

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
ÚSTAV TECHNOLOGIE LÉKŮ

ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE PRO PŘEDMĚT
„INSTRUMENTÁLNÍ ANALYTICKÉ METODY VE
FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGII“

Standardní operační postup pro ovládání elektronového mikroskopu
Tescan Mira 3

Zpracovali: Mgr. Klára Kostelanská
doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D.

Brno 2017

Obsah

1	Příprava vzorků a základní nastavení.....	- 3 -
2	Detektory.....	- 7 -
3	Snímkování.....	- 8 -
4	Typy zobrazovacích módů.....	- 8 -
5	Zpracování obrázku (postprocessing).....	- 9 -

Pracovní návod k elektronovému mikroskopu

Nejprve je potřeba se **přihlásit** přes svůj **uživatelský účet** do programu MIRA TC. Každý uživatel má svůj vlastní. Pro opakovaného měření je možné uložit si **předvolby** (v ovládacím panelu vpravo nahoře) nebo si načíst předvolby od jiného uživatele (volby → konfigurace → načíst výchozí parametry – popř. volby jiného uživatele – servisní konfigurace).

1 Příprava vzorků a základní nastavení

Nejdříve se připraví **vzorek**, tím že se vodivě zafixuje (stříbrné lepidlo, uhlíková páska) na držák vzorku – stub a následně se **umístí do komory**. Před otevřením se komora musí **vypumpovat tlačítkem VENT**. Následně lze komoru otevřít.

Pokud je vzorek nevodivý a nabíjí se (viditelné např. jako čáry přes obraz), pak je důležité jej pokovit pomocí **naprašovačky**. Při jejím použití je potřeba, aby byly zavřeny ventily na dusík i bomba na argon (vstupní tlak 0,3 bar). Vše následně probíhá pomocí programu QT – Timed Gold – Run profile.

Otevřít komoru → vybrat na počítači číslo na manipulátoru, kam se bude vzorek vkládat → odšroubovat → zasunout vzorek na stubu pomocí pinzety → upevnit vzorek pomocí šroubku → zavírat rukou a sledovat kameru, aby nedošlo k nárazu → **PUMP** pro vypumpování komory (vytvoření vakua – sledovat barevný indikátor, který se musí dostat do zelené oblasti).

Pro měření je důležité mít **zapnutý svazek elektronů**, k čemuž slouží tlačítko **BEAM ON** (nutné jej vypnout při odchodu/pauze/vkládání vzorků). Obsluha vzorků pak probíhá přes **manipulátor (carousel)**. V případě, že bliká tlačítko u manipulátoru, je potřeba jej **kalibrovat**. Poté je důležité vybrat vzorek, který bude pozorován (pozn. pravým tlačítkem myši na číslo vzorku je možné jej pojmenovat).

Pro **posunutí carouselu o jedno zorné pole** je potřeba kliknout pravým tlačítkem myši. Pro **posunutí o danou vzdálenost z výchozí pozice** slouží ++ -- XY.Z. Jestliže je potřeba **carousel rotovat a naklánět**, ať už v jeho ose či podle zorného pole, doporučuje se vždy zakliknutí „držet zorné pole“.

Během přibližování manipulátoru k objektivu, pomocí funkce **WD&Z**, je nutné sledovat obrázek vpravo, který přibližuje situaci v komoře (živá kamera), aby nedošlo k poškození objektivu nárazem manipulátoru.

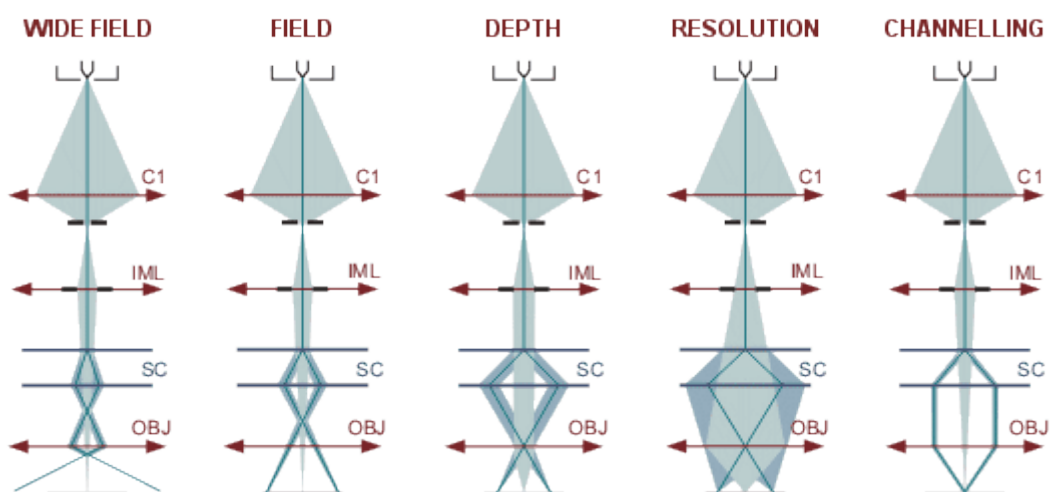
V prostoru plochy se objeví **rastrovací (skenovací) okénko**, což je obraz, který je nutné vidět během celého měření (pozn. okénko může být otevřeno několik).

