

基于空间外差的三叶草拉曼特征光谱测量实验研究

王新强^{1,3}, 葛浩然^{1,3}, 熊伟², 叶松^{1,3}, 王方原^{1,3}, 甘永莹^{1,3}, 汪杰君^{1,3}, 李树^{1,3*}

1. 桂林电子科技大学, 广西 桂林 541004
2. 中国科学院安徽光学精密机械研究所通用光学定标与表征技术重点实验室, 安徽 合肥 230031
3. 广西光电信息处理重点实验室, 广西 桂林 541004

摘要 空间外差光谱技术凭借超高光谱分辨率、高通量、瞬态探测、无运动部件等优势, 在星际暗物质及大气微量气体成分等微弱光谱信号检测方面得到广泛应用。为了探索一种基于空间外差光谱技术实现物质拉曼光谱(RS)快速、直接检测的可行性, 选择三叶草作为测量对象, 使用一体化 HEP-765-S 空间外差光谱系统作为拉曼特征光谱探测器, 配合特定波长激光器搭建系统, 开展拉曼特征光谱直接测量实验。首先使用 Gaussview6.0 构建三叶草所含主要色素: 叶绿素 a、叶绿素 b、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的分子结构, 然后利用 Gaussian16 获取优化的仿真 RS, 分析四种色素最强拉曼谱峰的波段范围, 确定四种成分的信号特征波段为 $1\ 537\sim 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 。根据激发光源与拉曼位移的理论关系, 结合探测系统 $759\sim 769\ \text{nm}$ 的检测波段范围, 计算出用波长 $680\ \text{nm}$ 的激光器作为光源激发拉曼信号, 可保证四种色素特征拉曼信号正好落在探测范围, 且可避开光源瑞利散射光及荧光干扰的影响。最终购置中心波长为 $680.28\ \text{nm}$ 的激光器与 HEP-765-S 空间外差光谱系统搭配开展三叶草强峰拉曼信号的直接检测实验。实验结果表明: 搭建系统能够实现三叶草 RS 的直接测量, 但是所测拉曼信号强度偏弱, 这主要是两方面原因造成: (1) 由于所用激光器的输出功率峰值偏小, 约为 $130\ \text{mW}$; (2) 所用 HEP-765-S 空间外差光谱系统为一体化设计仪器, 软硬件系统及参数固化后不能进行调整, 仪器数据采集的最大积分时间偏小, 设定值为 $832\ \text{ms}$ 。光源功率不够大且仪器积分时间小共同导致采集信号偏弱。通过与仿真光谱比较, 实测光谱在使用空间外差系统探测波段与三叶草叶片内四种主要色素拉曼信号叠加的包络基本一致, 中央主峰与两端次峰都符合较好, 实测光谱与仿真光谱具有较好一致性, 说明采用空间外差系统对物质拉曼信号进行快速、直接检测具有可行性。

关键词 空间外差光谱仪; 拉曼光谱; Gaussian 仿真; 三叶草

中图分类号: O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)07-2110-06

引言

拉曼光谱(Raman spectroscopy, RS)一直以来都备受重视, 因为不同物质的 RS 都能显示其不同的特征, 例如物质的分子结构、振动归属、结晶度等信息^[1]。RS 在材料、地质探测、血液分析、深海环境等应用广泛^[2-4]。目前关于 RS 最新研究: 用 RS 分析法鉴定生咖啡豆的基因型、识别咖啡豆感官质量的化学变化^[5]; 用 RS 快速筛选技术对受污染玉米中的玉米赤霉烯酮进行研究^[6]; 连续石油焦的 RS 表征对焦炭形态的定量评估^[7]; 用激光闪光 RS 法表征单个纳米粒子

