

现代分析仪器分析方法通则

激光喇曼光谱分析方法通则

JY/T 002—1996

General rules for laser raman spectrum analysis

1997-01-23 发布

1997-04-01 实施

前 言

本标准的编写格式和方法符合 GB/T1.1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》，GB/T1.4—88《标准化工作导则 化学分析方法 标准编写规定》的要求。

本标准附录 A、附录 B、附录 C 都是提示的附录。

本标准起草单位：国家教育委员会

本标准主要起草人：郑思定

本标准参加起草人：盛蓉生

目 次

1 范围.....	(35)
2 引用标准.....	(35)
3 定义.....	(35)
4 方法原理.....	(36)
5 试剂和材料.....	(37)
6 仪器、设备	(37)
7 样品.....	(38)
8 分析步骤.....	(39)
9 分析结果的表述.....	(41)
10 安全注意事项	(41)
附录 A(提示的附录) 喇曼散射的经典理论	(42)
附录 B(提示的附录) 喇曼光谱仪主要组成部分的若干参量	(43)
附录 C(提示的附录) 喇曼光谱定量分析	(49)

1 范围

本通则规定了喇曼光谱的测定和分析方法,本通则适用于一般激光喇曼光谱仪的常规分析。

2 引用标准

GB/T1.1—1993 标准化工作导则 第1单元:标准的起草与表述规则 第1部分:标准编写的基本规定

GB/T1.22—1993 标准化工作导则 第2单元:标准内容的确定方法 第22部分:引用标准的规定

GB/T1.4—88 标准化工作导则 化学分析方法标准编写规定

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 波长 λ Wavelength

光波在一个振动周期内传播的距离,也就是沿波的传播方向,两个相邻的同相位点(如波峰或波谷)间的距离。单位常用 nm。

3.2 波数 $\bar{\nu}$ Wavenumber

波长的倒数,即每厘米内包含的波长数目,单位为 cm^{-1} 。

3.3 喇曼位移 Raman shift

在喇曼散射中入射光波数与散射光波数间的差值,单位为 cm^{-1} 。它是反映分子转振能级的量。

3.4 喇曼强度 Raman intensity

喇曼散射光的强度。

3.5 杂散光 Stray light

杂散光水平定义为 I_{Δ}/I_0 ,其中 I_0 为进入单色仪的入射光强度, I_{Δ} 为距入射光 λ_0 为 Δ 处的光强,即 $\lambda_0 \pm \Delta$ 处测得的光强。 Δ 通常取 20cm^{-1} 或 50cm^{-1} 。

3.6 分辨率 Resolution

光谱仪的分辨本领为两条刚能分辨的光谱线的波长平均值对它们波长差的比值。

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN \quad (\text{理论值})$$

m 为衍射级数, N 为光栅总条数。

实际应用中常以分辨本领的倒数来定义,称之为分辨率,它是表征仪器分开两个相邻谱带

的能力,与波长及狭缝宽度等因素有关。应用中分辨率常以 $\Delta\lambda$ 表示, $\Delta\lambda$ 也是波长为 λ 的谱峰的半高宽。

3.7 波数精度 Wavenumber accuracy

在规定测量条件下,波数的真值与测量值之间的一致程度,其值为两者之差。

3.8 波数重复性 Wavenumber repeatability

在多次重复测量时,各次测量值之间的一致程度,其值为多次测量时的偏差。

3.9 退偏比 ρ Degree of depolarization

喇曼散射中,退偏比是确定分子振动模对称类的重要依据。在散射平面为包含入射光的传播方向和观测方向的平面时,入射光是偏振光且其电矢量垂直于散射平面,散射光与入射光的夹角为 θ 时,其退偏比定义为

$$\rho_{\perp}(\theta) = I_{11}(\theta)/I_{\perp}(\theta)$$

式中 $I_{11}(\theta)$ 为散射光的电矢量与散射平面平行部分的强度

$I_{\perp}(\theta)$ 为散射光的电矢量与散射平面垂直部分的强度

3.10 激发的激光波长 Exciting Laser Wavelength

用于激发试样产生散射光的激光波长。

3.11 激光功率 Laser power

照射在样品上的激光功率。

3.12 90°散射 90°Scattering

收集的散射光的传播方向与入射光传播方向呈 90° 夹角。

3.13 180°散射(背散射) 180°Scattering (Back Scattering)

收集的散射光的传播方向与入射光传播方向呈 180° 角,即散射光与入射光是反向的。

3.14 0°散射(前向散射) 0°Scattering (Forward Scattering)

