

## 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前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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2-4]</sup>。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、化学和生物学的各个领域，特别是在聚合物研究<sup>[5]</sup>、中草药研究<sup>[6-8]</sup>、蛋白质的研究<sup>[9]</sup>和化学化工<sup>[10]</sup>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<sup>[11-12]</sup>，他把核磁实验中的多重射频励磁看作是

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

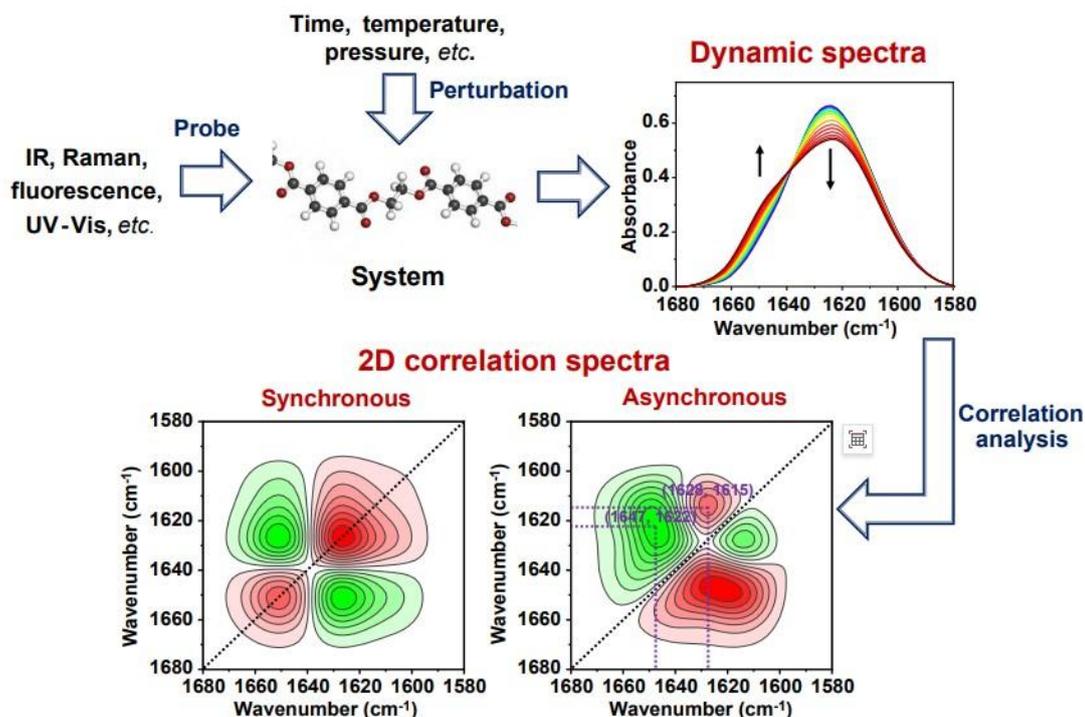


图 1、广义二维相关红外光谱获取的基本流程示意图；在 2D 同步和异步光谱中，红色表示正强度，而绿色表示负强度<sup>[5]</sup>。

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<sup>[13-14]</sup>。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<sup>[15]</sup>、热<sup>[16]</sup>、机械<sup>[17]</sup>、温度<sup>[18]</sup>、浓度<sup>[19]</sup>、压力<sup>[20]</sup>、磁场<sup>[21]</sup>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<sup>[22]</sup>。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：

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

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<sup>[22]</sup>：

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

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：

$$X(v_1, v_2) = \frac{1}{\pi (T_{max}-T_{min})} \int_0^\infty \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) d\omega \quad (4)$$

$$\tilde{Y}_1(\omega) = \int_{-\infty}^\infty \tilde{y}(v_1, t) e^{-i\omega t} dt \quad (5)$$

$$\tilde{Y}_2^*(\omega) = \int_{-\infty}^\infty \tilde{y}(v_2, t) e^{-i\omega t} dt \quad (6)$$

式中  $\tilde{Y}(\omega)$  是光强  $\tilde{y}(v, t)$  经傅里叶变换得到，傅里叶频率  $\omega$  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：

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

(7)

$\tilde{y}_j(v_i)$  是外扰  $t_j$  点的光学强度。

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

(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:

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

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:

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

### 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、Mat2DCorr、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 $\nu_1 = \nu_2$ ）方向对称，其中相关峰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。

