

抑制容器荧光干扰的双轴共焦拉曼检测方法

戴艳^{1,2}, 董作人^{1,3}, 刘铭晖^{1,2}, 辛国锋¹, 孙延光¹, 蔡海文¹

¹中国科学院上海光学精密机械研究所中国科学院空间激光信息传输与探测技术重点实验室, 上海 201800;

²中国科学院大学, 北京 100049;

³南京简智仪器设备有限公司, 江苏 南京 210038

摘要 为消除拉曼光谱检测中样品装载容器的荧光背景干扰, 利用样品拉曼信号光与容器产生的荧光不共焦的特性, 设计了一种双轴共焦的检测光路结构。实验结果表明: 来自容器的荧光干扰幅度出现数量级的衰减, 拉曼信号光幅度下降了约 30%; 双轴共焦拉曼检测方法能够避免传统共轴共焦检测方法中拉曼信号光和荧光混合接收的问题, 解决了荧光干扰对拉曼信号动态检测范围的限制, 实现了对荧光材料容器装载样品拉曼信号的有效检测。

关键词 光谱学; 荧光干扰; 双轴共焦; 拉曼光谱

中图分类号 O433

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0711001

A Dual-Axis Confocal Raman Detection Method for Suppressing Fluorescence Interference from Containers

Dai Yan^{1,2}, Dong Zuoren^{1,3}, Liu Minghui^{1,2}, Xin Guofeng¹, Sun Yanguang¹, Cai Haiwen¹

¹Key Laboratory of Space Laser Communication and Detection Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³Nanjing Simple & Smart Instruments Co. Ltd., Nanjing, Jiangsu 210038, China

Abstract Aimed at eliminating the fluorescence interference from containers of the sample in the detection of Raman spectroscopy, a dual-axis confocal detection scheme is proposed based on the characteristic that the fluorescence generated by the container and the Raman signal of the sample are not confocal. The experimental results show that the fluorescence interference signals from the container are reduced by an order of magnitude, and the intensity of Raman signal decreases by about 30%. The dual-axis confocal Raman detection scheme can solve the mixed reception problem of Raman signal and fluorescence in the conventional coaxial confocal Raman detection scheme, solve the limitation of the dynamic detection range of Raman signal caused by the fluorescence interference, and achieve the effective detection of Raman signal of the material in fluorescent material containers.

Key words spectroscopy; fluorescence interference; dual-axis confocal; Raman spectroscopy

OCIS codes 300.6450; 300.6280; 260.2510; 180.5655

1 引言

拉曼光谱检测技术具有简便快捷、灵敏度高和无损检测等优点, 在生物医学、化学分析、食品安全和考古等领域应用广泛^[1-4]。目前, 荧光干扰是阻碍

拉曼光谱检测技术发展的一个普遍问题。当受到激光照射时, 被测样品不仅会被激发出表征信息的拉曼散射光, 还有可能被激发出荧光, 如样品装载容器的荧光和样品本身的荧光。通常情况下, 荧光信号的强度远远大于拉曼散射光强, 有的可以达到拉曼

收稿日期: 2017-12-15; 收到修改稿日期: 2018-02-06

基金项目: 国家自然科学基金(61535014, 61475165, 61775225)

作者简介: 戴艳(1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事拉曼光谱检测方面的研究。E-mail: daiyan@siom.ac.cn

导师简介: 董作人(1971—), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事光电检测方面的研究。

E-mail: zrdong@siom.ac.cn(通信联系人)

光强的上千倍^[5-6],甚至会淹没拉曼信号,使拉曼光谱不可识别,因此研究荧光干扰的抑制方法十分必要,这对于拉曼光谱检测技术的发展具有重要意义。

随着拉曼光谱检测技术的发展,消除荧光干扰的方法层出不穷,主要有扣除荧光基线的软件算法^[7-9]、差分拉曼法^[10-12]和空间偏移拉曼光谱(SORS)技术^[13-14]等。

