

拉曼光谱中荧光抑制技术的研究新进展综述

王欢^{1,2}, 王永志¹, 赵瑜¹, 朱俐¹, 尹利辉^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘要 拉曼光谱技术反映了物质的结构特征, 可用于分析有机或者无机样品的化学组分。但由于某些被测物的荧光背景远远强于拉曼信号, 这些物质的拉曼光谱测量有时十分困难, 这限制了拉曼光谱的广泛应用。因此有必要在拉曼检测中对荧光采取抑制措施以准确获取高信噪比的拉曼光谱指纹信息。近些年来, 很多的相关研究探讨及发展了多种荧光抑制的新方法。在目前的科研活动中, 常用的技术有表面增强拉曼光谱技术、傅里叶变换拉曼光谱技术、共焦显微拉曼光谱技术和高温拉曼光谱技术等。这些技术解决了拉曼光谱早期存在的一些问题, 如荧光干扰、灵敏度低等, 极大地扩展了拉曼光谱技术在各个领域的应用。而这些新方法可大致归类为物理/化学方法, 基于光学性质不同衍生的方法, 计算处理方法和其他方法。文章概括性的介绍了上述方法的理论、实现方式, 并分析比较了各自的特点。

关键词 光谱分析; 拉曼; 荧光抑制; 信噪比

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2017)07-2050-07

引言

1928年印度物理学家拉曼(Raman)首先发现了拉曼散射效应, 图1所示为形成拉曼光谱分子散射图。此后拉曼光谱受到了科学家们的广泛重视。20世纪60年代, 激光器的诞生给拉曼光谱的应用带来了新的发展空间。拉曼光谱技术是一种非破坏性的测试技术, 几乎无需试样准备, 用很少量试样就能获得足够强的信号, 而且适用于物质的各种物理形态^[1]。

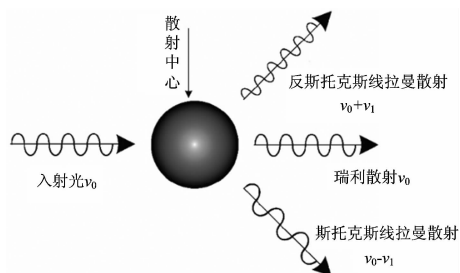


图1 瑞利散射和拉曼散射

Fig. 1 Rayleigh scattering and Raman scattering

目前, 拉曼光谱在化学、生物医学、材料、环保等领域有非常广泛的应用。在药学应用领域, 王玮^[2]等使用显微拉曼光谱法对阿司匹林固体分散体进行了拉曼图谱研究并与红外图谱进行了对比分析, 实验结果反映了药物在固体分散体中是以无定型形态存在的。在生物医学领域, 拉曼光谱可以对癌症进行早期诊断, Shiyamala Duraipandian等^[3]的研究表明近红外共焦拉曼光谱可以用于改善癌前期诊断技术以及用于宫颈癌早期的临床检查。在制药生产领域, De Beera等^[4]将拉曼光谱技术应用于生产过程的实时监控, 能够及时获得产品物理和化学在生产过程中的关键工艺信息, 实现了对生产工艺的即时控制。在药品快速筛查打假中, 拉曼光谱可以快速无损的对液体制剂进行检测^[5]。在食品领域, 拉曼光谱技术手段被证明能够有效识别不同油品^[6]。随着光谱技术的发展, 拉曼光谱将在科学研究中得到越来越广泛的应用。

在拉曼光谱测量中, 当用激光照射样品时, 除了能激发出拉曼散射光外, 还有可能会同时激发出荧光。当样品在激发激光的波长具有较强的荧光激发效率时, 则能够受激产生荧光, 形成荧光发射效应^[7]。荧光是拉曼背景光中最受关注的一种, 而激光引起的荧光是拉曼光谱中最普遍遇到的背景光源。拉曼散射强度通常十分微弱, 相反荧光的强度往往比拉曼散射光强得多, 在采用可见光波长激发的情况下, 荧

收稿日期: 2015-12-23, 修订日期: 2016-04-11

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAK08B02)资助

作者简介: 王欢, 1991年生, 中国药科大学硕士研究生 e-mail: whyaoxue91@163.com

* 通讯联系人 e-mail: yinlihui@nicpbp.org.cn; yinlihui@vip.163.com

光的强度是拉曼散射光强的 $10^6 \sim 10^8$ 倍^[8]。因此,在拉曼光谱测试中,对背景荧光采取一定的抑制措施是非常必要的。

近几十年里,国内外的学者提出了许多抑制荧光的方法和技术。有些是通过物理或者化学处理手段去除荧光;有些是基于拉曼散射光与荧光在性质上的不同,对拉曼测量仪器进行结构改造而实现;也有通过计算机算法处理消除荧光背景。本文介绍其中一些方法的原理以及特点,并对这些方法进行总结比较,便于读者针对应用需要参考选择合适的方法。

