

附件 1：扫描电子显微镜法草案第二次公示稿

扫描电子显微镜法

扫描电子显微镜(扫描电镜)法是利用细聚焦高能电子束在样品上扫描,电子束与样品相互作用产生二次电子、背散射电子、特征 X 射线等信号,通过不同的检测器对样品表面微观形貌进行表征的分析方法。扫描电镜与 X 射线能谱仪联用,还可对样品进行微区元素成分分析。

1. 原理

在扫描电镜中,由电子枪发射具有稳定束流和能量的电子束,通过电磁透镜聚焦,入射到样品表面,电子束与样品原子核或核外电子发生相互作用,而被散射,产生各种信号。入射电子束穿透的深度与加速电压成正比(加速电压越高,则电子束能量越高,穿透深度越深),与样品的密度成反比(样品的密度越低,穿透深度越深),在样品内部形成一定穿透深度的相互作用区(图 1)。入射电子与样品相互作用产生的各种信号反映了样品表面的形貌或成分,分别被不同检测器接收,经过信号转换、放大,由计算机转化为可供观察和记录的数字图像或谱线。

入射电子束与样品的相互作用会产生各种物理现象,释放的信号有俄歇电子、二次电子、背散射电子、特征 X 射线、阴极荧光等,其中用于药物材料的扫描电镜成像和成分分析的主要信号有:

(1) 二次电子

由入射电子轰击样品而从样品表面发射的电子称为二次电子。二次电子的能量较低($<50\text{eV}$),仅从距样品表面 $5\sim 10\text{nm}$ 的深度才能逸出,因此二次电子图像分辨率较高,对表面细节敏感,利于表面形貌的表征。二次电子的产率主要取决于样品表面局部倾斜角度的变化,入射电子入射角越大,二次电子产出率就越高,是反映样品表面形貌的主要成像信号。

(2) 背散射电子

背散射电子是入射电子在样品中受到原子核的卢瑟福散射而形成大角度散射，重新逸出样品表面的高能电子，一般是从距样品表面 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 的深度射出。背散射电子的产出率与表面形貌有一定关系，但更主要的是取决于样品的平均原子序数 Z ，平均原子序数越高，背散射电子产出率就越高，因此可以体现样品分析区域成分的差异。

(3) 特征 X 射线

当样品原子内层被入射电子激发或电离后，会在内层电子处产生一个空穴，外层电子就会跃迁到内层以填补该空穴，同时释放出具有特定能量的电磁辐射光子，称为特征 X 射线。特征 X 射线是从距样品表面 $0.5\sim 5\mu\text{m}$ 的深度发出的，其能量或波长与样品原子序数 Z 满足莫塞莱 (Moseley) 定律，通过探测特征 X 射线，即可获得样品的元素成分信息。

