



透射与衰减全反射: 红外光谱测试的实际案例及讨论

林 翔¹, 李 娟², 彭熙琳³, 程远贵¹, 承 强¹, 阮丽萍¹

(1. 四川大学 化学工程学院, 成都 610065; 2. 四川大学 发展规划处, 成都 610065; 3. 地奥集团成都药业股份有限公司, 成都 610041)

摘要: 对于专业实验技术人员及科研工作者, 合理应用红外仪器分析技术是获得理想测试结果的关键。该文采用文献总结与试验研究的方法, 结合实际案例开展了对红外光谱测试中遇到的常见及典型问题的探讨, 包括衰减全反射(ATR)测试的原理与高波数灵敏度衰减、非溴化钾压片的可行性、溴化钾压片的规范化操作、红外光谱图质量评价与优化等。针对上述问题开展了研究与探讨, 并提出解决方案与建议, 对红外光谱技术应用的改进完善以及红外光谱实验教学具有指导及推广意义。

关键词: 红外光谱; 透射; 衰减全反射; 分析技术; 案例

中图分类号: O433.4

文献标志码: A

DOI: [10.12179/1672-4550.20210457](https://doi.org/10.12179/1672-4550.20210457)

Transmission and Attenuated Total Reflection: Practical Cases and Discussion of Infrared Spectrum Testing

LIN Xiang¹, LI Juan², PENG Xilin³, CHENG Yuangui¹, CHENG Qiang¹, RUAN Liping¹

(1. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Development and Planning Division, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 3. Diaoyuan Group Chengdu Pharmaceutical Co., Ltd, Chengdu 610041, China)

Abstract: For the professional experimental technicians and scientific researchers, it is the key point to obtain an ideal test result that applying infrared instrument analysis technology reasonably. In this paper, by means of literature review and experimental study, some common and typical problems in the infrared spectrum testing are discussed in combination with practical cases, and the content includes the principle of attenuated total reflection (ATR) test, the high wave number sensitivity attenuation, the feasibility of non-KBr potassium tablets, the standardization operation of KBr potassium tablets, the quality evaluation and optimization of infrared spectra, etc. In view of the above problems, some solutions and suggestions are put forward in this paper to promote the application of infrared analytical technology, which are of great significance to the improvement of the application of infrared spectrometry technology and the experimental teaching.

Key words: infrared spectrum; transmission; attenuated total reflection; analysis technology; case

1944 年, 第一台商品化的单光束棱镜分光红外光谱仪诞生; 1950 年, 第一台商品化的双光束棱镜分光红外光谱仪诞生; 1984 年, 第一台商品化的傅里叶变换红外光谱仪诞生。红外光谱已经与紫外光谱、核磁共振谱和质谱构成了有机化合物结构解析的“四大谱”技术, 且红外光谱技术在“四大谱”实验教学中地位独特^[1-2]。其一, 红外测试多使用固相样品, 而其他三谱以液相样品为主, 红外的固体制样技术丰富了本科生实验技

能训练内容; 其二, 红外仪器防潮设计的改进, 如采用无孔铝材制成的密封系统, 显著降低了对设备工作环境湿度的要求, 仅需仪器处于常开状态并定期更换其内部的吸湿剂(分子筛)即可, 无需专门的除湿设施; 其三, 2010 年以后, 多种高可靠性、低维护性、高便携性的傅里叶变换红外光谱仪陆续推向市场, 其价格已经与中档紫外-可见分光光度计接近, 在本科教学中更容易实现多台套配备。由此, 学院购置了多台 PerkinElmer

收稿日期: 2021-09-14; 修回日期: 2021-11-25

基金项目: 四川省科技计划项目(2021JDR0317); 四川省重点研发项目(2021YFG0227); 四川大学实验技术立项项目(scu201127)。

作者简介: 林翔(1983-), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事光谱技术应用研究及实验教学。E-mail: linxiang@scu.edu.cn