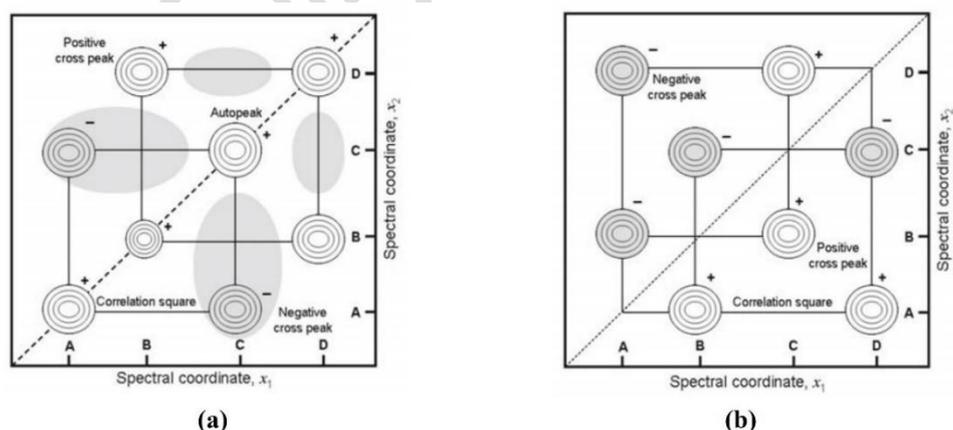


图 2、 二维相关光谱的 (a) 同步相关谱和 (b) 异步相关谱的等高线图<sup>[5]</sup>

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<sup>[23]</sup>。

### 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  $\nu_1$  和  $\nu_2$  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  $(\nu_1, \nu_2)$  处的峰强度记为  $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ ，将异步谱图中  $(\nu_1, \nu_2)$  处的峰强度记为  $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ 。

根据 Noda 规则<sup>[14]</sup>：

(1) 当  $\Phi(\nu_1, \nu_2) > 0$  时，如果  $\Psi(\nu_1, \nu_2) > 0$ ，则  $\nu_1$  谱带处的强度变化发生先于  $\nu_2$  谱带处的强度变化；而如果  $\Psi(\nu_1, \nu_2) < 0$ ，则  $\nu_1$  谱带处的强度变化发生晚于  $\nu_2$  谱带处的强度变化。

(2) 当  $\Phi(\nu_1, \nu_2) < 0$  时，如果  $\Psi(\nu_1, \nu_2) > 0$ ，则  $\nu_2$  谱带处的强度变化发生先于  $\nu_1$  谱带处的强度变化；如果  $\Psi(\nu_1, \nu_2) < 0$ ，则  $\nu_1$  谱带处的强度变化发生先于  $\nu_2$  谱带处的强度变化。简单来说，如果  $(\nu_1, \nu_2)$  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  $\nu_1$  谱带处的强度变化发生先于  $\nu_2$  谱带处的强度变化；如果  $(\nu_1, \nu_2)$  在同步和异步谱图的交叉峰符号不一致（一个为正而另一

个为负), 则 $\nu_2$ 谱带处的强度变化发生先于 $\nu_1$ 谱带处的强度变化。

(3) 如果只有同步相关峰 $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ , 而异步相关交叉峰强度消失, 即 $\Psi(\nu_1, \nu_2) = 0$ , 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 $\Phi(\nu_1, \nu_2) = 0$ , 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。

