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16期



分析测试中心 主办

2026年2月12日

目　　录

评述

二维相关红外光谱法的分析与应用进展 1

液质联用技术（LC-MS）在脂质组学中的应用进展 24

新技术应用

固体核磁 ^{13}C $CPXT_1$ 技术在材料结构解析中的应用 28

组织原位结构的冷冻电子断层成像研究方法与应用实例 33

典型应用案例

FT-ICR-ESI-MS 在金属氧化物中的应用 42

化学所 800 兆液体核磁谱仪的应用案例 46

橙花精油组分的定性定量分析 51

冷冻扫描电镜技术应用案例 56

用于电子束敏感材料的电子叠层成像技术的原理及应用 68

数据处理技巧

全分子特殊位置无序处理方法之二 79

测试技术及技巧

盖玻片对共聚焦荧光成像的影响 84

元素分析仪对总有机碳的定量方法 90

仪器及功能介绍

基于液质联用技术 MRM 模式准确定量分析 DNA 中低浓度核苷 5gmC 93

台式 X 射线吸收精细结构谱仪介绍及应用 100

片层选择性核磁技术在界面化学中的应用介绍 107

版权归中国科学院化学研究所分析测试中心所有

原位扫描电子显微镜技术的应用 112

分析测试中心动态

《分析测试中心通讯》征稿启事 125

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

评 述

二维相关红外光谱法的分析与应用进展

丰荣娟 刘美蓉

（分析测试中心光谱组 Email: fengrj@iccas.ac.cn）

摘要 二维相关红外光谱是将特定形式的微扰作用于样品，通过测定一系列扰动作用下的动态光谱，结合数学相关分析，获取与样品中分子结构及作用力相关的二维相关红外光谱特征。该方法主要基于分子振动光谱，将一维光谱扩展到二维空间，具有提高谱图分辨率、解析动态过程等优势，已成为光谱分析中重要的研究方法之一。本文重点围绕二维相关红外光谱，综述了发展历史和基本原理、获取谱图的方法、谱图的性质及解释规则，并列举了其在高分子化学、生物学、中药学、材料学等领域的应用，展示了二维相关红外光谱分析的优势，最后展望了广义二维相关光谱技术的发展趋势。希望通过本文的介绍，能够帮助读者更好地理解二维相关红外光谱，进一步拓展其在生物医学、药学、食品科学、环境科学以及高分子材料等领域的应用。

关键词： 二维相关红外光谱；同步光谱；异步光谱；应用

引言

传统的红外光谱分析方法是以波长或波数等参变量为横坐标，以相应的因变量吸光度、透过率等为纵坐标组成的平面光谱图。尽管传统的红外一维光谱具有很好的指纹特征、高分辨率和灵敏度，但是当多个因素同时作用于体系，或是若干因素之间相互作用时，传统的光谱分析方法就显示出了局限性，其中遇到的最大的问题就是严重的谱峰重叠现象[1]。二维相关红外光谱技术（two-Dimensional correlation infrared spectroscopy）是二维相关光谱技术在红外光谱领域的渗透和发展。二维相关红外光谱法关注的是因外扰引起的细微特征的光谱变化。其显著特点是：将光谱信号扩展到第二维度上以提高光谱分辨率，可以区分出在一维光谱上被覆盖的小峰和弱峰；简化含有许多重叠峰的复杂光谱；通过选择相关波段的光谱信号对同步交叉峰和异步交叉峰进行仔细分析，可以判断出各个基团相对于特定外扰的一个运动次序；鉴别和研究分子内和分子间的相互作用。

二维相关光谱采用二维等高线图或三维立体图进行展示，在二维相关光谱的三维图中，其 X、Y 坐标以波数或波长表示，而 Z 坐标是用 X 坐标轴和 Y 坐标轴

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

交叉处的相关强度值表示；在二维相关光谱的二维图中，其 X、Y 坐标同样以波数或波长表示，Z 坐标是用 X-Y 平面中的等高线表示，实际上，二维相关光谱图就是取任意相关强度处的三维剖面图。可以清晰地看出体系光谱学性质分别随两个变量变化的情况以及两者之间的相关性，可直观地获取和解析谱图信息。在光谱分析领域，二维相关光谱技术的出现为研究人员提供了一种强大的工具，显著提升了光谱信息的质量和可解释性[2-4]。这种方法的核心在于将传统的一维光谱数据转化为二维表示，通过将光谱强度与两个独立的光谱参数关联起来，从而揭示出更多隐藏的光谱特征。随着研究的深入，二维相关光谱的应用及发展非常迅速，已成功应用物理、化学和生物学研究的各个领域，特别是在聚合物研究[5]、中草药研究[6-8]、蛋白质的研究[9]和化学化工[10]等方面。然而，目前的应用主要集中在固态样品的分析上，对液态物质和气态物质的研究还相对较少，这也为未来的研究方向提供了新的可能性。本文重点围绕二维相关红外光谱，简述了发展历史、基本原理及其应用。

一、二维相关红外光谱的发展历程

二维相关光谱分析方法的基本概念最早起源于核磁共振（NMR）领域。二维核磁共振（2DNMR）谱通过多脉冲技术激发核自旋，采集原子核自旋弛豫过程的衰减信号，最后经双重傅里叶变换得到。通过将核磁信号扩展到第二维度，可以显著提高谱图的分辨率，并且有效简化包含许多重叠峰的复杂光谱。与此同时，通过选择相关的光谱信号，可以鉴别和研究分子内/间的相互作用。尽管二维光谱技术在核磁领域取得了快速发展，却在很长一段时间内未能深入到其他光谱分支，如红外、拉曼、紫外-可见吸收等。阻碍二维光谱技术发展的一个根本原因在于多重射频脉冲的二维核磁技术可以成功地在精密而昂贵的核磁仪器上实施，却不能在普通的红外、拉曼和紫外-可见吸收等光谱仪器上实现。因为这类光谱的时间尺度（time scale）远小于核磁共振。一般来说，核磁时间尺度数量级在毫秒到微秒之间，而红外吸收光谱观察分子振动的时间尺度在皮秒数量级，因此产生二维红外光谱必须采用特殊的新途径。

1986 年，特拉华大学（University of Delaware）的日本化学家 Isao Noda（野田勇夫）提出了一个概念性的突破[11-12]，他把核磁实验中的多重射频励磁看作是

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

一种对体系的外扰（外部扰动）。施加于体系的外扰可以多种多样，如热、磁、机

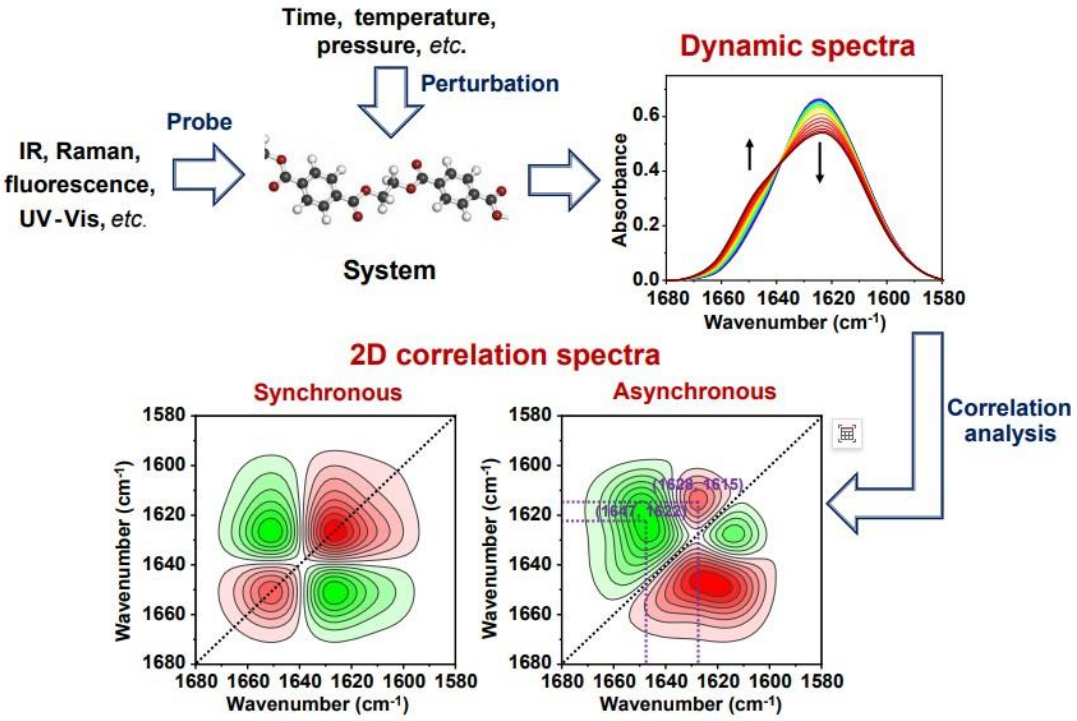


图 1、广义二维相关红外光谱获取的基本流程示意图；在 2D 同步和异步光谱中，红色表示正强度，而绿色表示负强度[5]。

械、电场、化学甚至声波等。每种外扰对体系的影响是独特而有选择性的，并由特定的宏观刺激和分子相互作用的机理所决定。因此，包含在动态光谱中的信息类型是由外扰的方式和电磁波的种类所决定的。外扰的波形没有任何限制，从简单的正弦波、脉冲到随机的噪音或静态的物理量（如时间、温度、压力等）的变化均可应用于外扰。由此，1989 年 Isao Noda 提出了一项新的实验方案（two-dimensional infrared correlation spectroscopy，简称 2DIR），他用外扰来激发被检测体系的分子，由于被激发分子的弛豫过程慢于振动光谱的时间标尺，因而可使用时间或温度等外扰分辨振动光谱（红外、拉曼）技术来跟踪研究被检测体系受外界扰动而产生的动态变化，结合数学中的相关分析技术，将原有的光谱信号扩展到第二维度，从而得到二维相关光谱（如图 1 所示），这就是最初的二

维相关技术理论，二维相关光谱实际研究的就是动态光谱的变化[13-14]。1993 年，Isao Noda 再次对已有理论进行修正，破除了外扰波形的局限，并且用 Hilbert 转换替代了原先二维相关分析中的 Fourier 转换，由此缩短了二维处理的时间，并把新的理论正式命名为“广义二维红外相关光谱（generalized two-Dimensional correlation spectroscopy）”。至此，外部微扰从正弦波形的低频扰动拓展到能导致光谱信号变化的任何形式，如电场[15]、热[16]、机械[17]、温度[18]、浓度[19]、压力[20]、磁场[21]等，提出基于 Wiener-Khintchine 定理和 Hilbert 变换实现二维相关谱图计算的快速算法，从而将二维相关光谱从普通的红外光谱推广到近红外光谱、拉曼光谱和荧光光谱等[22]。总体而言，二维相关光谱分析在红外光谱中的应用最为成功，这主要是由于红外光谱的信噪比相对较高，具有高灵敏度、高选择性和非破坏性等特点，能够在分子结构和链段运动等方面提供丰富信息。另一方面，红外光谱的谱峰重叠严重，解析起来存在一定困难，二维相关光谱的引入可以很好地解决这一问题。

二、二维相关红外光谱的计算原理

在二维红外光谱研究中，通常使用的实验方法是：在外部微扰（如电、热、磁、化学、声音、或机械的拉伸作用）的作用下，检测由于微扰诱发产生的样品体系光谱信号的瞬间变化，即系统的动态谱（dynamic spectra）。在红外光谱中，观察到的动态光谱的典型变化包括：吸收峰位的位移、吸收强度的变化和方向性吸收的变化（二向性现象）等。对这种动态谱进行一些简单数学处理，就可以产生一系列非常有用的二维红外光谱。在二维相关红外光谱中，微扰的选择非常重要，不同的微扰方式会得到不同的二维谱图。如果需要研究样品体系在某种条件下发生的变化，就可以选择这种特定的变化作为微扰手段。

二维相关光谱考虑外扰变量下（如时间、温度、压力、浓度、电场、磁场等）光谱强度 y（v, t）的变化情况，其中 v 为光谱变量，可以为任何光谱量化的参数，比如红外波数、拉曼位移、紫外波长、X 射线散射角等，t 为外扰变量，可以是任意合理的物理或化学变量，如时间、温度、压力、电场强度、浓度、PH、离子强度等。体系受外扰引起的动态光谱$\tilde{y}(v,t)$可以正式定义为：

$$\tilde{y}(v,t)=\begin{cases} y(v,t)-\bar{y}(v) & T_{min}\le t\le T_{max} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

式中$\bar{y}(v)$是体系的参比光谱，参比光谱的选择并不一定要严格一致，在大多数情况下，我们使用光谱的平均值，定义为：

$$\bar{y}(v)=\frac{1}{T_{max}-T_{min}}\int_{T_{min}}^{T_{max}}y(v,t)dt \quad (2)$$

实际过程中，可以选择某一个参考点 $t=t_{ref}$ 处的光谱作为参考光谱。参考点可以是实验的初始状态或结束状态，也可以直接简单地设为零，这种情况下，动态光谱即为我们观察到的光谱强度。

二维相关强度 $X(v_1, v_2)$ 表示在外扰变量区间内，对光谱变量 v_1 和 v_2 光谱强度$\tilde{y}(v,t)$的函数进行比较。由于相关函数是计算两个互不依赖的光谱变量 v_1 和 v_2 处强度的变化，因此可以将 $X(v_1, v_2)$ 转变为复数形式[22]：

$$X(v_1,v_2)=\Phi(v_1,v_2)+i\Psi(v_1,v_2) \quad (3)$$

这里，组成复数的相互垂直的实部和虚部分别被称作同步和异步二维相关强度。同步二维相关强度$\Phi(v_1,v_2)$表示随着 t 值的变化，两个在不同光学变量下测量的互不依赖的光学强度的相似性变化。恰恰相反，异步二维相关强度$\Psi(v_1,v_2)$表示光学强度的相异性变化。

广义二维相关函数及其定义的同步和异步相关强度如下：

$$X(v_1,v_2)=\frac{1}{\pi(T_{max}-T_{min})}\int_0^\infty \widetilde{Y_1}(\omega)\cdot\widetilde{Y_2^*}(\omega)d\omega \quad (4)$$

$$\widetilde{Y_1}(\omega)=\int_{-\infty}^{\infty}\tilde{y}(v_1,t)\,e^{-i\omega t}dt \quad (5)$$

$$\widetilde{Y_2^*}(\omega)=\int_{-\infty}^{\infty}\tilde{y}(v_2,t)\,e^{-i\omega t}dt \quad (6)$$

式中$\widetilde{Y}(\omega)$是光强$\tilde{y}(v,t)$经傅里叶变换得到，傅里叶频率ω代表$\tilde{y}(v,t)$随外扰t变化的个体频率。

由于二维相关光强的计算过程必须描述二维光谱中的每一点，即使使用快速傅里叶算法的计算步骤来按照公式(4)计算广义二维相关光谱，数据也会多得难以想象，所以我们在计算过程中应用了适当的估算。

我们在外扰t变化区间 T_{min} 和 T_{max} 内等间隔地选取 m 个动态光谱，$\Delta t=(T_{max}-T_{min})/(m-1)$，同步二维相关强度可以简单地表示为：

$$\Phi(v_1,\ v_2)=\frac{1}{m-1}\sum_{j=1}^{m}\tilde{y}_j(v_1)\,\tilde{y}_j(v_2) \quad (7)$$

$\tilde{y}_j(v_i)$是外扰 t_j 点的光学强度。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

$$\tilde{y}_j(v_i) = \tilde{y}_j(v_i, t_j) \quad i = 1,2 \tag{8}$$

如果光谱系列并不是在外扰t上等间隔选取的，那么我们就必须进行一定调整。比如我们可以通过内插等方法使本来不均匀的光谱系列变得均匀。同步光谱就按照这个新的系列由公式(7)给出。

异步二维相关光强的计算就更加困难。有许多估算方法可以对异步光谱进行合理的估算，然而最简单有效的估算方法由下式给出：

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1}\sum_{j=1}^{m} \tilde{y}_j(v_1) \cdot \sum_{k=1}^{m} N_{jk} \cdot \tilde{y}_j(v_2) \tag{9}$$

其中 N_{jk}代表 Hilbert-Noda 转变矩阵的第 j 行第 k 列的元素，表示为：

$$N_{jk} = \begin{cases} 0 & j = k \\ \frac{1}{\pi(k-j)} & \text{otherwise} \end{cases} \tag{10}$$

三、二维相关红外光谱性质及规则

将一系列动态光谱在特定的软件上进行数学处理，即可得到二维相关光谱同步和异步谱图。目前，能够快速获得二维相关光谱的软件种类很多，大都是免费获取或者是商业化的软件，包括 2D Shige、TDCOS、Mat2DCorrr、2DCS、Midas 2010、R corr2D、Python Scikit Spectra、Python NumPy 等。目前二维相关红外谱图多采用二维等高线图或三维立体图进行描述，可直观地获取和解析二维谱图信息。在二维相关光谱的二维图中，其 X、Y 坐标以波数表示，Z 坐标是 X-Y 平面中的等高线表示。在二维相关光谱的三维图中，其 X、Y 坐标同样以波数表示，而 Z 坐标是用 X 坐标轴 Y 坐标轴交叉处的相关强度值，是一个无单位的量纲。二维相关光谱图包含同步谱和异步谱两类，图 2 展示了典型的同步和异步谱图。

3.1 二维相关同步谱图

在特定外扰t作用下，同步相关峰$\Phi(v_1, v_2)$强度表征两个动态 IR 信号之间的协同程度。这种分子微观结构运动的同步性表明基团之间有很强的协同作用或可能存在强烈的相互作用。当发生在波数v_1和v_2的动态变化完全一致时，$\Phi(v_1, v_2)$到达最大值；当两个动态变化正交时，它的值为零；当两个动态变化彼此反相，它的值最小。图 2（a）显示了一个典型的同步二维相关谱的强度变化等高线图。同步二维相关谱是关于对角线（对应于光谱坐标$v_1 = v_2$）方向对称，其中相关峰

版权所有中国科学院化学研究所分析测试中心

可以出现在对角线上，也可以出现在对角线外。

落在对角线上的相关峰称作自动峰（auto peak），自动峰强度对应于外扰过程中光谱变化的自相关函数。在同步谱中，自动峰的强度始终为正（正峰用空白表示，负峰用阴影表示），其大小代表了对应波数下光谱强度动态波动的整体程度。所以，在动态谱图中表现出更大程度强度变化的区域对应的自动峰越强，而那些基本保持不变的峰自动峰强度小甚至没有自动峰。换言之，自动峰强度对应于外扰过程中光谱变化的自相关函数。图 2（a）中在波数 A、B、C、D 处都出现了自动峰，说明这 4 个峰在观察的区间内，强度发生了显著变化。

位于对角线以外的相关峰称为交叉峰（cross peak），表明不同波数上光谱信号的同步变化。这样一种同步的变化，反过来，预示着 2 波数间可能存在一定的相关性。尽管自动峰的强度始终为正，但交叉峰的强度可正可负。图 2（a）中 A 和 C、B 和 D 分别同步相关，A 和 C 形成负交叉峰，而 B 和 D 形成正交叉峰。在外扰 *t* 作用下，两个基团受激偶极矩取向方向相同，无论是平行于或垂直于外部扰动方向，同步交叉峰为正值；而如果两个基团受激偶极矩取向互相垂直，则交叉峰为负值。简单来说，如果 2 个波数对应的光谱强度在外扰下同时增大或减小，相应交叉峰为正；如果 2 个波数对应的光谱强度一个增加另一个减小，相应交叉峰为负。

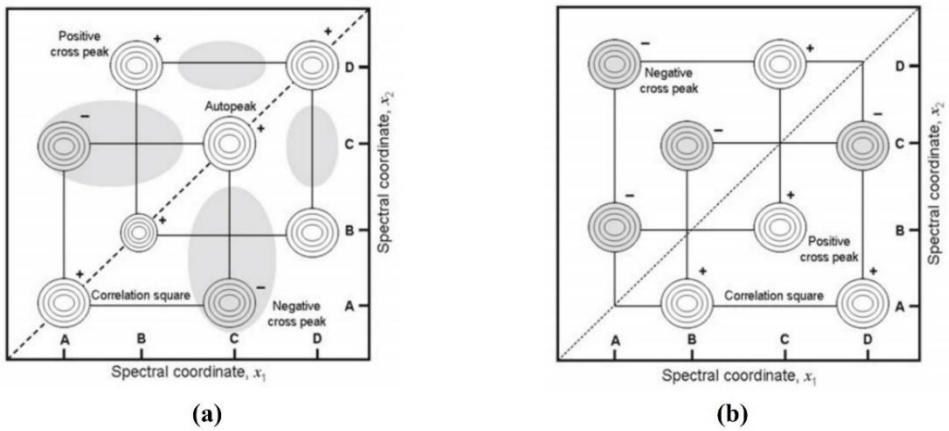


图 2、 二维相关光谱的（a）同步相关谱和（b）异步相关谱的等高线图[5]

但需要强调的是相关分析是一个数学方法，它不能区分不相关的协同过程。因此没有同步交叉峰表示没有化学偶联或相互作用，但是有同步交叉峰并不说明有化学偶联或相互作用，仅证明两者间对外部扰动有协同响应[23]。

3.2 二维相关异步谱图

图 2（b）显示的是一个异步二维相关谱的强度变化等高线图。异步谱图出现了 2 个给定波数v_1和v_2处光谱强度的异步或者相继变化。与同步光谱不同的是，异步光谱关于对角线反对称。异步光谱没有自动峰，只有交叉峰，交叉峰也有正负之别。从图中发现 A、B、C、D 这 4 个波数之间分别出现 A 和 B、A 和 D、B 和 C、C 和 D 4 个交叉峰。异步交叉峰只有在 2 个给定波数的光谱强度发生异相（如延迟或加快）变化时才出现。这一特性尤其可以帮助区分光谱中来源不同或组分不同形成的重叠峰。于是，外扰过程中，混合物中的不同组分、材料中的不同相或者化学基团经历不同的变化对光谱强度的贡献能够得以辨别。即使是两个谱带靠得很近，只要它们的瞬时特征或者时间依赖光谱强度变化模式存在本质不同，它们之间便会出现异步交叉峰。所以异步交叉峰的出现意味着这些谱带有着不同的来源或者是不同分子环境下的官能团。异步谱图的交叉峰可正可负，而异步谱图中交叉峰的符号可以用来辅助判断谱带在外扰过程中的变化次序。

3.3 二维相关光谱读谱规则

利用同步和异步谱图的交叉峰，可以获得外扰条件下光谱强度发生变化的先后次序关系。为方便表述，将同步谱图中$(v_1，v_2)$处的峰强度记为$\Phi(v_1，v_2)$，将异步谱图中$(v_1，v_2)$处的峰强度记为$\Psi(v_1，v_2)$。

根据 Noda 规则[14]：

（1）当$\Phi(v_1，v_2)>0$时，如果$\Psi(v_1，v_2)>0$，则v_1谱带处的强度变化发生先于v_2谱带处的强度变化；而如果$\Psi(v_1，v_2)<0$，则v_1谱带处的强度变化发生晚于v_2谱带处的强度变化。

（2）当$\Phi(v_1，v_2)<0$时，如果$\Psi(v_1，v_2)>0$，则v_2谱带处的强度变化发生先于v_1谱带处的强度变化；如果$\Psi(v_1，v_2)>0$，则v_1谱带处的强度变化发生先于v_2谱带处的强度变化。简单来说，如果$(v_1，v_2)$在同步和异步谱图的交叉峰符号一致（都为正或者都为负），则v_1谱带处的强度变化发生先于v_2谱带处的强度变化；如果$(v_1，v_2)$在同步和异步谱图的交叉峰符号不一致（一个为正而另一个

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

为负），则v_2谱带处的强度变化发生先于v_1谱带处的强度变化。

（3）如果只有同步相关峰$\Phi(v_1, v_2)$，而异步相关交叉峰强度消失，即$\Psi(v_1, v_2) = 0$，说明两个基团受激发偶极矩的取向同时发生。

（4）如果同步相关光谱中的相应同步相关强度消失，即$\Phi(v_1, v_2) = 0$，只能说明两个峰的信号各自以不同的速率变化，但两者的变化关系不能确定。

需要特别指出的是：以上讨论的 *t* 实际上可以看作是任意一个可以引起光谱变化的物理量，如温度、压力、距离甚至浓度。因此这种二维相关分析技术也可以用于拉曼光谱、紫外光谱、X 射线散射光谱等技术中，对任意波形的外部扰动引起的复杂的光谱强度动态变化都适用。

除了二维 contour map 的表示形式，二维相关的结果还能以 fishnet representation，一种 3D 渔网图表达（图 3）。虽然 fishnet 的形式可以更方便地比较各个二维相关峰的强度，但却无法清晰定位相关峰的波数，因此 contour map 的形式还是更为常用。

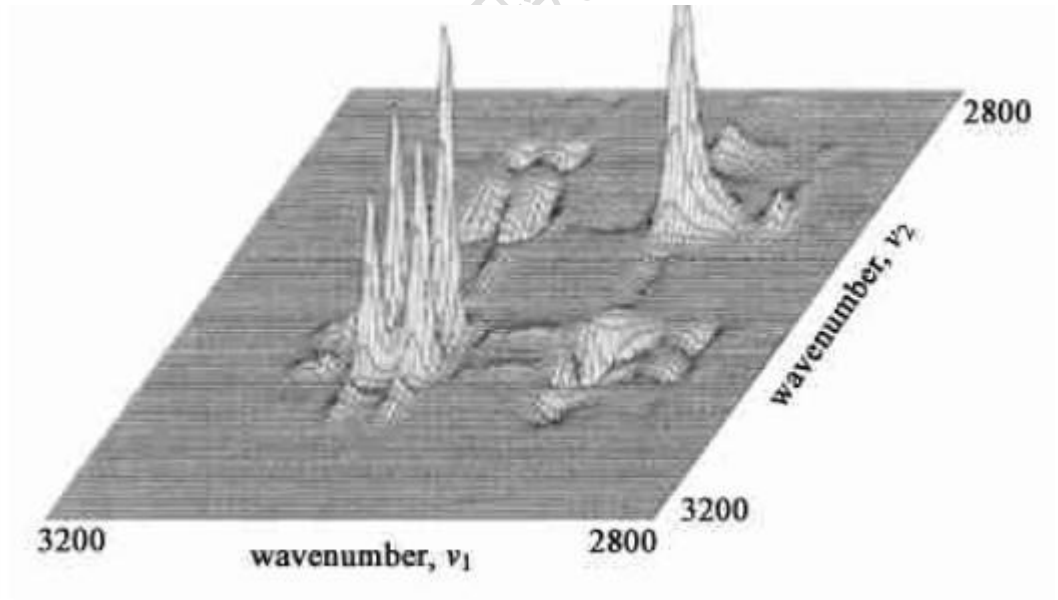


图 3、3D 渔网图表达[11]

总的来说，二维振动光谱相对于一维振动谱有以下几大优点：

（1）提高光谱分辨率。通过将原有的光谱信号扩展到第二维上，可以区分出在一维光谱上被覆盖的小峰和弱峰，并能有效地分离重叠的谱线；

（2）通过对同步交叉峰和异步交叉峰的仔细分析，可以判断出各个基团相对

于特定外扰的一个运动顺序，这点在研究体系分子间或分子内的结构和构象的变化方面显得尤为重要；

（3）通过谱线之间相关性的分析，能详细地研究不同分子间或分子内的相互作用；

（4）通过分析不同光谱区域内各吸收峰之间的相互关联，解决吸收峰的归属问题；

（5）可以在不同类型的光谱之间（比如：源于同一外扰的拉曼和红外光谱）进行相关性分析，从而获得通常光谱所不能获得的信息。

四、二维相关红外光谱的应用

4.1 聚合物的研究

聚合物材料体系涉及丰富的相互作用和多级结构，这是决定材料最终性能的关键。分子光谱（红外、拉曼光谱）作为表征聚合物材料的常用手段，一方面可以检测不同化学结构/组分所对应的官能团，依据特征吸收峰强度和位置，实现对高分子化学结构的鉴别，另一方面，可以基于不同官能团特征吸收峰的强度和位置变化，判别基团所处的物理或化学环境，实现对体系中复杂相互作用的解析。随着高分子材料的发展，体系趋向多样化、功能化，而传统的一维分子光谱存在谱峰重叠严重、分辨能力有限等问题，一定程度限制了分子光谱在复杂高分子体系的应用拓展。

二维红外光谱首先是作为一种聚合物的新型分析技术而提出来的，它不仅适合于研究单一聚合物[24-26]，还适合于共聚物[27-30]及其他高分子材料[31]等。通常使用的实验方法是通过拉伸聚合物薄膜而使之激发，由于在第二维方向上将重叠峰进行扩展，二维红外光谱可以提供更多的信息，而这些信息在通常的光谱图中是无法表示出来的，因而二维红外光谱有效地提高了谱图分辨率，将重叠峰甚至原先被掩盖的一些小峰，清晰地显示出来。它的另外一个显著特点是，可以清楚地反映出聚合物大分子在外界微扰作用下，分子内各结构单元、官能团发生变化然后弛豫恢复到初始的先后关系，这对研究聚合物分子的结构、构象变化、相变[32]以及与之相关的一些性质，如晶态、取向、粘度以及聚合物涂层的纵深层分析是非常有利的。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

将温度响应聚合物引入分离膜，能够赋予膜材料温度响应功能，实现可控的物质分离[33]。利用温敏性聚 *N*-乙烯基内酰胺（PVCL）和非温敏性聚乙烯吡咯烷酮（PVP）协同稳定金属有机框架（MOF）纳米片形成层层堆叠的温度响应纳米复合膜。所得 MOF 纳米片复合膜水通量及对染料截留能力具有温度敏感性。温度升高，PVCL 链塌缩使得层间纳米孔道体积增大，因而水通量增大，且升降温循环过程稳定性良好。将尺寸相近的三种染料分子（亮绿、中性红、结晶紫）混合液进行过滤测试发现，随温度升高，尺寸较小的亮绿和中性红分子截留率下降明显高于结晶紫。值得注意的是，对不同温度下滤液的紫外-可见光谱进行二维相关光谱分析，可以得到不同染料随温度升高的流出顺序：亮绿→中性红→结晶紫，证实了复合膜中纳米孔道尺寸随温度升高而逐渐增大。利用二维相关红外光谱进一步对纳米片复合膜的温度响应机制进行了解析，结果显示，PVCL 链段在升温过程的脱水和塌缩作为复合膜温敏行为的驱动力，降低了 MOF 纳米片的界面润湿性，最终导致纳米孔道的变化，而 PVP 链段在这一过程中并未发生明显变化，主要起到层间支撑作用（图 4）。

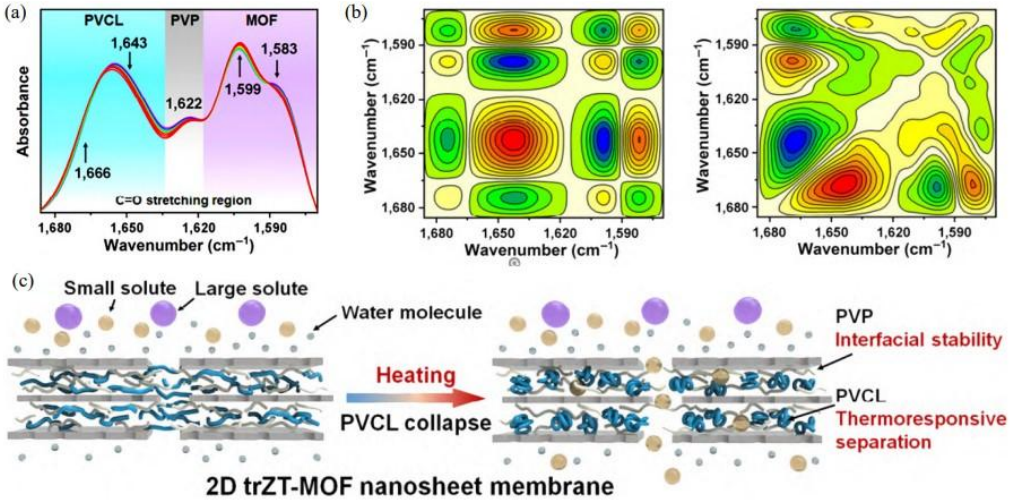


图 4、（a）复合膜的温度依赖性 FTIR 光谱（30-60 ℃）箭头表示不同波数下的光谱变化趋势；（b）复合膜的 2D 相关同步（左）和异步（右）光谱；（c）“智能”膜分离性能示意图[33]

海藻酸钠（SA）作为一种天然多糖，生产成本低、无毒且具有良好的生物相容性、可降解性，在食品工业、制药、纺织印染等领域得到了广泛应用。随着实验室和工业对 SA 的日趋重视，理解 SA 内部的氢键结构也变得越发重要。利用

红外光谱对 SA 升温过程特征基团的变化进行原位监测，结合二维相关光谱等分析手段从分子水平研究了 SA 体系的相互作用机制，探讨了温度扰动下 SA 分子间/内、SA 与水分子间氢键结构的演变历程[34]。研究发现，加热过程可分为 30~60 ℃和 60~ 170 ℃ 两个阶段：第一阶段为弱氢键结合的水分子脱除，第二阶段为强氢键结合的水分子脱除。二维相关红外光谱结果表明：30~60 ℃区间内，随脱水过程发生，SA 与水分子的氢键逐步断裂，SA 中 C－OH 和 COO^-基团逐渐参与形成分子间/内氢键(O3H3···O5 和 O2H2···O＝C－O^-)，因此水分子的存在一定程度破坏了 SA 中原有的氢键结构；60~170 ℃区间内，强结合水脱除，SA 与水分子的氢键进一步断裂，同时 SA 分子间/内氢键相互作用逐步减弱，出现了部分相对自由的 C－OH 和 COO^-基团（图 5）。由于相对自由的 COO^-基团比 C－OH 更早出现，可以推测 C－OH 形成的分子间/内氢键相互作用比 COO^- 更强。

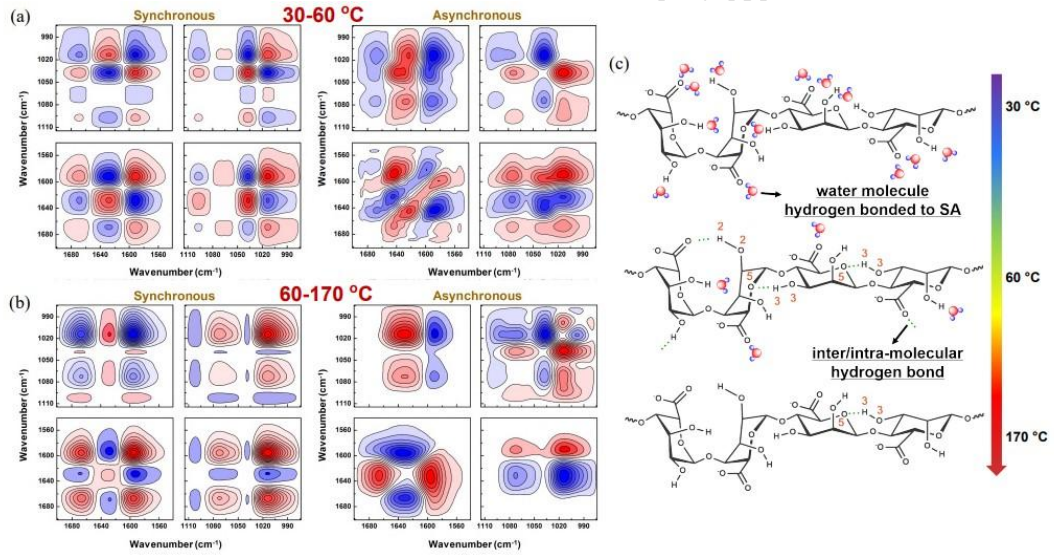


图 5、（a）30~60°C 和（b）60~170°C 之间加热期间 SA 薄膜的 2D 同步和异步光谱；（c）SA 膜中热诱导氢键转变的示意图[34]

4.2 蛋白质的研究

红外光谱仪是最早用来研究蛋白质结构的方法之一。由于生物体系组分的多样性以及蛋白质结构的复杂性，由微环境变化或外界物理变量扰动所引起的蛋白质结构变化、尤其是溶液中蛋白质结构的微弱变化的光谱研究一直是困扰人们的技术难题。二维相关红外光谱这一新的谱学方法可以提高分子光谱分辨率。从而

实现对各复杂分子，如蛋白质中的基团及其特定扰动下的变化进行定性定量分析，在蛋白类物质二级结构研究[35-38]、蛋白质相互作用研究[39-41]、酶的生化机理研究[42-44]以及蛋白质相关生理机理和疾病诊断研究等方面应用广泛。

二维相关红外光谱对蛋白质结构的变化非常敏感。Chae[35]等用二维相关红外光谱研究表面固化的聚 L-谷氨酸（poly L-glutamic acid， PLGA）的 pH 依赖性构象变化，发现随 pH 值增大，PLGA 侧链发生去质子化，诱导 PLGA 二级结构的构象转变，形成无规则折叠结构，增加了对该类聚合物随扰动发生可逆反应过程的了解，有助于其在药物控制释放系统、生物医学传感等方面的应用。二维相关红外光谱能够利用较高的动态分辨力，观察外界扰动作用下蛋白质结构细微变化和对应的发生顺序，是表征二级构象的转变发生顺序的有效方法。Yan[36]等应用二维相关红外研究了全 α一螺旋蛋白肌红蛋白（whole α-helixin myoglobin, Mb）。在热诱导变性和聚集过程中的二级结构去折叠过程，发现 50 和 58 ℃之间 Mb 热转换的同步谱在 1617 和 1684 cm^{-1} 处出现了分子间反平行β一折叠的特征谱带，表明β一折叠的形成是在螺旋结构展开之后，且 Mb 聚集的形成比天然螺旋结构的去折叠快，即在一定条件下，蛋白质聚集可以在自然结构状态或部分折叠结构状态的情况下形成。Rui[38]等采用衰减全反射(ATR)IR 技术，以温度为扰动采用二维相关红外对热诱导血红蛋白（hemoglobin，HB）二级结构和构象的变化进行研究（图 6），揭示了 HB 热变性温度范围和其分子构象随温度变化的详细过程，并基于牛血清白蛋白的热诱导构象变化的二维相关实验，对 HB 进行分析得出结论，为分析生物大分子的热诱导行为建立了通用方法。

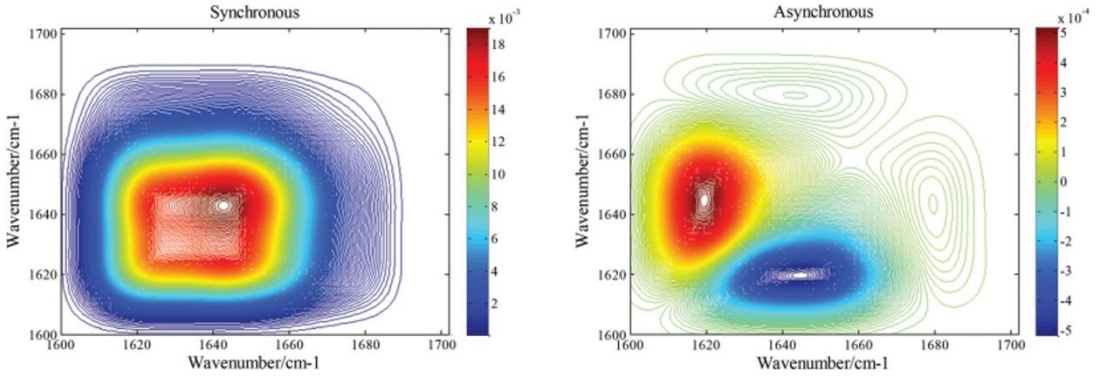


图 6、温度作为外部扰动，D_2O 中 BHb 的同步和异步二维红外相关光谱[38]

蛋白质之间相互作用机理与关联是生物制药研究的热点，二维相关红外在其

中发挥了重要作用。Kamerzell[39]等以浓度为扰动，采用二维相关红外研究两种免疫球蛋白（immunoglobulin，IgG）的相互作用。结果表明，浓度提高导致的β-折叠的变化先于无规则卷曲和α－螺旋的变化，谷氨酸和天冬氨酸残基则会触发两种 IgG 的关联过程。二维相关红外可用于分析化学键形成导致的光谱变化，通过相应波段分析价键类型，获得蛋白类物质与小分子物质或有机大分子物质之间结合作用的相关信息。Xiang[40]等以 pH 为扰动测定近红外光谱变化并进行二维相关分析，研究了蛋白质与法莫替丁在酸性环境下的相互作用，发现蛋白质和法莫替丁的结合表现在 5742 cm^{-1} 附近，表明蛋白质和法莫替丁之间为氢键相互作用。三氟乙酸酯（trifluoroacetate，TFA）是固相合成多肽的固有成分，Arrondo[41]等以温度为扰动，采用二维相关红外研究了 TFA 对合成肽的稳定性和完整性的影响，发现分子间盐桥是环肽 GXXG 聚集机理的关键因素，确定了无 TFA 时环肽 GXXG 的二级构象组成，以及 TFA 与精氨酸残基的相互作用机理，并建立了每个配方产生的肽内结构基序的相对稳定性由高到低的排列顺序表。

在酶生物化学机理研究中，应用二维相关红外光谱通过二级结构变化可以研究外部条件对酶结构和活性的影响，以及小分子与酶之间的作用机理。Ilore[42]等以温度为扰动，采用二维相关红外对大鼠肝脏蛋氨酸腺苷转移酶（methionine adenosyl transferase，MAT）的二级结构进行研究，得到 MAT 在温度升高过程中二级结构展开的顺序，并发现 MAT 在 55~80 ℃温度区间完成了变性过程，进一步升高温度后结构不再发生变化，为 MAT 二级结构变性关键温度提供了参考。Ismail[43]利用温度扰动下的二维相关红外研究马、牛和金枪鱼铁细胞色素 c 构象变化，将 1652 cm^{-1} 归属为α-螺旋，1637 cm^{-1} 归属为弯折/延伸链，1684 及 1616cm^{-1} 归属为蛋白质聚集，根据三者随温度展开过程中顺序的差异实现三种具有高度的序列一致性的铁细胞色素 c 的区分。Yan[44]等采用二阶导数处理和二维相关红外光谱相结合的方法研究了牛胰腺核糖核酸酶 A(ribonuclease A, RNase A)热聚集的相关过程，探索了 pH 值、NaCl 和乙醇对该酶发生低聚及热诱导聚集的影响，发现碱性 pH 值和 NaCl 均能加速低聚物的热聚集，但不影响低聚物的形成，而乙醇则能提高低聚物的聚集速度和分布，表明 RNase A 的聚集可能是由疏水相互作用引起、由寡聚化控制和静电作用介导的。

