

双波长激光移频激发拉曼光谱测试系统设计

王 昕¹, 吴景林¹, 范贤光¹, 许英杰¹, 卢仙聪¹, 左 勇²

(1. 厦门大学 航空航天大学, 福建 厦门 361005;

2. 北京长城计量测试技术研究所 国防科技工业第一计量测试研究中心, 北京 100095)

摘 要: 拉曼光谱检测常常受到荧光干扰, 而移频激发拉曼差分光谱法(SERDS)是一种有效抑制拉曼光谱荧光背景的方法。基于该方法, 采用两个波长相近、基于体布拉格光栅技术的固定波长激光器, 设计了一套拉曼光谱测试系统。通过控制激光器的功率和温度, 保证了输出波长的稳定性。采用高灵敏度的薄型背照式面阵 CCD, 设计了光谱数据采集光路和电路。同时, 在软件上实现了差分光谱的三种重构算法, 即简单积分算法、带数值插值的简单积分算法和多重约束解卷积算法。在实验中, 利用文中系统对强荧光背景的某品牌香油进行了拉曼光谱测量, 分别采用这三种算法处理差分光谱进行光谱重构, 并对比了重构效果。实验结果表明, 设计的系统能够有效抑制荧光对拉曼光谱检测的影响。

关键词: 移频激发; 拉曼光谱; 荧光抑制; 重构算法

中图分类号: TH744 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201645.0106005

Design of Raman spectroscopy measurement system based on shifted excitation method using two laser diodes with different wavelengths

Wang Xin¹, Wu Jinglin¹, Fan Xianguang¹, Xu Yingjie¹, Lu Xiancong¹, Zuo Yong²

(1. School of Aerospace Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. The 1st Metrology & Measurement Research Center of National Defense Science Industry of China, Changcheng Institute of Metrology & Measurement, Beijing 100095, China)

Abstract: Raman detection is often disturbed by fluorescence background, while Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy(SERDS)is an effective method for fluorescent suppression on Raman spectroscopy. Based on this method, a Raman spectroscopy measurement system was designed using two closely space fixed-wavelength laser diodes stabilized with the Volume Bragg Gratings. The output wavelength of laser diodes was stabilized by manipulating their power and temperature. The light path and circuit of spectral data acquisition were designed with back-thinned area array CCD with high sensitivity. Besides, the three different reconstruction algorithms of the difference spectrum, namely simple integration algorithm, simple integration with data interpolation algorithm and multiple energy constraint iterative deconvolution algorithm could be realized through software of this system. The Raman spectra of sesame oil of some brand in the presence of a highly fluorescent were measured with this system and then the spectra

收稿日期:2015-05-08; 修订日期:2015-06-09

基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ03012417)

作者简介:王昕(1984-),男,助理教授,博士,主要从事系统集成、信号处理技术研究。Email: xinwang@xmu.edu.cn

通信作者:范贤光(1980-),男,副教授,博士,主要从事光电信息与检测技术方面的研究。Email: fanxg@xmu.edu.cn

reconstructed with three different algorithms to process the difference spectrum respectively were compared. Experimental results show that the system designed in this paper can effectively reject the effect of fluorescence to the Raman spectroscopy measurement.

Key words: shifted excitation; Raman spectroscopy; fluorescence suppression; reconstruction algorithm

0 引言

拉曼光谱技术作为一种强有力的分子结构研究工具,广泛应用于食品安全、生物医学等领域^[1-2]。然而大多数食品、药品的拉曼光谱检测过程中都伴有强荧光干扰,荧光的存在严重影响拉曼光谱特征峰的识别,因此非常有必要采取措施抑制荧光干扰。

