



中国科学院化学研究所
INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

分析测试中心通讯

第10期



分析测试中心 主办
2020年2月20日

目 录

评述

单晶衍射技术在化学中的历史和现状	1
------------------------	---

新技术应用

DNP 技术介绍	6
元素分析仪与氧瓶燃烧滴定法对硫元素定量分析的对比	12
氧瓶燃烧前处理与电位滴定仪联用测试卤素方法的可行性探究 ..	18
辉光放电离子源的研发与应用	23
开发 MALDI-MS 的 3-HPA/CHCA 二元基质分析多电荷样品	27

典型应用案例

石榴皮和五倍子提取鞣花酸的差异性物质结构鉴定研究	33
--------------------------------	----

测试技术与技巧

石墨烯样品的透射电镜表征方法	40
荧光数据的可靠性测定(二)	44
利用全氟辛酸缩小样品结晶斑点提高 MALDI MS 检测灵敏度	52
核磁弛豫及其应用	56
FT-ICR-ESI 金属配合物方法学探索	62
单晶样品测试常见问题及处理方法	65
一种改进圆二色紫外区光谱质量的新尝试	67
用 XPS 和 UPS 方法测量导电固体材料逸出功的方法研究	71

仪器及功能介绍

冷冻聚焦离子束电镜的原理及应用 77

分析测试中心动态

《分析测试中心通讯》征稿启事 81

评

述

单晶衍射技术在化学中的历史和现状

► 郝 项

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

单晶衍射用于测定微观物质结构的技术创始于上世纪初, 距今已经有 100 多年的历史, 是一门相对比较成熟的技术。从入射光源看, 单晶衍射可以分为 X-射线、电子和中子。本文将着重介绍 X-射线衍射, 最后会简要介绍电子衍射。

虽然单晶衍射技术最初掌握在物理学家和晶体学家手中, 但是化学家马上就意识到这个技术是测定微观分子结构的有利手段。当然, 单晶衍射对样品有一个比较苛刻的要求, 那就是样品的形态必须为较大尺度的单晶体, 但是, 对于化学家来说, 将固体化合物从溶液中结晶出来通常是一门不难掌握的手艺, 而且, 如果将在实验室烧瓶中培养的、有时是意外获得的单晶送给晶体学家, 就可以通过单晶衍射测试得到分子结构, 还是让化学家很期待的。虽然这个技术对化学家如此重要, 但是直到上世纪九十年代以后, 单晶 X-射线衍射技术才被大量用于化学、特别是有机化学, 在此之前, 这个技术主要为少数懂晶体学的化学家掌握并使用, 原因有以下几点。

第一, 数据采集时间过长。1995 年以前的单晶衍射仪大部分配备点探测器, 灵敏度低, 信号采集速度慢, 特别对于衍射信号弱的、对称性较低的有机晶体, 一套完整的数据收集时间以“天”为单位计。当时的低温技术还不普遍, 特别是在中国, 消耗大量液氮保护样品还是比较奢侈的实验, 很多有机晶体在常温下被 X-射线照射后, 无法存活足够长的时间以完成数据采集。

第二, 结构解析过程耗时较长。虽然用于小分子结构解析的直接法在 1985 年获得化学诺奖, 但是真正大量的使用要晚将近 10 年。因为单晶数据采集完成后, 还必须做数据还原和结构解析, 这些都依赖电脑和软件, 那时的电脑速度普遍很慢, 结构解析的软件的自动化程度也不高, 鼠标还不是很常用, 软件大部分都是运行于 DOS 或 Linux 操作系统下的, 人机互动界面没有 windows 那么友好, 一般以黑色背景的 shell 为主, 很多结构解析命令都需要用键盘在 shell 中键入, 因此, 结构解析不仅费时, 而且还要花很长时间学习, 大多数化学家觉得结构解析不是必须掌握的技术。

第三, 单晶衍射技术不是化学系必修的课程。大部分合成化学家, 特别是有

机化学家，都觉得核磁、质谱和光谱的图谱更好理解，因为峰位通常直接对应于原子、基团和官能团。单晶衍射的图谱却不具有这种对应关系，必须先获取图谱中衍射点的相角，然后再结合衍射点的强度做傅里叶变换，才能得到电子云密度，进而获取分子结构，特别当涉及到空间群的对称性时，大多数化学家在本科甚至研究生的学习中都没有学过，结构解析还只能依赖少数晶体学家，而这些晶体学家本身有自己的研究课题，并没有义务做服务类工作，因此单晶衍射这种表征技术在 1995 年以前没有在化学类常见的测试仪器中流行开来。

上世纪 90 年代初，2 维探测器开始逐渐配备于单晶 X-射线衍射仪，特别是 95 年以后，这种趋势愈发明显。比如日本理学公司的 imaging plate 探测器，荷兰 Nonius 公司和德国布鲁克公司的 CCD 探测器。这种仪器不仅灵敏度高，而且测试速度极大提高，数据采集时间开始以“小时”为单位计，而且低温技术被更普遍地采用，不仅延长了单晶样品被 X-射线照射的存活寿命，而且提高了数据质量。另一个方面，计算机技术快速发展，不仅运算速度加快很多，而且操作系统和晶体学软件的人机互动界面越来越友好，简单的有机晶体从数据采集到结构解析甚至在一天内就可以完成，更多的化学家开始愿意学习结构解析技术。另外，很多大学的化学院系开始设立专门的单晶衍射岗位，不需要做科研项目，而是服务于合成化学家，这种趋势在进入 2000 年以后尤为明显。另外，以超分子研究为课题的一批有机化学家对单晶衍射技术的依赖越来越强，这在一定程度上进一步促进了单晶 X-射线衍射技术在化学领域的流行，甚至与核磁技术一样逐渐成为化学家必须掌握的技术之一。

进入 21 世纪以后，特别是近十年来，配备普通光管和普通转靶的单晶衍射仪已经几乎无人问津，光源都升级为微焦斑光管和微焦斑转靶，同功率下，X-射线的亮度更高，甚至还出现了比微焦斑转靶更高亮度的液态金属靶。探测器也从读取时间为秒级的 CCD 升级为读取时间为毫秒级的 CMOS 杂合探测器，测角仪也一般配备更高转速的 Kappa 类型，不仅转速高，而且更加自由灵活，对倒易空间的覆盖更加完整。数据采集模式从传统的一张一张衍射照片间断曝光，革新为仪器快门一直打开的连续曝光，相当于收集到旋转的倒易空间电影。衍射强的样品的数据采集时间进入以“分钟”为单位的时代。数据采集和还原软件的界面更加友好智能，甚至有全自动功能，很多专业知识和数学公式都隐藏在软件背后，化

学家无需懂得较多晶体学知识就可以使用仪器，自动结构解析软件甚至在数据尚未收集完全时就可以尝试解析，简单结构基本可以自动解析出来。当然，较为复杂的无序、孪晶、假对称性、非公度（包括准晶）等特殊结构仍然无法自动完成，需要晶体学家手动完成，经验和晶体学知识对正确完成解析显得尤为重要。单晶衍射仪正朝着更快速和更智能的方向发展。现在一个简单的、大尺寸有机晶体，如果使用最先进的单晶 X-射线衍射仪，从数据采集到自动数据还原和自动结构解析，甚至十几分钟之内就可以完成。

虽然经过 100 多年的发展，单晶衍射技术发生了飞跃式的进步，但是对于小尺寸、弱衍射的有机晶体，实验室级别的仪器还是不够强大。单晶样品的尺寸一般可以用长宽高 3 个数字来描述，一般来说，如果最小的方向低于 10 微米，那么这样的单晶样品在实验室级的单晶 X-射线衍射仪上测试会非常吃力，即使是目前最先进的仪器，测试时间也都要数小时甚至以“天”计，而测试结果可能仍然不理想。最小方向低于 10 微米的单晶最好在同步辐射光源上测试，因为相比实验室级的 X-射线，同步辐射的 X-射线亮度更高、发散度更低、相干性更好。目前国内只有上海光源和北京光源有单晶衍射测试，机时非常宝贵，很难约到，前些年单晶衍射线站一般都被大分子蛋白的用户使用，小分子化学单晶用户很难约到机时。近几年来，随着冷冻电镜技术在大分子领域的流行，越来越多的大分子用户不再使用同步辐射单晶线站，释放出来的机时自然被小分子用户使用，因此越来越多的小分子化学类晶体有机会在同步辐射上完成单晶测试。中国大陆目前的同步辐射光源线站中，还没有一个小分子单晶专用线站，现在的测试都只能在大分子线站上完成，而大分子线站的测角仪通常不能完全满足小分子用户的需求，导致数据完全度不理想。北京怀柔正在建设的第四代同步辐射光源，如果有可能建设一条小分子晶体学专用线站，将会填补国内这个空白。

同步辐射光源虽然很强大，但是对于尺寸低于 1 微米的纳米单晶样品就显得力不从心了。纳晶样品只能使用电子作为光源，完成单晶衍射测试，因为电子的散射能力远大于 X-射线光子的散射能力。电子衍射技术虽然已经有 90 多年的历史，但是将这门技术用于结构分析，特别是有机晶体的结构分析一直不是主流，原因有以下几点。

第一，目前没有专门的单晶电子衍射仪，电子衍射只是作为电镜的附属功

能存在，而电镜大多数时间是做成像类工作，电子衍射只是电镜的功能之一，而非唯一。电子衍射一般主要是可以确定样品是否为晶态，甚至进一步获取晶胞参数信息，但仅此而已，结构分析一般不会尝试

第二，结构解析对数据的完全度要求比较高，但是电镜配备的测角台一般倾转范围不是很大，不像单晶 X-射线衍射仪的测角仪有多个旋转轴，且旋转范围较大，因此，电子衍射对倒易空间的覆盖度不高，导致数据完全度不高，这个问题对低对称性的有机晶体尤为严重，制约了结构解析的成功率。

第三，有机晶体一般不耐受电子束长时间照射，即使采用冷冻技术保护样品，很多有机样品也无法支撑一套完整的数据采集。目前对有机样品，一般采用低剂量率+长曝光时间的模式收集数据，一方面提高样品存活寿命，另一方面还要兼顾衍射强度。为了得到一套比较合理的数据，通常要在电镜仪器上花费大量的时间对纳米晶粒一颗一颗的做衍射筛选，这个过程可能花费数小时到数天不等，需要极大的耐心。成功率取决于样品的结晶性，样品在铜网上的分散状态，以及样品对电子束的耐受能力。

第四，X-射线衍射遵守运动学散射理论，结构因子的平方正比于衍射强度，因此结构因子（是复数形式）的大小可以通过实验直接得到，但是结构因子的方向（相角）却无法直接得到，获得 1985 年化学诺奖的“直接法”就是从结构因子的大小和多个结构因子之间的关系入手，采用概率的方法从头求解相角，一旦相角得到，结构因子就完整得到了，然后再通过傅里叶变换得到电子云密度，进而得到分子结构。电子与原子的散射要比 X-射线强很多，而且 X-射线只同原子的核外电子散射，但是电子既同原子的核外电子散射，又同原子核散射，电子衍射遵守动力学散射理论，公式比 X-射线散射复杂很多，结构因子的平方也不再正比于衍射强度。目前科学家还无法直接从电子衍射的动力学理论出发获得完整的结构因子。一般常用的方法是尽量消减动力学效应，得到准运动学电子衍射，再用 X-射线的方法做近似的结构因子求解，成功率受到很大制约。

综上所述，本文简要介绍了单晶衍射技术在化学研究中的历史和现状。实验室级的单晶 X-射线衍射仪已经发展得非常成熟，仪器的智能程度也逐渐增强，简单结构除了挑选晶体外，其他步骤几乎可以全自动完成。但是，复杂结构、特别是无序和孪晶仍然需要人工花费较长时间处理。10 微米尺度以下的、衍射很

弱的样品可以采用同步辐射光源或电子进行单晶衍射实验。

小分子化学晶体学用户一直对国内同步辐射单晶衍射线站有很强需求，但是国内线站非常少，且没有小分子专用线站，因此小分子在线站的测试量很少。近些年来，一些大分子用户逐渐转向冷冻电镜，对同步辐射线站的需求在下降，空出的机时分给了小分子用户，间接导致线站的小分子用户群增大，这对国内建设专用的小分子化学晶体学线站是一个有利的促进。

纳米尺度的单晶即使用同步辐射光源也很难测试，一般只能在电镜上采用电子衍射测试。近些年来，电子衍射测定有机晶体取得了较大的进步，比如，采用旋进电子束消减动力学效应，冷冻制样技术提高样品对电子的耐受力，高稳定连续倾转样品台的开发，专用于电子衍射数据的还原软件及动力学精修软件的编写等。这些技术上的进步虽然促进了单晶电子衍射技术解析有机晶体结构的发展和普及，但是，由于缺乏类似直接法这种诺奖级的重大突破，因此目前这个技术还不像单晶 X-射线衍射一样自动和智能。结构求解无法从电子衍射严格遵守的动力学理论出发，而只能采用运动学理论做近似处理，故成功率不高，即使求解成功，随后的精修也一般采用运动学精修做近似处理，结果的一致性偏差因子相对较高。采用动力学精修有望得到更低的一致性偏差因子，但动力学精修参数更多更复杂，目前只能处理原子较少的无机和简单有机分子晶体结构。从现在的技术水平上看，采用电子衍射做结构解析的可信度还无法比拟 X-射线衍射。

DNP 技术介绍

► 武宁宁 向俊锋

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

1. 背景介绍

目前，固体核磁共振技术（Solid-State Nuclear Magnetic Resonance, SS NMR）是可用的最强大的分析技术之一，因无损制样、可从原子水平探测材料的结构等优势，它已成为研究固体材料结构及微观物理化学过程的重要表征手段。通过该技术可以解决原子核位点的对称性和结构信息、原子间的键合和结合信息以及精确得到原子间距离等问题^[1-2]。阻碍 SS NMR 技术发展的一项重要原因是其固有的低灵敏度问题：原子核处于热平衡时，符合玻尔兹曼分布，即核的极化为

$$P = \tanh \frac{\Delta E}{2kT} = \tanh \frac{\gamma \hbar B_0}{2kT} \quad (\text{式 1})$$

在 9.4T 磁场、温度 300K 条件下，两个自旋能级的布局数差异仅为 $\frac{32}{1000000}$ ，即 100 万个分子中才有 32 个差异。所以与其他光谱方法相比，NMR 灵敏度低了约 4 个数量级，因此核磁实验往往需要样品量大或测试时间长。多数 NMR 活性同位素核（见表 1）具有旋磁比低、天然丰度低、各向异性相互作用大等特点，这限制了固体核磁共振技术对材料的研究。从式 1 中可以看出，极化 P 大小与旋磁比 γ 、静磁场强度 B_0 成正比，和温度 T 成反比。NMR 测灵敏度（S/N）如式 2 所示：

$$S/N \cong n\gamma^{\frac{5}{2}} I(I+1) B_0^{\frac{3}{2}} \rho Q^{\frac{1}{2}} V_c^{-\frac{1}{2}} T^{-\frac{3}{2}} f^{-\frac{1}{2}} b^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{式 2})$$

为了增强 NMR 原子核的检测灵敏度，可以通过以下手段来解决：施加更高的磁场（信噪比 $S/N \propto B_0^{3/2}$ ，目前最高场强为 25.5T, 1.2GHz）、降低待测样品温度、使用超低温探头（减少电子噪音，Cryoprobe $S/N \approx \text{factor } 4$ ）、采用 CP、INEPT 极化转移脉冲序列或超极化（hyperpolarization）技术^[3]。传统固体核磁用到的交叉极化可使信号增强 $\frac{\gamma_I}{\gamma_S} \cdot \frac{1}{1+\epsilon}$ ，其中 $\epsilon = \frac{N_S}{N_I}$ （式 3），理论增强因子与 γ_I/γ_S （丰核旋磁比/稀核旋磁比）成正比。

1953 年，Slichter 等人在低场（3mT）下用电子极化转移的方法，实现了 ^7Li

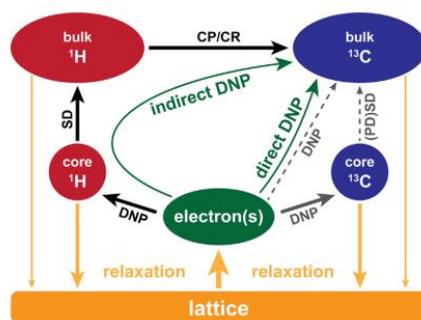
的超极化^[4]。在此基础上，衍生出了多种超极化技术：光泵（**Optical pumping, OP**）、仲氢诱导极化（**Para Hydrogen Induced Polarization, PHIP**）、动态核极化（**Dynamic Nuclear Polarization, DNP**）等^[5-7]。在 2008 年之前，DNP 技术主要局限于专业的科研及技术人员自主开发使用。2009 年，布鲁克推出了第一台商业化 DNP 谱仪，截止 2019 年布鲁克商业化 DNP 谱仪达 38 台。

表 1 NMR 活性核性质

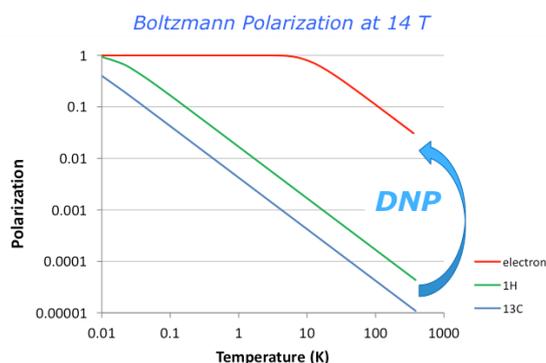
元素	I	γ [$10^7 \text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$]	Natural abundance (%)	Receptivity Molar rel. ^1H	Receptivity Natural rel. ^{13}C
^1H	1/2	26.7522205	99.9885	1.00E+00	5.87E+03
^{13}C	1/2	6.728286	1.07	1.59E-02	1.00E+00
^{15}N	1/2	-2.7126188	0.364	1.04E-03	2.23E-02
^{17}O	5/2	-3.62806	0.038	2.91E-02	6.50E-02
^{27}Al	5/2	6.9762779	100	2.07E-01	1.22E+03
^{29}Si	1/2	-5.31903	4.685	7.86E-03	2.16E+00
^{31}P	1/2	-5.31903	100	6.65E-02	3.91E+02
^{89}Y	1/2	-1.316279	100	1.19E-04	7.00E-01

2. DNP 技术原理

动态核极化(DNP)早已被证明可以极大地改善固体核磁共振分析，该技术是指在热平衡状态下，将未成对电子自旋态极化转移到核自旋态 ($\gamma_e \gg \gamma_n$)，从而增强原子核信号的技术。DNP 可以通过不同的转移路径提高检测核(以碳原子为例)的灵敏度：（1）直接极化转移：电子直接极化转移至碳核；（2）间接极化转移：首先将电子极化转移至质子，再由质子极化转移至碳核，如图 1 所示。



● 图 1、DNP 可能的转移路径的示意图^[6]



● 图 2、理论温度与极化效率关系图

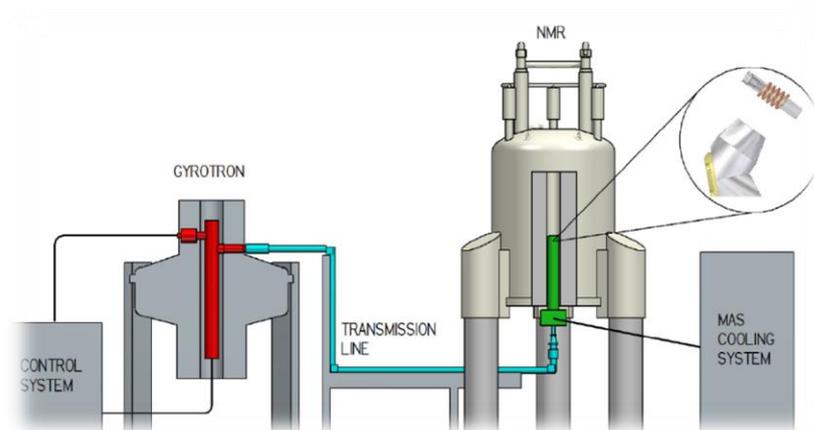
(<https://www.bruker.com/cn/products/mr/nmr/dnp-nmr.html>)

电子具有较大的旋磁比，在 600MHz、100K 条件下，根据式 1 得出，电子极化转移至质子核，理论增强因子为 $P(e^-)/P(^1H)$ 约 660 倍。EPR 照射频率以 GHz 为单位，检测频率以 MHz 为单位。极化转移的机制涉及交叉效应 (Cross Effect, CE)、固态效应 (Solid Effect, SE)、热混合 (Thermal Mixing, TM) 和 Overhauser 效应 (Overhauser Effect, OE)。

影响 DNP 增强的因素含：样品的性质，DNP 系统硬件的具体设置，极化试剂和溶剂/基质的选择，样品制备方法 (Film Casting, FC、Glass Forming, GF、Impregnation) 的选择，其中前两种制样方法要优于第三种。

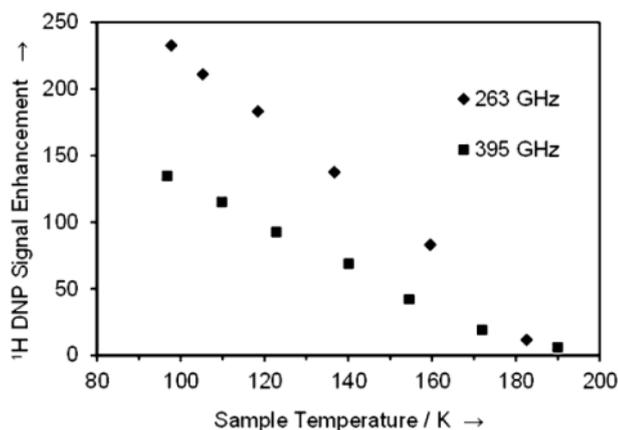
3. DNP 谱仪设备

DNP 谱仪主要有以下部分构成：核磁共振谱仪、微波源、低温探头、微波传输管、冷却系统 (如图 3 所示)。



● 图 3、DNP 谱仪主要设备示意图 (图片来自布鲁克)

从图 4 中可以直观地看出^[8]：质子信号增加强度与样品温度成反比，即温度越低，质子信号增加强度越高，因此低温 DNP 在某些领域有着绝对的优势。目前布鲁克商业化 DNP 谱仪最低温度可达 100K，日本电子（JEOL）的为 30K，文献中报道^[9]的最低温度可达 6K，其中液氦沸点 4K。

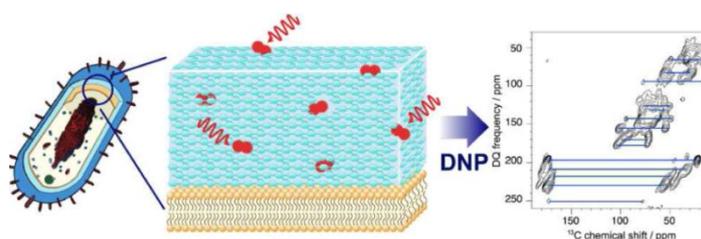


● 图 4、质子信号增加强度与样品温度关系图

4. 应用领域

4.1 生物领域

生物样品以 ^{13}C 、 ^{15}N 检测为主，通过多维实验得到更复杂化合物的结构信息^[10]。与常规固体 NMR 技术相比，DNP 技术增强绝对灵敏度 24 倍，文中提到仅用 4.5 小时，获得了 ^{13}C - ^{13}C 相关谱（如图 5 所示）^[11]。

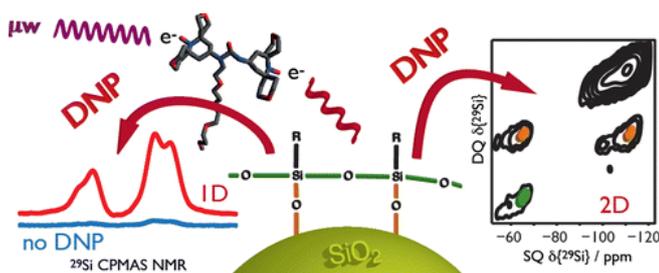


● 图 5、细胞膜的 ^{13}C - ^{13}C 相关谱

4.2 材料领域

新材料或化学材料^[12-14]需要从分子水平对材料进行表征，进而了解它们的机制，DNP 技术可应用于功能化材料、纳米颗粒、介孔二氧化硅、氧化铝、MOF 及混合有机硅材料涉及检测项目包括： ^{13}C 、 ^{29}Si 、 ^{15}N 、 ^{119}Sn 、 ^{27}Al 、 ^{17}O 、 ^{89}Y 一维谱、二维谱。功能化二氧化硅基材料在催化、药物传输、传感器、分离和纯化

装置等领域有着广泛的应用，其活性位点比例极低，传统 SSNMR 技术很难获得这部分信息。二氧化硅(SiO_2)纳米粒子(NPs)经硅烷化功能化后，表面覆盖有机硅氧烷，Daniel Lee 等人^[15]利用 SS NMR-DNP 技术 ^{29}Si - ^{29}Si DQ-SQ 相关谱得到了特定反应条件下聚合和生长的优先取向，与传统 SS NMR 相比，节省了 625 倍时间，在 DNP 技术应用之前，由于 ^{29}Si 的天然丰度低(4.7%)和同位素标记困难且费用成本高，这种相关谱技术通常被认为是实现不了的。



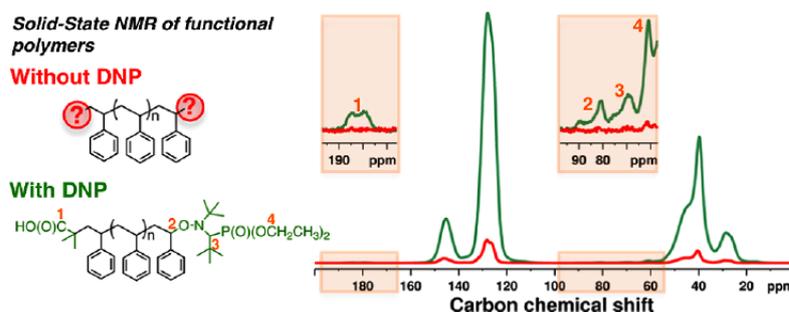
● 图 6、二氧化硅功能化示意图

4.3 有机小分子领域

对于刚性小分子，纵向弛豫时间一般很长，达几百秒，常规 NMR 因灵敏度低，大大限制了对其结构的研究。DNP 技术极大程度地提高了灵敏度，T. Dubroca 等人^[16]利用 DNP 技术 (110K) 将氨基酸 ^{13}C NMR、 ^{15}N NMR 灵敏度分别增强了 128 倍、90 倍。灵敏度的大大提升，促使相对较短时间内收集到天然丰度样品 ^1H - ^{13}C 和 ^{13}C - ^{13}C 相关谱得以实现。

4.4 高分子（天然、合成）领域

Ouari O.等人^[17]利用 DNP 技术采集 15 小时得到了聚氧乙烯聚合物端基的信息（如图 7 所示），这种用传统的 SSNMR 中通常是检测不到的，而对其链端进行精确的结构阐明是控制其反应活性并最终获得复杂结构的高级高分子材料的关键。这为高分子科学的表征和分析开辟了新途径和新前景。



● 图 7、PS 样品的 ^{13}C CPMAS SSNMR 谱

展望

化学所在怀柔科学城北京分子科学交叉研究平台筹备购买一台 600 兆动态核极化 (DNP) 核磁共振谱仪。该谱仪将丰富、拓展化学所材料科学的研究领域及测试范围, 实现原子层次的高灵敏度精细结构研究。

参考文献

1. M. K. Dudek, S. Kazmierski, M. Kostrzewa, M. J. Potrzebowski, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **2018**, 95, 1.
2. S. P. Brown, H. W. Spiess, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 4125.
3. Z. F. Pang, H. X. Guan, L. N. Gao, W. C. Cao, J.L. Yin, X. Q. Kong, *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2020**, 36, 1906018.
4. T.R. Carver, C.P. Slichter, *Phys. Rev.*, **1953**, 92, 212.
5. K.V. Kovtunov, E. V. Pokochueva, O. G. Salnikov, S. F. Cousin, D. Kurzbach, B. Vuichoud, S. Jannin, E. Y. Chekmenev, B. M. Goodson, D. A. Barskiy, I. V. Koptuyug, *Chem. Asian J.*, **2018**, 13, 1857.
6. A. S. L. Thankamony, J. J. Wittmann, M. Kaushik, B. Corzilius, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2017**, 102-103, 120.
7. W. C. Liao, B. Ghaffari, C. P. Gordon, J. Xu, C. Copéret, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2018**, 33, 63.
8. C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R. T. Weber, O. Ouari, P. Tordo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 10858.
9. P. T. Judge, E. L. Sesti, E. P. S. aliba, N. Alaniva, T. Halbritter, S. Th. Sigurdsson, A. B. Barnes, *J. Magn. Reson.*, **2019**, 305, 51.
10. Q. Z. Ni, E. Markhasin, T. V. Can, B. Corzilius, K. O. Tan, A. B. Barnes, E. Daviso, Y. C. Su, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Phys. Chem. B.*, **2017**, 121, 4997.
11. H. Takahashi, I. Ayala, M. Bardet, G. D. Paëpe, J. P. Simorre, S. Hediger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 5105.
12. C. Copéret, W. C. Liao, C. P. Gordon, T. C. Ong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139, 10588.
13. J. H. Du, L. M. Peng, *Chinese Chem. Lett.*, **2018**, 29, 747.
14. A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Copéret, L. Emsley, *Acc. Chem. Res.*, **2013**,

46, 1942.