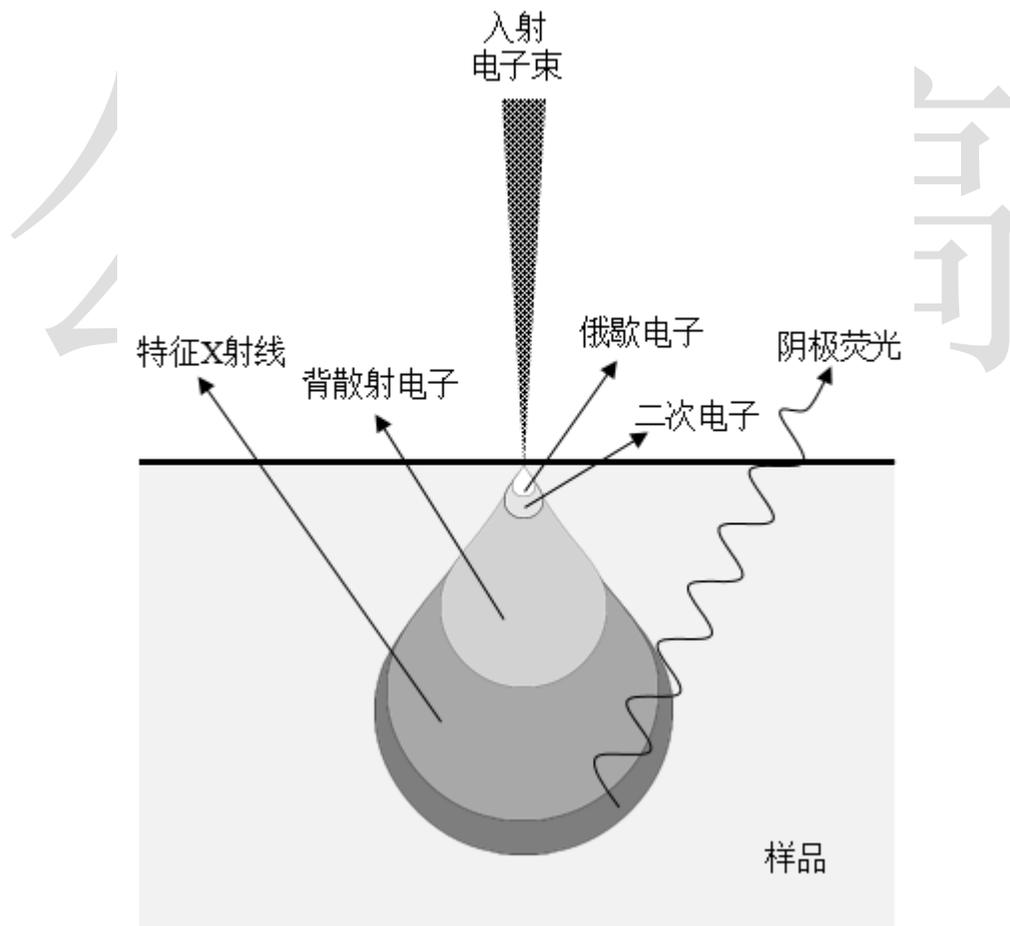


图 1 电子束与样品相互作用区

2. 对仪器的一般要求

扫描电镜通常由电子光学系统（镜筒）、信号检测处理系统、真空系统与电子控制系统组成。

（1）电子光学系统

电子光学系统包含电子枪、电磁透镜、扫描线圈、样品室等主要部件。

电子枪位于镜筒顶部，是扫描电镜的电子束发射源。常见电子枪分为三类：钨灯丝电子枪、单晶灯丝电子枪、场发射电子枪。钨灯丝电子枪通过电流直接加热钨丝产生热电子发射，在加速电压作用下形成电子束。六硼化镧（ LaB_6 ）或六硼化铈（ CeB_6 ）电子枪由一个钨丝间接加热的单晶组成，具有更大的电子发射产出率，比钨灯丝发射亮度更高。冷场或肖特基场发射电子枪作为发射源，具有极高亮度、极细束斑和低电子束流，使用寿命可达数千小时，具有更高的分辨率和优良的信噪比。电磁透镜（聚光镜和物镜）位于镜筒内，聚光镜用于汇聚电子束斑和控制束流，物镜最终将扫描电子束聚焦到样品上。扫描线圈用于控制电子束以光栅运动方式对样品表面进行扫描并放大。样品室位于镜筒底部，内部安装有可操控的样品台和检测器。

（2）信号检测处理系统

用于信号检测的主要有二次电子检测器、背散射电子检测器、X射线能谱检测器。

二次电子检测器是扫描电镜标准配备的检测器，主要接收来自样品表面以下较浅深度的二次电子以及部分背散射电子，样品表面倾斜角越大的部位，二次电子产出率越高。因此，二次电子图像反映了样品表面的微细形貌特征和表面粗糙度变化。

背散射电子检测器主要接收比二次电子具有更宽能量范围、更深发射深度的背散射电子。背散射电子不仅能反映样品的形貌，也能反映样品的原子序数信息，原子序数越高，则背散射电子信号产率越高。因此，背散射图像中重原子（如铁、溴等）组成区域比轻原子（如碳、氮、氧、铝等）组成区域具有更高亮度。利用这一原理，可对混合物（如混合粉末、片剂、受到异物污染的样品等）中轻原子和重原子成分的空间分布及均匀性进行分析。此外，背散射电子检测器受样品表面的荷电效应影响相对较小，也可以在低真空下运行，因此可以在高真空模式或低真空模式下用背散射电子检测器对非导电样品进

