

介绍我国第一台 WFL 型激光拉曼分光光度计

杨 明 台

(北京第二光学仪器厂)

激光拉曼光谱分析法是六十年代发展起来的一门重要的分析新技术,是研究物质结构与组成的重要工具之一。

1923 年,斯迈卡(Smekal)从理论上预示了拉曼效应这一现象。

1928 年,印度物理学家拉曼(C. V. Raman)在实验中发现了物质散射效应。后来称之为拉曼散射或拉曼效应。

在三十年代有人用水银灯作光源制成简单的拉曼光谱仪。由于光源太弱以及单色仪、电子学水平的限制,仅有极少数样品能够被激发,激发的时间也太长,由几十个小时到几百个小时或者根本激发不出拉曼散射光。因此,拉曼分光光度计在相当长的年代里被人们遗忘了。尽管发现拉曼效应和产生拉曼光谱仪都在红外分光光度计的前头,但是拉曼分光光度计的广泛应用较红外分光光度计大大落后了。

六十年代初,由于激光的产生,分光系统的改进,电子学的发展,使拉曼分光光度计获得了新生。七十年代前后出现激光拉曼分光光度计,近几年来发展很快,并广泛应用于科研和生产过程中,已成为研究物质结构和组成的必不可少的分析仪器。

北京第二光学仪器厂与中国科学院吉林应用化学研究所、上海有机化学研究所、北京电子所、武汉地质学院(原北京地质学院)等单位,遵照伟大领袖和导师毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,学习大庆工人阶级有条件要上,没有条件创造条件也要上的革命精神,充分发

挥“科研、生产、使用”和“工人、技术人员、领导干部”两个三结合的巨大威力,顶住了“四人帮”的干扰和破坏,打破了帝国主义的技术封锁。在不到三年的时间内,研制成功我国第一台激光拉曼分光光度计,主要技术指标达到设计要求,大部分技术指标超过了设计要求,达到国外同类型仪器的先进水平。填补了我国的一项空白,为英明领袖华主席争气,为毛主席的革命路线争光。

一、仪器用途

激光拉曼光谱法主要用于有机化学、生物化学、高分子物理、高分子化学、分析化学、络合化学、石油化工以及大气污染的监测等方面。可以测定各种有机化合物分子、生物高分子的结构;人造纤维、新型高分子材料的结构与性能;还可作快速微量和超微量分析,以及应用于络合催化、络合萃取等方面。

运用这种仪器将进一步揭示分子内部的秘密,可以得到有关分子的几何形状,分子内和分子间的作用力,分子的振动-转动信息及分子的结构和物质的组成等方面资料。

二、拉曼光谱仪的原理与结构

1. 拉曼效应

当有一束单色光(一般为可见光)照射试样物质时,入射光将有部分被试样分子所散射,产生两种效应。

单色光照射后,若散射光的频率与入射光

频率相同时为瑞利散射。在这种情况下,入射辐射光子与物质分子发生弹性碰撞,但是光子与分子无能量交换,只是光子的运动方向发生了改变。

单色光照射后,若在瑞利散射线两侧的散射光的频率低于或高于入射光频率的一系列对称排列的散射线称之为拉曼散射,这种现象叫做拉曼效应。此种情况下,发生非弹性碰撞,不仅光子的运动方向发生变化,而且光子与分子有能量交换,从而使光子的能量也发生变化,则又有两种情况。

(1) 当光子(设频率为 ν_0 的入射光可看作是具有能量 $h\nu_0$ 的光子)与处于基态分子碰撞时,如果分子原来处于低能级 E_1 状态,碰撞后使分子跃迁到高能级 E_2 状态,那么分子将获得能量 $(E_2 - E_1)$,而光子就要损失这部分能量,这时散射光频率比入射光频率小,出现斯托克斯线(也叫做红伴线)其频率为:

$$\nu_- = \nu_0 - \frac{E_2 - E_1}{h}$$

(2) 当光子与激发态分子碰撞时,如果分子原来处在高能级 E_2 状态,碰撞后使分子跃迁到低能级 E_1 状态,那么分子就要损失能量 $(E_2 - E_1)$,而光子将获得这部分能量,这时散射光频率比入射光频率大,出现反斯托克斯线(也称紫伴线)其频率为:

$$\nu_+ = \nu_0 + \frac{E_2 - E_1}{h}$$

E_1 为分子基态能量,
 E_2 为分子激发态能量。

斯托克斯线的频率或反斯托克斯线频率与入射光的频率之差表示为 $\Delta\nu$,称为拉曼位移。相对应的斯托克斯线与反斯托克斯线的拉曼位移 $\Delta\nu$ 相等:

$$\Delta\nu = \nu_0 - \nu_- = \nu_+ - \nu_0 = \frac{E_2 - E_1}{h}$$

图 1 表示拉曼效应图。

但必须指出:

