

扫描电镜 (SEM) 样本制备方法

1、扫描电子显微镜是现代材料科学（金属材料、非金属材料、纳米材料等）、生物学、医学、半导体材料、化学化工等科技领域中常见的分析工具。越来越多的科研人员选用扫描电子显微镜进行三维形貌观察和分析、微区的成分分析等。在扫描电镜分析过程中，样品制备是至关重要的一个环节，会直接影响观察效果、照片质量、设备寿命等。因此，本文专门针对 SEM 样品要求和制备方法进行详细讲解。

2、SEM 样品要求

2.1 样品不含水分

湿的样品会释放出水蒸气，往往真空度很难上去，而且水蒸气遇到高能电子束，会被电离，还会增加电子束能量分散，会使成像模糊分辨率降低；水蒸气还会与高温钨丝反应，加速电子枪灯丝挥发，极大的降低了灯丝的寿命；在高真空状态下，大部分含水样品的表面易发生变形，这会导致结果失真。绝大多数的生物样品需要经过干燥处理。

2.2 样品不含挥发物、污染物

样品中的挥发物会造成探测器、光阑等部件污染。还有有机油脂类污染物，在电子束的作用下会容易分解产生碳氢化物，会遮盖样品表面的细节或吸附在探测器晶体表面，最终降低成像信号产量以及探测器检测效率。

2.3 样品具有导电性

SEM 成像原理是通过探测器获得二次电子和背散射电子信号，样品不导电会造成表面多余电子或游离粒子的累积进而不能及时导走，到达一定程度后就会反复出现充放电现象，最终影响电子信号的传递，造成图像扭曲、变形、晃动。所以不导电的试样，其表面一般都需要镀金（影像观察）或者镀碳（成份分析）。

3、SEM 制样方法

在 SEM 制样时，针对不同的样品、不同的形态、不同的导电性能、不同的观测要求，会采用不同的方法制样。

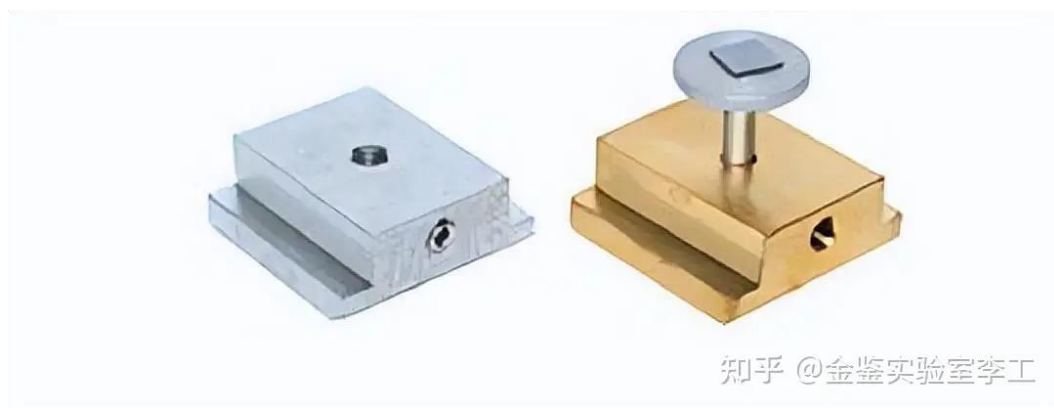


不同类型的扫描电镜样品台

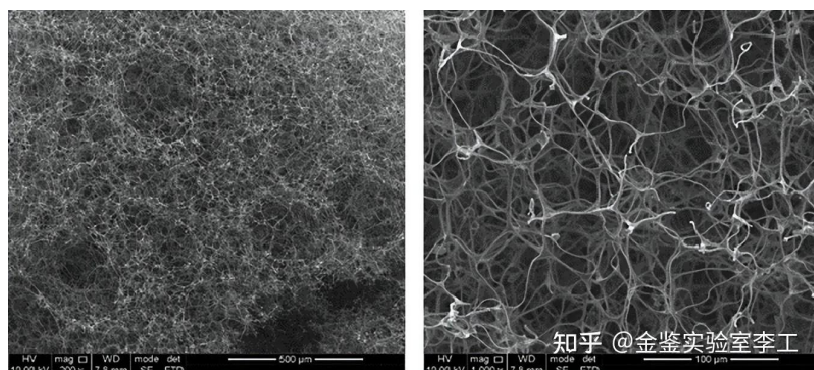
3.1 块体样品

块体样品应该尽量小，一定不能超过电镜样品台尺寸，选取的样品要具有代表性。为了避免取样过程样品被污染而影响结果分析，一般需要用溶剂先对样品进行超声清洗，特别是整个制样的过程都不能用手直接接触样品。然后用导电胶把样品