15. D. Lee, G. Monin, N. T. Duong, I. Z. Lopez, M. Bardet, V. Mareau, L. Gonon, G. D. Paëpe, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 13781.

16. T. Dubroca, A. N. Smith, K. J. Pike, S. Froud, R. Wylde, B. Trociewitz, J. McKay, F. M. Vigier, J.V. Tol, S. Wi, W. Brey, J. R. Long, L. Frydman, S. Hill, *J. Magn. Reson.*, **2018**, *289*, 35.

17. O. Ouari, T. Phan, F. Ziarelli, G. Casano, F. Aussenac, P. Thureau, D. Gigmes, P. Tordo, S. Viel, *ACS Macro Lett.*, **2013**, *2*, 715.

致谢

感谢布鲁克王秀梅博士提供的 DNP 技术宝贵资料及帮助；感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工！

元素分析仪与氧瓶燃烧滴定法对硫元素定量分析的对比

► 李巧连

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

氧瓶燃烧高氯酸钡滴定法是经典的硫元素定量方法，该方法最大的优点是无需高端仪器，耗材成本低。但是样品的前处理过程费时费力，滴定过程对测试人员的操作要求很高，而且部分元素（金属、氟、磷等）对滴定终点的判定有干扰，所以该方法有很大的局限性。元素分析仪（Elemental Analyzer, EA）也可以对硫元素进行精确定量，本文从测试原理、流程、测试误差等多方面对两种测试方法进行了对比。

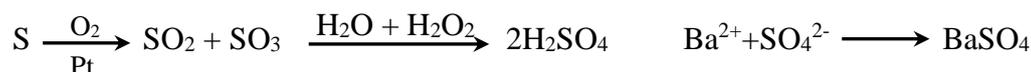
一、方法介绍

1. 氧瓶燃烧高氯酸钡滴定法

1.1 测试原理

精确称量的含硫有机样品在密闭充氧的锥形瓶中，在Pt的催化下燃烧分解，以H₂O₂的碱溶液吸收并氧化生成的SO₂与SO₃，使之转化为SO₄²⁻。以二甲砷偶氮III为指示剂，用高氯酸钡标准液滴定SO₄²⁻，过量的Ba²⁺与指示剂生成蓝色的络合

物，以此指示滴定的终点。

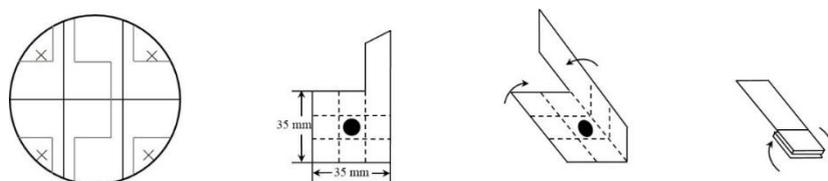


1.2 实验步骤

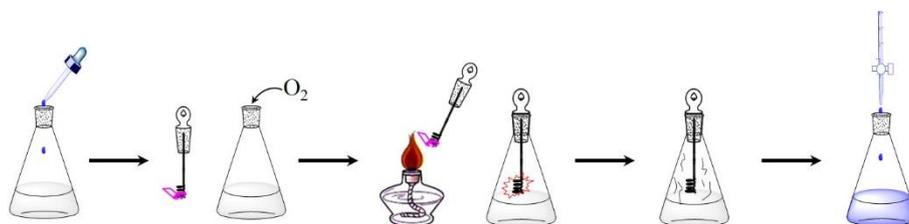
氧瓶燃烧高氯酸钡滴定法是最经典的硫测试方法，操作步骤多，具体实验步骤如下（见图1和图2）：

(1) 称量包样

用镊子夹取干燥的定量滤纸（ $\phi = 11 \text{ cm}$ ），按照图1所示用干净剪刀剪为8块大小均一的小滤纸条（ \times 号标记部分丢弃），每张纸条均按照图中所示压出折痕，用锡杯称量样品2-3 mg（天平精度为1 μg ），将样品小心倒在滤纸中心黑色圆心位置，将滤纸按照图示方法折叠。将倒空的锡杯再次称重后，差重法计算重量即为样品的绝对质量（图1）。



● 图1、滤纸剪裁及折叠法



● 图2、氧瓶燃烧滴定法流程图

(2) 配吸收溶液

在锥形瓶中加入4 ml H_2O_2 溶液及1滴KOH溶液。

(3) 充氧，燃烧，吸收氧化

将折叠包好样品的滤纸夹在玻璃塞铂丝的末端，将滤纸条长尾端引燃后迅速插入充满氧气的锥形瓶中，使劲按压并用少量水密封瓶口以防漏气，样品完全燃烧后，用手轻轻震荡锥形瓶至白烟消失，静止1小时。

(4) 淋洗，调酸碱，加指示剂滴定

用30 ml乙醇少量多次淋洗瓶塞、铂丝及瓶壁，在瓶中加入磁子放磁力搅拌

器上匀速搅拌，加入2滴溴酚蓝指示剂，先加入KOH溶液使溶液呈淡蓝色，再加入HNO₃溶液至溶液刚呈现黄色，加入1滴二甲基亚砷偶氮III溶液，用高氯酸钡标准溶液开始缓慢匀速滴定，溶液出现蓝色为滴定终点。

测试未知样品之前必须先用标准样品对高氯酸钡标准溶液进行标定计算滴定度（标定三次取平均值），每次滴定至少做两个空白对照样品，每个未知样品至少做两个平行实验。

（5）根据如下公式进行计算

$$S\% = \frac{TITER \times c(V - V_0) \times M}{m} \times 100$$

TITER —— 滴定度

c —— 高氯酸钡标准溶液浓度 mol/L

V —— 样品消耗高氯酸钡标准溶液体积 ml

*V*₀ —— 空白消耗高氯酸钡标准溶液体积 ml

M —— 硫元素摩尔质量 32.066 g/mol

m —— 样品绝对质量 g

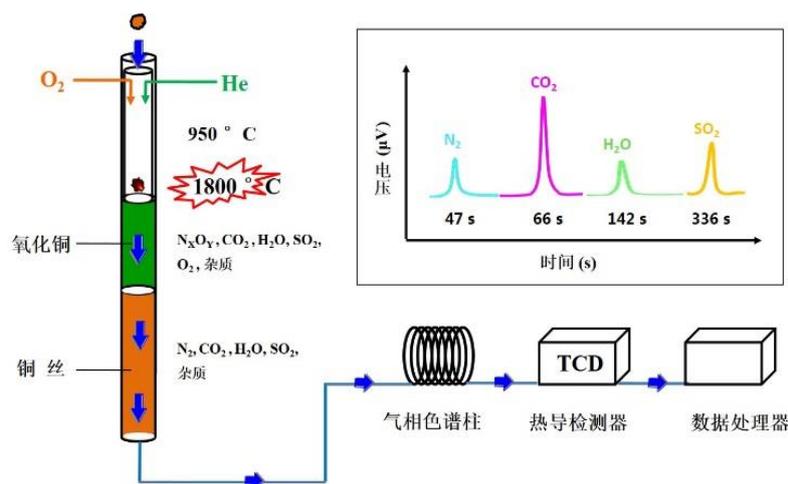
1.3 样品要求及测试影响因素

氧瓶燃烧高氯酸钡滴定法要求样品称样量2-3 mg，测试误差小于5%。样品中含有某些金属元素及氟元素和磷元素时，可能对测试结果产生一定的干扰^[1,2]。

2. 元素分析仪测试方法

2.1 测试原理

精确称量的含硫有机物用锡杯包裹后，在反应管中高温充氧条件下发生瞬时燃烧，温度达1800℃，在氧化铜的催化氧化作用下，样品中的碳、氢、氮、硫元素分别被转化为CO₂，H₂O，N_xO_y，SO₂，混合气体进一步与反应管中的还原铜发生作用，将N_xO_y完全转化为N₂，并除去过量O₂。随后混合气体随载气进入色谱柱进行分离，依据保留时间不同依次分离出N₂、CO₂、H₂O、SO₂色谱峰，不同组分的气体进入热导检测器进行检测，最后由计算机进行数据处理（见图3）。



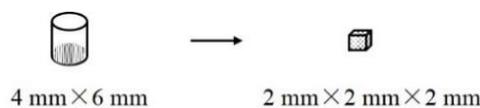
● 图3、元素分析仪测试原理示意图

2.2 实验步骤

具体实验步骤分为三步，其中称量包样为人工操作，其余步骤都为计算机软件操作。

(1) 称量包样

用镊子夹取干燥的锡杯（4 mm×6 mm），用精度为1 μg的电子天平称重，去皮后称量5 mg V₂O₅，再取一个空锡杯去皮后称量约1 mg样品，将称好的V₂O₅倒入装有样品的锡杯，将二者混合均匀，用镊子包成约2 mm的规则小块（图4）。



● 图4、锡杯包样示意图

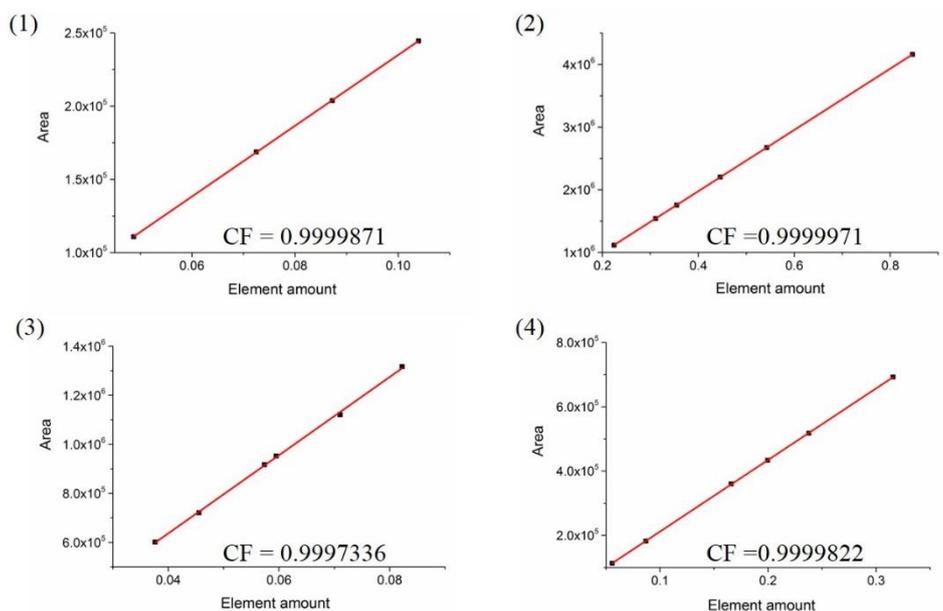
(2) 绘制标准曲线

用同样的称量包样方法称取不同碳氢氮硫含量的标准样品（表1），仪器根据元素的绝对含量及其对应色谱峰的积分面积自动绘制C、H、N、S元素的标准曲线，C、N、S元素线性回归系数需大于0.9999，H元素线性回归系数需大于0.999（图5）。

表1 不同标准样品的称样量及元素含量

样品编号	称重(mg)	N含量(%)	C含量(%)	H含量(%)	S含量(%)
BBOT	0.748	6.51	72.53	6.09	7.44
BBOT	1.167	6.51	72.53	6.09	7.44
Meth	0.772	9.39	40.25	7.43	21.48
Meth	1.107	9.39	40.25	7.43	21.48

Cys	0.748	11.66	29.99	5.03	26.69
Cys	1.183	11.66	29.99	5.03	26.69



●图5、根据标准样品绘制的不同元素的标准曲线 (1)N, (2)C, (3)H, (4)S

(3) 计算

称量测试未知样品时, 仪器根据不同元素的标准曲线自动计算出样品中各种元素的准确含量(表2)。

表2 未知样品的碳氢氮硫元素含量测试结果

样品编号	称重(mg)	N含量(%)	C含量(%)	H含量(%)	S含量(%)
Cuiyt IIOH	0.852	0.00	16.29	0.17	42.94
Cuiyt IIOH	0.887	0.00	16.24	0.17	42.83
Chen II P2	0.729	6.13	70.69	8.26	6.36
Chen II P2	0.707	6.25	70.75	8.28	6.38
Liang yy 1	0.836	7.69	58.02	2.13	18.47
Liang yy 1	0.817	7.48	57.86	2.20	18.48

2.3 样品要求及测试影响因素

元素分析法要求样品称样量约1 mg, 测试误差小于3%。元素分析仪测试硫的原理是燃烧分解, 如果待测样品中含有金属元素, 硫元素可能与部分金属元素, 尤其是碱金属及碱土金属形成比较稳定的硫酸盐(硫酸钾, 硫酸钠分解温度均大于1000 °C), 从而影响测试结果的准确性^[3]。我们用该方法对硫酸钾, 硫酸

钠中的硫元素进行了定量,其测试结果均在误差允许范围内,测试结果非常准确,说明该方法同样适用于含金属样品中硫元素的定量。

3. 方法对比

表3 氧瓶燃烧滴定法与元素分析仪测试方法对比

	氧瓶燃烧滴定法	元素分析仪法
样品前处理	复杂	无
称样量	约2-3 mg	约1 mg
测试流程及时间	5步, 2.5小时/样品	3步, <1小时/样品
检测方法	手工滴定, 难掌握	自动检测
误差	≤5‰	≤3‰
干扰元素	金属、F、P	无

二、结论

与经典的氧瓶燃烧高氯酸钡滴定法相比,元素分析仪测试硫元素有很大的优越性:样品进样量更少;分析过程无需对样品进行复杂的前处理,自动化程度高,测试人员无需进行长时间的培训即可掌握;分析结果精确度更高,而且该方法几乎不受其他元素的干扰,其适用性非常广,是一种非常便捷的硫元素精确定量方法。此外,该方法还可以实现对碳、氢、氮、硫四种元素同时进行精确定量分析。

参考文献

- 1、兰州大学化学系,中国科学院上海药物研究所. 有机微量定量分析. 北京: 科学出版社, 1978, 8.
- 2、王约伯, 高敏. 有机元素微量定量分析. 北京: 化学工业出版社, 2013, 9.
- 3、邓广勇. 分析仪器, 2000, 4, 50.

致谢

感谢朱道本老师课题组和张德清老师课题组提供测试样品!感谢丁丽萍老师审核编辑!

氧瓶燃烧前处理与电位滴定仪联用测试卤素方法的可行性探究

► 李巧连 罗晓菲

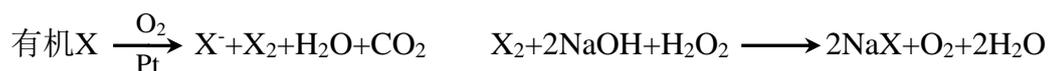
(分析测试中心元素分析组 Tel: 010-62554625 Email: liqiaolian@iccas.ac.cn)

氧瓶燃烧汞液滴定法是经典的氯溴定量方法，该测试方法无需高端仪器，耗材成本低，但是滴定过程对测试人员的操作要求很高，因此，本文探究了氧瓶燃烧前处理和电位滴定仪联用方法测试氯元素的可行性，为卤素的精确定量提供新的方法参考。

一、方法介绍

1. 前处理方法——氧瓶燃烧法

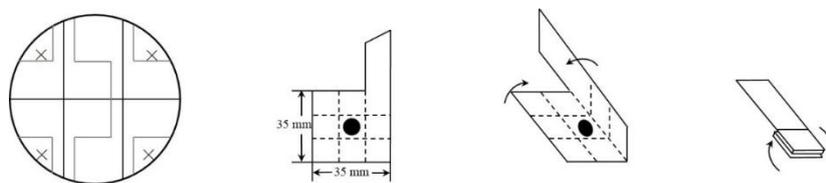
精确称量的含Cl样品在密闭充氧的锥形瓶中，在Pt的催化下燃烧分解，以过氧化氢的碱溶液吸收生成的卤化氢，使卤素以离子态存在于溶液中^[1,2]。



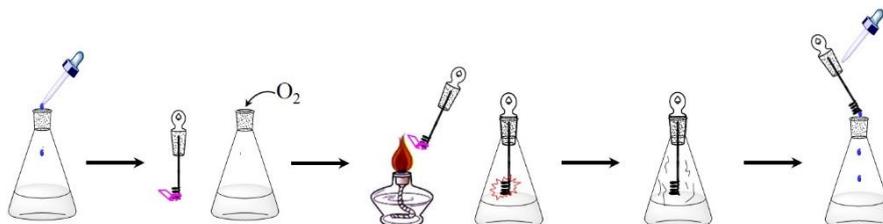
具体的前处理实验步骤如下：

(1) 称量包样

用镊子夹取干燥的定量滤纸（ $\phi = 11 \text{ cm}$ ），按照图1所示方法进行剪裁折叠。用锡杯称量样品2-3 mg（天平精度为1 μg ），将样品小心倒在滤纸中心黑色圆心位置，将滤纸按照图示方法进行折叠。将倒空的锡杯再次称重后，差重法计算重量即为样品的绝对质量。



● 图1、滤纸剪裁及折叠法



● 图2、氧瓶燃烧法流程图

(2) 配吸收溶液，充氧燃烧，吸收氧化，淋洗

在锥形瓶中加入4 ml H₂O₂溶液及2滴KOH溶液。将折叠包好样品的滤纸夹在玻璃塞铂丝的末端，将滤纸条长尾端引燃后迅速插入充满氧气的锥形瓶中，用力按压并用少量水密封瓶口以防漏气，样品完全燃烧后，用手轻轻震荡锥形瓶至白烟消失，静止1小时。用50 ml乙醇少量多次淋洗瓶塞、铂丝及瓶壁，淋洗液待用。

2. 测试方法——电位滴定仪法

工作原理：在滴定过程中用电极测量溶液电位，随着滴定剂加入，被测离子浓度不断变化，指示电极的电位也相应地变化，在等当点附近发生电位的突跃，以此确定滴定终点。常用来作为氯离子检测的有银环电极和氯离子选择性电极。

标准溶液的配制及标定：将NaCl标准样品在120 °C烘干后置于干燥器中冷却至室温，用去离子水配制浓度为0.01 mol/L的NaCl标准溶液。配制浓度为0.005 mol/L的AgNO₃标准溶液，并用NaCl标准溶液对AgNO₃标准溶液进行标定(标定三次取平均值，滴定度为0.9949)。

每个测试样品至少做两次平行实验，氯元素含量按照以下公式计算：

$$\text{Cl}\% = \frac{\text{TITER} \times c(V - V_0) \times M}{m \times 1000}$$

TITER —— 滴定度

c —— 硝酸银标准溶液浓度 mol/L

V —— 样品消耗硝酸银标准溶液体积 ml

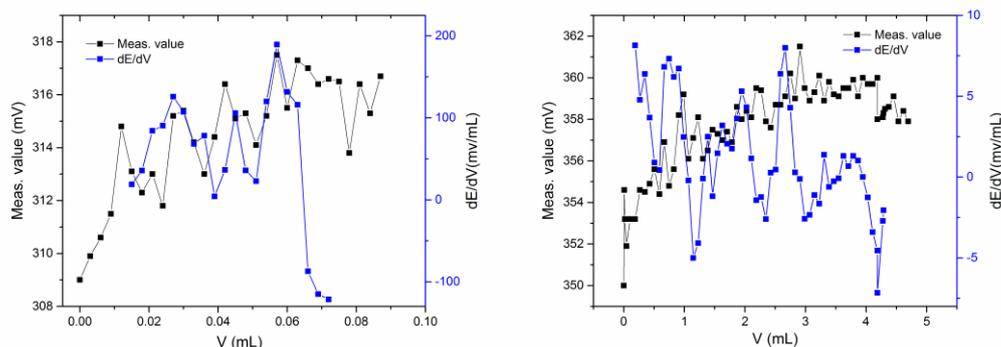
*V*₀ —— 空白消耗硝酸银标准溶液体积 ml

M —— 氯元素摩尔质量 35.453 g/mol

m —— 样品绝对质量 g

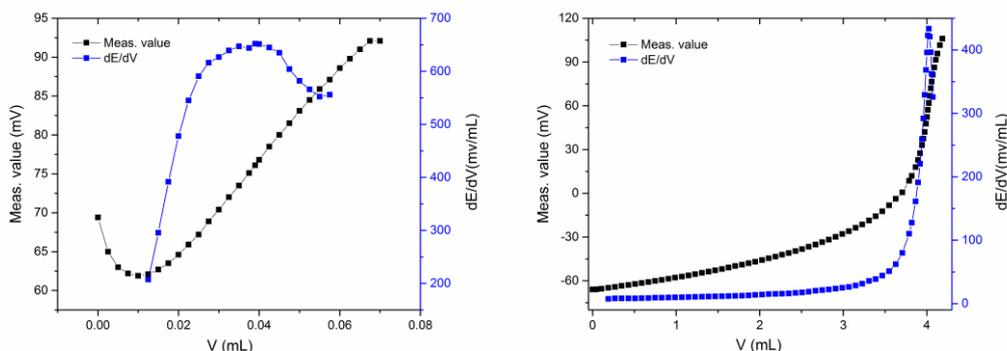
(1) Ag环电极

将空白样品及标准样品IV4按照样品前处理方法处理，淋洗液分别加入10滴5%的HNO₃溶液调节酸度后进行电位滴定实验，但滴定过程中实时电位变化均毫无规律，无法正确识别滴定终点（图3）。



●图3、空白样品（左）及标准样品IV4（右）电位滴定图
($m_{IV4} = 2.781 \text{ mg}$)

对前处理过程中添加的乙醇, KOH溶液及 H_2O_2 溶液分别进行单因素变量实验进行验证, 发现加入 H_2O_2 溶液时实时电位变化即变得毫无规律, 如果只加乙醇和KOH溶液, 而不加 H_2O_2 溶液, 空白样品和标准样品其电位变化均正常(见图4), 说明 H_2O_2 溶液对Ag环电极有影响, 导致其不能正常工作。因此Ag环电极不能用于样品前处理后的电位滴定测试。



●图4、未加 H_2O_2 溶液的空白样品（左）及标准样品NaCl（右）电位滴定图
 $c_{\text{NaCl}} = 0.01 \text{ mol/L}$, $V_{\text{NaCl}} = 2 \text{ mL}$, $\text{Cl}\%_{\text{测试}} = 60.80\%$, $\text{Cl}\%_{\text{理论}} = 60.66\%$

(2) 氯离子选择性电极

用氯离子选择性电极进行空白样品测试, 滴定过程中实时电位变化趋势正常, 可以正确识别滴定等当点(图5左)。在吸收液中直接加入标准NaCl溶液进行滴定实验, 测试NaCl中氯元素含量为60.56%, 与理论值60.66%误差低于3%, 测试结果准确(图5右)。对其他含氯标准样品IV4, III9, III22氧瓶燃烧前处理后验证, 其两次测试误差均低于3%, 稳定性非常好, 且测试结果与理论值误差均低于3% (见表1), 说明氧瓶燃烧法和氯离子选择性电极电位滴定法联用可以用于氯元素的精确定量分析。用该方法对三种未知样品进行测试, 测试结果见表2。

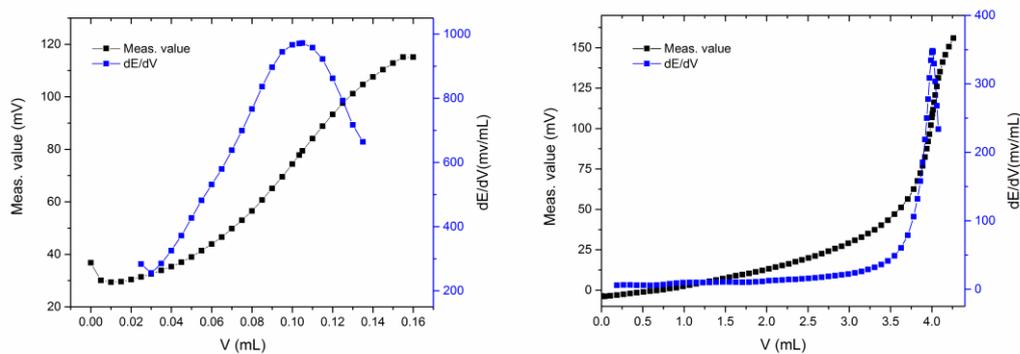


图5、加 H_2O_2 溶液的空白样品（左）及 NaCl 标准样品（右）电位滴定图

$c_{\text{NaCl}} = 0.01 \text{ mol/L}$, $V_{\text{NaCl}} = 2 \text{ mL}$, $\text{Cl}\%_{\text{测试}} = 60.56\%$, $\text{Cl}\%_{\text{理论}} = 60.66\%$

表1 氯离子选择性电极对空白样品及标准样品的电位滴定测试结果

样品 编号	质量 (mg)	消耗体积 (ml)	平均空白体积 (ml)	测试结果（扣空白） Cl%	理论值 Cl%
空白-1	0	0.0588			
空白-2	0	0.0538			
IV4-1	2.410	2.4545		17.55	17.49
IV4-2	2.356	2.3993	0.0563	17.54	17.49
III9-1	2.239	2.2854		17.56	17.50
III9-2	2.296	2.3632		17.72	17.50
III22-1	2.227	2.9131		22.62	22.65
III22-2	2.146	2.8238		22.74	22.65

IV4——S-苄基异硫脲盐酸盐, III9——2,4-二硝基氯苯, III22——对氯苯甲酸

表2 氯离子选择性电极对未知样品的测试结果

样品 编号	质量 (mg)	消耗体积 (ml)	平均空白体积 (ml)	测试结果（扣空白） Cl%
空白-1	0	0.1034		
空白-2	0	0.1072		
木屑-1	6.332	1.1937		3.03
木屑-2	6.331	1.1618	0.1053	2.94
水稻-1	6.354	0.7033		1.66
水稻-2	6.329	0.6643		1.56
玉米-1	6.524	2.0480		5.25
玉米-2	6.261	1.9158		5.10

3. 氯离子选择性电极电位滴定法对样品要求及测试影响因素

该测试方法可检测的氯元素绝对含量范围为 $50 \mu\text{g}$ - 1.773 g 。与银离子生成难溶沉淀或络合物的离子及 MnO_4^- 等均干扰测定^[3], 另外强还原性溶液会形成银表

面层,造成电极故障。氯离子选择性电极常见干扰离子及其最大允许浓度和对应干扰消除方法见表3。

表3 氯离子选择性电极常见干扰离子及其最大允许浓度

干扰离子	干扰离子与氯离子 允许最大摩尔浓度比率	干扰消除方法
(a) OH ⁻	80	(a)用1 mol/L HNO ₃ 调节pH值为4, 除去OH ⁻
(b) Br ⁻	3×10 ⁻³	(b)(c)使用氯离子氧化剂(溴酸钠(NaBrO ₃ 的硝酸溶液)可以氧化 500 mg/L S ²⁻ 、100 mg/L Br ⁻ 或 I ⁻ 、100 mg/L NH ₃ , 或超过 Cl ⁻ 100 倍的
(b) I ⁻	5×10 ⁻⁷	
(c) S ²⁻	10 ⁻⁶	CN ⁻ , 去除干扰物
(c) CN ⁻	2×10 ⁻⁷	
(c) NH ₃	0.12	(d) 选择已知增量法测试
(d) Mn ²⁺ 等金属离子	0.4 - 200	

二、结论

与经典的氧瓶燃烧汞液滴定法相比,氧瓶燃烧电位滴定法测试氯元素最大的优越性在于滴定过程全部由仪器自动控制,测试人员无需进行长时间的培训练习即可掌握,且数据的稳定性更高,相应其测试效率也更高,但是电位滴定法同样也存在很多的干扰因素会影响测试的准确性,因此在使用的过程中必须要采取相应的祛除干扰措施才可以得到准确的测试结果。

参考文献

- 1、兰州大学化学系,中国科学院上海药物研究所. 有机微量定量分析. 北京: 科学出版社, 1978, 8.
- 2、王约伯, 高敏. 有机元素微量定量分析. 北京: 化学工业出版社, 2013, 9.
- 3、GB/T 3050-2000 无机化工产品中氯化物含量测定的通用方法 电位滴定法. 2000.