目前,抑制荧光干扰的方法主要分为以下三类:系统设计法^[3-4]、数值处理法^[5-8]和移频激发拉曼差分光谱法(Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy, SERDS)^[9-15]。系统设计法包括时间分辨拉曼光谱法^[3]和傅里叶变换拉曼光谱法^[4],所用的测量系统比较复杂且成本较高;数值处理法包括频域滤波法^[5]、多项式拟合法^[6-7]和小波变换法^[8],这类方法容易引入人为误差,并且荧光背景的多样性可能导致这类方法失效;移频激发拉曼差分光谱法是由 Shreve 等人首次提出的^[9],采用两波长相近的激发光源对样品进行检测,然后通过对两光谱作差的方法有效地消除荧光的影响,广泛应用在各种样品的拉曼光谱分析中。

SERDS 方法的应用需要解决激发光源和光谱重构算法两方面的问题。保证激发光源波长的稳定性是 SERDS 方法的前提条件,目前通常使用可调谐激光器来获得双波长或多波长激光。可调谐激光器一般采用电流控制技术、温度控制技术或机械控制技术。电流或者温度可调谐的激光器产生的激光波长不稳定,需要额外的装置进行持续波长监测以保证输出波长的稳定性^[13]。机械可调谐激光器装置存在可移动的部件,不适合集成到便携式拉曼光谱系统中^[14]。

光谱重构算法用于对差分光谱进行重构,目前常用的有曲线拟合法^[9]、积分法^[10]和解卷积法^[11-13]。曲线拟合法需要人工判断拉曼峰的个数而且对各参数的初值要求选择得当,自动化程度不高,只

适用于处理简单的拉曼光谱。Matousek 等人^[10]提出了简单积分算法和带数值插值的简单积分算法,算法简单易于实现。Zhao 等人^[11]提出了傅里叶解卷积算法,相比于传统的曲线拟合和手动的基线扣除算法,算法简单快捷,且不会引入额外的人为误差。然而,单纯的解卷积算法对噪声有放大作用且容易出现振荡现象。因此,蔡志坚等人^[15]在此基础上提出多重约束解卷积算法,可以在去除荧光背景的同时抑制噪声以及因差分光谱的正负谱峰强度不对称所引起的干扰,获得高信噪比的拉曼光谱。

为解决 SERDS 方法的两个关键性问题,文中设计了基于 SERDS 原理的拉曼光谱测试系统。系统中使用两个波长相近、基于体布拉格光栅技术的固定波长激光器(Laser Diode, LD),具有波长稳定、线宽窄等优点。同时,系统控制激光器的功率和温度,保证其输出波长的稳定性,结构紧凑、高效。在实验中,利用文中系统对某品牌香油进行了拉曼光谱测量,对测得的两个光谱进行了归一化和差值处理,然后分别利用简单积分算法、带数值插值的简单积分算法和多重约束解卷积算法对差值光谱进行了光谱重构,并比较三种算法的重构效果。

1 测量原理

文中系统基于 SERDS 原理,使用两波长相近的激光分别照射样品,从而得到两幅原始拉曼光谱。由于激发波长的微小改变对荧光影响很小^[16],宽频带的荧光背景几乎保持不变,而拉曼信号将整体发生轻微移动,如图 1(a)所示。因此,只要将两原始光谱归一化后相减得到拉曼差分光谱,如图 1(b)所示。在拉曼差分光谱中荧光背景相互抵消,仅保留拉曼信号,有效地抑制了荧光干扰。但是拉曼差分光谱不是真正的拉曼光谱,需要通过算法处理才能重构出样品真正的拉曼光谱。

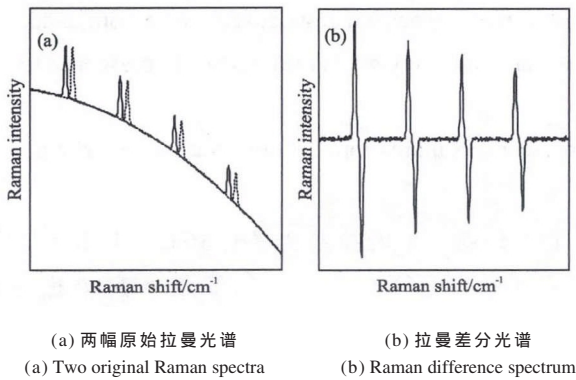


图 1 SERDS 原理图
Fig.1 Principle of SERDS

2 系统设计

文中研制的测试系统原理如图 2 所示, 具体设计如下:

