

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АЭРОКОСМИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ имени академика С.П. КОРОЛЕВА  
(НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)» (СГАУ)

## СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

*Рекомендовано редакционно-издательским советом федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королева (национальный исследовательский университет)» в качестве методических указаний (электронный ресурс)*

САМАРА  
Издательство СГАУ  
2015

УДК 621.375.8 (075)

ББК 22344я7

Составитель ***В.Н. Гришанов***

Рецензент канд. техн. наук, доц. В. Г. Н и к и т и н

**Спектроскопия комбинационного рассеяния в медицинской диагностике [Электронный ресурс]** : электрон. метод. указания / *сост.: В.Н. Гришанов.* – Электрон. текстовые и граф. данные (0,23 Мб). – Самара: Изд-во СГАУ, 2015. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

Приведены краткие сведения о спектроскопии комбинационного рассеяния и её применении в диагностике заболеваний, фармации и экологии. Основным содержанием указаний являются методики экспериментального получения спектров комбинационного рассеяния и их интерпретации.

Предназначены для использования при проведении лабораторных работ по дисциплинам «Лазерные диагностические системы», «Лазерная медицина», «Лазерные когерентные системы обработки информации», «Волоконная оптика», «Волоконно-оптические преобразователи информации», «Проектирование лазерных систем» со студентами, обучающимися по направлениям 201000.68 и 12.04.04.68 Биотехнические системы и технологии, 200500.62 Лазерная техника и лазерные технологии, курсовом и дипломном проектировании.

Подготовлены на кафедре лазерных и биотехнических систем.

УДК 621.375.8 (075)

ББК 22344я7

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
1. Краткая теория комбинационного рассеяния света.....	9
2. Примеры использования спектроскопии комбинационного рассеяния в медицинской диагностике, фармации и экологии .....	22
3. Техника спектроскопии комбинационного рассеяния .....	30
4. Методика выполнения экспериментов.....	39
Контрольные вопросы.....	40
Задания .....	41
Список библиографических источников .....	42

## ВВЕДЕНИЕ

Цель настоящей работы – освоение методов экспериментального исследования спектров комбинационного рассеяния и их интерпретации.

Анализ современных тенденций развития новейших методов диагностики и лечения в медицине показывает, что в подавляющем большинстве случаев на первое место сегодня выходят методы, минимизирующие инвазивность, фармахимизм и другие экологически и физиологически нежелательные воздействия на организм пациента. Кроме того, рост численности населения и его заболеваемости во всем мире увеличивает нагрузку на медицинский персонал клиник и выдвигает на первое место медицинские технологии, обладающие максимальным эффектом при минимальных затратах времени.

Этим требованиям в полной мере отвечают новейшие лазерные клинические методы диагностики, в том числе, спектроскопия комбинационного рассеяния. Её преимущества очевидны: отсутствие вредных ионизирующих излучений и медикаментозного воздействия на организм, отсутствие противопоказаний у большинства пациентов, неинвазивность, бесконтактность, асептичность, высокая информативность и т.д. Более того, с точки зрения эффективности вложения средств, этот метод полностью подпадает под определение так называемых прорывных технологий (*break through technology*), способных в очень короткое время при минимальных финансовых затратах обеспечить резкий качественный скачок на новый технологический уровень в той или иной области.

*Методы комбинационного рассеяния света* (КРС) дают возможность получить индивидуальный спектральный отпечаток, уникальный по отношению к рассматриваемой молекуле или целой молекулярной структуре. Преимущества, связанные со специфической природой метода, делают спектрометрию КРС мощным средством анализа и мониторинга химического состава. Каждое соединение имеет свой уникальный спектр КРС. В зависимости от применяемой аппаратуры, эта техника может быть использована для анализа твердых ве-

ществ, растворов, а также предоставлять информацию о физических характеристиках исследуемой среды, таких как кристаллическая решетка, ориентация, полиморфные формы и т.д.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения более 50% лекарств, продаваемых через Интернет фирмами, скрывающими свое местонахождение, являются контрафактными, также как и около 30% лекарств, продающихся в развивающихся странах. Для легальных производителей лекарств это означает потерю прибыли, а также возможность предъявления претензий со стороны лиц, пострадавших от подделок.

Существует три основных разновидности контрафактных фармацевтических товаров: а) искаженный активный фармацевтический ингредиент или полиморфная форма; б) корректный активный фармацевтический ингредиент, но некорректный наполнитель; в) переупакованные просроченные лекарственные средства. Следствием фармацевтического контрафакта может быть отсутствие эффекта при приеме таблетки от головной боли. Но если контрафактные лекарства применяются для лечения серьезных болезней, таких как малярия или СПИД, результат может иметь фатальный исход.

Применяемый в последние годы в спектроскопии КРС метод «пространственного сдвига», представляющий собой разработку на базе классического метода, особенно полезен для идентификации контрафактных лекарств, так как позволяет легко идентифицировать химические соединения через упаковку.

Методы КРС применяются для однозначного определения молекулярной структуры взрывчатых веществ.

*Лидарные системы или лидары* – это лазерные локационные оптоэлектронные системы активного типа, предназначенные для дистанционного зондирования окружающей среды лазерным излучением с целью получения информации для решения научных, метеорологических, производственных и экологических задач. Действие лидаров основано на таких специфических свойствах лазерного излучения как высокая плотность мощности, квазимонохроматичность, направленность и малая длительность импульсов и таких физических

процессах как упругое молекулярное и аэрозольное рассеяние, неупругое резонансное и комбинационное рассеяние, флуоресценция и поглощение лазерного излучения при его взаимодействии с атомами, молекулами и частицами вещества. Этим физическим процессам соответствуют методы лазерного дистанционного зондирования – метод комбинационного рассеяния, метод индуцированной флуоресценции и т.д. При распространении зондирующего лазерного излучения от передающего устройства лидара в исследуемой среде образуется лазерный «след» за счет указанных физических процессов, и возникает вторичное оптическое излучение, которое как лазерный локационный эхо-сигнал поступает на приемное устройство, где регистрируется с помощью высокочувствительного приемника оптического излучения и подвергается обработке по определенным правилам с целью получения данных о нужных параметрах исследуемой среды.

Комбинационное рассеяние можно рассматривать как неупругий процесс, при котором лазерное излучение вызывает переход молекулы на виртуальный уровень с последующим мгновенным ( $<10^{-14}$  с) излучением на длине волны, отличной от лазерной. Разность энергий падающего и испущенного фотонов является характеристикой, рассеивающей молекулы, и обычно соответствует изменению колебательного квантового числа на единицу. К сожалению, из-за незначительной величины сечений комбинационного рассеяния чувствительность этого метода весьма ограничена. Поэтому наиболее вероятным представляется применение комбинационного рассеяния для дистанционного контроля газодымовых шлейфов труб, концентрации составляющих в которых могут быть довольно высокими:  $10 - 100$  млн<sup>-1</sup> по сравнению со значениями  $0,1 - 5$  млн<sup>-1</sup>, типичными для малых составляющих, рассеянных в атмосфере.

Исследование состояния земной биосферы является важным источником информации для решения не только текущих социально-экономических задач, но и проблем устойчивого развития цивилизации в целом. Эффективность прогноза климатических и экологических изменений достигается при реализации достаточно полного мониторинга с учетом всех естественных и антропогенных

факторов, влияющих на окружающую среду. Учет источников загрязнения атмосферного воздуха и инвентаризация выбросов осуществляются во многих странах мира, в том числе и в России.

На территории России, как известно, насчитывается около 100000 опасных производств и объектов, из которых особую опасность представляют 1500 ядерных и 3000 химических и биологических объектов. В нефтяной и газовой промышленности стран СНГ эксплуатируются более 200000 км магистральных газопроводов, 65000 км магистральных нефтепроводов, более 6000 км продуктопроводов и более 300000 км промысловых трубопроводов различного назначения. При этом 2/3 магистральных трубопроводов имеют возраст более 25 лет. На трубопроводном транспорте нефти и газа ежегодно происходит более 100 крупных аварий.

Лидарные исследования позволяют оценивать выделение веществ техногенного и природного происхождения, их распространение и поглощение во всей земной биосфере, проводить оперативное дистанционное определение локальных концентраций вредных и взрывоопасных конденсированных и газообразных примесей в атмосфере, на поверхности земли и воды, в том числе обнаружение утечек из нефте- и газопроводов. Лазерное зондирование – наиболее современный метод исследования параметров составляющих земной биосферы, которые дистанционно в принципе не могут быть измерены другими методами. К преимуществам лидарного метода по сравнению с традиционными, например физико-химическими, относятся дистанционность, бесконтактность, возможность непрерывного площадного и профильного сканирования с одновременным определением широкого набора химических элементов и соединений, а также высокую скорость детектирования. Важно также, что лидарные комплексы осуществляют оперативное зондирование биосферы без деструктивных воздействий на нее.

Для измерения содержания газообразных примесей и конденсированных веществ в окружающей среде в основном используются метод дифференциального поглощения (ДП) и метод спонтанного КРС, или рамановский. Лидары,

построенные на методе ДП, работают в ИК диапазоне (в окнах прозрачности атмосферы), а метод КРС наиболее чувствителен в УФ области.

Метод СКР обладает следующими достоинствами:

- возможность при зондировании одним лазером одновременно регистрировать широкий набор и непосредственно измерять абсолютные значения концентраций химических веществ – газовых компонентов, жидкостей и аэрозолей – без изменения состава и режима аппаратуры;

- чрезвычайно высокая чувствительность к спектральным отличительным признакам различных покрытий и материалов, поэтому метод КРС особенно эффективен при обнаружении малоконтрастных объектов. Эффективность метода может быть усилена за счет дополнительной селекции целей по отрицательному контрасту «объект–фон»;

- возможность использования метода КРС как в ночных, так и дневных условиях из-за отсутствия солнечных помех при использовании ультрафиолетовой «солнечно-слепой» области спектра ( $\lambda \leq 300$  нм);

- возможность непосредственно измерять абсолютную концентрацию газовых составляющих атмосферы, так как в качестве репера служит концентрация азота;

- более высокая надежность и менее жесткие условия эксплуатации, в частности, в КРС-лидарах не требуются лазеры с точной настройкой и стабилизацией длины волны, охлаждаемые фотоприёмные устройства;

- легкая перестраиваемость схемы для регистрации флуоресценции обнаруживаемых веществ без изменения структурных элементов.



