

# 消除拉曼光谱荧光背景的新方法及其应用

高国明<sup>1</sup> 李 雪<sup>2,3</sup> 覃宗定<sup>2,3</sup> 魏坤莲<sup>4</sup> 黄汉明<sup>1</sup> 刘军贤<sup>2</sup> 姚辉璐<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 广西师范大学计算机科学与信息工程学院, 广西 桂林 541004  
<sup>2</sup> 广西师范大学物理科学与信息工程学院, 广西 桂林 541004  
<sup>3</sup> 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003  
<sup>4</sup> 玉林市第一中等职业技术学校, 广西 玉林 537000

**摘要** 拉曼光谱信号,尤其是生物活体的拉曼信号,由于受到荧光背景噪声的影响,光谱复杂,在很大程度上影响了分析效果。依据荧光背景特点提出了一种基于信号极小极大值自适应缩放的消除荧光背景方法,从峰强与质量分数关系、单光谱与混合光谱关系两个方面验证可行性,并与传统基于多项式拟合基线校正的荧光背景消除方法进行对比,结果表明该方法优于传统方法。为了显示血液在活体小鼠耳朵组织中的二维和三维分布,选用血红蛋白的特征峰  $1549\text{ cm}^{-1}$  来做拉曼成像,与以往数据处理的方法所得到的图像进行对比,结果表明此方法能够获得较好的拉曼光谱数据,特别是对一些较弱的拉曼特征峰,成像结果更好。

**关键词** 拉曼光谱;荧光背景;信号处理;消噪;活体成像

中图分类号 O657.3 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201333.0230002

## New Method for Eliminating Background Fluorescence of Raman Spectrum and Its Application

Gao Guoming<sup>1</sup> Li Xue<sup>2,3</sup> Qin Zongding<sup>2,3</sup> Wei Kunlian<sup>4</sup>  
Huang Hanming<sup>1</sup> Liu Junxian<sup>2</sup> Yao Huilu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> College of Computer Science and Information Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

<sup>2</sup> College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

<sup>3</sup> Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi 530003, China

<sup>4</sup> The First Professional Specialized Middle School of Yulin, Yulin, Guangxi 530007, China

**Abstract** Raman signal, especially signal from living organisms, sometimes is interfered so seriously by the background fluorescence that it is too complex to get good result. According to the characteristics of fluorescence background, a new fluorescent background method based on min-max signal adaptive zooming is developed. To verify the feasibility of this method, two ways are used; one is the relation between peak intensity and concentration, the other is the relation between single spectrum and mixed spectra. Compared to the traditional fluorescent background elimination (polynomial fitting baseline correction), the results show that this method is highly feasible and superior to the traditional method. To image the 2D, 3D blood distribution in mice ear tissue in vivo, the peak at  $1549\text{ cm}^{-1}$  which is one of characteristic peaks of hemoglobin is selected. By comparing the image results generated by this new method with the former process way, the results show this method can optimize the Raman spectral data, especially for low-density Raman characteristic peaks, so the imaging results are better.

**Key words** Raman spectrum; fluorescence background; signal process; noise; *in-vivo* imaging

**OCIS codes** 300.6450; 300.6170; 100.2980

收稿日期: 2012-08-20; 收到修改稿日期: 2012-09-21

基金项目: 国家自然科学基金(60868002, 31060128)、广西自然科学基金(2012GXNSFFA060008, 2011GXNSFA018143)和广西科技攻关(桂科合 10100019-22)资助课题。

作者简介: 高国明(1987—),男,硕士研究生,主要从事拉曼光谱数据处理和地震数据处理等方面的研究。

E-mail: gmgao01@gmail.com

导师简介: 姚辉璐(1972—),男,研究员,硕士生导师,主要从事仪器开发及光谱分析等方面的研究。

E-mail: huiluy@gmail.com(通信联系人)

# 1 引 言

拉曼光谱以其非侵入、无损伤和无电离辐射的特点成为一种热门的物质分析与研究手段。然而基于光散射原理的拉曼光谱信号仅仅为原始激发光信号强度的  $10^{-8}$  左右<sup>[1]</sup>, 微弱的信号严重影响了拉曼光谱的分析应用能力。例如: 在拉曼光谱的平滑过程中, 一些峰值小信号弱的特征峰, 经过基线校正或光谱平滑处理后便无法识别; 再如散粒噪声对于信号较强的峰的污染严重, 一般的噪声消除方法无法根除。因此, 必须增强拉曼信号, 才能使拉曼光谱分析应用的范围更加广泛。拉曼光谱增强方法主要包括表面增强散射(SERS)<sup>[2,3]</sup>和拉曼光谱后期数据处理。SERS需要寻找表面粗糙化的活性基底材料或者合适粒径的纳米颗粒来增强拉曼信号, 然而这些材料仅限一些过渡金属, 且多数材料不适用于生物体, 因此拉曼光谱数据的后期数据处理就显得特别重要。

