

傅立叶变换红外显微镜新技术及应用

余 静

(北京市刑科所 北京 100007)

摘 要 FT-IR 显微镜技术是采用 FT-IR 光谱仪与光学显微镜联用的新型系统。红外显微镜技术是一种非破坏性技术,仅需要少量的样品,这些优势使得红外显微镜被理想地用于数量有限的样品。这里将论述红外显微镜对一种特殊法庭样品—头发纤维的分析。红外显微镜对于法庭科学是一个很重要的工具。

关键词 傅立叶变换红外显微镜 物证技术 头发

FT-IR 显微镜技术是采用 FT-IR 光谱仪与光学显微镜联用(或融为一体)的新型系统¹。它是一种“微观”(Micro)技术;在某种意义上说,也是一种“探针”(Microprobe)技术,是近代科学技术领域出现的一种新型高技术。它可以与人们熟知的电子探针和电子扫描显微镜技术相媲美。然而,电子探针和电子扫描显微镜的分析对象是无机元素,并且要在高真空环境下,FT-IR 显微镜(探针)则不然,其对象是无机和有机分子化合物的分子结构和分子取向,并且只需在大气条件下。目前 FT-IR 显微镜技术已成为许多应用领域的必备设备,包括刑事侦破的物证鉴定、生物、药物、聚合物、高分子化学、催化化学、涂料工业、颜料化工、粘合剂、合成物、矿物、天然化合物、宝石中的疵点、纯材料的污染物、金属表面处理²、润滑剂在摩擦中的作用以及半导体产品等等。对绝大多数的物质而言,FT-IR 显微镜技术,无需像经典红外光谱那样分离试样和压片,在保持原样品形态时,只需在 1min 内收集扫描。

1 技术特性

FT-IR 显微镜系统除有 FT-IR 的全部特性之外,在光学显微镜部分,具有为测量红外光谱所需的特殊技术部件,例如红外物镜、光栏以及红外检测器等。世界上研制生产红外显微镜最著名的厂家首推美国 Spectra-Tech(光谱技术)公司。该公司为世界最大的红外光谱仪附件生产厂,为各种红外光谱仪制造商提供多种制样附件。

1.1 同轴(on-axis)光学系统

光学物镜和光学聚光器是同轴将 IR 光束聚焦在试样上。这种同轴光学设计,获得非常尖锐的聚焦点,提高对试样微区的分辨率,并且在透射方式中 100% 利用红外光束的能量,大大地提高光谱的信噪比,也就是提高灵敏度。这种同轴光学特性是离轴显微镜无法媲

美的。目前有些厂商采用的离轴光学系统有两种:一种是使用低价的椭球面反射镜;另一种是在物镜的侧面加入导光镜。这两种形式都不能使红外光束达到像同轴那样高度聚焦,并且它的透射式和反射式都只利用了 50% 的红外光束能量。因此离轴的分辨率和灵敏度均低于同轴光学系统。

1.2 双光栏(Redundant Aperturing)系统

双光栏系统可以非常有效地消除红外光在分析微小样品时的衍射效应所致的额外伪光谱信息。这种额外的伪光谱信息严重时会造成对被测样品光谱的误判。众所周知,当测量的波长范围在中红外(2.5 ~ 25 μm ,即 4000 ~ 400 cm^{-1}),而被测的试样又小于 25 μm 时,必然会产生衍射。衍射光的直接效果是被测微区的光谱被其邻接物质的光谱“污染”,因而出现假峰。

下面列举一个多层聚合物薄膜的实例加以说明。

多层聚合物薄膜的横切面是由三层组成,上、下外层和中间夹层分别是聚丙烯和聚乙烯醇,中间夹层为 25 μm 厚,而上、下两外层为 220 μm 厚。分别用单光栏和双光栏测量外层和中间夹层的红外光谱(见图 1)。图 1 中 A 谱是用双光栏测量的外层显微镜红外光谱,这是纯正的聚丙烯红外光谱。图 1 中 C 也是用双光栏测量的 25 μm 的中间夹层的显微红外光谱,从图 1 中 D 的标准谱库证实,属纯正的聚乙烯醇。问题产生在用单光栏测量的 25 μm 的中间夹层(见图 1B),B 的显微红外光谱明显地告诉我们,它除有主要的中间夹层聚丙烯醇谱之外,还有少量的外层的聚丙烯的光谱信息,即在 1000 cm^{-1} 左右的两个小的锯齿峰(998 cm^{-1} 、971 cm^{-1})以及 1162 cm^{-1} 附近的小尖峰和 1380 cm^{-1} 附近的高尖峰等都是外层 A 谱聚丙烯的光谱信息。所以单光栏衍射光所造成的这样额外的错误光谱信息,巧妙地被双光栏系统消除。这个实例证明,双光栏系统为