A. 在通常情况下,分子多处于基态,故斯托克斯线比反斯托克斯线强得多,所以拉曼光

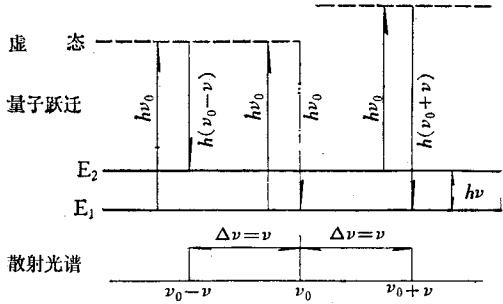


图 1 拉曼效应示意图

谱分析中多采用斯托克斯线。

B. 拉曼散射线的频率位移 $\Delta\nu$ 与入射光的频率 ν_0 无关(所以在做拉曼光谱分析中,可以任意选择合适频率的激光作光源),而与分子的结构有关。事实也是如此,某物质的散射分子的拉曼位移 $\Delta\nu$ 就是该物质分子的振动或转动频率,因此利用分子的拉曼光谱强度的大小,拉曼谱线的数目,位移大小就可以对物质分子的结构和组成进行研究。

C. 通常,入射光子的能量必须远远大于振动跃迁的能量而小于电子跃迁的能量时,才能产生拉曼散射。且光子是被分子所散射,而不是被吸收。

2. 仪器工作原理

仪器用单色性、方向性好的高强度激光器作光源,射入前置单色器(即激光滤光器)滤光后,将所需波长的激光照射试样,从而试样分子产生拉曼散射光,用复合反光镜和大孔径聚光透镜收集拉曼散射光至入射狭缝处,通过双光栅单色器获得拉曼光谱,然后经出射狭缝射至光电倍增管阴极,由光讯号变为电讯号,用直流放大器或光子计数器把讯号放大处理送记录仪记录拉曼谱线和位置,则可分析出试样结构和组成。

仪器的结构方框图见图 2。

3. 仪器的组成

(1) 光源 仪器带有氩离子 (Ar^+) 激光器及激光电源、氦-氖 (He-Ne) 激光器。

(2) 外光路系统(包括前置单色器,样品照明和拉曼光收集系统)。

(3) 双联单色器。

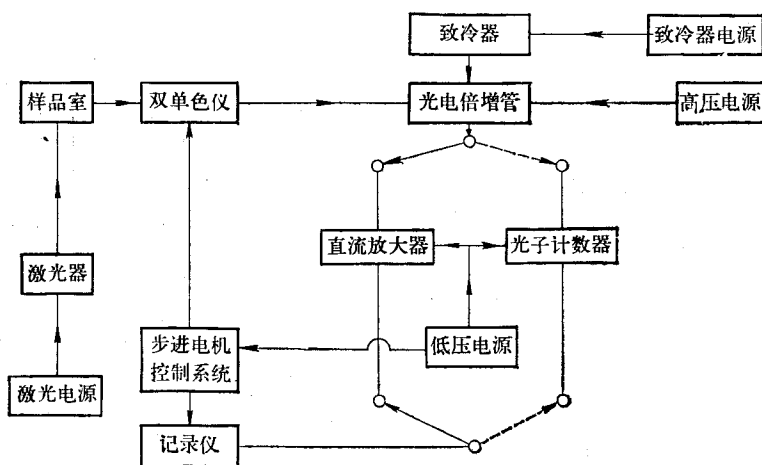


图2 接收系统方框图

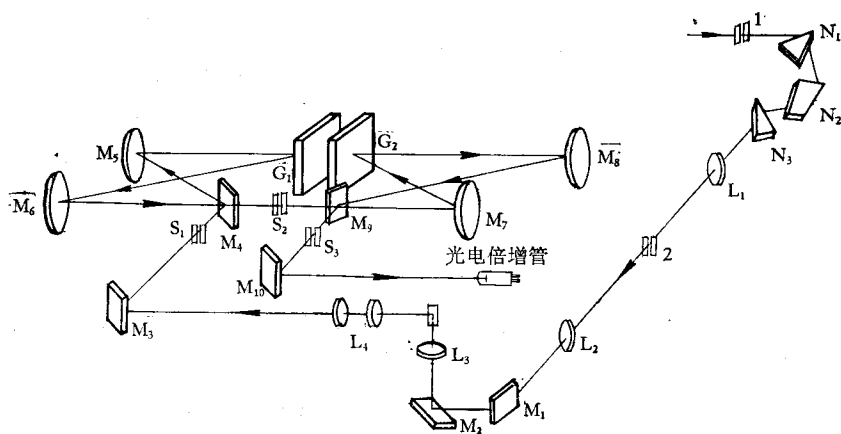


图3

1、2 为外光路系统狭缝； N_1 、 N_3 为三棱镜； N_2 为阿贝棱镜； L_1 、 L_2 、 L_3 为透镜； L_4 为大孔径聚光透镜； M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 、 M_9 、 M_{10} 为平面反光镜； M_5 、 M_6 、 M_7 、 M_8 为离轴抛物镜； S_1 、 S_2 、 S_3 为入射，中间和出射狭缝； G_1 、 G_2 为平面衍射光栅