致谢

感谢梅特勒公司提供电位滴定仪样机! 感谢丁丽萍老师审核编辑!

辉光放电离子源的研发与应用

► 王振鹏 王光辉 赵镇文*

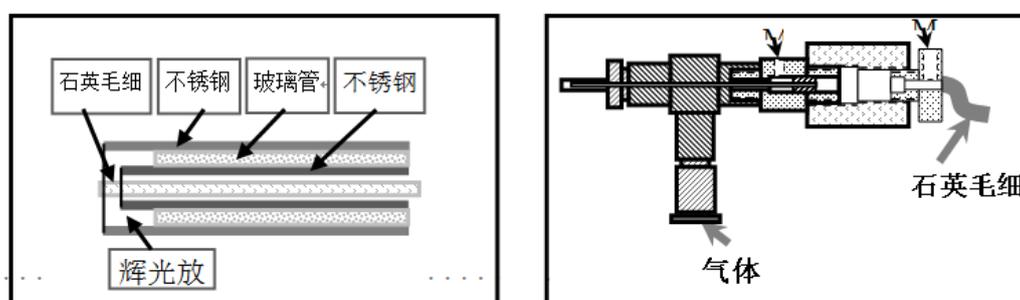
(分析测试中心质谱组 Tel: 010-62554495 Email: wang_82713@iccas.ac.cn)

一、开发新型辉光放电离子源解决的问题和意义

目前, 质谱分析仍存在一些不完善的地方: 1) 没有适合分析中等极性化合物的离子源。2) 烷烃类化合物使用 EI 离子源分析, 由于电离能过高把样品分子全部电离成碎片离子找不到分子离子, 不能确定化合物分子量。3) 缺少官能团鉴定的质谱分析方法。为了解决上述问题, 构建了一种新型辉光放电质谱离子源 (GD-ESI MS), 并围绕这个离子源开展了一系列应用开发工作, 解决了当前质谱分析中遇到的一些难题。

二、GD-ESI MS 离子源结构、工作原理、性能和分析能力

GD-ESI MS 离子源与已发展的辉光放电离子源结构完全不同, 具有全新的结构设计。它主要由内、外两根金属电极管构成, 两根电极管之间用绝缘管隔开; 惰性反应气体从金属电极管与绝缘管的夹缝流过; 在内侧金属电极管中心通过一根石英毛细管用于传输样品溶液, 见图 1。



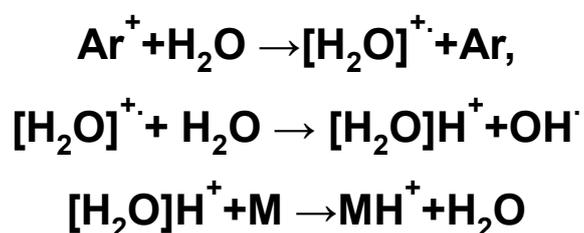
● 图 1、新型辉光放电离子源结构图

GD-ESIMS 离子源具有 GD 和 ESI 两种电离模式, 每种电离模式又分为正、负电离模式。GD 和 ESI 两种电离模式可以通过简单的变化电源线的接线方式实现快速转换。ESI 电离模式已是经典的电离模式本文就不再赘述了, 下面只介绍当 GD-ESI MS 离子源使用 GD 电离模式时工作原理和分析能力。当使用 GD 电离模式时, 内外两根金属电极管之间加直流高压电, 辉光放电发生在离子源端口处, 见图 2。



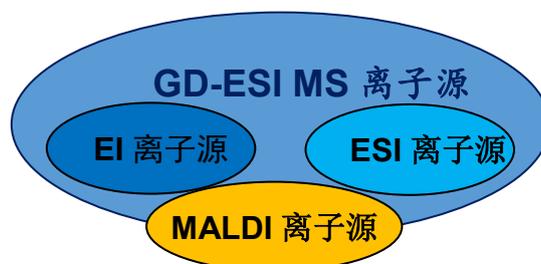
● 图 2、新型辉光放电离子源照片

惰性气体（一般为氩气）从两根金属电极管之间的狭缝喷出，在流经辉光放电区域时被电离成具有很高电离能的等离子体（ Ar^+ ）。样品溶液通过微量进样器注入石英毛细管，并从石英毛细管端口缓慢流出。由于受到辉光放电加热和惰性气体流的吹扫，样品溶液迅速蒸发气化。气化的样品分子与具有高能的惰性气体等离子体（ Ar^+ ）发生一系列电荷交换转移反应，见图 3，样品分子被电离成样品离子，继而被质谱仪端口吸入仪器检测。



● 图 3、辉光放电电离样品原理

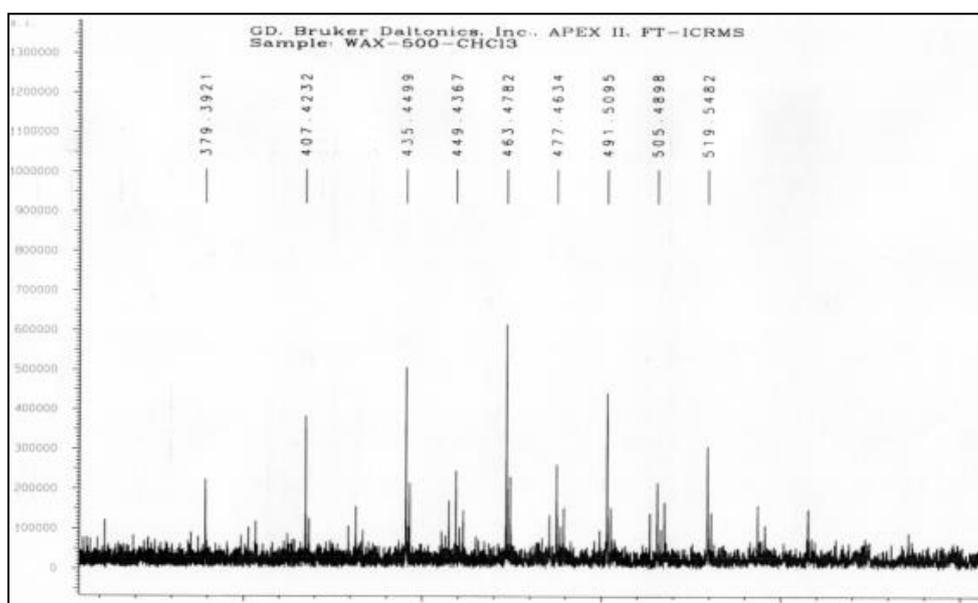
由于该离子源不仅具有经典的 ESI 电离模式还具有强大的 GD 电离模式，所以它适合分析样品的范围非常广谱，见图 4。



● 图 4、新型辉光放电离子源检测样品范围

GD 电离模式由于电离能量强弱适中，不但可以分析现有商品化离子源分析

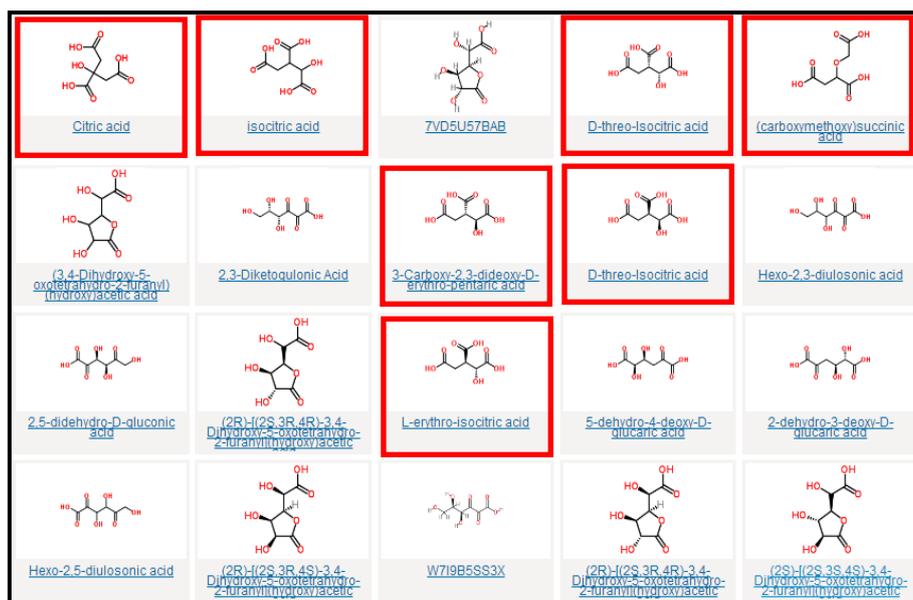
的样品，还可以分析现有商品化离子源不能分析的样品和用 EI 离子源分析得不到分子离子峰的样品，图 5 展示了用 GD 电离模式分析石蜡样品得到的质谱图，图中出现了不同聚合度的分子离子峰，首次用质谱法揭示了石蜡中分子量大小的分布情况。从而弥补了目前商品化离子源分析烷烃类样品得不到分子离子峰的缺陷。



● 图 5、石蜡质谱图

三、利用 GD-ESI MS 离子源 GD 电离模式在线衍生反应分析未知化合物官能团

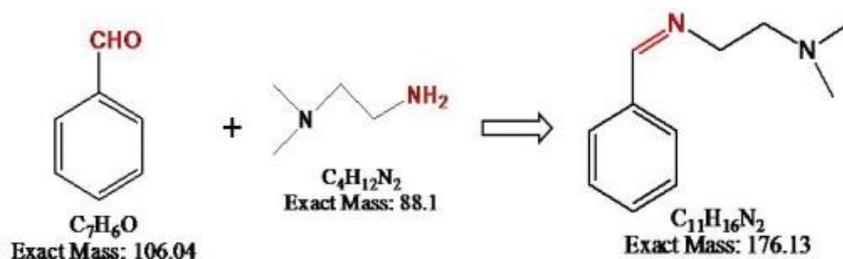
核磁共振和光谱法是分析未知化合物结构的常用方法，但这两种方法都存在需要样品量较大的问题，在分析微量样品时常常受到限制，而质谱分析恰恰对样品量要求非常少，具有极高的检测灵敏度(一般检测限在纳克级别)。高分辨质谱可以计算出化合物元素组成，通过网络大数据对化合物元素组成进行检索获得未知物可能的分子结构。例如：元素组成为 $C_6H_8O_7$ 的化合物，通过大数据库检索可得到 81 种可能的分子结构。由于化合物候选结构数目过于庞大，很难进一步确定哪种结构为正确结构。如果能检测出其结构中含有三个羧基，则可从 81 个候选结构中筛选出 7 个符合条件的可能结构，再根据质谱裂解规律和二级质谱图从 7 个候选结构中进一步确定最终结构就很容易了，见图 6。



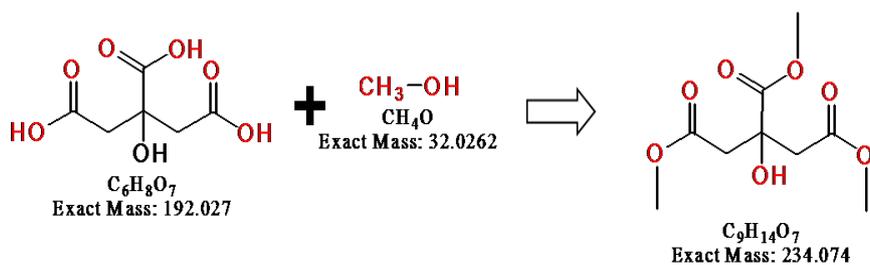
● 图 6、推测出的 7 个候选分子结构（红框中）

因此，用质谱法确定未知化合物分子结构中的官能团具有检测灵敏度高，可以大大简化推断未知化合物结构过程的特点。

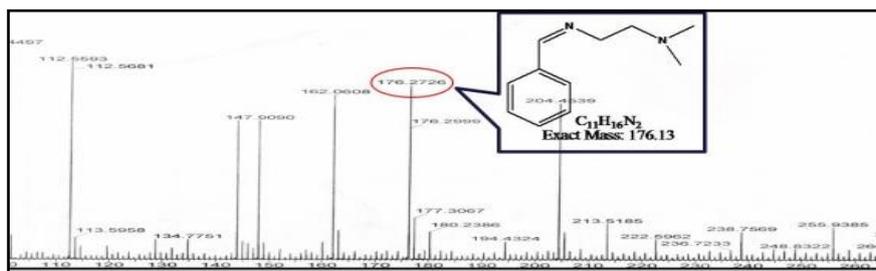
在分析样品前把同浓度衍生化试剂与被测样品 10/1 (V/V) 混合，使用 GD 电离模式，N,N-二甲基乙二胺作衍生化试剂，用微量进样器将样品溶液注入到进样毛细管中，样品流量为 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在检测过程中，被测物醛基与衍生试剂在辉光放电诱导下发生在线席夫碱反应，检测到衍生物相对原始样品发生分子量位移 $[M+70*n]^+\text{Da}$ (n 表示被测物结构中醛基的数量)，图 7、9 是苯甲醛在线席夫碱反应方程式和质谱图，利用此方法可知道被测物结构中是否含有醛基和醛基的数量。用甲醇作衍生化试剂，在辉光放电诱导下，被测物羧基与甲醇发生酯化反应，可检测到衍生物相对原始样品分子量发生位移 $[M+14*n]^+\text{Da}$ (n 表示被测物结构中醛基的数量) 见图 8、10 通过此方法可以知道被测物结构中是否含有羧基和羧基的数量。



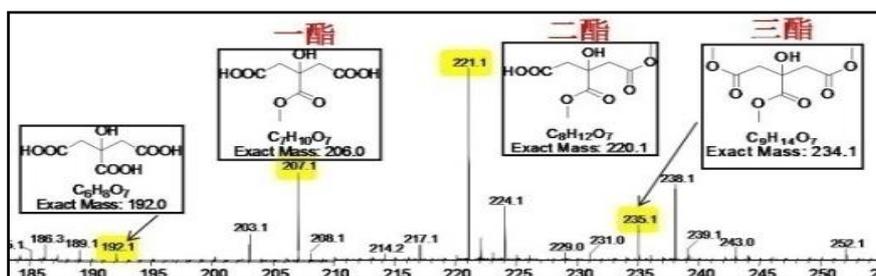
● 图 7、席夫碱反应方程式



● 图 8、酯化反应方程式



● 图 9、席夫碱反应质谱图



● 图 10、酯化反应质谱图

通过上面这两种衍生方法可以确定未知化合物中是否含有醛基和羧基官能团并确定其数量。这些官能团信息的确定，可以大大简化剖析未知化合物结构的过程，对剖析未知化合物结构具有巨大的帮助作用。

开发 MALDI-MS 的 3-HPA/CHCA 二元基质分析多电荷样品

► 李书沐 刘健安 赵耀

(分析测试中心质谱组 Tel: 010-62554495 Email: lishumu@iccas.ac.cn)

一、背景介绍

AUTOFLEX III 质谱仪配备单一基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 源，能测定分子量大于 400 的有机小分子、多肽、蛋白质、DNA 生物大分子、高分子等。

具有分子离子峰信号强，碎片少，谱图简单，可测分子量高达数十万的特点。由于 MALDI-MS 的高通量，检测速度快，无交叉污染等特点，近些年来用此仪器来进行生物活性分子的检测也成为了热点领域。

多电荷样品如 DNA，水溶性富勒烯样品都是化学生物学研究的热点分子，富勒烯是由不同数目的碳原子组成的具有封闭结构的原子团簇，具有独特的分子结构与理化性质，在生物医学领域展示了重要的应用前景。功能化水溶性富勒烯材料能够高效清除生物体内过量的活性氧类，保护机体抗氧化损伤、防治相关疾病；有效治疗肿瘤，并具有优异的生物安全性。探索功能化富勒烯材料的生物效应和生物作用机制，对于进一步推进富勒烯材料在生物医学领域的应用具有重要意义。DNA 是生命体活动中的重要分子，在特定离子的诱导作用下，DNA 分子可能会自组装形成二级结构如 G 四链体，也可与小分子发生相互作用从而影响生物的代谢行为。因此开发 MALDI-MS 对这类分子的表征方法非常重要。

MALDI-MS 技术中的传统基质无法很好的表征多电荷的样品，这主要是由于 MALDI 质谱检测到的离子通常为单电荷状态，DNA、水溶性富勒烯等分子的电荷分布广泛也就降低了检测的灵敏度，使得这类分子无法获得检测信号。用 3-HPA 有助于这类分子的 MALDI 检测，但是由于 3-HPA 的结晶大且不易气化使得检测灵敏度一直难以提高。

二、方法介绍

2.1 技术原理

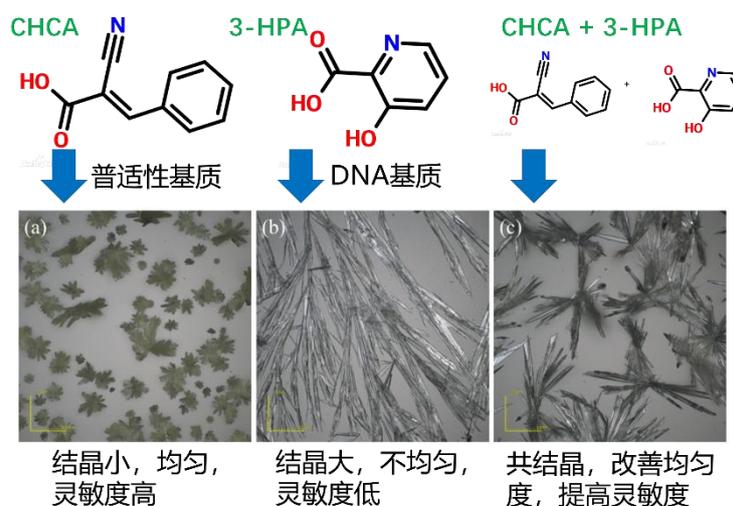
针对多电荷分子 MALDI-MS 测试这个难题，我们设计了一种 3-羟基-2-吡啶甲酸(3-HPA)/ α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)二元基质体系，使水溶性多电荷化合物在这种复合基质体系帮助下得以分析并很大程度的提升灵敏度，还具有一定耐盐性能。相比来说，在相同的测试条件下传统 MALDI 基质 CHCA、DHB 均无法采集到被测物信号；而单独使用 3-HPA 作为基质时可获得信号但信号较弱。3-HPA/CHCA 的复合基质体系中，3-HPA 可调节体系的 pH 值，一定程度的抑制被测分子在水中的质子化，从而使被测分子处于相对集中的电荷状态以增强检测灵敏度，另一方面，CHCA 由于其结晶小且均匀，并与 3-HPA 具有很好的相互作用力，可非常明显的改善样品的结晶性，从而大幅提升检测灵敏度。

2.2 实验方法

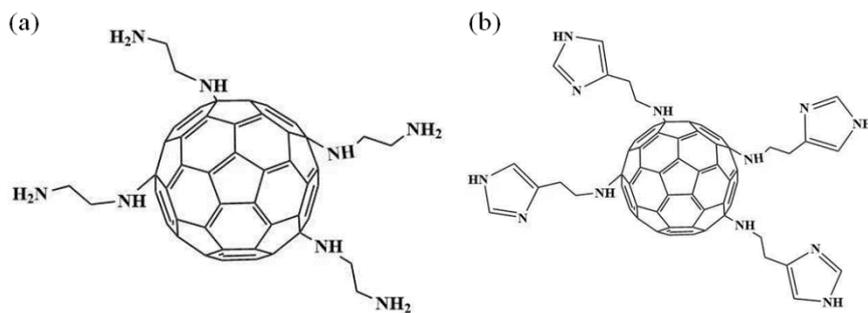
配制 3-HPA/CHCA 两种不同基质溶液(5 mg/mL, 溶剂为乙腈/水 v/v 7:3 加入千分之一甲酸)。与待测样品(水溶性富勒烯 1 mg/mL, DNA 1 μ M)等体积混合后取样点于不锈钢靶, 常温常压下洁净后进行测试。

3-HPA 虽然可以抑制多电荷物质的电离及质子化, 但由于其结晶较大(图 2b), 激光难以使其从靶面解吸, 测试灵敏度不高, 限制了 3-HPA 基质的应用。CHCA 的结晶小且均匀(图 1a), 容易在激光轰击下易解吸从而获得较好的质谱信号, 在实验过程中, 发现 CHCA 与 3-HPA 分子有较好的相互作用, 它们的混合溶液在结晶时不会出现相分离而是形成均匀的小结晶(图 1c)。也使得 3-HPA/CHCA 的混合结晶在激光解吸过程中比单独 3-HPA 更容易, 从而获得了更好的灵敏度。

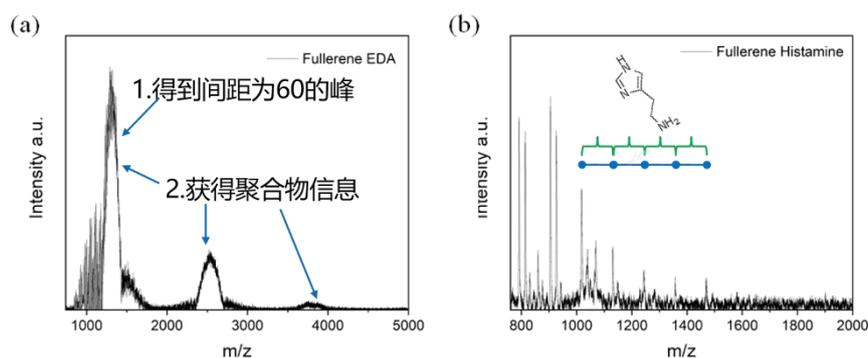
如图 2 所示, 两种功能化水溶性富勒烯衍生物均具有很多质子化位点, 使它们在水中容易呈现多电荷状态, 而常规基质(5 mg/mL)如 CHCA 酸性较强(pH 约为 2), 会加剧富勒烯分子的质子化, 无法成功得到信号。3-HPA 基质为 DNA 分子测试经典基质, 它可以抑制 DNA 分子的电离, 从而增加 MALDI-MS 的检测信号。我们用 3-HPA 作为基质, 成功得到图 2 中两个分子的 MALDI 质谱图, 但信号较弱。用 3-HPA/CHCA 作为二元基质, 两种不同的富勒烯衍生物(富勒烯-乙二醇和富勒烯-组胺)均可获得很好的质谱信号(图 3)。由富勒烯分子的质谱图, 可以得到重要信息, 3a 图谱表明氨基富勒烯体系中存在水溶性聚合物, 说明了此物质生物相容性好的理由, 3b 图谱中得到多个组胺修饰的信号, 为后面化合物的分离提供了有力证据。



● 图 1、CHCA(a),3-HPA(b)和 CHCA/3-HPA 二元基质的结晶图(显微镜放大 20 倍)

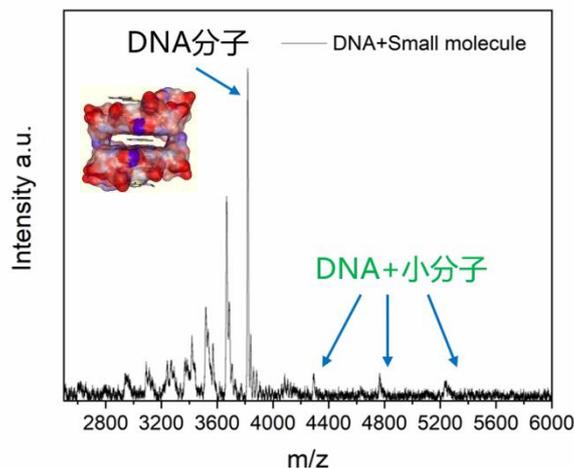


● 图 2、功能性水溶性富勒烯分子的结构示意图



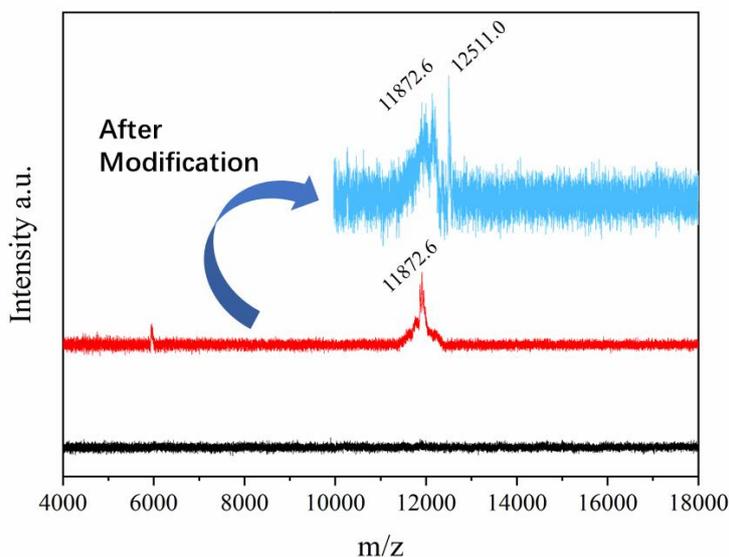
● 图 3、富勒烯乙二胺衍生物(a)，和富勒烯组胺衍生物(b)的 MALDI 质谱图

与此体系类似，我们尝试用 3-HPA/CHCA 二元基质体系提升 DNA 分子测试的灵敏度，在实验中发现，用此二元基质体系不仅可以提高 DNA 检测的灵敏度，而且可以提高体系的耐盐能力。在 DNA 与小分子作用的体系中，需要由较高浓度的 Na^+ 或 K^+ 来引发二者的相互作用(盐浓度约为 mM 级)，常规的 3-HPA 基质由于自身的结晶就较大，耐盐性能很差，体系中含盐时无法进行测试。而二元基质体系由于优化了结晶过程，使得体系耐盐性有所提升，成功得到了 DNA-小分子相互作用的质谱信号(图 4)。



● 图 4、DNA 与小分子复合物的 MALDI 质谱图

借助此二元基质体系 DNA 分子的检测灵敏度得以显著的提升，更重要的是成功的扩展了 DNA 分子的检测质量范围。如图 5 所示，本体 12kDa 左右的 DNA 分子被二元基质成功表征，传统方法单独使用 3-HPA 作为基质时，AutoFlexIII 目前状态难以得到信号。在此基础上，DNA 修饰小分子的信号也成功被捕捉，为合成提供了有力证据。



● 图 5、使用二元基质表征 10kDa 以上 DNA 分子

三、 结论

我们设计了一种 3-羟基-2-吡啶甲酸(3-HPA)/ α -氰-4-羟基肉桂酸(CHCA)二元基质体系，使多电荷水溶性化合物在这种复合基质体系帮助下得以分析并很大程度的提升灵敏度，还具有一定耐盐性能，并且提升 DNA 分子的检测范围。3-

HPA/CHCA 的复合基质体系中, 3-HPA 可调节体系的 pH 值, 一定程度的抑制被测分子在水中的质子化, 从而使被测分子处于相对集中的电荷状态以增强检测灵敏度, 另一方面, CHCA 由于其结晶小且均匀, 并与 3-HPA 具有很好的相互作用力, 可非常明显的改善样品的结晶性, 从而大幅提升检测灵敏度。能够很大程度的扩展 MALDI-MS 的应用范围。

参考文献

1. Muddiman, D. C.; Cheng, X. H.; Udseth, H. R.; Smith, R. D., Charge-state reduction with improved signal intensity of oligonucleotides in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, 7, 697.
2. Scalf, M.; Westphall, M. S.; Krause, J.; Kaufman, S. L.; Smith, L. M., Controlling charge states of large ions. *Science* **1999**, 283, 194.