多层薄膜和小于 $25\mu\text{m}$ 的微区测量提供正确的纯正的红外光谱信息。

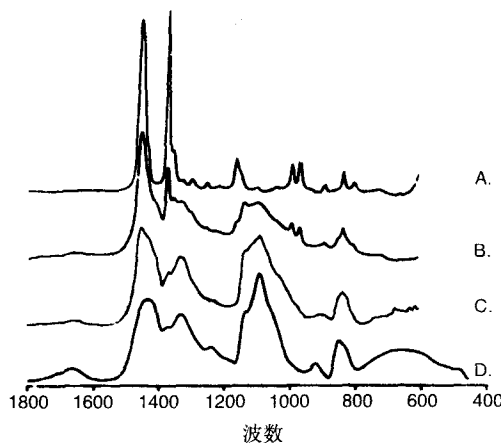


图1 多层聚合物薄膜的显微红外光谱图

1.3 无限校正光学系统 (Infinity Corrected Optics)

无限校正光学系统首次将平行光引入红外显微镜的设计当中, 这和 Leica 公司目前采用的技术一致。无限光学技术改变过去聚焦光为平行光, 消除透镜所产生的球面像差及彗形像差, 使图像轮廓清晰, 同时如果在光路中加滤光片、偏振片时不会产生像差。平行光比聚焦光有着更精确的聚焦性能, 精确的聚焦是检测器能否正确响应信号的根本保证。在无限校正光学系统光路中无法再加入滤光片、偏振片等光学元件。

1.4 DIC (微分干涉相衬) 技术 (Differential Interference Contrast)

该技术基于无限校正光学系统, 有些微小样品可能混杂多种成分, 但是直接观测很难分辨出不同物质。这个时候 DIC 技术就可以让操作者更容易区分样品的不同区域。简单地说, 在无限校正光学系统中加入偏振元件, 通过偏振光的干涉就可以以不同颜色、不同对比度区分出上述类型样品的不同区域。加入偏振元件后, 还可以研究物质的偏振红外光谱。

2 品种与类型

从光学性质不同来分类, FT-IR 显微镜系统可分为透射式、反射式 (属于常用类型)、掠角式 (Grazing Incidence) 和内反射式等四个品种。它们之间的区别主要在红外物镜上。

2.1 掠角式

这是一种特殊的反射/吸收形式。当红外光束的入射角大于 75° 时, 极薄试样的表层, 对掠过的红外光束既产生吸收又发生反射, 这对研究物质表

面和极薄层面 (如 20\AA 厚) 的单分子层的取向能提供非常有用的红外光谱信息。

2.2 内反射式

也可称为“接触式”, 即红外物镜与被测物质的表面完全接触。IR 光束在物镜的全反射晶体内多次反射, 仅穿透物质与晶体接触到界面, 对被测表面而言只有 $1\mu\text{m}$ 的深度。这种内反射形式是显微 ATR 晶体作为探头的红外物镜, 也是物镜直接接触被测物质的表面。这种形式通常用于含水分 (或潮湿) 的试样、生物材料、刚性聚合高分子化合物、杂质以及表面被损伤或污点等方面。由于内反射式的测量深度永远是恒定的值, 因此可以应用于精确定量分析。这是其它形式的物镜所不具备的优势。

3 红外显微镜在法庭科学上的应用——头发纤维分析

3.1 说明

法庭科学极大地得益于红外显微镜内在的众多优势。首先, 显微镜技术仅需要少量的样品用于分析 (皮克或以下)。另外, 红外显微镜是一种非破坏性技术。这些优势使得红外显微镜被理想地用于数量有限的样品, 如法庭调查中的物证。这里将论述红外显微镜对一种特殊法庭样品——头发纤维的分析。

3.2 仪器

尼高力 NEXUS 智能型傅立叶变换红外光谱仪, 红外显微镜, ATR 附件。

3.3 问题

头发纤维是一种罪案现场非常常见的物证。白光显微镜在法庭上通常用于判定未知的头发样品是否来源于某个已知物。如果头发的化学信息也能被包含, 那么判定未知头发与已知物的匹配能力大大提高; 这样红外显微镜在许多法庭实验室中很快成为一个必要的工具。

通过使用红外显微镜, 可以获得大量有关样品的信息。例如, 如果头发由于埋葬或长时间而变质, 用于鉴定的表面特征可能不再存在。在这种情况下, 红外显微镜能够鉴别该纤维是蛋白质的、纤维质的还是合成的。此外, 红外技术还可以检测对头发所进行的任何化学处理 (如漂白或持久卷发)。红外显微镜可用于检测单根头发纤维沿长度方向上的化学损坏, 这对于判定头发自然侵蚀或频繁化学处理的程度非常有用。ATR 显微镜可以分

