**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Сканирующая электронная микроскопия** |  | **ОФС.1.2.1.0001** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Метод сканирующей электронной микроскопии является электронно-оптическим методом наблюдения (визуализации) и исследования изображений поверхности, а также получения информации о составе и некоторых других свойствах испытуемых образцов веществ, применяемых в фармацевтической практике.

По сравнению с традиционной оптической (световой) микроскопией (ОФС «Оптическая микроскопия»), сканирующая электронная микроскопия позволяет исследовать испытуемые образцы при более высоких увеличениях, например, 250000 × по сравнению с увеличением 1000 × в оптической микроскопии, с большим разрешением по плоскости (например, 3 нм или больше по сравнению с примерно 200 нм в оптической микроскопии), а также с большей глубиной резкостью. Для исследования деталей испытуемого образца размером до 10 нм могут быть применены самые простые системы сканирующей электронной микроскопии.

Совместное использование сканирующей электронной микроскопии и элементного рентгеновского микроанализа (ОФС «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия») позволяет получать данные об элементном составе испытуемого образца и осуществлять его элементное картирование.

**Область применения**

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) может быть применена для исследования и определения характеристик широкого спектра твёрдых веществ, используемых в фармацевтической практике: исходные материалы; сырьё; фармацевтические субстанции; вспомогательные вещества; нерасфасованная продукция; лекарственные препараты; материалы первичной и вторичной упаковки и т.д.; вещества в мягком и жидком агрегатных состояниях при использовании специальных методов подготовки образцов.

Исследование веществ методом сканирующей электронной микроскопии проводят на различных этапах обращения лекарственных средств: при фармацевтической разработке, технологическом процессе производства, контроле качества готового лекарственного препарата и т.п.

Изучение изображений, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, позволяет качественно и количественно оценить однородность и постоянство порошков, находящихся в качестве сырья или после обработки, например, после технологического процесса прессования в виде таблеток, в отношении формы, размеров и распределения частиц в порошках, а также текстуры, пористости и формы кристаллов. Эта информация может коррелировать с профилем растворения, биодоступностью и степенью кристалличности веществ в твёрдых лекарственных формах. Сканирующая электронная микроскопия имеет особое значение для поддержки разработки и оптимизации производственных процессов для большинства твёрдых лекарственных форм, таких как таблетки, порошкообразные смеси для приготовления суспензии для приёма внутрь, гранулы, порошки для ингаляций, порошки лиофилизированные или распылительной сушки, порошки для приготовления растворов для парентерального применения.

Сканирующая электронная микроскопия может быть использована для получения дополнительной информации при разработке методов определения размера частиц, включая возможность распределения частиц по размеру. Кроме того, используя сканирующую электронную микроскопию можно не только определить механические включения в лекарственных препаратах для парентерального применения, но и установить источник загрязнения.

**Метод**

Для получения увеличенных изображений в методе сканирующей электронной микроскопии используют точно сфокусированный пучок ускоренных электронов вместо источника света, как в оптической микроскопии. Увеличение разрешающей способности реализуется за счёт того, что длина волны электронного пучка в три раза меньше длины волны видимого света. Сфокусированный пучок электронов сканирует (растрирует) поверхность испытуемого образца с применением различных типов детекторов, в результате чего генерируются различные типы сигналов, используемые для получения соответствующей информации об испытуемом образце.

Электроны, находящиеся в сканирующем электронном пучке, называемые *первичными* (ускоренными, бомбардирующими, падающими), не только взаимодействуют с поверхностью образца, но и проникают с поверхности образца на глубину до нескольких десятков микрометров. Взаимодействие, рассеивание, поглощение электронов происходит на участке испытуемого образца чуть ниже его поверхности, известном как объём взаимодействия, имеющем каплеобразную форму, представленном на рис. 1.

