

分子光谱的 基本原理：硬件

构建

科学更加美好的明天

安捷伦与您一路同行

安捷伦致力于教育事业，愿意提供
公司拥有的材料。

这组幻灯片由安捷伦制作，仅用于教学目的。

如果您希望将其中的图片、示意图或绘图用于其它任何
目的，请事先与安捷伦取得联系。

目录

简介

- [分类](#)

分子光谱

- [概念](#)
- [紫外-可见光谱](#)
 - [通用设置](#)
 - [光源](#)
 - [分光设备](#)
 - [检测器](#)
 - [系统](#)
 - [定性和定量分析](#)
 - [应用](#)
 - [示例](#)
 - [分析能力](#)

- [荧光光谱](#)
 - [通用设置](#)
 - [光源](#)
 - [系统](#)
 - [应用](#)
 - [示例](#)
 - [分析能力](#)
- [傅立叶变换红外光谱](#)
 - [通用设置](#)
 - [干涉图](#)
 - [定性和定量分析](#)
 - [系统](#)
 - [应用](#)
 - [示例](#)
 - [分析能力](#)
- [更多信息](#)



简介

分类

光谱学是一门研究领域十分广泛的学科，根据被分析物质的类型，可分成许多分支学科。本演示文稿将重点介绍**分子光谱**。

原子

原子光谱

- AAS
- MP-AES
- ICP-OES
- ICP-MS

分子

分子光谱

- UV-VIS
- UV-VIS-NIR
- FTIR
- 荧光

晶体

- X-射线晶体学

核

- 核磁共振

分子光谱

概念

原子组成分子的过程会激发独特的能量状态，因此可获得不同过渡态之间的独特光谱。

通过以下途径可获得分子光谱：

- 电子自旋状态
- 分子转动
- 分子振动
- 电子状态

分子光谱

根据应用分类

紫外-可见光谱

研究紫外光、可见光和近红外光电磁能与物质之间的相互作用

傅立叶转换红外光谱

研究红外光电磁能与物质之间的相互作用

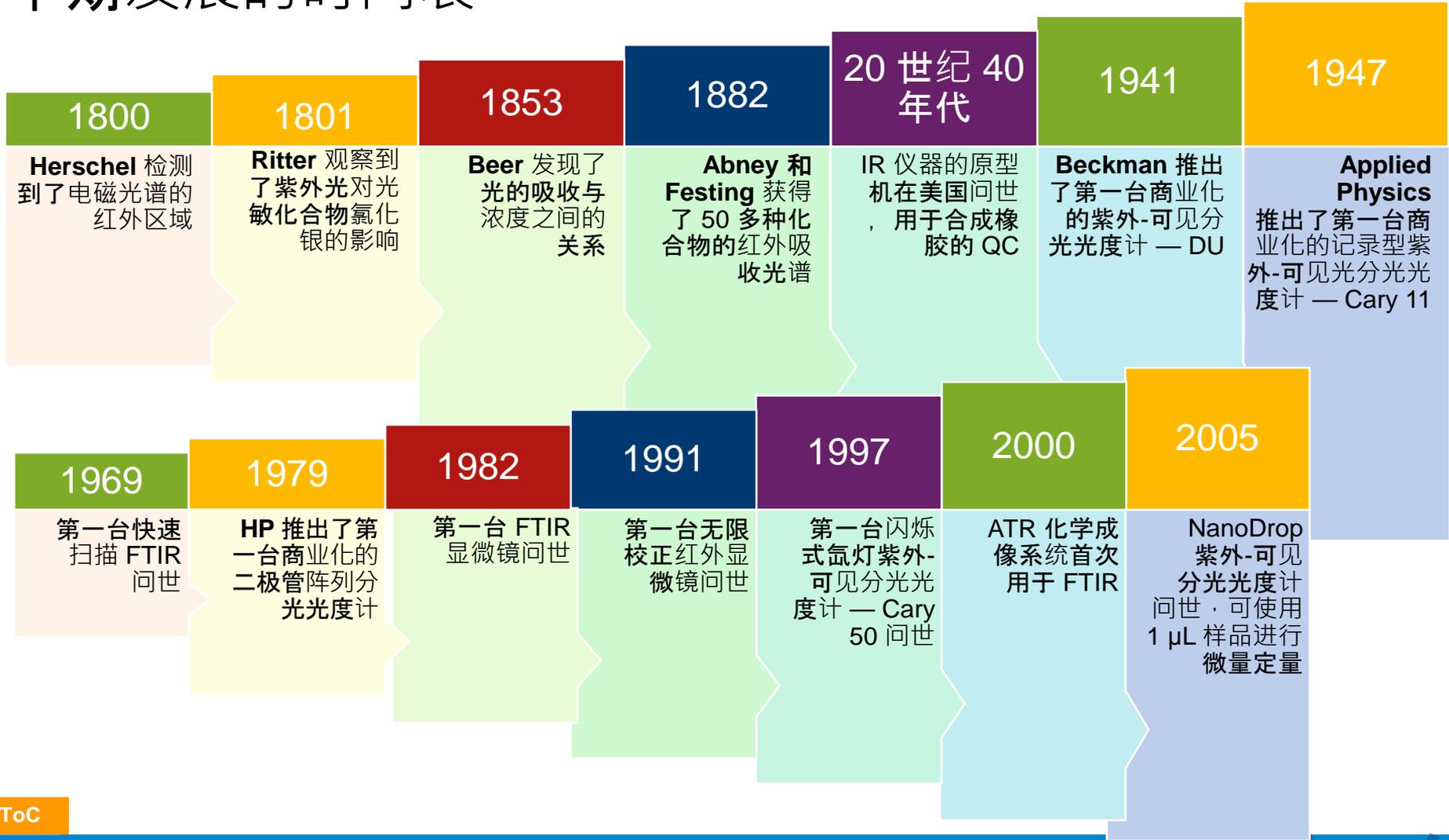
荧光光谱

研究典型的紫外光和可见光电磁能与物质相互作用之后发射的电磁能



简介

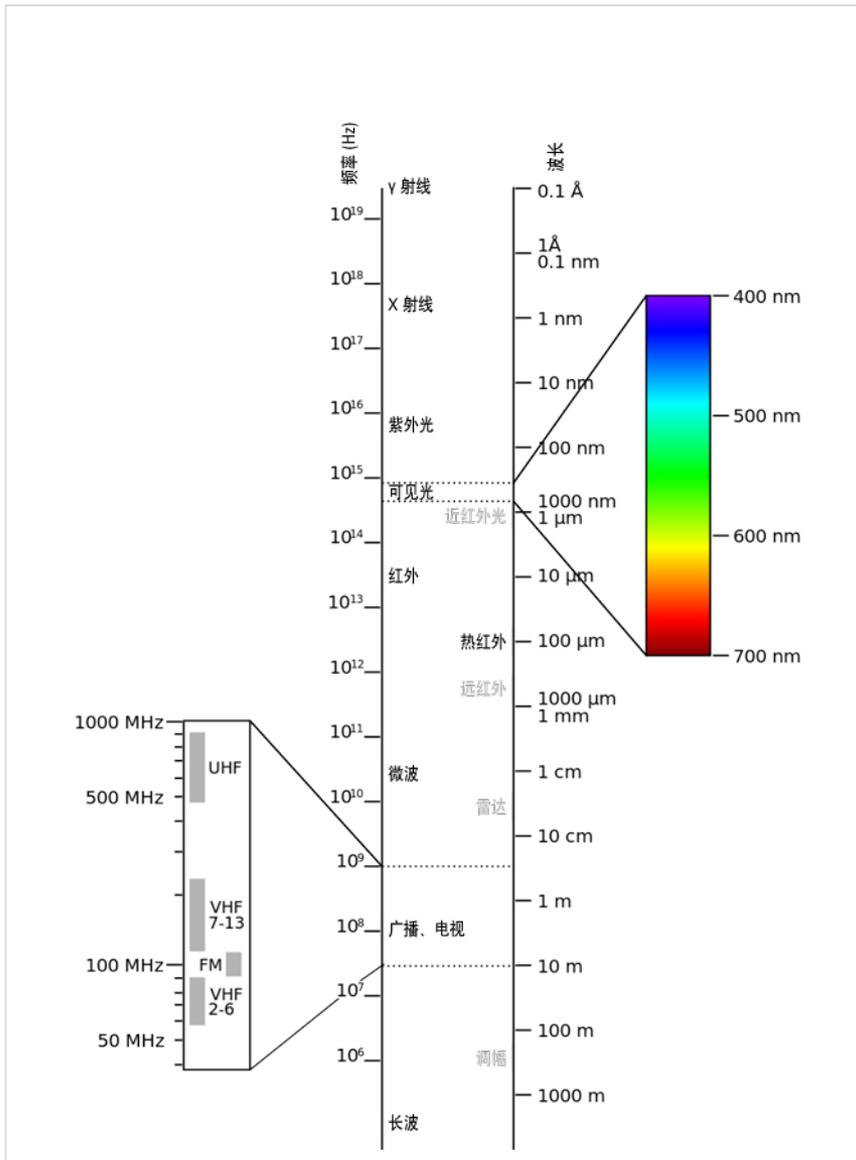
早期发展的时间表



紫外-可见光谱 概念

电磁光谱的频率和波长涵盖多个数量级。可见光只代表电磁光谱的很小一部分。

- 紫外光：190 至 400 nm
- 可见光：400 至 800 nm
- 红外光：800 至 100000 nm



“电磁光谱”，作者：
Victor Blacus

来源：[维基百科](#)



