

共振拉曼光谱技术应用综述

徐冰冰, 金尚忠*, 姜丽, 梁培

中国计量大学光学与电子科技学院, 浙江 杭州 310018

摘要 拉曼光谱是提供物质结构信息的强有力工具。但由于拉曼散射信号弱, 灵敏度低, 因此应用范围受到限制。而在共振拉曼光谱(RRS)中, 由于激发光源频率落在分子的某一电子吸收带内, 分子吸收光子向电子激发态的跃迁变成了共振吸收, 因此对入射光的吸收强度大大增加。与常规拉曼光谱相比, RRS能够提高信号强度的 10^6 倍。因此, RRS检测技术以其更高的灵敏度和选择性而具有更广的应用, 特别是在生物学及医学等领域。如: (1)生物基质中的类胡萝卜素和叶绿素等色素分析; (2)细胞、蛋白质和DNA等有机物研究以及一些临床疾病诊断。RRS可以得到在常规拉曼光谱中隐藏的、更为重要的分子结构信息。RRS总是在很低的浓度下测试, 且共振拉曼增强的谱线是属于产生电子吸收的基团, 这对于有色物和生物样品尤为重要。因为很多这类样品的活性部位接近于生色基团, 且研究对象往往是生物大分子的某一部分, 所以在研究生物物质的结构和功能的关系时, RRS起着重要作用。近年来, 由于光谱技术的发展使得RRS检测技术得到创新与延伸, 如液芯光纤共振拉曼光谱和透射共振拉曼光谱等新技术的应用。通过对近几年有关RRS技术应用的原始论文、数据和主要观点进行归纳整理与分析提炼, 介绍了RRS这一专题的历史背景和研究现状, 分别对共振拉曼光谱的色素检测、生物检测和爆炸物检测等应用领域展开详细的综述, 并介绍了相关新技术的发展应用。随着光谱技术的快速发展, RRS必将在科研领域拥有其他光谱技术不可取代的重要地位。

关键词 共振拉曼光谱; 色素检测; 生物检测; 爆炸物检测

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** R **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)07-2119-09

引言

1928年印度物理学家拉曼(Raman)因发现了拉曼散射效应而获得了诺贝尔奖, 从此该散射效应受到了科学家们的广泛重视。拉曼散射是光照射到物质上发生的非弹性散射。单色光束的入射光子与分子相互作用时可发生弹性碰撞和非弹性碰撞, 在弹性碰撞过程中, 光子与分子间没有能量交换, 光子只改变运动方向而不改变频率, 产生的散射过程称为瑞利散射。而在非弹性碰撞过程中, 光子与分子之间发生能量交换, 光子不仅改变运动方向, 同时其一部分能量传递给分子, 或者分子的振动和转动能量传递给光子, 从而改变了光子的频率, 产生的散射过程称为拉曼散射(Raman scattering, RS), 所以探测拉曼散射信号可以测量物质结构信息。RS包括斯托克斯散射和反斯托克斯散射。拉曼光谱技术是一种非破坏性测试技术, 几乎无需试样制备, 用少量

试样就能获得足够信号, 而且使用于物质的各种物理形态分析, 被广泛用于化学、物理学、生物学和医学等领域检测。它对定性分析、定量分析和分子结构测定具有重要意义。

拉曼散射中, 当激发光频率与待测分子的某个电子吸收峰接近或重合时, 由于电子跃迁和分子振动的耦合, 这一分子的某个或几个特征拉曼谱带强度陡然增加, 产生共振拉曼散射(resonance Raman scattering, RRS)效应。共振拉曼散射效应可以从拉曼散射截面公式得到解释: 根据Kramers-Heisenberg-Dirac散射公式

$$\sigma'_{rs} = \sum_r \left[\frac{(\mu_p)_{fr}(\mu_\sigma)_{ri}}{\hbar(\omega_i - \omega_L) + i\Gamma_r} + \frac{(\mu_\sigma)_{fr}(\mu_p)_{ri}}{\hbar(\omega_f + \omega_L) + i\Gamma_r} \right] \quad (1)$$

式(1)中, ω_i 是初始态*i*到激发态*r*的频率差, ω_L 是入射激光频率, μ_p 与 μ_σ 为偶极矩算子的分量, Γ_r 为描述均匀展宽的阻尼因子。当激发光频率靠近电子吸收带时, 第一项分母趋近于零, 因而其散射截面异常增大, 导致某些特定的拉曼散射强度增加 $10^4 \sim 10^6$ 倍。RRS收集的光谱峰较少, 但峰的

收稿日期: 2018-04-26, 修订日期: 2018-08-17

基金项目: 国家重大科学仪器设备研发计划(2016YFF0103302), 国家自然科学基金项目(61505194)资助

作者简介: 徐冰冰, 女, 1992年生, 中国计量大学光学与电子科技学院硕士研究生 e-mail: 13221018192@163.com

* 通讯联系人 e-mail: jinsz@cjl.u.edu.cn

分辨率较高。与常规拉曼光谱(RS)相比,由于激发波长和电子跃迁吸收波长的重叠,RRS显著提高了灵敏度和选择性,因此,它可以选择性地分析复杂体系中相对较少的分子,为混合物中的单个组分提供更多的指纹信息,这对于定量分析非常有利。现已证明它在生物分子分析、生物医学诊断、环境污染监测、液体成分检测和合成物质鉴定方面具有很大的潜力和优势。RRS技术的高选择性和高灵敏度不仅可以检测出发色团的存在,还可以检测出发色团的结构和微环境的变化。

共振拉曼散射取决于激发波长。首先,激发光源的频率必须在分子电子吸收带波长附近;其次,光源单色性好;而且激发光要尽可能强和会聚。常用的能够获得共振拉曼光谱的激发光源有:产生457.9、488.0、496.5和514.5 nm的氩离子激光器;产生356.4、413.1、476.2和568.2 nm的氪离子激光器;产生632.8 nm的氦氖激光器;产生532.0 nm的半导体激光器以及产生325和441.6 nm的Liconix-氩镉激光器;产生244.0和257.2 nm等紫外激光的腔内倍频氩离子激光系统,以及激光波长在一个较大范围内(330~1 850 nm)连续可调的染料激光器。

在产生共振拉曼散射效应过程中,当激发频率接近或重合于分子的电子跃迁频率时,要得到拉曼光谱图会遇到一系列的困难,主要有:散射与吸收过程之间的竞争、热透镜效应、样品的热分解,以及荧光和光解问题。这些问题通常采用以下方法和技术来解决:(1)对拉曼谱带与样品自身吸收的校正,尽可能地将激光聚焦到靠近激光束出口的样品表面上,甚至掠样品表面入射以减小激光在样品中的光程来降低吸收;(2)采用使样品与激光光束之间有相对运动,或激光扫描样品表面来避免热透镜效应和热分解;(3)在共振条件下常会有宽的荧光带出现,荧光增高了背景,使谱带畸变,信噪比变劣。采取的荧光抑制方法有:荧光淬灭法、光漂白法、紫外/红外光激发法、移频激发法、小波变换法等。

相对于拉曼光谱应用范围存在一定的局限性,共振拉曼光谱以其更高的灵敏度和选择性而被广泛应用。本文介绍了共振拉曼光谱检测技术在几个研究领域的应用,分析了拉曼光谱中产生共振效应的物质以及相对应的具体位置,便于读者在科研探索时以合理的精度预测并能准确判断各类分子的共振拉曼光谱。

