

分析测试中心通讯

第1期



分析测试中心 主办 2012 年 5 月 25 日

目 录

新技术应用

激光的反射光模式分析没有荧光且不透光的样品	. 1
粉末样品的 CD 光谱测试	. 2
离子淌度质谱测试新技术	. 4

典型应用案例

XPS 分析中的 X 射线诱导光致变色效应	8
¹ H, ¹⁵ N 异核单量子相关谱(HSQC)及其应用	9
beta-CD 对伯胺的选择性识别和非对称催化的核磁证明	11
单晶结构解析中位置占据无序的分析方法	13

数据处理技巧

孪晶的数据处理技巧	17
红外光谱数据处理——导数光谱	19
Autodeblur 图像处理软件的应用	20

测试技术及技巧

有机样品中高硫样品的准确测试	22
有机样品中高氮样品的准确测试	24
质谱成像技术	26
氘代氯仿中的微酸性对测试谱图的影响	32
俄歇参数法分析分析铜锌化学态	33

仪器及功能介绍

粉末衍射分析方法	34
单晶衍射分析方法	35
受体光漂白法分析荧光共振能量转移(FRET)	36
等离子清洗仪及其应用	38
扫描电镜低加速电压及减压模式的应用	39

分析测试中心动态

分析测试中心将举办仪器分析沙龙	42
新购仪器及仪器新功能培训的安排	42

新技术应用

激光的反射光模式分析没有荧光且不透光的样品

▶ 刘美蓉

(分析测试中心光谱组 Tel:010-82613026 Email:mrliu@iccas.ac.cn)

常规的共聚焦显微镜分析有荧光的样品,样品需自身有荧光或进行荧光标记。对没有荧光且不透光的样品,我们尝试用激光的反射光模式观察其形貌。下图为一个纤维的例子,纤维本身不透光,也没有荧光。将激发二色镜换成BS20/80,此二色镜意思为对任何波长的光都20%的反射,80%的透过。这样,激发光如488nm 经扫描单元(SU)、激发二色镜 BS20/80 反射后,经物镜到达样品,经样品反射后,激发光按原路返还。经激发二色镜 BS20/80 透过激光,然后用 mirror和光栅收集激光的反射光,设定波长范围为480nm-490nm。这个范围基本上只有激光的反射光而不包括激发样品可能产生的荧光。

共聚焦反射光模式光路图

化学所分析测试中心的圆二色光谱仪 (CD)J-815 的附件 DRCD-466S 可对粉 末样品进行 CD 光谱表征。难溶固态样品的 CD 光谱表征一直是研究难点。该附 件是 JSCAO 公司新近研发产品,用于对非溶液体系的 CD 光谱测试。经过对该 附件测试条件的摸索,我们改进了制样过程。本台仪器 DRCD 测试,只需将粉 末样品与 KBr 粉末混合后研磨、压片,然后将透明的片状样品采用 DRCD 附件 测试即可。附图如下。

图1、 KBr 压片制样

图 2、 DRCD-466S 附件

图 3、同一样品溶液态与粉末态 CD 图

图 3 中粉末态样品经 KBr 压片后,用附件 DRCD 对其进行光谱测试;溶液态样品的 CD 光谱由常规的 CD 测试得到。由图 3,同一样品溶液态与粉末态的 CD 光谱中的峰位基本对应,说明采用 KBr 压片制样并进行 DRCD 测试,可以 准确地得到粉末样品的 CD 谱图。

图 4 显示样品粉末 1 及其手性对映体(粉末 2)的 CD 谱、紫外可见光吸收 图,均采用 DRCD 附件测试得到。由此可见,CD 光谱在分析物质的手性结构方 面是最直接的方法之一。

图 4 样品粉末 1 及其对映体(粉末 2)的 CD 光谱图及紫外可见光吸收图

离子淌度质谱测试新技术

▶ 熊少祥

(分析测试中心质谱组 Tel:010-62554495 Email: <u>mscbj@iccas.ac.cn</u>)

在传统的有机质谱仪中,增加离子淌度这一新的分离和测量因素,从而构成 了新的离子淌度质谱(HDMS)系统,它除了按质量和电荷数之外,还可以根据 离子的尺寸和形状分析样品,为研究人员提供了传统质谱所不能获取的特异性信 息。该技术所获取的4维数据信息,包括保留时间、质荷比、漂移时间和强度。 通过软件能够对其中的任意二维或三维信息进行自由选取或可视化处理。

1、HDMS 这种特性非常适合于有关于结构或组成个性差异的研究,如食品中类 似蛋白、多肽等大分子化合物以及氨基酸等小分子化合物的研究。因为传统质谱, 不论分辨率多高,只能判断其分子量。而对于分子量相同或分子式相同的化合物, 无论其结构上存在多大差异,均无法进行区分。而采用 HDMS,则能够根据化 合物的空间结构上的差异,通过其独有的离子淌度功能对于同分异构体进行区 分,且能够同时得到高精确质量信息与不同的离子淌度分离时间信息。

示例 1: 由相同氨基酸按照不同顺序组成的两个肽段,其分子组成完全一致。但 是由于其空间结构上存在细微的差异,借助于 HDMS 的离子淌度功能,能够实 现对两种肽段同分异构体的分离检测。

示例 2: 相同质量不同形状的两个同分异构蛋白,在 HDMS 中按照离子淌度分

离,分别得到 A 与 B 两个分离的区域。通过在数据处理软件中分别选取 A 区域 或 B 区域,能够非常简单快速的获取到各个区域的质谱信息。

示例 3: 对于亮氨酸及异亮氨酸这两种氨基酸小分子化合物, HDMS 的离子淌度 依然能够根据其空间结构上的差异, 对两者进行分离。

示例 4: 三种糖苷的同分异构体,由于葡萄糖链接的位置不同,从而造成空间结构上的细微差异。借助于 HDMS 的离子淌度功能,能够实现对这三种小分子同分异构体的分离。

2、同一物质在带多个电荷时,不同电荷数的离子在离子淌度中能够分布在不同 的区域。而相同电荷的离子中如果存在空间构造上的差异,也能够被离子淌度进 行分离。

示例 1: 蛋白构象研究: 在对溶菌素的研究过程中,对于带 8 个电荷的部分进行 深入分析,发现在离子淌度中可以区分为两个部分。经过 MS-IMS-(CID)-MS 分 析发现,离子淌度中两个部分的构象不同。

3、对于食品中高分子材料的分析,由于数种高分子混在一起,再加上可能包含 不同电荷的离子信息,质谱信号会相当复杂,此时离子淌度可依不同形状大小电 荷来进行分离。

以上可见,离子淌度质谱测试新技术,为相关的科学研究打开了新的一扇窗,能 够给出更多的数据和信息,有利于复杂化合物及其结构与性能的更深探求和认 识。

参考于 Waters 公司技术资料。

(分析测试中心光电子能谱组 Tel:010-62553516 Email: <u>xps@iccas.ac.cn</u>)

