

文章编号: 1001-3806(2004)05-0491-03

## 光纤共振喇曼光谱法探测水中超痕量生物分子

赵永柱<sup>1</sup>, 里佐威<sup>1</sup>, 高淑琴<sup>1</sup>, 任春年<sup>1</sup>, 陆国会<sup>1</sup>, 于英宁<sup>2</sup>

(1. 吉林大学 物理系, 长春 130023; 2. 中国科学院 长春应用化学研究所, 长春 130022)

**摘要:** 水中微量生物分子的探测、识别和控制研究是很重要的课题。采用光纤内共振喇曼光谱法, 可以提高喇曼光谱的强度  $10^9$  倍。把少量  $\beta$ -胡萝卜素溶于吡啶与水的混合液体, 充入空心光纤中构成液芯光纤, 用 514.5nm, 30mW 激光激发, 获得了浓度为  $10^{-7}$  mol/L  $\sim 10^{-9}$  mol/L 的  $\beta$ -胡萝卜素喇曼光谱。该技术为研究水中微量生物分子提供了一种新的实验方法。

**关键词:** 液芯光纤; 共振喇曼光谱; 生物分子; 超痕量

**中图分类号:** O657.37 **文献标识码:** A

### Ultra-trace analysis of biological molecules in water by means of the resonance Raman spectra in liquid-core optical fiber

ZHAO Yong-zhou<sup>1</sup>, LI Zuwei<sup>1</sup>, GAO Shu-qin<sup>1</sup>, REN Chun-nian<sup>1</sup>, LU Guo-hui<sup>1</sup>, YU Ying-ning<sup>2</sup>

(1. College of Physics, Jilin University, Changchun 130023, China; 2. Changchun Institute of Applied Chemistry, the Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

**Abstract:** The study on detecting, identifying and controlling the biological molecules in water is profound and significant project. We used the means of the resonance Raman spectra in the liquid-core optical fiber, and the intensity of the Raman spectra was enhanced  $10^9$  times.  $\beta$ -carotene was dissolved in organic solution (pyridine and water), poured into a number of hollow-core capillary made up of liquid-core optical fiber. The laser wavelength is 514.5nm. The laser power is 30mW. By this means we obtained the resonance Raman spectra of  $\beta$ -carotene with the concentration of  $10^{-7}$  mol/L  $\sim 10^{-9}$  mol/L. This means provided an experiment technique for trace analysis of biological molecules in water.

**Key words:** liquid-core optical fiber; the resonance Raman spectrum; biological molecules; ultra-trace

## 引言

分子生物学的飞速发展, 大大促进了生命科学、医药科学、化学等学科的发展<sup>[1,2]</sup>。很多相关的前沿课题成为倍受人们关注的热门课题。其中, 对水中少量生物分子、乃至单分子的探测、识别和控制研究就是这种热门课题之一。这是因为大多生物过程、化学过程都是在水中进行的。在对水中生物分子研究的技术方法中, 测量生物分子振动光谱是研究分子结构及其变化的重要手段之一。然而, 由于水对红外光谱的强烈吸收, 阻碍了应用红外光谱对水中生物分子的测量。这样, 喇曼光谱就成为测量水中生物分子的一种重要方法。遗憾的是, 分子的

喇曼散射截面太小(只有激发光的  $10^{-8}$  倍  $\sim 10^{-12}$  倍), 影响了应用。有的研究表明, 水溶剂可使在其内的分子的某些振动模式的喇曼光谱减小<sup>[3]</sup>。因而, 应用喇曼光谱方法研究水中生物分子, 尤其对水中少量分子、单分子探测遇到了很大的困难。很多研究人员都在努力探求对水中生物分子测量并获得高灵敏度、高精度的技术方法。液芯光纤以模变换系数小、保偏性能好、对电磁场、温场等反应灵敏等特性, 在传感<sup>[4]</sup>、光谱分析<sup>[5,6]</sup>等领域都得到重要的应用。液芯光纤技术可以将喇曼光谱强度提高  $10^2$  倍  $\sim 10^3$  倍, 共振喇曼效应可以将喇曼光谱强度提高  $10^6$  倍, 若在液芯光纤内产生共振喇曼效应, 则可以提高喇曼光谱强度  $10^9$  倍, 作者运用光纤内共振喇曼技术, 获得了高强度、高灵敏度的喇曼光谱。在液体分子结构、痕量分析研究中都取得了理想效果。将该技术用于探测水中生物分子, 可获得预期结果。下面将介绍用光纤内共振喇曼效应探测低浓度下水中  $\beta$ -胡萝卜素分子的实验原理、实验方法

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20275013)