1 色素分子的共振拉曼光谱

1.1 类胡萝卜素分子

共振拉曼光谱被广泛用于类胡萝卜素分子的研究。类胡萝卜素的光吸收带在400~550 nm范围内,当激发光的波长与类胡萝卜素的 $\pi-\pi^*$ (S_0-S_2)电子跃迁刚好吻合时,产生RRS。通常由其吸收引起的RRS相对于RS增加1 000倍以上^[1],检测限低达到 10^{-8} mol·L⁻¹。典型的类胡萝卜素的拉曼光谱在950~1 600 cm⁻¹之间,RRS谱主要由1 500~1 550(ν_1),1 120~1 200(ν_2)和1 000 cm⁻¹(ν_3)三组频段组成^[2]。 ν_1 频段由C=C双键伸缩振动引起,跃迁类型为 $\pi-\pi^*$; ν_2 频段由C—C单键伸缩振动引起,跃迁类型为 $\sigma-\sigma^*$;

ν_3 频段由—CH₃弯曲振动引起,跃迁类型为 $\sigma-\sigma^*$ 。由于 ν_1 波段的共振拉曼峰最明显,因此该波段常用于鉴别和区分胡萝卜素的种类^[3]。

Ibarrondo等^[4]用514和785 nm激发光源观察油菜中类胡萝卜素的拉曼光谱。 ν_1 、 ν_2 和 ν_3 频段模式在514 nm激发下得到了显著的共振增强,而在785 nm激发下却不存在共振增强(如图1所示)。共振条件下不仅可以测量到类胡萝卜素典型的三个特征拉曼谱带的显著增强,而且还可以检测到常规激发下测不到的光谱,如956和1 205 cm⁻¹处的拉曼特征峰。扩大拉曼光谱测量范围至3 500 cm⁻¹,则会测得2 020($2\nu_3$),2 510($\nu_1+\nu_3$)和3 294($2\nu_2+\nu_3$)等拉曼特征峰。一般地,在514 nm的共振条件下,由于在类胡萝卜素中发生的强电子-声子耦合,共振拉曼光谱的1 100~1 200和1 400~1 600 cm⁻¹区域中的两个拉曼谱光会更强。

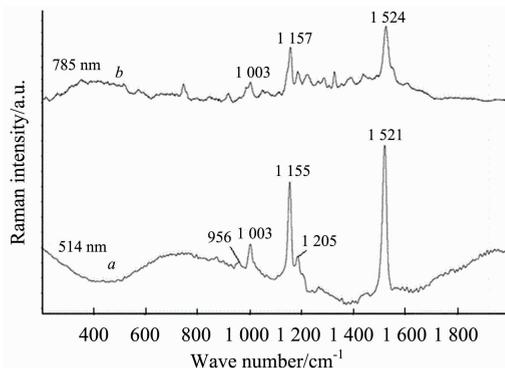


图 1 (a) 514 nm 和 (b) 785 nm 激发下获得的油菜拉曼光谱^[4]

Fig. 1 Raman spectra of campestris obtained by (a) 514 nm and (b) 785 nm excitation sources^[4]

Tintchev等^[5]用413和514.5 nm同时检测虾青素时,发现413 nm可产生比514 nm激发光更明显的共振。由于虾青素的强吸收峰位于400~600 nm之间,经加压处理后用514 nm激发,虾青素在1 157(ν_2)和1 518 cm⁻¹(ν_1)处出现两个强共振拉曼特征峰。然而,当用413 nm激发时, ν_1 位移至1 521 cm⁻¹。从Ruban等^[6]的实验可以发现,在类胡萝卜素的共振拉曼光谱中,最强烈带(ν_1)的位置会根据分子具有的共轭C=C键的数目而变化。由于新叶黄素在440和470 nm附近存在强吸收峰,而叶黄素在465和495 nm附近存在强吸收峰。所以,叶黄素和新叶黄素在氩镉激光器发出的441.6 nm激发光下,以及在氩离子激光器发出的457.9、476.5、488.0和501.7 nm激发下,其频段 ν_1 波动范围分别在1 532~1 534和1 525~1 527 cm⁻¹之间。488 nm激发下,叶黄素在 ν_1 区域存在两条明显的共振拉曼谱带(955和963 cm⁻¹),而在501.7 nm共振条件下, ν_1 区域除了957和965 cm⁻¹两个谱带外,在952和973 cm⁻¹处也出现了拉曼谱带。基于类胡萝卜素的这些共振拉曼特征峰的特性,使得共振拉曼光谱在很多实际应用中发挥及其重要的作用,如可以被用来检测化妆品中类胡萝卜素的浓度,继而确定化妆品抗氧化和稳定性等。显然,共振拉曼光谱在提供有关类胡萝卜素的

精确分子信息方面具有显著的实用性, 这些类胡萝卜素分子的检测也促进了 RRS 光谱分析方法的发展。

1.2 叶绿素分子

RRS 可以研究叶绿素的分子特征, 叶绿素在 432 nm 附近存在吸收峰, 所以通常采用该波长附近的激发光对叶绿素进行研究。叶绿素 RRS 含有约 60 条谱带, 分为三个主要区域: 低频区($200\sim 500\text{ cm}^{-1}$, 中心 Mg 原子作用引起)、中频区($900\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$, $\text{Ca}=\text{N}$ 和 $\text{Ca}=\text{Cb}$ 伸缩振动模等多种模作用)和高频区($1\ 620\sim 1\ 710\text{ cm}^{-1}$, $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动模引起)。叶绿素分子的 RRS 包含了由振动模式产生的谱带和用于产生共振的电子跃迁(通常是最高能量的 Soret 带, 其主要由允许 $\pi-\pi^*$ 跃迁的电偶极子运动而产生, 以避免叶绿素内在荧光的干扰)。RRS 也可以用于评估更细微的结构特征, 如 Okad 等^[7]用纳秒脉冲 Nd: YAG 激光器发出的 1 064 和 355 nm 两束激发光对细菌叶绿素 a 进行检测, 发现只有在 355 nm 激发下有共振增强现象, 且该现象由细菌叶绿素 a 分子的 Soret 带实现。由于叶绿素 a 的大部分电子转换以及相关分子由平行于分子平面偏振的 $\pi-\pi^*$ 跃迁组成, 所以叶绿素 a 和相关分子的 RR 谱中观察到的大部分谱带是由面内模式产生的。叶绿素 a 在 413.1 和 406.7 nm 等激发下, 在 1 680, 1 659 和 1 610 cm^{-1} 附近出现非常强烈的拉曼特征峰, 最敏感的拉曼谱带是那些由叶绿素分子共轭 $\text{C}=\text{O}$ 羰基伸缩振动模作用引起的在光谱高频区域中出现的谱带。可以通过叶绿素 a 在约 400 nm 的激发下被选择性识别出。Kish 等利用氩氟激光器产生的 441.6 nm 激发光对叶绿素 b 进行拉曼检测, 发现在 1 550, 1 570, 1 630, 1 640 和 1 675 cm^{-1} 处出现共振拉曼特征峰。叶绿素 c 在 457.9 和 441.6 nm 等激发下, 在 1 693 和 1 679 cm^{-1} (叶绿素 c 的酮基-羰基簇伸缩模作用)和 1 360 cm^{-1} ($\text{C}-\text{N}$ 呼吸模式的 Soret 带电子跃迁作用)处显示非常强的谱带。由于叶绿素 a 和叶绿素 c 分子的 Soret 带电子跃迁的位置不同, 所以叶绿素 c 分子主要在 457.9 和 441.6 nm 激发下表现出共振现象, 而叶绿素 a 则在 413.1 和 406.7 nm 激发下占优势^[8], 如图 2 所示。大多数类胡萝卜素和叶绿素的不同构象可以根据它们的拉曼光谱