(1) 两组激光器驱动电路分别保证两个激光器稳定工作在设定相同的温度和光功率下。

(2) 光纤光开关切换这两个激光器光源, 分别传输到拉曼探头以照射样品。

(3) 样品产生的拉曼光信号由拉曼探头收集, 经过光栅分光系统后入射到探测器 CCD 的光敏面上, 经光电转换变成光谱电信号。

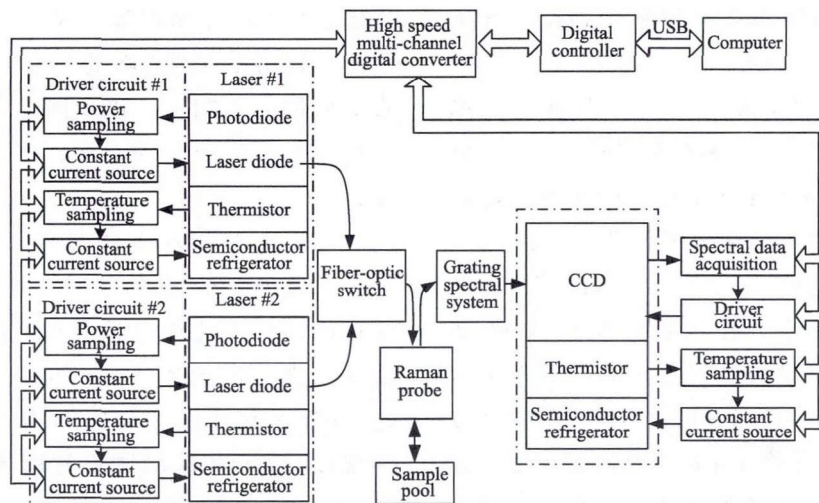


图 2 系统原理图
Fig.2 Schematic diagram of system

(4) 光谱数据采集电路处理相应的光谱电信号, 并通过 USB 将光谱数据传至计算机, 在软件上用 SERDS 技术分析处理拉曼光谱。

2.1 激光波长稳定性设计

SERDS 测量方法的关键是要保证 LD 光源波长的稳定性, 而功率和温度是影响 LD 输出波长的关键性因素。

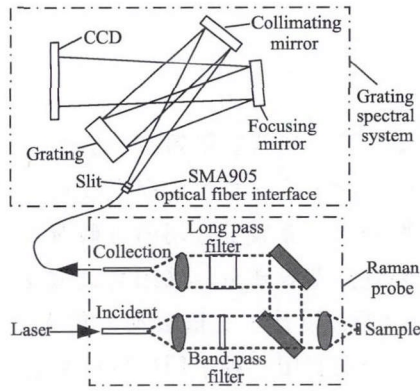
文中系统使用的两个激光器器件为美国 PD-LD 公司生产的波长固定的蝶形封装光纤耦合激光器, 波长分别为 784.7 nm 和 785.8 nm (波长由 Coherent 公司激光波长计, 型号 WaveMaster 测量获得), 半高宽小于 0.2 nm, 最大功率为 500 mW。蝶形封装激光器内置光电二极管、热敏电阻温度传感器和半导体制冷器模块。光电二极管用于监控 LD 输出的光功率, 利用功率负反馈机制进行 LD 自动功