1 抑制荧光的方法及其原理

1.1 物理/化学方法

在拉曼光谱检测应用中,常用的物理/化学方法主要有荧光猝灭剂法、光漂白法和表面增强拉曼光谱技术等。

荧光猝灭剂法是最传统的一种方法,该方法是将荧光猝灭剂加入样品中,降低或者熄灭荧光强度,从而抑制荧光。常见的猝灭剂有卤素离子、重金属离子、氧分子以及硝基化合物、重氮化合物、羰基化合物。Joel Friedman 等^[9]在检测荧光黄时发现,相比直接测试,加入荧光猝灭剂(碘化钾)后,能够清晰观察拉曼特征谱。这种方法成本低,操作简单,但荧光猝灭剂有可能影响样品的表征拉曼光谱,因而使其应用受到了较大的限制。

光漂白法,也称为脱色,是在数据测定开始前用激光对试样照射一定时间用以“漂白”降低被测区表面的荧光响应,其时间长短可从几秒到几小时。在这一过程中,由于荧光分子被破坏,荧光发射强度也得到了降低,从而成功的得到样品的较强的拉曼光谱-荧光背景比。Macdonald 等^[10]在对红丹颜料进行拉曼检测时,光漂白后发现荧光背景强度整体下降,同时也可清楚地观察到一些小的拉曼峰。Janina Zieba-Palus 等^[11]为了获得金属涂料的拉曼光谱,在检测前用高能量激光照射样品,得到了使荧光猝灭的理想结果。该方法不需要其他设备,但是由于检测时需要用高能量的激光长时间照射样品,很可能破坏样品的分子结构。

表面增强拉曼现象是 1974 年 Fleischmann 及其合作者在实验中发现的,他们发现吡啶分子在粗糙的银电极表面有很强的拉曼信号产生^[12]。直到 20 世纪 90 年代随着激光技术、电荷耦合探测器(CCD)及纳米制备技术的发展才使其得到实质性进展。一个重要的突破在于单分子 SERS 的发现^[13]。表面增强拉曼光谱术是目前发展较为成熟的方法,其存在劣势如失去了拉曼光谱术非侵入和不接触分析的基本优点等。

1.2 基于拉曼散射光与荧光性质不同的方法

1.2.1 基于拉曼散射光与荧光寿命不同

拉曼光的寿命一般在皮秒级别,而荧光寿命一般在纳秒级别。当用超快激光激发时,拉曼散射光的发生在时间上紧随激发光而产生,而荧光的发射则在时间尺度上延后于拉曼散射光^[14],如图 2 所示。因此信号接收器总是先接收到拉曼信号,之后才会接收到荧光信号。基于此原理有许多拉曼测量的方法和仪器改造方法,如克尔门控件法、光电倍增管

法、加强型电荷耦合器件(CCD)相机法、互补金属氧化物半导体(CMOS)检测器法和超快速扫描相机法等。

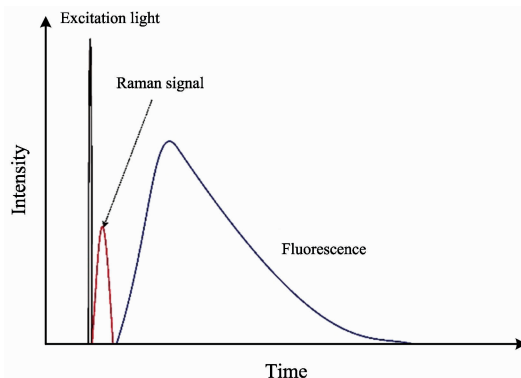


图 2 拉曼光与荧光在响应激发光时间及寿命上的不同
Fig. 2 The difference between Raman signal and Fluorescence