扣除荧光基线软件算法和差分拉曼法都是对测量后的拉曼光谱数据进行处理,在荧光干扰背景中提取拉曼信号。这些方法通常适用于处理荧光光谱变化比较平缓 and 拉曼信号比较强的情况,但由于算法误差的影响,这些方法难以识别弱小的拉曼信号。对于比较复杂的荧光光谱形状和噪声较大的光谱,这些方法的误差更大,甚至可能会产生误判。对于完全淹没在强荧光信号中的拉曼信号,这些方法更是无能为力。

当被测样品自身没有荧光或有弱荧光时,就需要解决容器产生的荧光干扰。SORS 技术利用拉曼散射光在样品深层扩散时横向转移的特性,将检测点设置在偏移激发点一定距离处,这样虽然可以避免容器的荧光干扰,但接收到的拉曼散射光强度也变得很弱,对光谱探测器的灵敏度要求很高,导致硬件成本昂贵,不利于大范围推广使用。

采用无荧光效应的石英材料制作样品容器也是一种消除荧光的解决方案,但石英材料价格是普通玻璃材料(如硼材料)的几十倍,增加了测试成本,降低了产品竞争力。

目前,大多数拉曼设备的检测探头都采用共轴共焦光学结构,这种探头的激光发射和拉曼信号接

收光路是共轴重合的,在接收拉曼散射光的同时无法避免荧光信号的接收。本文提出一种抑制样品装载容器荧光接收的双轴共焦拉曼检测方法,激发光路和拉曼信号接收光路的光轴在空间上有一定夹角,通过聚焦透镜共焦在一点,与共轴共焦光学结构一样满足物(发射光纤)像(接收光纤)共轭关系,可以接收到在焦点处样品被激发的拉曼信号,而荧光激发区域由于偏离了共焦点位置,因此荧光信号不会被接收。该方法可以有效抑制容器荧光的干扰,解决了荧光干扰对拉曼信号动态范围调整的限制问题,拓展了拉曼光谱检测技术的应用范围。

2 原理和方法

目前,拉曼光谱检测设备采用的拉曼探头大都是 Dilor、InPhotonics 等公司的产品,是一种双光纤共轴共焦结构^[15],如图 1(a)所示。在发射光路中,激光器发射的激光经高反镜(HR)和二向色镜(DM)引入接收光路中,并与其平行共轴,再经聚焦透镜(F)两光路共焦在一点。图中 CM1 和 CM2 分别为发射光路和接收光路的准直镜,NBF 为窄带滤光片,HPF 为高通滤光片。

共轴共焦光路原理如图 1(b)所示。通常接收光纤和发射光纤的数值孔径相同,而接收光纤的芯径是发射光纤的 2 倍,所以在共焦点处,被激发的散射光基本上都能被接收光纤收集,而远离焦点(距离大于接收光纤芯径)和焦平面前后的散射光会在探测接收焦平面上形成弥散斑^[16-18],基本不会被接收光纤收集,从而实现了共焦点处被测样品的拉曼光谱检测。