4.3 中药材的研究

厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室测试中心版权所有

中药材不同品种之间价格相差数倍，掺杂售假、一药多源、产区生长环境不同等因素致使市售中药材品种和质量混乱不一，在一定程度上阻碍了中医药事业的发展。利用二维相关红外光谱技术分析研究中药材、重要配方颗粒、中药注射剂等中药制品，是一次将二维红外技术与国内科研生产需要相结合的有益尝试。众所周知，中药内含物质群是一个非常复杂的混合物体系，试图研究清楚每个内含成分是不切实际的。而采用对物质群体的整体研究使对中药质量的宏观控制成为可能。在药物分析中，以红外光谱所具有的“指纹特征”，作为药物鉴定的依据是各国药典共同采用的办法。而复杂混合物组成的中药，其一维红外光谱较相似；而在二维相关红外光谱上，较高的谱图分辨率和更多的结构信息使区分中药变得十分容易。2003 年，孙素琴等[45]编写了《中药二维相关红外光谱鉴定集》一书，共收载百余种中药材的红外光谱、二阶导数谱及二维相关红外谱图，涵盖了原药材及配方颗粒、注射剂等剂型。

二维相关红外光谱应用于中药鉴别，通常以温度为外扰，分析随着温度的变化，基团分子振动的变化情况。这种变化可以清晰、直观地在二维相关红外光谱中通过自动峰、交叉峰在位置、强度等方面的信息，分析化学成分差异，比较物质相对含量大小，为中药鉴别、种质资源、质量控制等提供新的思路。该方法保留了重要组分的全部信息，具有快速、简单、无损、方便、快捷且成本低廉等优势。热微扰下二维红外光谱在混淆掺伪鉴别、栽培品和野生品鉴别、不同产区鉴别、不同药用部位鉴别有着广泛应用[46-49]。Qu[46]等以温度为外扰，采集沉香标准品和 3 个市售掺假样品在 50~120℃温度范围内的红外光谱图并进行二维分析。结果标准品与 3 种掺假样品中树脂化合物的含量与种类之间存在差异，根据二维红外相关同步谱 1500~1700 cm^{-1}、800~1000 cm^{-1} 波段内自动峰个数、最强峰峰位、交叉峰正负的差异，可以对真假沉香进行鉴别。吴方斌等[47]研究表明，二维相关红外光谱可以鉴别羌活和宽叶羌活药材。在 1150~1500 cm^{-1} 波段内，羌活和宽叶羌活自动峰个数分别为 4 和 3；在 850~1150 cm^{-1} 波段内，二者自动峰个数分别为 9 和 6。周欣[48]将新会、广西、江西产区陈皮的二维相关红外光谱对比分析后发现，在 1500~1700 cm^{-1} 波段内，新会、广西产区陈皮相关峰相似，江西产区陈皮与二者比差异明显。杨兰芬等[49]采用红外光谱三级鉴定法比较了三七不同药用部

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

位（三期主根、三七支根和三七花）之间的差异，指出三者所含的芳香类、糖类成分明显不同，在 1350~1750 cm^{-1} 波段内，三七主根的二维相关红外光谱有 4 个自动峰，且三者最强峰位置及交叉峰正负不同；在 1050~1300 cm^{-1} 波段内，三者的二维相关红外光谱均有 5 个明显的自动峰，三七主根与支根的交叉峰均为正值，三七花的交叉峰有正有负，该区域内三者自动峰位置和强度有很大差异。张春晖等[50]采用二维相关红外技术，实现了对生黄芪、黄芪片、酒黄芪的鉴别分析。在 1300~1800 cm^{-1} 波段内，三者自动峰个数及峰的区域有明显区别。进一步结合红外光谱图及二阶导数谱，对生黄芪、黄芪片、酒黄芪的水提物、醇提物进行二维分析，指出酚苷类化合物为三者共有成分，与水提物相比，醇提物中黄酮类成分含量更高。通过对一维光谱和二维相关光谱的比较研究表明：二维相关分析能提供更丰富的结构信息，提高了谱图的分辨率，并能捕捉到热力学过程中物质体系和分子结构的动态变化，为中药注射剂的质量控制提供了一种强有力的手段。

4.4 液晶的研究

液晶分子的排列容易受外部热、电场、磁场、压力等的影响，因此，一旦受到外部刺激，液晶的光学等特性就随之变化。红外光谱是研究分子结构非常有用的工具，能直接清楚地提供液晶分子单组分的构型及定向。我们知道，超分子体系的宏观性质不仅由组成超分子体系的单个基元性质决定，而且很大程度上取决于基元之间的作用形式及排列方式。但由于一维红外光谱的局限性，使得氢键模式以及各基团的相互作用机理一直得不到合理的解释。而二维相关红外光谱将信号扩展到第二维上，能够有效地对超分子体系中重叠峰进行区分，对结构的微弱变化具有独特的敏感性，并且可以提供不同功能基团在给定物理变量诱导下的结构变化顺序。这对于研究液晶超分子体系具有独特的优势。

近年来，二维相关红外光谱在液晶材料的研究中发挥了重要作用。Miroslaw 等[51]利用二维相关红外光谱法对侧链聚合的铁电液晶在电场作用下重新极化定向的转化过程进行了研究。结果发现，在电场的作用下，只有中间层和与之相连的终端基团和部分层发生重定向，而剩余层和铁电液晶主链并未参加重新定向；虽然定向的速率随着温度的升高而加快（是因为液晶粘度随温度升高而降低），但是在分子水平上，温度并不能影响其重新定向的机理。Cheng 等[52]研究了在温度影响下抗铁电液晶自聚膜的结构和相转变，结果表明，液晶中两条 C-H 链平行

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

于分子长轴而较短的链则垂直于分子长轴方向；在相变过程中，不同位置的 C=O 对温度有不同的响应速率。红外光谱对于氢键的存在具有很好的分辨能力，但氢键的存在情况通常较为复杂，仅利用一维红外光谱并不能对体系中的所有氢键进行很好的归属和区分，而二维相关红外恰好弥补了这方面的不足。Yamaguchi 等[53]采用二维红外对手动剪切后的液晶甲壳素膜分子内的氢键情况进行了全面的研究，考查了升温过程中各氢键的运动次序。根据二维相关红外光谱的 Noda 规则，40~120 ℃范围内随温度升高各氢键的运动先后顺序为：分子间氢键→协同作用的分子内氢键→分子内氢键。同理对 120~180 ℃的二维相关分析结果对应于分子内和分子间氢键的断裂过程。此外，他们还对 NH 区域进行了自相关及 OH 和 NH 区域的相关分析，很好地区分了各种氢键，并进一步验证了 OH 区域得到的结果。红外光谱以其对分子结构的高分辨本领和实时跟踪能力在液晶聚合物的研究中显得尤为重要，二维相关分析技术等的发展进一步提高了红外光谱的分辨率，并能够跟踪极短时间内发生的基团运动变化过程，对于液晶聚合物的分子结构、相转变、基团取向等机理的研究也使人们对于液晶有了更为深刻的理解。但红外光谱仍存在固有的局限性，如制样过程中存在的样品厚度限制及切片所带来的取向等问题，以及谱图中信息较复杂也给分析带来了一定的困难。二维相关光谱技术毕竟是一种数学方法，通过二维相关分析所得到的结果并不一定完全与实测方法的结果相吻合，要求我们在分析谱图过程中进行有目的的选择和判断。

五、结论与展望

本文主要介绍了二维相关红外光谱概念的提出和发展、基本原理、性质及解释规则等，并结合具体的体系，简述了二维相关红外光谱在高分子表征、蛋白质研究、中药材研究及液晶表征中的应用。二维相关红外光谱不仅能够有效鉴别上述体系涉及的丰富相互作用，还能提供外扰作用下动态过程发生的分子机制。遗憾的是，目前二维相关红外光谱在化学所的研究中几乎没得到应用，未来二维相关红外光谱可以应用于化学所研究的聚合物体系、智能仿生材料以及聚合物功能膜等多个前沿领域。具体可以应用于温度响应高分子的响应机制、可拉伸离子导体中的复杂相互作用、小分子在聚合物基质中的扩散机理，以及天然高分子的结构表征等研究。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

二维相关红外光谱作为一种先进的光谱分析手段，在高分子材料、蛋白质、中药等体系的表征中得到了越来越多的关注。随着上述体系越来越复杂、功能越来越强大，这为二维相关红外光谱的应用提供了更多的机遇，但同时也带来了更多的挑战。在后续的研究工作中，二维相关红外光谱分析可以重点关注以下几方面：

（1）光谱手段的多样性。目前关于二维相关光谱的应用主要是基于中红外光谱，关注的是分子层面相互作用信息。一方面，中红外光谱也有一定的局限性，例如低浓度溶液体系信号弱、水的吸收峰干扰严重等。对于中红外光谱难以表征的体系，可以尝试其他分子光谱手段，如拉曼光谱、近红外光谱等，开展二维相关光谱分析。另一方面，其他光谱手段，包括荧光光谱、紫外-可见吸收等都可以进行二维相关光谱分析，大部分因信噪比低而导致噪声被显著放大，使得结构解析变得困难，如何有效解决这一问题是丰富二维相关分析光谱手段的关键。

（2）外扰变量的丰富。时间、温度便于控制，是目前获得动态光谱最常用的外扰变量。但是，以高分子材料的外扰变量举例，影响其分子结构和性能的因素是多种多样的，例如湿度变化能够引起高分子力学性质的改变、紫外光照射可以引起高分子的老化等，尤其是刺激响应高分子，可以对温度、压力、电场、磁场、pH、浓度等丰富的外扰产生响应，引起物理或化学性质的变化。利用二维相关光谱探讨不同刺激下高分子结构的演变机制，将进一步拓宽二维相关光谱的应用范围。而国内的许多研究仅局限于现有光谱仪提供的外扰附件，所以未来研究各种专用的外扰装置是广义二维相关光谱技术发展的一个趋势。需要注意的是，对于测试过程无法原位施加的外扰变量，应尽量避免其他因素改变而引起的光谱变化，否则将影响二维相关光谱分析结果的真实性和可靠性。

（3）多种分析手段的关联。一方面，通过二维相关光谱交叉谱的计算和解析，可以将不同分析手段所得结果进行关联，这能够帮助理解高分子不同层面结构的内在联系。另一方面，二维相关光谱分析结果涉及丰富的相互作用和结构变化，经过与其他分析表征手段的结果进行比对和相互验证，可有效加深人们对二维相关光谱分析结果的理解。

（4）目前广义二维相关光谱技术的应用都是基于研究对象的同步谱、异步谱结合相关的读谱规则，得到的都是研究对象定性结构分析和相关性方面的一些结

版权所有 中国科学院化学研究所分析测试中心

论。随着计算机、数据挖掘、化学计量学等相关技术的发展，结合广义二维相关光谱提供的丰富的研究对象的结构和组成的信息，完全可能突破现有的读谱规则，谱图的表达更加数字化，从而使广义二维相关光谱技术在研究对象的定量应用成为现实，这是广义二维相关光谱技术一个更有意义和广阔前景的发展趋势。

参考文献：

1. 陈自强，等，紫外光固化聚氨酯丙烯酸酯的二维红外光谱。*华东理工大学学报（自然科学版）*，**2006**，*32*，422。

2. Zhang, T., et al., Wheat Flour Discrimination Using Two-Dimensional Correlation Spectroscopy and Deep Learning. *Appl. Spectrosc.*, **2024**, *79*, 37028241279876.

3. Wang, H. P., et al., Recent advances of chemometric calibration methods in modern spectroscopy: Algorithms, strategy, and related issues. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, **2022**, *153*, 116648.

4. 孟伍德，等，傅里叶变换红外光谱自适应数字滤波算法研究。*量子电子学报*，**2024**，*41*，226。

5. 侯磊，武培怡，二维相关红外光谱分析技术在高分子表征中的应用。*高分子学报*，**2022**，*53*，522。

6. 刘红霞，孙素琴，分子振动光谱在中药现代化中的应用。*现代仪器*，**2005**，*5*，6。

7. 孙素琴，等，真伪半夏二维相关红外光谱法的鉴别研究。*光谱学与光谱分析*，**2004**，*24*，427。

8. 孙素琴，等，炮附片、黑顺片和白附片二维红外相关光谱的分析研究。*光谱学与光谱分析*，**2003**，*23*，1082。

9. 李晨曦，等，二维相关光谱法及其在蛋白类物质分析中的研究进展。*光谱学与光谱分析*，**2023**，*43*，1993。

10. Noda, I, Non-Isothermal Melt Crystallization of a Biodegradable Polymer Studied by Two-Dimensional Infrared Correlation Spectroscopy. *Molecules*, **2025**, *30*, 1131.

11. Noda, I, Two-Dimensional Infrared Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc*, **1989**, *111*, 8116.

12. Noda, I, Two-Dimensional Infrared (2D IR) Spectroscopy: Theory and Applications. *Appl. Spectrosc.*, **1990**, *44*, 550.

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

13. Noda, I, Two-Dimensional Correlation Analysis Useful for Spectroscopy, Chromatography, and Other Analytical Measurements. *Anal. Sci.*, **2007**, *23*, 139.

14. Noda, I, Generalized Two-Dimensional Correlation Method Applicable to Infrared, Raman, and other Types of Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **1993**, *47*, 1329.

15. Nagasaki, Y., and Ozaki, Y., A polarized infrared spectroscopic study on electric-field-induced layer rotation of ferroelectric liquid crystal mixtures with ultrashort pitch. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2000**, *2*, 3037.

16. Wu, P.Y., et al., Two-dimensional near-infrared correlation temperature studies of an amorphous polyamide. *Polymer*, **2001**, *42*, 10181.

17. Chao, K., et al., Characterization of spectral variations of irradiated chicken breasts with 2D-correlation spectroscopy. *Appl. Eng. Agric.*, **2002**, *18*, 745.

18. Ataka, K., and Osawa, M., In Situ Infrared Study of Water-sulfate coadsorption on gold(111) in sulfuric acid solution. *Langmuir*, **1998**, *14*, 951.

19. Czarnecki, M.A., and Orzechowski, K., Effect of temperature and concentration on self-association of octan-3-ol studied by vibrational spectroscopy and dielectric measurements. *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, 1119.

20. Jarvis, M.C., and McCann, M.C., Macromolecular biophysics of the plant cell wall: Concepts and methodology. *Plant Physiol. Biochem.*, **2000**, *38*, 1.

21. Nagai, N., et al., IR and EPR study of the Na ion-implanted SiO_2/Si system. *Appl. Spectrosc.*, **2001**, *55*, 1207.

22. 申婷婷，等，二维红外相关光谱法的分析。*济南大学学报(自然科学版)*， **2007**，*2l*，124。

23. Noda, I., et al., Generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **2000**, *54*, 236A.

24. 田格，等，二维傅立叶变换红外(2DIR)相关光谱技术研究聚羟基丁酸酯(PHB)的熔融与结晶。*高等学校化学学报*，**2002**，*23*，1627。

25. Noda, I., et al., Pressure-induced transitions of polyethylene studied by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Vib. Spectrosc.*, **1999**, *19*, 461.

26. Pademshoke, A., et al., Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Spectrochimica. Acta. Part. A*, **2005**, *61*, 541.

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

27. Pademshoke, A., and Sato, H., Crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) studied by 2D IR correlation spectroscopy. *Polymer*, **2004**, *45*, 7159.

28. Hou, L., and Wu, L., LCST transition of PNIPAM-b-PVCL in water: cooperative aggregation of two distinct thermally responsive segments. *Soft Matter*, **2014**, *10*, 3578.

29. Hou L, and Wu P., Comparison of LCST-transitions of homopolymer mixture, diblock and statistical copolymers of NIPAM and VCL in water. *Soft Matter*, **2015**, *11*, 2771.

30. Sun W, et al., UCST or LCST? composition-dependent thermoresponsive behavior of Poly(N- acryloylglycinamide-co-diacetone acrylamide). *Macromolecules*, **2017**, *50*, 2175.

31. Chen, Y.P., et al., The structure and two-dimensional correlation infrared spectroscopy study of a new 2D polyoxomolybdate complex containing β -octamolybdate linked up by potassium ions: (4,40 -Hbpy)2($K_2Mo_8O_{26}$). *Vib. Spectrosc.*, **2006**, *40*, 142.

32. 吴 强，等，二维红外光谱分析对十二烷氧基苯甲酸的相变过程。*光谱学与光谱分析*，**2001**，*21*，778。

33. Jia, W., et al., Interfacially stable MOF nanosheet membrane with tailored nanochannels for ultrafast and thermo-responsive nanofiltration. *Nano Res.*, **2020**, *13*, 2973.

34. Hou, L., and Wu, P., Exploring the hydrogen-bond structures in sodium alginate through two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.*, **2019**, *205*, 420.

35. Chae, B., et al., Two-dimensional (2D) infrared correlation study of the structural characterization of a surface immobilized polypeptide film stimulated by pH. *J. Mol. Struct.*, **2016**, *1124*, 192.

36. Yan, Y., et al., Two-dimensional infrared correlation spectroscopy study of sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation process of myoglobin. *Biophys. J.*, **2003**, *85*, 1959.

37. Yan, Y.B., et al., Protein thermal aggregation involves distinct regions: sequential

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

events in the heat-induced unfolding and aggregation of hemoglobin. *Biophys. J.*, **2004**, *86*, 1682.

38. Rui, L., et al., Fourier transform infrared spectroscopy on external perturbations inducing secondary structure changes of hemoglobin. *Analyst*, **2016**, *141*, 6061.

39. Kamerzell, T.J., et al., Increasing IgG Concentration Modulates the Conformational Heterogeneity and Bonding Network that Influence Solution Properties. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 6109.

40. Yu, L.Y., and Xiang, B.R., Two-dimensional near-IR correlationspectroscopy study the interaction of protein and famotidine in acidic pH region. Spectrochimica. *Acta. Part A*, **2008**, *69*, 599.

41. Nassif, A.R., et al., 2D IR correlation spectroscopy in the determination of aggregation and stability of KH domain GXXG loop peptide in the presence and absence of trifluoroacetate. *Anal. Chem.*, **2017**, *89*, 5765.

42. Iloro, I., et al., Methionine adenosyltransferase a-Helix structure unfolds at lower temperatures than β-sheet: a 2D-IR study. *Biophys. J.*, **2004**, *86*, 3951.

43. Iloro, I., et al., Two-dimensional infrared correlation spectroscopy as a probe of sequential events in the thermal unfolding of cytochromes c. *Biochem.*, **2001**, *40*, 8256.

44. Yan, Y.B., et al., Oligomerization and aggregation of bovine pancreatic ribonuclease A: characteristic events observed by FTIR spectroscopy. *Biophys. J.*, **2006**, *90*, 2525.

45. 孙素琴，等，《中药二维相关红外光谱鉴定集》。2003，*北京: 化学工业出版社*。

46. Qu, L., et al., Identification of authentic and adulterated aquilariae lignum resinatum by fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation analysis. *J. Mol. Struct.*, **2016**, 1124, 216.

47. 吴方斌，等，羌活与宽叶羌活药材的红外光谱鉴别。*中药材*，**2007**，*40*， 543。

48. 魏爱华，等，不同产地草乌的红外光谱鉴别研究。*现代中西医结合杂志*，**2013**，*22*，2066。

49. 杨兰芬，等，三七不同药部位的红外光谱分析与鉴定。*云南化工*，**2018**，*45*，81。

50. 张春晖，等，黄芩及其提取物红外光谱与二维相关光谱的鉴别。*光谱学与光*

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

谱分析，**2010**，*30*，1774。

51. Czarnecki, M.A., et al., The switching process in a ferroelectric liquid crystalline side-chain polymer by time-resolved step-scan FT-IR spectroscopy and 2D correlation analysis. *Vib. Spectrosc*., **1998**, *18*, 17.

52. Cheng, Y.C., et al., Structure and phase transition in self-assembled films of an anti-ferroelectric liquid crystal studied by two-dimensional correlation FTIR spectroscopy. *Spectrochimica. Acta. Part A*, **2005**, *61*, 905.

53. Yamaguchi, Y., et al., Characterization of uniaxially aligned chitin film by 2D FT-IR spectroscopy. *Biomacro.*, **2005**, *6*, 1941.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

液质联用技术（LC-MS）在脂质组学中的应用进展

▶刘健安 李书沐

（分析测试中心质谱组 Email:lja@iccas.ac.cn）

摘要： 脂质组学（Lipidomics）作为系统生物学的重要组成部分，侧重于研究生物系统内全谱脂质的结构与功能。由于脂质分子具有极高的化学多样性和广泛的浓度跨度，对其进行精确分析极具挑战。液相色谱-质谱联用（LC-MS）技术通过高效的物理化学分离与高灵敏度的质量检测，已成为当前脂质组学研究的首选平台。本文系统综述了 LC-MS 的关键技术环节，包括样品前处理、色谱分离模式、质谱鉴定策略，并详细探讨了其在临床生物医学中的前沿应用。

一、引言

脂质不仅是细胞膜的结构支架和能量储存载体，更是信号传导路径中的核心小分子 。根据 LIPID MAPS 系统分类，脂质可分为脂肪酰、甘油脂、甘油磷脂、鞘脂、固醇脂等八大类 。在生物体内，由于脂肪酸链长度、不饱和键位置及空间构型的不同，脂质异构体数量可达数十万种 。传统的分析方法难以实现如此复杂体系的覆盖，而 LC-MS 技术解决了“分离”与“鉴定”的双重难题[1,2] 。

二、样品前处理：脂质组学的基石

在 LC-MS 分析之前，如何从复杂的生物样本（如组织、血浆、细胞）中高效提取脂质至关重要。

2.1 经典液液萃取：

Folch 法与 Bligh-Dyer 法 [3]：使用氯仿/甲醇/水体系。氯仿层处于下层，虽然提取效率高，但在自动化移液操作中容易吸取到中间层的蛋白质杂质。MTBE 法：由 Matyash 等人提出，使用甲基叔丁基醚。由于 MTBE 层（有机相）处于上层，极大地便利了自动化高通量提取[4]。

2.2 固相萃取：

用于针对性富集特定类别的脂质，如利用氨丙基键合硅胶柱富集中性脂质或酸性磷脂。

2.3 衍生化技术：

用于针对某些离子化效率较低的脂质（如胆固醇或某些脂肪酸），通过化学

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

衍生化引入易离子化的基团，可将检测灵敏度提高 10-100 倍。

三、液相色谱分离模式的选择与优化

色谱分离是减少质谱共流出干扰、区分异构体的关键。

3.1 反相色谱（RPLC）

RPLC 是目前应用最广的分离方式。通常采用 C18 或 C8 填充柱[5]。分离机制：脂质根据其疏水性的脂肪酸链进行分离。脂肪酸链越长，保留时间越长；双键数量越多（不饱和度越高），保留时间越短。优势：RPLC 对甘油三酯（TG）和磷脂（PL）具有极佳的分离能力，且流动相（通常为乙腈/异丙醇/水，含甲酸铵）与质谱兼容性极好。

3.2 亲水作用色谱（HILIC）

分离机制：根据脂质极性头部基团（Headgroup）进行分离[6]。应用：同一类别的脂质（如所有 PC）会在相近的时间洗脱。这对于快速类别定量非常有用，因为它可以消除由于脂肪酸链长度不同导致的基质效应差异。

3.3 超高效液相色谱（UHPLC）

UHPLC 使用粒径小于 2μm 的填料，在极高压力下运行。相比传统 HPLC，UHPLC 极大地提升了峰容量，使原本在色谱图上重叠的脂质信号得以分开，是处理高复杂度生物样本的必备工具。

四、质谱鉴定策略与数据处理

4.1 离子化方式

电喷雾电离（ESI）是脂质组学的核心技术。正离子模式通常用于检测 PC、PE、TG（形成 $[M+H]^+$ 或 $[M+NH4]^+$ ），负离子模式则擅长检测 FA、PI、PS 和 PG[3]。

4.2 数据采集模式

非靶向（Discovery Lipidomics）：利用 Q-TOF 或 Orbitrap 进行数据依赖型采集（DDA）或数据非依赖型采集（DIA）。其目标是尽可能覆盖所有脂质信号[7]。靶向（Targeted Lipidomics）：利用三重四极杆（QQQ）进行多反应监测（MRM）。通过选定特定的母离子和特征碎片离子对，实现极高的定量准确度和动态范围。

4.3 结构鉴定的深度

目前的挑战在于确定双键的精确位置。新兴的技术如臭氧诱导解离（OzID）或紫外光解离（UVPD） 正在被整合进 LC-MS 流程中，用于定位脂质分子内

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

C=C 双键的具体位置[8]。

五、LC-MS 在生物医学研究中的应用

5.1 慢性代谢性疾病

在糖尿病和肥胖研究中，LC-MS 揭示了神经酰胺（Ceramide）与胰岛素抵抗之间的直接联系。研究发现，血浆中特定长度脂肪酸链的神经酰胺水平可作为心血管事件风险的独立预测指标。

5.2 肿瘤脂质组学

癌细胞为了满足快速增殖的需求，会进行剧烈的脂质重构。通过 LC-MS 分析，研究者发现肿瘤组织中饱和脂肪酸磷脂的比例显著升高，这增加了膜的刚性并帮助癌细胞逃避氧化应激诱导的细胞凋亡。

5.3 神经科学

大脑是人体中脂质含量最高、最复杂的器官之一。LC-MS 被广泛用于阿尔茨海默症（AD）患者脑脊液的筛查，发现了缩醛磷脂（Plasmalogens）水平的显著下降，为疾病的早期诊断提供了潜在标志物。

六、 结论与未来展望

目前，质谱组有 LC-MS 相关仪器三台，分别为 Thermo Fusion LUMOs, Waters Xevo G2-XS TOF, Bruker Compact，并搭载不同数据库可做交叉比对。可以使用 Fusion LUMOs 对血液样本，尿液样本，细胞提取液等类型生物样本进行处理分析，得到其中代谢物，脂质的种类和含量信息，用于进行某些特定疾病的早期诊断和相关标志物的筛选。

LC-MS 技术已将脂质组学推向了精细化研究的高度。然而，未来的发展仍需解决以下问题：空间脂质组学：将质谱成像（MSI）与 LC-MS 结合，在保持结构鉴定能力的同时，获取脂质在组织中的空间分布信息。[9]多组学整合：将脂质组数据与基因组、蛋白质组数据进行关联建模，构建完整的代谢调控网络。单细胞脂质组学：开发极微量样本的处理技术，以探索单细胞层面的脂质异质性。总之，随着硬件分辨率的提升和生物信息学算法的不断完善，LC-MS 将继续为脂质组学在分子生物学，新材料的生物学应用等方向提供深度支持。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

参考文献：

1.Wenk, M. R. Lipidomics: new tools and applications. *Cell*, **2010** , 143(6), 888.

2.Sud, M., et al. LIPID MAPS-nature lipidomics gateway. *Nucleic Acids Research*, **2007** ,*35*, D527.

3.Han, X., & Gross, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, **2003**, *44*, 1071.

4.Matyash, V., et al. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, **2008** , *49*, 1137.

5.Cajka, T., & Fiehn, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, **2014**, *61*, 192.

6.Zheng, L., et al. Liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2010**, *52*, 747.

7.Köfeler, H. C., et al. High-resolution mass spectrometry-based lipidomics: From guidelines to confidence strategy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2012**

8.Poad, B. L., et al. Ozone-induced dissociation on a traveling wave ion guide: Determination of double-bond positions in lipids. *Analytical Chemistry*, **2018**, *90*, 1292.

9.Murphy, R. C., et al. Imaging specific lipids by mass spectrometry: a new frontier. *Journal of Lipid Research*, **2015**, *56*, 1634.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

新技术应用

固体核磁 ^{13}C $CPXT_1$ 技术在材料结构解析中的应用

►武宁宁[1] 王秀梅[2] 向俊锋[1]

（1、分析测试中心核磁组 Tel: 010-62627946 Email: ningning@iccas.ac.cn；2、布鲁克（北京）科技有限公司）

现代材料体系的构效关联日趋复杂，从原子尺度揭示其微观本质源头已成为关键科学挑战。本文将介绍一种原位、无损“虚拟分离”新方法——固体核磁弛豫技术，它亦可助力实现了对复杂材料的空间、动态及手性多维度全景解析。

一、$CPXT_1$ 技术原理

自旋-晶格弛豫时间（spin-lattice relaxation time, T_1）作为核自旋系统与环境（晶格）交换能量的时间标度，对局部分子运动极度敏感。当分子在特定频率（对应核的拉莫尔频率）上运动时，这种运动可以高效地将核自旋的能量耗散到环境中，导致 T_1 缩短。反之，在刚性环境中，弛豫路径有限，T_1 则显著延长。由于 T_1 对分子的运动非常敏感，使之成为分辨不同微区的天然探针。以 ^{13}C 的 $CPXT_1$（Bruker 谱仪中脉冲序列名称）技术为例，它是基于 CP (Cross-Polarization）发展的一种交叉极化反转恢复法技术，可用于不同碳官能团的自旋-晶格弛豫时间的测定[1-2]。图 1 为其脉冲序列示意图，其中，PLW1 用于建立 CP，PLW11 表示 ^{13}C 通道 P1 脉宽对应的 90 度脉冲功率，vd list 表示反转脉冲后的弛豫延迟时间，需要根据实际样品设定[3]。

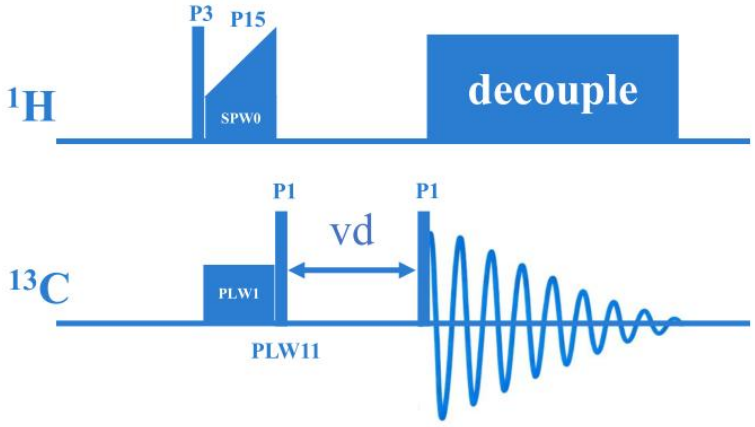


图 1、$CPXT_1$ 脉冲序列示意图[3]

二、技术应用实例

2.1 核磁弛豫研究证实纤维素/离子液体新型复合晶体的形成

基于单纯的纤维素或单纯的离子液体均表现为非晶态或液晶态（^{13}C 的 T_1 较短），文中将两者以特定比例复合后，复合物中纤维素链上几乎所有碳核的 T_1 值显著增长了一个数量级，直接证明了纤维素链运动被完全“冻结”束缚，从而确证了一种新型、长程有序的纤维素/离子液体复合晶体的形成，并揭示了其内部均一且强烈的分子相互作用。文中同时利用弛豫差异，实现了离子液体晶体与纤维素晶体的“虚拟分离” [4]。

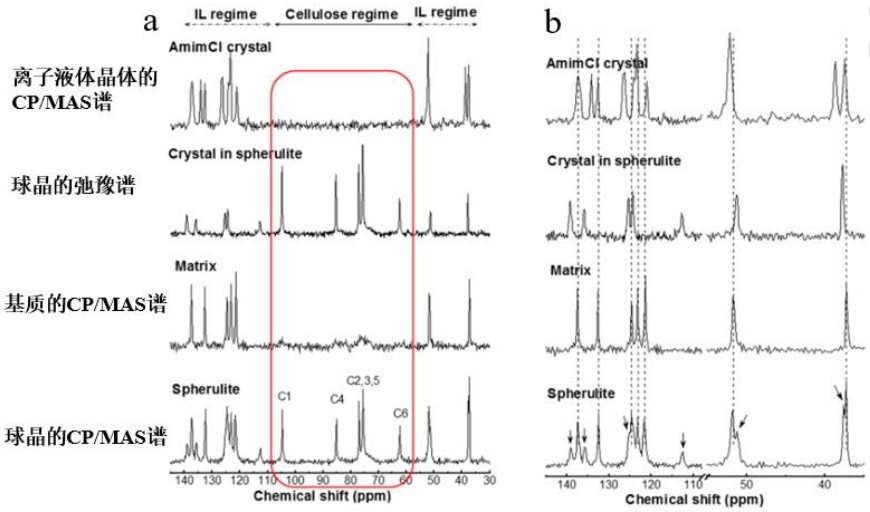


图 2、（a）不同样品（$Amim^+Cl^-$ 晶体、球晶的结晶部分、基体包括非晶纤维素和离子液体、球晶）的 ^{13}C 固体核磁共振谱图（b）^{13}C 固体核磁共振谱图的部分放大图[4]

2.2 纤维素晶区、非晶区的“虚拟分离”

Song 等人[5]根据分子运动状态不同，选择 CP/MAS 技术、高功率去耦技术以及弛豫技术来确认凝胶中的多尺度结构，从溶液到凝胶转变过程中纤维素存在拉伸诱导结晶现象，通过弛豫技术得到了纯结晶谱图。

版权为中国科学院化

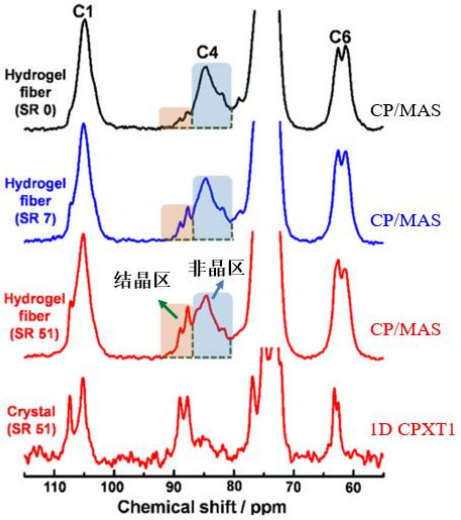
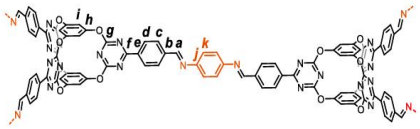


图 3、不同样品的 ^{13}C 图体核磁共振谱图：水凝胶纤维样品 SR 0、SR 7、SR 51（CP/MAS 谱），以及 SR 51 水凝胶纤维的晶态区域（一维 $CPXT_1$ 谱）[5]

2.3 解析笼状共价有机框架材料的特殊运动性能

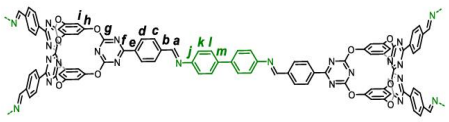
Ma 等人[6]利用固体高分辨 NMR 方法，测定 ^{13}C 的自旋-晶格弛豫时间（T_1），解析分子的结构及分子的运动特性。值得注意的是，固体核磁一维 ^{13}C CP/MAS 谱中有些信号峰相对尖锐（cage-COF-1 中的 C^k，cage-COF-2 中的 C^k、C^l），表明悬挂的苯基连接臂具有显著更高的运动性。T_1 弛豫时间测量进一步佐证了这一现象：这些信号峰（连同 C^c、C^d 信号）的 T_1 值远低于其他信号，甚至比非晶态样品中的对应值更短。

a



Assignment	cage-COF-1		amorphous cage-polymer-1	
	Region (ppm)	T1 (s)	Region (ppm)	T1 (s)
f	179.8-175.8	20.3	179.6-175.9	13.7
g	175.8-170.9	24.6	175.6-171.2	22.3
a, h	158.6-151.2	20.7	157.8-150.7	18.5
j	151.1-147.6	17.9	149.0-146.3	15.1
b, e	143.8-134.1	16.1	142.9-138.0	14.2
c, d	**133.7-124.8**	**5.4**	**133.2-125.6**	**8.9**
k	**123.5-118.3**	**1.8**	**124.3-119.0**	**4.9**
i	117.3-111.1	18.4	118.8-111.7	14.2

b



Assignment	cage-COF-2		Assignment	amorphous cage-polymer-2	
	Region (ppm)	T1 (s)		Region (ppm)	T1 (s)
f	179.6-175.6	13.1	*f*	180.8-175.8	21.2
g	175.6-171.7	10.3	*g*	175.7-170.7	14.9
a, h	158.8-151.0	13.8	*a, h, j*	161.8-145.0	10.2
j	151.0-148.8	8.8			
b, e, m	142.0-134.8	11.6	*b, e, m*	145.0-133.9	13.2
c, d	**132.1-126.8**	**3.4**	*c, d*	**133.9-123.0**	**5.5**
l	**126.8-124.3**	**2.4**	*l, k*	**123.0-116.7**	**16.1**
k	**121.3-118.4**	**2.4**			
i	118.0-110.0	13.8	*i*	116.7-110.6	9.7

图 4、（a）Cage-COF-1 及其无定形聚合物的 T_1 弛豫时间测定（b） Cage-COF-2 及其无定形聚合物的 T_1 弛豫时间测定[6]

2.4 利用弛豫差异解析多孔复合材料的主-客体相互作用及“虚拟分离”

通过测定多孔材料在吸附溶剂前后的固体核磁^{13}C T_1 弛豫时间，可对多孔材料骨架与其吸附客体进行有效的分析。当客体分子被限域在孔道内时，其分子运动自由度降低，表现为^{13}C T_1 值的显著延长；而多孔骨架自身的 T_1 则相对稳定。此差异源于两者分子运动模式与频率的区别。利用这一弛豫对比，可从重叠的谱峰中区分并归属主、客体的信号，进而分析：（1） 吸附是否均匀；（2）主客体相互作用的强弱，与孔壁紧密结合的分子运动性低，T_1 较长，而在孔道中心快速运动的分子，T_1 较短；（3）孔道限域对客体分子动态行为的影响。该方法为从分子动力学层面揭示多孔材料吸附与限域机制提供了独特手段。此外，也可以通过筛选合适的一个 vd list 值做一维碳谱，实现主-客体的原位、无损地“虚拟分离”，该技术已成为简化多孔材料固体碳谱的常用手段。

2.5 立体化学维度解析——精准区分手性异构体

手性（对映异构）化合物的区分是化学分析中的经典难题。由于它们在普通光谱中表现出高度相似的性质，其分离与鉴定通常依赖手性色谱柱或化学衍生化等方法，过程较为繁琐，且存在破坏样品的风险。固体手性分子的结晶可能形成不同的对映体晶体或外消旋晶体。这些不同的固体手性组装体，尽管每个分子的化学键相同，但它们在晶体环境中的分子构象、分子间相互作用网络（氢键、π-π 堆积等）以及晶格内的受限运动模式存在细微而系统的差异。这些差异足以被高灵敏度的固体 NMR，特别是对局部环境极为敏感的 T_1 弛豫所捕获[7]。该技术已为胶体、界面与化学热力学实验室成功地证明了镜面对称手性氨基酸中超分子中水结构与不同手性氨基酸的弱相互作用强度存在不同。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

参考文献:

参考文献:

1. Torchia, D. A., The Measurement of Proton-Enhanced Carbon-13 T_1 Values by a Method Which Wuppresses Artifacts, *J. Magn. Reson.*, **1978**, *30*, 613.

2. Alamo, R.G., et al., Measurement of the ^{13}C Spin-Lattice Relaxation Time of the

Non-crystalline Regions of Semicrystalline Polymers by a CP MAS-based Method, *Polymer*, **2002**, *43*, 1857.

3. Solid state NMR User Manual, **2022**, *Bruker Corporation*.

4. Song, G.J., et al., A Novel Cellulose/Ionic Liquid Complex Crystal, *Cryst. Growth Des.,* **2018**, *18*, 4260.

5. Diao, H.L., et al., Stretch-Induced Crystallization of Cellulose Spun from Ionic Liquid Solution, *Biomacromolecules*, **2022**, *23*, 2264.

6. Ma, J.X., et al., Cage Based Crystalline Covalent Organic Frameworks, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 3843.