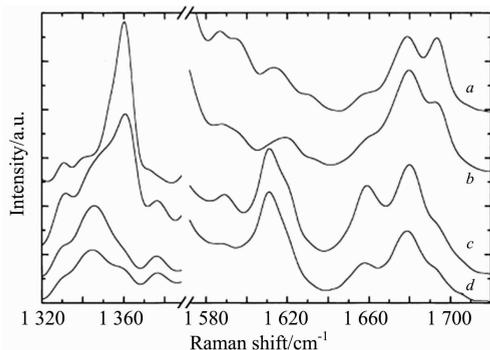


图 2 分别在 457.9, 441.6, 413.1 和 406.7 nm 激发的叶绿素共振拉曼光谱^[8]

a 和 b: 叶绿素 c; c 和 d: 叶绿素 a

Fig. 2 Resonance Raman spectra of chlorophylls excited at 457.9, 441.6, 413.1 and 406.7 nm^[8]

a, b: Chlorophyll c; c, d: Chlorophyll a

来区分。由于这些分子产生的信号特别强烈, 它们一直都是光合作用中共振拉曼光谱的研究主题。由于 RRS 可以提供分子更细微的结构特征, 所以它在涉及藻类和地衣细菌的环境监测方面将会有突出贡献。

1.3 罗丹明 6G 检测

罗丹明 6G(R6G)在 530 nm 附近存在强吸收, 在 470 nm 左右存在一个强振动肩, Londero 等^[9]用 456 nm 对 R6G 进行 RRS 测量的实验中, 发现在 609, 1 475, 1 573 和 1 645 cm^{-1} 处显示出明显的共振现象。Jensen 等^[10]用 474 和 1 064 nm 对 R6G 进行检测, 发现在 474 nm 激发获得的共振拉曼光谱中, 由于 R6G 的 $\text{C}-\text{C}$ 键的伸缩振动模作用, 使得其在 611 和 775 cm^{-1} 处出现显著的共振增强现象, 并且在 1 178, 1 577 和 1 649 cm^{-1} 处出现了新的拉曼谱带, 这些现象在 1 064 nm 激发的常规拉曼光谱中不曾出现。

综上所述, 共振拉曼光谱技术是色素分子检测的有效工具之一。RRS 结合了灵敏度和选择性, 使人们能够选择性地观察稀释溶液中的发色溶质以及研究复杂基质中的产生特定拉曼散射的物质。

2 疾病检测

2.1 癌症检测

RRS 可用于检测癌症过程中分子组成和结构的变化, 且对人类大脑, 乳房等组织的疾病研究有很高价值。在癌症疾病检测中, 现多采用 532 nm 激发光, 其优点主要在于: 该激发光能对组织中关键结构单元分子(如蛋白质和脂质等分子, 以及亚甲基和羰基等官能团)进行有效激发, 从而实现拉曼光谱强度的增强, 具有更高的信噪比和快速信号采集优势。Alfano 团队^[11]在 1987 年用 457.9 和 488 nm 两束激光对人体乳腺组织进行了第一次的 RRS 检测。Liu 等^[12]用 785 和 532 nm 激发光检测了乳腺细胞, 由于人的正常乳腺组织在 514 nm 处存在吸收峰, 所以正常的乳腺组织在 532 nm 激发下产生了共振效应, 主要存在 750, 1 004, 1 156, 1 306, 1 441, 1 521 和 1 656 cm^{-1} 这七个特征峰。其中 750 和 1 306 cm^{-1} 特征峰在癌症患者 RRS 光谱中表现出强烈的增强现象。除此之外, 癌症患者 RRS 中的 1 358 cm^{-1} ($\text{CH}_3-\text{C}(\text{O})$ 伸缩振动模), 1 378 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$ 弯曲振动模引起), 1 548 cm^{-1} (归属于蛋白质酰胺 II) 以及 1 605 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动模和苯丙氨酸和酪氨酸中的 $\text{C}=\text{C}$ 弯曲振动模共同引起)这几个特征峰在 532 nm 激发下同样较正常人乳腺组织 RRS 有所增强(如图 3 所示)。当使用 785 nm 激发时, 光谱中主要的拉曼峰是由蛋白质和脂质振动引起。在此激发下, 正常乳腺组织的拉曼光谱中主要存在 830, 1 078, 1 310, 1 448 和 1 652 cm^{-1} 这几个特征拉曼峰, 而在癌变的乳腺组织的拉曼光谱中, 则存在 1 663 cm^{-1} (归属于蛋白质酰胺 I), 1 453 cm^{-1} (归属于蛋白质酰胺 II) 以及 1 262 cm^{-1} (归属于蛋白质酰胺 III) 这三个拉曼特征峰。以上所述的是正常与癌变乳腺组织分别在 532 和 785 nm 激发下所呈现的拉曼现象。将 532 与 785 nm 激发下获得的患者与正常人的乳腺组织的拉曼光谱相比较, 会发现在 1 262 cm^{-1}

(归属于蛋白质酰胺 II, 由亚甲基(-CH₂-)变形导致)和 1 663 cm⁻¹(归属于蛋白质酰胺 I, 由羰基(C=O)伸缩振动模作用)都呈现了共振增强现象。而乳腺癌患者的乳腺细胞则是在 1 548 cm⁻¹(归属于蛋白质酰胺 II)产生显著的共振增强。Sriramoju 等^[13]还利用 532 nm 激发光对人体的正常皮肤细胞和患有基底细胞癌(BCC)患者的皮肤细胞进行了检测,发现患有基底细胞癌(BCC)患者的细胞光谱中,位于 763, 1 012, 1 452, 1 662 和 2 932 cm⁻¹的拉曼谱强度较正常皮肤细胞有显著增强现象。Zhou 和 Köhler 等^[14-15]分别用 532 和 785 nm 激发光对脑癌进行了研究,发现脑癌细胞组织在 532 nm 激发下产生共振拉曼效应,且在 1 547 cm⁻¹(酰胺 II), 1 587 cm⁻¹(归属于细胞色素 c/线粒体), 1 606 cm⁻¹(苯丙氨酸和酪氨酸引起)和 1 004 cm⁻¹(苯丙氨酸的苯环呼吸模式作用)处发生显著的共振增强。

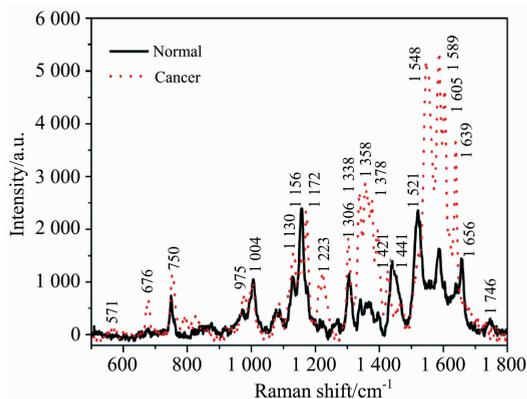


图 3 532 nm 激发下的正常和癌变的乳腺组织 RRS 光谱^[12]

Fig. 3 The RR spectra of normal and cancer breast tissues excited at 532 nm^[12]

综上所述,肿瘤的拉曼光谱通常会显示出大量的共振增强峰,特别是 1 547 cm⁻¹附近的酰胺 II 带显示出强共振增强。在使用非共振拉曼系统收集的光谱中一般观察不到这些现象,可见 532 nm 激发光对于癌症诊断非常有效。