收集的散射光的传播方向与入射传播方向一致。

4 方法原理

当一束频率为 ν_0 的单色光照射到样品上后,分子可以使入射光发生散射。在散射光谱中出现频率产生几个到几千个波数改变的散射光被称为喇曼散射。如图 1 所示,分子受入射光激发后可以从电子基态的振动能级 E_0 跃迁到虚态高能级,当它回复到基态时,可以不回到 E_0 而是跃迁到基态中的振动能级的上能级 E_1 或 E_2 ……上,这样散射光就失去了一部分能量 ΔE ,而变成 $hc(\nu_0 - \nu_m)$, $\Delta E = E_1 - E_0 = hc\nu_m$, ν_m 为喇曼位移。若被激发的分子是处于 E_1 或 E_2 ……上,回复时跃迁到 E_0 上则散射光将增加一部分能量,而变成 $hc(\nu_0 + \nu_m)$ 。前者是喇曼散射中的斯托克斯线,后者为反斯托克斯线。

关于经典理论的解释参见提示的附录 A。

因为喇曼位移与激发光的频率无关,它所对应的仅是分子的转、振能级。实验证明不同分子或不同的分子结构应有不同的转、振能级,所以不同的分子或结构应有特征的喇曼位移。若事先测出各种已知纯物质的特征喇曼谱,再将未知物质的喇曼谱与之比较,在允许的误差范围内,如未知物质的喇曼谱与某一已知物质的特征喇曼谱相吻合,就可认为此未知物质即为该已知物质。对混合物而言其喇曼谱应是所含单一物质特征喇曼谱的叠加,因此也可利用特征喇曼位移来定性分析混合物中所含有的成分。

因为喇曼强度与处于基态的分子数目有关,所以在具有内标的条件下也可利用喇曼强度

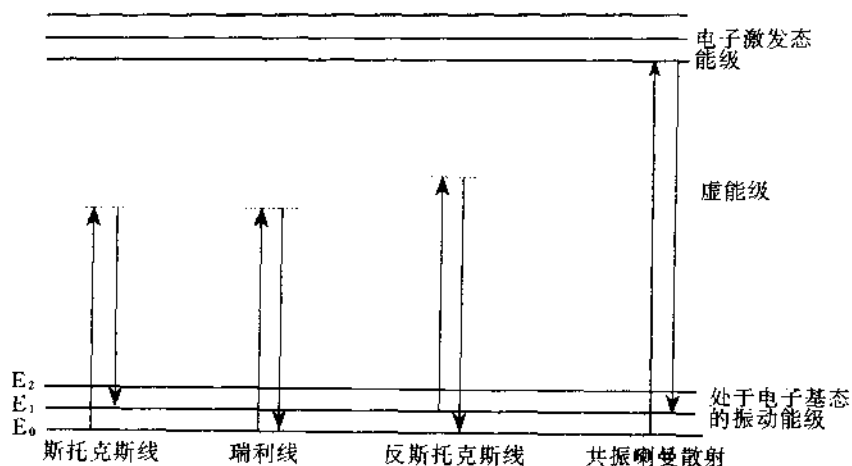


图1 光散射时分子的跃迁能级图

进行定量分析,但由于影响喇曼强度的因素很多,实验中准确测量喇曼强度有相当难度,因此喇曼光谱的定量分析只有相对意义。

5 试剂和材料

5.1 标准物质

用于校正仪器用的分析纯四氯化碳。

用于测定杂散光情况的纯左旋胱氨酸。

5.2 分析纯乙醚、乙醇、丙酮等用于清洁待测物质的表面或仪器部件。

6 仪器、设备

6.1 仪器组成

激光喇曼光谱仪应有光源(激光器)、样品室、单色器、检测器和控制及数据处理系统五部分构成,图2是激光喇曼光谱仪的组成框图。

由于各组成部分的配置上有所改变,现代激光喇曼光谱仪已发展成系列产品。由于单色器中的分光元件光栅配置不同,形成了由单、双、三联光栅单色器组成的低到高分辨率和低杂散光的喇曼光谱仪。由于采用脉冲激光器和快速记录系统而构成的瞬态喇曼光谱仪,它可测量时间分辨喇曼谱。由于样品室装有显微系统,构成显微喇曼谱仪。用光电倍增管或用列阵探测器(CCD或OMA)作为检测器可组成单道或多道激光喇曼谱仪。