拉曼信号和其他的信号一样, 常常会受到各种噪声的干扰, 如高斯噪声、散粒噪声和荧光背景噪声等, 如何有效的消除这些噪声一直是拉曼光谱应用研究的一个热点。目前, 拉曼光谱降噪研究主要集中在利用小波消除能量均匀分布的白噪声方面, 对消除能量分布不均的噪声如散粒噪声和荧光背景的研究相对较少<sup>[4,5]</sup>。

本文建立了一种新的基于极小极大值自适应缩放的消除荧光背景方法, 并从峰强与质量分数关系、单光谱与混合光谱关系两个方面进行可行性验证, 与传统荧光背景消除方法(多项式拟合基线校正)进行对比, 结果表明该方法明显优于传统方法。此外, 还利用此方法对从活体小鼠耳朵组织区域收集到的拉曼扫描光谱数据进行处理, 对比以往数据处理方法得出的成像结果表明: 此方法能够获得较好的拉曼光谱数据, 尤其是对一些较弱的拉曼峰, 成像结果优化明显。

## 2 实验设备与信号收集

### 2.1 实验材料与设备

本实验动物为 3~5 周龄的无特定病原(SPF)级 KM 雄性小鼠, 重量在 15~25 g 之间, 购于广西医科大学动物实验中心。实验鼠用质量分数为 4% 的水合氯醛[0.1 mL/(10 g)]腹腔注射将小鼠麻醉, 并用脱毛膏将小鼠耳朵进行脱毛处理。本实验所采用的拉曼成像系统实验装置与参考文献[6]大致相同, 激

发光波长为 780 nm, 激光功率约为 15 mW。

### 2.2 信号扫描与收集

将小鼠麻醉后固定于载物台, 耳朵紧贴载玻片上, 选定合适的血管区域, 设定光斑在 X 轴、Y 轴上的步长均为  $2 \mu\text{m}$ , 并手动调节激光聚焦深度(即 Z 轴的步长), Z 轴的扫描步长为  $5 \mu\text{m}$ , 每个光谱的积分时间为 10 s, 使用 Winspace32 软件自动收集光谱信号并保存为 txt 格式。

## 3 数据处理与成像方法

### 3.1 荧光背景消除方法

消除荧光背景的主要目的是寻找拉曼波谱特征峰, 而这些特征峰常常处在一些较大的荧光背景上, 同时相邻特征峰常常会相互干扰, 甚至叠加在一起。为了消除荧光背景噪声和相邻峰间的影响, 提出一种基于信号极小极大值自适应缩放的荧光背景消除方法, 通过极小值与极大值位置确定信号峰的划分范围, 归零后通过自适应信号缩放来减少相邻峰的影响。信号处理方法步骤如下:

- 1) 对光谱进行平滑, 并使用小波阈值去噪方法消除高频白噪声;
- 2) 对处理后的信号抽取极小点位置;
- 3) 取相邻两个极小值点, 找到这两点之间极大值位置, 由极大值位置将该段信号分为左右两片;
- 4) 左边片段统一减去左边片段的极小值, 右边片段统一减去右边片段的极小值, 经过处理后多数情况下会出现左右两个片段不连续, 此时需要将较高的片段进行缩放, 即乘以一个比例系数  $f$ ,  $f$  表示为

$$f = \frac{f_{\max} - a}{f_{\max} - b}, \quad a > b$$

式中  $f_{\max}$  为左右两个片段总的最大值, 而  $a$ 、 $b$  分别为分段后左右两边各自的最大值;

- 5) 信号经过前面方法处理后, 仍存在一些持续范围过大的峰。为减小峰的持续范围, 进行如下操作: 左边信号片段为  $\mathbf{X}$ , 其中  $\mathbf{X} = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ ,  $n$  为左边信号片段长度, 令  $x_i = x_i \left(\frac{i}{n}\right)^i$ , 同样, 右边信号片段为  $\mathbf{Y}$ , 其中  $\mathbf{Y} = \{y_1, y_2, \dots, y_m\}$ ,  $m$  为右边信号片段长度, 令  $y_i = y_i \left(\frac{i}{m}\right)^i$ 。以上程序代码用 Matlab 软件实现。

经过荧光背景消除方法处理后的拉曼光谱, 对于任何一个特征峰, 峰的范围都分为两部分: 左边的严格单调上升阶段, 范围是  $[0, f_{\max}]$ , 右边的严格单

调下降阶段,范围是 $[f_{\max}, 0]$ 。那么在左右两边都存在且唯一存在一个点,这个点的高度为 $f_{\max}/2$ ,那么这两点间的距离就是所求的峰的半峰全宽。

算法步骤5)可以有效的减小相邻特征峰之间的影响,但是仍然不能彻底正确的分开相邻特征峰或者重叠在一起的特征峰。根除相邻特征峰影响必须对拉曼特征峰进行分解,无法通过简单的荧光背景消除达到此效果。

图1是对随机抽取的一个信号光谱应用上述方法处理后的结果。光谱a为原始拉曼信号,b为经过多项式拟合基线校正后的光谱,c为经过本文方法处理后的结果。通过对比可以看出,传统的多项式拟合基线校正的方法无法将特征峰明显的表示出来,很多弱的特征峰被湮灭在强的特征峰中,而本方法可以有效的提取和增强较弱的特征峰。