析单根头发纤维上不连续的表面区域,从而检测各种酸中的残留物,如发胶和护发素。

所有这些技术将为调查者提供更多的信息,以便于鉴定和判别未知纤维可能的来源。

3.4 解决方法

将单根头发纤维切成长度约 $100\mu\text{m}$, 在一块干净的载波片上用滚刀展平。然后用钨探针夹起展平的纤维并移到微量加压池中的底部 KBr 盐片上,同时放一个 KBr 晶体。将第二块 KBr 盐片放在底部盐片的上面,拧紧微量加压池直到在纤维和盐片之间形成光学接触。将加压池放在与尼高力 Magna-IR[®] 傅立叶红外光谱仪联机使用的 Nic-Plan[™] 显微镜的载物台上,透过 KBr 晶体得到背景谱图,透过纤维得到样品谱图。采集条件为 4cm^{-1} 光谱分辨率,背景和样品分别扫描 64 次,样品尺寸为 $50 \times 100\mu\text{m}$ (见图 2)。

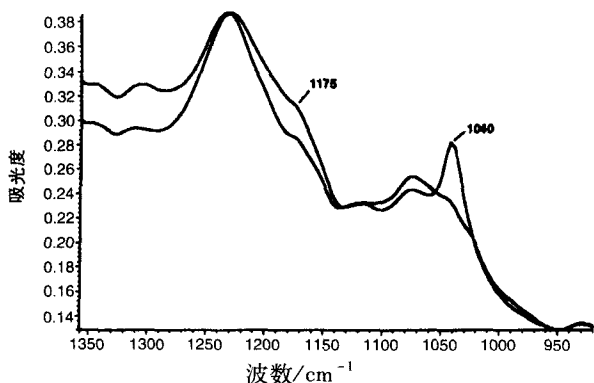


图 2 正常未经处理的头发纤维和化学损坏后的头发纤维的红外谱图

图 2 显示正常未经处理的头发以及经漂白和持久卷发处理后的头发的谱图。在 1175cm^{-1} 和 1040cm^{-1} 处吸收峰增强,说明角蛋白中胱氨酸经二硫化物氧化。这种氧化可以由碱性过氧化氢或漂白处理而引起。 1040cm^{-1} 吸收是由于磺基丙氨酸中对称 $S=O$ 的伸缩, 1175cm^{-1} 吸收是由于不对称 $S=O$ 的伸缩。表 1 表明了头发纤维经不同化学处理后的峰位。显然,这个信息在判定未知头发纤维的可能来源上非常有用。

表 1 不同头发处理方法产生的氧化产物

头发处理方法	氧化产物
碱性过氧化氢	磺基丙氨酸(1040cm^{-1} 和 1175cm^{-1})
偏亚硫酸氢盐处理	S-磺酸盐(Bunte-salt)(1022cm^{-1})
自然侵蚀	胱氨酸一氧化物(1071cm^{-1}),磺基丙氨酸(1040cm^{-1} 和 1175cm^{-1}), Bunte-salt(1022cm^{-1})

第二个例子是关于鉴定头发纤维表面所发现的化妆处理方法。如果这个样品采用透射方式分析,

像第一个样品,谱图显示主要是蛋白质。头发对红外光吸收非常强,用传统的透射技术来鉴定表面的一些物质很困难。而使用 ATR 显微镜,可以容易地获得发胶的谱图。这个实验里,头发纤维放在一块载波片上,两端用双面胶带固定。把样品放在载波片,样品下方的照明光可以用来辅助 ATR 物镜观测模式观察样品。ATR 物镜所使用的晶体是 ZnSe 晶体 ($n=2.4$),当使用直径 2.5mm 上光栏时可以获得直径 $42\mu\text{m}$ 的采样区域 ($100/2.4=42\mu\text{m}$)。以空气为背景光谱(晶体不接触任何东西),背景和样品分别采集 64 次, 8cm^{-1} 分辨率。

图 3 是干净头发和表面有发胶头发的红外光谱图。两张谱图之间存在着明显的区别。将干净头发的谱图与表面有发胶头发的谱图进行差谱处理,图 4 是差谱后的结果,很容易辨认,发胶中主要的残留物为聚乙烯基醋酸盐(或酯)。