(4) 光电测试记录系统(包括直流放大器、光子计数器、供光电倍增管用的高压电源、放大器用的低压电源、供光子计数器和步进电机用的电源及外接电子电位差计作记录仪)。

仪器光学系统见图3。

三、仪器各部分的技术性能和特点

1. 激光器及激光电源

(1) 氙离子激光器采用腔内分光，谐振腔没有热补偿机构、三点球形支撑、备有电磁充气阀门，贮气瓶和气压测量装置。激光器具有工作寿命长、输出功率高、稳定性好的优点。主要指标：总功率在4瓦以上、5145埃、4880埃的

单线输出功率不少于700毫瓦，与激光电源配合输出稳定度优于1%。

(2) 本仪器还备带He-Ne激光器，它具有成本低、操作简便的优点，利用其长的波长，可以降低荧光，并扩充了波长范围。

2. 外光路系统

包括前置单色器、样品照明和聚光系统。它的作用是引进激光束至样品池，照射样品产生拉曼光，然后以最大限度收集拉曼光送进双联单色器。

(1) 前置单色器 前置单色器又称激光滤光器，它是由 $62^\circ 22'$ 的三棱镜、一块相当 $62^\circ 22'$ 的阿贝棱镜、焦距为170毫米的消色差双胶合

聚光镜及缝宽为 0.3 毫米的狭缝所组成(见图 4)。它的主要作用是: A. 可以消除激光的等离子线及其他杂散光进入光路。 B. 任意选择激光的不同波长满足分析样品的需要。

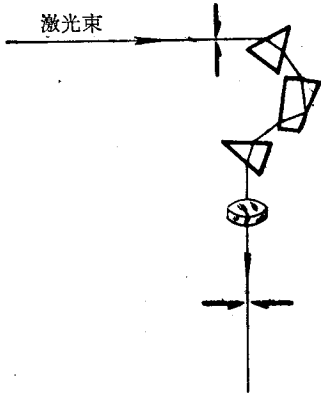


图 4 前置单色器原理图

前置单色器的主要特点: A. 它的结构具有 90° 恒偏向, 即当改变激光波长时方向恒定不变。 B. 处于最小偏向角满足布儒斯特条件: $\tan i = n$, n 为棱镜材料折射率, i 为入射角。

(2) 样品照明和拉曼光收集系统 为了最大限度收集极微弱的拉曼散射光, 本系统备有成像质量好、消色差的大孔径 ($f/1$)、长工作距离的聚光透镜, 并在样品池的上方和右方设有球面反光镜, 致使拉曼光近一倍的增加, 见原理图 5。

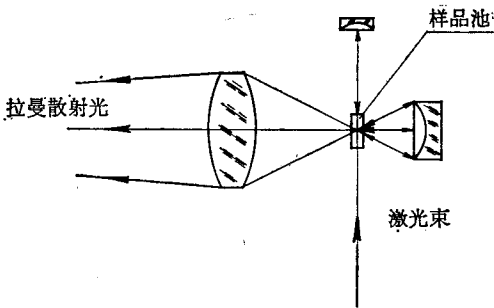


图 5

(3) 样品室 样品室比较宽大, 它处于主机右侧前方, 样品池的工作台可作 $x-y$ 两个方向微调, 使得试样、激光束及双联单色仪的入射狭缝被聚光镜所成的像, 三者能精确地重复定

位。

3. 双联单色仪

由于拉曼散射光极其微弱, 仅有激发光强度的 10^{-6} — 10^{-8} , 所以它对单色仪的要求, 除了一般分光光度计的要求外, 尚有一些特殊要求。本仪器采用 Chupp-Grantz (C-G) 光学系统, 按照色散相加方式把两个单色仪串联成双联单色仪。它主要是由两块背靠背的大面积优质复制光栅, 四块离轴抛物镜和三个精密狭缝等部分组成。

(1) WFL 型的双联单色仪具有下列优点: A. 由于拉曼光极微弱, 为了收集更多的拉曼散射光, 仪器具有大的相对孔径。 B. 采用了双联单色仪结构, 可以有效地降低杂散光, 以及克服二次衍射。光路严格密封, 致使杂光干扰降到最低程度, 大大地提高了讯噪比。 C. 双联单色仪 (C-G 型) 按 U 字型排列又采用离轴抛物镜, 既消除球差, 又降低彗差, 使成像质量达到最佳的程度。 D. 具有大的色散和高分辨率。

(2) 双联单色仪的主要技术指标

焦距: $f = 500$ 毫米。

抛物镜离轴角: $\alpha = 15^\circ$ 。

相对孔径: $D/f = 1/6$ 。

光栅参数:

