

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
ÚSTAV TECHNOLOGIE LÉKŮ

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

Studijní materiál a návod pro praktické cvičení

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

Brno 2017

Obsah

1	Moderní mikroskopické metody	- 3 -
1.1	Optická (světelná) mikroskopie	- 3 -
1.2	Elektronová mikroskopie	- 4 -
2	Skenovací elektronový mikroskop	- 7 -
2.1	Příprava vzorků	- 9 -
2.2	Zdroj elektronů	- 10 -
2.3	Elektromagnetické čočky	- 13 -
2.4	Umístění preparátu	- 14 -
2.5	Detektory sekundárních a zpětně odražených elektronů	- 14 -
2.6	Záznam a zpracování (postprocessing) obrázku	- 17 -
3	Mikroskopické pozorování povrchu orálních filmů	- 18 -

1 Moderní mikroskopické metody

V dnešní době existuje řada mikroskopických technik a jejich aplikací, jež mají důležité uplatnění v mnoha vědeckých oborech, a které v poslední době přispěly k mnoha objevům (např. sledování změn v živých buňkách). Pro určení tvaru a povrchu pevných částic v prášcích, granulátech, aerodisperzích a suspenzích, pozorování vzhledu lékových mikroforem (pelet, mikročástic, nanočástic), hodnocení struktury neobalených i obalených tablet a filmů nebo měření velikosti kapek v emulzích a krémech je ve většině případů nezbytná jejich vizualizace. K zobrazování se většinou využívá mikroskopů, ať už optických či elektronových. Hodnocení systému mikroskopickými metodami poskytuje velmi cenné informace nejen o tvaru, ale i o velikosti, mikrostruktuře, povrchové topografii a textuře povrchu, pórovitosti a mnohdy také o fyzikálním stavu a distribuci látek v konečném produktu. Mikroskopické metody je možné rozdělit podle různých kritérií, např.: podle způsobu zobrazení předmětu – mikroskopie světelná, elektronová, sondová; podle prohlížení objektu – zobrazení všech bodů najednou (např. prosvětlovací elektronová mikroskopie) nebo postupně rastrováním povrchu (např. skenovací elektronová mikroskopie); podle osvětlení objektu – mikroskopie v procházejícím světle (prozařovací techniky) nebo v dopadajícím světle; atd. Každá mikroskopická metoda má své výhody a nevýhody, liší se svým principem, rozlišovací schopností, mírou zvětšení i nároky kladenými na přípravu vzorku.

1.1 Optická (světelná) mikroskopie

Přestože se vzestupem elektronové analýzy se dostala optická mikroskopie do pozadí, v praxi, zejména ve farmaceutické technologii je stále hojně využívána především k určení morfologie lékových forem (velikost a tvar). Metody optické mikroskopie jsou založeny na interakci viditelného světla s preparátem. Pomocí ní je možné pozorovat mikroskopické objekty a struktury do 1000 násobného zvětšení bez speciálních úprav mikroskopu a při běžné úpravě a rozložení vzorků na skleněné podložce (Tab. 1).

<i>Mikroskopická technika</i>	<i>Dosažitelné rozlišení</i>
<i>Prosté oko</i>	~ 0,1 mm
<i>Světelná mikroskopie</i>	~ 0,2 μm
<i>Skenovací elektronová mikroskopie</i>	> 2 – 3 nm
<i>Transmisní elektronová mikroskopie</i>	> 0,1 nm
<i>Mikroskopie rastrovací sondou</i>	~ 0,1 nm

Tab. 1: Rozlišovací schopnost mikroskopických technik

1.2 Elektronová mikroskopie

Mikroskopické zobrazovací techniky využívající proudy elektronů můžeme rozdělit dle způsobu vytváření obrazu do dvou základních skupin. Všeobecně známé jsou mikroskopické techniky, kdy je preparát pozorován jako celek. Záření prošlé nebo difraktované preparátem je pak zpracováno zobrazovací soustavou a výsledkem je obraz pozorovaného objektu. Příkladem je transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie (TEM). Druhým typem zobrazovacích zařízení jsou rastrovací (skenovací, řádkovací) mikroskopy. Ty preparát zkoumají bod po bodu a celý obraz pak vzniká složením jednotlivých signálů. Typickým příkladem je skenovací elektronová mikroskopie (SEM).

Mezi hlavní výhody elektronové mikroskopie patří velké zvětšení (až 1 000 000 krát), velké rozlišení (řádově až desetiny nanometrů) a velká hloubka ostrosti (několik mm). Výhodou je také to, že elektronový mikroskop je schopen poskytnout nejen informace o topografii vzorku, ale také o jeho materiálovém složení. Nevýhodami jsou zejména velké nároky na prostor, vysoká pořizovací cena a také nutnost umístění vzorku v komoře s nízkým tlakem.

Rovněž jako při světelné mikroskopii využívají optické mikroskopy viditelného světla, tak elektronové mikroskopy využívají pro zobrazení pozorovaných objektů svazku elektronů urychlených ve vakuu.

Elektronové záření, stejně jako světlo a jiné formy záření má duální charakter – má vlastnosti částic i vln. Podle Luise de Broglieho může být pohybujícímu se elektronu přiřazena také vlnová délka:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

kde h je Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js), m je hmotnost elektronu ($9,109 \cdot 10^{-31}$ kg) a v je rychlost elektronu.