公司生产的 Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱仪,配备了常规透射、衰减全反射(ATR)、气体长程反射附件,为本科实验教学和科研活动提供了良好的服务,本科生、研究生经过仪器上机操作培训后均能独立完成测试。8年以来,该类设备一直是学院接纳本科生人数最多,开放机时数最长的现代分析仪器之一,并通过独立设置以及整合于其他实验项目两种形式有效地融合到制药工程专业实验体系。

8年来,使用红外光谱仪器的学生和教师不断提出各种问题,其中多数问题可在教材中获得答案;但是有些问题在当前教材中要么不提,要么语焉不详,无法让师生满意(如哪些物态的样品适合分析、还有哪些替代溴化钾的稀释剂等)。在实际工作中不断解决此类问题将有助于推动专业实验教学与科研的开展。基于此,本文梳理了红外实验操作的常见要点以及容易被忽视的细节,通过文献总结与试验研究的方法,结合实际案例展开了探讨,最后提出了解决方案与建议,以期促进红外光谱技术更好地应用于实验教学与科研活动。

1 红外光谱测量方法的选择

光学系统是傅里叶变换红外光谱仪的主要部件,透射光路为傅里叶变换红外光谱仪的常用配置,此外,还可选择性地安装其他光路附件,如 ATR 附件、漫反射附件、气体长程反射附件等^[3-4]。透射光谱法是传统的、常用的红外光谱测量方法,现有的红外光谱数据库中存储的亦多为透射光谱标准谱图,此方法常用于粉末样品或易研磨为粉末的固体样品检测。然而,一些固体样品不易研磨成粉末或不易压片,如膜、橡胶、塑料纸、高分子材料等,漫反射、ATR 等方法为无法使用常规红外透射法测量的样品提供了可靠的光谱测量手段^[5-6]。

ATR 光谱法因其无需或较少对样品进行前处理,可实现样品原位分析的特点,是近年来傅里叶变换红外光谱仪应用最广泛的光路模式之一。单次反射 ATR 光路原理如图 1 和式(1)所示,入射光经过折射率较大的光学晶体透射到折射率较小的试样表面,当入射角 θ 大于临界角 θ_c 时,试样(光疏介质)中将不再存在折射光,即发生全反射现象,入射光穿透试样内一定深度后再返回表

面,产生反射^[4]。在这个过程中,如果试样在入射光频率区域内有吸收,反射光强度在试样有吸收的频率位置发生减弱,可产生和普通透射吸收相类似的谱图,因此可用于不易溶解、熔化、难于粉碎的弹性或粘性样品的官能团鉴别。

$$\sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1} \quad (1)$$

式中, n_1 为光学晶体的折射率, n_2 为试样的折射率, θ_c 为临界角^[6-7]。实验室 ATR 使用 ZnSe 作为光学晶体,折射率约为 2.4,有机物折射率通常接近 1.5,由式(1)计算,入射光在 ZnSe 晶体的 θ_c 约为 38.68° 。且随着试样折射率降低,临界角 θ_c 相应减小。

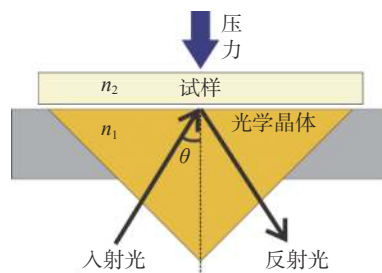


图1 ATR 光路原理示意图

采用 ATR 光谱法时,须注意以下 3 点。

1) 样品与 ATR 光学晶体表面密切接触,如果二者之间存在小的空隙,将可能无法获得理想的 ATR 光谱。因此,需要对样品进行压实,以确保样品与晶体有良好的接触;同时,应避免因加压力度过大而导致的光学晶体表面磨损。