X 光致变色效应在某些技术领域有潜在的应用。比如,它可以用来在复合材料表面创建临时颜色图案。在 XPS 分析过程中,有些材料会出现颜色改变,其颜色的变化与 X 射线照射直接相关。通常,当含有某种特定的元素(如 Bi、W 等)或存在某种特殊结构时会在 X 射线诱导下产生光致变色。在我们的研究中,BiI₃/nylon11 纳米复合膜和 BiOI/nylon11 膜都观察到了 X 光致变色效应。在

BiI₃/nylon11 纳米复合膜中,当 BiI₃发生了氧化还原作用,Bi 从高氧化态还原到 金属态,直接对应于其颜色从橘红色变为黑色(见下图)。

相关文章如下:

1. XPS Study on BiI3-nylon11 Nanocomposites, *Mater. Chem. Phys.*, 2010, 124: 55-59.

2. Preparation and XPS study of X-ray photochromic transparent BiOI/nylon11 composite film, Appl Phys A (2011) 103:1059–1065

Correlation, HSQC)及其应用

▶ 向俊锋

(分析测试中心核磁组 Tel:010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn)

异核相关谱对于有机化合物的结构鉴定非常重要。如果这类二维谱对异核 (非氢)进行采样,灵敏度就比较低。一般而言,二维核磁实验中的 S/N 值与激发 核和检测核之间有如下关系

$$S_N \propto \gamma_{exe} \times \gamma_{det}^{3/2}$$

其中:γ_{exc}和γ_{det}分别为激发和检测核的磁旋比。因此,对于氢和异核之间的相关 谱由检测杂核改变为¹H,S/N将比直接检测杂核提高数倍,如检测¹³C改为检测 ¹H,由于¹³C的磁旋比为¹H的0.2515倍,其¹H,¹³C-HSQC的S/N将为直接 检测¹³C的31.4倍。如检测¹⁵N改为检测¹H,¹H,¹⁵N-HSQC的S/N将为直接 检测¹⁵N的316倍。在相同条件下,我们可以用较少的样品获取更佳的核磁图谱, 同时也可以减低仪器机时,提高仪器使用效率。

上图为天然丰度¹⁵N 的多头酰肼化合物所形成超分子(样品浓度约 10 mM)的¹H,¹⁵N-HSQC 谱(600 MHz),采样次数为 16 次,使用仪器时间为 4 小时。从图 谱中可以看出超分子有 8 类 NH(或 NH₂),同时从¹⁵N 间接维上可以得到¹⁵N 的 化学位移。与直接对¹⁵N 采样并进行观测的图谱结果相比,相对样品用量和仪器 时间大大缩短,并节省了大量同位素标记的费用。该结果与其它二维核磁图谱结 合,几种多头酰肼化合物的结构得以充分指认(J. Am. Chem. Soc. 2009, 131,

12657-12663)。

值得指出的是,这种方法只能用于直接与¹H相连的杂核指认上。

beta-CD 对伯胺的选择性识别和非对称催化的核磁证明

▶ 向俊锋

(分析测试中心核磁组 Tel:010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn)

有研究发现β-CD 能够识别手性伯胺,并对其催化作用有促进作用。利用 ROESY(旋转坐标的 NOESY)表征了超分子与手性伯胺的相互作用与立体构象关 系。扩散序谱(Diffusion Ordered NMR Spectroscopy, DOSY,参考文献见 Cohen 德国应用化学 2005,44,520-554 上的综述)结果证实在 2 到 20mM 浓度范围内, 手性二胺以单体形式存在。这说明β-CD 与手性伯胺的相互作用主要与手性二胺 的单体形式有关。相关结果见 JACS 2010,*132*,7216–7228。

Figure 8. ROESY spectrum and conformation of (a) **CD-1** (0.02 M) in D2O; (b) **CD-1** (0.02 M) in acetate buffer (pH) 4.80); (c) **CD-2** (0.02 M) in D2O; and (d) **CD-2** (0.02 M) in acetate buffer (pH) 4.80). (600 M)

Figure S10 The DOSY spectrum of **CD-1** (D2O, T = 298 K, 600 M) under 2 mM (**a**) and 20 mM (**b**), showing the same diffusion coefficient.

在单晶样品测试中出现无序数据是一种很常见的现象。当一种物质大部分结构长程有序,仅有小部分结构无序时,其晶体结构可以用通常的方法进行解析,但是无序部分可能会出现原子位移参数异常,其结构在化学上不合理的情况,因此需要对其进行必要的无序处理。

无序种类很多,较常见的是位置占据无序,通常指的是晶体中某些位置同时 被两种或两种以上的原子以统计无序的方式占据。这种无序最直观的例子是合 金,在有机类型的单晶样品中,此种无序也并不少见,例如我组测试过的一个单 晶样品即属于这种情况。该样品的晶胞参数如下: a = 5.808 Å, b = 25.770 Å, c = 10.286 Å, β = 96.37°,空间群为 *P*2₁/*n*。根据送样人提供的信息,化合物的结构 如图 1 所示。

图 1. 模型 1 的化合物结构图,其中灰色原子代表 C,浅蓝色原子代表 H,亮红色原子代表 O,左上方的深红色原子代表 Br,右下方的绿色原子代表 Cl。

该数据的分析我们一共采用了 3 种模型,表 1 列出了 3 种模型下的结构解 析参数,现就这 3 种模型分别说明如下。

结构解析参数	模型1	模型 2	模型 3
R indices [data of I>2 σ (I)]	R1=0.0892,	R1 = 0.0560,	R1 = 0.0532,
	wR2=0.1983	wR2 = 0.1565	wR2 = 0.0982
R indices[all data]	R1=0.0990,	R1 = 0.0654,	R1 = 0.0628,
	wR2=0.2014	wR2 = 0.1668	wR2 = 0.1022
Largest diff. peak and hole($e/Å^3$)	2.224 and -0.823	0.964 and -0.344	0.919 and -0.334
C-C Bond length precision (Å)	0.0101	0.0064	0.0049

表 1. 数据分析采用的 3 种模型下的结构解析参数。

在数据分析中,模型1是最先采用,即完全按照送样人提供的化合物结构(如 图1)做数据分析。在这种模型下,结构没有任何无序,但是有如下症状表明结 果不合理。第一,氯原子的原子位移参数偏小(参看图1);第二,C-CI键的键 长比正常值偏大;第三,氯原子周围有很大的残余电子密度峰;第四,氯原子的 位置占有率大于100%;第五,结构解析参数比正常情况偏大(参看表1的模型 1 一列)。以上症状表明,送样人提供的化合物结构信息有误,现在认为的氯原 子的位置上极有可能不是氯原子,而是一个原子序数比氯更大的元素。通过与送 样人讨论,我们又提出了模型2。