紫外-可见光谱 概念

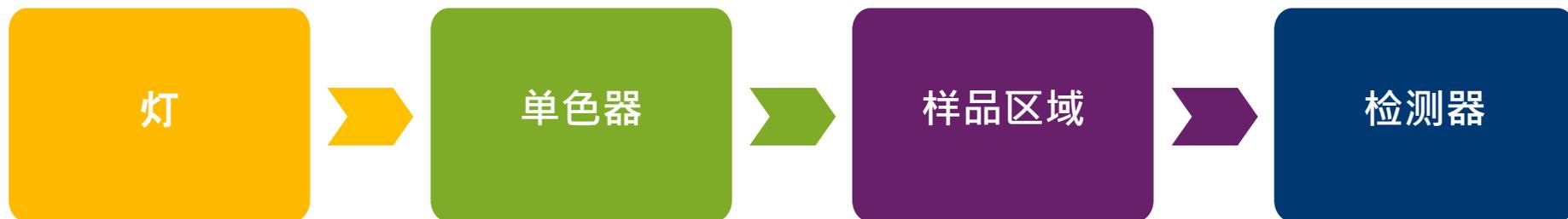
分光光度计测量透射样品或被样品反射的光的量。

所有真正的研究型分光光度计均可测量从约 190 nm（中紫外光）到至少 900 nm（近红外光）范围内所有波长的透射光或反射光的百分比，分辨率可达亚 2 nm。

在溶液中，透射光的百分比以吸光度表示，吸光度与溶液的浓度成正比。



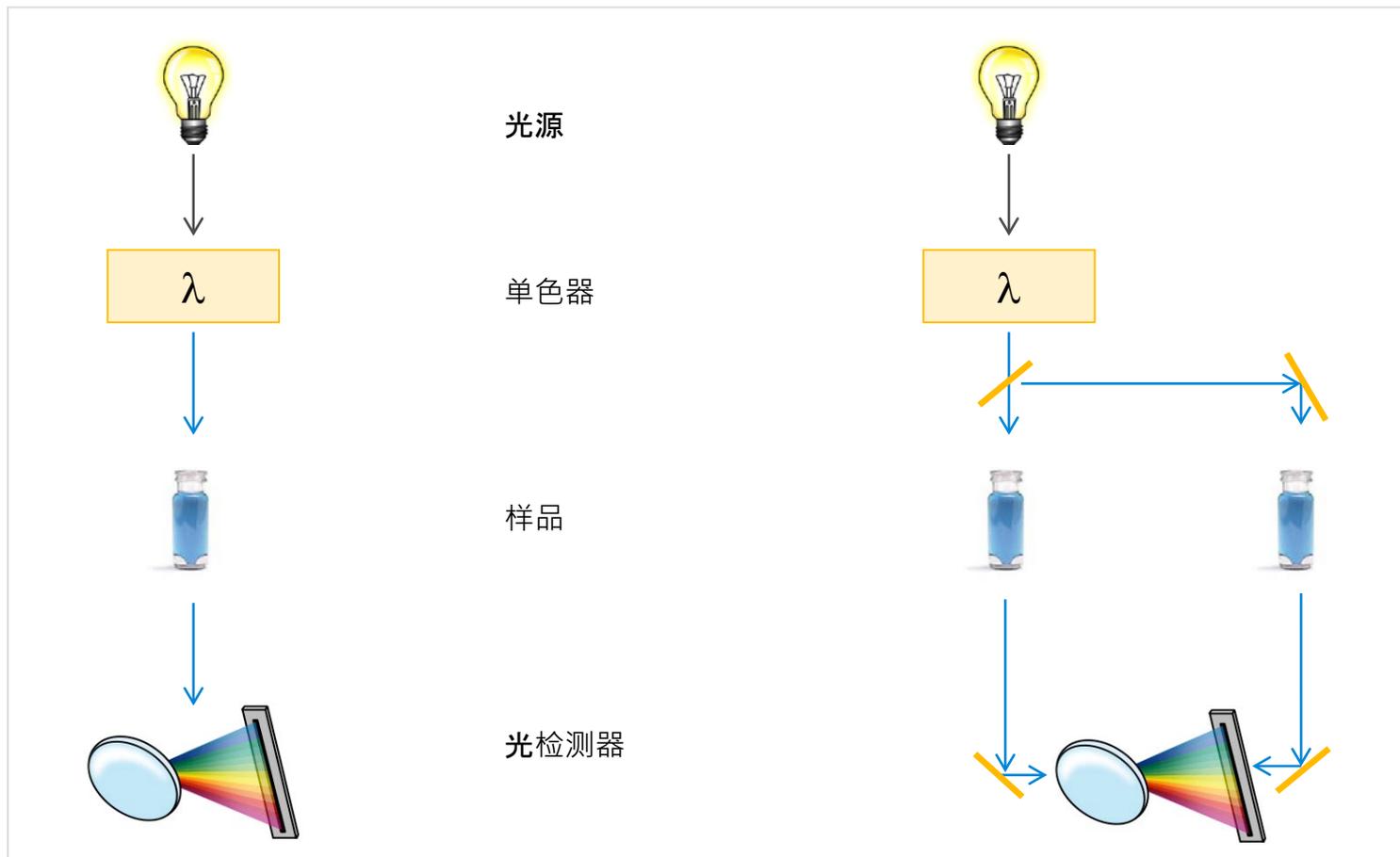
紫外-可见光谱 通用设置



- 灯（光源）发射一定波长范围的光
- 单色器（分光装置）选择某个**波长**的光
- 分析物吸收光（样品区域）
- 测定透射的光（检测器）
- 通过对比标样测定试样的浓度

紫外-可见光谱

通用设置：单光束 vs. 双光束分光光度计



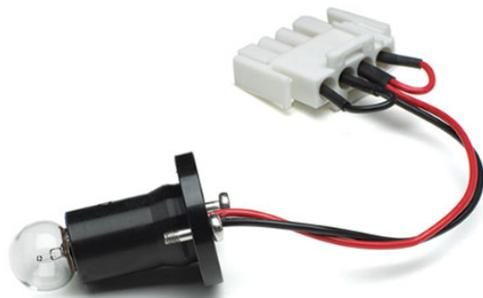
双光束方法可校正光强度的变化

紫外-可见光谱 光源

理想的光源会在所有波长范围内产生恒定的强度，同时具有低噪音和长期稳定性。

紫外-可见分光光度计常用的光源：

- 氙弧灯 → 在紫外区域具有有效的光强度
- 卤钨灯 → 在部分紫外光谱和整个可见光谱范围内具有良好的光强度
- 氙灯 → 在整个紫外光和可见光区域内具有良好的连续性



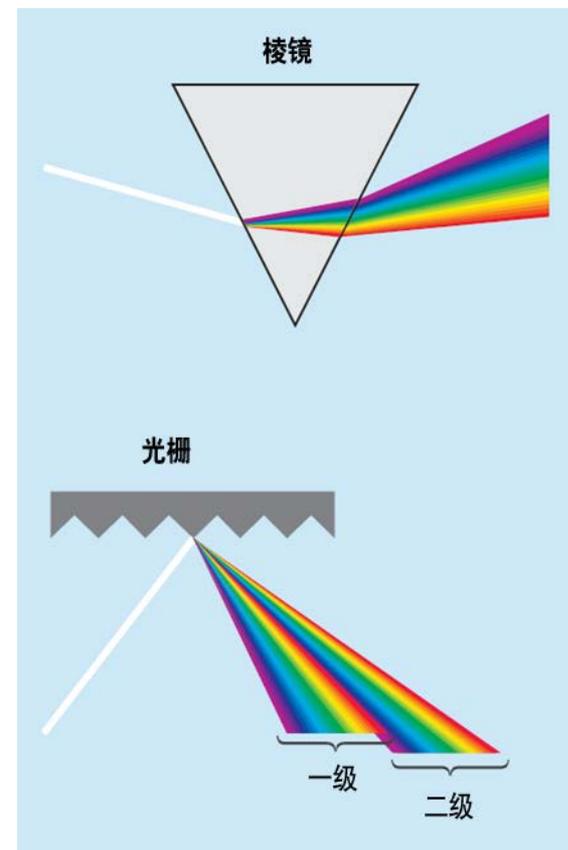
紫外系统使用的氙灯光源 (上图) 和卤钨灯 (下图)

紫外-可见光谱 分光设备

分光设备以不同的角度分散光的波长。这些设备与**适当的出射狭缝**结合时，可用于从连续光源发射的光中选择特定的波长（或更确切地说，窄波段）。

有两种类型的设备：

- **棱镜**
此类设备可将白光分散为七色光；它的缺点是分散角度对温度敏感
- **全息光栅**
此类设备对温度不敏感；落到光栅上的光以不同的角度反射，反射角度取决于波长。



分光设备示意图。
大部分现代分光光度计都使用光栅进行分光

来源：[紫外-可见光谱的基本原理](#)

紫外-可见光谱 检测器

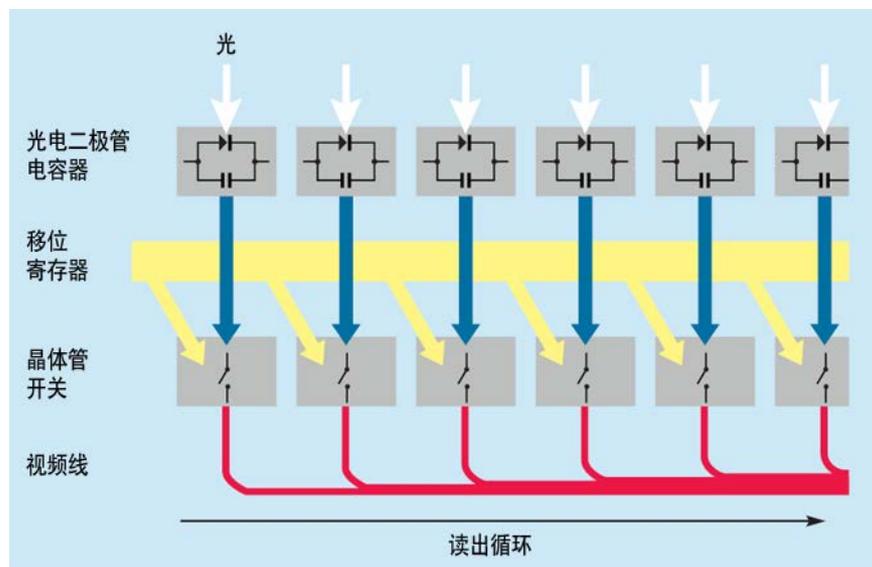
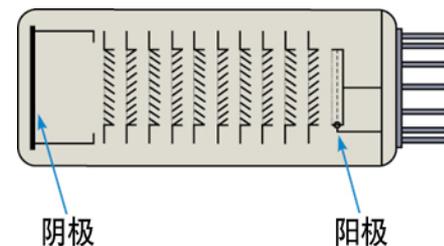
检测器将光信号转化为电信号。理想情况下，检测器应在广泛的范围内以低噪音和高灵敏度提供线性响应。

光电倍增管检测器

管内结合了信号转化和多级信号放大功能；可扫描整个波长范围。

光电二极管检测器

落在半导体材料上的光使得电子能够穿过该材料，从而消耗连接整个材料的电容中的电荷。电容再次充电所需的电荷量与光的强度成正比；一次读数即可测量整个波长范围。

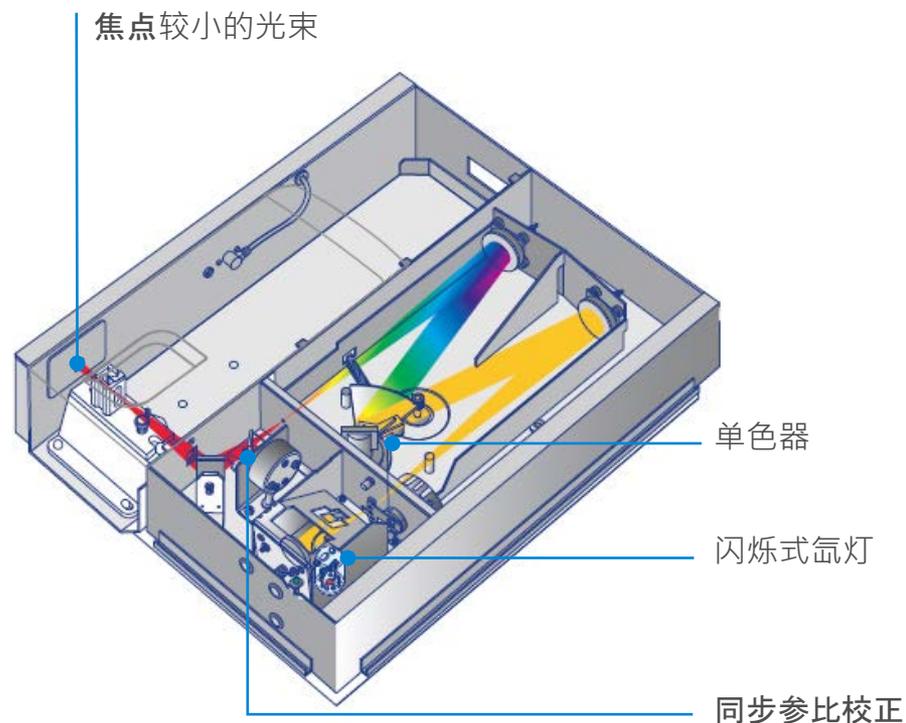


光电倍增管检测器 (上图) 和光电二极管阵列 (下图) 示意图

紫外-可见光谱系统

主要应用

- 动力学监测
- 鉴定未知或新合成的化合物
- 评价 DNA 纯度
- 定量分析 DNA 和蛋白质
- 分析水、食品和农作物中的营养元素



紫外-可见光谱

定性和定量分析

紫外-可见光谱通常只有几个较宽的吸收带。大多数有机化合物对紫外-可见光的吸收源自其 π (即不饱和) 键。发色团通常是指具有 π 键的分子基团。当发色团被插入饱和烃 (该物质没有紫外-可见光吸收) 中, 产生的化合物在 185 到 1000 nm 内具有吸收。

