

## 荧光褪色效应与拉曼光谱基线干扰消除

姚志湘<sup>1,3,4</sup>, 粟 晖<sup>1,3\*</sup>, 韩 莹<sup>2</sup>, 徐记各<sup>2</sup>, 黄晓程<sup>1,3</sup>, 忻 欣<sup>2</sup>

1. 广西科技大学生物与化学工程学院, 广西 柳州 545006
2. 西派特(北京)科技有限公司, 北京 100029
3. 广西科技大学广西糖资源绿色加工重点实验室, 广西 柳州 545006
4. 广西蔗糖产业协同创新中心, 广西 南宁 530004

**摘 要** 荧光是直接测定的拉曼光谱中背景的最主要来源, 需要采用真实、准确的方法消除, 以得到纯净的拉曼响应。基线拟合消除和查找荧光贡献扣除是解决背景问题的两条思路, 目前多采用基线拟合方法, 其优点是满足用户“视觉”要求, 无需额外硬件, 但并非机理或实质上的解释, 因而难以保证数据的真实性与合理性; 查找荧光的方法, 更为真实, 但是目前提出的方法, 需要增加光源等额外设计和成本。另外, 在实验方法上, 也有采用消荧光剂和长时间照射漂白的, 存在操作繁琐、效率低等不足。利用稳定体系中拉曼和荧光的时间差异解决体系中荧光问题。在微小的时间段内, 例如几个毫秒, 激发光不会导致体系性质发生显著变化, 荧光具有寿命周期, 会随激发时间延长强度下降的“褪色”, “褪色”的强度差异可以被认为是整体荧光的一个微元; 与此同时, 由于体系组成未发生显著变化, 拉曼光对于短时间照射可以保持稳定。利用此差异可以区分出混合信号中的荧光和拉曼光。根据该原理, 提出了荧光褪色差分法(FBDA), 实现拉曼光谱的背景校正。方法的主要步骤: 测量微小时刻内的多张直接拉曼光谱, 求取系列光谱的差分, 对差分值作高频滤波降噪, 可获得荧光强度微元; 然后, 多个荧光微元平均归一化后, 得到荧光强度单元。以拉曼光谱  $2\ 000\sim 2\ 500\ \text{cm}^{-1}$  的静默区, 即通常不会出现拉曼信号的频段为基准, 对荧光单元作逆差分, 逆差分累计值与原始光谱在此频段一致时, 得到整体荧光响应; 最终, 从原始光谱中扣除荧光成分, 完成背景扣除和基线校正。以盐酸二甲双胍片的拉曼测量为例, 说明和讲解了所提出的原理和方法, 验证方法的有效性。与目前效果较好的基线校正方法(不对称最小二乘和自适应迭代再加权惩罚偏最小二乘)进行了对比, 表明 FBDA 方法更为客观真实, FBDA 的另一个优势是不需要额外的设计和成本, 所有数据都是在现有设备直接采集和完成。需要说明的是, 微小时刻光谱差异的要求, 可以确保 FBDA 光谱实时性, 长时间的光谱差异, 将会影响结果的准确性; 另外, 对于光化学反应体系和其他非荧光引起的复杂背景, FBDA 的适用性有待改善。

**关键词** 拉曼; 荧光; 光褪色; 差分; 降噪

**中图分类号**: O657. 37 **文献标识码**: A

**DOI**: 10. 3964/j. issn. 1000-0593(2019)07-2034-06

## 引 言

拉曼光谱及其仪器是近年来市场和应用的一个热点, 而荧光干扰和基线漂移是困扰用户和仪器厂商的关键问题。拉曼光和荧光都经由激发光激发产生, 荧光强度通常比拉曼光高出若干数量级, 而且激发波长越短荧光强度越大; 为了避免荧光干扰, 往往推荐采用波长更长的激发光, 如 785 nm

或者 1 064 nm 的激光<sup>[1]</sup>; 受到造价和元器件性能约束, 785 nm 是目前拉曼光谱主要选择的激发波长, 尽管如此, 荧光问题仍然是普遍存在的; 另一方面, 长波长激发又带来其他问题, 诸如拉曼激发效率低、热效应强可能导致样品烧毁等。有效、可靠地消除背景干扰, 得到清晰、准确的拉曼谱图, 仍然是仪器研发和使用中关注的关键问题。