2) 红外辐射透过 ATR 晶体表面并穿透到样品的深度部分取决于红外辐射的波长。穿透深度(d_p)是指从表面到辐射强度为表面辐射强度 $1/e$ 的距离,如果样品无红外吸收,则存在以下关系:

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{1/2}} \quad (2)$$

式中, $n_{21} = n_2 / n_1$, $\lambda_1 = \lambda / n_1$ 。式(2)表明,随着红外辐射波长减小(波数增加),对试样的穿透深度减小,这导致 ATR 光谱峰的强度相应下降(相对于同一样品的透射峰);同时,ATR 晶体的折射率 n_1 亦影响红外辐射穿透试样的深度,折射率越小,穿透深度越大。因此,尽管 ATR 光谱与透射光谱相似,但 ATR 光谱中波段的相对强度取决于波数和 ATR 光学晶体的折射率,在实际测试时,随着扫描波长(波数)由 $25 \mu\text{m}$ (400 cm^{-1})变化到

2.5 μm (4000 cm^{-1}), 穿透试样的深度相应降至 1/10, 故 ATR 光路在短波长(高波数)区域的灵敏度会显著下降^[6-7]。

3) ATR 光学晶体的红外透光范围。在红外光谱区, 不同光学材料透过红外线的波长范围、物理性能均有所不同^[8]。实验室所用 ATR 附件的光学材料 ZnSe 在 550 cm^{-1} 以下的区域有非常强的红外吸收, 使得该区域样品吸收峰的信噪比(S/N)低, 从而导致无法准确测量样品在 550 cm^{-1} 以下的红外吸收信号^[6]。因此, 采用 ZnSe 作为光学材料的 ATR 附件, 中红外检测波数通常设置为 4000~550 cm^{-1} 。

以学生实验为例, 在教学中引导学生分析和比较透射谱图与 ATR 谱图的差异。在药物波谱解析实验教学中, 设计了采用透射和 ATR 两种光路模式分析同一样品, 并对两种谱图(如图 2 所示)进行对比分析。结果表明, ATR 谱峰的强度整体较透射峰更弱, 约为透射峰强度的 10%~20%。透射谱图在 3400 cm^{-1} 附近的羟基峰为圆钝的强峰, 而 ATR 谱图羟基峰的绝对和相对强度均明显减弱, 这是由于随着红外辐射波数的增加, 其透过 ATR 晶体表面穿透到样品的深度减小, 从而导致 ATR 光谱峰的强度相应下降(相对于同一样品的透射峰)。总体而言, 乙酸对硝基苯酯的红外透射峰和 ATR 峰在峰强、峰形上均存在差异。

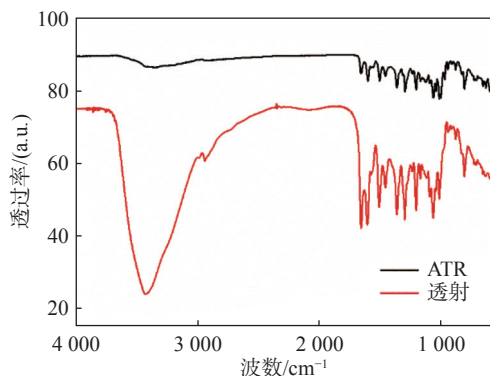


图 2 乙酸对硝基苯酯的透射和 ATR 红外光谱图

在科研活动中, 部分教师曾遇到采用 ATR 附件分析金属板表面的有机涂层时无明显的红外吸收信号的情况。针对这一问题, 笔者与前来咨询的师生进行了交流探讨, 分析导致测试结果不理想可能是以下 2 个原因。

1) 因 ATR 吸收峰强度约为透射峰的 10%~20%, 金属板涂层中有机成分含量接近或低于仪器

的检出限。

2) ATR 测试要求样品与光学晶体表面良好接触, 如金属板表面不平滑, 与晶体接触时无法较好地贴合, 导致无明显的红外检测信号。基于上述原因, 建议将金属板的有机涂层刮下, 然后进行透射分析, 结果如图 3 所示, 产生了明显的红外特征峰信号。

