

## 基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法

崔 晗<sup>1</sup>, 王 允<sup>1\*</sup>, 邱丽荣<sup>1</sup>, 赵维谦<sup>1</sup>, 朱 恪<sup>2</sup>

1. 北京理工大学, 精密光电测试仪器及技术北京市重点实验室, 北京 100081
2. 中国科学院物理研究所, 北京 100190

**摘 要** 拉曼光谱技术因其光谱信息丰富、非接触、无破坏、样品用量少、高灵敏度等特点, 为现代前沿基础科研领域提供一种有力的分析手段, 成为分析科学的研究热点。激光共焦拉曼技术结合共焦显微探测和拉曼光谱探测技术, 具有空间分辨力高、可层析探测的优势, 在物理化学、材料科学、生物医学、考古及文物鉴定、刑侦科学等众多领域应用广泛。现有共焦拉曼系统由于在扫描过程中无法对探测点进行定焦, 因而在长时间的探测过程中会因环境变化、系统漂移等问题导致系统离焦, 从而造成测量结果存在误差甚至错误的问题。本文针对这一问题, 在现有共焦拉曼系统的基础上, 提出一种基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法。该方法利用二次曲线对光谱共焦曲线进行拟合, 通过寻找曲线最大值, 得到系统焦点, 进而在扫描过程中对每个探测点进行焦点定位后, 采集该点光谱信息, 从而保证扫描过程中系统始终位于焦点位置, 消除系统离焦对实验结果的影响, 实现共焦拉曼光谱系统的精确测量。通过仿真分析和实验结果表明: 本文提出的基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法可以有效消除系统离焦对实验结果造成的影响, 提高系统轴向定焦的准确度, 为共焦拉曼光谱技术的进一步应用提供了保证, 是一种行之有效的定焦准确、抗漂移强的拉曼光谱测量方法。

**关键词** 共焦拉曼; 二次曲线拟合; 高准确度; 抗漂移

**中图分类号:** O433.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2016)12-3958-05

### 引 言

自1990年Puppels等将共焦显微技术与拉曼光谱探测技术相结合发明共焦拉曼光谱技术, 并成功用于探测单细胞和染色体的形态与组成起<sup>[1]</sup>, 激光共焦拉曼技术因继承了拉曼光谱技术独特的“分子指纹”特性和共焦技术的高分辨层析成像特性, 而被作为极其重要的光谱探测手段广泛应用于物理学<sup>[2-3]</sup>、材料科学<sup>[4-5]</sup>、医学<sup>[6-7]</sup>、生物学<sup>[8]</sup>、地质学<sup>[9-10]</sup>、考古及文物鉴定<sup>[11]</sup>、刑侦科学<sup>[12]</sup>等领域。

在物理化学、生物医学等研究领域, 分析样品的化学成分、空间分布、表面物理化学性质时, 常以图像的形式来获取样品更多的信息, 因此需要将拉曼光谱探测由单点分析的方式拓展到对一定区域范围内样品的探测分析, 即拉曼光谱成像。然而, 在拉曼光谱成像时需要较长的探测时间, 常达几个小时, 甚至是几十小时<sup>[8]</sup>, 才能完成。而在长时间的实

验过程中, 例如活体探测, 由于生物的运动, 致使系统离焦<sup>[13]</sup>, 导致得出错误的结果; 另外, 仪器在长时间成像过程中受环境温度、振动、空气抖动等影响较大, 同样易使系统产生漂移, 从而导致样品被探测位置产生离焦。可见, 在采集光谱信息的过程中, 对系统进行实时定焦是非常必要的。由于现有共焦拉曼光谱探测技术不具备实时焦点跟踪能力, 因而在整个成像过程中, 无法补偿因样品探测位置偏移引入的离焦误差, 制约了共焦拉曼光谱成像技术的应用。为此, 本文基于二次曲线对光谱共焦曲线进行拟合, 寻找曲线极值点, 对系统进行精确定焦, 改善系统定焦准确性, 消除系统离焦对实验结果的影响。