典型应用案例

石榴皮和五倍子提取鞣花酸的差异性物质结构鉴定研究

► 魏金超 李书沐 辛斌

(分析测试中心质谱组 Tel: 010-62554495 Email: weijincho@iccas.ac.cn)

鞣花酸广泛存在于各种软果、坚果等植物组织中的一种天然多酚组分，它是没食子酸的二聚衍生物，是一种多酚二内酯。通过研究发现，鞣花酸对化学物质诱导癌变及其他多种癌变有明显的抑制作用，也是皮肤科医学公认可使用的有效美白成分之一，鞣花酸还具有多种生物活性功能，例如抗氧化功能、抗突变性能、对人体免疫缺陷病毒的抑制作用，同时发现，鞣花酸还具有降压、镇静作用^[1]。石榴皮提取鞣花酸是可以食用的，由于五倍子是动物的虫瘿，虽属于中药但是仅限于外用，不可食用。由于五倍子提取鞣花酸成本低，所以现在市场上鞣花酸保健品原料多数是五倍子提取冒充石榴皮以次充好卖给厂家，现在急需寻找一个标志性物质区分原料来源是五倍子还是石榴皮。

本实验利用LC-MS-MS寻找差异性组分，推导出未知化合物的结构，并购买标准品进一步验证推导是否正确。

一、实验部分

1.1、实验材料及仪器

HPLC级甲醇从Thermo Fisher Scientific公司购买；标准品漆树酸购买于北京百灵威科技有限公司；超高效液相色谱仪含自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机、低压四元梯度泵、PDA检测器和LTQ Orbitrap velos pro质谱仪（高分辨静电场轨道阱质谱，ESI源）购自Thermo Fisher公司；离心机购买自SIGMA实验室。

1.2、仪器条件

液相色谱条件：优化了不同的流动相梯度以获得最优的液相色谱条件，优化后的色谱条件如下：色谱柱为BEH C18柱（1.7 μm , 2.1 mm ID \times 100 mm, Waters）；柱温为35 $^{\circ}\text{C}$ ；样品盘温度为4 $^{\circ}\text{C}$ ；流动相为A水和B甲醇，梯度洗脱条件为0-3 min, 3% B；3-30min, 3%-97% B；30-40 min, 97% B；40-60 min, 97%-5% B；60-62 min, 3% B；流速为0.2 mL/min；进样体积为1 μL 。

质谱条件：对于高分辨质谱LTQ Orbitrap质谱仪，电喷雾（ESI）离子源参数设

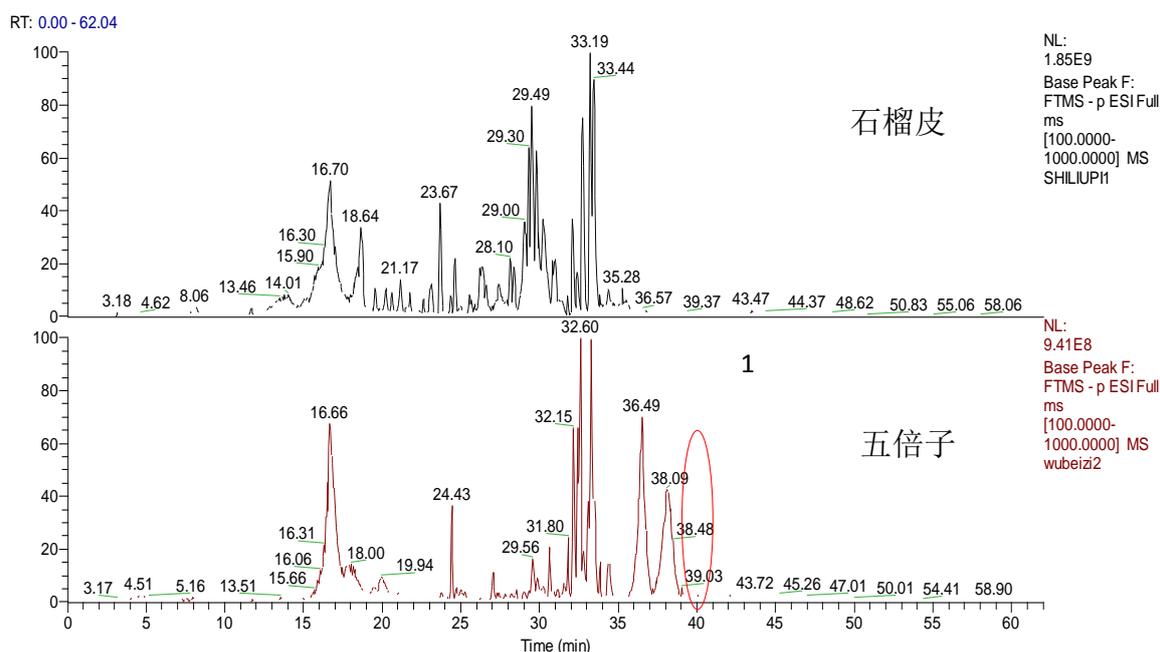
定如下：负离子扫描模式，加热器温度为300 ℃，毛细管温度为350 ℃，毛细管电压为35 V，喷雾电压为-3.5 KV（负离子检测模式），鞘气（N₂）流速为35 arb，辅助气（N₂）流速为10 arb；样品一级质谱在负离子进行全扫描（分辨率R为30000，m/z扫描范围为100-1500 Da），二级质谱采用数据依赖性扫描，数据采集和分析采用Xcalibur，Mass Frontier 7.0软件。

1.3、样品制备方法

样品分别是纯度90%的石榴皮和五倍子提取的鞣花酸原料，各取原料1g，加入10mL的甲醇超声半小时，高速离心取上清液，过0.22μm的聚四氟乙烯针头过滤器上机。

二、实验数据及讨论

在分析过程中，我们首先进行了液相和质谱参数的优化，然后对比了样品在正离子模式和负离子模式下物质的质谱信号响应程度，发现在负离子模式下具有很好的响应信号，因此主要分析了负离子采集模式下的数据。



● 图1、石榴皮提取鞣花酸和五倍子提取鞣花酸在负离子检测模式下的总离子流图

从图1中可以看到，石榴皮提取鞣花酸在t=36min之后没有很明显的特征峰，而五倍子提取鞣花酸在t=38.09min有明显差异性杂质峰化合物1，找到差异性物质后，下面利用质谱解析新思路推导未知化合物的结构。

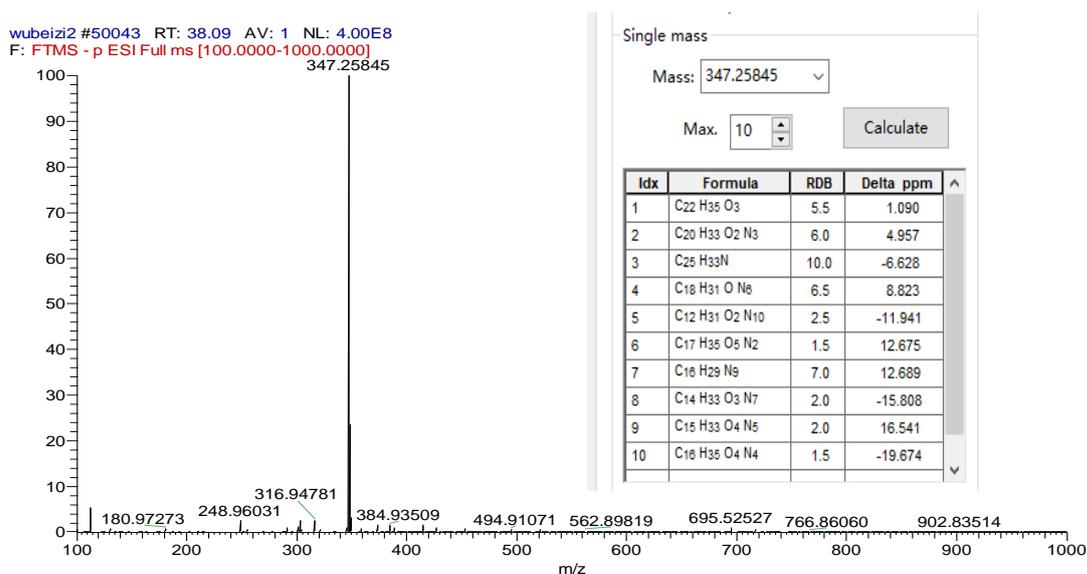


图 2、化合物 1 对应一级质谱图

从图2可以看到化合物1其[M-H]⁻离子m/z为347.25845，根据高分辨数据利用Xcalibur 3.0 软件计算出最可能分子式是C₂₂H₃₅O₃，误差是1.090ppm。

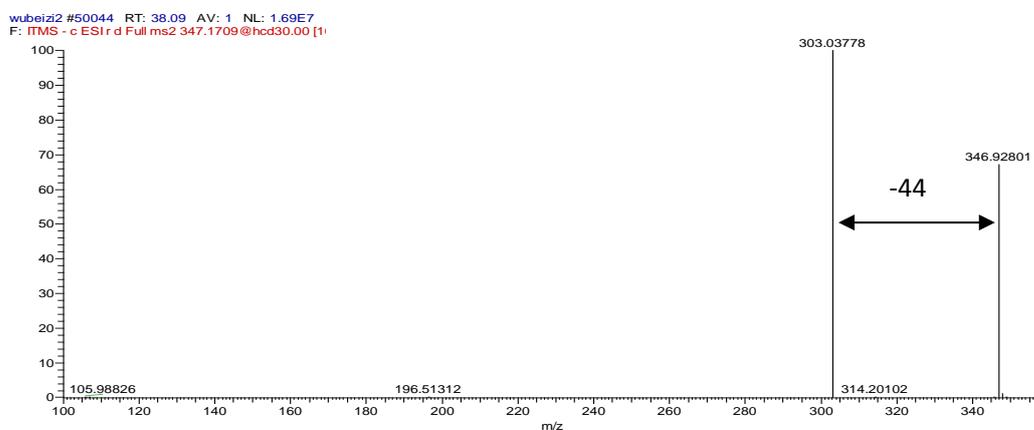
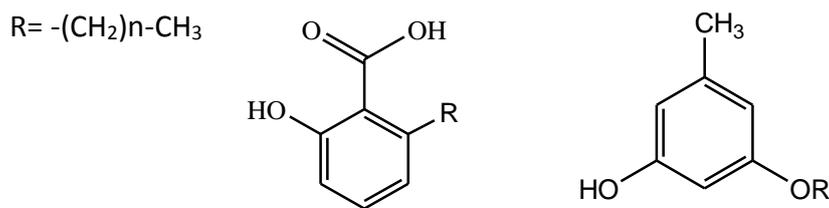


图3、化合物1对应二级质谱图

在二级质谱图中，由一级[M-H]⁻离子m/z为346.92801丢失CO₂得到[M-H-44]⁻得到m/z为303.03778，推测该化合物1结构中可能含有羧基，然后利用ChemSpider网上检索，并结合可能的官能团结构和碎片找到可能的候选化学结构。首先根据化合物1分子组成C₂₂H₃₆O₃，在ChemSpider中检索到了468个可能结构，根据二级碎片推测可能含有羧基官能团，进一步筛选，在468个化合物中筛查含羧基化合物最后剩下12个可能结构，如下表1：

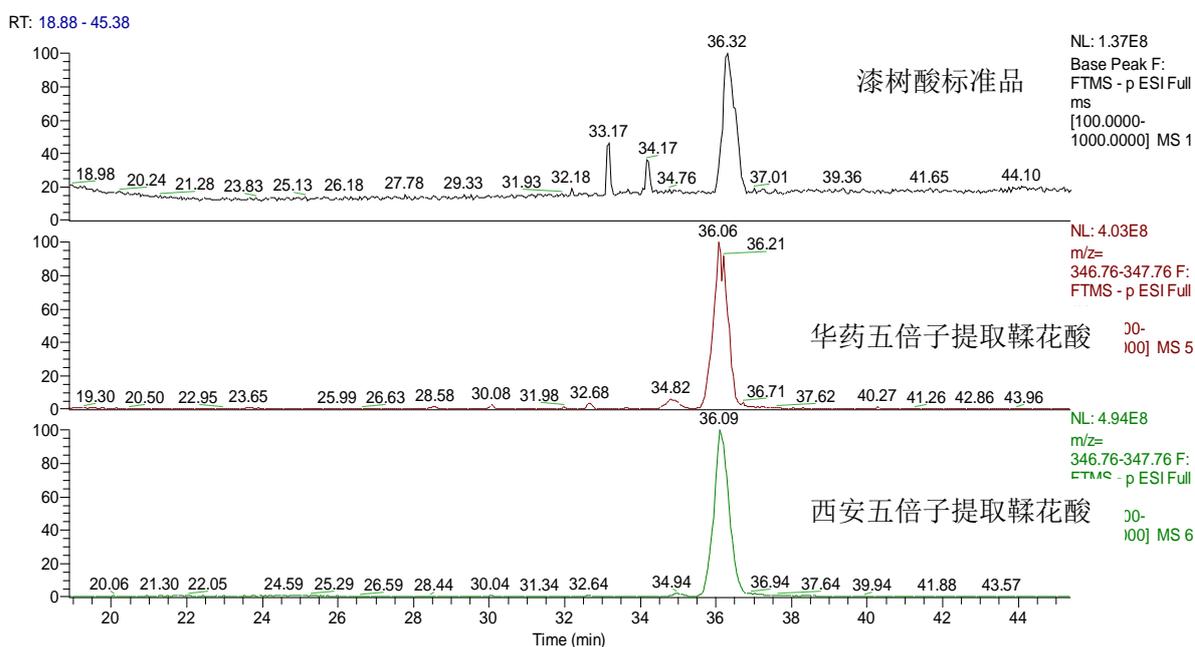
表1 化合物1对应可能的结构

然后查阅五倍子相关文献^[2], 发现漆树科盐肤木作为生产五倍子的寄主植物, 含有酚酸类化合物, 结构如下图4, 表1中第一个化合物跟文献报道的五倍子寄生植物中酚酸类结构一致, 进一步推测未知化合物1的结构最有可能是Anacardic acid (6-十五烷基水杨酸) 漆树酸。



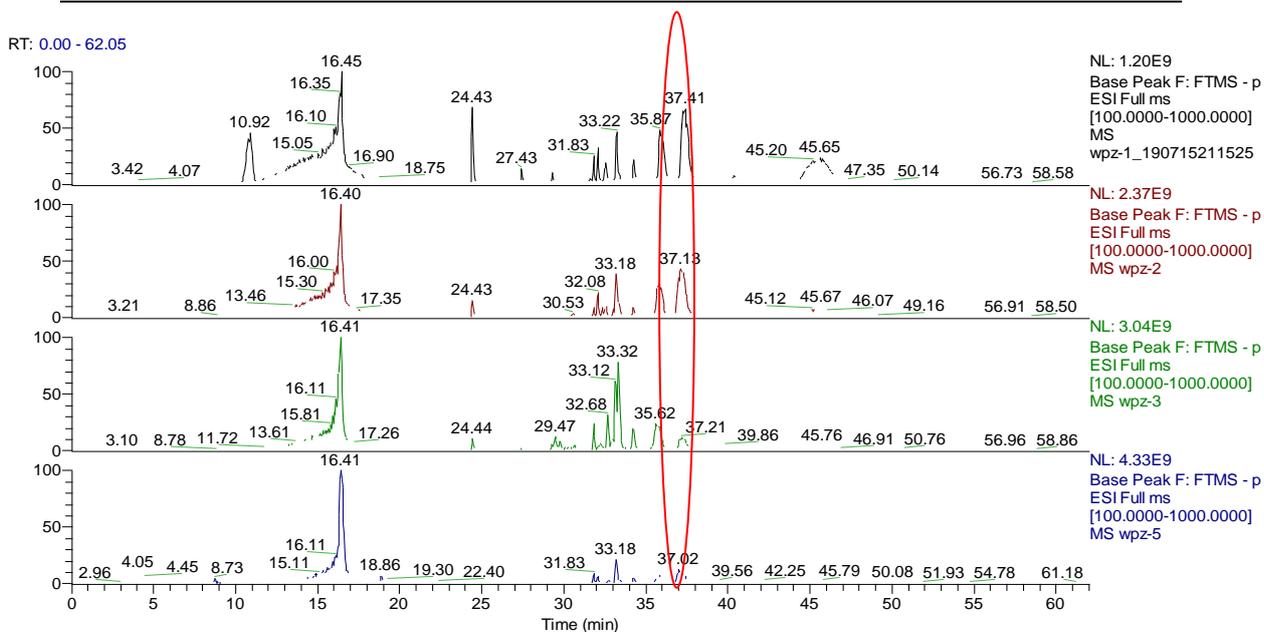
● 图4、盐肤木属植物中报道的酚酸类化合物

然后购买了漆树酸标准品，找到不同厂家西安和华药生产的五倍子提取鞣花酸原料，经过与标准品对比，其结果如图5所示，我们可以看到在 $t = 36 \text{ min}$ 时出峰的物质与标准品漆树酸保留时间一致。



● 图5、漆树酸标准品和五倍子提取鞣花酸中化合物1提取离子流对比图

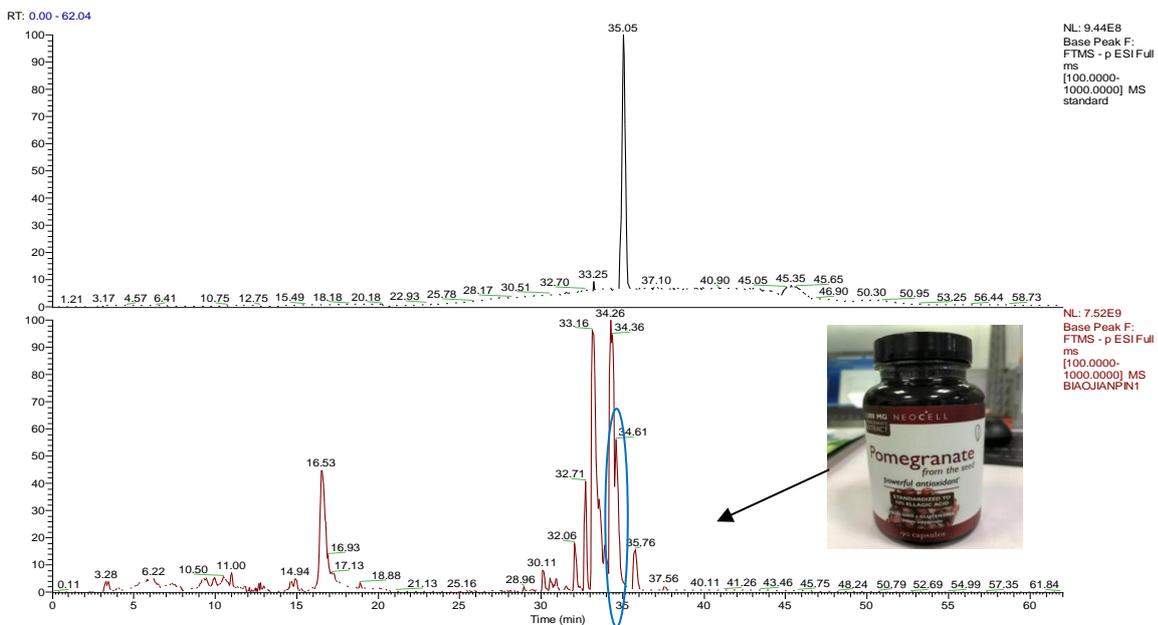
标准品漆树酸 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子 m/z 为347.26099，其二级碎片 $[\text{M}-\text{H}-44]^-$ 离子 m/z 为303.41553，华药五倍子原料中差异性物质 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子 m/z 为347.26096，其二级碎片 $[\text{M}-\text{H}-44]^-$ 离子 m/z 为303.38586，西安五倍子原料中差异性物质 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子 m/z 为347.26099，其二级碎片 $[\text{M}-\text{H}-44]^-$ 离子 m/z 为303.37616，与标准品对比保留时间，一级及二级高分辨质谱数据，完全一致，进一步确认化合物1是漆树酸推导是正确的，所以漆树酸可以作为区别鞣花酸来源是五倍子还是石榴皮的标志物质。



● 图6、不同厂家五倍子提取鞣花酸的总离子流图

购买四个不同厂家的五倍子提取的鞣花酸原料，进一步验证该方法的可行性，都检测到标志性物质漆树酸，方法简单快速。

进一步用保健品验证该方法的可行性，保健品中每个胶囊1000mg，鞣花酸含量百分之七十，取了10个胶囊5.3g，溶于11mL的甲醇中超声30min，然后冷冻干燥，复溶后溶度提高一倍，经计算保健品鞣花酸的浓度是675mg/mL，过0.22μm的聚四氟乙烯针头过滤器上机，LC-MS-MS测试结果如下图7。



● 图7 标准品和保健品总离子流对比图

在 $t=34.61\text{min}$ 检测到了漆树酸，说明该保健品原料中含有五倍子提取的鞣花酸，验证了该方法的可行性。该方法为保健品市场提供了一种新的鉴定手段，能快速鉴定原料的来源。

参考文献

1. 李素琴，袁其朋，徐建梅. 铁花酸的生理功能及工艺开发研究现状. *天然产物研究与开发*, **2001**, 13, 71.
2. 孙美荣，张照. 盐肤木开发利用研究. *昌维师专学报*, **1997**, 16, 31.

石墨烯样品的透射电镜表征方法

► 泰靖 关波

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

1. 背景介绍

石墨烯是由单层碳原子以 sp^2 键连接紧密堆积形成蜂窝状二维晶体结构的新型碳质材料,由于其具有独特的二维结构以及良好的电学、光学、力学等性能,石墨烯在复合材料、传感器、电子器件、能量存储等领域有很大的发展空间,因此受到科研工作者的广泛关注。

石墨烯的制备方法主要包括微机械剥离法,化学气相沉积法、氧化还原法、外延生长法以及电化学还原法等。然而,由于制备方法不够成熟,且不同方法制备的石墨烯都会有所差异,无法满足各个领域对于大尺寸、高质量的石墨烯的需求。因此,对于石墨烯结构和层数的表征是获得高质量石墨烯关键表征手段。

目前针对石墨烯的表征技术主要有:扫描电镜 (SEM)、透射电镜 (TEM)、原子力显微镜 (AFM)、X-射线衍射 (XRD)、拉曼光谱 (RAMAN)、紫外光谱 (UV)、X 射线光电子能谱 (XPS) 等。这些表征手段能够对石墨烯的形貌、片层数量、缺陷等进行表征,从而对石墨烯的实验制备提供一定的理论依据。我们主要介绍透射电镜表征技术,利用石墨烯边缘的高分辨像或者电子衍射来判断石墨烯的层数。

2. 方法介绍

2.1 技术原理

利用透射电镜,可以应用石墨烯片层边缘或褶皱处的高分辨电子显微像 (HRTEM) 估算石墨烯片的层数和尺寸,这种表征技术比较简单快速,但是只能用来估算,无法精确判断出石墨烯的层数。应用选区电子衍射结合电子衍射 (SAED),则可对石墨烯的层数做出准确的判断。通过透射电镜中的电子衍射来判断石墨烯的层数,此种方法是改变入射石墨烯的电子束方向,通过在不同电子束入射角的情况下石墨烯衍射斑点强度的变化规律来判断样品的层数^[1,2]。当改变电子束入射方向时,单层石墨烯的各个衍射斑点的强度基本保持不变,而对于双层以及多层的石墨烯,由于层间干涉效应的存在,电子束入射角的改变会带来

衍射斑点强度的明显变化, 可以用倒易空间模型解释^[1]。当入射电子束方向发生变化时, 其电子衍射斑点强度不发生明显变化, 这是单层石墨烯所特有的性质。因此, 通过改变电子束入射角的方法, 可以非常明确地将单层与多层石墨烯区分开。

上述判断方式中, 对于多层石墨烯的堆垛方式没有区分, 也就是说不管多层石墨烯是 AA、AB 或者 ABC 堆垛的, 均可采用改变电子束入射角的方法来与单层石墨烯区分开。而电子衍射的方法可以更简单。对于单层石墨烯和 AB 堆垛的双层石墨烯, 可以不用改变电子束入射的方向, 只要通过观察电子束垂直入射情况下电子衍射的斑点强度的比值, 就可以将单层石墨烯与双层石墨烯(AB 堆垛)区分开。需要指出的是, 这一方法仅对区别 AB 堆垛的石墨烯与单层石墨烯有效, 而对 AA 堆垛的石墨烯来说, 在电子束垂直入射时, 其电子衍射与单层石墨烯无明显差异, 无法进行区分。

2.2 实验方法

2.2.1 石墨烯材料层数测量—选区电子衍射

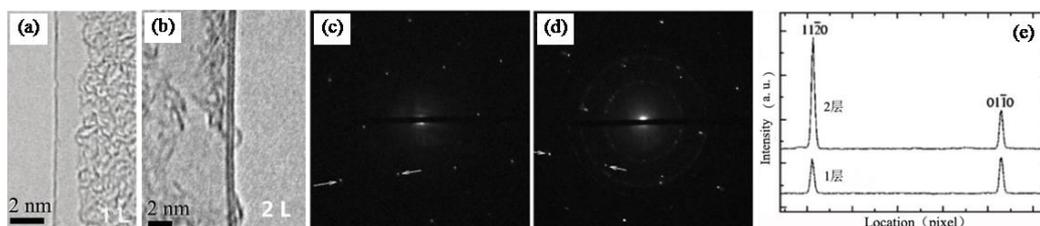
1) 单层石墨烯的判断

采用透射电镜选区电子衍射斑点来判断石墨烯的层数。单层石墨烯的各个衍射斑点的强度基本相同, 当改变电子束入射方向后, 各个衍射斑点的强度基本保持不变。因此, 可通过在不同电子束入射角时石墨烯衍射斑点强度的变化规律来判断石墨烯样品是否是单层。图 1 (a) 和 (c) 分别是石墨烯样品的透射电镜高分辨晶格像和选区电子衍射斑点, 图 1 (e) 下方对应的是图 1 (c) 中两个衍射斑点的强度线, 各个衍射斑点的强度基本相同, 由此可判断石墨烯样品为单层。

2) 双层石墨烯的判断

对于双层石墨烯, 由于层间干涉效应的存在, 改变电子束入射角可能会导致某些衍射斑点强度明显变化。对于 AA 堆垛的双层石墨烯, 当电子束垂直入射时, 各个衍射斑点的强度基本相同, 当电子束入射角为 20° 时, $[0-110]$ 衍射斑点的强度将减弱至少 10 倍。对于 AB 堆垛的双层石墨烯, 当电子束垂直于样品表面入射时, 次内层衍射斑点的强度约为最内层的 2 倍。图 1 (b) 是 AB 堆垛的双层石墨烯的高分辨晶格像, 图 1 (d) 是相应的选区电子衍射斑点, 图 1 (e) 上方对应的是图 1 (d) 中两个衍射斑点的强度线, 次内层衍射斑点的强度约为最内层