在模型2中,化合物不再是最初送样人提供的信息了,而是如图2所示,分子的主要结构没变,只是右下方的氯原子变成了溴原子。

图 2. 模型 2 的化合物结构图,其中灰色原子代表 C,浅蓝色原子代表 H,亮红色原子代表 O, 左上方和右下方的深红色原子代表 Br。

模型2同模型1一样,结构没有任何无序,各个结构解析参数同模型1相比 明显变小(参看表1),表明模型2比模型1更合理,但是仍然有以下几个不合 理之处,且全部集中在图2中右下方的溴原子上。第一,溴原子的原子位移参数 偏大(参看图2);第二,C-Br键的键长比正常值偏小;第三,溴原子的位置占 有率小于100%。以上结果表明,除了溴原子外,此位置处还应该存在另一种原 子序号小于溴的元素,其位置占有率与溴原子的位置占有率加和为100%,于是 我们提出了模型3。

模型 3 就是本次讨论的位置占据无序。在模型 3 中,晶体不再是由一种纯 化合物构成的,而是由两种化合物组成的混合物,这两种化合物的结构基本相同, 唯一的差别是右下方的取代基不同(参看图 3),一种化合物的取代基为氯,而 另一种化合物的取代基为溴。两种化合物在晶体中以统计无序的方式堆积,即形 成了分子类型的"合金"。通过数据拟合计算,表明在晶体中取代基为氯的化合物 占 70%,而取代基为溴的化合物占 30%。模型 3 的结构解析参数如表 1 所示, 可以明显看出其结构解析参数是最小的,说明模型 3 是最合理的。为了进一步确 认模型 3 的合理性,我们建议送样人采用其他仪器做进一步表征,最终通过质谱 的测试证实了该样品确为上述两种化合物的混合物。

图 3. 模型 3 的两种化合物的重叠结构图,其中灰色原子代表 C,浅蓝色原子代表 H,亮红 色原子代表 O,左上方的深红色原子代表 Br,右下方的绿色原子代表 Cl,右下方的深红色 原子代表 Br。

综上所述,本文通过一个例子描述了位置占据无序的分析方法,当单晶结 构解析中出现这种情况时,分析人员需要花费额外的时间和精力。在本例中,我 们先后共采用了3种模型来解析结构,而常规单晶结构解析1套数据只需要1 个模型就够了。此外,这种数据要求分析人员要严谨认真,且有一定的经验和水 平,否则很难发现模型1和模型2的问题,并进一步提出位置占据无序的分析方 案,即模型3。为了慎重起见,我们还建议送样人采用质谱测试佐证了模型3的 合理性。

16

孪晶的数据处理技巧

▶梁同玲

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel:010-62658187 Email: <u>ltl@iccas.ac.cn</u>)

孪晶是指在单个晶粒中存在两套晶格,且两套晶格之间有确定的空间取向关 系;如果忽略这种空间取向关系,那么两套晶格的晶体结构是完全一致的。描述 孪晶的晶体结构包括三个方面:

- 1. 两套晶格之间的空间取向关系,通常用一个 3X3 矩阵表示
- 2. 两套晶格的相对含量
- 3. 解析出其中一套晶格的晶体结构

在晶体结构测定中,出现孪晶是比较常见的现象。与常规单晶数据相比,孪 晶数据解析的难点在于如何发现该数据为孪晶数据,并进而找出两套晶格之间的 空间取向关系,因此孪晶数据给晶体结构测定带来了额外的困难。在实际工作中, 孪晶样品一般分为以下两种情况:

- 李晶现象比较严重的样品,这类样品在数据收集初期就容易被发现,通常 数据很难被正确指标化,因此一般会得出错误的晶胞参数,且衍射点强度 的积分效果也很差,从而很难得到一套合理的数据,并最终导致结构解析 工作无法完成。出现这种情况时,通常要把样品重结晶,得到更好的单晶 样品时再重新测定。
- 2.还有一些孪晶样品,虽然在数据收集初期也被发现有孪晶现象,但却能够得到正确的晶胞参数,而且表征数据质量的各个参数也在合理的范围之内,并最终得到一套质量很好的数据。这类孪晶样品的结构解析就需要把第一段所讲的三个方面全部描述清楚,否则将导致解析结果不合理,具体症状如R因子偏大,键长不合理,衍射点强度的观测值比计算值大很多,以及最大残余电子密度峰值偏高等。当出现这些症状时,一个常用的处理技巧是,采用晶体学软件包PLATON中的程序TwinRotMat检查解析结果,一般能够查出两套晶格之间的空间取向关系以及两套晶格的相对含量。

以下案例是我组测试过的一个孪晶样品,属于上述第二种情况。该样品的晶

胞参数如下: a = 8.071Å, b = 31.409Å, c = 10.945Å, $\beta = 90.01$ °, 空间群为 $P2_1/c$ 。 结构解析结果表明分子结构如图 1 所示。未做孪晶处理时,解析结果不合理,表 现为各个结构解析参数偏高(参看表 1)。采用本文描述的孪晶数据处理技巧后, 不仅得到了两套晶格之间的空间取向关系(Twin law),以及两套晶格的相对含 量(Twin fraction),而且进一步的结构精修表明解析结果明显好转,表现为各个 结构解析参数降低到了合理的数值区间(参看表 1),至此一个完整的孪晶数据 结构解析工作完成。

图 1. 分子结构图 表 1. 孪晶处理前后结构解析参数对比

结构解析参数	未做孪晶处理	做孪晶处理后	
R indices [data of I > $2\sigma(I)$]	R1 = 0.1423, wR2 = 0.3742	R1 = 0.0381, wR2 = 0.0846	
R indices (all data)	R1 = 0.1431, wR2 = 0.3746	R1 = 0.0387, wR2 = 0.0849	
Largest diff. Peak and hole (e/Å $\!\!\!^3)$	1.741 and -1.039	0.258 and -0.188	
C-C bond length precision (Å)	0. 0230	0.0050	
Twin law	_	$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	
Twin fraction		76% : 24%	

红外光谱数据处理——导数光谱

数据处理技巧

▶ 丁 í ī 萍

(分析测试中心光谱组 Tel:010-62566250 Email: <u>npns@iccas.ac.cn</u>)

利用红外操作软件中数据处理菜单的导数(derivative)命令,将红外光谱转 化为一阶导数光谱或二阶导数光谱。一阶导数谱中 y=0 的 x 值为原红外吸收谱中 吸收峰的峰尖、峰谷位置。二阶导数谱中 y 的极小值为原红外吸收谱中吸收峰尖 的中心位置, y₀的极大值为原红外吸收谱中峰谷的中心位置,如下图 1-3 所示。

图 2、该样品的红外吸收一阶导数图(仪器 TENSOR27, ± 4 cm⁻¹)