### 1 共焦拉曼光谱技术基本原理

共焦成像原理是一种点对点的成像技术, 其将点光源、样品被测点和共焦针孔置于彼此对应的共轭位置上, 利用逐

收稿日期: 2015-12-04, 修订日期: 2016-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(61475020), 国家自然科学基金重点基金项目(51535002)和国家重大科学仪器设备开发专项(NIP)课题项目(2011YQ04013601, 2011YQ04013607)资助

作者简介: 崔 晗, 1990年生, 北京理工大学光电学院博士研究生 e-mail: cuih1990@gmail.com

\* 通讯联系人 e-mail: alotrabbits@163.com

点照明和空间针孔调制来去除样品非焦点平面散射光，与传统成像方法相比可以提高光学分辨力。

共焦拉曼系统原理如图 1 所示，激光经准直扩束并被 Notch Filter 反射后，经物镜在物体表面聚焦成光斑，激发出载有样品信息的拉曼散射光，拉曼散射光沿原光路返回，再透过 Notch Filter 将拉曼散射光导入放置于单色仪前面的共焦针孔内，形成点检测，单色仪只接收来自物镜焦点处的拉曼散射光，焦点以外的光全被针孔屏蔽。当物体恰好位于焦平面时，单色仪接收到的拉曼散射光能量最大；当物体偏离焦平面时，拉曼散射光被聚焦于像焦平面前或后的某个位置上，此时单色仪仅接收到部分光谱能量，因此，样品离焦时容易造成探测信号降低，进而造成扫描成像结果错误。

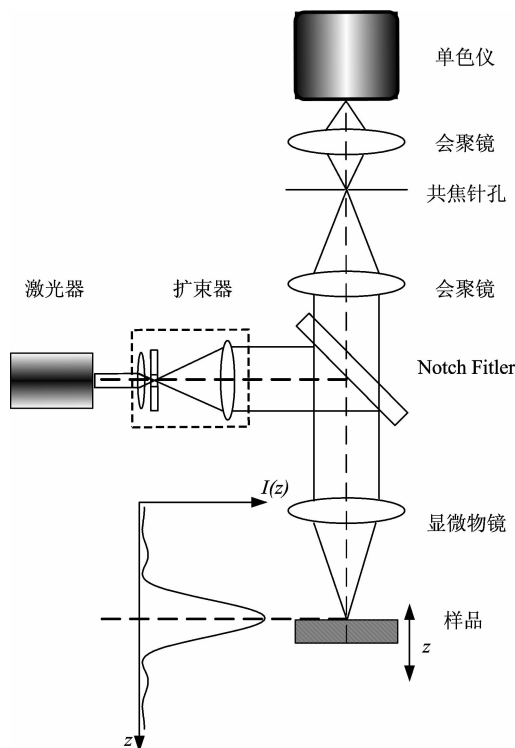


图 1 共焦拉曼原理图  
Fig. 1 Diagram of confocal Raman spectroscopy

因此，根据共焦拉曼成像原理，为获得足够强度的拉曼光谱信号，测量时需要将样品进行准确对焦，而现有共焦拉曼光谱系统依靠图像清晰度进行对焦，同时无法进行焦点跟踪，不能补偿实际测量中因样品离焦而造成的影响。

从图 1 中可以看出，共焦拉曼光谱轴向曲线呈钟形分布，峰值点准确对应物镜焦点，但是实际测量中，受采样间隔限制，测量数据呈离散化分布，难以精度捕获峰值点，并且受系统噪声影响，峰值点附近数据可能发生无规律跳跃，如图 2 所示，导致峰值点位置由点 H 偏移到了点 M，造成焦点定位错误，进而影响共焦拉曼系统的成像质量，因此，针对该问题本文提出基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法。

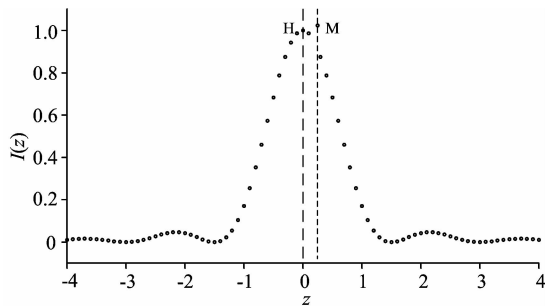


图 2 共焦拉曼曲线最大值对比图  
Fig. 2 Comparison of maximum position of confocal curve

## 2 算法原理

### 2.1 基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测原理

为解决系统离焦及定焦不准确对测量结果造成的影响，我们拟利用基于曲线拟合的共焦拉曼光谱测量方法进行改善。本文利用现有共焦拉曼技术中的光谱轴向响应曲线，采用对每个探测点进行定焦的方法消除共焦拉曼光谱系统因离焦对结果造成的影响，采用曲线拟合寻找共焦曲线峰值点的方法确定共焦拉曼系统焦点，消除共焦拉曼系统因随机误差对测量结果准确性的影响。