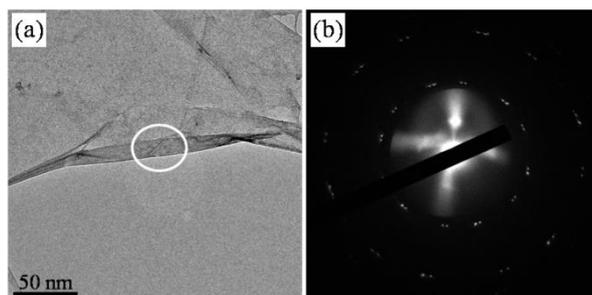
衍射斑点的 2 倍，由此可判断石墨烯样品为双层^[3]。



● 图 1、石墨烯的高分辨像和选区衍射：(a) 单层石墨烯的高分辨像；(b) 双层石墨烯的高分辨像；(c) 单层石墨烯的选区电子衍射；(d) 双层石墨烯的选区电子衍射；(e) 选区电子衍射斑点的强度。

3) 少层石墨烯的判断

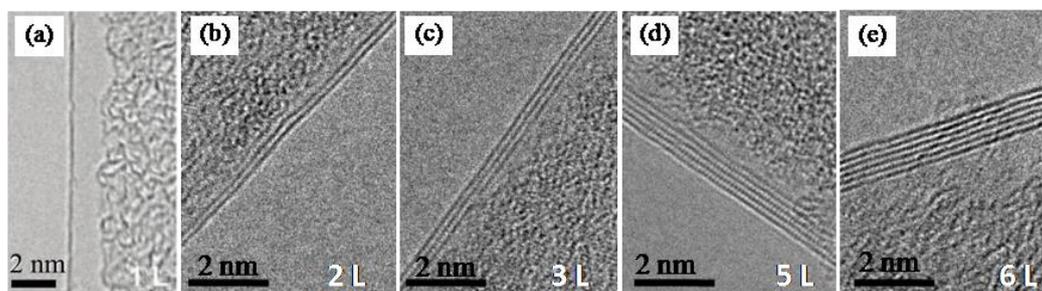
对于 AA 堆垛的少层石墨烯，由于层间干涉效应的存在，改变电子束入射角会导致不同层的衍射斑点旋转分离，多套衍射斑点以一定的角度旋转叠加在一起，计数衍射斑点套数，可确定石墨烯的层数。对于其它堆垛的少层石墨烯，不同层的取向会略有不同，即碳原子六元环的方向不同，形成旋转错位，多套衍射斑点以一定的角度旋转叠加在一起，计数衍射斑点套数，可确定石墨烯的层数 L_s 。图 2 (a) 是石墨烯样品的明场像，图 2 (b) 是图 2 (a) 中白圈区域的选区电子衍射斑点，计数外层衍射斑点数量共计 30 个，而每层石墨烯有 6 个衍射斑点，因此，白圈区域的石墨烯为 5 层。



● 图 2、石墨烯材料的明场像和选区电子衍射：(a) 明场像；(b) 图 (a) 中白圈区域的选区电子衍射。

2.2.2 石墨烯的层数测量—高分辨晶格像

采用透射电镜高分辨晶格像来测量石墨烯的层数^[4,5]。石墨烯边缘的折叠或卷曲，可以很容易获得高分辨晶格像，每一层石墨烯，在高分辨晶格像中对应一条暗线，通过计数边缘区域的暗线数目，可确定石墨烯的层数。图 3 是不同层数

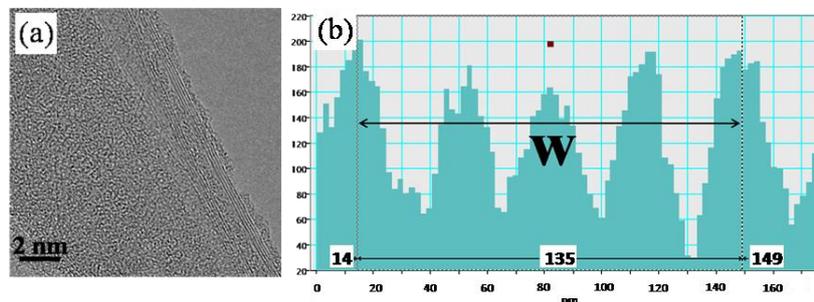


的石墨烯的高分辨晶格像。

● 图 3、石墨烯的透射电镜晶格像：(a) 1 层；(b) 2 层；(c) 3 层；(d) 5 层；(e) 6 层

2.2.3 石墨烯的厚度测量—高分辨晶格像

拍摄石墨烯边缘的高分辨晶格像，获取石墨烯层暗线垂直方向的强度线谱图，测量包含 n 个强度峰的宽度 W ，计算单个强度峰的平均宽度，即得到石墨烯的单层厚度 $d_g = W/n$ 。图 4 (a) 是石墨烯样品的高分辨晶格像，图 4 (b) 是图 4 (a) 中蓝线方框区域石墨烯层暗线垂直方向的强度线谱图，测得 4 个强度峰的总宽度 W 为 1.35 nm，计算出单个强度峰的平均宽度为 0.375 nm，即石墨烯的单层厚度 d_g 为 0.3375 nm。



● 图 4、石墨烯的高分辨像和单层厚度：(a) 高分辨晶格像；(b) 单层厚度测量

3. 结论

随着石墨烯研究进展，对于石墨烯的表征手段也不断丰富。无论是透射电镜还是其他各种表征方法，虽然都可以对石墨烯进行表征，但每种技术都有一定的局限性，在实际科学研究中要根据实际需要选择合适的表征手段或者多种表征手段相结合，才能得到关于石墨烯的相对准确的信息。

参考文献

1. Meyer J C, Geim A K, Katsnelson M I, et al. On the roughness of single and bilayer graphene membranes. *Solid State Comm.*, **2007**, *143*, 101.

2. Meyer J C, Geim A K, Katsnelson M I, et al. The structure of suspended graphene sheets. *Nature*, **2007**, *446*, 60.
3. Ferrari A C, Meyer J C, Scardaci V, et al. Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, *97*, 187401.
4. Reina A, Jia X, Ho J, et al. Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. *Nano Lett.*, **2009**, *9*, 30.
5. Wu Y A, Fan Y, Speller S, et al. Large single crystals of graphene on melted copper using chemical vapor deposition. *ACS Nano*, **2012**, *6*, 5010.

荧光数据的可靠性测定(二)

► 刘美蓉

(分析测试中心光谱组 电话: 62566250 Email: mrlu@iccas.ac.cn)

1. 背景介绍

在荧光光谱仪的测试过程中,有很多影响因素决定了获得数据的可靠性(本文所有数据均出自Edinburgh FLS980 荧光光谱仪)。比如,杂散光、样品架、样品槽、脉冲周期、积分球污染等。本文从稳态光谱、寿命测试、量子产率三个方面探讨可能影响测定结果准确性的因素。

2. 方法介绍

2.1 技术原理:

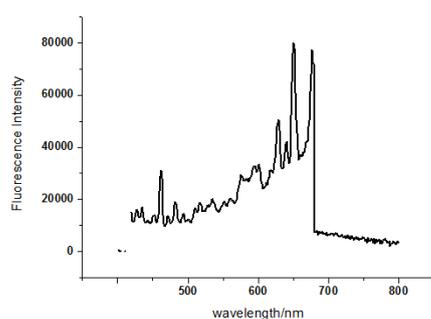
一般固体样品散射光较强,溶液样品散射光较弱,散射光的强度与粒径大小的六次方成正比,粒径越小,散射光越弱。稳态光谱或寿命测试中可以通过添加滤光片或者与KBr研磨压片,来降低杂散光,获得真实的荧光数据。寿命测试中,寿命曲线衰减是否完成直接影响拟合寿命值的准确性;寿命曲线必须衰减完成,才可以得到准确的寿命值。量子产率测定中,样品槽、积分球都会吸收光,造成量子产率测定的不准确性;溶液吸光度不同,会显著影响量子产率测定值;积分球污染会产生不必要的荧光,致使量子产率无法测试。

2.2 实验方法:

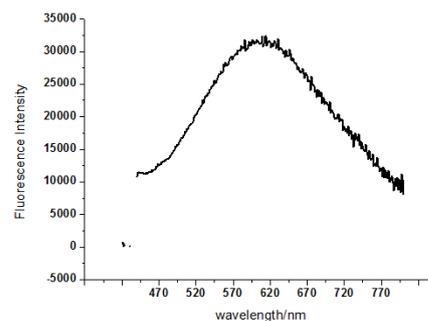
稳态光谱

(1) 杂散光的影响

一般固体样品散射光较强，溶液样品散射光较弱，散射光的强度与粒径大小的六次方成正比，粒径越小，散射光越弱。有的样品散射光非常强，如TiO₂类样品，散射光远远超过荧光信号，对测试带来极大的影响，无法获得真实的数据。因此，测试固体样品或浓溶液样品时，需要在激发处加带通滤光片，发射处加截止滤光片，有必要的话在激发、发射处加两片以上滤光片。



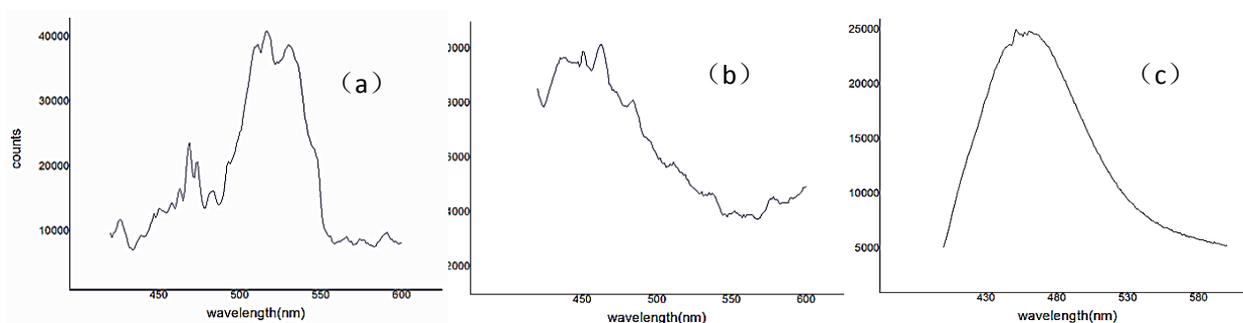
(a)



(b)

● 图1、TiO₂类样品荧光发射光谱 (a) 激发370nm，激发处加370nm(带宽10nm) 滤光片，发射处加400nm长通滤光片。(b) 激发370nm，激发处加370nm(带宽10nm) 滤光片，发射处加400nm和420nm长通滤光片。

TiO₂类样品散射非常强，在370nm激发下做荧光发射光谱时，图1 (a) 激发处加了370nm带通滤光片，发射处加了400nm长通滤光片，做出的谱图依旧完全没法用 (670nm后谱图有显著变化是因为仪器自带的自动长通滤光片670nm在起作用)；发射处又加了420nm的长通滤光片，对杂散光抑制就非常好，得到样品的正常发射光谱，如图1 (b) 显示。



● 图2、某有机样品荧光发射光谱 (激发350nm) (a) 发射处加400nm长通滤光片。(b) 激发处加290nm-380nm带通滤光片,发射处加400nm长通滤光片。(c) 与KBr混合研磨压片, 激发处加290nm-380nm带通滤光片, 发射处加400nm长通滤光片。

某有机样品散射非常强，在350nm激发下做荧光发射光谱，图2（a）发射处加了400nm长通滤光片，图2（b）激发处加290nm-380nm带通滤光片，发射处加400nm长通滤光片。图2（a）显然做出的谱图不对，峰的位置错误，但图2（b）仍有很多杂峰。将样品与KBr混合后研磨压片，如图3所示，然后进行测试，杂散光明显得到抑制，得到满意的谱图。因此，如果样品研磨压片不改变其荧光性质的话，这也是一种有效降低杂散光的方式。



● 图3、某有机样品与KBr研磨压片



● 图4、带通滤光片、截止滤光片和中性衰减片



● 图5、固体样品支架

因此，散射光的降低方法可以通过在激发和发射处加滤光片，或者与KBr研磨压片。一般激发处加带通滤光片，须包括激发光波长，带通越窄越好，发射处加截止滤光片（如图4所示），一般比激发波长大20nm以上，但收集最短发射波长比所加截止滤光片要再多20nm以上，因为国产滤光片的透过率有一个逐渐上升沿，并不是完全直角突变，约20-30nm缓冲区。但这些方法只可有效降低瑞

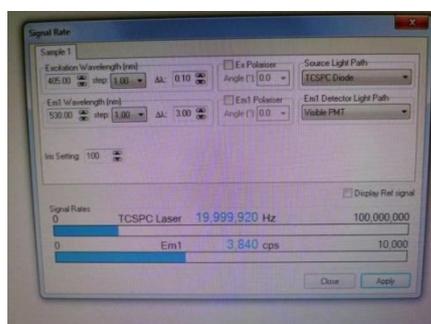
利散射，拉曼散射与激发光波长不同，与荧光相伴出现，不可消除。

另外，也可以通过使用显微激光拉曼光谱仪来减少散射光，因为拉曼仪器使用单色激光作为激发光，激发光带宽很窄，且其edge滤光片可以很好地过滤掉绝大多数激发光，从而有效抑制激发光的瑞利散射。

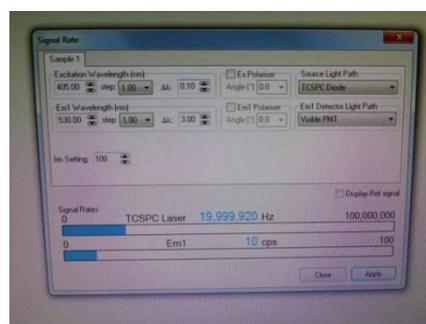
(2) 固体样品支架的影响

在做固体粉末样品、膜类样品及块状样品时，会用到固体样品支架，如图5所示。但固体样品支架有时会被样品污染，产生荧光信号，如图6所示。(a)为未清洁前固体样品支架的荧光信号，405nm激发，530nm发射；(b)为用乙醇清洁后固体样品支架的荧光信号，405nm激发，530nm发射。固体样品支架经乙醇清洁后，荧光信号明显降低。如样品较薄或较少，激发光会穿透样品照射到固体样品架上，对样品的真实荧光信号造成影响，因此固体样品支架的影响一定要考虑。

另外，发射校正文件、激发校正文件都会影响荧光光谱的准确性；在做共聚焦荧光成像时，也会存在荧光假象；盖玻片本身存在荧光等，这些已经在荧光数据的可靠性测定（一）中做了介绍，不再重述。



(a)



(b)

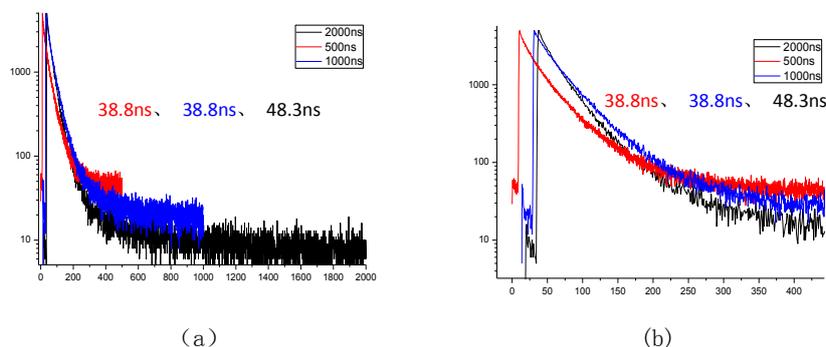
● 图6、固体支架的影响, (a)为未清洁前固体样品支架的荧光信号，405nm激发，530nm发射；(b)为用乙醇清洁后固体样品支架的荧光信号，405nm激发，530nm发射。

荧光（磷光）寿命

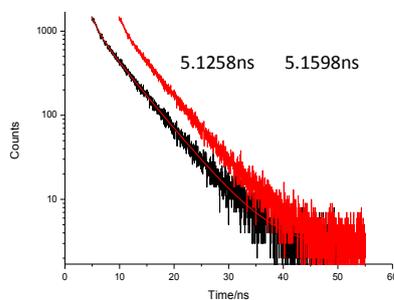
在做荧光寿命和磷光寿命时，同样要考虑杂散光和固体样品支架的影响。寿命测定时，激发波长和发射波长固定。如用脉冲EPL激光作光源，因激光单色性比较好，激发处的带通滤光片是否添加一般对测试影响不大，发射处加截止滤光片，一般比发射波长小20nm以上，比激发波长小20nm以上；当使用脉冲氙灯做光源时，因氙灯是场光源，波长范围很宽，做固体样品时，激发处最好添

加带通滤光片，同样发射处添加截止滤光片。针对寿命测试，还有一些其他影响因素，比如脉冲周期、脉冲触发延迟等。

寿命曲线必须完全衰减结束，才能拟合得到正确的寿命值。图7(a)显示不同脉冲周期500ns、1000ns、2000ns下的寿命曲线，拟合得到的寿命分别为38.8ns、38.8ns和48.3ns。为什么会拟合得到不同的荧光寿命？不同的脉冲周期，脉冲触发延迟不同，如图7(b)所示，是因为不同的脉冲触发延迟引起的吗？为了回答这个问题，对同一个寿命曲线，在x轴上做了平移，也就是保持纵坐标不变，横坐标加一个常数，如图8所示，拟合寿命值没有明显的变化，也就是脉冲触发延迟不会影响拟合寿命值。实际是脉冲周期影响拟合寿命值，对于图7(a)，脉冲周期为500ns和1000ns时，寿命曲线并没有衰减结束，一直在单调下降，这样拟合得到的寿命值不准确，偏小，38.8ns，寿命曲线必须衰减完成才可以拟合得到正确的寿命值。脉冲周期为2000ns时，寿命曲线衰减完成，拟合得到正确的寿命值48.3ns。



● 图7、不同脉冲周期对拟合寿命的影响



● 图8、脉冲延迟时间对拟合寿命的影响

荧光寿命测试时，一般来说峰值处的光子数尽量多些（3000-10000），数

据统计更接近真实情况，寿命拟合更加准确。但一般不超过样品发射光子数，否则光子累积时间过长，激发光对热敏、光敏样品损伤就会很大，不能反映样品真实情况。寿命测试一般不超过30min, 最好在10min内完成。

量子产率

光谱组的FLS980稳态瞬态荧光光谱仪可以做绝对量子产率，按照定义，就是样品发射的光子数除以样品吸收的光子数。相比相对量子产率不需要标准品，但需要有积分球附件，实验室的积分球附件内壁为聚四氟乙烯。相对量子产率用普通荧光光谱仪就可以测试，但只能测试溶液样品，而且需要标准品，标准品的激发、发射波长和折射率要与样品相近。

(1) 样品皿或样品槽的影响

绝对量子产率的测试过程并不复杂，但要得到准确的量子产率值并非易事。对溶液样品来说，先用溶剂做空白，一般溶剂体积为3ml，溶液样品须和溶剂体积相同，且用同样的比色皿。以确保溶液样品扣去空白的吸收，只是所测溶质的吸收。因为样品在积分球内放置，为避免污染积分球，一定要确保比色皿表面清洁（用擦镜纸蘸上无水乙醇擦拭表面，并用洗耳球吹干），比色皿盖子塞紧（比色皿平放，不会漏液）。溶液的量子产率与浓度有很大的关系，一般浓度越低量子产率越高，但要保证荧光发射峰具有可测定性。一般OD

（optical density）值在0.05-0.1之间，因此在做量子产率之前先做紫外可见吸收，确保样品浓度合适。

相比溶液样品，准确测定固体样品量子产率的难度要大。固体样品量子产率测定时，一般用聚四氟乙烯白板作为空白，测试样品时，样品放在固体样品槽中，如图9所示。但实际上，聚四氟乙烯白板、固体样品槽和积分球本身对光都有吸收，尤其是紫外段，因此量子产率测定肯定会有误差。从表1可以看出，对于这四个激发波长，固体样品槽和白板吸收光子数接近，紫外区吸收光子数较大，可见区较小，随激发波长的增加而减少。但以白板作空白，样品置于固体样品槽时，因为会遮挡一部分样品槽的表面，致使其吸收会比白板要少，实验测得样品吸收的光子数比真实情况偏小，测得的量子产率偏大。有时，会直接用固体样品槽作为空白使用，但加入样品后，固体样品槽的吸收会与原来不同，同样测得的量子产率偏大，而且与加入样品的多少会有关系。举例说明：以

白板或固体样品槽作为空白，显示光子数为100万，固体样品槽加上样品后，显示光子数为80万，那么在激发波长下测得的吸收光子数为20万。假定白板或固体样品槽实际吸收光子数为15万，固体样品槽加上样品后实际吸收光子数为10万。如果不放白板或固体样品槽检测器收集的光子数应为115万，减去固体样品槽（加样品）的吸收10万，再减去显示的光子数80万，实际样品吸收的光子数为25万。因此，测得的量子产率比样品真实的量子产率理论上要偏大，但具体偏大多少与激发光波长、样品量多少、样品吸收及样品量子产率相关。为了避免白板或固体样品槽对测定结果的影响，我们加工了一种石英样品槽，如图10所示。从表1可以看出，石英样品槽在这几个波长下对光几乎没有吸收，也就是加不加石英样品槽对量子产率测定结果理论上是没有显著影响的，因此使用石英样品槽测定结果更接近真实情况。当然，石英样品槽在使用前和使用后都须用无水乙醇擦拭干净。放上样品后，尤其是粉状固体时（样品表面须加石英盖片），确保将石英样品槽和石英盖片的表面、周围用无水乙醇擦拭干净，以防粉末落到积分球内污染积分球。



● 图9、固体样品槽（左）和聚四氟乙烯白板（右）

● 图10、石英样品槽

（2）积分球的清洁

积分球在使用前后都要用高压气体吹扫，去除可能的灰尘或污染物。但有些污染物用高压氮气吹扫并不能完全除去。如果做空白实验，明显有荧光发射峰，那说明积分球已被污染，无法在相应激发波长下进行实验。将积分球拆卸后，仅剩聚四氟乙烯内胆，如图11所示，采用各种溶剂（ H_2O 、乙醇、二氯甲烷、 H_2O_2 、 HNO_3/HCl ）对积分球进行浸泡、超声清洁，有明显的效果，如图12所示。但无法完全去除污染，360nm以下的空白激发，依旧有荧光发射。因此，要尽可能避免

积分球污染，样品皿或石英样品槽表面确保干净，不泄露样品。冬天静电较强，用除静电风机对样品皿、样品槽和积分球去除静电后再操作，可以降低对固体粉末状样品的吸附。

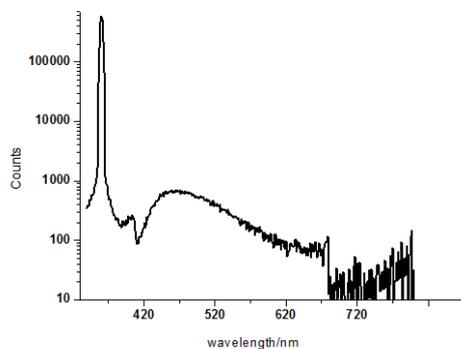
表1、样品槽和白板对光子损失的分析

* 指积分球内没加固体样品槽、白板或石英样品槽

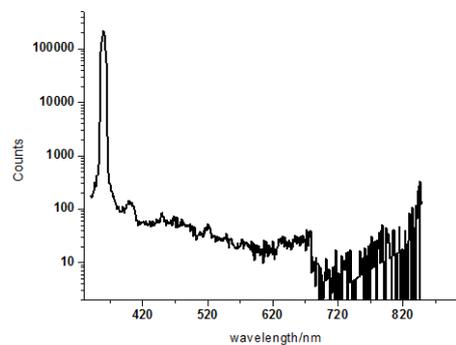
Ex波长 (nm)	Em波长 (nm)	Ex带宽 (nm)	Em带宽 (nm)	NO*(万 光子)	固体样品槽(万光 子)/光子损失百 分率	白板(万光子)/ 光子损失百分率	石英样品槽 (万光子)/ 光子损失百分 率
360	360	4.0	0.42	94	75 20.2%	75 20.2%	94 0
380	380	3.5	0.34	96	81 15.6%	79 17.7%	95 1.0%
400	400	3.0	0.28	95	83 12.6%	82 13.7%	94 1.1%
420	420	2.8	0.27	98	92 6.12%	92 6.12%	97 1.0%



图11、积分球聚四氟乙烯内胆的拆卸



(a) 清洁前，360nm激发



(b) 清洁后，360nm激发

图12、积分球清洁前后空白的荧光谱图

3 结论

在做稳态光谱和寿命测试时，建议激发处加带通滤光片，纯化激发光，发射处加截止滤光片降低杂散光；寿命测试时，一定确保脉冲周期可以使得寿命曲线衰减完成，以拟合得到正确的寿命值；量子产率测定时，一定要确保样品不泄露，避免污染积分球，溶液OD值要在0.05-0.1之间，固体样品测定时，必须注意样品槽的影响。

利用全氟辛酸缩小样品结晶斑点提高 MALDI MS 检测灵敏度

► 刘健安 李书沐

(分析测试中心质谱组 Tel: 010-62554495 Email: lja@iccas.ac.cn)

一、背景介绍

基质辅助激光解吸离子化质谱 (MALDI MS) 具有高通量、快速，样品处理简单等优点，尤其软电离方式可以很好地保证分子的完整性，使其在小分子化合物的结构鉴定与分析中表现出很大的优势和潜力。针对一些结构比较脆弱的大分子，传统电离方式的电离很容易造成其结构和成分被破坏，但使用 MALDI 离子化技术却可以实现很好的软电离，避免了分析物在离子化过程中容易产生碎片的缺点，保护了目标物分子的完整性。因此，MALDI 技术被广泛应用于蛋白质、核酸、聚合物、合成反应检测与结构分析，已成为研究分子合成、跟踪监测、指导有机合成反应的重要工具。

MALDI 质谱指导有机合成反应，主要是应用 MALDI 质谱对粗反应物检测并找寻目标化合物，再经过对改良合成条件或者提纯后的反应物进行的 MALDI 检测，观察目标物信号的变化，指导修改合成条件及提纯方法，最终实现目标物的合成。在这一过程中粗反应中低浓度目标化合物的检出是最为重要的，因此需要对提高 MALDI 检测灵敏度进行研究。

目前提高 MALDI 检测灵敏度的主要方法有样品富集、样品衍生、加入离子化试剂、靶面疏水处理，但受限于操作繁琐、普适性差、溶剂选择性差等诸多因素不适用于提高粗反应物中目标化合物的检测灵敏度的提高。故此研究了通过在