克尔门控件是由非线性克尔介质和位于介质两侧的正交偏光镜组成的。由于存在光学克尔效应,当高能脉冲门控激光与克尔介质产生非线性相互作用时,会导致克尔介质产生短暂的各向异性,使得线性偏振光的偏振方向旋转 90° 。当同步调整门控激光脉冲和激发激光时,因为克尔介质起到了半波片的作用,拉曼光能够通过正交偏光镜,并且偏振方向旋转 90° ,而由于荧光的寿命较长,时序上用门控在荧光形成前旋转克尔介质的偏振,使后形成的荧光信号无法通过正交偏光镜^[15]。Matousek 等^[16]提出使用皮秒级克尔开关来抑制荧光的方法,克尔开关门宽度 3 皮秒,在克尔开关通光瞬间拉曼光完全通过,而由于荧光寿命长,大部分荧光被阻挡,该方法的应用结果表明其对于液体样品的测量具有良好的效果。在用于对含有乙腈与激光染料二氯甲烷(DCM)溶液检测时,发现使用克尔开关后几乎不再观测到荧光的干扰,谱线分辨力也得到大幅提高。然而,由于偏振旋转不完全以及光学器件的制作缺陷,克尔门的光透射率在打开和关闭状态下的差别分别为 15% 和 0.005%。在后续的研究中,有关人员优化了偏光镜,提升了克尔门的性能,使得打开和关闭状态下的消旋比达到了 10^5 ,在打开克尔门状态下,透光率提升到了 40%^[17]。然而在生物样品检测中,过高的激光能量可能会破坏样品分子、增加光诱导损伤的风险,因此该方法应用并不广泛^[18]。

另一类方法是直接利用超快速时间门检测器,其中有两个关键参数,一是较短的门宽度,另一个是足够高的重复频率以维持检测器的工作周期^[19]。配以数百皮秒级别的时间门,能够有效检测到拉曼信号并且过滤荧光信号。这类技术常用的检测器有光电倍增管、加强型电荷耦合器件(ICCD)检测器、互补金属氧化物半导体(CMOS)单电子雪崩检测器(SPAD)。Junji Watanabe 运用了单通道检测器并配以短时(约 5 皮秒)、高频(约 82 MHz)的激光脉冲和微通道板型光电倍增管,成功在抑制乙醇中罗丹明 6G 的荧光信号。相比无时间门检测器的方法,该法提高了拉曼信号的信噪比以及拉曼/荧光强度比^[20]。Joseph 设计了成本相对较低的拉曼系统,采用了 6.4 kHz, 900 皮秒脉冲宽度的二极管激光器和

光电倍增管进行数据采集。该系统检测含有杂质罗丹明 6G ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的纯苯时, 采用 0.7 ns 的时间门相比 25 ns 的时间门, 信噪比提升了 15 倍^[21]。

如今, 二维阵列检测器逐渐取代了光电倍增管、光电二极管等单通道检测器。二维阵列检测器, 如加强型电荷耦合器件 (ICCD) 检测器、互补金属氧化物半导体 (CMOS) 检测器和超快速扫描检测器等, 能有效提升光谱质量, 并且能够利用二维的检测面来同时捕捉不同空间点 (或通道) 产生的多条拉曼谱带, 提高检测效率^[22]。Martyshkina 等^[18] 利用配有加强型 CCD 检测器的锁模激光器, 采用时间门控的方法, 成功抑制了六苯并蒽和 Nd^{3+} 杂质的荧光效应。当时间门检测器适当延迟一段时间后开启, 就有可能分辨来自不同样品深度的拉曼散射^[23]。此外, 也有用配有 100 皮秒之内的时间门互补金属氧化物半导体-单电子雪崩检测器 (CMOS-SPAD) 来抑制橄榄油样品中的荧光背景的工作报导。CMOS-SPAD 是二维检测器, 优点是时间门非常短 (小于 100 皮秒)。然而, 该技术有两个不足: 一是 CMOS-SPAD 检测器只有中等的光子探测效率, 二是它较低的填充系数, 这些会影响 SPAD 的敏感性和捕获拉曼光子的能力, 尤其是在近红外谱区的光子^[24]。超快速扫描相机结合皮秒脉冲激光也能够做到荧光抑制。超快速扫描相机具有高达 10 皮秒的时间分辨率, 因此不必进行去卷积的计算过程。该相机同时也具有二维扫描能力, 因此可以进行二维平面的光谱检测, 该特点使得多通道拉曼同时检测成为可能, 也大大提高了多通道的检测效率, 简化了系统。采用该方法, 在检测苯和罗丹明 640 荧光团混合溶液时, 使拉曼/荧光强度比达到了 281^[25]。

在这些二维阵列检测方法中, CMOS 检测器法相比较 CCD 检测器法和超快速扫描相机法, 其成本较低; 并且在读出电路的高集成度、功耗率、系统体积上均优于 CCD 检测器法^[26-27]。但 CCD 检测器和超快速扫描相机法能提供更加优质的图像质量, 以及在近红外区依然能够保持高检测灵敏度噪比^[28]。