仪器的各个组成部分的其他情况可参阅附录B。

6.2 仪器性能

激光喇曼光谱仪的主要技术指标列于表1,另外,光电倍增管的暗基数和单色器的透过率也是重要的性能。

表1 激光喇曼谱仪的主要技术指标

技术指标名称	Spex 1403	JY U-1000
光谱范围	31000~110000cm ⁻¹	30500~109500cm ⁻¹
分辨率(在汞 579.1nm)	0.15cm ⁻¹	0.15cm ⁻¹
色散率(在 514.5nm 处)	10cm ⁻¹ /mm	9.2cm ⁻¹ /mm
杂散光(在距瑞利线 20cm ⁻¹ 处)	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁴
波数精度	±1cm ⁻¹	±1cm ⁻¹
	越过 10000cm ⁻¹	越过 5000cm ⁻¹
波数重复率	±0.2cm ⁻¹	优于 0.1cm ⁻¹
焦距	0.85m	1m
相对光径	f/7.8	f/8
光栅尺寸(mm)	110×110	110×110
光栅密度(grooves/mm)	1800,2400,3600	1800,300~3600(300 的倍数值)

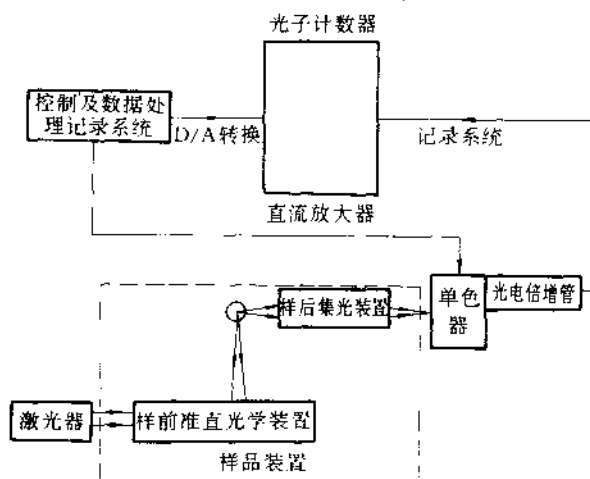


图2 典型的激光喇曼光谱仪的组成框图

7 样品

7.1 试样

由于喇曼测量可实行无损伤直接测量,所以有些送往实验室供检验的样品可以不必制样,直接用作试样进行测量。

7.2 试样的制备

7.2.1 气体试样

将待测气体充入气体池中,试样的气压随样品不同而定。

7.2.2 液体试样

可以将液体样品装入内径为 1mm 的毛细管中或液体样品池内,但对易挥发或有腐蚀性的样品,应将其注入毛细管密封后再进行测量。易光解的样品应装入旋转装置的样品池中利用旋转样品架去测量。深色液体或透明度很低的样品,宜稀释后再进行测量。

7.2.3 固体试样

粉末样品可装入毛细管中作 90° 散射的测量,也可将粉末压成片状再作 90° 散射或 180° 散射的测量。

块状样品可将样品的一个面制成光滑平面,然后作 90° 或 180° 散射的测量,也可装在特别的三维调节样品架上,进行无损伤测量。

7.2.4 晶体试样

将单晶体按极化率椭球的轴加工成六面体(边长 $5\text{mm}\sim 10\text{mm}$ 为宜),然后按不同几何配置进行测量。

8 分析步骤

8.1 试样准备

首先应了解样品的理化特性和测试要求,以便选择适合的制样方法和实验步骤。根据测试要求按第 7 项的方法进行试样的制备。

8.2 检测前准备

启动所有仪器、设备。必要时用四氯化碳对仪器进行校准,同时检查前光路(从激光器输出端到激光照射到样品上的位置)和后光路(主要指单色器的光路)的准直情况。

8.3 工作条件的选择

应根据测定要求和样品情况选择适当的样品架。根据测定要求,喇曼信号强弱和光电倍增管的量程去选择缝宽和激光功率。

8.3.1 样品架的选择

应根据测量要求选择适当的样品架,液体或粉末样品可选择 90° 散射的毛细管样品架;粉末压片或块状固体可用 90° 散射样品架;固体、晶体或薄膜可用背散射样品架;易光解样品应选用旋转样品架;晶体样品应选用可作三维调节的晶体样品架;需作高温或低温测量的样品应选用高温或低温装置。

8.3.2 狭缝宽度的选择

对于一般样品狭缝应选 $200\mu\text{m}\sim 600\mu\text{m}$,对生物大分子样品狭缝宜选用 $400\mu\text{m}\sim 800\mu\text{m}$ 。

