

液芯波导对溶液拉曼光谱探测灵敏度的放大*

谷怀民 邢 达

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

提要:采用折射率比石英(1.46)低的 Teflon-AF($n=1.29$)液芯波导系统,研究了乙醇和四氯化碳溶液的拉曼光谱,通过利用液芯波导的内全反射特性,延长激发光对波导管内的溶液试样的总的有效激发光程,并有效增强对光谱信号的收集,成功地采集到四氯化碳和乙醇的拉曼光谱。并与采用常规 90 度几何散射结构获得的拉曼光谱进行了对比,表明液芯波导系统可以使拉曼光谱信号强度增强 200 倍以上,并大大提高探测灵敏度和信噪比。展示了液芯波导拉曼光谱应用于化合物溶液的微量分析、生物医药成分的定量检测、临床医学诊断中对病理样本的微量分析和定量检测等领域的可行性,为进一步采用液芯波导拉曼光谱进行定量标定的研究工作和实际应用提供了实验依据。这项技术也适合于对其它包含多种成分的复杂的生物体系和化学药品进行定量分析,具有巨大的应用前景和实际价值。

关键词:液芯波导,拉曼光谱,拉曼灵敏度放大,定量检测

Raman sensitivity enhancement for liquid samples using a liquid waveguide capillary cell

Gu Huaimin Xing da

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: We use a long Teflon-AF2400 liquid waveguide capillary cell (LWCC) to study Raman spectroscopy of alcohol and tetrachloride. LWCC can provide the enhancement of signal intensities and detection sensitivity in liquid sample Raman spectroscopy measurements, in which the optical path length through the liquid sample is much longer than it would normally be, and Raman scattering light emitted by the sample can also be trapped by LWCC. In our work, we have demonstrated the use of a liquid waveguide cell to measure Raman spectrum of alcohol and tetrachloride. We also compare Raman Spectra of alcohol and tetrachloride collected in LWCC to those collected in a traditional 90° scattering geometry, and obtain a detection sensitivity enhancement factor of more than 200. It has shown that LWCC can provide much higher Raman signal intensities while simultaneously significantly reducing sample volume requirements. This result can be used to evaluate the potential of Raman spectroscopy using LWCC to perform microanalysis and measurements of liquid samples. This technique is capable of measuring the concentration of other Raman-active liquid samples and complicated biology system.

Key Words: Liquid Waveguide Cell, Raman Spectrum, Raman Sensitivity Enhancement, Quantitative Analysis.

1 前言*

拉曼光谱能为化合物分析提供分子振动和其它特殊结构信息,与红外光谱相比,拉曼光谱具有其独特优点。但遗憾的是拉曼散射是一个弱过程,其量子效率通常只有 10^{-10} — 10^{-4} ,因此拉曼光谱信号弱,灵敏度低,应用范围受到限制。为了提高拉曼光谱的信号强度,人们进行了大量卓有成效的研究工作,提出了一些新的拉曼光谱技术。但对于液体样品而言,拉曼光谱的灵敏度仍然不够高,其适用范围仍然相当窄,通常检测样品只能是浓度较高的溶液。而在实际应用中,通常待测试样的浓度较低,对探测灵敏度的要求提高,如采用常规拉曼光谱仪研究浓度小于 1mM 的某些生物溶液是很困难的^[1],这就要求测试系统具有相当高的探测灵敏度。

通过将待检测样品置于光学波导管内,可使得拉曼光谱、荧光光谱、UV/可见光谱、吸收光谱等光学检测方法的灵敏度得到大大提高,引起了人们广泛的研究兴趣^[2-6],这类波导管称为液芯波导(LWCC)。我们分别采用折射率比石英低的 Teflon-AF2400($n=1.29$)波导系统和常规 90 度几何散射结构在相同的条件下分别研究了乙醇和四氯化碳的拉曼光谱,并对二者的研究结果进行了比较,表明采用液芯波导系统的确可以大大提高系统的探测灵敏度,证实了可采用液芯波导系统对低浓度溶液和微量样品进行拉曼光谱研究,并根据拉曼光谱数据实现对溶液中待测成分进行定量标定的