2.2 牙周炎检测

RRS 技术可以以非侵入形式快速检测唾液样本,实现早期牙周炎检测。它主要是由唾液中类胡萝卜素提供分子指纹信息。采用 488 和 514.5 nm 两种激发光来获得共振拉曼光谱。Gonchukov 等^[16]用上述两束激发光以及 632.8 和 532 nm 激光对唾液样本进行了检测,由于 β -胡萝卜素在光谱的绿色区域存在强吸收,所以发现牙周炎患者的 RRS 光谱中出现了 1 156 和 1 524 cm⁻¹这两处共振拉曼特征峰,这一现象在正常人的 RRS 中则非常弱甚至无法观察到,并且这两个特征峰在 632.8 和 532 nm 激发条件下不会出现。而且还发现这两个特征拉曼峰强度随着牙周炎的加重而增加。因此,根据这一实验现象可以对牙周炎进行早期诊断。由于深紫外光将降低荧光信号,且酰胺 I 的 RRS 增强(通过酰胺 I 的 $\pi-\pi^*$ 跃迁实现)需要较短的波长激发(接近 200 nm),所以可以采用深紫外光进行牙质检测。对 244 nm 激发下获得的人骨和牙质的紫外共振拉曼光谱(UVRRS)中观察到的主

要特征峰进行总结:有 955~965 cm⁻¹(归属于磷灰石中的 PO₄³⁻ 离子), 1 245~1 255 cm⁻¹(Amide III), 1 455~1 465 cm⁻¹(CH₂ 振动引起), 1 555~1 560 cm⁻¹(Amide II), 1 610~1 620 cm⁻¹(酪氨酸侧链振动引起)和 1 655~1 665 cm⁻¹(Amide I)。比较牙质在 244, 205 和 229 nm 处激发下的光谱,发现只有 244 nm 激发导致 Amide I 的共振增强,而 Amide II 在这三种激光激发条件下只出现很弱的共振现象^[17],如图 4 所示。尽管目前 RRS 在疾病检测方面的应用不是很广,但随着医学的不断发展以及医学界专家们的不懈探究,RRS 将在人类疾病预防以及检测等方面发挥重大的作用。

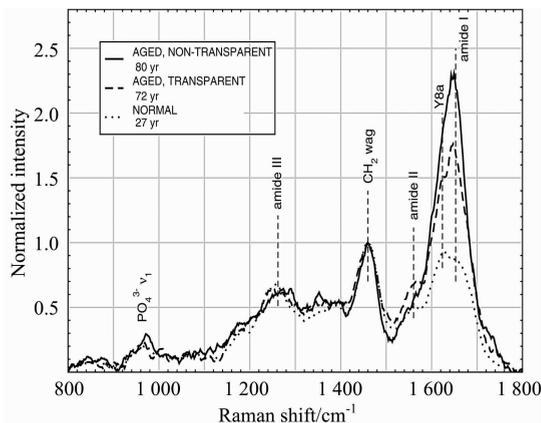


图 4 244 nm 激发下的人的牙本质紫外共振拉曼光谱^[17]

Fig. 4 UV resonance Raman spectra excited at 244 nm from human dentin^[17]

3 生命科学中的 RRS 检测

3.1 蛋白质检测

紫外共振拉曼光谱(UVRRS)技术可用于测量在紫外区域有吸收的大分子中的生色团,该技术比其他类型的拉曼光谱技术更具优势。首先它具有共振增强效应,使拉曼信号增加 100~1 0000 倍;其次,它在低于 250 nm 的情况下不受荧光干扰,具有高信噪比^[18]。再者它可以实现痕量检测和选择性测试。许多重要标记物,如核酸、酶、细胞壁蛋白等的吸收区位于小于 300 nm 的深紫外区。因此紫外激发光可以实现微生物的共振拉曼定量测量。由于芳香族氨基酸和蛋白质分子的紫外共振拉曼光谱信号能够被选择性地增强,所以 UVRRS 在治疗与监测疾病方面非常有效。已知血浆的几个常见的 UVRRS 峰来源于芳香族氨基酸,且其拉曼峰信号都被增强。因此在此分析色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸这三种重要的氨基酸,由于其在 275 nm 波长附近存在吸收峰,Harz 等^[19-20]采用 244 nm 作为激发光源对血浆进行拉曼检测时,发现它们在该激发条件下都产生了共振拉曼效应。如色氨酸在 758 和 1 009 cm⁻¹(对称苯/吡咯同相和异相呼吸模式), 1 340 和 1 356 cm⁻¹(由吡咯环中的 N₁-C₈ 伸缩与面外弯曲的组合带之间的费米共振引起的振动), 1 551 cm⁻¹(吡咯环 C-C 伸缩振动)处显示特征拉曼峰;酪氨酸在 829(对称环伸缩模式), 851, 1 173(平面内 C-H 弯曲振动), 1 208(C-C₉

的伸缩振动)和 1 615(平面内环伸缩振动)处出现拉曼峰; 苯丙氨酸在 1 214(C—C_β 的伸缩振动), 1 604(平面内环伸缩振动)和 1 006 cm⁻¹(环呼吸模式)处存在拉曼特征峰。因为疾病会改变了人体血浆的组成, 所以对血浆中蛋白质的检测有利于疾病诊断。如利用 RRS 对人体血浆样品进行检测及分析其组份从而鉴别人类是否患有血栓性微血管疾病的应用中, 确定了人类血浆中主要信号是来自芳香族氨基酸, 且不受如类胡萝卜素等其他因素的干扰, 因此 UVRRS 可以更有效和特异性地区分健康人体和血栓性微血管患者的血浆。

Mak 等^[21]用 406.7 nm 激光对细胞色素 P450 进行了检测, 该物质在 446 nm 处存在吸收峰, 所以产生了共振效应, 主要在 1 372~1 373(ν₄ 模式), 1 460~1 500(ν₃ 模式), 1 560~1 580(ν₂ 模式)和 1 600~1 640 cm⁻¹(ν₁₀ 模式)处发生共振增强^[22]。Tosha 等^[23]采用 363.8 nm 波长对其进行检测, 发现在获得的共振拉曼光谱的低频区中的 349, 410, 470 和 676 cm⁻¹附近存在共振增强。Chi 等^[24]利用紫外共振拉曼光谱来确定蛋白质的结构。已知血红蛋白的共振拉曼光谱的出现强烈依赖于激发光波长。而紫外激发可以通过共振效应来增强蛋白质某些部分的振动强度。接近 200 nm 激发下测量的蛋白质共振拉曼光谱由酰胺 I, II 和 III 区域中的肽键的振动带以及来自芳香族氨基酸侧链的振动带的叠加作用引起。Arzhantsev 等^[25-26]用深紫外激发对蛋白质进行了检测, 对药物测试中, 含有 Novol, Humalog 和 Lantus 三种胰岛素在 195 nm 激光激发的实验中发现, 由于酰胺 III 模式、酪氨酸的芳香环拉伸模式和酰胺 I 模式作用, 在 1 235, 1 610 和 1 655 cm⁻¹附近出现共振拉曼特征峰。通过这一现象可以判别基于蛋白质配制的药物中胰岛素成分以及判定胰岛素的存在与否。George 等^[27]采用 514.5(非共振条件)和 229 nm(共振条件)对丝状病毒(fd)进行拉曼检测, 病毒的衣壳蛋白白色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)组成成分在 229 nm 处激发下同样会产生的共振拉曼现象^[28], 且拉曼特征峰出现在 757, 1 010, 1 616 以及 1 767 cm⁻¹处。而这些峰在 514.5 nm 激发下是不存在的^[29], 这些特征峰足以作为判定 fd 存在与否的有力证据。在深紫外(如 222.5, 242.4, 250.9 和 230.6 nm 等)的激发下, 几种细菌(包括大肠杆菌)的共振拉曼光谱的谱线大致相似, 且最显著的共振谱带是在 1 614 cm⁻¹处(如图 5 所示)。一般对于细菌蛋白质, 在 218~242 nm 区域内激光波长的适当选择将会增强苯丙氨酸, 酪氨酸芳香族侧链的 UVRRS 带。此时, 每个细胞的 DNA, RNA 和蛋白质芳香族氨基酸都会出现细菌共振拉曼光谱的最强峰。因此, 紫外共振拉曼光谱技术在蛋白质检测方面具有明显的优势。

