

附件：光学显微镜法公示稿

光学显微镜法

光学显微镜法是利用光学原理对样品微观形貌进行表征的分析方法。通常适用于 $1\mu\text{m}$ 及以上、肉眼难以观察的样品的观察与测量，下限由显微镜的分辨率决定。光学显微镜法特别适用于表征非球形的粒子，该方法可作为其他方法的校准基础。显微镜与红外光谱仪、拉曼光谱仪联用，还可对极微量或需微区分析的样品进行分析。

1. 对仪器的一般要求

光学显微镜通常由光学系统、机械装置两部分组成，还可配有成像系统。

(1) 光学系统

主要包括光源、聚光镜、物镜、目镜等组成。

透射光源一般为卤素灯或者 LED 灯；反射光源有汞灯、氙灯、LED 灯、激光光源等。可根据不同的研究对象，选用适当的光源。

显微镜的分辨率取决于光学系统的数值孔径（NA），包括物镜和聚光镜，计算公式为分辨率 = $\lambda / 2\text{NA}$ ，当 λ 光的波长固定时，NA 值越大，分辨率数值越低，即能分辨两个信号间的最小距离越小，清晰度越高。显微镜的放大率等于物镜的放大率、目镜的放大率和其他放大装置（如倍增器）的放大率的乘积。

照明方式对显微镜的成像质量有较大影响，尤其是进行显微镜摄影时，更要求在全部可视范围内有明亮可调、均匀、无反光的照明条件。一般优选科勒照明。

在实际运用中要根据具体情况选择不同的物镜、目镜组合，尽量选择高倍物镜以获得较高的分辨率。加装偏光装置（起偏器和检偏器）是将普通光改变为偏振光，以观察晶体样品的光学特征。根据观察要求，还可加装外置聚光灯。选用适宜的滤光片与消色差物镜一起使用，可获得色彩更真实的图像。

(2) 机械装置

主要包括镜座、镜筒、载物台、物镜转换器和调焦旋钮等，作用是固定与调节光学系统的各部件、固定和移动样品等。载物台一般是 XYZ 三个方向运动，根据分析的需求，选择具有加热、冷却或平面 360° 转动等功能的载物台。

(3) 成像系统

显微摄像是指用相机拍摄的方式记录显微图像的方法。可以用普通相机连接显微镜进行拍摄，也可以用带有图像传感器的显微数码相机进行记录。常见的图像传感器有 CCD、CMOS 等。

显微成像系统通过显微数码相机和图像分析软件，把显微镜观察的图像，在计算机上呈现出来，进行观察、测量分析等。

目镜测微尺标定方法见显微鉴别法（通则 2001）。图像分析软件的校准通常使用已标定载物台测微尺对软件的测量数值进行校准，也可采用标准粒子做验证。当测定时要用不同的放大倍数时，应分别校准。

2. 样品制备

针对不同类型样品、不同分析目的，可采取不同的制样方式，如切片法、整体封片法、涂片法和压片法等。盛载样品除载玻片外，还可用培养皿、血球计数板等。

除另有规定外，中药样品显微制片方法见显微鉴别法（通则 2001）；原料药和药物制剂的制片方法见粒度与粒度分布测定法（通则 0982）；微生物、血细胞等样品制片多采用整体封片法或涂片法。

3. 表征与测定

3.1 粒子表征

3.1.1 粒径表征

粒径测量的复杂程度取决于粒子形状，用于粒径表征的粒子数量必须足以确保测量参数的不确定度要求。对于球形粒子，大小由直径决定。对于不规则粒子，有多种大小的定义方式。一般而言，对于形状不规则的粒子，粒径表征还必须包括所测量的直径类型和粒子形状的信息。以下为几种常用的粒径测量方法（见图 1）。