# 1. КРАТКАЯ ТЕОРИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Комбинационное рассеяние света (КРС) было открыто в 1928 г. Г.С. Ландсбергом и Л.И. Мандельштамом при исследовании рассеяния света в кристаллах и одновременно Ч.В. Раманом и К.С. Кришнаном при исследовании рассеяния света в жидкостях. Комбинационное рассеяние света (рамановское рассеяние) – неупругое рассеяние оптического излучения на молекулах вещества (твёрдого, жидкого или газообразного), сопровождающееся заметным изменением частоты излучения. В отличие от рэлеевского рассеяния, в случае комбинационного рассеяния света в спектре рассеянного излучения появляются спектральные линии, которых нет в спектре первичного (возбуждающего) света. Число и расположение появившихся линий определяется молекулярным строением вещества.

Применение лазеров позволило снять многие трудности, существовавшие при исследовании КРС. В частности, за счет большой спектральной яркости лазеров на несколько порядков были уменьшены времена экспозиции, необходимые для регистрации спектров, упрощены геометрические схемы экспериментов, улучшены условия для проведения температурных и поляризационных экспериментов, уменьшен фон мешающих линий и т.д. Доступными для исследования оказались новые типы объектов, в частности разнообразные кристаллы: диэлектрики, полупроводники и даже металлы. Открылись возможности для анализа дефектности материалов, влияния различных возмущающих факторов (электрического и магнитного полей, давления,  $\gamma$ -облучения и т.д.), для исследования неоднородностей в кристаллах, изучения сплавов, тонких пленок, поверхности и т. д.

Комбинационное рассеяние света можно рассматривать как процесс, состоящий из двух связанных актов – поглощения кванта  $h\nu$  первичного света частоты  $\nu$  и испускания кванта  $h\nu'$  частоты  $\nu'$ . В отличие от люминесценции при КРС система под действием кванта с энергией  $h\nu$  не переходит в возбуж-

дѐнное электронное состояние даже на очень короткое время. Поэтому энергия  $h\nu$  первичного кванта может быть значительно меньше энергии  $h\nu'$  кванта, способного перевести молекулу из основного электронного состояния  $E_{э0}$  в возбуждѐнное электронное состояние  $E_{э1}$ . В процессе комбинационного рассеяния квант света  $h\nu$  воздействует на электронную систему молекулы, передавая ей (или принимая от неё) часть энергии, причѐм молекула переходит в другое колебательное состояние, а рассеянный ею квант имеет изменѐнную энергию  $h\nu' \neq h\nu$ .

Интенсивности спектральных линий, возникающих при КРС, очень малы и при обычных методах наблюдения составляют  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  Вт, причѐм интенсивность антистоксовых линий значительно меньше, чем стоксовых. Схема переходов при комбинационном рассеянии света со стоксовой и антистоксовой компонентами представлена на рис. 1.1.

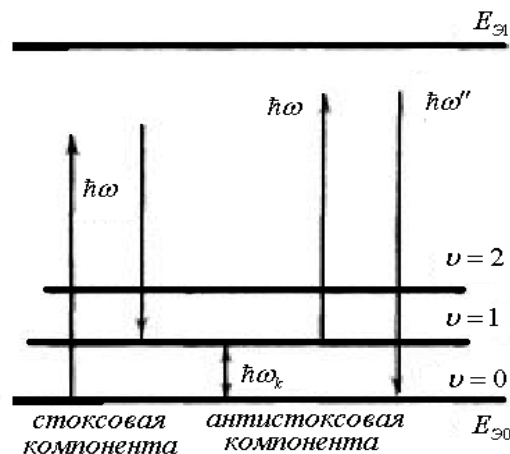


Рис. 1.1. Схема переходов при комбинационном рассеянии света

Соотношение между энергиями падающего и рассеянного фотонов для стоксовой компоненты имеет вид:

$$\hbar\omega' = \hbar\omega - \hbar\omega_k, \quad (1.1)$$

где  $\omega_k$  – частота колебательного или вращательного переходов рассеивающих молекул, а для антистоксовой компоненты имеет вид:

$$\hbar\omega'' = \hbar\omega + \hbar\omega_k . \quad (1.2)$$

Величина  $\hbar\omega_k$  представляет собой энергию возбуждённого колебательного (или вращательного) состояния молекулы. Комбинационные линии располагаются симметрично относительно несмещённой (рэлеевской) линии, частота которой совпадает с частотой возбуждающего света  $\omega$ . Частота каждой из компонент представляет собой комбинацию частоты возбуждающего света и частоты колебательного или вращательного переходов  $\omega_k$  рассеивающих молекул. Каждой компоненте с частотой  $\omega - \omega_k$  (красные сателлиты, или стоксовы линии) соответствует компонента с частотой  $\omega + \omega_k$  (фиолетовые сателлиты, или антистоксовы линии).

Теория КРС – часть общей теории взаимодействия электромагнитного излучения с веществом. Классическая теория КРС на отдельных молекулах основана на трёх положениях: молекулы рассеивают свет вследствие колебаний дипольного момента молекулы, индуцируемого полем падающей световой волны; свет видимой и ближней УФ областей спектра рассеивается в основном электронной оболочкой молекулы; возникает комбинационное рассеяние в результате электронно-колебательного взаимодействия в молекуле. КРС можно рассматривать как результат модуляции индуцированного дипольного момента колебаниями ядер.

Характер связи электронного и колебательного движения в классической теории может быть рассмотрен лишь феноменологически. Величина электрического поля падающей электромагнитной волны представляет собой косинусоиду:

$$E = E_0 \cos \omega t , \quad (1.3)$$

где  $E_0$  – амплитуда напряженности поля световой волны,  $\omega$  – частота колебаний в падающей световой волне. Поляризуемость молекулы  $\alpha$  зависит от межъядерного расстояния в данный момент времени, т.е. является функцией колебательной координаты  $q_i$   $i$ -го колебания:

$$\alpha = \alpha(q_i). \quad (1.4)$$

Разложив эту функцию в ряд по степеням  $q_i$  в окрестности равновесного значения координаты  $q_i = 0$ , находим:

$$\alpha(q_i) = \alpha(0) + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \dots \quad (1.5)$$

Дипольный момент совпадает по направлению с направлением вектора напряжённости электрического поля и пропорционален напряжённости по величине:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}. \quad (1.6)$$

Со временем  $t$  индуцированный в молекуле электрическим полем световой волны (3) дипольный момент изменяется по закону:

$$\begin{aligned} p &= \left[ \alpha(0) + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q_i} \right)_0 \cdot q_{i0} \cdot \cos(\omega_i t + \delta_i) \right] \cdot E_0 \cdot \cos \omega t = \\ &= \alpha(0) \cdot E_0 \cdot \cos \omega t + \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q_i} \right)_0 E_0 \cdot q_{i0} \cdot \cos((\omega - \omega_i)t + \delta_i) + \\ &+ \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q_i} \right)_0 E_0 \cdot q_{i0} \cdot \cos((\omega + \omega_i)t + \delta_i) \end{aligned} \quad (1.7)$$

где  $q$  – значение колебательной координаты,  $E_0$  – амплитуда напряженности поля световой волны,  $\omega$  – частота падающего света,  $\delta$  – начальная фаза,  $t$  – время. Последнее и предпоследнее слагаемые в (8) появились в результате модуляции колебаний индуцированного колебаниями ядер дипольного момента; в результате в спектре рассеянного света кроме линии частоты  $\omega$  появляются линии с комбинационными частотами  $\omega - \omega_k$  и  $\omega + \omega_k$ . Интенсивность линии

КРС пропорциональна  $\left( \frac{\partial \alpha}{\partial q_i} \right)_0^2$ .

Однако классическая теория комбинационного рассеяния света не может объяснить, почему интенсивности стоксовых и антистоксовых компонент раз-

личны. Поэтому для объяснения этого различия прибегают к квантовой теории КРС. Поскольку вероятность рассеяния пропорциональна числу рассеивающих молекул, интенсивности стоксовой ( $I_{cm}$ ) и антистоксовой ( $I_{acm}$ ) компоненты определяются населённостями нулевого и первого колебательных уровней энергии молекул. При не очень высоких температурах населённость первого колебательного уровня невелика (например, при комнатной температуре при колебательной частоте  $1000 \text{ см}^{-1}$  на первом уровне находится 0,7% всех молекул), поэтому  $I_{acm}$  мала. С повышением температуры населённость возбуждённого колебательного уровня возрастает и  $I_{acm}$  увеличивается. Населённость уровней определяется распределением Больцмана – распределением молекул по колебательной энергии, в соответствии с которым:

$$\frac{I_{acm}}{I_{cm}} = \left[ \frac{(\omega + \omega_k)}{(\omega - \omega_k)} \right]^4 \cdot \exp\left(-\frac{\hbar\omega_k}{kT}\right), \quad (1.8)$$

где  $\omega$  – частота падающего света,  $\omega_k$  – частота колебательного или вращательного переходов рассеивающих молекул,  $k$  – постоянная Больцмана, равная  $1,38 \cdot 10^{-23}$  Дж/К,  $T$  – температура. Как правило,

$$\frac{(\omega + \omega_k)}{(\omega - \omega_k)} \approx 1, \quad (1.9)$$

поэтому:

$$\frac{I_{acm}}{I_{cm}} = \exp\left(-\frac{\hbar\omega_k}{kT}\right). \quad (1.10)$$

При обычных условиях эксперимента большинство молекул находятся на самом нижнем энергетическом уровне с  $\omega = 0$ , и лишь очень малая их часть имеет состояние с  $\omega = 1$ , поэтому  $\exp\left(-\frac{\hbar\omega_k}{kT}\right) \ll 1$ . Таким образом, интенсивность стоксовой линии всегда должна быть больше интенсивности антистоксовой линии. Общий вид спектра КРС приведен на рис. 1.2.