2900

wavenumber(cm⁻¹)

3000

2800

3100

图 3、该样品的红外吸收二阶导数图(仪器 TENSOR27, ±4cm⁻¹)

对比图 1 和图 3,不仅可以准确找到吸收峰的峰尖中心位置,还可以确定吸收带 bd 主要由 2 个吸收带 (2866.86cm⁻¹~2893.70cm⁻¹、中心位置 2878.98cm⁻¹, 2893.70cm⁻¹~2951.74cm⁻¹、中心位置 2923.16cm⁻¹)组成。另外,通过图 3 可以确 定图 1 中吸收带 de 间的肩峰中心位置为 2997.67cm⁻¹,波谷位置为 3009.78cm⁻¹。

通过二阶导数谱可以找出原光谱中所有的吸收峰、肩峰的准确位置,所以二 阶导数谱在数据处理中比一阶导数谱更有用。

参考于《傅里叶变换红外光谱分析 (第二版)》翁诗甫著 化学工业出版

所有的显微镜光学检测,都受限于物理法则,这个法则就是光穿过介质时, 光的方向会发生弯折。这就是一般显微图像产生模糊或眩光的最主要原因。 Deconvolution(去卷积)能够修正这个问题,不仅可以修正模糊与不清楚还能将 重要的图像细节呈现。 Autodeblur 针对生命科学的研究,提供多种功能强大的 Deconvolution 工具, 其中包含 2D 与 3D 图像的相关算法。Point Spread Function (PSF) 是指显微镜内 的点扩散现象,使得图像呈现出模糊与眩光。因此实际物体受到点扩散现象的影 响,产生了模糊与不清楚。 Autodeblur 不需要手动去计算点扩散函数(Point Spread Function),系统会自动建立点扩散函数。

- An object is a collection of point sources.
- Mathematical operation called a convolution.
- The Microscope is a convolution operator.

Autodeblur 适用于几种图像:透射光明场、 宽场荧光、共聚焦图像、转盘扫描 共聚焦、双光子荧光。下面分别是宽场荧光、共聚焦 3D 和共聚焦 2D 图像用 Autodeblur 软件处理前后的图片,处理后图像分辨率明显提高。

测试技术及技巧

有机样品中高硫样品的准确测试

▶宗文杰

(分析测试中心元素分析组 Tel:010-62554625 Email: wjzong@iccas.ac.cn)

针对有机化合物中硫含量较高的样品,采用常规的分析方法不易得到准确的 分析数据,通过我组大量的反复试验及经验的积累,根据S含量的不同,采用更 合适的样品的称样量,以减少测定误差,从而得到准确的分析数据。例如:

高硫类样品的测定结果

样品	元素	理论值%	实验值%	误差%
			36.87	+0.09
			36.90	+0.12
	N	26 79	36.66	-0.12
	N	30.78	36.87	+0.09
			36.65	-0.13
			36.88	+0.10
			15.92	+0.16
			15.86	+0.10
	C	15.70	15.84	+0.08
	C	15.70	15.91	+0.15
			15.85	+0.09
硫脲			15.86	+0.10
CH_4N_2S	Н 5.25	5. 25	5. 31	+0.06
			5. 29	+0.04
			5. 25	0.00
			5. 27	+0.02
			5.25	0.00
			5.24	-0.01
		42.04	41.95	-0.09
			41.84	-0.20
	S		41.79	-0.25
	5		41.85	-0.19
			41.94	-0.10
			41.81	-0.23
C II S	c	50.55	56.88	+0.31
$U_{13}H_{16}D_7$	5	00.0 <i>(</i>	56.93	+0.36

称样量的不同对测定结果也是有影响的

样品	称样量(mg)	S 元素 理论值%	实验值%	误差%
	2. 770		53.00	-3.57
$C_{13}H_{16}S_7$	2. 387	56.57	52.10	-4.47
	2. 570		50.94	-5.63

1.387	56.88	+0.31
1.323	57.18	+0.61
2.121	56.93	+0.36

有机样品中高氮样品的准确测试

▶宗文杰

(分析测试中心元素分析组 Tel:010-62554625 Email: wjzong@iccas.ac.cn)

针对有机化合物中氮含量较高的样品,采用常规的分析方法不易得到准确的 分析数据,通过我组大量的反复试验及经验的积累,根据 N 含量的不同,采用 更适合所测试的样品的标准样品以及更合适的样品的称样量,使得被测样品得到 准确的校正,从而得到准确的分析数据。例如:

高氮样品的测定结果

样品	元素	理论值%	实验值%	误差%
	N	31.08	31.21	+0.13
			31.14	+0.06
	C	50.07	60.11	+0.14
$C_{19}H_{16}N_4$	C	59.97	59.98	+0.01
	Н 8.95		8.81	-0.14
		8.95	8.94	-0.01
	N	66.60	66.58	-0.02
			66.73	+0.13
双氰胺 C ₂ H ₄ N ₄			66.36	-0.24
			66.59	-0.01
			66.70	+0.10
			66.52	-0.08

			28.68	+0.14
	с	28.54	28.69	+0.15
			28.52	-0.02
			28.58	+0.04
			28.65	+0.11
			28.61	+0.07
	н	4.76	4.83	+0.07
			4.83	+0.07
			4.79	+0.03
			4.80	+0.04
			4.80	+0.04
			4.77	+0.01
			32.64	-0.20
	N	32.84	32.55	-0.29
			62.02	+0.06
$C_{22}H_{22}N_{10}$		01.90	62.18	+0.22
	н		5.20	0.00
		5.20	5.22	+0.01
			36.87	+0.09
	N		36.90	+0.12
		26.79	36.66	-0.12
		36.78	36.87	+0.09
			36.65	-0.13
			36.88	+0.10
	c	15.76	15.92	+0.16
			15.86	+0.10
硫脲			15.84	+0.08
CH ₄ N ₂ S			15.91	+0.15
			15.85	+0.09
			15.86	+0.10
	н	5.25	5.31	+0.06
			5.29	+0.04
			5.25	0.00
			5.27	+0.02
			5.25	0.00
			5.24	-0.01

质谱成像技术

▶ 熊少祥

(分析测试中心质谱组 Tel:010-62554495 Email: <u>mscbj@iccas.ac.cn</u>)

现代生物学研究已经不再停留在仅从组织中识别一种特殊的化学成分,或者 蛋白成分上了,我们需要精确的了解这些物质是如何分布,如何构成的,解答这 些问题需要更进一步的实验技术,比如免疫组化或免疫荧光检测方法,但是这些 技术需要特殊的抗体,而且效率低,偏差大。