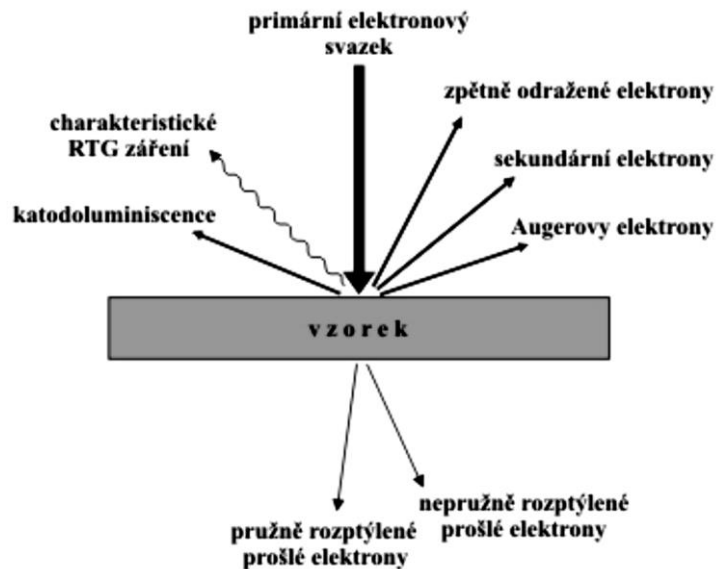
Elektron je výhodný díky svému zápornému náboji, který jej umožňuje urychlovat elektrickým napětím U , přičemž ten následně získá kinetickou energii:

$$E_k = eU = \frac{1}{2}mv^2 \Rightarrow v = \left(2 \frac{eU}{m}\right)^{\frac{1}{2}}$$

kde e je náboj elektronu ($1,602 \cdot 10^{-9}$ C), U je urychlovací napětí (V), m je hmotnost elektronu a v je jeho rychlost.

Během interakce urychlených elektronů s hmotou vzorku dochází k rozptylu elektronů a následnému brždění v poli jader a elektronových obalů atomů vzorku. Tak vznikají signály, jež přinášejí informace o elementárním složení zkoumaného objektu (topografie povrchu vzorku, chemické složení, rozložení elektrických a magnetických polí, atd.).

Jednoduše lze interakce mezi primárními elektrony a atomy vzorku rozřadit do dvou skupin, a to na pružné (elastické kolize), které mají za příčinu vznik zpětně odražených elektronů a nepružné (neelastické), při nichž dochází k předávání energie primárních elektronů atomům vzorku a následnému uvolnění sekundárních a Augerových elektronů, RTG záření a katodoluminiscenci (Obr. 1). U TEM pronikají elektrony skrz pozorovaný preparát, kde mohou být interakcemi s ním odchylovány od původního směru, než se pohyboval hlavní svazek. Většina takto odchylených elektronů je pomocí clony ze svazku vyloučena. Obraz je následně tvořen dopadem převážně neodchylených elektronů na zobrazovací systém.



Obr. 1: Signály vyvolané interakcí urychleného elektronového svazku s materiálem vzorku

Druhy signálů zachytitelné při elektronové mikroskopii

Primární elektrony ($10^3 - 10^5$ eV) – detekují se u TEM. Část primárních elektronů je pohlcena vzorkem (absorbované elektrony). Obraz je vytvořen na základě rozdílné „propustnosti“ elektronů.

Sekundární elektrony (SE) – jsou elektrony uvolněné po dopadu primárního svazku mající menší energii a detekující se u SEM. Jsou uvolněny z tenké povrchové vrstvy a jsou nosiči informací o povrchové topografii. Obraz je následně vytvořen na základě různé emise sekundárních (resp. i odražených) elektronů v závislosti na chemickém složení vzorku.

Zpětně odražené elektrony (BSE) – jejich energie je srovnatelná s energií primárního elektronového svazku, detekují se rovněž u SEM. Vystupují z větší hloubky a nesou informaci o lokálních změnách materiálu (morfologické a chemické složení materiálu).

Augerovy elektrony (AE) – pomocí nich lze provádět prvkovou analýzu. Jestliže je elektron z vnitřních vrstev elektronového obalu atomu vyražen (např. primárním elektronovým svazkem) a v této vrstvě zůstane nezaplňená slupka, pak dojde k přesunu elektronu z vnější vrstvy elektronového obalu do této nezaplňené vnitřní slupky. Uvolněná energie pak může být vyzářena formou fotonu (RTG záření) nebo v některých případech je předána jako kinetická energie jinému elektronu ve vnitřní slupce, který tím získá dostatečnou energii pro opuštění atomu. Vyražené elektrony jsou označovány jako Augerovy elektrony. Zda bude vzniklá energie

vyzářena formou RTG záření nebo Augerovými elektrony, závisí na atomovém čísle prvku, v němž se tento děj odehrává. Platí, že Augerovy elektrony se spíše projevují u lehčích prvků.

Rentgenové záření – je vybuzeno dopadem primárního svazku elektronů a je nositelem informace o chemickém složení preparátu (emisní RTG spektrum). Ve spolupráci s elektronovými mikroskopy je používaná technika RTG analýzy s rozptylem (EDAX). EDAX měří intenzitu rentgenového záření a jeho energii. Energie RTG záření je pak charakteristická pro jednotlivé chemické prvky, následným porovnáním s dostupnými charakteristikami je možné provést identifikaci jednotlivých prvků, jež jsou přítomné ve vzorku.

Katodoluminiscence – energie vyzářená formou infračerveného, ultrafialového či viditelného záření. Využívá se především ve specializovaných aplikacích, jako je krystalografická analýza geologických preparátů.