Глубина проникновения первичных электронов зависит от элементного состава образца, плотности образца, угла наклона образца и энергии падающего луча, определяемого ускоряющим напряжением. Глубина, на которую проникает пучок первичных электронов, прямо пропорциональна энергии пучка и обратно пропорциональна среднему атомному номеру составляющих элементов образца. Электронный пучок высокой энергии проникает на большую глубину образца, чем электронный пучок низкой энергии. Электронный пучок проникает гораздо глубже в испытуемый образец, содержащий лёгкие элементы, чем в образец, богатый тяжёлыми элементами.

**Типы излучаемых сигналов**

В результате взаимодействия пучка ускоренных первичных электронов с испытуемым образцом происходит ряд различных процессов, приводящих к выходу из испытуемого образца электронов или квантов электромагнитного излучения, регистрируемых в виде излучаемых сигналов, используемых для построения изображений и, в определённых случаях, для получения информации об элементном составе образца.

Основные типы сигналов, которые регистрируют при использовании метода сканирующей электронной микроскопии, показаны на рис. 1.

 

Рисунок 1 ‒ Схема объёма взаимодействия и типов излучаемых сигналов

*Вторичные электроны* ‒ это электроны низкой энергии от 5 эВ до 20 эВ. Они испускаются непосредственно из-под поверхности образца в результате столкновения первичных электронов с образцом и неупругого их рассеяния. Вторичные электроны выходят с небольшой глубины образца, как правило, в пределах от 2 до 30 нм от поверхности, на которой рассеяние пучка в плоскости изображения не очень значительно, поэтому они генерируют изображения с высоким разрешением. Количество вторичных электронов определяется углом падения пучка электронов на поверхность, т.е. морфологией поверхности образца. Для большинства испытуемых веществ характерны участки возбуждения диаметром 0,5–5 мкм.

*Обратно рассеянные электроны* ‒ это электроны высокой энергии, возникающие в результате упругого рассеяния ускоренных первичных электронов. Обратно рассеянные электроны выходят с глубины, составляющей примерно половину глубины проникновения первичных электронов в образец, как правило, 0,1–5 мкм. При этом размер области выхода в плоскости изображения существенно больше, чем у вторичных электронов, что приводит к генерированию изображения с более низким разрешением, чем в случае вторичных электронов, показывая меньше деталей поверхности. Количество отражённых обратно рассеянных электронов определяется атомным номером атомов, входящих в состав испытуемого образца, плотностью образца, морфологией поверхности образца.

*Рентгеновское излучение* образуется при взаимодействии ускоренных первичных электронов с элементами вещества испытуемого образца. Когда электрон из ускоренного пучка электронов сталкивается с орбитальным электроном атома вещества испытуемого образца, возникающее взаимодействие может поднять данный орбитальный электрон на более высокий энергетический уровень, либо ионизировать атом. Рентгеновское излучение, возникающее в результате торможения ускоренных электронов в веществе, называется тормозным или белым излучением, а возникающее в результате возбуждения атомов вещества ‒ характеристическим рентгеновским излучением.

Стабилизация орбитального электрона происходит за счёт ослабления электрона с более высоким энергетическим уровнем, что приводит к испусканию рентгеновского излучения. Эти энергии рентгеновского излучения, являющиеся дискретными и специфическими для конкретного элемента, представляют собой характеристическое дискретное излучение и они равны разности между энергиями электронов оболочки для различных оболочек данного элемента. Спектр характеристического излучения представлен набором линий, соответствующих переходам на внутренние оболочки атома. Внутренние оболочки обозначают латинскими буквами по алфавиту, начиная с *K*, соответствующие переходы обозначают той же буквой, что и уровень, на который происходит переход. При этом добавляют греческую букву, обозначающую, насколько выше лежит уровень, с которого происходит переход.