行成像。

X 射线能谱检测器接收入射电子束轰击样品激发产生的特征 X 射线。通过能谱仪与扫描电镜联用，可在观测样品微观形貌的同时进行微区元素成分分析。根据工作方式不同，可对样品进行点、线、面的定性或定量元素成分分析。

(3) 真空系统

真空系统用于维持电子光学系统所需的高真空条件。传统的扫描电镜将整个电子光学部分和样品室置于高真空状态下，可以观测导电样品。然而，最新的技术除了具备高真空工作模式以外，还具备低真空工作模式。低真空模式通过压差真空设计，可将样品室处于低真空状态，同时保持电子枪处于高真空状态。根据样品室真空度不同，低真空模式又可分为可变真空 (VPSEM) 与环境真空 (ESEM) 模式，可直接观测不导电样品，甚至含水材料。另外，对于含水含油样品，还可通过样品台冷冻的方式减少气体挥发，从而保护真空系统正常工作。

(4) 电子控制系统

电子控制系统为电子光学系统和真空系统提供电源并进行控制，通过信号处理获得数字化图像，并可对图像进行放大及尺寸测量。

3. 校准

(1) 扫描电镜长度测量误差校准

现代扫描电镜自备测量程序，可进行微纳米几何尺寸的直接测量。由于扫描电镜本身的质量、使用状况以及使用者不同，因此有必要评价不同放大倍率下扫描电镜长度测量的准确性，对长度测量示值误差进行校准。可直接利用经过校准的线宽、线间距、格栅复型等标准样品对扫描电镜长度测量示值误差进行校准。通常在低放大倍率和高放大倍率下的长度测量示值误差不超过实际值的 $\pm 5\%$ 。

(2) X 射线能谱仪的校准

X 射线能谱仪的检查和校准可选用国家标准物质或含量值可溯源的多元素标样进行。校准的主要内容包括：能量分辨率、定量分析示值误差和定量分析重复性。能量分辨率通过测量特定元素如锰的 $\text{Mn-K}\alpha$ 谱峰半高宽 (FWHM)

来表示。应定期检查或重新校准能谱仪检测器系统的能量标尺，当辨别峰谱有疑问时也要进行校准。

4. 测定方法

(1) 样品制备

扫描电镜对样品的基本要求为：导电良好、粘贴牢固、无挥发性。针对不同样品类型，不同分析目的应采取不同的制样方式。

对于固态样品（如粉末、颗粒物、片剂、冻干块等），可使用导电介质将样品直接粘附在样品台上。对于粉末或毫米尺度小块样品，可使用双面导电胶带作为导电介质进行固定。制样时，可将粉末均匀地洒在样品台导电胶带上，或将导电胶带面轻轻地压向粉末，粘附薄薄一层样品，然后用**惰性气体吹走适宜的方法除去**多余的松散粉末。避免操作过程中外力挤压对粉末样品表面的微观形貌造成破坏，同时要避免交叉污染，建议使用一次性工具，对于重复使用的工具，需做好清洁处理。对于微区成分分析的样品，因金属工具可能会制造新的外源性污染物，建议使用塑料工具（如针、铲、镊子等）。对于大块样品，可适当减少尺寸后使用导电银胶、导电碳胶等导电介质进行固定。对于片剂、丸剂等，为了观察芯部，可将其剖开后获得横切面，再将其固定在样品台上。

对于液体内的不溶性微粒或异物，可进行过滤，并将得到的携带样品的滤膜直接固定到样品台上。滤膜应能有效滤除液体而截留目标物，且不对目标物的测定产生影响。

对于潮湿、半固态、凝胶类样品，不可以直接进行观察。可采用化学固定、脱水并结合临界点干燥**或**冷冻干燥的方法脱除内部水分，制得干燥样品后进行观察。对于配置冷冻样品台的扫描电镜，可对此类样品进行冷冻固定后直接观察。

大多数药物材料不导电，在高真空模式下，会因电荷积累产生荷电效应，导致样品观察位置异常明亮，图像产生明暗不一的放电干扰条纹。因此需要使用离子溅射仪在样品表面镀上一层超薄的导电材料。常见导电材料有金、铂、铂钯合金等贵金属和碳，导电镀层的厚度一般为3~10nm。除了减少荷电效应，导电镀层还可增加二次电子的产出率，以提供更优质的图像，并能将电