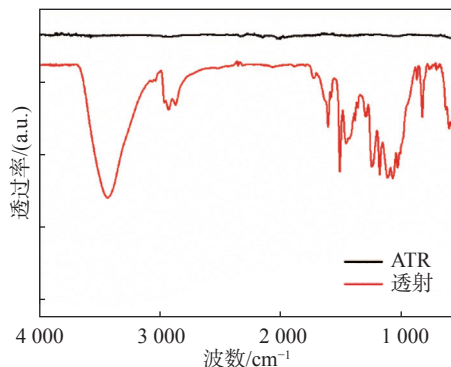


图 3 金属板有机涂层的透射和 ATR 谱图

因此, ATR 不太适合于观察 3000 cm^{-1} 以上的区间信号, 如果一定要采用 ATR 模式, 则应对 3600~3000 cm^{-1} 区域的信号弱化有足够认识。本节列举以上两个实例, 以说明在使用傅里叶变换红外光谱仪时, 测试者应了解实验室所配红外光路附件的工作原理、适用范围等, 并根据样品的性状和测试目的选择适合的红外光谱检测方法。

2 红外透射光谱分析的稀释剂筛选

在红外光谱分析中, 样品制备技术非常重要。如果试样处理不当, 即使仪器性能优良, 也难以得到理想的红外光谱图。红外光谱分析的样品可以是气体、液体或固体, 一般要求是单一组分的纯物质, 且不含游离水。气体样品一般直接导入充真空的气体池检测, 液体样品可以采用溶液法或液膜法检测, 固体样品可用压片法、糊状法或溶液法等进行测量^[9]。

压片法是红外光谱实验室分析固体样品应用最广的方法。将固体样品分散在 4000~400 cm^{-1} 光区不产生红外吸收的化合物(稀释剂)中, 充分混合并研磨, 压制成透明的薄片, 进行红外透射光谱测量。除文献^[10-11]已经报道的稀释剂除溴化钾外, 还有聚四氟乙烯、硫化锌等, 但是, 稀释剂对测试结果的影响没有系统的研究和探讨。教学中时常遇到同学提问而难以给出有说服力的答案。为此, 购买了市售的化学纯聚四氟乙烯粉末、

硫化锌粉末,参照溴化钾制样操作规程进行压片、测试,结果如图4所示。

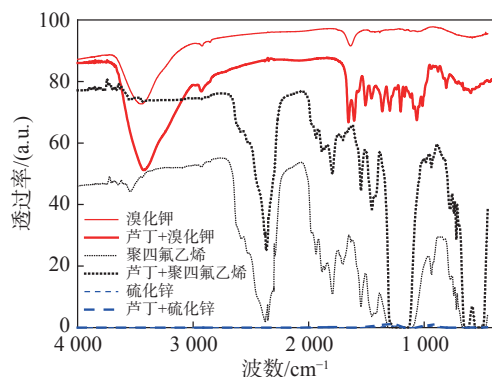


图4 3种稀释剂及芦丁与3种稀释剂混合物的红外光谱图

结果表明,空白硫化锌、芦丁+硫化锌混合物的红外光谱测试结果均无信号峰,这是由于硫化锌为白色颜料,压片所得样片为白色不透明状,光路无法透过样片,因此硫化锌不适合用作红外透射分析的稀释剂。聚四氟乙烯、芦丁+聚四氟乙烯混合物的红外吸收峰的峰位和峰形基本一致,仅由于芦丁与聚四氟乙烯混合研磨和压片的操作中有样品损耗,导致混合物的红外信号强度较未经研磨直接测试的聚四氟乙烯空白更弱,故芦丁+聚四氟乙烯的谱图中难以观察到芦丁的信号峰。基于上述谱图分析结果,在本文所述试验条件下硫化锌和聚四氟乙烯均不适合用作红外透射分析的稀释剂。