的比热^[8]等。

由于拉曼信号较弱, 提取比较困难, 所以常用的方法是对样品进行表面增强处理, 比较繁琐。近年来, 人们不断尝试用高分辨率的空间外差光谱仪(spatial heterodyne spectrometer, SHS)来探测 RS。2018 年 Allen 等使用远程 LIBS 和拉曼 SHS 在 $10\ \text{m}$ 距离处测量各种样品^[9]; 2018 年 Qiu 等用阶梯镜结构开发空间外差拉曼光谱仪(spatial heterodyne Raman spectrometer, SHRS), 并测量了岩石的 RS^[10]; 2017 年 Hu 等利用 SHS 对化学战剂模拟物进行 RS 检测^[11]。

三叶草是一种可食用的豆科草本植物, 外形优美, 生命力顽强, 是绿化装饰的佳品。因其在牧草、保健品、医学等

收稿日期: 2019-06-07, 修订日期: 2019-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(41561079), 中国科学院通用光学定标与表征技术重点实验室研究项目, 广西光电信息处理重点实验室基金项目(GD18104, GD18105)资助

作者简介: 王新强, 1977 年生, 桂林电子科技大学正高级实验师 e-mail: xqwang2006@126.com

* 通讯联系人 e-mail: lishu_owen@sina.com

方面的研发价值,近年来人们越来越重视对三叶草的研究。目前主要是研究三叶草的色素含量、活力指数、光合荧光特性等^[12]在其他物质影响下的变化,以及在药用功效:抗炎、愈合伤口等^[13]。而对三叶草 RS 的研究未见报道,加之三叶草便于得到,所以本文选择三叶草进行初步试验,希冀有助于在保健食品、医学等方面的研究工作。

本文搭建了基于 SHS 的 RS 探测系统,不用对样品做复杂处理,能快速、非接触检测拉曼信号。首先介绍 SHRS 检测原理,接着是对三叶草里主要色素进行理论 RS 计算,然后详细说明实验装置与设计,最后测出了三叶草的 RS,将理论 RS 与实测 RS 进行分析对比。结果表明理论 RS 与实测 RS 可以很好的吻合,证明拉曼探测系统的可行性。最后分析了产生误差和实测 RS 强度较弱的原因,在接下来的工作将对测量系统进行改进,进行基于 SHRS 的物质含量定量测试。

1 空间外差拉曼光谱检测原理

RS 是一种散射光谱,光照射到物体会发生能量转移,进而会产生瑞利散射与拉曼散射。若入射与散射光的频率分别为 ω_0 和 ω_1 ,当 $\omega_0 = \omega_1$ 则为弹性散射,即瑞利散射。若光子与分子间的能量相互传递, ω_0 会产生变化,则为非弹性散射。若 $h\omega_0 - h\omega_1 = h\Delta\omega$, $\Delta\omega$ 的变化对应于分子的转动能级差,这一过程称为拉曼散射。可以用能级理论来解释,如图 1 中的红色线和蓝色线都是拉曼散射。

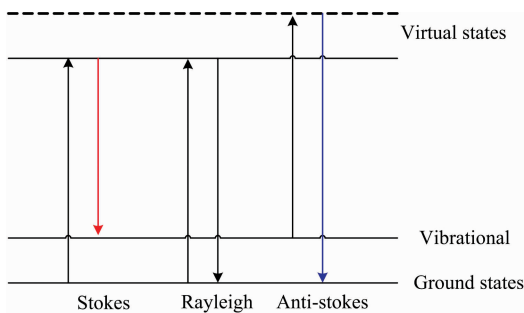


图 1 拉曼散射原理图

Fig. 1 Raman scattering schematic

其中红色的称斯托克斯谱线(Stokes),即 $\omega_0 > \omega_1$

$$\Delta E = h\omega_0 - h\omega_1 \quad (1)$$

蓝色的又称反 Stokes 谱线(anti-stokes),即 $\omega_0 < \omega_1$

$$\Delta E = h\omega_1 - h\omega_0 \quad (2)$$

通常情况下拉曼信号强度只有瑞利散射光强的千分之一,信号微弱,对于精确探测比较困难。采用 SHS 作为光谱探测器,具有超光谱分辨率、高通量、无运动部件等优点,能在被测物质特征波长中心范围探测,实现微弱光信号的直接测量。检测原理如图 2 所示,样品被激光器照射后,产生拉曼散射光,该散射光经透镜准直,由分束器分成两束相干光,两相干光束分别被光栅 G1, G2 以 θ 角反向衍射回分束器重新合束,两合束光在出射面形成干涉条纹,并由光学成像系统成像在探测器上,最后对干涉数据进行傅里叶变换可