7. Santos, J. I., et al.,Chirality-Induced Electron Spin Polarization and Enantiospecific Response in Solid-State Cross-Polarization Nuclear Magnetic Resonance, *ACS Nano*, **2018**, *12*, 11426.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

组织原位结构的冷冻电子断层成像研究方法与应用实例

▶李 昊 何万中

（分析测试中心生物电镜组 Email:lihao9x@iccas.ac.cn）

前言

近年来结构生物学领域正在经历一场从“离体”（in vitro）向“原位”（in situ）研究的深刻变革。单颗粒冷冻电镜分析（Single Particle Analysis，SPA）在原子分辨率水平解析纯化生物大分子结构方面取得了巨大成功，为生物医学研究带来了一场深刻的技术革命 [1]。然而，单颗粒冷冻电镜分析技术要求将生物大分子从其天然的细胞环境中分离纯化，不可避免地破坏了生物大分子在细胞内的自然分布、复杂的相互作用关系及生理性状态信息。此外，传统的组织样品电镜制样方法，需经过化学固定、脱水和树脂包埋、切片、重金属染色等过程，往往会导致样品严重的变形和生理性结构变化，无法满足对组织原位高分辨率研究需求。因此，如何在保持生物样品近生理状态的前提下，获取其原位高分辨率三维结构信息的冷冻电子断层成像技术（Cryo-electron Tomography，Cryo-ET），正成为当前冷冻电镜领域新的研究热点，许多制约 Cryo-ET 的关键技术瓶颈亟待攻克[2]。

Cryo-ET 要求利用物理固定方式——即快速的玻璃化冷冻固定（Vitrification），在毫秒至秒级的时间尺度内将生物样品“定格”在非晶态冰中，从而最大程度地保留了生物大分子的原生构象及其所处的细胞微环境[3,4]。通过对同一薄片样品进行一系列倾转成像并重构，Cryo-ET 能够揭示细胞器、大分子复合物在纳米尺度下的三维原位结构。本文将重点综述 Cryo-ET 的技术原理，特别是针对从单层细胞向块状动物组织（Tissue）样品拓展所面临的制样技术挑战（如高压冷冻与离子束减薄），并探讨该技术在解析生理状态和病理状态下组织原位三维结构方面的应用前景[5,6]。

技术原理

针对不同厚度的生物样品，目前已建立了两套不同的冷冻制样策略。对于厚度小于 10~20 μm 的样品（如细菌、悬浮病毒或单层培养细胞的边缘区域），通常采用投入式冷冻技术（Plunge Freezing），直接将样品冷冻固定再电镜载网上，

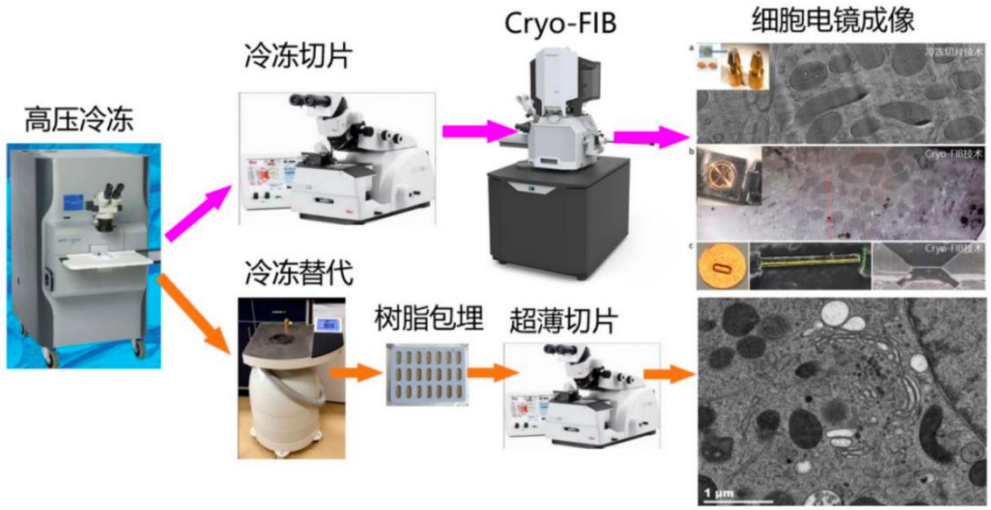
然后利用 cryo-FIB 技术减薄制样，目前建立了成熟可靠的制样流程。然而，对于厚度超过 20 μm 甚至达到数百微米的块状动物组织，投入式冷冻会产生破坏原位结构的冰晶，必须采用高压冷冻（High-Pressure Freezing, HPF）固定技术，在约 2100 bar 的高压条件下进行瞬时冷冻，从而实现整体组织的快速玻璃化固定[7,8]。针对组织样品的 Cryo-ET 制样，需要解决系列技术挑战建立一套新的技术流程（如图 1 所示），主要包含以下四个关键步骤：

（1）组织取样与高压冷冻固定：将实验动物在麻醉状态下进行活体原位快速取样，迅速将组织切至 50 μm 以下厚度并装入特制的 D 型铜盘（厚度约 80 μm，凹槽深度约 50 μm）。加入适量冷冻保护剂后覆盖蓝宝石片，整个过程需在 1 min 内完成，随后立即进行高压冷冻，以最大程度保留组织的生理状态。

（2）冷冻修块：参考 VHUT-cryo-FIB 方法[9]，使用冷冻超薄切片机对玻璃化样品进行第一次修块减薄，将样品厚度修至 20~30 μm，并将样品盘装入 Autogrid 中，为后续 FIB 减薄做准备。这一步骤可显著缩短后续 FIB 减薄时间，提高制样通量。

（3）Cryo-FIB 减薄：利用冷冻聚焦离子束（Cryo-FIB）技术对冷冻组织块进行“纳米雕刻”：通过高能镓离子束或等离子束轰击样品，逐步移除目标区域上下的多余物质，最终留下一片厚度小于 300 nm 的薄片（Lamella）供冷冻电镜成像使用[10,11]。

（4）数据采集与三维重构：将制备好的薄片转移至冷冻透射电镜中，在 -170 ℃以下进行倾转系列数据采集，随后通过加权反投影或迭代重构算法进行三维重构，最终获得断层图像。



中国科学院化学研究所分析测试中心版权所有

图 1、两种组织样品的冷冻样品制备和成像方式：一种是通过冷冻替代技术，在常温下拍摄样品的图像；另一种是利用冷冻聚焦离子束（FIB）技术，在完全冷冻状态下进行冷冻电镜成像

上述流程中，Cryo-FIB 减薄是最具挑战性的环节。大块组织样品在减薄过程中会释放巨大的内应力（通常比单层细胞高出一个数量级），极易导致薄片弯曲、破裂，制备成功率极低[12]。传统的应力释放方案，如单边应力释放槽、梳子状（Furrow-Ridge）结构等，在实际操作中均存在明显局限：单边切口无法有效释放应力，薄片中部仍易破裂；而梳子状结构虽能提供一定的机械支撑，但其"山脊"在电镜倾转时会严重遮挡成像视野，导致有效倾转角度受限（图 2）。

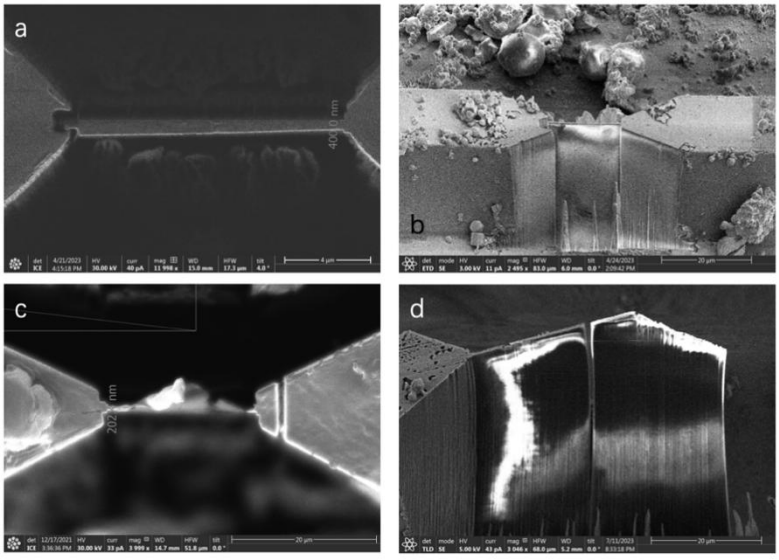


图 2、不同应力槽方案尝试：（a）单边小应力槽（b）单边大应力槽（c）单边切出一条缝（d）切断一边但薄片较大

目前，针对上述难题已发展出两种有效的解决策略：

其一为“对称切口应力释放方案”[11]（图 3）。该方案的核心思路是：当薄片减薄至约 2 μm 厚度时，先在中部切出一条 0.5~1 μm 宽的缝隙，随后继续将两侧分别减薄至 300 nm 以下，最终形成两个宽度约 5 μm 的独立薄区。

该设计的优势在于：

（1）每侧薄片因悬臂长度短（<5 μm）而具备良好的机械稳定性，不易弯曲破裂；

（2）对称结构使两侧应力分布均匀，避免了单边切断导致的翘曲问题；

（3）两薄区在 TEM 倾转采集时可提供连续的有效视野，不存在遮挡问题。采用该方案后，厚度小于 300 nm 薄片的制备成功率可稳定达到 90 %以上。

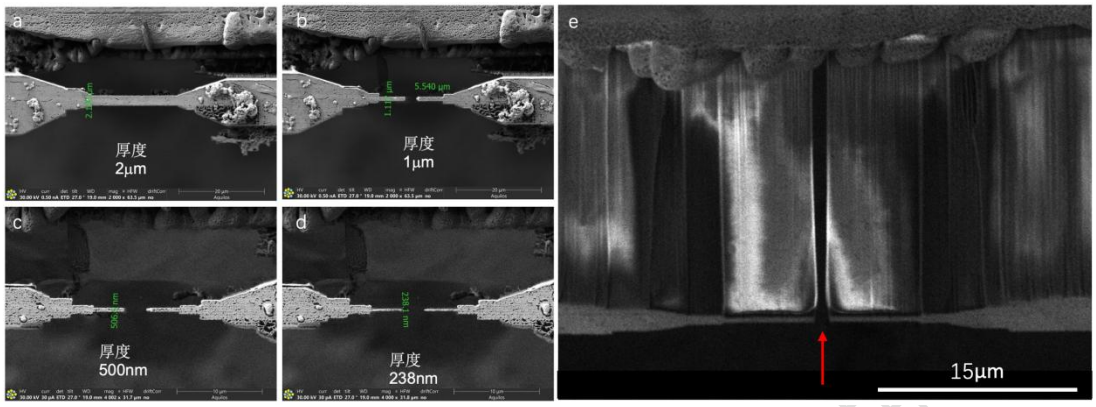


图 3、对称切口应力释放方案实例：（a-d）为薄片减薄过程，在减薄至 2 μm 的时候先将中间切一个 0.5~1 μm 宽度的缝隙，再逐步将两边减薄至 300 nm 以下（e）为 sem 下的效果，红色箭头为中间缝隙，两边薄片宽度在 5 μm 左右

其二为 Cryo-Lift-Out 技术[13]（图 4）。该方法借鉴材料科学领域的 lift-out 技术，使用冷冻机械臂通过再沉积（redeposition）方式将样品与机械臂牢固连接，随后切割三条缝隙将目标区域从大块样品中完整取出。取出的样品块被转移至预先修出约 20 μm 宽槽的 TEM 载网上，再进行后续减薄。

该技术的优势在于：

（1）样品在转移过程中应力得到充分释放，后续减薄时不易破裂；

（2）对高压冷冻样品的初始质量要求较低，即使存在局部冰晶损伤也可通过精准提取避开；

（3）可在同一载网上制备多个薄片，显著提高制样通量。该方法尤其适用于厚度较大或结构异质性较强的组织样品。

版权为中国科学院生物物理研究所分析测试中心

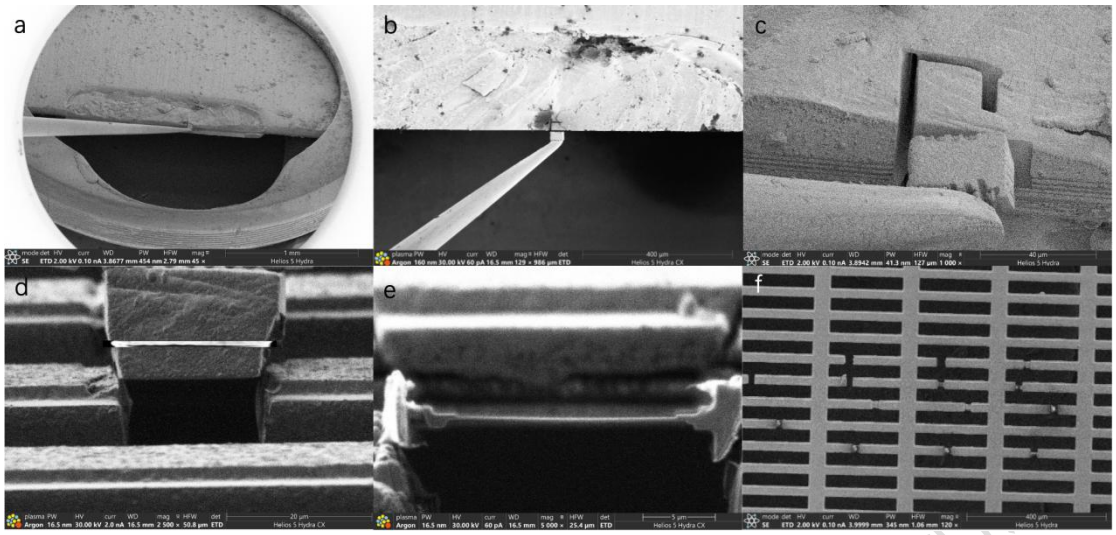


图 4、改进的 Lift-out 流程：（a）将机械臂用反沉积的方式粘住样品（b-c）切 3 条缝并将样品取出（d）放入预先修出 20 μm 宽度槽的载网将样品搭上去并修下一块厚 5μm 左右的样品（e）将样品在载网上减薄（f）最终在载网上呈现的效果

冷冻电子断层技术原理要求采集系列倾转样品的投影像然后进行三维重构（图 5）。在低温（约-170 ℃）条件下，样品台携带玻璃化冷冻样品在电子束下进行一定角度范围（通常为-60°至+60°）的连续倾转，每旋转一个微小角度采集一张二维投影图像，形成一套倾转系列（Tilt Series）。随后，利用加权反投影（Weighted Back-projection）或迭代重构算法将这些二维投影反演为三维密度图（Tomogram）[14]。然而，电子束在穿透样品时会发生非弹性散射，导致图像信噪比随样品厚度增加而急剧下降。对于常规 300 keV 透射电子显微镜而言，能够实现高质量成像的样品厚度物理极限通常在 500 nm 以内。这一物理限制意味着，除了边缘较薄的贴壁细胞或微小的病毒颗粒外，绝大多数真核细胞及生物组织样品都无法直接进行透射成像，必须经过精细的减薄处理。

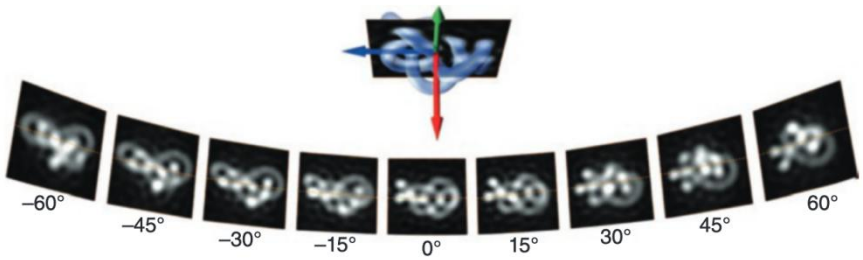


图 5、断层成像的数据采集与三维重构。目标样品（蓝色结构）在坐标系中绕倾斜轴（红色箭头）旋转，同时接受来自正交方向（绿色箭头）的穿透式照明。在不同的旋转角度（-60°

至 60°）下，采集得到一系列二维投影图像（下图）。这些二维投影数据将用于后续的反投影计算，以重构目标的三维体积。

重构得到三维断层图后，如何从极低信噪比（SNR）的电子断层图中提取高分辨率结构信息是另一大挑战。子断层平均技术（Subtomogram Averaging, STA）可以用来提取重复结构的高分辨率信息。该技术基于一个假设：即生物样品中存在大量结构相同的重复单元（如核糖体、病毒衣壳蛋白等）。通过从三维重构体中提取成千上万个这样的子体积（Subtomograms），并在三维空间中对它们进行平移和旋转对齐，最后叠加平均，可以显著消除随机噪声，将分辨率提升至近原子水平[15]。这一技术使得 Cryo-ET 不仅能看清细胞的“轮廓”，更能解析分子的“细节”[16]。

典型应用与研究进展

Cryo-ET 技术最早在较薄的单细胞及微生物样品中取得了突破性应用。在细菌、古菌以及真核细胞的边缘区域，研究人员利用该技术成功解析了细菌鞭毛马达的原位组装机制、核糖体在细胞质中的多聚体状态以及病毒侵染宿主细胞的动态过程。这些研究不仅验证了 Cryo-ET 在近生理状态下解析超微结构的能力，也为后续的技术拓展积累了宝贵经验。然而，基于单层细胞培养（2D Cell Culture）的研究体系存在天然局限性：它们往往缺乏细胞外基质（ECM）的三维支撑，且细胞极性、基因表达谱系及信号转导通路与体内真实环境存在显著偏差[17][18]。例如，许多细胞间原位结构需要在组织样品中才能观察到，如细胞间连接、肌肉神经连接、多种细胞互作等，因此迫切需要实现组织原位结构的 Cryo-ET 成像技术。

有效整合高压冷冻术与 Cryo-FIB 制样技术制作出冷冻薄片组织样品后，可利用 Cryo-ET 解析一些关键原位结构。以神经肌肉接头（Neuromuscular Junction, NMJ）为例（图 6），其生理功能的实现高度依赖于运动神经元末梢、突触后肌纤维膜以及末端施旺细胞（Terminal Schwann Cells）三者构成的“三方突触”精密结构[19]。这种跨细胞类型的复杂连接涉及突触前膜活性区与突触后膜乙酰胆碱受体簇的精确对齐，在解离的单细胞体系中根本无法重现。通过对小鼠骨骼肌组织进行原位 Cryo-ET 分析，研究者不仅能观察到突触间隙中神经递质受体的原位分

版权所有中国科学院化学研究所分析测试中心

布，还能解析施旺细胞如何通过复杂的膜突起包裹神经末梢，从而揭示组织特异性微环境对神经信号传递的调控机制[20]。这种在组织层面保留细胞间相互作用网络的能力，是 Cryo-ET 区别于其他结构生物学方法的独特优势。

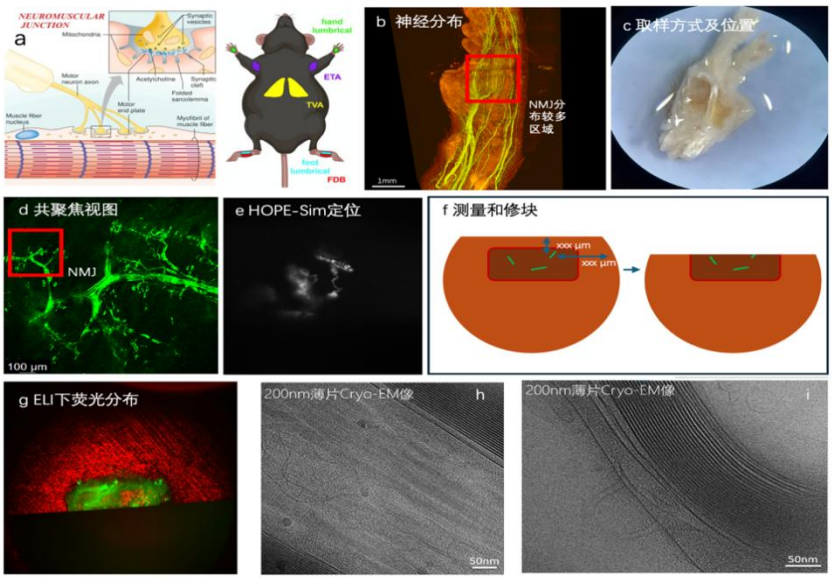


图 6、Thy1-GFP 小鼠（北京脑科学与类脑研究所赵瑚组提供小鼠）（a） NMJ 示意图和位置；（b）在老鼠前爪的神经分布，红框内为 NMJ 分布较多的区域，根据分布区域决定取样方案(c)；（c）直接从中间剪断，从前爪手心贴近指骨处提取样品，可以保证精准取样；（d）在共聚焦中拍到 NMJ 形态；（e）将样品进行高压冷冻以后在 HOPE-Sim 当中成像进行粗定位；（f）找到大概位置之后记录距离铜盘边缘的位置，然后修块至目标区域；（g） 将切到位置的铜盘放在 ELI 下面找到目标位置并切割标记；（h,i） 最终在 Cryo-EM 下拍到的神经髓鞘。

在临床转化与病理学研究领域，Cryo-ET 正成为连接分子病理与组织形态学的桥梁。例如，在阿尔茨海默病（AD）和帕金森病（PD）的研究中，传统病理切片仅能提供淀粉样斑块或路易小体的宏观分布信息，而缺乏分子层面的细节。最新的研究利用 Cryo-ET 技术，直接在死后人脑组织或疾病模型小鼠的脑组织切片中，解析了淀粉样蛋白和 Tau 蛋白聚集体在原位环境下的纤维结构及其与周围细胞器（如线粒体、内质网）的病理互作[21]。这些高分辨率的原位结构数据，揭示了病理蛋白聚集体如何物理性地破坏细胞膜系统或干扰细胞运输，为理解疾病的致病机理及开发针对性的阻断药物提供了前所未有的结构基础。

版权为中国科学院脑科学研究所所有

总结与展望

综上所述，冷冻电子断层成像技术（Cryo-ET）通过整合高压冷冻、聚焦离子束减薄及先进的图像重构算法，目前已经成功实现了从单细胞到复杂组织样品的原位结构解析，为理解生物大分子在组织原位状态下的功能机制提供了革命性的工具。然而，我们必须清醒地认识到，该技术在组织样品应用中仍面临严峻挑战：特别是针对厚度大于 20 μm 的哺乳动物组织，Cryo-FIB 减薄过程耗时极长且极易因应力释放导致样品破裂，制样成功率和通量依然较低[12]。此外，在海量断层数据中精准定位目标分子的难度也随着样品复杂度的增加而指数级上升。展望未来，随着自动化制样技术（如自动 Lift-out）的成熟、光电联用技术（CLEM）定位精度的提升以及人工智能辅助的数据处理流程的引入[13]，Cryo-ET 有望突破现有的通量瓶颈，成为解析复杂组织及临床病理机制的利器。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

参考文献：

1. Sali, A., et al., From words to literature in structural proteomics., *Nature*, **2003**, 422，*6928*, 216.

2. Asano, S., et al., In Situ Cryo-Electron Tomography: A Post-Reductionist Approach to Structural Biology. *J. Mol. Biol*., **2016**, *428*, 332.

3. Berger, C., et al., Cryo-electron tomography on focused ion beam lamellae transforms structural cell biology. *Nat. Methods*, **2023**, *20*, 499.

4. Turk, M. and W. Baumeister, The promise and the challenges of cryo-electron tomography. *FEBS Lett*., **2020**, *594*, 3243.

5. F. Förster and A. Briegel, Cryo-Electron Tomography: *Structural Biology in situ*, **2024**, Springer International Publishing.

6. Kixmoeller, K., et al., Bridging structural biology and clinical research through in-tissue cryo-electron tomography. *EMBO J*., **2024**, *43*, 4810.

7. Studer, D., et al., Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing. *J. Microsc.*, **1995**, *179*, 321.

8. Studer, D., et al., Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. Histochem. *Cell Biol*., **2008**,

130, 877.

9. 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.

10. Marko, M., et al., Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nat. Method*s, **2007**, *4*, 215.

11. Wang, S., et al., CryoFIB milling large tissue samples for cryo-electron tomography. *Sci. Rep.*, **2023**, *13*, 5879.

12. Wolff, G., et al., Mind the gap: Micro-expansion joints drastically decrease the bending of FIB-milled cryo-lamellae. *J. Struct. Biol.*, **2019**, *208*, 107389.

13. Schaffer, M., et al., A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native Caenorhabditis elegans tissue. *Nat. Methods*, **2019**, *16*, 757.

14. Dubochet, J., et al., Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.*, **1988**, *21*, 129.

15. Zhang, P., Advances in cryo-electron tomography and subtomogram averaging and classification. *Curr. Opin. Struct. Biol*., **2019**, *58*, 249.

16. Hylton, R.K. and M.T. Swulius, Challenges and triumphs in cryo-electron tomography. *iScience*, **2021**, *24*, 102959.

17. Pampaloni, F., et al., The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **200**7, *8*, 839.

18. Kapałczyńska, M., et al., 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.*, **2018**, *14*, 910.

19. Barik, A., et al., Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *J. Neurosci.*, **2016**, *36*, 9770.

20. Nishimune, H. and K. Shigemoto, Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. *Neurol. Clin.*, **2018**, *36*, 231.

21. Gilbert, M.A.G., et al., CryoET of amyloid and tau within postmortem Alzheimer's disease brain. *Nature*, **2024**, *631*, 913.

版权归中国科学院化学研究所分析测试中心所有

典型应用案例

FT-ICR-ESI-MS在金属氧化物中的应用

▶ 韩娟娟

（分析测试中心质谱组 Email:hjj@iccas.ac.cn）

光合作用水裂解催化中心（又称放氧中心，OEC）是一个独特的 Mn4CaO5 异核金属氧化物团簇，作为自然界中唯一能高效、温和地将水催化裂解为氧气、质子和电子的生物催化剂，阐明其反应机理（尤其是 O-O 键形成机制）对理解自然光合作用及发展人工催化剂具有重要的科学意义。然而，该团簇及其反应中间体对水、温度等环境因素极为敏感，这为实时、原位表征带来了巨大挑战。

基于这些问题，我们开发了高分辨质谱实时监测联用装置，通过超高分辨率和质量准确度，精准追踪反应中间体、解析产物结构，并揭示反应路径。为催化机理研究提供了一种具有超高分辨率、超高质量精度和“原位”捕获能力的强大工具。

傅里叶变换离子回旋共振质谱（FT-ICR-MS）可在单次分析中区分质荷比差异极小（如小于 0.001 Da）的离子，结合电喷雾电离源（ESI）的“软”电离特性，能够将反应体系中的离子近乎原位地转移至气相并进行精确测量。这使得复杂反应混合物中目标中间体的直接检测与鉴定成为可能。通过精确测定离子的质荷比，可推断其元素组成，从而为复杂样品的分子组成解析提供了技术支撑。

一、仪器原理和分析方法

傅立叶变换离子回旋共振质谱仪（FT-ICR-MS）是一种利用离子在超导磁场中回旋频率差异进行质量分析的高性能仪器，通过傅里叶变换将离子信号转换为质谱图。结合 ESI 离子源，适用于复杂样品有机物的精确分析，其应用领域涵盖医药、环境科学、食品安全及生命科学等。

1.1 FT-ICR-ESI-MS 的基本原理

（1）电喷雾电离源（ESI）： ESI 是一种“软”电离技术，能够在接近常温常压的条件下，将溶液中的离子或中性分子转化为气相离子，并保持其原有的结构和化学状态。这对于将反应液中的中间体“无损”地转移到质谱仪中进行分析至关重要。

（2）离子捕获：离子被引入超高真空环境下的 ICR 池（Penning Trap），在

质谱实验室 中国科学院化学研究所分析测试中心版权所有

强磁场（通常为 3~15 Tesla）作用下做回旋运动。

（3）回旋共振：离子在磁场中的回旋频率（ω）与其质荷比（m/z）相关，通过测量频率可确定离子的质量。

（4）傅里叶变换检测：离子回旋运动产生的微弱电流信号被检测，并通过傅里叶变换转换为质谱图，实现高分辨率质量分析。

1.2 分析方法

被测样品来源于化学研究所光化学实验室张纯喜团队合成的一系列仿生簇合物。在开始实验之前，用干燥的乙腈冲洗注射器和取样管，保证进样系统为无水环境，所有样品均溶于无水乙腈中进行质谱分析测试。

二、结果与讨论

为确定最佳检测条件，系统性优化了关键实验参数，包括溶剂的选择、团簇浓度、干燥气温度、雾化气压力和毛细管电压。由于该团簇是水的催化剂，对水敏感，在开始实验之前，用干燥的乙腈彻底清洗注射器和取样管，将所有样品溶解在无水乙腈中进行质谱测试。确定簇合物的溶液浓度为 50 μmol，避免浓度过高产生离子抑制。优化干燥气温度为 150 ℃，确保液滴完全蒸发，有效去除溶剂分子，减少簇合物间非特异性结合。雾化气压力过高可能导致加和离子解离，过低则影响离子化效率，需要通过实验确定最佳压力范围。毛细管电压建议设置在 3000~3500 V 之间。通过系统优化上述参数，可显著提高团簇离子在 FT-ICR-ESI 中的稳定性和检测灵敏度，测试结果如图 1 所示。该方法无需繁琐前处理，能保留反应液中离子的原始状态。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

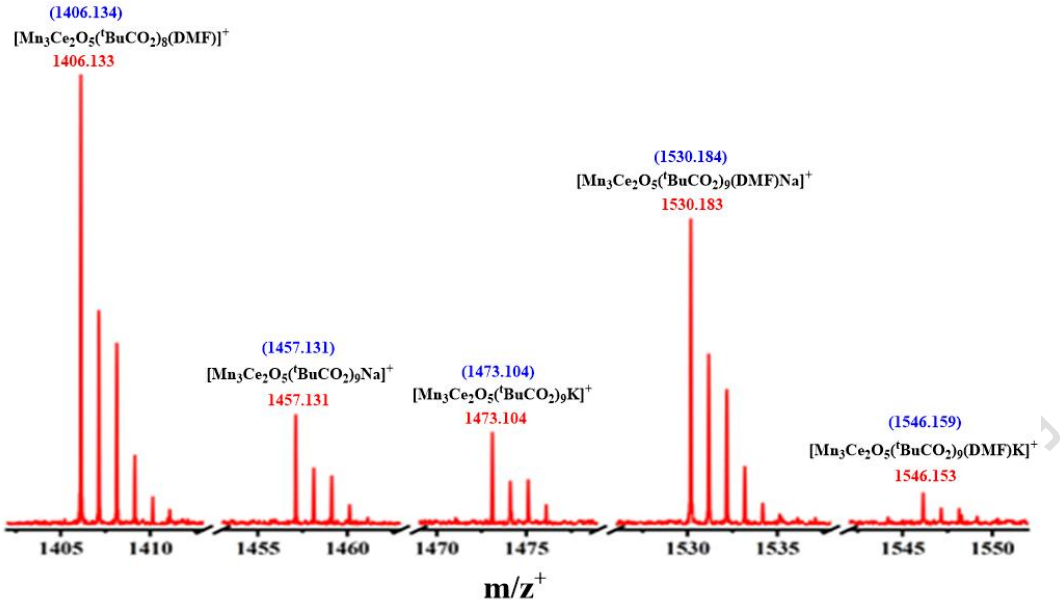


图 1、簇合物的 FT-ICR-ESI-MS 测试全谱[3]

高分辨质谱（图 1）分析表明，该团簇在有机溶剂中可以与中性配体和 Na^+、K^+形成一系列的复合物，通过其精确质量数精准鉴定出复合物中团簇与中性配体的比值，证实该团簇在溶液中的存在形式。

为了进一步表征水裂解催化过程中 O-O 键形成的机理，在仿生 $Mn_4Ce_2O_5^-$ 簇合物溶液中加入 $H_2{}^{18}O$，通过高分辨质谱跟踪该簇合物中的 O 原子与 ^{18}O 的同位素交换，测试结果如图 2 所示。

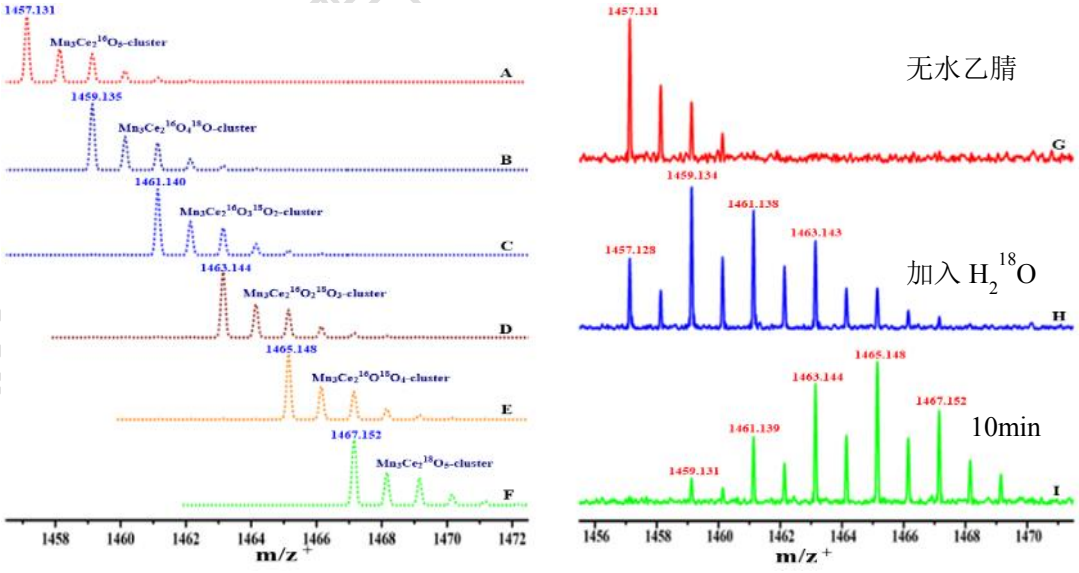


图 2、水裂解催化过程中 $Mn_4Ce_2O_5^-$ 簇合物与 $H_2{}^{18}O$ 的同位素交换质谱图

高分辨质谱结果表明，仿生簇合物中的氧化桥是可交换的，并且可以在乙腈

溶液中被 $H_2{}^{18}O$ 的同位素氧快速取代。同位素交换质谱表明在 OEC 的催化转换过程中，氧化桥可能直接参与 O-O 键的形成。这些结果也为人工光合作用中高效水分解催化剂的开发提供了重要的实验证据。

三、结论

利用 FT-ICR-ESI-MS 表征新型仿生 $Mn_4Ce_2O_5^-$ 簇合物，不仅为理解生物和人工 OEC 的构效关系和催化机理提供了化学证据，也为发展新型仿生水裂解催化剂提供了新线索。

参考文献：

1. Chen, C.; et al., A synthetic model for the oxygen-evolving complex in Sr^{2+}-containing photosystem II. *Chem. Commun.*, **2014,** *50*, 9263.
2. Zhang, C.; et al., A synthetic Mn_4Ca-cluster mimicking the oxygen-evolving center of photosynthesis. *Science*, **2015,** *348*, 690.
3. Chen, Y.; et al., Synthetic $Mn_3Ce_2O_5$-Cluster Mimicking the Structure and Function of the Oxygen-Evolving Center in Photosynthesis. *ChemSusChem.*, **2024**, 17, e202401031.
4. Chen, C.; et al., Artificial Mn_4SrO_4-Cluster Mimicking the Structural Changes of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *J. Am. Chem. Soc.,***2025***, 147,* 41012.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

化学所 800 兆液体核磁谱仪的应用案例

▶王立霞 向俊锋

(怀柔研究中心核磁共振系统 Email: wlx8825@iccas.ac.cn)

化学所 800 兆液体核磁谱仪是国内首台针对化学体系进行专门选配与优化的核磁共振设备。自投入运行以来，凭借其卓越的硬件性能与前沿技术优势，该设备持续为我所及相关合作单位的科研工作提供关键支撑。该谱仪融合了超高场磁体（18.8 T）与超低温探头（采用氦气将检测线圈冷却至 20 K）两项核心硬件优势，从而具备极高的灵敏度与分辨率——其中碳核灵敏度指标位居国内首位。这一特性使其能够精准捕捉分子结构的细微特征与动态变化，尤其在复杂有机化合物的结构解析、反应机理追踪等领域表现出独特价值，已有力推动多项重要课题的进展。

为促进内部经验交流与技术共享，我们特整理 2025 年度三类典型应用案例，供所内科研人员参考：

案例一：高分子材料的微观结构分析

国科大王洋团队与化学所刘国明团队合作，设计并合成了一类新型烯烃嵌段共聚物[1]。该材料由结晶性“硬段”与无定形“软段”交替构成，通过调节α-烯烃单体的共聚比例，可精确调控软、硬链段的结晶行为与材料性能。在高温条件下，高分子链运动加剧，核磁信号易发生展宽，对谱仪的分辨率与灵敏度提出极高要求。在 800 兆液体核磁谱仪的支撑下，在 373/393 K 高温下成功获取了高质量的氢谱、碳谱、及 ^{1}H-^{13}C HSQC/HMBC 等多维核磁数据(图 1)，清晰捕捉并确认了特征性的 ESE（乙烯–苯乙烯–乙烯）三单元组序列结构单元。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

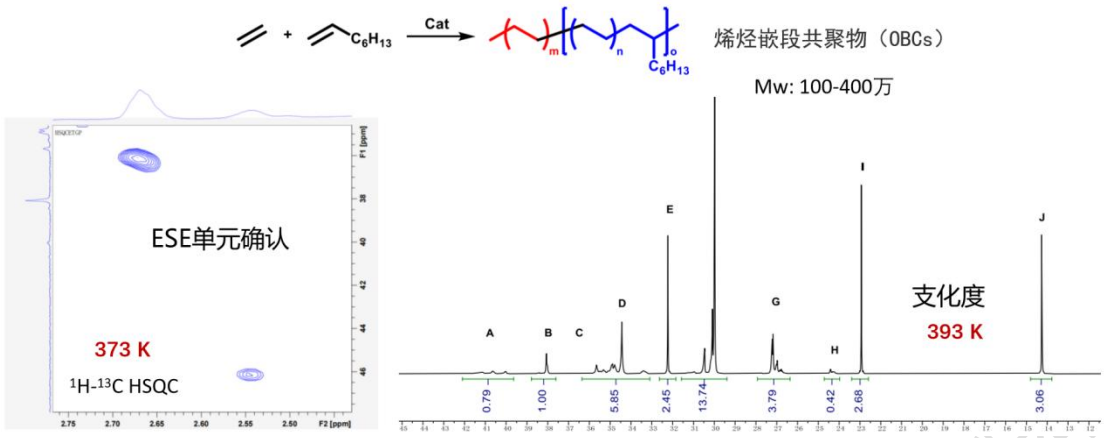


图 1、烯烃嵌段共聚物的核磁表征

案例二：复杂有机分子结构的精准确证

化学所王其强研究员团队合成一类新型缺电子分子笼时[2]，面临复杂的结构解析挑战。该类分子使用传统核磁方法如 HMBC，常伴随信号繁杂与解析不确定性的问题。基于该 800 兆液体核磁谱仪对 ^{13}C 核突出的检测性能，我们建立了 ADEQUATE-1,1 实验方法。该技术能直接、灵敏捕获 ^{13}C-^{13}C 耦合信号，精准解析 C-C-H 两键连接关系。结合常规 HSQC 技术，可系统获取分子中 C-H（一键）、C-C-H（两键）的准确连接信息，从而绘制出清晰的二维碳骨架图谱（图 2）。在该类缺电子分子笼的结构解析中，ADEQUATE-1,1 技术成功指认了传统 HMBC 难以明确的远程 C-C 连接信息，显著提高了指认的准确性与效率。

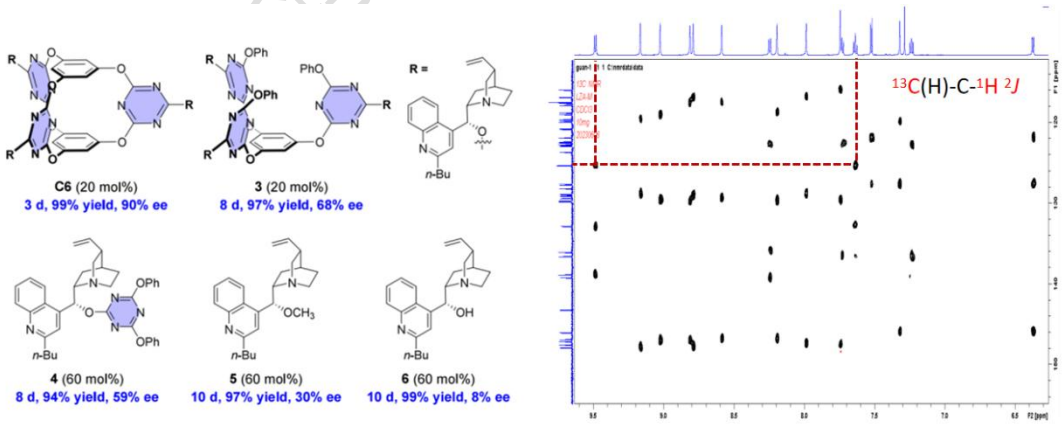


图 2、 ADEQUATE-1,1 技术的应用案例

案例三：动态化学过程与分子交换原位表征

动态化学过程与分子交换的原位表征需要能够捕捉瞬时、低浓度中间体的技

术。我们利用 800 兆液体核磁谱仪，发展并优化了化学交换饱和转移（CEST）技术。该技术通过对特定化学状态的信号进行选择性饱和，利用化学交换将饱和效应转移至其他状态，从而显著放大低浓度、瞬态物种的检测信号[3,4]。一个典型案例是脯氨酸催化的烯胺形成反应[5]。在该反应中，通过饱和 9 ppm 附近的共振信号并监测恶唑烷酮峰强度，在 250 K 下观察到 *exo*-恶唑烷酮峰强度下降，证实了亚胺离子中间体的存在及其与 *exo*-恶唑烷酮之间的化学交换。由于该中间体浓度极低，传统核磁方法（包括 EXSY）难以检测，而 CEST 技术则首次实现了对该反应路径中亚胺离子中间体的原位观测，为反应机理研究提供了关键依据。

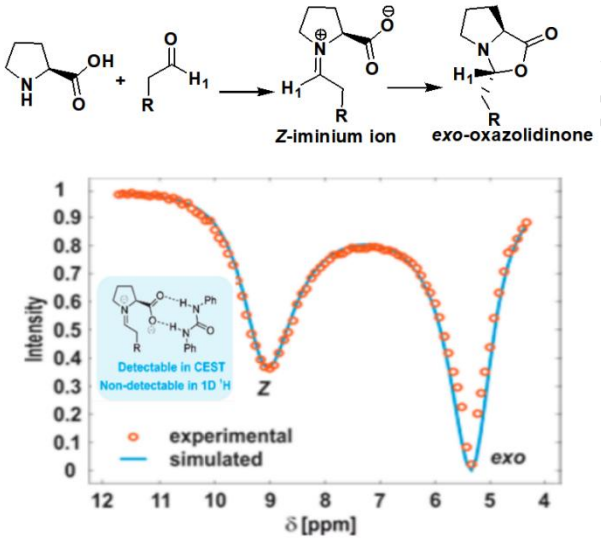


图 3、CEST 技术的应用案例

除前述典型案例外，该谱仪在杂核检测方面的功能也得到进一步拓展。凭借其宽带多核检测能力，谱仪能够覆盖从^{1}H、^{13}C 到多种化学重要磁性核在内的广泛范围（见表 1）。目前该谱仪已成功开展包括 ^{7}Li（电池材料[6]）、^{11}B（电池材料与催化化学[7]）、^{19}F（含氟药物与材料[8]）、^{29}Si（硅基材料[9]）、^{31}P（磷化学与生物分子[10]）、^{125}Te（金属簇化合物[11]）、^{129}Xe（多孔材料与生物成像探针[12]）等多种磁性核研究，为能源化学、药物设计、材料科学等交叉领域的探索提供了坚实的技术支撑。

表 1.800 兆赫兹液体核磁谱仪可检测的磁性核

800MHz核磁谱仪覆盖的磁性核范围							
^{1}H	^{2}H	^{6}Li	^{7}Li	^{9}Be	^{10}B	^{11}B	^{13}C
^{15}N	^{19}F	^{23}Na	^{27}Al	^{29}Si	^{31}P	^{45}Sc	^{51}V
^{55}Mn	^{59}Co	^{63}Cu	^{65}Cu	^{69}Ga	^{71}Ga	^{77}Se	^{79}Br
^{81}Br	^{87}Rb	^{93}Nb	^{99}Tc	^{111}Cd	^{113}Cd	^{113}In	^{115}In
^{115}Sn	^{117}Sn	^{119}Sn	^{121}Sb	^{123}Sb	^{123}Te	^{125}Te	^{127}I
^{129}Xe	^{133}Cs	^{137}Ba					

2025 年是 800 兆液体核磁谱仪投入运行的第二年。本年度，我们坚持“稳定运行、聚焦优势技术”的宗旨，持续保障设备高效运转，支持所内用户数量稳步增长，并取得了多项具有显示度的科研支撑成果。未来，我们将继续深化该谱仪的技术能力与应用边界，致力于发展新型的核磁方法、强化原位动态表征、丰富杂核检测体系，努力为复杂化学体系的研究提供更深层次、更精准的技术支撑。我们将持续努力，全力为化学所的前沿科研突破提供坚实保障。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

参考文献：

1. Lu, L.F., et al., Single Catalyst with Dynamic Ligands Enabled Synthesis of OleffnBlock Copolymers. *J. Am. Chem. Soc*., **2025**, *147*, 13405.

