

非法食品添加剂拉曼检测中的荧光抑制

周红武 蔡志坚* 吴建宏

(苏州大学信息光学研究所, 江苏 苏州 215006)

摘要 基于外腔半导体可调谐激光器(ECDL)设计了一种结构紧凑的移频激发差分拉曼光谱(SERDS)法的多波长光源,具有 15 nm 的波长调谐范围,优于 0.2 nm 的线宽以及最大 80 mW 的输出功率。提出用多重约束反卷积算法对 SERDS 差分光谱进行复原处理,可有效抑制噪声。应用 SERDS 方法对苏丹红 I 号、罗丹明 B、三聚氰胺、乌洛托品等非法食品添加剂进行了测量,证明该方法不仅能很好地去除荧光背景,而且能大幅提高检测信噪比。

关键词 光谱学; 拉曼光谱; 荧光抑制; 移频激发; 外腔半导体激光器; 反卷积

中图分类号 O433.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201340.0915001

Fluorescence Rejection in Raman Testing of Illegal Food Additives

Zhou Hongwu Cai Zhijian Wu Jianhong

(Institute of Information Optical Engineering, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract A compact shifted excitation Raman difference spectroscopy (SERDS) multi-wavelength light source based on tunable external cavity semiconductor laser (ECDL) is designed. A wavelength tuning range of 15 nm can be achieved, with the laser spectral line-width less than 0.2 nm and output power up to 80 mW. We also developed a deconvolution algorithm with multiple constraints to process the difference spectrum of SERDS, which can suppress the noises efficiently. This SERDS system is used to test several illegal food additives (sudan I, rhodamine B, melamine, hexamine). The results show that this method can effectively remove the background fluorescent and significantly increase the signal-to-noise ratio of Raman detection.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; fluorescence rejection; shifted excitation; external cavity diode laser; deconvolution

OCIS codes 300.6450; 140.3550; 170.5660

1 引 言

非法食品添加剂的滥用严重威胁着人民群众的健康甚至生命,近年来各类案件频发,成为社会广泛关注的热点,比如饮料塑化剂、馒头染色剂、苏丹红、三聚氰胺等。对此,必须加大执法监督力度,推广使用先进的检测方法和仪器。拉曼光谱技术具有测量速度快、制样简单、无损非接触、直接反映分子结构等优点^[1-2],在检测非法食品添加剂、爆炸物、毒品、药品等方面具有突出优势,便携式拉曼光谱仪的出现更是为拉曼光谱技术的推广应用奠定了基础。

拉曼光谱技术的大范围应用还存在两个主要的

障碍:1)检测限问题,即如何稳定地测出低浓度样品的拉曼光谱,目前普遍采用表面增强(SERS)技术来提高拉曼检测灵敏度;2)荧光干扰问题,即如何去除拉曼光谱中的荧光背景。由于大多数食品、药品、毒品、爆炸物在拉曼检测过程中都伴有强荧光,使拉曼测量信噪比变差,有时荧光背景甚至淹没拉曼信号,影响了拉曼定性和定量分析,因此必须采取有效措施来抑制荧光的干扰。抑制荧光有多种方法,如加入荧光猝灭剂^[3]、激光长时间照射漂白^[4]、紫外激发^[5]、近红外激发^[6]、基线校正^[7]、时间分辨光谱技术^[8]等。目前商用仪器中一般采用近红外785nm激

收稿日期: 2013-03-15; 收到修改稿日期: 2013-04-22

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(12KJB460007)

作者简介: 周红武(1987—),男,硕士研究生,主要从事拉曼光谱方面的研究。E-mail: zhouhong152102@163.com

导师简介: 吴建宏(1960—),男,博士,教授,主要从事全息光栅、大口径光栅、光电仪器等方面的研究。

E-mail: jhwu@suda.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: caizhijian@suda.edu.cn