Změnu parametrů okna nebo výsledné fotografie lze vyvolat pomocí nabídky SEM → parametry obrazu, kde lze nastavit velikost živého a akvizičního (výsledné fotografie) obrazu.

Veškerou nabídku, která je během pozorování potřeba, obsahuje **panel nástrojů**, který se nachází vpravo na rastrovací obrazovce.

1. Rastrovací režim

- RESOLUTION – rozlišení pro větší přiblížení, nízká hloubka ostrosti
- DEPTH – lepší plasticita, vhodné při nižším vakuu, větší hloubka ostrosti – výhoda pro topografické vzorky (ale nižší rozlišení), skenování malé části vzorku
- FIELD – širší záběr, pro menší přiblížení
- WIDE FIELD – při hledání vzorku (centrování kříže)
- CHANNELING



Obr. 1: Jednotlivé módy měření skenovacího elektronového mikroskop

Při pozorování preparátu je dobré mít zakliknuté *continual wide field*, přechází pak při zoomování automaticky mezi módy WIDE FIELD a RESOLUTION.

2. Rastrovací rychlost

Při úpravě snímku je vhodné zvolit rychlost 2 – 3 = vyšší rychlost. Pro vlastní snímkování pak 7 – 8, což je pomalejší. Je možné tuto funkci navolit buď přímo pomocí výběru, kolečka na myši či na numerické klávesnici.

3. Zvětšení

Řídí se pomocí trackballu pro přibližování či případné oddalování. Pro přesunutí dané části obrazu do středu, je nutno kliknout na vybranou část kolečkem myši.

4. Pracovní vzdálenost

Zaostření probíhá pomocí trackballu, ideální ostření je pomocí malého okýnka, které se vytvoří dvojklikem do dané oblasti obrazu.

5. Stigmátory

Slouží pro případ, kdy dochází k astigmatismu, což lze definovat jako rozmazané okraje v jedné ose. Zaostřuje se opět pomocí trackballu.

6. Jas/kontrast

Pro upravení jasu či kontrastu.