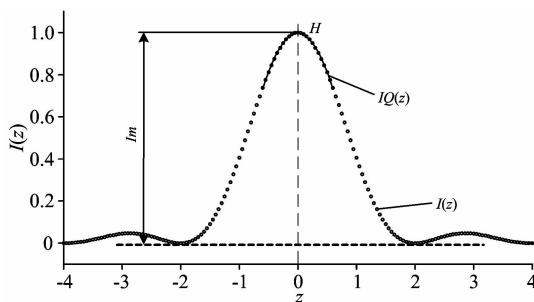


图 3 共焦拟合算法原理  
Fig. 3 Schematic diagram of confocal fitting algorithm

共焦拟合算法基于二次曲线拟合，利用共焦曲线最大值两侧边附近区间内的数据，拟合二次曲线方程，通过寻找二次曲线方程的峰值点确定共焦曲线极值点位置，进而确定系统焦点位置。从共焦系统的轴向响应特性曲线可以看出，其理论特性曲线关于极值点位置左右对称，并且在极值附近的数据具有二次曲线特性。因而，如图 3 共焦拟合算法原理所示，该方法利用共焦曲线靠近极值点附近的数据来进行拟合，而由该数据段拟合得出的共焦特性曲线极值点位置的准确度也得到大幅提高。

本文利用二次曲线对光谱共焦曲线进行拟合，并采用最小二乘法进行回归方程求解，最小二乘法具有拟合数据与真实数据之间残差和最小的特点，使得拟合方程更能准确的反应真实数据的分布。

基于二次曲线拟合的拉曼光谱探测方法需要在显微物镜上安装物镜驱动器 (piezoelectric ceramic acuator, PZT) 以带动物镜进行轴向扫描，利用该方法进行拉曼光谱测量，具体

可分为以下五步:

Step1: 通过计算机软件设置扫描层数  $N$ , 通过确定扫描上下限, 及扫描层间隔, 得到相应的扫描层数  $N$ ;

Step2: 通过 PZT 控制物镜移动, 快速探测每层位置的拉曼光谱;

Step3: 提取每层光谱光强最大值  $I_m$ , 获得光谱共焦曲线  $I$ ;

Step4: 基于二次曲线, 对光谱共焦曲线  $I$  进行拟合, 并获得系统焦点位置;

Step5: 利用 PZT 驱动物镜移动到 Step4 中获得的焦点位置, 并探测焦点位置拉曼光谱。

图 4 为基于二次曲线拟合的拉曼光谱探测方法的焦点定位流程图。

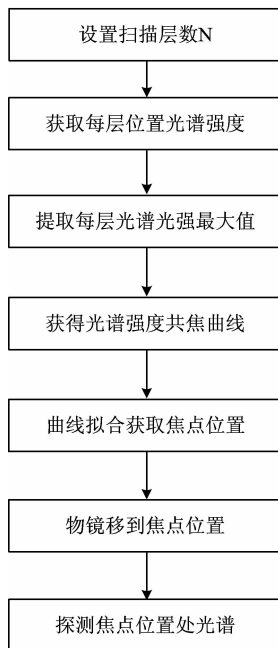


图 4 焦点定位流程图  
Fig. 4 Flow chart of focalization

## 2.2 仿真分析

如图 3 共焦曲线拟合原理所示, 对共焦曲线进行二次曲线拟合时, 拟合数据段区间的选取需要兼顾拟合优度, 随着拟合区间的扩大, 拟合优度降低, 因此, 需要根据实际测量曲线和数据量进行优化选择。本文以共焦拉曼理论轴向响应曲线为对象, 采用连续曲线离散化数据作为拟合输入数组, 根据最小二乘拟合算法, 以残差为依据对共焦拉曼系统轴向定焦响应曲线的拟合区间进行仿真分析与优化选取。