处理出样品的拉曼光谱。由于 SHS 探测波段仅覆盖 RS 强特征光谱范围,故可以避开瑞利散射光影响。

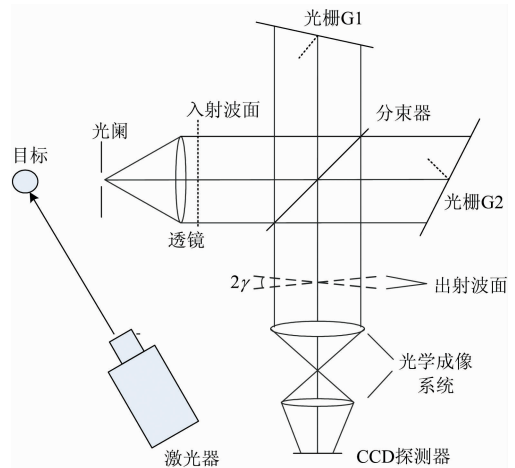


图 2 空间外差拉曼检测原理图

Fig. 2 Space heterodyne Raman detection schematic

2 理论计算部分

SHS 与普通光谱仪相比较,SHS 更像是光谱仪中的放大镜,具有更窄的波段范围和更高的光谱分辨率,其光谱范围一般只有十几或几个纳米,光谱分辨率可达 10^{-4} nm。基于空间外差的 RS 测量系统测量时只针对目标的最强特征峰进行探测,因此获取被测样品 RS 谱峰信息对 SHS 参数设计与搭建具有指导作用。

理论 RS 仿真通过使用 Gaussview6.0 搭建被测物质的分子结构,利用 Gaussian16^[14] 仿真出 RS。三叶草主要的光合色素是叶绿素和类胡萝卜素^[15]。叶绿素包括叶绿素 a 与叶绿素 b,类胡萝卜素由胡萝卜素和叶黄素两大类组成。叶片里类胡萝卜素主要是 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素,所以本文选择仿真叶绿素 a、叶绿素 b、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的 RS。它们含量从文献[13]的含量图可以算出,叶绿素与类胡萝卜素之比大致为 10 : 1。

首先搭建它们的分子结构,从图 3 的优化结构可以看到,叶绿素 a 和叶绿素 b 分子结构的区别在其中一个吡咯环的附加基团上,从图 3(a)和(b)的标注可以看出,分别是甲基与醛基。类胡萝卜素是异戊二烯类化合物, α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素分子结构的差异在于其中一个环己烷上的碳碳双键位置不同,如图 3(c)和(d)的标注所示。然后对搭好的分子构型进行优化,最后进行频率计算。叶绿素分子中 C, H 和 O 元素选用 DFT/B3LYP/6-31 G 基组, Mg 元素选用 Lan12DZ 基组进行频率计算。类胡萝卜素分子选用 DFT/B3LYP/6-31+G(d, p)基组进行频率计算。

优化结构图如图 3 所示,所有分子计算后均没有虚频,说明优化的分子构型很稳定,仿真结果可信。修正^[16]后的 RS 如图 4 所示。从图 4 可以清晰的看出不同谱峰的强度大小,从中选出最强谱峰附近的波段进行探测。图 4(a)为叶绿素 a 的理论 RS,可以看出波数为 1662 cm^{-1} 时强度最大,要测出其附近的四个峰,即实测 $1570 \sim 1747 \text{ cm}^{-1}$ 的波段。图