刻线数: 1,200 条/毫米,

闪耀波长: 5,000 埃,

刻划面积: 81×84 毫米²,

杂散光: 离主线 50 厘米⁻¹处为 2×10^{-5} ,

集光效率: 4,000 埃, 8,500 埃处不低于 40%, 线色散 ≈ 8.6 埃/毫米。

(3) 狭缝机构 入射、中间、出射狭缝均用手动开启和关闭, 稳定可靠、开启范围为 0.04—2 毫米, 示值误差 2 微米、重复性 1 微米。

(4) 线性波数扫描机构 仪器的波数线性扫描是由余割机构和光栅台转动轴系精密配合实现的, 波数精度和再现性达到了理想值, 两块光栅背靠背地安装在同一个光栅台上, 使得两块光栅严格同步, 见图 6。

(5) 波数显示采用二套度盘 显示光栅位置的为绝对波数, 拉曼谱线对主线的位移为相

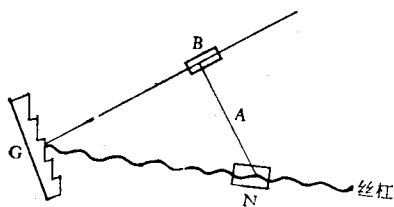


图6 余割机构原理图

对波数,大度盘格值为 100 厘米^{-1} ,小度盘格值为 1 厘米^{-1} ,可估读到 0.2 厘米^{-1} 。

扫描速度依赖于改变供步进电机用的脉冲信号频率。共分为16挡速度:1、3、5、10、30、50、80、225 $\text{厘米}^{-1}/\text{分}$;机械放大20倍后又得到20、60、100、200、600、1,000、1,600、4,500 $\text{厘米}^{-1}/\text{分}$ 。

4. 光电探测记录系统

(1) 光电倍增管 本仪器采用两种光电倍增管作为光电转换放大元件。为配合氩离子激光器(激光波长为4880埃、5,145埃),选用了6,256S光电倍增管。为配合氮-氛激光器(激发波长为6,328埃),选用了9,558B光电倍增管。

(2) 高效能的小型光电倍增管致冷器 在激光拉曼分光光度计中,拉曼讯号是极微弱的,为了降低倍增管的热噪声(即暗电流)提高讯噪比,WFL型采用了半导体致冷技术,致冷器开机后30分钟使室温降到 -30°C ,噪声可以降低二个数量级,与光子计数器密切配合,供探测极其微弱的拉曼讯号具有无可争辩的优越性。

(3) 小型稳定的直流放大器 直流放大器主要用于一般强度的拉曼光测量,即平均电流大于 10^{-9} 安培的拉曼讯号。尽管如此,拉曼讯号毕竟是微弱的,所以提高讯噪比和稳定性是直流放大器的主要问题。本仪器采用了场效应管组成差分放大器。其优点可以提高光电倍增管阳极负载电阻,加大信号电压,使场效应管工作温度低,漂移大大减少,工作稳定可靠。主要参数:

电流测量范围: 10^{-6} — 10^{-10} 安培,

电流增益: 10^4 ,

工作4小时零点漂移小于100微伏。

为了保护光电倍增管和场效应管,直流放大器附加有保护电路,当输入光强较强时(一般是三倍满度输出),电磁快门动作挡住光路,过载指示灯显示过载,扫描停止,从而保护了电路元件。

(4) 高灵敏度的光子计数器 光子计数器原理见图7。

为了探测极微弱的拉曼散射光(测量平均电流小于 10^{-10} 安培),本仪器备带有高灵敏度光子计数器,其主要参数: A. 计数量程分为9挡: 10、30、100、300、1K、3K、10K、30K、100K。 B. 时间常数分为9挡: 0.5、1、2、4、6、8、10、15、30秒。 C. 电荷灵敏前置放大器; 带宽20兆赫,增益为200倍。 D. 主放大器: 带宽20兆赫,增益10—500倍,主放大器为线性宽频带放大器,其特点是噪音小,线性好,频带宽。 E. 阈值: 0.1—5伏。 F. 道宽: 0.1—2.5伏。

(5) 高低压电源 A. 光电倍增管高压电源数据: 输出电压: -500 — $-1,500$ 伏,连续

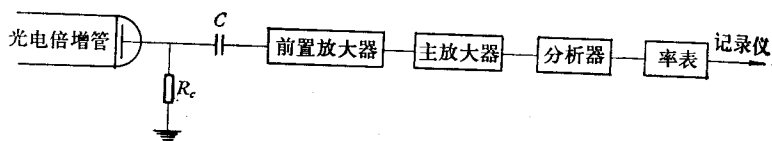


图7

可调,输出电流: 2毫安,稳定度: 0.05%,纹波: <30 毫伏。 B. 各路低压电源采用稳压单元,设有过流短路保护。

5. 各种不同用途的样品池架

为了便于分析不同性质和状态的样品,WFL型仪器备带液体、固体、气体、毛细管、旋转样品池架和正在研制中的测角器,高温和低温样品池架。

四、鉴定测试结果

1976年年底由中国科学院、一机部、北京市仪表局等部门主持下,组织来自全国有关科研机关、工矿企业、大专院校等69个单位组成鉴定委员会,对WFL型仪器进行了全面的鉴定和测试,其结果(包括记录的有关拉曼谱图,见