2. Yue, M.S., et al., Cooperative Anion-π Catalysis with Chiral Molecular Cages towardEnantioselective Desymmetrization of Anhydrides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, *147*, 2303.

3. Wang, L.X., et al., Kinetic Characterization of A Slow Chemical Exchange between Two Sites in *N,N*-Dimethylacetylamide by CEST NMR Spectroscopy. *Chin. Chem. Lett.*, **2022**, *33*, 4335.

4. Wang, L.X., et al., Chemical Exchange Saturation Transfer NMR: An Analytical Tool and Its Applications. *Mag. Reson. Lett.* doi.org/10.1016/j.mrl.,2025.200255.

5. Lokesh, N., et al., Chemical Exchange Saturation Transfer in Chemical Reactions: A Mechanistic Tool for NMR Detection and Characterization of Transient Intermediates, J. *Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 1855.

6. You, Q., et al., Decoding the Competing Effects of Dynamic Solvation Structures on Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Battery Electrolytes via Machine Learning. *J. Am. Chem. Soc*., **2025**, *147*, 14667.

7. Zhang, M., et al., General Base-Free Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction *via* Electrophilic Substitution Transmetalation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2025**, *64*, e202512496.

8. Wang, C., et al., Trifluoromethylation of Alkylelectrophiles with ^{11}C- or ^{18}F-labeled fluoroform for PET applications. *Science* ,**2025**, 1278.

9. Kelly, N.L., et al., Exploiting *in situ* NMR spectroscopy to understand non-traditional methods for zeolite synthesis. *Chem. Sci.,* **2025**, *16*, 4245.

10. Sung, G.K., et al., Phosphorus-Ligand Redox Cooperative Catalysis: Unraveling Four-Electron Dioxygen Reduction Pathways and Reactive Intermediates. *J. Am. Chem. Soc*., **2024**, *146*, 11440.

11. Ding, Y.S., et al., Atomically precise semiconductor clusters of rare-earth tellurides. *Nature Synth.*, **2024**, *3*, 655.

12. Nie, S.X., et al., Xenon Induces Its Own Preferred Heterochiral Host from Exclusive Homochiral Assembly. *J. Am. Chem. Soc*., **2022**, *144*, 22884.

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

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！

橙花精油组分的定性定量分析

► 王振鹏 赵镇文

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

在植物精油领域，橙花精油[1]作为一种具有独特理化性质与广泛应用价值的天然产物而备受关注。它隶属于芸香科柑橘属植物所衍生的精油范畴，其主要产地集中在摩洛哥和意大利等地理气候条件适宜的地区。

由于橙花精油的获取过程较为复杂，需要耗费大量人力物力，加之其原料稀缺，使得橙花精油的价格相对昂贵。为了攫取高额利润促使一些不法商家，采用不正当手段生产混掺或合成的橙花精油产品。这些伪劣产品主要以合成沉香醇（赋予花香特征）和柠檬烯（带来果香气息）为主要成分进行仿制，虽然在香味方面一定程度的模仿了天然橙花精油，但由于缺乏天然精油中众多复杂成分的协同作用，其品质和功效与天然橙花精油存在较大差距，且价格相对低廉许多。

为了能有效鉴别橙花精油产品的真伪，尝试利用气相色谱质谱联用仪对正品橙花精油进行定性定量分析，确定其中各组分的化学结构及含量，把这些信息确定后，可以作为鉴定橙花精油真伪的一个参照标准。

一、实验过程

1.1 样品制备

用色谱纯乙醇把橙花精油和苦橙花精油样品配置成 1:100（V/V）待测溶液。

1.2 仪器型号和参数

使用日本岛津公司 GCMS-QP2010 ultra 型气质联用仪，配备 DB-5 ms 石英毛细管色谱柱，氦气作载气（纯度：99.999%），进样口温度：250 ℃，接口温度：250 ℃，离子源温度：200 ℃，电子轰击能量：70eV。色谱升温过程：50 ℃保持 2 min，以 20 ℃/min 的升温速度升到 250 ℃，保持 20 min。进样量为 1 uL。

2. 数据处理

对检测得到的色谱图中色谱峰进行积分处理，并对每个色谱峰物质做出的质谱图进行标准质谱图库（NIST 14）检索，所得结果如表-1 和表-2 所列。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

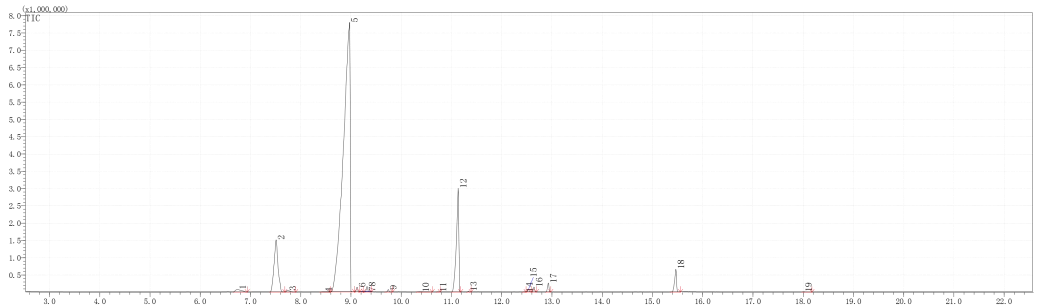


图 1、橙花精油 TIC 图

表 1、橙花精油组分及含量

峰号	保留时间	峰面积%	物质名称	CAS 编号
1	6.74	0.75	beta.-Myrcene	123 - 35 - 3
2	7.509	8.58	Limonene	138 - 86 - 3
3	7.739	0.32	3-Octen-5-yne	28935 - 76 - 4
4	8.459	0.07	(3E)-2,7-Dimethyl-3-octen-5-yne	55956 - 33 - 7
5	8.971	75.71	Linalool	78 - 70 - 6
6	9.121	0.26	Phenylethyl Alcohol	60-12-8
7	9.204	0.07	3-Octen-5-yne, 2,7-dimethyl-	55956 - 33 - 7
8	9.321	0.36	Ethanone, 1-(1,2,2,3-tetramethylcyclopentyl)-, (1R-cis)-	59642 - 07 - 8
9	9.742	0.17	Acetic acid, phenylmethyl ester	140 - 11 - 4
10	10.384	0.09	Terpineol	
11	10.73	0.02	Dihydrocarvyl acetate	20777 - 49 - 5
12	11.134	10.6	Linalyl acetate	115 - 95 - 7
13	11.336	0.06	1,7-Nonadien-4-ol, 4,8-dimethyl-	17920 - 92 - 2
14	12.451	0.02	2-(2-Methylenecyclopropyl)-2-propanol	126434 - 25 - 1
15	12.532	0.18	Benzoic acid, 2-(formylamino)-, methyl ester	41270 - 80 - 8
16	12.643	0.29	2,6-Octadien-1-ol, 2,7-dimethyl-	22410 - 74 - 8
17	12.928	0.57	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate, (Z)-	141 - 12 - 8
18	15.467	1.85	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	7212 - 44 - 4
19	18.008	0.03	Benzyl Benzoate $$ Benzoic acid, phenylmethyl ester	120 - 51 - 4

版权为中国科学院化学所分析测试中心所有

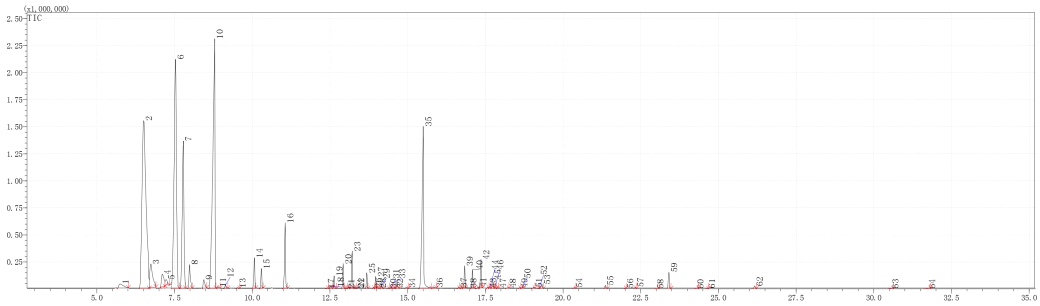


图 2、苦橙花精油 TIC 图。

表 2、苦橙花精油组分及含量

峰号	保留时间	峰面积%	物质名称	CAS 编号
1	5.751	0.67	(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	7785 - 26 - 4
2	6.508	24.07	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	3387 - 41 - 5
3	6.737	2.34	beta.-Myrcene	123 - 35 - 3
4	7.108	1.13	(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	7785 - 26 - 4
5	7.228	0.32	Cyclohexene, 4-methyl-3-(1-methylethylidene)-	99805 - 90 - 0
6	7.53	19.21	Limonene	138 - 86 - 3
7	7.781	8.82	1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-	502 - 99 - 8
8	7.982	1.24	alpha.-Pinene	80 - 56 - 8
9	8.441	0.51	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	586 - 62 - 9
10	8.79	19.53	Linalool	78 - 70 - 6
11	8.894	0.05	2-Pentene, 4-bromo-	1809 - 26 - 3
12	9.133	0.14	3-Octen-5-yne, 2,7-dimethyl-, (E)-	55956 - 33 - 7
13	9.519	0.04	cis-7-Decen-1-al	21661 - 97 - 2
14	10.07	1.15	Terpinen-4-ol	562 - 74 - 3
15	10.295	0.71	Terpineol	
16	11.059	2.41	Linalyl acetate	115 - 95 - 7
17	12.367	0.02	1,5-Heptadiene, 2,5-dimethyl-3-methylene-	74663 - 83 - 5
18	12.521	0.09	3H,4H-Pyrrolo[1,2-a]pyrazine	71257 - 37 - 9
19	12.636	0.39	2,6-Octadien-1-ol, 2,7-dimethyl-	22410 - 74 - 8
20	12.925	0.76	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	16409 - 44 - 2
21	13.023	0.01	Copaene	3856 - 25 - 5
22	13.088	0.04	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-	110823 - 68 - 2
23	13.214	1.26	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-	110823 - 68 - 2
24	13.32	0.01	(Z,Z)-.alpha.-Farnesene	
25	13.686	0.49	cis-.alpha.-Bisabolene	29837 - 07 - 8
26	13.9	0.03	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)-	3879 - 26 - 3
27	13.974	0.34	1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-	77129 - 48 - 7

成为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

28	14.037	0.03	1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-	77129 - 48 - 7
29	14.165	0.13	cis-.alpha.-Bisabolene	29837 - 07 - 8
30	14.371	0.02	1,3-Bis-(2-cyclopropyl,2-methylcyclopropyl)-but-2-en-1-one	
31	14.464	0.03	1,3,6,10-Dodecatetraene, 3,7,11-trimethyl-, (Z,E)-	26560 - 14 - 5
32	14.586	0.02	Decane $$ n-Decane	124 - 18 - 5
33	14.659	0.26	.alpha.-Farnesene	502 - 61 - 4
34	14.976	0.06	1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-	77129 - 48 - 7
35	15.5	9.34	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	7212 - 44 - 4
36	15.867	0.08	1,2-Epoxy-5,9-cyclododecadiene	943 - 93 - 1
37	16.64	0.04	Undecane, 2-methyl-	7045 - 71 - 8
38	16.729	0.02	2-Tetradecyne	638 - 60 - 8
39	16.835	0.74	2-Tridecene, (Z)-	41446 - 59 - 7
40	17.086	0.6	1,4-Nonadiene, 2-nitro-, (Z)-	80255 - 19 - 2
41	17.272	0.06	Dodecanal	112 - 54 - 9
42	17.36	0.91	Geraniol	106 - 24 - 1
43	17.576	0.03	2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	502 - 67 - 0
44	17.648	0.05	3-Tetradecene, (Z)-	41446 - 67 - 7
45	17.736	0.29	2,6,9,11-Dodecatetraenal, 2,6,10-trimethyl-, (E,E,E)-	17909 - 77 - 2
46	17.812	0.06	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	106 - 25 - 2
47	17.901	0.02	Tetradecane, 1-iodo-	19218 - 94 - 1
48	18.215	0.02	Octadecane, 1-(ethenyloxy)-	930 - 02 - 9
49	18.594	0.02	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	16409 - 44 - 2
50	18.692	0.03	Carbonic acid, hexyl prop-1-en-2-yl ester	
51	19.056	0.05	2-Tridecene, (Z)-	41446 - 59 - 7
52	19.223	0.01	1,6,11-Dodecatriene, (Z)-	96165 - 45 - 6
53	19.322	0.19	Undecane, 2-methyl-	7045 - 71 - 8
54	20.358	0.04	Octadecane, 1-(ethenyloxy)-	930 - 02 - 9
55	21.36	0.1	Tridecane $$ n-Tridecane	629 - 50 - 5
56	21.997	0.01	3-Tetradecyn-1-ol	55182 - 74 - 6
57	22.323	0.05	Dodecane	112 - 40 - 3
58	22.968	0.01	Octane, 2-methyl-	3221 - 61 - 2
59	23.406	0.65	Tricosane, 2-methyl-	1928 - 30 - 9
60	24.259	0.01	Nonane, 3,7-dimethyl-	17302 - 32 - 8
61	24.628	0.03	Dodecane, 2-methyl-	1560 - 97 - 0
62	26.166	0.15	Tricosane, 2-methyl-	1928 - 30 - 9
63	30.531	0.03	Undecane, 3,7-dimethyl-	17301 - 29 - 0
64	31.714	0.03	Formic acid, 2-ethylhexyl ester	

三、结论

从分析数据来看，橙花和苦橙花作为原料萃取得到的精油在组成成分上存在显著差异。橙花精油中主要含有 19 种物质，苦橙花精油中主要含有 64 种物质，

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

这些物质主要是包括单萜醇类（如：沉香醇、橙花醇）、单萜烯类（以右旋柠檬烯为代表）、酯类（如：乙酸沉香酯）以及倍半萜酮类（如：素馨酮）等。这些成分在香气形成、生物活性和发挥性等方面都扮演着重要角色。除上述这些主要成分外，精油中还含有很多微量成分，它们决定着精油独特的气味特征。这些微量成分虽然含量相对较少，但却对精油的香气轮廓起着至关重要的调控作用，它们相互协同或拮抗，共同塑造了清新、优雅且富有层次感的气味。

对橙花精油成分的深入研究，不仅有助于我们对真伪橙花精油的鉴别，也为进一步开发利用橙花精油在香料、化妆品、医药等领域的应用提供了重要的理论依据。

参考文献：

1. 喻晖清，张亚丽，房媛，耿梦云，李楠楠，橙花中化学成分及药理作用研究进展，*生物化工*，2025 年，第 2 期,231-233

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

冷冻扫描电镜技术应用案例

▶岳纪玲 于润波 梁丽荣 关 波

((分析测试中心电镜组 Email: yuejiling@iccas.ac.cn, guanbo@iccas.ac.cn)

一、概述

常规扫描电子电镜（Scanning electron microscopy，SEM）无法观察含水样品，部分样品在干燥过程中易发生结构变化，导致无法获得样品的真实结构。环境扫描电子显微镜（ Environmental Scanning Electron Microscope，ESEM）可观察含水样品，但受其真空度限制，难以获得高分辨率图像。相较于传统 SEM 和 ESEM，冷冻扫描电镜（Cryo-SEM）结合了冷冻制样技术与 SEM 的高分辨成像能力，能够对含水或其他溶剂的样品进行高分辨成像和成分分析。

利用 Cryo-SEM 技术，样品在制样、传输和观察整个过程中都保持在低温状态，最大程度保留样品在液相中的原始结构。Cryo-SEM 技术在表征液相样品（如乳液、水凝胶、有机组装体等）及电子束敏感样品中具有独特的优势：（1）快速冷冻技术（如液氮泥冷冻、高压冷冻）将样品固定在溶剂玻璃态的冰层中，避免了水或溶剂结晶对样品内部结构的损坏，以及样品干燥过程引起的结构变化。（2）快速冷冻后的样品在转移及观察过程保持在低温状态（-170 ℃以下），低温条件能够尽可能保持液相样品的微观结构，并显著减少电子束对样品的损伤。同时配合二次电子探测器及能谱仪，可同时获得样品表面的高分辨率形貌图像及成分信息。

分析测试中心电镜组的聚焦离子束-电子束双束电子显微镜（型号：Helios G3 CX，Thermo Fisher Scientific）配备了冷冻传输系统（型号：PP3010T，Quorum）和能谱仪 EDS（型号：UltimMax 40 ，Oxford），实现了对液相和不耐辐照样品在低温冷冻条件下高分辨 SEM 观察、成分分析及离子束刻蚀。本文介绍该 Cryo-SEM 系统运行以来开展的典型应用实例。

二、仪器与系统组成

仪器装置组成与实验操作流程在第 11 期分析测试中心通讯[1]中已详细介绍，本文仅作简要概述。

2.1 仪器装置

如图 1 所示，冷冻传输系统主要包括： aQuilo 冷冻制备腔室、 Prepdek™ 工

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

作站、传输装置、电镜镜筒冷阱和冷台、涡轮分子泵抽气系统、自增压液氮罐等。

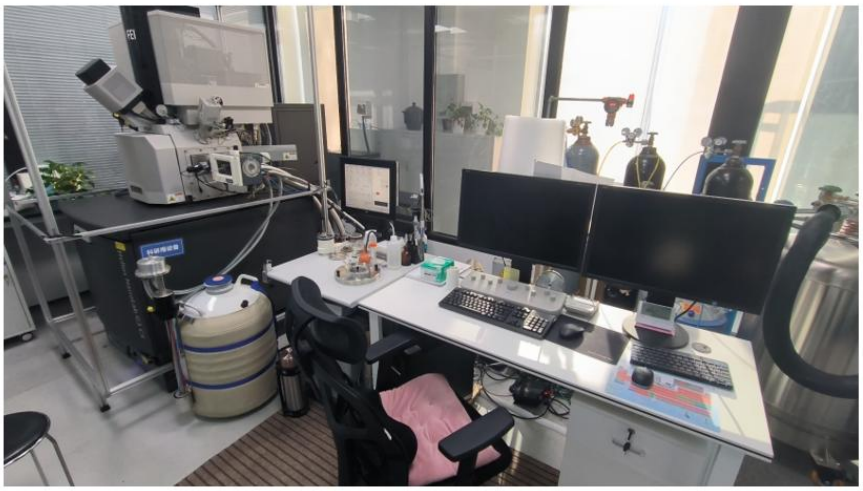


图 1、 双束电镜及冷冻传输系统装置图

2.2 实验操作方法

实验前需对扫描电镜样品室和制备腔室（转换仓）降温，降温完成后制备液氮泥，然后快速冷冻液相样品，迅速将预冷的样品转移到冷冻制备腔室之内，在冷冻状态下进行冷冻断裂、升华，镀膜溅射三个步骤，处理结束后将样品传入至双束电镜中的低温样品台上进行观察。

三、典型应用实例

该台 Cryo-SEM 系统已用于化学、生物、材料领域等多种液相、不耐电子束样品的研究，开展了黏稠样品、溶液、固液界面样品、电子束/空气敏感型固态样品、生物样品五大类样品的测试。以下分别介绍这五大类样品的典型应用实例。

3.1 黏稠样品

此类样品主要包括水凝胶、液晶、复合功能材料等典型粘稠样品。以水凝胶为例，水凝胶由于其较强的锁水能力，通过 Cryo-SEM 技术控制升华条件（如-90 ℃ 30 min），可有效去除凝胶网络中的游离水，清晰揭示其三维多孔网状结构。化学所电镜室利用 Cryo-SEM 技术已表征聚稀乙醇水凝胶[2] （图 2（a）所示）、牛血清白蛋白水凝胶[3] （图 2（b）所示）、磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯水凝胶[4] （图 2（c）所示）等多种类型水凝胶，从而为研究凝胶化机理及结—性能关系提供关键证据。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

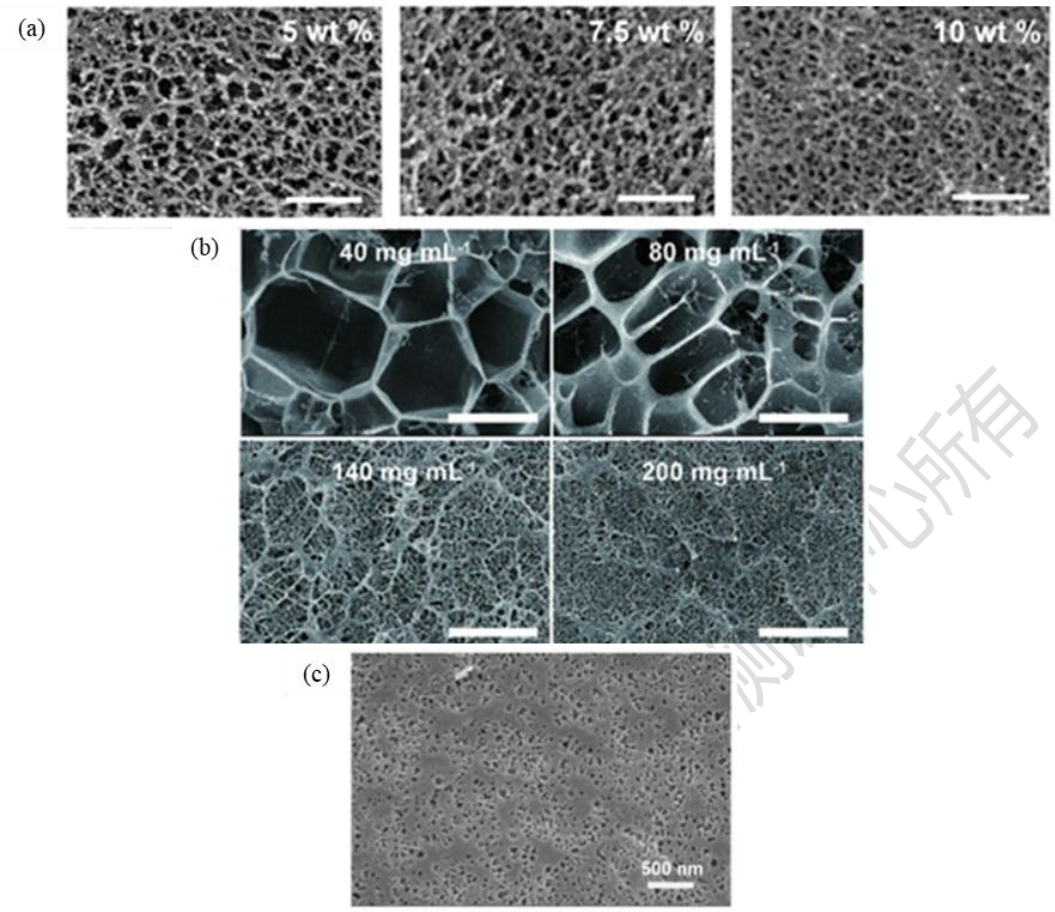


图 2、(a)不同浓度的聚乙烯醇水凝胶的 Cryo-SEM 图像[2] (b)牛血清白蛋白水凝胶 Cryo-SEM 下图像[3] (c)不同浓度的磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯水凝胶的 Cryo-SEM 图像[4]。图(a)和图 (b)的比例尺为 3μm。

3.2 溶液样品

此类溶液样品主要包括液相中的组装结构，乳液样品中的微球、纳米颗粒等，Cryo-SEM 能获取其在溶液中原始状态。

3.2.1 新型环状胶体颗粒 Pickering 溶液

Li 等[5]通过使用环状二氧化硅胶体颗粒作为乳化剂，制备了具有低界面覆盖率但稳定性增强的新型 Pickering 乳液体系，该乳液体系在界面催化和表面增强拉曼散射检测中具有优越的性能。

在该研究中，Cryo-SEM 用于直接观察和验证功能化的纳米二氧化硅颗粒在 Pickering 乳液界面的精确位置和分布形态。通过 Cryo-SEM 可证明该环状胶体颗粒在乳液液滴表面形成了六方密堆积的单层结构（图 3（a）），这与图 3（b）所

示光学显微镜的结果一致，这种有序的结构是该乳液具有高稳定性的基础。同时，Cryo-SEM 也观察到该环状胶体颗粒具有明显的空腔结构，其空腔结构使每个乳液液滴具有超过 80%的自由油水界面。此外，Cryo-SEM 图像还清晰显示催化用的钯纳米颗粒（Pd NPs）主要分布在环状胶体颗粒的空腔以及环与环之间的空隙中，如图 3（c-e）所示，Pd NPs 能够占据环状胶体颗粒留下的自由界面，以此从结构上揭示了环状胶体颗粒能够提供更大的接触界面用于催化反应的机理。

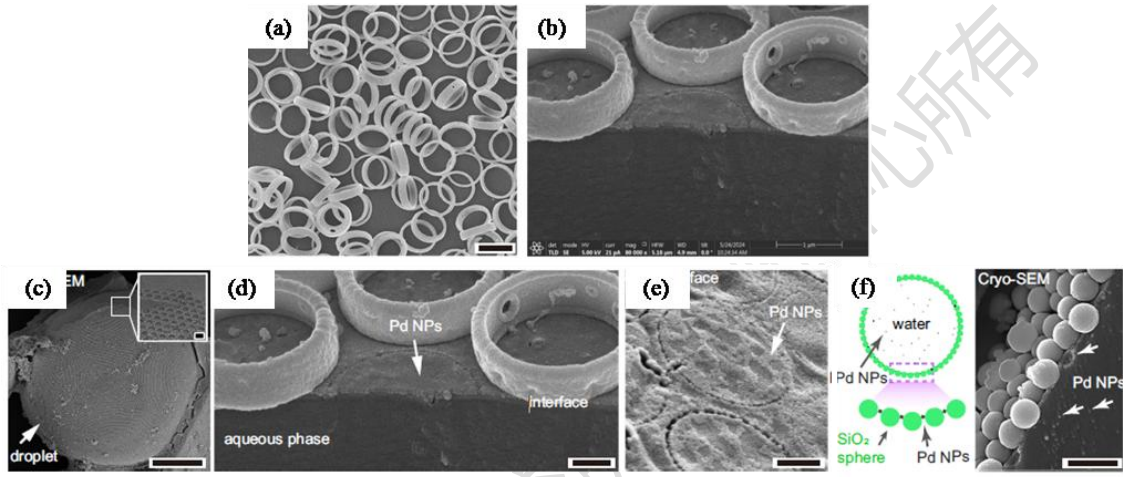


图 3、（a）Cryo-SEM 下乳液液滴表面图像(b) 光学显微镜下乳液液滴单层环状纳米颗粒覆盖图像(c-e) Cryo-SEM 下负载的 Pd NPs 在环状胶体颗粒的位置。比例尺：50 μm(a)，2 μm（a 中插图），20 μm(b)，500 nm(c，d，e)。

3.2.2 多级组装体结构的新型表面活性剂

Wang 等[6]设计并构建了一系列由 2-甲酰基苯磺酸钠（FBSS）和直链胺（C_nNH_2, n=6, 7, 8, 10, 12）通过动态亚胺键（-CH=N-）反应形成的表面活性剂。其中，FBSS-C_8NH_2 在清洗效率、适用范围、循环使用中表现出优异性能。研究人员通过使用 Cryo-SEM 揭示了 FBSS- C_8NH_2 组装体的形貌，如图 4（a）所示，其为直径 100 nm 到 1.5 μm 不等的球形聚集体，并阐明了该表面活性剂的多级组装路径：由直径 20 nm 左右的小囊泡进一步聚集形成网络结构，网络结构卷曲闭合后最终形成中空的网状壳层球。这种独特的多级组装结构能够富集在油污周围并包覆油滴，促进了乳化过程。Cryo-SEM 的观察数据为阐释该多级组装体结构的工作机理提供了直接证据。

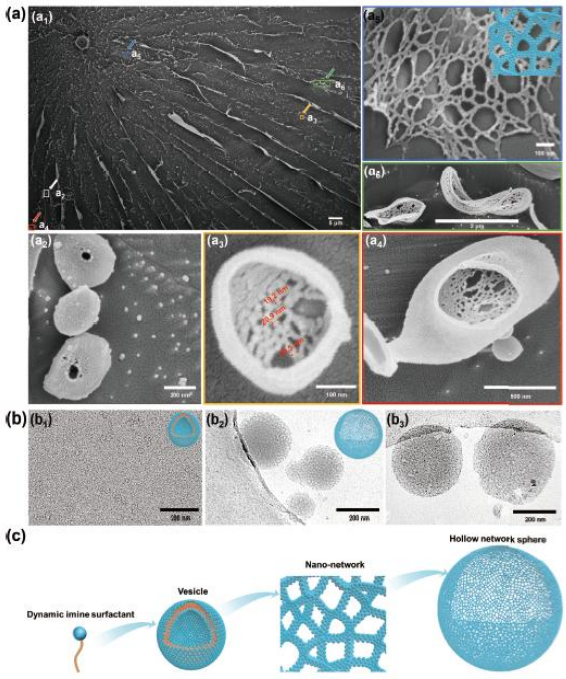


图 4、FBSS- C_8NH_2 形成聚集体的组装机制：（a） FBSS- C_8NH_2 溶液（15.0 mM）中形成聚集体的 Cryo-SEM 图像（a_1-a_6）（b）冷冻透射电镜图像（b_1-b_4）（c）囊泡、网络及空心网状球的形成过程示意图

3.2.3 受限气泡群中两亲性分子的手性分级组装

Gao 等[7]系统地研究了微柱模板稳定的受限气泡阵列与其他几种受限条件（如无气泡、平板、液滴）下手性两亲分子的蒸发诱导组装行为。研究发现，气泡场景下的组装能产生独特的分形形态，并展现出最高水平的手性程度、有序性和取向一致性。这种独特的促进作用归因于两个关键因素：界面效应和受限空间形成动力学。研究人员通过 Cryo-SEM 技术证实了在气泡边界处存在与最终分形组装体中相似的纳米粒子，而体相中则缺乏这些特征纳米粒子，如图 5（b）所示，这一观察结果直接证明了组装开始于气/水界面，纳米粒子是在界面处形成的，此结果是支撑该研究界面组装机理的关键数据。此外，通过对比气泡场景（界面机制主导）和无气泡场景（体相预组装主导）的 Cryo-SEM 结果以及其他表征，研究人员将界面组装和体相组装机制区分开来，如图 5（c）-（e）所示。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

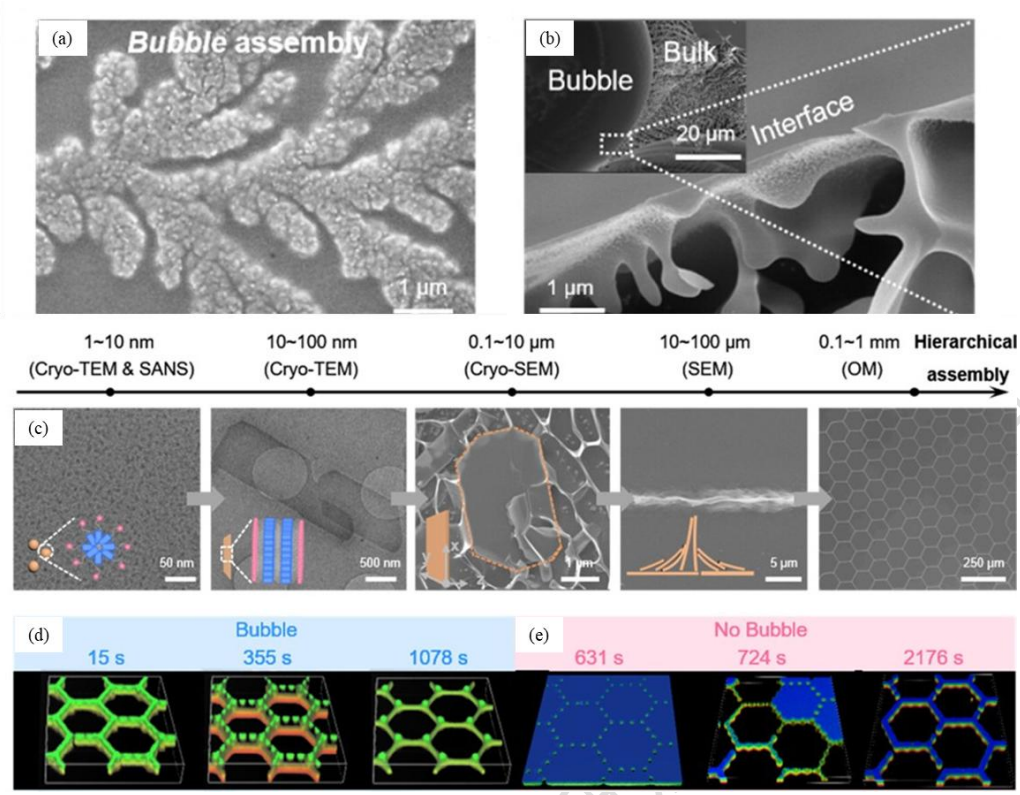


图 5、（a）气泡组装体的 SEM 图像（b）含有气泡的手性两亲分子组装墨水的 Cryo-SEM 图像（c）在第三种调控条件下气泡组装的分级组装过程，包括中间聚集体和最终形貌的 Cryo-TEM、Cryo-SEM、SEM 和光学显微镜图像（d）气泡场景和(e)无气泡场景中液桥实时演化的共聚焦荧光显微镜图像

3.3 固液界面样品

固液界面样品主要包括固液界面的表面活性剂液滴、高分子溶液、电解质溶液等，Cryo-SEM 能够原位固定界面结构，避免液体干燥造成的界面塌陷或重组，从而获取固液界面处的微观结构、元素分布、反应过程等信息。

3.3.1 用于植物叶片抗菌的全生物基凝聚层

Wang 等[8]开发了一种基于表面活性素（Surfactin，SFT）和木质素（sodium lignosulfonate，SL）的全生物基凝聚层，该凝聚层是兼具高效载药能力和广谱抗真菌活性的环保型农药，用于防治植物叶片病原菌。此外，该农药高速冲击到植物叶片后可稳定沉积在叶片表面，减少农药飘移损失。Cryo-SEM 在此研究中发挥了关键作用，直观观察到 SFT/SL/氯化钠凝聚液滴的微观形貌，液滴内部具有纳米尺度的网络状结构，如图 6（a）所示，该数据直接证实了凝聚层并非均相溶

液，而是具有海绵状或网络状的复杂内部结构。这种结构为其高效包封不同极性农药分子提供了丰富的微环境（亲水界面和疏水微区），是解释其高包封效率的重要结构基础。此外，研究人员还借助 Cryo-SEM 观察了凝聚液滴沉积在植物叶片后的界面精细结构。结果显示凝聚液的网络状结构能够与叶片表面的鞭毛状微观结构发生缠绕和结合，并在叶片表面形成一层薄薄的液体覆盖层（图 6（b）），该结果为阐释该凝聚层优异沉积能力的机理提供了不可或缺的证据。

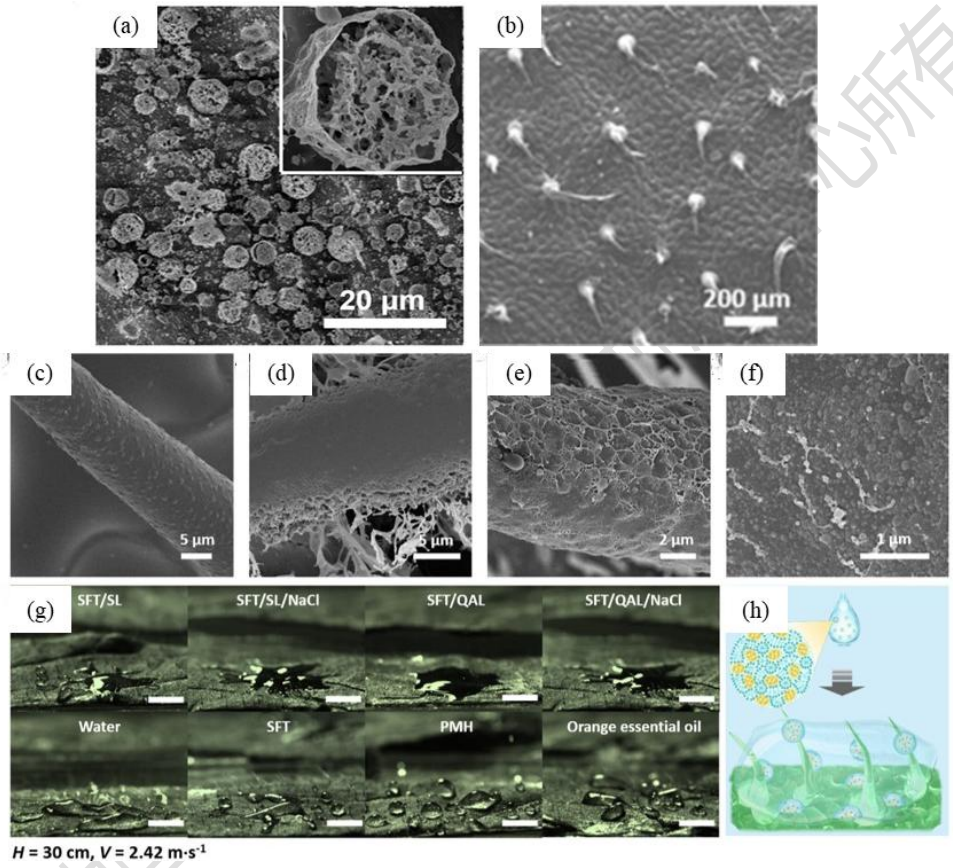


图 6、（a）SFT/木质素/NaCl 凝聚层液滴的 Cryo-SEM 图像；SFT/SL 和 SFT/SL/NaCl 凝聚层液滴在番茄叶片上的沉积行为（b） 疏水番茄叶片表面形态的 SEM 图像（c）番茄叶片鞭毛状结构的 Cryo-SEM 图像（d-e）SFT/SL 凝聚层结合并缠绕鞭毛状结构 Cryo-SEM 图像（f）SFT/SL 凝聚层的薄液层覆盖在番茄叶片表面的 Cryo-SEM 图像(g)凝聚层液滴从 30 cm 高处滴落到番茄叶片上时的沉积状态；比例尺为 2 mm（h）凝聚层网络与番茄叶片微/纳米结构相互缠绕的示意图

3.3.2 高效包覆农药的三聚表面活性剂凝聚相体系

Liu 等[9] 通过合成具有亚胺动态共价键的三聚表面活性剂，使其在水溶液中自组装形成具有纳米网络结构的凝聚相。该凝聚层用于精准控制农药应用的高效封装、完全沉积、牢固持留、可控释放的全过程，从而提高了农药利用率并促进可持续农业发展。研究人员利用 Cryo-SEM 技术确定了无论是否包封农药，凝聚相内部均存在随机缠绕的纳米纤维网络结构，（图 7（d-e）），这一结果直接证实了凝聚相具有复杂的多孔微观结构，为其同时高效包封不同极性农药分子提供了结构基础。同时，研究人员通过 Cryo-SEM 观察了液滴冲击后与叶片表面的界面情况，发现凝聚相的纳米网络与叶片表皮蜡质的纳米柱状结构发生了深刻的相互缠绕和钉扎（图 7（f）），从而阐明了凝聚相在超疏水植物表面的沉积与钉扎机制。

