

一、样品处理的要求

扫描电子显微镜的优势为可以直接观察非常粗糙的样品表面,参差起伏的材料原始断口。但其劣势为样品必须在真空环境下观察,因此对样品有一些特殊要求,笼统的讲:干燥,无油,导电。

1 形貌形态,必须耐高真空。

例如有些含水量很大的细胞,在真空中很快被抽干水分,细胞的形态也发生了改变,无法对各类型细胞进行区分;

2 样品表面不能含有有机油脂类污染物。

油污在电子束作用下极端容易分解成碳氢化合物,对真空环境造成极大污染。样品表面细节被碳氢化合物遮盖;碳氢化合物降低了成像信号产量;碳氢化合物吸附在电子束光路引起极大象散;碳氢化合物被吸附在探测器晶体表面,降低探测器效率。对低加速电压的电子束干扰严重。

3 样品必须为干燥。

水蒸气会加速电子枪阴极材料的挥发,从而极大降低灯丝寿命;水蒸气会散射电子束,增加电子束能量分散,从而增大色差,降低分辨能力。

4 样品表面必需导电。

在大多数情况下,初级电子束电荷数量都大于背散射电子和二次电子数量之和,因此多余的电子必须导入地下,即样品表面电位必须保持在 0 电位。如果样品表面不导电,或者样品接地线断裂,那么样品表面静电荷存在,使得表面负电势不断增加,出现充电效应,使图像畸变,入射电子束减速,此时样品如同一个电子平面镜。

5 在某些情况下,样品制备变成重要的考虑因素。

若要检测观察弱反差机理,就必须消除强反差机理(例如,形貌反差),否则很难检测到弱的反差。当希望 EBSD 背散射电子衍射反差, I 和 II 型磁反差或其他弱反差机理时,磁性材料的磁畴特性必需消除样品的形貌。采用化学抛光,电解抛光等,产生一个几乎消除形貌的镜面。

特殊情况:磁性材料,必须退磁。

二、扫描电镜样品的制备

1 块状样品的制备

对于块状导电样品,基本上不需要进行什么制备,只要其大小适合电镜样品底座尺寸大小,即可直接用导电胶带把样品黏结在样品底座上,放到扫描电镜中观察,为防止假象的存在,在放试样前应先先将试样用丙酮或酒精等进行清洗,必要时用超声波清洗器进行清洗。对于块状的非导电样品或导电性较差的样品,要先进行镀膜处理,否则,样品的表面会在高强度电子束作用下产生电荷堆积,影响入射电子束斑和样品发射的二次电子运动轨迹,使图像质量下降,因此这类样品要在观察前进行喷镀导电层的处理,在材料表面形成一层导电膜,

避免样品表面的电荷积累，提高图象质量，并可防止样品的热损伤。

2 粉末样品的制备

对于导电的粉末样品，应先将导电胶带黏结在样品座上，再均匀地把粉末样撒在上面，用洗耳球吹去未黏住的粉末，即可用电镜观察。对不导电或导电性能差的，要再镀上一层导电膜，方可用电镜观察。为了加快测试速度，一个样品座上可以同时制备多个样品，但在用洗耳球吹未黏住的粉末时，应注意不要样品之间相互污染。

对于粉末样品的制备应注意以下几点：

A、尽可能不要挤压样品，以保持其自然形貌状态。

B、特细且量少的样品，可以放于乙醇或者合适的溶剂中用超声波分散一下，再用毛细管滴加到样品台上的导电胶带上(也可用牙签点一滴到样品台上)，晾干或强光下烘干即开。

C、粉末样品的厚度要均匀，表面要平整，且量

不要太多，1g左右即可，否则容易导致粉末在观察时剥离表面，或者容易造成喷金的样品的底层部分导电性能不佳，致使观察效果的对比度差。

3 半导体材料

一般的制备样品方法都适合。但有些特殊的反差机制，如电压反差，电子通道反差，感生电流，样品电流等，半导体材料需要特殊的制备。

4 金属和陶瓷样品

1)、形貌观察

彻底的去油污以避免碳氢化合物的污染。超声波清洗机：溶剂为丙酮、乙醇、甲苯等。溶剂不危害样品表面形貌完整性是非常重要的。

确定样品污染方法：在很高的放大倍数下观察样品，然后降低放大倍数（扫描电镜为齐焦系统，高倍聚焦清楚，在低的倍数下不离焦），如果有污染，在低倍会观察到原来高倍的扫描区域有明显黑色痕迹。污染物沉积的速率和电子束照射区域的剂量有关，由于越高的放大倍数，相同扫描时间内样品单位面积电子束照射剂量越大。

