

电子探针X射线微区分析技术
在生物学中的应用

电子探针 X射线微区分析技术

在生物学中的应用

刘发义 编

872

2

科学出版社

电子探针
X 射线微区分析技术
在生物学中的应用

刘发义 编

科学出版社

1990

DL50/02

内 容 简 介

本书介绍了生物科学中的电子探针 X 射线微区分析技术。全书共分六章: 第一、二章介绍该技术的基本知识、基本原理和仪器设备, 第三章介绍各种样品的制备技术, 第四、五章是有关分析操作和定量分析问题, 第六章介绍该技术在生物科学中的应用实例。各章后面附有参考文献。

本书可供电子探针和电子显微镜工作者、有关生物学科的科研技术人员、教师 and 研究生参考。

电子探针 X 射线微区分析技术 在生物学中的应用

刘发义 编

责任编辑 王爱琳

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1990 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1990 年 3 月第一次印刷 印张: 4 1/2

印数: 0001—5904 字数: 98 000

ISBN 7-03-001575-4/Q·235

定 价: 4.60 元

前 言

电子探针X射线微区分析技术是50年代开始发展起来的一种新的光谱分析技术,其最显著的特征之一,就是能分析样品中非常微小区域内的元素组成及含量。它开始是在矿物、冶金等非生物科学领域中得到应用,人们对这方面的理论和实践了解得比较深入,国内在这方面做的工作也比较多,已经有了一些专著和译著。然而在生物科学领域中的应用,只是近十几年来才逐渐发展起来的,在样品的制备、分析操作,以及定量分析的理论和实践方面,与非生物样品分析相比,都有其特殊的地方。目前这项技术已经在细胞学、生理学、环境生物学和生物化学等生物学的许多学科以及其它有关学科中得到广泛的应用,对于推动生物科学的发展起到了重要的作用,而且可以肯定,今后将会起到越来越重要的作用。但是,目前在我国这方面的工作还只是刚刚开始。编写这本小册子的目的,是希望对这项工作的进展有一点帮助。

本书重点介绍用于X射线微区分析的生物样品的制备技术、分析操作以及定量分析需要注意的一些基本问题。为了便于读者更好地理解 and 掌握上述有关问题,首先对电子探针X射线微区分析的基本原理和仪器设备作些简单的介绍,最后则举些实例,介绍该项技术在细胞学、生理学、医学、环境和生物化学等科学领域中的应用,以使读者对其在生物科学中的重要作用有比较直接的了解。由于本人水平所限,书中的错误之处恐难避免,诚恳希望有关专家和广大读者批评指正。

目 录

前言

第一章 绪 论	(1)
1.1 什么是电子探针X射线微区分析	(1)
1.2 电子探针X射线微区分析的特点	(1)
1.3 电子探针X射线微区分析的发展史	(3)
第二章 基本原理和仪器设备	(5)
2.1 X射线的产生	(5)
2.1.1 原子的壳层模型	(5)
2.1.2 电子引起原子电离	(6)
2.1.3 特征X射线的产生	(6)
2.1.4 特征X射线的能量与原子序数的关系	(7)
2.1.5 特征X射线的强度	(8)
2.1.6 连续X射线的产生	(9)
2.1.7 X射线谱	(10)
2.2 产生X射线的装置——电子光学系统	(11)
2.2.1 电子探针微区分析仪	(12)
2.2.2 带有X射线探测装置的扫描电子显微镜	(13)
2.2.3 装配有X射线探测装置的扫描透射电子显微镜	(13)
2.2.4 装配有X射线探测装置的透射电子显微镜	(14)
2.2.5 电子显微镜微区分析仪	(15)
2.2.6 分析电子显微镜	(16)

2.2.7 各种电子光学系统性能的比较	(16)
2.3 X射线的探测	(16)
2.3.1 波长色散型谱仪	(18)
2.3.2 能量色散型谱仪	(0)
2.3.3 探测器的能量分辨率	(24)
2.3.4 能谱仪和波谱仪的比较	(25)
第三章 样品的制备	(29)
3.1 生物样品的分类	(29)
3.1.1 组织切片样品	(30)
3.1.2 液体样品	(31)
3.1.3 无机颗粒或纤维状物质的样品	(31)
3.1.4 分离细胞或亚细胞颗粒样品	(31)
3.2 常温下的样品制备技术	(31)
3.2.1 湿化学制样技术	(31)
3.2.2 分离细胞或亚细胞颗粒样品的制备	(40)
3.2.3 液滴样品的制备	(43)
3.3 低温条件下的样品制备技术	(46)
3.3.1 冷冻干燥法	(49)
3.3.2 冷冻置换法	(50)
3.3.3 冰冻超薄切片技术	(55)
3.3.4 冰冻含水样品的制备	(60)
3.4 硬组织样品的制备	(61)
3.5 标准样品的制备	(63)
3.5.1 树脂包埋的标样	(64)
3.5.2 冰冻切片标样	(67)
3.5.3 液滴标样	(67)
3.6 样品的支持物	(68)
第四章 分析操作	(72)
4.1 影响分析的几个因素	(72)
4.1.1 X射线的吸收	(72)