对于拉曼光谱的荧光及基线问题, 在数据处理上, 近年来主要通过非均匀 B 样条<sup>[2]</sup>、连续小波变换<sup>[3]</sup>、全自动基线

**收稿日期**: 2018-05-10, **修订日期**: 2018-10-28

**基金项目**: 国家自然科学基金青年科学基金项目(21602036), 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139038), 广西糖资源绿色加工重点实验室、广西高校糖资源加工重点实验室开放基金项目(2015TZYKF08)资助

**作者简介**: 姚志湘, 1968 年生, 广西科技大学生物与化学工程学院教授 e-mail: zxyao@gxust. edu. cn

\* 通讯联系人 e-mail: suhui@gxust. edu. cn

校正(FABC)<sup>[4]</sup>、自动迭代移动平均算法(AIMA)<sup>[5]</sup>、不对称最小二乘(ALS)<sup>[6]</sup>以及自适应迭代再加权惩罚最小二乘(Air-PLS)<sup>[7]</sup>、多项式拟合<sup>[8]</sup>等手段进行低通滤波,拟合出基线,实现直观的扣减,满足用户“视觉”要求;这种扣减并非机理或实质上的解释,因而难以保证数据处理的真实性与合理性。处理荧光的另一类方法是利用拉曼光随激发光迁移而荧光相对稳定,采用双波长或多波长激发,区分荧光和拉曼光并加以消除,这些方法对设备硬件提出了附加要求,提高了设备造价,增加了复杂性<sup>[9-11]</sup>。

在用户层面,有经验的用户往往会通过增加照射时间来降低荧光强度,利用物质的“荧光褪色效应”,实质是荧光的不完全猝灭,随照射时间延长荧光强度出现不同程度下降,经过数秒至小时级的照射,有可能使得荧光降到很低程度;但并不是所有体系的荧光都会降至可接受的程度,另外也延长了测量时间,还存在强光下体系变质的风险<sup>[12]</sup>。

既然大多数体系存在不同程度的荧光“褪色”效应,如果这种“褪色”均匀可测,就能够通过追溯,累积出光谱响应信号中荧光所占总量,实现拉曼光和荧光的分离,达到消除干扰的目的。

### 1 荧光褪色效应

在拉曼光谱测量时,光照初期出现的基线向下漂移主要就是由荧光褪色(photo-bleaching)效应导致的,但体系荧光褪色速度由快趋慢,强度下降非常缓慢而逐渐趋于稳定,残留的荧光强度仍然显著干扰测量结果。作为消除荧光的辅助手段,可能需要长达小时级的褪色时间;此外,样品暴露时间过长,体系因受环境影响的改变,最终也会反映到测量结果中。

荧光猝灭的机理复杂,但是在确定体系中,荧光发射光谱可以保持确定形状;如果仅考虑光照时间变化因素,光谱强度通常随时间延长而降低。即,发射光谱强度  $I_{\lambda_{Em}}$  是发射波长和时间  $t$  的函数,见式(1)

$$I_{\lambda_{Em}} = F(\lambda_{Em}, t) \tag{1}$$

而,  $\lambda_{Em}$  和  $t$  相互独立;  $I_{\lambda_{Em}}$  可以分离变量为

$$I_{\lambda_{Em}} = g_{\lambda_{Em}} f(t) \tag{2}$$

对式(2)中  $I_{\lambda_{Em}}$  以  $t$  为变量求差分,得到式(3)

$$\Delta I_{\lambda_{Em}} = g_{\lambda_{Em}} \Delta f(t) \tag{3}$$

定义,单位  $\Delta f(t)$  下的  $\Delta I_{\lambda_{Em}}$  为  $DI_{\lambda_{Em}}$ , 则有式(4)

$$DI_{\lambda_{Em}} = g_{\lambda_{Em}} \tag{4}$$

拉曼光通常是持续稳定的,其强度  $I_{Ram}$  不是照射时间  $t$  的函数。测量到总的光响应  $I$  由拉曼光和荧光贡献,见式(5)和式(6)