Например, испущенный электрон *K*-оболочки может стабилизироваться за счёт более высокого энергетического состояния электрона *L*-оболочки, и произвести чистую энергию (*EL – EK*), специфическую для энергии рентгеновского фотона элементной *K*-линии. Линии рентгеновского излучения классифицируют в соответствии с оболочкой электрона, в которой была вакансия, например, *K, L, M*. Данные линии затем распределяют по категориям в соответствии с оболочкой, из которой исходит расслабляющий электрон. Таким образом, линия рентгеновского излучения *K*α появится из вакансии в *K*-оболочке, заполненной электроном из *L*-оболочки; линия рентгеновского излучения *K*β появится из вакансии в *K*-оболочке, заполненной электроном из *М*-оболочки, и так далее в соответствии с рис. 2.



Рисунок 2 ‒ Модель атома

Рентгеновское излучение выходит практически из всей области взаимодействия, при этом часть рентгеновского излучения поглощается в испытуемом образце. Глубина генерации рентгеновского излучения определяется глубиной проникновения в образец первичных электронов пучка. В случае непрерывного тормозного излучения возбуждение может идти на всей глубине проникновения электронов. Пространственное разрешение изображения при регистрации рентгеновского излучения определяется размерами области генерации излучения и составляет порядка нескольких микрон (мкм). Для получения минимального размера области генерации и максимального отношения интенсивности характеристических линий к фону используют энергии электронного пучка в 2–3 раза больше критических для данного материала. Еcr – критическая энергия, необходимая для возбуждения данной линии излучения, равна энергии необходимой для ионизации соответствующей внутренней оболочки. Значения энергии характеристических линий для разных химических элементов хорошо известны, и слабо зависят от химического соединения, что позволяет качественно анализировать элементный состав образца. Интенсивности характеристических линий определяются концентрацией атомов соответствующего химического элемента и используются для количественного анализа состава образца. В основе количественного анализа лежит измерение отношения интенсивностей характеристической линии в исследуемом образце к интенсивности той же линии в стандарте.

*Катодолюминесценция* ‒ это испускание фотонов в видимой области спектра, когда атомы и молекулы внутри объёма взаимодействия возвращаются в своё основное состояние после возбуждения электронным пучком.

**Оборудование**

Выпускается большое количество разнообразных конструкций и типов сканирующих электронных микроскопов, оснащённых детекторами разных типов. На рис. 3 представлена схема электронного микроскопа, который состоит из следующих основных частей:

- электронная пушка ‒ размещается в верхней части электронно-лучевой колонны и испускает пучок электронов. Электроны ускоряются вниз по колонне под воздействием высокого напряжения, которое обычно изменяется от 100 В до 30 кВ;

- колонна электронного микроскопа, содержащая различные детали, используемые для управления и фокусировки пучка электронов;

- камера для образцов, расположенная в нижней части колонны. В ней находится образец и набор детекторов, которые ловят излучаемые сигналы;

- система насосов, которая поддерживает камеру электронной пушки и колонну микроскопа в условиях глубокого вакуума для сохранения стабильности источника электронов.

Колонна электронного микроскопа содержит следующие основные детали:

- систему конденсорных линз, контролирующую диаметр и энергию электронного пучка;

- сканирующие катушки, которые используются для перемещения пучка растровым способом по прямоугольной области образца;

- линзу объектива, которая фокусирует пучок в точную точку и направляет его на образец.



Рисунок 3 ‒ Схема сканирующего электронного микроскопа

***Основные системы сканирующей электронной микроскопии.*** Традиционную стандартную систему сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проводят в условиях, когда электронная колонна и камера для образцов находятся в условиях глубокого вакуума, чтобы можно было исследовать образцы, способные выдерживать высокое давление
до 10–6 торр, используемое для построения изображений. Образцы должны обладать свойствами проводников, либо на них должно быть нанесено специальное покрытие, обеспечивающее проведение больших поверхностных зарядов.