2 Skenovací elektronový mikroskop

SEM (scanning electron microscope) neboli skenovací (rastrovací, řádkový) elektronový mikroskop je určen především k pozorování povrchu vzorků (Obr. 2). Využívá k zobrazování pohyblivý svazek elektronů. Jedná se o nepřímou zobrazovací metodu, a to z důvodu tvorby obrazu pomocí sekundárního signálu. Tato metoda poskytuje velkou hloubku ostrosti – trojrozměrný aspekt. Elektrony interagující ve vzorku s atomy produkují různé signály, jež mohou být zachyceny. Z nich následně získáváme informace o topografii povrchu a složení vzorku. Metodou skenovací elektronové mikroskopie lze dosáhnout v ideálním případě rozlišení lepšího než 1 nanometr. Vzorky je možné pozorovat ve vysokém vakuu, při nízkém vakuu, za mokra i v širokém rozsahu kryogenních a zvýšených teplot.

Nejvyužívanějším módem v SEM je detekce sekundárních elektronů emitovaných atomy, které byly vybuzeny elektronovým paprskem. Počet sekundárních elektronů závisí na úhlu, pod kterým paprsek dopadá na povrch. Skenováním vzorku a sběrem sekundárních elektronů pomocí speciálního detektoru se vytvoří snímek topografie povrchu.

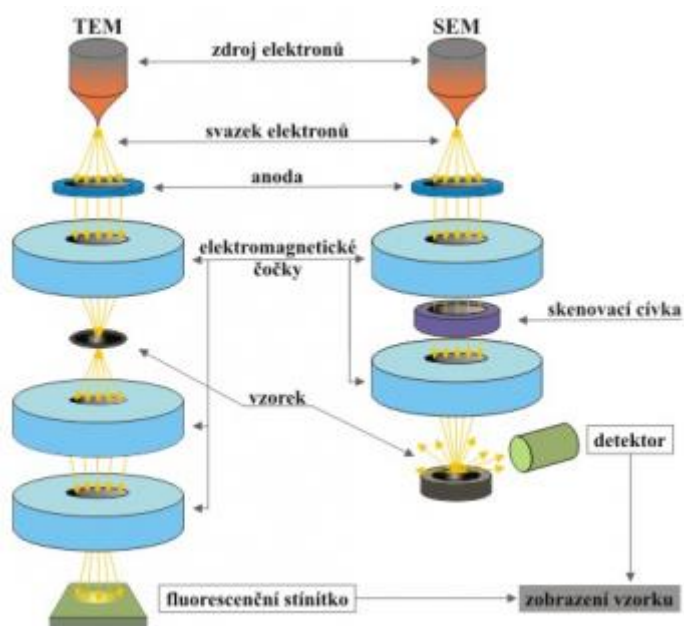


Obr. 2: Skenovací elektronový mikroskop Tescan MIRA 3

Výstupy SEM:

- Studium povrchů
- Rozměry objektů a jejich částí
- Prvková spektra

Konstrukce přístroje (Obr. 3)



Obr. 3: Schématické znázornění skenovacího (vpravo) a transmisního (vlevo) elektronového mikroskopu

Po prvním pohledu na skenovací elektronový mikroskop (SEM) jsou patrné výrazné rozdíly v konstrukci přístroje ve srovnání s transmisním typem (TEM). Významná je především délka tubusu, která je u SEMu poloviční oproti TEMu. Tento rozdíl je dán tím, že u skenovacího elektronového mikroskopu se detekují signály, jež primární svazek elektronů uvolnil nad povrchem preparátu, není tak potřeba soustava čoček, které u transmisního elektronového mikroskopu vytváří zobrazovací systém ve spodní části tubusu. Namísto toho má SEM k dispozici detektory sekundárních a odražených elektronů a elektroniku na zesílení a zpracování signálu a také na tvorbu obrazu.

Zisk obrazu v SEMu je založen na interakci primárního svazku elektronů s povrchem preparátu. Součástí dolní části tubusu je komora s preparáty, která je ve srovnání s TEMem značně rozměrná. V komoře se nachází goniometrický stolek, na který se upevňují vzorky a s nímž je možné otáčet či jej naklánět.

2.1 Příprava vzorků

Preparáty je nutné vždy pro elektronový mikroskop specificky připravovat, a to z několika důvodů:

- Vzorek nesmí obsahovat vodu (pokud se nepoužívá environmentální mód)
- Vzorek musí být stabilní pod svazkem elektronů
- Biologický materiál musí být zafixován, aby u něj nedocházelo k posmrtným změnám
- Vzorek by měl být elektricky vodivý, aby nedocházelo k jeho nabíjení elektrony

Z důvodu tepelné a elektrické nevodivosti u většiny pozorovaných vzorků, dochází při jejich prohlížení pomocí SEM, k nabíjení rastrovaného povrchu. Důsledkem je odklon primárních elektronů, které zahltí prostor sekundárních elektronů. Na obrazovce je pak možné pozorovat v závislosti na intenzitě nabíjení bílé řádky až celkovou pulzaci obrazu.

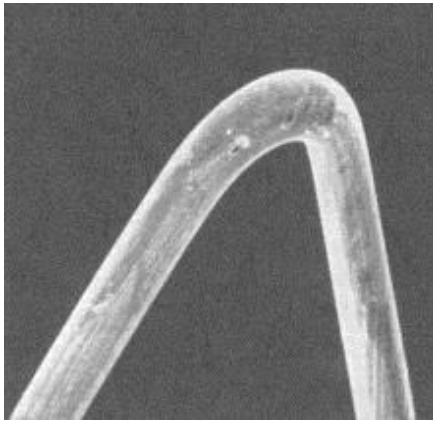
Protože objekty ve vysokovakuovém SEM musíme stejně jako v případě TEM pozorovat vysušené, kdy nejsou elektricky vodivé, musí se před vlastním pozorováním potáhnout tenkou vrstvou kovu (zlato, stříbro, platina, uhlík nebo slitina platiny a paladia) s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí. Tloušťka vrstvy se pohybuje v řádech desítek nm. K pokovení slouží tzv. naprašovací zařízení. Vrstva kovu zajistí odvod záporného náboje a tepla, ve které se přemění většina energie urychlených primárních elektronů. Teplo, které lokálně ve vzorku uvolňují primární elektrony, je velké a projevuje se např. kontaminací skenované oblasti, pohybem preparátu pod svazkem nebo přímo jeho poškozením, např. popraskáním.

