



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13期



分析测试中心 主办
2023年2月27日

目 录

新技术应用

超高速魔角旋转固体核磁新技术及应用	1
气体团簇刻蚀在有机及无机材料深度剖析中的应用	4
生物样品的冷冻制样技术及应用	9

典型应用案例

应用 FLS980 稳态瞬态荧光光谱仪测试重叠的荧光和磷光发射	17
---------------------------------------	----

测试技术与技巧

电位滴定仪对固体样品中低含量氯元素的准确定量	23
扫描电镜 Regulus 8230 的减速模式简介及其应用	27
双束电镜在化学所分子材料研究中的应用	32
高梯度扩散表征技术介绍	49

仪器及功能介绍

可移动单晶样品挑选台和封管装置功能介绍	54
三维激光扫描仪的原理及应用	57
顶空固相微萃取-高分辨气质联用的原理及应用	60
低场核磁共振 (Low Field NMR) 技术及其应用	66

分析测试中心动态

《分析测试中心通讯》征稿启事	71
----------------------	----

新技术应用

超高速魔角旋转固体核磁新技术及应用

► 武宁宁 向俊锋

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

化学所新购置的 600 兆宽腔固体核磁波谱仪配备的超高速魔角旋转探头 (1.3 mm 探头, 0.7 mm 探头) 于 2022 年完成安装调试, 现进入试运行阶段。该谱仪配备了一系列宽带多功能探头, 可实现 ^1H 、 ^{19}F 、 ^{13}C - ^{31}P 频率段原子核的检测工作。其中, 1.3 mm 探头 (最高转速达 67 kHz), 0.7 mm 探头 (最高转速达 111 kHz), 为有效开展如下研究提供了必要的硬件支持: (1) 高分辨氢谱; (2) 基于质子检测的多维核磁共振谱, 如固体二维异核相关谱 (HETCOR, Heteronuclear Correlation); (3) 四极核和强各向异性核的超高速 NMR 研究; (4) 同时对氢对氟去耦的碳谱或杂核测试^[1-2]。欢迎有需求或感兴趣的老师和同学来核磁实验室交流。

举例 1

固体核磁共振技术可在原子级的分辨率上来研究各种化学、生物、材料等的结构和动力学。因质子具备高的自然丰度和旋磁比, 核磁中常用质子激发和检测, 以达到最佳灵敏度。 ^1H 反向检测 X 核观测的理论灵敏度增强因子^[2-3]可表示为

$$\varepsilon = C \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C} \right)^{3/2} \left(\frac{\Delta V_X}{\Delta V_H} \right)^{1/2}$$

为了更好检测这些自然丰度低的原子核 (稀核), 针对固体核磁, 波谱学家发明了交叉极化技术。它的原理是在稀核和丰核在满足 Hartmann-Hahn 匹配 (即能量匹配) 的条件下, 将丰核 (I) 的自旋状态转移到稀核 (S), 以达到提高测试灵敏度的目的。

CP 可增强的信噪比表示为

$$S/N = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \times \frac{1}{1 + \varepsilon} \quad (\text{其中 } \varepsilon = \frac{N_S}{N_I})$$

其中 N_S 和 N_I 分别为样品中所含稀核和丰核原子数目。如 ^{13}C 核的信号理论上可通过 CP 技术最多可增强 4 倍。

但固体材料因 ^1H - ^1H 的偶极耦合相互作用强, 导致谱线展宽严重, 谱图化学

位移分辨率较差，这严重限制了该技术的应用范围。在量子力学中，核自旋体系的哈密顿算符(Hamiltonian) H 主要有以下六种相互作用：

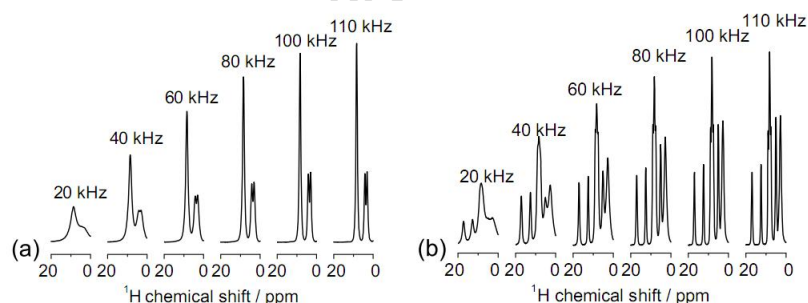
$$H = H_Z + H_{RF} + H_{CS} + H_D + H_Q + H_J$$

其中 H_D 代表核与核间的偶极-偶极耦合相互作用 ($0 \sim 10^5$ Hz)，当同核间的 H_D 很大，魔角旋转频率需满足 $\omega_R \gg |H_D|_{\max}$ ，可消除同核 H_D 。

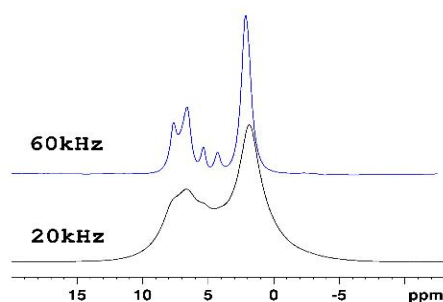
$$\omega_D = H_D^{H-H} = \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} = 120 \text{ kHz} \quad (r=0.1 \text{ nm})$$

$$\omega_D = H_D^{H-C} = \frac{\gamma_C \gamma_H \hbar}{r^3} = 30 \text{ kHz} \quad (r=0.1 \text{ nm})$$

为了获得刚性固体材料“类液态”的高分辨氢谱，关键之处在于魔角旋转的频率要远高于 ^1H - ^1H 偶极耦合（至少 70 kHz）。2021 年，Samoson 实验室将 MAS 提高至 200 kHz。自 2012 年起，日本电子和布鲁克公司相继推出了商业化的超高速魔角旋转探头 (>110 kHz)。由于近十年来该技术的飞速发展，固体核磁高分辨氢谱在各类分子体系的结构和动力学研究中引起了广泛关注。图 1 显示了不同旋转速度下的固体 ^1H NMR 谱，图 2 是化学所某种材料不同转速下的固体 ^1H NMR 谱。



● 图 1、不同旋转速度下 (14.1 T) 的固体 ^1H NMR 谱 (a) 甘氨酸 (b) L-组氨酸·HCl·H₂O (该图摘自参考文献^[2])。



● 图 2、实测某种材料不同转速下 (11.74 T) 的固体 ^1H NMR 谱。

举例 2

当 MAS 频率远低于各向异性相互作用的大小时，信号强度分布在大量旋转边带上，最强的峰值不一定是我们需要的中心带样品峰。为了确定样品峰的位置，需要多次改变 MAS 频率或/和进行数值模拟。超高速魔角旋转技术可以有效减少旋转边带的数量，提高信号强度，同时可以很容易区分样品峰和旋转边带^[4]，如图 3 所示。

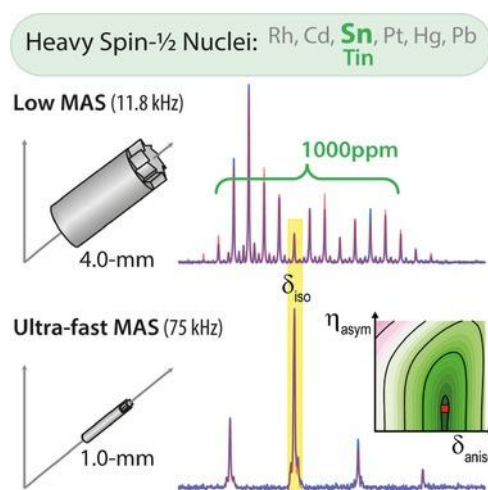


图 3、不同 MAS 频率下 SnO 固体的 ^{119}Sn NMR 谱（该图摘自参考文献^[4]）。

综上，化学所新安装的 600 兆固体核磁超高速魔角旋转探头可有效开展高分辨氢谱；固体二维异核相关谱；四极核和强各向异性核的超高速 NMR 研究；同时对氢对氟去耦的碳谱或杂核测试等，为固体核磁超高分辨测定提供了一个新的手段。

参考文献：

- 1、 R. C. Zhang, K. H. Mroue, A. Ramamoorthy, Proton-based ultrafast magic angle spinning solid-state NMR Spectroscopy, *Acc. Chem. Res.* 2017, 50, 1105.
- 2、 Y. Nishiyama, Fast magic-angle sample spinning solid-state NMR at 60-100 kHz for natural abundance samples, *Solid State, Nucl. Magn. Reson.* 2016, 78, 24.
- 3、 Y. Ishii, R. Tycko, Sensitivity enhancement in solid state ^{15}N NMR by indirect detection with high-speed magic angle spinning, *J. Magn. Reson.* 2000, 142, 199.
- 4、 A. C. Poppler, J. P. Demers, M. Malon, A. P. Singh, H. W. Roesky, Y. Nishiyama, A. Lange, Ultrafast magic-angle spinning: benefits for the acquisition of ultrawide-line NMR spectra of heavy

spin-1/2 nuclei, *ChemPhysChem*. 2016, 17, 812.

气体团簇刻蚀在有机及无机材料深度剖析中的应用

► 章小余 赵志娟

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

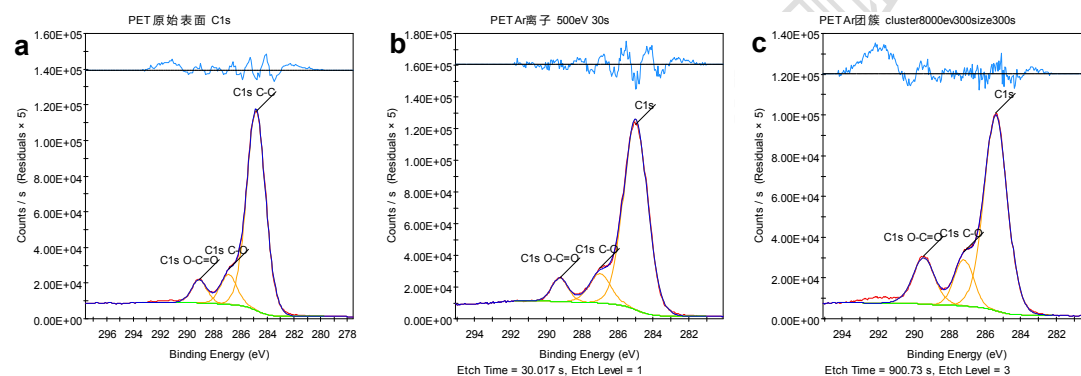
X 射线光电子能谱仪 (XPS) 是一种表面敏感的分析技术, 其分析深度约 10 nm, 它提供的仅是样品表面的元素定性、定量与化学态信息, 并不能直接反映样品体相的化学状态。然而在研究各种材料的镀层, 有机/无机材料的界面, 检测生物器件上等离子沉积镀层以及研究有机发光电子器件 (如 OLED) 和太阳能电池的工作中, 我们需要将 XPS 技术扩展到材料内部结构的分析, 对此我们结合离子刻蚀方法来剖析不同深度范围内元素及化学态的变化。对于有机/聚合物材料和无机/氧化物材料进行深度剖析时, 由于传统的单粒子源 Ar^+ 离子在刻蚀过程中很容易造成材料化学结构的破坏, 引起表面元素化学态改变, 因此针对这类材料的刻蚀我们通常选用气体团簇离子源, 可以实现无损深度剖析从而获得材料表面的本征化学结构信息。

本工作使用多技术集成型光电子能谱仪 (型号 NEXSA) 的 Ar 单离子和气体团簇离子源, 以聚合物 (有机材料) 和氧化物 (无机材料) 为研究对象, 进行了一系列的对比实验, 研究上述两种刻蚀模式下对材料表面结构的损伤, 以及不同刻蚀参数对测试结果的影响。下面具体介绍我们的实验结果及分析案例。

1、有机和无机材料表面吸附/污染层的清洁

以聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 和二氧化钛 (TiO_2) 为例, 我们分别采用 Ar^+ 离子和 Ar 团簇离子模式进行溅射, 测试的 XPS 高分辨谱见图 1 和图 2。对于有机聚合物 PET 样品, 结合表 1 中 $\text{C}1s$ 的相对含量分析, 对于未刻蚀的样品表面 (图 1a), C-C 结构相对强度明显更高, C-C/C-O/C=O 的比例约为 10.5:1.4:1 说明表面除了本征 C-C 结构外还含有较多的污染碳; 当使用能量为 500 eV 的 Ar 单离子清洁聚合物表面 (图 1b), 虽然 C-C 结构相对强度降低 (表面污染碳被清除), 但 C-C/C-O/C=O 的比例为 8:1.6:1, 显然即使在低能量单离子刻蚀的情况下 PET 中的碳氧结构也不可避免地被破坏, 不能准确反映材料本征化学结构; 当使用 Ar

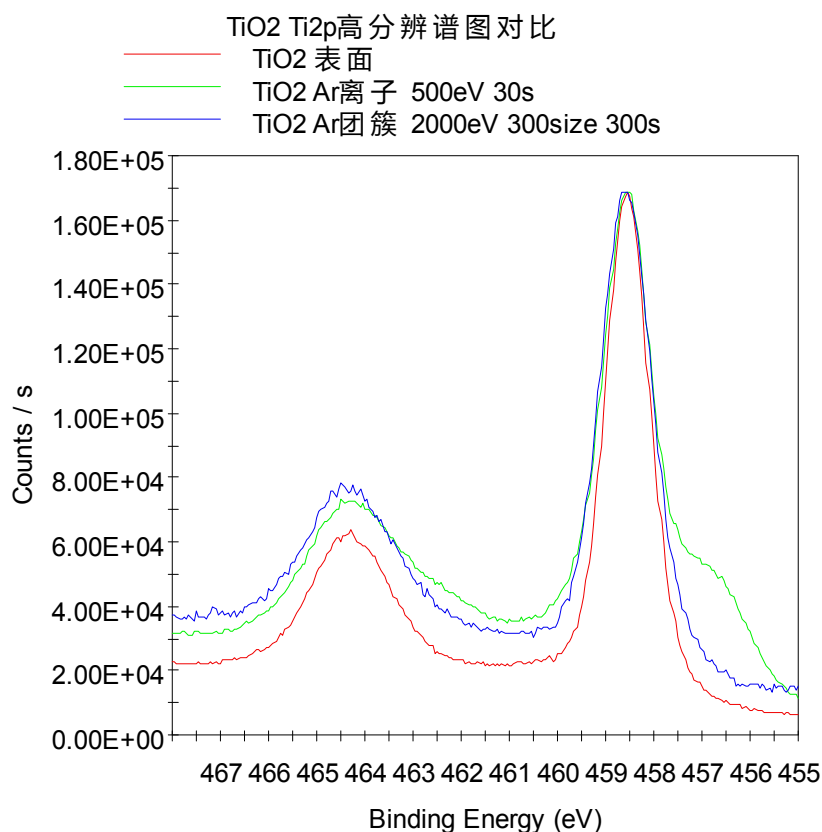
团簇离子源清洁聚合物表面（图 1c），拟合定量结果显示 C-C/C-O/C=O 的比例为 3:1:1，与 PET 结构的化学计量比一致，说明团簇离子源在清除污染碳的同时并未造成材料本征结构的破坏，由此可见团簇刻蚀可以有效清洁样品表面并真实反映材料化学结构信息。对于无机氧化物 TiO₂ 样品，结合表 2 中 Ti2p 的相对定量结果分析，相比于未刻蚀的样品，当使用 Ar 团簇离子源清洁 TiO₂ 表面，在清除表面污染层（主要是 C/O 污染）的同时，Ti 元素仍然都是以纯 Ti⁴⁺氧化物形式存在，而即使使用低能量（500 eV）的 Ar 单离子清洁表面，在较低结合能处出现了明显的低价态的 Ti2p 光电峰（如图 2 所示），拟合定量结果显示大约有 22% 的 Ti 被还原，说明单离子刻蚀对氧化物材料存在不可避免的刻蚀还原问题，在涉及此类材料的深度剖析研究中需要引起重视。



● 图 1、PET 的 C1s 高分辨谱图: (a) 样品表面; (b) Ar⁺离子刻蚀 (Ar⁺离子能量 500 eV); (c) 气体团簇离子刻蚀 (团簇离子能量 8000 eV, 300 size)。

表 1、PET 中 C 元素不同化学态的百分含量

清洁方式	C1s C-C (%)	C1s C-O (%)	C1s O-C=O (%)
未刻蚀	81.4	10.84	7.76
Ar ⁺ 离子刻蚀	75.55	15.17	9.28
Ar 团簇刻蚀	62.6	18.3	19.1



● 图 2、TiO₂ 表面及刻蚀后的 Ti2p 高分辨谱图。

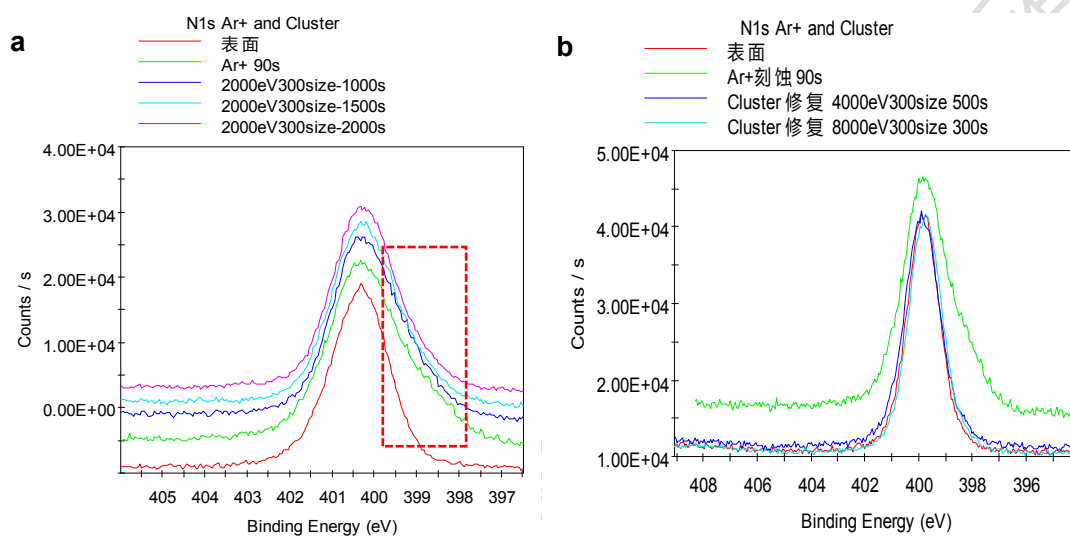
表 2、TiO₂ 中 Ti 元素不同化学态的百分含量

清洁方式	Ti2p TiO ₂ (%)	Ti2p 还原 (%)
未刻蚀	100	-
Ar ⁺ 离子刻蚀	77.98	22.02
Ar 团簇刻蚀	100	-

2、有机/聚合物材料的深度剖析

气体团簇离子源的能量在溅射时平均分散到每个 Ar 原子上的能量只有几个 eV~100 个 eV 的量级，可极大减少样品表面的破坏损伤。但是团簇溅射速率比单离子低很多，因此在实际测试中为了提高测试效率通常采用单离子和团簇离子交替刻蚀的方法，第一步用单离子快速剥离至目标深度，第二步用团簇离子去除单离子刻蚀损伤层，两种模式联合应用可有效避免单一模式所存在的不利影响。以聚酰胺 (PA) 材料为例，我们先采用 Ar⁺离子模式溅射，再采用 Ar 团簇离子模式去除单离子刻蚀损伤层，测试的 XPS 高分辨谱见图 3。从图 3a 中 XPS 高分辨谱

图可以看到，PA 表面的 N 是单一的酰胺键结构，但 Ar^+ 离子刻蚀 90 s 后，N1s 谱峰在较低结合能处出现明显的不对称，这是由于单离子刻蚀引起的损伤。此时，我们采用团簇离子溅射来去除损伤层。当采用低能量的团簇（2000 eV）离子溅射 2000 s 仍未将损伤层去除；而团簇离子能量提高到 4000 eV 溅射 500 s 或 8000 eV 溅射 300 s 时单离子损伤层则完全去除（见图 3b）。因此，在测试中我们需根据样品情况来选择合适的能量进行深度剖析，在实现高效分析的同时获得真实准确的化学态信息。



●图 3、PA 的 N1s 高分辨谱图：（a）表面、 Ar^+ 离子溅射（500 eV，90 s）与 Ar 团簇（2000 eV）溅射不同时间的对比图；（b）表面、 Ar^+ 离子溅射与 Ar 团簇（4000 eV 和 8000 eV）溅射不同时间的对比图。

3、无机/氧化物材料深度剖析

虽然 Ar 团簇离子源溅射时分散到每个原子上的能量很低，但是更高能量的团簇离子对一些无机/氧化物材料也会造成一定程度的损伤。以 TiO_2 和 CeO_2 为例，我们采用 Ar^+ 单离子和不同能量的 Ar 团簇离子对样品进行溅射，测试的 XPS 高分辨谱见图 4。我们结合氧化物表面的 $\text{Ti}2p$ 和 $\text{Ce}3d$ 的高分辨谱图分析，氧化物表面是以 Ti^{4+} 和 Ce^{4+} 氧化物形式存在；样品表面采用低能量的单离子溅射 30 s 或者分别在团簇能量 4000 eV、6000 eV 和 8000 eV 溅射 300 s 后，在 $\text{Ti}2p$ 和 $\text{Ce}3d$ 谱峰较低结合能处均出现明显的不对称，说明溅射后氧化物结构被破坏，氧化物在一定程度上被还原。而当团簇能量为 2000 eV 即使溅射 1200 s 后， $\text{Ti}2p$ 和 $\text{Ce}3d$

谱峰仍然是以单一结构的氧化物形式存在，并未对材料化学结构造成破坏。因此，我们在采用 Ar 团簇溅射氧化物（无机材料）时，应根据样品情况对测试条件进行摸索对比后选择合适的溅射能量再进行实验，以确保获得材料真实的化学结构信息。

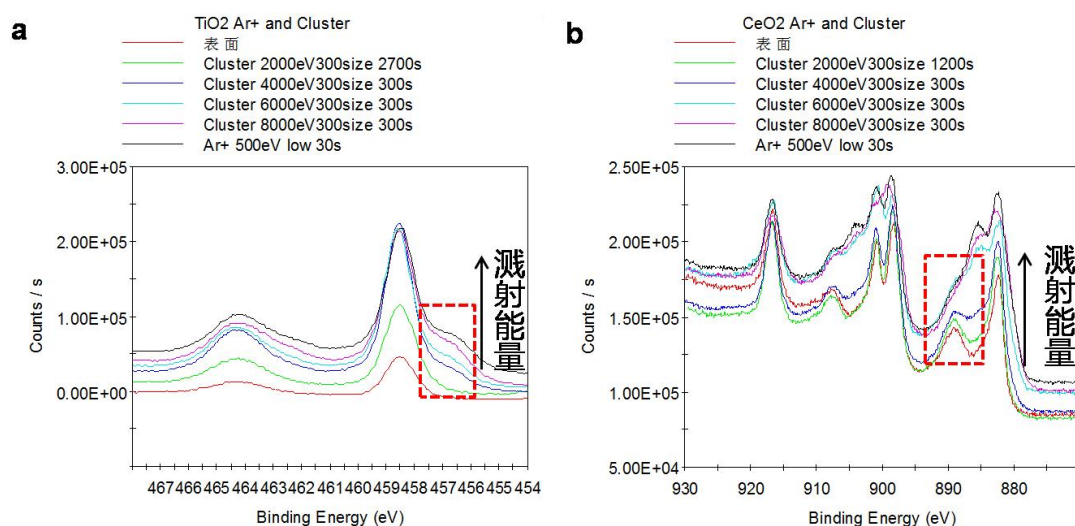


图 4、样品表面、Ar⁺离子刻蚀后与不同能量的 Ar 团簇溅射对比图：（a）TiO₂ 的 Ti2p 高分辨谱图；（b）CeO₂ 的 Ce3d 高分辨谱图。

总的来说，XPS 是目前材料研究中非常有用且有效的一种表面分析方法，研究者们更关注材料多维度的信息以更好地研究材料特性，解释机理问题。在材料深度剖析方面，气体团簇离子源的应用弥补了单粒子源的不足，拓展了 XPS 在材料分析领域的应用，我们将继续探索 Ar 团簇离子在不同类型材料体系深度剖析方面更好更深入的应用。