Системы сканирующей электронной микроскопии в режиме естественной среды (ССЭМ) и сканирующей электронной микроскопии в режиме переменного давления (СЭМПД) позволяют исследовать непроводящие образцы и гидратированные материалы либо во влажной атмосфере с использованием средовой СЭМ (ССЭМ), либо в сухом неполном вакууме с применением СЭМ в режиме переменного давления (СЭМПД) от 10 до 103 Па (до 50 торр). Дифференциальная система вакуумирования оборудования, поддерживая в камере электронной пушки глубокий вакуум, создает относительно неглубокий вакуум, иногда близкий к атмосферному давлению, в камере для образца. Преимущество использования систем ССЭМ или СЭМПД заключается в том, что они также могут работать в условиях глубокого вакуума.

Сканирующая просвечивающая электронная микроскопия сочетает традиционную систему просвечивающей электронной микроскопии и регулировки сканирования, обеспечивая при исследовании образцов получение микрофотографий с высоким разрешением, информацией на уровне атомов, такой, как атомная структура, химический состав, межфазные связи. Значительное увеличение разрешения достигается за счёт регулировки мощности зонда электронного пучка до размеров атомов. Но при этом образцы должны выдерживать бомбардировку электронами, что не всегда могут выдержать фармацевтические материалы.

***Излучатели электронов***. Основой для формирования электронного изображения служит генерация сильноточного потока электронов, сталкивающихся с поверхностью образца. При слишком высокой интенсивности пучка, образец может сгореть по мере распространения пучка по его поверхности. Это важный фактор, который необходимо учитывать при исследовании фармацевтических материалов. Различают два основных типа источников электронов – электронных пушек.

*Термоионная эмиссия.* Широко распространённый термоионный источник представляет собой нить накала, обычную вольфрамовую проволоку, нагреваемую путём пропускания электрического тока непосредственно через неё. Альтернативным вариантом может являться эмиттер на основе лантана гексаборида (LaB6), который состоит из нагретого косвенным путём монокристалла. Он имеет гораздо больший выход электронов и намного ярче, чем вольфрамовый эмиттер.

*Автоэлектронная (полевая) эмиссия.* Электроны испускаются из сверхострого наконечника тонкой вольфрамовой проволоки, погружённой в сильное электростатическое поле. Такие эмиттеры, называемые также полевыми эмиттерами, используемые в электронных микроскопах высокого разрешения, излучают очень яркий слаботочный электронный пучок малого диаметра. Они довольно стабильны и имеют срок службы в несколько тысяч часов. Автоэлектронная сканирующая микроскопия обладает значительными преимуществами, поскольку создаёт изображения в высоком разрешении при низких ускоряющих напряжениях (до нескольких сотен вольт), с повышенным отношением сигнал/шум, обеспечивая высококачественные изображения с низким уровнем шумов, и с большей глубиной резкости. Приборы для полевой эмиссии лучше подходят для анализа фармацевтических материалов, поскольку они производят очень яркий пучок, который меньше повреждает образец. Кроме того, сканирующая электронная микроскопия, выполняемая методами полевой эмиссии, отличается более высокой разрешающей способностью по спектру, что делает их более подходящими для определения механических включений.

***Детекторы.*** В сканирующем электронном микроскопе на оптимальных расстояниях вблизи образца находятся необходимые детекторы, регистрирующие различные сигналы, испускаемые при взаимодействии образца с электронным пучком.

*Детекторы вторичных электронов.* Как правило, традиционные сканирующие электронные микроскопы, используемые в режиме глубокого вакуума, оснащены детектором Эверхарта-Торнли (Э-T), расположенным с одной стороны образца. Детекторы Э-T чувствительны к вторичным электронам низкой энергии, которые возникают на небольшой глубине, обычно менее 50 нм, под поверхностью образца.