$$I = I_{Ram} + I_{\lambda_{Em}} \tag{5}$$

同样的,

$$DI = g_{\lambda_{Em}} \tag{6}$$

于是,拉曼强度可表示为式(7)

$$I_{Ram} = I - \sum DI \Big|_{f(t) = \sum \Delta f(t)} \tag{7}$$

如果函数  $f(t)$  能从微元  $\Delta f(t)$  累加得到,那么,就可以

从整体光响应测量中消除荧光影响,得到该时刻实际的拉曼响应。

### 2 荧光强度差分及荧光消去

对盐酸二甲双胍片持续照射 100 s(拉曼光谱仪 ExR610,西派特(北京)科技有限公司),可测量光谱范围为  $200 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ ,激发波长 532 nm,样本光谱采集积分时间 1 秒,CCD 像素数 3 648),每 10 s 记录一次的拉曼测量系列信号,不同时间下盐酸二甲双胍片拉曼测量光谱如图 1。由图 1 可见基线下降随时间变化逐渐缓慢,长时间照射后,并未实现基线平直。

图 1 所含系列数据构成  $3648 \times 10$  矩阵  $M$ ,沿矩阵列(照射时间)方向求差分,绘于图 2。从图 2 可以看出沿时间方向差分后曲线轮廓一致,这说明光谱“褪色”均匀可测,不同时刻下的褪色强度仅是光照时间的函数,即式(7)的含义。

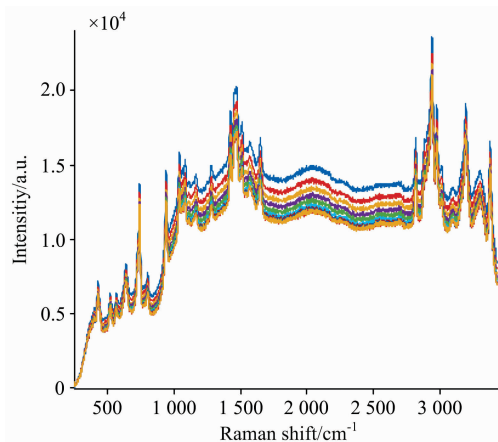


图 1 不同测量时间的盐酸二甲双胍片拉曼光谱  
Fig. 1 The spectra of metformin hydrochloride tablets were measured at different times

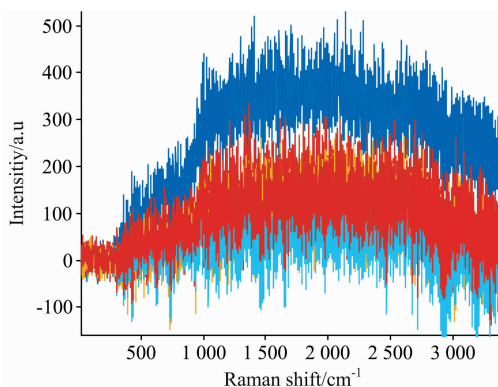


图 2 矩阵  $M$  沿照射时间方向差分图  
Fig. 2 The difference of  $M$  in the direction of irradiation time

#### 2.1 荧光强度差分

图 2 所示谱线其中包含了大量噪声,在实际信噪比不是

非常高的情况下,光褪色与仪器噪声强度处于同一数量级,无法满足荧光度量要求,必须要经过降噪处理。由于荧光基本表现为低频,与高频噪声差异很大,不需要严苛定义,采用简单的低通滤波,即可去除绝大部分噪声。

对光谱直接差分降噪,图 3 为降噪前后的情况。图 4 是将测量到的前 20 s 连续获取数据,两两间的 9 组差分数据,经过降噪和归一化后得到的结果。数据呈现了良好一致性,彼此相关系数均大于 0.98,其中值得注意的是,前 10 s 数据的相关系数更是大于 0.995。这说明,在短时间照射条件下,式(1)一式(7)成立的前提能够得到充分满足。