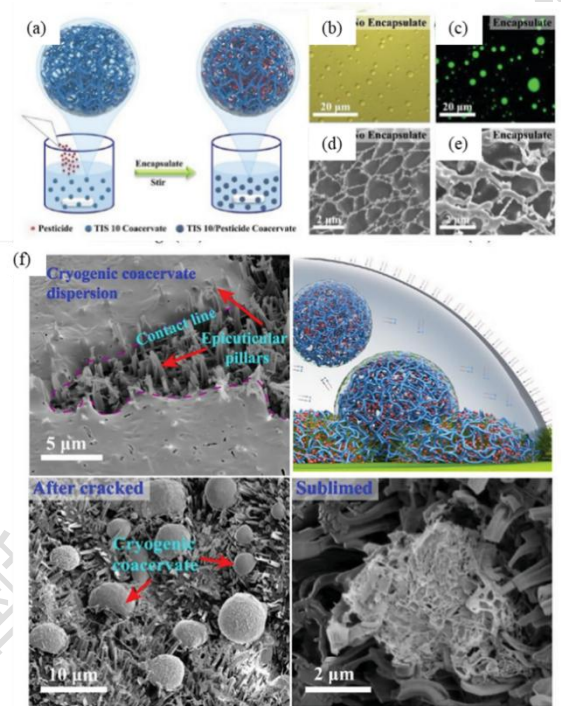


图 7、（a）TIS10 凝聚相溶液封装农药的示意图（b）光学显微镜图像（c）共聚焦激光扫描显微镜图像显示大量凝聚层微滴（d-e）5.0 mM TIS10 凝聚相（无论是否封装农药）具有纳米尺度的网络结构的 Cryo-SEM 图像（f） Cryo-SEM 图像展示了凝聚相液滴与卷心菜叶片表面的微/纳分级结构相互缠绕的状态；底部的两张图像是左上角图像的冷冻断裂状态；右上角的图像展示了其模型

3.4 不耐电子束损伤/空气敏感型固态样品

扫描电镜表征电池材料、钙钛矿等对电子束辐照敏感或空气敏感型样品时，

为减轻电子束损伤，通常采用低加速电压与低束流的操作模式，然而该模式仍会造成样品部分损伤，同时此操作模式会降低分辨率。化学所电镜室利用 Cryo-FIB-SEM 技术，通过低温制样，低温条件下对不耐电子束损伤/空气敏感型固态样品进行精确截面切割，同时在低温条件下对切割的截面进行高分辨成像，有效减少了电子束损伤及荷电效应，从而实现了此类材料的表面形貌观察。

Zhang 等[10]通过真空紫外光诱导的液相聚合物衍生法，在商业聚乙烯隔膜表面构建超薄（仅 20 nm 厚）、Si-C 共价键锚定的 SiO_x 涂层，从而使涂层与隔膜基底强效结合，以解决锂金属电池中锂枝晶生长问题，并提升了电池的安全性和循环寿命。然而由于电池隔膜材料不耐电子束，常规方法很难获取隔膜内部微观孔隙结构。研究人员应用 Cryo-FIB-SEM 技术，在低温下（＜-140℃）使用镓离子束对该电池隔膜进行的截面切割，暴露出其内部的孔隙结构，利用 SEM 成像对切割出的新鲜截面进行成像（观察条件：电压 5kV 束流 86pA），如图 8（a-h）所示。Cryo-FIB-SEM 技术在该锂金属电池隔膜的改性研究中发挥了关键作用，揭示了不同制备条件下超薄 SiOx 涂层对隔膜内部微观孔隙结构的影响，从而为优化工艺参数提供了数据支撑。

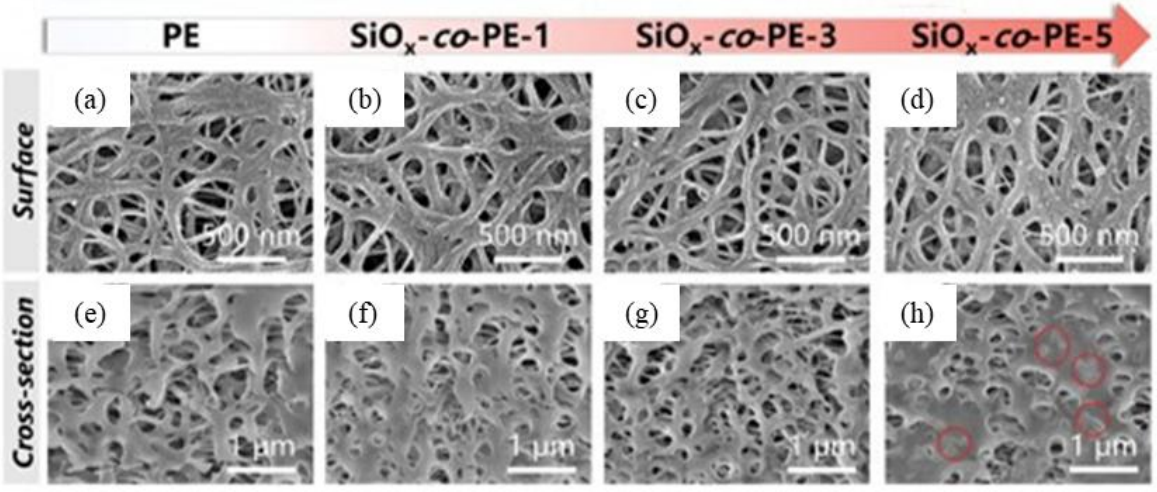


图 8、（a-d）Cryo-SEM 表面形貌图像（e-h） Cryo-FIB-SEM 切割出的截面图像（堵塞的孔隙已用红圈标出）

3.5 生物样品

Cryo-SEM 在生命科学研究中具有重要作用，可用于观察细胞、细菌、酵母、动植物组织等。Cryo-SEM 可最大限度保存生物样品的原始微观结构，实现生物

样品近天然的结构观察。

3.5.1 仿生自组装纳米结构

Li 等[11]设计了一对磷脂仿生的谷氨酸衍生物对映体（L/D-UG），通过动力学与热力学控制，使其分别自组装形成高曲率的囊泡和低曲率的二位纳米晶两种结构。研究发现，由 L-氨基酸构成的纤连蛋白在 L-UG 二维晶表面以半有序模式特异性吸附，该模式有效地促进了间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）的整合素β_1簇集，从而激活成骨分化信号通路。动物实验进一步证实，L-UG 二维晶是促进大鼠颅骨缺损修复的最有效材料。该工作首次在自组装体系中实现了手性与曲率的同步调控，并阐明了其在骨再生中的关键作用。在该研究中，冷冻电镜技术（Cryo-SEM 和 Cryo-TEM）作为重要表征手段，为上述研究提供了直接的形貌与结构证据，Cryo-TEM 揭示了 L/D-UG 分子由囊泡到二维晶的两步自组装机制（图 9（a-d）），并获得囊泡的直径与壁厚及二维晶的厚度及双层结构，直接观察到了纤连蛋白在 L-UG 二维晶表面的半有序吸附图案（图 9（c））。Cryo-SEM 进一步确认了二维纳米晶的形貌（图 9（e）），还验证了 L/D-UG 组装体与水凝胶基质复合后仍保持原有形貌（图 9（f）），同时进一步表征了 L-UG 组装体（囊泡与二维晶）能够紧密结合在细胞膜表面（图 9（g）），为理解材料与细胞相互作用提供了界面信息。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

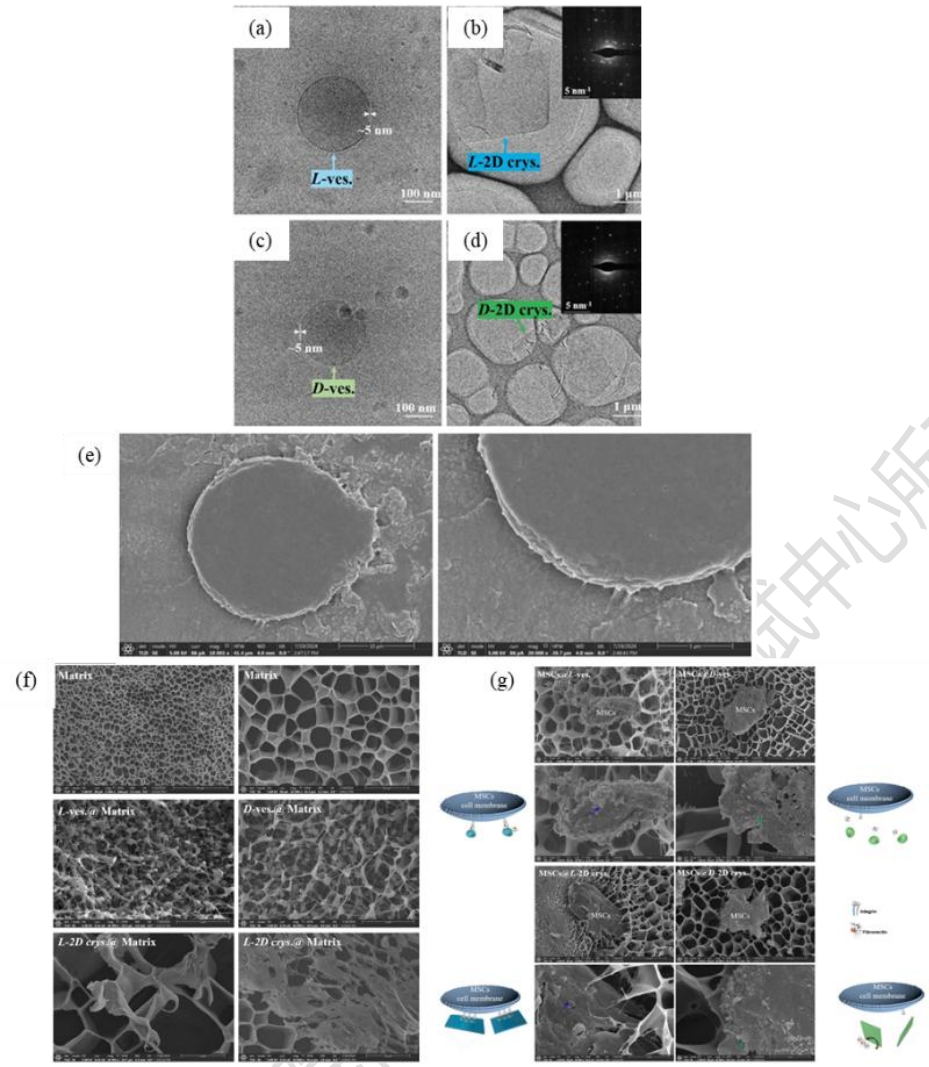


图 9、（a）和（c）分别为第一天自组装的 L-UG 和 D-UG 囊泡的 Cryo-TEM 图像（b）和（d）分别为第三天自组装的 L-UG 和 D-UG 二维晶体的 Cryo-TEM 图像（e）MSCs 的 Cryo-SEM 图像显示细胞表面光滑（f）Cryo-SEM 图像显示，掺杂于水凝胶基质中的 UG 组装体在与水凝胶混合后，囊泡和二维晶体的形貌均得以保持；由于 UG 带负电荷，研究人员选用了带负电荷的水凝胶基质以避免 UG 组装体在水凝胶上吸附，通过 Cryo-SEM 得到了验证（g）水凝胶基质中 MSCs 与 UG 组装体共培养的 Cryo-SEM 图像；样品制备过程中，研究人员将间充质干细胞与 UG 组装体混合，以实现其在细胞膜表面的最大化附着；结果显示 UG 组装体在细胞膜上的吸附情况。

3.5.2 耐热型冻干巧克力

Li[12]等通过创新性地结合乳化技术和冷冻干燥技术，开发出一种具有优异耐热性的冻干巧克力，不改变巧克力的基本配方，通过工艺流程改变其微观结构来

实现耐热性。Cryo-SEM 技术在揭示和验证冻干巧克力微观结构的形成机理中起到了关键作用，如图 10（a）所示，Cryo-SEM 图像清晰地显示了冻干巧克力内部的多孔网络结构以及嵌入其中的球形脂肪颗粒（直径约 100 μm）。同时，Cryo-SEM 技术还对冻干巧克力的关键加工步骤进行了追踪，通过对冷冻后的巧克力乳液进行 Cryo-SEM 观察，研究发现乳化后形成的球形脂肪结构在冷冻阶段得到了完好保持，这证明了乳化步骤是形成油/水结构的关键（图 10（d））。

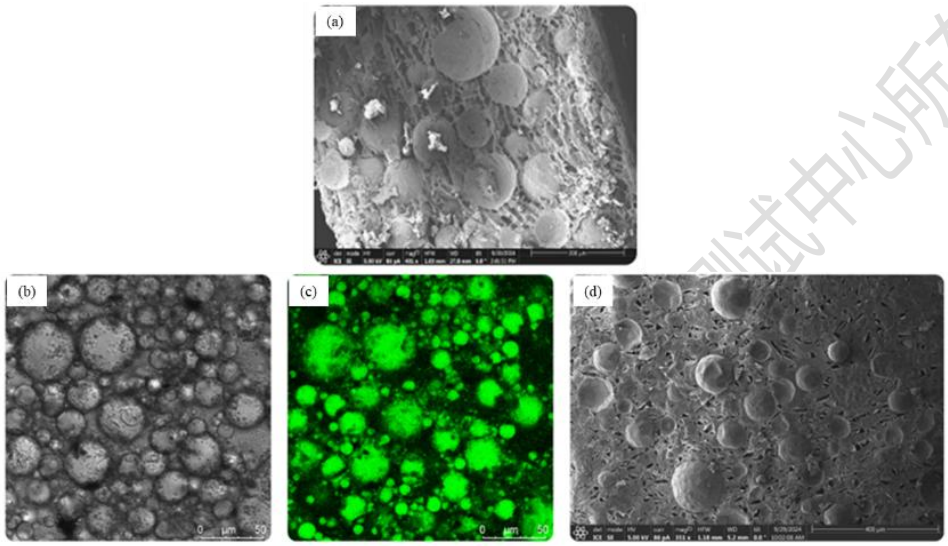


图 10、（a）冻干巧克力的 Cryo-SEM 微观结构图像（b）常规巧克力与水乳化后的光学显微图像(c)常规巧克力乳化后的激光共聚焦显微图像(d)冷冻状态下巧克力液体的 Cryo-SEM 图像

四、结论

Cryo-SEM 通过快速冷冻制样技术，使含水、溶剂或电子束敏感样品在低温条件下保持原始微观结构，避免了干燥过程引起的结构破坏或电子束损伤。本文系统介绍了化学所电镜室应用 Cryo-SEM 技术在表征五类样品的应用案例，涵盖黏稠样品、溶液样品、固液界面样品、不耐辐照/空气敏感型固态样品以及生物样品。这些应用案例表明，应用 Cryo-SEM 技术能够得到高分辨形貌和成分信息，为化学、材料和生物领域的研究提供了直接的数据支撑。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

参考文献：

1. 刘力瑶，关波，聚焦离子束-电子束双束电镜冷冻传输系统应用案例。*分析测试中心通讯*， **2021**，*11*， 15。

2. Pan, Y.F., et al., An Implantable Robust Micro-thermometer Uncovers the Dynamic Change of Brain Temperature.*CCS Chem.,*doi: 10.31635/ccschem.025.202506041.

3. Guo, G.G., et al., Hydrogel-filled Micropipette Enables Antifouling in Vivo Iontronic Sensing. *Sci.Bull.*,**2025**,*70,*469.

Zhao, Y.R., et al., Ultrasensitive and Selective Iontronic H_2O_2 Nanosensor Reveals the Biphasic Redox Dynamics Invoked by l-DOPA at a Single-cell Level. *ACS Sens.,***2025**,*10,*8947.

4. Li, M.K., et al., Pickering Emulsions with Low Interface Coverage But Enhanced Stability for Emulsion. *Nat.Commun.,***2025**,*16,*2490.

5. Wang, T.D., et al., Detachable and Hierarchical Assemblies for Recyclable and Highly Efficient Oil-fouling Removal. *Nano. Res.,***2022**,*16,*2551.

6. Gao, J., et al., Spatiotemporal-dependent Confinement Effect of Bubble Swarms Enables a Fractal Hierarchical Assembly with Promoted Chirality. *J. Am. Chem. Soc.*,**2024**,*146*,18104.

7. Wang, J., et al., Lignin/Surfactin Coacervate as an Eco-friendly Pesticide Carrier and Antifungal Agent against Phytopathogen. *ACS Nano,***2024**,*18,* 22415.

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.* ,**2020**,*31,*2006606.

9. Zhang, Y.L., et al., Covalently Anchoring an Ultrathin Conformal SiOx Coating on Polyolefin Separator for Enhanced Lithium Metal Battery Performance. *Adv. Funct. Mater.,***2025**,*35,*2417160.

10. Li, M.J., et al., Chirality and Curvature on Protein Adsorption and Osteogenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.,***2024**,*63,* e202411733.

11. Li, Q.Q., et al., Innovative Emulsification and Freeze-drying Techniques for Developing Heat-resistant Chocolates with Tunable Textures and Sensory Attributes.

版权所有中国科学院化学研究所分析测试中心

Food Chemistry,**2025**, *493*, 145822.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

用于电子束敏感材料的电子叠层成像技术的原理及应用

▶ 程永鑫[1] 关 波[2]

(1、怀柔研究中心, 2、分析测试中心 Email: chengyongxin@iccas.ac.cn，guanbo@iccas.ac.cn)

一、背景介绍

透射电子显微镜技术（Transmission electron microscopy, TEM）集成了衍射、成像和谱学分析功能，是材料化学研究的重要工具。现代配备球差校正器的电子显微镜能够在亚埃尺度下表征材料的晶体学、物理和化学性质。然而，许多软物质材料对电子束辐照敏感，束流引起的辐照损伤限制了高分辨TEM在此类材料结构解析中的应用。典型的束流敏感材料包括金属-有机框架（Metal organic frameworks, MOFs）、共价-有机框架（Covalant organic frameworks, COFs）、有机-无机杂化钙钛矿、超分子晶体和蛋白质等，这些材料通常具有多孔结构、有机成分或弱化学键特征。此类材料的电子剂量耐受阈值约为数十e^- /Å^{2}或者更低，需要在低于该阈值的超低电子剂量下成像以避免结构损伤。但在如此低的电子剂量条件下，传统TEM技术难以获得有效信息。

近年来，高性能探测器与新型成像方法的结合使电子显微镜在透射模式和扫描透射模式（Scanning tansmission electron microscopy, STEM）模式下实现了束流敏感材料的成像。在TEM模式下，直接探测电子计数相机的应用实现了超低电子剂量的高分辨率成像。一系列图像采集和处理方法的发展显著提高了超低剂量高分辨TEM的效率，该方法可在几个e^- /Å^{2}的电子剂量下生成图像。但高分辨TEM图像对比度的解读需要专业知识，且处理过程可能产生假象。在STEM模式下，积分差分相位衬度（Integrated differential phase contrast, iDPC）成像已成为束流敏感材料的有效低剂量表征技术，在沸石、COFs和MOFs等材料表征中得到应用。相比高分辨TEM，iDPC图像衬度更易于解读。但iDPC需要精确聚焦电子束以达到原子分辨率，在样品对电子束高度敏感时，聚焦过程中的束流曝光可能导致结构损伤，降低成像成功率。此外，样品厚度增加会导致iDPC图像质量快速下降。基于四维扫描透射电镜(4D-STEM)数据集的电子叠层衍射成像（Ptychography）技术综合了高分辨TEM和iDPC的优点，同时克服了各自的局限性，特别适用于束流敏感材料的表征：

版权所有中国科学院化学研究所分析测试中心谢绝转载

（1）相位重构优势：从衍射花样重构物体的透射函数，直接生成可解释的相位像。相位像具有更高对比度，因此所需电子剂量更低，且能同时探测重元素和轻元素。

（2）聚焦容忍度：可在多种光学配置下进行，允许使用离焦电子束获取衍射花样，避免了iDPC中因剂量受限导致的聚焦困难，提高束流敏感材料的成像效率。

（3）厚度容忍度：传统STEM成像为避免多重散射通常要求极薄样品，而Ptychography通过在重构算法中引入多层片（multislice）方法，可有效抑制多重散射影响，对样品厚度具有更高容忍度。

二、方法介绍

2.1 技术原理

4D-STEM数据集的采集方式为:将会聚电子束以二维光栅方式扫描样品,使用像素化探测器记录每个扫描位置的二维衍射图（图1）[1]。通过采集会聚电子束在各扫描位置的二维衍射数据，运用叠层算法可突破透射电镜物理透镜的分辨率极限，有效解决传统球差校正透射电镜成像存在的问题。

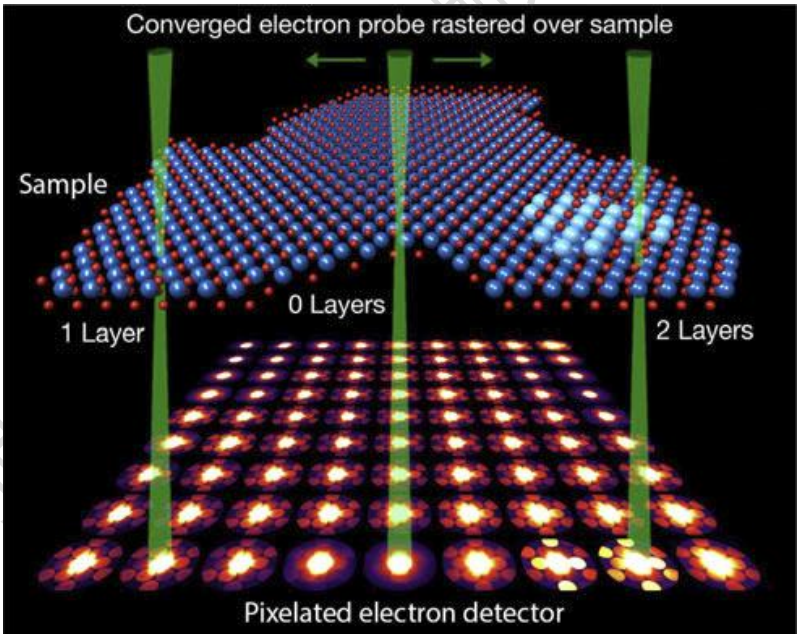


图1、二维材料的4D-STEM实验示意图：原子结构从每个扫描位置的衍射信号重构所得，图中示意了三束STEM束斑（绿色）分别位于一层、真空和两层原子位置[1]。

叠层成像是一类从实验记录的振幅信息中恢复相位信息的计算成像方法，在可见光和X射线成像等中均有广泛应用。在透射电镜中的电子Ptychography是扫描

透射电镜与相干衍射成像相结合的形式，即叠层相干衍射成像。采集多个来自样品不同位置的衍射强度分布图，利用不同散射波的相干叠加产生的干涉现象，通过数学算法实现入射电子波函数和样品物函数的重构[1]。

电子Ptychography与其他相位恢复算法类似，基本思路是通过实验测量具有冗余的数据并施加约束条件，通过迭代算法获得与实验测量相符的最优解。图2展示了叠层迭代引擎（Ptychography Iterative Engine, PIE）算法的基本流程。对于薄样品的相干衍射成像，可假设电子束与样品相互作用后的出射波函数为束斑函数$P(r)$与物函数$O(r)$的乘积，通过以下步骤迭代：

（1）用物函数$O(r)$子区域1的出射波函数$s(1)$做傅里叶变换，得计算衍射图S（1）。

（2）用子区域的实验衍射图$D(1)$的平方根替换S (1)的振幅，保留相位，得$S'(1)$，此即傅里叶约束。

（3）用$S'(1)$做逆傅里叶变换，得$s'(1)$。

（4）因为子区域1和子区域2有重叠，更新了$S'(1)$也就更新了部分子区域2，此即重叠约束。

（5）对子区域2重复步骤（1）-（4），如果有N个子区域(扫描位置)，则重复N次。

（6）回到第1步，开始新一轮计算，直至收敛。

收敛时，所有的计算衍射图都与实验衍射图差别足够小，且继续迭代时变化足够小。这时候的物函数就是重构结果，包括振幅和相位。

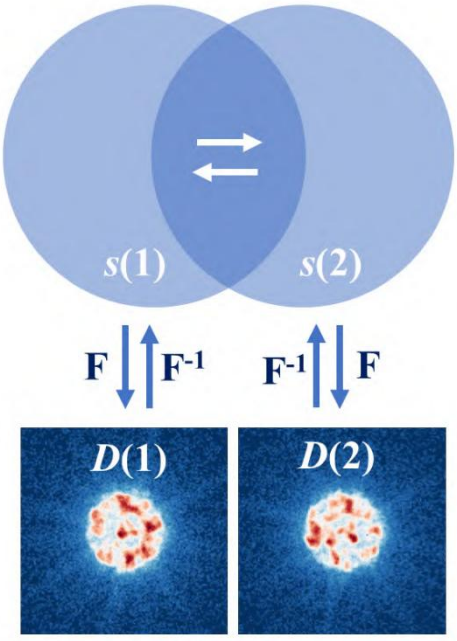


图2、 PIE算法的示意图[2]

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

2.2 实验方法

电子叠层成像包括数据采集和数值重构两个阶段。在数据采集阶段，通过像素化探测器记录电子束在样品上二维扫描时每个位置的二维衍射图（图3a，b），形成四维STEM数据集。在数值重构阶段，通过算法从这些数据集中提取样品的振幅和相位，除可合成常规的各种成像模式，如Annular Bright-Field (ABF)、Annular Dark-Field (ADF)、iDPC 等，还可利用不同衍射束间的相干效应产生新的成像模式—电子叠层成像（如图3c），可充分利用4D-STEM的大量数据获取样品更多的结构信息。由于Ptychography技术的快速发展及其在超高分辨率和鲁棒性方面的独特优势，现在4D-STEM技术主要是Ptychography技术。

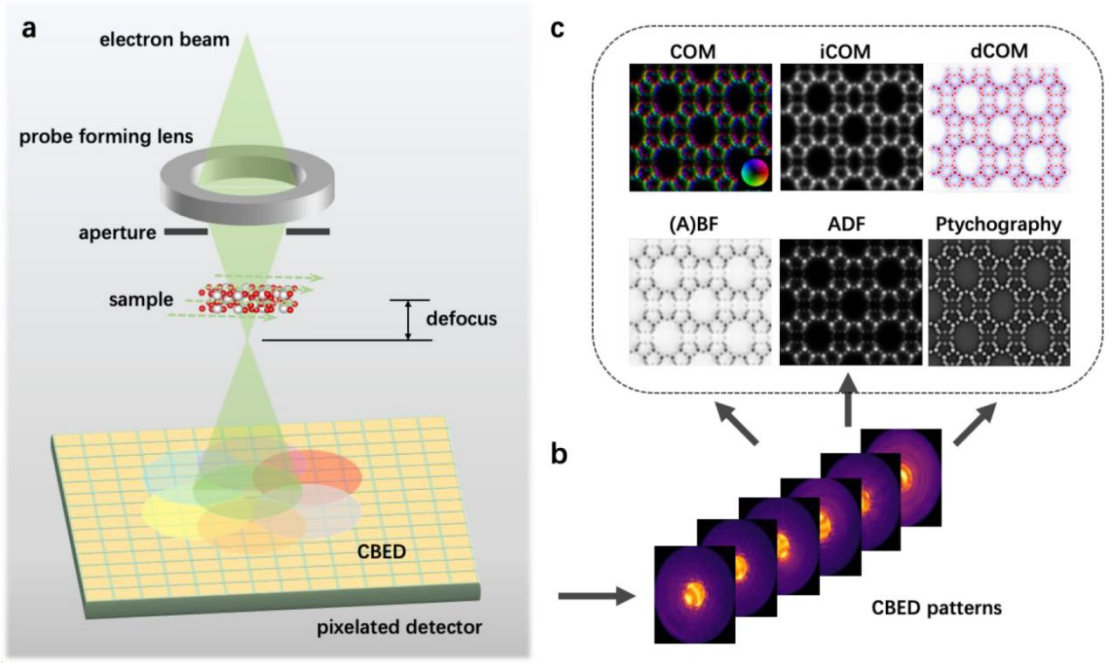


图3、4D-STEM技术示意图[3]

Ptychography是利用会聚束衍射盘相干叠加的干涉现象进行相位重构，因此需要选择适当的会聚半角（α）使衍射盘相互重叠。为获得良好的叠层重构效果，需要足够的数据冗余度，通常要求大于60 %。为了实现这个冗余，为实现这一冗余度，应选择合适的束斑大小和扫描步长，确保相邻扫描区域有足够重叠。与传统STEM成像使用聚焦束斑相比，离焦束斑可使用更大的扫描步长，以更低的电子剂量覆盖相同区域，或在相同数据量下查看更大的扫描区域。通过离焦束斑实

现原子分辨率的结构信息重构是电子叠层成像在束流敏感材料成像中的主要优势。还需选择合适的相机长度以平衡采集的二维衍射图的像素尺寸和散射角度范围，相机长度过小会导致衍射图采样不足，过大则会限制可实现的重建分辨率，两者均会影响重构相位图像的质量。

除正确设置成像参数外，高性能电子探测器也是实现Ptychography重构的关键，特别是在检测超低电子剂量衍射图时（束流敏感材料成像）。获得高质量4D-STEM数据需要高探测量子效率的直接电子探测器。探测器的读取速率是另一个关键因素，更高的读取速率可缩短扫描时间，减少样品漂移对重构质量的影响。此外，探测器应具有宽动态范围，以同时记录高强度的明场（BF）信号和低强度的高角度信号。理想的4D-STEM探测器应具有高动态范围（通常对应大像素尺寸）、大像素数和高数据读出速度。随着新一代快速读取直接电子探测相机技术的发展，目前可实现每秒采集1000至100000帧图像，单帧动态范围可达10^7。这使得在STEM模式下快速采集每个束斑位置的二维会聚束电子衍射成为可能，推动了4D-STEM相关技术的发展，在纳米尺度物相分析、应变测量和电磁场分布测定等方面得到广泛应用[2]。需要说明的是，每套电子叠层数据包含1万至100万张衍射图，相比常规电镜图像单张约2~10 MB的数据量，电子叠层的数据量增加约1万倍。电子叠层的计算重构过程目前较为耗时,典型迭代算法所需时间以小时计，距离实时成像尚有距离。

三、Ptychography技术在束流敏感材料中的应用实例

电子叠层成像技术在重构过程中利用了大部分散射电子，因而具有较高的电子利用率。图4的模拟重构结果表明，对于沸石等束流敏感材料，Ptychography在相同剂量下能够获得比iDPC更高的信噪比，多层片重构方法克服了多重散射对分辨率的负面影响，提高了厚样品的分辨率[3]。

相比常规方法，Ptychography可在厚样品、低剂量、大离焦量条件下获得较好的成像结果。对于MOFs、COFs和有机-无机杂化钙钛矿等极度束流敏感材料，Ptychography也可在更低电子剂量下获得高分辨率成像结果。

Li等人[4]利用电子叠层衍射技术，在剂量约100 e^- /Å²条件下，得到了MOFs约2 Å的近原子分辨的结构（图5）。重构图像清晰显示了有机配体、金属团簇及团簇内部的原子列，并揭示了MOFs中缺失配体、多余团簇及表面终止等局域结

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

构特征。通过模拟与实验相结合,发现在此低剂量条件下，采用较小会聚半角采集数据是实现有效迭代重构的关键。该研究深化了对电Ptychography的理解，为束流敏感材料的高分辨成像提供了新思路。

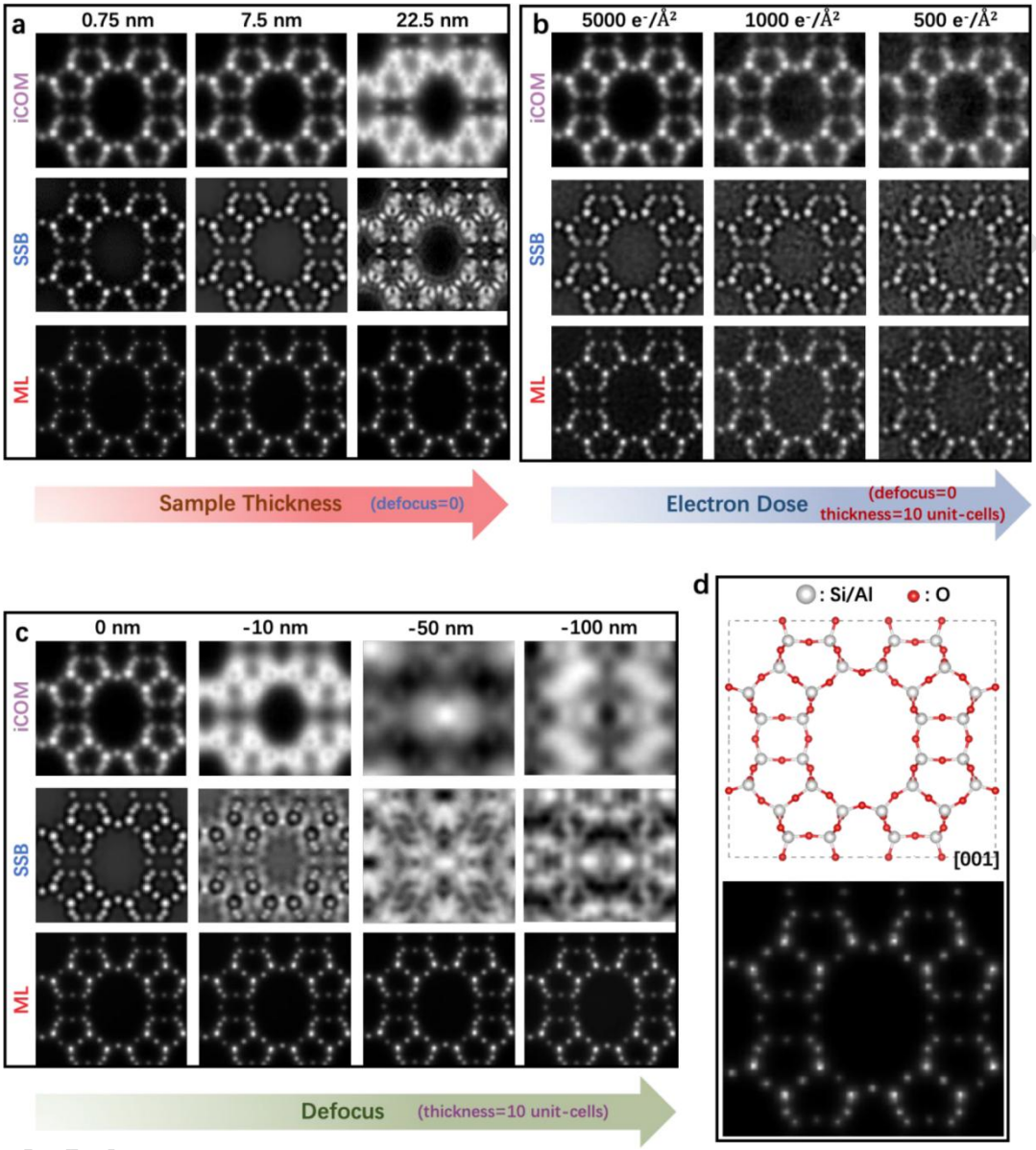


图4、基于束流敏感沸石材料模拟4D-STEM 数据的iCOM及Ptychography重构结果对比：(a)样品厚度的影响(b)电子剂量的影响(c)离焦量的影响;(d)沸石原子结构模型及投影势图[3]

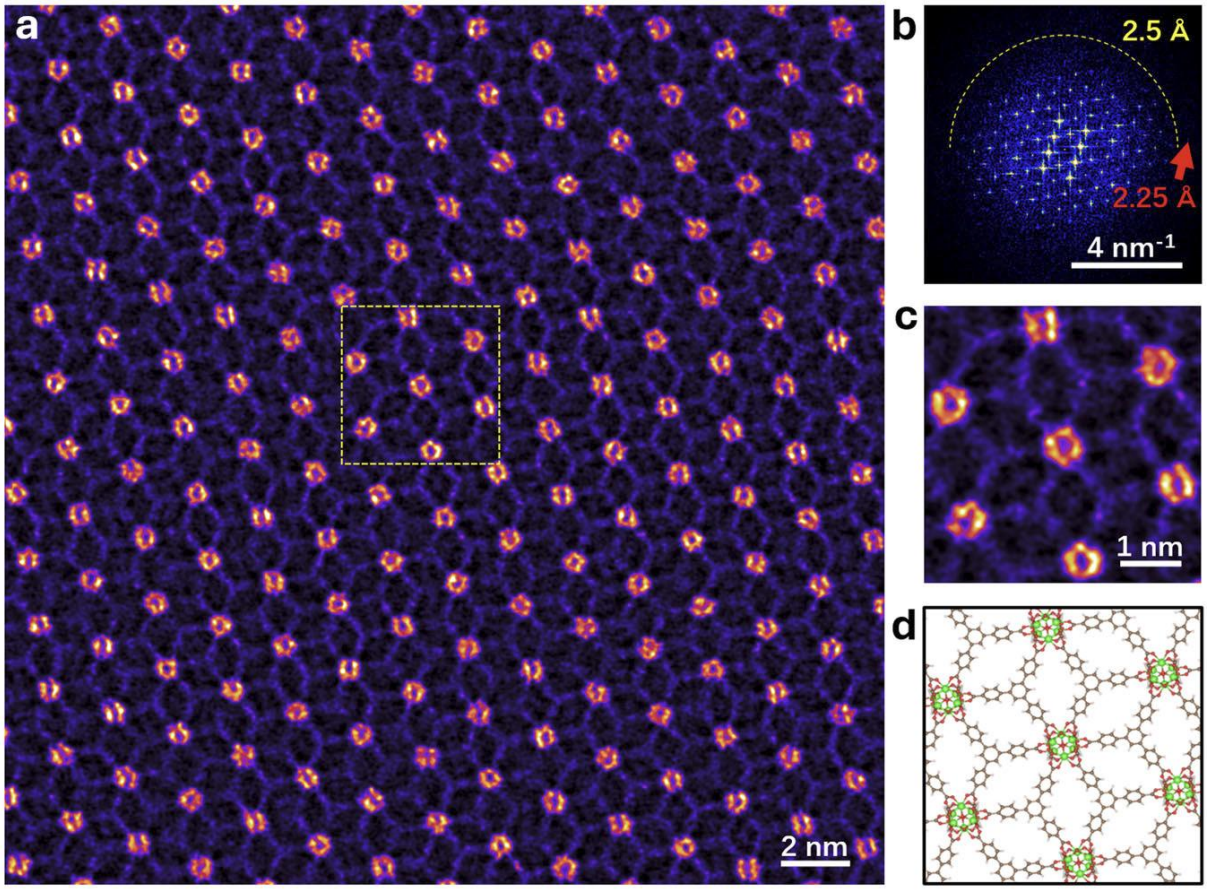


图5、Zr-BTB MOF样品的叠层电子衍射成像：（a）叠层衍射相位重构结果，重构参数为会聚角10mrad，扫描步长1.05 Å 重构剂量115 $e^{-}/Å^{2}$（b）图a的频谱显示信息分辨率为2.25 Å（c）图a中框选区域的放大图（d）MOF Zr-BTB沿[100]方向的投影结构图，绿色为Zr，红色O，灰色C，粉色H。(c)和(d)高度一致性表明电子衍射重构具有备很高的精度。

近来Yuan等人[5]使用高速超低剂量4D-STEM与剂量分化技术，对有机-无机杂化卤化物钙钛矿进行了电子叠层成像，首次在原子分辨率下观察了这种高电子束敏感材料的结构细节和损伤动态。研究发现，材料边缘和内部缺陷的损伤速率与存在的碘（I）或铅（Pb）空位浓度密切相关，其中I空位增多会加速结构降解，而Pb空位能提高稳定性。文章还对比了LAADF（Low-angle annular dark-field）图像和ptychography等成像重建方法的优势（图6），指出ptychography在识别较轻原子（如 MA^{+}）方面具有更高的剂量效率。

版权为中国科学院化学研究

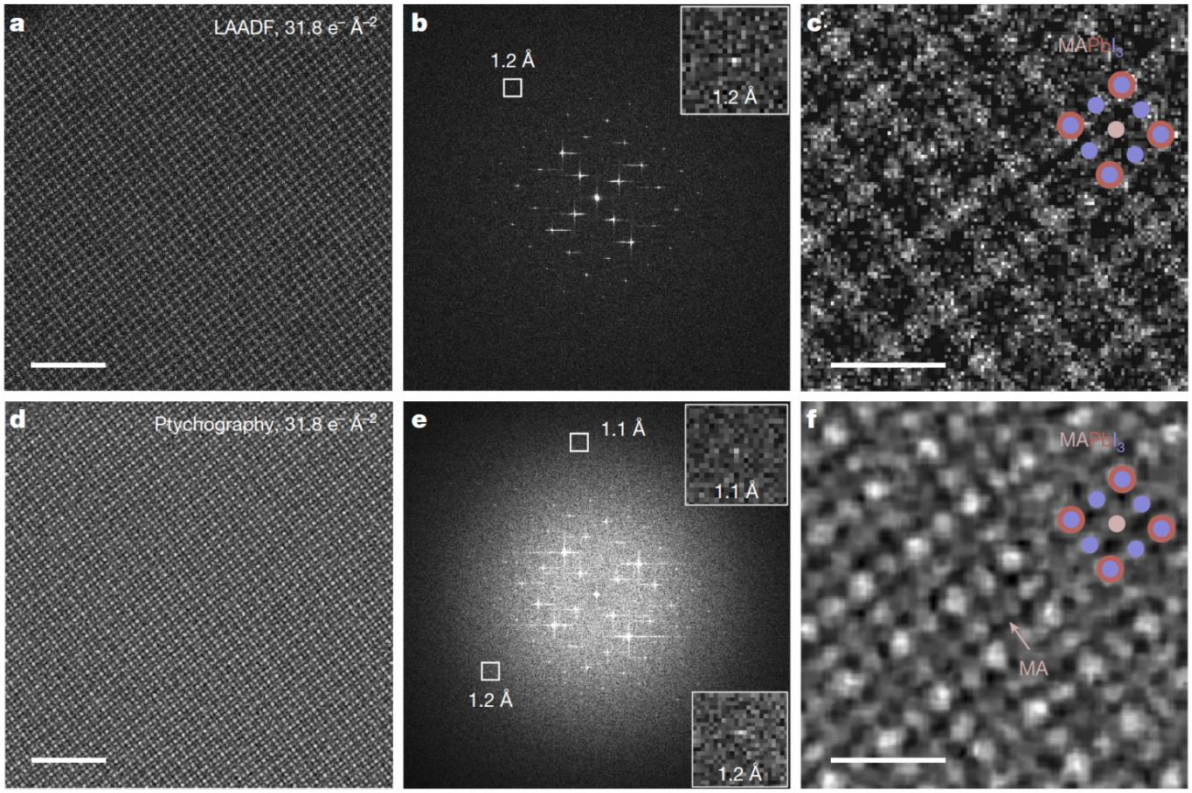


图6、 $MAPbI_3$的原子分辨率成像对比。LAADF成像(a–c)和束流31.8 e^- Å^{-2}时ePIE电子叠层成像(d~f)。b和e为a和d图的频谱信息；图c和图f为图a和图d的局部放大图，其中图a和图d的标尺为为5 nm，图c和图f的标尺为1 nm。

四、总结

本文简要介绍了4D-STEM数据采集和处理的标准流程，并展示了4D-STEM Ptychography在束流敏感材料低剂量成像中的应用实例。相较于传统扫描透射电镜成像方法，4D-STEM Ptychography方法在有机晶体、有机-无机杂化材料及高分子等束流敏感材料的结构表征中具有较大的应用潜力。化学所预计于2007年在球差校正透射电镜上配置混合像素直接电子探测器，探索4D-STEM技术在化学所的应用。

随着计算机硬件和算法的发展，电子叠层将也将获得更广泛应用，空间分辨信息极限将不断提高，进入深亚埃分辨，有望揭示自旋结构等电子层面的信息，从而将材料的微观结构分析带上一个全新的高度。另外，电子叠层成像通过数学算法对成像透镜不完美所引入的像差进行校正，降低了透射电镜硬件性能提升的成本，为研发低成本的高分辨透射电镜提供了新的思路。

版权为中国科学院化学研究所

参考文献：

1. Ophus, C. *Microscopy and Microanalysis,* **2019**, 25: 563-582.

2. 于荣, 沙浩治, 崔吉哲, 杨文峰. *电子显微学报*, **2023**, 42(6): 767-781.