率控制, 保证两激光器稳定地输出设定的光功率。采用精密恒流源驱动热敏电阻温度传感器进行精确的温度采样, 并通过由 MOS 管搭建的恒流源驱动半导体制冷器, 实现对 LD 的加热或制冷调节。模块 LD 器件温度的稳定度可以达到 0.1 °C, 波数稳定度可达到 0.5 cm⁻¹, 相比于两激光的波数差 18 cm⁻¹, 波数变化在可接受的范围之内, 满足移频激发实验的需求。

2.2 光谱数据采集设计

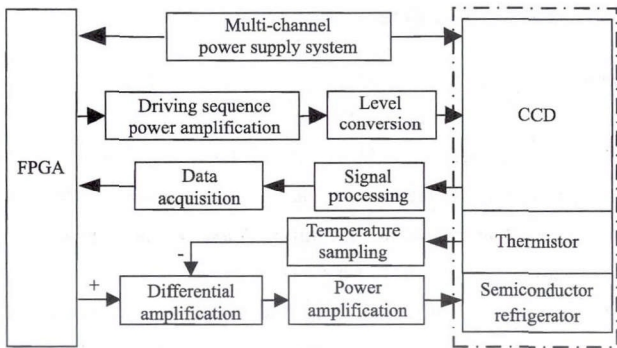
光谱数据采集包括光路和电路两部分, 如图 3 所示。系统中使用的 CCD 是一个高灵敏度的薄型背照式面阵 CCD, 具有低噪声和低暗电流特性。

图 3(a)为光谱数据采集光路, 激光通过拉曼探头的带通滤波器后聚焦到样品上, 拉曼探头收集样品的拉曼光信号并通过长通滤波器滤除瑞利散射光。拉曼光信号经光栅分光系统使拉曼散射光按波



(a) 光路图

(a) Diagram of light path



(b) 电路图

(b) Circuit diagram

图 3 光谱数据采集图

Fig.3 Diagram of spectral data acquisition

长在空间上分开并聚焦到 CCD 的感光面上,经光电转换得到光谱电信号。

图 3(b)为光谱数据采集电路,FPGA 产生 CCD 所需的多路驱动时序信号,经功率放大和电平转换后,与多路电源系统一起驱动 CCD 正常工作。在驱动时序下,光谱电信号逐个像素输出,经过相关双采样等一系列的信号处理和 AD 数据采集后送入 FPGA,之后通过 USB 传至计算机,进行进一步的分析处理。由于 CCD 的暗电流噪声与温度紧密相关,利用 CCD 内置热敏电阻温度传感器和半导体制冷器对 CCD 进行有效的制冷,进一步抑制暗电流噪声,提高采集电路的工作性能。

3 重构算法

文中采用简单积分算法^[10]、带数值插值的简单积分算法^[10]和多重约束的迭代解卷积算法^[11]三种算法,分别对差分光谱 D_n 进行处理以重构拉曼光谱。

(1) 简单积分算法是对差分光谱进行简单的线性数据操作,即采用如下所示的递归表达式:

$$S_n = S_{n-\Delta} + D_n \quad (1)$$

式中: S_n 为重构的拉曼光谱,第 n 个与第 $n-\Delta$ 个点的波数差为拉曼光谱频移值。由于公式(1)得到的光谱仍然残留小的曲线背景,此后还需要用三阶多项式拟合基线进行背景扣除。

(2) 带数值插值的简单积分算法是在简单积分算法基础上增加数值插值步骤,即:

$$S_n = D_n + \sum_{x=1}^{N-1} \left\{ \left[\frac{(w_n + \delta - w_x) \cdot (S_{x+1} - S_x)}{(w_{x+1} - w_x)} + S_x \right] \cdot [(w_x > w_n + \delta) \&\& (w_{x+1} \leq w_n + \delta)] \right\} \quad (2)$$