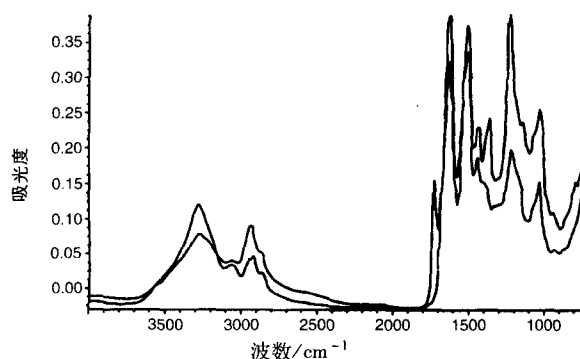


图 3 干净头发和表面有发胶头发的红外光谱图

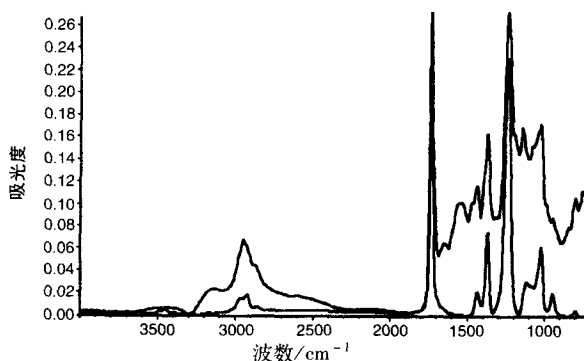


图 4 干净头发与表面有发胶头发的差谱及聚乙烯基醋酸盐(或酯)的参考光谱

3.5 结论

红外显微镜对于法庭科学是一个很重要的工具,可以很容易地对单根头发纤维进行分析,由于化学损坏、自然侵蚀和化妆处理而对头发产生的差异非常明显。因此,红外显微镜所提供的信息可以极大地辅助法庭科学家的调查工作。

(上转第 21 页)

2.4 商业性辐照中二例事故重度急性放射病人照后3h及18h注射10mg E₃,作为防护措施,照后第1,2,3,4,8天尿中E₃水平(见表3)。

表3 急性放射病人尿中E₃

照后 天数	Wei		Ch(女)	
	μg/24h	%	μg/24h	%
1	20.095	0.201	10.491	0.105
2	12.242	0.122	15.693	0.157
3	15.037	0.150	11.304	0.113
4	4.294	0.043	6.742	0.067
8	0.371	0.004	1.044	0.010

表中数据显示注射后大部分E₃在头3天排出,故建议在第四或第五天可再注射一针E₃,对推迟症状和减轻病情有好处。

2.5 孕妇尿中E₄检测

10例正常妊娠妇女尿样(正常组),1例无脑胎儿妊娠者尿,1例贫血妊娠者,6例高血压妊娠者,共8例尿样为不正常组。经GC/MS检测,不正常组8例,尿中均无E₄。正常组尿中E₄含量(见表4)。

不正常组尿中E₄全部阴性,说明孕妇尿中有否E₄可作为判断胎儿是否发育正常的标志之一。

2.6 以上三例实验显示GC/MS在雌激素研究中的应用是可行的,有比较合适的样品前处理方法,内标法可排除操作误差。在MS鉴定的基础上得出定量数据是可信的。

Application of GC/MS in estrin study

Luo Chuanhuan Huang Rongqing Liang Qiande Liang Xiaodong Zhang Ning

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850)

Abstract GC/MS was used in Estrins(E)study including in (I)E in urine from a female Leukemic case with autotransplantation of bone marrow;(II)E₃ in urine of 2 patients who were suffered from radiation accidents and then treated with E₃, (III)E₄ in pregnant woman urine. The results show that GC/MS method was feasible and data from experiment was authentic.

Key words GC/MS Estrins Quality Quantity

(下接第26页)

参考文献

1 吴瑾光等. 近代傅立叶变换红外光谱技术及应用,北京;

科学技术文献出版社,1994

2 周怡等. 近代傅立叶变换红外光谱技术及应用研讨会论文集(五),北京:化学工业出版社,2002

A new technology and an application on the FTIR microscope

Yu Jing

(Beijing Forensic Science Institute, Beijing 100007)

Abstract FTIR microscope is a new system combining the FTIR spectrometer with the IR microscope, which is an ideal tool to analyze some limited samples because of its non-damage and trace examining ability. An analysis of the hair fiber, a kind of forensic evidence sample, is discussed here to illustrate the IR microscope is a very important tool in the forensic science.

Key words FTIR microscope Evidence analysis Hair

表4 正常组尿中E₄含量

序号	妊娠周数 10 天数	E ₄ (μg/24h)
1	39	279.4
2	42+5	226.7
3	38+2	146.4
4	36+5	622.5
5	38+6	585.4
6	41+2	142.8
7	40+3	157.6
8	39+2	144.3
9	34+4	232.2
10	38+4	167.9

参考文献

- 1 Xiao X, McCalley D. Quantitative analysis of estrogens in human urine using gas chromatography/negative chemical ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass spectrum. 2000, 14 (21):1999~2001
- 2 Vinggaard AM, Korner W, Lund KH, et al Identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by an vitro yeast estrogen screen and chemical analysis Chem Res Toxicol 2000, 13 (12):1214~22
- 3 Croley TR, Hughes RJ, Koeing BG, et al Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. Rapid Commun Mass spectrum. 2000, 14(13):1089~93