因此研究人员将目光转向了质谱技术上,以质谱为基础的成像方法不局限于 特异的一种或者几种蛋白质分子,可在组织切片中找到每一种蛋白质分子,并提 供这些蛋白质分子在组织中的空间分布的精确信息,而事先无需知道所检测蛋白 的信息,不需要对待测物进行标记,分析物可以其最初的形态被检测,同时可对 这些蛋白质分子含量进行相对定量,适用于研究生物分子的反应。

质谱成像(Imaging Mass Spectrometry,IMS)这种最新原位分析技术主要是利用 质谱直接扫描生物样品,分析分子在细胞或组织中的"结构、空间与时间分布" 信息。其基本流程(以质谱分析生物组织标记物为例)见下:

简单而言,质谱成像技术就是借助于质谱的方法,再配套上专门的质谱成像软件 控制下,使用一台通过测定质荷比来分析生物分子的标准分子量的质谱仪来完成 的。但是随着这项技术的不断发展,也陆续出现了许多针对各种问题的新技术。 最早的质谱成像技术是基质辅助激光解吸电离(MALDI, matrix assisted laser desorption ionization)质谱分子成像技术,由范德堡大学(VanderbiltUniversity)的 Richard Caprioli等在 1997年提出,他们通过将 MALDI 质谱离子扫描技术与专业图像处理软件结合,直接分析生物组织切片,产生任意指定质荷比(m/z)化合物的二维离子密度图,对组织中化合物的组成、相对丰度及分布情况进行高通量、全面、快速的分析,可通过所获得的潜在的生物标志物的空间分布以及目标组织中候选药物的分布信息,来进行生物标志物的发现和化合物的监控。

正如数字图像包括三个通道: 红,绿,蓝一样(单个亮度定义了每个像素的颜色),质谱成像也包含了数以千计的通道,每一个对应于一个特殊的光谱峰值, "你可以通过质谱方法从这些像素中获得任何信号,然后调整图像中所需分子像 素的相对亮度,最后得到一张分子特异性的成像图。"

这种方法可用于小分子代谢物,药物化合物,脂质和蛋白,而且质谱成像能 相对快速的利用许多分子通道,完全无需特殊抗体。下面列出五种先进的质谱成 像方法。

I、挑战高分子量蛋白——MALDI 质谱分子成像技术

在对组织或生物体进行成像,分析小分子构成的时候,有一个"拦路虎"总是 阻碍实验的进程,那就是多肽,这些多肽体积十分大,要想对它们进行分子成像 几乎是不可能的,比如想要研究肿瘤边缘的分子微环境,如果直接成像是不可能 获得清晰图像的。

来自范德堡大学的质谱方法专家 Richard Caprioli 博士因此发明了基质辅助 激光解吸电离(MALDI)质谱分子成像技术,这项技术不局限于特异的一种或 者几种蛋白质分子,它可在组织切片中找到每一种蛋白质分子,并提供这些蛋白 质分子在组织中的空间分布的精确信息,而事先无需知道所检测蛋白的信息,同 时可对这些蛋白质分子含量进行相对定量。

MALDI 质谱分子成像是在专门的质谱成像软件控制下,使用一台通过测定 质荷比来分析生物分子的标准分子量的质谱仪来完成的。被用来研究的组织首先 经过冰冻切片来获得极薄的组织片,接着用基质封闭组织切片并将切片置入质谱 仪的靶上。通过计算机屏幕观察样品,利用 MALDI 系统的质谱成像软件,选择 拟成像部分,首先定义图像的尺寸,根据尺寸大小将图像均分为若干点组成的二 维点阵,来确定激光点轰击的间距。激光束通过这个光栅图案照射到靶盘上的组

27

织切片,软件控制开始采集质谱数据,在质谱仪中,激光束对组织切片进行连续的扫描,组织样品在激光束的激发下释放出的分子被质谱仪所鉴定从而获得样品上每个点的质荷比(m/z)信息,然后将各个点的分子量信息转化为照片上的像素点。在每个点上,所有质谱数据经平均化处理获得一幅代表该区域内化合物分布情况的完整质谱图。仪器逐步采集组织切片的质谱数据,最后得到具有空间信息的整套组织切片的质谱数据。这样就可以完成对组织样品的"分子成像"。设定m/z 的范围,即可确定该组织区域所含生物分子的种类,并选定峰高或者峰面积来代表生物分子的相对丰度。图像中的彩色斑点代表化合物的定位,每个斑点颜色的深浅与激光在每一个点或像素上检测到的信号大小相关。

通过增加单位面积上轰击的激光点数量和像素,研究人员可以获得更多的样品信息,例如采用4000 像素比200 像素能够得到更好的样品图像。质谱分子成像技术是一种半定量或相对定量技术,图像上颜色深的部分表明有更多的生物分子聚集在组织的这个部分。然而,不可能据此确定生物分子在组织的不同部位的实际绝对含量。选择组织图像上的任意一个斑点,图像都能够给出一个质谱谱图或者离子谱图,代表在组织的该部位存在这种生物分子,然后与做指纹图谱类似,像做指纹图谱那样,将样品的离子谱图与已知标准品进行对照,分析差异,从而进行生物标志物的发现和药物作用的监控。

II、无需样品处理 实时成像——电喷雾电离技术

一般质谱成像方法由于体积庞大,重量重,需要冗长的样品准备阶段,因此 并不适用于即时成像(bedside applications),比如说要帮助外科医生进行实时的 肿瘤边界成像监控,那么就要寻找新的方法了。

一种称为电喷雾电离技术(desorption electrospray ionization, DESI)的 MS 成像技术解决了这个问题。DESI 技术于 2004 年首次提出,由于这一方法具有样 品无需前处理就可以在常压条件下,从各种载物表面直接分析固相或凝固相样品 等优势而得到了迅速的发展。

这种方法的原理是带电液滴蒸发,液滴变小,液滴表面相斥的静电荷密度增大。当液滴蒸发到某一程度,液滴表面的库仑斥力使液滴爆炸。产生的小带电液 滴继续此过程。随着液滴的水分子逐渐蒸发,就可获得自由徘徊的质子化和去质 子化的蛋白分子 DESI 与另外一种离子源: SIMS (二次离子质谱) 有些相似,只 是前者能在大气压下游离化,发明这项技术的普渡大学 Cooks 博士认为 DESI 方 法其实就是一种抽取方法,即利用快速带电可溶微粒(比如水或者乙腈 acetonitrile)进行离子化,然后冲击样品,获得分析物的方法。

DESI系列产品最大的优势就在于无需样品处理,一般质谱和高效液相色谱分析,样品必须经过特殊的分离流程才能够进行分析检测,使得一次样品检测常常需要约一个小时,而 DESI系列产品可将固体样品直接送入质谱,溶液被喷射到检测表面,促使样品离子均匀分布。采用这一手段的质谱分离过程,只需 3 分钟左右即可完成。