如需测量高分辨率的喇曼光谱,狭缝宽度应选择得小一点,可选为几个 μm 到几十个 μm 。固体或单晶样品需测低波数喇曼谱时,缝宽宜选得小一点。

8.3.3 激光功率的选择

激光器的输出功率要随不同测试样品而改变,对固体或液体的样品且不易光解的宜选 $200\text{mW}\sim 500\text{mW}$;生物样品应选得低一点,有些样品为了防止热变性取几十毫瓦的激光器输出功率已足够了。一些喇曼信号弱又不会光解或热解样品,可将功率用得大一点,但运用 1000mW 以上的高功率时激光器易于老化,应综合考虑各种因素。

8.3.4 积分时间的选择

积分时间一般取 1s 左右,全谱信号都比较强(如表面增强喇曼光谱),取 0.5s 即可。对信号弱,且希望获得高分辨率的光谱,积分时间可取 $5\text{s}\sim 10\text{s}$ 。其他情况可根据信噪比的情况而定,信噪比高的积分时间可取得短些,反之信噪比低,则取得长些。

8.4 测定

8.4.1 光路调节

在检查仪器处于正常工作状态的情况下,这部分光路调节主要是指样品架的调节,也就是

保证试样能安放在确当的位置。

8.4.1.1 液体样品光路调节

用分析纯四氯化碳作标准样品,用 CCl_4 的 459cm^{-1} 峰对样品架进行调整,将激光照在液体的界面上,调节激光聚焦透镜,使激光聚焦在界面上,同时稍微移动毛细管,这时应出现来自界面的全反射亮光。转入射缝前的反射镜使被收集的散射光成像在靶面上,仔细调节激光聚焦透镜和收集镜,应在靶面上出现如图 3 的工字型花纹。调节样品架基板上的三个定位螺丝,使工字型花纹移到靶的准心(调节时要注意保持前面已调节好的状态)。转反射镜让收集的散射光进入单色器的入射缝;同时将喇曼谱仪设置在 459cm^{-1} 处,打开激光挡板和入射缝,这时应观察到 CCl_4 的喇曼信号。移动毛细管让激光照射在液体上观察信号强弱,反复调节聚焦透镜、收集镜、定位螺丝和毛细管的位置,以求得到最大信号。

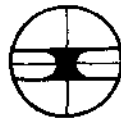


图 3 在靶上的试样像

取下标准样品,将待测定的试样放入样品架,再稍许调节聚焦透镜、收集镜和毛细管的位置使待测信号达到最大。

对已调节好的样品架,仅需检查 459cm^{-1} 峰的强度在相同条件下是否与原始值相近,若相同则可直接放上样品进行细调。

8.4.1.2 固体样品光路调节

若采用 180° 散射配置,以单晶硅片作为标准样品。将单晶硅片放在背散射样品架上,将单色器设定在 520cm^{-1} 的位置,调节样品架与激光的准直(用样品架基板上三个定位螺丝调节)和调节样品安放台的高低,保证样品能在要求的位置被激光照射(因涉及散射光采集反射镜所以调节时要与底板三个定位螺丝配合进行),同时调节入射光的聚焦镜和散射光的收集镜,直到获得最大的信号。取下标准样品,换上待测试样进行测定。

若样品架已固定在调节好的位置,则仅需调节激光以保证与样品架准直,然后调节激光聚焦镜和收集镜的旋钮直至信号最大。

如用 90° 散射配置,可以 Na_2SO_4 的粉末压片为标准,用 Na_2SO_4 的 990cm^{-1} 峰对样品架进行调整,得最大信噪比后可换上待测试样进行测定。

8.4.1.3 单晶样品光路调节

用 LiNbO_3 单晶为标准,将单晶粘合在样品台上,使单色器设定在 LiNbO_3 的最强峰位上。在前光路已准直的前提下,利用样品架的三维调节功能调节样品架,使样品能被安放在要求的位置,以保证散射光能充分照明双单色器的入射反射镜。再反复调节入射光的聚焦镜和散射光的收集镜协同检查样品架的调节情况,直到获得最大的信噪比。取下标准样品,换上待测试样同上方法微调后可进行测量。

注:如果已知待测试样的最高峰,可不用以上的标准样品,直接用待测试样进行光路调节。

8.4.2 预扫描

为了保证能得到最佳的喇曼光谱图,在调好光路后可先用积分时间短,步长较大的设定参量进行一次预扫描,然后根据最强和最弱谱线的情况选择最佳缝宽和激光功率,同时将仪器设定在最强峰位上,对试样再进行仔细调节。缝宽和激光功率的选择应保证光子计数器的最大输出小于 10000。