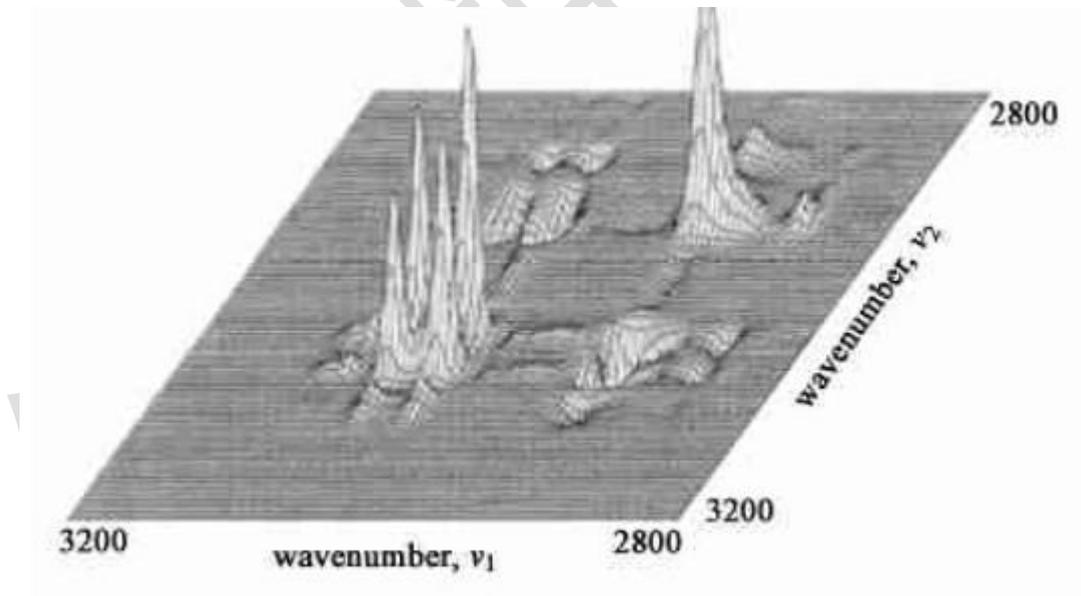


图 3、3D 渔网图表达<sup>[14]</sup>

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<sup>[24-26]</sup>,还适合于共聚物<sup>[27-30]</sup>及其他高分子材料<sup>[31]</sup>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<sup>[32]</sup>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。

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<sup>[33]</sup>。利用温敏性聚 *N*-乙基内酰胺（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）。

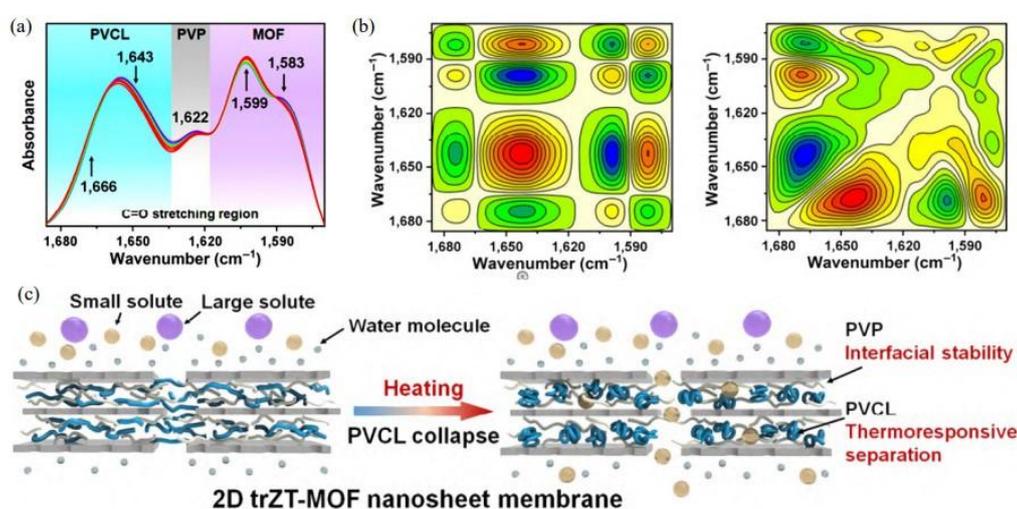


图 4、(a) 复合膜的温度依赖性 FTIR 光谱（30-60 °C）箭头表示不同波数下的光谱变化趋势；(b) 复合膜的 2D 相关同步（左）和异步（右）光谱；(c) “智能”膜分离性能示意图<sup>[33]</sup>

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<sup>[34]</sup>。研究发现，加热过程可分为 30~60 °C 和 60~170 °C 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 °C 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<sup>-</sup> 基团逐渐参与形成分子间/内氢键(O3H3···O5 和 O2H2···O=C—O<sup>-</sup>)，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 °C 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<sup>-</sup> 基团（图 5）。由于相对自由的 COO<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 更强。