2.2 Zdroj elektronů

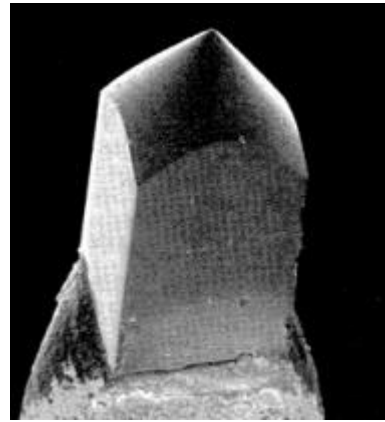
Zdroj elektronů elektronového mikroskopu je nazýván elektronová tryska (popř. elektronové dělo). Rozlišujeme:

- Termoemisní zdroj (wolframové vlákno, krystal LaB_6) – díky průchodu elektrického proudu dojde k zahřátí vlákna a následnému úniku elektronů.
 - Wolframové vlákno (Obr. 4) se vyznačuje nízkou vstupní energií, vysokým bodem tání, nízkou hodnotou vakua nutného pro provoz, žhavením na 2800 °C a životností cca 1 měsíc.

- Oproti tomu krystal LaB₆ (Obr. 5) emituje 10x více elektronů, než wolframové vlákno, nažhaví se na 2100 °C a jeho životnost je rok.

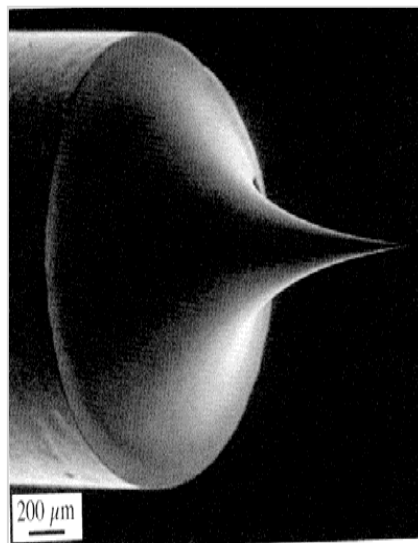


Obr. 4: Wolframové vlákno



Obr. 5: Krystal LaB₆

- Autoemisní zdroj (FEG) – elektrony jsou emitovány studeným wolframovým vláknem, které je vyleptané do hrotu
 - Autoemise (studená emise) je vyvolaná silným elektrickým polem. Studené wolframové vlákno je vyleptáno do tvaru hrotu (Obr. 6). Proti hrotu se nachází elektroda s kladným napětím, tudíž je kolem hrotu elektrické pole. To vede k následnému vytrhávání elektronů z povrchu hrotu. Nevýhodou však je nutná vysoká hodnota vakua. Životnost je až několik let.



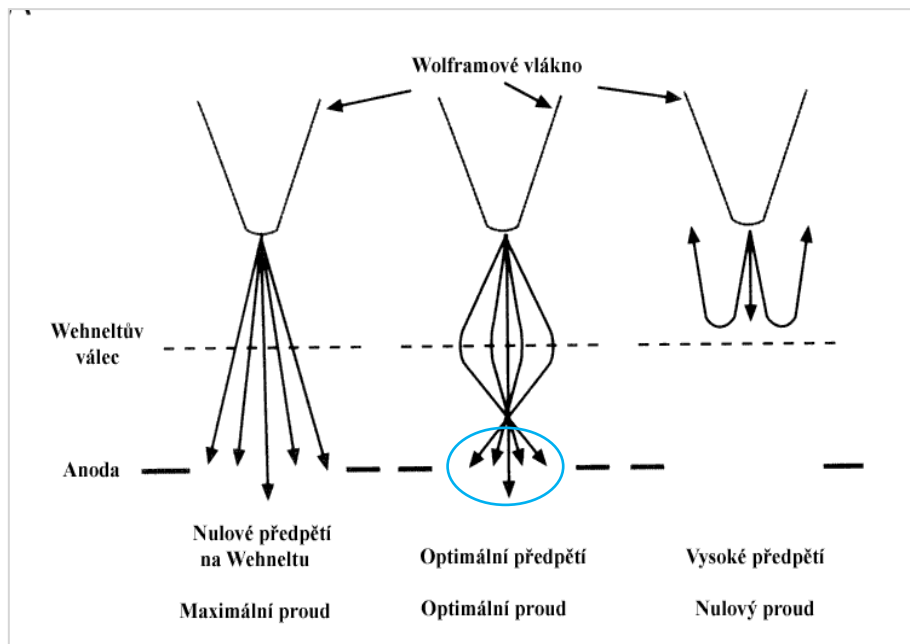
Obr. 6: Autoemisní zdroj

- Schottkyho zdroj – vhodná velikost, jas, životnost a větší stabilita než chladný emisní zdroj. Má nižší hodnotu vakua než chladná emise. Na rozdíl od hrotových zdrojů má vyšší odolnost a kratší tzv. zotavovací dobu. Využívá Schottkyho jevu, který je možné popsat jako zvýšení průtoku elektronů z povrchu zahřátého materiálu vlivem elektrického pole. Schottkyho zdroj se skládá z monokrystalického wolframového drátu, jež je na jednom konci vyleptaný do hrotu, zakončeného ploškami krystalových rovin (Obr. 7). Na druhém konci monokrystalického drátu se nachází svár polykrystalického wolframového drátu o přibližně stejném průměru. Životnost je cca rok.