3.2 DNA 检测

不同 DNA 化合物在不同的激发条件下显示出不同共振增强。单细胞核中 DNA 的光谱特征在 260 nm 左右的激发光激发下, 其核酸碱基的紫外共振拉曼光谱(UVRRS)强度最强。257 nm 等紫外光都非常适用于核酸及其复合物的 UVRRS 研究。在 325, 282 和 257 nm 等激光的激发下, 腺苷的峰值最强, 但在 244 nm 条件下却很弱。A, C, G 和 T 四

种碱基之间相互作用使得其在 282 nm 的激发下出现强烈的共振拉曼峰。在紫外光激发下, DNA 碱基的共振拉曼峰出现在 1 427, 1 484, 1 569 和 1 616 cm⁻¹附近^[30-31]。George 等用 514.5(非共振条件)以及 257 nm(共振条件)对丝状病毒(fd)进行拉曼检测。比较这两种激发下的拉曼光谱, 发现 DNA 碱基在 257 nm 激发下产生显著的共振拉曼现象, 并且特征峰出现在 981, 1 335, 1 483 和 1 575 cm⁻¹处(如图 5 所示)。UVRRS 对于 DNA 化合物组成成份中碱基的判定非常有效, 由于 DNA 结合化合物作为基因导向治疗剂具有巨大的潜在价值, 所以, UVRRS 在研究 DNA 与小分子, 如致癌物或染料等相互作用方面有良好的应用前景。

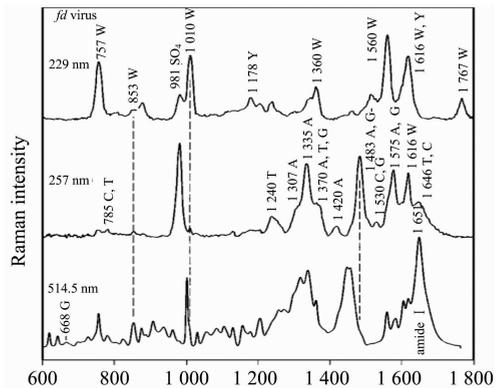


图 5 229, 257 和 514.5 nm 激发下的 fd 病毒拉曼光谱^[27]

Fig. 5 Raman spectra of fd virus excited at 229, 257 and 514.5 nm^[27]

3.3 血红素检测

Ramser 等^[32]使用 488.0, 514.5 和 568.2 nm 波长的激发光对红细胞中的血红素进行了共振拉曼检测。由于血红素分子的 Soret 带和 Q 键的综合作用引起共振了增强现象, 且大多数强烈的共振拉曼谱带位于 1 000~1 650 cm⁻¹之间^[33], 主要涉及卟啉环中各种 C—C 和 C—N 键的伸缩振动, 以及次甲基质子的弯曲振动。将由以上 3 种激发光激发获得的红细胞拉曼光谱与 830 nm(非共振)获得的光谱进行比较, 发现在这 3 种激光激发下获得拉曼光谱非常相似, 血红素在 1 375, 1 525 和 1 650 cm⁻¹附近有三个明显的特征带, 并且能够很好地消除非共振激发下出现的荧光背景^[34]。而在 568.2 nm 条件下, 除了上述几种特征带外, 在 750 cm⁻¹处出现的共振拉曼特征峰的强度非常强。

Hamada 等^[35]用 488, 514.5, 532 和 632.8 nm 的激光对细胞色素 c 进行了检测(如图 6 所示), 由于细胞色素 c 在 510~550 nm 处存在吸收峰, 所以它在 514.5 和 532 nm 激发下产生共振效应。共振拉曼特征峰出现在 753, 1 127, 1 314 和 1 583 cm⁻¹处。从光谱中还发现 532 nm 激发产生的自发光信号比 514.5 nm 激发低约 12 倍, 比 488 nm 激发的低 167 倍。可见 532 nm 激发可用于产生强烈的拉曼散射信号并抑制通常会模糊拉曼信号的自发光, 所以该激发光对于无标记观察分布在活细胞中的细胞色素 c 是非常优越的。

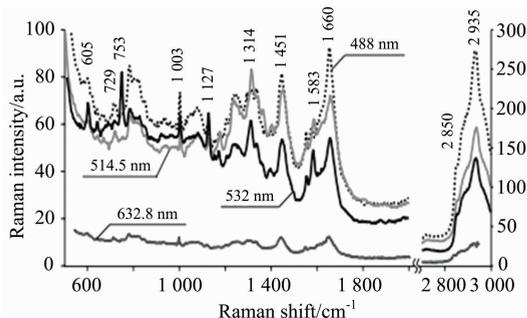


图 6 在 488, 514.5, 532, 488 和 632.8 nm 激光下的细胞溶质光谱^[35]

Fig. 6 Raman spectra obtained from the cytosol one cell irradiated with laser light of 488, 514.5, 532 and 632.8 nm wavelengths^[35]

4 生物分子的拉曼探针检测

激光拉曼探针是一种非破坏性测定物质分子成分的微观分析技术。该技术可以快速、准确、无损地实现对单个包裹体($>1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的定性分析,并可以对包裹体的部分流体成分进行相对定量分析。而共振拉曼探针在选择性标记细胞膜和活细胞中线粒体的快速拉曼成像方面具有明显的潜力,并且为细胞免疫测定开辟了一条新途径。偶氮苯(Azo-benzene)具有低荧光量子产率,可以降低共振拉曼信号中的荧光干扰,它经常被设计成拉曼探针。Li 等^[36]采用 532 和 633 nm 激发光对基于 Azobenzene 而设计的拉曼探针 Am-CN Azo-OH 进行了研究,由于 Am-CN Azo-OH 在 472 nm 波长下存在最大吸收峰,所以其在 532 nm 激发下的拉曼信号比在 633 nm 激发下的信号强度高 30 倍,即在 532 nm 条件下,拉曼探针 Am-CN Azo-OH 会产生共振效应,且在 $1\ 036(\delta(\text{C}-\text{C}))$, $1\ 375(\delta(\text{C}-\text{N}))$ 和 $\nu(\text{C}-\text{C})$ 和 $1\ 594 \text{ cm}^{-1}(\delta(\text{C}-\text{C}))$ 和 $\nu(\text{C}-\text{C})$ 处呈现显著的共振增强现象。