本文以共焦曲线最大值附近、以附加 1% 高斯噪声的曲线的最大值 60%~95% 范围为备选区间, 针对于不同的区间, 对其进行仿真分析, 根据菲涅尔衍射理论, 构建共焦拉曼探测系统的标量理论模型, 对系统的轴向定焦响应进行仿真计算, 得到共焦拉曼探测系统的理论轴向响应函数, 并通过光学反向归一化公式获得系统拟合的目标函数, 以最小二乘法建立递归方程判别残差梯度方向, 迭代计算得到最佳拟合曲线, 并进行峰值点遍历定位。

为获得最优化的拟合结果, 本文针对数据拟合曲线的选取进行仿真分析, 对拟合优度和拟合区间进行了优化选择。从表 1 中可以看出, 拟合区间越接近极值附近, 其残差越小, 二次曲线特性越好。在所给范围内, 拟合区间为最大值 95% 时, 该段数据的残差最小, 二次曲线特性最好, 但是该区间范围较小, 拟合数据过少, 因此, 为兼顾拟合区间与拟合优度, 选取区间 82.5% 为拟合区间。为使拟合数据充足, 在 82.5% 区间附近 2.5% 范围内进行扩大选取, 发现该数据段内, 保证残差不变时的最大拟合区间为最大值的 81.5% 处。因而, 本文在均衡残差与拟合区间范围后, 选取最大值 81.5% 以上的数据为曲线拟合时的拟合数据。

表 1 拟合区间与残差值

区间/%	残差	区间/%	残差
95	$4.28 \times 10^{-5}$	72.5	$2.8 \times 10^{-3}$
92.5	$2.05 \times 10^{-4}$	70	$2.8 \times 10^{-3}$
90	$3.69 \times 10^{-4}$	67.5	$3.8 \times 10^{-3}$
87.5	$6.12 \times 10^{-4}$	65	$4.9 \times 10^{-3}$
85	$6.12 \times 10^{-4}$	62.5	$4.9 \times 10^{-3}$
82.5	$9.54 \times 10^{-4}$	60	$4.9 \times 10^{-3}$
80	$1.4 \times 10^{-3}$	57.5	$4.9 \times 10^{-3}$
77.5	$1.4 \times 10^{-3}$	55	$8 \times 10^{-3}$
75	$2 \times 10^{-3}$	50	$9.9 \times 10^{-3}$

基于以上仿真分析, 对光谱强度共焦曲线进行二次曲线拟合求解系统焦点位置的具体步骤如下。

Step1: 选取光谱强度共焦曲线强度最大值 81.5% 以上的数据点为二次曲线拟合区间;

Step2: 对选取的数据段利用二次曲线方程进行拟合, 得到二次曲线拟合方程  $IQ(z)$ ;

Step3: 对二次曲线拟合方程  $IQ(z)$  求导, 求解二次曲线拟合方程导数为零的点  $H$ , 即令  $\frac{dIQ(z)}{dz} = 0$ , 得到导数为零的点位置  $z = z_0$ ;

Step4: 被测点的焦点  $O$  位置即为  $z = z_0$  处。

## 3 结果与讨论

采用单晶硅为实验样品, 进行以下几组实验测试。现有共焦拉曼光谱技术与基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱技术受系统离焦影响的大小: 将样品分别置于物镜焦点位置、离焦 0.1~5  $\mu\text{m}$  范围内(其中, 0.1~1  $\mu\text{m}$  离焦范围内离焦采集间隔为 0.1, 2~5  $\mu\text{m}$  离焦范围内离焦采集间隔 1  $\mu\text{m}$ ), 并分别采用现有共焦拉曼光谱技术和基于二次曲线拟合的拉曼光谱探测方法进行拉曼光谱探测, 观察光谱信号强度变化。其中, 激发光源为 532nm, 激光器稳定性为  $\pm 2\%$  (8hrs  $\pm 1.5^\circ\text{C}$ ), 显微物镜放大倍率为 100 倍, 数值孔径为 0.9, 光谱 CCD 暗噪声为  $0.0006\text{e}^-/\text{s}/\text{pixel}$ 。图 5 和图 6 所示为两种方法在拉曼频移为  $520.7\text{cm}^{-1}$  时, 光谱强度信号变化。