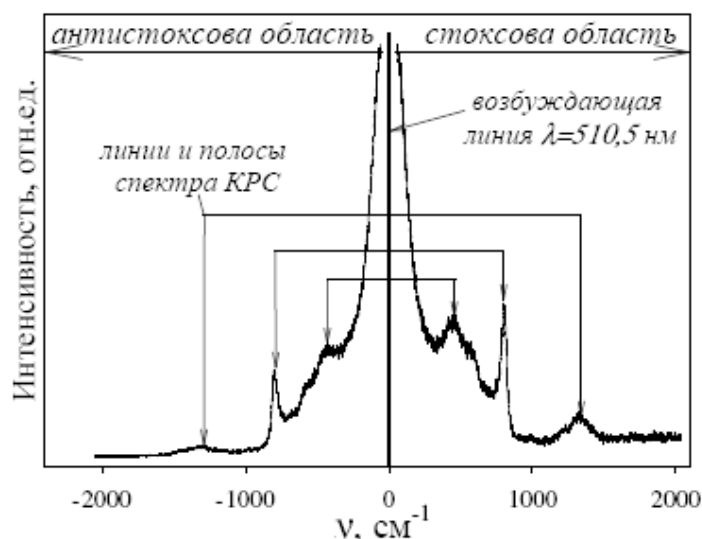


Рис. 1.2. Общий вид спектра КРС оксида бора при температуре 1400 К и возбуждающем излучении длиной волны  $\lambda = 510,5$  нм

Различают следующие виды комбинационного рассеяния:

- 1) спонтанное КРС, механизм которого был описан выше;
- 2) резонансное КРС, состоящее в резком возрастании эффективного сечения рассеяния при приближении частоты возбуждающего излучения к полосе электронного поглощения вещества;
- 3) вынужденное КРС, состоящее в резком уменьшении ширины и увеличении интенсивности одной или нескольких линий КРС до значений, сравнимых с интенсивностью возбуждающего излучения;
- 4) гиперкомбинационное рассеяние света, состоящее в возникновении комбинационных спутников в области частоты второй оптической гармоники возбуждающего излучения;
- 5) гигантское КРС, состоящее в увеличении до  $10^5 - 10^6$  раз эффективного сечения рассеяния для ряда молекул, адсорбированных на шероховатой поверхности некоторых металлов;
- 6) когерентное антистоксово рассеяние, состоящее в резком увеличении интенсивности и угловой направленности сигнала рассеяния при возбуждении вещества одновременно двумя лазерными источниками света.

Все эти явления открывают совершенно новые возможности для решения научных и практических задач и, несомненно, будут использованы в будущем.

Основными параметрами линий комбинационного рассеяния, по которым проводится анализ, являются:

а) частота  $\nu$  равная частоте одного из колебательных процессов в среде. Она определяет положение рассматриваемой линии по отношению к возбуждающей линии (рис. 1.2) и, как правило, измеряется в  $\text{см}^{-1}$ , т.е.  $[\nu] = 1 \text{ см}^{-1}$ ;

б) интенсивность линии  $I$ , характеризующая эффективность КРС при данном колебательном процессе. Различают пиковую  $I_0$  (расстояние от вершины линии до уровня фона), и интегральную  $I_{\text{инт}}$  интенсивность (площадь, ограниченная контуром линии). Последняя обычно выражается в условных единицах по отношению к значениям эталонного образца. За эталон принимается алмаз. Иногда  $I_{\text{инт}}$  выражается в процентах от возбуждающей линии;

в) ширина (синоним – полуширина) линии  $\delta$  равная расстоянию между точками контура данной линии на высоте  $I_{\text{cm}}/2$  и показана на рис. 1.3;

г) степень деполяризации линии  $\rho$ , определяемая отношением интенсивности рассеянного света  $s$  в плоскости поляризации перпендикулярной к плоскости поляризации возбуждающего излучения к интенсивности рассеянного света  $s$  плоскостью поляризации, совпадающей с плоскостью поляризации возбуждающего излучения.

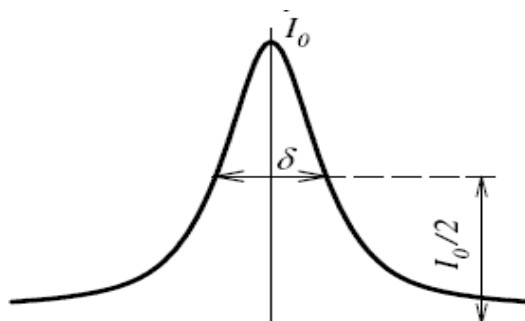


Рис. 1.3. Интенсивность и ширина линий комбинационного рассеяния света

В ИК-спектроскопии исторически сложилось при построении спектров по оси абсцисс откладывать волновые числа в обратных сантиметрах ( $\text{см}^{-1}$ ) и обозначать их буквой  $\nu = 1/\lambda$ , которой часто обозначается частота колебаний. Поэтому некоторые авторы употребляют для волновых чисел термин «частота», хотя, если речь идёт о ИК спектрах, для частоты  $\nu$  в смысле  $1/\lambda$  единицей измерения служит  $\text{см}^{-1}$ . Кроме того, частота, в смысле волновое число, действительно пропорциональна частоте в традиционном смысле слова и измеряемой в герцах. Если речь идёт о частоте электромагнитных волн в вакууме, выраженной в герцах, то для пересчёта волновых чисел в  $\text{см}^{-1}$  в истинную частоту колебаний, например, вектора электрического поля электромагнитной волны нужно  $\nu[\text{см}^{-1}]$  домножить на скорость света, выраженную в  $\text{см}/\text{с}$ , т.е. на  $3 \cdot 10^{10} \text{ см}/\text{с}$ . Таким образом, лишь из контекста и единиц измерения нужно уметь распознавать, что (какая физическая величина) обозначена буквой  $\nu$ .

В спектроскопии КРС происходит перенос спектров из дальней ИК-области в ближнюю ИК-область или даже в видимую. Спектрометры ближней ИК-области и видимого диапазона имеют шкалу длин волн, проградуированную в нанометрах. Технические параметры спектрометров (спектральный диапазон и спектральное разрешение) на видимую и ближнюю ИК области спектра также приводятся в нанометрах. Поэтому полезно получить выражения для перехода от нм к  $\text{см}^{-1}$  и обратно.

Эти выражения легко получаются из следующих соображений. Для стоксовой компоненты спонтанного КРС энергия колебательного фотона  $E_{\text{ИК}}$  равна разности энергий зондирующего  $E_3$  и рассеянного фотонов  $E_p$ :

$$E_{\text{ИК}} = E_3 - E_p . \quad (1.11)$$

Далее

$$\frac{hc}{\lambda_{\text{ИК}}} = \frac{hc}{\lambda_3} - \frac{hc}{\lambda_p} \Rightarrow \frac{1}{\lambda_{\text{ИК}}} = \frac{1}{\lambda_3} - \frac{1}{\lambda_p} . \quad (1.12)$$

В последнее из равенств (1.12) длину волны, в принципе, можно подставлять в любых одинаковых единицах измерения. Другое дело, что при рассуж-



дениях и оценках по комбинационному рассеянию желательна левую часть иметь в обратных сантиметрах  $[\text{см}^{-1}]$ , а в правую подставлять длины волн в нанометрах. Поскольку  $1 \text{ нм} = 10^{-7} \text{ см}$  и  $1 \text{ см} = 10^7 \text{ нм}$ , то правое из равенств (1.12) примет вид:

$$\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}] = \frac{1}{\lambda_{\text{ик}}[\text{см}]} = 10^7 \left( \frac{1}{\lambda_3[\text{нм}]} - \frac{1}{\lambda_p[\text{нм}]} \right) = 10^7 \frac{\lambda_p[\text{нм}] - \lambda_3[\text{нм}]}{\lambda_p[\text{нм}]\lambda_3[\text{нм}]} \quad (1.13)$$

С помощью выражения (1.13) можно рассчитывать смещения по частоте в обратных сантиметрах  $[\text{см}^{-1}]$  компонент комбинационного рассеяния  $\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}]$  по известным в нм длинам волн зондирующего  $\lambda_3[\text{нм}]$  и рассеянного  $\lambda_p[\text{нм}]$  излучения. Если выражение (1.13) разрешить относительно  $\lambda_p[\text{нм}]$ , то по известным  $\lambda_3[\text{нм}]$  и  $\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}]$  можно рассчитать спектральное положение пика рассеянного излучения:

$$\lambda_p[\text{нм}] = \frac{\lambda_3[\text{нм}]}{1 - \frac{\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}]}{10^7} \lambda_3[\text{нм}]} \quad (1.14)$$

Если под  $\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}]$  подразумевать ширину спектра комбинационного рассеяния, то по (1.14) рассчитывается длинноволновая граница пропускания оптического тракта  $\lambda_p[\text{нм}]$ . Например, при регистрации спектров КРС биообъектов используется  $\lambda_3[\text{нм}] = 785 \text{ нм}$ , а наибольшие значения  $\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}] = 4000 \text{ см}^{-1}$ . Тогда (1.14) даёт  $\lambda_p[\text{нм}] = 1144 \text{ нм}$ . Полная ширина спектра комбинационного рассеяния в нм  $\Delta\lambda_{\text{шк}}[\text{нм}]$  рассчитывается с помощью очевидного выражения:

$$\Delta\lambda_{\text{шк}}[\text{нм}] = \lambda_p - \lambda_3 = \frac{\nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}]\lambda_3^2[\text{нм}]}{10^7 - \nu_{\text{ик}}[\text{см}^{-1}]\lambda_3[\text{нм}]} = \frac{4000 \cdot 785^2}{10^7 - 4000 \cdot 785} = 359 \text{ нм}, \quad (1.15)$$

т.е. посредством выражений (1.14) и (1.15) оценивается спектральный диапазон спектрометра КРС.