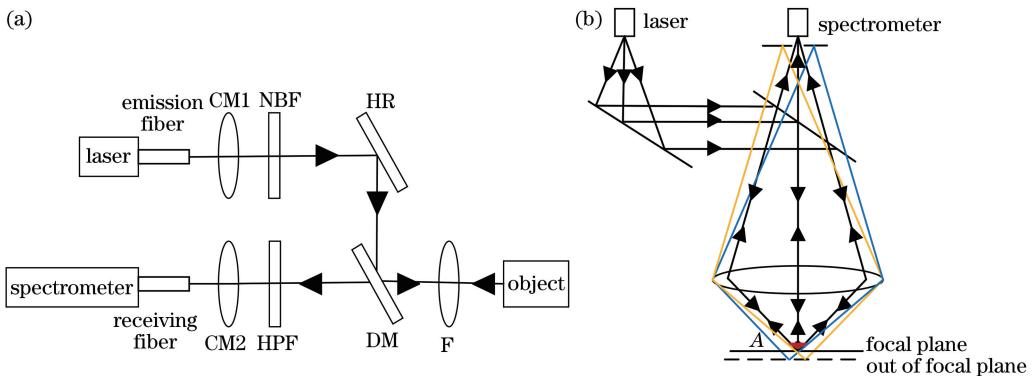


图 1 (a)传统共轴共焦拉曼检测方法;(b)共轴共焦光路原理

Fig. 1 (a) Scheme of conventional confocal and coaxial Raman detection; (b) principle of confocal and coaxial optical path

在实际应用中,采用共轴共焦光路结构的拉曼探头进行检测时,激发光透过容器聚焦在样品上,含有荧光的容器与被测样品在同一激发和探测光路

内,虽然容器偏离焦点位置,如图 1(b)A 处所示红色区域,但荧光信号通常是拉曼散射光信号的上千倍,所以接收光纤会不可避免地同时收集到拉曼散

射光和荧光。

为解决荧光信号对拉曼信号的影响,设计了一种双轴共焦拉曼检测方法,如图 2(a)所示,激发光轴与接收光轴之间成一定的夹角,并且共焦于被测样品表面。这样,容器壁上被激发的荧光区域不仅离焦,而且偏离接收光接收视场,如图 2(b)红色区域所示。这时,接收光纤收集到的大部分光是在接

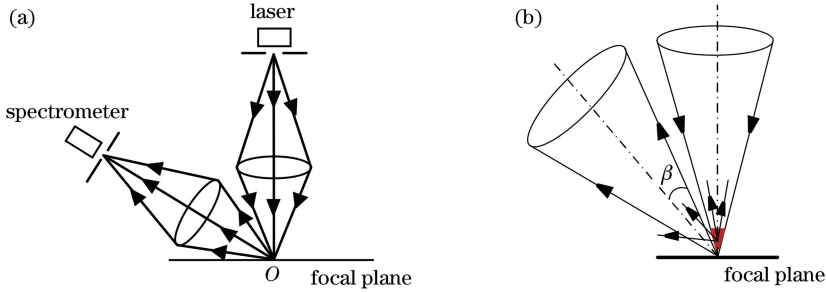


图 2 (a) 双轴共焦拉曼检测光路原理; (b) 细节图

Fig. 2 (a) Principle of dual-axis confocal optical path; (b) detail figure

3 实验设计

3.1 实验装置

实验装置主要由激发光路、接收光路、光谱仪、360°旋转平台、被测样品组成,如图 3 所示。

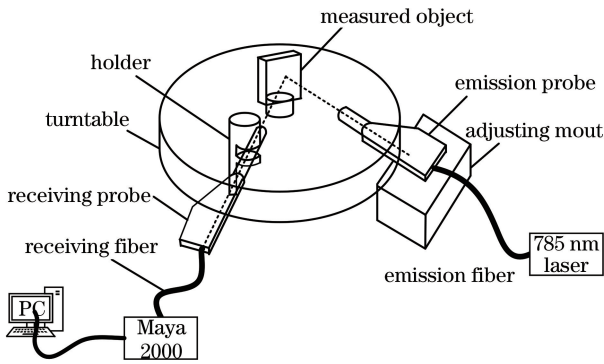


图 3 实验装置图

Fig. 3 Experimental setup diagram

激发光路、接收光路分别采用传统共轴共焦拉曼探头的激发和接收部分,其中激发光纤的纤芯直径为 105 μm ,接收光纤的纤芯直径为 200 μm ,两者的数值孔径均为 0.22 ± 0.01 。光谱仪使用 Maya2000(美国海洋光学公司),其分辨率为 3 nm;旋转平台为中空带有角度刻度的 360°旋转平台。