发色团及其最大吸收波长示例

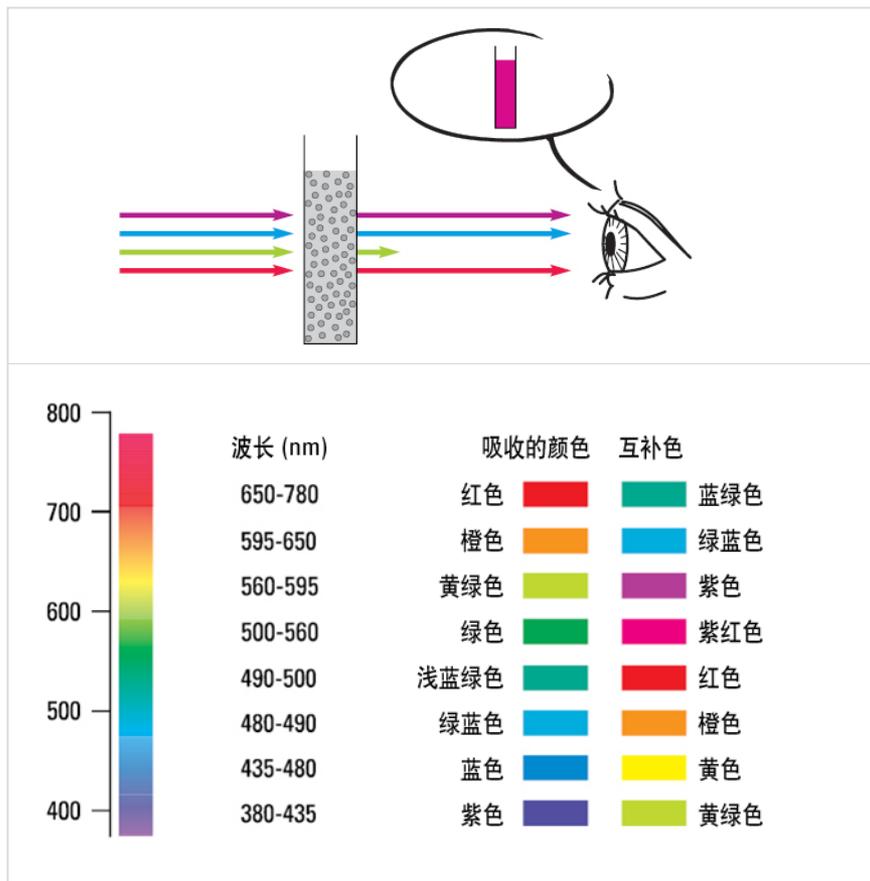
发色团	分子式	示例	λ_{\max} (nm)
羰基 (酮类)	$RR'C=O$	丙酮	271
羰基 (醛类)	$RHC=O$	乙醛	293
羧基	$RCOOH$	乙酸	204
酰胺	$RCONH_2$	乙酰胺	208
硝基	RNO_2	硝基甲烷	271



紫外-可见光谱

定性和定量分析

颜色是物质的一个重要属性。物质的颜色与其吸光系数或反射率相关。人类的眼睛看到的是物质吸收的光的互补色。



透射与颜色 (上图)
吸收与互补色 (下图)

来源：[紫外-可见光谱的基本原理](#)

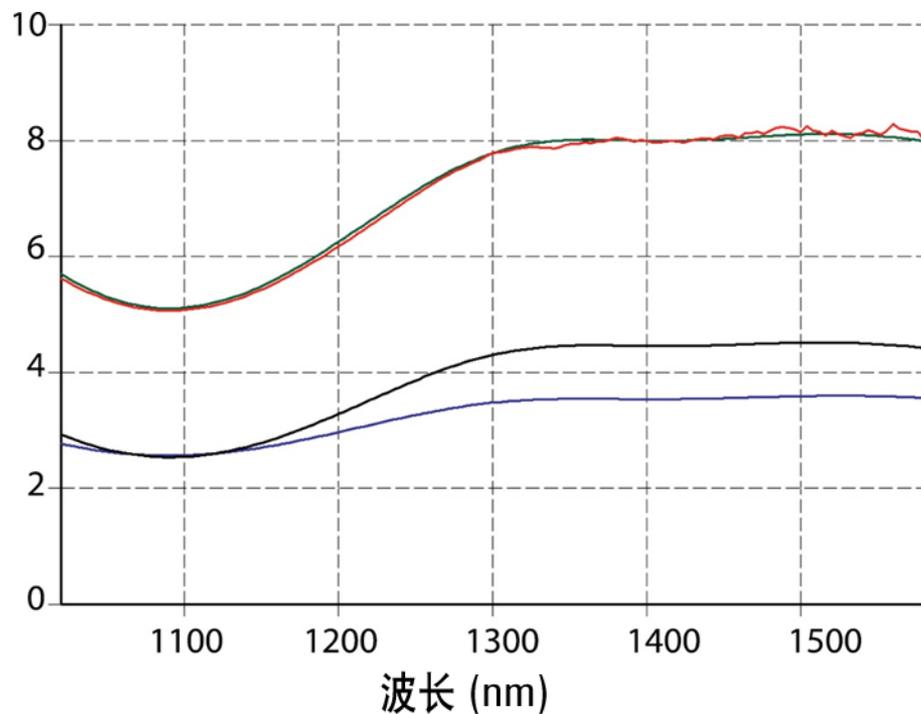
紫外-可见光谱 应用

应用领域	应用
材料	<p>基体材料</p> <ul style="list-style-type: none">• 光学部件：滤光片、透镜、镜子、分束器、偏振器、玻璃• 薄膜、光学及抗反射涂层、纳米复合材料、涂料、太阳能电池• 安全护目镜• 纸浆和纸张• 伪装材料• 太阳镜• 织物/纺织品
化学制品	<ul style="list-style-type: none">• 在制造过程中对原材料和成品进行 QA/QC• 化学鉴定或化学流程研究：合成化学实验室、光化学研究、纳米粒子表征、表面化学研究• 分析化学• 颜色测量：涂料和纺织品（颜色匹配、织物的 QA/QC、SPF 测定）
生物技术和制药	<ul style="list-style-type: none">• 药物结合试验• 酶反应• 分析浑浊的生物样品、组织、细胞匀浆• 细胞内离子测量• 核酸 (RNA/DNA) 和蛋白质检测• DNA 和蛋白质变性/复性检测



紫外-可见光谱

测量 Schott 玻璃滤光片的吸光度



UG11 滤光片 1 的光谱 (蓝色)、UG11 滤光片 2 的光谱 (黑色) 以及 UG11 滤光片 1 和 UG11 滤光片 2 一起测量所得的光谱 (红色)。绿色光谱是基于蓝色和黑色光谱加和的预测结果。

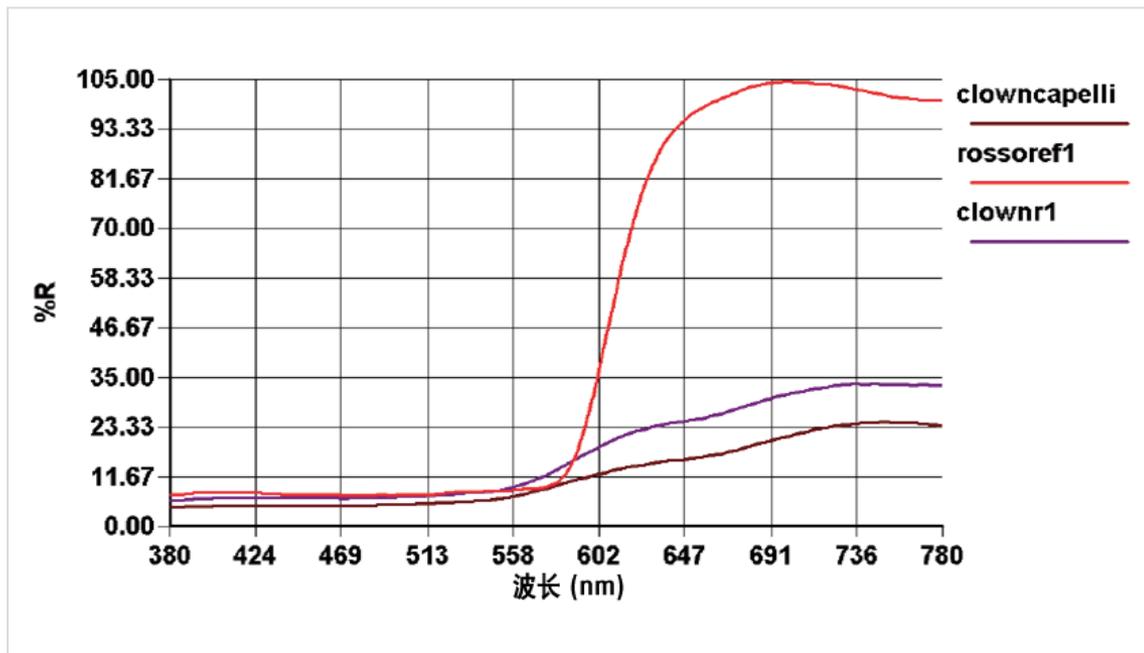
分别测量 2 个滤光片的吸光度并将所得的值相加 (预测值)。该结果与同时测量 2 个滤光片所得的结果 (测量值) 一致。

紫外-可见光谱

测量帆布上颜料的颜色



谱图表明样品 clownnr1 和 clowncapelli 由类似的材料制成。



来源：[使用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计直接通过外部漫反射测量帆布上颜料的颜色](#)