Погрешность в определении положения пика на спектре КРС по погрешности шкалы длин волн спектрометра  $\Delta\lambda_{\text{шк}}$  можно получить путём дифференцирования средней части выражения (1.13):

$$\Delta\nu_{ик} [\text{см}^{-1}] = 10^7 \left( \frac{1}{\lambda_3^2 [\text{нм}]} + \frac{1}{\lambda_p^2 [\text{нм}]} \right) \Delta\lambda_{ик} [\text{нм}] \approx 2 \cdot 10^7 \frac{\Delta\lambda_{ик} [\text{нм}]}{\lambda_3^2 [\text{нм}]}, \quad (1.16)$$

поскольку для превалирующих стоксовых компонент

$$\lambda_3 \leq \lambda_p \Rightarrow (1/\lambda_3) \geq (1/\lambda_p). \quad (1.17)$$

Из (1.16), разрешённого относительно  $\Delta\lambda_{ик}$ , следует, что для требуемой, например, погрешности в определении положения пика спектра КРС  $\Delta\nu_{ик} [\text{см}^{-1}] = 1 \text{ см}^{-1}$  нужно обеспечить погрешность спектральной градуировки спектрометра, не превышающей значения

$$\Delta\lambda_{ик} [\text{нм}] = \frac{\Delta\nu_{ик} [\text{см}^{-1}] \lambda_3^2 [\text{нм}]}{2 \cdot 10^7} = \frac{1 \cdot 785^2}{2 \cdot 10^7} = 0,031 \text{ нм}. \quad (1.18)$$

Если считать, что  $\lambda_3 [\text{нм}]$  для лазерного источника излучения известна точно, то 2 из знаменателя (1.18) нужно убрать и перевод требуемого разрешения спектра КРС  $\Delta\nu_{ик} [\text{см}^{-1}]$  из обратных сантиметров в спектральное разрешение спектрометра  $\Delta\lambda_{сп}$  в нанометрах будет давать выражение:

$$\Delta\lambda_{сп} [\text{нм}] = \frac{\Delta\nu_{ик} [\text{см}^{-1}] \lambda_3^2 [\text{нм}]}{10^7} = \frac{1 \cdot 785^2}{10^7} = 0,062 \cdot \Delta\nu_{ик} \cdot [\text{см}^{-1}]. \quad (1.19)$$

Если под  $\Delta\nu_{ик} [\text{см}^{-1}]$  подразумевать требуемое спектральное разрешение в спектрах КРС, то выражение (1.19) позволяет оценить требуемое спектральное разрешение спектрометра КРС, т.е. второй спектральный технический параметр спектрометра КРС.

В рассмотренном разложении (1.5, см. стр. 12) не учитывались высшие члены разложения в (1.4, стр. 12). Учет членов второго порядка приведет к появлению в спектре рассеяния линий с удвоенной частотой нормальных колебаний, а также к комбинации частот двух различных колебаний. Но интенсивность этих линий существенно меньше, чем линий, соответствующих первым членам разложения (соотношения примерно такое же, как между нормальным рамановским рассеянием и рэлеевским).

Таким образом, собственные колебания вещества приводят к появлению в спектре рассеянного света дополнительных частот разной интенсивности, связанных с этими колебаниями, и, следовательно, со структурой вещества. Для молекулы из  $N$  атомов количество колебательных степеней свободы равно  $(3N - 6)$ , а для линейной молекулы  $(3N - 5)$ . Но в экспериментальных спектрах комбинационного рассеяния в случае молекул, обладающих симметрией, число линий часто оказывается меньшим. Это связано с тем, что некоторые нормальные колебания в симметричных молекулах могут быть вырождены, т.е. число нормальных частот молекулы оказывается меньше числа колебательных степеней свободы. Кроме того, не все нормальные частоты могут наблюдаться в спектре комбинационного рассеяния из-за запрета по соображениям симметрии. Строгие рассуждения о том, какие колебания видны, а какие – нет, в спектре комбинационного рассеяния, основаны на использовании аппарата теории групп, которая позволяет классифицировать колебания, определить их вырождение, к какому виду они относятся (валентные или деформационные). Но основные идеи доступны и с помощью качественных рассуждений.

Комбинационное рассеяние света связано с изменением поляризуемости молекул за счет колебаний ядерного скелета молекулы. При этом существенна именно способность к изменению – производная по нормальной координате в уравнении (1.5, см. стр. 12), а не величина самой поляризуемости. Поэтому нормальное колебание будет «активно» в спектре комбинационного рассеяния, если оно приводит к таким изменениям поляризуемости. Для сравнения, в инфракрасном поглощении важно изменение величины дипольного момента под действием возбуждающего излучения. Нормальное колебание «активно» в спектре инфракрасного поглощения, если при данном колебании изменяется дипольный момент молекулы.

Рассмотрим это на примере молекулы  $\text{CO}_2$ . Это линейная молекула, поэтому количество колебательных степеней свободы равно 4. На рис. 1.4 схематично указаны возможные виды собственных колебаний. Первое колебание (слева вверху) полностью симметричное и сохраняет все виды симметрии,

имеющиеся в этой молекулы. Поскольку молекула имеет центр симметрии, то ее дипольный момент равен нулю, а, следовательно, не может излучать (поглощать) инфракрасное излучение соответствующей частоты (в дипольном приближении). А в спектре комбинационного рассеяния это колебание, напротив, наблюдается (говорят, что колебание «активно»), поскольку при таком колебании изменяется расстояние между атомами, а значит, сильно изменяется поле, в котором находятся валентные электроны молекулы, и, как следствие, изменяется поляризуемость молекулы.

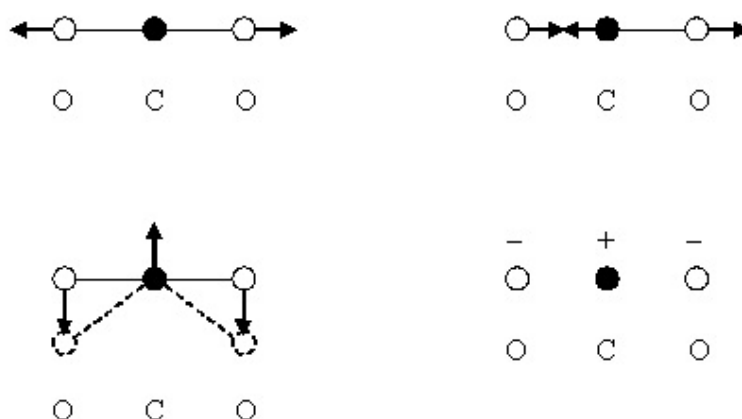


Рис. 1.4. Схема колебаний молекулы CO<sub>2</sub>

Второе колебание (справа сверху) – антисимметрично (относительно центра симметрии). В тот момент, когда одна половина молекулы растянута, другая сжата, поэтому линейные вклады их в полную модуляцию взаимно компенсируются, а из разложения (1.5, см. стр. 12) остаются последующие члены, т.е. модуляция поляризуемости пропорциональна квадрату амплитуды колебаний молекулы и ею можно пренебречь. Тот факт, что переменная часть  $\alpha$  изменяется с частотой, пропорциональной  $\cos^2\omega$ , легко видеть и из формы колебаний (форма молекулы повторяется через каждые полпериода).

Следующее колебание двукратно вырождено – это изгибные колебания во взаимно перпендикулярных плоскостях (слева внизу – колебания в плоскости рисунка, справа внизу – с выходом из плоскости рисунка). Эти колебания дают дипольное излучение и не дают комбинационного рассеяния. Последний

факт легко понять. Действительно, представив себе изменение формы молекулы через половину периода, мы получаем, в сущности, ту же картину, т.е. модуляция поляризации происходит только на частоте  $2\omega$ . Двойная частота возникает из модуляции, пропорциональной квадрату амплитуды колебания молекулы, и такой модуляцией следует пренебречь. Говорят, что такое колебание не активно в комбинационном рассеянии.

Приведенный пример показывает, что наиболее простым для рассуждений является случай молекул, обладающих центром симметрии. В случае симметричных колебаний (относительно центра симметрии) дипольный момент таких молекул не изменяется. Поляризуемость молекулы, наоборот, сильно изменяется при таких колебаниях, так как в этом случае изменяется расстояние между ядрами, а значит, и поле, в котором находится электронное облако, следовательно, и способность электронного облака к деформации. В случае антисимметричных колебаний форма молекулы искажается, что приводит к изменению дипольного момента молекулы. Поляризуемость же при таком колебании не меняется. Для таких молекул существует «правило альтернативного запрета»: «При наличии в молекуле центра симметрии колебания, разрешенные в спектрах комбинационного рассеяния, запрещены в инфракрасных спектрах, и наоборот».

Строгая теория позволяет установить не только способность колебаний к проявлению в экспериментальных спектрах, но и то, какой тип рассеяния разрешен (скалярный или анизотропный), степень поляризации рассеянного света. Степень поляризации рассеянного света является еще одной важной экспериментальной характеристикой (наряду с положением и интенсивностью линий), позволяющей делать выводы об анизотропии молекул, их симметрии.

## 2. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ, ФАРМАЦИИ И ЭКОЛОГИИ

Одним из первых применений спектроскопии комбинационного рассеяния было изучение белков. Причем если первые спектры КРС белков были получены в конце 50-х годов с помощью ламп, то в последние два десятилетия в качестве источников возбуждения применяют только лазеры. Целью большинства исследований является изучение структуры молекул и изучение функциональных групп, определяющих их биохимическую активность. Из обычного (спонтанного) комбинационного спектра белка можно получить информацию о его структурных характеристиках.

Наряду с исследованием белков также методом комбинационного рассеяния света проводилось изучение нуклеиновых кислот. Первый такой спектр ДНК был получен в 1968 году. С этого момента проведено большое число исследований методом спектроскопии КРС свободных оснований и нуклеотидов, комплексов их с белками, тяжелыми металлами и другими элементами и соединениями. Были получены спектры растворов природных вирусов и хромосом. В качестве примера на рис. 2.1 представлены спектры комбинационного рассеяния водной суспензии пурпурных мембран.

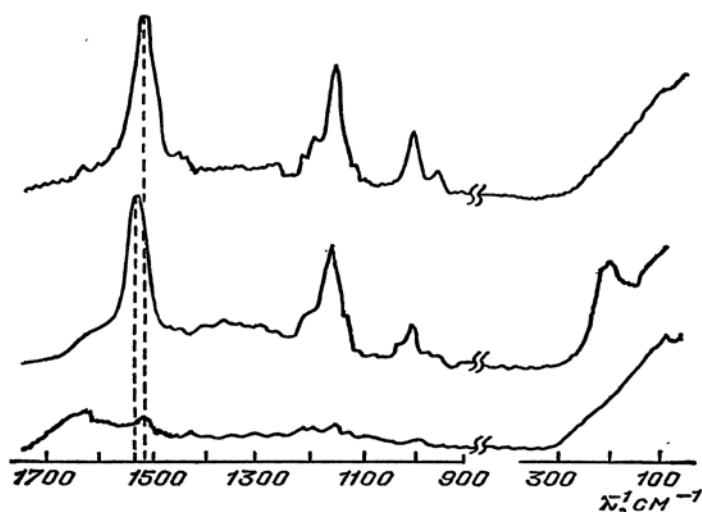


Рис. 2.1. Спектры комбинационного рассеяния водной суспензии пурпурных мембран разной концентрации

В последнее время спектроскопия комбинационного рассеяния как неразрушающий метод лазерной диагностики, дающий информацию об объекте на молекулярном уровне и имеющий значительные перспективы, все больше проникает в область медицинских исследований. Первым и остающимся одним из основных применений в медицине является офтальмология, а именно изучение хрусталиков глаза животных и человека. Разработка микроспектрометров комбинационного рассеяния с многоканальной регистрацией спектров, обеспечивающих высокое быстродействие и пространственное разрешение (локальность) при значительной чувствительности, открывает возможность проведения ранней диагностики такого серьезного и массового заболевания, как катаракта. В качестве примера приведен комбинационный спектр хрусталика глаза кролика в области ядра при мощности излучения лазера равной 2 мВт и времени экспозиции порядка 0,5 с, представленный на рис. 2.2. Следует отметить, что мощность излучения лазера 2 мВт при времени облучения 0,5 с является предельной, при которой не происходит повреждения сетчатки глаза.