粘结在样品台上，对于不导电或者导电性差的样品，需要进行镀膜处理后再放入扫描电镜中观察；而对于导电样品，可以直接放入扫描电镜中观察。如果样品的底面不平整，我们就需要采用导电银胶进行粘贴，银胶可以填满缝隙，更好的保证样品在抽真空时保持平稳不漂移。



块体样品的粘托图

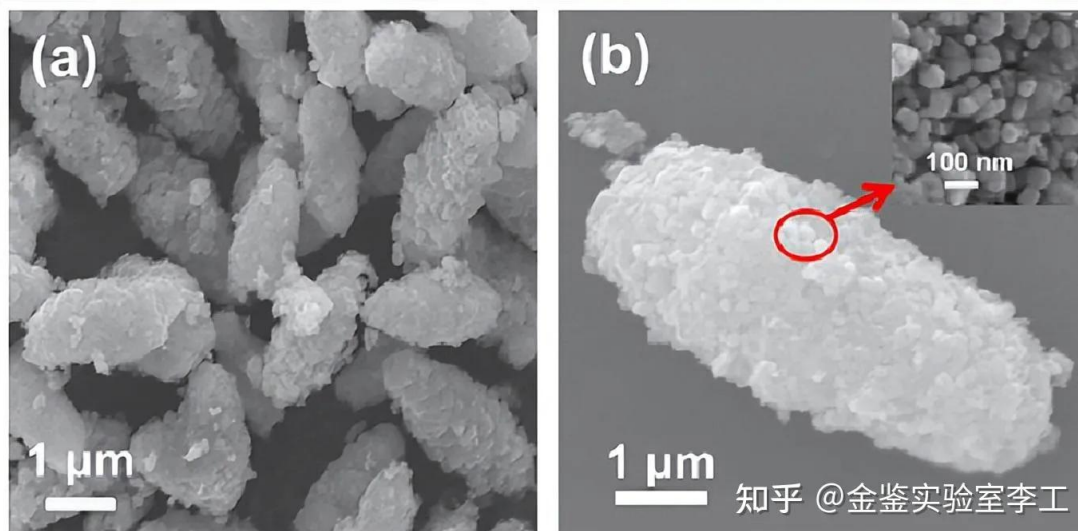


三聚氰胺泡沫材料的 SEM 图

3.2 粉末样品

先将导电胶带粘在样品台上，然后将粉末样品均匀的撒在导电胶上面，随后用压缩空气（或者洗耳球）吹去没有黏住的样品，能很好的防止未被黏住的样品污染设备；切记粘样品时不能挤压样品，主要是避免挤压过程对样品表面的微观形貌造成破坏。同样的，对于不导电或者导电性差的样品，需要进行镀膜处理后再放入扫描电镜中观察；而对于导电样品，可以直接放入扫描电镜中观察。对于粉末

样品，一般为了提高测试效率，一个样品台上会同时制备多个样品，但需要保证样品之间不会互相污染，位置不被混淆。



LiNi_{0.8}Co_{0.1}Mn_{0.1}O₂ 材料的 SEM 图

3.3 液体样品

液体样品制样时，一般需要借用薄铜片作为载体。首先将导电胶粘在样品台上，然后将干净的薄铜片粘在导电胶上，采用少量多次的方法把液体样品滴在铜片上，等待溶剂完全挥发干燥后就可以进行喷镀处理和扫描电镜测试。对于团聚十分严重的粉末样品，也会将粉末混合在易挥发溶剂（如乙醇、超纯水、环己烷等）中配成悬浊液。不过值得注意的是选择的溶剂不能对要观察的样品有影响，否则会改变样品的初始形貌。

3.4 生物样品

生物样品性质较为特殊，一般都具有含水量高、质地柔软、导电性差、对热和电子束等敏感等特性。所以生物样品的制样过程较为复杂，主要包括取样、清洗、固定、脱水、干燥、粘样、导电处理几个步骤。