相比而言,溴化钾具有一定的可塑性,在压力作用下,成型性较好,压制的薄片呈透明状,在中红外吸收区域除吸潮产生的水峰,无其他明显的特征峰^[12-14]。因此,从综合性能分析,溴化钾是红外透射光谱分析中当前仅有的广普稀释剂^[15-16]。

3 溴化钾压片的规范操作

为了获得高质量的红外光谱图,测试工作者必须进行经常是冗长的、细致的样品前处理工作,即使是常规的样品处理方法,也必须严格遵守规定的程序以获得理想的测试结果^[17]。

进行溴化钾压片操作时,通常样片厚度应在1 mm左右,样片太薄,容易出现碎片现象,样片太厚,影响红外光的透过性。因溴化钾的用量与样片的厚度正相关,所以为控制样片厚度,溴化钾的取用量建议控制在 $120\text{ mg} \pm 10\text{ mg}$ 。制样时,

在用红外灯预先干燥的环境中,使用玛瑙研钵先将试样研细后再加入溴化钾再次研细研匀,这样比较容易混匀。研磨时应按同一方向(顺时针或逆时针)均匀用力,如不按同一方向研磨,可能导致试样转晶,从而影响检测结果。研磨力度不宜太大,研磨到手捻无颗粒感即可。

关于溴化钾压片制样时应研磨到何种粒度,光学理论指出:为了防止溴化钾、样品等颗粒对红外光形成衍射,其粒度应该低于中红外的最小波长,即粒度应小于 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ (大致相当于6500目)^[3]。然而,依靠手工研磨是无法达到这样的粒度。同时手动研磨过程中应减少对水分和二氧化碳的吸收。因此,溴化钾压片操作应该通过充分的试验评价后建立操作规范。

综合考虑上述影响因素,所建溴化钾压片的规范操作为:取约1 mg试样于干净的玛瑙研钵中研细,加约120 mg的溴化钾,沿同一方向混合研磨成细粉后,移入压片模具中,将模具放在压片机上加压,在12~15 MPa的压力下维持3~5 min,缓慢放气去压,取出模具脱模,即得透明的样品薄片^[18-19]。

曾有学生在红外谱图分析时出现数据重现性不佳的问题,与学生探讨和重复试验后发现,是由于溴化钾纯度问题所致。学生作对比分析的样品,一部分使用其所在科研实验室的溴化钾(化学纯),另一部分使用红外仪器实验室的溴化钾(光谱纯),含杂质的溴化钾则源自科研实验室。基于此问题,笔者搜集了四川大学开展红外光谱学生实验以及学校分析测试中心红外仪器室的溴化钾样品,采用压片法制样,进行红外透射光谱分析,开展不同厂家溴化钾(红外级/光谱级)的比较研究,结果如图5所示。

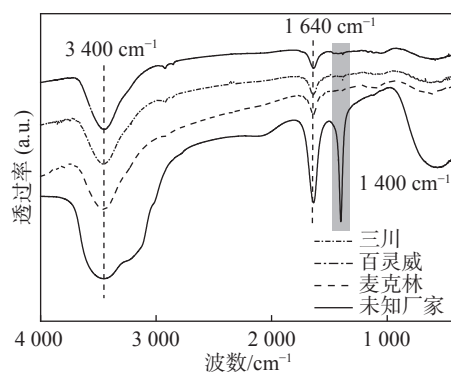


图5 不同厂家溴化钾样品的红外光谱图

由图可得, 4 条谱线在 3400 cm^{-1} 和 1640 cm^{-1} 附近出现了水的吸收峰, 这是由于溴化钾粉末在制样过程中吸附空气中的水蒸气导致。研磨之前无论溴化钾粉末烘得多么干, 也无论空气湿度多么低, 都会出现此现象^[3]。图中河北百灵威超精细材料有限公司的红外级溴化钾、上海麦克林生物化学有限公司的光谱级溴化钾、自贡三川实业有限公司的光谱级溴化钾的红外谱图均只有水峰, 而学生提供的溴化钾(未知厂家)除水峰外, 在 1400 cm^{-1} 处有明显的杂质峰。因此, 红外透射光谱测试建议购买光谱级或红外级的溴化钾, 并测试溴化钾空白片的红外光谱, 如果光谱中没有杂质峰即说明其纯度合格。