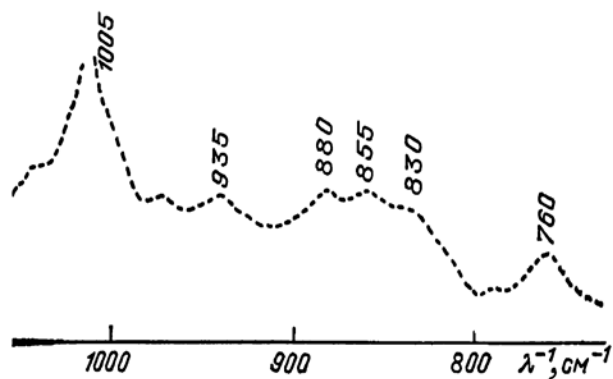


Рис. 2.2. Спектр комбинационного рассеяния хрусталика глаза кролика в области ядра

Также спектроскопия комбинационного рассеяния нашла применение в дерматологии. В последнее десятилетие спектроскопия КРС зарекомендовала себя как высокоточный автоматизированный метод визуализации и диагностики как доброкачественных (пигментный невус, себорейный кератоз), так и злокачественных новообразований, таких как меланома и базально-клеточная карцинома. Пример спектров комбинационного рассеяния кожи представлен на

рис. 2.3. Как видно из рисунка, определение наиболее опасного и распространенного вида рака кожи – меланомы – является наиболее простым, по сравнению с остальными, не только ввиду высокой интенсивности спектра меланомы, но и из-за существенного отличия по форме данного спектра от остальных.



Рис. 2.3. Спектры комбинационного рассеяния света кожей

Классическими объектами для интерпретации спектров комбинационного рассеяния биомолекул являются белки и их компоненты. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал по спектроскопии комбинационного рассеяния света биологических молекул. Примером сложной группы атомов, выступающей в качестве независимого осциллятора в молекулах всех полипептидов и белков, является так называемая амидная группа, образующаяся при связывании аминокислот друг с другом. Различные типы колебаний этой группы проявляются в комбинационных спектрах в виде так называемых полос амид-1, амид-2, амид-3. Точное положение максимумов полос и форма их контуров определяется вторичной структурой белка. Из спонтанного комбинационного спектра белка можно получить информацию о его структурных характеристиках, например о средней конформации основной полипептидной цепи. В частности, такая информация содержится в положении и форме контуров полос амид-1 и амид-3. Анализируя положение максимума и форму контура полосы (например, разлагая экспериментальную полосу по спектрам



отдельных структур), можно получать количественные оценки содержания отдельных типов структуры в исследуемом белке.

Также для применения спектроскопии комбинационного рассеяния активно используются аминокислоты. Так, например, фенилаланин, тирозин и триптофан являются протеиногенными аминокислотами и входят в состав белков всех известных живых организмов. Фенилаланин играет значительную роль в фолдинге и стабилизации белковых структур, является составной частью функциональных центров. Тирозин входит в состав ферментов, во многих из которых именно тирозину отведена ключевая роль в ферментативной активности и её регуляции. Триптофан участвует в гидрофобных и стэкинг-взаимодействиях. Каждый компонент содержит несколько пиков комбинационного рассеяния. Примеры пиков комбинационного рассеяния и их интерпретации представлены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Примеры пиков комбинационного рассеяния и их интерпретации

$\nu, \text{см}^{-1}$	Интерпретация пика	$\nu, \text{см}^{-1}$	Интерпретация пика
622	фенилаланин	1256	амид-3
644	тирозин	1268	амид-3
697	C – S-колебания	1322	C – H-колебания
725	C – S-колебания	1342	триптофан
760	триптофан	1404	– CO <sub>2</sub> -колебания
829	тирозин	1450	CH <sub>2</sub> -колебания
855	тирозин	1550	триптофан
880	триптофан	1586	тирозин, фенилаланин
936	C – C-колебания	1606	фенилаланин
961	C – C-колебания	1617	тирозин
1005	фенилаланин	1670	амид-1
1032	фенилаланин	2568	S – H-колебания
1075	C – N-колебания	2877	C – H (неароматич)
1129	C – N-колебания	2939	C – H (неароматич)
1159	C – N-колебания	3062	C – H (ароматич)
1177	тирозин, фенилаланин	3287	H <sub>2</sub> O, N – H-колебания
1209	тирозин	3390	H <sub>2</sub> O
1240	амид-3		

Кроме этих характерных линий спектры КРС биологических макромолекул содержат большое число других линий, приписка которых определенным

внутримолекулярным колебаниям составляет одну из задач спектроскопии комбинационного рассеяния биологических объектов.

Высокое разрешение и чувствительность метода КРС позволяют осуществить быструю идентификацию и анализ состава лекарственных средств. Например, аспирин (рис. 2.4), ацетоминофен и кофеин присутствуют в эфедрине в пропорции 4:4:1, что может быть идентифицировано качественно и количественно по их уникальным пикам. Спектры КРС являются мощным инструментом для анализа критических добавок, например, таких как аскорбиновая кислота, анти-оксиданты, сульфат бария, неорганическая соль и прочие важные в медицине и хирургии соединения.

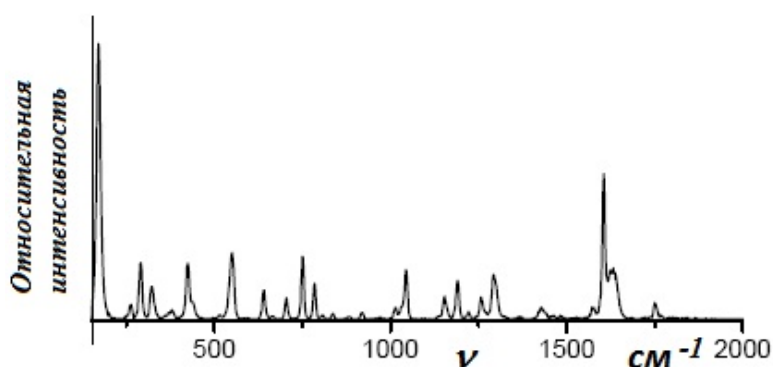


Рис. 2.4. Спектр комбинационного рассеяния света аспирином

Многие лекарственные формулы содержат в себе высокие концентрации наполнителей, таких как отбеливающий пигмент  $\text{TiO}_2$ , содержащийся в ибупрофене в таблетках и капсулах. Рамановский метод позволяет количественно рассчитать содержание этих компонентов, а в случае с  $\text{TiO}_2$  также возможен качественный контроль кристаллизации этого неорганического пигмента путем анализа частотного сдвига и относительных интенсивностей пиков. Рамановский анализ лекарственных средств может быть достаточно критичным для идентификации злоупотребления сильнодействующими лекарствами, например, эфедрином, а также способен обеспечивать контроль качества и чистоты такого важного средства, как теofilлин (рис. 2.5), важнейшего вещества для лечения астмы и других респираторных заболеваний.

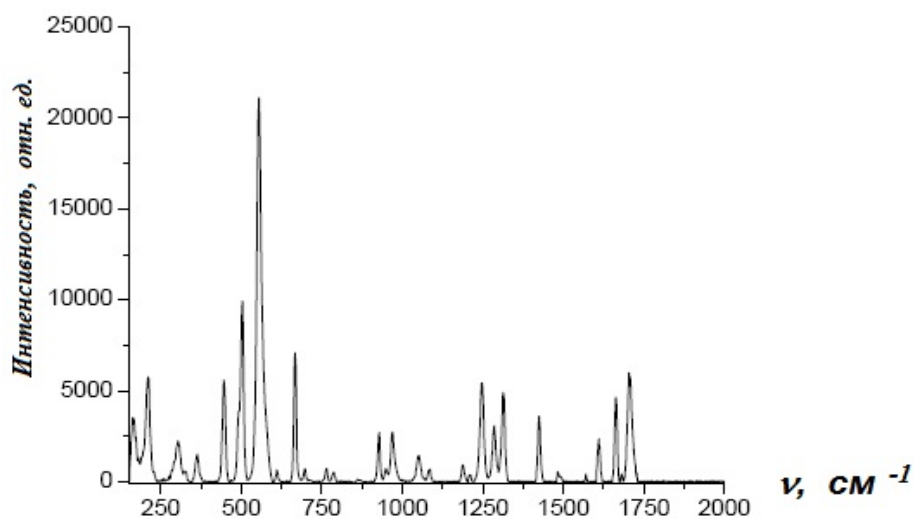


Рис. 2.5. Спектр комбинационного рассеяния света теофиллином

Наработаны библиотеки спектров большинства важных лекарств, наиболее популярных среди производителей контрафактной продукции. Использование этих спектров позволяет произвести качественный анализ состава лекарственного средства с определением взаимных пропорций содержания тех или иных компонентов.

Возможно проведение анализа лекарственных препаратов без нарушения целостности упаковки (для препаратов в прозрачной упаковке), инъекционных препаратов в ампулах без вскрытия, в условиях передвижной лаборатории. При этом спектроскопию КРС на стадии применения методики отличают незначительные финансовые затраты, отсутствие особых требований к квалификации персонала, простая интерпретация результатов измерения типа ДА/НЕТ.

Для интерпретации спектров КРС следует обращаться к соответствующим базам данных или материалам оригинальных исследований. Примером таковых могут статьи, ссылки на которые приведены в списке библиографических источников. Например, в статье С.А. Бурикова и др. описана диагностика водно-этанольных растворов методом спектроскопии комбинационного рассеяния света, а в работе Аграфенина А.В. и др. – одновременное количественное определение глицерина и ацетата калия в водном растворе. Вода, этанол, глицерин, ацетат калия входят в состав многих лекарственных препаратов и поэтому могут предметами анализа.