紫外-可见光谱 分析能力

吸光度与浓度之间简单的线性关系以及紫外-可见光相对容易的测量方法使得紫外-可见光谱成为了成千上万种定量分析方法的基础。

紫外-可见光谱

优点

- 可广泛应用于定性和定量分析
- 可用于多种类型的有机和无机分子及离子
- 容易使用
- 快速
- 维护少
- 无损测量

局限

- 检测限比荧光光谱高（更差）
- 重叠的吸收谱带可能会干扰分析
- 如果使用 D2 和 QI 光源（如果使用氙灯光源，则不适用），光敏化合物的测定可能比较困难



荧光光谱 概念

荧光是更高能级的光子激发后发射光子而产生的。

荧光分光光度计的灵敏度高（皮摩尔级），它检测的是暗背景下的信号，这一点与分光光度计不同。

研究级仪器使用扫描单色器对光子进行激发和发射。

许多荧光系统还能测量磷光和发光。

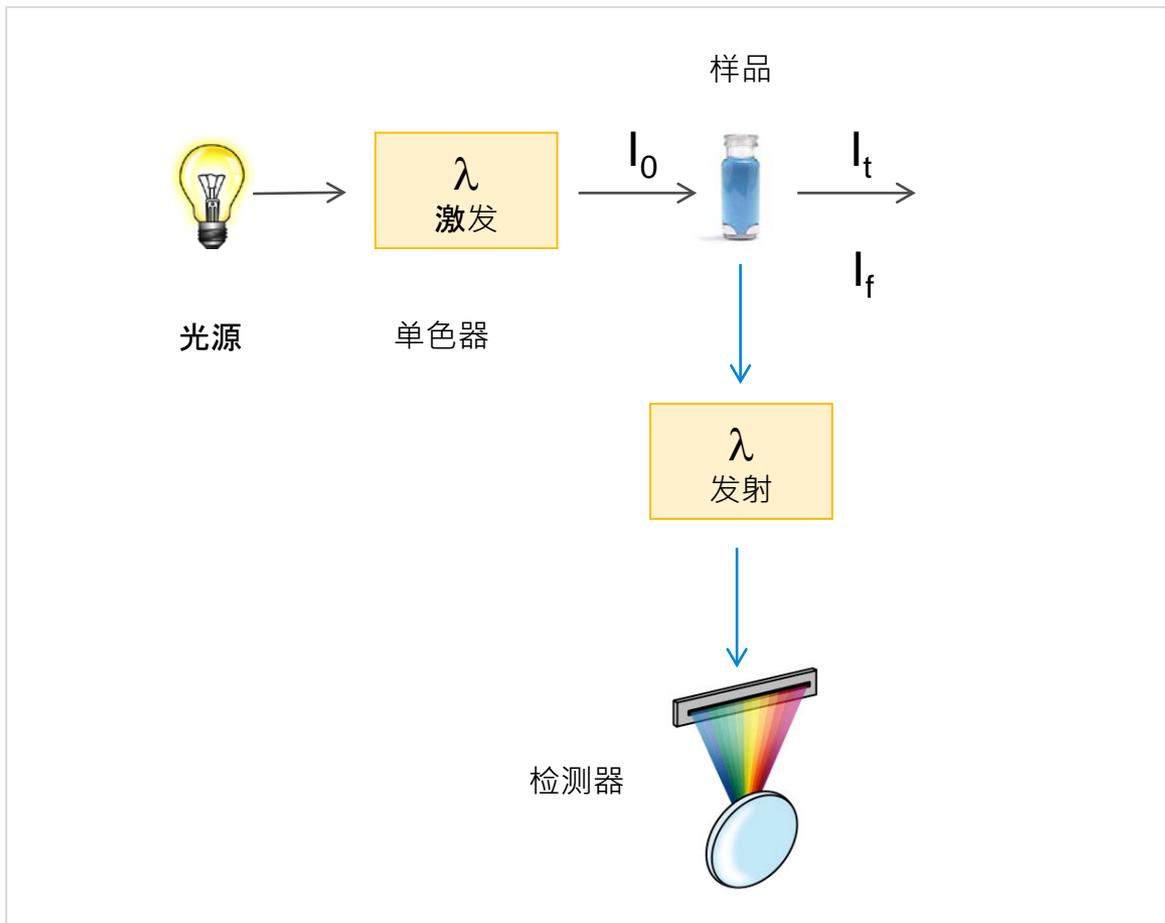


荧光光谱 通用设置



- 灯（光源） 发射一定波长范围的光
- 单色器选择激发光波长
- 样品区域放置样品，分析物吸收光
- 发射更长波长的光
- 单色器选择发射光波长
- 测定透射的光（检测器）

荧光光谱 通用设置



注意：检测器与光源并不在一条直线上，这是为了最大程度降低透射或反射的入射光到达检测器。

荧光光谱 光源

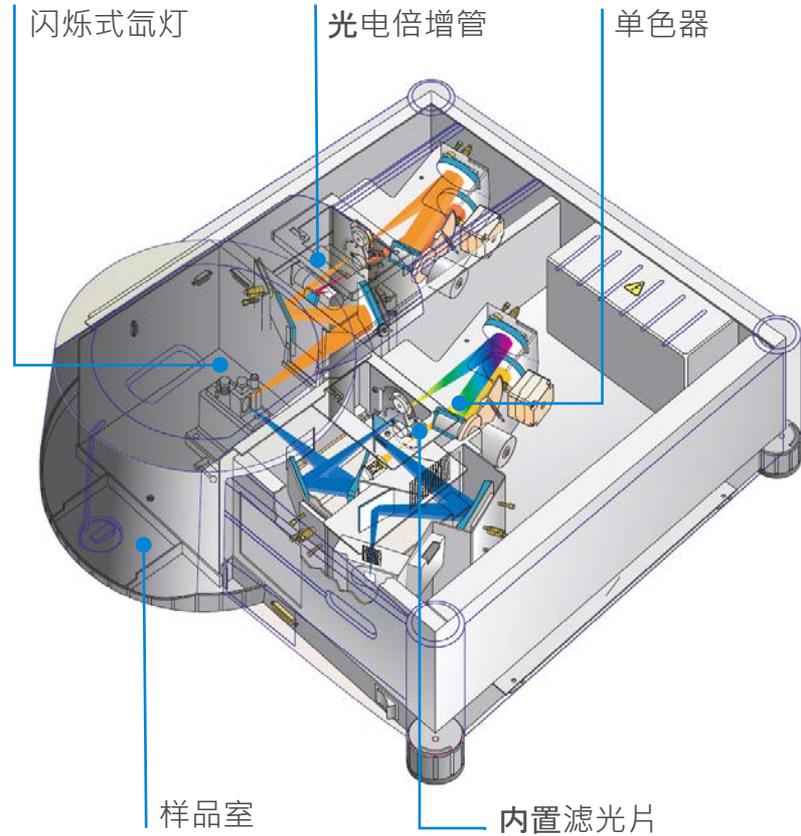
荧光分光光度计采用多种光源：

- **氙灯**：可提供 300 至 800 nm 的连续发射光谱，且光强度基本上恒定
- **汞蒸气灯**：线光源灯，发射接近峰值波长的光
- **激光**：波长选择有限；实际上难以更改

荧光光谱系统

主要应用

- 生物催化剂的热稳定性测定
- 用于活体细胞成像的生物标记物表征
- 石油中的烃类混合物分析
- GPCR 齐聚反应表征

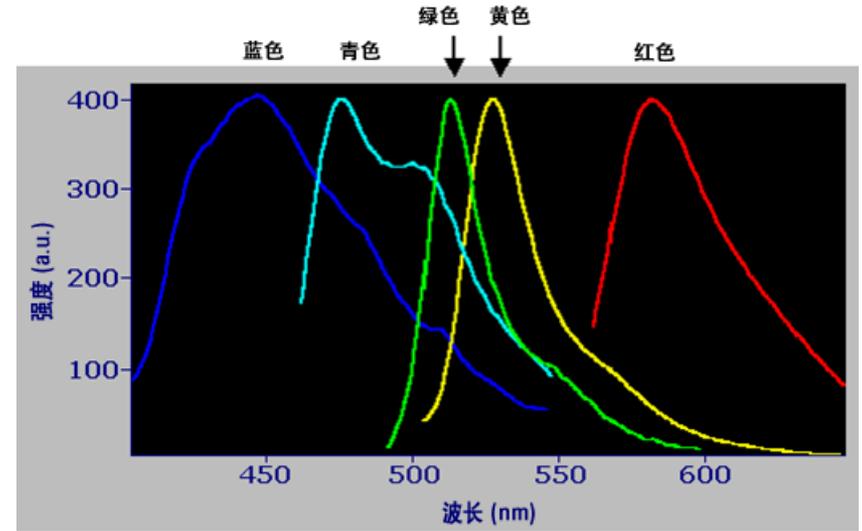
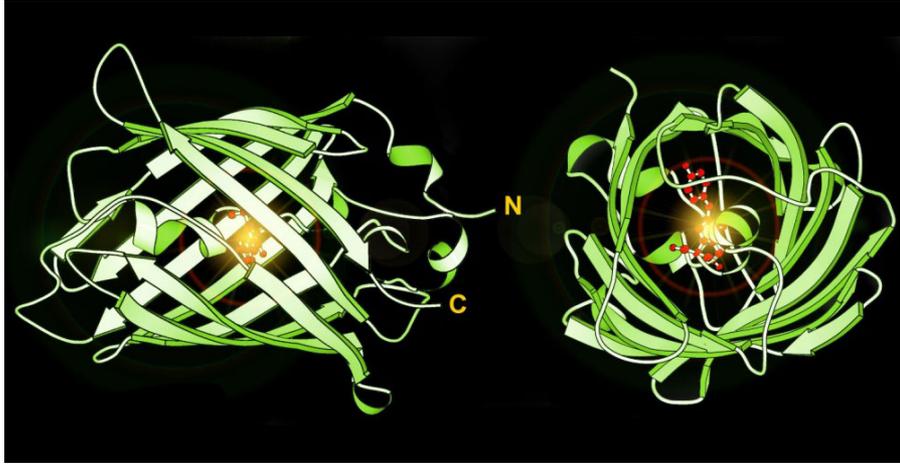


荧光光谱 应用

应用领域	应用
化学	<ul style="list-style-type: none">• 光化学研究• 纳米粒子表征• 表面化学研究• 分析化学
制药和 生物技术	<ul style="list-style-type: none">• 生物化学和生物物理学研究• 蛋白质定量和结构研究：蛋白质-蛋白质相互作用、膜研究• 酶学：利用荧光底物进行酶动力学研究• 分子生物学：DNA 和 RNA 定量分析

荧光光谱

绿色荧光蛋白的胞浆表达

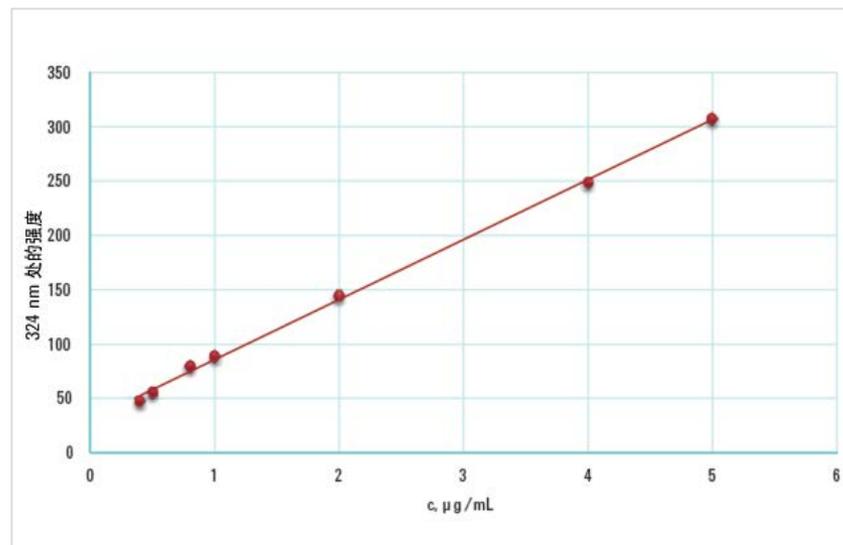
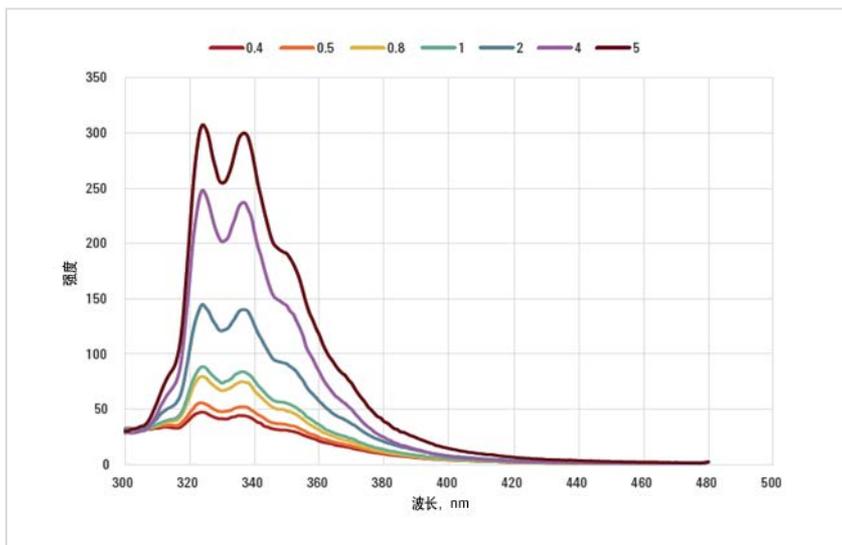