发结合基线校正法,但是即便使用 785 nm 激发许多样品仍然会有较强的荧光,而用基线校正法可能引入人为误差不利于定量分析。移频激发差分拉曼光谱(SERDS)方法是近几年发展起来的一种技术^[9],适用于各种样品,荧光抑制效果较好。该方法的基本原理是利用两个相近波长的激光分别照射样品获得两幅拉曼谱,然后相减得到差分谱,由于拉曼谱峰位置紧随激发波长的改变产生平移而荧光光谱基本不随激发波长变化而变化,因此在差分谱中荧光背景互相抵消,只剩下与拉曼有关的信号,通过信号复原算法即可获得无荧光干扰的拉曼光谱。

SERDS 方法的关键在于光源和差分谱复原算法。光源方面,现有的 SERDS 方法大多采用多个独立半导体激光器或者可调谐半导体激光器,存在结构复杂、成本高的问题。算法方面,现有的复原算法有累加积分法^[10]、反卷积法^[11]、曲线拟合法^[12]等,存在抗噪声能力不强、可能导致分辨率下降等问题。由于便携式拉曼光谱仪对体积、成本、结构有特殊要求,并且稳定性和噪声性一般比实验室拉曼系统更差,因此 SERDS 方法要应用到便携式仪器上还必须进行改进,克服光源和复原算法两个方面的问题。本文设计了一种低成本外腔半导体激光器,作为 SERDS 的多波长光源,并提出用多重约束反卷积算法对差分谱进行复原,可以在去除荧光背景的同时抑制各种噪声和拉曼谱峰强度不一致等情况的干扰,获得高信噪比的拉曼光谱。利用这种 SERDS 系统对苏丹红 I 号、三聚氰胺等几种非法食品添加剂进行了拉曼检测,获得了无荧光干扰的高质量拉曼光谱。

2 基于外腔可调谐半导体激光器的 SERDS 多波长光源

2.1 外腔可调谐半导体激光器原理

便携式 SERDS 方法对光源的特殊要求包括:

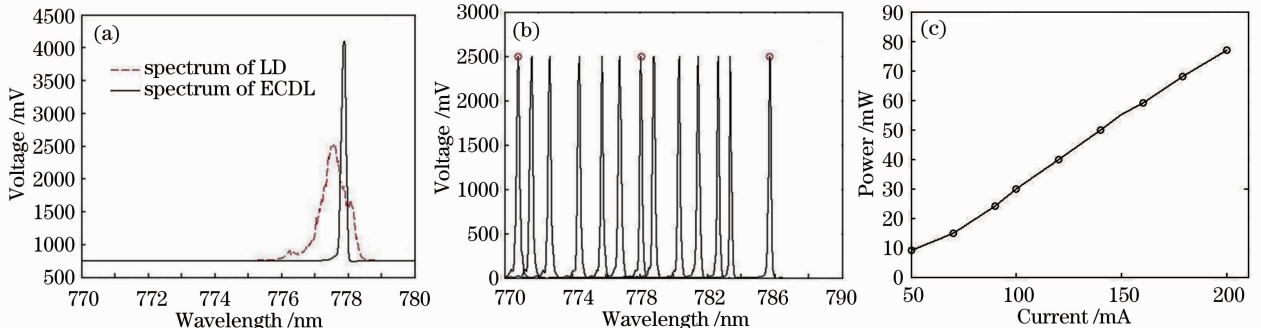


图 2 ECDL 输出特性。(a)线宽;(b)波长调谐范围;(c)输出功率

Fig. 2 Output characteristics of ECDL. (a) Line-width; (b) wavelength tuning range; (c) output power

体积小、成本适中、功率较高、光谱线宽窄、可输出多个波长。为了简化系统结构、减少成本,本课题组并没有使用多个独立半导体激光器,而是设计了 Littrow 结构的外腔可调谐半导体激光器(ECDL),其原理如图 1 所示。激光二极管(LD)管芯发出的激光经准直后投射在闪耀光栅上,零级直接出射,负一级衍射沿入射光方位原路返回,重新进入 LD 管芯参与内部模式竞争。外腔光栅起选频作用,不仅大幅增加了激光器的有效腔长,而且改变了 LD 内部增益曲线,使输出激光的光谱线宽被压窄。而且,转动光栅可以使输出波长发生改变,这样可以较容易获得多个波长的输出^[13-14]。