式中: S_n 为重构的拉曼光谱; w_n 为第 n 个点的波数;&& 项为逻辑与操作。由于残留背景,同样需要用三阶多项式拟合基线进行背景扣除。

(3) 多重约束的迭代解卷积算法为抑制噪声放大以及振荡,对解卷积过程施加三种约束,包括平滑约束 Q 、负能量约束 N 和正能量约束 P ,表示为:

$$R = (H^T H + \alpha Q^T Q + \beta N^T N + \gamma P^T P)^{-1} \cdot (H^T D) \quad (3)$$

式中: R 为要重构的拉曼光谱; H 为卷积核,是一个与两激光频率相关的方阵; D 为差分光谱; (α, β, γ) 为各约束算法的参数,用来设定不同约束的相对强度。

4 实验与结果

在实验中,利用所开发的拉曼光谱测试系统对某品牌香油进行拉曼光谱测量。两个激光器均设定工作在 25°C 、 200 mW 光功率下,CCD 的积分时间设为 3 s 。测量结果如图 4 所示。

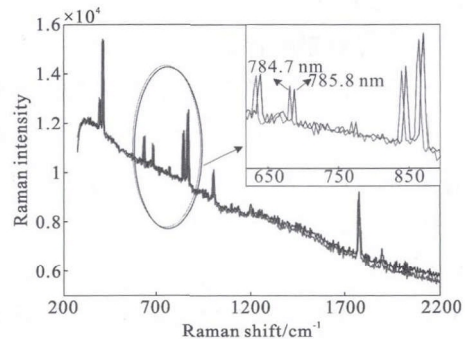


图 4 两激光分别对某品牌香油测量的拉曼光谱图

Fig.4 Raman spectra of sesame oil of some brand measured with two lasers respectively

从图 4 可知, 被测香油样品具有很强的荧光背景, 同时还存在一定的噪声干扰。由图 4 的插图可以清楚看到样品在两波长相近的激光激发下, 拉曼光谱整体发生了移动, 而荧光背景基本保持不变。

此外, 在实验测量中, 由于使用两个不同激光器激发样品可能导致采集的整体信号强度不同而造成光谱数据存在偏差, 因此在两光谱数据相减前需要进行归一化处理。将归一化后的两光谱相减得到差分光谱, 有效地抑制了荧光的干扰, 如图 5 曲线(a)所示。

使用简单积分算法、带数值插值的简单积分算法和多重约束的迭代解卷积算法三种算法, 分别对差分光谱进行处理以重构拉曼光谱, 重构效果分别如图 5 中的曲线(b)、(c)、(d)所示(其中, 曲线(a)为差分光谱; 曲线(b)为简单积分算法; 曲线(c)为带数值插值的简单积分算法; 曲线(d)为多重约束解卷积算法)。

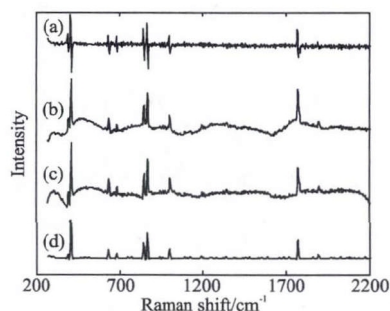


图 5 某品牌香油的 SERDS 重构效果图

Fig.5 Raman spectra of sesame oil of some brand reconstructed with different algorithms

从图 5 可看出, 三种算法都能有效地重构拉曼光谱。简单积分算法虽然算法简单, 但通过三阶多项式拟合基线进行背景扣除后仍然存在较大的背景残留, 而带数值插值的简单积分算法相比之下基线相对平稳。多重约束解卷积算法重构的光谱有效地避免了负能量峰和振荡现象的出现, 具有基线平稳、信噪比高的优点, 但算法复杂, 所需的处理时间远大于另外两种算法。