绿色荧光蛋白的示意图。左图：三肽荧光团以红色表示。右图：荧光蛋白在全谱波长范围内的强度对发射波长图。

来源：[绿色荧光蛋白 \(GFP\) 的胞浆表达及其在 *Saccharomyces cerevisiae* \(酿酒酵母\) 中的衍生物：Agilent Cary Eclipse 用于体内检测](#)

荧光光谱

稠环芳烃或石油的定量分析



萘的荧光光谱，激发波长 250 nm，激发光的狭缝宽度 10 nm，发射光的狭缝宽度 5 nm（左图）；在 324 nm 处对萘进行荧光检测的校准曲线（相同浓度的数据点取平均值），激发波长 250 nm，激发光的狭缝宽度 10 nm，发射光的狭缝宽度 5 nm。

来源：[根据 ASTM D5412-93 \(2000\) 采用 Cary eclipse 荧光分光光度计定量分析水中的复杂稠环芳烃或石油](#)

荧光光谱 分析能力

在低浓度条件下，荧光强度通常与荧光团的浓度成正比。

淬灭效应会影响分析结果。淬灭效应是指指定物质的荧光强度降低，其诱因多种多样，如激发态反应或碰撞淬灭。

荧光光谱

优点

- 对芳香族和不饱和化合物灵敏度极高
- 通过衍生或标记可应用于其它化合物
- 容易使用
- 维护少

局限

- 局限于某些类型的化合物
- 混合物可能需要净化
- 可能发生淬灭



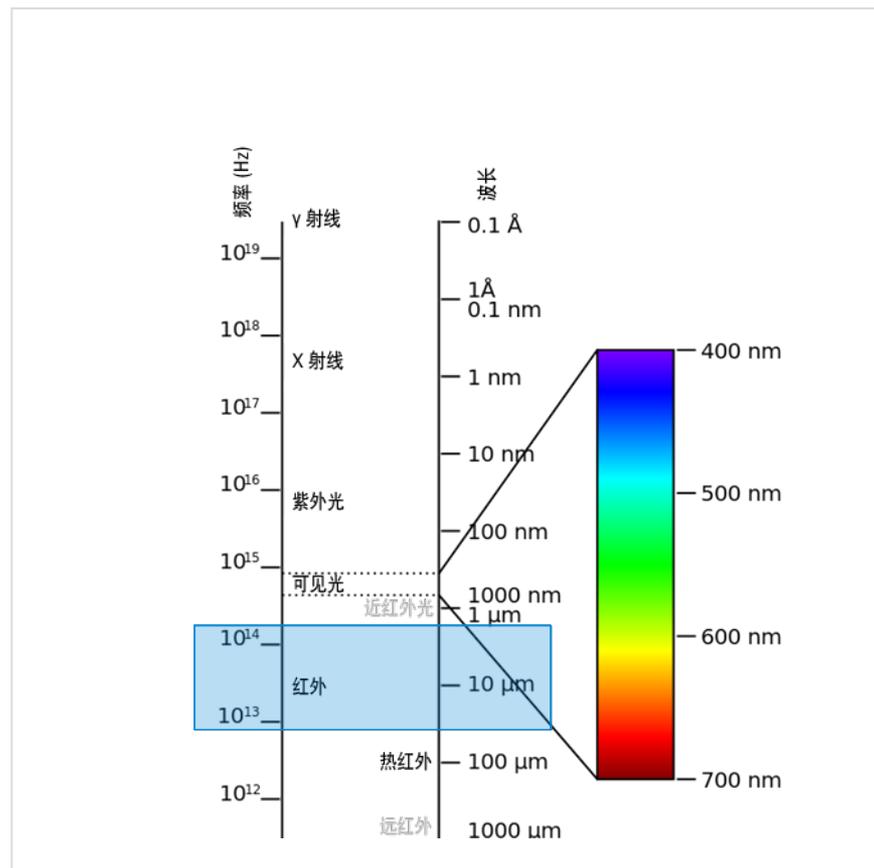
傅立叶变换红外光谱 概念

红外光的波长比可见光长，频率比可见光低。

红外光谱分为近红外、中红外和远红外辐射。最常用的区域是中红外区（波数：4000 - 400 cm^{-1} ）。

傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 是一项分析固体、液体或气体在红外光谱范围内的吸收、发射、光电导性能或 Raman 散射的技术。

FTIR 分光光度计能够在宽广的光谱范围内同时采集高谱图分辨率的数据。

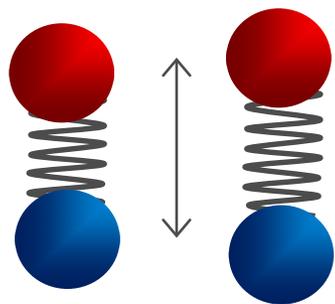


“电磁光谱”，作者：Victor Blacus

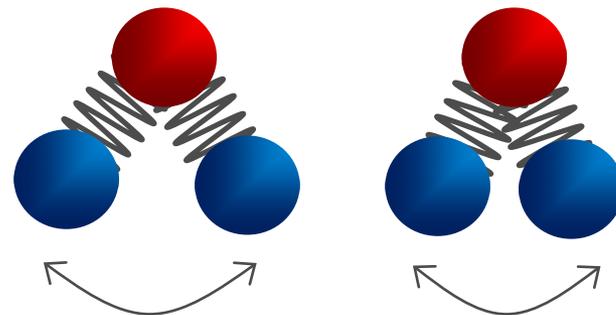
来源：[维基百科](#)

傅立叶变换红外光谱 概念

吸收红外光会引起分子振动。
红外光谱测定振幅的变化。

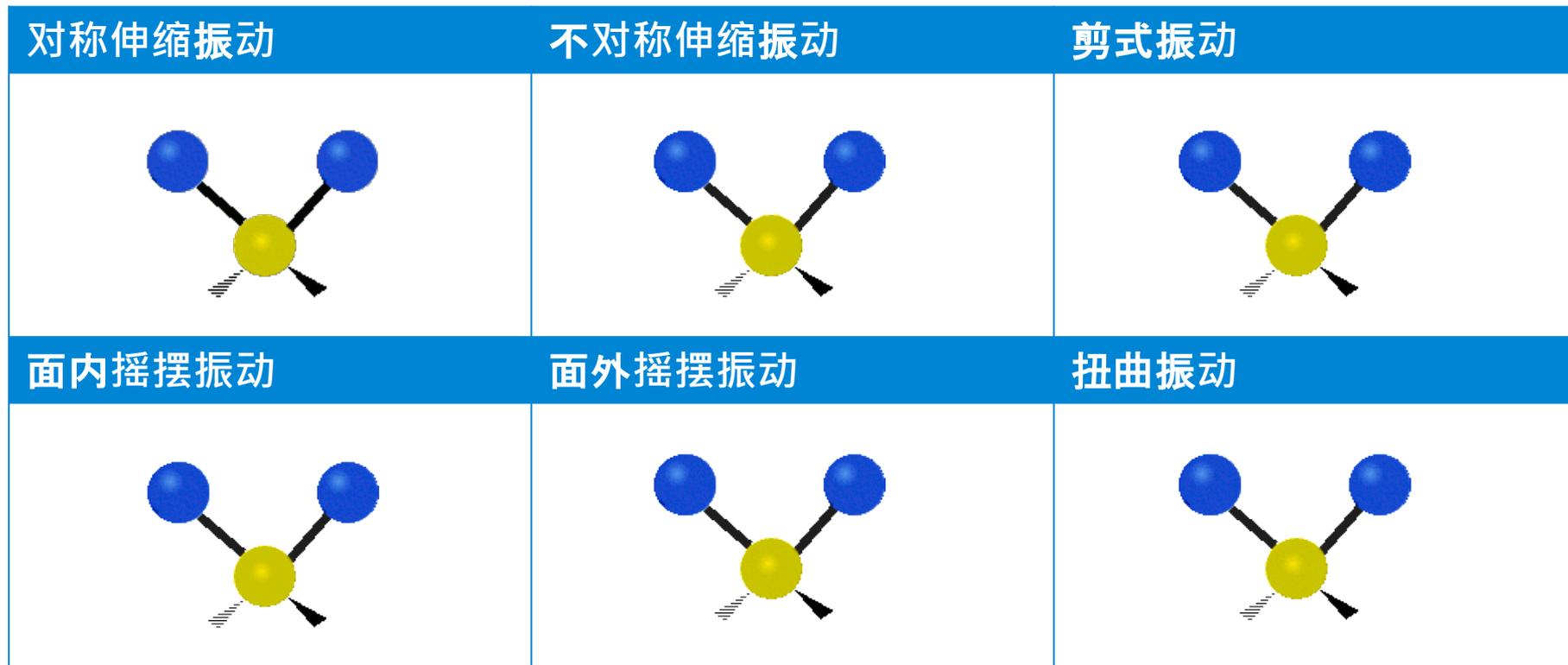


$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$



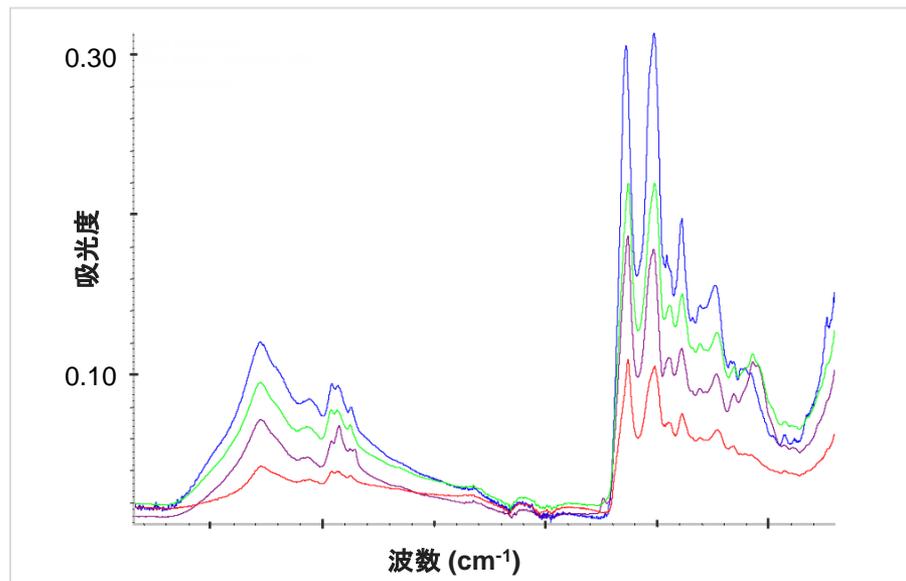
$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