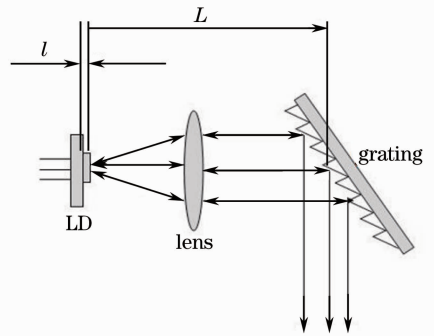


图 1 ECDL 的原理图

Fig. 1 Schematic of ECDL

2.2 外腔可调谐半导体激光器的输出性能测试

采用 CD 读写头上的低成本激光二极管设计了中心波长为 780 nm 的光栅弱反馈外腔可调谐激光器,光谱线宽从 1.2 nm 压窄到 0.2 nm,可获得 15 nm 的波长调谐范围,输出功率可达到 80 mW,输出功率与工作电流之间呈线性关系,即工作电流每增加 1 mA,激光输出功率将增加约 0.5 mW,基本符合 SERDS 对激发光源的要求,该激光器的性能测试实验结果如图 2 所示。

3 多重约束反卷积 SERDS 差分谱复原算法

SERDS 方法使用两个相近波长的激光分别照射样品获得两幅原始拉曼光谱 S_1 和 S_2 , 然后彼此相减得到差分谱 D 。原始拉曼谱中包含了荧光背景 F 和拉曼光谱 R , 而在差分谱 D 中荧光背景互相抵消只剩下与拉曼相关的信号。用 ν_1 与 ν_2 表示两次激光照射的频率, 差分谱信号处理过程可表示为:

$$\begin{cases} S_1 = F(\nu, \nu_1) + R(\nu, \nu_1), \\ S_2 = F(\nu, \nu_2) + R(\nu, \nu_2), \end{cases} \quad (1)$$

$$F(\nu, \nu_1) \approx F(\nu, \nu_2), \quad (2)$$

$$D(\nu) = S_1 - S_2 = R(\nu, \nu_1) - R(\nu, \nu_2). \quad (3)$$

由于拉曼谱随激发光频率的变化而产生平移, 这个平移过程可以表示成一个固定的拉曼谱 $R(\nu)$ 与不同频率下对应的 δ 函数的卷积, 即:

$$\begin{cases} R(\nu, \nu_1) = R(\nu) \otimes \delta(\nu - \nu_1), \\ R(\nu, \nu_2) = R(\nu) \otimes \delta(\nu - \nu_2), \end{cases} \quad (4)$$

$$D(\nu) = R(\nu) \otimes [\delta(\nu - \nu_1) - \delta(\nu - \nu_2)]. \quad (5)$$

令 $\delta(\nu - \nu_1) - \delta(\nu - \nu_2) = h(\nu)$, 则差分谱可以简写成:

$$D(\nu) = R(\nu) \otimes h(\nu). \quad (6)$$

将(6)式用矩阵的形式表示出来, 即:

$$\mathbf{D} = \mathbf{H} \cdot \mathbf{R}, \quad (7)$$

式中 \mathbf{D} 为差分谱, 是一个已知的一维列向量; \mathbf{H} 为卷积核, 是一个与两激光频率有关的方阵; \mathbf{R} 就是要复原的拉曼光谱。直接反卷积信号复原方法可用下式表达:

$$\hat{\mathbf{R}} = (\mathbf{H}^T \mathbf{H})^{-1} \mathbf{H}^T \mathbf{D}. \quad (8)$$

这种直接反卷积信号复原法没有考虑噪声的影响, 在复原过程中噪声会被放大。同时, 当差分谱中一对谱峰的正负强度不对称时, 复原结果就会产生严重的振荡。为了抑制噪声放大以及振荡, 必须对反卷积过程施加约束^[15]。本实验采用了三种约束, 包括平滑约束 \mathbf{Q} 、负能量约束 \mathbf{N} 和正能量约束 \mathbf{P} 。这种多重约束的迭代反卷积算法可表示为:

$$\mathbf{R}_k = (\mathbf{H}^T \mathbf{H} + \alpha \mathbf{Q}^T \mathbf{Q} + \beta \mathbf{N}^T \mathbf{N} + \gamma \mathbf{P}^T \mathbf{P})^{-1} \cdot (\mathbf{H}^T \mathbf{D}), \quad (9)$$