8.4.3 参数设定和测定

根据测定要求和试样情况设定扫描范围、步长、积分时间、缝宽、激光功率和扫描次数。设

定完成后可利用计算机自动控制系统进行自动测定,若试样易于光解,除降低激光功率外,还可调换试样测试点实行分段扫描。

8.5 测定后仪器的检查

测定后应检查光电倍增管的暗基数有否变化,单色器指示的波数位置是否准确,激光功率有否漂移,样品有否损伤(光解、热解、脱落、变性……)

9 分析结果的表述

9.1 数据处理

测定后在原始数据中写入样品编号、日期和工作参数后,存入专用软盘,以备以后检查。测定出的原始数据,进行平滑后送打印机打图,并对峰位进行标定,有标峰程序的用计算机直接标峰,没有的应读出各喇曼峰的喇曼位移值。

9.2 图谱分析

因为化合物的喇曼峰均是各纯物质特征喇曼位移的叠加,所以据此可以对待测试样进行定性分析。

9.2.1 纯化合物的定性分析

对照标准喇曼图谱或已知标准物质的喇曼谱,在允许的误差范围内若测定得的喇曼谱与某一已知标准谱吻合,就可认为未知试样即为该已知物质。

9.2.2 化合物中基团的鉴别

利用已发表的各种化合物基团的特征喇曼位移表,在允许的误差范围内进行对照分析,即可对化合物的基团作出鉴别。

9.2.3 分子结构的分析

喇曼光谱的位移、谱线强度、谱线数目、相对强度及退偏比等均与分子结构、对称性及分子的其他参量有关,以此为依据可对分子结构作出判断,有时也可利用以上结果间接测定一些物理参量。

注:定量分析的测定方法参阅提示的附录 C。

9.3 分析结果报告

10 安全注意事项

10.1 激光是一种强光,易对人眼等造成损伤。实验时应注意不要让激光直接射入眼睛,严格执行安全规则。

10.2 喇曼谱仪是一种精密的光学仪器,有些试样可能有腐蚀或爆炸,应在测定前详细了解性能,订好充分的防范措施。

10.3 短暂停水时氙离子激光器会自动切断电源,注意供水恢复后不宜立即开机工作,应等激光器的放电管冷却后再启动工作,以防损坏激光器。

注:本标准未提出使用此标准过程所碰到的其他安全问题,使用人也应作好必要的安全措施。

附录 A(提示的附录)

喇曼散射的经典理论

此处理方法虽不能解释瑞利散射和喇曼散射所有方面的问题,但它却可以作为更严格处理的一个初步引导。

按经典理论一个分子系统与频率为 ν_0 的单色光的相互作用,可只考虑感生偶极矩 P 。

$$P = \alpha \cdot E$$

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad \alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0 Q \quad Q = Q_0 \cos 2\pi\nu_m t$$

E —— 辐射场(激发光)

E_0 —— 激发光电场的振幅

α —— 分子极化率张量

α_0 —— 平衡位置的极化率张量

Q —— 分子的简正坐标

Q_0 —— 简正坐标振幅

ν_m —— 分子固定于平衡位置振动时的振动频率

$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0$ 平衡位置时单位核位移引起的极化率变化

将 E 、 α 、 Q 代入 P 则得:

$$\begin{aligned} P &= \left[\alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0 Q\right] E_0 \cos 2\pi\nu_0 t = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left[\left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 \cos 2\pi(\nu_m t)\right] [E_0 \cos 2\pi\nu_0 t] \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 E_0 \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_m)t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 E_0 \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_m)t \end{aligned}$$

上式中第一项相当于没有能量变化的瑞利散射,第二项是喇曼散射中的斯托克斯线,第三项是喇曼散射中的反斯托克斯线。从上式可见,若 $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_0 \neq 0$, 则为喇曼活性。

附录 B(提示的附录)

喇曼光谱仪主要组成部分的若干参量

B1 激光器

喇曼谱仪常用的连续激光器有氩离子激光器、氦离子激光器、氦氖激光器和染料激光器。这些激光器都具有单色性好,单色功率强且有很好的稳定性。激光器主要是由工作物质(放电管或染料池部分)、谐振腔和电源构成。为了充分发挥激光器的效益,注意防尘和创造良好的安装条件并仔细调节谐振腔,让激光器能在同样的工作电流下有最大的输出功率。另外注意水冷系统的条件(水质、流量)和尽可能小功率使用激光器是延长等离子管寿命的有效方法,由于工作物质不同,各种激光器输出的主要波长见表 B1-1。表 B1-2,表 B1-3,B1-4 列出了它们的等离子线。利用激光器的等离子线可进行波长校正。同时在测定中也应注意未经滤光的激光束中杂有等离子线,这会在测得的喇曼谱中形成“伪线”。