Obr. 7 – Schottkyho zdroj

Elektronová tryska/dělo je tvořena katodou, jež je obklopena tzv. **Wehneltovým válcem**, který má naproti špičce vlákna katody otvor. Za válcem se nachází anoda, která má uprostřed otvor a je uzemněna. Wehneltův válec tvoří v okolí vlákna katody elektrické pole, jež způsobuje, že svazek elektronů emitovaných z katody zužuje tak, že těsně před otvorem anody vytvoří křížičku, tedy nejužší místo svazku. Takové místo lze pak považovat za bodový zdroj urychlených elektronů (Obr. 8). Elektrostatická optika promítající obraz emisního hrotu (křížičku do otvoru anody) musí být schopna zajistit co nejdokonalejší kruhovitost průmětu vlákna v křížičce tak, aby bylo možné považovat zdroj elektronů za bodový a koherentní.



Obr. 8: Schématický náčrt elektronové trysky

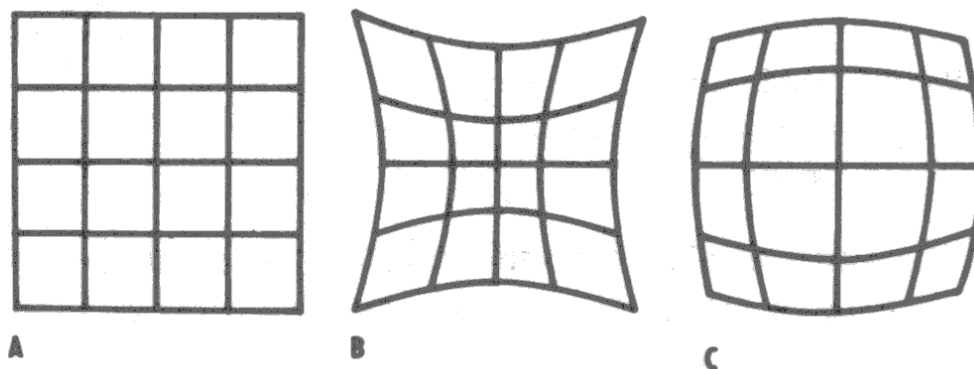
Následně pak dráha, rychlost a šířka svazku elektronů musí být upravena systémem clonek a čoček, které společně s elektronovou tryskou tvoří ozařovací soustavu elektronového mikroskopu.

2.3 Elektromagnetické čočky

Jsou další součástí elektronového mikroskopu. Jsou to prstence vyrobené z velmi čistého a měkkého železa, jež jsou zasazené v cívkách. Pracují výhradně ve vakuu. Jejich hlavním úkolem je co největší zmenšení průměru svazku elektronů, které dopadají na povrch preparátu. Soustava čoček je ve většině případů tvořena jednou nebo dvěma kondenzorovými čočkami a objektivovou čočkou.

Vady elektromagnetických čoček (Obr. 9):

- Sférická vada – je to neschopnost zaostření paprsků z bodového zdroje do daného bodu. Důsledkem je jiné zvětšení v krajích, než uprostřed obrazu. Velikost sférické vady závisí na ohniskové vzdálenosti čočky, čím je vzdálenost vyšší, tím větší je i vada. Korekce pomocí clony.



Obr. 9: Deformace obrazu vlivem sférické vady: A – nezkraslený obraz, B – poduškovité zkreslení, C – soudkovité zkreslení

- Chromatická vada – je způsobena rozdílnou energií elektronů ve svazku. Tuto vadu je možné snížit zlepšením koherentnosti a monochromaticnosti elektronového svazku, čehož lze docílit maximální stabilizací urychlovacího napětí mikroskopu. Zcela odstranit tuto vadu nelze.
- Osový astigmatismus – způsoben nesymetrií magnetického pole, elektrony pak procházejí čočkou v různých rovinách, mají různé ohnisko. Zdrojem jsou nečistoty na vnitřních plochách mikroskopu.

2.4 Umístění preparátu

V dolní části tubusu mikroskopu se nachází komora, jež je ve srovnání s TEM mnohem větší. V komoře se nachází goniometrický stolek, jehož součástí je držák, na který se upevňují vzorky. V blízkosti vzorku jsou umístěny detektory jednotlivých signálů – sekundárních a odražených elektronů, apod.

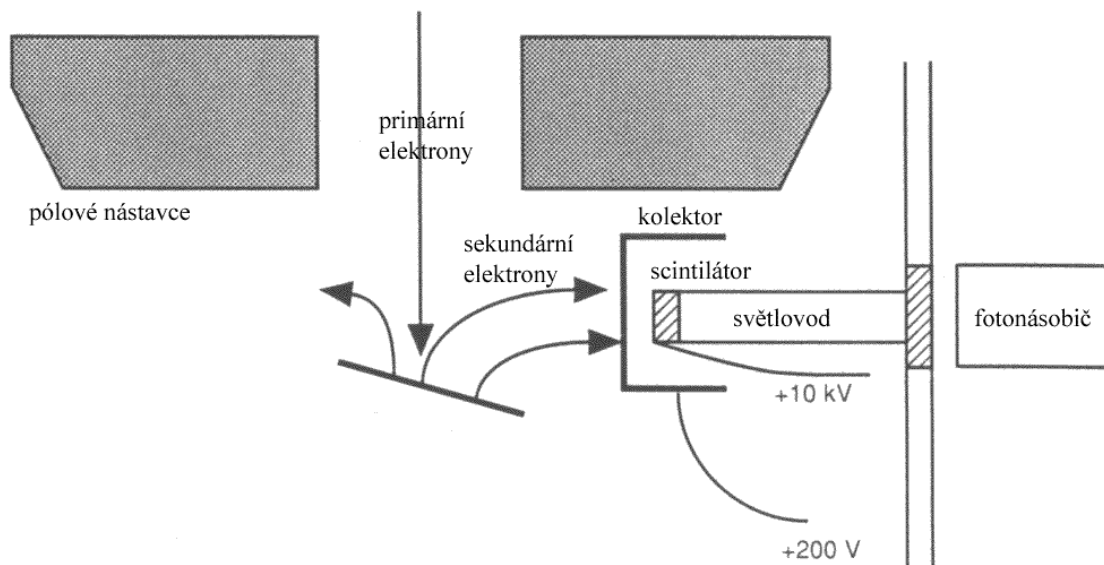
2.5 Detektory sekundárních a zpětně odražených elektronů