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！

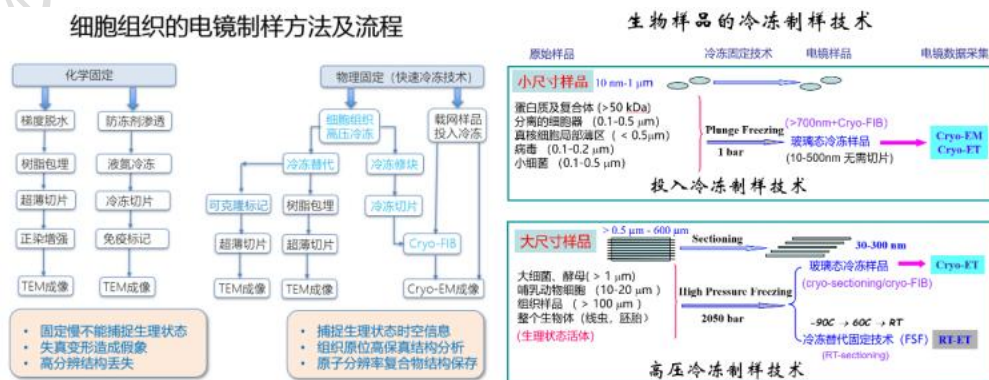
生物样品的冷冻制样技术及应用

▶何万中 梁丽荣 关波

(分析测试中心生物电镜组 Tel: 010-82698318 Email: hewanzhong@iccas.ac.cn)

一、背景

生物样品通常需要在含水条件才能保持结构稳定，而电镜则要求样品高真空条件下成像而且样品不能太厚（不超过电子平均自由程，通常为 200~500 nm），因此生物电镜制样需要解决样品稳定性及厚度、水分子、高真空等问题。传统生物电镜制样通常采用化学固定技术，化学交联固定含水样品，然后脱水、树脂包埋聚合、超薄切片、重金属染色制作出干燥的电镜样品；对于免疫标记则对化学固定后的生物样品，经 2.3 M 蔗糖（防冻剂）包埋后，缓慢冷冻成固态，然后低温切片，水化免疫标记、最后重金属负染干燥制作出电镜样品。然而，传统制样技术不可避免地会造成生物样品高分辨率结构信息损失和变形。上世纪 70~80 年代以后，科学家们探索出了高保真的物理固定技术，即快速冷冻制样技术将水分子迅速固定为玻璃态固体来解决高分辨率生物分子结构在真空中的稳定性问题，如投入式冷冻技术^[1]（plunge freezing, Dubochet 博士因发明该技术获得 2017 年诺贝尔化学奖）、镜面冷冻、丙烷喷射冷冻、高冷冻技术^[2,3]（high pressure freezing, Moore, 1987）等，这些冷冻制样技术的普及促进了生物冷冻电镜的飞速发展。生物样品冷冻固定之后，与后期冷冻制样技术衔接以满足电镜观察要求，如冷冻替代固定技术、冷冻超薄切片技术、冷冻蚀刻技术、冷冻聚焦离子束减薄技术（Cryo-FIB 技术）等。本文将着重介绍着生物电镜常用冷冻固定技术及其应用情况（图 1）。



●图 1、生物电镜制样技术

二、快速冷冻技术原理

快速冷冻技术（如最常用的投入式冷冻、高压冷冻等）是通过快速物理降温方式固定生物样品，让样品中水分子来不及调整位置取向结晶成冰晶体，就被快速凝固成玻璃态水，从而保存生物分子的近生理状态高分辨率结构。冷冻后的生物样品，如果厚度超过了 500 nm，通常需要进一步整合衔接冷冻制作超薄电镜样品的其他制样技术，如冷冻超薄切片技术，Cryo-FIB 技术，冷冻替代固定与树脂超薄切片技术。下面介绍几种常用技术的基本原理。

A. 投入式冷冻技术（Plunge freezing）

溶液中的生物样品，如蛋白质、大型蛋白质复合物、分离的亚细胞器、病毒、细菌、细胞等，如果样品厚度在 10 μm 以下，一般采用投入式冷冻技术进行物理固定。关于纯水的冷冻，因水和冰的导热系数都非常低，需要非常高的降温速率（ -10^6 K/s）条件才能在常压下避免水分子结晶制作出大约 200 nm 厚度的玻璃态冰，超快的冷却速度让水分子来不及结晶就被凝固下来。Dubochet 等人在上世纪 80 年代初（Dubochet & McDowell, 1981），系统探索了含水样品的快速冷冻技术，发明了投入式冷冻技术^[1]，即将大约 4~5 μL 含水生物样品悬液加载到铺有多孔碳膜的电镜载网上，然后用滤纸吸走多余液体，载碳膜微米级小孔中因水的表面张力形成大约 100~200 nm 厚度的含样品水层，快速插入液氮（ -196 $^{\circ}\text{C}$ ）预冷的液态乙烷（ -183 $^{\circ}\text{C}$ ），或者丙烷（ -188 $^{\circ}\text{C}$ ），或者 1:1 乙烷/丙烷（ -196 $^{\circ}\text{C}$ ）液体中，快速冷冻制作出玻璃态的含水生物样品，实现样品原始状态下原子分辨率结构冻存。该技术简单有效，目前冷冻电镜得到了广泛的应用，在此基础上也派生出了其他改进型的各种制样技术方案。需要指出的是，投入冷冻技术只适合制作厚度小于 10 μm 的样品，因为水的导热差，厚样品中的热量无法及时移走而导致结冰样品损坏。单层细胞冷冻后，可以配合后面介绍的 Cryo-FIB 减薄技术制作出适合电镜观察的样品。

B. 高压冷冻技术（High pressure freezing）

电镜制样技术发展早期，大块组织样品的冷冻需要加入防冻剂（如二甲基亚砜，甘油，乙二醇，蔗糖等），抑制溶液中水分子在降温过程中结晶形成冰晶体，但这种方法不仅会改变生物分子结构，还会严重影响电镜成像质量。1968 年 Moor 和 Riehl 在罗马电镜会议上提出不要防冻剂的高压冷冻制样的新概念^[3]（1968），

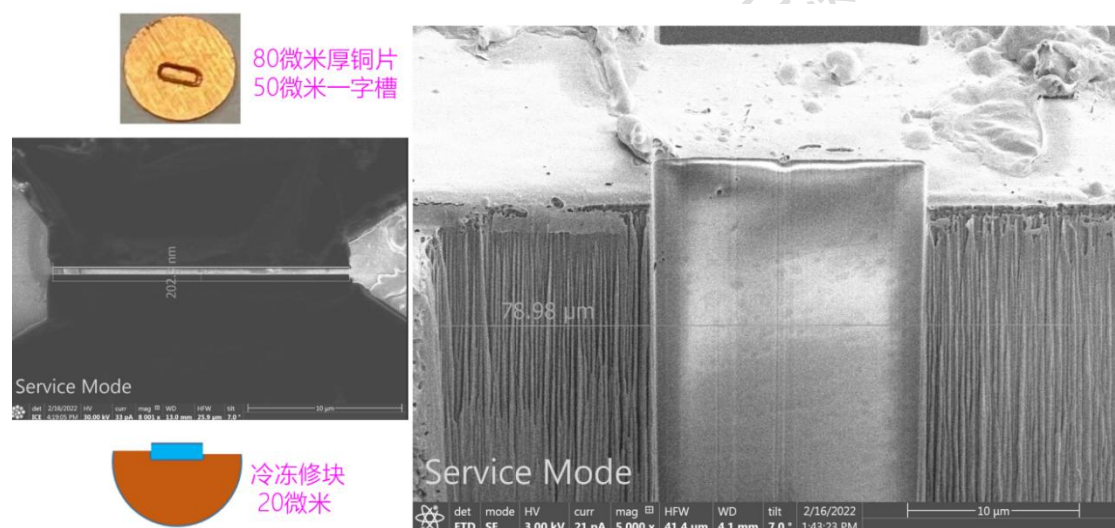
并于 1987 年推出首款商业化高压冷冻机 BalTec HPM-100 (Moor, 1987) [2]。高压冷冻是基于勒夏特列原理 (Le Chatelier)：若热动态平衡系统中某个物理量的改变，会导致平衡会朝减小这种变化的方向移动。常压下，水分子之间在 0 °C 时会以正六边形方式形成氢键（能量最低）而结晶，但冰的体积比相应液态水的体积增大 1/9，因此会严重破坏样品结构。对于高压冷冻情形，当对溶液施加 2045 bar 冷冻时，高压会促使系统朝减少体积方向移动，会抑制溶液形成常压下的体积增大的结晶方式避免形成低密度冰晶。2045 bar 高压会导致水的冰点降低至 -22 °C，同时改变水的黏度，大大抑制了冰晶生长速率（比常压下低~1500 倍），从而在低导热系数的水或冰中，以较低降温速率（ $10^3\sim 10^4$ K/s）情况下避免较厚样品中水分子的结晶，最佳条件下高压冷冻可以制作 200 μm 厚度玻璃态的生物组织样品。因为高压冷冻技术不用防冻剂同时抑制了低密度六方冰晶的形成，从而避免了因体积增大导致的细胞组织结构损伤，因此可以用来固定高分辨率的大块组织样品（100~200 μm ），是目前用来捕捉近生理状态原位精细结构的利器。除了外源施加高压外，最近也有研究人员探索了自增压快速冷冻技术 (SPRF) [4]，就是将含水生物样品封装在密闭空间内（如 0.65 mm 直径铜管），放入液氮或液态乙烷中冷冻，随着外层六方冰晶形成，因六方冰晶密度低于水会导致管内自增压到 2000 bar，最后管中心样品无法形成冰晶而以玻璃态凝固。

C. 冷冻超薄切片技术 (Cryo-sectioning, CEMOVIS)

快速冷冻冷冻（投入式冷冻和高压冷冻）固定的玻璃态生物样品，如果厚度超过 500-1000 nm，尤其是大块组织样品（100~200 μm ），通常不适合直接电镜成像，需要后期冷冻超薄切片处理。冷冻超薄切片技术就是维持玻璃态的冰包埋条件进行超薄切片，常压下玻璃态冰重结晶温度为 -135 °C，因此冷冻超薄切片需要在 -140 ~ -160 °C 范围的冷冻腔内进行，避免重结晶破坏样品结构。冷冻超薄切片技术面临很多问题，样品的褶皱压缩、裂纹、划痕、卷曲等变形，还有静电影响，因此一般很难得到好的切片，而且电镜下导电导热差，因此目前基本上无法推广使用[5]。但冷冻超薄切片技术可用来修剪较厚的组织样品（50~200 μm ），得到 20 μm 厚度的样品用于后面介绍的 Cryo-FIB 技术进一步加工制作 100~300 nm 超薄冷冻电镜样品。

D. 冷冻聚焦离子束切割技术 (Cryo-FIB 技术)

聚焦离子束切割技术已经广泛应用于材料科学中的电镜制样，其基本原理就是将 Ga^+ 离子（或者其他离子）加速通过电磁透镜聚焦到纳米级离子束，轰击样品实现样品的精确切割。2007 年 Marko 等人发展了在低温条件下对冰冻含水样品的 FI 切割技术^[6]，冷冻聚焦离子束切割需要引入专门的冷冻传输装置和冷台机温控系统保证整个过程样品温度维持在 $-140\text{ }^\circ\text{C}$ 以下，还需要在样品表面喷镀一层有机铂保护样品免受辐照损伤，离子束的束流需要精确控制。冷冻样品可以是直接冷冻在电镜载网上，也可以是经冷冻超薄切片机修块至 $20\text{ }\mu\text{m}$ 厚度的大块样品。Cryo-FIB 目前已有细胞和组织样品的详细具体操作流程^[7-9]。我们最近设计了一种带“一字型”槽的 $80\text{ }\mu\text{m}$ 厚度铜片用于制作小鼠皮肤组织的高压冷冻样品，经冷冻切片粗修至 $20\text{ }\mu\text{m}$ 厚，然后进行 Cryo-FIB 减薄成功制作出 200 nm 厚度的冷冻电镜样品（图 2）。



●图 2、高压冷冻的小鼠皮肤组织制作 Cryo-FIB 减薄的冷冻电镜样品（姜招弟、梁丽荣协助 Cryo-FIB 制样）。

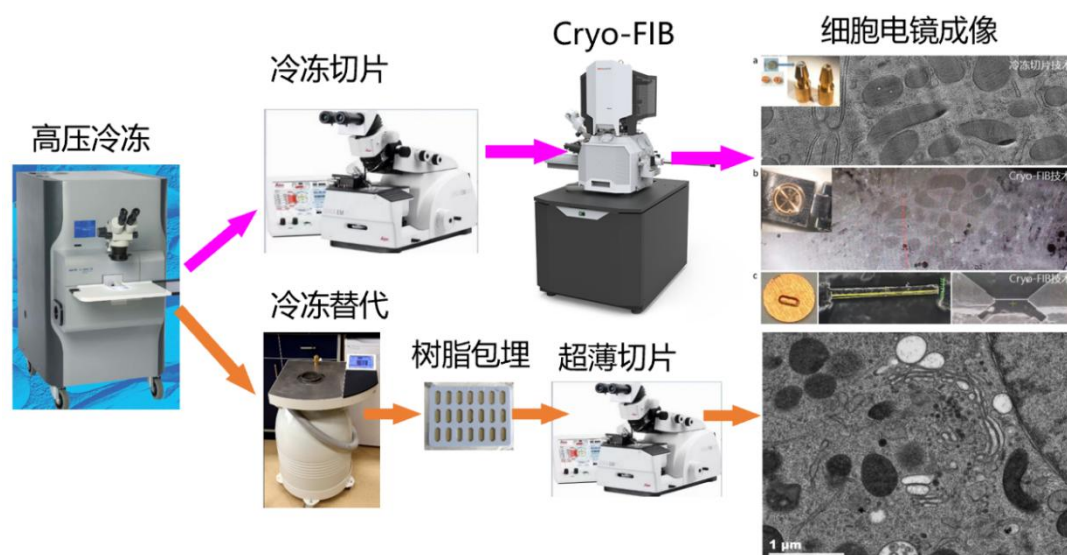
E. 冷冻替代固定技术（Freeze-substitution fixation）

快速冷冻的生物样品，除了前面提及的冷冻切片或者Cryo-FIB切割外，还有一种广泛使用的后期制样技术，就是冷冻替代固定技术^[10]。含水生物样品中通常含有蛋白质、电解质和其他可溶物，因此跟纯水的重结晶温度（ $-135\text{ }^\circ\text{C}$ ）有所不同，通常温度升高至 $-90\text{ }^\circ\text{C}$ 也不会发生明显的重结晶。冷冻替代固定技术，就是将冷冻样品放入含有化学固定剂（如 1~2% 四氧化锇、0.1% 醋酸铀、0.01% 揉

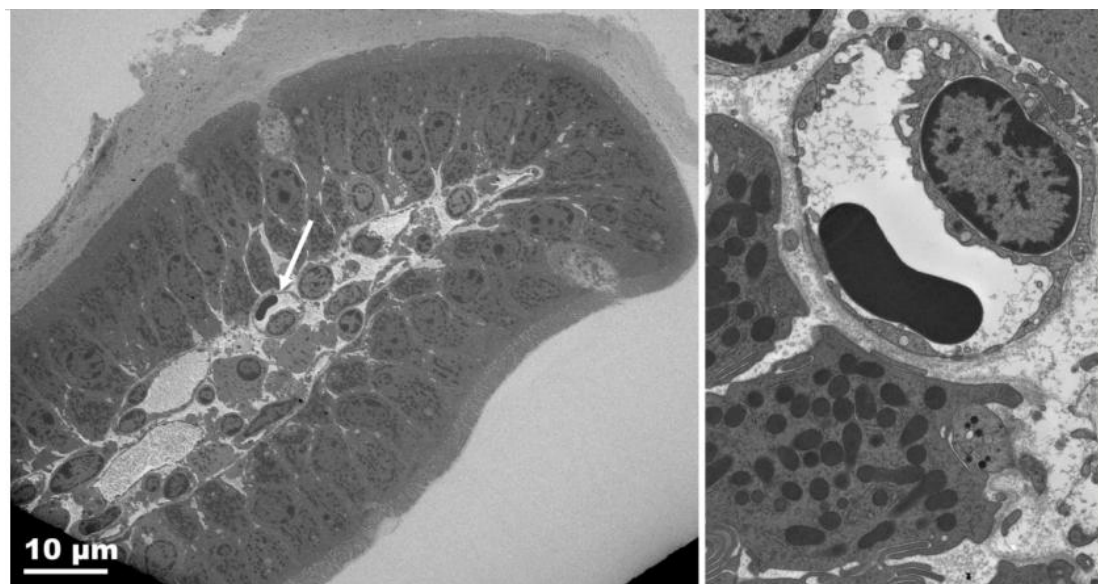
酸、0.5%戊二醛等)的预冷丙酮(或者其他有机溶剂如乙醚、甲醇等)中,样品从-196 °C升温至-90 °C停留8~24小时,丙酮分子会缓慢溶解替代样品中的水分子,让化学固定剂逐步渗入并交联样品中的蛋白质分子,而大的生物分子在-90 °C低温下运动幅度很小基本保持原位不动被交联固定下来,然后逐步升温到-60 °C、-30 °C、4 °C实现完全脱水固定,最后在室温用树脂渗透包埋聚合。聚合后的冷冻替代样品经室温超薄切片重金属染色后,进行电镜观察。冷冻替代可以很好地保存3~5 nm分辨率的细胞精细结构,样品分辨率和保真度都远比传统化学固定技术的样品好,而且可以连续切片(50~300 nm)大规模观察(可弥补Cryo-FIB及冷冻切片等有损制样的不足)。

三、应用实例

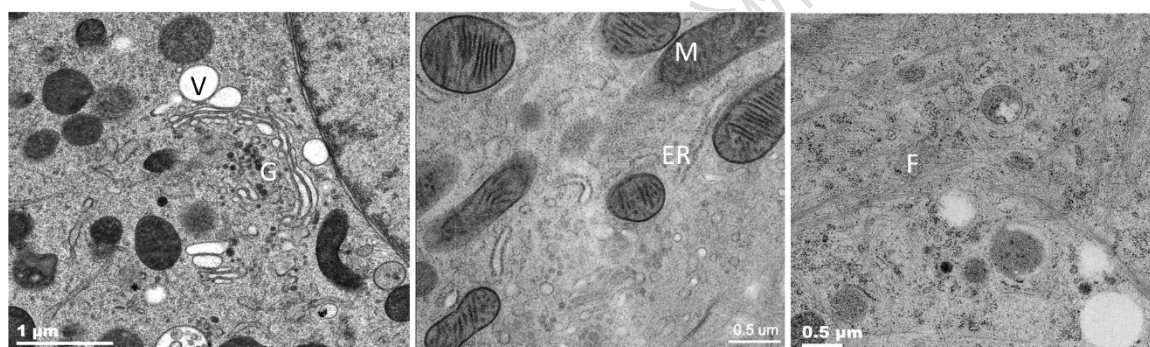
以生物组织样品制作流程为例(图3),经过高压冷冻固定制作含水生物组织玻璃态固定样品,可以经过冷冻切片及Cryo-FIB制作出适合冷冻电镜成像的200 nm薄片电镜冰冻样品,或者经过冷冻替代固定脱水,然后树脂包埋聚合,超薄切片制作出70~120 nm厚度电镜薄片样品。优化的高压冷冻技术可以制作出完全不结冰的玻璃态固定样品,经过冷冻替代脱水,可以得到高保真的组织原位精细结构(图4),室温电镜下可以得到精细的各种细胞器超微结构(图5)。



●图3、生物组织样品的高压冷冻、冷冻切片、冷冻替代,超薄切片、Cryo-FIB电镜制样流程图(姜招弟、许淑曼、梁丽荣协助Cryo-FIB制样)。



●图 4、高压冷冻-冷冻替代固定制作的小鼠小肠绒毛组织样品电镜图像，箭头所指部分为毛细血管，右图为箭头所指的放大图，整个绒毛完全避免了冰晶损伤。



●图 5、高压冷冻-冷冻替代固定制作的细胞组织样品电镜图像，展示保存结构完好的膜泡（V），高尔基体（G），线粒体（M），内质网（ER）和微丝（F）等精细结构。

四、展望与讨论

目前冷冻电镜领域，纯化的蛋白质及大型复合物的原子分辨率结构的冷冻电镜单颗粒解析方法已经常规化，但生物组织原位结构的冷冻电镜研究正逐步称为蓬勃发展的新热门方向。生物组织的冷冻电镜样品制作，目前制样难度大、成功率低、通量低，比较依赖制样人员的技术经验。动物组织样品对生理状态变化十分敏感，因此对制样技术有极高的要求，我们大量的高压冷冻制样技术经验表明，捕捉生理状态原位结构，对实验人员的制样技能要求极高。我们今后会在生物样品生理状态快速取样、高压冷冻机高压样品腔、样品盘的导热设计以及低毒防冻等进行改进设计，以降低制样技术经验的依赖度，实现高可靠、高成功率、高通

量的冷冻电镜制样。目前单细胞的 Cryo-FIB 制样技术已经较为成熟，但组织原位结构的 Cryo-FIB 制样方法尚处于初步探索阶段，需要很多方面的开拓，如生理状态捕捉、高成功率的冷冻制样、精准的修块及目标定位的 Cryo-FIB 减薄技术（如三维荧光关联定位^[9]）。

参考文献:

- 1、Dubochet, J. & McDowell, A.W. , Vitrification of pure water for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **1981**, 124, RP3.
- 2、Moor H., Theory and practice of the high pressure freezing, *Cryotechniques in biological electron microscopy* (Ed. Steinbrecht R.A, Zierold K.), Berlin : Springer-Verlag, **1987**,175.
- 3、Moor H, Riehle U, Snap-freezing under high pressure: A new fixation technique for freeze-etching. In: Steve Bocciarelli D (ed) *Electron microscopy 1968*, 2, Proc 4th Eur Reg Conf Electron Microsc, Rome, 33.
- 4、LEUNISSEN J.L.M. & YI H. , Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy, *Journal of Microscopy*, **2009**, 235, 1, 25.
- 5、Al-Amoudi A., Cryo-electron microscopy of vitreous sections, *The EMBO Journal*, **2004**, 23, 3583.
- 6、Marko M, Hsieh C, Schalek R, Frank J, Mannella C. , Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nature Methods*, **2007**,4(3),215.
- 7、Wagner, F.R., Watanabe, R., Schampers, R. *et al.* Preparing samples from whole cells using focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography. *Nature Protocol*, **2020**, 15, 2041.
- 8、Zhang J. et al., VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography, *Journal of Structural Biology*,

2021,213, 107763.

9、Li W et al., Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation. *Nature Methods*, **2023**, doi: 10.1038/s41592-022-01749-z.

10、He W., He Y., Electron Tomography for Organelles, Cells, and Tissues, *Methods in Molecular Biology* (Ed. John Kuo) **2014**, Humana Press, 1117, 445.