7. Auto jas/kontrast

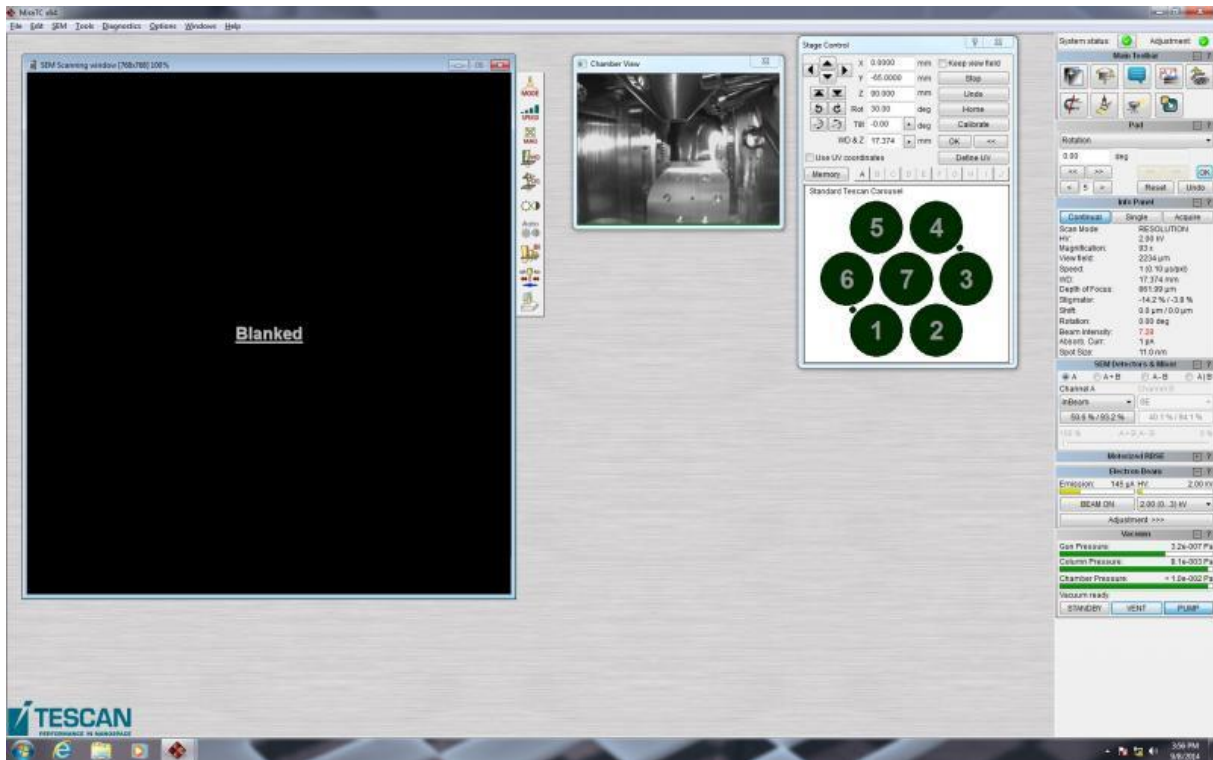
8. Beam intensity

9. Manuální centrování tubusu

Používá se v případě, kdy je obraz prodloužen v nějakém směru. Trackballem se pak pohybuje ve směru vychýlení (tlačítko na klávesnici **F11 blokuje osu x**, **F12 blokuje osu y**). Centruje se, dokud obraz nepřestane kmitat a pouze pulsuje.

10. Získat obrázek

Pomocí této ikony získáme výsledný obraz.



Obr. 2: Vzhled obrazovky programu MIRA TC. Vlevo rastrovací okénko, jehož součástí je panel nástrojů. Uprostřed malé okénko – pohled do komory. Dalším okénkem s číslicemi je ovládání manipulátoru. Dlouhým oknem úplně vpravo je další nabídka nástrojů.

Panel nástrojů vpravo nahoře:

Nové rastrovací okno

Panel geometrických transformací

Panel předvoleb

Panel analýzy a odměřování

Panel manipulátoru

D (degauss tubusu)

Buď výběrem v nabídce, nebo písmenem D na klávesnici dojde k úpravě obrazu po změně parametrů, módu, centrování, změně urychlovacího napětí, apod. Slouží hlavně pro vylepšení obrazu, tedy nové ustavení magnetického pole.

Pohled do komory

Přepnout do režimu easySEM

Continual x Single x Akvizice

Continual vypíná sken (Shift + C). V určitém místě se najde nejlepší obraz → vypnout sken a posouvat (pro citlivé vzorky).

Single – jen pro jeden sken (velmi citlivé vzorky).

Akvizice – pro ukládání.

Histogram

Slouží pro rozložení intenzity barev obrázku (ideálně, aby byl vrchol uprostřed). Dá se upravit posuny.

2 Detektory

Některé z detektorů se nachází v komoře mikroskopu, některé v tubusu.

- **SE** – nejčastěji používaný komorový detektor pro sekundární elektrony – vhodný pro pozorování povrchu (topografie)
- **RBSE** – používá se pouze někdy, detekuje zpětně odražené elektrony (vyjíždí z boku nad vzorek – nenarazit – stolek do 7 mm) – vhodný pro materiálový kontrast
- **In beam SE** – v tubusu pro sekundární elektrony – vhodný pro povrchové nerovnosti
- **In beam BSE** (zpětně odražené elektrony) – v tubusu – vhodný na materiálový kontrast

- Složený obraz z více detektorů A + B (lze vybrat poměr 0 – 100 %)
- Součet detektorů vhodné zkusit při nabíjení vzorků
- BSE detektory méně citlivé k nabíjení, s výhodou lze nastavit poměr A + B (BSE + SE) pro eliminaci nabíjení a zároveň kvalitní topografii
- Více detektorů vedle sebe – nutno upravit jas/kontrast u každého zvlášť

Doporučené pracovní vzdálenosti (WD&Z)

- Komorové SE – 5 mm, popřípadě blíže, ale je potřeba vzorek naklonit kvůli případnému stínění
- LE-BSE – min 8 mm
- In beam – 3 mm
- STEM – co nejnižší WD&Z

3 Snímkování

Po splnění všech požadavků (vlození vzorku, zapnutí svazku elektronů, zvolení správného módu apod.) je také doporučena změna velikosti stopy (vpravo v nabídce, pro lepší rozlišení nutná co nejmenší – 0) či úpravy napětí v řádu 1 – 30 kV (optimum pro začátek kolem 10 kV, při špatné viditelnosti zvýšit; 30 kV vysoké rozlišení – vhodné pro vodivé povrchy; 5 kV vyšší plasticita – topografie).