从实验中可看出, 文中设计的基于 SERDS 方法的系统能够有效地抑制强荧光背景对拉曼光谱的影响, 且对于幅度较小的拉曼峰也能够获得较好的重构效果。

5 结 论

文中设计了一套基于移频激发法的拉曼光谱测试系统, 采用两个波长相近的固定波长半导体激光器作为激发光源, 克服了常用的可调谐激光器波长不稳定或装置复杂等缺点。采用高灵敏度的薄型背照式面阵 CCD, 设计了光谱数据采集光路和电路。在软件上, 分别利用三种不同的重构算法实现了对强荧光背景的某品牌香油的光谱重构。实验结果表明, 该系统能够有效地抑制荧光背景, 为后续的定性研究提供可靠的依据。

参考文献:

- [1] Wu B, Chen K, Wang H. Composition dependence of molecular interactions in ethanol-water mixture studied by laser Raman spectra [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2013, 42(S1): 68-73.(in Chinese)
- [2] Fan Xianguang, Wang Xin, Xu Yingjie, et al. Design of Raman spectroscopy measurement system based on SHINERS [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2013, 42(7): 1798-1803. (in Chinese)
范贤光, 王昕, 许英杰, 等. 壳层隔绝纳米粒子增强拉曼光谱测试系统设计[J]. *红外与激光工程*, 2013, 42(7): 1798-1803.
- [3] Matousek P, Towrie M, Stanley A, et al. Efficient rejection of fluorescence from Raman spectra using picosecond Kerr gating[J]. *Applied Spectroscopy*, 1999, 53(12): 1485-1489.
- [4] Chase B. FT-Raman spectroscopy: a catalyst for the Raman explosion[J]. *Journal of Chemical Education*, 2007, 84(1): 75-80.
- [5] Mosier-Boss P A, Lieberman S H, Newbery R. Fluorescence rejection in Raman spectroscopy by shifted-spectra, edge detection, and FFT filtering techniques[J]. *Applied Spectroscopy*, 1995, 49(5): 630-638.
- [6] Zhao J, Lui H, McLean D I, et al. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy[J]. *Applied Spectroscopy*, 2007, 61(11): 1225-1232.
- [7] Lieber C A, Mahadevan-Jansen A. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra[J]. *Applied Spectroscopy*, 2003, 57(11): 1363-1367.
- [8] Bertinetto C G, Vuorinen T. Automatic baseline recognition

- for the correction of large sets of spectra using continuous wavelet transform and iterative fitting[J]. *Applied Spectroscopy*, 2014, 68(2): 155–164.
- [9] Shreve A P, Cherepy N J, Mathies R A. Effective rejection of fluorescence interference in Raman spectroscopy using a shifted excitation difference technique[J]. *Applied Spectroscopy*, 1992, 46(4): 707–711.
- [10] Matousek P, Towrie M, Parker A W. Simple reconstruction algorithm for shifted excitation Raman difference spectroscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 2005, 59(6): 848–851.
- [11] Zhao J, Carrabba M M, Allen F S. Automated fluorescence rejection using shifted excitation Raman difference spectroscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56(7): 834–845.
- [12] Osticioli I, Zoppi A, Castellucci E M. Fluorescence and Raman spectra on painting materials: reconstruction of spectra with mathematical methods[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37(10): 974–980.
- [13] Osticioli I, Zoppi A, Castellucci E M. Shift–excitation raman difference spectroscopy–difference deconvolution method for the luminescence background rejection from raman spectra of solid samples[J]. *Applied Spectroscopy*, 2007, 61(8): 839–844.
- [14] Martins M A S, Ribeiro D G, Pereira dos Santos E A, et al. Shifted–excitation Raman difference spectroscopy for in vitro and in vivo biological samples analysis [J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(2): 617–626.
- [15] Cai Z, Zou W, Wu J. A dual–excitation difference technique for fluorescence rejection in Raman spectroscopy [C]// Bioelectronics and Bioinformatics (ISBB), 2011 International Symposium on IEEE, 2011: 29–32.
- [16] Kasha M. Characterization of electronic transitions in complex molecules[J]. *Discuss Faraday Soc*, 1950, 9: 14–19.