### 3.2 方法验证

表1给出了几种主要特征峰的峰值归属表<sup>[7~9]</sup>。

表1 拉曼光谱特征峰归属

Table 1 Characteristic peak assignments for the Raman spectra

Peak positions / $\text{cm}^{-1}$	Major assignment
721	Adenine (C—C, ring mode)
754	Vibrational breathing mode of porphyrin
853	Ring breathing mode of tyrosine and C—C stretch of proline ring
1001	Symmetric ring breathing mode of phenylalanine
1078	C—C or C—O stretch (lipid), C—C or PO <sub>2</sub> stretch (nucleic acids)
1125	CO stretching
1170	C—H in-plane bending mode of tyrosine
1264	=C—H in plane bending (lipid)
1300	CH <sub>2</sub> wagging (lipid)
1340	CH bending of the aliphatic chain of proteins
1446	CH <sub>2</sub> bending mode of proteins
1549	Vibrational breathing mode of Porphyrin
1660	Amide I [ $\nu(\text{C}=\text{O})$ ]

对于任何的光谱荧光背景去除方法,去除后的光谱必须满足两个条件:1)对于单一的某种物质,其拉曼光谱特征峰的峰强与该物质的质量分数呈线性关系;2)对于多种物质的混合物,如果混合物中各种物质间不发生反应,那么混合物中各物质将保持不变,即混合物中包含的各种化学键质量分数是混合物中各种物质的对应的化学键质量分数之和,在光谱上表现为混合物拉曼光谱的特征峰强度是混合物中各种物质特征峰强度之和。所以,分别从上面所述的两个方面来验证荧光背景校正方法的可行性:峰强与质量分数关系验证和单光谱与混合光谱的关系验证。

#### 3.2.1 质量分数与峰强关系验证

选取质量分数为5%~35%,梯度为5%的7个

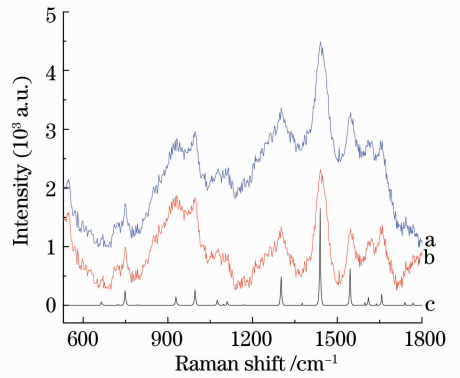


图1 活体小鼠耳朵组织中血液的拉曼光谱。(a)原始光谱;(b)经过多项式拟合基线校正后的光谱;(c)本文提出的方法校正后的光谱

Fig. 1 Raman spectra of blood in mice ear in vivo. (a) Original spectrum; (b) fitted by polynomial and processed using baseline correction; (c) rectified with the presented method

葡萄糖溶液样品,每个样品收集5个拉曼光谱,然后取平均值,光谱收集时间均为10s,并通过本文方法进行基线校正,给出了不同质量分数的葡萄糖特征峰 $1125\text{ cm}^{-1}$ 的光谱曲线及峰面积数据柱状图(图2),从图中看到,葡萄糖溶液质量分数与特征峰峰面积呈线性关系。

表2是经过本文荧光背景方法处理后不同质量分数葡萄糖溶液各个特征峰的峰面积数据、峰强(峰面积)、葡萄糖质量分数的线性相关系数、质量分数误差均值数和特征峰的增长系数。其中增长率是指质量分数每增加一个单位(1%)时峰面积的增加量。从表2中可以看到,经本文方法处理后质量分数与峰强的线性相关系数除 $850\text{ cm}^{-1}$ 特征峰相关系数

为 0.9695 外,其余系数都大于 0.9925,呈现很强的相关性。从质量分数误差均值可以看到,误差大部分都在 1%以内,由此验证了本文荧光背景消除方法对质量分数与峰强的关系影响很小,且具有很高的准确性。

表 3 为经过多项式拟合基线校正处理后不同质量分数的葡萄糖溶液各个特征峰的峰面积数据、葡萄糖质量分数、峰强(峰面积)的线性相关系数、质量分数误差均值数和特征峰的增长系数。由表 2、3 中相对应的线性相关系数可以看到,本文处理方法得

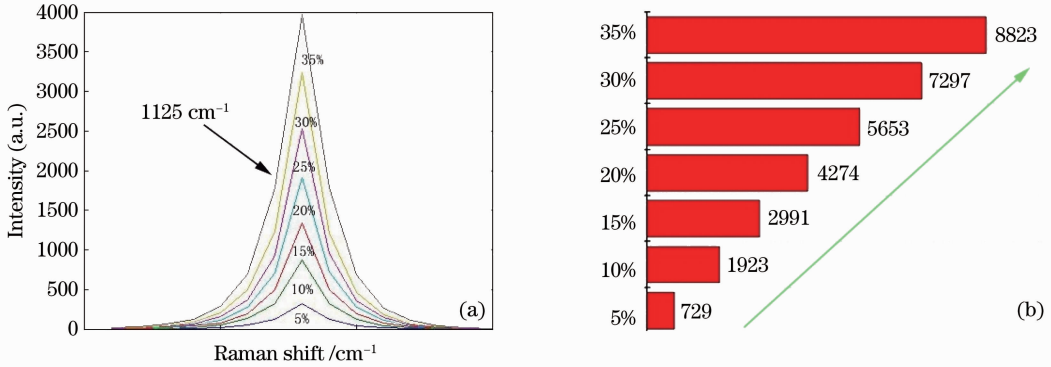


图 2 5%~35%葡萄糖拉曼光谱与峰面积柱状图

Fig. 2 Raman spectra from 5%~35% glucose solution and the histogram of peaks area