Kuzmin 等^[37]利用 633 nm 波长的激光器研究了一种新型的基于 BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650)的拉曼探针,由于 BBQ-650 在 620 nm 附近存在的强吸收峰,因此,该物质在 RRS 增强机制下出现了高强度信号,观察到在 $1\ 087 \sim 1\ 133 \text{ cm}^{-1}$ 范围内出现了最强拉曼特征峰。除此之外,在 $1\ 240$ 和 $1\ 370 \text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼特征峰也相应的而出现了共振增强现象。与用 532 和 785 nm 激发获得拉曼光谱相比,拉曼特征峰的信号最大增强了约 10^4 倍。BBQ-650-NHS 的检测阈值为 $7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,比普通生物分子的检测阈值低 2~3 个数量级。因此,BBQ-650 非常适合作为细胞生物成像的 RRS 探针。由于共振拉曼探针信号能够选择性增强,而不依赖于来自细胞生物分子的拉曼信号这一特性,使得其在细胞器结构鉴定方面具有显著潜力,已经被验证用于活体培养靶向细胞中的溶酶体等细胞器的动态检测。相信 RR 探针用于标记特定的细胞结构域以指导光谱空间成像的特性能够给细胞生物学提供有效的技术支持。

5 爆炸物检测

Emmons 等^[38]用 532 和 244 nm 对爆炸物成份 PETN(季戊四醇四硝酸酯)进行了拉曼检测,由于 PETN 在 194 nm 附近存在吸收峰,所以该物质在 244 nm 激发下产生了共振效应,且在 $870(\text{O}'-\text{N}$ 伸缩模), $1\ 295(\text{NO}_2$ 对称伸缩模), $1\ 510(\text{CH}_2$ 剪切)和 $1\ 657 \text{ cm}^{-1}(\text{NO}_2$ 反对称伸缩模)处的共振现象非常显著^[39],如图 7 所示,他们还发现硝酸盐类爆炸物成份中的 NO_3^- 在 244 nm(共振)当激发下,由于该离子在 200 nm 附近存在吸收峰^[40],所以其在 $1\ 300 \sim 1\ 450$ 和 $1\ 660 \sim 1\ 670 \text{ cm}^{-1}$ 等范围内出现共振现象^[41],而这一现象在 532 nm(非共振)激发下是不存在的。紫外激发比其他激发光激发的爆炸物拉曼光谱信号有显著增强,如在 229 nm 条件下的拉曼信号比那些在近红外和可见光区域的激发光激发下获得的信号大 1 000 倍左右。总结几种炸药成份在 229 nm 激发下获得的共振拉曼光谱信息如下: TNT(三硝基甲苯)的特征拉曼谱带有: $826, 1\ 170, 1\ 208, 1\ 361$ 和 $1\ 624 \text{ cm}^{-1}$; PETN: $872, 1\ 295, 1\ 511$ 和 $1\ 658 \text{ cm}^{-1}$; NH_4NO_3 (硝酸铵): $1\ 325, 1\ 372, 1\ 400$ 和 $1\ 663 \text{ cm}^{-1}$; HMX(环四亚甲基四硝酸胺): $879, 1\ 079, 1\ 221, 1\ 329$ 和 $1\ 521 \text{ cm}^{-1}$; RDX(环三亚甲基三硝酸胺): $885, 1\ 218, 1\ 458, 1\ 517$ 和 $1\ 589 \text{ cm}^{-1}$ ^[42-44]。在 229 和 248 nm 等深紫外激发下的光谱中, $1\ 044 \text{ cm}^{-1}$ 处的谱带强度通常可用于区分硝酸盐炸药和其他非爆炸性硝酸盐^[45]。通常使用从 229~262 nm 的深紫外激发波长来测量普通爆炸物的共振拉曼横截面。目前,在标准溶液中测量紫外拉曼截面非常简单,并且在文献中也比较常见,但固态测量很少见,所以,在未来的研究探索中,要克服如固态测量中存在的由于爆炸物强烈的紫外线吸收而造成的实验偏差等问题,从而实现爆炸物的 UVRRS 准确检测。

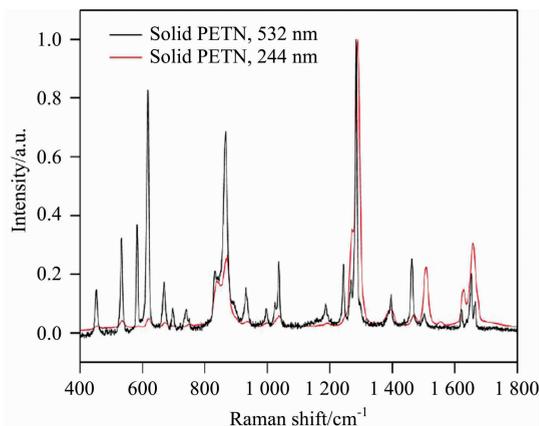


图 7 PETN 在 532 和 244 nm 下的拉曼光谱^[38]

Fig. 7 Raman spectra of PETN excited at 532 and 244 nm^[38]

6 其他检测应用

UVRRS 可以检测钼酸盐物种^[46], Xiong 等^[47]分别用 244, 325 和 488 nm 波长的激发光对 $\text{MoO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 进行拉

曼检测。由于四面体钼酸盐的 $\text{Mo}=\text{O}$ 键和八面体钼酸盐的 $\text{Mo}-\text{O}-\text{Mo}$ 键分别在 220~250 和 320 nm 处存在吸收峰, 所以 $\text{MoO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 在 244 和 325 nm 激发下产生了共振效应。 $\text{MoO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 在 325 nm 激发下, 在 325, 837, 910 和 $1\ 670\ \text{cm}^{-1}$ 处出现共振增强现象。而在 244 nm 激发下, 其在 325, 910, $1\ 802$ 和 $2\ 720\ \text{cm}^{-1}$ 处出现共振增强现象。且 325 和 $910\ \text{cm}^{-1}$ 特征峰归属于 $\text{Mo}=\text{O}$ 键的弯曲和对称伸缩模。而 837 和 $1\ 670\ \text{cm}^{-1}$ 则是归属于 $\text{Mo}-\text{O}-\text{Mo}$ 键的不对称伸缩模。这些现象在 488 nm 激发下是不存在的。

Frey 等^[48]的实验中, 采用 488 和 632.8 nm(共振)两束激光对 MoS_2 纳米粒子进行了拉曼检测, 由于 MoS_2 在 620~670 nm 之间存在吸收峰, 所以 MoS_2 在 632.8 nm^[49] 激发下产生了共振效应, 且在 226, 460, 545 和 $640\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现了共振拉曼特征峰。

Bayazit 等^[50]分别用 632.8, 532 和 785 nm 三束激发光对单壁碳纳米管(SWNTs)分子进行了拉曼检测, 由于该分子在 550 和 600~800 nm 附近存在吸收峰, 所以在这三种激发条件下都存在共振拉曼效应。观察所得光谱, 发现在 632.8 nm 激发下的 SWNTs 拉曼光谱中存在 187, 197, 209, 236 和 $251\ \text{cm}^{-1}$ 这五个特征峰^[51]; 由 785 nm 激发获得的 SWNTs 拉曼光谱特征峰则是在 202, 212, 222, 230 和 $265\ \text{cm}^{-1}$ 处。而在 532 nm 激发条件下, 拉曼特征峰则是在 187 和 $273\ \text{cm}^{-1}$ 处^[52]。RRS 对单壁碳纳米管分子的敏感性检测非常有用。

Laing 等^[53]分别用 514 和 633 nm 对四甲基联苯胺单电子氧化产物($\text{TMB}^+ + \text{CTC}$)进行拉曼检测, 由于该物质在 650 nm 处存在吸收峰, 所以其在 633 nm 激发下产生了共振效应。且在 $1\ 191(\text{CH}_3$ 弯曲振动模), $1\ 336$ (环间 C—C 伸缩振动模)和 $1\ 609\ \text{cm}^{-1}$ (环伸缩振动和 CH 弯曲振动模结合)处出现了拉曼特征峰, 而这几个特征峰在非共振激发波长(514 nm)条件下是不存在的。