4.1.2	样品的辐射损伤和热损伤	(72)
4.1.3	样品的污染	(73)
4.1.4	来自样品以外的X射线的干扰	(73)
4.1.5	X射线分析的空间分辨率	(74)
4.2	分析条件的选择	(76)
4.2.1	加速电压	(76)
4.2.2	电子束电流	(78)
4.2.3	分析时间	(79)
4.2.4	放大倍数	(81)
4.3	分析操作	(81)
4.3.1	电子束聚焦	(81)
4.3.2	调节探测器的位置	(82)
4.3.3	调节样品或探测器的倾角	(83)
4.3.4	多道脉冲高度分析器能量范围的校准	(85)
4.3.5	死时间的校正	(85)
4.3.6	X射线谱的探测和鉴别	(86)
4.3.7	元素分布图	(87)
4.3.8	线扫描	(87)
4.3.9	静态探针分析	(89)
第五章	定量分析	(91)
5.1	影响定量分析的因素——基体效应	(91)
5.1.1	原子序数效应	(91)
5.1.2	吸收效应	(92)
5.1.3	荧光效应	(92)
5.2	X射线谱的处理	(93)
5.2.1	背景值的扣除	(93)
5.2.2	峰的积分	(96)
5.2.3	复杂X射线谱的分解	(97)
5.3	薄样品或超薄样品的定量分析	(100)
5.3.1	比率法	(100)

5.3.2 连续法	(103)
5.4 厚样品的定量分析	(107)
5.4.1 理论修正方法——ZAF 法	(107)
5.4.2 峰/背景比率法	(108)
5.5 电子计算机在定量分析中的应用	(109)
第六章 在生物科学中的应用	(111)
6.1 在细胞生物学中的应用	(111)
6.1.1 研究元素在细胞和亚细胞颗粒中的分布	(111)
6.1.2 研究电解质和水在组织细胞内的运输	(114)
6.1.3 对红细胞成熟过程的研究	(117)
6.1.4 对细胞老化的研究	(118)
6.1.5 对植物细胞的研究	(118)
6.2 在医学上的应用	(119)
6.3 在生理科学中的应用	(121)
6.4 在环境毒理学中的应用	(122)
6.4.1 研究重金属在生物体内的分布	(123)
6.4.2 研究重金属在细胞内的代谢过程	(125)
6.4.3 研究生物对金属的贮存和解毒机制	(126)
6.5 在生物化学中的应用	(127)
6.6 对硬组织的分析	(128)
附录: 元素X射线的能量	(132)

第一章 绪 论

1.1 什么是电子探针 X 射线微区分析

简单地讲,电子探针X射线微区分析(electron probe X-ray microanalysis)就是用非常细的电子束入射到样品表面,激发样品使之发射出特征X射线,再用某种探测装置探测发射出来的X射线,根据所探测到的X射线的能量大小和射线强度,以确定样品所含元素的种类和含量。实际分析中,是将X射线探测器与电子光学系统组装到一起,譬如将X射线探测器组装到电子显微镜的电子光学系统中,电子枪发射出的电子束被聚焦后投射到样品表面,激发样品产生X射线。电子束可以被聚焦很细,能在样品非常微小的区域内激发出X射线,从而分析出该区域内的元素组成。这种很细的电子束称为电子探针,这种分析方法则称为电子探针X射线微区分析,又称为X射线微区分析(X-ray microanalysis)、电子探针分析(electron probe analysis)或电子微束分析(electron microbeam analysis)等。

1.2 电子探针 X 射线微区分析的特点

与其它分析方法相比,电子探针X射线微区分析具有如下特点:

1) 能把对样品的成分分析和形态结构观察结合起来。在比较老式的电子探针分析仪中,是通过高质量的光学显微镜

9010072

• 1 •

来观察所分析的区域，而利用装配有X射线探测装置的电子显微镜进行分析时，则可以直接通过其电子图像来观察分析的区域，这样可以把样品被分析区域的元素组成与其超微结构联系起来，这对于解释许多生物学现象是非常有用的。