式中 (α, β, γ) 是算法的参数, 用来设定不同约束的相对强度。 \mathbf{Q} 是一个二阶差分拉普拉斯变换矩阵, 该约束条件抑制了复原结果中数据过快的起伏, 起到平滑的效果。 \mathbf{N} 是在一个零矩阵的基础上迭代演变而来的, 当上一次迭代结果中出现负数时, \mathbf{N} 矩阵对角线相应位置上的 0 就替换成 1, 这样可以控制复原

的光谱结果不出现负数。 \mathbf{P} 是从一个单位矩阵迭代演变而来的, 对于拉曼光谱信号较强的位置, \mathbf{P} 矩阵对角线相应位置的数值就从 1 开始减小, 放松约束, 而对拉曼光谱信号弱或没有信号的位置, \mathbf{P} 矩阵约束较强, 防止噪声和振荡的传播。算法以直接反卷积结果作为初始迭代值 \mathbf{R}_0 , 不断迭代并修正 \mathbf{P} 和 \mathbf{N} 矩阵, 最终达到稳定。最终的反卷积复原结果可以避免噪声被放大, 也可有效抑制振荡的传播, 使复原结果具有更高的信噪比。

4 拉曼光谱测量实验

为了检验上述荧光抑制方法的有效性, 针对非法食品添加剂问题, 选择苏丹红 I 号、罗丹明 B、三聚氰胺、乌洛托品作为拉曼测试的对象, 所有样品均为分析纯粉末状样品。采用如图 3 所示的测量光路组成一套 SERDS 系统。

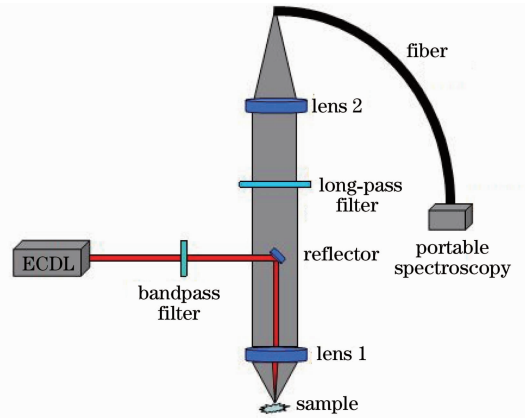


图 3 SERDS 拉曼系统光路

Fig. 3 Optical setup of SERDS Raman system

激发光源为自制 ECDL, 采用后向散射式拉曼收集光路。激光通过中心波长为 780 nm 的带通滤光片后, 经小口径反射镜、透镜 1 后聚焦到样品上, 后向散射光经过透镜 1 准直, 再经过一个截止波长为 800 nm 的长通滤光片滤除瑞利散射光, 最后经透镜 2 聚焦到便携式光谱仪 (Ocean Optics USB4000 型) 的光纤探头上, 实现拉曼光谱测量。

ECDL 的输出功率保持在 60 mW, 波长分别调至 780.6 nm 和 782.6 nm, 光谱仪 CCD 积分时间固定为 5 s, 对每个样品分别测得两个波长激发下的拉曼光谱。原始拉曼光谱测量曲线如图 4 所示, 实线对应 782.6 nm 激发下的拉曼光谱, 虚线对应 780.6 nm 激发下的拉曼光谱。由图 4 可以看出, 苏丹红 I 号和罗丹明 B 的荧光背景很强, 一些弱拉曼峰被淹没,