可行性。

2 原理

采用液芯波导系统进行光谱研究的基本方法是将待测溶液样品按照一定的流速以动态流动方式泵入一根直径为 50 至数百微米、长度 1 至数米的微型波导管内。当入射激光进入波导管后,由于波导管材料的折射率比液体样品的折射率小,使得激光能在液体与波导管界面上产生内部全反射,此时该液芯波导实际上已成为一根液芯波导光纤,激发光能在液芯波导内经多次反射而不会从波导管管壁透射,于是进入波导管内的激发光能一直沿波导管往前传输,因此激发光也能多次通过波导中的液体样品,直至从波导管的另一端输出。通过波导管的传输,最终使得激发光通过样品的有效激发光程远远大于波导管的几何长度,因此,将很小量的待测样品置于这种波导管内,就可获得特别长的有效激发光程,这种特长的有效激发光程可以显著提高光谱信号强度和探测极限。在理想情况下,检测灵敏度与有效光程的长度成比例,从而可使得拉曼光谱、荧光光谱等光学检测方法的灵敏度得到大大提高。同时在拉曼和荧光光谱研究中,样品的激发光谱也能同时通过内全反射被捕捉在波导管内,与激发光一同多次通过样品沿液芯波导往前传输,使得光谱信号能得

* 2003 年 4 月 2 日收稿
广东省自然科学基金团队项目(015012)资助课题

到更有效的收集,并在传输中不断地被增强。因此,同传统的90度几何散射结构相比,波导管能够提供高得多的拉曼信号强度和检测灵敏度^[7-9],同时还能减少对样品的需求量^[10]。另一方面,由于Teflon-AF波导管的折射率较低($n=1.29$),比石英($n=1.46$)低很多,因此,可大大扩展液芯波导拉曼光谱的研究对象范围,能对大多数生物溶液进行拉曼光谱、荧光光谱及吸收光谱研究。

3 实验装置与方法

实验装置如图1所示。采用长度为100cm,内径为500微米(200 μ L的总体积)的Teflon-AF2400液芯波导系统(LWCC)作拉曼样品池,该液芯波导系统由石英材料制成,波导管的外表面镀有Teflon-AF24反射膜,最大耐压达2000PSI,Teflon-AF24材料的折射率为1.29,能够满足各种水溶液样品的光谱研究。在液芯波导管的两端各连接一个T型连接器,T型连接器的另外两个断口一个通过一小段同规格的液芯波导管同光纤耦合适配器相连,另一端口连接有普通毛细管作为溶液样品的输入端口或输出端口。在输入端口装有溶液过滤器,在输出端口连接液体蠕动泵(Peristaltic Pump,保定兰格恒流泵有限公司,BT00-100M/YZ1515型)均匀抽取液芯波导系统内的溶液,使得溶液能够从输入端口通过T型连接器流入液芯波导内,通过液芯波导后由另一T型连接器进入蠕动泵,最后由输出端口流出,流速可由蠕动泵控制,在0.007—290ml/min之间连续可调。