绝缘样品需要喷镀导电膜：真空蒸发镀膜技术和离子溅射镀膜技术。实现导电，导热，很大程度上增加二次电子发率。

1、导电率：

电阻率高的材料，在电子束入射下会迅速充电，而且形成相当高的电位，使样品某个区域绝缘击穿，导致样品表面电位发生变化，产生复杂的图像假象，所谓充电效应。表现为，低能二次电子被偏转或者加速，在裂缝中，二次电子发射增加；严重的还会干扰物镜磁场，引起象散不稳定，亮度不均匀，和杂散的X射线信号；使得系统分辨率下降，分析能力下降。

2、减少热损伤：

在正常观察图像时，电子探针的束流通常为 nA 级，所以对于大多数样品，受热不是问题。但对于阴极荧光，x 射线显微分析，探针电流往往是几百 nA 甚至 μA 级别，热效应较为严重。样品过渡受热会表现为图像扫描区域移动，不稳定，还可能会破裂损坏。---电子束损伤。表现为，样品起泡，龟裂，内部出现孔洞，较高的束流引起，塑料，聚合物，生物样品中的有机材料迅速分解，甚至造成大量元素损失。

3、二次电子和背散射电子发射：

绝缘样品镀一层 10nm 厚的 Au 层，能够提高 SE 发射率。但对于某些含有碱土的金属氧化物陶瓷，SE 产额反而会减少低很多。

背散射电子观察，如果镀上一层重金属，会掩盖原子序数反差，因此常常利用一薄层地原子序数导体，蒸碳较为合适，这样不会大量散射入射电子。

对于高分辨，低能量损失的信号，样品必需镀有在分辨率 1nm 时不会显现结构的重金属层，一般推荐，高熔点金属，钽或者钨作为镀层。

4、提高机械稳定性：

颗粒样品和脆性的有机材料镀上一层碳后，可以被牢固的固定在样品杯上。甚至可以不用胶带固定，直接蒸镀碳膜或者溅射金属膜层，就能很好的固定。

5、未镀膜的绝缘样品几种方法：

1)、低电压操作--在反射率和二次电子产额等于 1 之间的电压下操作，对于钨灯丝扫描电镜，电子束亮度相对高电压会降低几十倍，而且电子光学系统的像差亦会增大，这需要考虑扫描电镜的潜能。

而对于场发射扫描电镜来说，在低加速电压下，也可以获得好的分辨率，在样品表面增加离子，中和表面累积电荷，可采用低真空样品室，获得等离子气体，含水样品可以采用冷冻台，直接观察，有赖于样品中的水分有足够的电导率。