Детектор Э-T имеет перед собой проволочную сетку с положительным потенциалом для притягивания электронов к сцинтиллятору, который преобразует вторичные электроны в световые вспышки, направленные в фотоумножитель. Вторичные электроны могут следовать по криволинейным траекториям из участков образца, которые могут находиться вне прямой видимости детектора. Как следствие, изображения в режиме детектирования вторичных электронов обычно имеют высокую контрастность и показывают значительные детали поверхности, которые подчеркивают топографические элементы и различия в шероховатости поверхности разных образцов.

Помимо вторичных электронов, детекторы Э-T также чувствительны к обратно рассеянным электронам, испускаемым из участков образца, которые находятся в прямой видимости детектора. Как следствие, изображения, созданные с помощью вторичных электронов, включают сигналы как вторичных, так и обратно рассеянных электронов, и именно это сочетание создает трёхмерный эффект, являющийся отличительной характеристикой изображений во вторичных электронах.

Детектор Э-T не может быть использован в ССЭМ или СЭМПД, поскольку вторичные электроны, испускаемые образцом, рассеиваются и поглощаются молекулами газа в камере. Для наблюдения изображений во вторичных электронах в ССЭМ или СЭМПД используют детектор, чувствительный к небольшому количеству света, испускаемого ионизированными молекулами газа, окружающими образец (процесс, называемый люминесценцией газов) в камере для образца. Именно это облако положительно заряженных ионов вокруг образца также нейтрализует любое накопление отрицательного заряда.

*Детекторы обратно рассеянных электронов.* Обратно рассеянные электроны имеют более высокие энергии, чем вторичные электроны, и излучаются в широком угловом диапазоне. Следовательно, детектор располагается вблизи образца и над ним. Большинство глубоковакуумных и неглубоковакуумных электронных микроскопов оснащены специальным детектором обратного рассеяния электронов, использующим либо сцинтиллятор, либо полупроводниковые диоды.

Сцинтилляционные детекторы работают так же, как детекторы вторичных электронов типа Э-T, обнаруживая электроны как вспышки света, но не имеют сетку с положительным потенциалом для притяжения электронов к ним. Полупроводниковые детекторы обратно рассеянных электронов состоят из зубчатого колеса, содержащего 4 или 5 отдельных фотодиодов, расположенных в виде широкого ряда. Диоды могут быть включены или выключены в различных комбинациях, что позволяет создавать топографические изображения, структурные изображения или и то, и другое вместе.

Испускание обратно рассеянных электронов увеличивается со средним атомным номером различных компонентов (чистых или составных) образца. Такое поведение может быть использовано для изучения пространственного распределения и однородности образцов, содержащих атомы лёгких и тяжёлых элементов в таких смесях, как порошкообразные смеси, таблетки, полученные путём прессования, образцы, загрязнённые посторонними включениями. Структурные изображения в обратно рассеянных электронах не показывают, какие элементы присутствуют в образце, но они показывают, где находятся материалы с высоким атомным номером относительно материалов с низким атомным номером. Материалы, состоящие в основном из атомов тяжёлого элемента (например, железа, брома), выглядят ярче, чем те, которые имеют атомы более лёгких элементов (например, углерода, азота, кислорода, алюминия). Чтобы определить, какие элементы действительно присутствуют, используется рентгеновский микроанализ элементного состава.

В отличие от детекторов вторичных электронов, детекторы обратно рассеянных электронов не сильно подвержены воздействию электрического заряда на поверхности образца. Следовательно, изображения в непроводящих образцах можно получить в условиях глубокого и неглубокого вакуума с помощью детектора обратно рассеянных электронов.

Как сцинтилляционные, так и полупроводниковые детекторы обратного рассеяния электронов очень чувствительны к видимому свету и поэтому могут также функционировать как катодолюминесцентные детекторы.

*Катодолюминесцентные детекторы.* Свет слабой интенсивности, излучаемый катодолюминесцентными материалами, собирается выдвижным параболоидным зеркалом и направляется в светочувствительный сцинтилляционный детектор, который на рис. 3 не показан. Зеркало располагают непосредственно над образцом и убирают, когда оно не используется. Электронный пучок проходит через небольшое отверстие в зеркале, попадая на образец и вызывая излучение света в видимой части спектра.