图 8—14) 如下:

1. 分辨率

设计要求: $1-2\text{ 厘米}^{-1}$ 。

实测结果: 0.8 厘米^{-1} 。

能够很好地分辨四氯化碳 (CCl_4) 459 厘米^{-1} 处四个峰。

2. 波数精度

设计要求: $0-2,000\text{ 厘米}^{-1}$, 为 $\pm 2\text{ 厘米}^{-1}$;

$2,000-4,000\text{ 厘米}^{-1}$, 为 $\pm 4\text{ 厘米}^{-1}$ 。

实测结果: 全波段为 $\pm 0.5\text{ 厘米}^{-1}$ 。

3. 波数重复性

设计要求: $\pm 1\text{ 厘米}^{-1}$ 。

测试结果: $\pm 0.3\text{ 厘米}^{-1}$ 。

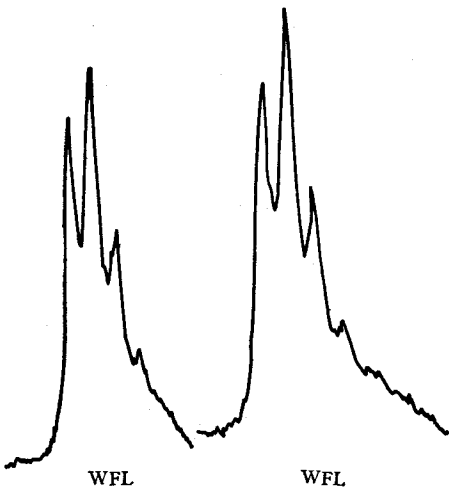


图 8 四氯化碳 459 厘米^{-1} 谱带的高分辨谱图

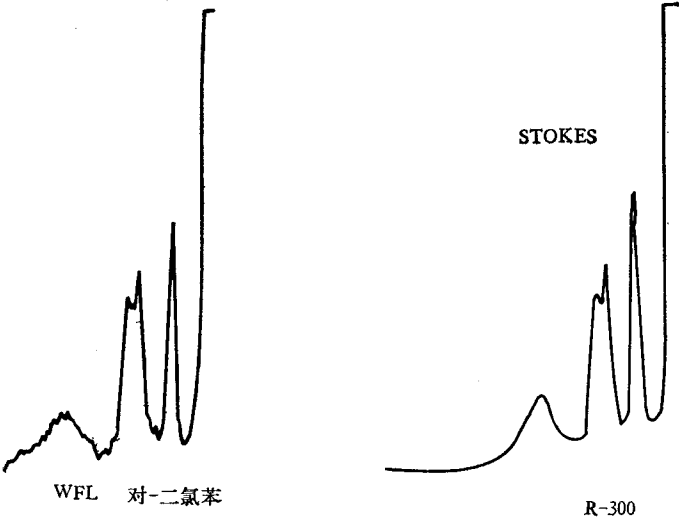


图 9

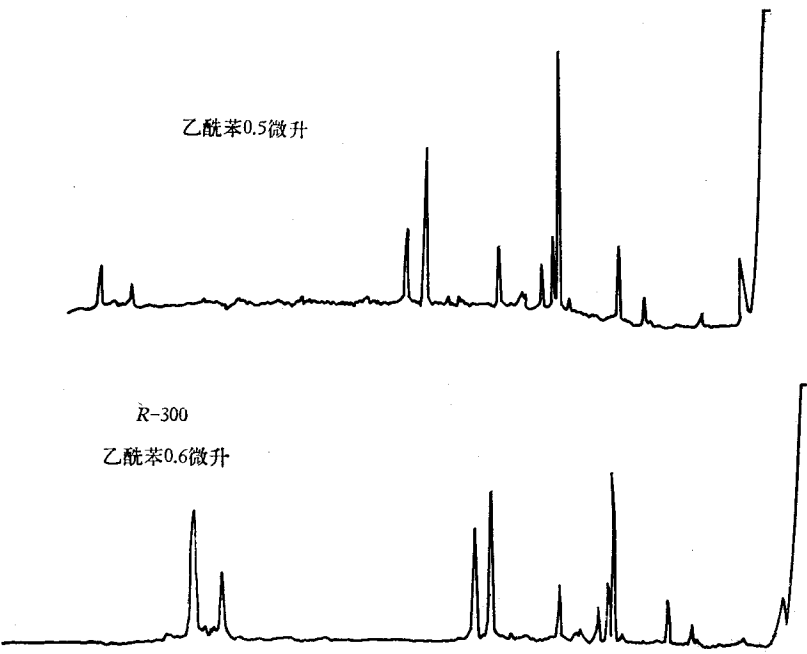
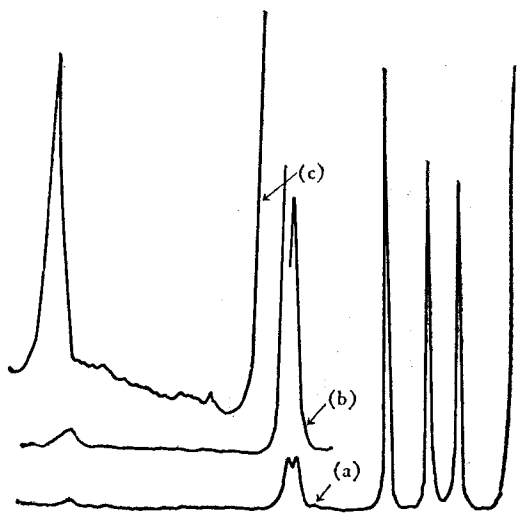
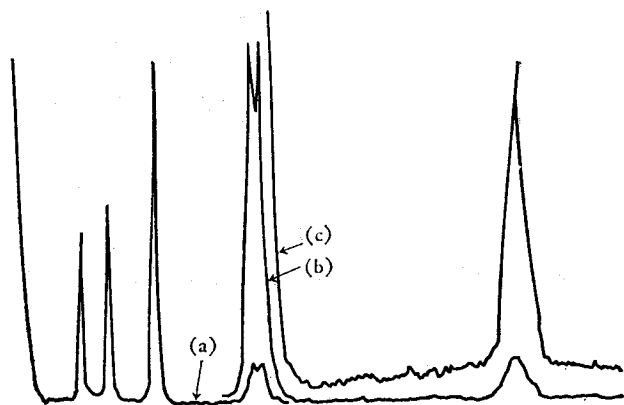