致谢:

高压冷冻制样、冷冻替代固定及冷冻切片制样技术得到了北京生命科学研究
所姜招弟博士的大力支持; Cryo-FIB制样技术得到南方科大许淑曼的大力支持。
感谢科技部973项目(2011CB812502, 2014CB849902)和中科院化学所启动项
目(E28003BZ3)的经费支持。感谢分析测试中心丁丽萍的审核编辑。

典型应用案例

应用 FLS980 稳态瞬态荧光光谱仪测试重叠的荧光和磷光发射

► 王 娴 刘美蓉

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

FLS980稳态瞬态荧光光谱仪是一种用于化学、材料科学领域的分析仪器。目前光谱组运行的FLS980配备有visible-PMT（检测范围 200~900 nm）和 NIR-PMT（检测范围500~1700 nm）光电倍增管检测器，脉冲激光器（EPL-LED-TCSPC和 EPL-Laser-TCSPC）和脉冲灯（ μs flashlamp-MCS）光源。采用时间相关单光子计数（TCSPC）技术测试 ps 或 ns 级的荧光样品寿命；单光子计数多通道扫描（MCS）技术测试 μs 到 ms 时间尺度的磷光样品寿命。

如图1所示，常见的PMT检测器通过高压将电子从光阴极驱动至阳极。电子倍增的过程在每个相邻的打拿极重复进行，而倍增的二次电子随后被阳极收集。因此电子倍增增益超过 1×10^7 是很容易实现的，从而实现高灵敏度荧光检测。高电子倍增增益需要注意的是PMT必须避免强光信号的照射，产生过多电流使 PMT饱和并可能损坏PMT。特别是当两种发射过程发生在完全不同的时间尺度（如荧光和磷光），PMT很可能因为过强荧光信号而饱和。事实上，许多实际样品同时显示出荧光和磷光发射，这使得重叠在荧光发射范围内的磷光寿命及光谱的测试十分具有挑战性。解决这个问题最好的方法是对PMT进行定时控制，以保护它不被过度曝光。在本文中，将进一步介绍 FLS980中门控PMT在重叠的荧光和磷光发射测试中的应用原理和方法。

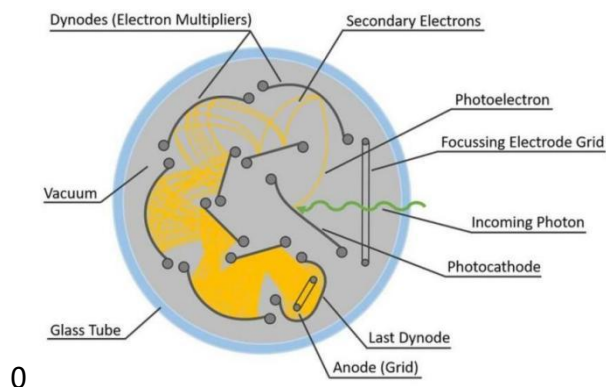
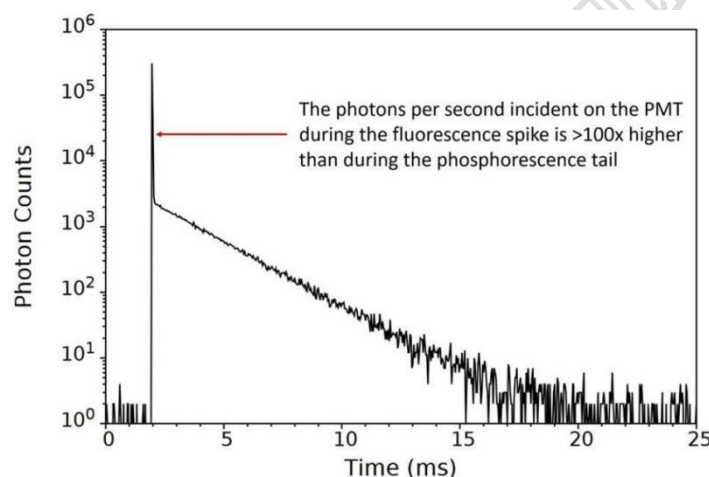


图1、环形排列的9倍增极侧窗PMT俯视图^[1]。PMT是一种真空管，包含光阴极、二次电子倍

增系统（打拿极）和阳极。

如磷光发射和荧光发射在波长上无法分离，在某个波长下测定磷光寿命时（MCS多通道扫描技术），荧光和磷光在此波长下的强度差异会对测试产生非常大的影响。图2为掺杂 Tb^{3+} 的荧光介质的光致发光衰减图。最前面的尖峰来自于荧光发射，而后面的长尾则来自于 Tb^{3+} 离子的磷光。可以看到，在荧光发射期间记录的光子数是磷光发射期间的约100倍，这反过来意味着在荧光发射期间，每秒钟撞击探测器的光子数是磷光发射期间的100倍。当PMT检测的信号速率（Events）超过1百万次/秒时，PMT检测器将开始饱和，光子计数则变得非线性。当采集的信号进一步增加时，PMT中的高电流将会导致电压下降和增益降低，从而造成磷光衰减曲线失真以及对PMT的损害。



●图2、没有PMT门控的情况下，测试掺杂 Tb^{3+} 离子的荧光介质的光致发光衰减图^[2]。

此外，测试磷光寿命的 MCS 技术本身也存在通道饱和极限，其受限于样品寿命和仪器响应函数（IRF）。图3是单指数衰减，时间窗口为10倍预估磷光寿命时，样品衰减测量和仪器响应函数测量的 MCS 饱和极限示意图。以激发脉宽 $1\ \mu s$ ，重复频率在 $0.1\sim 100\ Hz$ 可调的光源举例：（1）当采用 $10\ Hz$ 的脉冲灯频率，检测时间窗口为 $100\ ms$ 的磷光（寿命在 $10\ ms$ 内）时，饱和极限降至 300 次/秒；检测其IRF时，饱和极限降至 100 次/秒。（2）当采用 $100\ Hz$ 的脉冲灯频率，检测时间窗口为 $10\ ms$ 的磷光（寿命在 $1\ ms$ 内）时，饱和极限降至 1000 次/秒；检测其IRF时，饱和极限降至 1000 次/秒。此外，对于多组分衰变（在短时间内检测到更多的光子）和激光激发源的操作（对于IRF测量），这种情况将信号速率降到MCS

的饱和极限变得更加关键。因为PMT检测的信号速率一旦超出MCS饱和极限，窄时间通道内的光子将会溢出，磷光衰减曲线失真。

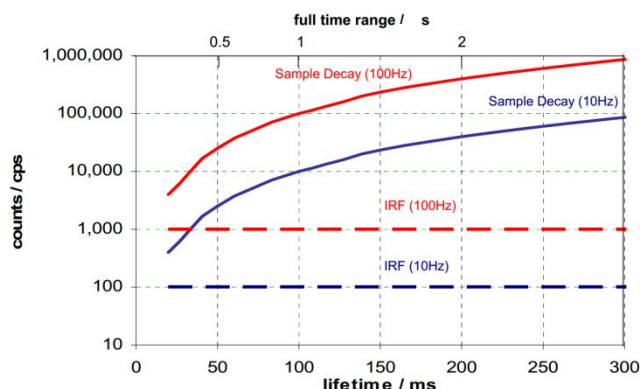


图3、样品衰减测量和仪器响应函数测量的 MCS 饱和极限^[3]。

为避免PMT检测器饱和以及 MCS 通道饱和，最简单的方式就是减弱到达PMT的光子数（通过降低激发能量或减小发射侧狭缝），从而将荧光峰的信号采集率降低到一个安全水平。然而，这对于磷光测试来说是极为低效的方法，因为在设置条件时，信号采集强度会受到短寿命荧光组分的限制，这会大大增加测量磷光衰减所需的时间。解决这个问题的高效解决方案是对PMT进行时间门控，这样在荧光发射期间就可以防止过度曝光（图4）。时间门控检测器是通过在PMT插口增加一个门控电路来实现的，它可以切断打拿极中前三个电子倍增器的电压；从而大大降低了PMT的电子倍增增益。FLS980软件可以设置门延迟（激光或闪光灯脉冲到门启动的时间）和门宽，从而实现仅在感兴趣的时间区域内检测，滤除高强度荧光。三个打拿极的切换提供了高荧光抑制（ $>1 \times 10^6$ 抑制比），这适合于大多数磷光发光物质。

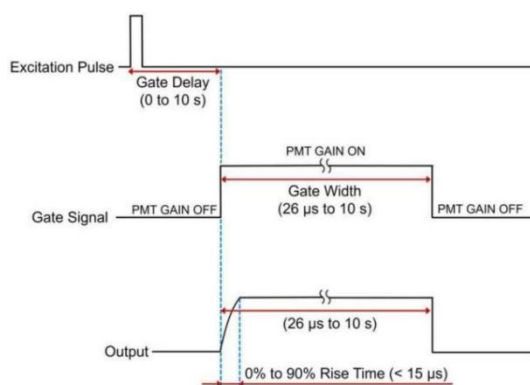
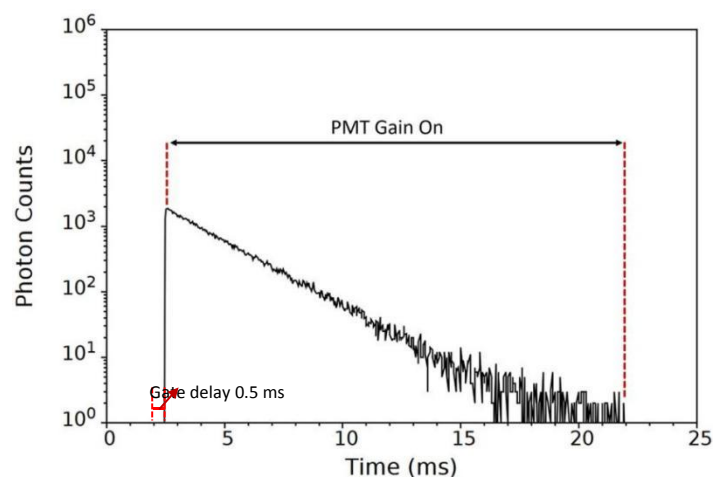


图4、FLS980门控检测器原理^[2]。

将掺杂 Tb^{3+} 离子的荧光介质使用门控检测器再次进行寿命测试，其结果如图5所示。门控延迟的时间设置为0.5 ms。图中可以看到去除荧光后的 Tb^{3+} 离子的磷光寿命衰减曲线。通过使用时间门控检测器，0.5 ms之前PMT检测器放大切断，强的荧光光子被抑制，0.5 ms之后PMT检测器放大重启，弱的磷光光子实现高电子倍增。因此我们可以设置更高的磷光信号采数率，以获得磷光衰减曲线的效率更高，而不会出现探测器荧光过强而使得检测器饱和的风险。



●图5、使用PMT门控检测器，测试具有荧光介质的 Tb^{3+} 离子的光致发光衰减图^[2]。

测试举例

磷光衰减测试本身受限于PMT检测器饱和极限以及MCS的通道饱和极限。测试磷光样品衰减时，样品被脉冲光源激发，光子数在脉冲光源低重复率下进行快速采集，此时其计数率限制需严格按照图3的MCS饱和极限设置。如图6所示，长余辉发光样品使用脉冲光源 μs flashlamp-MCS，灯频率为0.2 Hz，通道数为2000，Em cnts（每秒收集光子数）信号采集率分别设置为大于50000，小于3000和小于1000。停止条件均设置为峰值计数达到10万光子数（这里不加门控，以期展示未使用PMT门控时不同Em cnts计数率下磷光衰减差异）。该样品存在多个寿命，尾部拟合均能得到一个~200 ms（15%）和一个~1 s（85%）的寿命值。计数率越高，可以发现（1）荧光（初始时刻的尖峰）和磷光组分之间峰值光子比值的差异越小；（2）采集衰减曲线越迅速且越收敛；（3）总体平均寿命变长（平均寿命从1 s变长到1.2 s）。这里我们通过图3预估MCS通道饱和极限为1000 cnts，所以超过1000的计数率测试均出现了不同程度光子溢出现象。因此测试磷光衰减，需在MCS饱和极限范围内，合理设置狭缝大小，得到高的计数率值同时，防止光子

溢出等非线性增益，以高效获得准确的衰减值。

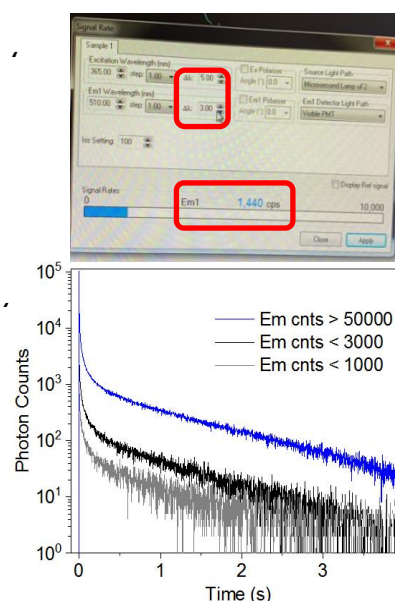


图6、(a) 设置不同激发和发射狭缝以获得不同 Em cnts信号采集率的软件界面；(b) 未使用PMT门控不同Em cnts信号采集率下的磷光衰减图。

PMT门控也是分离光谱中重叠荧光和磷光光谱的一种功能强大且易于使用的方法。当样品被脉冲闪烁氙灯激发时，在设定的具体某一门宽下的光子数被记录为发射光谱。例如，对多元发光物质的研究，需要精确的各发光光谱来计算能级分裂。当将样品冷却至78 K时，这些发光物质样品发射出主要的荧光（低温可排除热延迟荧光），并伴有少量重叠的磷光贡献。门控PMT可以用来分离荧光和磷光来获取荧光和磷光光谱，如图7所示。

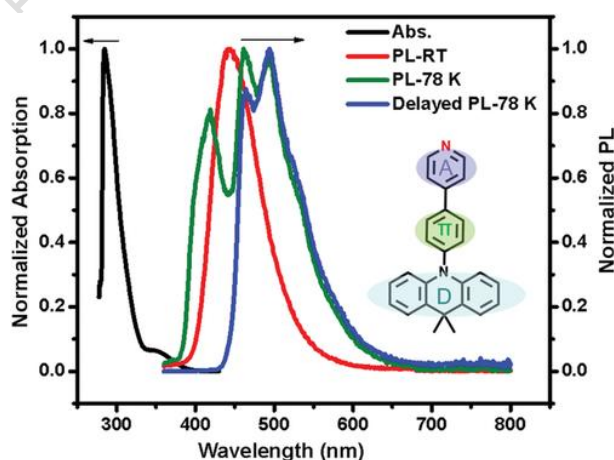
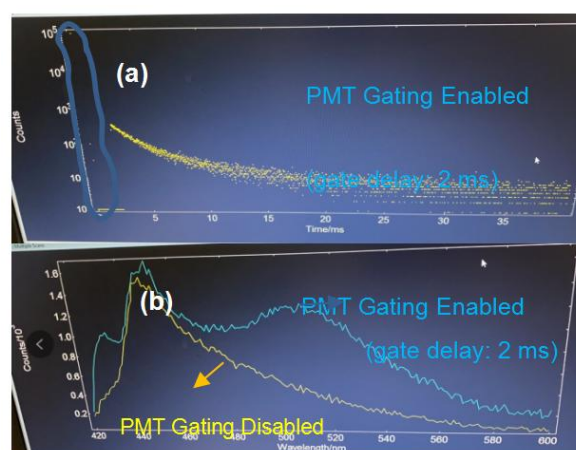


图7、DMACPPY甲苯溶液中室温和78 K下的发射光谱；门控延迟时间为0.1 ms^[4]。

对强荧光背景的磷光测试，PMT门控技术受限于其硬件条件并不能完全去除荧光贡献。如图8所示，为某荧光较强的固体样品（量子产率大于40%）在门控设置下的衰减图和光谱图。由图8a可见设置2 ms的门控，仍有较强荧光漏出，这部分荧光光子同样会反映在光谱收集上（图8b），虽然门控作用后有磷光峰出现，但荧光光谱仍存在。FLS980的门控PMT提供的是三个打拿极的切换（ $>1 \times 10^6$ 抑制比），若荧光背景（荧光和磷光在同一波长下的强度差 $> 1 \times 10^6$ ）强于门控的抑制比，那么存在荧光不能完全去除的现象。



●图8、（a）某样品在PMT门控下的磷光衰减图，信号最高处为荧光（未被完全抑制，有荧光漏出）；（b）使用PMT门控检测器没有去除该样品的荧光背景信号。

结论

门控PMT是测量样品中不同时间尺度的发射衰减曲线和发射光谱的一种非常好的选择和解决方案。通过时间门控，探测器可以去除荧光发射，从而快速高效地获得磷光衰减；此外，门控检测器可以用来从光谱中去除不需要的背景荧光，从时间上分离荧光和磷光，从而获得磷光光谱。

参考文献：

- 1、Photomultiplier Tubes Basics and Applications, 3rd ed. (Edition 3a), Hamamatsu Photonics, (2007).
- 2、FLS1000 荧光光谱仪之门控检测器的独有技术优势，
https://www.yiqi.com/zt74175/article_14553.html.
- 3、Multi-channel Scaling, Operation manual of FLS980 spectrometer.

测试技术及技巧

电位测定仪对固体样品中低含量氯元素的准确定量

► 李巧连

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

固体样品中氯元素定量一般多采用经典的氧瓶燃烧法对样品进行前处理，之后进行电位滴定。低含量样品在滴定过程中滴加体积很小，电位变化小，且容易发生过量滴定，不能准确判定等当点，造成测试不准确。本文探究了固体样品中低含量氯元素的定量方法，为卤素的精确定量提供新的方法参考。

一、实验方法介绍

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：

称量包样 → 配吸收溶液 → 充氧燃烧 → 吸收氧化 → 淋洗

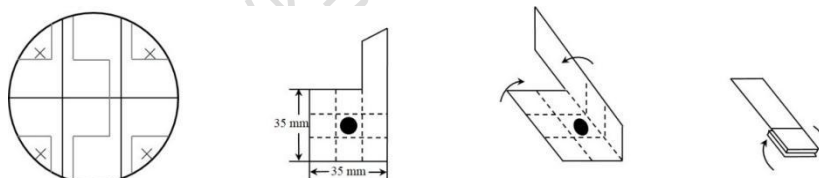


图 1、滤纸剪裁及包样折叠

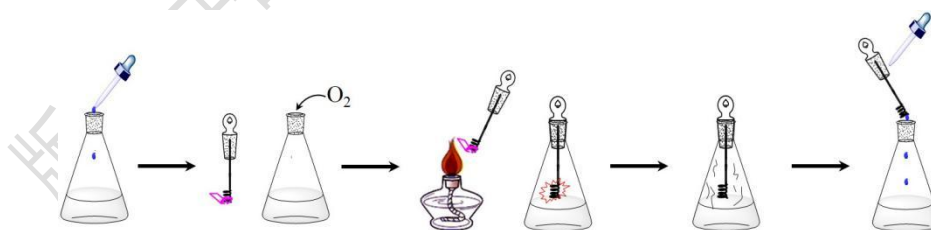


图 2、氧瓶燃烧法流程图

在锥形瓶中加入 4 ml 30% 的 H_2O_2 溶液及 2 滴 KOH 溶液 ($c(\text{KOH}) = 0.1 \text{ mol/L}$)。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超纯水少量多次淋洗瓶塞、铂丝及瓶壁，收集淋洗液待用。

2. 测试方法——电位滴定仪法

工作原理：在滴定过程中用氯离子选择性电极测量溶液电位，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。

标准溶液的配制及标定：用NaCl标准样品及超纯水配制浓度为0.002 mol/L的NaCl溶液。用NaCl标准溶液对理论浓度0.01 mol/L的AgNO₃标准溶液（外购）进行标定（标定三次取平均值，滴定度为1.010）。

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：

$$\text{Cl}\% = \{(V_{\text{样品}} - V_{\text{空白}}) \times c \times \text{TITER} \times M\} / (m \times 1000)$$

$V_{\text{样品}}$ ——样品消耗滴定剂体积 ml

$V_{\text{空白}}$ ——空白消耗滴定剂体积 ml

c ——AgNO₃ 名义浓度 mol/L

TITER——滴定度

M ——氯元素摩尔质量 35.453 g/mol

m ——样品质量 g

二、实验过程

将空白样品（空白-1，空白-2为平行样）及未知低含量样品7（7-1，7-2为平行样）按照样品前处理方法处理，淋洗液分别加入0.5 ml 5%的HNO₃溶液调节酸度后进行电位滴定实验，用水淋洗瓶壁瓶塞后收集的淋洗液其主要介质为水，其初始电位值比较高（约180 mV），在整个滴定过程中其电位没有发生明显突越，无法正确识别滴定终点，不能得到空白样品的滴定体积（图3左）。同样，未知样品在滴定过程中电位变化也不明显，由于小范围电位波动，出现了多个小突越，系统无法准确识别滴定终点，造成测试结果不准确（图3右），2个平行样之间测试结果重复性差，测试结果不可信（表1）。

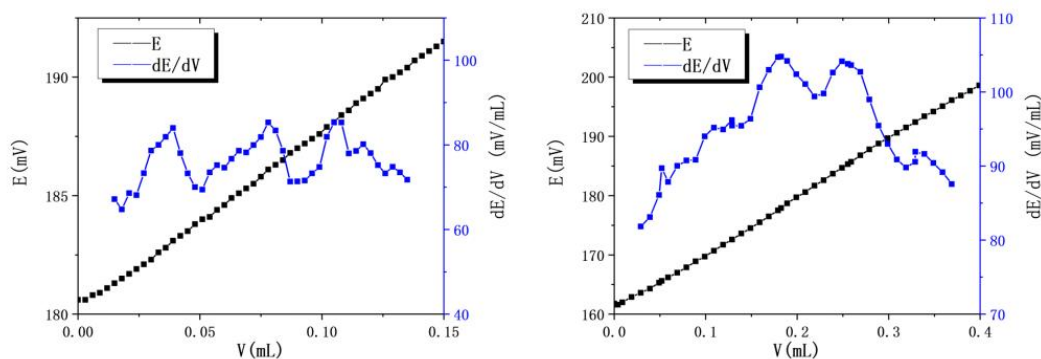


图3、空白样品 1 (左) 及未知样品 7-1 (右) 电位滴定图 ($m_{7-1} = 7.425 \text{ mg}$)。

表1、空白及未知样品的电位滴定测试结果 (水介质)

样品 编号	质量 (mg)	消耗体积 (ml)	平均空白体积 (ml)	测试结果(未扣空白) Cl%
空白1	0	—	—	—
空白2	0	—	—	—
7-1	7.425	0.052	—	0.251
7-2	7.198	0.101	—	0.504

根据参考文献报道在卤素滴定过程中加入醇类试剂可以降低产物的溶解度，且增加电位突跃^[1]，因此氧瓶燃烧后用乙醇代替水对瓶壁瓶塞进行淋洗，此时体系中主要介质为乙醇，用同样的方法进行滴定（滴定参数见表2），从图4左图可以看到在乙醇介质中空白样品的起始电位明显低于在水中的起始电位，当滴定完成时其电位约 220 mV，电位变化明显，滴定曲线有明显的电位突越，可以得到准确的空白样品滴定体积，2 个空白样品的平均值为 0.041 mL。

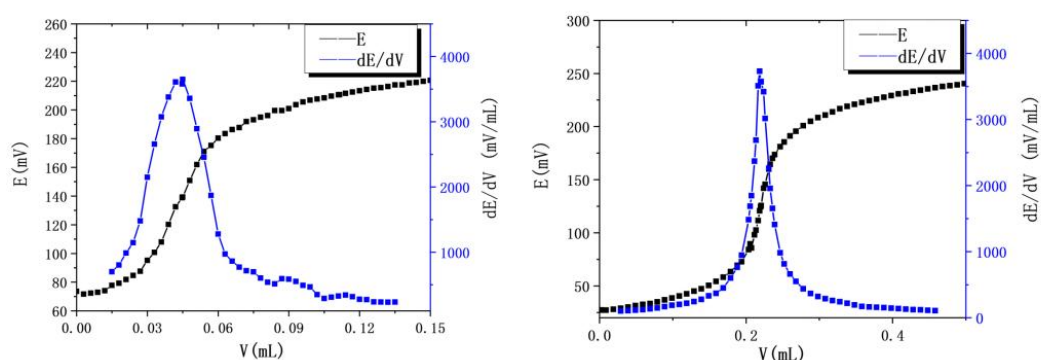


图4、空白样品3 (左) 及未知样品7-4 (右) 电位滴定图 ($m_{7-4} = 8.401 \text{ mg}$)。

表2、空白及未知样品的电位滴定方法参数（乙醇介质）

	空白样品	未知样品
搅拌速度 [%]	30	30
控制		
滴定剂添加模式	增量添加模式	动态添加模式
dE [mV]		5
dV [ml]	0.003	
dV _(最小) [ml]		0.002
dV _(最大) [ml]		0.01
模式	固定时间	平衡控制模式
dE [mV]		0.5
dt [s]	5	1
t _(最小) [s]		5
t _(最大) [s]		30
评估与识别		
阈值 [mV/ml]	100	50
附件EQP标准	最陡突越	最陡突越
最陡突越	1	1
终止		
最大体积 [ml]	0.15	0.5

从空白样品的滴定结果可以看出，将滴定介质更换为乙醇后，其起始电位降低很多，达到突跃时其电位变化更大，确实可以达到增大电位突越的目的，同样对未知样品滴定也得到了完整的滴定曲线，其电位突越非常明显，可以准确识别等当点（图4右），得到准确的滴定体积，2个平行样之间的测试结果重复性也很好，测试结果分别为0.729%、0.763%，平均值为0.746%，见表3。

表3、空白及未知样品的电位滴定测试结果（乙醇介质）

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3	0	0.037		
空白4	0	0.045	0.041	
7-3	8.736	0.219		0.729
7-4	8.401	0.220		0.763

三、结论

电位滴定仪对固体样品中低含量氯元素进行定量时,以水作为介质,其电位变化非常小,未出现明显的电位突跃,不能准确识别滴定终点,空白及样品含量都不能准确定量,更换乙醇作为介质,可以明显增大电位突跃,得到完整的滴定曲线,进而得到准确的空白及样品含量,更有益于低含量样品的准确定量。高含量样品的测试比低含量样品更加简单,可以直接用水作为介质进行滴定,其空白样品消耗的滴定液体积可以忽略不计,并不影响测试结果的准确性。

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.

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!