Упрощённый детектор не различает разные длины волн света, и получаются полутоновые изображения с катодолюминесцентными участками образца, показываемыми как яркие. Более сложные детекторы имеют возможность выбирать различные длины волн света для получения монохромных изображений, настроенных на одну длину волны, представляющую определенный материал. Катодолюминесцентный спектральный анализ достигается пропусканием полихроматического света, испускаемого образцом, в спектрометр, где он рассеивается для получения видимого диапазона спектра.

Спектральный анализ излучаемого света не получил широкого распространения, но нашёл применение для исследования и определения характеристик некоторых органических и неорганических материалов. Он может быть использован для получения диагностической информации о химическом составе и структуре отдельных материалов, а спектральная визуализация может быть использована для анализа смесей материалов.

*Детекторы для рентгеновского микроанализа элементного состава.* Рентгеновский анализатор, встроенный в камеру для образцов электронного микроскопа, позволяет проводить мгновенный и неразрушающий анализ элементного состава исследуемых материалов. Существует два основных типа детекторов: первый обнаруживает дисперсию энергий (энергодисперсионный рентгеновский микроанализ), второй – дисперсию длин волн (волнодисперсионный рентгеновский микроанализ) характеристических рентгеновских лучей, испускаемых образцами, которые описаны в ОФС «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия».

**Пробоподготовка**

Максимальная производительность электронного микроскопа зависит от ряда факторов, связанных с пробоподготовкой, при этом свойства самого образца оказывают существенное влияние на качество итогового изображения.

Перед подготовкой образца для анализа путём сканирующей электронной микроскопии необходимо определить цель испытания, так как от неё может зависеть способ обработки образца.

Также необходимо учесть удельную электрическую проводимость образцов, чтобы свести к минимуму накопление электрического заряда на его поверхности при прохождении пучка электронов по образцу. Для непроводящих образцов могут потребоваться специальные процедуры подготовки, чтобы можно было рассеять накопленные заряды.

Обычно для выполнения традиционной сканирующей микроскопии требуется всего небольшое количество твёрдого образца: от 10–3 до10–12 г в зависимости от способа применения.

Разработано множество методов подготовки образцов таким образом, чтобы они сохраняли свою целостность при минимальном влиянии артефактов. Подготовка большинства образцов фармацевтической продукции проста и быстра в осуществлении и не требует специального оборудования или сложных процедур.

Для фиксации порошков, отдельных частиц, таблеток, лиофилизированных масс, капсул используют держатель образцов. Быстроотвердевающий, совместимый с вакуумом клей или электропроводная углеродная или серебряная краска идеально подходят для фиксации крупных образцов диаметром до нескольких миллиметров. Мелкодисперсные порошки и небольшие образцы можно зафиксировать на держателе с помощью двухсторонней клейкой ленты или полосок с клеевым слоем. Крупные образцы может понадобиться уменьшить, чтобы они помещались на держатель или в камеру образцов, а таблетки перед надёжной фиксацией на держателе допустимо разламывать для доступа к ядру образца.

Порошки можно просто распылить или высыпать на держатель с тонко нанесённым клейким слоем; при этом незафиксированный излишек стряхивают или сдувают с помощью тонкой струи инертного сжатого газа. Быстро и легко порошки можно зафиксировать путём нанесения двухсторонней клейкой ленты на держатель и его аккуратного погружения в порошок таким образом, чтобы лента оказалась покрыта тонким слоем порошка, после чего излишек сдувают, избегая вдыхания порошка, оказавшегося в воздухе.