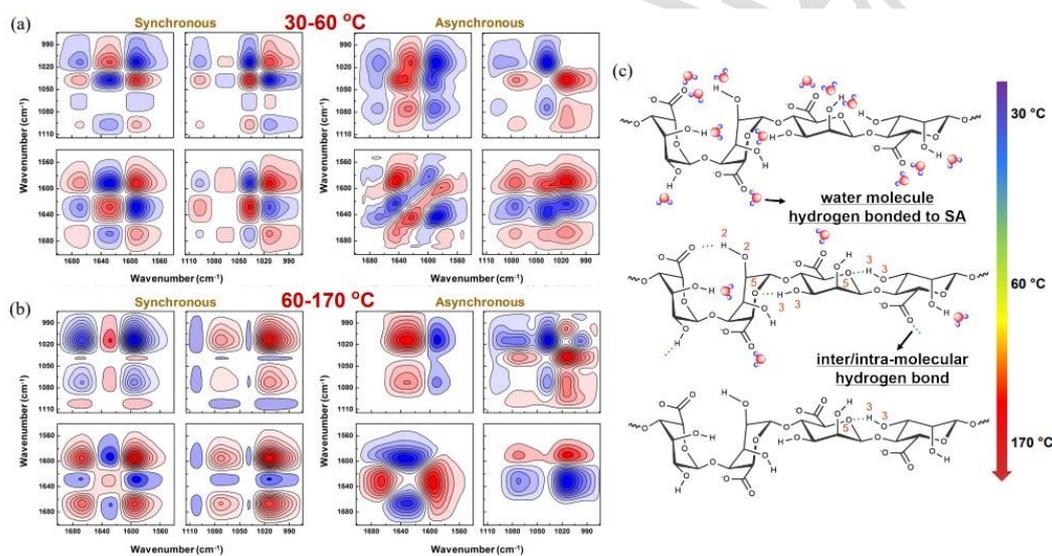


图 5、(a) 30~60°C 和 (b) 60~170°C 之间加热期间 SA 薄膜的 2D 同步和异步光谱；(c) SA 膜中热诱导氢键转变的示意图<sup>[34]</sup>

## 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<sup>[35-38]</sup>、蛋白质相互作用研究<sup>[39-41]</sup>、酶的生化机理研究<sup>[42-44]</sup>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<sup>[35]</sup>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<sup>[36]</sup>等应用二维相关红外研究了全  $\alpha$ -螺旋蛋白肌红蛋白 (whole  $\alpha$ -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  $^{\circ}\text{C}$  之间 Mb 热转换的同步谱在 1617 和 1684  $\text{cm}^{-1}$  处出现了分子间反平行  $\beta$ -折叠的特征谱带, 表明  $\beta$ -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<sup>[38]</sup>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。

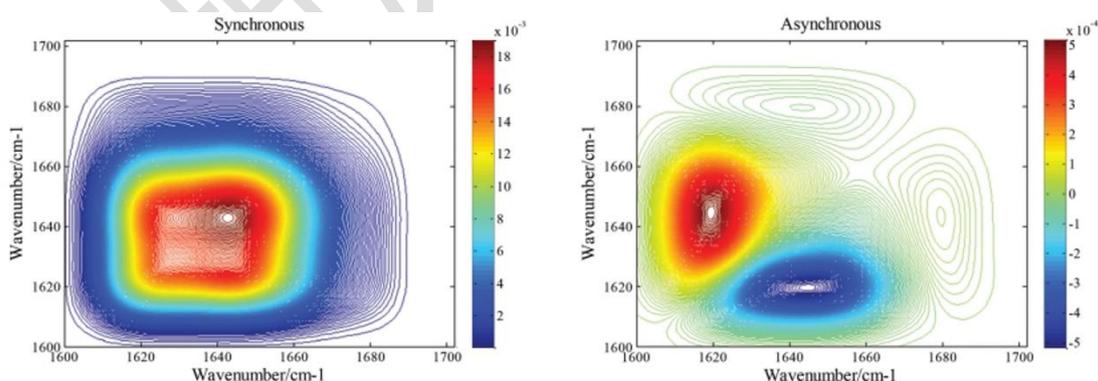


图 6、温度作为外部扰动,  $\text{D}_2\text{O}$  中 BHb 的同步和异步二维红外相关光谱<sup>[38]</sup>

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<sup>[39]</sup>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 $\beta$ -折叠的变化先于无规则卷曲和 $\alpha$ -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<sup>[40]</sup>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  $5742\text{ cm}^{-1}$  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<sup>[41]</sup>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<sup>[42]</sup>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  $55\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  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<sup>[43]</sup>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  $1652\text{ cm}^{-1}$  归属为  $\alpha$ -螺旋,  $1637\text{ cm}^{-1}$  归属为弯折/延伸链,  $1684$  及  $1616\text{ cm}^{-1}$  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<sup>[44]</sup>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

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<sup>[45]</sup>编写了《中药二维相关红外光谱鉴定集》一书，共收录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<sup>[46-49]</sup>。Qu<sup>[46]</sup>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<sup>-1</sup>、800~1000 cm<sup>-1</sup>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<sup>[47]</sup>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<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup>波段内，二者自动峰个数分别为9和6。周欣<sup>[48]</sup>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<sup>-1</sup>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<sup>[49]</sup>采用红外光谱三级鉴定法比较了三七不同药用部位（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  $1350\sim 1750\text{ cm}^{-1}$  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  $1050\sim 1300\text{ cm}^{-1}$  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<sup>[50]</sup>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  $1300\sim 1800\text{ cm}^{-1}$  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<sup>[51]</sup>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<sup>[52]</sup>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<sup>[53]</sup>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 °C 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 °C 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聚合物表征、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。

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.

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<sub>2</sub>/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**, *21*, 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.

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  $\beta$ -octamolybdate linked up by potassium ions:  $(4,40\text{-Hbpy})_2(\text{K}_2\text{Mo}_8\text{O}_{26})$ . *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

- 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 correlation spectroscopy 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  $\alpha$ -Helix structure unfolds at lower temperatures than  $\beta$ -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!