扫描电镜 Regulus 8230 的减速模式简介及其应用

► 李肇华 关波

(分析测试中心电镜组 Tel: 010-62557012 Email: lizhaohua92@iccas.ac.cn)

一、扫描电镜中的荷电现象

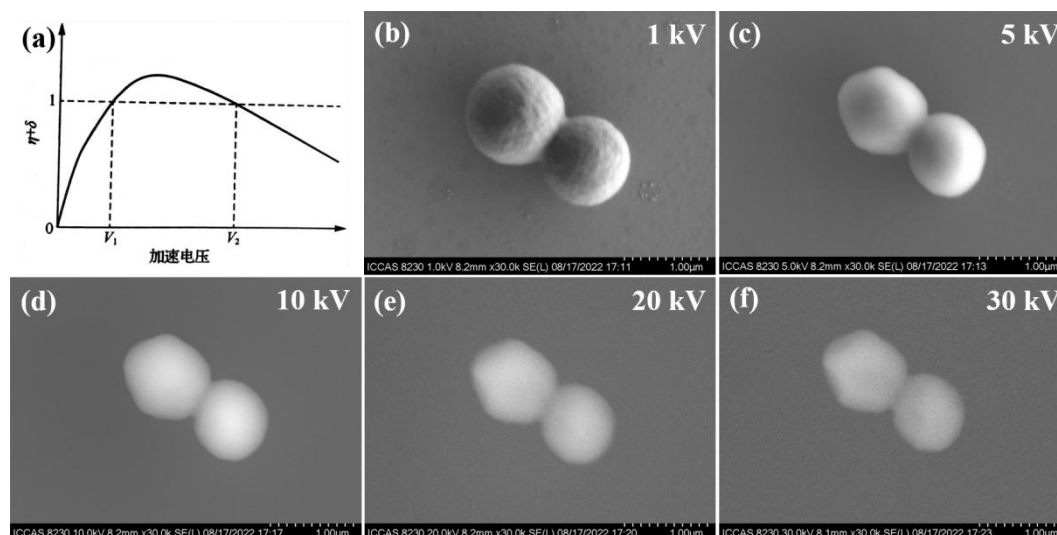
扫描电镜对导电性不好的样品如有机样品的表面形貌进行表征时,荷电现象是最常见且棘手的问题。荷电现象是在观察导电性差的样品时,入射电子数与从样品表面溢出的电子数不相等,大量自由电子在样品浅表层的全部或局部堆积形成荷电场,影响该部位二次电子和背散射电子正常溢出,样品表面形貌像出现的异常亮、异常暗和表面被磨平这三种异常现象。针对导电性差的样品,通常采用在样品表面喷涂一层导电物质如金、铂、铬、碳等来减弱、消除荷电现象,但是喷涂的这一层导电层会掩盖样品表面的细节形貌,因此,近些年,通常通过调节

加速电压的方式来减弱、消除荷电现象。

二、加速电压与荷电的关系

理论上认为荷电现象与加速电压和电子产额的关系有关，如图 1 (a) 所示。其中， η 为背散射电子产额， δ 为二次电子产额。当加速电压为 V_1 或 V_2 时， $\eta+\delta=1$ ，样品表面为零电位，样品无荷电现象，图像正常；当加速电压小于 V_1 或大于 V_2 时， $\eta+\delta<1$ ，样品表面为负电位，样品带负电，图像异常亮；当加速电压介于 V_1 和 V_2 之间时， $\eta+\delta>1$ ，样品表面为正电位，样品带正电，图像异常暗^[1]。

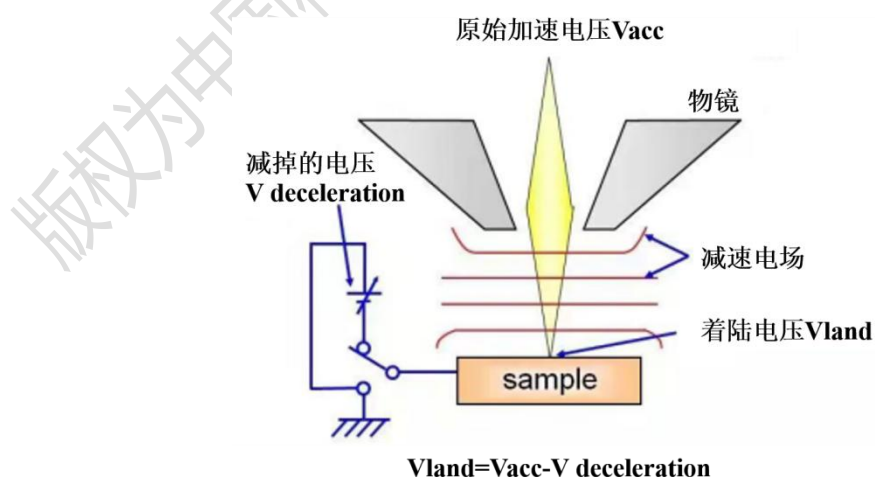
然而，在实际观察样品时，不仅是理论描述的简单情况，通常更加复杂。例如，聚甲基丙烯酸微球（图 1 (b-f)）在较低的加速电压 1 kV 时，边缘有一定的荷电现象，表面呈现凹凸不平的细节，但图像模糊、不清晰。当电压逐渐增大时，荷电现象并不是一直存在，而是在加速电压大于 5 kV 时逐渐消失。这是由于随着加速电压的增大，电子射入样品的深度增加，形成的荷电场位置下移并远离二次电子溢出区，达到一定值时，对样品电信号溢出的影响将会减弱直至消除，同时，高加速电压的扩展深度大，穿透能力强，透过样品之后通过导电的样品座形成接地电流，从而避免荷电现象。虽然没有荷电现象，但过高的加速电压会使样品图像“变透”，无法呈现表面细节，这与较高电压导致 SE2 增多有关。具体地，溢出样品表面的二次电子有两种：一种是电子束直接激发并溢出样品浅表层的二次电子 SE1，是形成高分辨表面形貌像的关键信息，其扩散范围小，图像清晰度高、分辨率高，另一种是由样品内部各种散射电子激发并溢出样品浅表层的二次电子 SE2，SE2 向周边扩散的弥散度较高，而且加速电压越高，其产额和弥散度也越大，导致表面形貌像的分辨率大大降低，所以，虽然加速电压升高到一定值后不存在荷电现象，但是由于穿透深度增加及 SE2 信号的增多，致使没有表面形貌细节。而且对于有些样品，高加速电压会造成损伤，因此，一般选择低加速电压对样品表面形貌的细节进行观察^[2, 3]。



● 图 1、(a) 加速电压与电子产额的关系；(b-f) 聚甲基丙烯酸微球在不同加速电压下的图像。

三、减速模式及应用实例

应用低加速电压可解决荷电、表面细节被掩盖、样品损伤等问题，但是低加速电压下分辨率不足，可以使用减速模式（Deceleration Mode）在减少样品损伤和荷电效应的同时，保持高分辨率。其原理如图 2 所示，电子枪发射电子束时使用较高的加速电压（ V_{acc} ），出物镜极靴后，电子束在样品台和极靴之间减速电场的作用下减速，使实际到达样品的电压即着陆电压（ V_{land} ）减小。这样的电子束既保持了高加速电压的分辨率，又由于使用了低着陆电压，有效地减少了样品损伤和荷电效应，可以更好地显示样品表面细节。



● 图 2、减速模式示意图

分析测试中心电镜组自 2022 年 6 月起负责场发射扫描电镜 Regulus 8230 (图 3 (a)) 的运行, 该电镜具有优异的低电压减速模式成像性能, 在减速模式下的分辨率为 $0.7 \text{ nm}@1 \text{ kV}$ 。图 3 (b) 所示为其电压设置部分, 图中红色框为着陆电压, 减速模式允许使用的着陆电压范围为 $0.01\sim 20 \text{ kV}$, 由于较大着陆电压使用减速模式意义不大, 因此着陆电压一般选择 2 kV 及以下。当着陆电压确定后, 可根据需求在 High、Medium、Low、Free 四种模式中选择相应的加速电压与减掉的电压, 见图 3 (b) 绿色方框部分, High 模式减掉的电压为 3.5 kV , Medium 模式减掉的电压为 1.5 kV , Low 模式减掉的电压为 $0.7\sim 1.3 \text{ kV}$, Free 模式减掉的电压为 $0.1\sim 3.5 \text{ kV}$ 。

针对导电性差的样品, 可在不喷镀导电层的情况下, 采用减速模式直接观察。如上文提到的聚甲基丙烯酸微球, 从图 3 (c-f) 可以看到, 使用非减速模式时, 加速电压为 1 kV 时无法清晰观察到样品表面。使用减速模式观察时, 着陆电压为 0.5 kV , 图像清晰度比非减速模式有大幅提升。即使放大到 40 万倍, 分辨率依然足够, 可以看到表面颗粒状的细节结构 ($\sim 5 \text{ nm}$)。

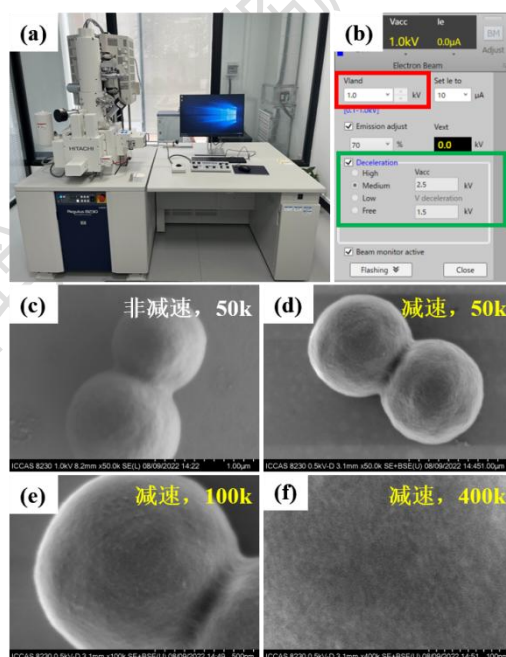


图 3、(a) 扫描电镜 Regulus 8230 仪器实物照片; (b) 扫描电镜 Regulus 8230 软件高压控制部分; (c-f) 聚甲基丙烯酸微球在非减速与减速模式下形貌对比, 其中, 非减速模式加速电压为 1 kV , 减速模式着陆电压为 0.5 kV 。

将减速模式用于对所内的聚苯乙烯、光刻胶、二氧化硅球表面等导电性差的

样品进行观察，不喷镀导电层，并与非减速模式进行对比。如图 4 所示，三种样品在减速模式下，均比非减速模式更清晰，更好地显示了表面细节。

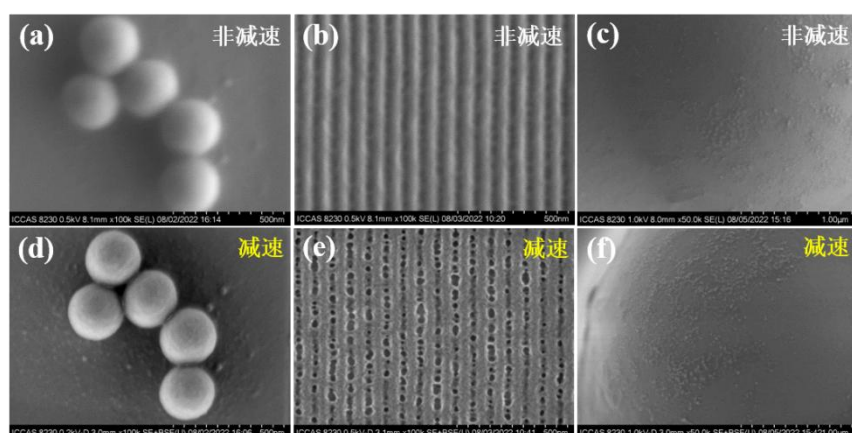


图 4、样品在非减速模式与减速模式下的图像对比。（a, d）为聚苯乙烯；（b, e）为光刻胶；（c, f）为二氧化硅球表面。

进一步地，在不喷镀导电层的情况下，使用减速模式测试了所内具有代表性的样品，包括碳纤维、聚合物、无机物、COF 膜材料、UiO-66 等，在着陆电压为 0.5~1 kV 时，均可得到清晰的表面形貌图像。

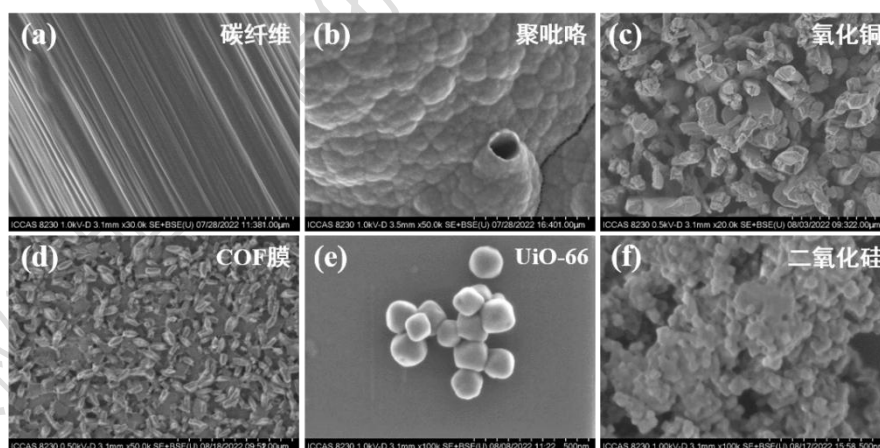


图 5、多种样品在减速模式下的图像

应用 Regulus 8230 对各种导电性差的样品进行观察的结果表明，低电压减速模式相比于非减速模式，分辨率更高，可呈现出更加清晰、真实的表面形貌信息。使用该模式时，无需对样品喷镀导电层，可以得到样品表面的形貌细节，特别适

合有机、高分子等导电性差的样品的高分辨表面形貌表征。

参考文献:

- 1、林中清, 李文雄, 张希文。电子显微学中的辩证法——扫描电镜的操作与分析[M], 人民邮电出版社, 2022.
- 2、曾毅, 吴伟, 刘紫微。低电压扫描电镜基础及技术[M], 上海科学技术出版社, 2015.
- 3、华佳捷, 刘紫微, 林初城, 吴伟, 曾毅。场发射扫描电镜中荷电现象研究[J], 电子显微学报, 2014, 33 (3), 226.

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!

双束电镜在化学所分子材料研究中的应用

► 梁丽荣 关波

(分析测试中心电镜组 Tel: 010-62557012 Email: lianglirong@iccas.ac.cn)

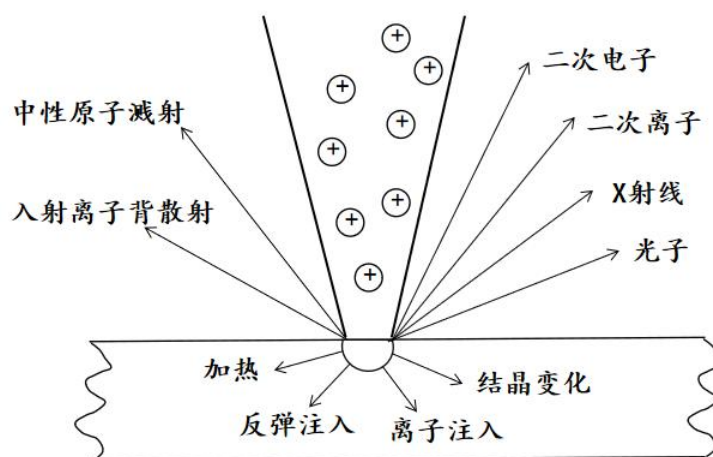
分子科学是指在分子层次上创制材料并调控其化学组成、组装结构与功能特性的科学, 是化学学科的核心, 涉及能源、材料、生命、和环境等科学问题。其研究对象为分子材料, 特点是种类较多、性质不一, 多数为“软”材料, 很多含有液相组分, 大部分不耐电子束、离子束损伤, 因此在电镜表征中除了常温, 也应用低温条件最大限度地固定和保存样品原始的结构与化学信息。化学所分析测试中心自 2016 年起负责双束电镜 Helios Nanolab G3 CX 的运行, 实现了分子材料的冷冻扫描电镜表征及透射电镜制样等微纳加工工作, 本文将根据该设备 6 年多来的分析测试工作, 总结其在分子材料研究中的应用情况。

一、聚焦离子束-电子束技术简介

1.1 聚焦离子束技术 (Focused Ion Beam, FIB)

聚焦离子束技术是利用静电透镜将离子束聚焦成非常小的尺寸轰击材料表面，实现材料的剥离、沉积、注入和改性。具体地，在离子枪中外加电场于液态金属离子源，可使液态金属形成细小尖端，再加上负电场牵引尖端的金属，从而导出离子束，然后通过静电透镜聚焦，经过一系列可变孔径的光阑，再通过八极偏转装置及物镜将离子束聚焦在样品上并进行扫描，高能离子束与样品发生相互作用，产生多种信号，如图 1 所示，其中利用物理碰撞来实现切割或研磨，同时收集产生的二次电子和离子进行成像。如果同时注入化学气体，就可通过局部的化学沉积(CVD) 得到所需的沉积图案。现代的聚焦离子束电镜通常是集成离子束和电子束的双束电镜（Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscope, FIB-SEM），应用电子束的高分辨成像能力，在微观成像实时观察下对样品进行微加工。

聚焦离子束一般使用镓离子，其离子质量较大，当轰击样品时，其中的能量传递给样品中的原子而发生溅射，但是同时离子束在撞击处有一定的损伤和注入。高能离子撞击样品时，会给样品表面带来损伤，离子注入样品表面以及高能离子引起的反弹注入会导致材料结晶发生变化，甚至晶体表面非晶化。同样，高能电子束作用于样品也会导致电子束辐照损伤，破坏样品结构，尤其是针对一些“软”材料。同时，电子显微镜内部是高真空环境，因此只能表征相对稳定的“固体”材料，不能直接对含有易挥发成分的材料、液体材料、生物材料等进行加工及观察。



●图 1、高能离子与固体表面作用的主要物理化学现象

低温可降低材料的反应活性、避免热辐照损伤、固定液相组分，最大限度保

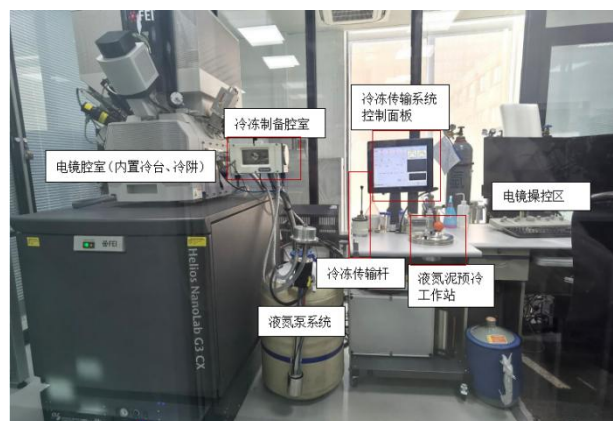
存样品的原始结构与化学信息。将冷冻技术与聚焦离子束电镜相结合，就组成了冷冻聚焦离子束电镜。冷冻聚焦离子束电镜可以对液体样品和热敏感材料进行微纳加工及分析，降低电子束和离子束对样品的损伤，实现对不耐损伤样品及含液体组分样品的原位观察、蚀刻、特定位置的截面制备及观察、连续截面加工的成像分析“三维”表征、透射电镜样品制备等。另外，还可冷冻制备动态液相反应过程中的一系列样品，研究反应的动态变化规律。因此近年来冷冻聚焦离子束电镜受到了越来越广泛的关注。

1.2 分析测试中心双束电镜的基本配置

分析测试中心负责运行的双束电镜 Helios Nanolab G3 CX 搭载了微机械手、X 射线能谱仪、多种诱导沉积气源，另外还配备了几款应用软件如用于三维重构技术的 Auto Slice&View 软件及图形设计软件 Nano builder 等。2019 年，通过配置 Quorum 冷冻传输系统升级为冷冻聚焦离子束电镜，因此该设备同时具备常温加工功能以及冷冻加工功能。

冷冻传输系统具体配置（图 2）包括：（1）aQuilo 冷冻制备腔室与双束电镜直接相连，具有冷冻断裂、全自动升华蚀刻、全自动溅射镀膜功能；（2）Prepdektm 工作站，包括组合式液氮泥预冷工作站（内含样品托装载机构）、电源及控制面板，完成液相样品的冷冻固定及系统的控制；（3）冷冻传输杆，样品冷冻后在真空的环境下传输至冷冻制备腔室，减少结霜的污染；（4）电镜镜筒冷阱和冷台及液氮泵系统。

对于含液体组分样品，可根据具体要求选择高压冷冻、投入式冷冻或者液氮泥冷冻等方式对样品进行冷冻固定，然后装载到冷冻传输杆上，在真空密闭的环境下快速地传送至冷冻制备腔室中的冷台（冷台由过冷氮气冷却，温度可达 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ），经过冷冻刀断裂、溅射 W 等处理之后，传至聚焦离子束电镜腔室内冷台，此冷台同样由过冷氮气冷却，温度最低可稳定在 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。对于不含液相但不耐辐照损伤的“软”材料，可直接将样品传输至聚焦离子束电镜腔室的冷台。整个过程遵循“全程真空、全程冷冻”的原则。



●图 2、双束电镜及冷冻传输系统照片

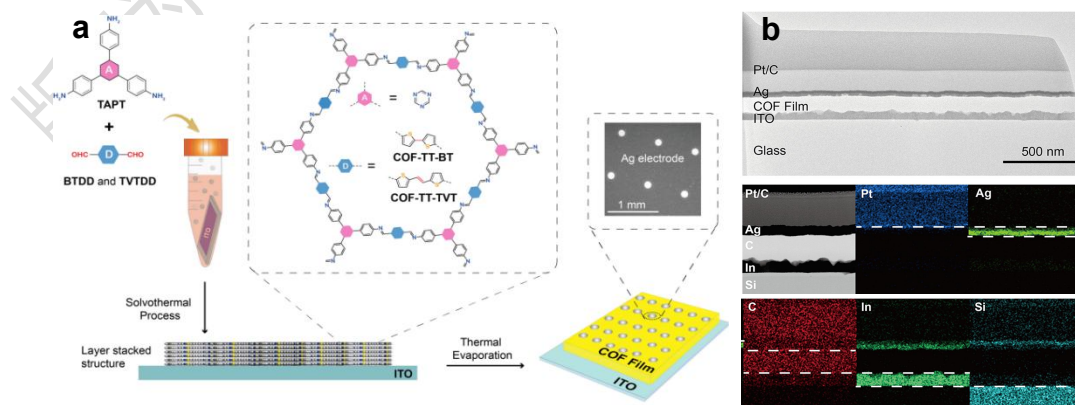
二、双束电镜在分子材料研究中的应用实例

2.1 常温双束电镜在分子材料研究中的应用

2.1.1 透射电镜样品制备

COFs 薄膜制备忆阻器

共价有机框架 (COFs) 材料是一类由 p-共轭构筑单元通过共价键连接形成的具有二维拓扑结构的晶态多孔材料。该类材料具有高结晶性、高的孔隙率和比表面积，可通过选取聚合单元，设计分子结构并赋予 COFs 材料许多独特性能，使其在有机电子学器件方面具有潜在的应用前景。在电子学器件应用中，COFs 材料是以薄膜形式存在的。由于 COFs 材料溶解性与成膜性能差，使得基于 COFs 材料的电学器件性能较低。为解决这一难题，有机固体实验室于贵研究员课题组研究人员原位生长了高质量的 COFs 薄膜并构筑了高性能忆阻器。

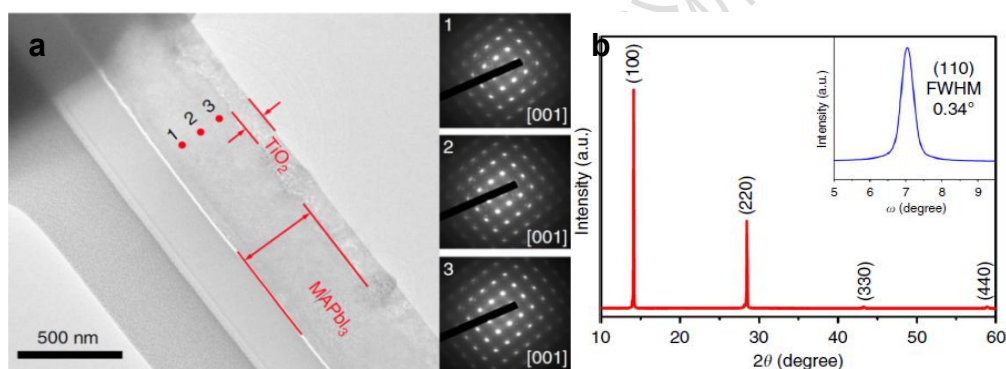


●图 3、(a) COFs 薄膜制备忆阻器的结构示意图；(b) COFs 薄膜制备忆阻器透射电镜图以及元素面分布图。

通过 FIB-SEM 制备透射样品观察可以看到 COF 薄膜截面形貌信息，并且通过 EDS 获得整个器件截面层的化学成分分布信息。COF 薄膜与衬底接触较好，且结晶性良好。因此该器件表现出优秀的忆阻性能，驱动电压为 1.30 V，开关比为 105，保留时间为 3.3×10^4 秒。相关研究工作发表在 *Angew. Chem. Int. Ed.* [1]。

单一取向 MAPbI₃ 薄膜

有机-无机杂化钙钛矿材料具有优异的光学和电学性能，成为近年来光电功能材料领域的研究热点，而高质量的钙钛矿薄膜是提高器件性能和稳定性的关键。由于钙钛矿材料具有快速成核和结晶的特点，简单的溶液涂布工艺很难制备覆盖度高、结晶度高和晶界密度低的钙钛矿薄膜。绿色印刷重点实验室宋延林研究员课题组的科研人员针对钙钛矿溶液涂布存在的成核和结晶问题开展了研究，他们利用甲胺辅助重结晶方法原位制备 CH₃NH₃PbI₃ 钙钛矿薄膜，制备的钙钛矿薄膜厚度仅几百纳米，晶粒达到 1~2 μm。