При подготовке образцов порошков необходимо исключить перекрёстную контаминацию, поскольку присутствие в образце даже единичной частицы другого материала может привести к неверной интерпретации изображения или химического анализа. По этой причине не рекомендуется наносить частицы порошка на держатель с помощью кисти, поскольку кисть необходимо очищать или утилизировать после каждого применения. При проведении микроанализа для манипуляций с образцом рекомендуется использовать инструменты, например, иглы, лопаточки, пинцеты и т.д., из инертных материалов или пластмассы, поскольку инструменты из металла могут быть источником загрязняющих частиц.

***Покрытие образцов.*** Большинство фармацевтических материалов готовы к анализу и не требуют длительной и сложной процедуры подготовки. Однако такие материалы, в основном, не являются электропроводными, поэтому образцы для испытания с помощью сканирующей электронной микроскопии в высоковакуумном режиме необходимо покрывать сверхтонким слоем проводящего материала. Без проводящего покрытия образцы получат чистый отрицательный заряд при прохождении по ним электронного пучка; это приведёт к яркому свечению образца, и при разряде на изображении будут видны помехи в виде вспышек и ярких полос. Подходящими материалами для покрытия являются металлы, например, платина и золото. Их можно наносить на неровные и гладкие поверхности образцов с помощью устройства для плазменного напыления. При использовании углерода его необходимо выпарить в условиях очень высокого вакуума, поскольку его невозможно напылить. Помимо сокращения влияния заряда проводящее покрытие увеличит испускание вторичных электронов для получения более ярких изображений, а также перенесёт с образца локализированную тепловую энергию, вызванную прохождением пучка электронов. Некоторые порошки, состоящие из очень мелких частиц, например, кремния диоксид коллоидный, для предотвращения получения заряда могут требовать трёх-четырёхкратного напыления, поскольку при однократном напылении материал покрытия не сможет сформировать цельный проводящий слой.

Некоторые образцы, чувствительные к пучку электронов, такие как полутвёрдые или влажные материалы, может потребоваться охладить или заморозить с использованием этапа охлаждения с целью минимизации деградации или испарения. Учитывая это, автоэлектронная сканирующая микроскопия позволяет анализировать поверхности чувствительных образцов с помощью пучка электронов с очень низкой энергией, например, 500 В или меньше, что может способствовать снижению или устранению деградации под влиянием пучка.

Образцы для рентгеновского микроанализа элементного состава, как правило, не покрывают металлом, поскольку такое покрытие станет причиной дополнительных пиков в рентгеновском спектре, что может повлиять на анализ или даже перекрыть малые количества некоторых элементов, тем самым препятствуя возможности количественного определения неизвестных элементов. Большинство анализаторов элементного состава способы обнаруживать лёгкие элементы, поэтому даже тонкий слой углерода может отрицательно сказаться на интерпретации спектра. Для минимизации или исключения потенциальных проблем и артефактов из-за покрытия образца материалы, не обладающие электрической проводимостью, можно анализировать без покрытия с помощью средовой ССЭМ или СЭМПД в режиме переменного давления. Для любого покрытия может понадобиться коррекция с помощью программного обеспечения.

**Настройки оборудования и условия исследования**

Параметры используемого оборудования, необходимые для получения качественного изображения, могут в значительной степени зависеть от типа и подготовки образцов. Некоторые важные свойства образцов включают форму (порошки, цельные образцы, волокна, стекловидные жидкости и т.д.), общие размеры, текстуру, атомный состав и присущую им проводимость. К параметрам, влияющим на качество изображения, можно отнести необходимые настройки оборудования и условия исследования.

Стандартные настройки и компоненты оборудования, способные повлиять на качество изображения, включают ускоряющее напряжение, ток эмиссии, рабочее расстояние, детекторы вторичных или обратно рассеянных электронов, если используется несколько режимов, настройки тока конденсаторной линзы и диаметр линз объектива.