表 2 不同质量分数葡萄糖溶液的拉曼光谱特征峰面积的相关系数表

Table 2 Characteristic peaks area of glucose solution of Raman spectra and the correlation coefficient calculated

Wave number /cm <sup>-1</sup>	Solution cocentration							Correlation coefficient	Cocentration error average /%	Growth rate
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%			
656	171	191	212	234	256	277	299	0.9999	0.114	4.27
717	253	276	322	345	370	403	432	0.9972	0.540	5.98
850	0	47	937	1473	2921	3200	3285	0.9695	2.150	129.63
909	250	820	1217	1777	2476	2781	3352	0.9977	0.535	103.47
1062	151	475	1982	2817	3610	4259	5498	0.9931	0.993	180.27
1125	729	1923	2991	4274	5653	7297	8823	0.9972	0.700	296.23
1267	34	230	348	553	739	960	1240	0.9944	1.013	39.06
1362	1677	2194	2553	3075	3364	4139	4734	0.9934	0.920	99.08
1460	894	1163	1316	1662	2017	2241	2664	0.9944	0.971	58.33
1600	342	411	484	546	686	772	893	0.9925	0.958	18.40

表 3 经多项式拟合基线校正后的不同质量分数葡萄糖拉曼光谱的各个特征峰峰面积与相关系数

Table 3 Peaks area of glucose solution and the correlation coefficient calculated using the polynomial fitting baseline correction

Wave number /cm <sup>-1</sup>	Solution cocentration							Correlation coefficient	Cocentration error average /%	Growth rate
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%			
656	9460	10000	17038	19137	29889	33038	44069	0.7573	1.779	116
717	44679	43131	55121	67812	100242	98942	138806	0.9530	2.588	3137
850	71880	83328	113271	162943	260614	250114	351682	0.9676	2.249	9431
909	30181	52991	90655	148419	255009	257157	397558	0.9705	2.143	11963
1062	154644	171156	191634	232675	329632	296810	425512	0.9434	2.945	8585
1125	166000	255853	341091	468568	737772	709990	1062614	0.9696	2.220	28534
1267	8468	15105	17634	33649	67502	71120	123422	0.9402	3.040	3620
1362	101483	163884	210060	288448	469028	458179	694293	0.9666	2.363	18757
1460	33083	41738	44691	55090	84766	81413	123699	0.9419	3.050	2795
1600	98763	100981	93548	89224	113380	92579	110343	0.3189	7.934	270

到的线性相关系数要明显大于传统的多项式拟合基线校正处理方法,而且传统的方法中  $1600\text{ cm}^{-1}$  特征峰峰面积出现很大偏差。将表 2、3 质量分数误差均值数据对比可以看到:本文处理方法得到的质量分数误差要明显低于传统的多项式拟合基线校正方法,且表 3 中的  $1600\text{ cm}^{-1}$  特征峰拟合后质量分数误差均值达到了  $7.934\%$ ,误差很大。因此,从物质拉曼特征峰峰强与物质质量分数关系可以看出,本文方法要优于基于多项式拟合基线校正的荧光背景消除方法,优化的原因在于:1)多项式拟合基线校正方法无法正确判断一些弱的特征峰始末位置,而本文通过极小极大值确定了峰的始末范围;2)多项式拟合基线校正不能降低周围特征峰对所求特征峰的影响,仅仅只是减去一个拟合背景曲线;3)多项式拟合基线校正不能在原理说明的情况下直接去除背景,降低了特征峰的高度,而本文算法可以保持原始的固有峰高。

### 3.2.2 混合物各个成份峰强的关系验证

对于多种物质混合的拉曼光谱,由于不同的物质可能含有相同的化学键,导致这些物质的拉曼光谱中都含有某个(某些)拉曼特征峰,那么这个(这些)特征峰的峰强将叠加,这些共有的特征峰峰强应该是单独物质拉曼特征峰峰强之和。因此,经过荧

光背景消除后的拉曼光谱,必须适合上述约定条件。

小鼠耳朵组织从外到内分为表皮、真皮、皮下组织、软骨层四层结构,血管位于真皮和软骨层之间,在做活体小鼠耳朵拉曼扫描成像实验时,激光聚焦在小鼠的静脉或动脉血管里正在流动的血液时,收集到的信号难免会受到周围脂肪组织的干扰,因此可以通过使用小鼠体外血液光谱与  $10\%$  脂肪乳光谱按一定的比例系数合成的方法来模拟小鼠耳朵血液所处的实验环境。