图 10 WFL 乙酰苯的光谱图



国产 WFL



日本 JRS-01B

图 11 四氯化碳光谱图

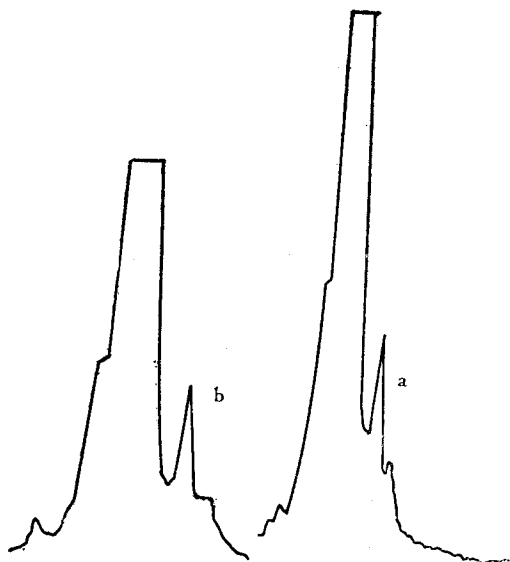


图 12 苯 992 厘米⁻¹谱带 a₁ WFL b₁ R-300

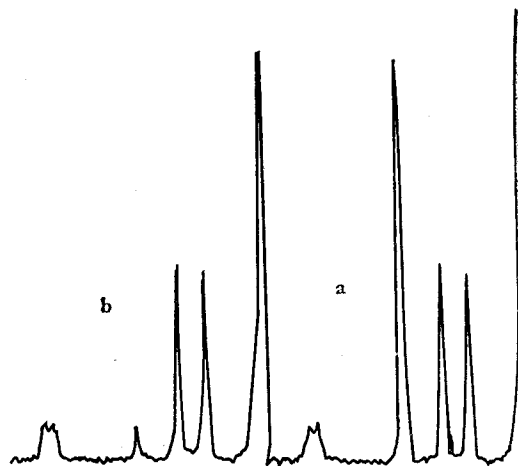
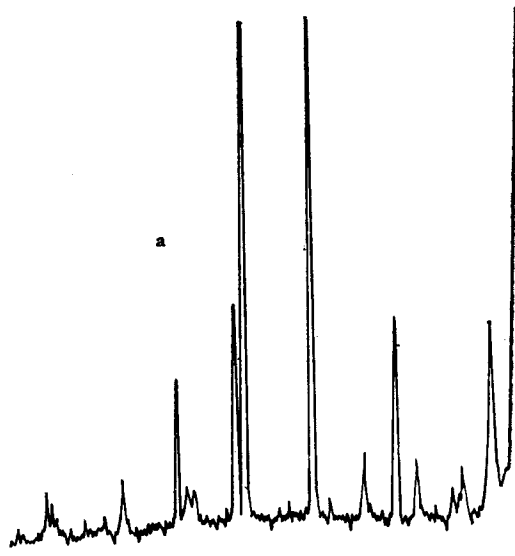
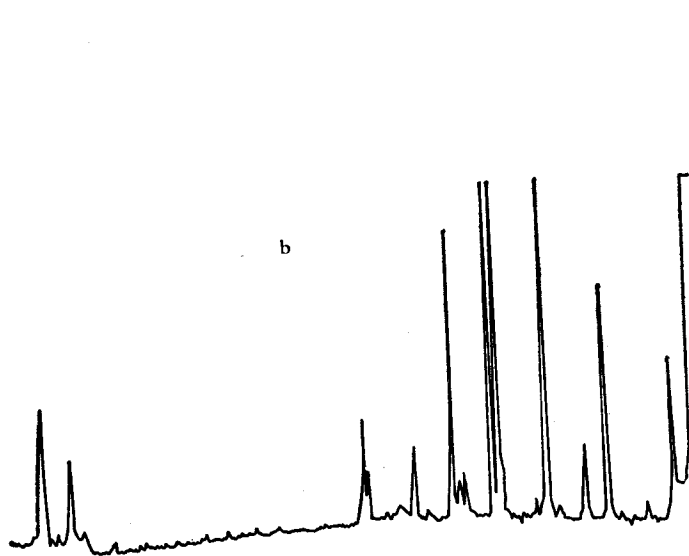