4(b)是叶绿素 b 的理论 RS, 选择实测 $1\ 580\sim 1\ 744\ \text{cm}^{-1}$ 的峰段, 其中波数为 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 时谱峰最强。图 4(c)是 α -胡萝卜素的理论 RS, 从图中可以看出当频率为 $1\ 697\ \text{cm}^{-1}$ 谱峰最强, 选择测量 $1\ 663\sim 16\ 97\ \text{cm}^{-1}$ RS 波段。图 4(d)是 β -胡萝卜素的理论 RS, 从图中可以看出当频率为 $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 时, 谱峰最强, 选择测量 $1\ 616\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ RS 波段。通过要测的仿真 RS 波段和 SHS 可测的光谱范围, 可以反推出激光器的中心波长, 进而选择合适的激光器, 下面的实验部分会给出具体计算公式。

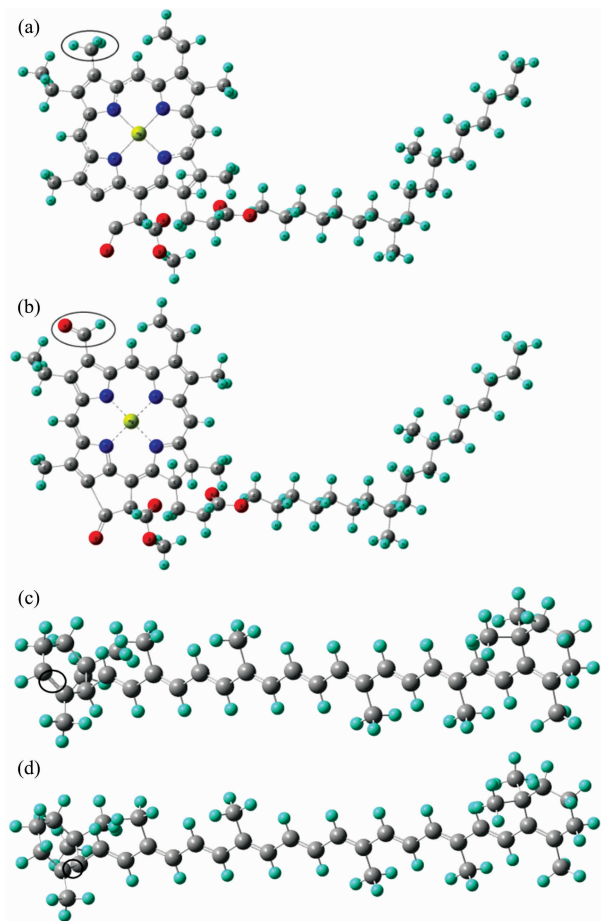


图 3 四种色素分子优化结构图

(a): 叶绿素 a; (b): 叶绿素 b; (c): α -胡萝卜素; (d): β -胡萝卜素

Fig. 3 Optimized structure diagram of four pigment molecules

(a): Chlorophyll a; (b): Chlorophyll b;

(c): α -carotene; (d): β -carotene

3 实验部分

搭建的物质 RS 快速、直接检测系统, 是基于高分辨率的 SHS, 将光谱范围设计在近红外, 可以有效的规避荧光; 由于 SHS 探测波段仅覆盖 RS 强特征光谱范围, 可以避开瑞利散射光。

图 5 为物质 RS 快速、直接检测系统, 系统由空间外差拉曼探测单元与光谱数据提取单元两部分组成, 其中空间外差拉曼探测单元包括激光器、被测物、高分辨率 SHS。光谱