4 影响红外光谱图质量的因素及处理建议

红外光谱技术已广泛用于有机化合物的定性鉴别和结构分析。基团的特征吸收频率是定性的基础而特征峰的强度可以用于定量分析^[9]。红外光谱定量分析的依据是朗伯-比尔定律, 所选择的定量分析吸收峰应有足够的强度, 即摩尔吸光系数大的峰, 且与其他峰相重叠。但由于红外吸收峰的摩尔吸光系数小, 灵敏度低; 吸收光程较难控制, 测量误差大; 吸收峰受化学环境、溶剂效应的影响较大等原因, 给红外光谱定量分析带来一定的困难, 目前红外光谱技术仍主要用于样品的定性分析^[20-21]。

开展定性分析时, 经常有学生询问红外光谱图的质量问题, 建议可将以下几点作为判断依据:

1) 无平头峰, 无倒峰, 与试样取用量有关;

2) 基线较平滑, 与粉末样品研磨混合的均匀程度以及颗粒的粉碎程度有关;

3) 针对透射光谱图, 大多数吸收峰的透过率一般应在 10%~80% 范围内, 主要与样品的浓度和样片的厚度有关(浓度太低, 厚度太薄, 会使一些弱信号和细微部分不能显示出来; 过浓、过厚, 又会使强吸收峰超出检出限而无法确定其真正位置)^[22]。

图 6 是学生实验所得芦丁的红外透射光谱图, 图中谱线 1 存在数个透过率接近 0% 的最强吸收峰, 且有平头峰出现, 说明在制样时试样芦丁的用量过大。减少芦丁的用量, 重新制样测试, 结果如谱线 2 所示。

谱线 1 和谱线 2 在 $3000\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 均存在基

线倾斜和基线波动的问题, 可能是由于样片透明度不佳或存在白色斑点所致。在重新制样时, 增加研磨混合时间并控制样片加压时间, 所得样片为透明薄片, 检测结果如谱线 3 所示。说明试样与溴化钾的研磨粒度、混合均匀程度以及加压时间会影响样片的透明度, 进而对红外谱图的质量产生影响, 需在操作中予以重视。

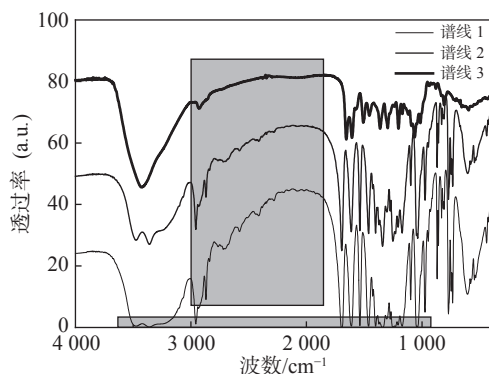


图 6 芦丁的红外谱线质量对比图

5 结束语

该文从实验室分析操作的技术层面, 针对傅里叶变换红外光谱仪透射光谱和 ATR 光谱分析, 给出以下 4 点建议。

1) 了解待测样品的来源、状态和性质, 选择合适的红外检测光路模式和相应的制样技术, 有利于获得高质量的红外光谱图; 同时, 分析人员须掌握实验室所配光学附件的工作原理、适用范围、分析特点等, 以便在实际应用中不断积累经验, 做出正确的测试条件选择。