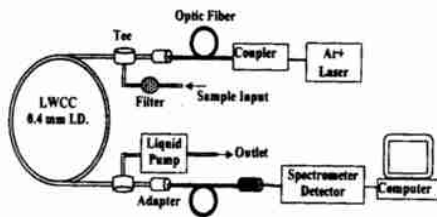


图1 实验装置示意图

激发光采用514.5nm的氩离子激光(美国Coherent Inc.),输出功率10mW—2W连续可调。由激光器输出的激光通过一套专用光纤耦合适配器进入一根石英光纤,光纤长1m,光纤芯径400微米,该光纤通过一个适配器同液芯波导LWCC耦合,将激光传输到LWCC中,进入LWCC中的激光能够以极低的反射损耗由LWCC往前传导,同时LWCC中流动的溶液样品因激光的照射而产生的拉曼散射光也能通过内全反射由LWCC进行高效率地收集,并将收集的拉曼光往前传导。激光和拉曼光通过LWCC传输后到达连接于LWCC另一端头的光纤探头,耦合进入另一根同规格的石英光纤,由该光纤输出的拉曼光信号由一个合适的适配器耦合到用于光谱采集的光谱仪中。光谱仪为JY-T64000型三光栅拉曼光谱仪(法国Jobin Yvon公司),探测器采用光子计数光电倍增管,光谱仪输出的光谱数据送入计算机作进一步的数据分析处理。实验采集的光谱范围为200—1800 cm^{-1} 。

在采用传统的90度几何散射结构研究拉曼光谱时,采

用微型玻璃毛细管封装样品,激发光聚焦后直接照射样品,从与激光照射方向垂直的方向收集拉曼散射光。

4 结果和讨论

实验分两步进行,首先采用常规的90度几何散射结构对乙醇和四氯化碳分别进行拉曼光谱研究;第二步是采用液芯波导系统对相同的乙醇和四氯化碳溶液进行光谱研究,在没有采用HNF滤波器的情况下,在200—1800 cm^{-1} 波段范围内成功地收集到两种溶液的拉曼光谱。在两种情况下,除采用的激光功率有差异外,其它条件包括样品浓度、光谱仪参数、数据点的积分时间、光谱扫描速度等都相同,每个光谱数据点的光谱积分时间都为3s。

在90度几何散射结构中,由于拉曼光谱信号较弱,通常要求采用较高功率的激发光对样品进行激发,若激光功率过低,即使通过适当地增大光谱仪的入射狭缝宽度或数据积分时间,也很难得到可分辨的拉曼光谱。在实验中为了能获得可探测的光谱信号,在不损伤样品的情况下,将激发光功率提高到400mW。当采用液芯波导系统时,由于有效激发光程很长,从而可以大大降低激发光功率,在本研究中,如不对光纤耦合系统作高标准要求,当激光器输出功率达到50mW以上时,通常就能获得较强的光谱信号。但为了便于同常规方法进行比较,我们将激光功率提高到200mW,此时由第一根光纤输出的激光功率为100mW,耦合进入液芯波导内实际照射样品的激光功率更低,比常规方法中实际照射在样品上的激光功率400mW低很多。当液芯波导中注入样品后,100mW的激发光通过液芯波导后,经液芯波导系统传输再耦合进入第二根光纤并由该光纤输出的激光功率达20mW以上,拉曼光谱信号很强。若对光纤耦合系统进行精密调试,对激光器输出功率的要求还能进一步降低。

图2给出了乙醇和四氯化碳的拉曼光谱。在各图中,信号较强的光谱A是采用液芯波导系统测得的拉曼光谱,而位于该光谱曲线下面的信号较弱的光谱B代表采用常规90度几何散射结构得到的拉曼光谱。光谱B的实际信号强度很弱,为了便于对两种方法获得的光谱结果进行比较,我们将采用常规方法获得的拉曼光谱放大20倍后,将它同采用液芯波导系统获得的光谱放在同一图中进行比较。图示结果表明,采用常规90度几何散射结构获得的拉曼光谱信号相当弱,而采用LWCC获得的拉曼光谱信号则强得多。即使不考虑实际照射样品的激光功率差异,采用液芯波导系统得到的拉曼光谱的信号强度、信噪比等都远远优于采用常规方法得到的拉曼光谱。

图3的结果表明,在800—1700 cm^{-1} 拉曼频移波段内,乙醇在876 cm^{-1} 、1044 cm^{-1} 、1087 cm^{-1} 、1268 cm^{-1} 和1446 cm^{-1} 有明显的拉曼峰。从图4的结果可知,在300—550 cm^{-1} 拉曼频移波段内,四氯化碳在315 cm^{-1} 和460 cm^{-1} 有两个明显的拉曼峰。结果表明,LWCC对拉曼光谱强度有相当显著的增强和放大作用,通常将灵敏度放大因子定义为在其它实验条件