●图 4、(a) 钙钛矿薄膜不同区域的选区电子衍射图证明是单一(110)取向；(b) 钙钛矿薄膜 XRD 结果显示是单一(110)取向。

利用 FIB-SEM 对钙钛矿薄膜原位提取并制备出透射电镜样品，选区电子衍射分析表明钙钛矿薄膜具有单一的(110)取向(如图 4 所示)。制备的钙钛矿薄膜具有较低的缺陷态密度和较长的载流子寿命，对应的光伏电池光电转化效率达到 21.36%，该研究成果发表于 *Nat. Commun.* [2]。

有机太阳能电池

有机太阳能电池作为最有前景的清洁型能源技术之一，具有重量轻、机械柔性好、无毒等独特优势。事实上，有机太阳能电池中的光吸收产生库仑强束缚激子，不能自发地分离成自由电荷，限制了其光伏技术的竞争力，而具有不同前线

轨道能量的给体-受体异质结是解离激子最有效的方法。高分子物理与化学实验室侯剑辉研究员课题组构建了一种理想杂化的有机太阳能电池异质结。利用 PBDB-TF:BTP-eC9 作为本体异质结 (BHJ)，并将共混物夹在由 PTO3 和 NDI-i8 组成的平面异质结 (PHJ) 之间，最终构成了异质结有机太阳能电池，可以有效地避免光致分离的强结合激子重新结合，最高光电转换效率 (PCE) 达到 18.5%。

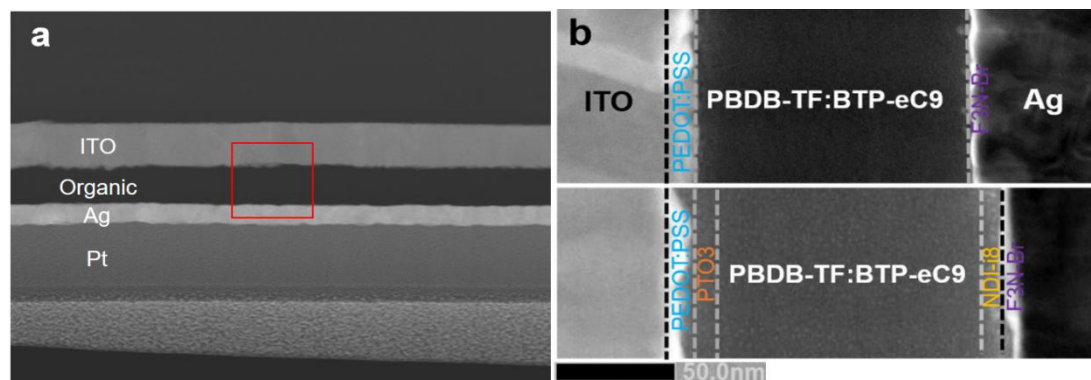


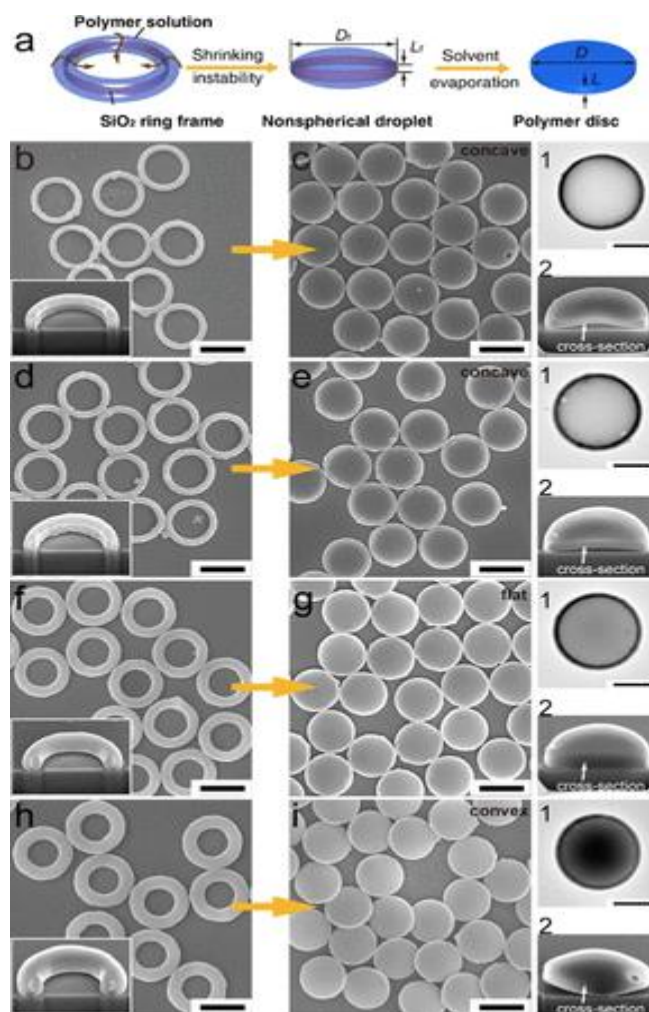
图 5、异质结有机太阳能电池器件结构的 (a) SEM 图; (b) TEM 图。

通过 FIB-SEM 制备电池薄膜截面样品可以看出实验获得了具有良好垂直成分分布的混合异质结，整个器件截面分层明显且薄膜厚度均匀，并结合能谱分析确定有机分子的分布和作用。相关研究成果发表于 *Adv. Mater.*^[3]。

2.1.2 定点刻蚀

盘状胶体

盘状胶体作为最典型的各向异性胶体之一，是自组装构建复杂层级结构的理想单元，也是研究自组装、玻璃化转变、扩散、颗粒流变学、介晶相行为中许多基本物理化学问题的有效模型。目前，合成单分散、形状可控、表面化学清晰的高分子盘状胶体仍缺少普适性方法。化学所高分子物理与化学实验室刘冰研究员课题组，提出了一种通用的基于框架引导液滴收缩的新策略，成功制备了多种高分子胶体圆盘。利用该策略，所制备的聚合物圆盘形状参数可调，不依赖于特定的聚合物、溶剂或者框架，具有很好的扩展性。



●图 6、FIB-SEM 定点刻蚀获得不同的胶体环和胶体盘颗粒截面结构

应用 FIB-SEM 定点切割对聚合物盘在形成过程中不同时间的形貌进行表征，为研究合成动力学过程提供了直接证据。相关研究工作发表在 *J. Am. Chem. Soc.* [4]。

空心碳体系结构

作为锂离子电池的廉价替代品，钾离子电池正在引起越来越多的研究兴趣。钾离子电池在确保了宽电压窗口和高能量密度的同时，钾金属镀层不容易形成枝晶，从而确保更安全的充电/放电过程。然而，由于 K^+ 的大尺寸，能够维持重复的 K^+ 的稳定的电极材料插入/脱嵌循环极其不足。分子纳米实验室万立骏研究员和曹安民研究员课题组研究人员通过结构工程开发了用于钾离子电池的高性能负极材料，所述电极材料为空心互连结构，形状类似于神经元细胞网络。该材料不仅能够促进 K^+/e^- 的传输，而且还确保用于稳定的钾化/去透明过程的弹性结构。

当用作钾离子电池负极时，电极能提供在 0.1 C 下 340 mA h/g 超常的可逆容量，具有卓越的循环稳定性和优良的库仑效率。

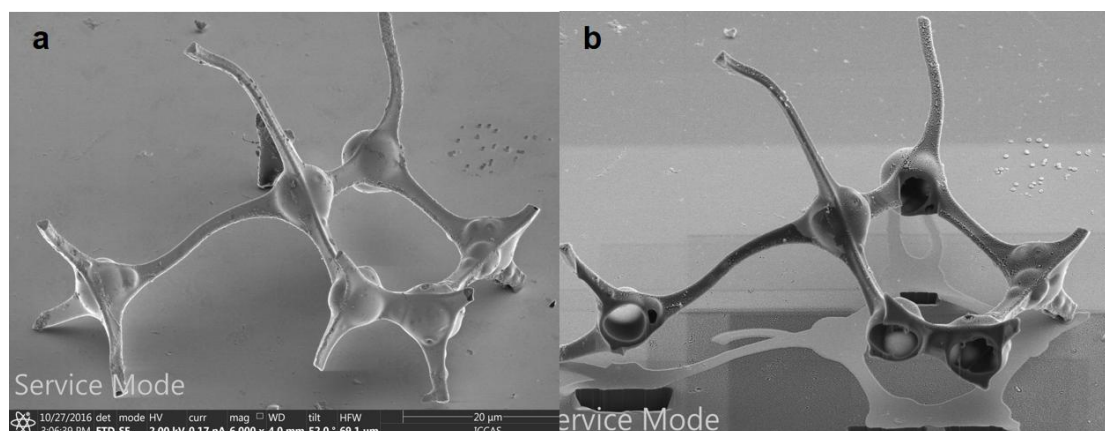


图 7、通过 FIB 切割前后的空心碳体系结构：（a）FIB 切割前；（b）FIB 切割后

通过三聚氰胺甲醛树脂制备出中空碳骨架，这些类神经元细胞网络可以高效地负载钾离子，是钾离子电池很好的电极材料，通过 SEM-FIB 切割可以证明碳中空结构，相关成果发表在 *J. Am. Chem. Soc.* [5]。

新型二维碳材料：C₆₀ 层状材料

有机固体重点实验室郑健研究员课题组在常压下通过简单的反应条件，创制了一种新型碳同素异形体单晶—单层聚合 C₆₀。这是一种全新的簇聚二维超结构，C₆₀ 簇笼在平面上通过 C-C 键相互共价键合形成规则的拓扑结构。这种新型碳材料具有较高的结晶度和良好的热力学稳定性，并具有适度的禁带宽度，为碳材料的研究提供了全新的思路。该新型二维碳材料由于非对称结构，因此具有面内各向异性特质，在二维电子器件中有很好的应用前景。

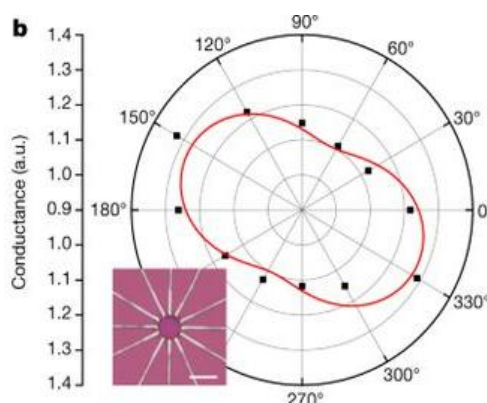


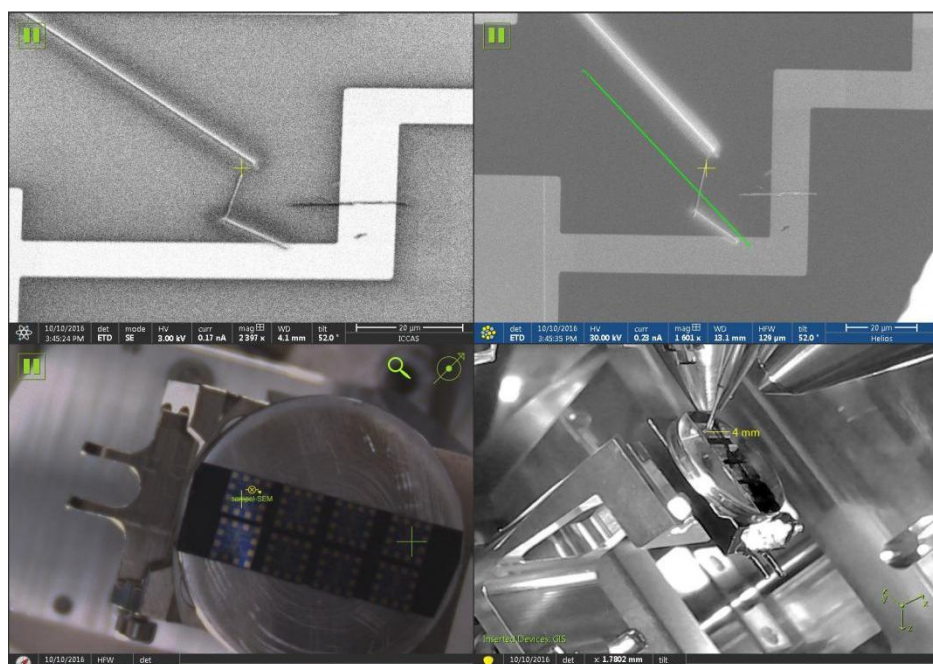
图 8、单层 qHP C₆₀ 电导率各向异性

FIB-SEM 微加工系统在单层 C₆₀ 聚合物四周不同象限刻蚀出电极模板，测试不同方向的导电性质，证实了单层 C₆₀ 聚合物由于不对称成键结构，使这种新的碳材料具有显著的平面各向异性，表明该材料在非线性光学和功能化电子器件方面具有巨大应用前景。相关研究成果发表于 *Nature* [6]。

2.1.3 诱导沉积

电子束诱导沉积 (Electron beam-induced deposition, EBID) 是一种使用电子束分解气相分子，从而在衬底上的特定位置实现沉积生长的技术。离子束诱导沉积 (Ion beam-induced deposition, IBID) 与电子束诱导沉积极为类似，只是将电子束替换为聚焦离子束 (常用 30 keV Ga)。相对比而言，离子束诱导沉积的沉积速率较快，且沉积纯度较高；电子束无 Ga 离子损伤且具有极高的空间精准度 (可达纳米级别)，生长的结构和沉积的准确度更为精准。二者主要应用于加工前为材料提供保护层，集成电路分析与修理，MEMS 器件制作。

在微小的尺度上，宏观尺度下的电学模型以及电学特性已不再适用，因此微纳材料的电学性质等研究需要在微观尺度下进行电学性质测量，在微小的微测试芯片上操作非常困难，例如有机固体实验室合成了一种异质结纳米线，对其进行电学参数测量，通常操作是将纳米线随机地分散在刻有多个电极阵列的芯片上，然后在电镜下“盲找”到纳米线两端正好分别搭在同一个电极的正负极，然后可在该电极上连接外接电路进行测量，但是该方法不可控且成功率低。应用 SEM-FIB 可在电子束观察下，找到离目标纳米线最近的一对电极，用 FIB 诱导 Pt 定点沉积的方式将纳米线两端与该电极的正负极连接，实现了微芯片上微电路的完整搭建 (详见图 9)，大大提高了成功率。



●图 9、诱导沉积完成微电路搭建

2.1.4 三维重构

应用聚焦离子束三维重构过程就是通过软件控制进行逐层切割，再将得到的每个截面用电子束进行拍摄，以上依次交替进行得到系列切片图像，最后再将得到的系列切片导入重构软件得到材料的三维重构的结果。研究人员能够在三维空间对材料的结构形貌以及成分等信息进行表征，这种表征手段多用于材料类、岩石类以及各种功能材料等。

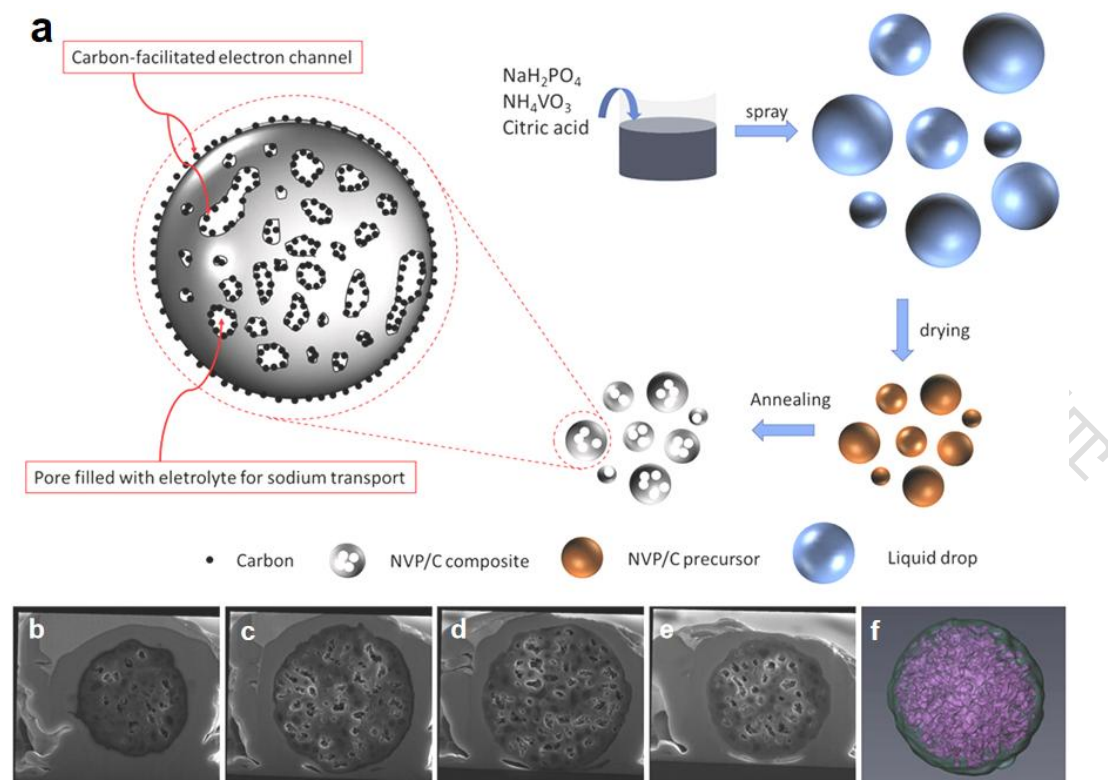


图 10、(a) NVP 微球合成流程图; (b-e)NVP 微球不同深度的截面图; (f) NVP 微球三维重构图。

NASICON 型 $\text{Na}_3\text{V}_2(\text{PO}_4)_3$ (NVP) 是一种潜在的钠离子电池材料。然而, NVP 由于其固有的电子导电性差而导致其倍率性能较差。针对这些问题, 构建了微尺度的球形空穴 NVP 粒子, 即微粒子加上内部的纳米通道。制备的 NVP/C 微球样品在纳米尺寸下表现出较好的电化学性能。通过 FIB-SEM 获得 NVP 内部微纳信息, 重建了单个 NVP 粒子的三维模型, 充分展示了微球内部连续的纳米通道。相关研究成果发表在 *Energy Storage Mater.* [7]。

2.2 冷冻双束电镜在分子材料研究中的应用

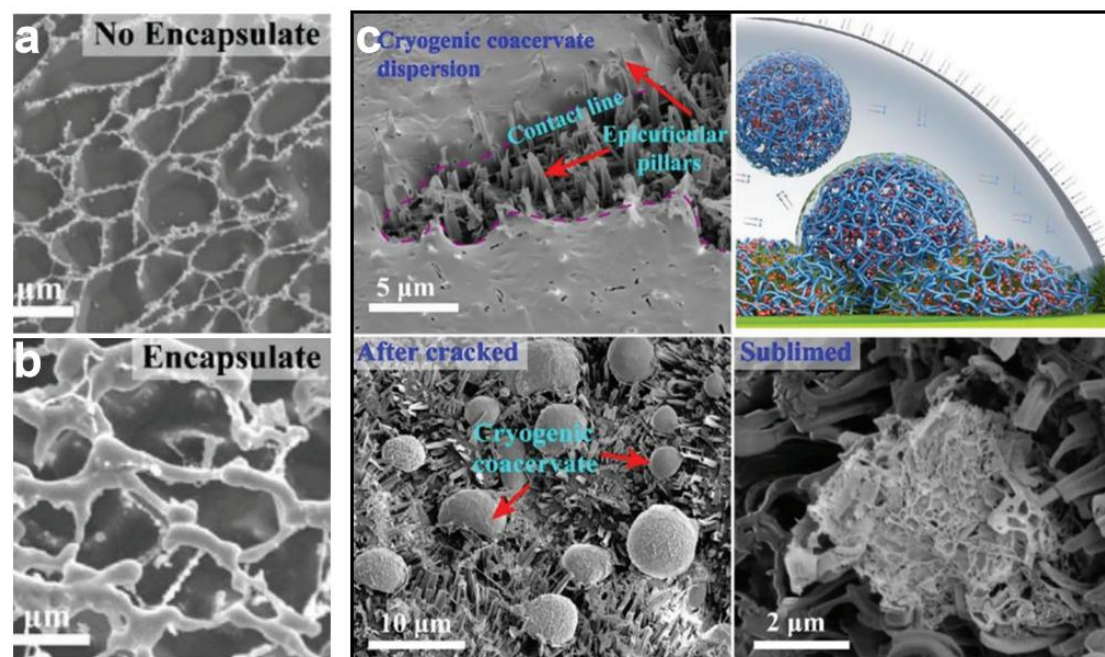
2.2.1 冷冻扫描电镜观察

冷冻扫描电镜允许在“自然”含水状态下直接观察样品, 样品冷冻固定后通过低温断裂、升华, 也可通过双束电镜中的聚焦离子束切割显示样品内部信息。

动态共价三聚表面活性剂水基凝聚体

胶体、界面与化学热力学重点实验室王毅琳研究员课题组研究人员利用亚胺基动态共价三聚表面活性剂, 构建了一种水基凝聚体。凝聚体中的纳米网络结构包含了亲水和疏水两个结构域, 可以有效地包裹亲水/疏水性农药, 同时能与超疏

水植物表面的微/纳米结构发生缠结。此外，二氧化碳诱导的降解表面活性剂凝聚体决定了农药的精确释放。

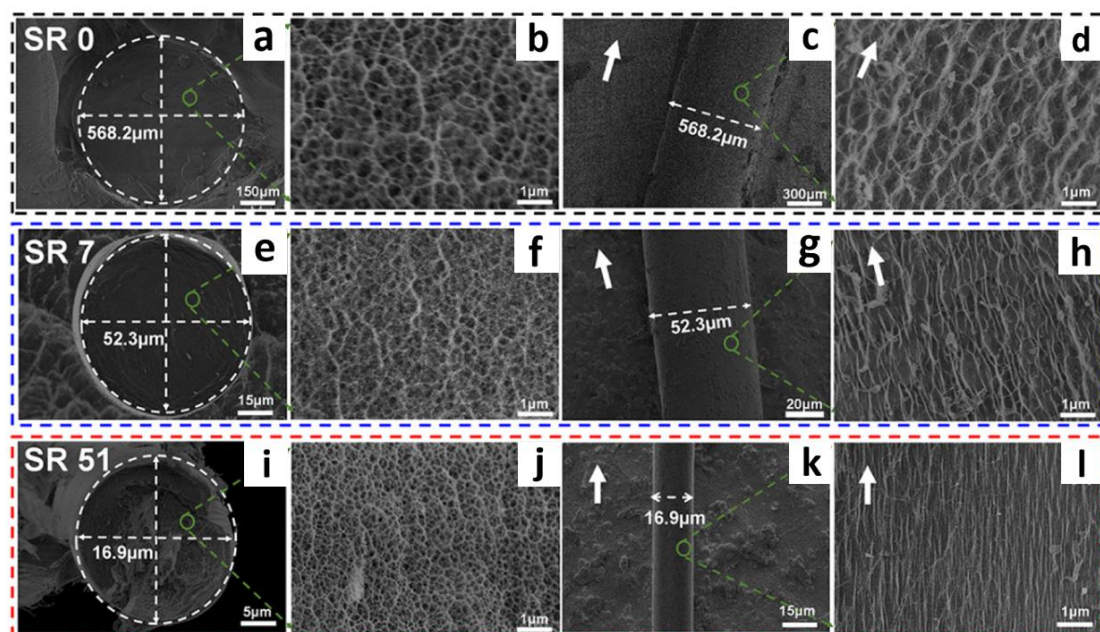


●图 11、(a) 未包裹农药的纳米网络结构；(b) 包裹农药的纳米网络结构；(c) 凝聚体液滴纠缠在白菜叶表面的微/纳米结构。底部的两张图片是左上方图像的冷冻断裂状态形貌。右上方的图像是它的模型。

对液液凝聚相体系及其撞击的超疏水表面进行冷冻制样，并进行冷冻扫描电镜观察，直接证实了该体系形成液液凝聚相的机理，并捕捉到撞击超疏水表面的微观结构。相关结果发表于 *Adv. Funct. Mater.* [8]。

离子溶液纺丝纤维素

高分子结晶具有很高的工业应用价值，研究高分子在外场作用下的结晶行为一直是个重要的课题。工程塑料重点实验室张军研究员课题组科研人员研究发现，离子溶液纺丝纤维素在拉伸作用下会诱导结晶，这种晶体结构的调控对纤维素材料的性能具有重要意义。



●图 12、不同拉伸率水凝胶纤维横截面和纵截面的冷冻扫描电镜图像：SR 0 水凝胶纤维的横截面（a, b）和纵截面（c, d）图像，SR 7 水凝胶纤维的横截面（e, f）和纵截面（g, h）图像，SR 51 水凝胶纤维的横截面（i, j）和纵截面（k, l）图像。箭头表示轴向。

冷冻扫描观察发现，随着拉伸率增大，纤维素水凝胶纤维中微纤之间的水填充孔洞尺寸减小，纤维素水凝胶纤维的固体成分增多，另外，从纵截面上可以看出，随着拉伸率增大，微纤沿轴取向度也增加，如图 12 所示，相关结果发表于 *Biomacromolecules* [9]。