III、活体成像——APIR MALDI/LAESI 技术

了解细胞的内部成分是理解健康细胞不同于病变细胞的关键。但是直到目前为 止,唯一的方法是观察单个细胞的内部,然后将其从动物或植物中移除,或者改 变细胞的生存环境。但是这么做的话,会使细胞发生变化。科学家还不是很清楚 一个细胞在病变时与健康细胞的 差别,或者当它们从一个环境移到另一个环境 中产生的变化。

来自华盛顿大学Akos Vertes 教授希望能从另外一个方面来进行活细胞分析, 在他的一项关于活叶样品中初级和次级代谢产物分布的研究中,研究人员发现叶 片中积累基质很厚,常导致光谱末端低分子量部分模糊,而且基质辅助激光解析 电离(MALDI)质谱分析需要在真空中进行,但活体样本在真空中无法存活。

实际上, MALDI 质谱分析的原理是将分析物分散在基质分子中并形成晶体, 当用激光照射晶体时,由于基质分子经辐射所吸收的能量,导致能量蓄积并迅速 产热,从而使基质晶体升华,致使基质和分析物膨胀并进入气相。而生物样品也 可以直接吸收能量的,比如 2.94mm 波长的光能激活水中氢氧键。

因此 Vertes 等人想到复合两种技术来解决这一问题。首先他们利用大气压红 外线(an atmospheric pressure infrared, APIR) MALDI 激光直接激活组织中的水 分,使样品气化,就像是组织表面发生了细胞大小的核爆炸,从而获得了离子化 微粒,进入质谱中进行分析。但是并不是所有的气化微粒都带电,大部分其实是 不带电的,会被 APIR MALDI 遗漏。

为了捕捉这些中性粒子, Vertes 等人采用了第二种方法: LAESI (laser ablation electrospray ionization, 激光烧蚀电喷雾电离),这种方法能捕捉大量带电微滴的

29

微粒, 然后重新电离化。通过对整个样品进行处理, 复合这两种方法, 就能覆盖 更多的分子, 分析质量更高。

与一般质谱成像过程不同, Verte 的方法还在成像中增加了高度, 从而实现 了 3D 代谢物成像。这项技术的分辨率是直径 10mm, 高度 30mm, 这与生物天 然的立体像素相吻合, 这样科学家们就可以获得天然构像。

IV、3D成像——二次离子质谱技术

质谱成像技术能将基质辅助激光解吸电离质谱的离子扫描与图像重建技术 结合,直接分析生物组织切片,产生任意质荷比(m/z)化合物的二维或三维分布 图。其中三维成像图是由获得的质谱数据,通过质谱数据分析处理软件自动标峰, 并生成该切片的全部峰值列表文件,然后成像软件读取峰值列表文件,给出每个 质荷比在全部质谱图中的命中次数,再根据峰值列表文件对应的点阵坐标绘出该 峰的分布图。

但是一般的质谱成像技术不能对一些携带大分子碎片的化学成分进行成像, 来自宾夕法尼亚州州立大学的 Nicholas Winograd 教授改进了一种称为二次离子 质谱(SIMS, secondary ion mass spectrometry)的方法,可以对样品进行完整扫 描,三维成像。

SIMS 早在用于生物学研究之前就已经应用广泛了,比如分析集成电路 (integrated circuits)中的化学成分,这种质谱技术是表面分析的有利工具,能 检测出微小区域内的微量成分,具有能进行杂质深度剖析和各种元素在微区范围 内同位素丰度比的测量能力。

这种技术具有几个优点:速度快(-10,000 spectra per second),亚细胞构造 分辨率(-100 nm),以及不需要基质。但是另外一方面,不同于 MALDI 方法, SIMS 方面不是一种"软"技术,这种方法只能对小分子成像,因此常常需要进行 粉碎。

Winograd 教授改进了这一方法,他利用了一种新型 SIMS 光束(carbon-60 磁 性球),这种新光束比传统的 SIMS 光束对物体的化学损伤更小。C60 同时撞击 样品表面,类似于"一阵爆炸",这样重复的轰击使得研究人员能深入样品,进行 三维分子成像,Winograd 教授称这个过程是"分子深度成像"(molecular depth profiling)。

C60 的能量与其它的离子束相当,却不到达样品表面以下,这样样品可以连续地被逐层剥离,研究人员就可以得到纵面图形,最终获得三维的分子影像。 Winograd 教授等人用含有肽的糖溶液将硅的薄片包裹起来并进行 SIMS 实验,随着薄膜逐渐被 C60 剥蚀,可以获得糖和肽的稳态信号。最终,薄膜完全剥离后就可以获得硅的信号。如果用其它的射线或原子离子代替 C60,粒子束会快速穿过肽膜而无法提供有关生物分子的信息。因此这种方法具有良好的空间分辨率,能够获得巨噬细胞和星型细胞的细胞特征和分析物的分布情况。

这里还要说到一点,SIMS 和上一技术(APIR MALDI/LAESI 技术)都可以对三 维成像,但两者也有差别,SIMS 方法中,采用高能离子轰击样品,逐出分析物 离子(二级离子),离子再进入质量分析器。MALDI 方法则用激光辐射样品使之 离子化,另外 SIMS 探针可以探测到 100nm 的深度,能提供纳米级的分辨率, 而 MALDI 可以探测更深,但空间分辨率较低。

V、高灵敏度 高分辨率——纳米结构启动质谱技术

质谱在检测生物分子方面有很大潜力,但现有方法仍存在一些缺陷,灵敏度 不够高和需要基质 分子促使分析对象发生离子化就是其中之二。比如说,需要 溶解或者固定在基质上的方法检测代谢物,较易错判,因为这些代谢物与那些基 质常常看上去都一样。另外基于固定物基质的系统也不允许研究人员精确的判断 出样品中某一分子到底来自于哪儿。

来自斯克利普斯研究院的 Gary Siuzdak 博士发明了一种称为纳米结构启动 质谱(nanostructure-initiator mass spectrometry, NIMS)的新技术,这种技术能 以极高的灵敏度分析非常小的区域,从而允许对肽阵列、血液、尿和单个细胞进 行分析,而且还能用于组织成像。

NIMS 利用了一种特制的表面,这种多孔硅表面上聚集了一种含氟聚合物, 这些分子在受到激光或离子束照射时会猛烈爆发,这种爆发释放出离子化的分析 物分子,它们被吸收到表面上,使其能够被检测到。这种方法利用激光或离子束 来从纳米尺度的小囊中气化材料,从而克服了一般质谱方法缺少所需的灵敏度和 需要基质分子促使分析对象发生离子化的缺陷。

通过这种方法可以分析很多类型的小分子,比如脂质,糖类,以及类固醇, 虽然每一种分析材料需要的含氟聚合物有少许差别,但是这是一种一步法的方

31

法,比 MALDI 简单多了——后者需要固定组织,并添加基质。

由于含氟聚合物不能很好的离子化,因此会发生轻微的光谱干扰,而且由于 离子化过程是"软性"的——就像 MALDI,所以 NIMS 产生的生物分子是整块离 子化,而不是片段离子化。不过这种技术对于完整蛋白的检测灵敏度没有 MALDI 高。

