* (5932), 1309–1312.
- (5) Li, D.; Nielsen, M. H.; Lee, J. R. I.; Frandsen, C.; Banfield, J. F.; De Yoreo, J. J. Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment. *Science* **2012**, *336* (6084), 1014–1018.
- (6) Nielsen, M. H.; Aloni, S.; De Yoreo, J. J. In Situ TEM Imaging of CaCO_3 Nucleation Reveals Coexistence of Direct and Indirect Pathways. *Science* **2014**, *345* (6201), 1158–1162.
- (7) Yamazaki, T.; Kimura, Y.; Vekilov, P. G.; Furukawa, E.; Shirai, M.; Matsumoto, H.; Van Driessche, A. E. S.; Tsukamoto, K. Two Types of Amorphous Protein Particles Facilitate Crystal Nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (9), 2154–2159.
- (8) Holtz, M. E.; Yu, Y.; Gao, J.; Abruña, H. D.; Muller, D. A. In Situ Electron Energy-Loss Spectroscopy in Liquids. *Microsc. Microanal.* **2013**, *19* (4), 1027–1035.
- (9) Keskin, S.; Kunnas, P.; de Jonge, N. Liquid-Phase Electron Microscopy with Controllable Liquid Thickness. *Nano Lett.* **2019**, *19* (7), 4608–4613.
- (10) Wu, H.; Su, H.; Joosten, R. R. M.; Keizer, A. D. A.; van Hazendonk, L. S.; Wirix, M. J. M.; Patterson, J. P.; Laven, J.; de With, G.; Friedrich, H. Mapping and Controlling Liquid Layer Thickness in Liquid-Phase (Scanning) Transmission Electron Microscopy. *Small Methods* **2021**, *5* (6), No. e2001287.
- (11) Koo, K.; Li, Z.; Liu, Y.; Ribet, S. M.; Fu, X.; Jia, Y.; Chen, X.; Shekhawat, G.; Smeets, P. J. M.; dos Reis, R.; Park, J.; Yuk, J. M.; Hu, X.; Dravid, V. P. Ultrathin Silicon Nitride Microchip for in Situ/Operando Microscopy with High Spatial Resolution and Spectral Visibility. *Sci. Adv.* **2024**, *10* (3), No. eadj6417.
- (12) Yuk, J. M.; Park, J.; Ercius, P.; Kim, K.; Hellebusch, D. J.; Crommie, M. F.; Lee, J. Y.; Zettl, A.; Alivisatos, A. P. High-Resolution EM of Colloidal Nanocrystal Growth Using Graphene Liquid Cells. *Science* **2012**, *336* (6077), 61–64.

- (13) Park, J.; Koo, K.; Noh, N.; Chang, J. H.; Cheong, J. Y.; Dae, K. S.; Park, J. S.; Ji, S.; Kim, I.-D.; Yuk, J. M. Graphene Liquid Cell Electron Microscopy: Progress, Applications, and Perspectives. *ACS Nano* **2021**, *15* (1), 288–308.
- (14) Dunn, G.; Adiga, V. P.; Pham, T.; Bryant, C.; Horton-Bailey, D. J.; Belling, J. N.; LaFrance, B.; Jackson, J. A.; Barzegar, H. R.; Yuk, J. M.; Aloni, S.; Crommie, M. F.; Zettl, A. Graphene-Sealed Flow Cells for In Situ Transmission Electron Microscopy of Liquid Samples. *ACS Nano* **2020**, *14* (8), 9637–9643.
- (15) Hutzler, A.; Schmutzler, T.; Jank, M. P. M.; Branscheid, R.; Unruh, T.; Spiecker, E.; Frey, L. Unravelling the Mechanisms of Gold–Silver Core–Shell Nanostructure Formation by in Situ TEM Using an Advanced Liquid Cell Design. *Nano Lett.* **2018**, *18* (11), 7222–7229.
- (16) Koo, K.; Park, J.; Ji, S.; Toleukhanova, S.; Yuk, J. M. Liquid-Flowing Graphene Chip-Based High-Resolution Electron Microscopy. *Adv. Mater.* **2021**, *33* (2), 2005468.
- (17) Mohanty, N.; Fahrenholtz, M.; Nagaraja, A.; Boyle, D.; Berry, V. Impermeable Graphenic Encasement of Bacteria. *Nano Lett.* **2011**, *11* (3), 1270–1275.
- (18) Wang, C.; Qiao, Q.; Shokuhfar, T.; Klie, R. F. High-Resolution Electron Microscopy and Spectroscopy of Ferritin in Biocompatible Graphene Liquid Cells and Graphene Sandwiches. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (21), 3410–3414.