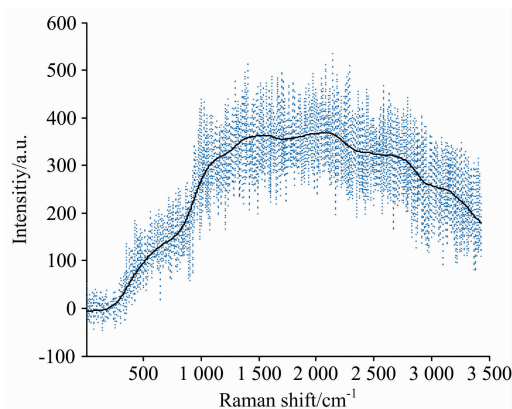


图 3 光谱直接差分 and 差分降噪后情况  
Fig. 3 The situation before and after the direct difference of the spectrum

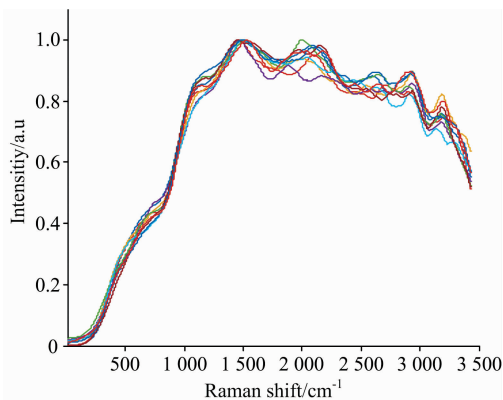


图 4 降噪后的差分谱作归一化  
Fig. 4 The difference and normalization of the spectra

经过推导和实例验证可认为,实际测量所包含的荧光信号可采用其强度差分来描述,两次短暂时间间隔的直接信号的强度差可作为荧光强度差分看待,经过低通滤波降噪后,用于表达信号中荧光的分布。

## 2.2 荧光强度和逆差分

短暂时间间隔的直接光谱强度差,经过降噪后,可认为式(7)中  $DI$ 。通过式(7)求取  $I_{Ram}$ , 还存在一个问题,即如何实现准确的逆差分  $f(t) = \sum \Delta f(t)$ 。

在拉曼信号中,值得注意的是  $2\ 200 \sim 2\ 500\ \text{cm}^{-1}$  普遍存在一段无响应的静默区,此范围内的  $I_{Ram} = 0$ , 静默区段的光

谱响应值完全由荧光贡献。那么通过对比该段信号与差分累加值的差异,即可完成准确的逆差分计算。

由于仪器本底噪声和环境光扰动的存在,通常会使得静默区光强与实际逆差分可能存在差异,通常这种差异是均匀平坦的。因此,选用判断静默区段的实际测量光强与差分累加值差值的平坦程度作为逆差分计算终点判据,会使逆差分计算更为合理与可行。

选用前 10 s 连续采集的拉曼数据,通过均值降噪提升信噪比后,作为原始信号;通过逆差分和差值平坦判断,得到了背景值;图 5(a)中分别绘出了原始信号和背景情况;将原始信号减去背景,即可得到实际的拉曼响应值,见图 5(b),从图可以看出荧光被消除,得到清晰、准确的拉曼图谱。

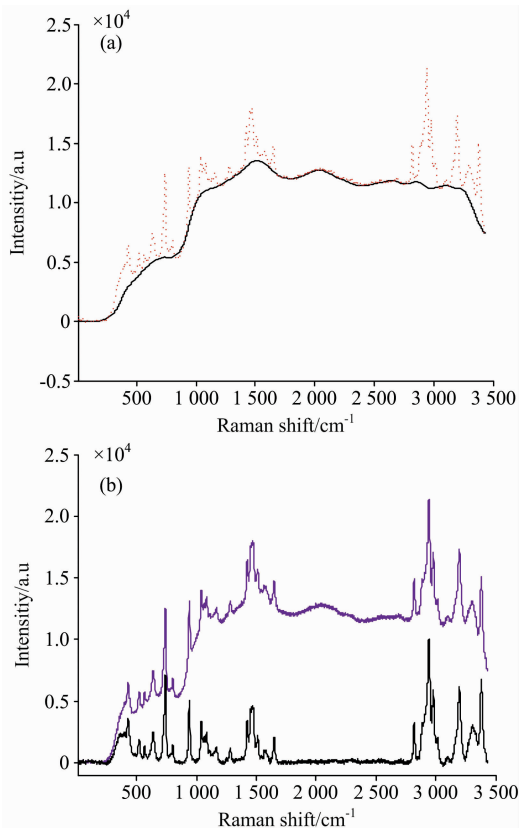


图 5 荧光褪色差分法(FBDA)处理结果

(a): 原始信号和背景值; (b): 原始信号和消除荧光的拉曼光谱

Fig. 5 FBDA processing results

(a): Original signal and background; (b): The original signal and fluorescence removal of the Raman spectrum