为了体现提出的消除荧光背景方法可以适用于活体小鼠数据的处理与分析,分别收集了小鼠体外血液、 $10\%$  脂肪乳两种物质的拉曼光谱,并收集活体小鼠血液的拉曼光谱做参考。

图 3(a)为原始光谱,其中包括小鼠体外血液光谱、 $10\%$  脂肪乳光谱、组合光谱和活体小鼠体内血液光谱。图 3(b)为多项式拟合基线校正方法处理后的光谱,图 3(c)为本文方法消除后光谱。图 3 中组合光谱是由小鼠体外血液光谱和  $10\%$  脂肪乳光谱通过最小二乘拟合方法得到的与小鼠体内血液光谱最近似的光谱。其组合方法为:组合光谱 = 体外血液光谱  $\times 0.7155$  + 脂肪乳光谱  $\times 0.7571$ 。

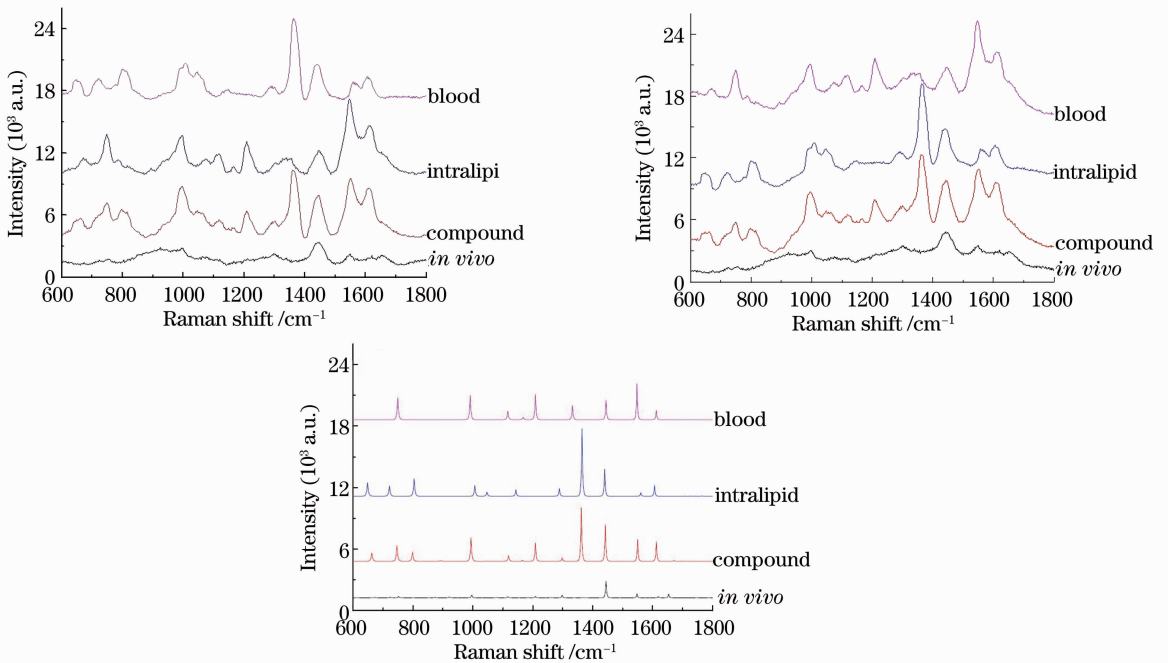


图 3 原始光谱、多项式拟合基线校正后的光谱和本文方法处理后的光谱

Fig. 3 Original spectrum, spectrum processed with baseline correction of the polynomial fitting, spectrum processed with the method presented in this paper

表 4 中第 2、3、4 列分别列出了经本文荧光背景消除方法校正后的体外血液光谱、脂肪乳光谱和组合光谱的峰强(峰面积)数据,第 5 列是将第 2、3 列的峰面积数据按照组合光谱的比例进行数据组合,即:模拟峰面积数据=体外血液特征峰峰面积×0.7155+脂肪乳特征峰峰面积×0.7571。第 6、7 列为合成光谱峰面积数据与模拟峰面积数据的偏差与偏差率。从偏差率可以看出,除 1125 cm<sup>-1</sup> 特征峰外其他特征峰的偏差率很小,基本可以验证方法的可靠性。1125 cm<sup>-1</sup> 特征峰却偏差较大,出现此种情

况可能是由于脂肪乳中也含有 1125 cm<sup>-1</sup> 特征峰或血液中血糖因新陈代谢逐渐被消耗所致。

为体现本文方法要优于传统的荧光背景消除方法,对上述相同的数据进行多项式拟合基线校正并平滑,然后求其特征峰峰强(峰面积),数据如表 5 所示,通过表 5 中偏差率与表 4 中偏差率对比可以看到,本文的荧光背景消除方法处理后的光谱峰强偏差率要明显低于多项式拟合基线校正处理后的峰强偏差率,即该方法优于传统荧光背景消除方法。

表 4 经本文荧光背景消除方法校正后的各个光谱的特征峰峰面积

Table 4 Characteristic peaks area of the various spectra corrected using the method presented in this paper to eliminate fluorescent background