完全相同的情况下,从LWCC中获得的拉曼信号强度同常规方法所获得的拉曼信号强度之比。图4的结果表明,即使不考虑照射样品的激发光功率的差异,比较采用液芯波导和常规方法获得的各个拉曼峰的数值发现,液芯波导系统的拉曼强度的灵敏度放大(增强)因子仍然达到200以上。有了灵敏度的放大,那么在采用LWCC进行拉曼光谱研究时,即使

降低激光功率或减少积分时间,仍然能够获得与在常规方法中测量所能获得的相同或更高的拉曼信号强度。另一方面,比较在两种情况下所获得的拉曼光谱可以发现,采用液芯波导系统所获得的拉曼光谱的信噪比远远高于常规方法所得拉曼光谱的信噪比,前者的信噪比达到50以上,而后的信噪比则很差。

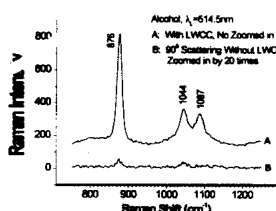


图2 乙醇在750-1250 cm^{-1} 的拉曼光谱

图2

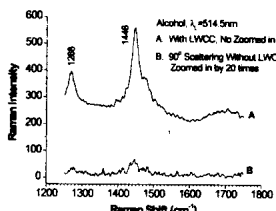


图3 乙醇在1250-1750 cm^{-1} 的拉曼光谱

图3

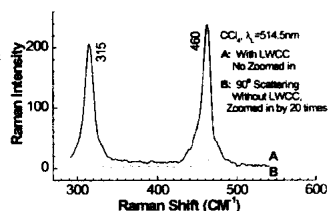


图4 CCl_4 在300-550 cm^{-1} 的拉曼光谱

图4

通常待测样品都有一个激光损伤阈值,因此,即使能够通过提高激发光的功率来获得可探测的光谱信号,在实际应用中也不能无限制地提高照射功率,否则会严重损伤样品的物理和化学活性,甚至严重破坏样品。同时,在90度几何散射结构中,通常采用的方法是将激光聚焦到一个很小的点,激光功率密度更高,而样品又是保持静止不流动,更容易导致激光对待测样品的热损伤效应和光解作用,而采用液芯波导系统时,一方面实际照射在样品上的激发光功率低得多,另一方面,由于通过光纤传输后激光是以发散光方式均匀地照射整个样品区,使得照射区的激光功率密度进一步降低,而且样品一直保持动态流动,因此,由激光造成热损伤或光解作用的可能性大大降低,这对拉曼光谱的生物医学应用而言特别有利。

在拉曼光谱研究中,各种背景噪声的干扰将严重影响检测灵敏度和信噪比的提高,如激发光源的功率起伏、样品的热平衡状态变化、探测系统的响应特性变化等随机噪声都对获得的光谱信号有很大影响,而LWCC的灵敏度放大因子可减少所需的积分时间和激光功率,使得产生随机噪声的几率降低,从而可以降低系统对激光功率、探测器噪声限制的要求。除随机噪声的影响外,还可能来自样品的拉曼散射光与光谱仪采集系统的耦合状态的变化造成的非随机噪声的干扰,耦合状态的变化可能是由于样品与激发光焦点的相对位置的变化、或是激发光聚焦状况和能量分布模式的变化等因素。LWCC系统通过光纤耦合使得样品中的激光强度分布和来自样品的拉曼信号强度在采集光学装置的焦平面上分布都很均匀,且光纤探头与液芯波导系统之间的耦合相当稳定,在测量中不存在样品与光学耦合系统之间的相对位置变化问题,因此可以降低非随机噪声干扰,这些也是我们采用LWCC获得高灵敏度和高信噪比的拉曼光谱的原因之一。