## 3 荧光褪色差分法校正拉曼基线干扰的步骤

通过上述推演和对实例数据处理,实现了拉曼基线干扰校正。采用荧光褪色差分法(FBDA)校正拉曼基线干扰方法的步骤总结如下:

(1) 从激光开始照射样品开始,连续采取并记录 5~10 组光谱数据,采集时间间隔建议 500 ms~2 s。

(2) 计算系列光谱数据间的差值,按照采集先后,向后差分,即前一个光谱减去后一个,得到荧光强度的系列差分

值。如果荧光下降程度太小,或者信噪比不高,也可以扩大差分间隔,即前一个光谱减去向后若干个序列的光谱。

(3) 对直接差分光谱降噪,由于噪声频率与荧光频率相差较大,对降噪参数无严格要求。前文案例选用 2 阶 Savitzky-Golay 滤波,窗口宽度 301,约为整体信号长度的 1/10。

(4) 计算差分光谱相关系数,如果各相关系数均大于 0.98,表明样本褪色均匀,将差分光谱平均、归一化后用作荧光强度差分度量,个别异常的可剔除。如果相关系数普遍小于 0.98,表明体系对光照敏感,可能有其他光化学反应存在。

(5) 累加差分度量值,求荧光强度逆差分。

(6) 将系列原始光谱数据平均后作为待扣背景的测量数据,目的是提高信噪比。

(7) 选择拉曼位移 2 200~2 500  $\text{cm}^{-1}$  一段,求测量值与逆差分值的差,计算数据方差判断其平坦度,若差值表现平坦,表明逆差分累加达到终点,得到了信号所含的荧光强度总量。

(8) 将测量信号减去荧光总量,完成基线校正。

## 4 方法影响因素分析

荧光褪色差分校正方法的优势在于不需要改造设备,利用荧光强度随时间改变这一特性,得到更满足机理解的校正结果。尽管在直觉上和依据逻辑假定的推导上都能够接受,但是仍然存在一定的影响因素。

### 4.1 与基线拟合校正类方法比较

基线拟合方法是目前各类仪器进行基线平直处理最常用的,优点是直接、受仪器限制小,通过各种改进的信号处理方法,也使得处理结果在感官上更自然美观;但其不可克服的缺点是,仅凭对基线的主观感觉来确定最终结果,难以判断是否导致了结果失真。

图 6 是荧光褪色差分法与近年来应用效果较好基线校正方法的 ALS(OriginPro2017 所含)和 AirPLS 的处理结果比较。

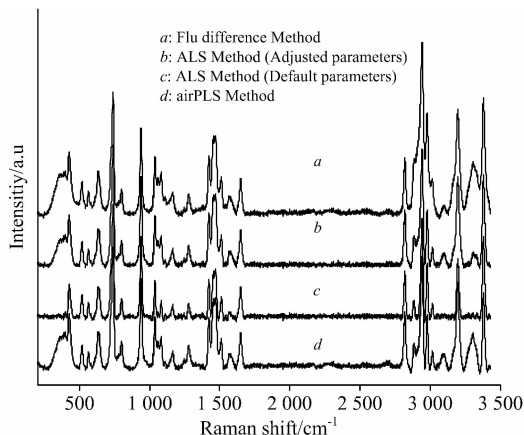


图 6 应用 FBDA, ALS 和 AirPLS 处理结果比较

Fig. 6 The original Raman spectrum are processed by FBDA, ALS and AirPLS

图 6a 是荧光褪色差分结果,交叠部分没有作为基线处理,保留了拉曼峰的真实形态。参考拉曼峰的实际形态,调整 ALS 基线拟合程度,得到的谱线 *b*,由于拉曼散射在不同波数上的展宽程度不同,波数越大展宽越大,所以在 3 000  $\text{cm}^{-1}$  及以后的拉曼谱型仍然出现了处理失真。谱线 *c* 是采用默认参数的 ALS 结果,校正结果平直、美观,但是拉曼交叠峰提升区域(1 000  $\text{cm}^{-1}$  右侧的三叠峰,3 000  $\text{cm}^{-1}$  附近)被作为基线拟合,将重叠峰处理成了多个独立峰,出现了明显失真;利用 AirPLS 推荐参数得到谱线 *d*,同样在 3 000  $\text{cm}^{-1}$  以后出现了一定程度失真。