Wave number /cm <sup>-1</sup>	<i>In vitro</i> blood	Intralipid 10%	Compound spectrum	Compound in proportion	Error	Error rate
721	0	2223.1	1843.7	1683.1	160.6	0.0871
754	4619.4	0	3113.7	3305.2	191.5	0.0614
853	0	0	0	0	0	0
1001	5534.5	2097.0	4867.2	5547.6	680.4	0.1398
1078	354.7	0	256.3	253.8	2.6	0.0100
1125	1792.1	1334.8	1378.7	2292.8	914.1	0.6630
1170	655.7	0	435.3	469.1	33.8	0.0700
1264	0	0	0	0	0	0
1300	0	1657.5	1734.8	1254.9	479.9	0.2760
1446	3446.7	5878.2	5989.1	6916.5	927.4	0.1540
1549	7248.1	0	5102.4	5186.0	83.6	0.0160
1660	2098.1	2435.5	3687.2	1501.2	591.0	0.1023

表 5 经多项式拟合基线校正后的各个光谱的特征峰峰面积

Table 5 Characteristic peaks area of the various spectra corrected using the polynomial fitting baseline correction

Wave number /cm <sup>-1</sup>	<i>In vitro</i> blood	Intralipid 10%	Compound spectrum	Compound in proportion	Error	Error rate
721	278.1	24380	876.4	18657	17781	20.2900
754	24784	85.6	17594	17797	203.5	0.0120
853	63.1	252.5	304.4	236.4	68.0	0.2230
1001	73157	43827	56903	85526	28622	0.5030
1078	8612.9	2.5	1781	6164.4	4382.7	2.4590
1125	25226	185.8	11056	18190	7133.0	0.6450
1170	5000.1	1039.8	1919.8	4364.8	2444.9	1.2730
1264	1034.9	101.7	115.8	817.5	701.7	6.0610
1300	1560.2	14562	17464	12141.2	5322.8	0.3048
1446	45225	23012	80493	206586	126093	1.5665
1549	154612	284.8	114399	110841	3558.3	0.0311
1660	35075	36638	63229	52835	10395	0.1644

### 3.3 成像方法及步骤

近些年光学成像技术在国内外发展迅速,尤其是生物活体的成像研究越来越受到人们的广泛关注<sup>[10,11]</sup>。然而基于拉曼光谱的生物活体组织成像

报导较少,本文给出了拉曼光谱活体组织成像的一般步骤并将本文荧光背景消除方法应用在拉曼光谱活体成像,对成像效果进行改进。

通过对活体小鼠体内血液光谱数据的模拟验证



结果可知,本文的荧光背景消除方法可适用于小鼠活体光谱的数据处理。图 4 给出了拉曼光谱成像的方法步骤:

- 1) 对小鼠耳朵组织进行逐点拉曼扫描,并通过手动调节激光聚焦深度实现对鼠耳的逐层扫描;
- 2) 用 Winspec32 软件(光谱仪自带)收集每个点的光谱数据;
- 3) 使用本文方法进行荧光背景消除;
- 4) 提取特征峰进行峰面积计算,经归一化后缩放为 0~255 数据矩阵;
- 5) 画出二维灰度图像;
- 6) 将二维峰面积数据矩阵按照采集顺序排列成三维矩阵;
- 7) 使用 Matlab2010b 中 slice 函数进行三维绘制。

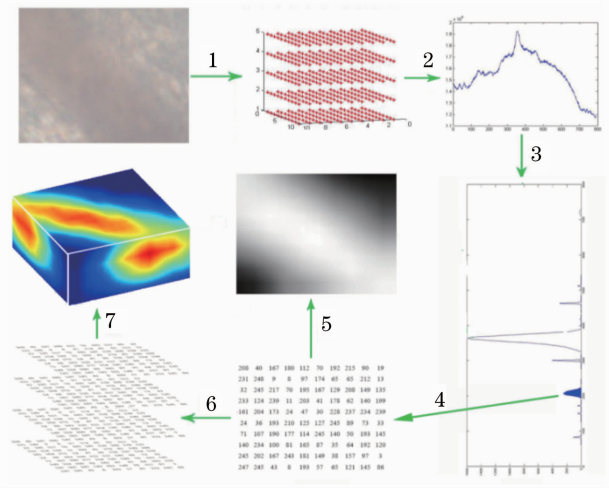


图 4 活体拉曼成像步骤

Fig. 4 Steps of Raman imaging in-vivo

## 4 实验结果与分析

### 4.1 二维成像结果对比

拉曼光谱中  $1549\text{ cm}^{-1}$  特征峰属于卟啉呼吸振动模式,是血红蛋白的标志特征峰,血红蛋白大量存在老鼠体内的血液中,选用  $1549\text{ cm}^{-1}$  特征峰来做血红蛋白分子结构物质的二维灰度图像分布,以此判断出血管在组织中的大致位置。根据两次实验的数据,分别经本文荧光背景消除和多项式拟合基线校正两种方法处理,两次实验中  $x$  轴,  $y$  轴的扫描步