在测试操作过程中,接收探头固定在旋转平台上面的夹持器上,激发探头固定在旋转平台外侧的五维调整架上,被测样品安装固定在旋转平台的中心,调整容器的内表面(样品的被测点)位于旋转平台中心,通过五维调整架和夹持器调整激发光焦点、

接收透镜数值孔径范围内的拉曼散射光,而荧光信号幅度会显著下降,从而达到抑制容器荧光干扰的目的。收集到的荧光信号的强弱与激发光轴和接收光轴之间的夹角大小有关。原理上,激发光轴与接收光轴之间的夹角 θ 应满足:

$$\theta > 2\beta, \quad (1)$$

式中: β 为接收透镜(激发透镜)的收光锥角。

接收光焦点、样品被测点重合在旋转平台的旋转中心轴线上,并调整接收光和激发光的光轴构成的平面与旋转面平行。当旋转平台转动时,可带动接收探头一起转动,从而改变激发光与接收光之间的夹角。

实验的具体光路如图 4 所示。激发光纤的 785 nm 激光经准直镜成准直光束后通过 785 nm 窄带滤波片,再经过聚焦透镜聚焦到被测样品表面。激发光路与接收光路光轴之间的角度为 θ ,聚焦镜接收到信号光后经高通滤波片滤除 785 nm 瑞利光,再经准直镜入射到接收光纤内。接收光纤和光谱仪相连,再接入个人计算机(PC)显示光谱仪的探测信息。实验中若无特别说明,光谱仪的积分时间均为 1 s。

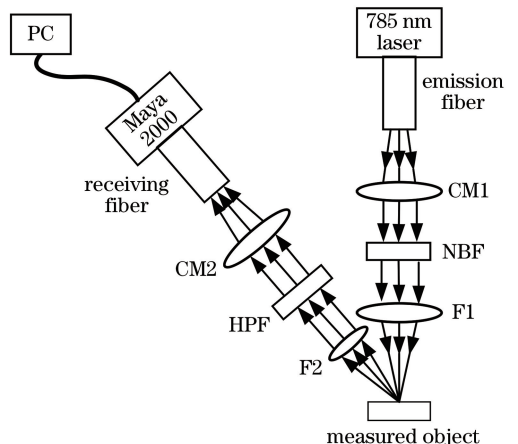


图 4 实验光路图

Fig. 4 Experimental optical path

3.2 实验结果

3.2.1 双轴夹角对拉曼信号强度的影响

采用双轴共焦检测方案测试在不同双轴夹角 θ 下山梨酚粉末样品的拉曼光谱。夹角范围为 $34^\circ \sim 84^\circ$ ，递增角度为 2° ，测试记录拉曼光谱（10 次测量后的平均光谱数据），作出 900.30 nm 处拉曼信号强度和 θ 的关系曲线，如图 5 所示。由图 5 可见：随 θ 增大，拉曼信号幅度呈单调下降的趋势，在 $34^\circ \sim 44^\circ$ 范围内，拉曼信号下降平缓；在 44° 位置处，山梨酚 900.30 nm 处的拉曼峰信号下降约为 2.5% ；在 64° 位置处，信号下降约为 40% ；在 84° 位置处，基本探测不到拉曼信号，如图 6 所示。

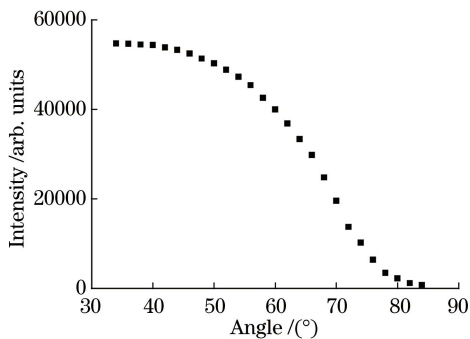


图 5 900.30 nm 处拉曼信号强度和双轴夹角之间的关系
Fig. 5 Relationship between Raman intensity at 900.30 nm and angle of dual-axis