2.2.2 低温刻蚀

对于电子束、离子束辐照敏感的软物质以及含液相样品而言，通过冷冻聚焦离子束进行样品微纳加工是非常必要的，可以有效避免电子束和离子束对样品的损伤。针对不同样品，我们设计了系列冷冻样品台，满足了不同的分子材料的微纳加工需求。

毛细玻璃管尖端内的水凝胶

该样品为毛细玻璃管尖端的水凝胶，如果干燥后进行观察，无法保持水凝胶的微观结构，应用自行设计的斜面冷台，通过液氮冷冻固定、冷冻条件下离子束切割出截面、冷冻升华及镀导电层后进行观察，可以获得真实自然的样品结构（图 13）。

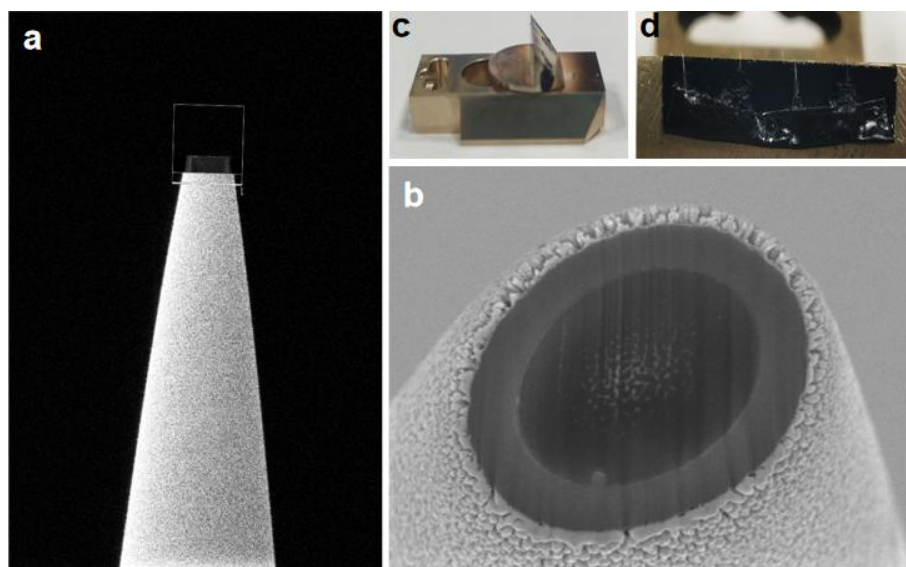
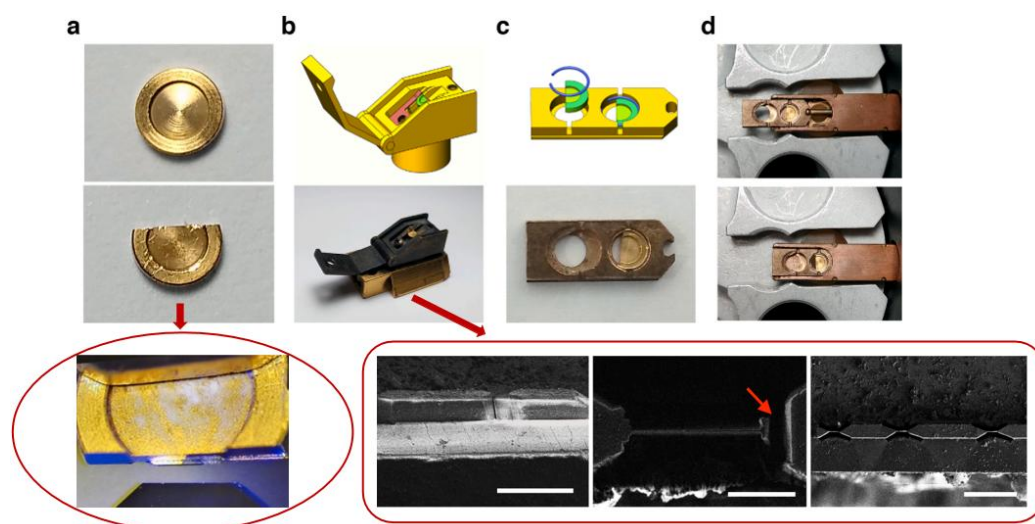


图 13、(a, b) 为冷冻聚焦离子束切割后毛细玻璃管尖端内水凝胶的微观结构；(c, d) 为斜面样品台实物图。

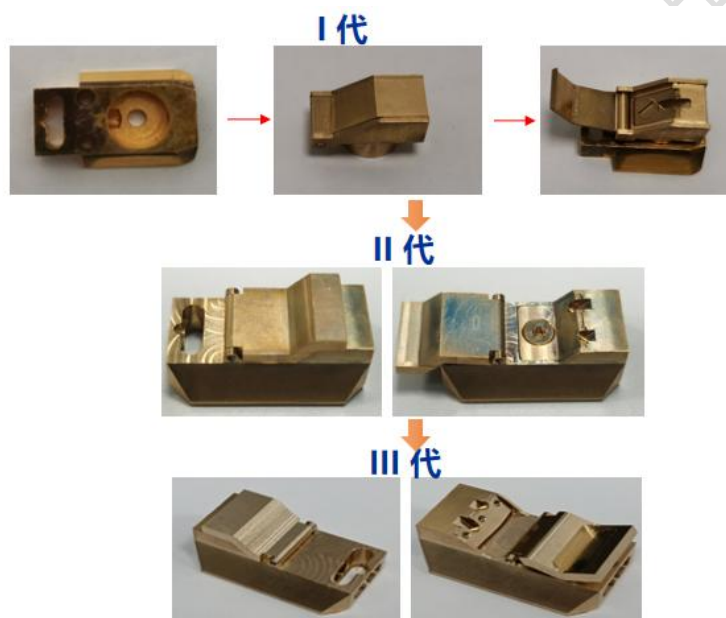
2.2.3 低温制备生物/有机透射电镜样品

VHUT-cryo-FIB (vibratome slicing, high-pressure freezing, ultramicrotome Cryo-trimming and Cryo-FIB milling) 技术可以高效制备出厚度在 150~300 nm 之间的组织样品冷冻含水切片, 如图 14 所示, 样品通过高压冷冻固定在样品盘内, 经过冷冻超薄切片机修块后暴露出样品结构并围绕样品修整成突出的平台 (厚度约 20 μm), 然后通过 Cryo-FIB 进一步加工成厚度 200 nm 左右的组织样品冷冻含水切片, 最后将切片转移到冷冻透射电镜进行冷冻电子断层成像技术研究。

该技术有效地将高压冷冻技术、冷冻修块技术和冷冻聚焦离子束减薄技术结合起来, 形成了一套完整高效的组织样品冷冻含水切片制备技术流程^[10]。不仅适用于生物组织含水样品, 也适用于部分“软”材料、含水材料样品。为实现该制样方法, 我们设计了一套冷冻 FIB-TEM 样品台, 根据实际使用情况, 形成了满足分子材料需求的第三代样品台, 详见图 15。



●图 14、VHUT-cryo-FIB 技术流程



●图 15、三代冷冻 FIB-TEM 样品台

小鼠肠绒毛组织

肠绒毛不同区域的细胞有不同功能，相对应的微观结构也有所差异。冷冻透射电镜下的生物结构是最接近真实状态的，但前提是先获得结构真实的冷冻肠绒毛组织薄片。冷冻组织薄片的制备是由冷冻聚焦离子束实现的，具体流程见图 16，先找到目标样品，沉积 Pt 保护层；然后用大束流快速加工去除多余组织；接下来逐渐降低束流，将组织样品梯度减薄至 200 nm 左右；最后转移到冷冻透射电镜进行观察分析。

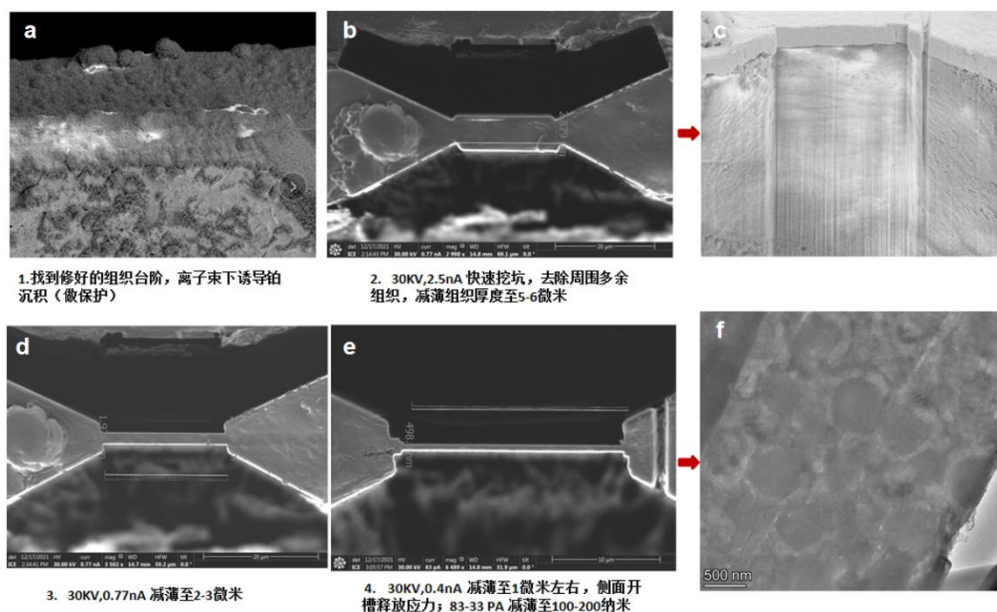


图 16、小鼠肠绒毛冷冻 TEM-FIB 制备流程图

有机弹性晶体薄膜

该工作中的有机晶体薄膜具备非常优秀的弹性性能，希望通过透射电镜观察有机弹性晶体薄膜弯曲过程中的晶体结构变化来分析其弹性机理。因为要观察样品动态弯曲过程中的结构变化，所以要借助原位弯曲透射样品杆来实现。因此，样品制备不仅要满足透射电镜观察要求，也要满足原位弯曲透射样品杆的操作要求。应用第三代样品台，通过沉积保护层，并从微米级的薄膜截面方向进行离子束切割、减薄，形成如图 17d 所示的多个厚度约为 100 nm、宽度为几十 nm、长度为几个 μm 的长条。

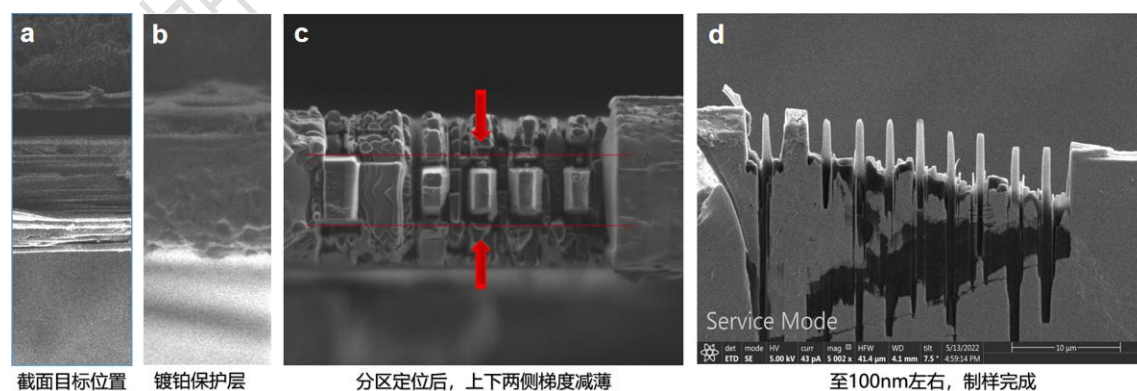


图 17、有机弹性晶体薄膜冷冻 TEM-FIB 制备流程图

三、总结

聚焦离子束电子束双束电镜具有优异的微纳加工功能，在配置冷冻传输系统后，还可以实现冷冻条件下扫描电镜观察、聚焦离子束加工功能，是现代电镜制样技术发展的一个热点方向。本文综述了化学所分析测试中心应用双束电镜对不耐损伤的有机、高分子、含液相等的分子材料开展的定点刻蚀、形貌观察、透射电镜样品制备及三维重构等工作。随着离子束技术的发展如离子束分辨率提升、氙离子等多种气体离子源的使用，冷冻双束电镜技术将会在分子材料的研究中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- 1、 Li, C. et al. Towards High-Performance Resistive Switching Behavior through Embedding a D-A System into 2D Imine-Linked Covalent Organic Frameworks, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 27135
- 2、Fan, H. et al. Methylamine-assisted growth of uniaxial-oriented perovskite thin films with millimeter-sized grains, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 5402
- 3、 Hong, L. et al. 18.5% Efficiency Organic Solar Cells with a Hybrid Planar/Bulk Heterojunction, *Adv. Mater.*, **2021**, *33*, 2103091
- 4、 Qu, N. et al. Frame-Guided Synthesis of Polymeric Colloidal Discs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143* (4), 1790
- 5、 Bin D. et al. Engineering Hollow Carbon Architecture for High-Performance K-Ion Battery Anode, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 7127
- 6、 Hou, L. et al. Synthesis of a monolayer fullerene network, *Nature*, **2022**, *606*, 507
- 7、 Yang, J. et al. Constructing micro-nano Na₃V₂(PO₄)₃/C architecture for practical high-loading electrode fabrication as superior-rate and ultralong-life sodium ion battery cathode, *Energy Stor. Mater.*, **2020**, *24*, 694
- 8、 Liu, B. et al. Control the Entire Journey of Pesticide Application on Superhydrophobic Plant Surface by Dynamic Covalent Trimeric Surfactant Coacervation, *Adv.Funct. Mater.*, **2021**, *31*, 2006606.
- 9、 Diao, H. et al. Stretch-Induced Crystallization of Cellulose Spun from Ionic Liquid Solution, *Biomacromolecules*, **2022**, *23*, 2264

10、Zhang, J. et al. VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography, *J STRUCT BIOL*, **2021**, *213*, 107763

高梯度扩散表征技术介绍

► 崔洁 向俊锋

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

一、高梯度扩散技术简介

扩散序谱 (Diffusion Ordered Spectroscopy, DOSY) 是研究分子运动的一种强大方法, 已经在超分子、分子自组装、分子探针、主客体识别等多个研究方向得到成功应用。但是, 在对不同体系的扩散测试中发现, 测定高粘度体系及快速弛豫原子核的扩散系数一直很困难。观测到的信号强度与扩散系数、扩散长度和施加梯度场强度之间可用下面的公式表示:

$$I = I_0 \exp \left[-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2} \right) \right] \quad (1)$$

其中, D 是扩散系数, γ 是旋磁比, g 是磁场梯度强度, δ 是双偶极梯度的长度, Δ 是两个自旋回波起始点之间的时间间隔, τ 是在每个自旋回波中两个梯度之间的时间间隔。在 Δ 、 δ 和 g 三个变量中, 因受到 J 耦合调制及 T_2 弛豫的影响, Δ 和 δ 变化的范围受限制, 再加上常规探头配备的梯度场强度 g (通常配置为 50-60 G/cm) 所限, 无法满足部分特殊体系测试需求 (图 1 所示)。此时如果增加磁场梯度强度 g , 那么就可以提升可测定扩散系数 D 的范围, 降低自旋退相干的程度, 进而克服由于四极矩机制导致的快速弛豫难题。以上通过增强磁场梯度强度改进的扩散技术即为高梯度扩散技术。

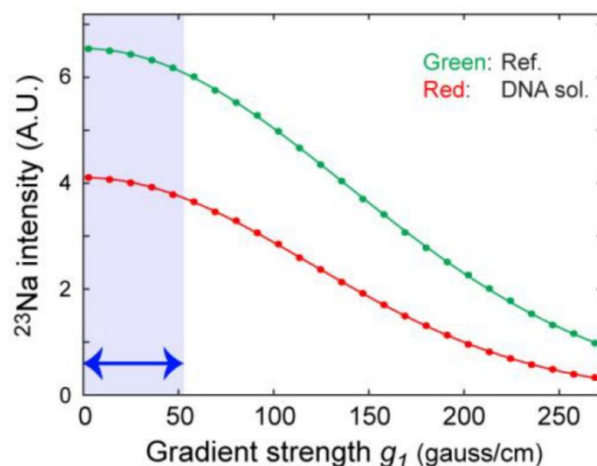


图 1、使用 BPP-LED 脉冲序列在 0 和 265 G/cm 之间的各种梯度场梯度下测量蛋白样品的 ^{23}Na 信号强度。延迟 Δ 为 20 ms, δ 为 1 ms。常规 NMR 探头场梯度 (即 55 G/cm) 以蓝色表示。

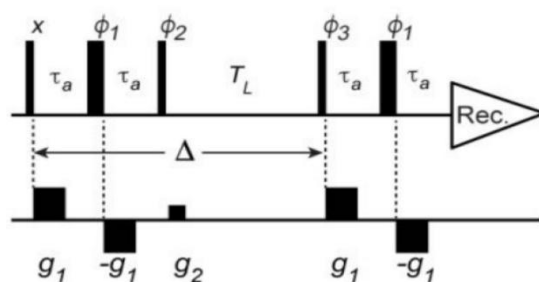
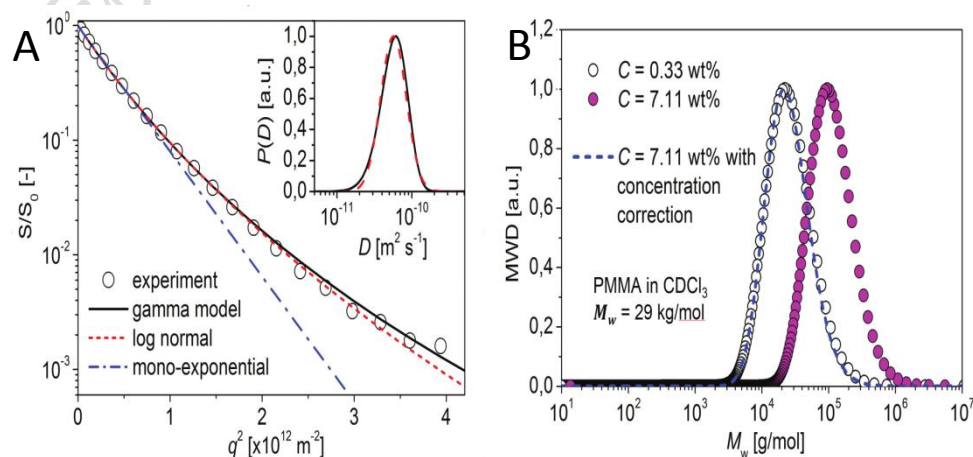


图 2、BPP-LED (bipolar pulsed-gradient pair longitudinal eddy-current delay) 脉冲序列。

二、高梯度扩散技术应用

2.1 聚合物的分子量分布

分子量分布是表征聚合物的重要数据,它反映了聚合反应的类型,与聚合物的物理和机械性能有关。高梯度扩散技术可作为常用测量方法-凝胶渗透色谱的替代方法,它具有简化样品制备、消耗更少的溶剂和时间的优势。

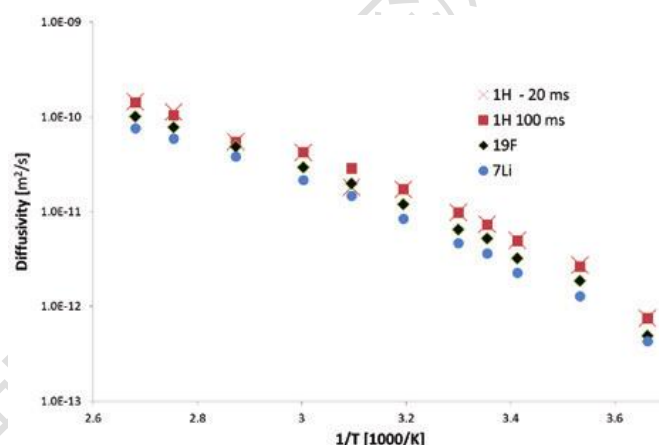


●图 3. A) 在 CDCl_3 溶液中 PMMA 的扩散曲线。实验数据显示出与单指数行为的显著偏差。插图显示了作为使用两种不同模型计算的扩散系数的函数的概率分布。B) 低浓度下 (0.33 wt%, 圆点) 及高浓度下 (7.11 wt%, 粉色点) 的分子量分布, 以及根据高浓度数据计算的浓度校正 MWD (虚线) [1]。

文献报道[1], 使用高梯度扩散技术进行的扩散测试实现了对 MWD 的直接表征。样品是合成的 29 kD 的聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA), 使用的脉冲序列为梯度受激回波序列。非单分散聚合物溶液的扩散曲线 (图 3A) 显示出与单指数行为的偏差, 表明扩散系数的分布, 而偏差的程度取决于分布的宽度。进而, 根据与扩散系数的概率分布的函数来计算得出分子量分布 (图 3B)。

2.2 电池中离子的迁移率

在电池开发中, 通过分子添加剂等手段改善目标离子的传输性能至关重要, 但是电池中粘度大, 分子扩散慢, 常规探头难以准确测量出相关离子的迁移率。高梯度扩散技术可以通过测量不同核 (如 ^1H 、 ^{19}F 和 ^7Li) 的扩散率来测量不同离子的迁移率, 是测量离子迁移率的理想工具。



●图 4、在 0 至 100°C 的温度范围内, 从 ^1H 、 ^{19}F 和 ^7Li 获得的扩散系数的阿伦尼乌斯图。所有离子的活化能大致相同 (0.43 eV) [2]。

文献中[2]的实验表明高梯度扩散技术在锂离子电池研究领域的可能性。实验对象是 LiTFSI, 所有实验结果都显示了在整个温度范围内所有核/离子的单指数行为。低温下, ^7Li 的扩散测试需要高功率扩散探头的全梯度强度来研究。图 4 中的 Arrhenius 曲线首先显示了与 Arrhenius 定律略有偏差的行为, 在第一近似中, 标准 Arrhenius 定律可以拟合到数据中, 同时数据显示携带不同核的离子的活化能几乎相同。

2.3 揭示生物分子周围阳离子的动力学行为

反离子对生物分子的结构和功能至关重要。然而，由于实验上难以表征移动的离子，反离子的行为仍然难以捉摸。相关科研工作已经证明了 ^{23}Na 高梯度扩散核磁共振技术可以对生物大分子及其复合物溶液中的 Na^+ 离子进行扩散系数的测定。利用在不同条件下测得的表现 ^{23}Na 扩散系数，可以研究 Na^+ 离子与大分子相互作用的动力学性质^[3]。

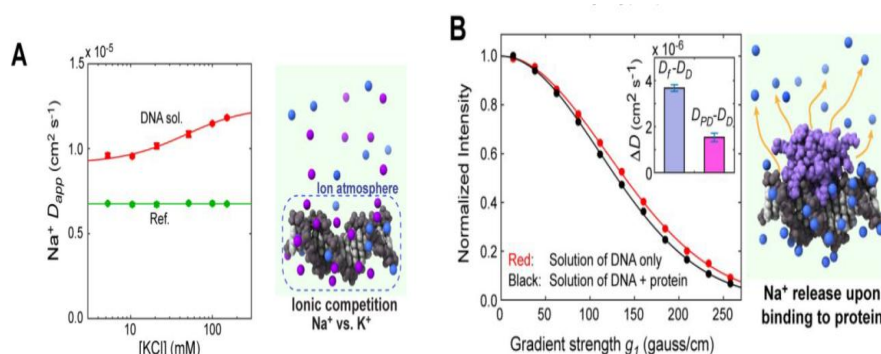


图 5、通过高梯度 ^{23}Na 扩散谱观察到 Na^+ 离子从 DNA 中的释放。(A) 表现 ^{23}Na 扩散系数的变化是由于 Na^+ 离子通过与 K^+ 离子竞争而从 DNA 双链体中释放而导致的。将 KCl 加入到 DNA 的溶液中，当与蛋白质结合时， Na^+ 离子从 DNA 双链体释放，导致观察到的 Na^+ 离子扩散系数增加。(B) 基于高梯度 ^{23}Na 扩散谱观察 Na^+ 在蛋白质-DNA 结合上的释放。

根据文献报道，使用强磁场梯度的 ^{23}Na 扩散谱能够详细表征凝聚在 DNA 和蛋白质分子周围的 Na^+ 离子，提供了对生物分子周围阳离子行为的表征。图 5 显示 ^{23}Na 扩散系数的变化可为反离子通过蛋白质与 DNA 的结合从 DNA 中释放提供直接证据，这有助于促进我们对生物分子及其复合物的结构和功能的理解。

三、AV 600 液体核磁谱仪高梯度扩散功能介绍

基于所里的测试需求，AV 600 液体核磁谱仪新引进了 BB (Broad Band) 扩散探头，磁场梯度强度从原来的 50 G/cm 增加到 1700 G/cm ，可以产生 30 倍于常规 NMR 探头硬件最大梯度的磁场梯度，同时具有超快的梯度切换时间 ($< 300 \mu\text{s}$)，可测试扩散系数低至 $5 \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ 的样品，大幅提升了检测范围及分辨率，可测试频段同常规的 BB 探头 ($^{31}\text{P} \sim ^{15}\text{N}$)，满足宽带杂核测试要求，同时温度可以在 ($-40 \sim +150 \text{ }^\circ\text{C}$) 范围内变化。高梯度扩散技术可将扩散核磁的应用领域扩展到电解液、聚合物及其他高粘度体系分子运动性表征中。

参考文献:

- 1、Xiaoai Guo, Esther Laryea, Manfred Wilhelm, Burkhard Luy, Hermann Nirschl, Diffusion in Polymer Solutions: Molecular Weight Distribution by PFG-NMR and Relation to SEC, *Chem. Phys.*, **2017**, *218*, 1600440.
- 2、Sabina Abbrent, Steve Greenbaum, Recent progress in NMR spectroscopy of polymer electrolytes for lithium batteries, *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, **2013**, *18*, 228.
- 3、Binhan Yu, Karina G. Bien, Channing C. Pletka, and Junji Iwahara, Dynamics of Cations around DNA and Protein as Revealed by ^{23}Na Diffusion NMR Spectroscopy *Anal. Chem.*, **2022**, *94*, 2444.