Detekce sekundárních elektronů (SE) zprostředkovává komunikaci mezi dějem, který se odehrává při interakci primárních elektronů s povrchem preparátu, během něhož dochází k uvolnění sekundárních elektronů, a obrazovkou mikroskopu, na níž jsou přenášeny informace získané zachycením sekundárních elektronů o topografickém kontrastu zkoumaného vzorku.

Detektor sekundárních elektronů by měl splňovat následující požadavky:

- Vysoká citlivost – signál zachycovaný detektorem je 1 pA – 1 nA.
- Široký dynamický rozsah – signál se může měnit z bodu na bod 1:1000 a větším.
- Účinnost – detekce slabého signálu, navíc v neideální pozici. Jeho účinnost pak limituje konečnou kvalitu obrazu.
- Malá velikost – u větších zvětšení je nezbytné pracovat s malou pracovní vzdáleností, tedy tak, aby byl preparát co nejbližší elektromagnetickým čočkám, pomocí nichž dochází k formování paprsku. Díky malé velikosti detektoru je snazší jeho optimální umístění.
- Odolnost – detektor má své místo v komoře preparátů, která často bývá zavzdušněna, zejména při výměně vzorku. Detektor proto musí být odolný vůči změnám tlaku, světla či vzdušné vlhkosti.
- Nízká cena a dlouhá životnost

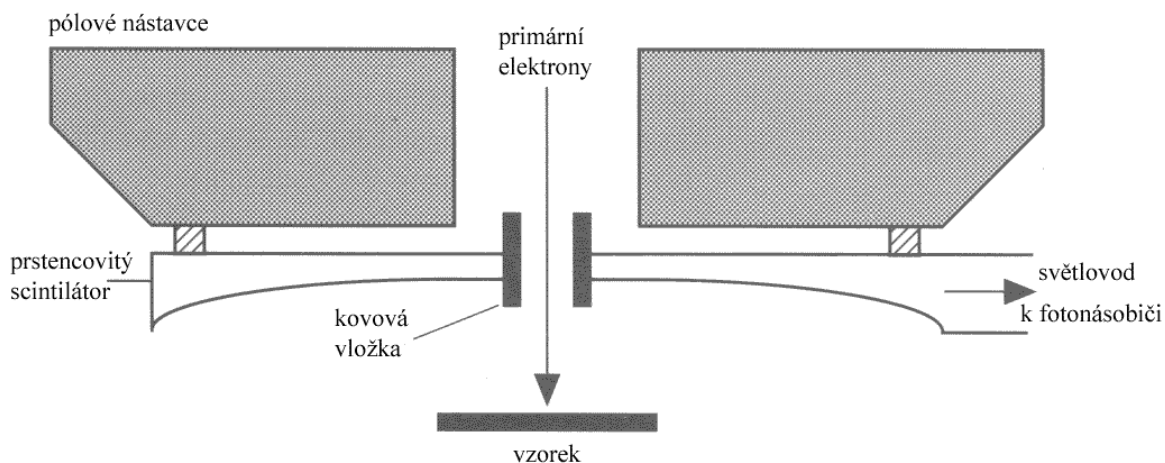
Detektor SR je jedním z nejčastěji využívaných detektorů. Jeho součástí je scintilátor, který po dopadu uvolní záblesk světla, jehož intenzita je přímo úměrná energii elektronů, jež ho vyvolaly. Na přední straně scintilátoru se nachází tenký kovový film, na nějž je přiveden potenciál o hodnotě 10 kV, který urychlí dopadající elektrony, aby měly dostatečnou energii na vyvolání světelného pulsu. Světlo dále prostupuje přes světlovod a komoru opouští křemenným okénkem. Mimo komoru se nachází fotonásobič, jež zachytí světelný signál, který převede na elektrický, přičemž dojde k několikanásobnému zesílení signálu. Nevýhodou detektoru je omezená životnost scintilátoru. Detektor bývá umístěn do systému Faradayovy klece s předpětím 200 V proto, aby nedocházelo k ovlivňování napětí na scintilátoru dopadem primárních elektronů. Díky tomu tedy dochází k procesu, kdy na scintilátor dopadne 60 % uvolněných sekundárních elektronů, ale nedojde k ovlivnění primárního svazku elektronů (Obr. 10).



Obr. 10: Schéma detektoru sekundárních elektronů (Everhart – Thornleyova)

Detektor zpětně odražených elektronů (BSE)

Má jiné uspořádání, než detektor sekundárních elektronů. Scintilátor detektoru je umístěn na okraj pólových nástavců poslední elektromagnetické čočky, v nejuhodnější geometrické poloze pro zachycení odražených elektronů (Obr. 11). Jeho účinnost záchytu je více než 50 %.