表 B1-1 典型气体激光器在可见区的一些激光线

激光器	在空气中的波长 (nm)	在空气中的波数 (cm^{-1})	典型功率 (mW)
Ar 离子 ^a	457.9(紫)	21838.8	300
	465.8	21468.4	130
	472.7	21155.1	250
	476.5(蓝)	20986.4	60
	488.0(蓝)	21491.8	1300
	496.5	20141.0	600
	501.7(绿)	19932.2	300
	514.5(绿)	19436.3	1700
	528.7(黄绿)	18914.3	300
Kr 离子 ^b	476.2	20999.6	60
	482.5	20725.4	45
	520.8	19201.2	90
	530.9	18835.9	200
	568.2	17599.4	200
	647.1(红)	15433.6	500
	676.4	14784.2	120
	752.5	13289.0	100
	799.3	12510.9	30
He—Ne ^c	632.8(红)	15802.8	50
染料			
罗丹明 B	590.0~690.0		
罗丹明 6G	560.0~660.0		
罗丹明 110	530.0~620.0		
尼罗蓝高氯酸盐	710.0~800.0		

a. Spectro—Physics 型号 164—08 的功率值。

b. Spectro—Physics 型号 164—01 的功率值。

c. Spectro—Physics 型号 125A 的功率值。

表 B 1-2 氫离子激光器的主要等离子线

空气中的波长 (nm)	相对强度	空气中的波长 (nm)	相对强度
487.9860	5000	569.1650	27
488.9033	200	572.4325	23
490.4753	130	573.95207	16
493.3206	970	577.2326	69
494.2915	14	578.6560	16
495.5111	10	581.2746	49
496.5073	960	584.3781	10
497.2157	330	587.0443	12
500.9334	1500	588.26250	11
501.7160	620	588.85851	18
506.2036	1400	591.20861	38
509.0496	10	592.88124	10
514.1790	360	595.0905	11
514.5319	1000	598.5920	23
516.2745	8	598.9339	20
516.5774	38	603.21291	57
517.6233	41	604.32254	37
521.6816	20	604.4468	14
528.6895	150	604.6894	14
530.5690	12	604.9072	14
539.7522	18	605.93735	15
540.2604	11	607.7431	11
540.7340	12	610.3546	91
545.4307	19	611.4929	<1750
549.5876	14	612.3368	100
549.8185	14	613.8660	97
550.0334	14	617.2290	1400
555.4050	22	618.7136	26
555.87031	30	623.9713	26
557.25428	12	624.3125	590
557.7609	18	632.4414	16
557.8518	11	638.47189	11
560.67341	48	639.6614	14
562.5684	14	639.9215	160
563.5882	14	641.63075	50
565.07054	29	643.7604	27
565.4450	27	644.1908	22
567.2952	22	644.3858	16

来源: N. C. Craig and I. W. Levin, Appl. Spectroscopy, 33, 475 (1979)

表 B 1-3 氪离子激光器的主要等离子线

空气中的波长 (nm)	相对强度	空气中的波长 (nm)	相对强度	空气中的波长 (nm)	相对强度
521.60	350	591.17	110	731.05	80
522.49	20	596.75	100	733.78	60
522.95	600	599.22	1000	736.16	90
527.65	220	601.00	90	737.30	60
530.87	2300	602.24	200	740.70	800
532.28	200	603.72	10	743.58	400
533.24	2000	609.45	50	744.38	150
534.68	300	611.96	70	748.68	280
535.55	80	616.88	160	749.36	180
541.84	200	60.37	160	751.26	400
543.86	400	631.28	10	752.45	600
544.63	900	639.11	100	755.57	180
546.82	1100	640.98	70	756.54	250
549.95	450	641.66	150	758.74	550
552.29	1050			760.15	600
555.30	400			768.52	400
556.22	200	647.09	250	769.45	250
556.86	1000	651.09	430	773.57	200
557.03	550	657.01	1000	775.07	200
563.50	1400	660.30	160	778.94	130
565.04	250	662.50	30	781.25	250
566.99	300	662.86	160	782.60	450
567.20	570	663.50	110	783.58	190
567.45	400	664.45	100	784.07	520
568.19	3500	665.25	100	785.48	500
569.03	2000	668.40	60	790.76	120
569.41	400	676.44	330	791.01	190
569.99	400	677.12	100	791.45	70
571.72	180	687.08	110	793.14	130
575.30	1000	694.41	30	797.36	100
577.14	1700	707.40	100	799.32	700
577.80	400	713.40	170	799.80	300
586.07	270	721.31	600	801.86	110
587.09	750	728.98	900	805.95	600