傅立叶变换红外光谱 概念



傅立叶变换红外光谱 概念

- IR 活性键产生峰
- 这些键以不同的频率振动
- 峰位及峰高小的变化来区分化学键
- IR 谱图可作为化合物的指纹图谱



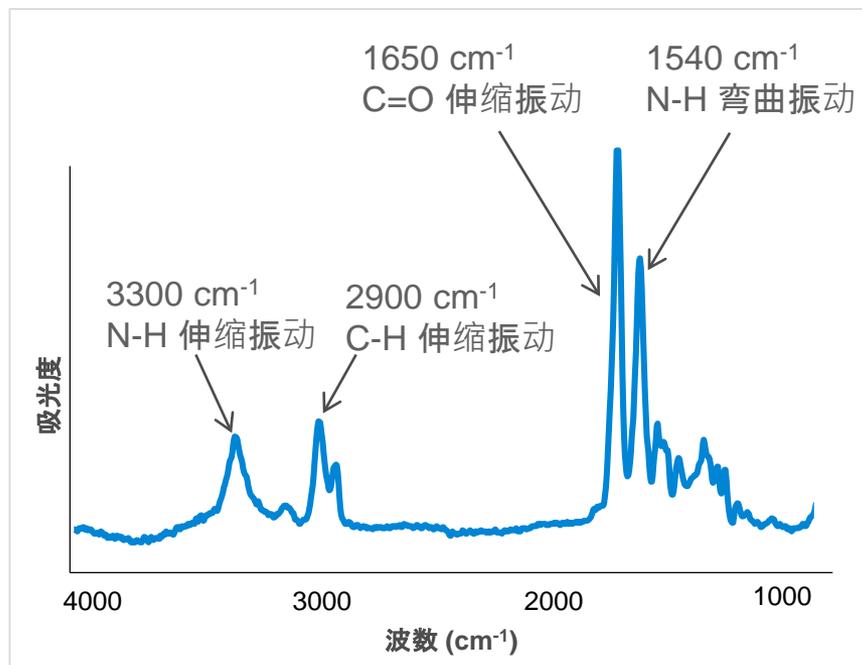
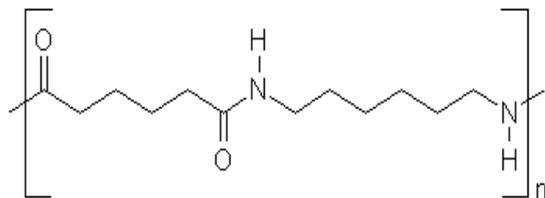
IR



傅立叶变换红外光谱 概念

不同化学键（通常被称为“官能团”）
在吸收处的波数代表了化学键的强度。
较强的化学键在高波数处产生吸收峰。

每个官能团都有其特征吸收频率，可
利用物质的红外光谱解析其化学结构。



傅立叶变换红外光谱

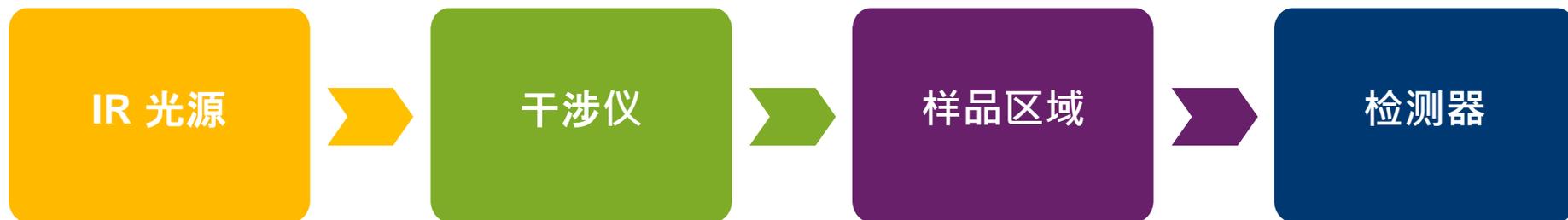
概念

分子的化学键和波数

键	振动类型	波数范围 (cm ⁻¹)
C-H	烷烃 (伸缩)	3000 – 2850
	-CH ₃ (弯曲)	1450 & 1375
	-CH ₂ (弯曲)	1465
	烯烃 伸縮 (面外弯曲)	3100 – 3000 1000 – 650
	芳香烃 (伸縮) (面外弯曲)	3150 – 3050 900 – 600
C=C	炔烃 (伸縮)	~ 3300
	醛类 (伸縮)	2900 – 2700
C=C	烯烃 芳香烃	1680 – 1600 1600 & 1475
C≡C	炔烃	2250 - 2100
C=O	醛类	1740 – 1720
	酮类	1725 – 1705
	羧酸	1725 – 1700
	酯类	1750 – 1730
	酰胺	1680 – 1630
酸酐	1810 – 1760	

键	振动类型	波数范围 (cm ⁻¹)
C-O	醇类、酯类、 醚类、羧酸、酸酐	1300 – 1000
O-H	醇类、酚类 游离 氢键 羧酸	3650 – 3600 3400 – 3200 3400 – 2400
N-H	伯胺和仲胺 及酰胺 (伸縮) (键)	3500 – 3100 1640 – 1550
C-N C=N	胺 亚胺和肟	1350 – 1000 1690 – 1640

傅立叶变换红外光谱 通用设置



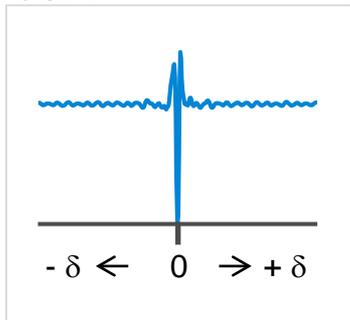
- IR 光源产生红外光束 (宽带光源)
- 干涉仪 (镜像配置) 产生干涉光
- 样品区域放置样品，红外光束穿过样品
- 检测器生成干涉图
- 计算机将干涉图转换为谱图

傅立叶变换红外光谱干涉图

以红外光强度对动镜的位置作图即得到干涉图。

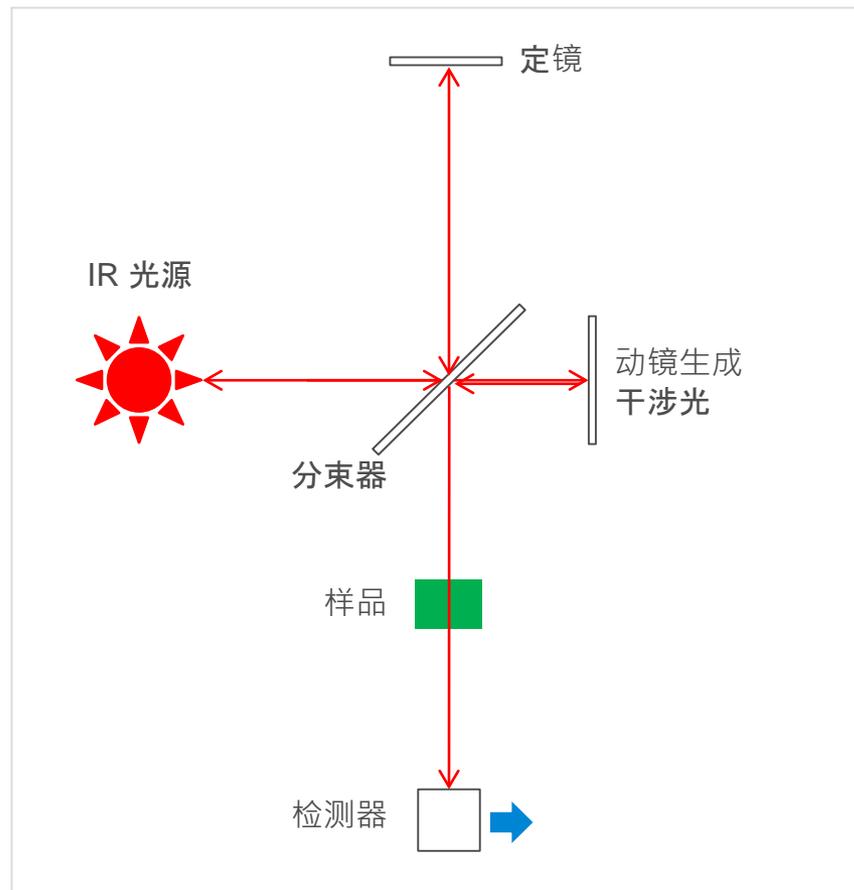
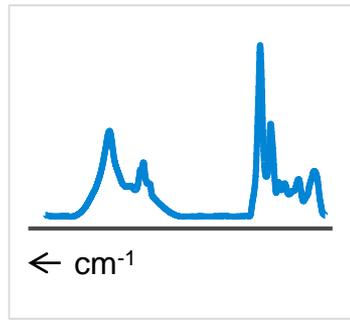
傅立叶变换算法通过分开单个吸收频率并生成强度对波数的图，从而将干涉图转换为谱图。

干涉图



傅立叶
变换

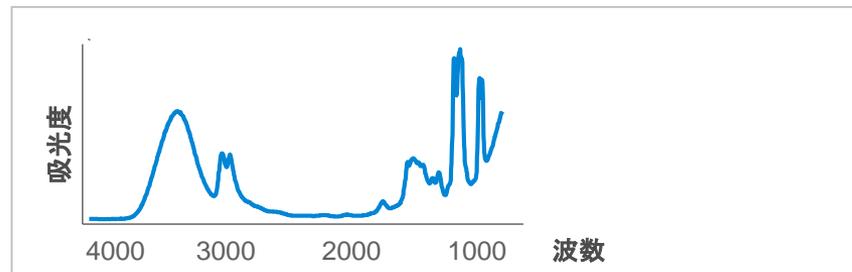
谱图



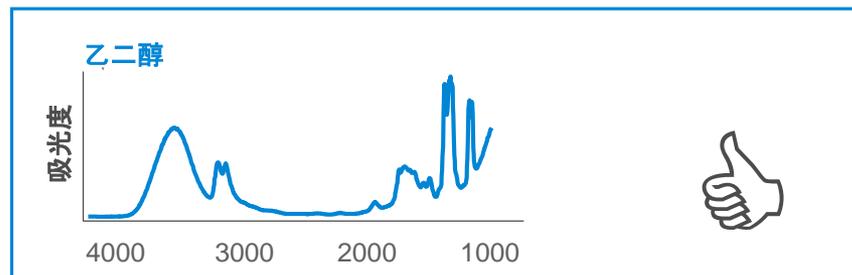
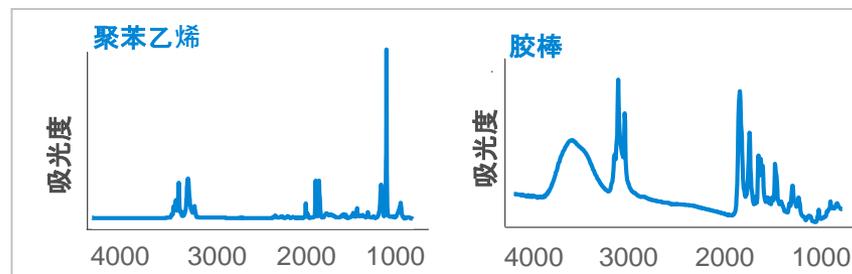
傅立叶变换红外光谱 定性分析