5 结论

本文的研究结果表明,通过利用液芯波导系统的内全反

射而大大延长激发光对波导管内的溶液的总有效激发光程和有效增强对光谱信号的收集,可以使光谱信号强度显著增强,信噪比以及探测灵敏度也得到显著提高,从而使人们可以对弱拉曼激活的或低浓度的化合物溶液、生物医药、人体体液等进行高灵敏度的光谱研究,并可根据获得的光谱数据通过进一步的数据处理对待测试样成分进行定量标定,可为样品的微量分析、定量检测、临床医学诊断中对病理样本的分析和检测提供高灵敏度的光谱分析方法,具有广泛而重要的应用前景。本研究通过采用液芯波导系统,成功地对乙醇和四氯化碳进行了高灵敏度拉曼光谱研究,获得了大于200倍的灵敏度放大因子,展示了液芯波导拉曼光谱应用于这些领域的可行性,并为将来进一步进行定量标定的研究工作和实际应用提供了实验依据。要进一步提高系统探测能力,一方面可以提高光纤耦合效率,改善光谱仪性能,另一方面可考虑使用较长的或较小内径的LWCC(如100 μm i. d, 250cm长),内径较小的LWCC还可获得较小的探测体积,具有更广泛的应用前景。

致谢 作者非常感谢孟耀勇教授在拉曼光谱测量中给予的帮助。

参考文献

- [1] Dong J, Dinakarpanidian D, Carey P R. Extending the Raman Analysis of Biological Samples to the 100 Micromolar Concentration Range. *Applied Spectroscopy*, 1998, 52(8): 1117 - 1122
- [2] Altkorn R, Koev I, Van Duyne R P et al. Low-loss liquid-core optical fiber for low-refractive-index liquids: Fabrication, characterization and application in Raman spectroscopy. *Applied Optics*, 1997, 36(34): 8992 - 8998
- [3] Altkorn Robert, Koev Iliia, Gottlieb Amos. Waveguide Capillary Cell for Low-Refractive-Index Liquids. *Applied Spectroscopy*, 1997, 51(10): 1554 - 1558
- [4] Waterbury R D, Rao W, Byrne R H. Long Pathlength Absorbance Spec-

- troscopy: Trace Analysis of Fe (II) Using a 4.5m Liquid Core Waveguide. Anal. Chim. Acta, 1997, 357(1-2): 99-102
- [5] Purnendu K Dasgupta, Zhang Genfa, Li Jianzhong et al. Luminescence Detection with a Liquid Core Waveguide. Anal. Chem, 1999, 71(7), 1400-1407
- [6] Gooijer Cees, Hoornweg Gerald, Beer Tjipke de et al. Detector Cell Based on Plastic Liquid - Core Waveguides Suitable for Aqueous Solutions: One - to - Two Decades Improved Detection Limits in Conventional - Size Column Liquid Chromatography with Absorption Detection Journal of Chromatography A, 1998, 824(1): 1-5
- [7] Tsunoda Kin - Ichi, Nomura Akira, Yamada Joseph 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. Applied Spectroscopy, 1989, 43(1): 49-55
- [8] Li Song, *Liu Suyi, Valentin Zhelyaskov et al. Application of liquid waveguide to Raman spectroscopy in aqueous solution. Appl. Spectrosc., 1998, 52(10): 1364-1367
- [9] Pelletier M.J. and Altkorn Robert. Raman Sensitivity Enhancement for Aqueous Protein Samples Using a Liquid - Core Optical - Fiber Cell. Anal. Chem., 2001, 73(6): 1393-1397
- [10] Holtz Mark, Dasgupta Purnendu K, and Zhang Genfa. Small Volume Raman Spectroscopy with a Liquid Core Waveguide. Anal. Chem. 1999, 71(14): 2934-2938

激光医学与医学·

糖尿病患者白内障摘除术后眼底激光光凝的疗效观察

干雪梅 贺翔鸽 袁蓉娣

(第三军医大学大坪医院眼科, 重庆 400042)