1.2.2 基于拉曼散射与荧光在频率性质上的不同

拉曼散射和荧光对高频信号的响应不同, 当用高频正弦波作为激发光源时, 荧光信号在激发光照射到样品之后一段时间才发出, 无法跟随高频信号的调制, 而拉曼散射几乎在激发光照射到样品的同时产生, 因此可以进行高频率的调制。以此为理论基础的方法有频率调制法和频率相位归零法。

在频率调制法方面, Frank V Bright 等对激发光进行 328 MHz 的高频调制, 并把散射光和调制信号送入微波分析仪进行选频放大, 对浓度为 $10 \text{ pM} \cdot \text{L}^{-1}$ 的罗丹明水溶液进行检测, 拉曼光谱的信噪比得到了明显的提高, 同时也得到了调制频率越高越容易区分拉曼光与荧光的结论。然而更高频率的调制和检测技术难度较大, 因此该方法仅适用于荧光寿命较长的情况^[29]。

频率相位归零法的一般步骤是用一束经正弦调制的激光激发样品, 激光发生器与增益可调型图像增强器通过相位延迟发生器相耦合。拉曼/荧光信号通过分光镜和长通滤片后, 其角频率相同但延迟时间不相同, 通过增益可调型图像增强

器之后, 被耦合在其上的检测器检测到, 增益可调型图像增强器具有与信号相同的角频率。激发光与增益可调型图像增强器之间的相位差可由相位延迟发生器调节^[30]。当设定了一个合适的相位差值时, 锁相放大器及相位敏感检测器可分别侦测拉曼信号和荧光信号。当检测器与荧光信号呈异相时 (90°), 理论上荧光信号可以被完全抑制, 图 3 为频率相位归零法的原理图。Demas 在研究中, 利用 40 kHz 的激发光和相位敏感检测器成功抑制了罗丹明 6G 水溶液中的荧光信号。在增加了锁相放大器后, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 的荧光信号也能够被分离出来^[31]。

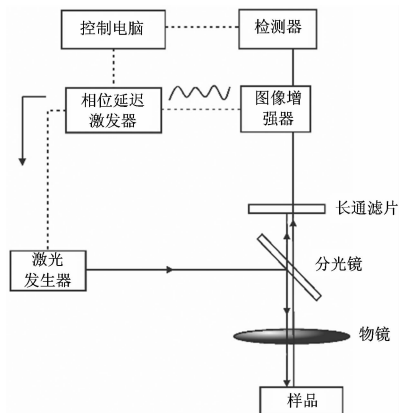


图 3 频率相位归零法原理

Fig 3 Schematic of a frequency-domain phase-nulling system
solid lines represent the flow of optical signals; dashed lines represent the electronic signals

Wirth 对利用寿命性质和频率性质来消除荧光的方法进行了比较。当激发光频率调制为 329 MHz 时, 高频调制的方法使拉曼信号值提升了 200 倍, 并且显著抑制了荧光信号, 而利用拉曼光与荧光寿命不同的方法效果较差。然而, 频率调制的方法依托于非常复杂的仪器设备, 并且很难降低仪器本身的随机噪声; 在大跨度频谱范围内, 该方法并不能较好的分离出拉曼光谱^[32]。Rusciano 等提出了另一种新技术, 高频调制配以能够相位变化 90° 的相敏光电倍增管, 光电倍增管同时耦合单色器以获得全波段光谱, 然而由于是单通道光电倍增管, 扫描用时较长^[33-34]。

1.2.3 基于拉曼散射与荧光在波长性质上不同

20 世纪 50 年代发现了拉曼散射与荧光对激发光波长不同而表现出的不同响应特性的现象, 在一个相对较小的范围内, 荧光光谱的分布特征几乎不会随着激发波的频率变化而产生较大的变化, 相反拉曼光谱具有其相对于激发频率间的位移恒定的特性, 会紧密跟随激发光波的频率变化而表现出在以波长显示的拉曼谱的移动^[35]。根据这个理论, 对应不同激发频率光所获得的光谱进行相减可有效扣除基本相同的荧光背景。用于增强较大荧光背景下的较弱拉曼信号的提取能力的波长控制检测方法因此应运而生^[36]。一般的波长控制方法包括移频激发法 (SERDS), 波长调制拉曼光谱法 (WMRS) 和差移拉曼光谱法 (SSRS)。