无法清楚地辨识,三聚氰胺和乌洛托品的荧光背景较小,但仍有一部分荧光干扰。而且这些原始拉曼

谱的数据噪声较大,一些拉曼峰在两个波长激发下出现了强度不一致的情况。

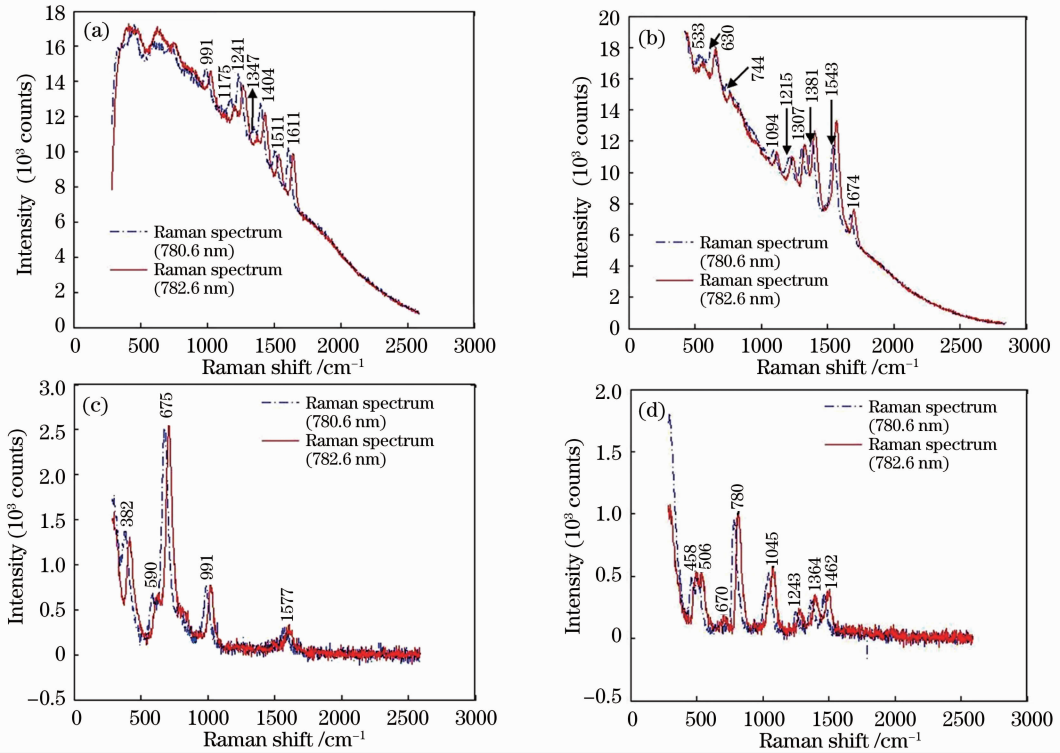


图 4 非法食品添加剂的拉曼光谱。(a)苏丹红 I 号;(b)罗丹明 B;(c)三聚氰胺;(d)乌洛托品

Fig. 4 Raman spectrum of illegal food additives. (a) Sudan I; (b) rhodamine B; (c) melamine; (d) hexamine

图 5(a)是苏丹红 I 号两波长激发的差分拉曼谱,从中可以看到荧光背景完全消失,只剩下拉曼光谱的差分。图 5(b)是用直接反卷积法复原的拉曼

信号,由于差分谱中有的拉曼峰强度不对称,导致直接反卷积结果中出现了严重的振荡。

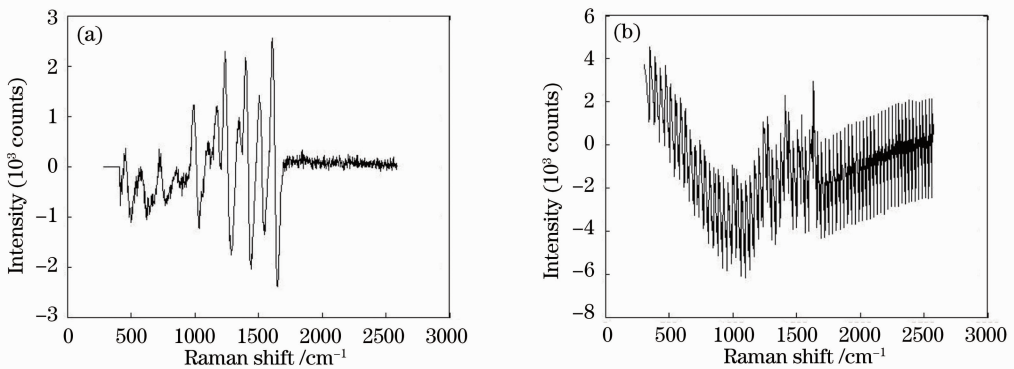


图 5 直接反卷积复原算法效果。(a)苏丹红 I 号的差分光谱;(b)差分光谱直接反卷积结果

Fig. 5 Effect of direct deconvolution algorithm. (a) Differential spectrum of Sudan I; (b) restoration results by direct deconvolution algorithm