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!

仪器及功能介绍

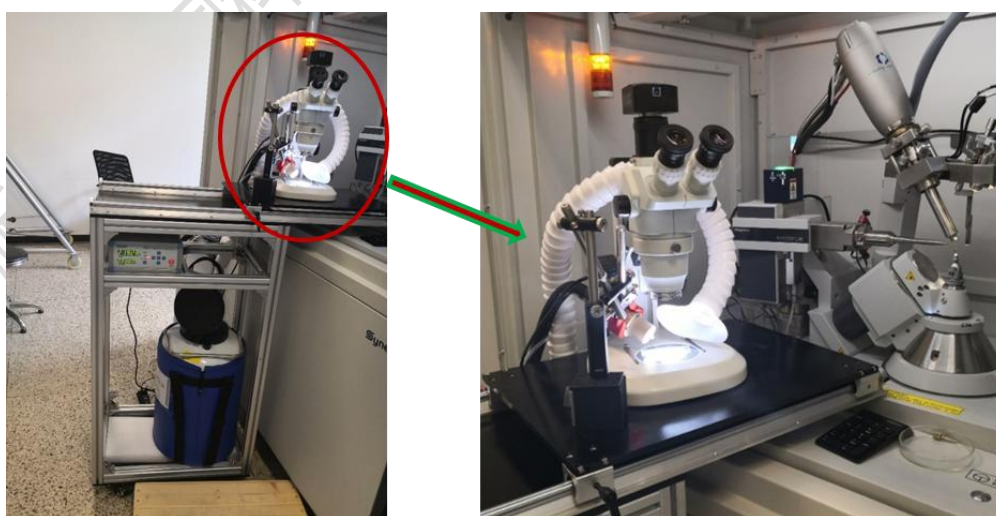
可移动单晶样品挑选台和封管装置功能介绍

► 梁同玲 袁 震

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

单晶测试前需要进行样品挑选和转移两个步骤。第一个步骤是挑选，实验室制备的单晶样品通常较小（百微米尺度），需要在光学显微镜下挑选合适的单晶样品，当然有时需要对单晶实施切割“手术”得到更理想的样品，从而保证测试结果更优。挑选过程通常在室温和空气的环境下进行，一般需要几十秒到十几分钟不等，主要取决于样品的优劣和挑选人的经验。第二个步骤是转移，将样品固定在 loop（一段由高分子材料制成的环状细丝）或玻璃丝（毛细玻璃管受热条件下拉制的玻璃细丝）上，随后转移至载晶台。上述方法是对常规样品进行挑选和转移的最常用方法，但上述方法中样品挑选和转移过程均在大气环境中进行，对于包括对氧气、水、温度的敏感样品以及易失去溶剂分子而风化的空气敏感样品，其并不适用。由于空气敏感样品在挑选和转移过程中非常容易变坏，因此，对这类样品进行挑选和转移具有一定的挑战性。为此我们在中科院仪器设备功能开发技术创新项目的支持下研制了两套装置来解决空气敏感样品的挑选和转移难题。

一套是可移动单晶样品挑选台，主要解决可以脱离母液的空气敏感样品的挑选和转移难题。下面是装置实物图，主要包括氮气保护系统、显微镜、可移动挑样台、可移动支架。



● 图 1、可移动单晶样品挑选台

我们的设计思路一是样品挑选时根据样品的特点给与一定的保护措施，防止样品挑选时变坏；二是尽量缩短挑晶台与载晶台之间的距离，防止样品在转移过程中变坏。挑样时可把整体装置移动到仪器外，挑晶台移动到仪器屏蔽仓内，上样完毕，整个装置可以快速方便的移开，不影响样品测试和仪器维护维修。

另一套装置是一体式封管装置，主要解决不能脱离母液的样品挑选和转移难题。主要有双层玻璃管、一体式底座和移液器组成。

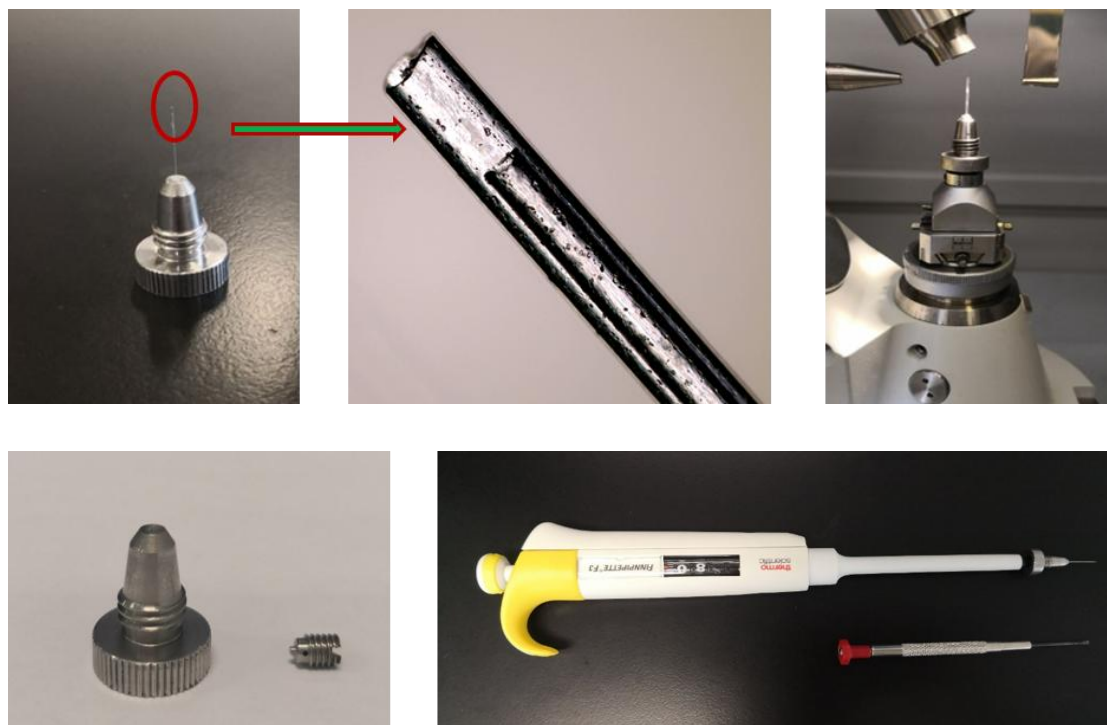


图 2、一体式封管装置

双层玻璃管用来固定和密封样品；底座与仪器载晶台相匹配；移液器用来吸取样品。取样时将底部螺丝拧松，此时移液器、底座和玻璃管是互通的，取样完成后用石蜡或者粘稠度较高的油将双层玻璃管的上端密封，然后取下移液器，拧紧底端螺丝。这样就保证了样品被密封在玻璃管中，且一直处在母液的氛围中。另外一体式封管装置还可以与可移动单晶样品挑选台配合使用，低温下封管。下图是一有机分子在常规条件下测试和用封管装置测试的衍射照片。此样品是用二氯甲烷培养的，晶体脱离母液后迅速风化变坏。图三是没有封管测试的最好的衍射照片，衍射点明显连在一起，晶胞参数找不准；图四是封管测试的衍射照片，衍射点明显变好，整体数据质量良好。其晶胞参数： $a = 9.5594 \text{ \AA}$, $b = 10.2301 \text{ \AA}$, c

$= 17.7293 \text{ \AA}$, $\alpha = 94.232^\circ$, $\beta = 104.68^\circ$, $\gamma = 109.816^\circ$; $R_{\text{equivalents}} = 0.1177$,
 $\text{sigmaI/netI} = 0.058$ 。

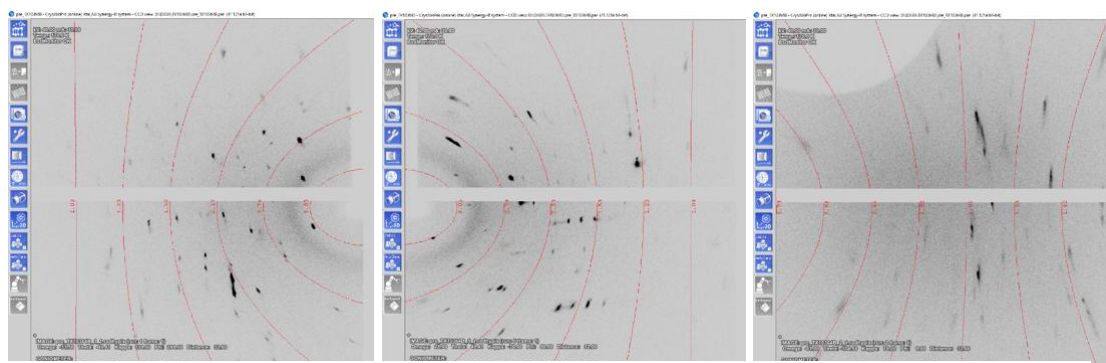


图 3、常规条件下测试的衍射照片

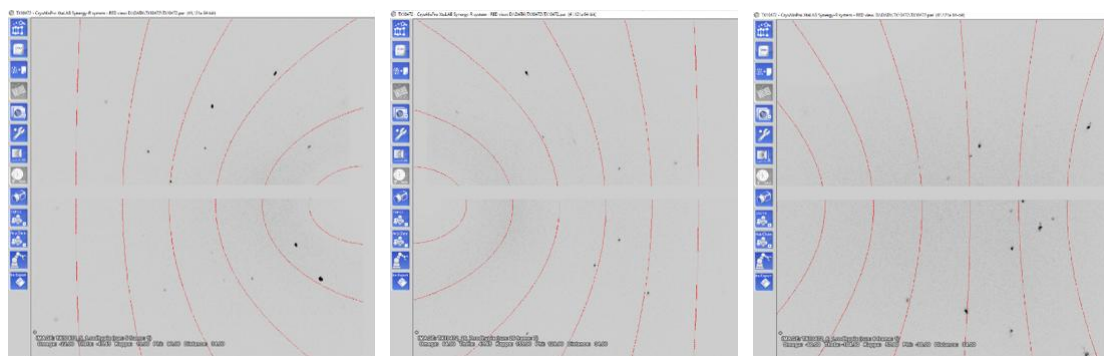


图 4、封管测试的衍射照片

现在我们实验室能够在 -50°C —室温的氮气保护下、在仪器内部进行样品的挑选和粘贴，并且能够 1 s 快速转移样品；我们有了新的封管装置，实现了一步快速封管。这将有效解决各种空气敏感样品的挑选和转移难题，提高衍射数据质量和样品测试成功率。

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！

三维激光扫描仪的原理及应用

► 袁 震

(分析测试中心仪器研发岗 Tel: 15210166150 Email: yuanzhen@iccas.ac.cn)

一、 三维激光扫描仪的原理及类别

三维激光扫描是一种使用激光光线来捕捉和数字化真实世界物体的技术。三维激光扫描系统主要由三维激光扫描仪、计算机、电源供应系统、支架以及系统配套软件构成。三维激光扫描仪作为三维激光扫描系统的主要组成部分，是由激光器、接收器、时间计数器、可旋转滤光镜、控制电路板、微电脑、CCD 相机以及软件等组成。三维激光扫描仪利用激光测距的原理，把激光先投射到被测物体表面，继而反射回扫描仪内的传感器中，扫描仪据此计算其与物体的距离，确定物体在空间中的位置，得到三维点云数据。三维激光扫描系统分为机载（用于大地测绘，城市级别的测绘）、车载（用于建筑、道路测绘）、背包（用于规划测绘）和手持型（用于工业测绘）等几种类型。

根据工作需要，分析测试中心 2021 年购置了一台武汉中观自动化科技有限公司生产的手持式三维激光扫描仪，型号为 Atlascan（主要技术指标见表 1），主要用于分析测试中心商业化仪器功能开发、维修以及科学仪器研制过程中涉及的逆向设计、三维测量等工作。

表 1、 Atlascan 三维激光扫描仪主要技术参数

参数	标准模式	精细模式
测量速率	1,600,000 次测量/秒	900,000 次测量/秒
激光光源	13 对激光线 1 束扫描深孔	7 对激光线
激光类别	II 类（人眼安全）	
分辨率	最高 0.02 mm	最高 0.01 mm
精度	最高 0.02 mm	最高 0.01 mm
基准距	350 mm	200 mm
重量	1 kg	
尺寸	138×295×72 mm	

扫描区域	最大 500×550 mm
输出格式	*.asc,* .stl,* .Obj, *.ply,* .txt

二、 三维激光扫描仪的应用

2.1 逆向设计

逆向设计是对已有零部件进行重新测量并建立模型的过程，因此逆向设计是仪器研制、维修以及功能开发工作的必要组成部分。传统手工测量方法（卡尺、三坐标等）通常很难或不能精确获得商业化仪器复杂、不规则的接口尺寸和外形轮廓，进而造成尺寸不准确、定位不匹配、零件反复修改的问题。三维激光扫描仪可快速、无接触扫描零件表面，获得复杂零件表面的高精度三维点云数据。这些数据经过配套软件处理为三角面片，使用 NX/UG、Design X 等软件对三角面片进行形状拟合和特征提取，进而快速获得复杂部件的三维轮廓与精确尺寸，极大提高功能开发和关键零部件逆向开发效率。

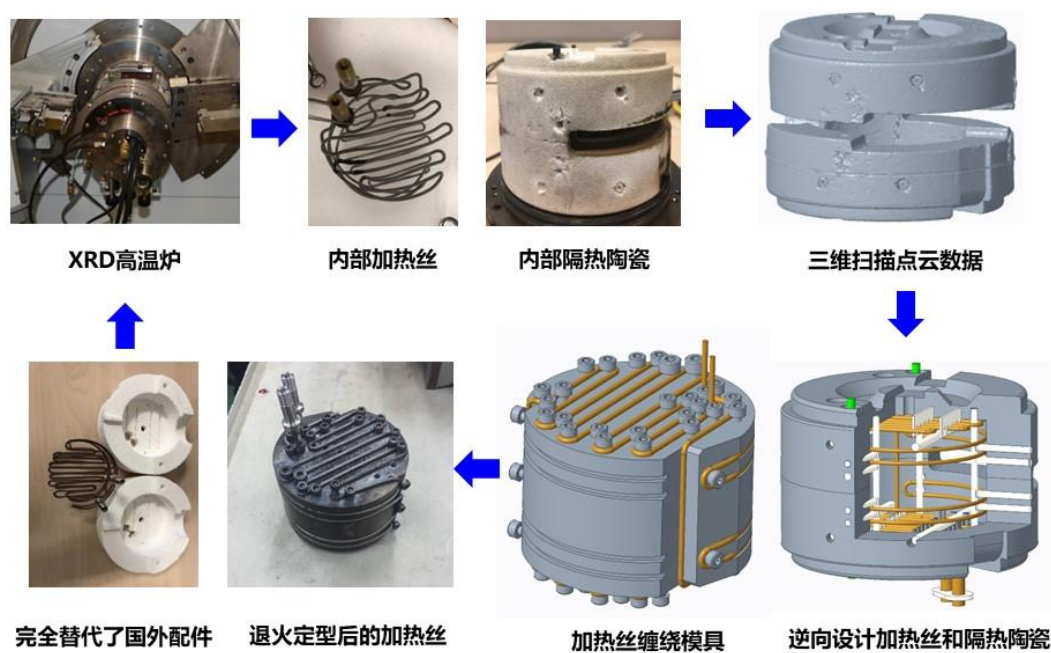


图 1、使用三维扫描仪逆向设计 XRD 高温炉耗材的工作流程示意图

2.2 质量检测

对于形状比较复杂、曲面轮廓较多的零件，使用传统的测量方法，如检具、治具、三坐标等，不仅十分繁琐、耗时，而且不易对零部件的结构进行准确、快

速地测量、检测。三维激光扫描为此类零件的检测带来很大方便。它可在不对扫描工件造成磨损破坏的前提下提供可靠、真实的三维数据信息；可将得到的三维数据与三维模型、二维图纸进行比对，快速准确地获取工件各个位置的偏差，从而基于比对结果给出修正方案；对于测量死角、复杂曲面、同轴度，圆柱度等用传统方法难以检测的数据，也都可以轻而易举地获取；同时，快捷的扫描也可以提高检测的效率，减少时间和人力成本。



图 2、使用三维扫描仪评估复杂零件加工精度的工作流程示意图

2.3 其他应用

其他应用还包括：三维可视化（通过扫描、建模以及贴图方式将实物以三维模型的形式进行展示）、3D 打印（将扫描的数据直接进行增材制造）、虚拟装配（以数字化形式验证装配设计、生产操作的正确与否）等。

三、 总结

三维激光扫描仪以其高效、快速、精准、无损无接触扫描、数字化兼容性好等优点，在工业设计、测绘工程、建筑工程、考古学等领域已被广泛使用，有望为我所科学仪器研制、商业化仪器功能开发和维修等相关工作提供极大便利，大幅提高工作效率。

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！

顶空固相微萃取-高分辨气质联用的原理及应用

► 魏金超

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

一、固相微萃取技术 (SPME) 介绍

1.1 固相微萃取的原理^[1]

固相微萃取技术是一项集采样、萃取、浓缩、进样于一体样品前处理技术，具有简单、快速、便携、无需溶剂、易于实现自动化等优点。固相微萃取过程是一个多相平衡的复杂过程，是待测物在基质、顶空和涂层中的分配的过程。分析物在涂层与基质之间的分配主要有两种机理—吸收机理和吸附机理，如图 1。吸收则是分子通过两相之间的分配作用溶进了涂层的主体内。吸附是分析物分子通过化学相互作用与涂层表面发生作用力。由于萃取机理的不同，各类萃取头涂层厚度、固定相极性、聚合物颗粒大小、孔径等性质对萃取性能有着明显的影响。

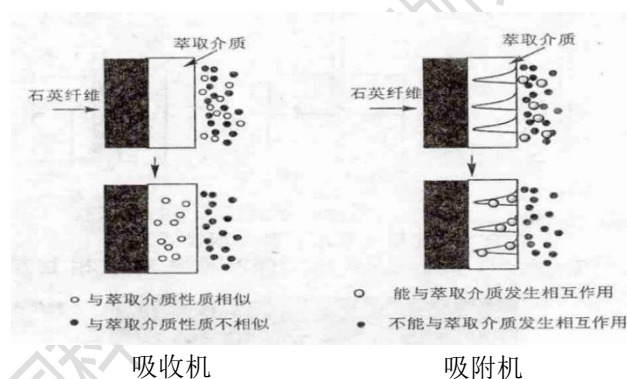
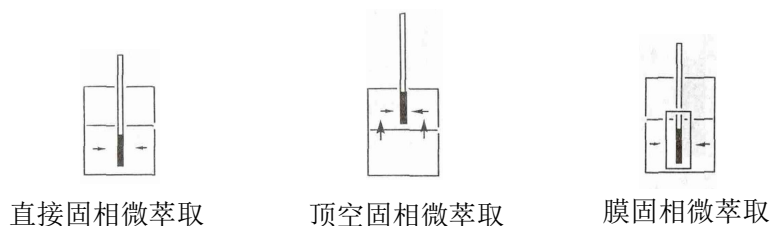


图 1、固相微萃取原理^[1]

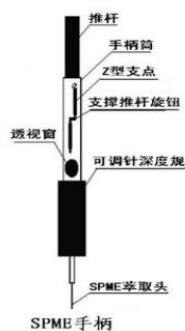
1.2 固相微萃取方式^[2]

固相微萃取有三种萃取模式：直接固相微萃取、顶空固相微萃取、膜固相微萃取，如图 2。直接固相微萃取是将具有吸附涂层的萃取头直接暴露在样品中进行萃取；顶空固相微萃取是将萃取头置于样品上方一段距离进行萃取。膜固相微萃取是通过一个选择性的高分子材料膜将试样与萃取头分离从而实现萃取。

图 2、固相微萃取方式^[2]

1.3 固相微萃取装置^[3]

固相微萃取装置由手柄和萃取头两部分构成，如图 3。萃取头是一根涂了一定厚度色谱固定相膜或吸附剂膜的熔融石英纤维，外套中空不锈钢针管（用于保护纤维头，及采样或进样时穿刺隔垫），纤维头可以在针管中自由伸缩。

图 3、固相微萃取装置^[3]

1.4 萃取头的选择

萃取头是固相微萃取的核心技术，影响分析灵敏度和选择性的最重要因素。萃取头选择遵循“相似相溶”的基本原则，对于极性的待测物，应该选择极性固定相，对于非极性的待测物要选择非极性的固定相。萃取膜厚度对于吸附也有重要作用，能够影响萃取时间和样品容量。

表 1、萃取头选择

萃取头类别	膜厚	具体描述	用途
PDMS	100 μm	非键合 红色平头	小分子挥发性非极性物质
	30 μm	非键合 黄色平头	半挥发性非极性物质
	7 μm	键合 绿色平头	半挥发性非极性物质
PDMS/DVB	65 μm	部分交联 蓝色平头	挥发性极性物质，醇、胺类

	65 μm	高度交联 褐色凹头	半挥发性极性物质, 胺类
PA	85 μm	部分交联 白色平头	半挥发性极性物质, 酚类
CAR/PDMS	85 μm	部分交联 黑色平头	痕量 VOC
CW/DVB	65 μm	部分交联 橙色平头	痕量 VOC
CW/TPR	50 μm	部分交联 紫色凹头	表面活性剂 HPLC
DVB/CAR/PDMS	50 μm	高度交联 灰色平头	C3-C20 大范围分析
CAR/PDMS	75 μm	野外采样 PK2	半挥发性极性物质
CAR/DVB	70 μm	野外采样 PK2	空气中有机组分
PEG/DVB	65 μm	部分交联 白色平头	极性化合物

注: PDMS-聚二甲基硅烷; DVB-二乙烯基苯; PA-聚丙烯酸酯; CAR-碳分子筛; PEG-聚乙二醇; CW-聚乙二醇。

二、顶空固相微萃取-高分辨气质联用技术

2.1 顶空固相微萃取 (HS-SPME)

将待测样本置于一恒温密闭顶空瓶中, 通过加热升温使得挥发性组分从样本中挥发出来, 当顶空瓶里面的气液(气固)两相中达到热力学平衡之后, 将 SPME 针管穿透顶空瓶, 萃取头置于样品上部空间进行吸附、富集, 然后将吸附有分析物的萃取头直接插入气相色谱进样口, 通过加热将分析物从萃取头上热解吸下来。顶空固相微萃取继承了顶空技术操作简单、不受样品基体干扰的优点, 延长萃取纤维的使用寿命, 又能在采样的同时进行浓缩, 大大提高分析的灵敏度。

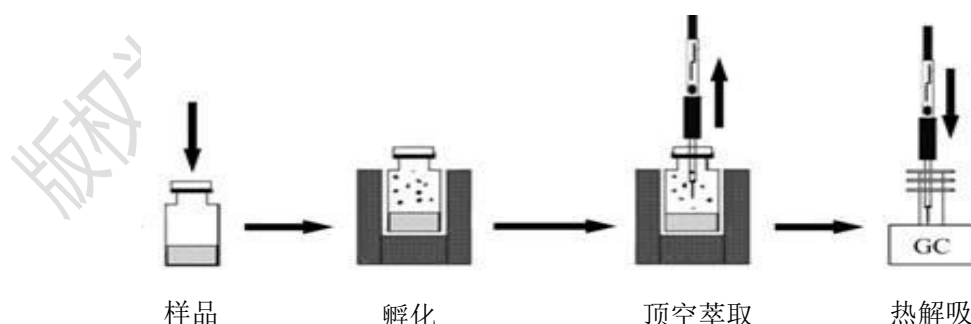


图 4、顶空固相微萃取流程图

2.2 高分辨气质联用技术 (GC-EI-Orbitrap-MS)

气相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱作为一款以静电场轨道阱为核心技术的高分辨质谱, 其分辨率可达 60000 FWHM 以上, 主要以全扫描数据采集模式, 具