В последние десятилетия разработаны лидары КРС различного назначения. Чаще они работают в спектральном диапазоне более 350 нм в верхнюю полусферу и размещаются стационарно на земле для обнаружения в атмосфере, в частности, паров воды и метана до высот порядка 10 км (в ночных условиях), на автомобилях для экологических исследований промышленных выбросов и на самолетах для измерения концентрации озона, паров воды и пр.

В табл. 2.2, составленной по материалам J. Of Geophysic Research 2003. V. 108. № D23, приведены примеры зарубежных авиационных КРС-лидаров, откуда следует, что все лидары, как правило, регистрируют лишь единицы атмосферных компонентов и примесей. В качестве источников зондирования в них применяются твердотельные лазеры с ламповой накачкой или эксимерные лазеры, обладающие небольшим ресурсом работы (не более  $10^8$  импульсов) и солидными массогабаритными характеристиками (масса 150 – 200 кг, объем до 1 м<sup>3</sup>).

Таблица 2.2

Примеры зарубежных авиационных КРС-лидаров

№ п/п	Наименование КРС-лидара	Длина волны лазера, нм	Регистрируемые вещества	Фирма-разработчик
1	IAP RMR Lidar	355, 532	SO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , пары Na,	Leibniz Inst. Of Atmospheric Physics, Germany
2	Tito Scalo (PZ)	355	Аэрозоли, пары HO <sub>2</sub>	Potenza, Southen Italy
3	UPC SRL system (Scanning Raman Lidar)	532, 1064	Аэрозоли, пары HO <sub>2</sub>	EARLINET European network, Spain-France
4	SRL (Scanning Raman Lidar)	532	Аэрозоли, пары HO <sub>2</sub>	Der. of Energy, Oklahoma, USA
5	RASL (Raman Airborne Spectroscopic Lidar)	308, 355, 532, 1064	CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub>	Colorado, State Univ., USA
6	AROTEL	355	Озон, аэрозоли, NO <sub>2</sub>	Langley Research Center, USA
7	ARL (Airborne Raman Lidar)	351	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Goddard Space Flight Center, USA
8	Raman Lidar c-130	532	SO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> , аэрозоли	National Center for Atmospheric Research, Japan
9	PARS (Photo-acoustic Raman spectrometer)	266	H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub>	Mitsubishi Heavy Industry, Japan

Компоненты атмосферы и примеси, концентрации которых являются предметом измерений КРС-лидарами, их стоксовы частотные сдвиги представлены на рис. 2.6. Как уже отмечалось, КРС газами, жидкостями и твердыми телами является прямым источником информации о химическом составе различных сред. Этот метод нашел широкое применение не только при оперативном контроле состояния приземной атмосферы, экологической безопасности среды, но и для проведения широкого круга исследований в интересах физики и химии атмосферы, геофизики и геологии, других сфер антропогенной деятельности.

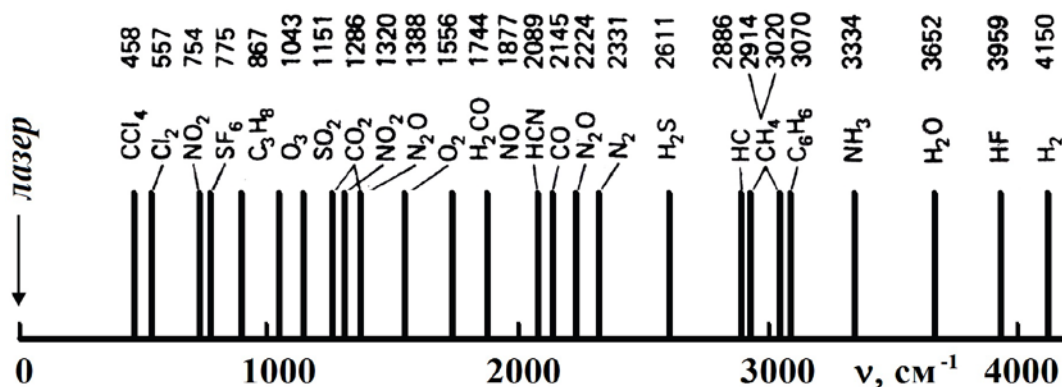


Рис. 2.6. Стоксовы сдвиги комбинационного рассеяния различных молекул, присутствующих в атмосфере

До последнего времени разработки лидарных систем, обладающих экстремально высоким спектральным разрешением, практически отсутствовали. В прототипе авиационного лидара, созданном в Институте лазерной физики (ИЛФ) ГОИ им. С.И. Вавилова, по-видимому, впервые реализована и продемонстрирована ультраспектральная селективность. Современные КРС-лидары могут быть построены с весьма малыми габаритами и массой. Это вполне обеспечивается применением компактных твердотельных лазеров с диодной накачкой и облегченной оптикой. Улучшение инструментальной точности и массогабаритных характеристик в оптико-электронных комплексах, как известно, связано с уменьшением длины волны излучения. Применение УФ средств подсветки и приема в лидарах позволяет качественно увеличить чувствительность и точность обнаружения химических веществ и физических объектов.

### 3. ТЕХНИКА СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

При экспериментальных исследованиях спонтанного КРС необходимо учесть, что поток комбинационно рассеянного излучения составляет очень малую долю от падающего ( $\sim 10^{-5} \dots 10^{-7}$ ), поэтому любое попадание, даже малой доли, упруго рассеянного исходного пучка на детектор даст значительный вклад в выходной сигнал. Отсюда следуют два важных условия, выполнение которых позволят фиксировать спектры КРС: малый уровень упруго рассеянного излучения на детекторе и мощность зондирующего пучка не менее десятков милливатт. Поскольку, как уже отмечалось, в настоящее время в качестве источников зондирующего излучения в экспериментах по КРС используются лазеры, то второе условие выполняется выбором лазера соответствующего уровня мощности. Подавление упруго рассеянного излучения достигается либо применением двойных или даже тройных монохроматоров, либо за счёт фильтра низких частот – отрезающего фильтра (пропускает длины волн оптического излучения больше заданной) – или «ночь»-фильтра (не пропускает излучение в узком диапазоне спектра), согласованного со спектром излучения используемого в установке лазера. Поскольку стоимость установки с качественным двойным монохроматором определяется в основном стоимостью самого монохроматора и, как правило, высока, то они используются в исследовательских целях с различными длинами волн зондирующего излучения.

Для рутинных измерений диагностической и аналитической направленности, когда фиксированная длина волны зондирующего излучения является скорее преимуществом, нежели недостатком, своеобразным стандартом стали установки с фильтрами. Основные компоненты подобной установки представлены на рис. 3.1.

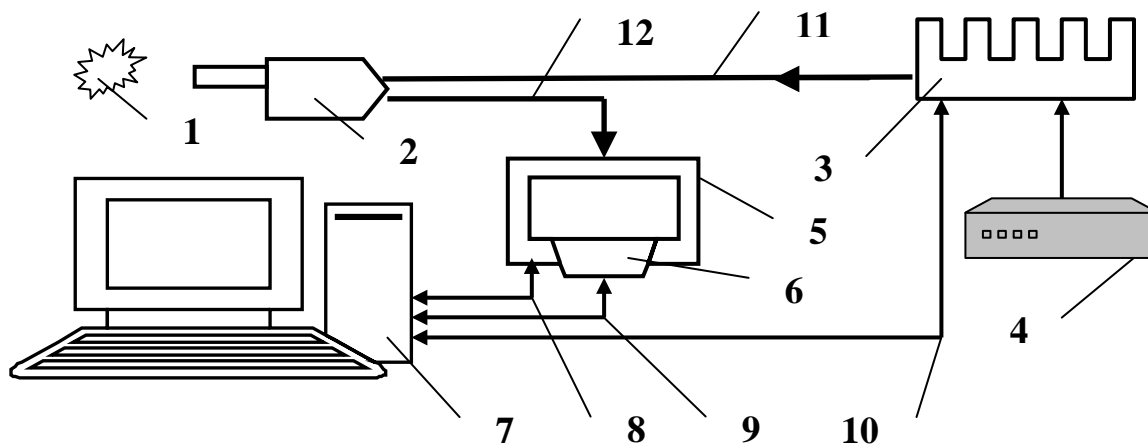


Рис. 3.1 Структурная схема типовой установки для измерений КРС с отсекающим фильтром: 1 – исследуемый объект; 2 – рамановский пробник (пробник КРС); 3 – лазерный модуль; 4 – источник питания лазерного модуля; 5 – спектрометр; 6 – встроенная охлаждаемая камера для фиксации спектров; 7 – компьютер; 8, 9, 10 – информационные электрические кабели; 11 – передающее оптоволокно; 12 – приёмное оптоволокно

Источником зондирующего излучения является лазерный модуль 3. Его излучение по оптоволокну передаётся в рамановский пробник 2, который выполняет роль приёмо-передатчика, фокусирующего излучение на поверхности кожи или иного исследуемого объекта 1, собирающего рассеянное излучение, подавляющего в приёмном канале излучение лазера и направляющее собранное и отфильтрованное рассеянное излучение в оптоволокно, связывающее пробник со спектрометром. Спектрометр 5 раскладывает рассеянное излучение в спектр, который фиксируется фотоприёмной матрицей или линейкой камеры 6. В силу слабости сигнала КРС, часто требуется время накопления в десятки секунд, поэтому фотоприёмник приходится охлаждать до  $20...50^{\circ}\text{C}$  ниже нуля. Назначение компьютера: а) управление параметрами спектрометра, камеры и лазерного модуля; б) запоминание спектров и их обработка.

Поскольку в лазерной медицинской диагностике всегда присутствует стремление заглянуть поглубже внутрь человеческого организма, то лазер для спектроскопии КРС выбирается из диапазона от 700 до 1300 нм («терапевтическое окно прозрачности»), в котором поглощение биотканей относительно не-

велико и глубина проникновения излучения через кожу достигает 1 – 2 мм. Своеобразным современным стандартом тут выступают лазерные модули с длиной волны излучения 785 нм.

Выбор лазерного модуля с длиной волны излучения 785 нм в качестве наиболее распространённого компонента современных КРС-спектрометров диктуется следующими соображениями.