- (19) Keskin, S.; Pawell, C.; de Jonge, N. Verification of Water Presence in Graphene Liquid Cells. *Micron* **2021**, *149*, 103109.
- (20) Crook, M. F.; Moreno-Hernandez, I. A.; Ondry, J. C.; Ciston, J.; Bustillo, K. C.; Vargas, A.; Alivisatos, A. P. EELS Studies of Cerium Electrolyte Reveal Substantial Solute Concentration Effects in Graphene Liquid Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (12), 6648–6657.
- (21) Algara-Siller, G.; Lehtinen, O.; Wang, F. C.; Nair, R. R.; Kaiser, U.; Wu, H. A.; Geim, A. K.; Grigorieva, I. V. Square Ice in Graphene Nanocapillaries. *Nature* **2015**, *519* (7544), 443–445.
- (22) Zhou, W.; Yin, K.; Wang, C.; Zhang, Y.; Xu, T.; Borisevich, A.; Sun, L.; Idrobo, J. C.; Chisholm, M. F.; Pantelides, S. T.; Klie, R. F.; Lupini, A. R. The Observation of Square Ice in Graphene Questioned. *Nature* **2015**, *528* (7583), E1–E2.
- (23) Phakatkar, A. H.; Megaridis, C. M.; Shokuhfar, T.; Shahbazian-Yassar, R. Real-Time TEM Observations of Ice Formation in Graphene Liquid Cell. *Nanoscale* **2023**, *15*, 7006–7013.
- (24) Ghodsi, S. M.; Anand, S.; Shahbazian-Yassar, R.; Shokuhfar, T.; Megaridis, C. M. In Situ Study of Molecular Structure of Water and Ice Entrapped in Graphene Nanovessels. *ACS Nano* **2019**, *13* (4), 4677–4685.
- (25) Hauwiller, M. R.; Ondry, J. C.; Alivisatos, A. P. Using Graphene Liquid Cell Transmission Electron Microscopy to Study in Situ Nanocrystal Etching. *J. Visualized Exp.* **2018**, No. 135, 57665.
- (26) Schneider, N. M.; Norton, M. M.; Mendel, B. J.; Grogan, J. M.; Ross, F. M.; Bau, H. H. Electron–Water Interactions and Implications for Liquid Cell Electron Microscopy. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (38), 22373–22382.
- (27) Johra, F. T.; Lee, J.-W.; Jung, W.-G. Facile and Safe Graphene Preparation on Solution Based Platform. *J. Ind. Eng. Chem.* **2014**, *20* (5), 2883–2887.
- (28) Lim, K.; Bae, Y.; Jeon, S.; Kim, K.; Kim, B. H.; Kim, J.; Kang, S.; Heo, T.; Park, J.; Lee, W. C. A Large-Scale Array of Ordered Graphene-Sandwiched Chambers for Quantitative Liquid-Phase Transmission Electron Microscopy. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (39), 2002889.
- (29) Kelly, D. J.; Zhou, M.; Clark, N.; Hamer, M. J.; Lewis, E. A.; Rakowski, A. M.; Haigh, S. J.; Gorbachev, R. V. Nanometer Resolution Elemental Mapping in Graphene-Based TEM Liquid Cells. *Nano Lett.* **2018**, *18* (2), 1168–1174.
- (30) Rasool, H.; Dunn, G.; Fathalizadeh, A.; Zettl, A. Graphene-sealed Si/SiN Cavities for High-resolution in Situ Electron Microscopy of Nano-confined Solutions. *Phys. Status Solidi B* **2016**, *253* (12), 2351–2354.
- (31) Yamazaki, T.; Yashima, Y.; Katsuno, H.; Miyazaki, H.; Gondo, T.; Kimura, Y. In Situ Transmission Electron Microscopy Study of Bubble Behavior Near the Surface of Ice Crystals by Using a Liquid Cell With a Peltier Cooling Holder. *Microsc. Microanal.* **2023**, *29*, 1940–1949.
- (32) Noh, N.; Park, J.; Park, J. S.; Koo, K.; Park, J. Y.; Yuk, J. M. Lithographically Patterned Well-Type Graphene Liquid Cells with Rational Designs. *Lab Chip* **2020**, *20* (15), 2796–2803.
- (33) Buseck, P. R.; Pósfai, M. Airborne Minerals and Related Aerosol Particles: Effects on Climate and the Environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (7), 3372–3379.
- (34) Massover, W. H. Electron Beam-Induced Radiation Damage: The Bubbling Response in Amorphous Dried Sodium Phosphate Buffer. *Microsc. Microanal.* **2010**, *16* (3), 346–357.