3. Li G, Zhang H, Han Y. *ACS Central Science*, **2022**, 8(12): 1579–1588.

4. Li, G. *et al. Nature Communications*, **2025**, 16: 914.

5. Yuan, B. *et al*. *Nature*, **202**5, 647: 364-368.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

数据处理技巧

全分子特殊位置无序处理方法之二

▶ 尤 爽　郝 项

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

在晶体学中，特殊位置是指该位置存在一种或多种对称操作，比如在 *P*-1 空间群中，坐标原点（0，0，0）的位置存在反演中心，该位置就是特殊位置。晶胞中所有的对称操作构成了空间群，由于晶胞具有三维平移性，故空间群中的对称操作分布在整颗晶体中。空间群的对称操作反映了多个分子之间的对称关系，不同于分子的点群。点群是单个分子所有对称操作形成的一个群，所有对称操作可以看成从分子中一个点发出（有的书上说所有对称操作交于一个点），因此称为点群。点群是局部的对称性，不具有平移性，空间群则分布于全空间，有平移性。

全分子特殊位置无序是指分子刚好处于晶胞中的某个特殊位置上，且分子本身的点群对称性与该特殊位置的空间群对称性不一致（既可以是对称操作种类不一致，也可以是对称操作取向不一致）时出现一种比较特殊的无序。这种无序不同于分子由于构象柔性较大导致的有一定随机性的热运动无序，严格来说，它是一种确定性的“无序”。如果我们只讨论一种最简单的情况，就是该特殊位置只有空间群中的一种二重对称操作，那么在这种对称操作的作用下，整个分子在同一个位置居然呈现出两种不同的取向，这两种不同取向正是通过该位置的对称操作关联的。当然，一个位置不会同时存在两个分子，这是一种平均效应引起的，我们可以理解为在这个晶胞中分子是这个取向，在另一个晶胞中的同一位置上，分子呈另一种取向，平均出来就是同一位置出现两种取向，每种取向占据 50%。

我们曾经在《分析测试中心通讯》中报道过两次全分子特殊位置无序案例，第一次是在第 8 期上，报道了几种溶剂分子的全分子特殊位置无序，由于这些溶剂分子比较简单，在结构精修的时候，处理这种无序不算复杂。但是，当分子结构稍微复杂一些，这种无序就比较难处理了。我们第二次在第 12 期上报道的分子就比较复杂，分子所处特殊位置的对称操作是镜面，导致解析时分子中的所有原子均成对出现，解析的原子位置扩大一倍，而且因为该分子的原子较多，这些“双重”的原子在位置上彼此干扰，导致解析的复杂度增大很多。在第 8 期和第 12 期上，虽然分子复杂程度不同，我们使用的无序处理方法都是相同的。本期，我

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

们再次报道一个全分子特殊位置无序的案例，虽然本次案例的无序分子也比较复杂，但是我们使用了另一种处理方法，简化了繁琐的人力寻找原子坐标，避免了人力寻找容易犯错，加快了处理速度。

近日，我们收到本单位某课题组的一个样品，该化合物晶胞参数如下：a = 16.8128(4) Å，b = 29.3120(5) Å，c = 18.5498(3) Å，α = 90°，β = 112.024(3)°，γ = 90°，属于单斜晶系，空间群为 $P2_1/m$。初步解析发现晶体结构中的 C_{70} 分子发生了全分子特殊位置无序。C_{70} 分子（如图 1）属于 D_{5h} 点群，本身具有对称镜面，但是在结晶时，C_{70} 分子正好处于晶体学镜面的特殊位置（如图 2），同时该镜面与 C_{70} 分子本身的点群镜面不重合，取向发生了偏移，从而导致 C_{70} 分子发生特殊位置无序。

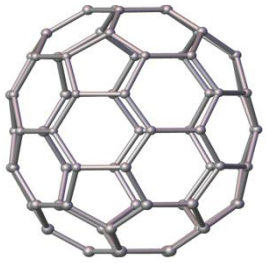


图 1、C_{70} 分子结构

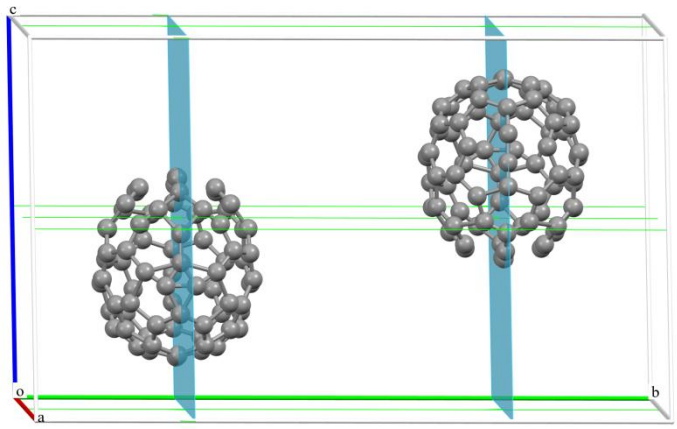


图 2、C_{70} 分子处于晶体学镜面（浅蓝色面）的特殊位置，导致全分子无序

我们先按照第 8 期和第 12 期报道的方法处理无序，在结构解析软件 Olex2 中先用 GROW 命令将两个取向的全分子都“生长”出来，在这些彼此部分叠加的 140 个原子中找到关于镜面对称的两个取向和构型合理的 C_{70} 分子，然后任取其中一个分子设为 PART -1，并将其占有率定为 50%，加入若干距离和温度因子

的限制后，再进行精修，结果如图 3。这种方法较为费时费力，而且容易找错原子位置。

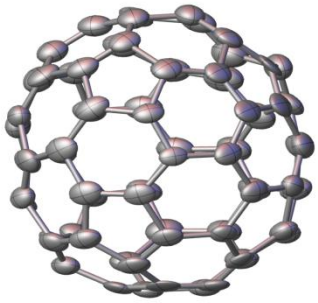


图 3、通过全分子特殊位置无序处理后的 C_{70} 分子（任取其一取向）

考虑到 C_{70} 分子是一个完全已知的结构，因此我们又采用了另一种方法处理本次无序，即使用精修程序 SHELXL 中的 FRAG 命令。首先，我们在剑桥晶体学数据库（CSD）中找到一个完整且没有无序的 C_{70} 分子结构[1]，以这个 C_{70} 分子作为模版，将我们结构中的 C_{70} 分子对照该模版进行结构生长和精修。首先找到模版 C_{70} 分子中的 6 个碳原子（即 C1 到 C6）处于 C_{70} 分子的相对位置，通过反复对比，找到我们结构中 C_{70} 分子同样位置的 6 个碳原子（即 C9 到 C14），如图 4。将我们的 6 个碳原子按照模版 C_{70} 的 C1 到 C6 的对应关系记录下来，即我们的 C12 对应模版的 C1，以此类推，如下是我们的 6 个碳原子按照上述对应关系的原子参数行（参数包括元素种类代码，分数坐标，占有率和温度因子）：

表 1、C 原子对应关系的原子参数行

元素种类	元素代码	分数坐标			占有率	温度因子
		x	y	z		
C12	1	0.699165	0.638908	0.540066	11.00000	0.07037
C11	1	0.670048	0.637715	0.603193	11.00000	0.08214
C10	1	0.729223	0.631270	0.674361	11.00000	0.07891
C9	1	0.820139	0.632477	0.690573	11.00000	0.06154
C14	1	0.851508	0.641298	0.630759	11.00000	0.07941
C13	1	0.783254	0.642731	0.546605	11.00000	0.07227

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

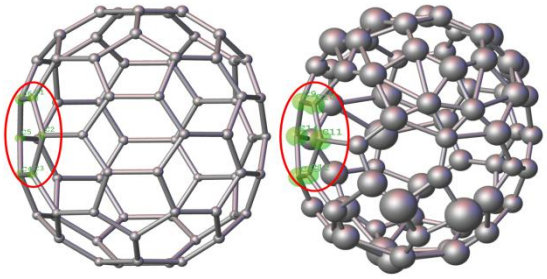


图 4、模版 C_{70}（左）和我们结构的 C_{70}（右，未精修好）中 6 个碳原子的对应位置

与之前报道的方法不同的是，此处我们只需找到 6 个合理的原子坐标，而完全不用管剩余的 64 个原子的坐标是否合理，这就比之前的方法简化了很多。然后，用文本编辑器打开 RES 文件，在命令栏下方输入 FRAG 命令以及模版分子的晶胞参数，这里根据我们选用的模版，输入 FRAG 17 32.398 21.103 32.293 90 90 90，随后将模版 C_{70} 分子的 70 个原子参数行按顺序拷贝在下面，再输入 FEND 命令。接下来，输入 PART -1 10.5，表示以下原子处于特殊位置，其原子占有率为 50%，在 PART -1 10.5 命令下输入 AFIX 179 命令，随后按照上述 C12，C11，…的顺序依次输入我们结构中的 6 个碳原子的原子参数行。为了让原子编号更清晰有序，我们将 C12，C11，…重新以 C1 到 C6 的顺序命名。随后将剩余 64 个碳原子的坐标全部定为（0, 0, 0），表示忽略它们的真实坐标（因为很多是错的），取而代之采用模版分子的对应原子计算它们的新坐标，最后输入 AFIX 0 和 PART 0 命令（如图 5A），并将 RES 文件保存。用 Olex2 打开 RES 文件，我们就可以得到一个基于模版计算出来的 C_{70} 结构（如图 5B），最后的结构在此基础上进行精修成功。

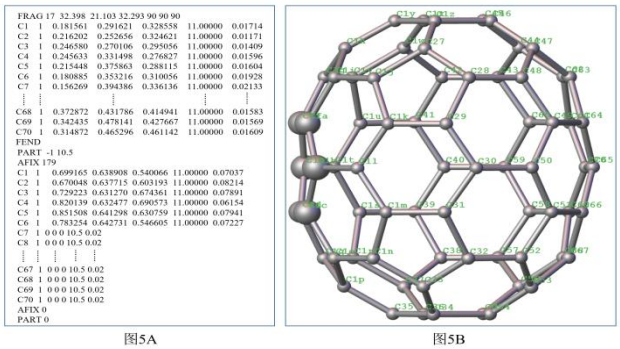


图5A　　图5B

图 5、(A) FRAG 命令。(B) 通过模版生长后的 C_{70} 结构图

相对于之前报道的找全 70 个原子的方法，此方法只找了 6 个起始原子，而其

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

他 64 个原子通过模版分子“带出来”。我们进一步发现最少找到 3 个起始原子，就可以通过模版分子带出剩余 67 个原子。值得注意的是，在找对应原子的过程中一定要保证与模版分子相应的原子完全对应；另外，经此方法得到的结构虽然完整，但其原子的温度因子以及分子的键长键角却未必准确，在精修过程中，需要依据结构化学知识加入一些适当限制。

综上所述，我们本次报道的全分子特殊位置无序案例的处理方法，明显不同于《分析测试中心通讯》第 8 期和第 12 期报道的方法，对于 C_{60}、C_{70} 以及烷基链等已知模版分子的无序具有显著作用，更为省时省力，避免人在繁琐的寻找中出错，是对之前报道的有益补充。当然，对于全新结构的分子，由于缺少模版，采用之前报道的方法是最可靠的选择。不过，我们也注意到现在的剑桥晶体学数据库（CSD）中已经包含了海量的分子结构，即使全新的分子结构，也总能拆解成若干已知的分子片段体，从这个角度讲，本次报道的方法具有一定的普遍性。

参考文献：

1. L. M. Baldauf, K. B. Ghiassi, M. M. Olmstead, and A. L. Balch. Fullerene nanostructures: how the oblong shape of C_{70} forms a cocrystal with an enormous asymmetric unit and related cocrystals. *Nanoscale*, **2020**, *12*, 20356.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

测试技术及技巧

盖玻片对共聚焦荧光成像的影响

▶穆 娇 刘美蓉

（分析测试中心光谱组 Email: mrliu@iccas.ac.cn）

在激光共聚焦显微镜成像实验中，通常使用盖玻片（常规厚度 120～170 μm）来支撑样品。在实验过程中，我们发现盖玻片在特定激发光下会检测到有发光现象。那么共聚焦成像是否会受盖玻片的影响呢？这对共聚焦荧光成像非常重要。

我们通过荧光光谱仪已经证实在 405nm、488nm、559nm 激光作用下，都不能激发盖玻片发光，且在 400nm 以上盖玻片几乎没有吸收。基于上述结果，我们首先观察盖玻片共聚焦三维成像、通过共聚焦对盖玻片进行光谱分析及酸洗前后盖玻片的发光现象进行比较，分析其是否与盖玻片表面可能粘附的物质相关。然后，通过荧光样品与盖玻片的不同贴合方式——荧光样品与盖玻片在同一焦平面和荧光样品与盖玻片不在同一焦平面，来分析盖玻片发光对共聚焦荧光成像的影响。

1、盖玻片共聚焦三维成像

我们通过采集纵向荧光强度变化，了解盖玻片在不同 Z 轴位置的发光情况，从共聚焦三维图中可以清晰地看到盖玻片发光现象仅发生在盖玻片与空气的界面，盖玻片内部并没有发光（图 1），说明盖玻片发光现象并非盖玻片自发荧光导致。



图 1、盖玻片的共聚焦三维图像（由 559 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下使用 FV1000 拍摄）

2、盖玻片共聚焦发光光谱分析

为了更直观地观察盖玻片发光现象和激发光的关系，我们采集了盖玻片在 580~750 nm 的发光发射光谱（图 2）。结合每幅图像平均荧光强度，可以观察到在 580~600 nm 之间荧光强度骤降（图 2）。当用激光扫描共聚焦显微镜对盖玻片

做发光光谱分析时，发现发光位置距离激光波长 559 nm 非常近。推测是因为 559 nm 激光很强，即使收集波长范围在 580 nm 以后，还是有一些在盖玻片表面的激光反射光被检测到。进一步证明观察到的盖玻片发光现象并非盖玻片自发荧光，而是源于激光的反射光，造成了盖玻片发光假象。

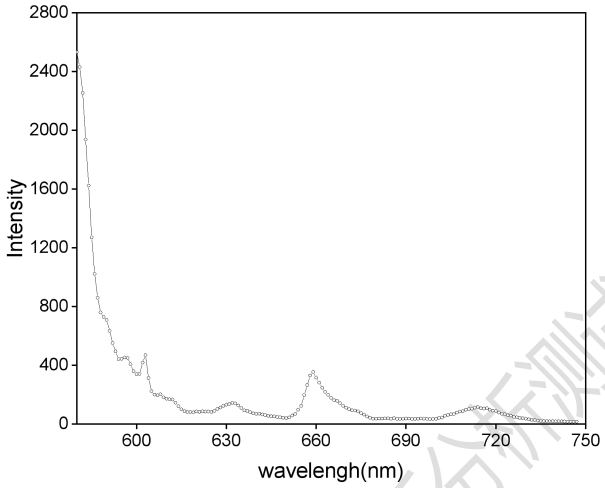


图 2、盖玻片发光现象的发射光谱（由 559 nm 激发，收集发射范围 580~750nm，步进为 1 nm，带宽为 3 nm，在 10×物镜下使用 FV1000 拍摄）

3.盖玻片酸洗前后发光假象强度比较

未经酸洗的盖玻片指用 100%无水乙醇擦拭后使用的盖玻片，经酸洗处理的盖玻片指先用 100 %无水乙醇擦拭再用 5 %盐酸浸泡微波震荡 30 min 后用超纯水进行多次擦拭后的盖玻片。从发光图像（图 3a、3c）中可以明显观察到酸洗前后滴水的盖玻片无明显发光强度差异，说明盖玻片表面粘附的杂质或其他物质对发光没有贡献。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

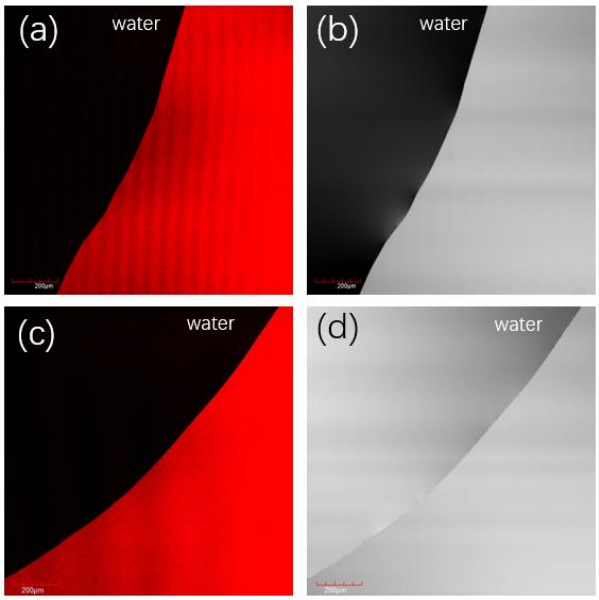


图 3、酸洗前后盖玻片的发光假象：（a、b）未经酸洗滴水的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，（c、d）酸洗后滴水的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像。图像均由 559 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下使用 FV1000 拍摄。

4. 盖玻片发光假象对样品荧光的影响

对于共聚焦成像，一个基本问题就是：观察到的荧光是否仅来源于样品，还是受到了盖玻片发光假象的污染？为解决这一疑问，我们设计了两个对照实验。（1）共平面接触设置：样品与盖玻片保持紧密接触，确保样品面与盖玻片上表面在同一焦平面。（2）不共面设置：样品被有意放置在距离盖玻片上表面一定距离的位置，从而样品与盖玻片上表面不在同一焦平面上。

4.1 样品与盖玻片共面接触设置

将水滴滴在盖玻片上，这时，水与盖玻片上表面紧密贴合。无论如何调焦，共聚焦成像表明水本身不产生发光，发光源自盖玻片（图 4a、4b）。将盖玻片上的水吸走一部分后，发光只发生在由水覆盖区域以外的位置（图 4c、4d）。水完全蒸发后，整个图像又显示完整的发光成像，较滴水之前并无差异（图 4e、4f）。因此，水覆盖区不发光并非由盖玻片表面荧光物质的溶解引起。相反，这种现象可能是由于水与盖玻片之间的折射率不匹配，导致激光在界面处无法有效聚焦。当用浸油替代水时，无论如何调整焦距，在浸油覆盖区域也未观察到发光现象（图 4g、4h）。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

由此可知，盖玻片发光假象并不会影响滴在盖玻片上水滴的荧光成像。

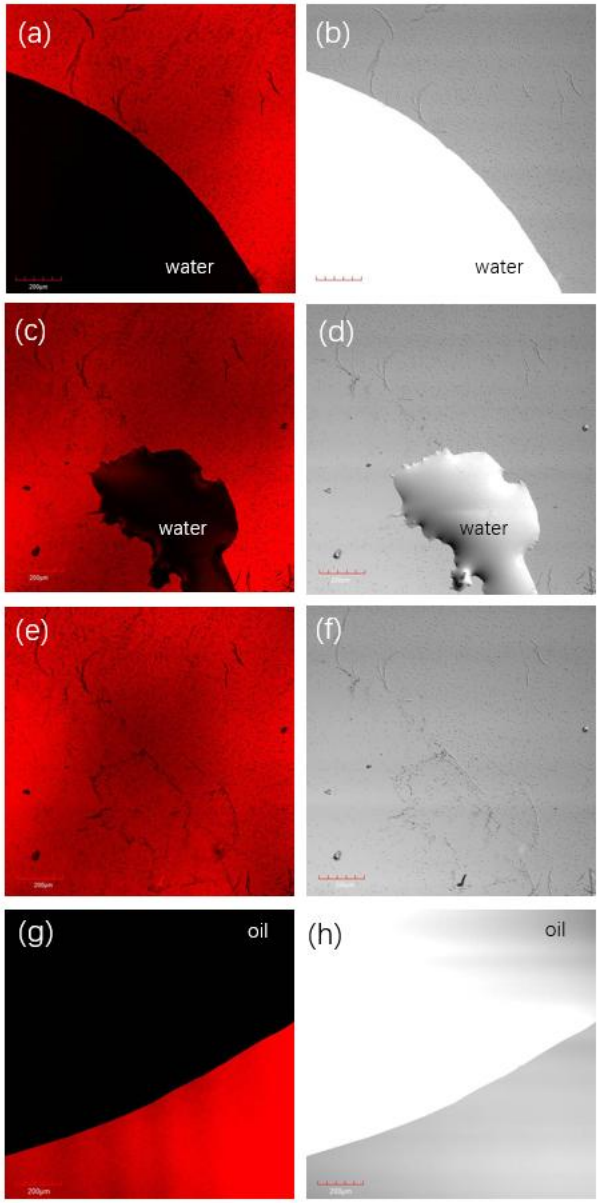


图 4、滴水和滴油后盖玻片的发光假象：（a、b）滴水盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，（c、d）滴水后吸走部分水的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，（e、f）水完全蒸发后的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，（g、h）滴油盖玻片发光假象成像和 DIC 成像。图像均由 559 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下 FV1000 拍摄。

4.2 样品与盖玻片不共面设置

发光薄纸夹在两个盖玻片之间，主盖玻片的上表面不与薄纸位于同一焦平面上（图 5g）。实验显示了主盖玻片上表面的发光假象（图 5e、5f）、次盖玻片

下表面发光假象（图 5a、5b）。由于薄纸不透光，激光无法穿透薄纸来照亮次盖玻片被薄纸遮住的部分，因此，在次盖玻片的薄纸遮挡区没有发光（图 5a）。

薄纸本身的发光（图 5c、5d），并不受盖玻片发光假象的影响。根据图 5 所示，盖玻片和薄纸完全位于 10×物镜的共焦景深内，其工作距离为 2.56 mm。因此，当样品和盖玻片不在同一焦面时，来自样品的发光信号代表其真实的发光特性。该信号不受盖玻片发光假象的影响。

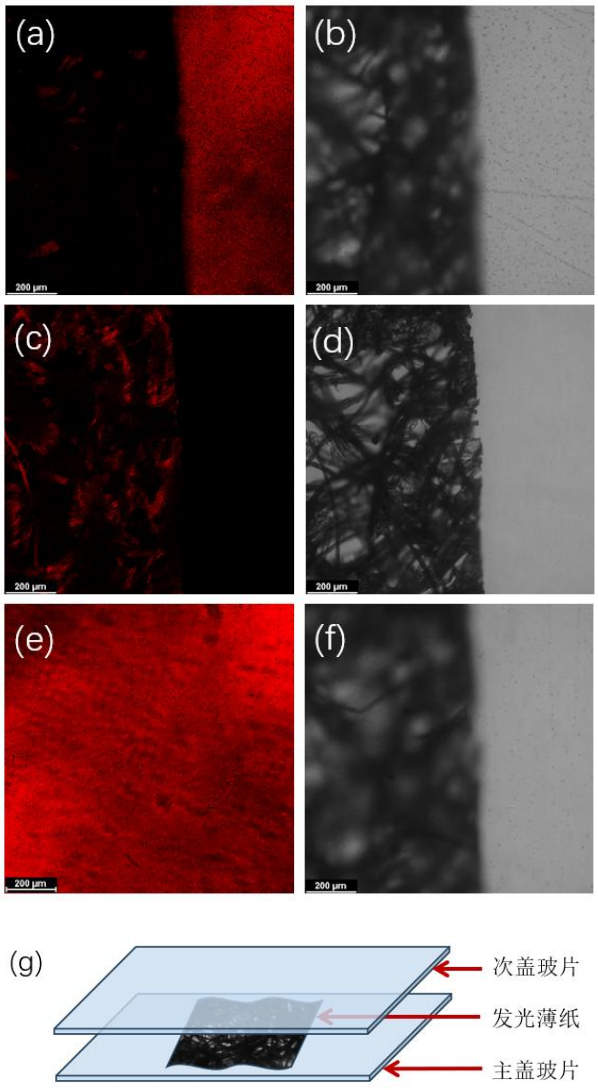


图 5、夹在两个盖玻片之间的薄纸的发光：（a、b）次盖玻片下表面的共聚焦发光假象图像和相应的 DIC 图像，（c、d）薄纸的共聚焦发光图像和相应的 DIC 图像，（e、f）主盖玻片上表面的共聚焦发光假象图像和相应的 DIC 图像，（g）两个盖玻片和薄纸的位置示意图。以上均由 550 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下使用 Stellaris 8 拍摄。

盖玻片本身在可见波长激光激发下不会产生荧光，共聚焦成像中发现的盖玻片发光仅发生在盖玻片的表面，且来源于激光的反射光。盖玻片酸洗与否并不会影响盖玻片的发光假象。盖玻片上滴水、在两片盖玻片间夹发光薄纸均证明盖玻片无论是否和样品处于同一焦平面上，都不会影响样品荧光。样品与盖玻片在同一共聚焦面时，样品区域显示样品的真实发光情况，在无样品区域显示盖玻片发光假象；样品与盖玻片不在同一共聚焦面时，样品显示本身的真实发光情况。因此，无论样品与盖玻片是否处于同一焦平面，均不会影响样品的荧光成像。

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

元素分析仪对总有机碳的定量方法

▶ 李巧连

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

元素分析仪法是一种应用广泛的元素定量分析方法，自二十世纪六十年代问世以来，已逐渐发展成为元素分析的关键技术手段，该技术能够对碳、氢、氮、硫、氧五种元素实现高精度定量分析，广泛应用于化学、化工、材料、医药、石油、地质、农业、食品、环保等众多领域[1]。

元素分析仪对碳元素定量分析的原理为：准确称量的样品用锡杯包裹后，在反应管中高温充氧条件下发生瞬时燃烧，温度达1800°C，在氧化剂的催化氧化作用下，样品中的碳元素全部被转化为二氧化碳气体，随后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得到碳元素的准确含量。此方法得到的碳元素含量为总碳含量（Total Carbon），并不能直接得到其中总有机碳（Total organic carbon，TOC）的含量。

本文采用银杯法对样品进行前处理[2]，将其中无机碳（Inorganic carbon，IC）去除后用元素分析仪进行分析，从而得到总有机碳的含量。

一、实验方法

1、实验试剂与仪器

土壤TOC/TC标准物质B-2176、B-2188（英国Elemental Microanalysis）。

盐酸（BVIII级，北京化学试剂研究所有限责任公司）

电子天平（感量0.001 mg，瑞士Mettler Toledo XP6 ）

元素分析仪（Thermo Scientific Flashsmart）

2、样品前处理方法

银杯法：采用差重法精确称取 4.000 ~20.000 mg 土壤样品于银杯（4 mm×6 mm）中，缓慢滴加 30 μL 浓盐酸（质量分数 36~38%），静置 12 h，再置于 70 ℃烘箱中烘干，用锡杯包裹样品（图 1），利用元素分析仪测定其中总碳及有机碳含量。

$$TC = TOC + IC$$

版权所有中国科学院化学研究所分析测试中心所有

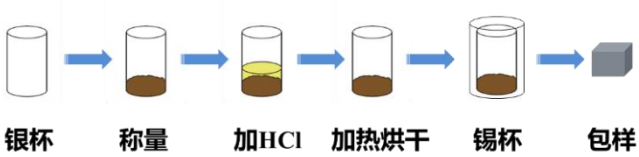


图1、元素分析仪测试有机碳前处理及包样示意图



图2、元素分析仪测试有机碳前处理加酸过程
左：银杯称量样品，中：加盐酸（30 μL），右：60℃烘干

在样品中加入盐酸后，盐酸可与其中的无机碳发生反应生成二氧化碳气体溢出，为了避免样品中挥发性有机碳（Volatile Organic Carbon，VOC）损失，烘干时温度不宜过高。

3、绘制标准曲线及测试未知样品

本文以土壤TOC/TC标准物质B-2176作为标准样品，以土壤TOC/TC标准物质B-2188作为未知待测样品，验证经前处理后有机碳含量测试结果的准确性（见表1）。为了确保测试的准确性，每个样品至少测试2次（见表2）。

表1、标准物质的元素含量

样品编号	C含量(%)	TOC含量(%)	TIC含量(%)
B-2176（Soil Standard-Peaty）	15.52	15.22	0.30
B-2188（Soil Standard-Chalky）	3.98	3.15	0.83

仪器根据标准物质B-2176中碳元素的绝对含量及其对应色谱峰的积分面积自动绘制碳元素的标准曲线，采用K因子法校正标准曲线。通过待测样品B-2188的碳元素色谱峰积分面积与碳元素标准曲线可以计算出待测样品中碳元素的准确含量。直接测试得到的结果为样品中总碳含量，样品经过酸化前处理后测试得到的结果为样品中有机碳含量。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

表2、标准物质及待测样品的样品量

样品编号	样品量(mg)
B-2176-1	5.447
B-2176-2	4.361
B-2176-3	7.251
B-2188-1	16.180
B-2188-2	16.231
B-2188-3 (+HCl)	15.792
B-2188-4 (+HCl)	16.914
B-2188-5 (+HCl)	15.163

二、结果与结论

本次选用的土壤标准物质B-2188总碳及总有机碳理论含量分别为3.98 %、3.15 %。直接测试总碳含量及经过酸化前处理后测试总有机碳含量结果见表3。从表中可见两次总碳含量的平均值为3.90 %，三次总有机碳含量的平均值为3.19 %，与理论值之间误差分别为0.08 %、0.04 %，误差非常小，说明采用银杯法酸化前处理后测试样品中的总有机碳含量准确性很好，该前处理方法简单，样品用量少，测试速度快，重现性好，是一种简单便捷的总有机碳测试方法。

表3、B-2188总碳及总有机碳测试结果

样品编号	C含量 (%)	TC/TOC
B-2188-1	3.94	TC
B-2188-2	3.87	TC
B-2188-3 (+HCl)	3.20	TOC
B-2188-4 (+HCl)	3.19	TOC
B-2188-5 (+HCl)	3.17	TOC

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

参考文献：

1. 王约伯，高敏，《有机元素微量定量分析》，**2013**，*化学工业出版社*。

2. 闵秀云等，基于元素分析仪测定土壤有机碳的不同前处理方法对比研究，*盐湖研究*，**2020**，*28*，4。

仪器及功能介绍

基于液质联用技术 MRM 模式准确定量分析 DNA 中低浓度核苷 5gmC

► 魏金超

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

摘要

本研究成功建立了基于多反应监测（MRM）模式的液质联用（LC-MS/MS）定量分析方法。该方法优化了色谱与质谱条件，实现了对 DNA 样本中 6 种极性相近的核苷，特别是痕量新型修饰核苷—5-甘油基-甲基胞嘧啶（5gmC）的高效分离与准确定量。该方法的检测下限（LOD）可达 0.3 nM，为“稀有 DNA 修饰”相关的甲基化与去甲基化研究提供了关键的数据支撑，有望推动该领域的深入探索。

一、仪器及原理介绍

1.1 液质联用（LC-MS）技术

液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）是一种强大的分析工具，它将液相色谱（LC）对复杂样品卓越的分离能力，与质谱（MS）高灵敏度、高选择性的检测能力完美结合。在 LC-MS 系统中，样品首先经由 LC 分离，随后进入 MS 检测。在质谱部分，分析物被离子化，经质量分析器筛选和检测，最终得到能够反映其分子量与结构信息的质谱图。凭借其独特优势，LC-MS 技术已在药物分析、食品安全和环境监测等领域获得广泛应用。

1.2 电喷雾离子源（ESI）

电喷雾离子源（ESI）是 LC-MS 中最常用的离子化技术之一。其核心原理是利用强电场将样品溶液雾化为带电液滴，通过溶剂的不断蒸发，最终形成气相离子。该过程主要包括三个阶段（如图 1 所示）：带电液滴形成，样品溶液以低流速通过带有高电压（2~5kV）的毛细管。在强电场作用下，液体在毛细管尖端形成一个被称为“泰勒锥”的锥形结构[1]。液滴收缩与库仑爆炸：当泰勒锥尖端的液滴达到“瑞利极限”（即表面电荷的库仑斥力与溶液表面张力相当的临界点）时[2]，会喷射出带电液滴。随着溶剂蒸发，液滴收缩，电荷密度增大，当再次超越瑞利极限时，液滴会发生“库仑爆炸”，裂变成更小的子液滴[3]。气相离子产

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

生：上述过程循环往复，最终使分析物分子完全脱溶剂化，形成气相离子，进入后续的质量分析器进行检测。

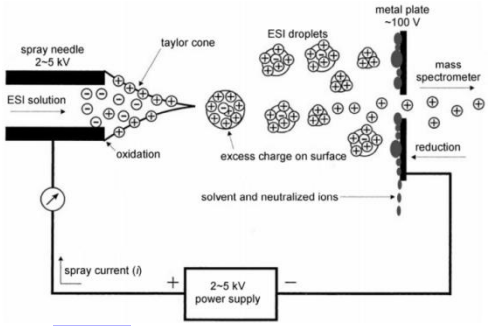


图 1、电喷雾离子化过程示意图

1.3 QTRAP 介绍

QTRAP 是一种基于三重四极杆（Triple Quadrupole，QqQ）并整合了线性离子阱（Linear Ion Trap，LIT）技术的高端串联质谱仪，能同时提供超高灵敏度的定量和定性分析数据。其结构如图 2 所示，Q1 和 Q3 为质量分析器，Q2 为碰撞室。其独特之处在于，第三个四极杆（Q3）既可用作传统的质量过滤器，也能作为线性离子阱（LIT）捕获和积累离子，从而显著提高检测的信噪比和定性能力。因此，QTRAP 质谱仪不仅保留了三重四极杆的所有扫描模式，如子离子扫描、母离子扫描、中性丢失扫描和多反应监测（MRM），还具备了离子阱的增强扫描功能，实现了定量“”与“定性”能力的高度统一。

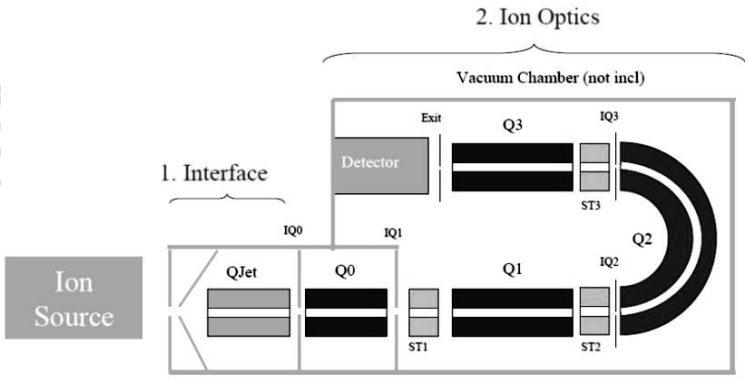


图 2、 QTRAP 4500 的基本构造示意图

1.4 MRM 原理介绍

多反应监测（MRM）是一种高选择性、高灵敏度的靶向定量技术，其原理如图 3 所示。核心流程如下：选择母离子：第一个四极杆（Q1）设定为只允许目

标分析物的特异性母离子通过。碰撞诱导解离：母离子进入碰撞室（Q2），在与中性气体（如 N_2）碰撞后，发生碎裂，产生一系列碎片离子。选择子离子：第三个四极杆（Q3）设定为只允许目标分析物的特征碎片离子通过并到达检测器。由于 Q1 和 Q3 的双重质量筛选，MRM 模式能够极大地排除基质干扰，实现对复杂混合物中痕量组分的精准、快速鉴别与定量。

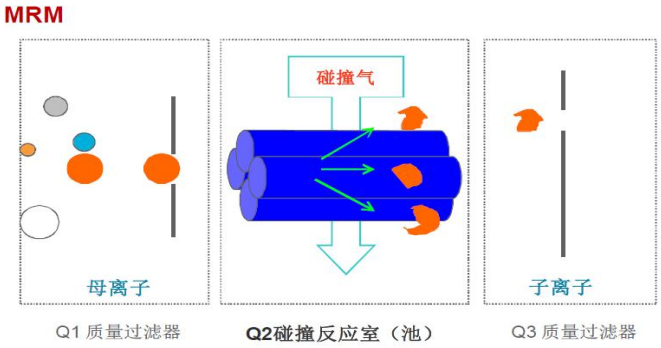


图 3、 MRM 原理示意图

二、LC-MS/MS 定量检测 DNA 中 5gmC 的准确定量分析

2.1 研究背景

2019 年《Nature》发表的一项研究报道称[4]，莱茵衣藻中的 5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine，5mC）可被 TET 同源蛋白 CMD1 氧化，生成一种全新的 DNA 修饰产物—5-甘油基-甲基胞嘧啶（5-glyceryl-methylcytosine，5gmC）。这一发现揭示了 5gmC 可能在一定程度上拮抗 5mC 介导的基因沉默，是 DNA 去甲基化领域的一项重大突破。然而，由于 5gmC 在细胞内含量极低，对其消除机制、识别蛋白等生物学功能的研究受到了极大限制。为了解决这个难题，科研人员用全合成的手段合成了 5gmC[5]（如图 4），并用其来孵育细胞，通过提取 DNA 并将其消化成核苷，最终得到 5gmC 浓度在 1 nM 左右的样本，本研究旨在建立一种高灵敏度的检测方法，以支持后续的功能探索。

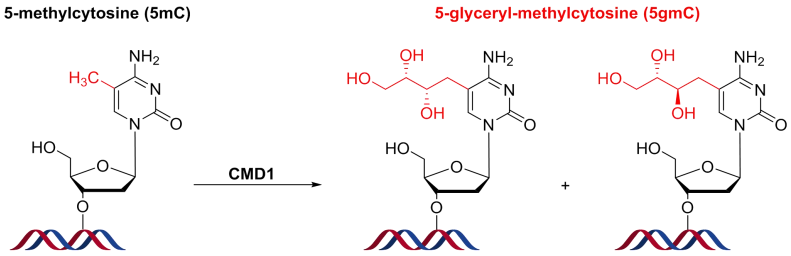


图 4、 5gmC 的全合成路线图[5]

2.2 实验方法与条件优化

本研究采用 API 4500 QTRAP 质谱仪，通过优化一系列质谱和色谱参数，对 6 种极性相近的核苷（dA、dG、dC、dT、5mC、5gmC）进行分析。

色谱条件：色谱柱：ACQUITY UPLC BEH amide column (1.7 μm; 2.1 mm×100 mm)，柱温：30 ℃，进样量：5 μL，流速：0.5 mL /min，流动相为 72 %水（5mM 醋酸铵溶液含 0.1% 甲酸）和 28%乙腈（含 0.1% 甲酸）恒梯度。

质谱条件：ESI 离子源，雾化气与脱溶剂气均为 N_2，气帘气（CUR）25，碰撞气（CAD）为中等能量，雾化气（GS1）45，脱溶剂气（GS2）50，正离子 MRM 模式下电喷雾电压 5500 V，温度 250 ℃。

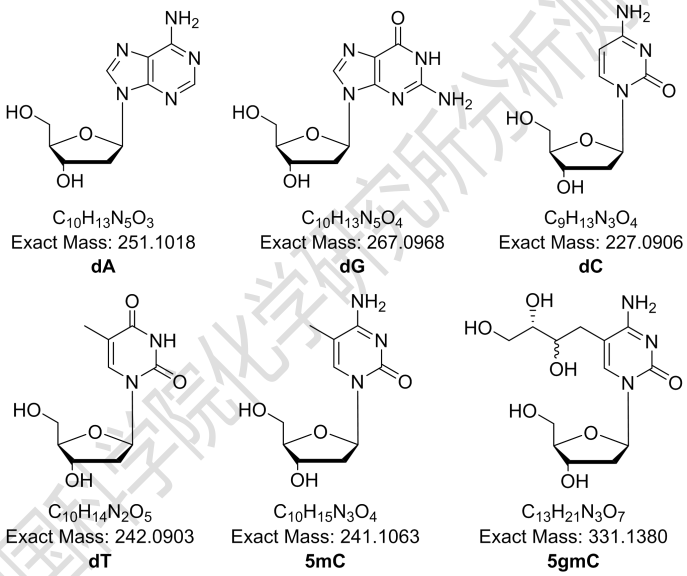


图 5、 6 种核苷标准品的化学结构图

针对每种核苷，我们优化了其去簇电压（DP）和碰撞能量（CE），以获得最佳信号响应（见表 1）。

表 1 、检测 6 种核苷的 MRM 质谱参数

母离子 Q1（Da）	碎片离子 Q3（Da）	ID	DP（volts）	CE（volts）
252.0	136.1	dA	40	20
268.0	152.1	dG	20	15
228.0	112.0	dC	30	15
243.1	127.1	dT	40	15
242.1	126.0	5mC	40	15

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

332.2	216. 1	5gmC	40	20

注：DP 为去簇电压；CE 为碰撞能量

通过上述优化，成功实现了 6 种极性相近且浓度极低的核苷（dA、dG、dC、dT、5mC、5gmC）的有效分离（图 6），其中目标物 5gmC 的最低检测下限（LOD）达到了 0.3 nM，充分满足了生物样本中痕量检测的需求。

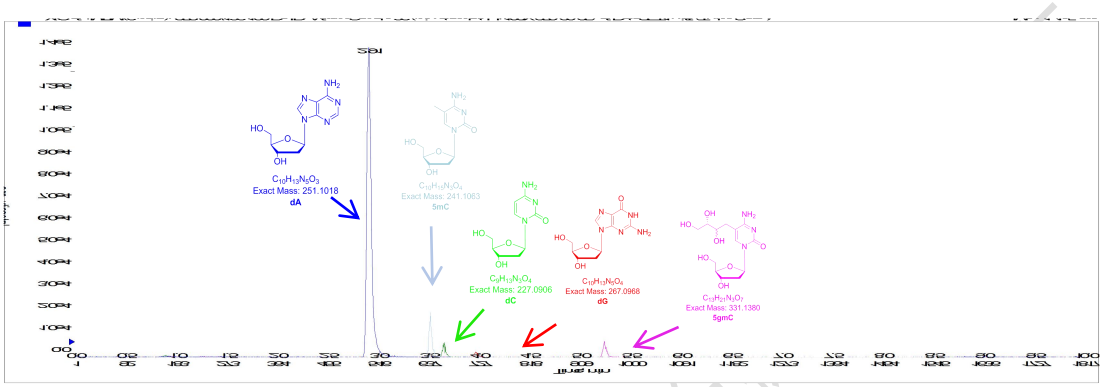
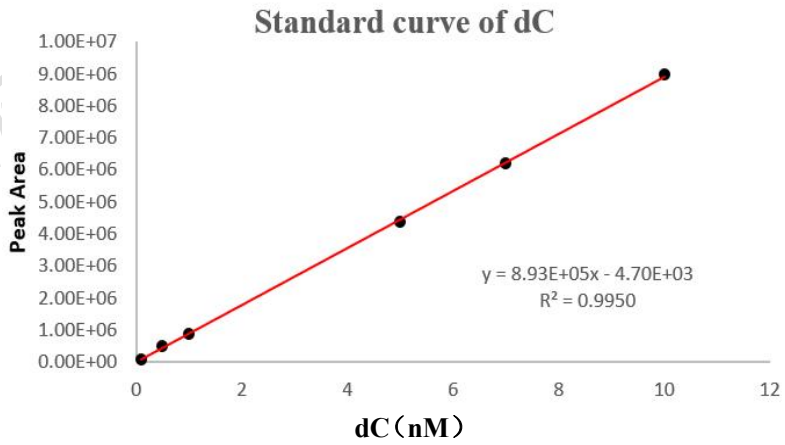


图 6、 MRM 模式 dA、dG、dC、 5mC 和 5gmC 的萃取离子流图[5]

2.3 建立标准曲线

为实现准确定量，本研究配制了一系列浓度的 dC 和 5gmC 标准品，并建立了标准曲线。如图所示，dC 和 5gmC 在考察的浓度范围内均表现出良好的线性关系，其相关系数（R^2）分别达到 0.9950 和 0.9997，证明了该方法的可靠性、准确性和宽广的线性范围。



版权

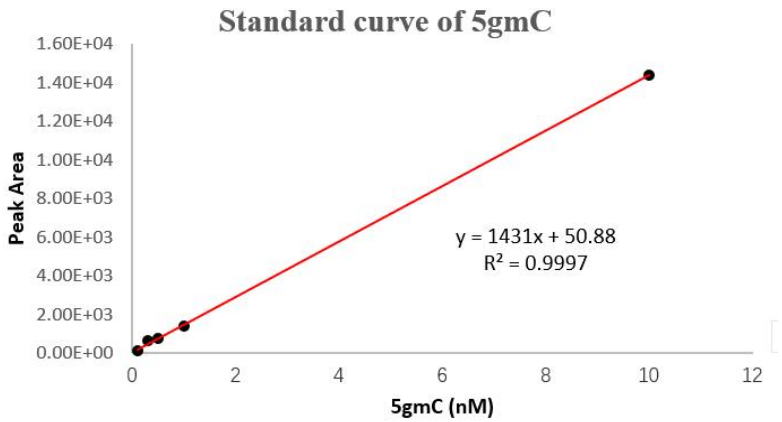


图 7、 dC 和 5gmC 的标准曲线图[5]

2.4 结论

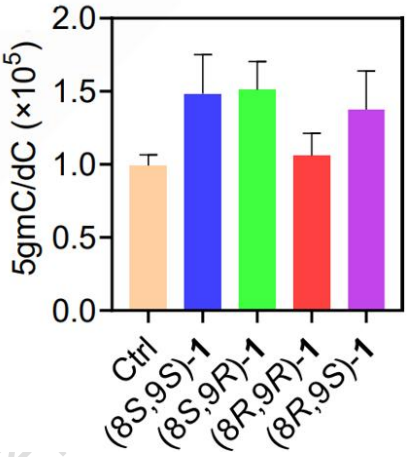


图 8、 DNA 中 5gmC 的动态变化[5]

本研究基于液质联用 LC-MS/MS 的 MRM 模式，成功建立了一套高效、灵敏的定量分析方法，能够对 DNA 样本中痕量 5gmC 进行准确定量。该方法的建立，不仅可以清晰地监测 5gmC 的动态变化（图 8），也为深入探索 DNA 甲基化与去甲基化调控机制，特别是与“稀有 DNA 修饰”相关的生物学问题，提供了关键的技术支持，有望推动该领域的深入探索。

参考文献：

1. N. B. Cech, C. G. Enke*. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*. **2001,** 20, 362.

2. D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis*. Electrified droplet fission and the rayleigh limit. *Langmuir.* **1989,** *5*, 376.