作者简介: 赵永柱 (1977-), 男, 硕士研究生, 现从事激光光谱与分子光谱技术方面的研究。

E-mail: zuowei-Li @163.com

收稿日期: 2003-09-04; 收到修改稿日期: 2004-04-13

及实验结果。

## 1 实验原理

大量研究充分证明,当频率为  $\nu_0$  的单色光入射物质时,物质分子会产生一种频率为  $\nu_0 \pm \Delta\nu$  的散射光,  $\Delta\nu$  为分子的某种振动模式频率。这种现象称为喇曼散射。当入射的激发光落在样品电子吸收谱带内时,某些喇曼谱带的强度将大幅度增加,这种现象称为共振喇曼效应,见图1。

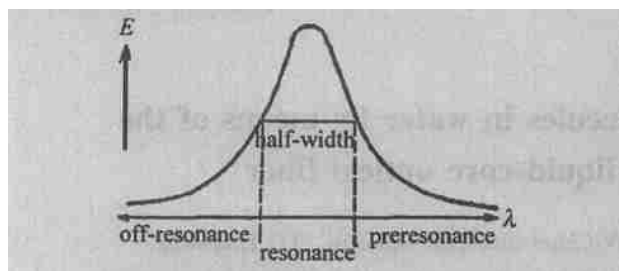


Fig. 1 Preresonance, resonance and off-resonance

PLACEK通过对喇曼散射强度的量子力学计算,获得了分子某一振动的喇曼光谱强度表达式。当一个分子的电子振动起始态  $m$  受一频率为  $\nu_0$  平面偏振光照射,分子跃迁到另一振动态  $n$ ,散射的  $\nu_0 + \nu_{mn}$  的喇曼光在  $4\pi$  立体角内强度为<sup>[7]</sup>:

$$I_{mn} = \frac{2^7 \pi^5}{3^2 c^4} I_0 (\nu_0 + \nu_{mn})^4 \sum_{\rho, \sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}|^2 \quad (1)$$

式中,  $c$  为光速;  $I_0$  表示频率为  $\nu_0$  的入射光的强度;  $\rho = X, Y, Z$  为散射光的方向分量;  $\sigma = x, y, z$  为入射光场在各方向的分量;  $\alpha_{\rho\sigma}$  为散射光张量的  $\rho, \sigma$  分量。按散射理论,由  $m$  向  $n$  跃迁的极化张量的第  $\rho, \sigma$  矩阵元  $(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}$  为:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{mn} = \frac{1}{\eta} \times \sum_{\gamma} \left[ \frac{(M_{\rho})_{\gamma n} (M_{\sigma})_{m\gamma}}{\nu_{\gamma n} - \nu_0} + \frac{(M_{\rho})_{m\gamma} (M_{\sigma})_{\gamma n}}{\nu_{\gamma n} + \nu_0} \right] \quad (2)$$

式中,  $\eta$  普朗克常量;  $\gamma$  为分子的各种电子激发态及其振动转动能级(称为中间态);  $(M_{\rho})_{\gamma n}, (M_{\sigma})_{m\gamma} \dots$  等为相应的跃迁矩的振幅。例如  $(M_{\sigma})_{m\gamma}$  可表示为:

$$(M_{\rho})_{m\gamma} = \int \Psi_{\gamma}^* m_{\rho} \Psi_m d\gamma \quad (3)$$

式中,  $\Psi_{\gamma}$  和  $\Psi_m$  为电子振动波函数;  $m_{\rho}$  为电偶矩运算符的第  $\rho$  分量。  $\nu_{\gamma n}, \nu_{\gamma m}$  为振动态的能差频率。

由(1)式不难看出,当入射光频率  $\nu_0$  趋近于  $\nu_{\lambda m}$  时,强度  $I_{mn}$  大幅度增加。实验研究结果证明,共振喇曼效应可以提高喇曼光谱强度  $10^6$  倍<sup>[8]</sup>,因而,在液芯光纤内产生共振喇曼效应可以提高喇曼光谱强度  $10^9$  倍,作者正是应用该技术进行水中生物分子探测研究的。

## 2 实验

用国产的优质石英拉制成内径为  $200\mu\text{m}$  的毛细管(空心光纤),外涂环氧树脂为保护层,使光纤柔软,不易折断。将从 Biosciences 公司购买的  $\beta$ -胡萝卜素溶于吡啶与水的混合溶液(吡啶与水的体积比为 5:1,混合溶液的折射率约为 1.48)。将不同浓度的溶液充入不同长度的空心光纤(折射率为 1.462)中,构成含不同浓度的溶液的不同长度的液芯光纤。两端用带有窗口的“封头”封住,防止液体流淌并保持测量时光纤内液体稳定。喇曼光谱测量是在法国生产的 DILOR-OMARS89 型喇曼光谱仪上进行,信号接收用 PI 公司生产的 CCD(LN/CCD-1100-PB/UVAR)。激发光源为  $\text{Ar}^+$ , 514.5nm, 50mW。激光入射光纤一端,另一端接收喇曼散射光。