图 13 四氯化碳 459 厘米⁻¹谱带的退偏测量



4. 杂散光

设计要求: 在离主线 6,328 埃的 50 Δ 厘米⁻¹处杂散光为 10⁻⁹。

测试结果: 用离主线 4,880 埃的 50 Δ 厘米⁻¹处为 3 $\times 10^{-8}$, 80 Δ 厘米⁻¹处优于 10⁻⁹。

杂散光测试说明:

(1) 设计要求在离主线 6,328 埃的 50 Δ 厘米⁻¹处为 10⁻⁹, 由于国产 He-Ne 激光器功率太低, 用衰减法无法测定。所以改用 Ar⁺ 激光器 (He-Ne 6,328 埃的 50 Δ 厘米⁻¹处估算相当于 Ar⁺ 4,880 埃的 80 Δ 厘米⁻¹处)。

(2) 为了说明消杂散光水平, 我们用同样方法对美国 Spex 公司 log5 的三联单色器进行测试 (仪器说明书指标离主线 6,328 埃的 50 Δ 厘米⁻¹处为 10⁻¹¹), 而实测为 5 $\times 10^{-9}$ 。

(3) 用低波数拉曼谱图来说明杂散光。所用样品为胱氨酸、对-二氯苯 (它们都是做低波数拉曼光谱著名的)。如果杂散光小, 低波数的拉曼谱图好。WFL 型的低波数拉曼谱图与日本分光公司出产的 R-300 型比较, WFL 型的谱图明显的优于 R-300 型。可见 WFL 型杂散光也优于 R-300 型。

5. 灵敏度

设计没有要求。

实测结果: 用样品乙酰苯, 样品用量为 0.5 微升, 获得的乙酰苯的拉曼光谱图与 R-300 型用量 0.6 微升的乙酰苯拉曼光谱图近似。

结论: 根据上述测试结果, WFL 型激光拉曼分光光度计的主要技术指标达到和超过了设计指标, 达到了国际同类型产品的先进水平。并同意厂方投入批试。

五、拉曼光谱法与红外光谱法的比较

1. 把拉曼光谱和红外光谱两者结合起来研究物质结构和组成是很好的。“拉曼光谱可以代替红外光谱”的说法是错误的, 两者可以相互补充。

2. 拉曼光谱与红外光谱两者的机理有本质的区别; 从光与物质的相互作用来看, 拉曼光谱

是一种散射光谱, 它是由于分子的极化率的变化所引起的; 而红外光谱是吸收光谱, 它是由分子的电偶极矩的变化而产生的。

从能级跃迁角度来看, 两者本质上通常均系分子振动或转动跃迁 (即反映了分子振-转能级变化) 的能级跃迁, 当用拉曼光谱来研究时, 出现在可见光区。用红外吸收来研究时, 出现在红外或远红外区。值得指出的是不能误认为拉曼光谱是把本来应用红外吸收方法获得的结果转移到可见光区来。

3. 拉曼光谱的波段范围较红外吸收光谱宽广得多。拉曼光谱的工作波长范围在可见光区 (4,000—8,500 埃), 一台激光拉曼分光光度计利用不同激发波长的激光, 可测量的拉曼位移 ($\Delta\nu$) 为 20—4,000 厘米⁻¹ (500 微米到 2.5 微米); 而红外吸收光谱, 现在最常测定波数范围为 2.5 微米 (4,000 厘米⁻¹) 到 50 微米 (200 厘米⁻¹)。要测定这样的波段范围, 一般要用三台不同波长范围的红外吸收分光光度计来完成。因此可以说, 一台激光拉曼分光光度计的工作波段范围相当于 2—3 台红外吸收分光光度计的工作波段范围。

4. 对于水溶液的分析, 拉曼光谱具有独特之处。由于水是弱的散射体, 不仅不受水本身干扰, 而且对液槽也无特殊要求, 适用于无机物、有机物和生物分子水溶液的分析。同时对络合物、水污染等的研究拉曼光谱法都是合适的。