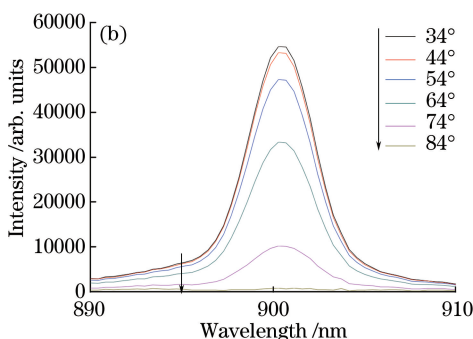
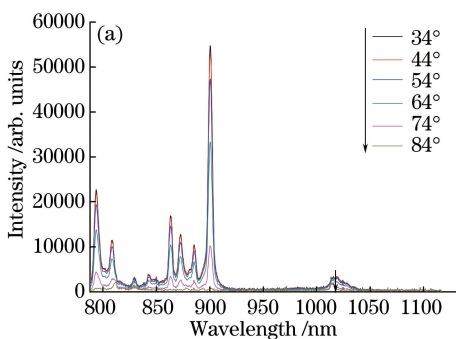


图 6 (a)山梨酚的拉曼光谱;(b) 900.30 nm 处放大图

Fig. 6 (a) Raman spectra of sorbitol; (b) enlarge image at 900.30 nm

实验测试结果表明，采用双轴共焦检测方案时，当双轴夹角小于一定值 (44° 以内) 时，对接收到的拉曼信号强度影响不大。

采用同样的测试方法，对空玻璃比色皿进行了荧光信号测试，结果发现：在 $34^\circ \sim 44^\circ$ 测量范围内，双轴夹角为 34° 时的荧光信号最大；接收到的荧光信号随着双轴夹角增大而不断减弱。

3.2.2 双轴夹角对荧光信号强度的影响

采用对比实验测试双轴夹角对玻璃比色皿容器（高硼硅）荧光的抑制作用，被测样品为山梨酚粉末。

从图 7 中可以看到：采用传统共轴共焦拉曼检测方法检测玻璃比色皿装山梨酚的拉曼光谱（垂直入射样品表面）时，由于玻璃的荧光干扰很强（最高幅度约为 38000 ），导致山梨酚在 885.30 nm (B) 和 872.70 nm (C) 处的拉曼峰变形，几乎被淹没，难于识别；采用双轴共焦方法检测玻璃比色皿装山梨酚的拉曼光谱，当双轴夹角为 34° 时，玻璃容器的荧光干扰信号基本被抑制，荧光最高幅度下降了约 92% ，从 38000 下降到 3000 ，减少了 1 个数量级， 885.30 nm 和 872.70 nm 处的拉曼峰清晰可见，易于识别，与无装载容器的山梨酚的拉曼光谱形状一致，

只是拉曼信号幅度下降了约 30% ，达到了抑制荧光干扰的目的。

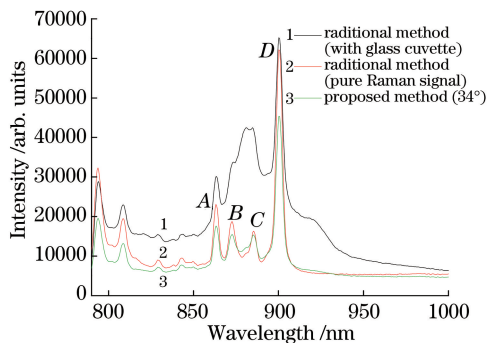


图 7 山梨酚的拉曼谱图对比

Fig. 7 Comparison of Raman spectra of sorbitol

对双酚 A 粉末也进行同样的对比测试，实验结果如图 8 所示，可以看到，相对于共轴共焦拉曼检测方法，采用所提方法检测到的双酚 A 粉末拉曼光谱中的玻璃容器的背景荧光干扰几乎被完全抑制， 869.08 nm (G) 和 897.72 nm (H) 处拉曼峰之间的荧光干扰幅度减少了约 95% ，而且样品本身的荧光强度也有所下降，拉曼谱峰信号幅度仅下降 30% 左右。