提要:目的:观察糖尿病患者白内障摘除术后行视网膜激光光凝的疗效。方法:对124例患者(168只眼)激光治疗。治疗前行视力、裂隙灯检查,眼底荧光血管造影(FFA)。采用德国 IEISS 公司 VISULAS ARGON 型激光眼科治疗机。行(1)直接光凝,(2)全视网膜光凝,(3)新生血管光凝,距黄斑中心 2DD 选用氩绿激光光栅样或大“C”字形光凝。结果:随访3月-5年,平均13个月,81例患者视力较激光前增进,26例视力稳定,17例患者视力有下降。FFA 见黄斑囊样水肿减轻、消退、视网膜新生血管退缩、消失。结论:患有白内障的糖尿病患者应及早行白内障摘除术,以便早日行视网膜激光光凝术,以阻止视网膜病变的发展。

关键词:

1 对象与方法

1.1 对象 我院1997年至今共收治患者124例(168只眼),男性68例(98只眼);女性56例(70只眼),单眼96例,双眼28例,年龄38~76岁,平均年龄52岁。根据荧光血管造影分为:(1)非增殖期76例(111只眼);(2)增殖前期32例(37只眼);(3)增殖期16例(20只眼)。激光治疗前视力:0.1者26只眼;0.2者42只眼;0.3者56只眼;0.4者34只眼;0.5者7只眼;0.6者3只眼。

1.2 氩激光治疗方法 采用德国 ZEISS 公司 VISULAS ARGON 型氩离子激光眼科治疗机,据眼底荧光血管造影所显示病变部位的范围、程度行(1)直接光凝,(2)全视网膜光凝,(3)新生血管光凝,距黄斑中心 2DD 选用氩绿激光光栅样或大“C”字形光凝。治疗参数:光斑直径 50~300 μ m;功率 100~500mW;时间 0.08~0.25s;光斑反应~级。分1~4次完成。治疗后3月、半年行荧光眼底血管造影,如发现新的新生血管需再次补加激光。观察时间3月至5年。

2 结果和讨论

2.1 视力 视力提高一行者28例(32只眼);视力提高二行者35例(48只眼);视力提高三行者18例(27只眼);视力不变者26例(41只眼);恶化者17例(20只眼)。

2.2 眼底所见 微血管瘤萎缩、黄斑水肿减轻、消退;视网膜新生血管减少、退缩、消失。

糖尿病是严重影响人们健康和生命的常见病,我国糖尿病的患病率在过去十年中提高了10%^[1]。糖尿病引起视网膜病变的病理变化,在血管方面,主要为毛细血管基底膜的增厚及周细胞的消失,毛细血管闭锁或阻塞。微血管瘤形成。以及纤维血管性新生血管形成^[2]。激光光凝非增殖期糖尿病视网膜病变的作用在于:封闭视网膜内血管渗漏,减少黄斑水肿、渗出、出血。激光光凝增殖期视网膜病变的作用在于:促进新生血管退缩,减少玻璃体出血及纤维血管组织收缩引起牵拉性视网膜脱离^[2]。我们主张在增殖前期就应及时行视网膜激光光凝,以阻止其发展至增殖期。

行眼底激光光凝时要求眼屈光间质必须清亮,以便能看清楚眼底。故合并白内障的糖尿病视网膜病变患者应先行白内障摘除术。一般术后一周、血糖控制在12mmol/L以下,可行视网膜激光光凝治疗。因糖尿病患者瞳孔不易扩大,加上人工晶体的折射,使激光光凝治疗较困难,故要求激光光凝的医生要熟练掌握全视网膜激光光凝镜的使用技巧,要用小光斑。治疗前要与患者充分沟通,解除患者紧张情绪,取得患者合作。

参考文献

- [1] 张承芬主编. 眼底病学,北京:人民卫生出版社,1998:223
- [2] 张承芬,徐国祥主编. 激光眼科学. 广州:广东科技出版社,2000年211-214