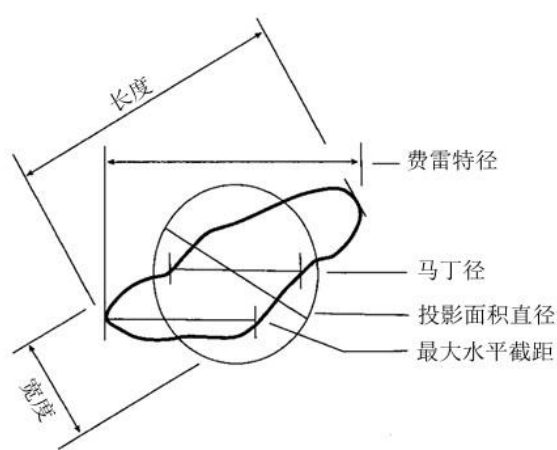


图 1 常用的粒径测量方法

- (1) 费雷特径：与随机取向的颗粒相切的假想平行线并垂直于目镜之间的距离。
- (2) 马丁径：将随机取向的颗粒分成两个相等投影面积的点处的颗粒直径。
- (3) 投影面积直径：与颗粒投影面积相同的圆的直径。
- (4) 长度：平行于目镜刻度方向的颗粒从边到边的最长尺寸。
- (5) 宽度：与长度成直角测量的颗粒最长的尺寸。
- (6) 最大水平截距：水平方向上颗粒最大直径。

3.1.2 形状表征

对于不规则形状的颗粒，粒径的表征还必须包括粒子形状的信息。应使用适当的放大倍数检查粉末的均匀性。以下为常见的颗粒形状术语（见图 2）。

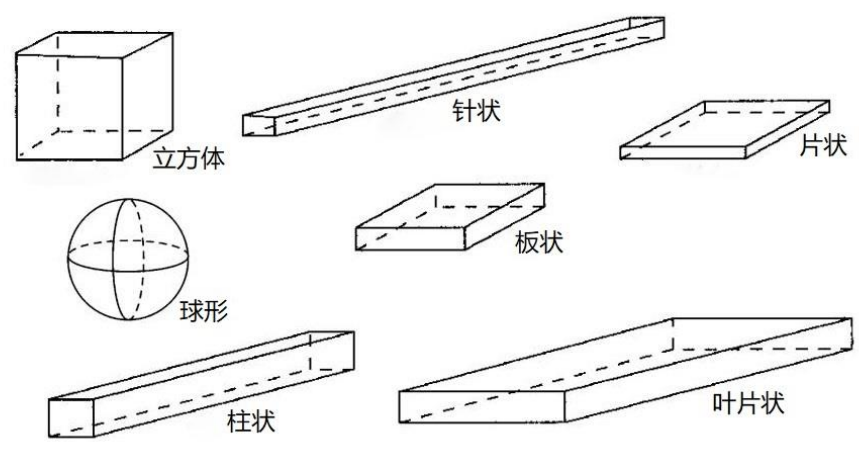


图 2 常用的颗粒形状术语

- (1) 针状：细长的针状颗粒，具有相似的宽度和厚度。

(2) 柱状：长而细的颗粒，其宽度和厚度大于针状颗粒。

(3) 片状：长度和宽度相似的薄而平的颗粒。

(4) 板状：长宽相似但比片状颗粒厚一些的扁平颗粒。

(5) 叶片状：长而薄，叶片状的颗粒。

(6) 等径：长度、宽度和厚度相似的颗粒；包括立方体和球形颗粒。

3.1.3 其他表征

粒子通常被认为是最小的离散单元。粒子可能是液体或半固体液滴，单晶或多晶，无定形或凝聚体。粒子间可能相互关联。这种关联程度可由以下术语描述：

(1) 层片状：堆叠的板状颗粒。

(2) 聚集体：粘附在一起的颗粒群。

(3) 凝聚体：熔合或粘结的颗粒。

(4) 混合物：两种或更多种颗粒的混合物。

(5) 球晶簇：放射状聚集体。

(6) 晶簇状：被微小颗粒覆盖的颗粒。

粒子状态可以由以下术语描述：

(1) 边缘：角形，圆形，光滑，锋利，断裂。

(2) 光学：颜色（使用适当的色彩平衡滤镜），透明，半透明，不透明。

(3) 缺陷：堵塞，杂质。

表面特征可以通过以下术语描述：

(1) 破裂：部分分裂，断裂或裂缝。

(2) 光滑：没有不规则、粗糙或突起。

(3) 多孔：有开口或通道。

(4) 粗糙：凹凸不平，不均匀，不光滑。

(5) 凹陷：小的凹槽。

3.2 显微鉴别

观察药材（饮片）切片、粉末、解离组织或表面制片及含饮片粉末的制剂中饮片的组织、细胞或内含物等显微特征，可以鉴别不同药材（饮片）以及含饮片粉末的制剂。照显微鉴别法（通则 2001）。