2) 分析的区域微小。由于分析时所使用的电子探针的直径非常小，最小的可达几个纳米 (nm)，可以分析组织中的单个细胞、细胞间隙、细胞膜内外微小区域，以至单个亚细胞颗粒内的元素组成，因而可以探讨细胞的超微结构和亚细胞组分的功能。

3) 分析灵敏度高。用X射线微区分析技术分析生物样品，对于原子序数大于8的元素，其能被探测出的最小量可达 10^{-16} — 10^{-19} 。

4) 可测元素的范围广。理论上，原子序数大于2的元素都能被测定，不过实际上，由于X射线的吸收等因素的影响，用能谱仪能测定的最轻元素是Na ($Z = 11$)，用波谱仪能测定的最轻元素是B ($Z = 5$)。

5) 分析结果与元素在样品中的化学状态无关，通常也不需对样品进行化学处理。用这种方法不会因待测元素的化学状态不同而引起误差。

6) 能进行多元素同时分析。用能谱仪进行分析时，几乎可以同时测定样品中原子序数大于10的所有元素，只要它们的含量足够高的话。

7) X射线谱比其它光谱简单，且与元素的原子序数密切相关，因而借此很容易鉴别探测到的元素。

上面谈的是X射线微区分析的优点，但任何一种技术都有其缺点。X射线微区分析的主要缺点是样品制备比较麻烦，要求具备较高的技术；分析设备比较昂贵；操作比较困难；分析所得的数据处理也比较复杂，特别是样品组成比较复杂

的分析结果更是如此。因此掌握上述的技术需要经过很好的专门训练。另外,该方法只能测定出样品中元素的有无及其含量,而通常不能鉴别出其化学状态,这也是该方法的缺点之一。

1.3 电子探针 X 射线 微区分析的发展史

早在 1895 年,德国物理学家伦琴就发现了 X 射线,所以又称之为伦琴射线。但直到 1910 年, Barkla 才第一次获得特征 X 射线谱。三年之后, Moseley 确定了特征 X 射线的频率,发现其能量与原子序数之间存在着密切的关系,这就为利用 X 射线鉴定元素打下了理论基础。但是由于技术上的限制, X 射线分析一直未能在实际中得到应用。直到 1951 年,法国的 Castaing 制出了一种新的仪器——电子探针,第一次有可能把电子束聚焦到 $1\text{ }\mu\text{m}$ 直径以下,借此,可以在固体样品中激发出特征 X 射线,这样, X 射线在元素分析中的实际应用才得以实现。1956 年,在 Castaing 的设计基础上,制造出了第一架具有商业价值的电子探针分析仪。这种分析仪可以把电子束聚焦到 $0.1\text{—}1\text{ }\mu\text{m}$, 其分析的区域靠光学显微镜来观察。X 射线的强度是利用波长色散型谱仪(即波谱仪)来测定。

1956 年以后的几年中,电子探针 X 射线微区分析得到了很快的发展,其中最重要的是找到了大晶格间距的衍射晶体,从而使得利用波谱仪可以测定轻元素如 F, O, N, C, B 等发射出的 X 射线。

1968 年,能量色散型谱仪(即能谱仪)的出现,在 X 射线微区分析技术发展史上可以说是一场革命。这种探测器可以

迅速地同时探测出样品中几乎所有原子序数大于 10 的元素。现在这种探测器已经成了应用最广泛的探测装置。

X 射线微区分析技术最早是在矿物学、冶金学等学科领域中得到应用的。在生物学中的应用是 60 年代才逐步开始,而且首先是用来分析硬组织,如骨骼、牙齿等。对软组织的分析直到 60 年代后期、70 年代初才逐渐多起来。这并不是由于仪器本身的限制,而主要是由于在软组织中,可溶性元素在样品制备过程中容易发生丢失和位移,并且在电子束轰击下,生物样品容易损伤,这使得对生物材料的分析比对矿物或金属材料困难得多。为了解决这些问题,人们进行了许多研究,目前还在不断地进行努力。

最近一些年,电子计算机已经广泛地与电子探针 X 射线微区分析装置连接起来使用,大大地简化了数据的分析和处理过程,从而大大地推动了电子探针 X 射线微区分析技术的应用。

参 考 文 献

- [1] Hall, T.A. (1971), in: *Physical Techniques in Biochemical Research*. 2nd ed., Vol. 1A (ed. G. Oster), p. 157, Academic Press, New York.
- [2] Goldstein, J.I. *et al.* (1981), *Scanning Electron Microscope and X-ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists and Geologists*. Plenum Press, New York, London.
- [3] Hayat, M. A. (1980), *Electron Microanalysis in Biology*. University Park Press, Baltimore, U.S.A.