- (35) Bunch, J. S.; Verbridge, S. S.; Alden, J. S.; van der Zande, A. M.; Parpia, J. M.; Craighead, H. G.; McEuen, P. L. Impermeable Atomic Membranes from Graphene Sheets. *Nano Lett.* **2008**, *8* (8), 2458–2462.
- (36) Sun, P. Z.; Yang, Q.; Kuang, W. J.; Stebunov, Y. V.; Xiong, W. Q.; Yu, J.; Nair, R. R.; Katsnelson, M. I.; Yuan, S. J.; Grigorieva, I. V.; Lozada-Hidalgo, M.; Wang, F. C.; Geim, A. K. Limits on Gas Impermeability of Graphene. *Nature* **2020**, *579* (7798), 229–232.
- (37) Dae, K. S.; Chang, J. H.; Koo, K.; Park, J.; Kim, J. S.; Yuk, J. M. Real-Time Observation of CaCO₃ mineralization in Highly Super-saturated Graphene Liquid Cells. *ACS Omega* **2020**, *5* (24), 14619–14624.
- (38) Zwolinski, B. J.; Eicher, L. D. High-Precision Viscosity of Supercooled Water and Analysis of the Extended Range Temperature Coefficient. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75* (13), 2016–2024.
- (39) Kwak, J.; Kim, S.; Jo, Y.; Kim, N. Y.; Kim, S. Y.; Lee, Z.; Kwon, S. Unraveling the Water Impermeability Discrepancy in CVD-Grown Graphene. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (30), 1800022.
- (40) O'Hern, S. C.; Stewart, C. A.; Boutilier, M. S. H.; Idrobo, J.-C.; Bhaviripudi, S.; Das, S. K.; Kong, J.; Laoui, T.; Atieh, M.; Karnik, R. Selective Molecular Transport through Intrinsic Defects in a Single Layer of CVD Graphene. *ACS Nano* **2012**, *6* (11), 10130–10138.
- (41) van Deursen, P. M. G.; Koning, R. I.; Tudor, V.; Moradi, M.; Patterson, J. P.; Kros, A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Koster, A. J.; Schneider, G. F. Graphene Liquid Cells Assembled through Loop-Assisted Transfer Method and Located with Correlated Light-Electron Microscopy. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (11), 1904468.
- (42) Yuk, J. M.; Zhou, Q.; Chang, J.; Ercius, P.; Alivisatos, A. P.; Zettl, A. Real-Time Observation of Water-Soluble Mineral Precipitation in Aqueous Solution by In Situ High-Resolution Electron Microscopy. *ACS Nano* **2016**, *10* (1), 88–92.
- (43) Wang, L.; Chen, J.; Cox, S. J.; Liu, L.; Sosso, G. C.; Li, N.; Gao, P.; Michaelides, A.; Wang, E.; Bai, X. Microscopic Kinetics Pathway of Salt Crystallization in Graphene Nanocapillaries. *Phys. Rev. Lett.* **2021**, *126* (13), 136001.
- (44) Ghodsi, S. M.; Sharifi-Asl, S.; Rehak, P.; Král, P.; Megaridis, C. M.; Shahbazian-Yassar, R.; Shokuhfar, T. Assessment of Pressure and Density of Confined Water in Graphene Liquid Cells. *Adv. Mater. Interfaces* **2020**, *7* (12), 1901727.
- (45) Hirokawa, S.; Teshima, H.; Solís-Fernández, P.; Ago, H.; Li, Q.-Y.; Takahashi, K. Random but Limited Pressure of Graphene Liquid Cells. *Ultramicroscopy* **2023**, *250*, 113747.
- (46) O'Hern, S. C.; Jang, D.; Bose, S.; Idrobo, J.-C.; Song, Y.; Laoui, T.; Kong, J.; Karnik, R. Nanofiltration across Defect-Sealed Nanoporous Monolayer Graphene. *Nano Lett.* **2015**, *15* (5), 3254–3260.
- (47) Hauwiller, M. R.; Frechette, L. B.; Jones, M. R.; Ondry, J. C.; Rotskoff, G. M.; Geissler, P.; Alivisatos, A. P. Unraveling Kinetically-Driven Mechanisms of Gold Nanocrystal Shape Transformations Using Graphene Liquid Cell Electron Microscopy. *Nano Lett.* **2018**, *18* (9), 5731–5737.
- (48) Seto, Y.; Ohtsuka, M. ReciPro: Free and Open-source Multipurpose Crystallographic Software Integrating a Crystal Model Database and Viewer, Diffraction and Microscopy Simulators, and Diffraction Data Analysis Tools. *J. Appl. Crystallogr.* **2022**, *55* (2), 397–410.
- (49) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 671–675.