2) 压片操作中, 溴化钾的质量, 样品与溴化钾的用量、混合程度、粒度以及水分吸附等因素均会影响二者混合样片的质量, 从而可能对测试结果产生影响, 应严格执行溴化钾压片的操作规范。

3) 针对进行对比分析的红外光谱图, 应尽可能做到以下实验操作的一致性: 仪器设备和光路模式、制样方法、试剂(如溴化钾, 应为同一厂家同一批次, 且合格的光谱级或红外级试剂)、浓度(如溴化钾压片操作, 应控制溴化钾和样品的用量)、仪器参数设置(包括检测波长范围、分辨率、背景选择等), 以及上机测试人员。

4) 一张比较理想的红外光谱图, 应是基线较平, 无平头峰和倒峰, 如果是透射光谱图, 大多

数吸收峰的透过率在 10%~80% 范围内。

该文是自 2013 年以来在红外光谱实验教学和科研服务工作中所遇到的常见及典型问题的回顾与总结,期望能对红外光谱技术应用的改进完善以及红外光谱实验教学有所贡献。同时,也期望国内企业能够开发出更多类似的国产化普及型红外光谱仪,以此达成其在各类实验室中与紫外-可见分光光度计同等的普及程度。

参考文献

- [1] HAMM P, ZANNI M. Concepts and methods of 2D infrared spectroscopy[M]. London: Cambridge University Press, 2011.
- [2] 张正行. 有机光谱分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [3] 翁诗甫, 徐怡庄. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 3版. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- [4] 吴征铠, 唐敖庆. 分子光谱学专论[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1995.
- [5] 魏福祥. 现代分子光谱技术及应用[M]. 北京: 中国石化出版社, 2015.
- [6] TASUMI M. Introduction to experimental infrared spectroscopy: Fundamentals and practical methods[M]. Tokyo: John Wiley & Sons, 2014.
- [7] THOMPSON J M. Infrared spectroscopy[M]. Singapore: CRC Press, 2018.
- [8] 柯以侃, 董慧茹. 分析化学手册. 3B分子光谱分析[M]. 3版. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [9] 李磊, 高宝希. 仪器分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- [10] 王宋明, 何欣翔, 孙殿卿. 实用红外光谱学[M]. 北京: 石油工业出版社, 1990.
- [11] LIU Y, THIBODEAUX D, GAMBLE G. Development of fourier transform infrared spectroscopy in direct, non-destructive, and rapid determination of cotton fiber maturity[J]. *Textile Research Journal*, 2011, 81(15): 1559–1567.
- [12] ALPERT N, WILLIAM E, HERMAN A. IR: theory and practice of infrared spectroscopy [M]. New York: Springer Science & Business Media, 2012.
- [13] SPRAGG R A. IR Spectroscopy sample preparation methods[M]. Amsterdam: Elsevier, 1999.
- [14] 江山. 溴化钾质量对红外光谱测试结果的影响[J]. *光谱实验室*, 2010, 27(2): 529–531.
- [15] ROBERT M S, FRANCIS X W, DAVID J K. 有机化合物的波谱解析[M]. 药明康德新药开发有限公司分析部, 译. 上海: 华东理工大学出版社, 2017.
- [16] CHRISTY A A, OZAKI Y, GREGORIOU V G. Modern fourier transform infrared spectroscopy[M]. Amsterdam: Elsevier, 2001.
- [17] KHOSHHESSAB Z M. Reflectance IR spectroscopy[J]. *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*, 2012, 11: 233–244.
- [18] 刘玉鑫. 波谱分析[M]. 成都: 四川大学出版社, 2004.
- [19] 赵瑶兴, 孙玉祥. 有机分子结构光谱鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [20] 任玉红, 王艳红. 现代仪器分析技术[M]. 济南: 山东人民出版社, 2014.
- [21] 方惠群, 于俊生. 仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- [22] 夏心泉. 仪器分析[M]. 北京: 中央广播电视大学出版社, 1992.

编辑 钟晓