移频激发法是基于拉曼光谱对激发光频率位移恒定而在

波长上的依赖程度不同而提出的,若用两个波长相近的激发光分别激发样品,会得到两组拉曼散射+背景光谱,再利用差分方法,得到两个散射谱的差值谱,在该差值谱中的荧光信号几乎可被完全消除,而拉曼信号却能够保留下来^[37]。然而由移频激发法得到的差分谱图与常规的拉曼谱图十分不同故不能进行常规的光谱分析,为了得到真实的拉曼光谱,需要对得到的差分光谱图进行数学处理,常用的数学处理方法有光谱曲线拟合法^[38]、去卷积法^[37, 39]和主成分分析法^[40]。运用这些方法,能够明显提升光谱质量。Shreve等利用该方法对掺杂高浓度染料的三氯甲烷溶液进行了检测,发现即使荧光强度是拉曼光谱的 10^3 倍,仍然能够分辨拉曼光谱^[38]。Stellman和Bucholz等利用声光调制器实现双波长拉曼激发,对含有 $100\text{ pM}\cdot\text{L}^{-1}$ 的荧光染料乙醇溶液进行拉曼检测,比采用单个激光激发的荧光背景噪声显著下降,拉曼特征谱线可以清楚得到辨认^[41]。Martin Maiwald采用了一个小型的二极管激光发射器,并且用布拉格光栅分开了激光腔,成功实现了 670.0 和 671.6 nm 两个波长激发光的输出^[42]。还有采用 488 nm 激发光源的系统,在调整温度后,可以激发出 487.61 和 487.91 nm 的激发波长,用以获取聚苯乙烯样品的拉曼光谱^[43]。移频激发法的优势是能够提升信噪比,缩短扫描时间,同时还能有效消除系统或随机噪声。Cooper等利用分布式布拉格反射镜砷化镓二极管激光器,在控制温度在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 时,激发出4条波长在 785 nm 左右的激发光,成功的实现了荧光扣除^[44]。而其与克尔门相结合也能够进一步提升抑制荧光的能力,甚至能在荧光信号强度为拉曼信号的 10^6 倍时,也能检测到强度仅有发射噪声水平的拉曼光^[45]。

波长调制拉曼光谱法(WMRS)与移频激发法的原理相似,相比SERDS,WMRS采用的是激发波长是连续调制的,并且采用多通道锁定检测器。当多通道检测器与激发光同步调整时,就能够有效的抑制荧光背景,分辨出拉曼散射光^[46]。De Luca等分析了含有直径为 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球的荧光染料溶液的拉曼信号,激发光波长在 $0.03\sim 0.4\text{ Hz}$ 的范围内连续调制,多通道锁定检测器在线检测拆分光谱。在研究中发现,相比SERDS,通过WMRS获得的拉曼信号信噪比在 0.4 Hz 频段高了三倍^[47]。如今,波长调制拉曼光谱法逐渐成为抑制荧光信号最简便有效的手段^[48]。

差移拉曼光谱法(SSRS)在理论上与移频激发法也相似,SSRS与WMRS相比,因为舍弃了变频的激光源,在实验简化方面具有优势^[49]。SSRS采用了可微旋转位置的光栅,来实现被测光谱落在检测元空间上的细微的变化以便于获得前光栅微转前后光谱的差分谱图。SSRS主要的局限是通过该方法获得的图谱需要进一步处理才能够转变为常规的光谱图,处理之后的图谱可能会引入杂峰。

1.3 基于计算机算法处理的方法

除了实验方法,计算机算法处理也是广泛应用的方法。最常使用的计算机算法处理方法有多项式拟合、小波变换和求导数等方法。这些方法在处理拉曼光谱背景中的共同使用前提是拉曼信号没有被荧光信号完全淹没。

多项式拟合的理论基础是荧光光谱能够拟合为低阶多项

式,并且能够从拉曼光谱中通过简单数学运算予以扣除。因为荧光光谱的变化比拉曼光谱小得多,因此这种方法是合理可行的^[50]。该方法的优势是能够保留去除背景后拉曼峰的原始形状。然而,多项式拟合的最佳选择往往是变化的,并且操作人员对最终结果有决定性的影响^[51],当不知道样品的荧光光谱时,难以实现最佳拟合。