来源: C. Julien and C. Hirlmann, J. Raman Spectrosc., 9, 62 (1980)

表 B 1-4 氦氖激光器的主要等离子线

空气中的波长 (nm)	相对强度	空气中的波长 (nm)	相对强度
638.299	53	706.519	31
640.108	>100	717.394	4
640.975	31	724.517	5
644.472	30	728.135	11
650.653	50	748.887	0.5
659.895	41	753.577	0.4
667.015		754.405	0.3
667.828	91	777.730	5
671.704	36	794.18	0.1
692.947	19	813.641	0.2

B2 显微喇曼附件

B2.1 结构和原理

为了观察检测微粒样品或微区的喇曼散射,有些喇曼谱仪均带有显微喇曼附件。

将待测试样置于 X—Y 平台上。对于透明试样用透射照明系统观察透射像。对于不透明试样用反射照明系统,观察反射像。透射像或反射像可直接用目镜观察,也可用投影屏(U—1000 型仪器使用)或电视摄像系统观察。将待检部分定在视场中心,入射光经分束器向下反射,并经物镜聚焦到该处,来自试样的背散射光由物镜收集并通过分束器射到目镜投影观察屏或电视摄像机供观察,或用直角棱镜和耦合光学装置将散射光聚焦到单色器入射缝,经光栅分光后用 PMT 或多道检测器测定喇曼光谱。

B2.2 分束器

一般显微镜中装备的分束器对非偏振入射光的反射/透射比为 50/50。这种分束器很适于显微光谱测定中的大多数试样。但是在大多数情况下采用反射/透射比为 10/90 或 20/80 的分束器来取代标准分束器是可行的。因为在这种情况下虽然照射激光使用了原有强度的 10% 或 20%,但背向弱喇曼散射光却有 90% 或 80% 以上得以通过分束器聚焦到单色器入射狭缝上,使检测灵敏度大大提高。此外使用反/透比小的分束器对于对光不稳定的光敏性样品,如大多数生物样品,也是有利的,因为它降低了照射光强度。

B2.3 物镜

要根据待测试样的类型来选择物镜。对于由亚微米级颗粒组成的试样,宜选择高放大倍率、大数字孔径(NA)的物镜,因为大数字孔径的物镜可以收集更大立体角内的喇曼散射光。对于这类样品,通常选用放大倍率为 100×,NA 为 0.9 或 150×,AN 为 0.95 的物镜。对于尺度大于 5μm 的样品,则 50× 或 60× 和 0.8NA 的物镜已足使用。对于埋于寄主物内的样品,则要用长工作距离物镜。通常一套可满足大部分应用要求的物镜应包括用于较小样品(<1μm ~5μm)的 150×、0.95NA 或 100×、0.9NA,用于普通样品(>5μm)的物镜 60× 或 50×、0.8NA 物镜,用于埋在寄主中的样品的 50×、0.55NA 和超长工作距离(8mm)物镜,适于玻璃

毛细管(扁的或圆的)内液体样品的 $20\times$ 、 0.45NA 物镜,以及用于初步观察和定位测定区的 $10\times$ 、 0.3NA 或 $5\times$ 、 0.1NA 。

有些物镜镀有抗反射层,它会在某些波段的激光照射下产生干扰线。例如 Nikon $40\times$ 、 $100\times$ 物镜, Olympus $80\times$ 、 $100\times$ 物镜在 Ar^+ 的激光 514.5nm 线照射下会产生 850cm^{-1} 、 910cm^{-1} 、 925cm^{-1} 、 1260cm^{-1} 和 1300cm^{-1} 的峰。而用 488nm 和 Kr^+ 激光的 647.1nm 线激发时,这些峰均不出现。因此,在显微喇曼测定中,切记这种效应,否则会导致错误结果,通常采用改变激发波长方法来避开这种影响,也可用一空间滤光片(一种能使激光焦点体积外面的各种光辐射被中间光栏排除的滤光装置)来抑制这种干扰。