样品溶剂中加入全氟辛酸增大溶液表面张力促使样品结晶斑点缩小提高 MALDI 检测灵敏的新方法。

二、方法介绍

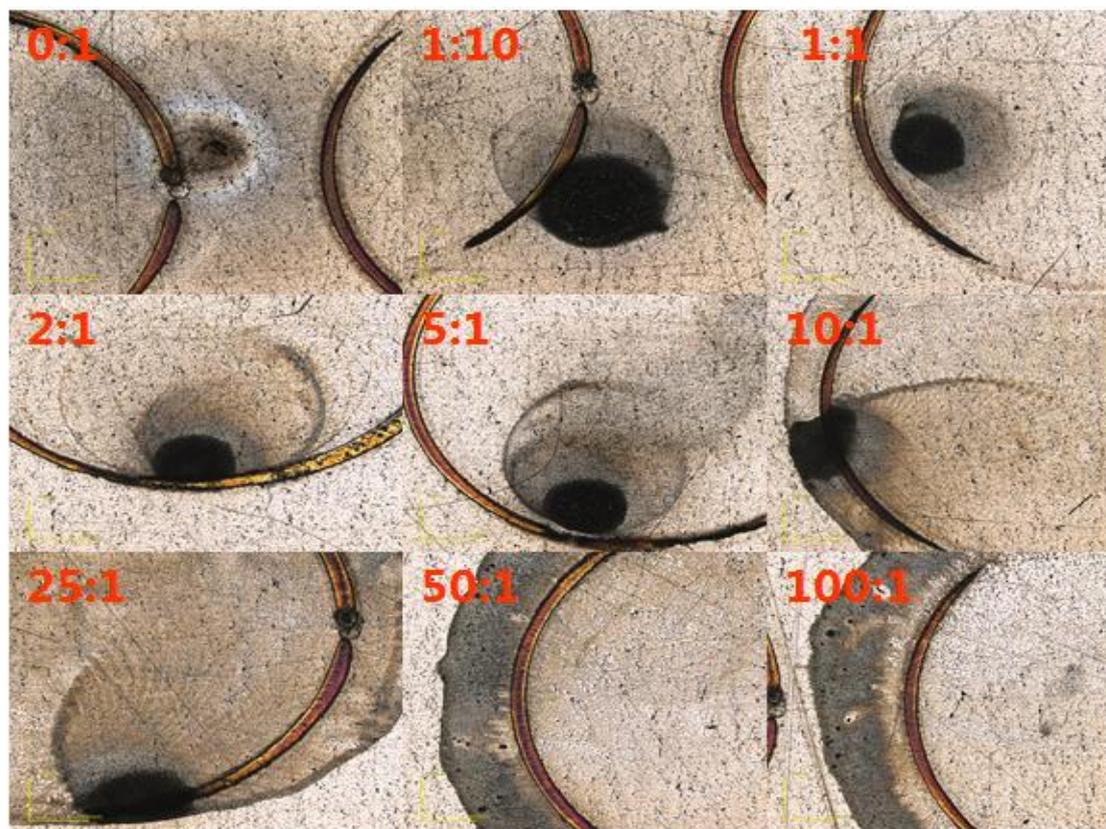
2.1 技术原理

液体分子之间的内聚力使得液体表面上存在着一种应力，即液体的表面张力。它存在于极薄的液体表面层内，是沿着表面趋于收缩的应力，而液体表面张力系数是表征液体这一性质的常数。单位长度液膜上的表面张力的大小为液体的表面张力系数，它受掺入不同的杂质可以升高液体的表面张力系数，研究希望利用全氟辛酸增大溶液表面张力系数促使样品结晶斑点缩小提高 MALDI 检测灵敏度。

2.2 基质与全氟辛酸比例

MALDI 技术涉及到分析物和基质在激光下的解吸和离子化过程。基质是 MALDI 质谱中必不可少的。MALDI 标准的样品准备方法是将一定体积的样品或基质溶液混合，随后沉积在样品载体或 MALDI 靶板上并结晶。样品和基质溶液的组成直接影响着分析结果的质量，故此我们首先对基质与全氟辛酸比例进行了优化实验。

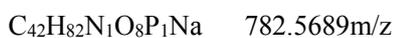
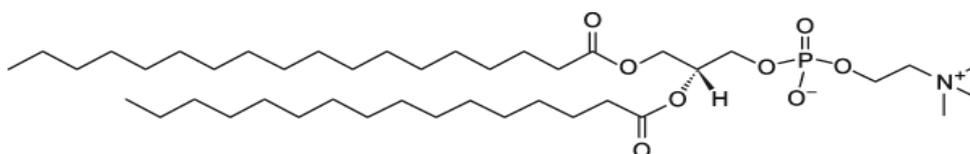
配制 2, 5-二羟基苯甲酸(DHB)基质溶液和全氟辛酸(PFOA)溶液(1 mg/mL, 溶剂为四氢呋喃)。分别以 0: 1, 1: 10, 1: 1, 2: 1, 5: 1, 10: 1, 25: 1, 50: 1, 100: 1 体积比混合后分别取 1 μ L 混合溶液滴加于 MALDI 靶面。如图所示，当 DHB 与 PFOA 的体积比为 1: 1 时溶液回缩效果最佳，结晶斑点最小，当 DHB 与 PFOA 的体积比大于 10: 1 时溶液回缩效果逐渐消失。故此在下面的实验中选用 DHB 与 PFOA 的体积比为 1: 1。



● 图 1、DHB 与 PFOA 不同比例的 MALDI 靶面结晶图(显微镜放大 5 倍)

2.3 对合成磷脂样品灵敏度测定

配制 DHB/PFOA 两种溶液(1mg/mL, 溶剂为四氢呋喃)混合基质和 DHB 基质溶液(1mg/mL, 溶剂为四氢呋喃)。与待测样品,如图 2(磷脂类化合物 1×10^{-8} mol/L, 磷脂类化合物 1×10^{-9} mol/L)等体积混合后分别取样点于不锈钢靶, 常温常压下洁净后进行测试。



● 图 2、磷脂分子的结构示意图

如图 3 所示应用 DHB/PFOA 混合基质测定 1×10^{-8} mol/L 磷脂类化合物的信号强度与单纯 DHB 为基质测定 1×10^{-8} mol/L 磷脂类化合物信号强度提高约 20 倍。应用单纯 DHB 为基质未检测 1×10^{-9} mol/L 磷脂类化合物的信号, 应用 DHB/PFOA 混合基质测定 1×10^{-9} mol/L 磷脂类化合物时得到了信噪比较好的信号。故此应用 DHB/PFOA 混合基质测定磷脂化合物时使 MALDI 的检测灵敏度

提高了一个数量级。

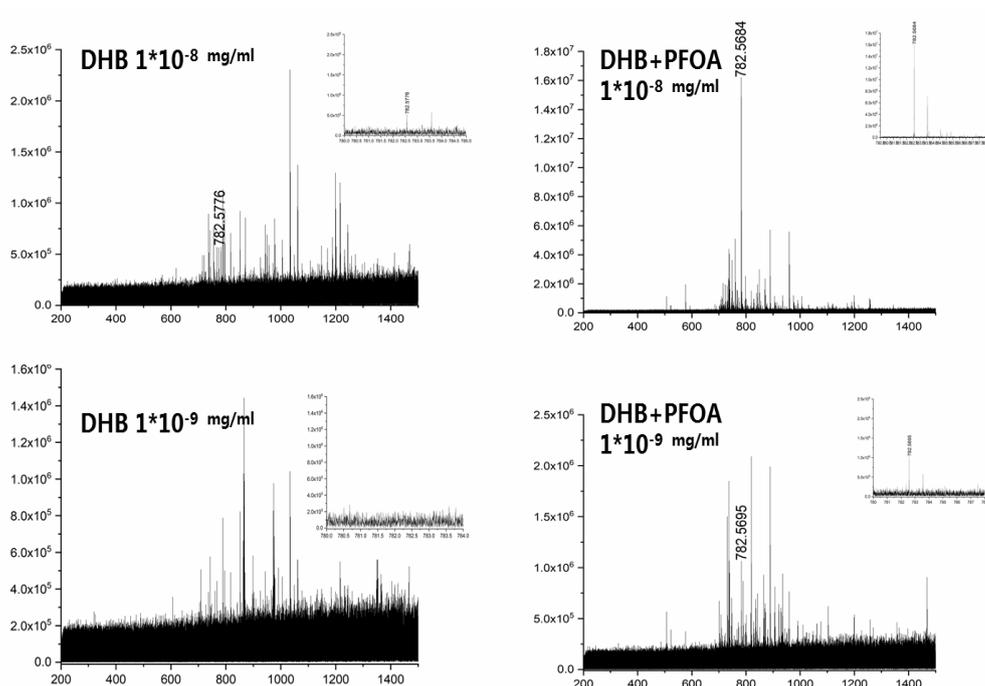


图 3、DHB 基质与混合基质测定不同浓度磷脂分子质谱图

三、 结论

我们设计了一种利用全氟辛酸提高溶剂表面张力，从而促使样品及基质混合溶液在 MALDI 靶面结晶过程中不断回缩，最终得到更小的结晶斑点提高结晶的单位面积的样品浓度，进一步提高 MALDI 检测灵敏度的方法。此种方法操作简单，通用性强，可广泛应用在有机合成中微量化合物的检测中。

参考文献

1. Agtap R N, Ambre A H. Overview literature on matrix assisted laser desorption ionization mass spectroscopy (MALDI MS): basics and its applications in characterizing polymeric materials. *Bull. Mater. Sci.* **2005**, 28, 515.
2. Limbach P A. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: An overview. *Spectroscopy* **1998**, 13, 16.

核磁弛豫及其应用

► 李 骞 向俊锋

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

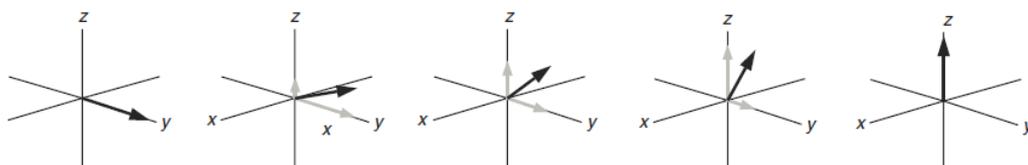
1、背景介绍

核磁共振技术广泛应用于化学学科各个领域，它至少提供了6个方面的信息：原子核、化学位移、偶合常数、空间关系、化学交换和弛豫等，通过这些信息，我们可以了解所研究对象的结构和性质。目前，绝大部分研究人员对结构解析所需前四种信息非常熟悉，应用也较多，而后两个信息被大家关注较少。实际上，核磁共振所获取的每个信息都非常有用，特别是后面两个信息，在某些特定的情况下有其独到的用途。这里，我们介绍其中的一个——弛豫以及它的应用，希望它能够各位研究者的创新科研工作提供一个新的工具。

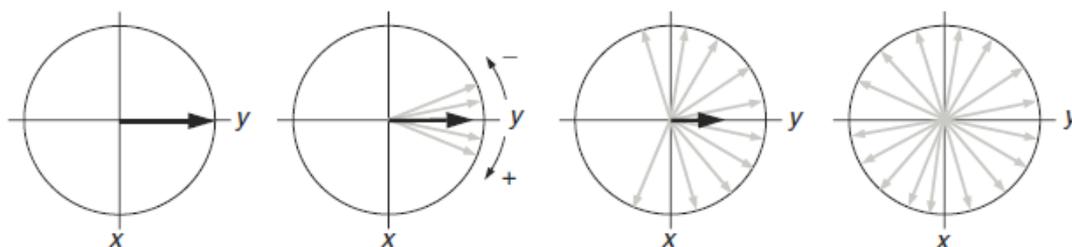
2、方法介绍

2.1 技术原理

在没有施加脉冲前核磁中的原子核处于平衡态(也称初始态)，其磁场强度与静磁场平行。在垂直于静磁场的方向施加一段时间的射频脉冲后移除脉冲，原子核要恢复到其原始的平衡态，这个过程被称作“弛豫”。在核磁共振中，弛豫过程分为两类：（1）原子核由偏离磁场方向返回到与磁场方向平行的状态即平衡态的过程，它被叫做自旋-晶格弛豫或纵向弛豫，简称为 T_1 弛豫。它是靠原子核自旋与晶格(环境)进行能量交换，结果原子核自旋体系本身的能量降低，其磁化强度变化如下图所示：



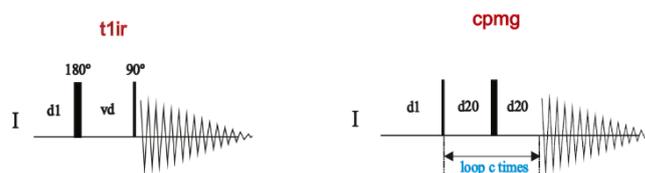
（2）原子核磁化强度由偏离与磁场垂直的平面返还到平衡态时没有横向磁化强度矢量的过程叫做自旋-自旋弛豫或横向弛豫，简称为 T_2 弛豫。它由自旋系统内部交换能量引起的， T_2 弛豫的结果是自旋系统能量不变。其磁化强度变化如下图所示：



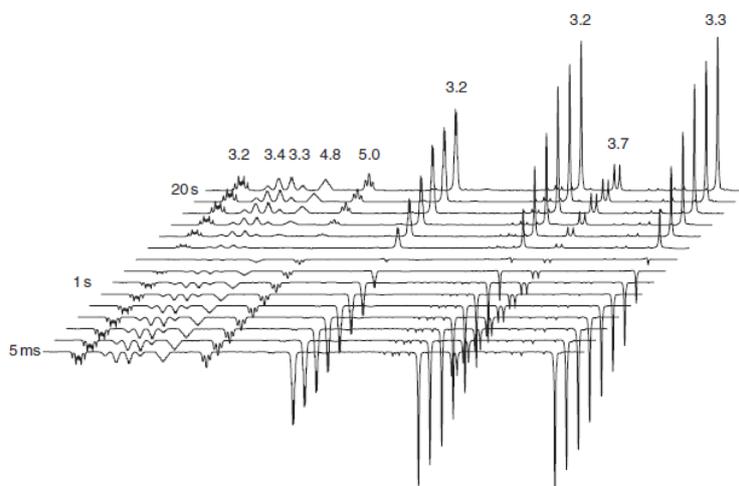
90度脉冲激发后，上述两种弛豫一般按照指数进行衰减。另外弛豫运动的快慢与分子的运动特性有关。分子运动越快，自旋-自旋弛豫(T_2 弛豫)越慢。但是自旋-晶格弛豫(T_1 弛豫)涉及自旋与周围环境的能量交换，只有当周围环境与原子核的自旋能量相当时，其 T_1 弛豫最快，而能量差异大则 T_1 弛豫慢。借助这种 T_1 和 T_2 弛豫对环境的依赖性，我们可以借助弛豫这类探针，探索分子周围的化学环境变化，从而为了解探针分子周围的性质变化提供方法支撑。

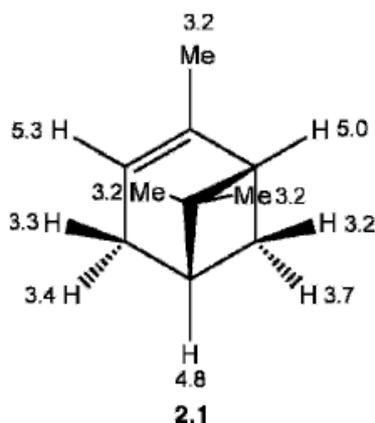
2.1 实验方法

目前，针对这两种弛豫都有对应的方法来进行测量，如测量 T_1 弛豫时间一般是反转恢复法，而 T_2 则用自旋-回波法，其对应的脉冲序列如下所示

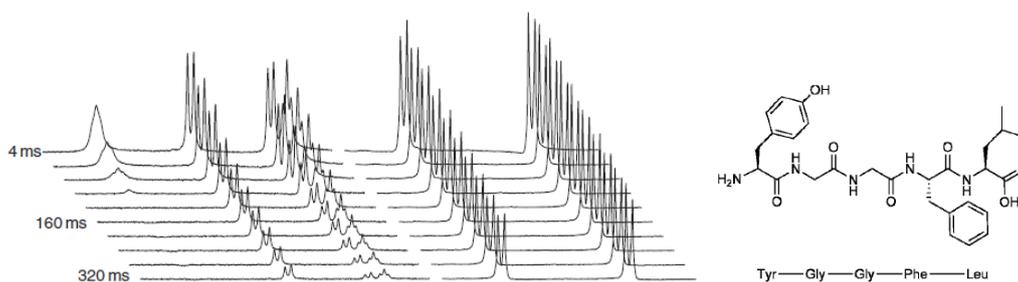


其中t1r和cpmg分别布鲁克公司软件中代表测量 T_1 和 T_2 脉冲序列名称。通过这些脉冲序列，我们能够测量得到对应原子核的弛豫谱，下面给出在上述两种脉冲序列测量出的典型弛豫谱以及相关的弛豫时间。



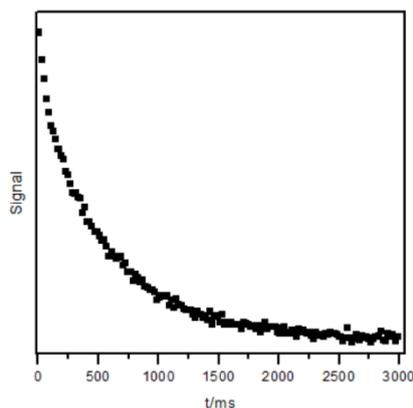


● 图 1、化合物2.1分子结构以及利用反转恢复办法测量得到的弛豫谱以及计算出的 T_1 值。



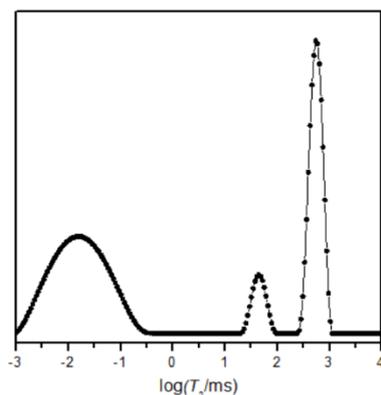
● 图 2、如右侧分子结构的化合物利用自旋回波法测量得到的弛豫谱

在实际工作中，由于 T_1 数值与磁场均匀性有关，而 T_2 与磁场均匀性无关，所以在更多的时候大家更倾向于测量 T_2 。为了简化讨论，更多人愿意采集指数衰减的核磁弛豫信号，如下图所示



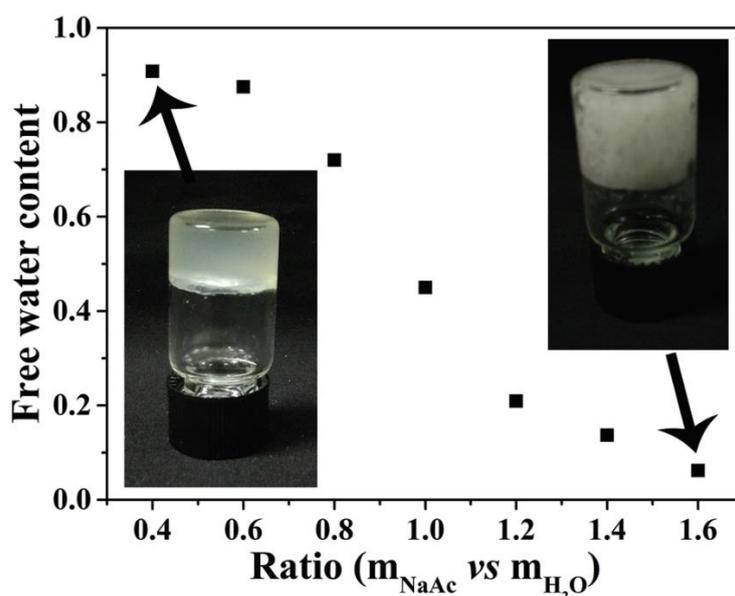
● 图 3、典型的核磁共振横向弛豫衰减信号

此类信号有两种数据处理方法：直接指数拟合和反转拉普拉斯变换处理。前者，一般得到不同时间的弛豫数值；而后者除了前面得到的信号外，还能得到弛豫时间的分布以及各个弛豫时间在整体弛豫中所占的组分，如下图所示：



● 图 4、根据图3衰减信号经过反转拉普拉斯变换计算出的弛豫谱

弛豫时间测定可以用于表征一系列材料的物理化学性质。例如，同济大学化学科学与工程学院王启刚教授课题组利用低场核磁弛豫时间测定技术，基于可溶盐（如醋酸钠等）过饱和析晶的原理在普通的水凝胶基础上开发了一种全新的“结晶型聚合物凝胶电解质”，并研究了其在超级电容器中的性能（如下图）^[1]。



● 图 5、不同可溶性盐比例条件下，利用低场核磁弛豫时间测定技术，表征凝胶体系中自由水含量。

华东理工大学曹学君教授利用低场核磁技术，精确表征了聚合物PADB与 β -葡聚糖之间的相互作用。其研究表明：聚合物PADB与 β -葡聚糖的相互作用大于聚合物PMDM与 β -葡聚糖的相互作用（如下图）^[2]。

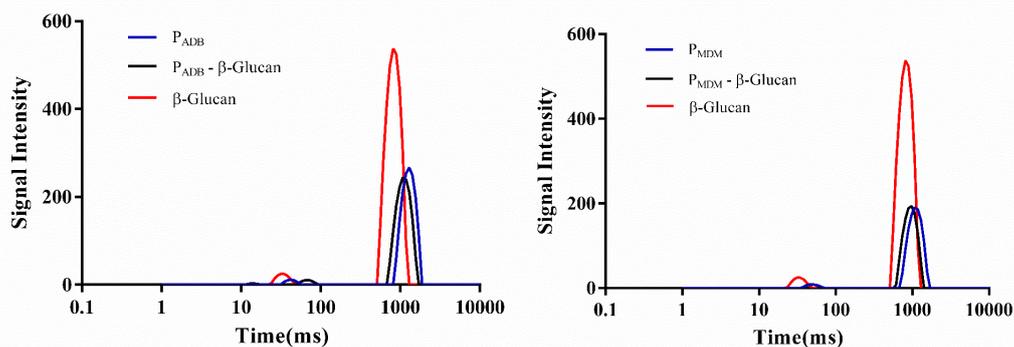


图 6、 β -葡聚糖与聚合物ADB、MDM的 T_2 弛豫时间分布谱图。横轴为质子信号弛豫时间，纵轴为质子信号强度。

上述方法同样在化学所科研工作中得到了广泛的应用。如刘瑞刚课题组利用核磁共振弛豫谱发现并研究了DMSO在离子液体溶解纤维素中的双重效应，为深入了解溶解机制提供了数据支持（如下图）[3]：

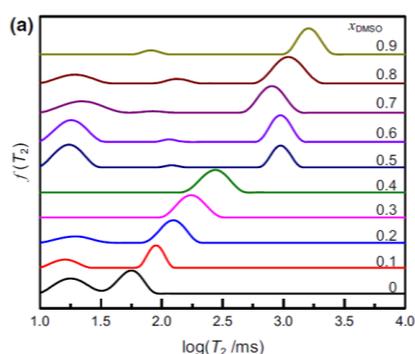


图 7、离子液体与DMSO不同比例混合下的 T_2 弛豫谱

王健君课题组则利用核磁研究了变温下界面水在不同体系中的运动状态，为理解界面水的结冰机制提供了数据支撑（如下图）[4]。

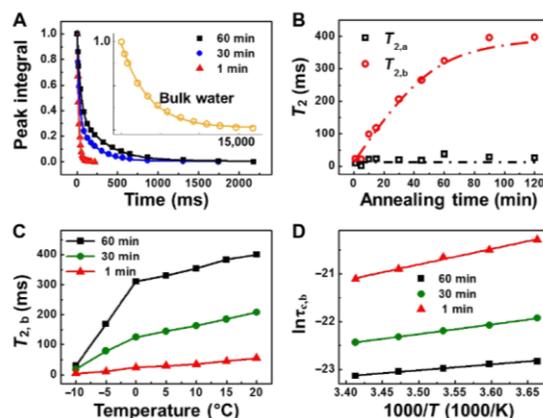


图 8、界面水分子在不同体系中的迁移率

赵宁课题组利用质子弛豫谱对他们发现的超拉伸高分子体系进行了研究，其结果很好符合其提出的机制（如下图）[5]。

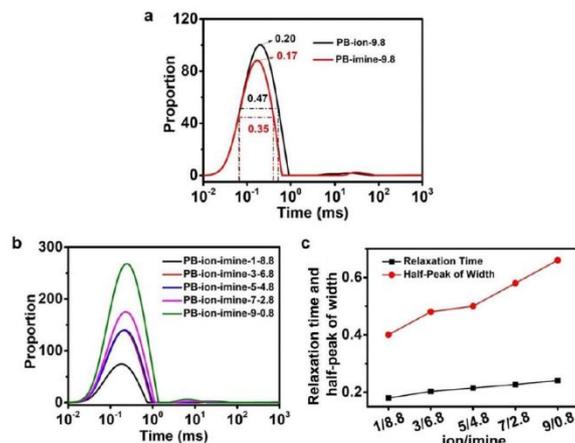


图 9、不同PB网络中的质子弛豫谱结果

同样的，核磁弛豫谱也可以应用于水凝胶体系的研究，借助这种方法，科研人员能够区分束缚水和自由水[6]。

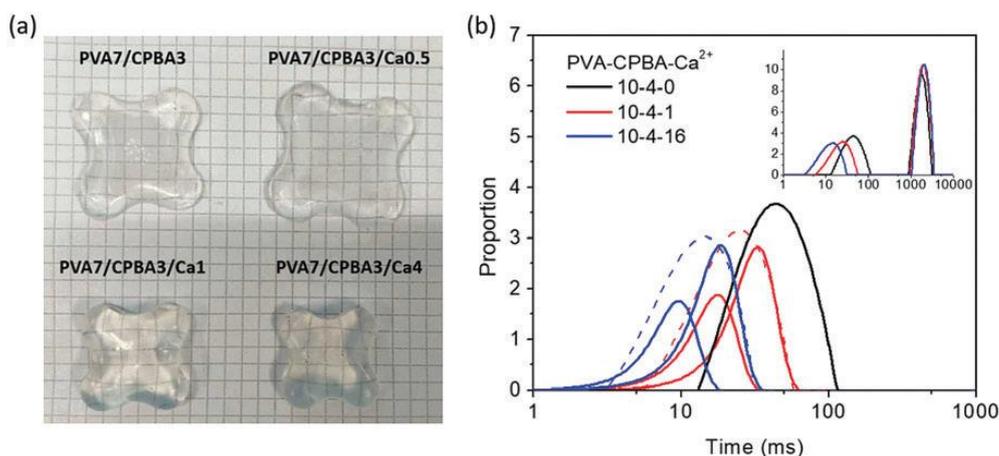


图 10、PVA/CPBA/Ca水凝胶的图像以及它们对应的核磁弛豫谱得到的水质子分布

3、结论

核磁弛豫技术利用弛豫探针对环境的敏感性，能够区分弛豫探针不同的微环境，从而为其应用于表界面的研究提供了广泛的理论支撑。目前化学所核磁实验室配备的高场核磁和低场核磁都具备这种功能，希望能够为所内的科学家提供更好的支持。

参考文献

1. Wei, J., G. Wei, Y. Shang, J. Zhou, C. Wu, and Q. Wang, Dissolution-Crystallization Transition within a Polymer Hydrogel for a Processable Ultratough Electrolyte. *Adv.*

Mater., **2019**. *31*, e1900248.

2. Hou, H. and X. Cao, pH recycling aqueous two-phase systems applied in extraction of Maitake beta-Glucan and mechanism analysis using low-field nuclear magnetic resonance. *J. Chromatogr. A*, **2015**. *1405*, 40.

3. Zhang, C., H.L. Kang, P.P. Li, Z.J. Liu, Y.J. Zhang, R.G. Liu, J.F. Xiang, and Y. Huang, Dual effects of dimethylsulfoxide on cellulose solvating ability of 1-allyl-3-methylimidazolium chloride. *Cellulose*, **2016**. *23*, 1165.

4. He, Z., W.J. Xie, Z. Liu, G. Liu, Z. Wang, Y.Q. Gao, and J. Wang, Tuning ice nucleation with counterions on polyelectrolyte brush surfaces. *Sci. Adv.*, **2016**. *2*, e1600345.

5. Zhang, H., Y. Wu, J. Yang, D. Wang, P. Yu, C.T. Lai, A.C. Shi, J. Wang, S. Cui, J. Xiang, N. Zhao, and J. Xu, Superstretchable Dynamic Polymer Networks. *Adv. Mater.*, **2019**. *31*, e1904029.

6. Zhao, Y.R., M.N. Li, B.C. Liu, J.F. Xiang, Z.Y. Cui, X.Z. Qu, D. Qiu, Y. Tian, and Z.Z. Yang, Ultra-tough injectable cytocompatible hydrogel for 3D cell culture and cartilage repair. *J. Mater. Chem. B*, **2018**. *6*, 1351.