小波变换的理论基础为:相比拉曼信号,荧光信号包含的部分变换缓慢并且主要是低频部分^[52]。小波变换的处理步骤是先对光谱信号进行小波分解,得到高频和低频小波系数矢量,然后通过阈值法去除小波系数中被认为是噪声或背景干扰的元素,最后对经过处理的小波系数进行反变换,得到预处理后的光谱信号^[53]。在小波变换的操作过程中,需设置许多参数,如何选择最优参数是一个急需解决的难点^[54]。Zhang等利用小波变换原理开发了一种智能背景扣除算法,该算法可智能模仿手动背景去除的过程,在拉曼图谱中取得了较好的效果^[55]。

求导数方法是应用较为广泛也是处理光谱最直接的方法,并且在计算上具有显著的优势。荧光背景的导数在数值上通常小于拉曼峰的导数,利用该性质,可以移除光谱中的背景成分,使得拉曼峰更为显著^[56]。然而,导数方法会造成高频噪声更加突出,并且会使图谱扭曲,在图谱表现上与原始图谱有差异,解读图谱具有一定难度^[57]。

除此之外,傅里叶变换法是根据荧光光谱与拉曼光谱的谱线宽度不同,有不同的傅里叶频谱特征,可以在频域中进行适当的滤波来区分拉曼谱与荧光谱^[58]。还有一种依据荧光背景特点提出的基于信号极小极大值自适应缩放的方法,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^[59]。除此之外,还有基于拉曼光谱的改进投影算法,应用于药品的快速鉴别,改进后的投影算法可以实现不同药品的准确识别与相近药品的准确区分,具有很好的普适性、准确性和可靠性^[60]。

1.4 其他方法

除了以上这些分类的方法,还有其他方法也对荧光具有抑制效果。

偏振调制法是基于荧光与拉曼光的偏振特性不同提出的,大部分荧光属于偏振光,拉曼光则是部分偏振光,采用偏振斩波器,将光路分成两路,一路进入单色仪作为输入信号,另外一路作为参考信号,利用锁相放大器进行检测,可以充分区分开荧光与拉曼信号。Angel等^[15]介绍了一种偏振调制方法,成功检测出了乙醇溶液中浓度为 $1\text{ nM}\cdot\text{L}^{-1}$ 的罗丹明拉曼谱。但是该方法较难实现多通道检测;同时并不是所有的荧光都是偏振光,因此应用范围也受到一定限制。

激发光采用近红外、紫外光是目前最为常用的方法。由于近红外波段的光子远离样品分子的主吸收区间,很难激发基态电子,因此产生荧光的效率较低。为了避开荧光干扰,Hirschfeld等^[61]采用傅里叶变换拉曼光谱仪(1064 nm 激光激发)检测聚对二甲苯酚粉末时几乎没有遇到荧光背景噪声干扰,信噪比较高,若采用 532 nm 激光激发同样的样品则

会出现很强的荧光。紫外光激发法是用紫外谱区激光激发样品,由于荧光的斯托克斯位移比拉曼位移大的多,因此通过针对该位移差的检测可以区别开拉曼光与荧光^[62]。其局限是用于激发的紫外光的光子的能量较高,有可能导致样品分解,并且同时对操作人员也存在伤害危险,此外仪器成本也较高。

当激发光的功率很大时会在样品中产生一些非线性效应,如反转拉曼效应、反斯托克斯散射增强效应等,利用这些非线性效应可以大幅增大拉曼光强度,拉曼信号检测更加便捷。但由于非线性效应法的激发光功率很大,可能会对样品产生破坏作用^[63]。

还有许多其他的技术,如激光共振拉曼光谱技术、光声拉曼技术和高温高压原位拉曼光谱技术^[64],以及共聚焦显微拉曼光谱技术^[65]和透射拉曼技术^[66]等能够实现荧光抑

制。

2 荧光抑制方法的比较

表 1 对列举的主要方法从表现、成本和特点几方面进行了粗略比较。从结论中可以看出,采用多种计算机算法处理图谱是成本效率最高的方法,但是其本身的局限,对原始图谱中拉曼峰较弱的情况处理效果不佳。获得原始图谱中效果最好的是利用寿命性质的方法,特别是超快速扫描相机法,能获得极佳的结果,由于这种方法对设备本身的要求较高,会造成仪器成本的大幅上升。较为折中的选择是频率性质方法,在成本和效果表现上较为平衡。

在现实应用中,往往是以上方法配合计算机算法处理,来进一步处理光谱图谱,获得最佳的检测效果。

表 1 拉曼光谱荧光抑制方法的比较

Table 1 Comparison among the major categories of fluorescence suppression methods