Liu 等^[54]分别用 325 和 532 nm 激光对 Si 进行拉曼检测。325 nm 的紫外激发光对于无机碳酸盐和有机聚碳酸酯等化合物非常灵敏。由 325 nm 激发而获得的 Si 光谱中, 出现了 $1\ 090(\text{CO}_3^{2-})$, $1\ 390$ 和 $1\ 605\ \text{cm}^{-1}$ (聚碳酸酯)这几个特征拉曼峰。而在 532 nm 激发下却未出现这一现象^[55]。

Frosch 等^[56]分别用 244, 257 和 532 nm 激发光对抗疟药物氯喹(CQ)和甲氟喹(MQ)进行了拉曼检测, 发现它们的拉曼信号在紫外激发下得到强烈的增强, 且具有更好的信噪比。CQ 在 244 nm 激发下, 其在 $1\ 636$, $1\ 557$, $1\ 487$ 和 $1\ 420\ \text{cm}^{-1}$ 处出现拉曼特征峰, 在 257 nm 激发下, 除了同样存在上述四个特征峰外, 还额外出现了 $1\ 614$ 和 $1\ 596\ \text{cm}^{-1}$ 两个特征峰。MQ 在 257 和 244 nm 激发下出现的现象格外一致, 其特征峰则是出现在 $1\ 619$, $1\ 585$, $1\ 475$ 和 $1\ 433\ \text{cm}^{-1}$ 附近。

综上所述, RRS 在紫外与可见光范围内对粒子检测非常有效。不仅仅体现在样品拉曼强度的增强, 而且对样品物质的定性与定量研究提供了有效的科学检测手段。

7 共振拉曼光谱新技术

液芯光纤共振拉曼散射(liquid-core optical fiber resonance Raman spectroscopy, LCOF-RRS)可以有效提高拉曼光谱强度, 因此可以检测低浓度样品的拉曼光谱, 并识别出痕量和超痕量物质。基于液芯光纤的共振拉曼散射(LCOF-RRS)能够提高拉曼强度 10^9 倍, 该技术已被用来测量 CS_2 (二硫化碳)中浓度在 $10^{-7} \sim 10^{-16}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的 β -胡萝卜素^[57]。

透射共振拉曼(transmission resonance Raman spectroscopy, TRRS)光谱技术将透射与共振增强的拉曼散射结合起来。一方面, 透射测量由于低荧光背景存在而提高了信噪比, 另一方面, 由于激发光的共振特性使得分析灵敏度得到增强。即将增加信噪比与增强的分析灵敏度相结合。TRRS 被用于直接测量, 无需任何样品制备。TRRS 通常应用在与营养相关的植物化学物质如类黄酮、类胡萝卜素和葡萄糖酸盐等^[58]的检测分析中。

表面增强共振拉曼光谱(surface enhanced resonance Raman spectroscopy, SERRS)的检测限能够达到 $10^{-15}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可以在极低的检测范围内显示超高灵敏度并获得更大的信号增强^[59]。SERRS 可以检测 DNA 中扩增的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和一系列不能通过 PCR 检测到的双链 DNA 分子序列, 并能提供法医和考古学领域由于 DNA 损伤而无法获取的信息^[60]。SERRS 技术也用于研究癌症分子问题^[61]。

时间分辨共振拉曼光谱(time-resolved resonance Raman spectroscopy, TRRRS)可以直接描述和量化三态激发的特性和基态的损失。通过 TRRRS 技术可以证明分子间单态裂变, TRRRS 用于区分和量化激发物种。大量的样品可以在 415, 551 和 473 nm 激发下产生 TRRRS 效应^[62]。

Liu 等^[63]基于超连续谱激光器和可调谐滤光片, 实现了在单光栅拉曼系统中进行了可调谐共振拉曼轮廓的测量。该共振拉曼光谱测量系统可实现有效杂散光过滤低至 $200\ \text{cm}^{-1}$, 用于在 400~1 000 nm 范围内的共振拉曼分布测量。由于双层转角石墨烯在 550~700 nm 存在吸收峰, 将该可调谐共振拉曼系统的激发波长调至 620 nm, 发现双层转角石墨烯样品的 G 模式强度在该激发下得到强烈的共振增强。即此系统的优异性能和灵活的可调谐能力通过在双层转角石墨烯 G 模的共振拉曼轮廓的测量中得到了验证。该系统不仅可以获得波长连续可调的稳定输出的单色光, 并且利用可调谐边带滤光片的截止边带可调的特点, 降低了共振拉曼轮廓谱测量对于仪器的要求, 使其可以在商业化的单光栅拉曼光谱仪中得以实现, 并且具有结构简单、操作简便、透过率高、光路布置合理和便于扩展的优点, 进一步推动了共振拉曼光谱研究的应用前景。

8 结 论

近年来的科研及实际应用中, 共振拉曼光谱的应用范围

变得更加广泛。本文综述了目前使用的共振拉曼光谱技术在分子检测分析中的特征和应用。与常规的拉曼光谱相比,共振拉曼光谱(RRS)可以更好地检测生物组织中的分子振动信息,而无需添加标记或对比增强剂。还可以检测到一些因信号太弱而不被常规拉曼光谱激活的分子振动。本文综述了共振拉曼光谱技术在色素检测、疾病检测、生物分子检测、生物分子的拉曼探针检测以及爆炸物检测中的实际应用。并且总结了各应用领域所测样品分子在相应的共振条件下产生共

振拉曼效应的具体激发和峰位,有利于科研人员更加清楚地了解这些分子的共振拉曼特征,使得他们在对不同领域样品进行研究时能够准确地采用合适的激发光源,从而获得最佳的光谱数据采集效果,便于对待测样品进行较准确的定量和定性分析,继而达到研究目的。随着科学技术的不断进步,共振拉曼光谱技术将会在更多领域,包括艺术品和考古学、地质学、药学等领域得到广泛应用。