FT-ICR-ESI 金属配合物方法学探索

► 韩娟娟

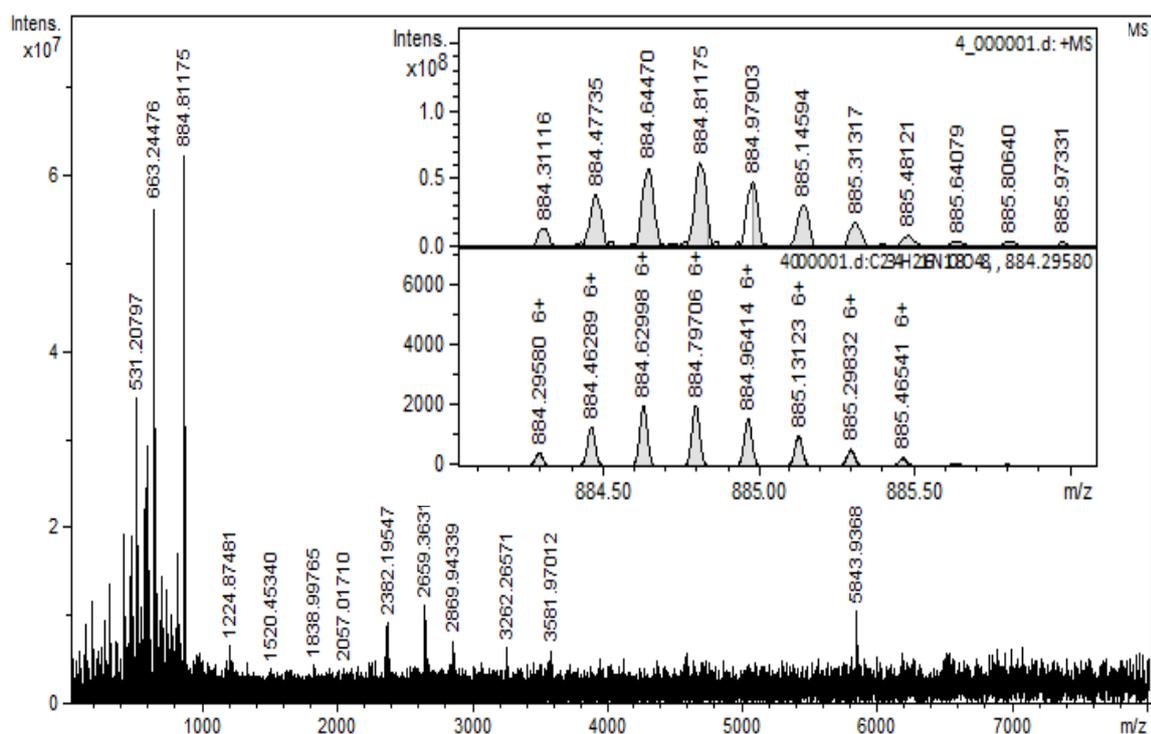
(分析测试中心质谱组 Tel: 010-62554495 Email: hjuan@iccas.ac.cn)

9.4T FT-ICR MS 是一台超高分辨率质谱仪，充分利用 ESI-FT-ICR MS 的优势，解决并拓展应用其它分析测试手段无法确定结构的样品。譬如，一些小分子热不稳定化合物的高分辨检测，利用 ESI-FT-ICR MS 可以得到误差小于 1 ppm 的精确分子质量；一些较大分子可以形成多电荷的 DNA、金属配合物等，均可以得到理想的谱图；不能通过传统液相手段有效分离的复杂混合物，利用 ESI-FT-ICR MS 的超高分辨率，有可能在较短时间内确定混合物中多个未知物的结构信息，缩短分析时间，譬如石油、食品和饮料、天然产物、环境及其他包含了成千上万生物小分子的样品；同时，也为化学所有有机合成课题组合成的复杂混合物提

供了新的分析途径。

配位化合物一般指由过渡金属的原子或离子（价电子层的部分d轨道和s、p轨道是空轨道）与含有孤对电子的分子（如CO、NH₃、H₂O）或离子（如Cl⁻、CN⁻、NO²⁻等）通过配位键结合形成的化合物。配合物是化合物中较大的一个子类别，广泛应用于日常生活、工业生产及生命科学中，近些年来的发展尤其迅速。它不仅与无机化合物、有机金属化合物相关联，并且与现今化学前沿的原子簇化学、配位催化及分子生物学都有很大的重叠。这类样品的测试难点是分子量比较大，且溶解性不好，我们采用加入某些助溶剂的方法对样品进行前处理，分别尝试加入苯甲酸、苯甲醇、甲苯并优化实验条件，发现加入30%苯甲醇效果最好，再通过优化质谱参数，得到了分子离子峰。

一、以葫芦脲为受体的超分子复合物：是当今化学研究的一个热门领域，其中以主体（受体）对客体（底物）的分子识别和组装是超分子化学的核心研究内容。葫芦脲是一类拥有内腔的大环穴状配体，其疏水内腔和由极性羰基基团形成的端口，通过氢键作用来键合金属离子或有机分子的带电部分。



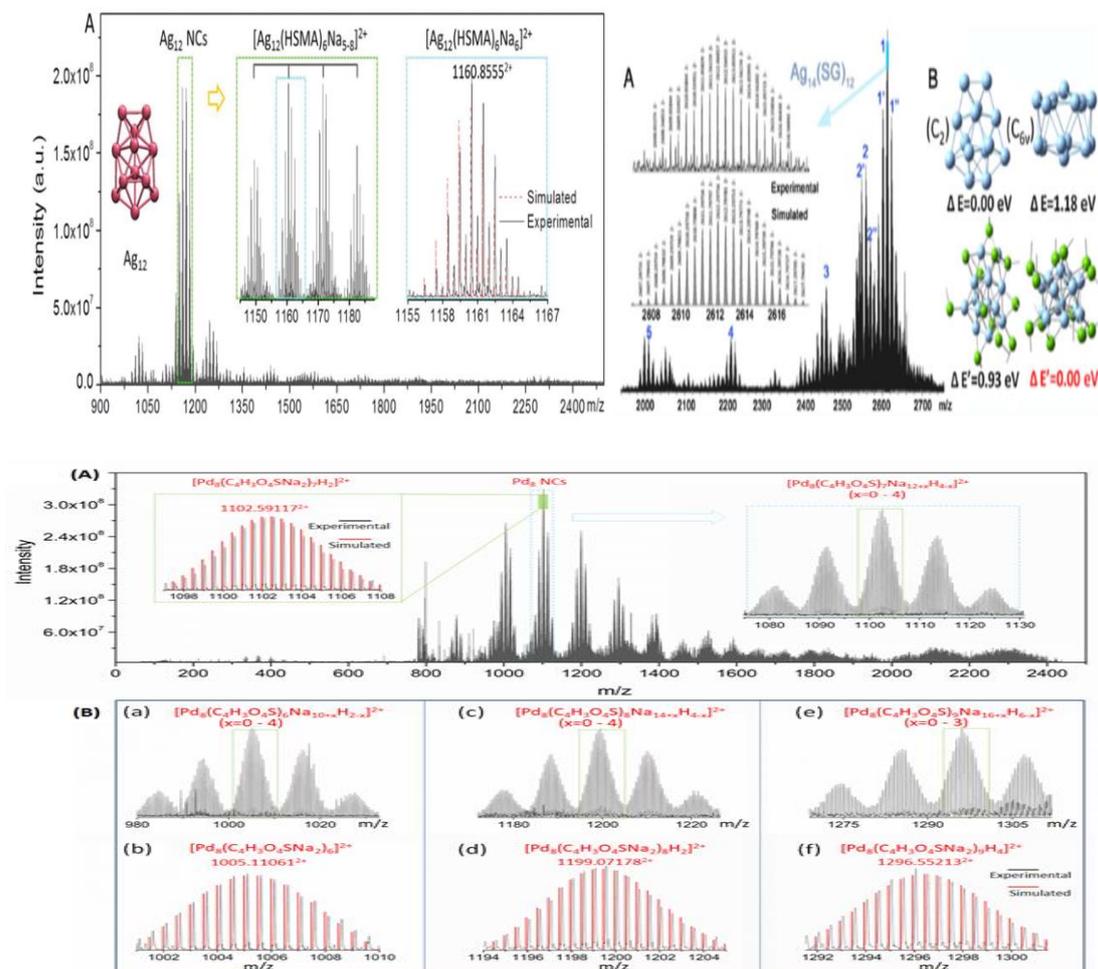
● 图 1、超分子复合物质谱图

实验测试与理论值相比，同位素峰完全吻合，且误差在可接受范围内。

二、金属团簇检测：

ESI-FTICR-MS 质谱检测速度快、灵敏度高、所需样品少且不需要提纯，以非常温和的电离方式将离子从溶液转至气相，得到分子离子峰，推测出金属簇的组成与结构。由于样品以溶液状态进行检测，得到的信息更接近于真实反应液中的样品存在形式。

我们经过大量的实验条件摸索，得到了一些Ag和Pd金属团簇，结果如下。



● 图 2、金属团簇质谱图

利用傅立叶变换离子回旋共振质谱仪 (FT-ICR MS) 的高灵敏度、超高分辨率、超高质量精确度、以及多级质谱功能、尤其是其特有的精细同位素结构

功能，实现了对未知化合物的结构鉴定以及复杂体系中多种化学成分的分析，今后必将会在科研中发挥更加重要的作用。

参考文献

1. Pan An, Rajini Anumula, Chaonan Cui, Yang Liu, Ye Tao, Zhixun Luo, A facile method to synthesize water-soluble Pd₈ nanoclusters unraveling the catalytic mechanism of p-nitrophenol to p-aminophenol, *Nano Res.*, **2019**, *12*, 2589.
2. Rajini Anumula, Chaonan Cui, Mengzhou Yang, Jie Li, Zhixun Luo, Catalytic Oxidation of Cyclohexane on Small Silver Clusters Supported by Graphene Oxide, *J. Phys. Chem. C*, **2019**, *123*, 21504.
3. Pan An, Rajini Anumula, Haiming Wu, Juanjuan Han, Zhixun Luo, Charge Transfer Interactions of Pyrazine with Ag₁₂ Clusters—Towards Precise SERS Chemical Mechanism, *Nanoscale*, **2018**, *10*, 10635.
4. Zhengang Ke, Bo Yu, Huan Wang, Junfeng Xiang, Juanjuan Han, Yunyan Wu, Zhenghui Liu, Peng Yang, Zhimin Liu, Cobalt-Catalyzed Synthesis of N-containing Heterocycles via Cyclization of Ortho-substituted Anilines with CO₂/H₂, *Green Chem.*, **2019**, *21*, 1695.