2)、成分像或者原子序数反差：

当我们需要研究弱反差机制（两个相之间的平均原子序数相差很小）的时候，必需消除样品形貌的反差影响。对样品进行抛光。

3)、WDS 化学元素显微定量分析：需要非常光滑的表面，机械抛光，电解抛光，化学处理等等。

4)、冶金金相显微结构：机械抛光，腐蚀。

5)、断口显微分析：采用低速金刚石锯，或者线切割取样，对材料产生最小的热量和机械损伤。

一般把样品用螺丝固定在样品托上，或者用双面导电胶带粘在样品托上。对于用环氧树脂或者胶木镶嵌的样品，必须保证样品能很好的导电和接地。

5 地质样品

地质矿物样品是典型的非导电样品，喷镀导电膜是必要的。也可以使用低加速电压模式，或者环境扫描电镜。

6 电子材料和器件

直接观察一般都是令人满意的。采用低加速电压模式效果更好。当然也需要喷镀情况要，高加速电压的高分辨模式观察。

X 射线能谱分析，往往比较难做。因为其特征往往很薄小于 1 微米，必需选择合适的加速电压，否则得不到好结果。

7 黏土，沙子，土壤

样品制备需要从两个方面考虑

有机成分

无机成分

只有环境扫描电镜才可以直接观察两种成分。

其他的扫描电子显微镜分析系统都需要对样品进行干燥。干燥方法如下：

- 烘箱干燥
- 空气自然干燥
- 真空干燥
- 置换干燥，
- 冷冻干燥
- 临界点干燥

8 颗粒和纤维

特点为大多数非导电样品，在电镜观察时候，往往静电排斥作用，机械不稳定。所谓样品漂移！ 小于 1 微米的尺度，电子束可能穿透样品，随后基底散射产生的信号，将使得图像反差降低。同时 X 射线信号会增加基底的成分。

超声波振荡分散：一定量样品放入分散剂中进行分散，分散剂中往往加入表面活性剂。

树脂分散：把颗粒样品镶嵌在树脂中。

用碳导电胶带，直接沾一些颗粒或者纤维。绝缘的样品喷镀导电膜。

9 生物样品

扫描电子显微镜样品的制备，必须满足以下要求：①保持完好的组织和细胞形态 ②充分暴露要观察的部位；③良好的导电性和较高的二次电子产额；④保持充分干燥的状态。

某些含水量低且不易变形的生物材料，可以不经固定和干燥而在较低加速电压下直接观

察，如动物毛发、昆虫、植物种子、花粉等，但图象质量差，而且观察和拍摄照片时须尽可能迅速。对大多数的生物材料，则应首先采用化学或物理方法固定、脱水和干燥，然后喷镀碳与金属以提高材料的导电性和二次电子产额。

化学方法制备样品

化学方法制备样品的程序通常是：清洗、化学固定、干燥、喷镀金属。

1、清洗：某些生物材料表面常附血液、细胞碎片、消化道内的食物残渣、细菌、淋巴液及粘液等异物，掩盖着要观察的部位，因而，需要在固定之前用生理盐水或等渗缓冲液等把附着物清洗干净。亦可用 5%碳酸钠冲洗或酶消化法去除这些异物。

2、固定：通常采用醛类(主要是戊二醛和多聚甲醛)与四氧化锇双固定，也可用四氧化锇单固定。四氧化锇固定不仅可良好地保存组织细胞结构，而且能增加材料的导电性和二次电子产额，提高扫描电子显微图象的质量。这对高分辨扫描电子显微术是极端重要的。为增强这种效果，可用四氧化锇-单宁酸或是四氧化锇-珠叉二胍等反复处理材料，使其结合更多的重金属锇，这就是导电染色。

3、干燥：固定后通常采用临界点干燥法。其原理是：适当选择温度和压力，使液体达到临界状态(液态和气相间界面消失)，从而避免在干燥过程中由水的表面张力所造成的样品变形。对含水生物材料直接进行临界点干燥时，水的临界温度和压力不能过高(37.4℃，218帕)。通常用乙醇或丙酮等使材料脱水，再用一种中间介质，如醋酸戊酯，置换脱水剂，然后在临界点干燥器中用液体或固体二氧化碳、氟利昂 13 以及一氧化二氮等置换剂置换中间介质，进行临界干燥。

4、喷镀金属：将干燥的样品用导电性好的粘合剂或其他粘合剂粘在金属样品台上，然后放在真空蒸发器中喷镀一层 50~300 埃厚的金属膜，以提高样品的导电性和二次电子产额，改善图象质量，并且防止样品受热和辐射损伤。如果采用离子溅射镀膜机喷镀金属，可获得均匀的细颗粒薄金属镀层，提高扫描电子图象的质量。