子束引起的局部热量导走。当某些块状样品因无法形成连续的导电层而荷电严重时，可以反复溅射镀膜多次。为了减少离子溅射过程中可能产生的样品损伤，建议使用冷溅射。对于具备低真空模式的扫描电镜，可以不镀金属直接在 $\leq 2\text{kV}$ 低电压或低真空模式下快速观测不导电的药物样品。

用于X射线能谱分析的样品通常不建议镀金属，因为金属镀层会给X射线能谱增加额外的特征峰，带来额外干扰。对于高真空扫描电镜，建议对样品进行镀碳处理。对于具备低真空模式的扫描电镜，可以不镀任何导电材料，在低真空模式下直接进行X射线能谱分析，以完全排除外来镀层引起的元素成分干扰。

(2) 样品测定

A. 电镜参数选择

在扫描电镜及能谱分析过程中，加速电压、束斑束流、检测器类型、工作距离是影响分析结果的主要仪器参数。

加速电压直接影响入射电子的穿透深度、分辨率以及X射线的激发。较低的电压($<5\text{kV}$)穿透深度浅，有利于表面细节的成像；较高的电压($>10\text{kV}$)可提高成像分辨率，也有利于X射线能谱分析，但过高的加速电压将给样品造成辐照损伤及荷电效应，常用的加速电压范围是 $1\text{kV}\sim 20\text{kV}$ 。

束斑束流会对分辨率、图片信噪比以及能谱分析的计数率造成影响，小束斑小束流可以提升图像分辨率，但获取图片的信噪比较差，大束斑大束流可以提升图片信噪比，但会影响获取图片的分辨率，应选择适中的束斑束流，以获得分辨率与信噪比均衡的图片；进行能谱分析时，可在不影响成像分辨率的情况下适当选择大束斑大束流。

检测器根据需求进行选择，如需获得成分元素衬度差异的图像信息，则需要选择背散射检测器；如需获得立体形貌信息良好的图像，则需要选择二次电子检测器。

工作距离通常需要根据分辨率、景深的要求进行选择。较短的工作距离可以获得更高的分辨率，但景深较小；较长的工作距离可以获得更大景深，但分辨率相对较差。

B. 样品微观形貌成像

对于常规的样品，可以通过以下步骤获得高质量的样品微观形貌成像：

- ① 在低放大倍率（1000~3000×）下用快扫描模式选择一个易观察的样品区域，调整图像亮度和焦距得到清晰的图像；
- ② 检查并调整电子束合轴、消像散；
- ③ 在较高放大倍率下选择感兴趣特征，调整焦距和消像散，再降到视野合适的放大倍率；
- ④ 调整图像亮度和对比度；
- ⑤ 采用照相模式或慢扫描模式采集高分辨图像并储存。

C. X 射线能谱分析

确定能谱分析的加速电压、束斑束流等参数。待 X 射线能谱仪开启并稳定后，通过能谱软件获得样品的扫描电镜图像，并可按以下 3 种方式选择待分析区域进行谱线采集：

- ① 点分析：电子束聚集在样品中某一点，检测器接收该点产生的特征 X 射线获得元素谱图，通过软件解谱得到此点的元素组成。
- ② 线分析：也称线分布。电子束沿着样品表面被划定的直线进行扫描，检测器记录该线上每一点的元素谱图。通过软件解谱获得特定元素在这条线上的分布情况，能得到元素含量变化的线分布曲线，曲线越高代表该元素在此位置分布越多。
- ③ 面分析：也称面分布。电子束在样品表面选定的区域内进行扫描运动，检测器记录此面积内所有点的谱图。通过软件解谱获得特定元素在这个面上的分布情况，面扫描结果用不同颜色代表不同元素的分布，而用颜色的亮度代表该元素含量的高低，颜色越亮代表该元素在此位置分布越多。

起草单位：浙江省食品药品检验研究院

参与单位：安徽省食品药品检验研究院、浙江大学、浙江工业大学

主要起草人及联系方式：陈超，0571-87180328，浙江省食品药品检验研究院，杭州市滨江区平乐路 325 号