利用多重约束反卷积算法对差分谱进行复原,得到的结果如图 6 所示。从拉曼信号复原的效果来看,基于 ECDL 和多重约束反卷积算法的 SERDS 系统不仅能很好地处理荧光背景强的样品,消除荧

光背景,使微弱拉曼峰清晰可见;对于荧光背景小的样品,该系统也能大幅提高检测信噪比,降低对硬件的要求。

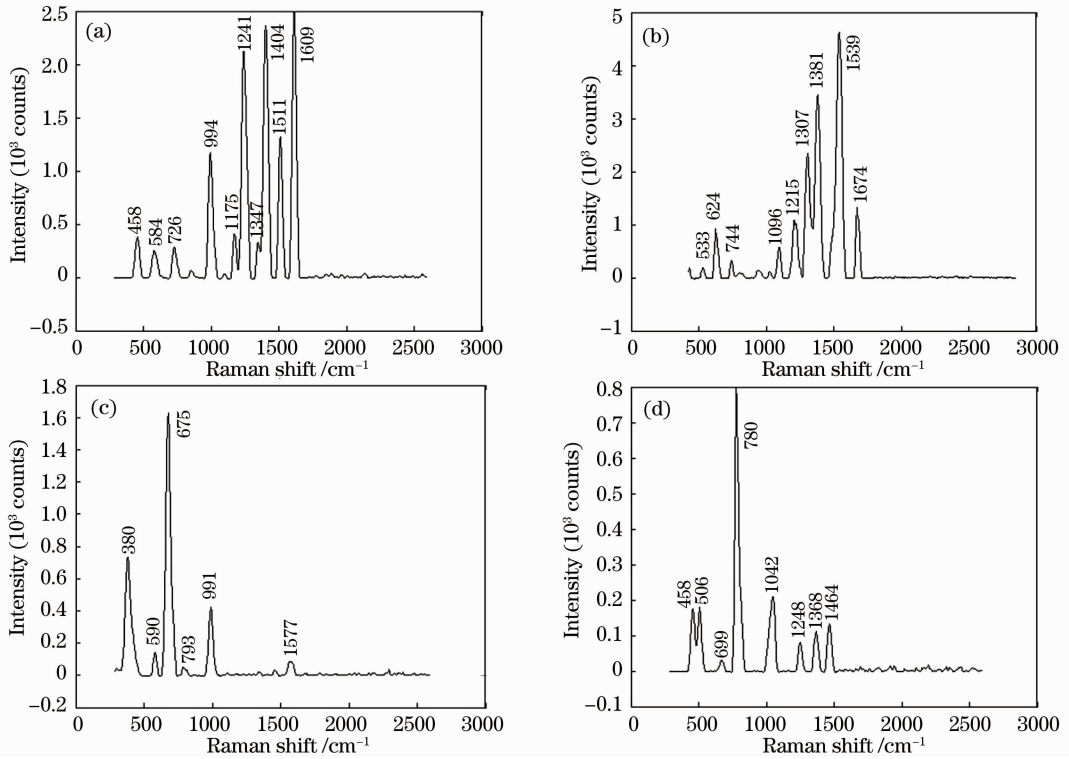


图 6 多重约束反卷积拉曼复原效果。(a)苏丹红 I 号;(b)罗丹明 B;(c)三聚氰胺;(d)乌洛托品

Fig. 6 Restored Raman spectra with multiple constraints deconvolution algorithm. (a) Sudan I; (b) rhodamine B; (c) melamine; (d) hexamine

5 结 论

采用外腔可调谐半导体激光技术实现了一种 SERDS 的便携式多波长光源,并针对便携式仪器稳定性和噪声性能相对较差的问题,提出了一种多重约束反卷积复原算法。通过对苏丹红 I 号、罗丹明 B、三聚氰胺和乌洛托品等非法食品添加剂样品的检测实验,证明了所提出的 SERDS 方法不仅能有效地去除荧光背景,而且可以抑制便携式仪器中的噪声、谱峰强度不一致等干扰,提高拉曼检测的信噪比。