4 Typy zobrazovacích módů

Mód LV a LVSTD (environmentální mód pro vzorky s obsahem vody)

V rámci přípravy je doporučeno nejdříve uložit Preset 1 (předvolba), a to dle současného nastavení (v nabídce zaškrtnout vše kromě pozice manipulátoru nebo vlastního výběru). V nabídce SEM vypnout In Beam SE a pro začátek navolit WD&Z na 10 mm. Poté vycentrovat svazek při co největším zvětšení a uložit nastavení jako Preset 2, což je důležité pro pozdější návrat do původního stavu.

Následně je nutné odmontovat zvenčí kryt Peltiera → sundat podstavec v komoře → namontovat do komory Peltiera → nainstalovat clonu do objektivu – pro BSE detektor → nastavit vakuum (UNIVAC) na max. 500 Pa (při změně tlaku vypínat el. svazek); možné také připouštět i vodní páru – ESEM → chlazení/vyhřívání manipulátoru (možno chladit i při otevřené komoře) → PUMP → UNIVAC (např. 15 Pa, zapnout vodní páru) → zapnout LVSTD (možno i BSE) → zapnout el. svazek → mód DEPTH (nejčastěji využívaný pro nalezení signálu).

Na konci práce vypnout Beam on, chlazení, LVSTD, vodní páry a VENT.

BDM (Beam Deceleration mode)

Především u plochých vzorků se používá zpomalení svazku elektronů. Elektronový svazek letí např. při 30 kV (vysokém rozlišení), následně je zpomalen tím, že je na povrchu vzorku přivedený opačný náboj/napětí, což vede k lepší topografii a nižšímu nabíjení.

Využívá se pouze ve vysokém vakuu a zpomalení lze pouze o 5 kV.

STEM – transmisní/prozařovací mód

U tohoto módu se využívají detekční diody s mikroampermetrem, které detekují množství elektronů. Výstupem jsou informace o vzorku.

Držák vzorku je nutné nejprve sešroubovat, protože se jedná o speciální mřížku. Vzorky též musí být připravené buď řezem, barvením, sušením apod.

Mřížka se upne do stolku na pozici 7 (do středu) → zapne se kabel s konektorem do zdířky v přední části komory → zakáže se rotace manipulátoru (v záložce SEM → konfigurace manipulátoru) → HV se nastaví na 30 kV (min 20 kV) – čím vyšší napětí, tím vyšší rozlišení a tím nižší kontrast.

Nejdříve je nutné ověřit obraz v SEM a použít In beam detektory → zaostřit na kovový držák → pracovní vzdálenost WD&Z cca 3 mm → přejít na sítku → přepnout na detektor STEM.

5 Zpracování obrázku (postprocessing)

Co se týče obrázku, je tato funkce velice důležitá. Obsahuje řadu možností jako je například změna jas/kontrast, doostření, kalibrace sady snímků (např. pro obrázky z optického mikroskopu) apod. Je zde možné automatické vypnutí nastavením časovače na vypnutí svazku nebo režim stand by.

Funkcí image snapper je možné poskládat více obrázků (panorama), což lze provést online nebo jako offline sešívání.

Pomocí funkce X-positioner v nástrojích je možné uskutečnit kalibraci více fotek na stejné místo (přehledová vs. reálná). Uložit předchozí obrázek → autokalibrováno → uložit další obrázek → přehledový obrázek při malém zvětšení → kalibrace → korelace obrázků (možný i import). Lze kalibrovat i obrázky jiných mikroskopů, je však nutné je nakopírovat do stejné složky.

Poznámky

Úprava velikosti stopy – 0 – mikroskop sám dopočítá nejmenší stopu při daných podmínkách.

Kombinací kláves Shift + A sejmutí snímku.

Kombinací kláves Shift + B dojde k úpravě autojasu.

Ctrl + šipky provádí jemný pohyb stolku se vzorkem.

Čištění carouselu pomocí izopropylalkoholu.

Nápověda → spustit relaci vzdálené podpory – vzdálený přístup pro servis v případě poruchy.

U vzorků o rozměrech v nanometrech je nutné omezit nabíjení. Pro takové vzorky se používá Beam deceleration mode (BDM), kvalitní vodivé spojení (lepidlo, oblepit páskou), LV mode a nižší urychlovací napětí.

Čáry od nabíjení je možné eliminovat i otáčením vzorku v carouselu.