图 5 为采用现有共焦拉曼光谱技术进行光谱强度变化测

试的实验结果,从图 5 中可以看出,当系统离焦  $0\sim 1\ \mu\text{m}$  时,光谱强度由 100% 减弱到 56%;当系统离焦  $1\sim 2\ \mu\text{m}$  时,光谱强度衰减到 27%,光强衰减速率减小;当系统离焦  $3\sim 5\ \mu\text{m}$  时,光谱强度由 15% 衰减到 6%,光谱强度趋于平缓;在系统离焦  $5\ \mu\text{m}$  时,光谱强度仅为焦点位置光谱强度的 6%,衰减明显。以上实验结果表明采用现有共焦拉曼光谱技术进

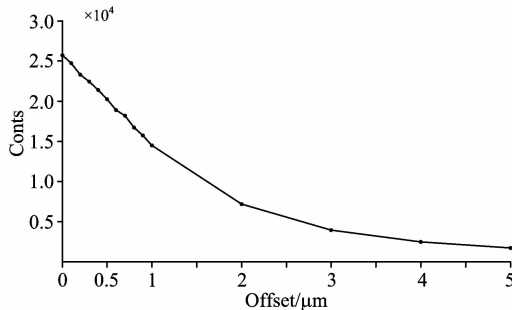


图 5 共焦拉曼光谱技术离焦实验结果

Fig. 5 Result of defocus by confocal raman microscope

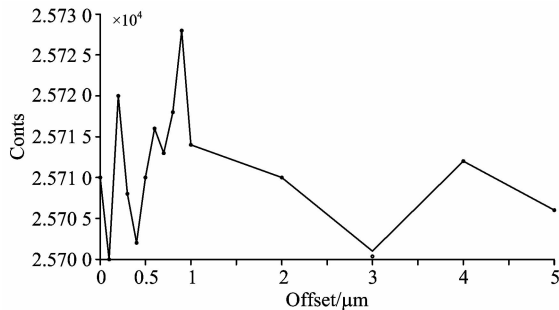


图 6 基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱技术离焦实验结果

Fig. 6 Result of defocus by confocal raman microscope based on quadratic curve fitting

行光谱测量时,受系统离焦影响严重,光谱光强衰减较大。

图 6 为采用基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱技术进行光谱强度变化测试的实验结果,从图 6 中可以看出,由于采用二次曲线拟合的方法精确寻找焦点位置,对被测样品进行实时定焦,保证系统始终位于焦点位置,因而,在实验中设定的  $5\ \mu\text{m}$  离焦范围内,光谱强度变化可以忽略,几乎保持不变。

从图 5 所示的结果中可以看出,现有共焦拉曼技术在没有实时定焦的情况下,随着系统离焦量的增大,光谱强度衰减逐渐减弱,最终趋于平缓。但是,在实际的实验测试中,受系统漂移、环境变化等影响,产生  $1\ \mu\text{m}$  以内的系统离焦非常常见,而从上述实验结果中可以看出,  $1\ \mu\text{m}$  离焦量范围内,光谱光强变化非常剧烈,从而严重影响了实际测试结果的准确性。从图 6 所示的结果中可以看出,本文提出的基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法,保证了系统始终位于焦点位置,在  $5\ \mu\text{m}$  离焦范围内光谱光强几乎保持不变,因而,可以有效改善系统离焦对实验结果的影响,同时利用光谱强度共焦曲线进行二次拟合,提高了焦点定位的准确度。

## 4 结 论

基于现有共焦拉曼技术,结合实际需求,提出了一种基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法,该方法对每个探测点进行定焦探测,消除了系统离焦对实验结果造成的影响,同时,利用二次曲线对光谱共焦曲线进行二次拟合提高了共焦拉曼系统定焦准确度。实验结果表明该方法具有定焦准确、抗漂移明显的效果,随着拉曼光谱应用需求的深入,对系统性能的要求也不断增加,基于二次曲线拟合的共焦拉曼光谱探测方法将在生物、材料等领域形成广泛应用。