References

- [1] Ermakov I V, Gellermann W. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2010, 504(1): 40.
- [2] Kish E, Wang K, Iliaia C, et al. *Biochimica Biophysica Acta*, 2016, 1857(9): 1490.
- [3] Rimai L, Heyde M E, Gill D. *Journal of the American Chemical Society*, 1973, 95(14): 4493.
- [4] Ibarrondo I, Prietotaboada N, Martínezarkarazo I, et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2016, 23(7): 6390.
- [5] Tintchev F, Kuhlmann U, Wackerbarth H, et al. *Food Chemistry*, 2009, 112(2): 482.
- [6] Ruban A, Pascal A A, Robert B. *FEBS Letters*, 2000, 477(3): 181.
- [7] Okada K, Nishizawa E, Fujimoto Y, et al. *Applied Spectroscopy*, 1992, 46(3): 518.
- [8] Pascal A A, Caron L, Rousseau B, et al. *Biochemistry*, 1998, 37(8): 2450.
- [9] Londero P, Lombardi J R, Leona M. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2013, 44(1): 131.
- [10] Jensen L, Schatz G C. *Journal of Physical Chemistry A*, 2006, 110(18): 5973.
- [11] Alfano R R, Tang G, Pradhan A, et al. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 1987, 23(10): 1806.
- [12] Liu C H, Zhou Y, Sun Y, et al. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2013, 12(4): 371.
- [13] Sriramoju V, Boydstonwhite S, Zhang C, et al. *Optical Biopsy XV: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis*, 2017, 60: 100601B.
- [14] Zhou Y, Liu C H, Sun Y, et al. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(11): 116021.
- [15] Köhler M, Machill S, Salzer R, et al. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(5): 1513.
- [16] Gonchukov S, Sukhinina A, Bakhmutov D, et al. *Laser Physics Letters*, 2013, 10(7): 075610.
- [17] Rd A J, Nalla R K, Balooch G, et al. *Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research*, 2010, 21(12): 1879.
- [18] Chen Q M, Xie Y F, Xi J Z, et al. *Food Chemistry*, 2018, 243: 58.
- [19] Harz M, Claus R A, Bockmeyer C L, et al. *Biopolymers*, 2006, 82(4): 317.
- [20] Harz M, Bockmeyer C L, Rösch P, et al. *Medical Laser Application*, 2007, 22(2): 87.
- [21] Mak P J, Kaluka D, Manyumwa M E, et al. *Biopolymers*, 2010, 89(11): 1045.
- [22] Wells A V, Li P, Champion P M, et al. *Biochemistry*, 1992, 31(18): 4384.
- [23] Tosha T, Kagawa N M, Waterman M, et al. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(7): 3708.
- [24] Chi Z, Chen X G, Holtz J S W, et al. *Biochemistry*, 1998, 37(9): 2854.
- [25] Arzhantsev S, Vilker V, Kauffman J. *Applied Spectroscopy*, 2012, 66(11): 1262.
- [26] Huang C Y, Balakrishnan G, Spiro T G. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37(1-3): 277.
- [27] Jr G J T. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, 1999, 28(28): 1.
- [28] Ahmed Z, Beta I A, Mikhonin A V, et al. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(31): 10943.
- [29] Wen Z Q, Overman S A, Jr T G. *Biochemistry*, 1997, 36(25): 7810.
- [30] Laigle A, Amirand C, Sureau F, et al. *Applied Spectroscopy*, 1990, 44(6): 1047.
- [31] Harz M, Krause M, Bartels T, et al. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(4): 1080.
- [32] Ramser K, Logg K, Enger J, et al. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, 9(3): 593.
- [33] Spiro T G, Streckas T C. *Journal of the American Chemical Society*, 1974, 5(14): 338.
- [34] Ioannou A, Pinakoulaki E, Ioannou A, et al. *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1152: 257.
- [35] Hamada K, Fujita K, Smith N I, et al. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(4): 044027.
- [36] Li Y, Heo J, Lim C K, et al. *Biomaterials*, 2015, 53: 25.
- [37] Kuzmin A N, Pliss A, Lim C K, et al. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28483.
- [38] Emmons E D, Tripathi A, Guicheteau J A, et al. *Journal of Physical Chemistry A*, 2013, 117(20): 4158.
- [39] And Y A G, Gupta Y M. *Journal of Physical Chemistry A*, 2001, 105(25): 6197.
- [40] Waterland MR, Kelley A M. *Journal of Chemical Physics*, 2000, 113(16): 6760.

- [41] Waterland M R, Stockwell D, Kelley A M. *Journal of Chemical Physics*, 2001, 114(14): 6249.
- [42] Lewis M L, Lewis I R, Griffiths P R. *Vibrational Spectroscopy*, 2005, 38(1-2): 17.
- [43] Moore D S, Lee K Y, Hagelberg S I. *Journal of Energetic Materials*, 2007, 26(1): 70.
- [44] Tuschel D D, Mikhonin A V, Lemoff B E, et al. *Applied Spectroscopy*, 2010, 64(4): 425.
- [45] Yellampelle B, Asher S, Lemoff B. *Proc. of SPIE*, 2011, 8018(1): 801819.
- [46] Wang L, Hall W K. *Journal of Catalysis*, 1982, 77(1): 232.
- [47] Xiong G, Li C, Feng Z, et al. *Journal of Catalysis*, 1999, 186(1): 234.
- [48] Frey G L, Tenne R, Matthews M J, et al. *Phys. Rev. B*, 1999, 60(60).
- [49] Élodie B, Afanasiev P, Berhault G, et al. *Comptes Rendus-Chimie*, 2016, 19(10): 1310.
- [50] Bayazit M K, Coleman K S. *Chemistry An Asian Journal*, 2012, 7(12): 2925.
- [51] Kazaoui S, Minami N, Kataura H, et al. *Synthetic Metals*, 2001, 121(1): 1201.
- [52] Bayazit M K, Clarke L S, Coleman K S, et al. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(44): 15814.
- [53] Laing S, Hernandezsantana A, Sassmannshausen J, et al. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(1): 297.
- [54] Liu X, Chao D, Zhang Q, et al. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15665.
- [55] Pan Z, Chou I, Burruss R. *Green Chemistry*, 2009, 11(8): 1105~.
- [56] Frosch T, Yan D, Popp J. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(13): 6264.
- [57] Yin J H, Xiao Z Y, Li Z W. *Vibrational Spectroscopy*, 2012, 62: 7.
- [58] González A G, Martínez N, Telle H H, et al. *Chemical Physics Letters*, 2013, 559(7): 26.
- [59] Yin Y, Li Q, Ma S, et al. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(3): 1551.
- [60] Feuillie C, Merheb M M, Gillet B, et al. *Plos One*, 2014, 9(12): 0114148.
- [61] Harmsen S, Wall M A, Huang R, et al. *Nature Protocols*, 2017, 12(7): 1400.
- [62] Wang C, Tauber M J. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(40): 13988.
- [63] Liu X L, Liu H N, Tan P H. *Review of Scientific Instruments*, 2017, 88(8): 083114.

A Review of Applications of Resonance Raman Spectroscopy

XU Bing-bing, JIN Shang-zhong*, JIANG Li, LIANG Pei

Institute of Optical and Electronic Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

Abstract Raman spectroscopy is a powerful tool for providing information about material structure, but its application scope is limited due to its weak Raman scattering signal and low sensitivity. However, in resonant Raman spectroscopy (RRS), the absorption intensity of the incident light by the molecule is greatly increased due to the frequency of the excitation light source falls within one electron absorption band of the molecule and the transition to the electron excited state of molecule becomes a resonance absorption after absorbing photons. RRS can increase the signal intensity by a factor of 10^6 compared to conventional Raman spectroscopy. Therefore, it is more widely applied with its higher sensitivity and selectivity, especially in the fields of biology and medicine. For instance: (1) Analysis of pigments such as carotenoid and chlorophyll et al. in biological matrices; (2) Researches on organic substances such as cells, proteins, and DNA, as well as the diagnosis of some clinical diseases. RRS can obtain more important information of molecular structure which is hidden in normal Raman spectroscopy. RRS can be achieved at very low concentration, and the Raman lines with resonance Raman enhancement belong to the group that can generate electron absorption, which is crucial to coloured substance and biological samples. The active sites of many of these samples are close to the chromophore groups, and the object of research is often one part of biological macromolecules, so RRS plays an important role in researching the relationship of the structure and function of biological substances. In recent years, RRS has been innovated and extended such as the application of new technologies of Liquid-core optical fiber Resonance Raman spectroscopy and Transmission Resonance Raman spectroscopy with the development of spectroscopy. This view summarizes and analyzes the raw paper, data and main viewpoint of RRS technology applications in recent years. It introduced the historical background and research status of RRS, and carried out a detailed overview of the application of resonance Raman spectroscopy in the fields of pigment detection, biology detection and explosive detection as well as the development and application of relevant new technology. RRS will have an irreplaceable position in the field of scientific research field with the rapid development of spectroscopy technology.

Keywords Resonance Raman spectroscopy; Pigment detection; Biology detection; Explosive detection

* Corresponding author

(Received Apr. 26, 2018; accepted Aug. 17, 2018)