3. R. B. Cole. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry.* **2000,** *35*,763.

4. Xue J H, Chen G D, Hao F*, et al. A vitamin-C-derived DNA modification catalysed by an algal TET homologue . *Nature,* **2019,** *569*,581.

5. Zhao L W, Xu J X, Liu G, He Y M, J Nafie, Wu C S, Wei J C, Liu L,Tang H R , Huang K Y , Xu G L, Cheng L*. Total synthesis of all stereoisomers of C5-glyceryl-methyl-2'-deoxycytidine 5gmC and their occurrence in Chlamydomonas reinhardtii. *Cell Rep. Phys. Sci.,* **2024,** *5*, 102041.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

台式 X 射线吸收精细结构谱仪介绍及应用

▶赵志娟 章小余 屈宝龙

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

X 射线吸收精细结构（X-ray Absorption Fine Structure，XAFS）谱学技术源自同步辐射光源的发展，凭借其对局域电子结构与原子近邻配位环境的高敏感性，已成为材料科学、化学、催化、能源等领域不可或缺的先进表征手段。传统 XAFS 测试依赖大型同步辐射装置，受限于机时紧张、实验周期长及样品环境复杂等瓶颈，难以满足常规科研的高频次、快速反馈需求。近十年来，随着微焦 X 射线源、高分辨率晶体分析器与硅漂移探测器（SDD）等关键技术的突破，国际国内台式 XAFS 仪器相继应运而生，实现了实验室级别下高信噪比、高能量分辨的 XAFS 测量，显著提升了科研的自主性与通量。

XAFS 原理基于 X 射线与物质相互作用的基本物理过程：当入射 X 射线能量达到某一元素的吸收边阈值时，其内层电子被激发生成光电子，该光电子在向外传播过程中受到邻近原子的散射，导致出射波与散射波发生干涉，从而调制 X 射线吸收系数，形成精细的振荡结构。XAFS 技术因其对短程有序结构高度敏感且不依赖长程周期性，特别适用于非晶、纳米、表面/界面及低浓度掺杂体系的结构解析，是 XPS、XRD 与 TEM 等技术的重要补充。典型的 XAFS 谱可分为两个关键区域：

X 射线吸收近边结构（XANES）：涵盖吸收边前约 10 eV 至边后约 50 eV 范围，对元素价态、空轨道占据情况、对称性及杂化状态高度敏感。每一种元素都有其特征的吸收边系，因此 XANES 可用于元素的定性分析。此外，吸收边的位置与元素的价态相关，氧化态增加，吸收边会向高能端移动（一般化学价+1，吸收边移动 2~3 eV），对于同种元素，通过吸收边位移可直接反映过渡金属氧化态的变化。

扩展 X 射线吸收精细结构（EXAFS）：位于吸收边后 50~1000 eV 区间，主要反映光电子的单次散射信息，通过傅里叶变换与拟合分析，可定量获得吸收原子与配位原子之间的配位数、键长、配位种类及无序度（Debye-Waller 因子），空间分辨可达 0.01~0.02 nm。

欢迎访问中国科学院化学研究所分析测试中心网站

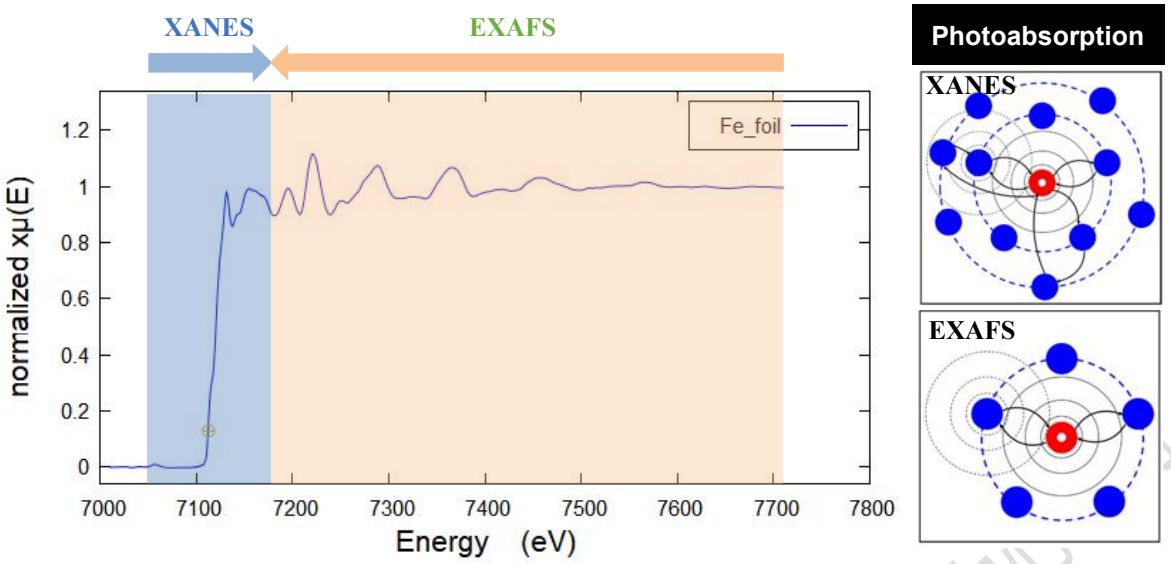


图 1、 典型的 Fe 元素 X 射线吸收谱（图片来源：J. Am. Chem. Soc., 2025, 147, 36494）

由于同步辐射光源资源有限，为突破大型光源的使用限制，多年来全球范围内加速推进台式 XAFS 系统研发。当前主流技术路线包括微焦斑 X 射线管+多层膜单色器、毛细管聚焦 X 射线源以及预单色固定能量 X 射线管等。其中，基于 Johann 或 Johansson 几何构型的弯曲晶体分析系统结合偏振 X 射线源（如 Mo Kα）与多通道 SDD 探测器，已成为高性能台式设备的核心架构。

在进口设备方面，代表产品如 EasyXAFS 系列，在 Cu、Fe、Ni、Pt 等元素 K 边已实现接近同步辐射的数据质量；另外，Sigray 公司的台式仪器在 X 射线光源上也有专利性的技术优势。在国产设备方面，近年来也取得显著突破。多家科学仪器公司（如安徽吸收谱仪、安徽创谱、国创科学仪器等）在政府的大力支持下，与国内顶尖科研院校合作，致力于 X 射线科学仪器的自主研发与产业化。国内公司聚焦台式 XAFS 谱仪的工程化开发，围绕“原理匹配性、性能可靠性、场景适配性、服务可持续性”四大核心维度，构建国产中高端 XAFS 仪器的选型与应用体系。目前，国产设备在能量分辨（目前约 1~2 eV）、微区聚焦能力（空间分辨率约 50 μm）等方面已达到国外同类产品的性能水平，尤其在性价比、本地化服务响应（24 小时技术支持、365 天服务承诺）和定制化适配方面展现出更明显优势，正逐步进入高校、科研院所及企业研发中心，推动 XAFS 技术的普及化与自主可控。

目前已实现商业化的高端设备集成高亮度微焦 X 射线源或双束 X 射线源、精

密单色系统与低噪声探测模块，支持透射与荧光模式切换，适用于粉末、薄膜、液体等多种样品形态，并已在催化材料价态演化、电池界面反应原位监测等场景中实现良好的应用验证。

下面介绍几个典型的台式 XAFS 设备应用实例。

应用实例一：双金属纳米结构催化剂构效关系解析

研究人员利用柯肯达尔效应构筑了一种 Cu/Ru 异质界面空心纳米结构催化剂[1]。该结构通过“界面效应—级联催化—纳米限域”的协同作用，有效降低了硝酸盐电还原制氨过程中的能垒并加快中间体转化。在关于催化剂电子结构演变、界面电荷转移及反应机理的深入分析中，研究人员利用台式 XAFS 仪器对催化剂在反应过程中的电子结构演变进行了实时原位追踪（图 1），确认了 Cu 在反应中保持金属态，并在负电位下表现出电子富集，有利于 NO_3^- 的吸附与活化；结合 XPS 等表征方法以及 DFT 计算充分揭示了 Cu 向 Ru 的电子转移行为，系统阐明了三重协同机制对提升 NO_3^-电还原制 NH_3 效率的关键作用，为其高效催化性能提供了有力支撑。

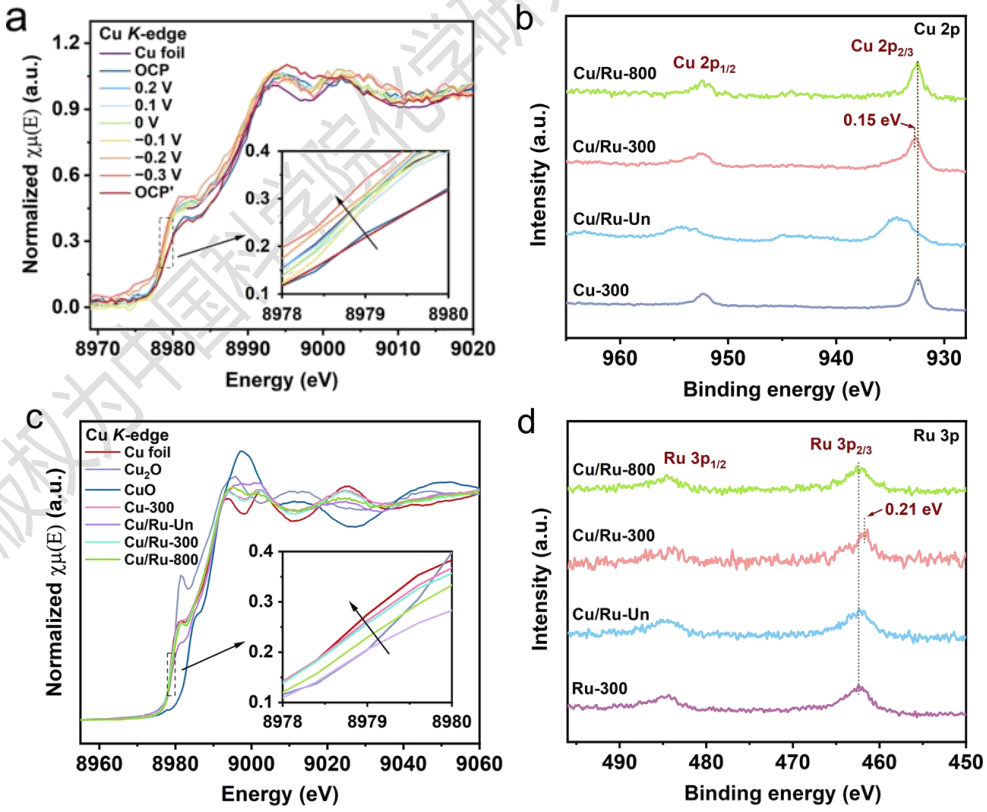


图 2、Cu/Ru 异质界面空心纳米结构催化剂结构与电子性质（图片来源：*Adv. Funct. Mater.*, doi.org/10.1002/adfm.202525702）

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

应用实例二：单原子锚定高熵氧化物界面电场工程对硫锂电池性能的影响

锂硫电池在极端充电条件下，存在多硫化物穿梭效应和缓慢的硫氧化还原动力学难题，制约着其实际应用。对此，研究人员创新性地将单原子 Cu 锚定在高熵氧化物（PHEO）上，利用二者逸出功差异成功构建了界面内建电场，该电场通过重排电荷密度、优化电子态，极大地加速了锂硫电池中 Li_2S 的氧化分解动力学，从而成功实现了锂硫电池的极端快速充电[2]。在该研究中，利用台式 XAFS 仪器对 Cu 的电子结构及其配位环境进行了深入分析（图 2），确认了 Cu 的原子级分散，且 Cu 原子并非取代钙钛矿 ABO_3 中 B 位阳离子，而是通过 Cu-O-M 键锚定在 PHEO 表面，形成了配位不饱和的活性位点。此外，对 B 位金属进行 XAFS 分析表明，这些金属中心的电子密度降低，电子被部分抽走，在引入 Cu 单原子后，它们的 M-O 键长发生了系统性增长，有力证实了 Cu 锚定导致的电子离域和电荷密度重排。

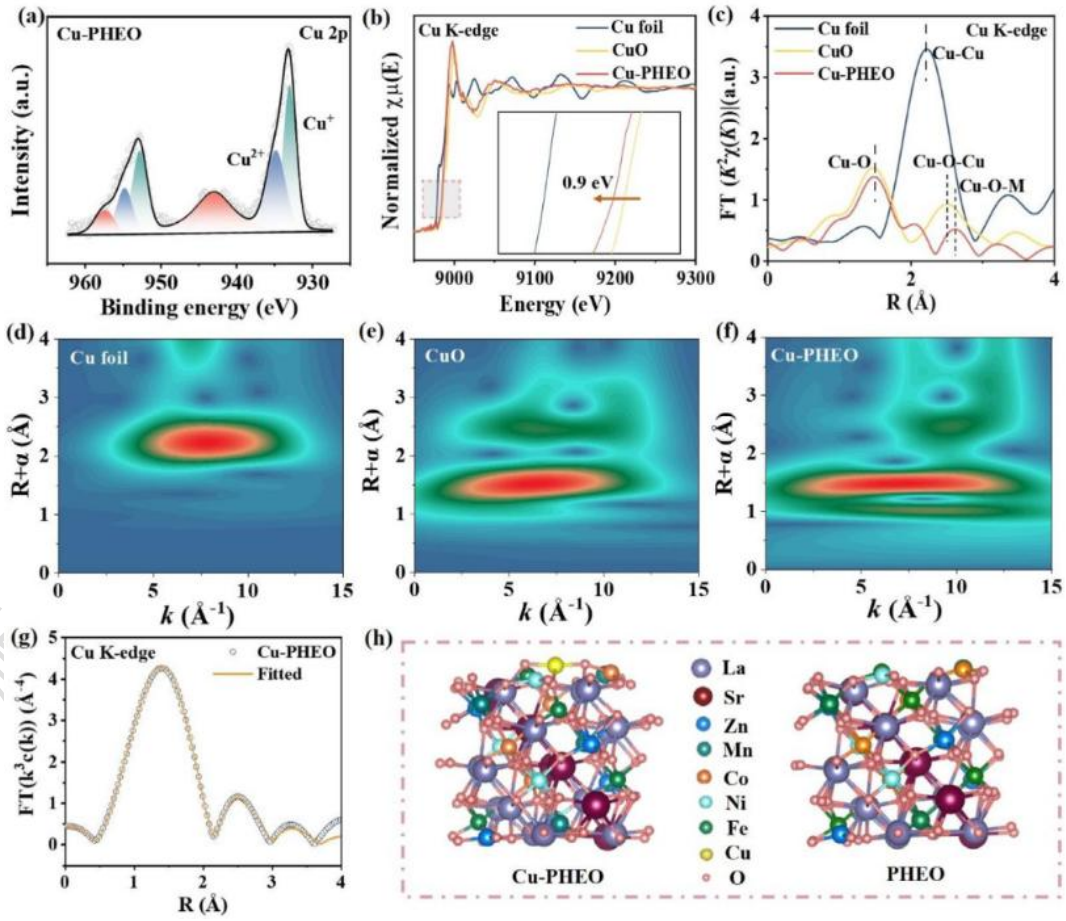


图 3、Cu-PEHO 中 Cu 元素的 XPS 与 XAFS 相关谱图（图片来源：ACS Catal., 2025, 15, 16165）

应用实例三：$TiNO_x$ 调控 FeCo 合金催化机制研究

在多相催化中，双金属纳米粒子的尺寸和组成对催化剂的反应性能至关重要，然而控制双金属纳米粒子的成核是一个巨大的挑战。研究人员通过对 TiN 载体进行 O 原子功能化处理来调控纳米粒子的生长，从而形成均匀分散的双金属合金提高催化反应活性[3]。在关于 Co-Fe 双金属催化剂相变与载体之间的关系研究中，利用台式 XAFS 仪器对合金元素进行局域结构分析，结果显示 FeCo/TiN-O-2 中 Co-Fe 键形成，且电子由 Fe 向 Co 转移，验证了合金结构的电子效应（图 3）。在费托合成反应中，$Co_{0.7}Fe_{0.3}$ 合金纳米颗粒表现出最佳的催化性能，XAFS 分析为深入理解催化体系中 Fe-Co 催化剂的结构与催化活性关系提供了直接的证据。

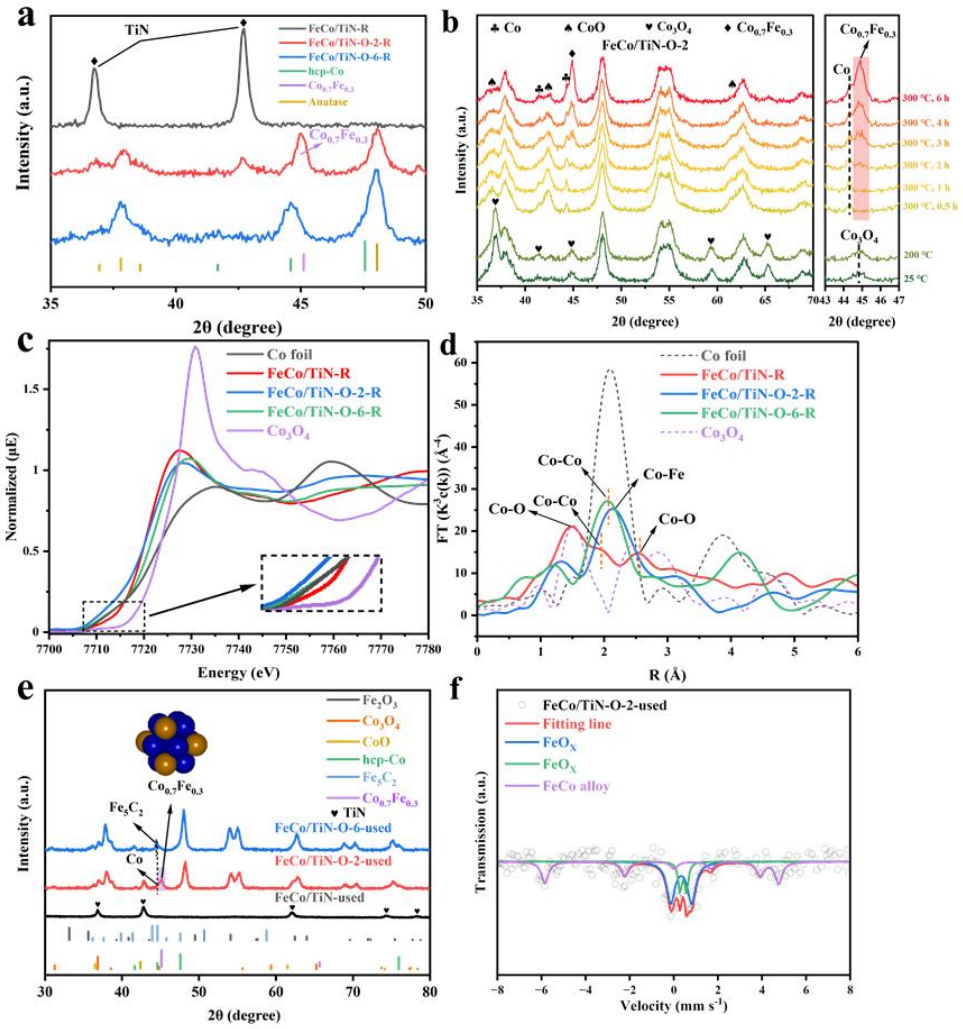


图 4、解析双金属催化剂的相态与结构演变

这些典型应用案例充分表明，台式 XAFS 仪器不仅具备与同步辐射方法高度一致的结构解析能力，更以高通量、低门槛、原位兼容等优势，成为材料研发中

“结构—性能”关系研究的利器，将台式 XAFS 仪器纳入常规表征体系，尤其在催化剂设计、储能机制、环境行为等方向，可以实现从“看到”到“理解”材料微观世界的跨越。

尽管台式 XAFS 在轻元素（如 C、N、O K 边）与低浓度样品（< 0.5 wt%）检测方面仍具挑战，但随着探测器效率与数据反演算法（如 FEFF、Demeter）的持续优化，其应用边界将不断拓展。随着国家对高端科学仪器自主可控的战略推动，大大促进了国产化加速与技术迭代。国产台式 XAFS 设备将在光源亮度、能量分辨、微区聚焦与自动化程度等方面持续升级，未来有望实现 5~10 μm 级微区 XAFS（μ-XAFS）能力，拓展至环境颗粒物、生物组织切片等复杂样品的 mapping 分析。此外，台式 XAFS 设备的发展将不仅局限于吸收谱，更将拓展深化与 X 射线发射谱（XES）的联合应用。XES 通过探测 X 射线激发后特征荧光的发射能量与线型，可提供关于价电子结构、轨道杂化、电荷转移通道等互补信息。例如，Kβ XES 对过渡金属的 3d 电子态高度敏感，结合 XANES 可实现氧化态与共价性的解耦分析；VtC-XES（valence-to-core）甚至可间接反映配体的价层电子分布。台式 XAFS/XES 深度联用将有望在实验室级别实现“吸收—发射”二维谱学分析，构建更完整的电子结构图谱，为新型催化剂设计、量子材料研究提供前所未有的洞察力。伴随智能化与多模态融合的发展趋势，结合原位气-固反应池、电化学池与温控装置，台式 XAFS 将更深度融入原位/工况表征平台，并与 XPS、XRD、Raman、MS 等技术联用，实现多维度、多尺度的动态结构解析。

化学所分析测试中心光电子能谱组在 2025 年底引入了一台国产台式 X 射线精细结构谱仪（型号：RapidXAFS 1M），并于 2026 年 1 月正式对全所开放，测试项目包括 XAFS、XES 和原位测试等。目前该仪器采用专人管理测试，接收送样模式。

该仪器配备 2.0 kW 的 X 射线源（Mo 靶），16 块单色器晶体。常规工作模式为透射式 XAFS，目前检测元素范围包括：Ti、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、Se、Kr、Sr、Y、Hf、Ta、W、Ir、Pt、Pb、Bi、La、Ce、Sm、Eu、Gd、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、Lu、Th、U、Np、Pu。可提供以下测试信息：（1）指定元素的近边吸收谱（XANES），用于分析元素的化学状态和价态；（2）扩展边吸收谱（EXAFS），用于分析目标元素原子局域环境的配位结构以及配位原子

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

种类、无序度等；（3）X 射线发射谱（XES），用于分析原子的氧化态、自旋态、质子化状态等信息。送样要求：样品无毒，粉末样品粒径 ≤ 50 μm，样品量不少于 0.2 g；块体薄膜厚度需满足透射测试要求；原位测试样品需要先到实验室进行评估。

该仪器技术参数如下：

1.XAFS 能量范围 5~20 keV，可扩展至 25 keV；

2.能量分辨≤1.5 eV（7~9 keV），布拉格角范围 55~85°；

3.重复性≤30 meV@24 h，无需重复的单色仪校准；

4.检测器处单色 X 射线有效计数率≥2×106 photons/sec（7~9 keV）；

5.XES 能量分辨 ≤2.0 eV（7~9 keV）；

6.XES 重复性 ≤30 meV 能量尺度漂移；

7.可实现二次电池、原位电催化、原位光催化实验。

参考文献：

1. Chen, S.Q., Zhu, Z.H., et al., Engineering Cu/Ru Heterointerface-Shelled Nanocavities by the Kirkendall Effect for Highly Efficient Nitrate Electroreduction to Ammonia. *J. Am. Chem. Soc*., **2025**, *147*, 36494.

2. Zhang, C., Wang, D.,et al., Enabling Extreme Fast-Charging Lithium-Sulfur Batteries via Interfacial Electric Field Engineering on Single-Atom-Anchored High-Entropy Oxides, *Adv. Funct. Mater.,* **2025**, e25702(1-12)

3. Zhao, Y.X., Wu, Caiyan Long,et al. Engineering Support Surface to Form Metal Alloy via Atom Migration for Efficient CO Hydrogenation, *ACS Catal*., **2025**, *15*, 16165.

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

片层选择性核磁技术在界面化学中的应用介绍

▶崔 洁 向俊锋

(分析测试中心核磁组 Email: cuijie@iccas.ac.cn)

界面化学是化学的重要分支，主要研究不同相之间的界面现象与界面反应，涉及萃取、相转移、电化学界面等多个方向，在能源催化、材料科学及环境工程等领域具有广泛应用。然而，界面区域通常极其微薄、动态变化且性质不均，传统分析技术难以在真实或接近真实条件下实现对其高分辨、非破坏性的表征。更进一步的挑战在于，界面研究往往需要同步完成多组分分离、反应实时监测与结构解析，这与传统高分辨核磁共振技术对磁场均匀性的严格要求相矛盾。

片层选择性核磁技术（Slice-selective NMR）通过结合选择性射频脉冲与脉冲梯度场[1]，具备了独特的空间分辨能力。该技术可定位核磁样品管中的特定区域，获取薄层切片内的氢谱信息（图 1）。由于薄层内部磁场均匀性显著高于宏观样品，谱图分辨率得到大幅提升，从而为界面研究提供了新的表征途径。

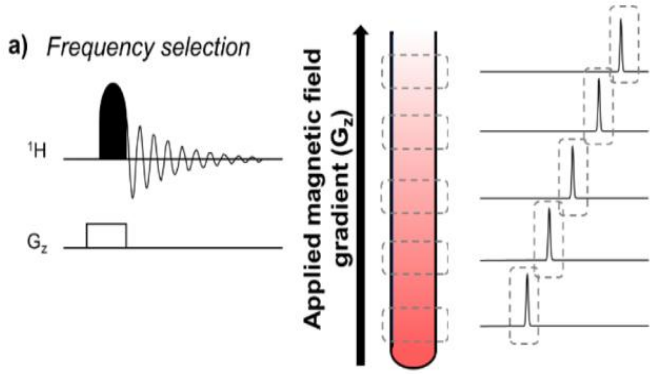


图 1、片层选择性核磁共振技术原理示意图

版权为中

该技术的核心机制在于空间定位与频率选择的结合。在 Z 轴方向施加梯度脉冲（G_z）时，原子核所感受的磁场强度与其轴向位置 Z 相关，表达式为：

$$B_z = B_0 + Z \cdot G_z$$

即在样品中实现了位置的“编码”。样品管中心处磁场为 B_0 ，沿轴向向上或向下磁场强度相应增减。随后施加的频率选择性激发脉冲，仅对特定频率范围

的核进行激发，由于不同位置对应的共振频率不同，从而实现了以 Z 为中心、厚度为 $\Delta Z = Z_1 - Z_2$ 截面的选择性激发。频率偏移Ω与激发带宽$\Delta\nu$可分别表示为：

$$\Omega = \nu_z - \nu_0 = \frac{Z \cdot \gamma \cdot G_z}{2\pi}$$

$$\Delta\nu = \nu_1 - \nu_2 = \frac{(Z_1 - Z_2) \cdot \gamma \cdot G_z}{2\pi}$$

片层选择性技术凭借其空间定位与分辨增强的优势，结合核磁共振无损检测的特点，为界面研究中的多项困难提供了解决方案。该技术已在多项界面体系中得到成功应用。例如，Volker Deckert 团队在《德国应用化学》上发表的研究中[2]，利用空间分辨核磁共振技术对水-苯液-液界面进行了高分辨原位探测。通过非接触式移动探测薄层，清晰区分并追踪了界面过渡区内苯与水信号的演变，直观揭示了组分空间分布。扩散测量进一步表明，界面处分子的垂直扩散系数显著降低（约为体相的五分之一）（图 2），证实了各向异性扩散行为，从而减轻了扩散对空间分辨率的限制。该工作首次在纳米尺度实现了对原始液-液界面的化学分辨原位表征，为界面结构与动力学研究提供了新手段。

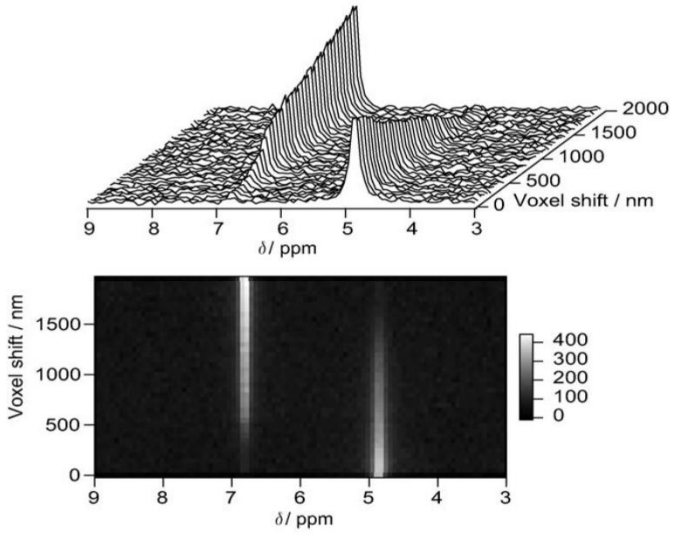


图 2、苯-水体系片层选择性^{1}H NMR 谱图的空间剖面展示（伪三维图）。谱图从左至右表示探测单元（250×250×1 μm³）以 50 nm 步长从苯相经界面进入水相的过程；约 20 个连续位置同时出现苯与水信号，与 1 μm 厚度和 50 nm 步长相吻合[2]。

Michel Bardet 团队在《磁共振化学》上报道的研究中[3]，片层选择性技术被应用于三类典型体系：在含圆柱形插入物的 4-甲基水杨酸溶液模型中，实现了对

局部结构的清晰空间分辨（图 3）；在 D_2 O/橄榄油双相体系中，直接测定界面位置及邻近浓度分布；在蔗糖溶解动力学体系中，实时观测浓度梯度变化并计算扩散系数（2.21×10^{-10} m^2/s）。这些结果共同表明，该技术能有效获取界面浓度分布、解析相结构并监测动态过程，为界面与扩散动力学研究提供了原位分析工具。

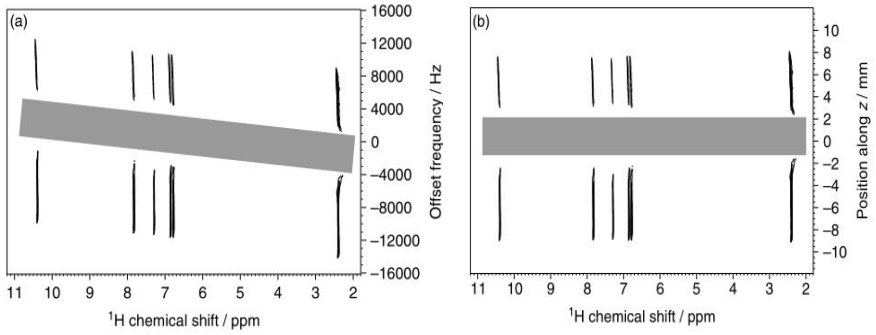


图 3、对含特氟龙圆柱体样品的高分辨空间定位（切片厚度约为 170 μm）

Jason E. Hein 团队在《有机化学杂志》中报道了片层选择核磁在复杂反应混合物液-液萃取（LLE）分析中的应用[4]。该技术实时揭示了各组分在两相间的分配行为：未反应起始物完全进入有机相，副产物 N-甲基吗啉完全进入水相，目标物二醇与叔丁醇则分配于两相之间（图 4）。研究进一步表明，使用乙酸乙酯、萃取前稀释反应液、以及采用盐水代替纯水，均可显著提高目标产物在有机相的保留率。基于上述信息，研究者快速优化出最佳的后处理方案—先以乙酸乙酯稀释，再以盐水萃取，从而大幅提升产物的回收效率。该方法以微量样品和快速实验替代了传统试错式萃取方法，为合成化学提供了直观、高效的流程诊断工具。

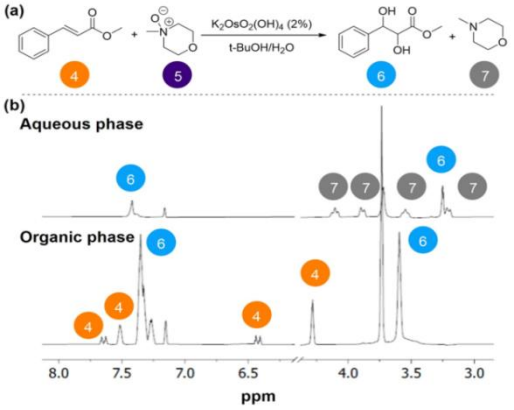


图 4、（a）测试所用 Sharpless 双羟化反应（b）萃取两相中各组分的片层选择性 NMR 谱图示例

版权为中国化学会研究所分析

基于上述文献基础，核磁组在 600 兆液体核磁共振谱仪（配备 50 G/cm 梯度场）上开展了该方法的应用探索。探头的梯度场强可以满足片层选择性技术的实施要求，可实现微米级薄层的选择性激发。在模型体系（水相为葡萄糖水溶液及有机相为乙酸乙酯的氯仿溶液组成的双相体系）中已获得良好的片层选择性与高分辨谱图（图 5）。

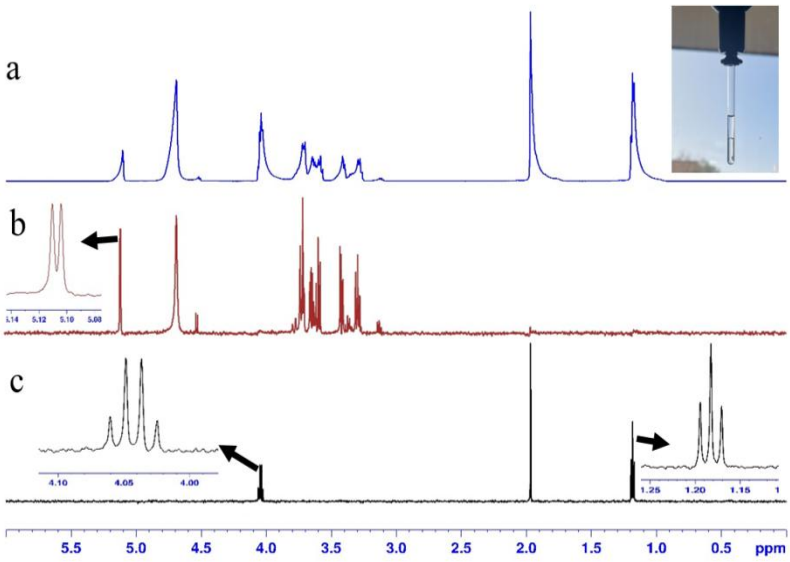


图 5、 水-有机双相模型体系的片层选择性^{1}H NMR 谱图（切片厚度约 50 μm）：（a）常规方法（激发并检测区域内全部样品）的^{1}H NMR 谱图（b）对应上层水相区域的片层选择性^{1}H NMR 谱图（c）对应下层有机相区域的片层选择性^{1}H NMR 谱图

片层选择性技术本质上是一种“虚拟切割”手段与丰富核磁共振检测能力的结合，与传统的核磁方法形成鲜明对比[5]。该技术有望广泛应用于课题组的双相萃取过程监测、特定界面反应研究、锂离子电池电解质离子传输分析以及多相催化体系表征等领域，为相关前沿科研提供坚实的技术支持。

欢迎感兴趣的课题组联系我们，期待与您交流合作。

参考文献：

1. Jean-Nicolas Dumez, Spatial encoding and spatial selection methods in

high-resolution NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2018**, *109*, 101.

2. Volker Deckert., et al., Probing Liquid–Liquid Interfaces with Spatially Resolved NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6343，

3. Michel Bardeta Study of liquid-liquid interfaces by an easily implemented localized NMR sequence. *Magn. Reson. Chem.*, **2010,** *48,* 600.

4. Yael Ban-Tal and Jason E. Hein, Slice-Selective NMR for Quantitative Analysis of Liquid−Liquid Biphasic Systems: A Tool for Organic Chemists. *J. Org. Chem.*, **2025,** *90,* 7832.