Значение 785 нм лежит в окне прозрачности биотканей. Поскольку наибольшие смещения пиков КРС в биотканях, обусловленные колебаниями групп О–Н, не превышают  $4000 \text{ см}^{-1}$  (см. разд. 1 выражения (1.15 – 1.19)), то наибольшая длина волны, разрешение и регистрацию которой должен обеспечить спектрометр, составит 1114 нм, а полная ширина спектра, регистрируемого спектрометром, составит всего 360 нм. Этот диапазон лежит в области спектральной чувствительности наиболее распространённых кремниевых фоточувствительных линеек и матриц. Более того, эта спектральная область является областью максимальной фоточувствительности кремниевых фотоприёмников. Еще одним аргументом является прозрачность кварцевых и полимерных оптоволокон в рассматриваемом спектральном диапазоне.

Примером лазерного модуля, используемого в установках КРС может служить модуль LuxxMaster Raman Voxх (рис. 3.2).

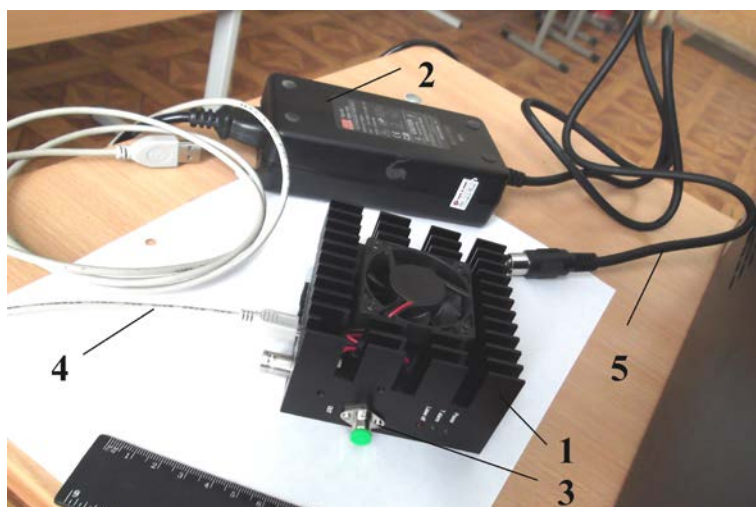


Рис. 3.2. Лазерный модуль LuxxMaster Raman Voxх с источником питания:  
1 – лазерный модуль LuxxMaster Raman Voxх; 2 – источник питания лазерного модуля;  
3 – выходной оптический разъём; 4 – информационный кабель; 5 – силовой кабель



Максимальное значение мощности излучения на выходном оптическом разъёме модуля составляет не менее 450 мВт с возможностью регулирования в пределах двух порядков от максимального значения под управлением с компьютера 7 через кабель 10 (рис. 3.1). Управляющая программа (рис. 3.3), позволяет управлять включением и выключением лазера, устанавливать выходную мощность излучения, а также индицировать текущие значения мощности излучения, тока и температуры лазера и температуры корпуса лазерного модуля.

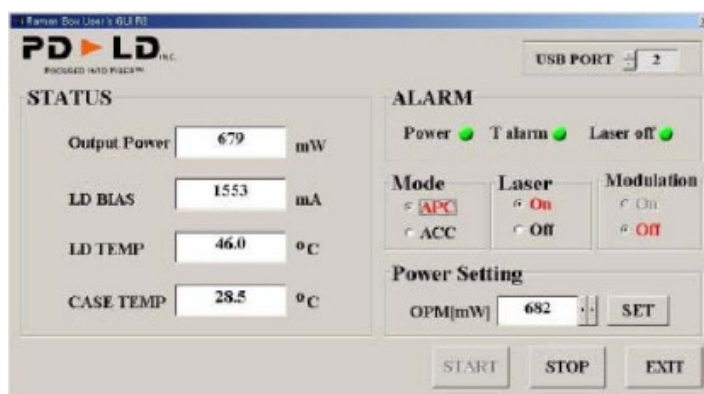


Рис. 3.3. Окно управляющей программы лазерного модуля LuxxMaster Raman Voxx

Конструктивное исполнение рамановского пробника – пробника RPB785 – представлено на рис. 3.4. Из его обозначения видно, что он согласован с лазерным модулем LuxxMaster Raman Voxx как по рабочей длине волны (785 нм), так и по максимально допустимой мощности лазерного излучения (500 мВт), которую выдерживают без разрушения оптические элементы, входящие в его состав.



Рис. 3.4. Рамановский пробник RPB785: 1 – оптоволоконный жгут; 2 – блок фильтров; 3 – движок управления шторкой; 4 – тубус

Рамановский пробник RPB785 выполняет следующие функции:

а) фильтрует зондирующее излучение от паразитных засветок;

б) фокусирует лазерное излучение на объекте на расстоянии 7,5 мм от выходного окна тубуса 2;

в) собирает рассеянное объектом излучение и преобразует его в параллельный пучок;

г) подавляет упруго рассеянное объектом и коротковолновое по отношению к зондирующему излучения;

д) фокусирует отфильтрованное излучение на входной торец приёмного оптоволоконна 12 (рис. 3.1);

е) перекрывает шторкой тубус, препятствуя при необходимости выходу лазерного пучка из пробника без отключения лазерного модуля. Оптическая схема пробника представлена на рис. 3.5.

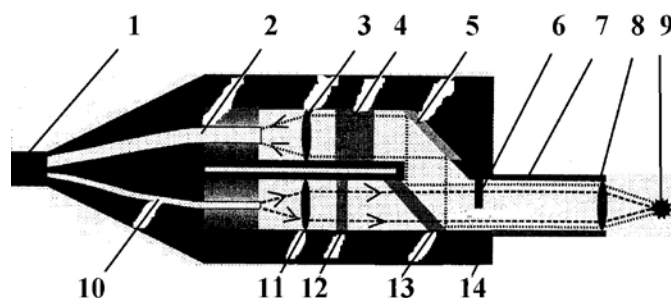


Рис. 3.5. Оптическая схема рамановского пробника RPB785: 1 – оптоволоконный жгут; 2 – приёмное оптоволоконно; 3 – фокусирующая линза; 4 – отрезающий коротковолновое излучение светофильтр с оптической плотностью в полосе подавления не менее 6; 5 – поворотное зеркало; 6 – подвижная шторка; 7 – тубус; 8 – фокусирующая линза; 9 – исследуемый объект; 10 – передающее оптоволоконно; 11 – коллимирующая линза; 12 – узкополосный пропускающий светофильтр на  $\lambda_b = 785$  нм; 13 – дихроичное зеркало; 14 – корпус блока фильтров

Назначение пропускающего узкополосного светофильтра 12 на  $\lambda_3=785$  нм состоит в подавлении неупруго рассеянного излучения в оптоволоконне, связывающем лазерный модуль с пробником. Тут надо помнить, что КРС – универсальное явление. Оно наблюдается и в твёрдых телах, в том числе, в сердцевине оптоволоконна, по которому распространяется зондирующее излучение. Упруго рассеиваясь на исследуемом объекте, спектр КРС сердцевины оптоволоконна бу-

дет накладываться на спектр КРС объекта исследования, что потребует дополнительной обработки зарегистрированных спектров. Дихроизм зеркала 13 состоит в минимизации коэффициента отражения на  $\lambda_3 = 785$  нм и высоком его значении для  $\lambda > \lambda_3$ . Это служит дополнительному подавлению упруго рассеянного излучения в приёмном канале.

Часть рассеянного объектом 9 излучения коллимируется линзой 8, его коротковолновая составляющая, включая  $\lambda_b = 785$  нм, подавляется не менее чем в  $10^6$  раз отрезающим фильтром 4 и фокусируется линзой 3 на входном торце приёмного оптоволоконна 2, по которому излучение транспортируется до входной щели спектрометра.

При использовании пробников с отрезающими фильтрами, упруго рассеянное излучение мало проявляется в спектре излучения, достигающего входной щели спектрального прибора, поэтому при выборе спектрометра достаточно учитывать его спектральный диапазон, спектральное разрешение и чувствительность фотоприёмного устройства, входящего в состав спектрометра. В силу малой доли зондирующего излучения, которое комбинационно рассеивается биотканью, и по опыту работы с биотканями на кафедре лазерных и биотехнических систем предпочтение следует отдавать спектрометрам с охлаждаемыми фотоприёмниками. Частично это объясняется ещё и тем, что путь, заключающийся в повышении мощности зондирующего пучка, при работе с биотканями неприемлем, т.к. высокие плотности мощности излучения ведут к деструктивным изменениям биотканей. Ещё более жёсткие ограничения на плотность мощности накладывают эксперименты *in vivo*.

В спектральных исследованиях биотканей, в том числе, и *in vivo* позитивно себя зарекомендовал спектрометр Shamrock sr-303i 1 (рис. 3.6). Спектральные составляющие излучения фиксируются встроенной охлаждаемой камерой DV420A-OE 2.

Файлы спектральных распределений оцифровываются, передаются в компьютер и сохраняются на его жёстком диске. Управление камерой и спектрометром, а также запись данных в файл осуществляется компьютером через

USB-интерфейс. Питание спектрометра и камеры осуществляется через блоки питания 3 и 4 от стандартной электросети 220 В, 50 Гц. Программное обеспечение спектрометра и камеры поддерживают различные форматы сохраняемых файлов. В лабораторной работе предпочтение следует отдать формату \*.asc, т.к. он интерпретируется программной средой обработки результатов MathCad как двухстолбцовая матрица, в первом столбце которой фиксируются длины волн, а во втором – соответствующие значения потока излучения.



Рис. 3.6. Спектрометрический комплекс: 1 – спектрометр Shamrock sr-303i; 2 – встроенная охлаждаемая камера DV420A-OE; 3 – источник питания спектрометра; 4 – источник питания камеры

Данный спектрометр позволяет работать с излучением в спектральном диапазоне от ближнего УФ до ближнего ИК (180 – 1200 нм) с погрешностью регистрации  $\pm 0,2$  нм и управляется специализированным программным обеспечением. Камера спектрометра имеет систему охлаждения на основе холодильника Пельтье, обдуваемого вентилятором, что обеспечивает захлаживание приемной матрицы до  $-65^{\circ}\text{C}$ , обеспечивая тем самым низкий уровень собственных шумов фотоприёмной матрицы.