参 考 文 献

- Huang Chao. Analysis of Single Cell Based on Optical Tweezers Raman Spectroscopy[D]. Nanning: Guangxi Normal University, 2007.
- 黄超. 基于光镊拉曼光谱的单细胞分析方法研究[D]. 南宁: 广西师范大学, 2007.
- Ai Min, Liu Junxian, Yao Huilu. Raman spectra of single reticulocytes and small lymphocytes in blood[J]. Acta Optica Sinica, 2009, 24(4): 1043-1046.
- 艾敏, 刘军贤, 姚辉璐. 外周血中单个网络红细胞与小淋巴细胞的拉曼光谱[J]. 光学学报, 2009, 24(4): 1043-1046.
- Yu Fang, Fang Yan, Wang Yali, *et al.*. Law of fluorescence quenching for dyemolecules[J]. Acta Photonica Sinica, 1993, 22(3): 239-244.
- 于芳, 方炎, 王亚利, 等. 染料分子荧光淬灭规律研究[J]. 光子学报, 1993, 22(3): 239-244.

- K Golcuk, G S Mandair, A F Callender, *et al.*. Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? [J]. BBA-Biomembranes, 2006, 1758(7): 868-873.
- J Zhang, S Yan, M Q Yuan, *et al.*. UV Raman spectroscopy study on the surface phase of ZrO₂ modified with Nd₂O₃ [J]. Mater Lett, 2011, 65: 201-204.
- Tian Guohui, Chen Yajie, Feng qingmao. The development and application of Raman spectroscopy[J]. Chemical Engineer, 2008, 148(1): 34-36.
- 田国辉, 陈亚杰, 冯清茂. 拉曼光谱的发展及应用[J]. 化学工程师, 2008, 148(1): 34-36.
- H Ruan, L K Dai. Automated background subtraction algorithm from Raman spectra based on iterative weighted least squares[J]. Asian J Chem, 2011, 23(12): 5229-5234.
- T Tahara, H Hamaguchi. Picosecond Raman spectroscopy using a streak camera [J]. Applied Spectroscopy, 1993, 47(4): 391-398.
- J Zhao, M C Carrabba, F S Allen. Automated fluorescence rejection using shifting excitation Raman difference spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2002, 56(7): 834-843.
- P Matousek, M Tourie, A W Parker. Simple reconstruction algorithm for shifted excitation Raman difference spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2005, 59(6): 848-851.
- L Osticioli, A Zoppi, E M Castellucci. Fluorescence and Raman spectra on painting materials: reconstruction of spectra with mathematical methods [J]. J Raman Spectroscopy, 2006, 37(10): 974-980.
- P A Mosier-Boss, S H Lieberman, R Newbery. Fluorescence rejection in Raman spectroscopy by shifted-spectra, edge-detection and FFT filtering techniques[J]. Applied Spectroscopy, 1995, 49(5): 630-638.

- 13 Zhang Hanyi, Pan Zhongqi, Yang Jinqiang, *et al.*. External cavity tunable semiconductor lasers with narrow linewidth[J]. *Physics*, 1995, 24(7): 429–433.
张汉一, 潘仲琦, 杨今强, 等. 可调谐单模窄线宽外腔半导体激光器[J]. *物理*, 1995, 24(7): 429–433.
- 14 Pan Zhongqi, Yang Jinqiang, Dong Qiming, *et al.*. An external-cavity semiconductor laser with a wide piezoelectric tuning range [J]. *Chinese J Lasers*, 1998, A25(6): 485–489.
潘仲琦, 杨今强, 董启明, 等. 电控宽带连续调谐外腔半导体激光器[J]. *中国激光*, 1998, A25(6): 485–489.
- 15 Zou Wenlong. The Method of Fluorescence Suppression in Raman Spectroscopy[D]. Suzhou: Soochow University, 2011.
邹文龙. 拉曼光谱检测中荧光抑制方法的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2011.

栏目编辑: 李文喆