相比于基线拟合方法,如果读取谱图的目的仅仅是确定各个峰位数据,基线拟合扣除可得到更好看、平直的谱图。但是荧光褪色差分法不要求参数调整和先验知识,基线在感官上不够平直,实际上是因为保留了拉曼峰的真实情况和更多细节,这对于需要获取更多拉曼谱图形貌信息的应用,无疑更具优势,对定量也更有利。

### 4.2 体系组成的稳定性

从确定性求解角度来看,拉曼信号和背景至少包含了两个因素,要从单一的混合谱线中确定出拉曼谱,直接扣减基线一定需要额外的参数(或者参数序列)定义。而荧光褪色差分的信息来自于随时间变化的两个以上谱线差异,原理上可以不需要做额外的参数定义。

需要注意的是,式(1)对荧光猝灭做了简化假设,即强度褪色仅为照射时间的函数,对于单组分或者荧光性质相似的多组分体系,这种假设是合理、可行的。在目前的成品仪器上,荧光褪色差分方法已经集成到产品数据处理系统中,对于大多数固体和液体样品都得到了满意结果。

但是,对于光化学现象明显和荧光性质差异大的体系,荧光强度变化不仅仅是照射时间的单变量函数,导致简化的假设不严密,影响方法稳定性;目前可行的方法是尽可能缩短照射持续时间,使得差分值更逼近强度变化微元,更进一步的方法还在探索中。

### 4.3 仪器性能和稳定性

方法实际实施中还可能受到仪器自身性能的影响,对方法影响较大的因素主要是光源稳定性和仪器动态响应范围。理想条件下,微小时刻内的光谱差分不会包含拉曼信息,但通常情况下仪器和光源因素,会导致强度有 1% 以内的波动,需要对光谱强度作相应补偿,消除差分内所含的拉曼信息。在成品仪器中,选择了峭度和信息熵作为荧光信号残留判据,具体步骤可参阅文献[13-14]。

拉曼光谱应用已经从简单的峰位、峰高定性分析,发展到挖掘峰位、峰宽、峰型等更全面的定性与定量信息,因此,要求基线校正不仅限于清晰和便于观察,更要求做到真实、准确。荧光褪色差分法通过多个差异信息源获取实际拉曼信号,因为满足“超定”求解要求,结果客观真实且确定,在本文案例以及其他实际应用中都取得了良好效果;与同样采用多信息源的激发波长平移差分法比较,优点是没有额外的硬件要求。