## 3 实验结果

### 3.1 低浓度下液芯光纤最佳长度

研究表明,用液芯光纤测量光纤内样品时,光纤存在着一个最佳长度  $L$ ,在这一长度下可以获得最大喇曼光谱强度。经理论推导<sup>[9,10]</sup>:  $L = \frac{1}{\alpha_0 - \alpha_i} \times$

$\ln \frac{\alpha_0}{\alpha_i}$ , 式中,  $\alpha_0, \alpha_i$  分别为光纤对激发光和喇曼光的损耗系数。在作者的研究中,水和吡啶的混合溶液在可见光范围内是高透明的。 $\beta$ -胡萝卜素在这样混合液体中浓度低,对光的吸收损耗一般小于空心光纤的工艺损耗(内表面欠光滑,内径的不均匀等)。这时光纤对光的损耗主要由液芯光纤工艺损耗决定,其损耗系数比较小,随波长变化更小。光纤对喇曼光的损耗系数  $\alpha_i$  和对激发光的损耗系数  $\alpha_0$  相差很小,为研究方便,可以认为  $\alpha_0 = \alpha_i = \alpha$ 。经数学运算得最佳长度  $L = 1/\alpha$  值。所用光纤损耗系数约为  $5 \times 10^{-3} \text{cm}^{-1}$ 。作者用 1m~2m 长光纤获得了高强度的喇曼光谱。

### 3.2 激发激光波长的选择

为了获得最佳的实验效果,尤其获得最佳的共振喇曼效应,激发光波长(频率)的选择是很重要的。选用的待测样品  $\beta$ -胡萝卜素分子的几个振动模式的振动频率分别为  $4.56 \times 10^{13} \text{Hz}$  (C=C 键伸缩振动, 频移  $\nu = 1520 \text{cm}^{-1}$ ),  $3.465 \times 10^{13} \text{Hz}$  (C-C 键伸缩振动,  $\nu = 1155 \text{cm}^{-1}$ ) 和  $3.015 \times 10^{13} \text{Hz}$  (C-H 键弯曲振动,  $\nu = 1005 \text{cm}^{-1}$ )<sup>[11]</sup>。由(1)式知道,当激发

频率  $\nu_0$  趋近电子基态和激发态跃迁频率  $\nu_{yn}$  时所获得喇曼强度越强, 选用  $\text{Ar}^+$  离子激光的 514.5nm 波长激光 ( $\nu_0 = 5.83 \times 10^{14} \text{ Hz}$ ), 这一频率即在  $\text{Ar}^+$  激光器产生的波长中功率较大, 又最接近  $\beta$ -胡萝卜素中电子基态和激发态的跃迁频率, 能获得最强共振喇曼光谱, 会使实验获得最佳结果。

选用 514.5nm 波长激光作为激发波长, 还因为在透明的有机溶剂中, 514.5nm 波长激光能使  $\beta$ -胡萝卜素几条吸收谱线产生共振效应, 它的位置及它们所激发的喇曼光在吸收谱带边缘和几乎在吸收带之外, 这就减少了光损耗而能获得高强度共振喇曼光谱, 见图 2。

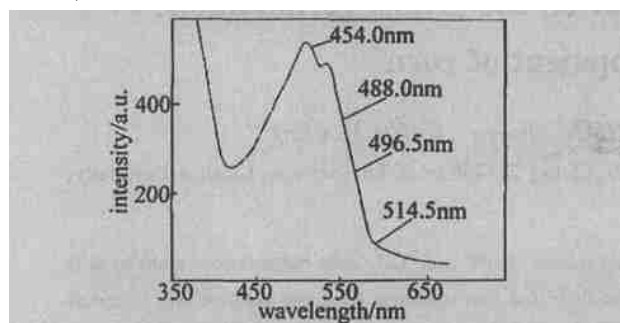


Fig. 2 The absorption spectrum of  $\beta$ -carotene in  $\text{CS}_2$  and the positions of the  $1520\text{ cm}^{-1}$  Raman lines excited by 514.5nm, 496.5nm, 488.0nm and 454.0nm laser