①取样：样品大小一般不超过 $10 \times 10 \times 5$ 毫米，确定观察样品的目标，避免取样过程中拉割、挤压样品。

②清洗：一般采用漂洗、换洗、加压冲洗、震荡超声等物理方法以及酶消化法等化学方法，主要是去除观察面的杂质，在保证不破坏观察面的条件下，充分暴露观察面。

③固定：一般在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下完成固定比较好，戊二醛、锇酸均可单独固定，也可以用“戊二醛-锇酸”双重固定。固定 1 - 3 小时（根据样品种类和固定剂选取相关）后，吸出固定液，加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（ $\text{PH} = 7.2$ ），漂洗 1 小时，换液 3 - 4 次。

④脱水：从小瓶中吸出缓冲液，加入乙醇逐级梯度脱水（乙醇浓度一次为 $30\% - 50\% - 70\% - 80\% - 90\% - 100\%$ ），每级停留时间根据样品大小而定，一般 15 - 30 分钟。最最后吸出乙醇，加入醋酸异戊酯与乙醇 1: 1 的混合液，浸泡 10 - 20 分钟并适当摇晃，再吸弃混合液，加入纯醋酸异戊酯浸泡 10 - 20 分钟并适当摇晃。

⑤干燥：干燥是扫描电镜生物制备中的关键缓解，需要在干燥过程中尽可能减少由于水分蒸发而引起的表面形貌的畸变，且必须确保干燥彻底。常用的有自然干燥法、烘干干燥法、临界点干燥法、冷冻干燥法以及真空干燥法，针对不同的生物样品会选择不同的干燥方法。

⑥粘样：用牙签将少量导电胶涂到样品台上，胶面应该略小于样品地面，用镊子轻轻夹样品侧面，保证观察面向上贴牢在涂胶上，粘贴后，待导电胶干透，才能进行真空镀膜和 SEM 镜检。

⑦导电处理：生物样品都是由低原子序数的碳、氢、氧、氮等元素组成，二次电子发射率很低，信号弱，难以获得必要的图像反差。生物样品在扫描电镜观察前，均需要进行表面导电处理。

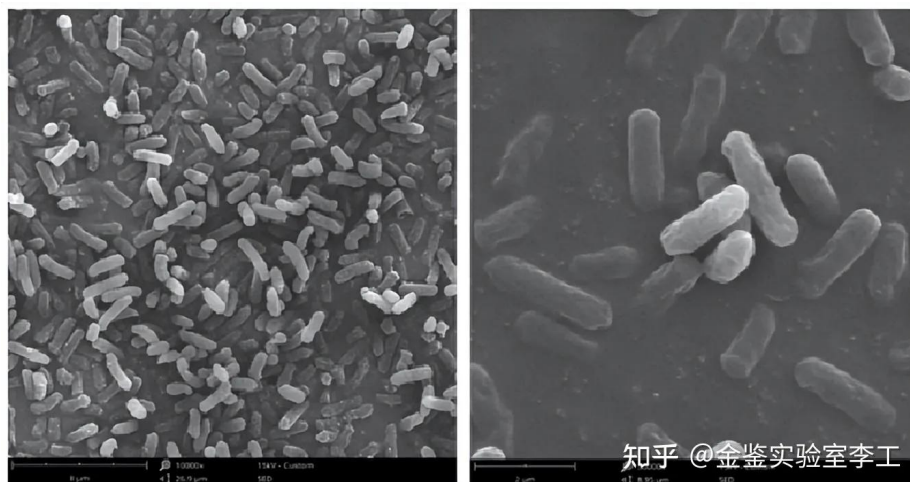


图 5 经过梯度脱水真空干燥的杆菌 SEM 图

4、注意事项

为了得到无损、真实而清晰的表面形貌结构，在扫描电子显微镜样品制备的全过程中都必须十分小心，这里分享几个在 SEM 制样过程中需要特别注意的事：

(1) 在样品制备时，应该把被观察面充分的暴露出来，同事需要保证被观察面无污染、无皱缩、无明显的人工损伤以及附加结构。

(2) 在不导电材料表面镀重金属（金、铂、钯等）时，镀层“厚度”即要大于等于入射电子束进入样品的扩散深度，又不能掩盖样品本身的凹凸形貌结构。例如镀 Au 膜，一般在 10 万左右就能看见金颗粒，所以镀 Au 膜厚度尽量控制在 10 nm 以下，如果镀 10 nm 的导电膜导电性能仍然没有得到改善，继续镀膜也没有意义。

(3) 通常情况下我们都选择镀 Au 膜，但是需要对样品进行严格的 EDS 定量分析，则不能镀金属膜，因为金属膜对 X 射线有较强的吸收，对定量分析结果影响较大。

(4) 粉末样品的厚度要均匀，量不要太多，否则容易造成喷金样品的底层部分导电性能不佳。