3.3 结晶性检查

利用晶体对光的基本特性可实现固态物质的结晶性检查。照结晶性检查法

97 （通则 0981 第一法）。

98 3.4 粒度和粒度分布

99 药物制剂的粒子大小或限度的测定方法照粒度和粒度分布测定法（通则
100 0982 第一法）；原料药或药物制剂的粒度分布的测定方法则根据供试品的特性，
101 选择适宜的分散方法，通常可采用物理分散的方法如压片法、真空分散器、制样
102 器等，使供试品均匀的分布在干净的载玻片上，覆以盖玻片，轻压使颗粒分布均
103 匀，立即在 50~500 倍的显微镜下检视，并采用专业的颗粒图像分析软件对颗粒
104 的颜色、形状、粒径等特征进行分析，计算粒度分布。

105 3.5 其他观察方法

106 3.5.1 热载台显微镜法

107 热载台显微镜法可观测程序温度控制下供试品的物相变化情况，照热分析法
108 （通则 0661 三、热载台显微镜法），温度控制部分需要进行校准。

109 3.5.2 镜检法

110 镜检法可用于生物制品生产用菌毒种、细胞特性的检定，生物制品半成品及
111 成品检定，包括结晶毒素检定、病毒检查、无菌检查、支原体检查、人血小板抗
112 体测定、疫苗效价测定、蛋白效价测定、生物学活性测定等检定中菌毒种和细胞
113 的研究。

114 3.5.3 荧光显微镜法

115 荧光显微镜法可用于对有荧光特性的物质，如自体荧光物质、交联有荧光染
116 料或荧光抗体的物质等，进行定性、定量及定位测量。包括支原体检查中的 DNA
117 染色法（通则 3301 第二法）、狂犬病免疫球蛋白效价测定法中的快速荧光灶抑
118 制试验法（通则 3512 第二法）等。

119 3.5.4 显微计数法

120 显微计数法可用于检查注射剂和供注射用无菌原料药中不溶性微粒的大小
121 和数量等，并且以该法的测定结果作为判定依据。对显微镜的一般要求和测定方
122 法照不溶性微粒检查法（通则 0903 第二法）。

123

起草单位：无锡市药品安全检验检测中心 联系电话：0510-66112735
主要起草人：张聪、张瑾、浦洁等

124

光学显微镜法增订说明

光学显微镜法是利用光学原理对样品微观形貌进行表征的分析方法。《中国药典》中光学显微镜的应用分散在各论众多检验项目之中，虽有部分通则提及应用，但局限性强，缺少相应通则来规范光学显微镜仪器性能及应用要求，世界各主流药典均收载光学显微镜法。因此有必要制订光学显微镜法通则，阐明仪器的关键参数、表征内容等，进一步规范光学显微镜在《中国药典》中的应用。

本通则参考各国药典、国家标准及行业指南等，以光学显微镜为核心，以具体检测项目为重点，力求与世界先进技术要求接轨，同时也符合我国现阶段国情，使技术要求便于操作。主要分为以下四部分内容：

1. 对仪器的一般要求：对光学显微镜的基本组成、关键参数等进行说明。
2. 校准：包括目镜测微尺标定和成像系统的测量校准。
3. 样品制备：阐述了常见的制片方法和装载样品的器皿。
4. 测定法：规范了显微观测粒子表征的术语，列举了光学显微镜在《中国药典》中常见的应用：显微鉴别、结晶性检查、粒度和粒度分布、热载台显微镜法、荧光显微镜法、显微计数法等。