### 4.4 方法适用性验证

选取含痕量罗丹明的无水乙醇溶液、辛伐他汀药片、纳

米二氧化锡以及微晶纤维素粉末等几种不同类型样本,其直接测量和经荧光褪色差分法(FBDA)处理后的拉曼光谱见

图 7(a—d)所示。从图可以确证该方法可以真实有效的实现消除荧光干扰的目的,方法具有较好的适用性。

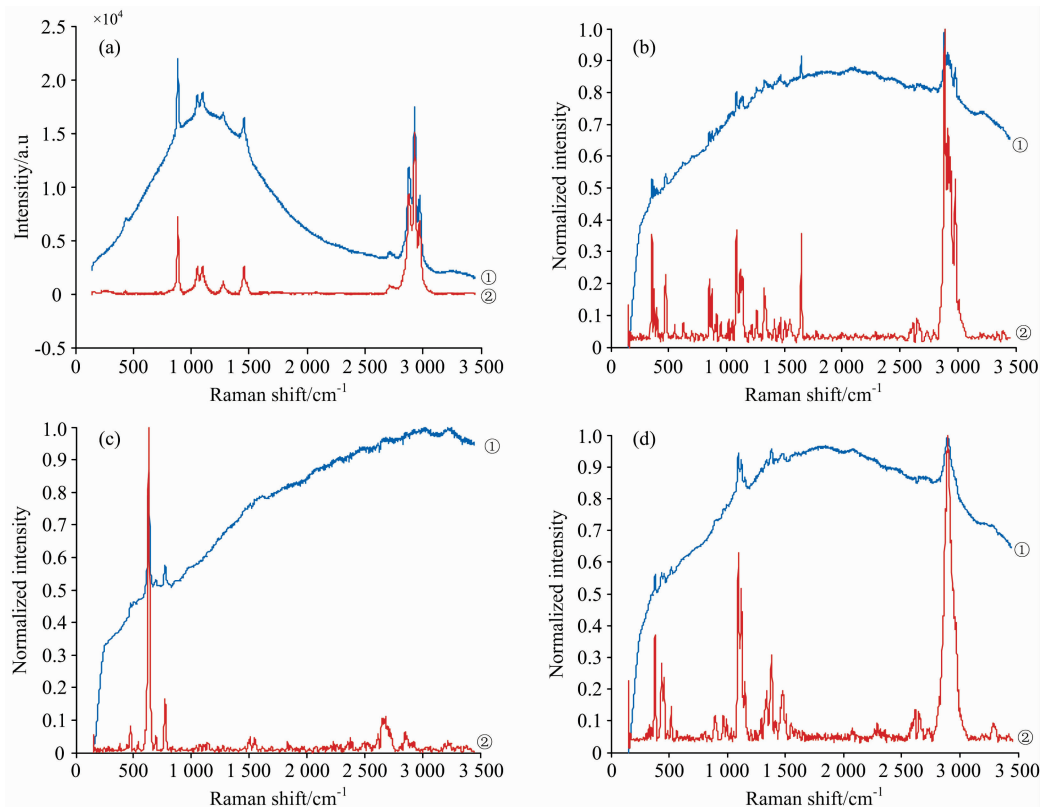


图 7 直接测量(1)和经荧光褪色差分法(FBDA)处理后(2)的不同样本拉曼光谱

(a): 罗丹明乙醇溶液; (b): 辛伐他汀片; (c): 纳米二氧化锡; (d): 微晶纤维素

Fig. 7 Raman spectra of different samples were directly measured and treated by FBDA

(a): Rhodamine B-ethanol; (b): Simvastatin; (c): Nano-SnO<sub>2</sub>; (d): Microcrystalline cellulose

## 5 结 论

荧光共生是拉曼光谱分析的一个重要干扰。对于稳定体系,荧光会随着激发时间延长出现强度下降的“褪色”效应,而拉曼光却保持稳定,该性质差异可以用来区分混合信号中的荧光和拉曼光,实现荧光去除,及拉曼光谱基线校正。

混合光谱内荧光的强度微元,可以用微小时间内光谱强

度的差分值(荧光褪色差分)代替,去除差分值中噪声成分后,利用拉曼光谱静默区内光谱强度完全为荧光响应值这一特点,通过求取逆差分,找出混合光谱中所包含的荧光,从而达到去除荧光,实现拉曼光谱基线校正的目的。荧光褪色差分法(FBDA)无需参数调整和先验知识,并可保留拉曼峰的真实情况和更多细节,有利于获取更多拉曼谱图形貌信息以及定量需求。

## References

- [1] Hirschfeld T, Chase B. Applied Spectroscopy, 1986, 40(2): 133.
- [2] FAN Xian-guang, WANG Hai-tao, WANG Xin, et al(范贤光, 王海涛, 王昕, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2016, 36(3): 724.
- [3] Kandjani, Ahmad Esmailzadeh, Griffin, et al. Journal of Raman Spectroscopy, 2013, 44(4): 608.
- [4] Qian Fang, Wu Yihui, Hao Peng. Optics and Laser Technology, 2017, 96: 202.
- [5] Prakash, Bhaskaran David, Wei Y-C. Analyst, 2011, 136 (15): 3130.
- [6] He Shixuan, Zhang Wei, Liu Lijuan. et al. Analytical Methods, 2014, 6(12): 4402.
- [7] Zhang Xun, Chen Sheng, Wu Boshi, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(12): 1846.
- [8] Gallo Crescenzo, Capozzi Vito, Lasalvia Maria, et al. Vibrational Spectroscopy, 2016, 83: 132.
- [9] YAO Zhi-xiang, SU Hui(姚志湘, 粟晖). China Patent(中国专利), CN101692045B. 2011-04-27.