5. Zhong Chen., et al., High-resolution NMR spectroscopy in inhomogeneous fields. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2015**, *90,* 1.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心

原位扫描电子显微镜技术的应用

▶袁 扬 关 波

（分析测试中心电镜组 Email: yuanyang@iccas.ac.cn, guanbo@iccas.ac.cn）

一、概述

原位扫描电子显微镜（*In-situ* scanning electron microscope, *In situ* SEM）将高空间分辨率成像能力与原位环境调控技术相结合，能够在模拟实际工况或特定外界刺激下对材料进行观测。该技术突破了传统扫描电子显微镜只能进行“静态观测”的限制，实现了调控-表征一体化，可在微观结构演变与宏观性能响应之间建立直接关联，为揭示材料内在机理提供了动态研究手段。与传统 SEM 相比，*In-situ* SEM 的核心优势在于：一方面可模拟温度、力学载荷、电场、化学气氛等工作环境；另一方面能够捕捉相变、裂纹萌生与扩展、晶粒生长、界面演化等微观结构的动态演变过程[1-2]。

In-situ SEM 的发展与扫描电子显微镜技术、原位环境调控技术的进步密切相关。20 世纪 60 年代, SEM 实现商业化后,研究人员开始探索在 SEM 中引入环境调控装置,早期主要以单一力学载荷或温度调控为主，分辨率较低（微米级），仅能观察较为缓慢的宏观变化。20 世纪 90 年代至 21 世纪初，随着电子光学技术的突破, SEM 的空间分辨率提升至纳米级，同时原位样品台的设计日趋精密,实现了温度、力学载荷的精确控制,开始应用于金属材料的形变机制、高分子材料的相变等研究。该阶段的标志性进展是多参数协同调控概念的提出，为后续多场耦合原位技术奠定了基础。

In-situ SEM 在过去十年进入快速发展期：一方面，原位控制能力得到增强, 实现了多场耦合控制, 如力-热-电-化学-气氛的协同调控; 另一方面, 表征维度不断扩展，结合能谱分析（Energy-dispersive X-ray spectroscopy，EDS）、电子背散射衍射（Electron backscattered diffraction，EBSD）等技术，实现了多维信息的同步获，*In-situ* SEM 在材料科学、能源工程、电子信息及生物医学等领域具有重要的应用价值[3]。

二、工作原理

2.1 扫描电子显微镜基础成像

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

In-situ SEM 的成像基础与传统 SEM 一致:电子枪发射的高能电子束经聚光镜、物镜聚焦后,在扫描线圈的控制下对样品表面进行逐点、逐行扫描。当高能电子与样品原子相互作用时,会激发产生多种信号,主要包括二次电子（SE）、背散射电子（BSE）、特征 X 射线等。二次电子来自样品表面浅表层（1~10 nm）,对样品表面形貌变化敏感,是 SEM 形貌成像的主要信号源。背散射电子来自样品较深层（10~100 nm）,其强度与样品原子序数相关,可用于成分衬度成像。探测器收集上述信号后,将其转换为电信号,经处理后与电子束的扫描同步显示在荧光屏或显示器上,形成与样品表面形貌、成分对应的图像。

2.2 原位调控与同步表征

In-situ SEM 与传统 SEM 的差异在于增设了高精度原位样品台及配套的环境调控系统,使“环境调控-信号激发-信号收集-数据同步”可协同进行。

工作流程为:首先将样品固定于原位样品台上,根据研究需求设定调控参数（如温度、力学载荷、电场强度、气氛成分等）；然后启动 SEM 成像系统，电子束扫描样品表面激发信号;对原位样品台实时施加外部刺激,同时持续采集样品的形貌、成分等信号；最后数据采集系统同步记录刺激参数与表征信号，形成“刺激条件-微观结构-性能响应”的对应关系,实现动态过程的全程追踪。主要应用 *In-situ* SEM 的分类主要依据原位调控的外部刺激类型，目前主要可分为以下几类：

2.2.1 力学原位 SEM

力学原位 SEM 是指在 SEM 观察过程中，对样品施加拉伸、压缩、弯曲、剪切等力学载荷，实时捕捉材料形变、裂纹萌生与扩展、界面剥离等动态力学行为的表征方法。应用此技术，研究人员观察到裂纹尖端塑性区存在滑移、孪生等多种变形机制，这些微观结构效应是面心立方相基体具备优异延展性、加工硬化能力的核心原因（图 1），也是提升材料损伤容限的关键因素[4]。在针对多层 MXenes 材料的研究中，研究人员通过原位 SEM 观测结合实验数据，测定了材料的力-位移响应，并识别出弯曲、屈服及分层等破坏模式（图 2），揭示了其在单轴压缩下的复杂结构行为，并分析了破坏机理[5]。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

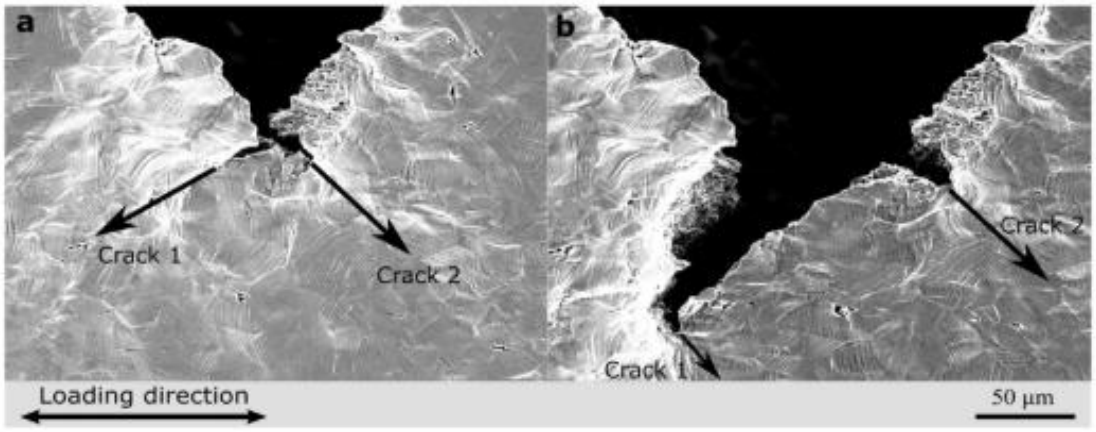


图 1、裂纹扩展初期观察到的裂纹分支现象：（a）第一时刻出现两个裂纹分支（裂纹 1 和裂纹 2）（b）随后时刻，裂纹 1 成为主要裂纹

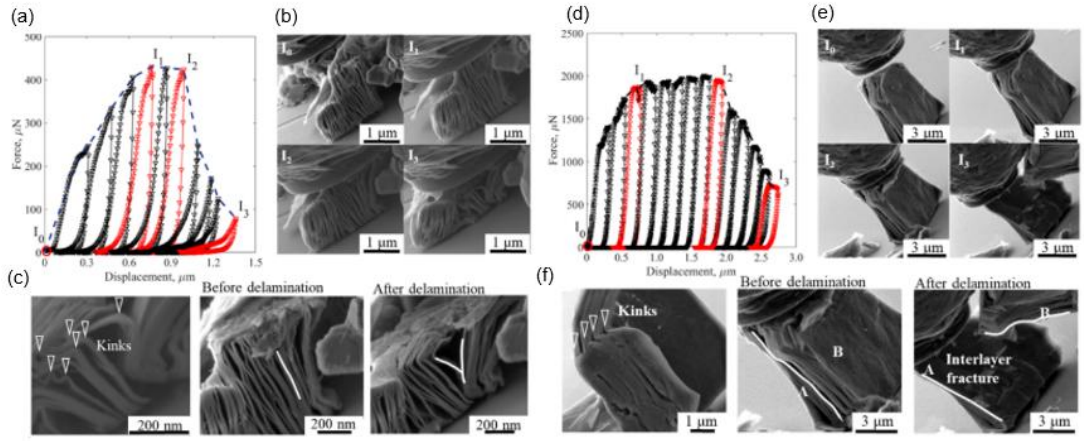


图 2、MXene 微粒的面内压痕：（a）Ti_2CTx 的力-位移响应（b）Ti_2CTx 在临界状态时的 SEM 图像（c）Ti_2CTx 失效后界面的 SEM 图像（d）Ti_3C_2Tx 的力-位移响应（e）Ti_3C_2Tx 在临界事状态的 SEM 图像（f）Ti_3C_2Tx 失效后界面的 SEM 图像

2.2.2 热原位 SEM

热原位 SEM 通过对样品施加升温或冷却处理，可实时观察材料在温度变化过程中的物理化学行为，为材料热性能与微观结构演化的关联研究提供直接可视化证据。王竹君等[6]利用环境扫描电子显微镜（Environmental scanning electron microscope，ESEM）探究了极端条件下材料的氧化行为。研究发现，在富氧高温环境中，单层石墨烯的抗氧化稳定性极差，曝光不足 1 s 即发生失效（图 3a）；而经双层石墨烯修饰的铜，其完全氧化过程耗时超过 120 min（图 3a~f）。研究

明确了石墨烯层数对铜基材料抗氧化性能的调控作用，拓展了铜在极端温度与富氧环境下的应用场景。

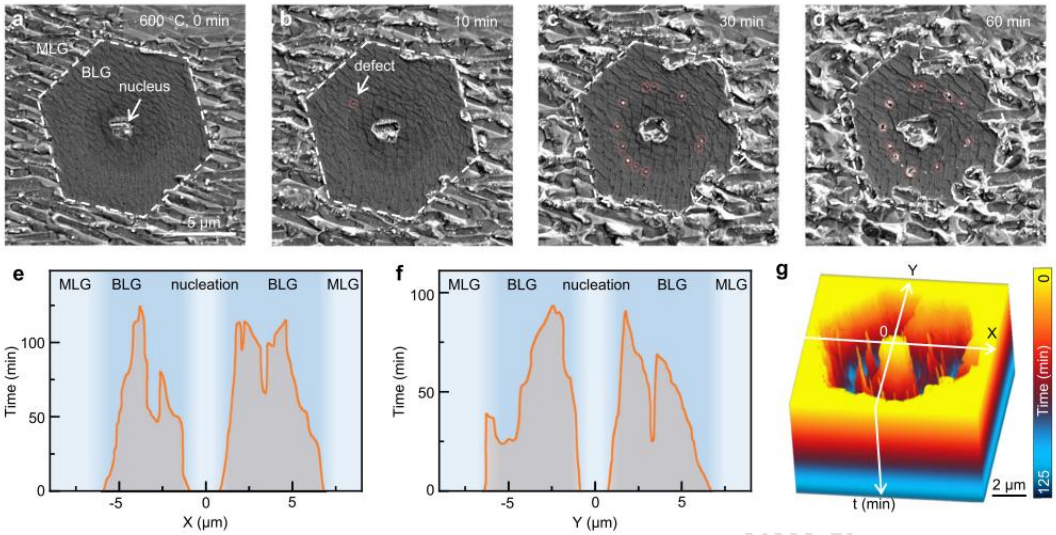


图 3、用石墨烯涂层原位表征铜的氧化过程：（a-d）单层和双层石墨烯包覆的铜表面在 600 ℃、150Pa O_2 和 80Pa H_2 下氧化的原位扫描电子显微镜图像,氧化过程中产生的缺陷用红色圆圈标记（e–f） 单层石墨烯(MLG)和双层石墨烯（BLG）沿 X 轴、Y 轴的氧化过程的随时间的演化图及（g）三维彩色图

Barreau 等人[8]首次采用高温环境扫描电子显微镜研究了材料表面在奥氏体化过程中的演化机制。通过在 ESEM 腔体内精准复现奥氏体化温度区间，清晰界定了 650~800 ℃为主要形貌变化阶段，该现象与铝元素同二元及三元 Fe-Al-Si 相之间的多重反应直接相关（图 4）。同时，研究进一步证实加热速率是影响材料表面形貌演化的关键参数，为精准调控材料热加工过程中的表面性能提供了重要参考[7]。在另一项相关研究中，科研人员借助原位 SEM 成像技术，全程追踪了热处理过程中铁素体/珠光体向奥氏体的相变历程，捕获了奥氏体在原始组织中的形核时间与空间分布特征，为通过优化热处理工艺参数、调控材料微观组织及提升综合性能提供了直接实验依据。

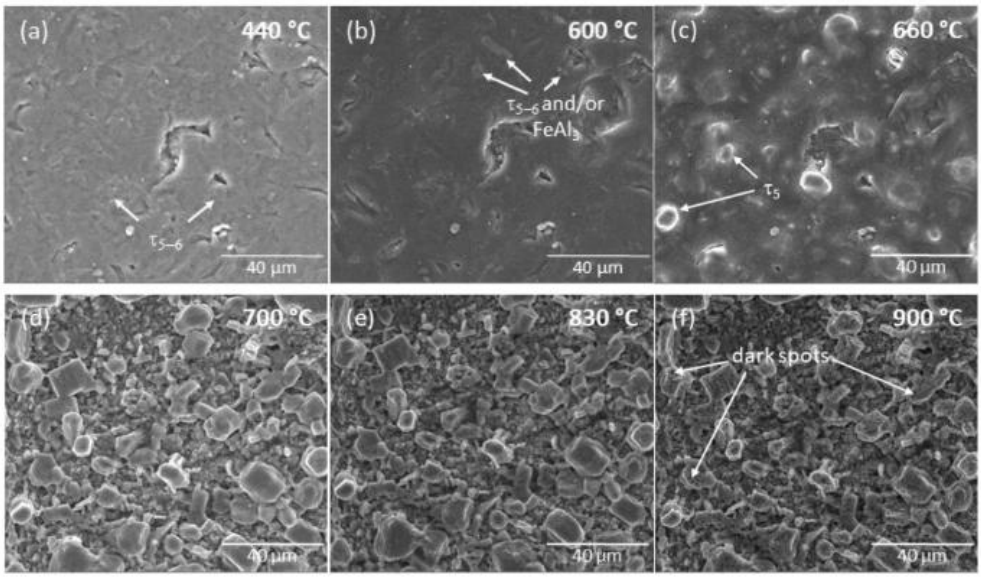


图 4、铝硅涂层 22MnB$_5$ 钢在 200Pa 空气中进行原位热处理时记录的 ESEM 图像：（a）440 ℃（b）600 ℃（c）660 ℃（d）700 ℃（e）830 ℃（f）900 ℃

2.2.3 电化学原位 SEM

电化学原位 SEM 可模拟电池、电解池等典型电化学环境，在施加电场与电解液共存的条件下，实时追踪电极材料的氧化还原反应、离子嵌入/脱嵌、锂枝晶生长及电极界面演化等关键电化学过程。Y. Kamikawa 团队[9]借助原位 SEM 实时观察发现，Ag-C 复合阳极中各组分的亲锂活性与扩散性之间的平衡对电极性能调控起着关键作用（图 5）。通过强化并精准调控该复合结构的上述特性，可突破传统单一合金化金属基阳极的固有局限，为开发高性能替代阳极材料开辟了新路径。在另一项研究中[10]，利用搭载纳米探针系统的环境扫描电子显微镜，成功实现了微型全固态锂氧电池充放电过程的直接可视化，首先对电池在-3 V 恒定电位、200 Pa 氧分压条件下的放电过程进行了观察，实时捕获了放电产物 Li_2O_2 的生长过程与形态演变特征（图 6）。同时，还通过完整的电化学循环实验，系统追踪了 Li_2O_2 的形成与分解全过程。

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心

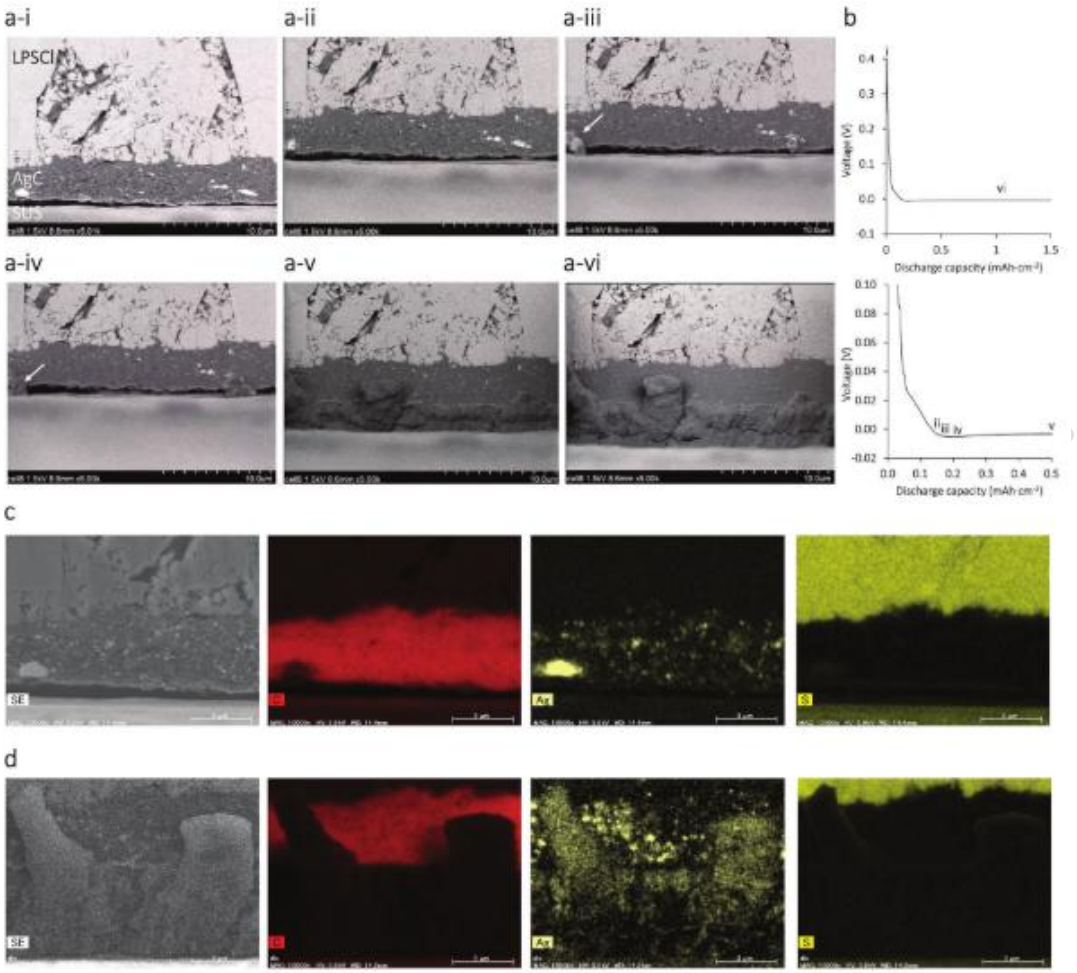


图 5、（a）Ag-C 阳极放电过程中的实时原位 SEM 观察（b） Ag-C 阳极的放电曲线（c） Ag-C 阳极的 SEM-EDS 分析（d）放电容量为 1.5 mAhcm^{-2} 时的形貌

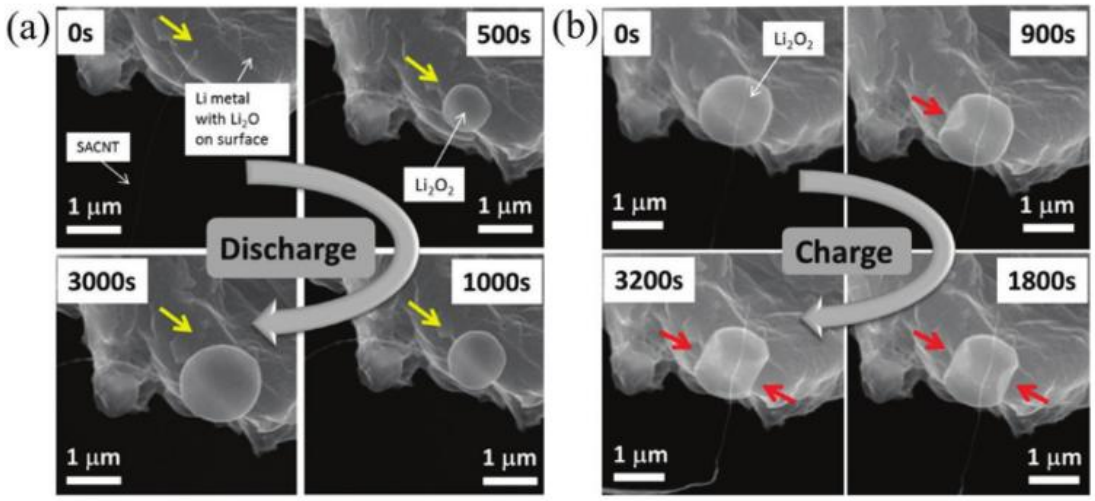


图 6、全固态锂氧电池电化学循环过程中 Li_2O_2 形成和分解的 ESEM 原位观察：（a）在放电过程中，球形粒子在碳纳米管-固态电解液-氧三项界面处长大，如黄色箭头所示（b）相同颗粒的分解在表面局部开始，并在充电过程中进入整体，红色箭头表示粒子分解的位置

2.2.4 气氛原位 SEM

气氛原位 SEM 可通过在样品室中引入特定气体氛围，实时观测材料在气体环境下的各类反应过程。研究团队[11]借助气氛原位 SEM，首先对铸态 AZ91 镁合金在水蒸气气氛中微滴周围的产氢过程进行观察，其次探究了铁在水蒸气、湿空气、干燥空气中的氧化行为，明确水对氧化过程的影响。图 7 为铁在水蒸气环境中暴露 17 min 和 24 min 后的表面形态演化特征。王等人[12]通过环境 SEM 实现了单层石墨烯等温生长与刻蚀实验的原位成像（图 8）。研究中，先以 C_2H_4 为气源，在环境 SEM 腔体内通过恒温化学气相沉积工艺，在多晶铂衬底上成功生长石墨烯薄膜。随后在 900 ℃、25 Pa 氢气氛条件下，对少层石墨烯的刻蚀过程进行原位监测，同步表征石墨烯层的形状与尺寸演变规律。

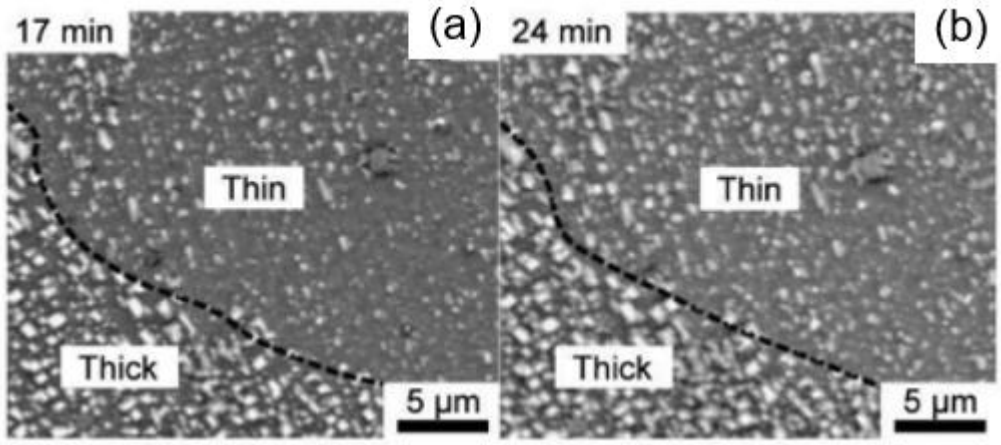


图 7、暴露在水蒸气中的铁表面形貌图，实验在 500 ℃低真空度下进行：（a）和（b）分别显示了曝光 17 min 和 24 min 后的表面形貌。黑色虚线表示不同厚度的两个区域之间的边界。

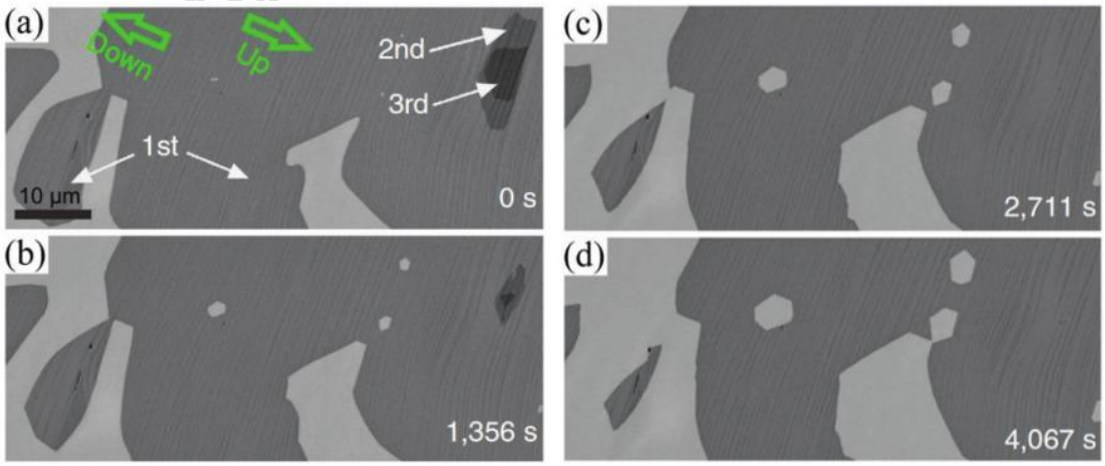


图 8、在 500 ℃、25 Pa 氢气气氛中原位观察氢气刻蚀石墨烯过程中石墨烯的形状演变。（a-d）时间推移图像序列显示了单层石墨烯、双层石墨烯和三层石墨烯中最顶层的刻蚀。绿色箭头表示铂的上升和下降方向。

2.2.5 液相原位 SEM

液相原位 SEM 技术，通过微流控芯片或封闭式液相样品池，将液体封装在芯片或样品池中，在隔绝电镜高真空环境的条件下，利用电子束穿透薄层液体实现对液相样品的高空间分辨率成像。陈等人[14]通过液相原位 SEM 观察了液滴的生长和颗粒的运动过程，对快速跟踪 Au 纳米颗粒的水平动态运动行为方法进行了探索，同时采集 SE 模式、SE/BSE 混合模式和 BSE 模式对 Au 纳米颗粒进行图像采集及对比（图 9）。

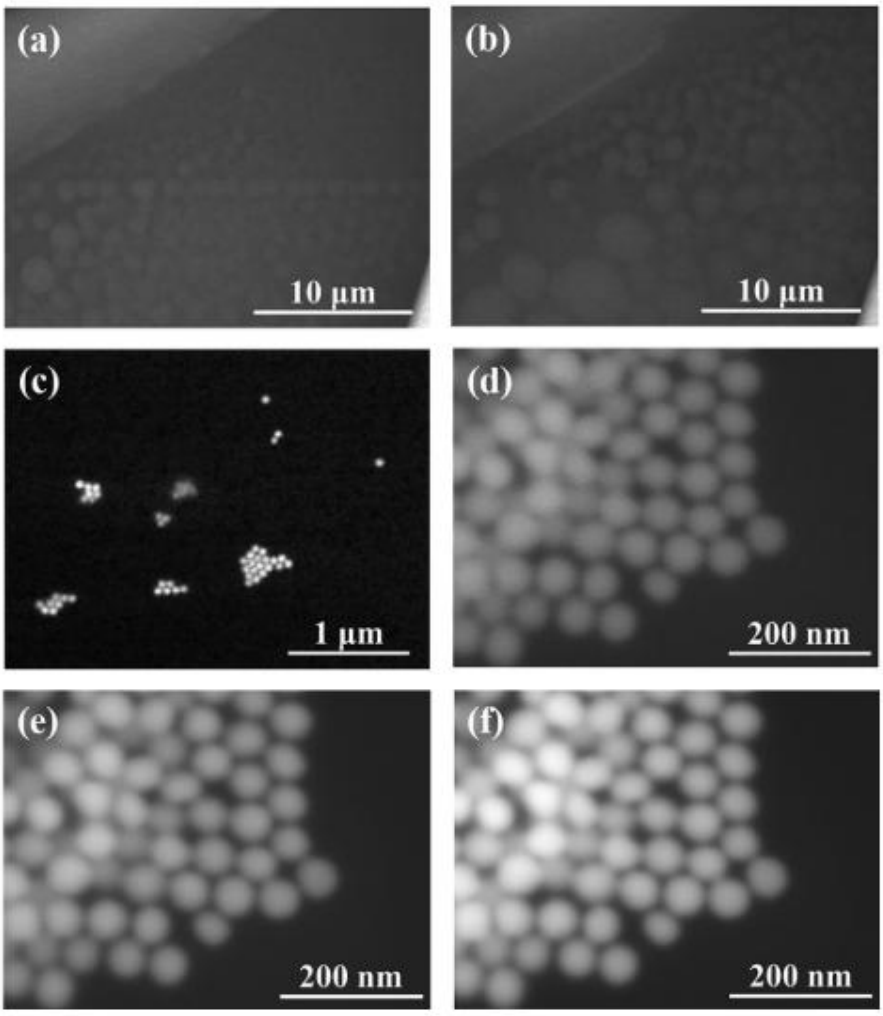


图 9、乳液及金纳米颗粒的原位液相 SEM 图像：（a-b） OA 乳剂的动态原位 SEM 图像（c）金纳米粒子在油酸乳剂中的原位 SEM 图像（d-f）高倍率原位 SEM 图像：（d）SE 模式（e）

SE/BSE 混合模式（f）BSE 模式

2.2.6 多场耦合原位 SEM

多场耦合原位扫描电子显微镜（SEM）技术能够同时施加两种及以上外部刺激（如力-热、电-热、力-电-化学等），模拟材料在真实服役过程中面临的复杂环境，直观、实时地揭示多场协同作用下材料的微观结构演化规律与失效机制。

在力-热耦合场景的研究中，Heijden 等人[15]搭建了集成于 SEM 内的拉伸-温度调控系统，对推进剂样品开展原位拉伸测试（图 10）。该系统可在施加拉力的同时精准控制测试温度，实现了推进剂材料在不同温度-拉力耦合条件下的实时原位 SEM 观测，明确了其失效机制的温度依赖性，为推进剂材料的服役稳定性设计提供了直接的微观证据[13]。

另有研究团队[14]借助原位 SEM 高温疲劳试验机，针对镍基单晶合金开展了 950 ℃与 1050 ℃下的高温疲劳测试，系统探究了疲劳微裂纹的萌生与扩展机制。在 950 ℃时，合金变形主要受滑移及裂纹剪切γ/γ′相主导，裂纹扩展呈现 I 型模式（图 11）；而在 105 ℃时，裂纹撕裂行为发生于平行于加载方向的γ相及垂直于加载方向的γ/γ'界面（图 12），先呈现垂直于加载轴的 II 阶段扩展模式，随后在加速扩展阶段转变为 I 型模式，清晰揭示了温度对镍基单晶疲劳裂纹演化路径的调控作用。

除力-热耦合外，热场与气氛场耦合下的材料微观演化研究也借助原位 SEM 技术取得重要进展。纳米多孔材料的热稳定性是拓展其应用的关键瓶颈，研究发现向纳米多孔材料中引入铂可有效抑制脱合金化及氧化后处理过程中的粗化现象。基于此，Perovic 等人[16]针对不同前驱体生长的纳米多孔层，开展了热粗化过程形貌演变的原位 STEM/SEM 对比研究。为排除氧化物种对 NPG-铂中铂相的干扰，测试全程采用氢气气氛构建还原环境，精准捕捉了不同前驱体衍生纳米多孔层的热粗化规律，为纳米多孔材料-铂材料的热稳定性优化提供了微观调控依据。

版权所有中国科学院化学研究所分析测试中心所有

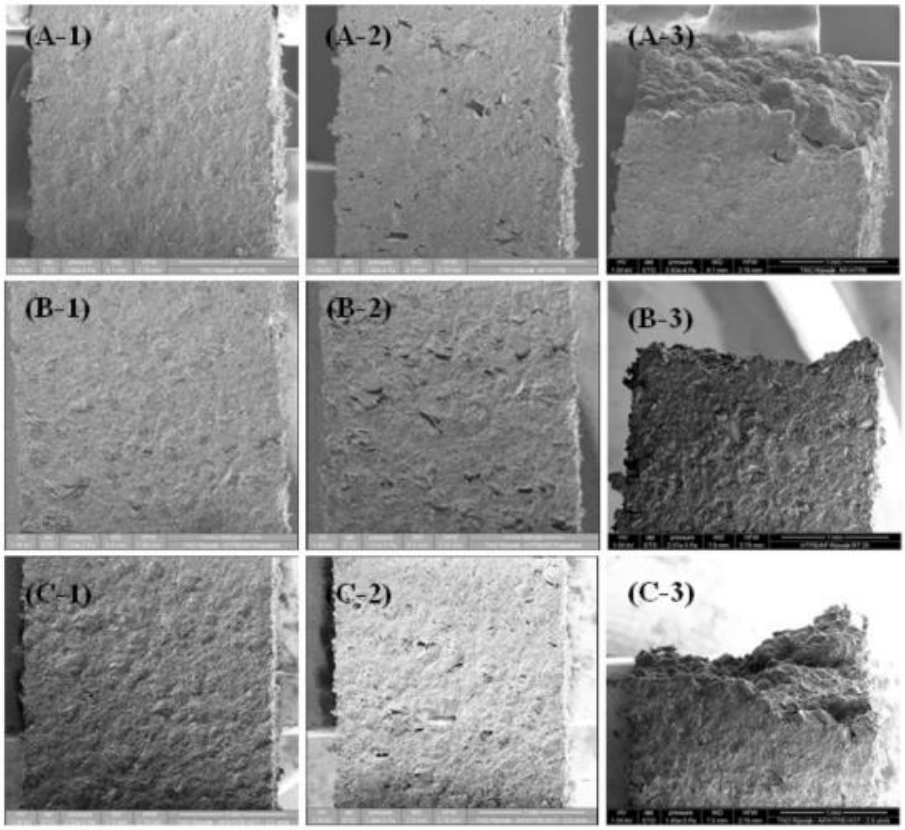


图 10、在不同温度下以 150 mm/min 的应变速率进行原位单轴拉伸试验时的 SEM 图像：（a）-54 ℃（b）+25 ℃（c）+40 ℃

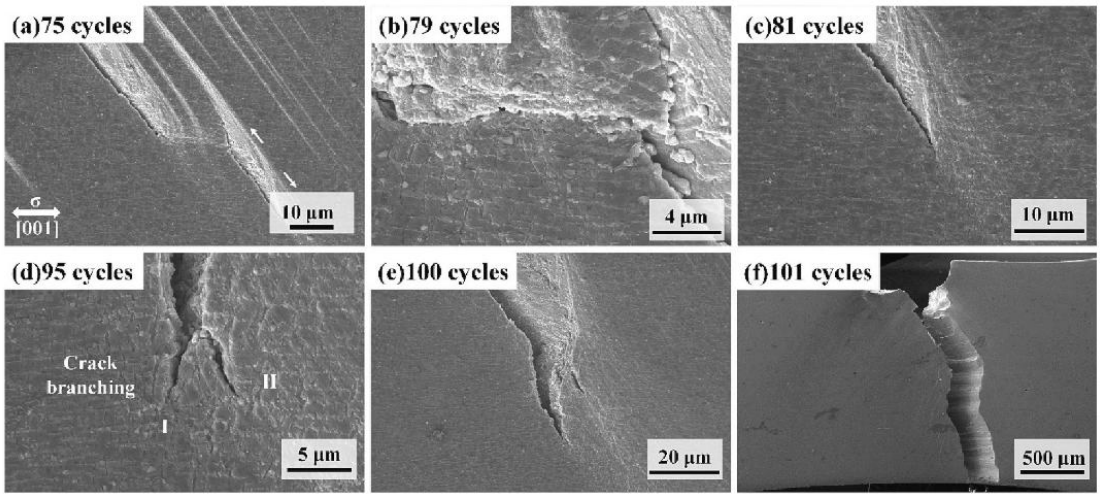


图 11、在 950°下对镍基单晶的疲劳裂纹扩展过程进行的原位观察：（a）5 次循环（b） 79 次循环（c） 81 次循环（d）95 次循环（e）100 次循环（f）101 次循环

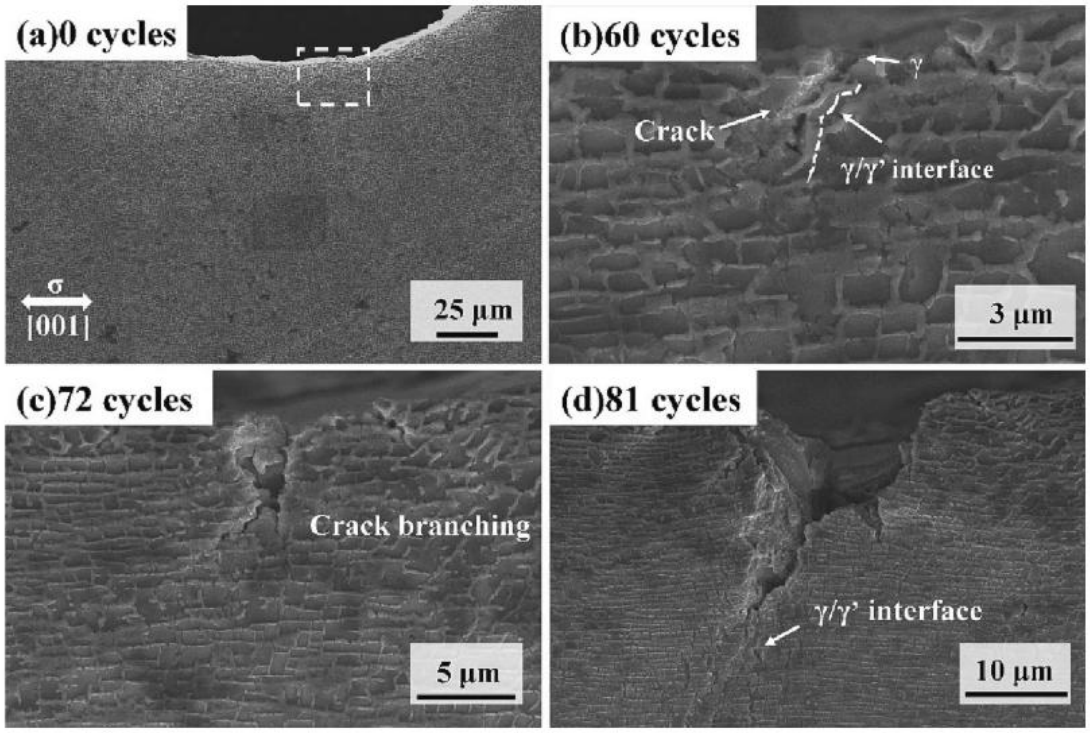


图 12、在 1050 ℃（加载方向为水平方向）下，原位观察了镍基单晶的疲劳裂纹萌生过程：（a）0 个循环（b）60 个循环（c）72 个循环（d）81 个循环。

三、技术挑战与局限性

原位电子显微镜技术的发展仍面临诸多挑战，核心难点在于如何建立可靠的原位环境，并在原位环境下保证高空间分辨率成像。虽然已在扫描电镜中是实现了力、热、电、气氛等多种原位环境，但是目前还无法实现一些实际反应的原位条件，例如很难实现高压的气体和液体条件，以及液相、加热并通入气体等复杂的原位环境，需要发展新的技术以实现更多的原位动态过程的微观结构演变表征。同时，电子光学系统依赖高真空环境以确保电子束聚焦并减少散射，而引入气体或液体环境会引发电子束散射，电子束在环境介质中传输时会产生信号衰减与噪音，导致图像分辨率和对比度下降。此外，由于高能电子束可能对样品产生加热、电离等作用，所以在原位实验中需要考虑电子束对反应过程的影响。

版权为中国科学院化学研究所

参考文献：

1. Chandra, S.E., et al., Advancements in transmission and scanning electron microscopy for nanomaterials: Insights into structural, morphological, and functional characteristics. *Appl. Mater. Today*., **2025**, *45*, 102829.

2. Renu, S., et al., Perspective and prospects of in situ transmission/scanning transmission electron microscopy. *Microscopy*., **2024**, *73*, 79.

3. Zheng, H.M., et al., Perspectives on in situ electron microscopy. *Ultramicroscopy*. **2017**, *180*, 188196.

4. Li, W.P., et al., Fracture mechanisms of a Mo alloyed CoCrFeNi high entropy alloy: In-situ SEM investigation. *Mater. Sci. Eng. A*., **2018**, *723*, 79.

5. Li, Y.X., et al., In-situ SEM compression accordion-like multilayer MXenes. *Extreme. Mech. Lett.,* **2020**, *41*, 101054.

6. Zhao, M.Z., et al., Enhanced copper anticorrosion from Janus-doped bilayer graphene. *Nat. Commun*., **2023**, *14*, 7447.

7. Barreau, M., et al., In situ surface imaging: High temperature environmental SEM study of the surface changes during heat treatment of an AleSi coated boron steel. *Mater. Charact*., **2020**, *163*, 110266.

8. Rhiannon, H., et al., Investigating Iron Alloy Phase Changes Using High Temperature In Situ SEM Techniques. *Materials*., **2022**, *15*, 3921.

9. Kamikawa, Y., Unraveling the Mechanisms of Lithium-Alloy Plating in Ag–C Anode: In situ SEM Study. *Adv. Sci*., **2025**, *12*, 2404840.

10. Zheng, H., et al., New Insight in Understanding Oxygen Reduction and Evolution in Solid-State Lithium–Oxygen Batteries Using an in Situ Environmental Scanning Electron Microscope. *Nano. Lett.*, **2014**, *14*, 4245.

11. Jonsson, T., et al., An ESEM in situ investigation of the influence of H_2O on iron oxidation at 500 °C. Corros. Sci., **2009**, *51*, 1914.

12. Wang, Z.J., et al., Stacking sequence and interlayer coupling in few-layer graphene revealed by in situ imaging. *Nat. Commun.,* **2016**, *7*, 13256.

13. Giuseppe, L., et al., In-Situ Tensile Testing of Propellants in SEM: Influence of Temperature. *Propellants. Explos. Pyrotech*., **2017**, *42*, 1396.

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

14. Chen, X., et al., In situ liquid cell SEM observation of dynamic processes of Au nanoparticles. *Microsc Res Tech*., **2023**, *86*, 1057.

15. Zhou, J.L., et al., In-situ SEM study on fatigue crack behavior of a nickel-based single crystal alloy at 950 ◦C and 1050 ◦C. *Mater. Charact*., **2023**, *199*, 112763.

16. El-Zoka, A.A., et al., In situ STEM/SEM study of the coarsening of nanoporous gold. *Acta, Mater*., **2019**, *162*, 67.

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！

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

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

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有

顾问：唐亚林　何圣贵　高　蘖
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