第二章 基本原理和仪器设备

2.1 X射线的产生

2.1.1 原子的壳层模型

我们知道,原子是由原子核和绕核运动的电子组成的。根据玻尔原子模型,这些电子是分布在不同的电子轨道上,聚集在一起的轨道组成一个壳层。按照距离原子核远近的不同,从里向外将这些壳层标记为 K, L, M, N, O 等壳层。每个壳层都具有一定的能量范围,称为能级。外面壳层的能量大于里面壳层的能量。同一壳层内的不同轨道,其能量也不相同,因而,在大能级内又分成许多小的能级。图 2.1 是这种原子壳层模型的示意图。

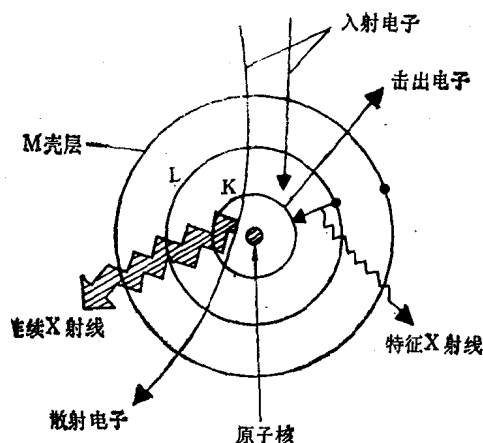


图 2.1 原子的壳层模型和 X 射线的产生

2.1.2 电子引起原子电离

物质是由原子构成的,当外来电子入射到物质中时,有可能把原子内壳层的电子击出原子之外,从而引起原子电离。这种射入原子的电子称为入射电子,或初级电子。

入射电子具有一定的能量,用 E_0 表示。如果要把轨道电子击出原子之外,则需要入射电子能量达到一定的程度,这种能量称为临界激发能 (critical excitation potential), 用 E_c 表示。因此,要用入射电子将轨道电子击出原子之外,必须满足 $E_0 \geq E_c$ 的条件。由于临界激发能是将轨道电子击出原子之外所需的能量,因此它差不多等于该电子所在壳层及其外面的所有壳层的轨道能量之和。例如铀的 K_α 线的临界激发能为 115.6 keV, 而它的 $K_\alpha + L_\alpha + M_\alpha$ 线的能量之和为 $98.4 + 13.6 + 3.2 = 115.2 \text{ keV}$, 两者差不多相等。由此可见,不同轨道电子的临界激发能是不同的,不同种类原子的相同轨道上的电子的临界激发能也不相同。

2.1.3 特征X射线的产生

当原子被入射电子电离,即它的轨道电子被入射电子撞击,从它所在的轨道被排斥到原子之外时,此时该原子就处于激发状态。为了使原子保持稳定状态,就会有另一个电子从较高能级轨道跃迁到内壳层的空位置上,在这个过程中,其多余的能量就会以X射线光子的形式发射出来(如图2.1所示)。由于每个轨道的能量是一定的,因此,两轨道之间的能量差是固定的,即发射出的X射线的能量,对于某种元素来说是固定的,这种具有特定能量的X射线被称为特征X射线。人们把电子从其它轨道跃迁到K壳层上时发射出来的特征X射线称为K线,跃迁到L壳层上时发射出来的称为L线,依此类推,

还有M线、N线等等。

内壳层上的电子被击出之后，譬如K壳层上的电子被击出后，补充K壳层上空位置的电子可能来自L壳层，也可能来自M壳层或N壳层等等。另外，因为每个壳层内部又有许多能量不同的轨道，其上的电子都有可能向内壳层的空位置上跃迁，所有这些跃迁发射出的特征X射线的能量都不完全相同。人们把外壳层电子跃迁到K壳层时所产生的能量不同的特征X射线，分别称为 K_{α_1} , K_{α_2} , K_{β_1} , K_{β_2} , K_{γ_1} , K_{γ_2} 线等等。它们的能量依次降低。

在电子由较高能级的轨道跃迁到较低能级轨道的同时，又会有另一个电子从更高能级跃入这个较高能级的轨道，同样也会发射出一种具有不同能量的特征X射线。例如，当L壳层上的电子跃迁到K壳层上时，同时可能有一个电子从M壳层跃迁到这个L壳层上，依次类推。因此，在重的原子遭到电子轰击时，可能会产生一系列的特征X射线(见图2.2)。