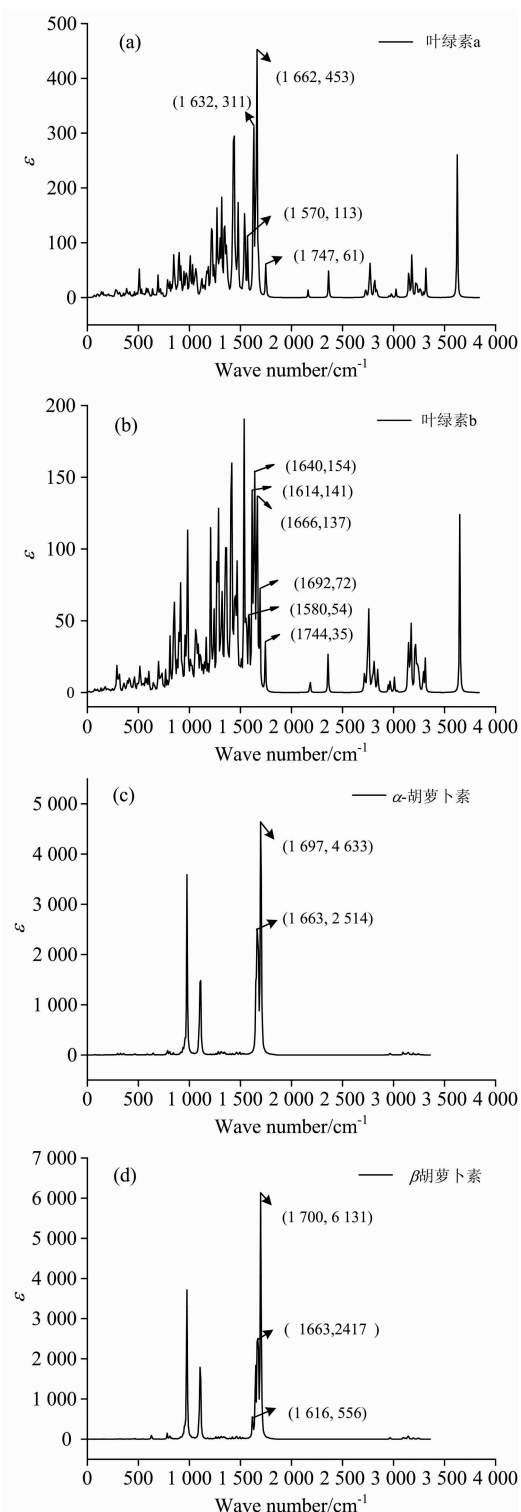


图 4 四种色素理仿真 RS

(a): 叶绿素 a; (b): 叶绿素 b; (c): α -胡萝卜素; (d): β -胡萝卜素

Fig. 4 Four pigment simulation Raman spectroscopy

(a): Chlorophyll a; (b): Chlorophyll b;

(c): α -carotene; (d): β -carotene

数据提取单元由计算机记录干涉图、光谱提取组成。具体的 RS 实测系统如图 6 所示。图 6 中 SHS 是中国科学院安徽光

学精密机械研究所设计的 HEP-765-S, 光谱波段范围为 759 ~ 769 nm, 光谱分辨率优于 0.1 nm, 通光孔径 < 30 nm, CCD 探测器为 CCD47-20AIMO(1 024 × 1 024)。

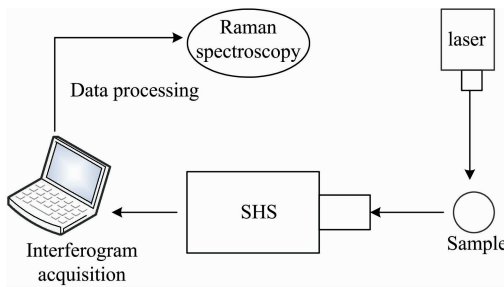


图 5 物质 RS 直接、快速检测系统结构图

Fig. 5 Direct and rapid detection system structure diagram of material RS



图 6 实验检测系统图

Fig. 6 Experimental detection system diagram

根据拉曼散射原理, 若 SHS 的光谱范围为 $\lambda_1 \sim \lambda_2$, 频率为 $\sigma_1 \sim \sigma_2$, 样品的仿真 RS 较强的频率段为 $\sigma_3 \sim \sigma_4$, 则激光器和被测物质的频率之差的绝对值应该落在 SHS 的频率范围 ($\sigma_1 \sim \sigma_2$) 内, 即满足式 (3) 和式 (4)