方法	成本	表现	特点
寿命性质方法	中等至高	好	优势:能够分离深层和浅层的拉曼信号并且最小化抑制有一定厚度样品的内散射。有效降低统计噪音。 局限:当荧光寿命与激发脉冲时间相近时无效果。光谱分辨率随激光脉冲宽度变宽而降低。在克尔门控方法上要求较高的激光脉冲能量。
频率性质方法	中等至高	中等	局限:需要较强的的拉曼信号以覆盖荧光背景。在测量大带宽拉曼光谱时无法抑制荧光。
波长性质方法	中等	中等	优势:只需对普通拉曼系统进行适度的修改。 局限:需要进行复杂数据处理才可获得正常的拉曼光谱。光谱再现强烈依赖原始光谱的噪声水平。
计算机算法方法	低	中等至高	优势:通常可以调整方法以保护削减背景后的特定光谱特性。 局限:对关键参数优化选取取决于用户的经验。数据处理过程较耗时间;某些衍生方法可能会扭曲结果图谱;特别是在微弱的拉曼信号,可能会人为的引进杂峰。

3 结 语

在近年来的科研及实际应用中,拉曼光谱的应用范围变得更加广泛,然而由于荧光背景的存在,必须对得到的拉曼

图谱进行一定的处理。这篇综述对目前使用的拉曼荧光背景抑制技术进行了总结分析和比较,便于科研人员参考针对不同的应用需求选择合适的技术。随着光电技术的发展,在不同应用方面都能保持性能一致和更加人性化的拉曼实验方法必将得到更广泛的应用。

References

- [1] YANG Xu-gang, WU Qi-lin(杨序纲, 吴琪琳). Raman Spectroscopy Analysis and Application(拉曼光谱的分析与应用). Beijing: National Defense Industry Press(北京: 国防工业出版社), 2008. 1.
- [2] WANG Wei, LI Xiao-man, TIAN Jing-hui, et al(王 玮, 李晓曼, 田京辉, 等). The Journal of Light Scattering(光散射学报), 2011, 23(1): 57.
- [3] Shiyamala Duraipandian, Wei Zheng, Joseph Ng, et al. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(6): 067007-1.
- [4] De Beera T, Burggraeva A, Fonteyne M, et al. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 417: 32.
- [5] ZHAO Yu, FENG Xue, YIN Li-hui(赵 瑜, 冯 雪, 尹利辉). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 2014, 34(4): 702.
- [6] WANG Xiang, DAI Chang-jian(王 翔, 戴长建). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2015, 35(4): 929.
- [7] FAN Mei-gong, YAO Jian-nian, TONG Zhen-he(樊美公, 姚建年, 佟振合). Molecular Photochemistry and Optical Functional Materials Science(分子光化学与光功能材料科学). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2009. 32.
- [8] Mosier-Boss P A, Lieberman S H, Newbery R. Applied Spectroscopy, 1995, 49(5): 630.
- [9] Joel M Friedman, Robin M Hochstrasser. Chemical Physics Letters, 1975, 33(2): 225.
- [10] Macdonald A M, Wyeth P. Journal of Raman Spectroscopy, 2006, 37(8): 830.