### 3.3 光纤共振喇曼光谱技术是探测水中生物分子的一种新实验方法

喇曼光谱是研究水中生物分子特性和含量的主要手段之一。由于喇曼散射截面小, 所以采用光纤内共振喇曼效应来提高喇曼光谱强度。但水的折射率(1.33)比所用的光纤材料石英的折射率(1.462)小, 以水为芯液体不能构成液芯光纤。将能溶解生物分子的吡啶(折射率 1.53, 且不与水和  $\beta$ -胡萝卜素发生化学反应)与水混合, 使混合后的溶液的折射率大于石英空心光纤的折射率, 充入石英空心光

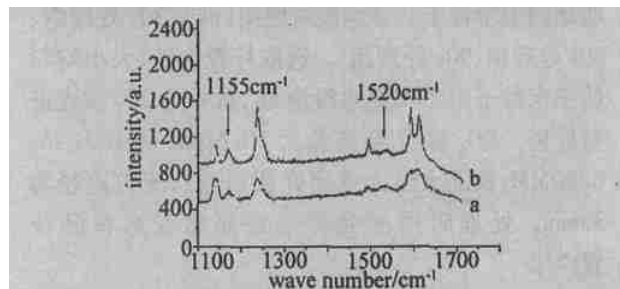


Fig. 3 The resonance Raman spectra of  $\beta$ -carotene in liquid-core optical fiber

a—1.10m,  $10^{-7} \text{ mol/L}$  b—1.10m,  $10^{-9} \text{ mol/L}$

纤后构成液芯光纤, 以便能使待测生物分子产生共振喇曼效应的激光入射光纤而获得高强度生物分子的喇曼光谱。采用这种方法并与纯吡啶喇曼光谱相比较, 获得了  $10^{-7} \text{ mol/L} \sim 10^{-9} \text{ mol/L}$  的理想的  $\beta$ -胡萝卜素的水相喇曼光谱(见图 3, 其它的峰均为吡啶的喇曼峰)。

## 4 结 论

喇曼光谱是研究水中微量生物分子主要方法之一, 采用光纤内共振喇曼光效应, 可以大幅度提高喇曼光谱的强度。用高折射率, 并能与生物分子、水相溶的溶剂提高光芯液体折射率可构成液芯光纤。该液芯光纤在测量中存在着一个最佳长度, 其大小为光纤总损耗系数的倒数。用这种光纤共振喇曼技术, 获得了低浓度 ( $10^{-7} \text{ mol/L} \sim 10^{-9} \text{ mol/L}$ ) 的  $\beta$ -胡萝卜素的水相喇曼光谱。光纤共振喇曼光谱方法是探测水中生物分子一种新的实验方法。

## 参 考 文 献

- [1] MIZUNO M, TAHARA T. Novel resonance Raman enhancement of local structure around solvated electrons in water [J]. *J Phys Chem*, 2001, 105(39): 8823~8826.
- [2] PEMBERTON R S, SHERVELL H F. Raman spectroscopy study of complex formation between P-cresol and propionitrile [J]. *J Raman Spectr*, 1995, 26: 373~380.
- [3] SINGH S, KRUEGER P J. Raman spectral studies of aqueous solutions of non-electrolytes: dimethylsulfoxide, acetone and acetonitrile [J]. *J Raman Spectr*, 1982, 13(2): 178~188.
- [4] AL TKORN R, KOEVI I, PELLETIER MJ. Raman performance characteristics of teflon AF 2400 liquid-core optical fiber sample cell [J]. *Appl Spectr*, 1999, 53(10): 1169~1176.
- [5] AL TKORN R, KOEVI I, van DUYNERP *et al.* Low-loss liquid-core optical fiber for low-refractive-index liquids: fabrication, characterization, and application in Raman spectroscopy [J]. *Appl Opt*, 1997, 36(34): 8992~8998.
- [6] TSUNODA K I, NOMURA A, YAMADA J *et al.* The possibility of signal enhancement in liquid absorption spectrometry with a long capillary cell utilizing successive total reflection at the outer cell surface [J]. *Appl Spectr*, 1989, 43(1): 49~55.
- [7] 郑顺旋. 激光喇曼光谱学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 16~143.
- [8] 麦克黑尔 J L. 分子光谱 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2003. 364~406.
- [9] LI Z W, LI J, GAO Sh Q. Resonance Raman spectrum of  $\beta$ -carotene in liquid-core optical fiber [J]. *J A P*, 1998, 37(4): 1889~1891.
- [10] LI Z W, GAO Sh Q, SUN X *et al.* Effect of optical fiber loss on resonance Raman spectra of sample with low concentration [J]. *Spectr Letter*, 2001, 34(5): 569~578.
- [11] 里佐威, 高淑琴, 孙成林 *et al.* 低浓度样品喇曼光谱的实验研究 [J]. *分析化学*, 2000, 28(2): 1512~1515.