$$\sigma_4 = | \sigma_0 - \sigma_1 | \quad (3)$$

$$\sigma_3 = | \sigma_0 - \sigma_2 | \quad (4)$$

从图 4 仿真 RS 光谱图可以看出, 叶绿素 a 的较强波段为 $1\ 570 \sim 1\ 747\ \text{cm}^{-1}$, 叶绿素 b 的较强 RS 波段为 $1\ 580 \sim 1\ 744\ \text{cm}^{-1}$, α -胡萝卜素较强 RS 波段为 $1\ 663 \sim 1\ 697\ \text{cm}^{-1}$, β -胡萝卜素较强 RS 波段为 $1\ 616 \sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 。为了测量三叶草 RS 的较强拉曼波段, 需测出 4 种色素的较强波段。利用式 (3) 和式 (4) 反推出激光器的中心波长, 选择中心波长为 680 nm 的激光器较为合适。因此本文采用了中心波长为 680.28 nm 的激光器作为激发光源, 最大功率为 130 mW。

实验前采摘三叶草, 清洗, 晾干。测量时首先将三叶草固定在白板上, 让激光器照射三叶草合适的位置, 确保激光器照射位置位于通光孔径的中心。接着设置采集的积分时间 832 ms, 触发时间 2 s, 在黑暗条件下进行探测。先不开激光器测量背景干涉图, 然后打开激光器测量三叶草干涉图。最后对采集的干涉图进行傅里叶变换, 预处理, 波长定标, 最

终得到三叶草的 RS, 如图 7(a) 所示。激光器的电流强度为 0.75 A, 室内温度为 24 °C。

4 结果与讨论

利用搭建的物质 RS 快速、直接检测系统, 对三叶草进行初步试验, 得到的 RS 如图 7(a) 所示。图 7(b) 是理论仿真光谱图, 按 4 种色素含量的比例, 将光谱强度进行调整, 最后拟合成一个光谱图。对比图 7(a) 和 (b) 可以看出, 三叶草的实测 RS 是叶子内各种色素的叠加包络。仿真图 7(b) 里最左边的谱峰(波数为 $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$) 有上升趋势, 与实验图 7(a) 谱峰上升的位置一致; 仿真图 7(b) 中间波段 ($1\ 620 \sim 1\ 715\ \text{cm}^{-1}$) 的较高的谱峰所形成的包络与实测光谱中间的凸起吻

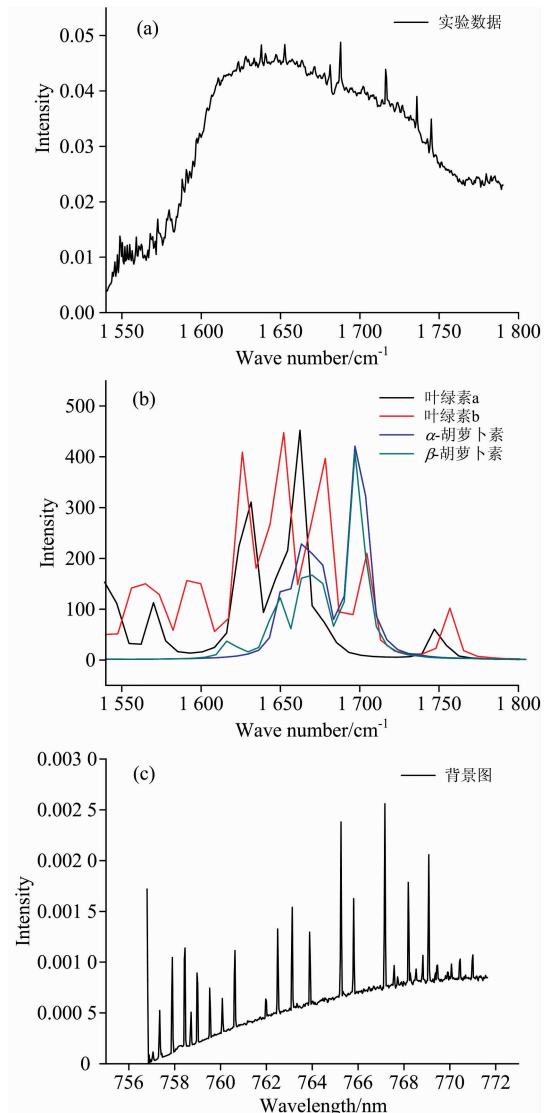


图 7 (a) 实测 RS, (b) 仿真 RS 合成图, (c) 实测的暗背景光谱

Fig. 7 (a) Measured Raman spectrum, (b) Simulated Raman spectrum composite diagram, (c) Measured dark background spectrum