Ускоряющее напряжение является наиболее важным из настроек. Необходимо использовать электронный микроскоп с ускоряющим напряжением луча, подходящим для получения изображений, на которых отражены искомые данные об образце. Например, низкое напряжение, менее 5 кВ, может использоваться для получения изображения деталей поверхности, а напряжение выше 10 кВ увеличивает разрешающую способность и может быть использовано для анализа широкого диапазона элементов. Наиболее пригодный диапазон ускоряющего напряжения составляет от 2 кВ до 20 кВ, поскольку большинство искомых элементов можно ионизировать электронами с энергией в данном диапазоне.

Регулировка линзы объектива позволяет сфокусировать пучок на образце в широком диапазоне рабочих расстояний, чтобы можно было охватить образцы как большого, так и малого размера. Глубину резкости также можно увеличить за счёт выбора меньших апертур пучка, чтобы вся глубина толстых образцов находилась в приемлемом фокусе единовременно.

В зависимости от образца, при использовании сканирующей электронной микроскопии в высоком вакууме можно достичь очень высокого увеличения, более чем в 10 000 раз, для получения чёткого изображения мелких деталей размером до 3 нм, за счёт того, что пучок электронов можно сфокусировать без рассеяния молекулами газа. В случае ССЭМ или СЭМПД ввиду присутствия газа и водяного пара в камере образцов электронный пучок подвергается некоторому боковому рассеянию. Такое рассеяние может отрицательно влиять на получение изображений высокого разрешения, поскольку пучок не может быть настолько чётко сфокусирован, как это происходит в высоком вакууме. Более короткое рабочее расстояние и оптимизация давления газа могут позволить минимизировать данный нежелательный эффект.

Боковые пространственные разрешения в 1 нм и выше возможны при использовании автоэлектронной сканирующей микроскопии. Для достижения такой высокой разрешающей способности может потребоваться ускоряющее напряжение луча выше примерно 15 кВ, но высокое напряжение луча может повредить чувствительные к лучу материалы. В случае большинства органических твёрдых материалов пучок электронов проникнет внутрь образца на много микрометров, и детали поверхности будут утеряны из-за рассеивания и поглощения испущенных электронов. Чтобы получить детали поверхности образцов, электронный микроскоп необходимо использовать с гораздо более низким напряжением, но за счёт этого ухудшится разрешение. Большинство образцов фармацевтической продукции, исследуемых с помощью сканирующей электронной микроскопии, с большой долей вероятности анализируют с увеличением менее чем в 10 000 раз, поэтому высокая разрешающая способность обычно не требуется.

***Сочетание сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского микроанализа***. Данная комбинация позволяет определять элементный состав образцов и осуществлять элементное картирование для визуализации распределения элементов, например, в таблетках и смесях.

Карты элементов легко и быстро генерируются для визуализации пространственного распределения элементов в образце при использовании слабого и сильного увеличения. Разрезанные поперек или раздробленные ядра таблеток и порошки, слегка спрессованные до формирования плоской поверхности, можно картировать, чтобы установить взаимосвязи между их компонентами. Данная техника целесообразна при сравнении различий между образцами, чтобы установить, почему одни имеют лучшие характеристики, чем другие. Важно, чтобы поверхности были ровными, поскольку испущенные рентгеновские лучи имеют прямую траекторию, а значит, могут быть не детектированы в зонах (по факту, в тени), которые находятся не в прямой видимости рентгеновского детектора. Такие артефакты можно уменьшить путём наклона образца к детектору. Рентгеновский микроанализ также используют для изучения механических включений. Видимый дефект в виде чёрных точек в таблетках, например, зачастую появляется из-за частиц металла или резины, попадающих в таблетки в процессе прессования из-за износа таблеточных прессов. Сканирующая электронная микроскопия в сочетании с рентгеновским микроанализом идеально подходит для их определения, поскольку она может использоваться для различения металлов, что позволяет установить источник и первопричину появления таких точек. Кроме того, этот способ испытания подходит для выявления и последующего изучения выявленных механических включений в растворах для парентерального применения, глазных каплях.