备高质量精度（在 2 ppm 内），高灵敏度（常规检测可达 pg/mL），同时利用 TraceFinder 的解卷积功能，可对获得的谱图进行快速处理，去除相应的干扰，在化合物鉴定方面提供了可靠、高效的保证。

2.2.1 静电场轨道阱（Orbitrap）原理

离子经过 C-Trap 冷却富集以一定的角度进入 Orbitrap，在 Orbitrap 里面做离子回旋共振运动，其中沿着 X 轴左右谐振的频率跟质荷比的平方根成反比，Orbitrap 就会记录这个左右谐振产生的镜像电流频率，通过傅里叶变换把这个镜像电流产生的频率信号转化成时域信号，得到对应质谱图，Orbitrap 既是质量分析器也是检测器，离子会在给定的时空条件下被同时检测出来，原始数据的每个扫描点都是高分辨率、高质量精度的数据。

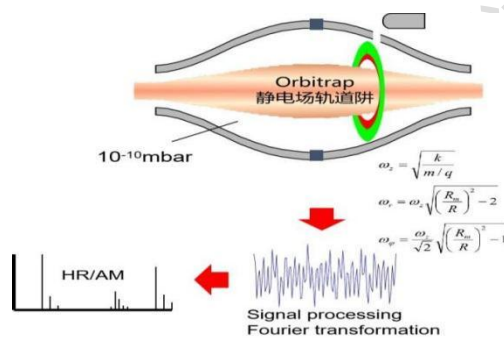


图 5、静电场轨道阱原理图

2.2.2 解卷积

解卷积是一种软件的算法，将共流出某一个时间点混合质谱图所有离子提取出来，然后再叠加，根据质谱峰顶点的保留时间和峰形进行重新归类，一张混合质谱图重新归类成数张比较纯的质谱图，得到纯的质谱图再进行 NIST 库的检索。可用于鉴定色谱上共流出但质谱峰顶点仍然分离的化合物。

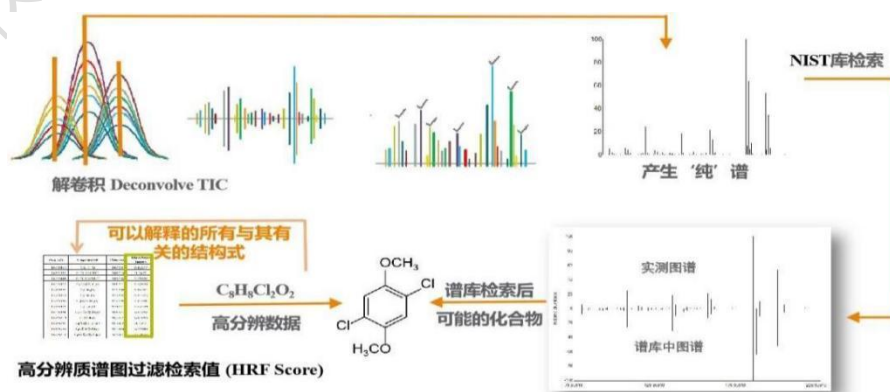


图 6、解卷积流程图

三、顶空固相微萃取-高分辨气质联用技术在分析显示屏光固化粘结胶膜(OCA)未固化残留组分中应用

丙烯酸树脂经改性可快速光固型丝网印刷用胶黏剂，广泛应用于薄膜开关、触控面板等电子设备组件的粘结。高端 UV 屏下胶黏剂光固化后通常会有单体残留，其单体残留量少，其沸点、组成以及分子量范围等信息未知。基于顶空固相微萃取高分辨气质联用技术开展相关测试工作。

3.1 实验流程

顶空固相微萃取-高分辨气质联用实验流程分为五步：1、实验条件优化 2、数据采集 3、数据分析 4、NIST 库检索 5、未知化合物鉴定。

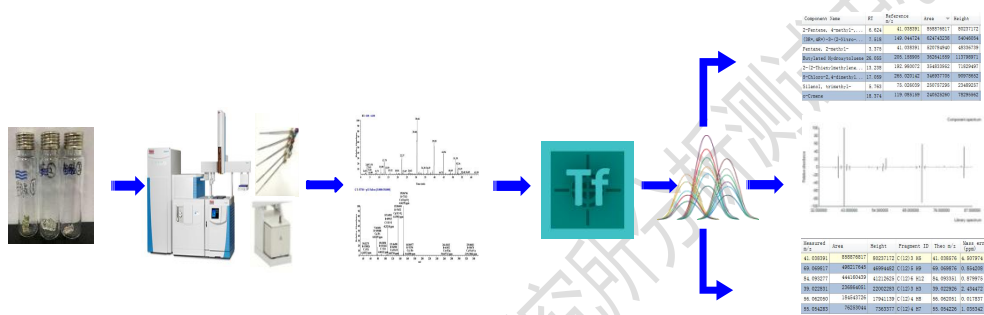


图 7、实验流程图

3.2 实验条件

SPME 条件：萃取头 85 μm CAR/PDMS，萃取温度 120 $^{\circ}\text{C}$ ，萃取时间 30 min，解析时间 5 min；GC 条件：色谱柱 DB-5HT (30 m \times 0.25 mm \times 0.1 μm)，进样口：200 $^{\circ}\text{C}$ ，不分流模式，升温程序：40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min，以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 250 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 15 min；MS 条件：离子源温度 260 $^{\circ}\text{C}$ ，分辨率 60000，电子轰击能量 70 eV。

3.3 实验结果

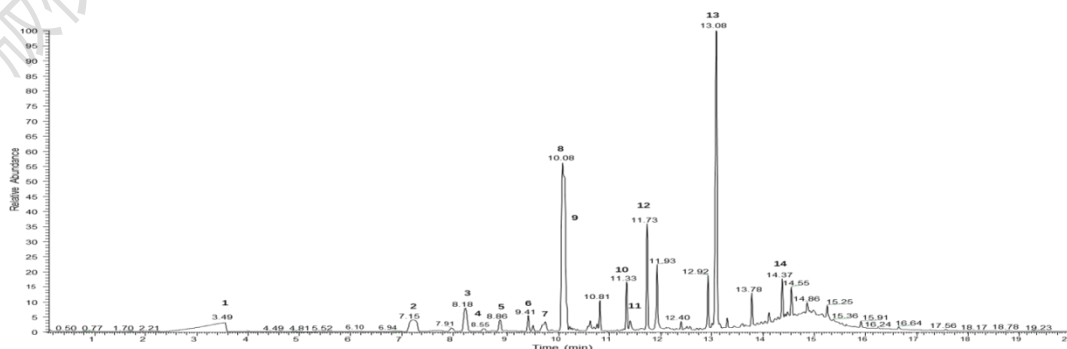


图 8、OCA 未固化组分总离子流图

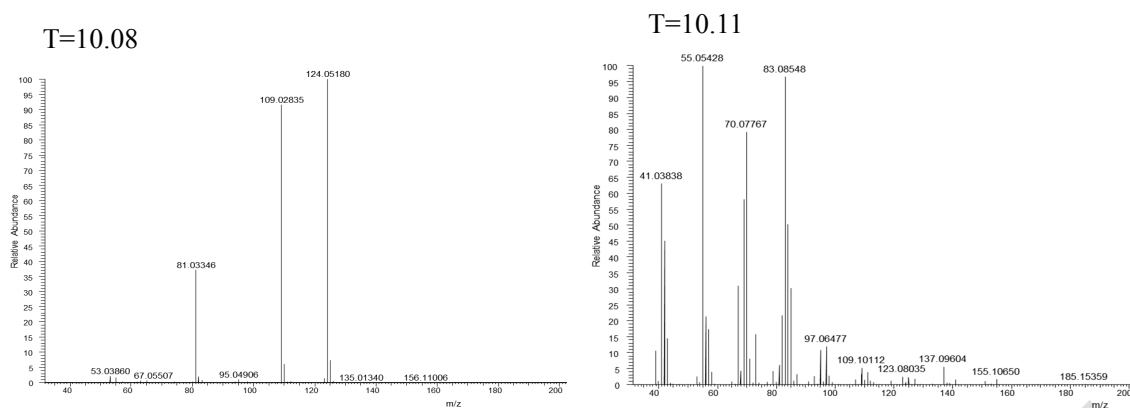

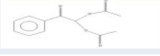














图 9、T=10.08 和 T=10.11 对应质谱图

图 8 是 OCA 未固化组分 TIC 图，得到的数据利用解卷积软件进行解卷积，得到纯的质谱图再进行 NIST 库的检索，并查阅相关参考文献，筛选出 $SI \geq 700$ ， $HRFScore \geq 90$ 定性结果，以各组分峰面积占总峰面积的百分比表示其相对含量。从图 8 中可以看到 T=10.08 是一个色谱峰，利用解卷积软件进行解卷积发现，T=10.08 和 T=10.11 是两个不同化合物，如图 9。

通过 HS-SPME-GC-MS 共检测 OCA 未固化组分 14 种，并确定各个组分相对含量，如表 2。

表 2、OCA 未固化组分 HS-SPME-GC-MS 分析结果

	RT	定性结构	SI	HRFScore	Area	相对含量/%
1	3.49		762	99.30	32472336544	11.28%
2	7.15		846	98.76	12260738544	4.26%
3	8.18		844	99.69	11632048406	4.04%
4	8.55		752	97.39	1759206150	0.61%
5	8.86		797	98.29	3727829756	1.29%
6	9.41		788	94.05	3878852837	1.35%
7	9.75		841	97.86	6092846558	2.12%
8	10.08		766	97.48	39707056518	13.79%
9	10.11		765	97.90	58877706563	20.45%
10	11.33		847	99.08	7958127226	2.76%
11	11.4		836	96.19	2114829493	0.73%
12	11.73		765	97.12	19488608080	6.77%
13	13.08		846	98.03	81095375907	28.16%
14	14.37		835	99.89	6873905819	2.39%

固相微萃取技术作为一种真正的无溶剂萃取技术, 随着性能更好的萃取头涂层材料的出现, 它必将拥有更为广阔的发展前景。全自动顶空固相微萃取与高分辨率、高灵敏度 GC-Orbitrap 相结合, 并拥有完整数据采集和处理流程, 可广泛应用食品、环境、工业和生物样品分析。

参考文献:

- 1、黄悯嘉, 游静, 梁冰, 欧庆瑜. 固相微萃取的涂层进展. *色谱*, 2001, 19, 314.
- 2、徐溢, 付钰洁. 固相微萃取萃取头制备技术及试验方法的进展. *色谱*, 2004, 22, 528.
- 3、陈丽梅, 张春艳, 潘国卿, 白国涛, 郑书展, 卢华卫, 盛万里. 固相微萃取技术简介. *内蒙古石油化工*, 2015, 17, 117.

低场核磁共振 (Low Field NMR) 技术及其应用

► 李 睿

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

核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, 简称 NMR)是交变磁场与静止强磁场中物质相互作用的一种物理现象。核磁共振技术发展之初主要应用于物理学研究, 用于核磁矩的测量等, 后来逐步进入化学应用领域, 成为鉴定化合物结构, 研究化学动力学、追踪化学反应过程的重要方法, 在有机化学、生物化学、药物化学和化学工业、材料等领域有着广泛和重要的应用。根据磁场的强弱, 核磁共振技术分为高场核磁共振 (≥ 1.0 T, T: 特斯拉, 表示磁场强度大小的单位)、中场核磁共振 (0.5 ~ 1 T) 和低场核磁共振 (≤ 0.5 T)。

理论上, 核磁共振波谱可对至少 8 种可观测量进行精确表征: 如元素 (同位素) 种类、化学位移 (原子化学环境)、积分 (原子摩尔比)、耦合常数 (键连关系及空间取向)、空间关系 (原子核间距)、动态交换、分子体积、原子核弛豫等; 其中, 前面 7 种可观测量主要反映分子结构信息, 为核磁共振波谱技术研究的对象, 场强越高, 参数分辨越好; 而原子核弛豫主要反映分子的动力学信息,

是低场核磁共振分析测试技术研究领域。虽然核磁共振波谱和弛豫测量法都使用磁共振特性并涉及相同的无线电波吸收，但核磁共振波谱学提供有关化学结构每个部分的化学特定信息，而弛豫测量法提供有关被测样品整体特性的信息。那么什么是核磁共振弛豫测量法呢？弛豫测量是指测量或研究核磁共振中的弛豫变量。核磁共振中的弛豫测定用于表征材料特定的物理化学特性，通过收集被测样品的 FID 并开展拉普拉斯逆变换从而确定快速与慢速弛豫组份及含量。虽然在高场谱仪（核磁共振波谱仪）和低场谱仪（弛豫计）均可开展弛豫测量，但通常利用低场核磁谱仪（弛豫计）开展弛豫测量更加准确与高效，更能够从整体角度反应被测样品的微观动力学特征。

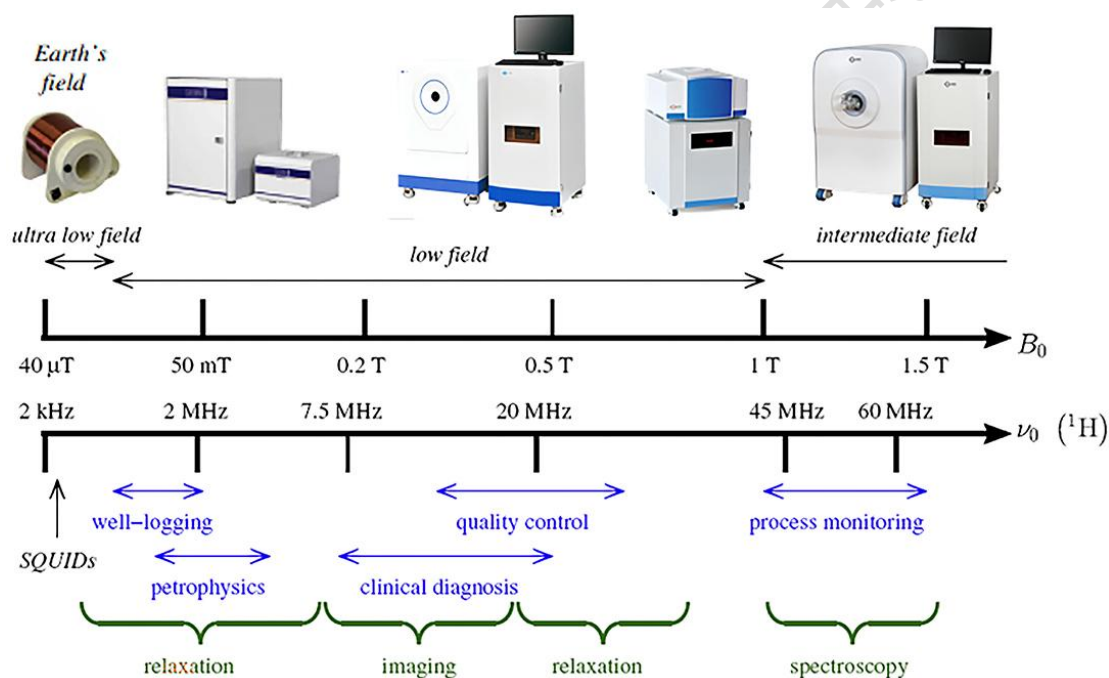


图 1、不同类型中低场谱仪磁场强度示意图^[1]

自旋-晶格弛豫是总磁化矢量的纵向分量从较高能量、非平衡状态到与其周围环境的热力学平衡呈指数弛豫的机制，该过程利用自旋晶格弛豫时间常数 T_1 标度（如式 1）。

$$M_z(t) = M_{z,eq} \left(1 - 2e^{-t/T_1} \right) \quad \text{式 1、纵向磁化矢量 } T_1 \text{ 随时间 } t \text{ 变化关系}$$

自旋-自旋弛豫是磁化矢量的横向分量 M_{xy} 在核磁共振 (NMR) 中呈指数衰减至其平衡值的机制。该时间常数被自旋-自旋弛豫时间常数 T_2 ，这是一个表征信号衰减的时间常数。 T_2 弛豫一般比 T_1 恢复进行得更快，不同的样本和不同的生物

组织有不同的 T_2 。例如，流体具有最长的 T_2 （质子的数量级为秒），水基生物组织在 40~200 ms 范围内，而脂肪基组织在 10~100 ms 范围内。无定形固体的 T_2 在 ms 范围内，而晶体样品的横向磁化强度在 0.05 ms 以内衰减（如式 2）。

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2} \quad \text{式 2、横向磁化矢量 } T_2 \text{ 随时间 } t \text{ 变化关系}$$

对于大多数核磁共振用户而言，频域数据是解锁化学信息的关键，精确的分子结构解析需要较高分辨率。但化学及材料研究中有许多复杂的体系并不需要表征其精确结构，而是需要表征其动力学或者聚集行为等性质。样品的横向和纵向弛豫时间常数与材料内部的动力学特性密切相关，通过利用实验开展时域数据的采集及研究能够有效表征与材料动力学相关的物理化学性质。简单的液体通常表现出单一的指数衰减弛豫行为，但更复杂的材料会产生多指数数据，可以使用反转拉普拉斯变换方法分析这些数据以产生弛豫谱。

利用低场核磁共振技术可有效表征材料内部分子的束缚状态。例如，利用低场核磁共振技术对于不同硬度的橡胶进行横向弛豫时间 (T_2) 的表征发现^[2]：硬度较大的橡胶其内部分子受束缚较强，因此表现出来其 T_2 弛豫时间常数相对较短；而硬度较小的橡胶其内部分子受束缚较弱，因此表现出来其 T_2 弛豫时间常数相对较长（如图 2）。

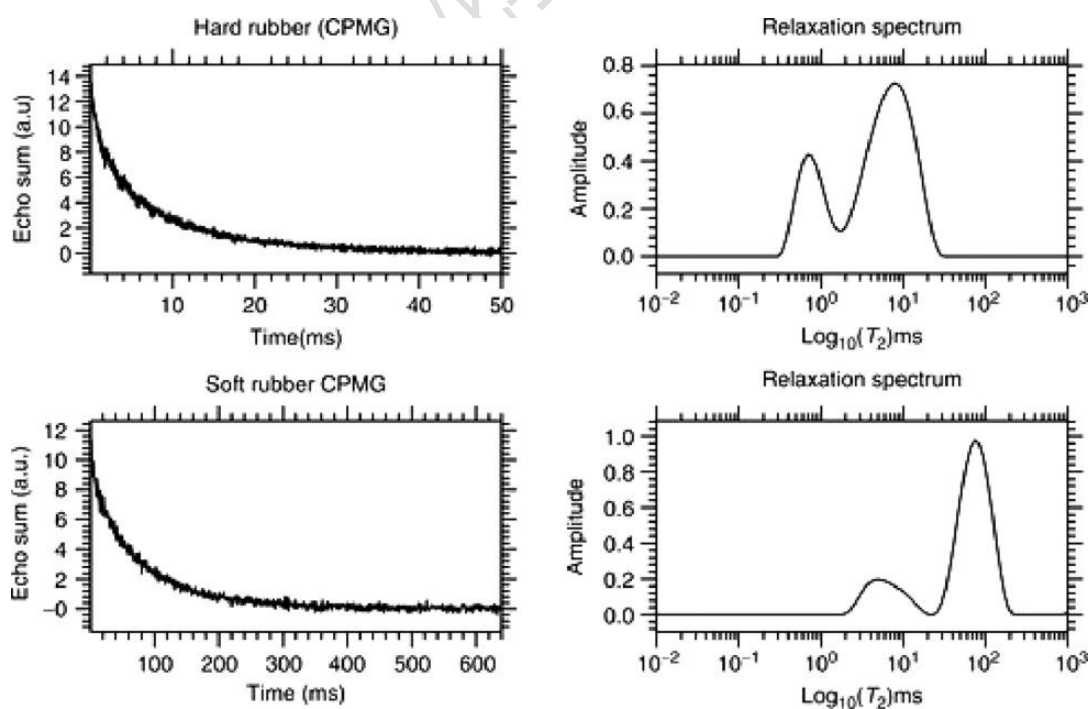


图 2、硬橡胶（上）及软橡胶（下）的低场核磁自由感应衰减谱（左）及弛豫谱（右）。

填充橡胶中聚合物基体的动力学因固体颗粒的存在而改变。法国国家科学研究中心 H el ene Montes 团队^[3]使用低场质子核磁共振弛豫来研究模型填充样品, 该样品由接枝二氧化硅颗粒分散到弹性体基质中组成。该团队利用低场核磁弛豫测定技术, 通过表征材料中不同组份的 T_2 弛豫时间常数, 从而确定其中具有较慢动力学运动性的聚合物部分, 并将其与二氧化硅比表面相联结。通过利用 T_2 弛豫时间常数对聚合物内部不同动力学运动性组份的表征, 表明固定聚合物的存在是由于固体二氧化硅颗粒与聚合物形成稳定的共价键而不是物理混合, 通过这种方式可以检测填料和基质之间是否存在共价键。此外, 随着温度的升高或溶剂的添加, 在二氧化硅和聚合物之间存在共价键的情况下, 弹性体基质的交联密度在颗粒附近局部增加。

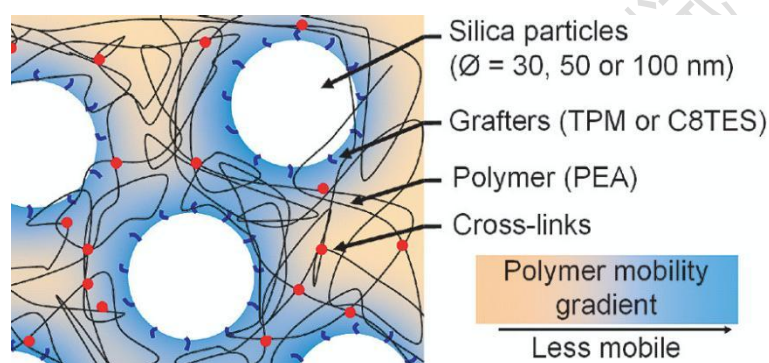


图 3、接枝二氧化硅颗粒分散到弹性体聚合物中并与其形成共价键后聚合物可移动性梯度。

纳米孔径测量对于了解多孔介质的物理和化学性质具有重要意义。东南大学易红团队^[4]近期开发了一种低成本的低场核磁共振测量技术, 针对三种分子筛目标物进行了核磁弛豫表征。该方法利用液体浸润分子筛目标物, 使分子筛内部孔隙被液体填充, 再利用低场核磁共振技术对吸附液体的分子筛体系进行 T_2 弛豫时间常数的测定, 由于不同孔径的孔隙对于液体束缚能力不同, 从而会导致液体 T_2 弛豫时间常数的差异, 通过测量不同孔径分子筛内部吸附液体的 T_2 弛豫时间常数, 可准确测量多孔介质纳米孔的孔径, 该方法为多孔材料纳米孔径的无损和准确表征提供了一种低成本的解决方案。



●图 4、化学所近期安装的低场核磁谱仪

化学所近期安装了一台低场（质子共振频率 20 MHz）核磁谱仪，配有 ^1H 和 ^{19}F 检测探头，分别用于检测含有 ^1H 及 ^{19}F 的样品。同时，该探头能够实现对于样品温度的精确控制（ $-80 \sim +150\text{ }^\circ\text{C}$ ），能够实现在不同温度下的样品弛豫测定。该谱仪可广泛应用于纳米材料孔隙测定；界面作用，润湿性，催化剂界面溶剂吸附动力学；电子设备的液晶研发（相转变）、电池锂材料研发（电解质溶液的传输特性和分子运动）；高分子旋转和平移分子动力学（与 MD 相互印证），链段活化能，同分异构体研究，纳米级聚集尺度评价，高分子扩散系数，凝胶体系溶剂与高分子的相互作用；MRI 造影剂研发、配方研发（溶剂性能、脂质体药物载体）、蛋白质聚集尺度研究，癌症早期诊断，血纤维蛋白测定，巨噬细胞定量，癌细胞跨细胞膜水分交换动力学等。低场核磁共振弛豫技术为多种化学材料及物质内部分子动力学特性的研究提供了一个新的有效的手段。

参考文献：

- 1、Xin-Yun Wang, Jing Xie and Xin-Jun Chen, Applications of Non-invasive and Novel Methods of Low-Field Nuclear Magnetic Resonance and Magnetic Resonance Imaging in Aquatic Products, *Front Nutr.*, **2021**, 8, 651804.
- 2、C. Eccles, Low Field NMR Methods and Applications, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, Elsevier Academic Press, **2017**, 611.

3、 Aurélie Papon, Kay Saalwächter, Kerstin Schäler, Laurent Guy, François Lequeux, and Hélène Montes, Low-Field NMR Investigations of Nanocomposites: Polymer Dynamics and Network Effects, *Macromolecules*, **2011**, *44*, 913.

4、 Rongsheng Lu, Siyu Liu, Qingsong Cai, Xiaowen Jiang, Zhengxiu Wu, Zhonghua Ni and Hong Yi, A Low-Cost Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Cryoporometry System for Nanopore Size Measurement, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, **2022**, *71*, 6003206.

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：010-82613026 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 何万中

郝 项 赵镇文 赵志娟

编辑： 丁丽萍