## References

- [1] Puppels G J, De Mul F F M, Otto C, et al. Nature, 1990, 347(6290): 301.
- [2] WU Rong-lin, SHAO Zheng-zheng, CHANG Sheng-li(吴榕琳, 邵铮铮, 常胜利). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2014, 34(4): 982.
- [3] Ninet S, Datchi F, Dumas P, et al. Physical Review B, 2014, 89(17): 174103.
- [4] Jonathan J Schaefer, Ma Chaoxiong, Joel M Harris. Analytical Chemistry, 2012, 3, 84(21): 9505.
- [5] Mo Ramirez, Wisdom J, Li H, et al. Optics Express, 2008, 16(9): 5965.
- [6] Nabiev I, Chourpa I, Manfait M. Journal of Raman Spectroscopy, 1994, 25(1): 13.
- [7] Day J C, Stone N. Applied Spectroscopy, 2013, 67(3): 349.
- [8] Notburga Gierlinger, Tobias Keplinger, Michael Harrington. Nature Protocols, 2012, 7(9): 1694.
- [9] Sabine Szunerits, Michel Mermoux, Alexandre Crisci, et al. The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110(47): 23888.
- [10] Hope G A, Woods R, Munce C G. Minerals Engineering, 2001, 14(12): 1565.
- [11] Vandenabeele P, Edwards H G, Moens L. Chemical Reviews, 2007, 107(3): 675.
- [12] Stewart S P, Bell S E J, McAuley D, et al. Forensic Science International, 2012, 216: e5.
- [13] Christopher L Arrasmith, Chetan A Patil, David L Dickensheets, et al. A. Proc. of SPIE, 2009, 7169: 71690N1.

# Confocal Raman Spectroscopy Method Based on Quadratic Curve Fitting

CUI Han<sup>1</sup>, WANG Yun<sup>1\*</sup>, QIU Li-rong<sup>1</sup>, ZHAO Wei-qian<sup>1</sup>, ZHU Ke<sup>2</sup>

1. Beijing Key Lab for Precision Optoelectronic Measurement Instrument and Technology, School of Optoelectronics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China
2. Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

**Abstract** Raman spectroscopy plays an important role in analytical science because of its unique characteristics, such as non-contact and non-destructive detecting, fewer sample consumption, high sensitivity and other characteristics, and it provides a powerful analytical tool for the modern basic research fields. Because of the combination of confocal microscopy technology and Raman spectroscopy technology, confocal Raman microscopy has the advantage of both high resolution spectroscopy and chromatography detection, which inherits from confocal microscopy and Raman spectroscopy. As a result, it is widely used in many fields, such as physical chemistry, materials science, biomedical, archaeological, cultural identification, and forensic science. But with the environmental changing, the system drifting or other issues, during the long detection process, the system turns to defocusing. As a result, during the hole scanning process, the system can not be focused on every detection point, and then it would lead to a mistake. Eventually, conventional confocal Raman system could obtain the presence of measurement error even erroneous results in the long process. In this paper, on the basis of conventional confocal Raman system, a confocal Raman spectroscopy method based on quadratic curve fitting is proposed to solve this problem. Based on the principle that the maximum of the confocal curve corresponding the system focus, the steps to find system focus as follows: first, using quadratic curve to fit confocal curve; second, finding the maximum of the confocal curve; and last obtaining the system focus. With this method, during the scanning process, every point should be focused, therefore, the effect of defocusing is eliminated efficiently, and accurate measurements of confocal Raman spectroscopy system is achieved. Through simulation and experimental results show that: the proposed method that confocal Raman spectroscopy method based on quadratic curve fitting can effectively eliminate the influence of system defocus on experimental result, and effectively improve the axial system of fixed focus accuracy, which could provide a guarantee for further application of confocal Raman spectroscopy. This anti-drift method is effective and accurate in focusing with great potential to be applied in broader areas.

**Keywords** Confocal Raman; Quadratic curve fit; High accuracy; Anti-drift

(Received Dec. 4, 2015; accepted Apr. 22, 2016)

\* Corresponding author