Рассмотренная выше комплектация стенда жёстко привязана пробником и лазерным модулем к длине волны 785 нм. К другим её ограничениям относятся лишь 180-градусная геометрия эксперимента и невозможность поляризационных измерений комбинационного рассеяния. Для реализации более широкого спектра задач комбинационного рассеяния используют оптические схемы на дискретных элементах, один из вариантов которой представлен на рис. 3.7, а её конструктивное исполнение – на рис. 3.8 и 3.9. Используя сочетание лазера с соответствующим «ночь»-фильтром можно варьировать длиной волны возбуждающего излучения в пределах спектра пропускания стеклянных линз (практически, от 300 до 2000 нм), наличие которых объясняется необходимостью формирования для «ночь»-фильтра параллельного пучка. Конструктивное исполнение допускает установку поляризаторов и разнообразие геометрий регистрации, например, 0, 45 или 90°.

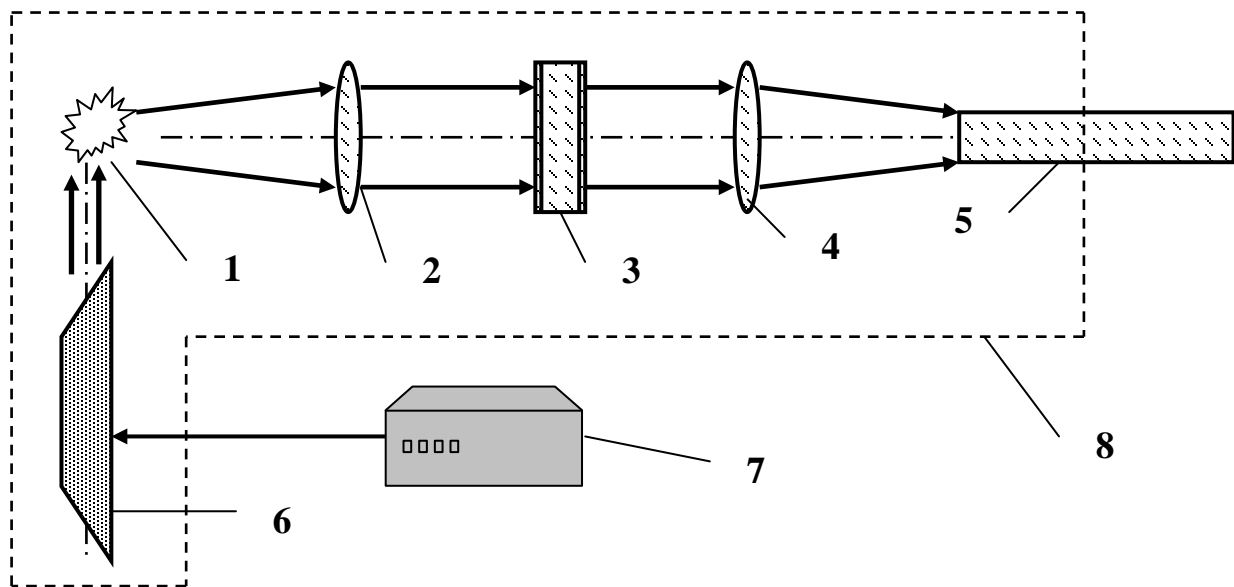


Рис. 3.7. Оптическая схема измерений КРС на дискретных элементах:  
 1 – исследуемый объект; 2, 4 – линзы; 3 – «ночь»-фильтр на  $\lambda_b$ ;  
 5 – приёмное оптоволоконно спектрометра; 6 – лазер; 7 – источник питания лазера;  
 8 – металлический кожух

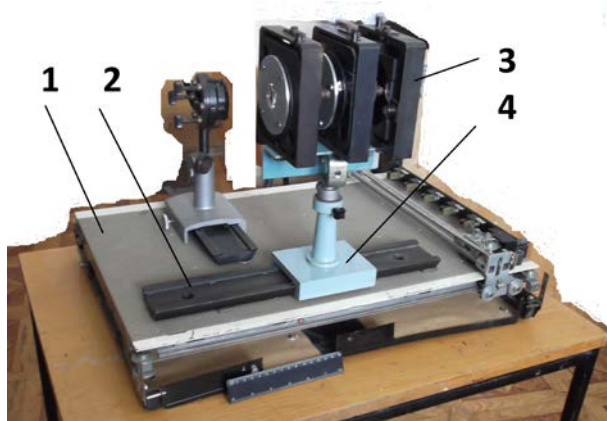


Рис. 3.8. Конструктивное исполнение стенда КРС на дискретных элементах:  
1 – плита; 2 – направляющая; 3 – линзово-фильтрующий узел; 4 – подставка



Рис. 3.9. Стенд измерений КРС на дискретных элементах под светозащитным кожухом

Для исключения влияния фоновых засветок стенд измерений КРС на дискретных элементах все его элементы, включая и источник излучения, размещены внутри светонепроницаемого кожуха (рис.3.9). Металлический кожух гарантирует светонепроницаемость во всём оптическом диапазоне спектра электромагнитного излучения.

#### 4. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

**ВНИМАНИЕ!** В установках КРС излучение лазера настолько мощное, что даже в отраженном виде может представлять угрозу для оператора и окружающих людей. Поэтому включить лазер можно лишь вставив в установку специальный ключ (5), который выдается оператору только после инструктажа и успешного прохождения теста на знание техники безопасной работы на установке. Работать следует в специальных защитных очках, предохраняющих зрение оператора от воздействия лазерного излучения.

При включённом лазерном источнике **ЗАПРЕЩАЕТСЯ**:

- отсоединять разъёмы оптоволоконных кабелей от установки;
- самостоятельно отсоединять оптоволоконный рамановский пробник (лабораторный зонд) от держателя образцов;
- снимать без необходимости крышку кюветного отделения держателя;
- присутствие посторонних лиц, не имеющих отношения к проводимым измерениям, в непосредственной близости с работающим спектрометром;
- оставлять работающую установку без присмотра ответственных за проведение измерений лиц.

Эксперимент выполняется после получения от преподавателя конкретного задания на проведение измерений, образцов для исследования и инструкций по технике безопасности. Экспериментальная часть работы сводится к креплению образца, регулировке его положения относительно зондирующего излучения и регистрации спектров.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чём состоит классическая теория комбинационного рассеяния?
2. Квантовая теория в интерпретации явления комбинационного рассеяния?
3. Каковы отличия между релеевским и комбинационным рассеянием света?
4. Что означают термины «стоксовы» и «антистоксовы» компоненты? Как они формируются?
5. Как соотносятся интенсивности «стоксовых» и «антистоксовых» компонент и их относительные расстояния от релеевской линии?
6. Можно ли зарегистрировать комбинационное рассеяние при возбуждении лазером, излучающим на длине волны, отличающейся от используемого в данной лабораторной установке? Как будет отличаться положение линий КРС в этом случае:
  - в шкале абсолютных длин волн?
  - в шкале относительных частотных расстояний (сдвигов) от частоты возбуждающей лазерной линии?
7. Дать объяснение причинам неодинакового числа линий, наблюдающихся в спектрах КРС разных индивидуальных соединений.



## ЗАДАНИЯ

1. Изучить описание установки для исследования КРС и её компонентов.
2. Сделать схему и эскиз экспериментальной установки с указанием основных размеров и расстояний.
3. Привести описание объекта исследования и методики его приготовления.
4. Составить таблицу использованного в экспериментах оборудования, приборов и элементов с их техническими характеристиками и параметрами.
5. Составить порядок выполнения эксперимента.
6. Измерить спектры КРС выданных объектов.
7. Путем сравнения полученных спектров с данными литературных и интернет-источников дать качественный, а возможно, и количественный анализ состава и структуры объектов.
8. Оформить отчёт по лабораторной работе.

## СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Горелик, В.С.* Комбинационное рассеяние света [Текст] / *В.С. Горелик* // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 6 – С. 91-96.
2. *Парфенов, В.А.* Лазерные методы в экологии [Текст] / *В.А. Парфенов.* – СПб.: ИТМО, 2009. – 95 с.
3. *Аграфенин, А.В.* Одновременное количественное определение глицерина и ацетата калия в водном растворе методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия) [Текст] / *А.В. Аграфенин* [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2014. – Т. 15. – № 3. – С. 48-51.
4. *Буриков, С.А.* Диагностика водно-этанольных растворов методом спектроскопии комбинационного рассеяния света [Текст] / *С.А. Буриков* [и др.] // Оптика атмосферы и океана, 2009. – № 11. – С. 1 – 7.
5. *Алимов, С.В.* Авиационный рамановский лидар с ультраспектральным разрешением [Текст] / *С.В. Алимов, О.Б. Данилов, А. П. Жевлаков* // Оптический журнал – 2009. – № 4. – С. 41 – 51.
6. *Тучин, В.В.* Оптическая биомедицинская диагностика [Текст] / *В.В. Тучин* // Известия Саратовского университета. 2005. – Т. 5. Сер. Физика. – Вып. 1. – С. 39 – 53.
7. *Гладышев, Е.* Спектроскопия комбинационного рассеяния для исследования витаминов-антиоксидантов [Текст] / *Е. Гладышев, С. Куценко, В. Храмов* // ФОТОНИКА. – 2009. – № 6. – С. 22 – 26.
8. *Братченко, И.А.* Устройство диагностики рака кожи методом спектроскопии комбинационного рассеяния [Текст] / *И.А. Братченко, В.Н. Гришианов, В.П. Захаров* – Патент РФ № 2506049 МПК А61В 6/00. Опубликовано 10.02.2014. Бюл. № 4.
9. *Золотухина, А.Д.* Диагностический потенциал совмещения оптической когерентной томографии с комбинационной спектроскопией. [Текст] / *А.Д. Золотухина, В.Н. Гришианов, И.А. Братченко.* – Сборник конкурсных докладов X Всероссийского молодёжного Самарского конкурса-конференции научных работ по оптике и лазерной физике. (Самара, 7 – 11 ноября 2012 г.). – Самара: СФ ФИАН, 2012. – С. 298 – 304.

*Учебное издание*

**СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ  
В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ**

*Электронные методические указания*

Составитель

***Гришанов Владимир Николаевич***

Редактор И.И. Спиридонова  
Довёрстка И.И. Спиридонова

Арт. 54/2015.

федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Самарский государственный аэрокосмический  
университет имени академика С.П. Королева  
(национальный исследовательский университет) (СГАУ)  
443086 Самара, Московское шоссе, 34.

---

Изд-во СГАУ 443086 Самара, Московское шоссе, 34.