冷冻方法制备样品

低温扫描电子显微术是 20 世纪 80 年代迅速发展和广泛应用的方法。它包括生物样品的冷冻固定、冷冻干燥、冷冻割断和冷冻含水样品的扫描电子显微术等。

1、冷冻固定：将生物材料投入低温的致冷剂中，如液氦、液氮、液体氟利昂及丙烷等。快速冷冻可使生物组织细胞的结构和化学组成接近于生活状态。被冷冻固定的生物样品，可以在低温条件下转移到具有低温样品台的扫描电子显微镜中直接观察无需进一步处理或仅在冷冻样品表面喷镀一薄层金属。这种方法不仅快速简便，而且可以排除由于干燥法造成收缩的假象，特别适合于研究含水量很高的生物材料。

2、冷冻干燥：生物样品经冷冻固定后，其中的水分冻结成冰，表面张力消失；再将冷冻样品放于真空中，使冰渐渐升华为水蒸气。这样获得的干燥样品在一定程度上避免了表面张力造成的形态改变。

三、样品导电膜的制备技术

1 理想膜层的特点

- 良好的导热和导电性能。
- 在 3-4nm 分辨率尺度内不显示其几何形貌特点，避免引入不必要的人为图像。
- 不管样品的表面形貌如何，覆盖在所有部位的膜层需要薄厚均匀。
- 膜层对样品明显的化学成分产生干扰，也不显著的改变从样品中发射的 X 射线强度。
- 这层膜主要增加样品表面的导电性能和导热性能，导电金属膜层的厚度普遍电位在

1-10nm。

2 导电膜制备技术

在样品表面形成薄膜有多种方法，对于扫描电镜和 X 射线显微分析，只有热蒸发和离子溅射镀膜最实用。

蒸发镀膜 许多金属和无机绝缘体在真空中被某种方法加热，当温升足够高蒸发气压达到 1.3Pa 以上时，就会迅速蒸发为单原子。

3 加热方法

1)、**电阻加热法** 电流加热一个难熔材料，钨丝，钼丝，钽丝或者某种金属氧化物制成的容器。

2)、**电弧法加热** 在两个电极之间，拉出电弧，导体表面则迅速蒸发，用于蒸发高熔点金属。

3)、**电子束加热法**：金属蒸发材料如钨、钼、钨等，作为阳极，被 2-3keV 的电子束辐射，这个电子束流一般要 mA 级别。由于电子束加热法，温度最高的地方为靶材表面，所以效率最高，另外金属材料蒸发沉积下的颗粒很细小。电子枪加热也可以蒸发熔点相对较低的 Cr 和 Pt。

4 高真空蒸发

机械泵+扩散泵（涡轮分子泵）

5 低真空蒸发

为避免氧化，用氩气保护。

1、蒸碳

把碳棒或者碳绳链接在两个电极上，为了避免碳在空气中加热燃烧，使其在高真空中通入交流电或者在低真空 1Pa 时用氩气保护。碳棒或者碳绳这时候相当于白炽灯的灯丝。“灯丝”的温度随着交流电压的加大而升高。当达到 3000° C 以上，开始白炽发光的时候，大量的碳原子从“灯丝”表面向任意方向发射。把样品放在灯丝附近，在样品表面可以形成致密的碳膜。为了使得样品不至于被高温灼烧，可以调节工作距离。另外蒸碳的时间非常短，可以在瞬间完成。

2、蒸发金属：一般用钨丝篮作为电阻加热装置，把小于 1 毫米以下的金属丝缠绕在其表面。就像在白炽灯灯丝上，或者电炉的加热丝上加上需要蒸发的金属，也有用加热坩埚，蒸发金属粉末。

优点：可提供碳和多种金属的镀层，镀层精细均匀，适合非常粗糙的样品，高分辨研究。可以喷碳（碳棒或碳绳），有利于对样品中非碳元素的能谱分析。非导电样品观察背散射电子图像，进行 EBSD 分析，也应该喷碳处理。

缺点：这种方法容易对样品产生污染，蒸发温度过高（例如碳的蒸发温度为 3500K），会损伤热敏感材料。

真空蒸发镀层厚度可以通过下面公式进行估算：

$$T = \frac{3}{4} \left(\frac{M}{4 \pi R^2 \rho} \right) \cos \theta \times 10^{-7}$$
（式中 2 和 -7 为指数）其中：T (nm) 为蒸镀层的厚度；M (g) 为蒸发材料的总质量； ρ (g/cm³) 为蒸发材料的密度；R (cm) 为蒸发源到试样的距离； θ (度) 为样品表面法线与蒸发方向的夹角。