B2.4 观察系统

最简单的观察系统是显微镜物镜。当激光照射到高反射率样品时,就会产生极强的反射光和瑞利散射。这种情况很容易损伤观察者的眼睛,故现今一般已不采用。U—1000 型喇曼微探部分,采用投影屏来观察。当样品是弱反射体时,样品变得较暗,对比度差,难于区分样品的形貌特征,给工作带来不便。如果用电视摄像系统进行观察,明显地比投影屏方便,样品明亮得多,对比度也高些,很容易识别样品形貌特征细节。但旧的电视摄像系统是分辨率不高的光导摄像管相机,为了避免摄像管被强激光损坏,摄像管前端放置了一个中密度滤光片。现在用 CCD 相机组成的观察系统不仅免除了这一顾虑,而且分辨率大为提高,是较理想的观察系统。

B2.5 耦合系统

耦合光路由消色差双透镜组成,其焦距要按能使整个光栅充分照明的要求去设计。此消色差双透镜能使喇曼光谱红、蓝两端处的色差彼此抵消,即反射光(瑞利线)和离它最远的喇曼散射都能同样聚焦在单色器入射狭缝上。

B2.6 照明系统

最通用的光学显微镜照明系统是透射和反射明场照明系统。当考查透明样品,如聚合物膜、生物细胞物质和组织切片等透明样品时,要使用透射明场。反射明场用来考查固体表面。这两种照明系统也是显微喇曼谱仪上最常用的。此外,光学显微镜中使用的偏振光(反、透射)、相差(透射)和干涉衬度(反、透射)照明也都可装配到显微喇曼谱仪上来,观察不能用明场照明系统考查的特征。

B2.7 喇曼图像技术

显微喇曼光度计的一个极其重要的特长是可获得样品分子在样品基体中分布状况的喇曼图像。

第一种成像技术是基于作为检测器的光电电视摄像机的多通道优越性。首先,将样品置于显微镜载物片上,用激光照射显微镜的整个视场。旋转激光束以形成一个指向暗场显微镜物镜聚光镜的环开光圈。聚焦后的激光束在样品表面顺序照射,积分成具有一定面积的照射明场。产生的喇曼散射经单色器分光后,选择一特征谱线照到摄像机上所成之像,即为该特征谱线所代表的分子在照射明场内的分布图像,此种系统的空间分辨率为 $1\mu\text{m}$ 。对于良好喇曼散射体样品,可形成清晰的喇曼图像,而对于差的喇曼散射体样品则难于形成可分辨的喇曼图。常分辨不开喇曼特征峰与荧光背景。采用 CCD 摄像机并结合阿德玛变换图像技术,可以获得分辨大为改善的喇曼图像。这种成像技术的主要优点在于检测器同时观察到了整个视野,一次获得微区样品分布图像。

第二种成像技术是使用计算机控制的步进马达去驱动 X—Y 平台沿坐标平面顺序扫描,然后用计算机将在扫描的每一点上某一种特征谱线强度对照坐标位置复原成该特征谱线表征

的样品分子在扫描区域内的分布图像。这是样品相对于静止激光束移动的扫描方式,其优点是可获得差的喇曼散射体样品的宏观图像。缺点是速度慢,且不适于较为笨重的样品或置于恒温池、变温池和压力池中的样品。

第三种技术是使聚焦激光在静止的样品上扫描,并顺序记录样品不同位置处的喇曼光谱。此法的优点是可用于各种笨重样品和置于恒温、变温、压力池中的样品。亦可得到它们的宏观喇曼图像。缺点是实现激光束扫描的光学系统较使样品台扫描的装置复杂。

附录 C(提示的附录)

喇曼光谱定量分析

喇曼光谱的定量分析是以下式为基础:

$$\Phi_k = \Phi_0 S_k N H L \cdot 4\pi \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)$$

式中 Φ_k ——收集到的喇曼散射光通量(正比于喇曼强度)

Φ_0 ——激发光的光通量

S_k ——喇曼散射系数

H ——样品有效长度

N ——单位体积内的分子数

L ——考虑到折射率和样品内场效应等因素影响的系数

α ——散射光对聚焦透镜的半张角

由上式可知喇曼强度与样品的浓度成正比,但直接比较不同浓度样品间的喇曼强度去进行定量分析是困难的,有效的方法是利用加入内标,即在被测样品中加入少量已知浓度的物质,均匀混合后,选合适的方法制样。选内标物质的一条喇曼线作基准,将样品的喇曼线强度与内标线进行比较(比较喇曼峰的高度或积分面积),以此为基础即可对不同浓度的样品作出定量分析。

选择内标必须满足的条件是:①化学性质稳定,且不与样品发生化学反应。②内标的喇曼谱线和被分析的喇曼谱线互不干扰。③内标物质纯度高,不含被测物质成分。喇曼光谱定量分析的灵敏度低,准确度也差,所以一般不采用。