单晶样品测试常见问题及处理方法

► 梁同玲

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

~~~~~

单晶测试对样品质量要求很高，测试中会遇到显微镜下观察样品很好，但是测试不成功，或者收集了衍射数据但是结构解析效果很差，甚至解不出结构的情况。单晶样品测试时经常需要对样品进行一定的处理；遇到空气敏感样品或者有特殊晶体学现象的样品需要有一定的测试经验和测试技巧。现将常见单晶样品种类及处理方法总结如下。

1、高质量的单晶样品。高质量的单晶样品棱角分明，表面光滑无裂痕，不沾附微小的晶粒或粉末状的杂质。从衍射照片看衍射点是一个一个独立的点，

衍射较强，高低角度衍射均匀，指标化率高，晶胞参数容易确定。这类样品按我们制定的标准测试步骤进行测试即可。

2、孪晶样品。有些孪晶样品在显微镜下很容易观察到，样品有裂纹或者几块晶体明显的堆在一起，上样时把有裂纹的部分切掉或者把几块叠在一起的样品切开即可。有些样品一碰就裂成很多块，所以切割时速度要快，做到“快刀斩乱麻”。从衍射效果看孪晶样品主要有以下几种：

(1) 衍射照片上高低角度都有很多较弱的衍射点，但是仪器控制软件可以自动识别出那些是主要部分的衍射点，那些是次要部分晶体的衍射点，虽然指标化率不高（50%左右），但是也能得到一套很好的衍射数据和结构数据。

(2) 样品的衍射照片中很多衍射点的距离很近，还有一些拉长和弥散的衍射点，这类晶体要么得不到晶胞参数，要么得到晶胞参数但指标化率很低，最后结构解析结果很差。如果只是看一下大致结构可以尝试收集数据；若想得到高质量的结构数据，建议重新培养晶体，重新测试。

(3) 孪晶严重的样品类似粉晶，样品是有很多的微小晶体聚集到一起的，衍射点连成一片。这类晶体得不到晶胞参数，无法进行单晶结构测试解析，需要重新培养晶体，重新测试。

3、衍射太弱的样品。晶体太小整体衍射太弱的样品，或者低角度衍射强高角度衍射弱的样品，增强曝光时间衍射强度增强效果不明显，这类样品需要重新培养晶体再测试。

4、空气敏感样品。这类样品的测试难度是样品的挑选和安置。测试时一定要先把仪器、显微镜、载玻片、单晶保护油、挑晶体用的针及切割晶体的刀等工具准备好，再取样品；取样、挑样和上样要“眼疾手快”，争取在最短的时间内将样品放到仪器的低温下。

5、低温相变样品。低温测试（170K）是我们实验室的常规测试，因为低温下晶体不易变坏，衍射强度比室温强，且分子无序度低。低温样品变坏有以下几种情况：晶体放到低温下立即冻裂，无法进行数据的收集；显微镜下观察晶体很好，但是衍射效果很差，把晶体取下会发现晶体有裂纹，或者表面已变得不透亮；还有一种情形是晶体低温衍射效果不好，取下晶体也看不到晶体有任何变化，这种情况经常被误认为是孪晶样品，而放弃测试。一旦发现以上几种情

况，要尝试在不同的温度下测试，找到衍射效果好的温度再收集数据。

6、多晶型和多种物质样品。单晶测试中会遇到一瓶样品中有两种或者多种晶型和物质的情况。样品可能是不同的颜色，也可能是不同的形状，这些晶体可能具有相同的结构但是堆积方式不同，即有多晶型现象；还可能是不同的物质，如有机物中部分基团的取代位置不一样，或配合物单晶的培养中长出不同配位方式的化合物。这类样品测试时要善于观察，多次尝试。

7、在数据收集时还可能遇到以下两种情况：（1）晶体质量很好，衍射效果也很好，但是解不出结构或解析效果很差。这一般是晶胞参数错误导致的。衍射照片中衍射点越密集，晶胞体积越大，衍射点越稀疏晶胞体积越小。程序自动计算晶胞参数时可能会把晶胞体积成倍增大或缩小。遇到这种情况可用不同的衍射照片、不同的方法多尝试几次，一般会找到正确的晶胞参数。（2）数据的完整度不高。一套完整的衍射数据完整度要 97%以上。分子结晶成非心群或手性群，按中心群来收集数据会导致完整度不高；收集数据时按高于实际对称性的晶系收集（如单斜晶系中  $\beta$  角接近  $90^\circ$  时程序会认为是正交晶系）数据也会导致完整度不高。遇到这种情况若晶体还在测角仪上可以补收数据来提高完整度，若晶体已取下，需要重新挑选样品按正确的对称性重收数据。

综上所述单晶样品测试中除了要对测试步骤熟练掌握外还要多观察，多尝试，熟悉不同样品的测试方法和技巧，这样才能快速有效的收集高质量的衍射数据，同时还能帮助科研人员发现一些重要的晶体学现象，拓展其研究范围。

## 一种改进圆二色紫外区光谱质量的新尝试

► 丁丽萍

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

### 一、背景介绍

手性是自然界中普遍存在的现象，圆二色光谱由于其对手性分子信号的敏感性，使其在生物大分子（蛋白质、DNA 和多糖等）、超分子和手性小分子等方面具有重要的应用。在蛋白质或多肽中，主要的光活性基团是肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基和二硫桥键，远紫外区（180-250nm）圆二色光谱可获得肽键信息

推导出稀溶液中蛋白质二级结构，进而分析辨别蛋白质三级结构类型<sup>[1-2]</sup>。

在实际中，由于光源、光学元件以及样品池等方面，使得商品圆二色光谱仪在小于 200nm 处的远紫外区的谱图信噪比较差。目前一般采用同步辐射装置建立圆二色测试模块而获得真空紫外波段（140–340nm）的圆二色光谱，即通过测量生色基团（如羟基、乙缩醛基团等）的高能跃迁，得到更详细、更新颖的有关生物大分子的结构信息<sup>[3]</sup>。

## 二、方法介绍

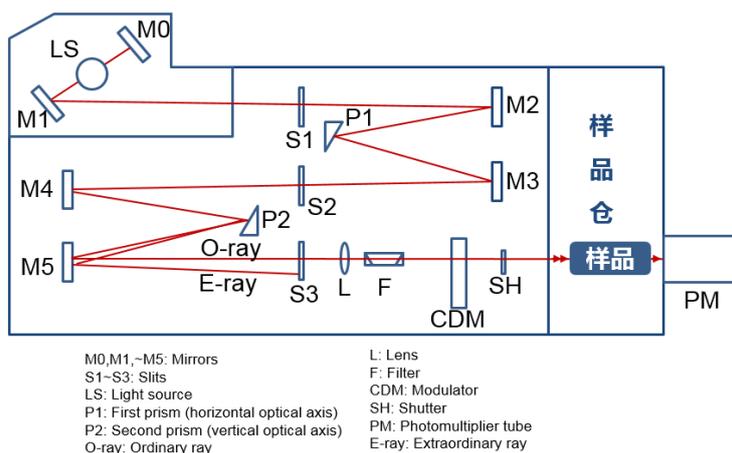
在生物类样品的圆二色测试中，波长通常需要测试到 180nm 或更短，但其光源氙灯在高温下容易把氧气转化为臭氧，臭氧在低波长处吸收很强，波长越低，吸收越强。为了解决现有 J-815 圆二色光谱仪测试中远紫外区光谱信噪比差的问题，我们进行了一些尝试，比如纯化通入的氮气、增大入射光通量、降低光谱扫描速度等。经过多次尝试，发现增加样品处氮气吹扫这一方法可有效增强信噪比，从而提高远紫外区圆二色光谱的质量。

图 1 为圆二色光谱仪光学系统示意图，光谱仪在 S1 处输入高纯氮气，以保证氙灯及光学元件处于氮气环境中工作，避免氙灯在含氧环境中产生臭氧。臭氧在 250nm 处会吸收光，减少进入样品的光通量，同时造成光学元件（如 M0、M1、M2 等）的损伤。我们将样品仓进行了改造，在样品仓内开通了输入氮气的气路（见图 2），从而加强了其样品仓的氮气氛环境。

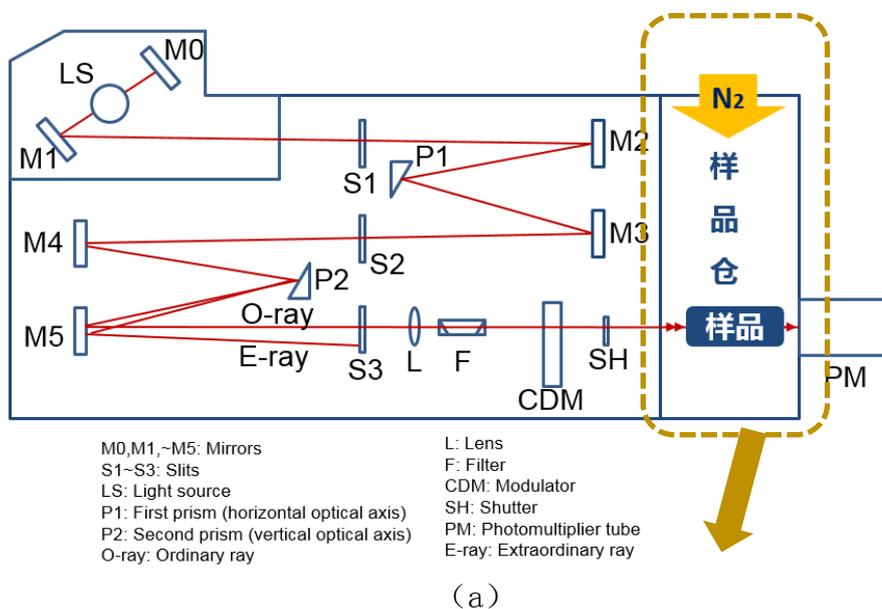
圆二色光谱在本质上仍然是吸收光谱，所以朗伯比尔定律也适用于圆二色光谱。在远紫外波段，很多有机分子和基团都有吸收，尤其选用一些有机分子作为缓冲液，这是造成光谱信噪比差的一个因素，获得信噪比高的基线数据对提高光谱质量很重要。图 3 和图 4 分别是有无该装置空样品仓和二次水为基线对比图。从图 3 可以看出，改造后的空样品仓的圆二色光谱较改造前的平缓，而图 4 可以看出样品仓的氮气氛环境有利于提高远紫外区光谱的信噪比。

## 三、结论

我们设计了一种气路，使得圆二色光谱仪的样品仓的氮气浓度增大，从而提高了光谱的信噪比，特别是远紫外区。此种方法操作简单，通用性强，可广泛应用于生物样品的圆二色光谱测试中。



● 图 1、圆二色光谱仪光学系统示意图



(a)



(b)

● 图 2、圆二色光谱仪的样品仓开通氮气路示意图 (a)，实物图 (b)。

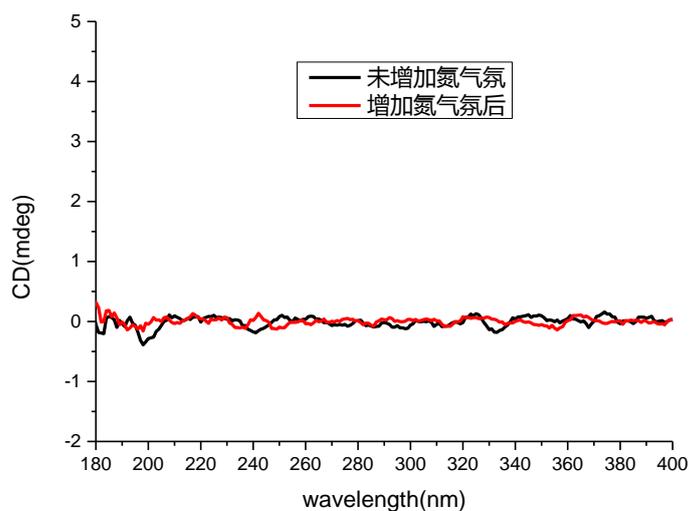


图 3、增加氮气氛前后空样品仓为基线的圆二色光谱

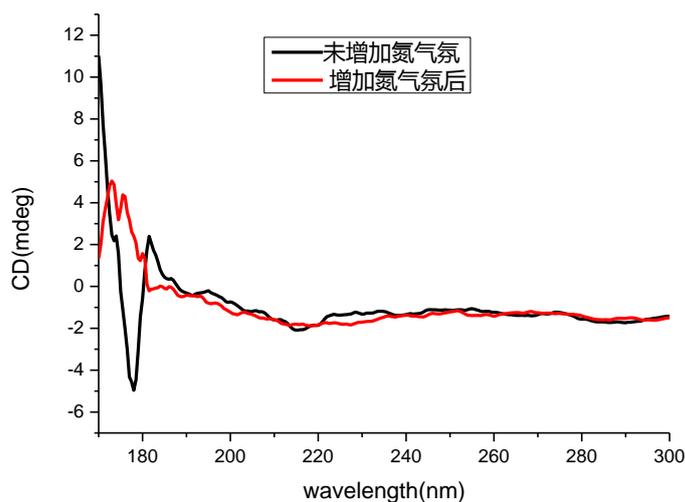


图 4、增加氮气氛前后水为基线的圆二色光谱

#### 参考文献

1. 沈星灿、梁宏、何锡文、王新省, 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展, *分析化学*, **2004**, 32, 388.
2. 吴明和, 圆二色光谱在蛋白质结构研究中的应用, *氨基酸和生物资源*, **2010**, 32, 77.
3. 张国斌, 吴文清, 石军岩, 周洪军, 戚泽明, 符义兵, 霍同林, NSRL 真空紫外圆二色光谱实验站设计及性能测试, *核技术*, **2007**, 30, 105.

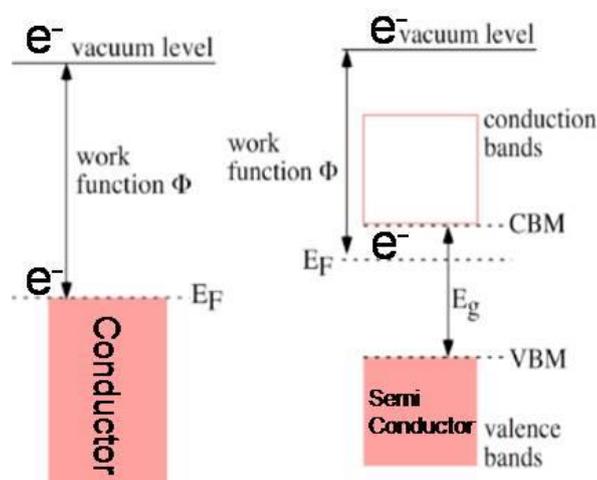
## 用 XPS 和 UPS 方法测量导电固体材料逸出功的方法研究

► 赵志娟 刘芬 章小余

(分析测试中心电子能谱组 Tel: 010-62553516 Email: zhaozj@iccas.ac.cn)

### 1. 背景介绍:

逸出功  $\Phi$  (见图 1) 是表征固体材料表面电子特性的一个最基本物理量, 体现电子的传输能力, 其大小与表面状态的变化以及材料的物理化学性质密切相关。在现代半导体技术及有机太阳能电池研究领域, 逸出功的准确测量对深入理解材料表面/界面现象, 如生长吸附, 表面分离与晶界形成, 电子传输及氧化还原能力等具有重要意义。



● 图 1、导电材料逸出功示意图

目前有很多基于不同物理效应的技术可用来测量材料的逸出功, 如光电子发射阈值法、场发射阻挡电势法、热电子发射法、Kelvin探针法等。不同方法测得的逸出功差别很大, 这与测量方法本身的局限性以及样品的表面状态有很大关系。这其中用光电子能谱技术测量半导体材料的逸出功具有独特的优势, 既能给出逸出功本身的值, 又能区分出电子亲和势和表面势垒高度的贡献, 这是其他一些测量技术无法做到的。

### 2. 方法介绍

#### 2.1 技术原理:

光电子能谱方法通过测量非弹性二次电子截止边来获得材料的逸出功, 不涉及其它实验参数, 只与激发源的能量 (这是已知的) 和材料费米边有关, 原理如

图 2 所示。当一定能量的光子照射材料表面时，除了激发出光电子、俄歇电子等特征电子外，还会有大量的低能二次电子（动能范围约为 0~50eV）出射。根据光电发射的基本能量关系，从非弹性散射二次电子截止边到真空能级的能量间隔为光子的能量，即：

$$h\nu = E_{\text{vac}} - E_{\text{cutoff}}$$

而材料逸出功的定义为：

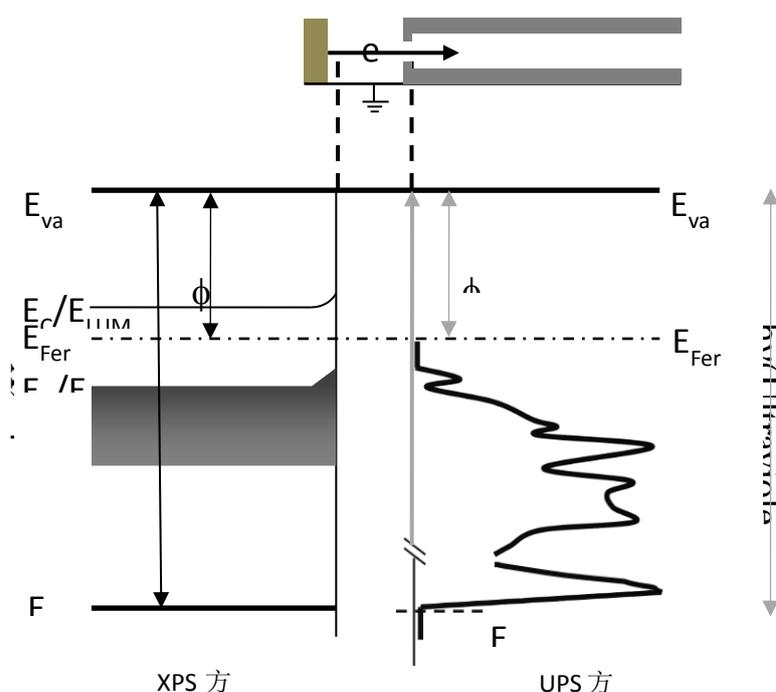
$$\Phi = E_{\text{vac}} - E_{\text{Fermi}}$$

所以

$$\Phi = h\nu - (E_{\text{Fermi}} - E_{\text{cutoff}})$$

当谱仪的动能读数以  $E_{\text{Fermi}}$  为参考点（即该点的动能为  $h\nu$ ），则

$$\Phi = E_{\text{cutoff}}$$



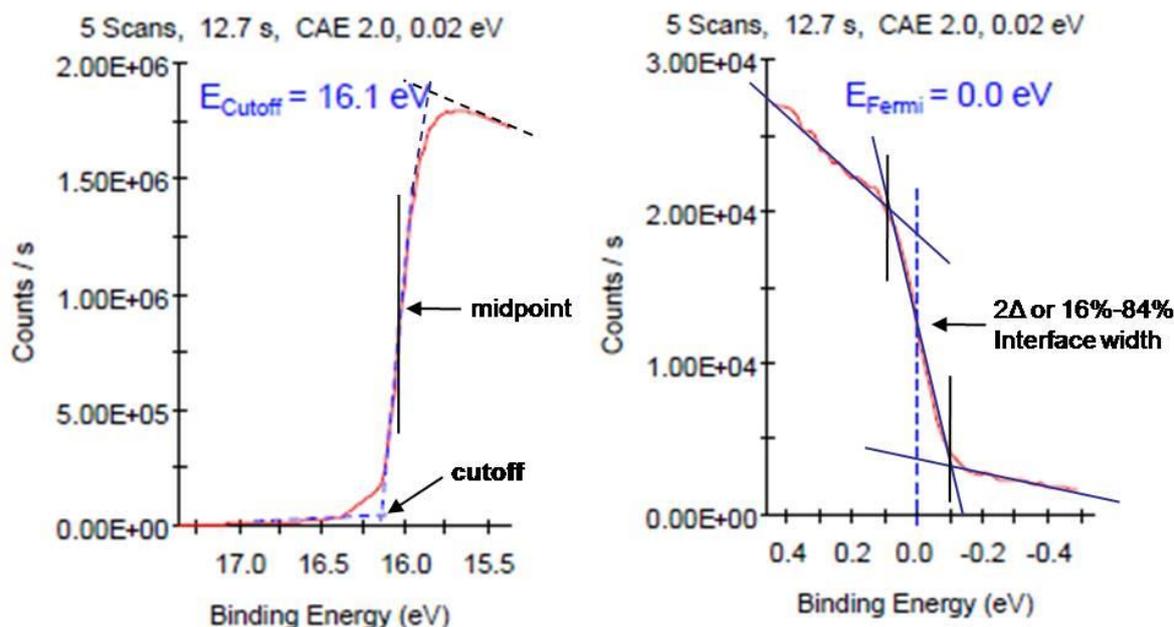
● 图 2、利用光电子能谱方法确定材料逸出功的原理示意图

$h\nu$ —入射光子能量， $E_{\text{vac}}$ —真空能级， $E_{\text{Fermi}}$ —费米能级， $E_{\text{cutoff}}$ —非弹性二次电子截止边， $E_{\text{C}}$ —导带底能量或 LUMO， $E_{\text{V}}$ —价带顶能量或 HOMO， $\phi$ —样品逸出功

## 2.2 实验方法：

XPS与UPS测试仪器为ThermoScientific公司生产的ESCALab 250Xi型多能电子

能谱仪。XPS测试时选用单色化的Al K $\alpha$  X射线源，分析室真空优于 $3\times 10^{-7}$  Pa，实验设置偏置电压-20~-30 V为宜，选择合适的分析器通能与采谱扫描范围，记录二次电子能量分布曲线；UPS测试时选用HeI紫外光源 ( $h\nu=21.22$  eV)，测试时分析室真空约为 $3\times 10^{-6}$  Pa，实验设置偏置电压-5~-10 V为宜，选择合适的能量分析器通能和采谱扫描范围，记录相应的二次电子能量分布曲线。二次电子截止边 ( $E_{\text{cutoff}}$ ) 和费米边 ( $E_{\text{Fermi}}$ ) 的测量如图3所示。



● 图 3、二次电子截止边 ( $E_{\text{cutoff}}$ ) 和费米边 ( $E_{\text{Fermi}}$ ) 的测量示意图

测试样品包括金属单晶Au<111>、Ag<111>、Cu<111>、Ni<111>和Al<111>，无机半导体薄膜InAs<100> (N型掺Si)、InP<100> (N型掺Si) 和CdS<0001>。测试时所有样品均使用铜夹子固定在样品托上。在测试前金属和无机半导体样品先用Ar $^+$ 束流清洁表面，刻蚀时间依材料种类以及污染/氧化程度而定。

## 2.3 实验结果：

### 2.3.1 金属单晶样品的逸出功测量比较

表 1 给出了两种方法测量金属单晶样品的逸出功值。从表中我们可以看到，与理论计算结果[2]相比实验测得的逸出功值都偏小，这是因为理论计算中设定的模型是具有单一的、紧密堆砌晶面的，而且表面没有缺陷的晶体，而实际的样品表面或多或少都存在缺陷，且处在不同的环境下表面状态各不相同，这些都会

影响最终的实验测量值。在本研究中，就<111>晶面而言，金属单晶样品 Al、Ni、Cu、Ag 和 Au 的 UPS 测量结果无论与理论计算值相比还是与文献[3]中给出的实验参考值相比都有较大差距，而用 XPS 方法测得的逸出功值与理论计算值相差较小，更接近于文献实验参考值。

表 1、利用 XPS 和 UPS 方法测量金属单晶样品的逸出功

(<sup>a</sup>See Ref. 2, <sup>b</sup>See Ref. 3)

| Sample  | WF measured by<br>UPS / eV | WF measured by<br>XPS / eV | WF Present <sup>a</sup><br>/eV | Expt. <sup>b</sup><br>/eV |
|---------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Al<111> | 3.72                       | 4.44                       | 4.54                           | 4.24                      |
| Ni<111> | 4.82                       | 5.29                       | 5.77                           | 5.35                      |
| Cu<111> | 4.57                       | 4.95                       | 5.30                           | 4.94                      |
| Ag<111> | 4.33                       | 4.75                       | 5.01                           | 4.74                      |
| Au<111> | 4.28                       | 4.93                       | 6.01                           | 5.31                      |

值得注意的是，对于 Au<111>样品，两种方法的测量结果都比文献参考值小很多，通过 XPS 检测样品表面的化学组成，如图 4 所示，我们发现经过 Ar<sup>+</sup>清洁后 Au 样品表面仍有少量的 Ag 杂质，说明测试的样品不纯导致测得的逸出功值偏小。

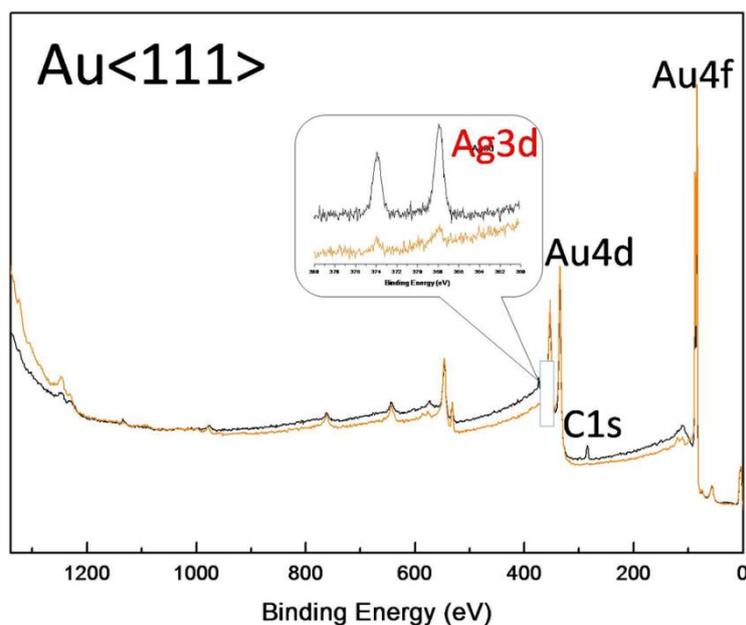
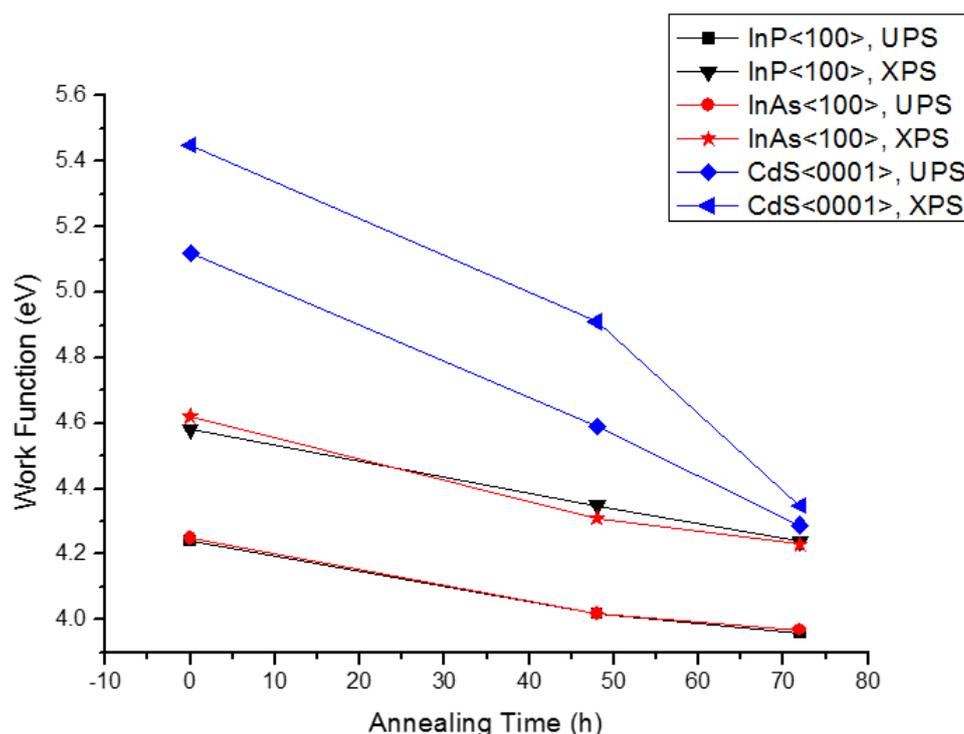


图 4、Ar<sup>+</sup>清洁前后 Au<111>样品的宽扫描谱图（小图为 Ag3d 光电子谱）。

通常，材料的逸出功对表面组成的变化非常敏感，金属逸出功的变化反映表面层原子的电偶极矩。在 Au<111>单晶表面，少量 Ag 原子的存在改变了原有的晶格排布，使得面原子密度降低，从而降低了材料的逸出功。由此可见，XPS 方法测量材料逸出功的突出优点是，即使材料表面只有 0.01 单层的污染物，也可以在测量逸出功的同时精确监测实际的表面状况。该方法测得的逸出功是对应于某种具体表面状况下的准确数值。

### 2.3.2 无机半导体样品的逸出功测量比较

图5显示，对于InP、InAs与CdS三种半导体材料，用UPS方法测量的逸出功值与XPS方法的测量结果相比偏离较大，UPS的测量值更小，这可能是由于无机半导体材料具有特殊的带结构、弛豫形貌和声子振动，而UPS方法对表面更为敏感，利用UPS方法测量无机半导体材料时，所测逸出功的值更容易受到表面状态以及荷电效应的影响，使得UPS的测量结果偏小。如果半导体材料对紫外光敏感，那么光辐照也是影响UPS测试结果准确性的一个重要因素。



● 图 5、不同刻蚀退火时间下，采用 XPS 方法与 UPS 方法测量 InP、InAs 与 CdS 无机半导体材料逸出功的变化趋势图。

此外，我们考察了刻蚀退火时间对逸出功测量稳定性的影响，从图中我们可

以看到, 对于三种不同的无机半导体材料, 随着退火处理时间延长, 采用XPS方法与UPS方法所测逸出功的值都呈现不断减小的趋势, 表明刻蚀后材料表面的状态发生变化, 由于晶体表面电荷弛豫会引起材料表面原子/电子的重新排布。

### 3. 结论

利用X射线光电子能谱(XPS)方法和紫外光电子能谱(UPS)方法分别测量了一系列金属单晶与无机半导体标准样品的逸出功, 并将测量结果进行对比。结果表明: 对于不同种类的导电薄膜样品, 用XPS方法测得逸出功的值普遍要高于UPS测量值, 这与测量方法的差异性有关, 如果两种方法的能量线性不一致也是重要的影响因素; 在Ar<sup>+</sup>刻蚀清洁样品表面后, 用两种方法测得逸出功的值都普遍增大。对于金属单晶样品, 刻蚀后XPS的测量值更接近于文献参考值, 表明XPS方法在测量此类材料时具有一定的优势; 对于无机半导体材料, UPS方法所测结果受表面状态以及荷电效应影响更大。在刻蚀清洁表面氧化或污染层后, 用XPS方法与UPS方法所测逸出功的值均随退火处理时间的延长而逐渐减小, 这可能与晶体表面电荷弛豫有关。

### 参考文献

1. Park Y., Choong V., Gao Y., Hsie, B. R. Tang, C. W., Work function of indium tin oxide transparent conductor measured by photoelectron spectroscopy, *Appl. Phys. Lett.*, **1996**, 68, 2699.
2. Skriver H. L., Rosengard N. M., Surface energy and work function of elemental metals, *Phys. Rev. B*, **1992**, 46, 7157.
3. Michaelson H. B., The work function of the elements and its periodicity, *J. Appl. Phys.*, **1977**, 48, 4729.
4. Liu W., Zheng W. T., Jiang, Q., First-principles study of the surface energy and work function of III-V semiconductor compounds, *Phys. Rev. B*, 2007, 75, 235322.

## 仪器及功能介绍

## 冷冻聚焦离子束电镜的原理及应用

► 刘力瑶 关波

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

## 一、背景介绍

聚焦离子束(Focused Ion beam, FIB)是利用静电透镜将离子束聚焦成非常小尺寸的束斑,并通过离子轰击材料表面,实现材料的剥离、沉积、注入和改性<sup>[1]</sup>,现代的 FIB 通常配置在扫描电镜上,实现在电子束观察下对样品进行定点微加工。FIB 应用方向包括材料领域(形貌观察、微刻蚀、微沉积和 TEM 制样等)、生物领域(成像、三维重构等)、半导体行业(缺陷分析、集成电路、光掩模修复、电路修改等)等。但是聚焦离子束对样品具有破坏性,尤其是对辐照敏感样品和生物样品,离子束在撞击处有一定的损伤和植入。而冷冻 FIB (Cryo-FIB)是将聚焦离子束电镜和冷冻系统结合,减少了离子束对样品的损伤,并且可对液相和离子束敏感的样品进行分析,如聚合物、乳液、颜料、油墨、食品、生物样品等<sup>[2]</sup>,因此近年来 Cryo-FIB 受到了越来越广泛的关注。

## 二、方法介绍

## 2.1 技术原理

FIB 是给液态金属离子源施加电场,使液态金属形成细小尖端,在负电场牵引下,尖端的金属产生离子束,通过静电透镜聚焦再轰击样品表面,产生的二次电子和离子可用来成像,离子束按照一定的图案扫描可刻蚀特定图案,若同时注入化学气体即可沉积所需图案。

然而,离子束轰击会对样品造成一定的损伤。当高能离子撞击样品时,样品表面会溅射出原子从而带来损伤,离子也会植入样品表面,使得晶体样品表面变成非晶,非晶样品的化学键遭到破坏。同时,由于 FIB 是在高真空环境工作,只能对非挥发样品进行微加工,而大部分含有液相的样品,干燥处理会引起严重的皱缩和变形,即使用一些处理方法如临界点干燥、冷冻干燥等仍存在一定程度的皱缩失真、易溶成分丢失、制备过程慢等问题。因此, FIB 不适合直接做电子束

敏感及含液相的样品。

Cryo-FIB 技术是将低温技术和 FIB 相结合，典型的仪器装置见图 1。对于液体样品，可通过高压冷冻、液氮泥冷冻、投入式快速冷冻等对液相进行冷冻固定，然后通过传输装置在真空下快速送至 FIB 制备腔室的冷台，冷台由过冷氮气冷却，温度可达 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，经过断裂、溅射 Pt 等处理之后，传至 FIB 的冷台，此冷台同样由过冷氮气冷却，温度为 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。对于不含液相的固体样品，可直接将样品传输至 FIB 的冷台。在低温下应用 FIB 进行刻蚀可有效减弱离子束的损伤，实现对不耐离子束的有机、高分子样品、含液相样品的截面形貌观察、三维结构重构等，配合冷冻机械手还可实现低温下透射电镜样品制备。另外，还系列取液相反应过程中一系列样品进行冷冻制备，用 Cryo-FIB 进行样品制备及观察，研究反应的动态变化规律<sup>[3]</sup>。

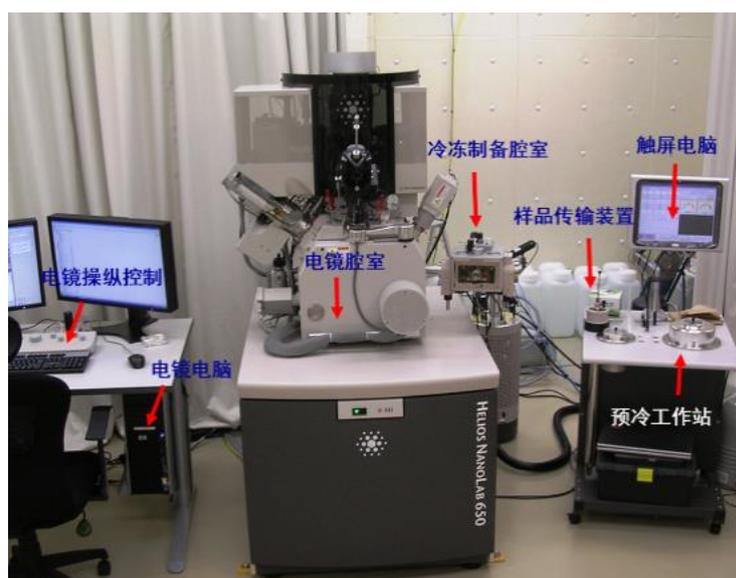


图 1、冷冻聚焦离子束电镜实物图

## 2.2 实验方法

Cryo-FIB 的整个操作均在“低温冷冻”和“真空”两个状态下进行，典型的操作过程如以下八个步骤（见图 2）：

- (1) 样品取样（含液相的样品）；
- (2) 载样，把样品固定在样品梭上，不同规格的样品梭（specimen shuttle）满足不同材料的固定和测试需求，也方便预冷和样品的对接传输操作；
- (3) 将样品梭装到传输装置；

(4) 将样品快速预冷（插入 Prepdek 工作站的液氮泥中），获得玻璃态冰，减少了水结晶带来的损伤，更好地保存了样品的微结构；

(5) 转移样品，样品快速冷冻后，将传输杆密闭，保证样品传输装置的低温和真空状态，减少样品表面结霜；

(6) 与制备腔室气锁对接，将样品转移至冷台，制备腔室采用过冷氮气的气冷方式，保证冷台温度在 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或者更低；

(7) 在制备腔室里断裂、升华刻蚀和镀膜；

(8) 传输到 FIB 腔室，进行成像、刻蚀、TEM 制样（见图 3）和三维重构等。

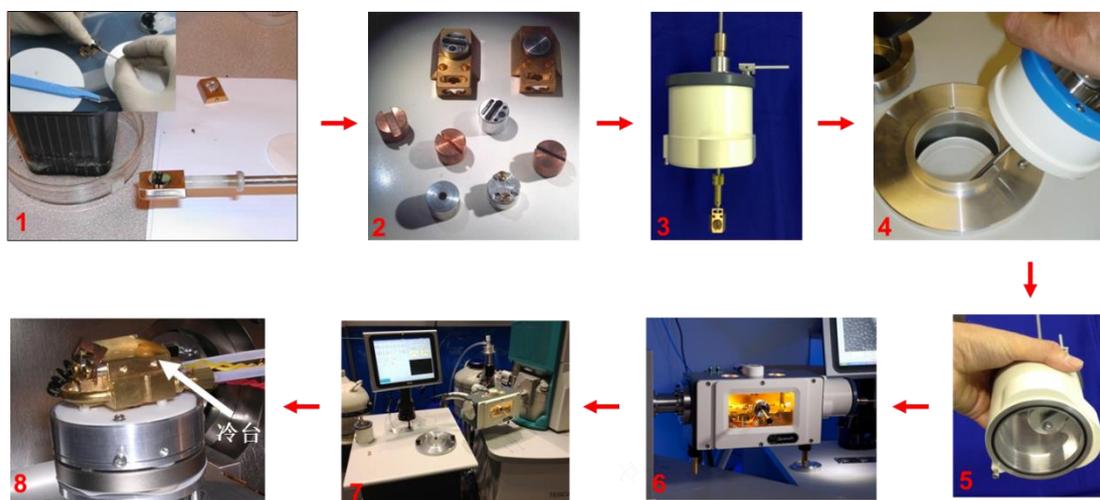


图 2、Cryo-FIB 的操作流程（1.取样 2.载样 3.装到传输装置 4.快速冷冻 5.转移样品 6.与制备腔室气锁对接 7.断裂、升华刻蚀和镀膜 8.传输至 FIB 腔室）

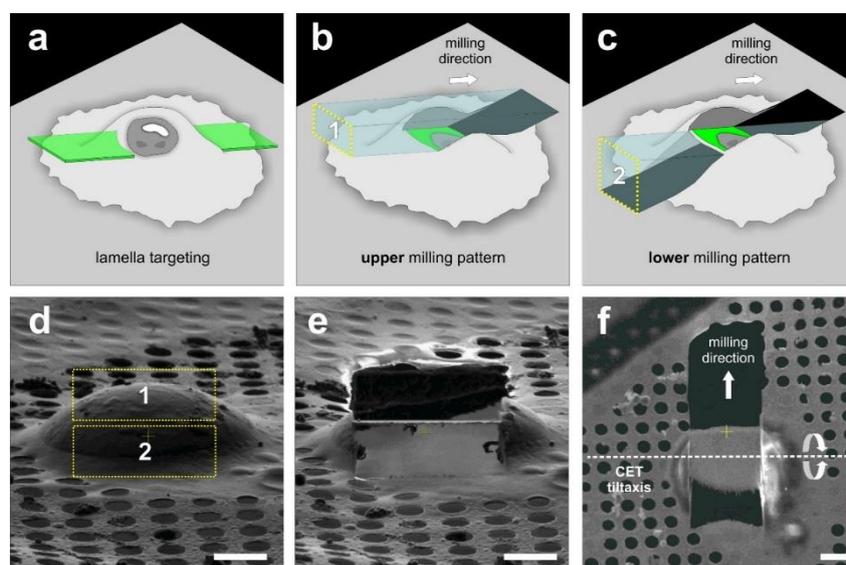


图 3、Cryo-FIB 的 TEM 样品制备<sup>[2]</sup>

### 2.3 应用实例

2018 年,康奈尔大学的 Lena F. Kourkoutis 课题组应用 Cryo-FIB 及冷冻 TEM 观察到了锂金属电池中电极-电解质界面膜和锂枝晶的纳米级结构并以此全面深入地阐述了该界面发生的化学反应过程<sup>[4]</sup>。他们将 Li 电池及液体电解质快速冷冻,通过 FIB 定点刻蚀得到使用状态下锂电池的界面结构,利用 FIB 三维重构表征了两种不同枝晶的三维形貌,其中一种拥有外延的 SEI 层,而另一种则由锂的氢化物组成。同时,应用 Cryo-FIB 进行定点 TEM 制样后,在冷冻条件下传输到冷冻透射电镜中应用 STEM 及 EELS 获得枝晶及固体-电解质界面层的高分辨结构及化学成分分布信息。

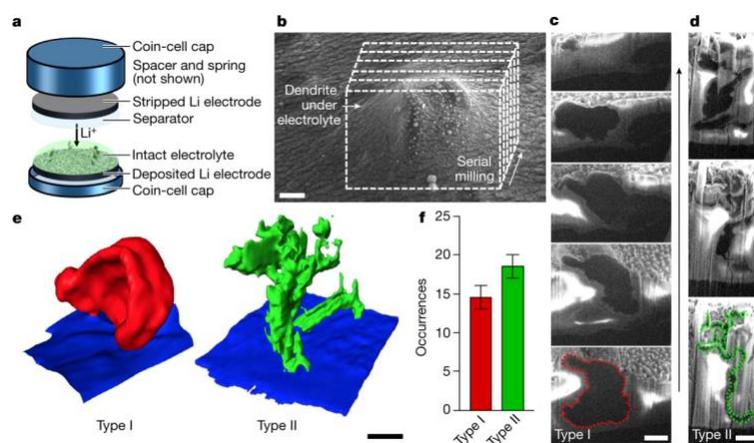


图 4、通过 Cryo-FIB 定点刻蚀样品观测到不同类型的枝晶<sup>[4]</sup>

### 三、结论

总之, Cryo-FIB 可实现对不耐损伤的有机、高分子材料以及含液相样品进行定点的刻蚀、形貌观察及透射电镜样品制备等, 是其他制样方法所不能实现的, 也是近些年电镜制样技术发展的一个前沿方向。目前, 分析测试中心电镜室已配备 FIB 设备, 型号是 Helios NanoLab G3 CX, 基于所内需求已购置与之匹配的一体式冷冻传输系统 PP3010T, 预计 2020 年 7 月到货, 配置完成后预期可实现可有机、高分子、大尺寸的液相组装体、固液界面等样品的截面形貌观察、三维形貌重构、透射电镜样品制备等功能。

### 参考文献

1. Melngailis J., Focused ion beam technology and applications. *J. Vac. Sci. Technol. B*, **1987**, 5, 469.

2. Rigort A, Plitzko J M., Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2015**, 581, 122.
3. Kizilyaprak C, Daraspe J, Humbel B M., Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. *J. Microsc.*, **2014**, 254, 109.
4. Zachman M J, Tu Z, Choudhury S, Archer L. A., Kourkoutis L. F., Cryo-STEM mapping of solid-liquid interfaces and dendrites in lithium-metal batteries. *Nature*, **2018**, 560, 345.

致谢

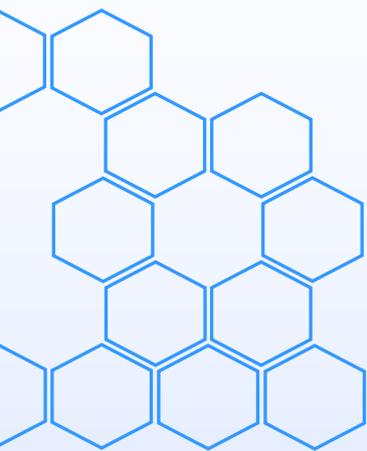
感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工！

## 分析测试中心动态

### 《分析测试中心通讯》征稿启事

《分析测试中心通讯》由分析测试中心主办，以促进测试技术的应用为理念，提供深度的科研支撑为宗旨，设置了评述、典型应用案例、测试技术及技巧、数据处理技巧、仪器的功能介绍和分析测试中心动态等栏目。为了进一步提升《分析测试中心通讯》的水平和作用，现向广大读者征稿，欢迎您的来稿，分享科研中的点滴！

联系人：丁丽萍      电话：010-62566250      邮箱：npns@iccas.ac.cn



顾问： 唐亚林 何圣贵

主编： 关 波 刘美蓉 李巧连 向俊锋

郝 项 赵镇文 赵志娟

编辑： 丁丽萍