长均为  $2\text{ }\mu\text{m}$ ,总的扫描点数为  $20\times 18$ ,扫描范围为  $40\text{ }\mu\text{m}\times 36\text{ }\mu\text{m}$  每个光谱的积分时间为  $10\text{ s}$ 。图 5(a),(d)是两次活体实验中小鼠耳朵扫描区域的光学显微镜下的图像,深红色的部分为血管的位置,图 5(b),(e)为经过多项式拟合基线校正方法处理后的成像结果,图 5(c),(f)为应用本文提出的方法处理后的成像结果,从两次实验的成像结果对比可以看到,应用本文提出的方法进行成像,由于减少了嘈杂的散粒噪声和其他特征峰的影响,在没有血红蛋白分子的区域,干净,明显,轮廓清晰,与拍照图中的血管区域基本一致。

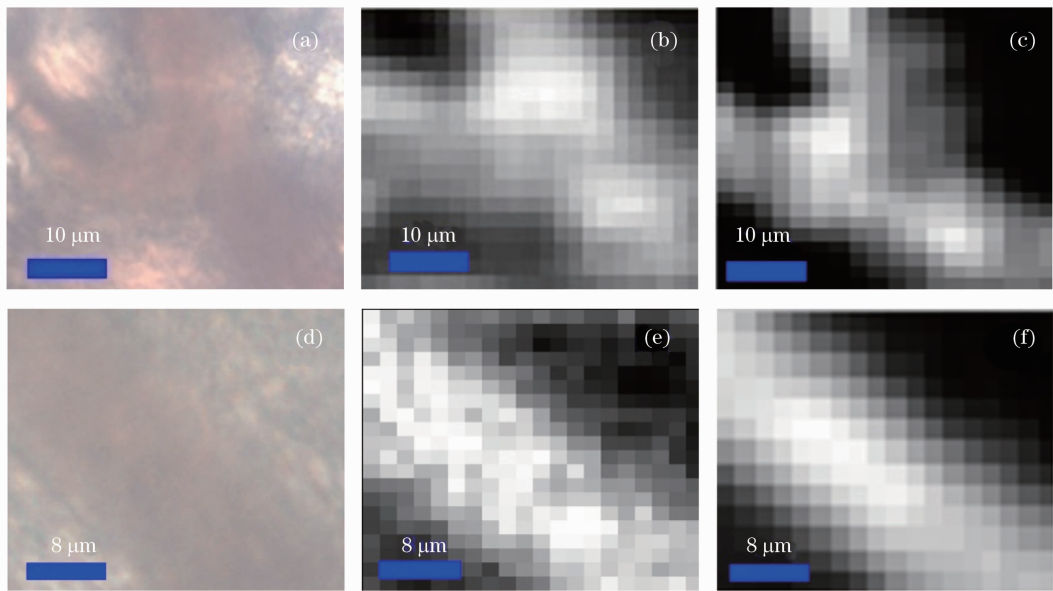


图 5 二维灰度成像

Fig. 5 2D gray Raman imaging

## 4.2 三维成像结果对比

三维成像实验中  $x$  轴,  $y$  轴的扫描步长均为  $2\ \mu\text{m}$ ,  $z$  轴的扫描步长为  $5\ \mu\text{m}$ , 共扫描 4 层, 总的扫描点数为  $20 \times 15 \times 4$ , 扫描范围为  $40\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ , 每个光谱的积分时间为  $10\ \text{s}$ 。

图 6 是根据本次实验的数据, 分别经本文荧光背景消除和多项式拟合基线校正两种方法处理, 抽取特征峰  $1549\ \text{cm}^{-1}$  做出的血红蛋白分子结构物质

的超三维立体图像分布, 图 6(a)~(d) 分别为多项式拟合校正后的超三维成像的立体图、切面图、俯视图和侧视图。图中仅有两种颜色的过渡且颜色混杂, 成像效果较差。图 6(e)~(h) 为经过本文提出的方法得到的超三维成像, 也同样分别为立体图、切面图、俯视图和侧视图。图中出现红色、黄色、淡蓝色和深蓝色等诸多的过渡颜色, 能够把血红蛋白在组织中的含量变化, 分布的区域表现的更形象。