合较好。仿真图 7(b)中最右边 1750 cm^{-1} 的谱峰, 实验图中相对应的位置有明显下降的趋势。通过与仿真光谱比较, 实测光谱在使用空间外差系统探测波段正好是三叶草叶片内主要色素 RS 信号叠加的包络, 中央主峰与两端次峰都符合较好, 实测光谱与仿真光谱具有较好一致性, 说明采用空间外差系统对物质拉曼信号进行直接检测具有可行性。

图 7(c)是实测的仪器暗背景光谱, 在一条缓慢上升的基线上叠加了一系列细脉冲信号, 这主要是由 SHS 探测器的热噪声构成。当系统在探测到目标拉曼信号后, 这些热噪声仍然存在, 但在快速傅里叶变换处理后强度有所减弱, 如图 7(a)中的小尖峰所示。另一方面实测图中拉曼信号强度总体较弱, 这主要是两方面原因造成: 一是由于所用激光器的功率峰值偏小, 约为 130 mW ; 二是所用 HEP-765-S 空间外差光谱系统为一体化设计仪器, 软硬件系统及参数固化后不能进行调整, 仪器数据采集的最大积分时间为 832 ms 。光源功率不够大且仪器积分时间小共同导致采集信号偏弱。

5 结 论

介绍了一种基于 SHS 的 RS 快速、直接探测系统, SHS

可测的光谱范围为 $759\sim 769\text{ nm}$, 搭配不同的激光器, 可以实现同一目标的不同波段 RS 或不同目标的拉曼特征峰探测。利用仿真出的 RS, 得到物质特征光谱, 也为激光器的选择提供依据。初步试验是测量三叶草的 RS, 首先理论计算了三叶草中的主要色素: 叶绿素 a、叶绿素 b、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素理论 RS, 接着根据 SHS 可测的光谱范围和四种色素的理论 RS 较强特征波段, 选择 680.28 nm 的激光器作为激发光源, 最后实测出三叶草的 RS。结果表明实测图与仿真图很吻合, 证明了测量系统的可行性。实验中测量 RS 信号的强度稍弱, 这主要是两方面原因造成: 一是由于所用激光器的输出功率偏小, 约为 130 mW ; 二是由于使用的 SHS 系统积分时间不可调且积分时间短造成。光源功率不够大且仪器积分时间小共同导致采集信号偏弱。后面我们将对测量系统进行改造或重新搭建, 进行基于 SHRS 的物质含量定量测试。

References

- [1] ZHOU Jian, YANG Shi-ying, JIN Gui-min, et al(周 健, 杨世颖, 靳桂民, 等). Herald of Medicine(医药导报), 2019, 38(2): 197.
- [2] Szunerits S, Mermoux M, Crisci A, et al. J Phys. Chem. B, 2006, 110(47): 23888.
- [3] ZHANG Ming, PENG Wen, LAI Zhen-quan, et al(张 铭, 彭 文, 赖珍荃, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2019, 39(3): 797.
- [4] Malard L M, Pimenta M A, Dresselhaus G, et al. Phys. Rep-Rev. Sec. Phys. Lett., 2009, 473(5): 51.
- [5] Figueiredo L P, Borem F M, Almeida M R, et al. Food Chem., 2019, 288: 262.
- [6] Ildiz G O, Kabuk H N, Kaplan E S, et al. J. Mol. Struct., 2019, 1184: 246.
- [7] Chen K, Zhang H R, Ibrahim U K, et al. Fuel, 2019, 246: 60.
- [8] Fan A, Li Q, Ma W, et al. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2019, 19(11): 7004.
- [9] Allen A, Angel S M. Spectroc Acta Pt B-Atom Spectr., 2018, 149: 91.
- [10] Qiu J, Qi X D, Li X T, et al. Optics Express, 2018, 26: 11994.
- [11] Hu G X, Xiong W, Luo H Y, et al. Applied Spectroscopy, 2018, 72(1): 151.
- [12] DONG Chun-yan(董春燕). Journal of West China Forestry Science(西部林业科学), 2018, 47(6): 35.
- [13] Gounden T, Moodley R, Jonnalagadda S B. Anal. Lett., 2019, 52(7): 1165.
- [14] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. Gaussian 16, Revision B. 01. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [15] Abd El-Naby Z M, Hafez W A K, Hashem H A. Afr. J. Range & Forage Sci., 2019, 36(1): 49.
- [16] Halls M D, Velkovski J, Schlegel H B. Theor. Chem. Acc., 2001, 105(6): 413.