参考于 BRUKER 公司技术资料。

测试技术及技巧 氘代氯仿中的微酸性对测试谱图的影响 ▶ 向後锋 (分析测试中心核磁组 Tel:010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn)

常用的氘代试剂中, 氘代氯仿的价格最低, 也是核磁实验最常用的两种试剂 之一。很多实验室和化学所的器材都存有大量的氘代氯仿, 以备急需。但是与其 它氘代试剂不同, 氘代氯仿的保存有特殊的要求: 避光保存在-5到5摄氏度, 质量保证期6个月。通常这个要求被大家忽略。根据核磁实验室的经验, 氘代氯 仿保存期过长后, 对有些化合物的图谱有影响, 特别是对酸敏感的化合物。我们 这里就提供一个例子供大家参考。

上图为二硫富瓦烯在氘代氯仿中 298K 下的氢谱。非常奇怪的是二硫富瓦烯 中烯键上的氢在图谱中表现为一积分面积非常小的宽峰(见放大图),远远低于 化学计量比,怀疑是交换所致。但在 238K 还是观测到相同的图谱,显然这个谱 峰的缺失与交换无关。后来考虑到氘代氯仿可能因保存时间过久降解产生酸所 致,更换氘代二氯甲烷为溶剂,我们能够观测到正常的氢谱(图 2),证实了我 们的猜测。

因此,我们在使用氘代氯仿时一定要谨慎。如果有些性质活泼的氢观测不到, 可以换溶剂或使用保存期在6个月内的氘代氯仿试试。

测试技术及技巧

俄歇参数法分析分析铜锌化学态

X 射线光电子能谱是分析元素化学态的有效方法之一。通常是通过电子结合能的化学位移来确定元素的化学态。但是,有一些元素其光电子峰的化学位移很

小,很难分辨其化学态,如 Cu0 与 Cu+、Zn0 与 Zn++。对于这些元素,如果它 们的俄歇峰比较强,则可以用俄歇参数的方法来确定其化学态。俄歇参数的定义 为最强光电子峰与最锐俄歇峰之和,即:α²=BE_p+KE_A

	光电子峰	俄歇峰	佛影会粉/-W	权论
	结合能/eV	动能/eV	1找匈∖参致/ € ٧	
Cu ^o	932. 4	918. 6	1851.0	
$\mathrm{Cu}^{\scriptscriptstyle +}$	932. 2	916. 9	1849.1	
Cu ⁺⁺	933. 4	918. 3	1851.7	Cu ^艹 的 Cu2p 峰有 shake up
				峰
Zn ^o	1021.4	992. 4	2013. 8	
Zn ⁺⁺	1021.7	988.8	2010. 5	

表.铜和锌不同化学态的数据

仪器及功能介绍

粉末衍射分析方法

▶郝项

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel:010-62658187 Email: <u>haoxiang@iccas.ac.cn</u>)

化学所分析测试中心的粉末衍射仪为日本理学公司生产的 D/max2500,于 2001 年购置,日常测试使用的 X-射线功率为 40 kV X 200 mA,即 8 kW,属于 转靶类型,波长为 CuKα线(1.54 Å),探测器为闪烁计数器,属于零维点探测器。 该仪器主要测试粉末和薄膜类型的样品,测试温度为室温,压力为一个大气压, 测试主要采用聚焦几何法,θ/20连续扫描模式测试。一般要求粉末样品颗粒细致 均匀,薄膜样品测试面平整。测试得到的图谱为 I-2θ(参看图 1.),横坐标为 2θ, 纵坐标为 I (衍射强度),通过将测试得到的图谱与数据库中的标准图谱比对,即 Search/Match (S/M,指横坐标 2θ的比对),可以得到物相信息,其他附加信息有 晶面间距(使用 Bragg 公式计算得到)和相应于该晶面方向上的晶粒尺寸(使用 Scherrer 公式计算得到)等。

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel:010-62658187 Email: <u>haoxiang@iccas.ac.cn</u>)

单晶衍射数据收集得到的衍射照片一般有几十张至几百张,经过指标化、积 分以及标度平均化处理后得到用于结构分析的原始数据(hkl 文件),然后用 SHELX 程序作结构求解及精修,最后得到分子结构和分子在晶体中的堆积结构, 如图所示。

图. 分子在晶体中的堆积结构

化学所分析测试中心目前拥有的三台单晶衍射仪的指标、功能,以及对晶体的要求如下表:

项目	单晶衍射仪1	单晶衍射仪2	单晶衍射仪 3
购置年份	2001	2007	2007
型号	日本理学 Rapid IP	日本理学 Saturn724+	日本理学 MM007HF Saturn724+
靶类型	转靶	固定靶	转靶
测试功率	40kV X 200mA,8 kW	50kV X 30mA, 1.5 kW	50kV X 24mA, 1.2 kW
波长	CuKaz 线(1.54 Å)	MoKaz 线(0.71 Ā)	MoKaz 线(0.71 Ā)
单色器	石墨	石墨	共聚焦镜
探测器	IP 面探测器	CCD 面探测器	CCD 面探测器
测试温度及压力	-100 °C,1 atm	-100 °C,1 atm	-100 °C,1 atm
样品尺寸要求	≥ <u>0.5 mm</u>	≥ <u>0.3.mm</u>	≈ <u>0.2.mm</u>
样品含元素要求	化合物由轻于 C1 的元素组成	无特殊要求	无特殊要求
绝对构型	无特殊要求	晶体中含有重于S的元素	晶体中含有重于 S 的元素

表. 晶体结构组单晶衍射仪的指标和功能

仪器及功能介绍

受体光漂白法分析荧光共振能量转移(FRET)

▶ 刘美蓉

(分析测试中心光谱组 Tel:010-82613026 Email: mrliu@iccas.ac.cn)

荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer)是指在两个不同的荧光基团中,如果一个荧光基团(供体 Donor)的发射光谱与另一个基团(受体 Acceptor)的吸收光谱有一定的重叠,当这两个荧光基团间的距离足够近时(一般小于100Å),就可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象,即以供体的激发波长激发时,可观察到受体发射的荧光。通过这种方法来判断分子之间是否有相互作用。

激光扫描共聚焦显微镜可用来分析 FRET,常用的方法是受体光漂白法和三通道 荧光法。受体光漂白法,简单、易用,直接测量,测量较准确,但会对样品造成 破坏,不适合对活细胞长期观察;而三通道方法可以保证活细胞状态,适合长时 间的观察,但三通道法比较复杂,涉及很多图像的加减,是一种间接计算方法, 需要对荧光的串色和渗漏进行校正。

下面是我们用受体光漂白法做的 FRET 实验:

此实验中供体为 TAM,激发波长为 559nm;受体为 cy5,激发波长为 635nm. 首先对样品(供受体都有,存在 FRET)在供体激发波长下对供体成像,做一个 时间序列,一般 5-10 张图即可,目的是为了分析成像过程中成像激光可能引起 的漂白,设为 prebleaching; 然后用受体激发光选择一个区域进行漂白(图中中间长方形区域即为漂白区域,漂白时间一般为 3-20s,具体多长时间通过实验确定);漂白后还是在供体激发波长下对供体成像,同样做一个时间序列,一般为 5-10 张图,设为 postbleaching。然后利用软件可得到 FRET 效率及供受体之间的距离。比较漂白区域 ROI2 和非漂白区域 ROI3、ROI4,可判断是否存在明显的 FRET.漂白区域 FRET 效率约为 39%,非漂白区域约为 10%,存在明显的 FRET.