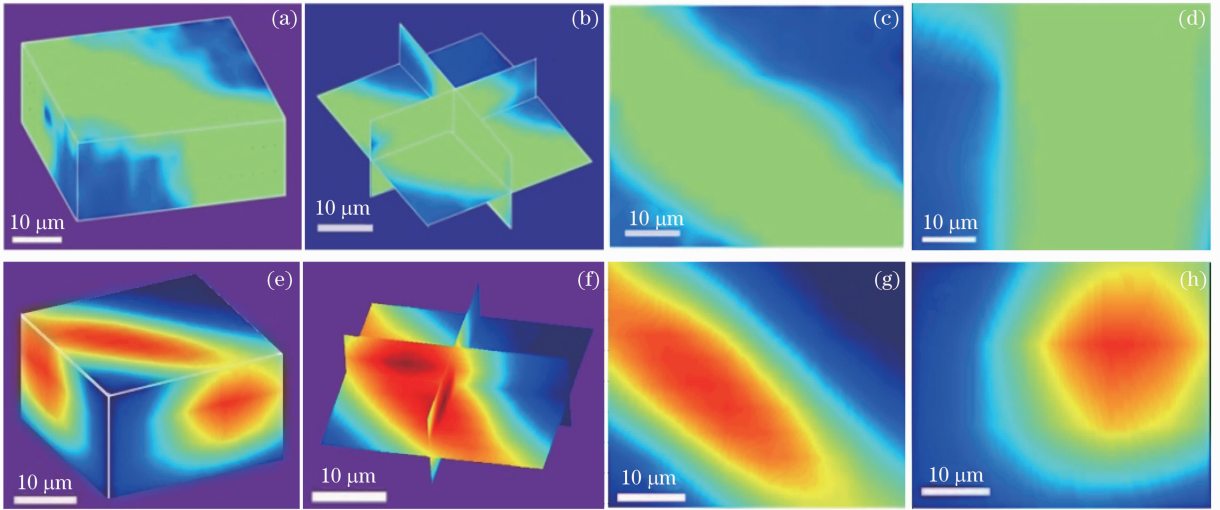


图 6  $1549\ \text{cm}^{-1}$  特征峰三维彩色成像, 扫描范围:  $40\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ , 像素点:  $20 \times 15 \times 4$ , 积分时间:  $10\ \text{s}/\text{光谱}$ 。

(a)、(e) 三维立体图; (b)、(f) 三维切面图; (c)、(g) 三维俯视图; (d)、(h) 三维侧视图

Fig. 6 3D color image of  $1549\ \text{cm}^{-1}$ , image area  $40\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ ,  $20\ \text{pixel} \times 15\ \text{pixel} \times 4\ \text{pixel}$ , integration time:  $10\ \text{s}/\text{spectrum}$ . (a), (e) 3D solid image; (b), (f) 3D section image; (c), (g) 3D image viewed from top; (d), (h) 3D image viewed from side

对比两种三维成像结果可以得出: 一般基线校正方法的血红蛋白成像结果仅仅推断出血管的大致形状与走向, 无法得到其他信息。而本文方法的成像结果不仅得到了血管的精细形状, 还可看出血管呈现圆柱形状且血液(血红蛋白)从圆柱中心到边缘逐渐递减的过程, 图像干净简洁, 效果很好。

## 5 结 论

提出了能够很好地消除拉曼信号荧光背景的方法, 使光谱数据得到优化, 通过两种方法的验证, 证明了本文方法的可行性, 且优于多项式拟合基线校正方法。同时活体成像结果也表明此方法在成像效果上较已有的方法有明显的提高。因此, 该方法有助于提高活体拉曼成像效果, 使成像分析方法在生物研究领域上发挥更广泛的作用。

## 参 考 文 献

1 Roger M. Jarvis, Alan Brooker, Royston Goodacre. Surface-

- enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface[J]. *Anal. Chem.*, 2004, **76**: 40~47
- 2 D. L. Jeanmaire, D. R. Van. Surface Raman spectroelectrochemistry. Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode[J]. *J. Electroanalytical Chemistry*, 1977, **84**(1): 120
- 3 M. G. Albrecht, J. A. Creighton. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**(15): 5215~5217
- 4 P. M. Ramos, I. Ruisanchez. Noise and background removal in Raman spectra of ancient pigments using wavelet transform[J]. *J. Raman Spectroscopy*, 2005, **36**(9): 848~856
- 5 F. Ehrentreich, L. Summechen. Spike removal and denoising of Raman spectra by wavelet transform methods [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**(17): 4364~4373
- 6 Meng Lingjing, Ji Xiaolu, Li Zida *et al.*. Mono-hepatocellular carcinoma by Raman mapping [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, **48**(2): 021703  
孟令晶, 纪晓露, 李自达等. 单个肝癌细胞的拉曼成像实验研究 [J]. *激光与光电子学进展*, 2011, **48**(2): 021703
- 7 Nicholas Stone, Catherine Kendall, Jenny Smith *et al.*. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers [J]. *Faraday Discuss*, 2004, **126**: 141~157
- 8 B. R. Wood, B. Tait, D. McNaughton. Micro-Raman characterization of the R to T state transition of hemoglobin



- within a single living erythrocyte[J]. *BBA*, 2001, **1539**: 58~70
- 9 Chan-gan Xie , Yong-qing Li, Wei Tang *et al.*. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy [J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, **94**(9): 6138
- 10 Nan Nan, Bu Peng, Guo Xin *et al.*. Three-dimensional full-range complex Fourier domain optical coherence tomography system for vivo imaging of human skin[J]. *Chinese J. Lasers*, 2012, **39**(7): 0704002
- 南楠, 步鹏, 郭昕等. 三维全深度复频域光学相干层析成像系统及其对人体皮肤的在体成像[J]. *中国激光*, 2012, **39**(7): 0704002
- 11 Xi Peng, Liu Yujia, Yao Zhirong *et al.*. Optical imaging techniques in skin imaging diagnosis [J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(2): 0201001
- 席鹏, 刘宇嘉, 姚志荣等. 用于皮肤影像诊断的光学成像方法[J]. *中国激光*, 2011, **38**(2): 0201001

栏目编辑：李文喆