Research on Raman Spectroscopy Measurement Method Based on Spatial Heterodyne

WANG Xin-qiang^{1,3}, GE Hao-ran^{1,3}, XIONG Wei², YE Song^{1,3}, WANG Fang-yuan^{1,3}, GAN Yong-ying^{1,3},
WANG Jie-jun^{1,3}, LI Shu^{1,3*}

1. Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China

2. Key Laboratory of Optical Calibration and Characterization, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China

3. Guangxi Key Laboratory of Optoelectronic Information Processing, Guilin 541004, China

Abstract The spatial heterodyne spectroscopy technology has been widely used in the detection of weak spectral signals such as interstellar dark matter and atmospheric trace gas components by virtue of its ultra-high spectral resolution, high through put, transient detection, and no moving parts. In order to study the feasibility of real-time Raman spectroscopy (RS) based on spatial heterodyne spectroscopy, and the integrated spatial heterodyne spectroscopy system HEP-765-S is used as the Raman characteristic spectrum detector. Firstly, Gaussview6.0 was used to construct the molecular structure of the main pigments in clover: chlorophyll a, chlorophyll b, α -carotene and β -carotene. Then Gaussian16 was used to obtain the optimized simulated RS, analyze the band range of the strongest Raman spectrum peaks of the four pigments, and determine the strong signal characteristic bands of the four components were $1\ 537\sim 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$. According to the theoretical relationship between the excitation light source and the Raman displacement, combined with the detection band range of the detection system of $759\sim 769\ \text{nm}$. It is calculated that the laser with the wavelength of $680\ \text{nm}$ can be used as the light source to stimulate the Raman signal, which can ensure that the Raman signals with the strong characteristic of four pigments fall within the detection range, and avoid the influence of Rayleigh scattering light and fluorescence interference of the light source. Finally, a laser with a central wavelength of $680.28\ \text{nm}$ and space heterodyne spectrum system HEP-765-S were purchased to conduct the direct detection experiment of clover strong peak Raman signal. The results show that the system can directly measure the RS of clover, but the measured Raman signal strength is weak, which is mainly caused by two reasons: one is that the peak power of the laser used is relatively small. Second, the space heterodyne spectrum system HEP-765-S is an integrated design instrument. The software and hardware system and parameters cannot be adjusted after curing, and the maximum integral time of instrument data collection is $832\ \text{ms}$. The acquisition signal is weak due to the insufficient power of the light source and the small instrument integral. Compared with the simulated spectrum, the measured spectrum in the detection band of the spatial heterodyne system is basically consistent with the envelope superimposed by Raman signals of four main pigments in clover leaves. The main peak ends with time are in line with the good, the measured spectra and simulation spectrum has a good consistency, using the spatial heterodyne system for material Raman signal is quick, direct detection is feasible.

Keywords Spatial heterodyne detection system; Raman spectroscopy; Gaussian calculation; Clover

(Received Jun. 7, 2019; accepted Oct. 16, 2019)

* Corresponding author