Obr. 11: Schéma detektoru zpětně odražených elektronů

Polovodičový detektor (STEM)

Polovodičový detektor pracuje na principu vzniku páru elektron – díra v polovodiči díky elektronům s vysokou energií. Dojde-li ke kontaktu mezi prošlým elektronem a

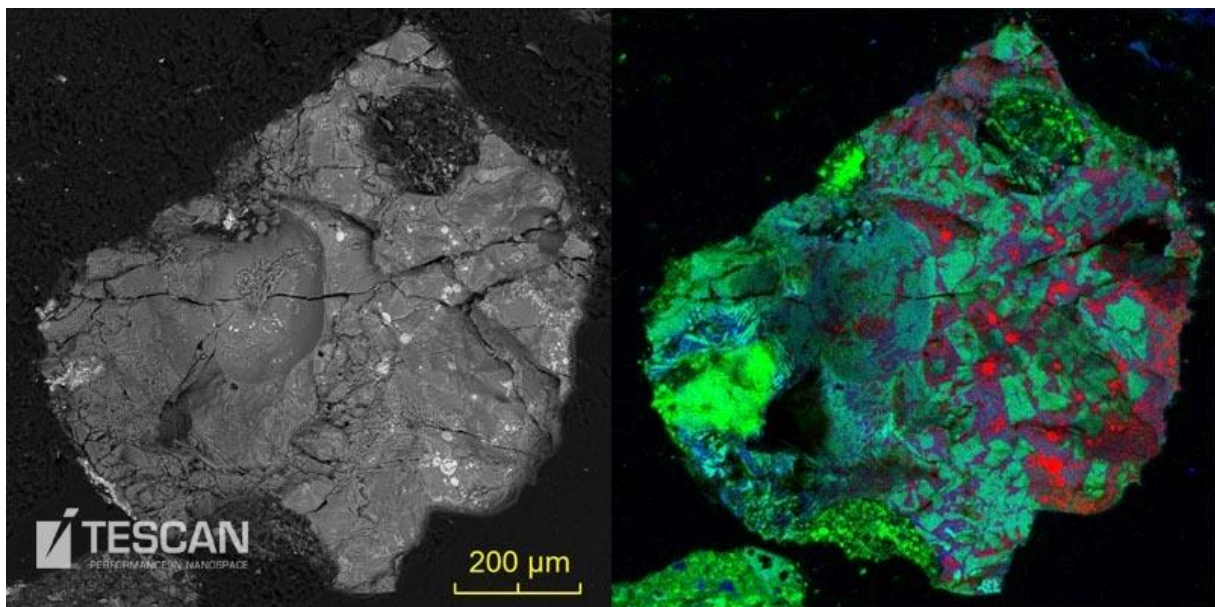
polovodičem, dojde zároveň v polovodiči k přemístění elektronů z valenčního pásu do vodivostního pásu. Jeho hlavní výhodou je tvar (tenký), díky němuž je umístěn velmi blízko vzorku a může zajišťovat velký prostorový úhel sběru. Jako detektor prošlých elektronů se umísťuje pod vzorek. Vzhledem k tomu, že princip detektoru závisí na dodání vnější energie, může fungovat pouze jako detektor zpětně odražených nebo prošlých elektronů. Tento detektor je ovlivňován i jinými typy záření, jako jsou RTG záření či viditelné světlo z katodoluminiscence.

EDS (energiově disperzní analyzátor) je založený na principu detekce rentgenového záření. Výstupy jsou spektra četnosti rentgenového signálu v jednotlivých energetických oknech. Využívá se pro analýzu chemického vzorku. Tato metoda je schopná zjistit, které prvky a v jakém množství se nacházejí ve vzorku.

2.6 Záznam a zpracování (postprocessing) obrázku

Běžným výstupem ze SEM je fotografie (obrázek). Výhodou rastrovacího elektronového mikroskopu je schopnost zobrazovat poměrně velkou plochu vzorku a schopnost zobrazovat sypké materiály (nejen tenké filmy či fólie).

Co se týče obrázku, je funkce postprocessing velice důležitá. Obsahuje řadu možností jako je například změna jas/kontrast, doostření, kalibrace sady snímků (např. pro obrázky z optického mikroskopu) apod. Výsledný obrázek se dá poté různě dobarvovat (Obr. 12).



Obr. 12: Skleněné částice bohaté na měď, zobrazení pomocí detektoru BSE, následné dobarvení (vpravo)

3 Mikroskopické pozorování povrchu orálních filmů

Nejprve je potřeba se **přihlásit** přes svůj **uživatelský účet** do programu MIRA TC. Každý uživatel má svůj vlastní.

Poté 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**, poté se může komora otevřít.

Pokud je vzorek nevodivý a nabíjí se (viditelné např. jako čáry přes obraz), pak je důležité jej pokovit pomocí **naprašovačky** – Quorum technologies, typ Q150R ES (Laughton, UK).

- otevřít ventily na dusík i bombu na argon – vstupní tlak 0,3 bar
- vložit vzorek vodivě zafixovaný na stubu do komory naprašovačky
- spustit program 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 si vzorek, který bude pozorován (pozn. pravým tlačítkem myši na číslo vzorku je možné si jej pojmenovat).

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.

Před samotným měřením dojde k výběru detektoru. Nejčastěji se používá detektor SE, který detekuje sekundární elektrony a je výborný pro zjišťování topografie (povrchu).

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

Prvním krokem měření je důležité najít měřený objekt pomocí trackballu (v režimu FIELD) a jemného posuvu vzorku (Ctrl + šipky). WD&Z nastavit u vzorku filmu na 5 mm. Urychlovací napětí 5 kV (citlivý vzorek).