6 离子溅射镀膜

高能离子或者中性原子撞击某个靶材表面，把动量释放给几个纳米范围内的原子，碰撞时某些靶材原子得到足够的能量断开与周围原子的结合键，并且被移位。如果撞击原子的力量足够，就能把表面原子溅射出靶材。

离子溅射的类型：

1)、离子束溅射：氩气态离子枪，发射的离子，被加速到 1-30keV，经过准直器或一个简单的电子透镜系统，聚焦形成撞击靶材的离子束。高能离子撞击靶材原子，原子以 0-100eV 的能量发射，这些原子沉积到样品与靶材有视线的范围内的所有表面。可以实现 1.0nm 分辨率镀膜。

2)、二极直流溅射：是最简单的一种。1-3keV

3)、冷二极溅射：将二极直流溅射改进，用几个装置保持样品在整个镀膜过程中都是冷态。克服二极溅射的热损伤问题。采用环形靶材代替盘形靶，在中间增加一个永磁铁，并且在靶的周围加上环形极靴，偏转轰击在样品表面的电子。如果用一个小的帕尔贴效应的低温台，可以实现融点在 30 摄氏度的样品镀膜。

以下四个因素影响溅射效率：

电压： 激发充入气体的电离，以及决定离子的能量。

离子流： 和气体的压力有关，决定溅射的速率

靶的材质：材料的结合能，对等离子对靶材的侵蚀有重大影响。(Au & Pd 溅射速度高于 W) 充入的气体：充入气体的原子序数越高，溅射速率越高。

离子溅射原理

直流冷阴极二极管式，靶材处于常温，加负高压 1-3kV，阳极接地。当接通高压，阴极

发射电子，电子能量增加到 1-3keV，轰击低真空中（3-10pA）的气体，使其电离，激发出的电子在电场中被加速，继续轰击气体，产生联级电离，形成等离子体。离子以 1-3keV 的能量轰击阴极靶，当其能量高于靶材原子的结合能时，靶材原子或者原子簇，脱离靶材，又经过与等离子体中的残余气体碰撞，因此方向各异，当落在样品表面时，可以在粗糙的样品表面形成厚度均一的金属薄膜，而且与样品的结合强度高。如果工作室中的气体持续流动，保持恒定压力，这时的离子流保持恒定。高压的功率决定了最大离子流，一般有最大离子流限制，用于保护高压电源。

溅射镀膜厚度经验公式：

$$D=KIVt$$

D--镀膜厚度 单位 埃 0.1nm

K--为常数，与靶材、充入气体和工作距离有关，当工作距离（靶材与样品的距离）为 50mm，黄金靶，气体为氩气时， $K=0.17$ ；气体为空气时， $K=0.07$ I--离子流 单位 mA

V--阴极（靶）高压 单位 KV

t--溅射时间 单位秒。

离子溅射仪操作：

一般工作距离可调，距离越近，溅射速度越快，但热损伤会增加。离子流的大小通过控制真空压力实现，真空度越低，I 越大，溅射速度越快，原子结晶晶粒越粗，电子轰击样品（阳极）产生的热量越高；真空度越高，I 越小，溅射速度越慢，原子结晶晶粒越细小，电子轰击样品产生的热量小。加速电压为固定，也有可调的，加速电压越高，对样品热损伤越大。一般使用金属靶材的正比区域。有些热敏样品，需要对样品区进行冷却，水冷或者帕尔贴冷却；也可以采用磁控装置，像电磁透镜一样把电子偏离样品。经过这样的改造，当然会增加很高的成本。可以在石蜡表面溅射一层金属，而没有任何损伤！

真空中的杂质越多，镀膜质量越差。一般黄金比较稳定，可以采用空气作为等离子气源，而其他很多靶材则需要惰性气体为好。气体原子序数越高，动量越大，溅射越快，但晶粒会较粗，连续成膜的膜层较厚。保持真空室的洁净对高质量的镀膜有很大好处。不要让机械真空泵长期保持极限真空，否则容易反油。