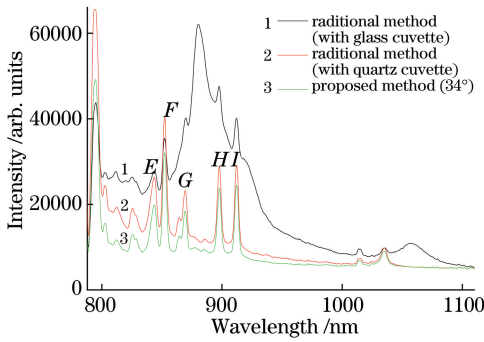


图 8 双酚 A 的拉曼谱图对比

Fig. 8 Comparison of Raman spectra of bisphenol A

4 分析与讨论

由(1)式可知,根据透镜的数值孔径 $N_A = \sin \beta = 0.25$ 计算得到可抑制荧光干扰的双轴夹角理论最小值 θ_{\min} 约为 29° ,即双轴夹角大于 θ_{\min} 时,由于容器荧光激发区域偏离接收范围,仅在接收光纤处形成弥散斑,能被光谱仪接收到的荧光干扰很小或几乎没有。实际的测试结果表明,当双轴夹角为 34° 时,玻璃容器荧光干扰信号幅度降低了一个数量级,而拉曼信号幅度虽然有小幅下降,但谱峰形状与原光谱一致,信噪比显著提升,实验结果与设计基本相符,说明双轴共焦检测方案是一种抑制被测样品装载容器荧光干扰的有效方案。

5 结 论

双轴共焦拉曼检测方法利用样品装载容器产生的荧光和样品拉曼散射光不共焦的特性,从光学原理上避免了拉曼检测中荧光和拉曼散射光混合接收的问题,达到了有效消除来自样品装载容器荧光干扰的目的,解决了光谱仪动态范围因被荧光干扰信号限制而无法进行调整的问题。

从实验测试结果中可以看到,所提检测方案对样品自身的荧光没有特别有效的分离作用。目前有效的抑制和消除样品自身荧光的方法是时间门控法,而更便利和低成本抑制样品荧光的方案有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Wei Y Q. Raman spectroscopy and its application in medicine [J]. Science and Technology Consulting Herald, 2011(33): 81.
 尉颖琪. 拉曼光谱技术及其在医学中的应用[J]. 科技创新导报, 2011(33): 81.
 [2] Hu J, Hu J M. Applications progress of Raman

techniques in analytical chemistry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2000, 28(6): 764-771.

胡军, 胡继明. 拉曼光谱在分析化学中的应用进展 [J]. 分析化学, 2000, 28(6): 764-771.

[3] Wang J Y, Wang M, Liu L, *et al.* Raman spectroscopy in archaeology [J]. The Journal of Light Scattering, 2006, 18(2): 130-133.

王吉有, 王冈, 刘玲, 等. 拉曼光谱在考古中的应用 [J]. 光散射学报, 2006, 18(2): 130-133.

[4] Fang X Q, Peng Y K, Li Y Y, *et al.* Rapid and quantitative detection method of sodium benzoate in carbonated beverage based on surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(9): 0930001.

房晓倩, 彭彦昆, 李永玉, 等. 基于表面增强拉曼光谱快速定量检测碳酸饮料中苯甲酸钠的方法 [J]. 光学学报, 2017, 37(9): 0930001.

[5] Mosier-Boss P A, Lieberman S H, Newbery R, *et al.* Fluorescence rejection in Raman spectroscopy by shifted-spectra, edge detection, and FFT filtering techniques [J]. Applied Spectroscopy, 1995, 49(5): 630-638.