图中 a 为漂白前供体的图片(时间序列的最后一张图片), b 为漂白后供体的图片(时间序列的第一张图片), c 为 FRET 效率图, d 为供受体之间距离图, e 为漂白后供体图像与漂白前供体图像之差。a、b、e、刻度为荧光强度; c 刻度为 FRET 效率; d 刻度为供受体之间的距离, 单位 nm.

Calculation Formula of Acceptor Photobleach

	FRET Effic	$\operatorname{ciency}(\mathbf{E}) = 1 - \frac{\operatorname{Prebleaching}}{\operatorname{Postbleaching}}$	ç g
	Distance(r)	$= R_{0} \left\{ \left(\frac{1}{E} \right) - 1 \right\}^{1/6}$	
	Variable	Meaning of Variable	
I	Prebleaching	Intensity value of Donor prebleach image	

R ₀	Forster Distance
Postbleaching	Intensity value of Donor postbleach image
Prebleaching	intensity value of Donor prepleach image

仪器及功能介绍

等离子清洗仪及其应用

▶关波

(分析测试中心电镜组 Tel:010-62588935 Email: guanbo@iccas.ac.cn)

在用扫描/透射电镜观察样品时,经常存在图像模糊、漂移、电子束照射之 后变黑等问题,致使拍不到高质量的图片,这是因为样品表面被碳氢化合物污染 后在电子束照射下发生了积碳现象。引起碳氢物污染的原因有以下几个方面:样 品表面通常会吸附一层碳氢物、样品合成制备过程中使用有机物(如表面活性 剂)、电镜油泵的油蒸汽进入真空系统、样品杆在空气中被污染。因此,为了便 于观察、得到清晰的高质量的图片,同时提高 EDX 等成分分析的精度,有必要 去除样品表面的污染物,比较有效的方法是等离子清洗,分为氢等离子和氧等离 子清两种。

氧等离子清洗的原理是利用氧等离子体将表面碳氢化合物氧化成水和二氧 化碳,还原样品真实表面,从而避免在电镜观察时出现积碳现象,可有效提高清 晰度。由于功率较低(大约 5W),所以不会对样品产生大的损伤。在清洗功能 之外,还可利用氧等离子进行材料表面改性或反应合成等实验。

扫描电镜低加速电压及减压模式的应用

▶关波

(分析测试中心电镜组 Tel:010-62588935 Email: guanbo@iccas.ac.cn)

扫描电镜观察样品时,使用较高的加速电压(一般 10 kV 以上)存在一些问题: 电子束能量高,穿透样品较深,得到的不是样品真实的表面信息;对于不耐电子 束的样品如有机材料损伤较大;对于导电性不好的样品,表面积累电荷造成荷电 和样品漂移,严重影响观察。选择低的加速电压(一般 1 kV 以下),可以有效改 善以上问题,高、低加速电压在应用中的区别主要表现在:

作用深度和区域不同,电子束与样品的作用深度和范围在高电压下较低电压 大,如图1为15 kV和1 kV加速电压下电子束与样品表面作用区域的 Monte Carlo 模拟图,可以看出低加速电压下,作用的深度和区域明显减小,因此,较高的加 速电压提供的是相对内部的信息而非表面信息,反应不出真实的表面形貌。图2 是不同加速电压下样品形貌的差异,可见使用 15 kV 的加速电压掩盖了样品表面 的一些形貌。另外,一些起伏很小的样品,用高的电压就观察不到,如单层排列 的碳纳米管,由于只有纳米级的起伏,只能用低电压观察。

Vacc=15kV

图 2

低加速电压可以有效地减少对样品的损伤和荷电效应,对于不导电的样品可 以直接观察,比如一些高分子微/纳米球在较高的加速电压下发生坍塌、损坏, 而且表面荷电严重,放电现象明显,严重影响观察拍照,即使喷涂导电层也存在 放电现象,而在低加速电压下能够保持其形态,而且没有明显的荷电现象。

要应用低加速电压观察样品,要求电镜的电子枪有足够的亮度,以获得足够的束流,提高图像分辨率;观察时要减小工作距离,甚至把样品升到物镜下极靴面,使物镜激励增强,焦距变短,像差减小,提高分辨率。对于扫描电镜 S-4800,应用低电压(1kV)观察,需要 Probe Current 选 High 模式,工作距离小于 3mm, 二次电子探头用上探头即 U 探头。

虽然低电压有以上优点,但是低加速电压比高加速电压的分辨率低,如扫描

电镜 S-4800 在 1kV 的分辨率是 1.4nm, 而 15kV 分辨率为 1nm。应用减速模式 (Deceleration Mode)可在保持较高分辨率的同时又保持低电压的优势,其原理如 图 3 所示,即在电子枪发射时使用较高的加速电压,在电子束到达样品之前加一 个减速电场以减速电压 (Deceleration Voltage),使实际到达样品的电压 (Landing Voltage)减小。如图 4 是应用普通模式和减速模式所拍的样品形貌,可以看出减 速模式提高了图像分别率。

Normal mode

Deceleration mode

图 4

分析测试中心动态

分析测试中心将举办仪器分析沙龙

为帮助科研人员更深入地了解仪器功能、分析的新技术,帮助科研人员解决 科研中分析测试问题,分析测试中心将从7月起举办仪器分析沙龙,计划每1~ 2个月举办一次,每次由测试机组的工作人员与科研人员、研究生围绕着仪器分 析的新技术、新方法、新应用的1~2个主题进行交流、讨论,欢迎大家参加。

新购仪器及仪器新功能培训的安排

分析测试中心将对化学所 2011 年新购仪器的功能及其相关分析技术进行 培训,培训将在今年8月举行,具体安排届时通知!

主编: 唐亚林

编委: (按姓氏笔画排序)

关 波 向俊锋 刘 芬 刘美蓉 宗文杰 郝 项 熊少祥 编务:丁丽萍