- 独特的红外光谱可鉴定化合物
- 借助红外光谱可深入了解分子结构
(例如, 氰基的存在)
- 计算机搜索红外数据库用来鉴定化合物

1. 未知样品的谱图



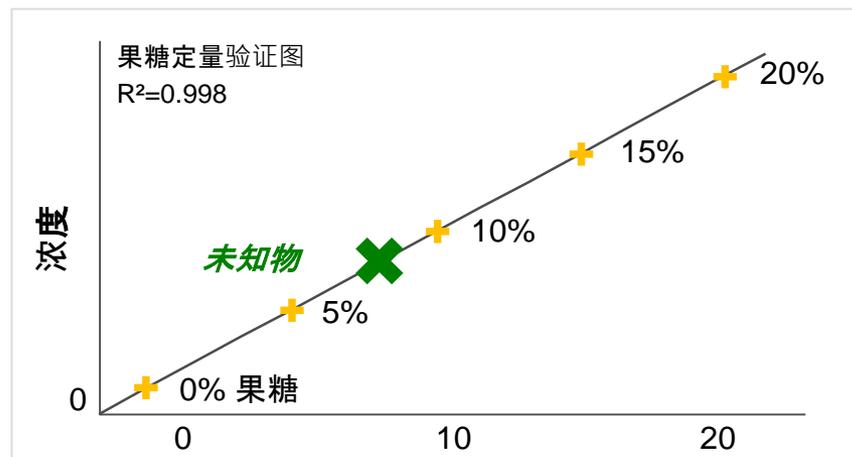
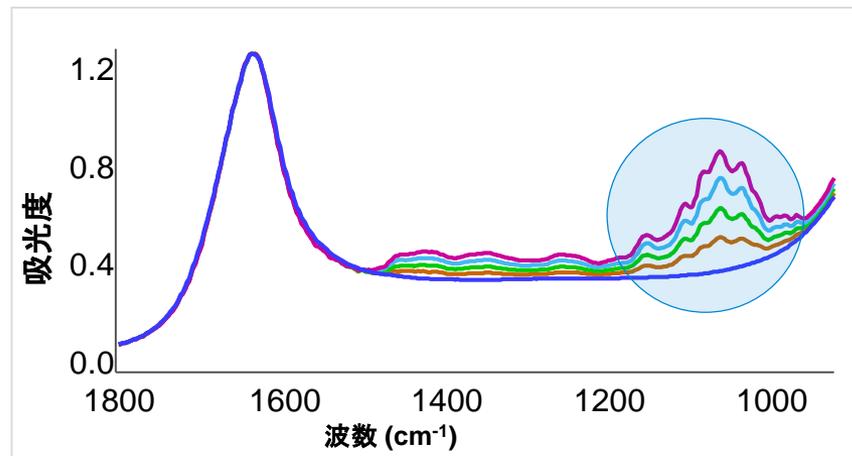
2. 与光谱数据库的对比



傅立叶变换红外光谱 定量分析

定量

- 比尔-朗伯定律可应用于 FTIR 光谱
- 将样品的吸光度与校准曲线（标样的吸光度对浓度作的图）对比
- 适用于混合物 — 同时定量

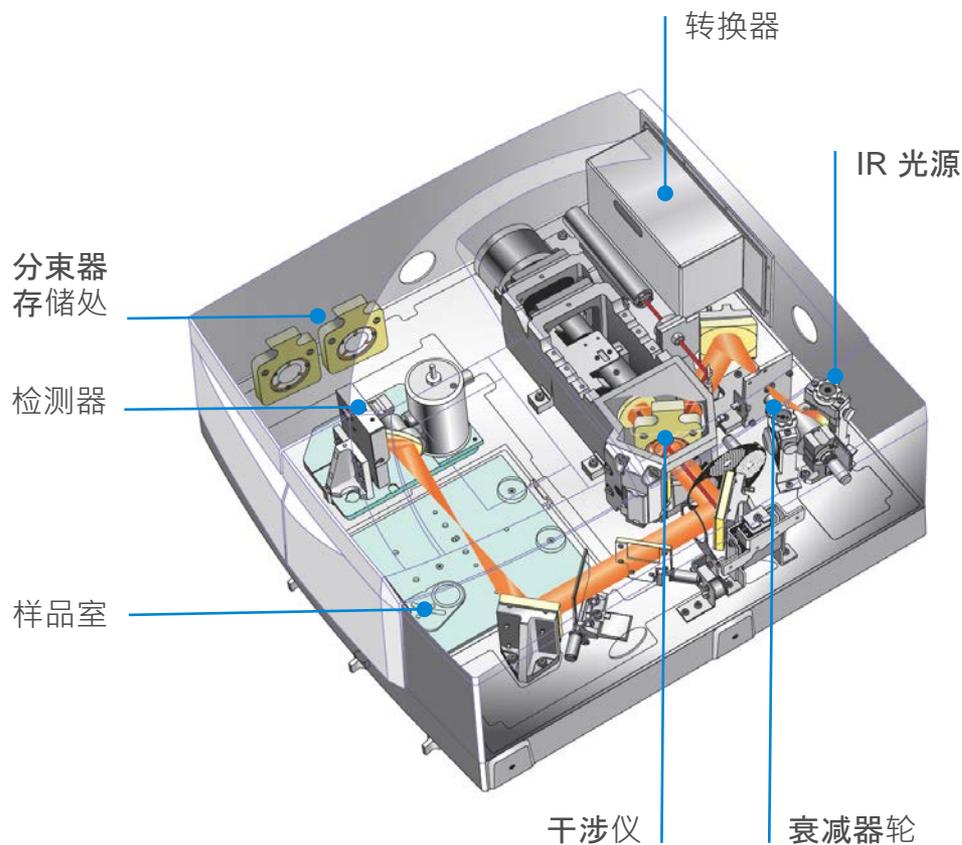


来源：安捷伦内部培训资料

傅立叶变换红外光谱系统

主要应用

- 生物学成像（组织）
- 化学成像
- 过程控制（生物柴油）
- 聚合物/材料研究/控制
- 法医学应用（血醇含量）

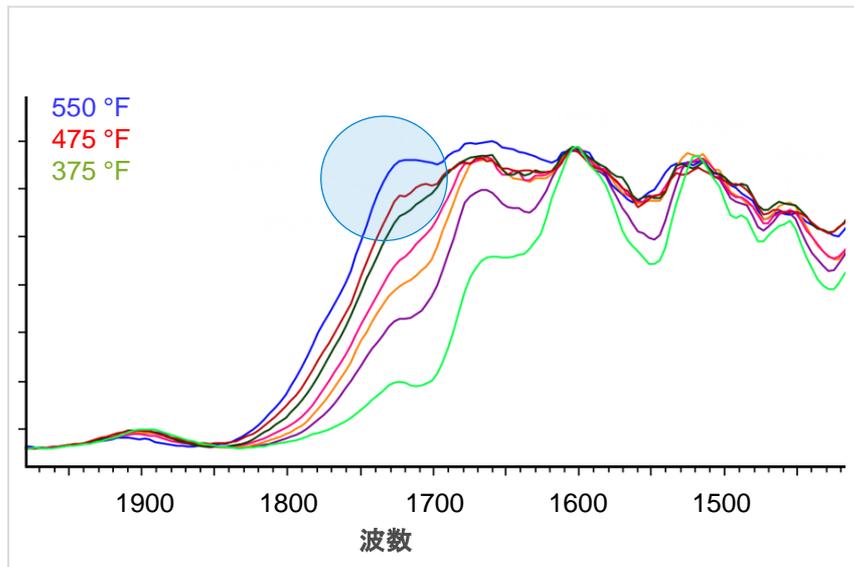


傅立叶变换红外光谱 应用

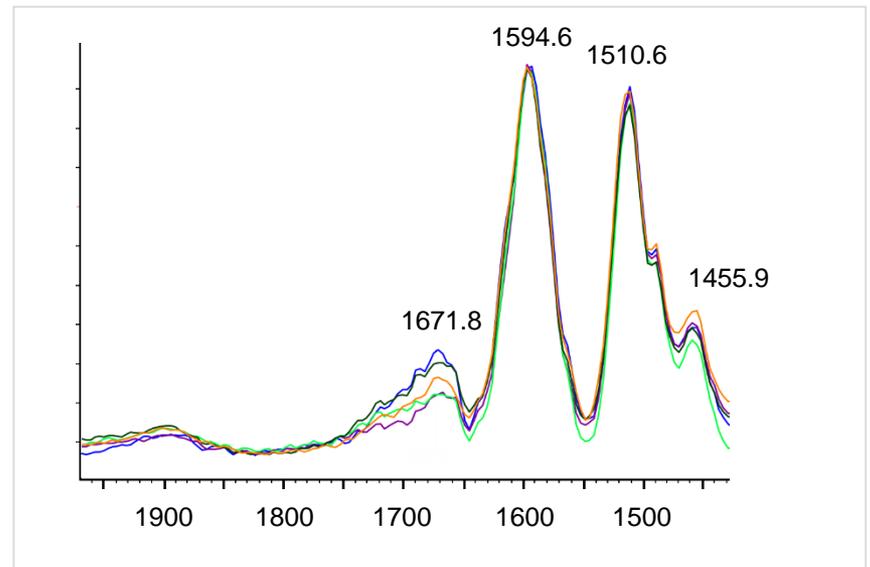
应用领域	应用
材料	<ul style="list-style-type: none">• 复合材料的热损伤和紫外线损伤检测、复合材料固化• 表面涂层鉴别、表面清洁和处理、涂层磨损及风化• 质量控制、艺术品与文物保护、材料研究
能源和化工	<ul style="list-style-type: none">• 对引入的液体原材料和最终产品进行质量控制，包括有机化学品、表面活性剂、润滑剂和食用油。
食品	<ul style="list-style-type: none">• 对引入的原材料和最终产品进行质量控制



傅立叶变换红外光谱 检测复合材料损伤



热损伤后的 Epoxy 1 无沙带复合材料。复合材料试样暴露在一系列的温度下 1 小时。1722 cm⁻¹ (蓝圈) 处的吸收带是由与树脂氧化相关的羰基伸缩振动产生的，表明材料已热暴露过量。



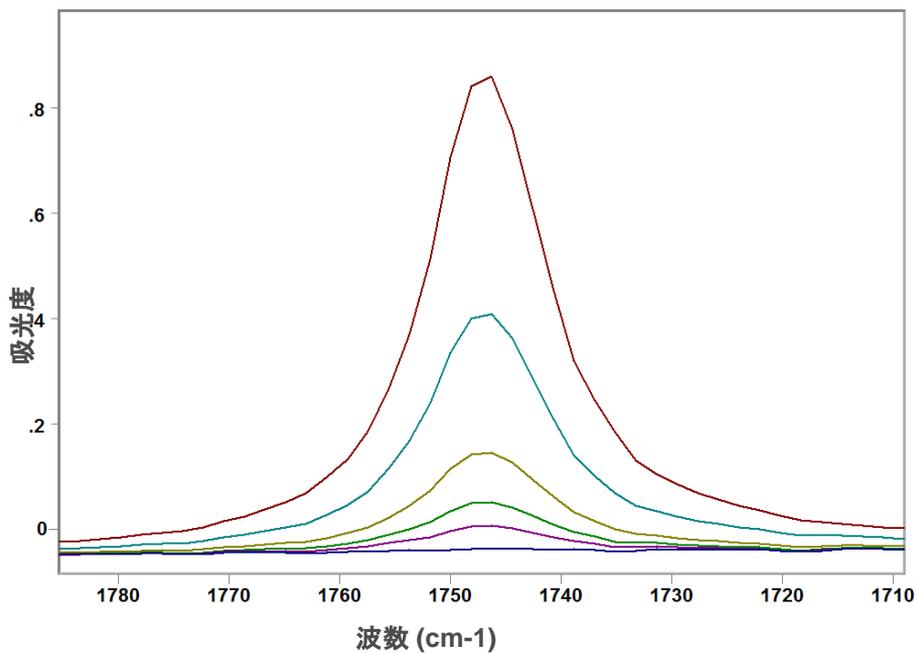
热损伤后的 Epoxy 1 沙带复合材料。复合材料试样暴露在一系列的温度下 1 小时。在厌氧环境下，未出现 1722 cm⁻¹ 振动。