而红外光谱法有一定的限制, 分析水溶液的样品较困难, 因为除了本身有吸收外, 还需要专门的窗作液槽, 如 KRS-5, 或 AgCl。而这种槽的使用受到被测定的对象所局限。

5. 一般说来, 拉曼光谱的定量分析比红外吸收光谱较困难。但是有内标准和高稳定的激光器相配合, 就能保证相当准确的定量分析。

6. 拉曼光谱线的强度与样品的浓度间的关系为线性关系。拉曼谱线的数目、位移大小和谱带的强弱直接与样品分子的振动、转动有关。因此, 拉曼光谱的研究可以得到有关分子振动或转动的信息。

(下转封二)

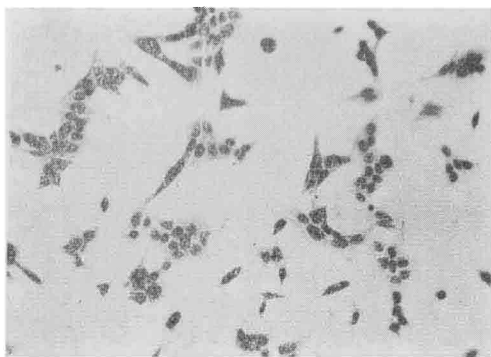


图1 实验组

Eca-109 细胞在 dbc AMP 及茶碱作用下 5 天, 细胞增殖受到抑制, 细胞密度稀, 细胞形态也变得瘦长起来 100×

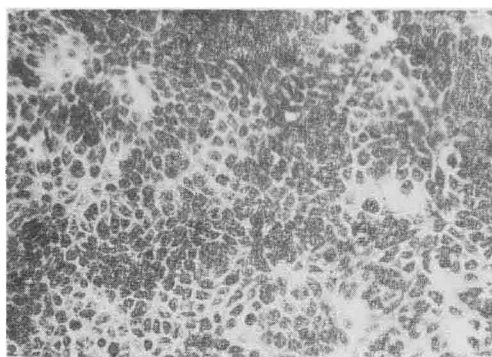


图2 对照组

Eca-109 对照组, 培养 5 天, 细胞密度大 100×

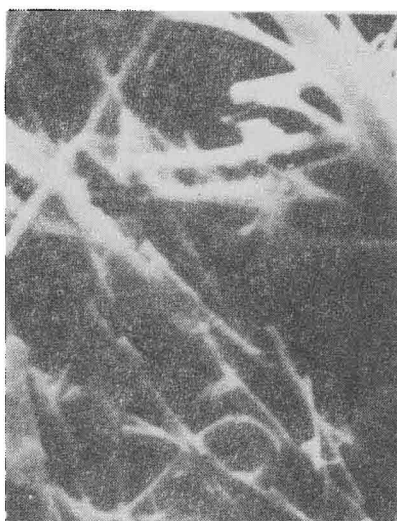


图3 玻璃微粒纤维滤膜的扫描电镜图
(2,500 倍)

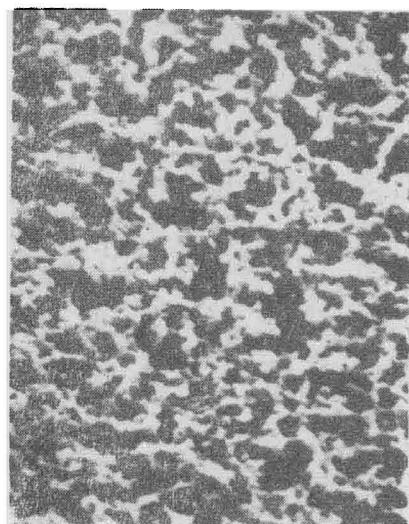


图4 0.45 微米 MF-型微孔滤膜的扫描电镜图谱
(2,500 倍)

(上接第17页)

而红外吸收光谱的强度是透过率的对数转换, 显然是麻烦的。

7. 拉曼光谱试样制备简便, 又便于做高低温测试, 退偏振度测量(决定分子的对称性)以及分析各种有色物质的拉曼光谱(即共振拉曼光谱)。如液体样品池, 可用一般硬质玻璃做毛细管样品池, 装上样品就可分析。对于不稳定的或贵重的样品可以直接测试(安瓶瓶包装), 而红外光谱样品处理很麻烦。

8. 拉曼光谱法可以研究超微量样品的分析(做到毫克级和微克级)。本仪器对乙酰苯样品取 0.5 微升, 就可轻而易举的获得乙酰苯拉曼光谱图。

9. 从制造上分析, 拉曼光谱在可见区, 无论是光源、色散元件(光栅), 还是接收元件(如光电倍增管)来源很容易。而红外光谱对这些元件还有一定困难。不过拉曼光谱仪在制造上精度要求高、复杂而且难度大。

[本文于 1977 年 4 月 30 日收到]