Následně je nutné vybrat rastrovací režim, nejčastěji se využívá RESOLUTION. Pokud je obraz moc tmavý, je možné použít tlačítko Jas/kontrast, kterým se kontrast manuálně upraví nebo jednodušší volbou je tlačítko Autokontrast.

Poté je potřeba vybrat rastrovací rychlost. Pro začátek se používá vyšší (2-3), až pro výslednou tvorbu obrazu pomalejší (7-8) – vlastní snímkování.

Pomocí tlačítka MAG (zvětšení) dochází k úpravě pracovní vzdálenosti. Řídí se pomocí trackball pro přibližování či případné oddalování. Pro přesunutí dané části obrazu do středu, je nutno kliknout na vybranou část kolečkem myši. Ve chvíli, kdy se vzorek zdá být dostatečně přiblížený se přejde k ostření, což probíhá pomocí funkce WD.

V případě, že dochází k astigmatismu, což je možné definovat jako rozmazané okraje v jedné ose, je nutno použít stigmátory. K zaostření dochází opět pomocí trackballu. Jestliže je obraz prodloužen v nějakém směru, doporučuje se použití manuálního centrování tubusu. Trackballem se pak pohybuje ve směru vychýlení (tlačítko na klávesnici **F11 blokuje osu x, F12 blokuje osu y**), dokud obraz nepřestane kmitat a pouze pulsuje.

Použitím klávesy D dojde k úpravě obrazu po změně parametrů, módu, centrování, změně urychlovacího napětí, apod. Slouží hlavně pro vylepšení obrazu, tedy nové ustavení magnetického pole.

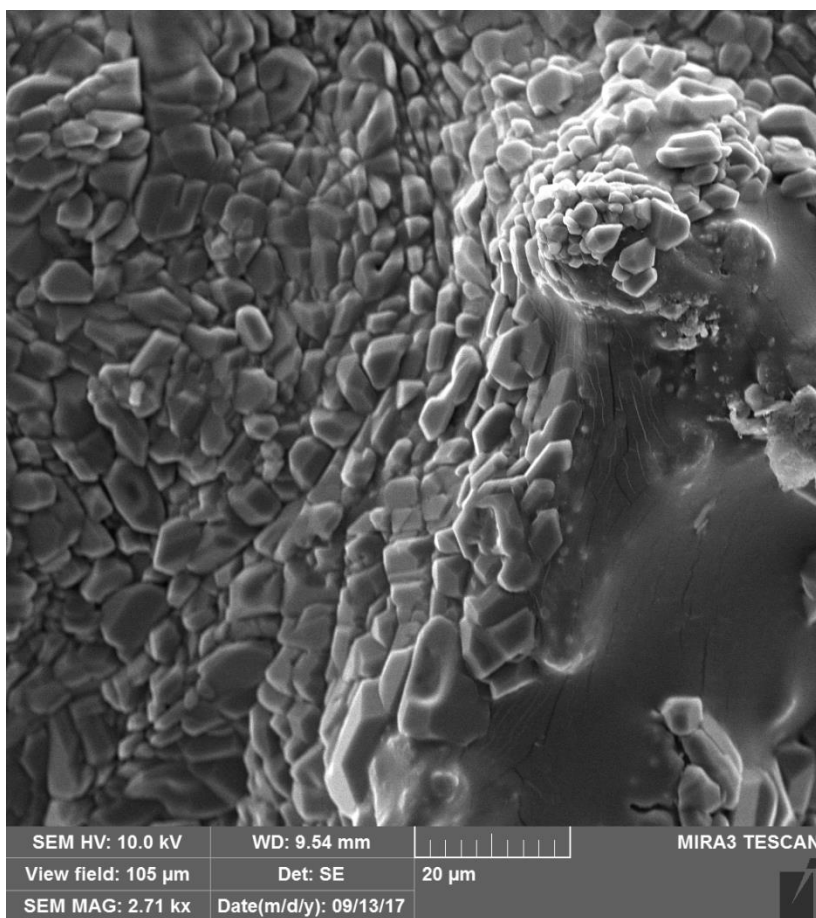
Po splnění všech požadavků (vlození vzorku, zapnutí svazku elektronů, zvolení správného módu apod.) je také doporučena změna velikosti stopy (vpravo v nabídce, pro lepší rozlišení nutná co nejmenší – 0) či úpravy napětí v řádu 1 – 30 kV (optimum pro začátek kolem 10 kV, při špatné viditelnosti zvýšit;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

Zpracování obrázku (postprocessing) je důležitá funkce, která 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 (panoramát), 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.



Obr. 13: Pokovený (Au) povrch orálního filmu

Měření ODF je možné pomocí Předvolby, nebo využitím podobných parametrů:

```
ODF 2kx_2
Rastrovací rychlost: 2 (320 ns)
Řádková akumulace: 50 snímků
Zorné pole: 106.50 µm
BI: 16.07
Scan mode: RESOLUTION
HV: 5.00 kV
WD: 10.000 mm
Stigmátory: 9.4 % / 6.1 %
Rotace: 0.0 °
Posun obrazu: 0.0 µm / -0.0 µm
Detektor: SE (29.9 % / 85.3 %)
In-Beam režim: ON
Posun trysky: 0.0 % / 0.0 %
Náklon svazku: -0.7 % / 0.5 %
IML cen.: -4.8 % / -15.9 %
OBJ cen.: 0.0 % / 0.0 %
Degauss
Poměr stran: 1.000/1.000
Jemná kalibrace zvětšení: 0.000
Korekce rotace: 0.00
```

- Vždy je nutné jemné doladění ostrosti s vypnutou akumulací v Parametry obrazu – mírně poladit v malém okénku WD ($\pm 0,10$ mm) – změnit lehce WD i zvětšení
- Po doostření zapnout zpátky akumulaci a fotit (Shift A)