1672 cm⁻¹ 处吸光度的下降很好地表明了其与温度暴露的负相关性。

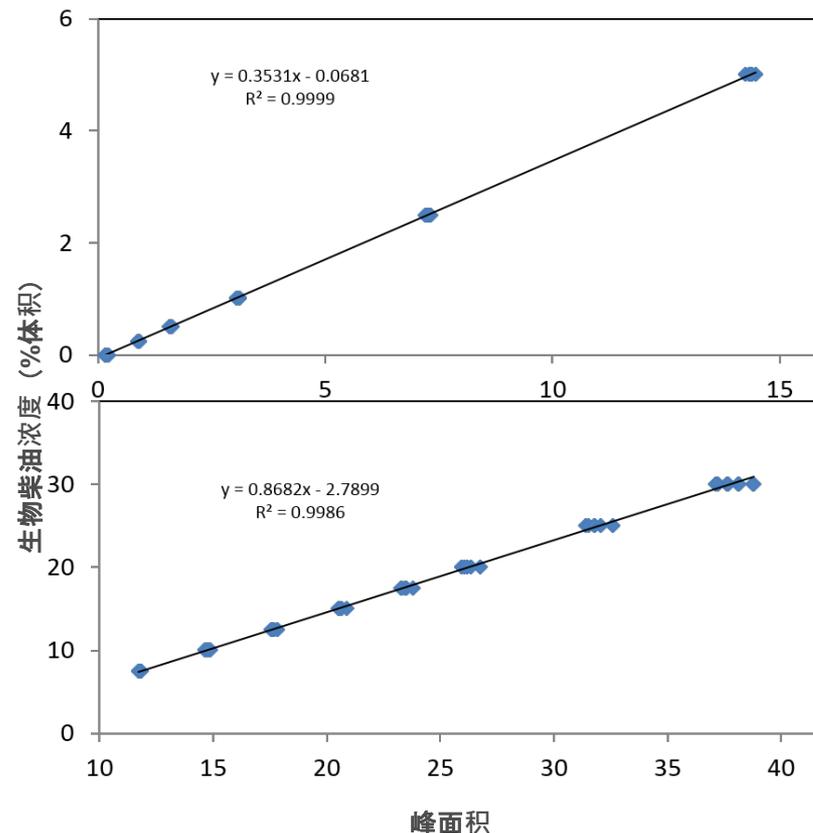
来源：[手持式 4300 FTIR 对复合材料热损伤进行无损评价](#)

傅立叶变换红外光谱

测定高十六烷柴油燃料中的生物柴油浓度



柴油燃料的红外光谱叠加图，以及多种生物柴油浓度在高十六烷柴油燃料吸收区域（1713 到 1784 cm^{-1} ，用于 0 到 6% 浓度范围的校准）的校准

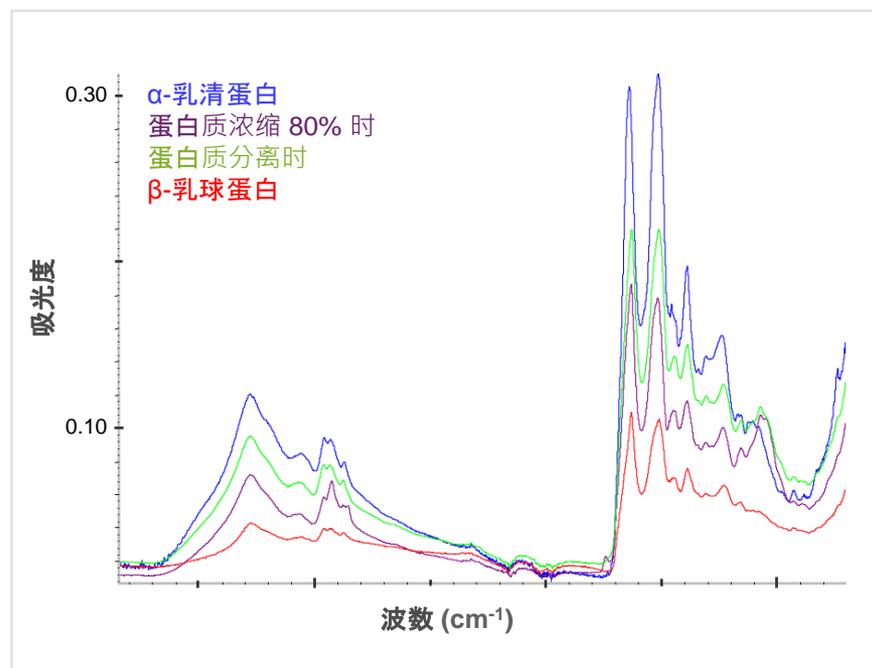


来源：[ASTM D7806-12 用于分析石油基柴油中的生物柴油](#)

傅立叶变换红外光谱 奶粉的质量控制

按照下列步骤采集光谱：

- 将少量蛋白粉放在钻石晶体 ATR 表面上。
- 附加压力钳使样品紧贴钻石晶体。
(钳子上的滑动离合器可避免拧得过紧。)
- 在 4000 到 650 cm^{-1} 范围内采集 64 张叠加干涉图 (在 4 cm^{-1} 的分辨率下采集约 30 秒)。



Cary 630 ATR-FTIR 分析仪上记录的所选奶粉样品的红外光谱

来源：[Agilent Cary 630 ATR-FTIR 分析仪对奶粉进行 QA/QC 分析](#)

傅立叶变换红外光谱

薯片中丙烯酰胺的测定

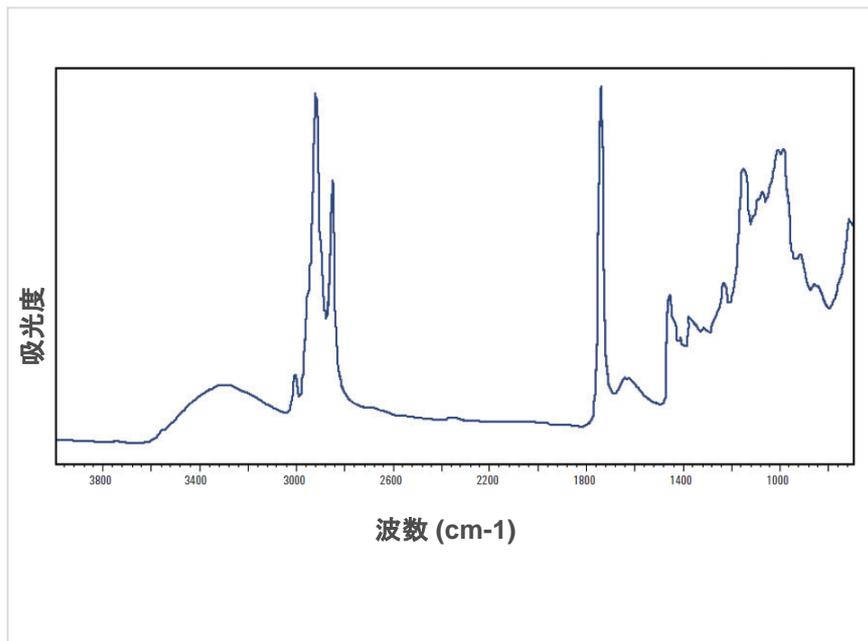
传感器	薯片类型	因子	SE ($\mu\text{g/L}$)	r	
便携式 Cary 630 MIR	a 普通薯片	校准	7	65	0.95
		交叉验证	7	74	0.93
		预测*	7	75	0.90
	b 调味薯片	校准	7	59	0.96
		交叉验证	7	75	0.92
	c 甘薯片	校准	7	74	0.99
交叉验证		7	98	0.98	

a. “普通薯片”是指只含有马铃薯、植物油和盐的薯片

b. “调味薯片”是指添加有其他成分的薯片

c. “甘薯片”是指由甘薯制成的薯片

* 只针对普通薯片的自变量预测



配置单反射钻石晶体 ATR 采样接口的便携式 FTIR 分析仪检测普通薯片饼所得的结果和谱图

来源：[分子光谱概要 — 确保食品质量、生产和安全](#)

傅立叶变换红外光谱 分析能力

红外光谱是一项强大的通用型技术，
可用于分析气体、液体和固体。

它常用于结构鉴定，因为官能团可生成特征谱带（就强度和位置（频率）而言）。

该技术简单、可靠，广泛应用于研究领域和工业领域。

红外光谱

优点

- 操作简单
- 分析快速且准确
- 可处理多种不同类型和尺寸的样品
- 兼备定性分析和定量分析
- 通常只需极少或无需样品前处理
- 无损分析

局限

- 分子必须能与红外光作用
- 元素信息太少



缩写

缩写	定义
A	吸光度
b	光程 (cm)
c	光速 ($3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$)
ε	消光系数或摩尔吸收系数 ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
E	振荡电场
E	能量
FTIR	傅立叶变换红外光谱
h	普朗克常数 ($6.62 \times 10^{-34} \text{ J s}$)
I	透射光强度
I_0	入射光强度
λ	波长
T	透光率
UV-VIS	紫外-可见光
ν	频率 (s^{-1})

了解更多信息

如需了解安捷伦产品的更多信息，请访问 www.agilent.com 或

www.agilent.com/chem/academia

对此幻灯片演示有问题或建议？请联系 academia.team@agilent.com

早期历史	“The Early History of Spectroscopy” by Nicholas C. Thomas, J Chem Edu, Vol 68, 6, August 1991	
入门书	Fundamentals of UV-visible spectroscopy (紫外-可见光谱的基本原理)	5980-1397EN
应用	Measuring optical densities over 10 Abs on the Agilent Cary 7000 Universal Measurement Spectrophotometer (Agilent Cary 7000 通用型分光光度计测量超过 10 Abs 的光密度)	5991-2528EN
应用	Measuring the color of a paint on canvas directly with external diffuse reflectance using the Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer (使用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计直接通过外部漫反射测量帆布上颜料的颜色)	5991-3783EN
应用	配置光纤的 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计简单、自动测量比色物质的光催化特性	5990-7864CHCN
应用	绿色荧光蛋白 (GFP) 的胞浆表达及其在 Saccharomyces cerevisiae (酿酒酵母) 中的衍生物：Agilent Cary Eclipse 用于体内检测	SI-A-1831
应用	Quantification of complex polycyclic aromatic hydrocarbons or petroleum oils in water with Cary eclipse fluorescence spectrophotometer according to astm d 5412-93 (2000) (根据 astm d 5412-93 (2000) 的规定, Cary eclipse 荧光分光光度计定量分析水中的复杂稠环芳烃或石油)	5991-3166EN
应用	安捷伦新型手持式 4300 FTIR 对复合材料热损伤进行无损评价	5991-4037CHCN
应用	ASTM D7806-12 for Biodiesel in Petroleum-based Diesel Fuel Oil (ASTM D7806-12 用于分析石油基柴油中的生物柴油)	5991-5591EN
应用	QA/QC of dairy powders using the Agilent Cary 630 ATR-FTIR analyzer (Agilent Cary 630 ATR-FTIR 分析仪对奶粉进行 QA/QC 分析)	5991-0784EN
应用	Molecular Spectroscopy Compendium - Ensure food quality, production, and safety (分子光谱概要 — 确保食品质量、生产和安全性)	5991-3818EN
网页	CHROMacademy — 学生和大学教职工可免费访问在线课程	
视频和图像	www.agilent.com/chem/teachingresources	



谢谢

◀ ToC

出版号 5991-6592CHCN

仅用于教学目的
2015年12月7日
50

 Agilent Technologies

学术机构
研究