RBSE je méně citlivý k nabíjení, poté akumulace.

Volby → předvolby → logo text (bude to pak v každém obrázku).

Uchovávat obrázek vždy s textovým souborem, který obsahuje většinu parametrů měření.

Měření profilu se využívá pro materiálové rozdíly a vzdálenosti mezi nimi.

Pokovení překrývá struktury povrchu, je však nevhodné pro malé vzorky s jemným povrchem (prášky).

Doporučuje se zaostřit a vystigmatovat vždy na detail (velké zvětšení – co nejlépe), a následně obrázek oddálit – větší ostrost.

Levá záložka obsahuje funkci *spravovat objekty*, která slouží k výpočtu času stráveného na projektu.

Pravým kliknutím myši na uložený obrázek po otevření v software a výběrem *obnovit parametry mikroskopu* se nastaví aktuální parametry, jako při focení uloženého obrázku.

Pokud se nedaří komoru vypumpovat, je nutné zkontrolovat, zda dvířka dobře těsní.

Pozor na nečistoty a zatékání do komory.

Funkce měření (v živém okně i v uloženém obrázku) nabízí měření vzdálenosti, popisek a úpravu parametrů.

Akumulace (klávesa A) je funkce pro průměrování (snímání více obrazů) využívající se především při nabíjení. Nastavení v parametrech obrazů – živý vs. akviziční. Dva

typy akumulací řádková (jednotky) vs. snímková (klidně i desítky snímků), které lze stopnout při pořizování fotky, když se zdá být obrázek přijatelný. Je však nutné vyzkoušet, který typ je lepší pro daný vzorek. Nutná je vyšší skenovací rychlost (pomalejší sken), aby byl obrázek méně zašuměný bez akumulace.

Klávesové zkratky

<u>Dialogy</u>	
Otevřít obrázek	Ctrl+O
Správce obrázků	Ctrl+M
Tisk	Ctrl+P
Uložit obrázek	Ctrl+S
Vlastnosti	Ctrl+H
<u>Pad</u>	
Zamknout 1. hodnotu	F11
Zamknout 2. hodnotu	F12
Změnit 1. hodnotu (hrubě)	Shift+Left, Shift+Right
Změnit 1. hodnotu (jemně)	Left, Right
Změnit 2. hodnotu (hrubě)	Shift+Up, Shift+Down
Změnit 2. hodnotu (jemně)	Up, Down
Změnit citlivost	<, >
<u>Elektronový svazek</u>	
Continual scanning	Shift+C
Degauss	D
Minimální zvětšení	Shift+M
Sejmout obrázek	Shift+A
Single scan	Shift+S
Spustit / zastavit wobbler	Ctrl+W
Spustit automatické ostření	Shift+W
Spustit automatický jas/kontrast	Shift+B
Vybrat BI jako aktivní funkci	I
Vybrat jako aktivní funkci centrování OBJ	O
Vybrat kontrast/jas jako aktivní funkci	B
Vybrat stigmátory jako aktivní funkci	S
Vybrat WD jako aktivní funkci	W
Vybrat zorné pole jako aktivní funkci	V
Vybrat zvětšení jako aktivní funkci	M
Zapnout/vypnout akumulaci	A
Změnit BI	+, -
Změnit rastrovací rychlost	Num 0 – Num 9
Změnit WD (hrubě)	Shift+Num *, Shift+Num /
Změnit WD (jemně)	Num *, Num /
Změnit zvětšení (hrubě)	Shift+Num +, Shift+Num -
Změnit zvětšení (jemně)	Num +, Num -
<u>Manipulátor</u>	
Pohyb manipulátoru v ose X (pomalu)	Ctrl+Left, Ctrl+Right
Pohyb manipulátoru v ose X (rychle)	Ctrl+Shift+Left, Ctrl+Shift+Right
Pohyb manipulátoru v ose Y (pomalu)	Ctrl+Up, Ctrl+Down
Pohyb manipulátoru v ose Y (rychle)	Ctrl+Shift+Up, Ctrl+Shift+Down
<u>Zásobník</u>	
Kopírovat	Ctrl+C
Vložit	Ctrl+V
<u>Okna</u>	
Aktivovat předchozí okno	Ctrl+Shift+Tab
Přepnutí do dalšího okna	Ctrl+Tab
Přizpůsobit oknu	Ctrl+End
Zavření aktuálního okna	Ctrl+F4
Zmenšit	Ctrl+Page Down
Zvětšení 1:1	Ctrl+Home
Zvětšit	Ctrl+Page Up
<u>Nápověda</u>	
Obsah	F1

Obr. 3: Seznam klávesových zkratk