[6] Chen S. Research on background deduction algorithm of Raman spectrum and its application [D]. Changsha: Central South University, 2011.
 陈珊. 拉曼光谱背景扣除算法及其应用研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[7] Wang H, Wang Y Z, Zhao Y, *et al.* Latest methods of fluorescence suppression in Raman spectroscopy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(7): 2050-2056.

王欢, 王永志, 赵瑜, 等. 拉曼光谱中荧光抑制技术的研究新进展综述 [J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(7): 2050-2056.

[8] Yang G Y, Li L, Chen H, *et al.* Baseline correction method for Raman spectra based on generalized Whittaker smoother [J]. Chinese Journal of Lasers, 2015, 42(9): 0915003.

杨桂燕, 李路, 陈和, 等. 基于广义 Whittaker 平滑器的拉曼光谱基线校正方法 [J]. 中国激光, 2015, 42(9): 0915003.

[9] Zhao F, Peng Y K. Measurement of iodine value of pork's subcutaneous adipose tissue by interval partial least square and Raman spectroscopy [J]. Chinese Journal of Lasers, 2017, 44(11): 1111001.

赵芳, 彭彦昆. 区间偏最小二乘法结合拉曼光谱测定猪肉皮下脂肪的碘值 [J]. 中国激光, 2017, 44(11): 1111001.

[10] Li F. Key techniques for suppression of fluorescence interference by frequency shift Raman excitation [D].

- Xiamen: Xiamen University, 2014.
- 李帆. 移频拉曼激发法抑制荧光干扰关键技术研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [11] Wu J L, Fan X G, Xu Y J, *et al.* Raman spectrum measuring device excited by multi-wavelength laser frequency shift excitation: 201510057825 [P]. 2015-05-06.
吴景林, 范贤光, 许英杰, 等. 一种多波长激光频移激发的拉曼光谱测量装置: 201510057824. 7 [P]. 2015-05-06.
- [12] Mou T T, Xiong S J, Zhao X, *et al.* Portable dual-wavelength fluorescence Raman spectrometry detection system: 201521113688.0 [P]. 2016-09-28.
牟涛涛, 熊胜军, 赵喜, 等. 便携式双波长消荧光拉曼光谱检测系统: 201521113688.0 [P]. 2016-09-28.
- [13] Matousek P, Clark I P, Draper E R, *et al.* Subsurface probing in diffusely scattering media using spatially offset Raman spectroscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 2005, 59(4): 393-400.
- [14] Matousek P. Inverse spatially offset Raman spectroscopy for deep noninvasive probing of turbid media [J]. *Applied Spectroscopy*, 2006, 60 (11): 1341-1347.
- [15] Yin L, Cai S W, Jiang X B, *et al.* A portable adjustable Raman probe: 201410061973.6 [P]. 2014-05-07.
殷磊, 蔡圣闻, 姜晓冰, 等. 一种便携式可调节的拉曼探头: 201410061973.6 [P]. 2014-05-07.
- [16] An Y. Research on the optical machine system of handheld Ramans pectrometer [D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2014.
安岩. 手持式拉曼光谱仪的光机系统技术研究 [D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2014.
- [17] Xiao X M. Comparison between two different Raman confocal techniques [J]. *Modern Scientific Instruments*, 2005(3): 17-20.
肖新民. 拉曼光谱仪的两种共焦显微术的对比 [J]. *现代科学仪器*, 2005(3): 17-20.
- [18] Wang Y J. Research on measurement and control technology of laser confocal Raman spectrometer [D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2016.
王雅杰. 激光共焦拉曼光谱仪测控技术研究 [D]. 北京: 北京理工大学, 2016.
- [19] Watanabe J, Kinoshita S, Kushida T. Fluorescence rejection in Raman-spectroscopy by a gated single-photon counting method [J]. *Review of Scientific Instruments*, 1985, 56(6): 1195-1198.
- [20] Martyshkin D V, Ahuja R C, Kudriavtsev A, *et al.* Effective suppression of fluorescence light in Raman measurements using ultrafast time gated charge coupled device camera [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(3): 630-635.