2.1.4 特征X射线的能量与原子序数的关系

并不是所有的X射线发射都能被探测到，只有那些最强的、即X射线发射次数最多的谱线最容易探测到。通常将这些最容易探测到的X射线作为元素的特征谱线。实际上，最强的谱线是电子从L壳层跃迁到K壳层时发射出的X射线，即 K_{α} 线。从M壳层跃迁到L壳层时发射出的X射线强度次之，从N到M壳层再次之。

Moseley 1914 年首先发现，X射线的频率与元素的原子序数之间有如下关系：

$$\nu = 0.248(Z - 1)^2 \times 10^6$$

这里 ν 是X射线的频率， Z 是元素的原子序数。由于X射线的能量 E 与频率之间的关系是 $E = h\nu$ ，此处 h 是普朗克常

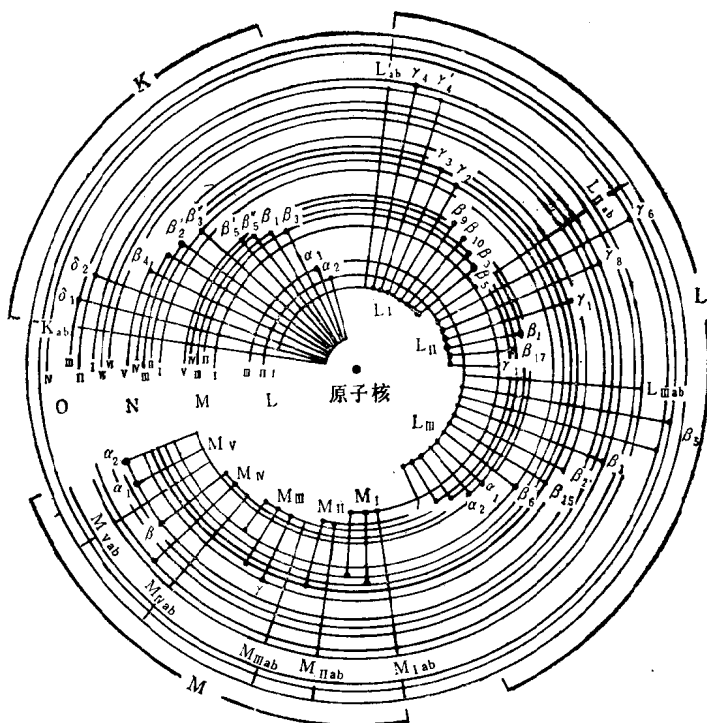


图 2.2 电子在不同能级间跃迁产生各种 X 射线

数,因此能量 E 与原子序数有直接的关系。现在,元素周期表中所有元素的特征X射线的能量都已经列成了表。因此,测量元素所发射出的X射线的能量,就可以鉴定出该元素。附录中列出了部分元素的K系列、L系列和M系列X射线的能量。

2.1.5 特征X射线的强度

特征X射线的强度是指发射出的特征X射线的强弱,它

与样品中被入射电子撞击能产生特征X射线的原子数目,即该元素在样品中的浓度成正比,此外还与X射线的荧光产额和电离截面成正比。

入射电子进入物质后,激发原子产生的X射线,并不能全部从原子中发射出来,它们有可能在该物质中与轨道电子相互作用而失去能量,同时发射出一个电子,称为俄歇电子(Auger electron),X射线本身则被吸收而不能发射出来。因此,入射电子引起的电离只有部分能发射出特征X射线。人们把这种发射X射线的几率称为X射线的产额,或叫荧光产额(fluorescence yield)。显然,荧光产额高X射线强度大。

荧光产额的大小,与被电子轰击的原子的原子序数、临界激发能以及入射电子的能量有关。它随着原子序数的增加而增加,例如原子序数为11的Na,其荧光产额为0.02,而到原子序数为30的Zn,则迅速增加到0.45。另外,实验证明,荧光产额是 $(E_0 - E_c)^{1.63}$ 的函数。

除此以外,荧光产额当然还与入射电子在被轰击物质中引起的电离几率,即入射电子中有多少能引起原子电离有关。人们用电离截面(ionization cross-section) Q 来描述电离几率。 Q 越大,电离几率越大。 Q 的大小与入射电子的能量和被激发原子的临界激发能有如下的关系:

$$Q = \frac{1}{E_0 E_c} \cdot \frac{\ln E_0}{E_c}$$

显然,电离截面大的,荧光产额也高。

2.1.6 连续X射线的产生

在2.1.2节中我们谈到,当入射电子撞击到轨道电子上击出电子时,会产生特征X射线。如果入射电子不是撞击到轨道电子上,而是靠近原子核通过,这些电子在带正电荷的原子