- [10] Stelman C M, Bucholtz F. *Spectrochimica Acta Part A*, 1998, 54(8): 1041.
- [11] Mc Cain S T, Willett R M, Brady D J. *Applied Spectroscopy*, 2008, 16(15): 10976.
- [12] Macdonald A M, Wyeth P. J. *Raman Spectroscopy*, 2006, 37(8): 830.
- [13] YAO Zhi-xiang, SU Hui(姚志湘, 粟 晖). China Patent(中国专利). CN105606589B, 2018-05-29.
- [14] YAO Zhi-xiang, SU Hui(姚志湘, 粟 晖). China Patent(中国专利). CN105699356A, 2018-10-19.

## Fluorescence Fading Effect and Raman Spectrum Baseline Interference Cancellation

YAO Zhi-xiang<sup>1, 3, 4</sup>, SU Hui<sup>1, 3\*</sup>, HAN Ying<sup>2</sup>, XU Ji-ge<sup>2</sup>, HUANG Xiao-cheng<sup>1, 3</sup>, XIN Xin<sup>2</sup>

1. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China

2. CSEPAT (Beijing) Technology Co., Ltd., Beijing 100029, China

3. Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China

4. Guangxi Sugar Industry Collaborative Innovation Center, Nanning 530004, China

**Abstract** Fluorescence is the main part of background within direct Raman spectrum, and a faithful and truthful method is needed to remove it from the Raman detection, and to provide one pure Raman spectrum. There are two paths for setting background of direct spectra, i. e., baseline fitting and fluorescence finding. The baseline fitting is a currently path whose significant advantage reflects in “visual experience” without additional hardware, nevertheless, “visual” means surface and not essential, so that its results probably may be wrong or unreal. The other way attends to find out the real fluorescence within spectra, but it needs additional design and cost, such as two and more wavelengths in laser sources. Furthermore, some handle methods, reagent for suppress fluorescence or long time photo-bleaching, are insufficient operation and low efficiency. This research focus on the time difference of Raman and fluorescence to find out fluorescence from the direct spectra of a stable system. For the stable system, and within a tiny time cell, a few milliseconds or so, the excitation light does not make the system to be changed significantly and a part of fluorescence has been out of the life cycle at the same time, that is, fluorescence is fading and Raman keep stable within the time cell. So that this difference of the time cell can be treated as a fluorescence infinitesimal and used to distinguish fluorescence and Raman from mixed signal. Based on this principle, the fluorescence photo-bleaching difference approach (FBDA) has been presented to eliminate the background under direct Raman spectra. The steps of FBDA is carried out as follows: Firstly, a series of Raman spectra between tiny time cell is directly measured, and then a series differences for each time cell is computed, these differences are de-noised by low pass filtering, to get the infinitesimals of fluorescence. Secondly, these infinitesimals are mean and normalized to be a fluorescence unit. Thirdly, the total fluorescence can be summed by inverse difference of the unit, in addition, the silence area of Raman,  $2\ 000\sim 2\ 500\ \text{cm}^{-1}$ , which usually do not appear Raman signal, can be used as a benchmark for deciding the gross of fluorescence. Finally, the fluorescence gross deducted from the original spectrum, and the background deduction or baseline correction is completed. The paper takes an example, the Raman spectrum measuring of metformin hydrochloride tablets, to illustrate the FBDA method and its validity. The FBDA is more objective and true than others baseline correction methods, which are considered to work well, such as, ALS and airPLS. Further advances of FBDA are more convenient and less costly than the current fluorescence-finding path, because all of the data for FBDA are collected by existing instruments without any change or addition. It should be noted that the tiny time cell is a key requirement for FBDA, and tiny time cell can ensure the real-time performance of spectrum, the difference of long time would affect the accuracy of the results. In addition, the applicability of FBDA needs further development under the complex background from photochemical reaction and other non-fluorescence.

**Keywords** Raman; Fluorescence; Photobleach; Difference; Denoise

\* Corresponding author

(Received May 10, 2018; accepted Oct. 28, 2018)