- [11] Janina Zieba-Palus, Aleksandra Michalska. *Vibrational Spectroscopy*, 2014, 74: 6.
- [12] Fleischmann M, Hendra P J, Mcquillan A J. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26(2): 163.
- [13] Nie Shuming, Steven R Emory. *Science*, 1997, 275(5303): 1102.
- [14] Joseph R Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. 851.
- [15] Angel S M, DeArmond M K, Hanck K W, et al. *Analytical Chemistry*, 1984, 56(14): 3000.
- [16] Matousek P, Towrie M, Stanley A, et al. *Applied Spectroscopy*, 1999, 53(12): 1485.
- [17] Matousek P, Towrie M, Ma C, et al. *Journal of Raman Spectros*, 2001, 32(12): 983.
- [18] Martyskhin D V, Ahuja R C, Kudriavtsev A, et al. *Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(3): 630.
- [19] Neil Evereall, Thomas Hahn, Pavell Matouesk, et al. *Applied Spectroscopy*, 2001, 55(12): 1701.
- [20] Junji Watanabe, Shuichi Kinoshita, Takashi Kushida. *Review of Scientific Instruments*, 1985, 56(6): 1195.
- [21] Joseph V Sinfield, Oliver Colic, Daniel Fagerman, et al. *Applied Spectroscopy*, 2010, 64(2): 201.
- [22] Juha Kostamovaara, Jussi Tenhunen, Martin Kögler, et al. *Optics Express*, 2013, 21(25): 31632.
- [23] Freek Ariese, Heleen Meuzelaar, Marleen M Kerssens, et al. *Analyst*, 2009, 134(6): 1192.
- [24] Juha Kostamovaara, Jussi Tenhunen, Martin Kögler, et al. *Optics Express*, 2013, 21(25): 31632.
- [25] Tahei Tahara, Hiro-O Hamaguchi. *Applied Spectroscopy*, 1993, 47(4): 391.
- [26] Litwiller D. *Photonics Spectra*, 2002, 36(1): 102.
- [27] Zlatanski M, Uhring W, Le Normand J P, et al. *Measurement Science and Technology*, 2010, 21 (11): 115203.
- [28] Hain R, Kähler C J, Tropea C. *Experiments in Fluids*, 2007, 42(3): 403.
- [29] Frank V Bright, Gary M Hieftje. *Applied Spectroscopy*, 1986, 40(5): 583.
- [30] Genack A Z. *Analytical Chemistry*, 1984, 56(14): 2957.
- [31] Demas J N, Keller R A. *Analytical Chemistry*, 1985, 57(2): 538.
- [32] Wirth M J, Chou Shiow-Hwa. *Analytical Chemistry*, 1988, 60(18): 1882.
- [33] Rusciano G, De Luca A C, Sasso A, et al. *Applied Physics Letters*, 2006, 89(26): 261116.
- [34] Rusciano G, De Luca A C, Sasso A, et al. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(10): 3708.
- [35] Michael Kasha. *Discussions of the Faraday Society*, 1950, (9): 14.
- [36] Scott T McCain, Rebecca M Willett, David J Brady. *Optics Express*, 2008, 16(15): 10975.
- [37] Zhao Jun, Mike M Carrabba, Fritz S Allen. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56(7): 834.
- [38] Andrew P Shreve, Nerine J Cherepy, Richard A Mathies. *Applied Spectroscopy*, 1992, 46(4): 707.
- [39] Matousek P, Towrie M, Parker A W. *Applied Spectroscopy*, 2005, 59(6): 848.
- [40] Kay Sowoidnich, Heinz-Detlef Kronfeldt. *Applied Physics B Laser and Optic*, 2012, 108(4): 975.
- [41] Stellman C M, Bucholtz F. *Spectrochimica Acta Part A*, 1998, 54(8): 1041.
- [42] Martin Maiwald, Heinar Schmidt, Bernd Sumpf, et al. *Applied Optics*, 2009, 48(15): 2789.
- [43] Martin Maiwald, Heinar Schmidt, Bernd Sumpf, et al. *Applied Spectroscopy*, 2009, 63(11): 1283.
- [44] Cooper J B, Abdelkader M, Wise K L. *Applied Spectroscopy*, 2013, 67(8): 973.
- [45] Matousek P, Towrie M, Parker A W. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2002, 33(4): 238.
- [46] Praveen B B, Mazilu M, Marchington R F, et al. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67211.
- [47] Anna Chiara De Luca, Michael Mazilu, Andrew Riches, et al. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(2): 738.
- [48] Bavishna B Praveen, Christian Steuwe, Michael Mazilu, et al. *Analyst*, 2013, 138(10): 2816.
- [49] Bell S E J, Bourguignon E S O, Dennis A. *Analyst*, 1998, 123(8): 1729.
- [50] Vincent Mazeta, Cédric Carteretb, David Brie. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005, 76(2): 121.
- [51] Alex Cao, Abhilash K Pandya, Gulay K Serhatkulu, et al. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9): 1199.
- [52] Galloway C M, Le Ru E C, Etchegoin P G. *Applied Spectroscopy*, 2009, 63(12): 1370.
- [53] YANG Gui-jun, CHEN Yu-lun(杨桂君, 陈玉伦). *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室)*, 2010, 27(1): 325.
- [54] Hu Yaogai, Jiang Tao, Shen Aiguo, et al. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2007, 85(1): 94.
- [55] Zhang Zhimin, Chen Shan, Liang Yizeng, et al. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010, 41, 659.
- [56] Georg Schulze, Andrew Jirasek, Marcia M L Yu, et al. *Applied Spectroscopy*, 2005, 59(5): 545.
- [57] Marc N Leger, Alan G Ryder. *Applied Spectroscopy*, 2006, 60(2): 182.
- [58] Mosier-Boss P A, Lieberman S H, Newberye R. *Applied Spectroscopy*, 1995, 49(5): 630.
- [59] GAO Guo-ming, LI Xue, QIN Zong-ding, et al(高国明, 李 雪, 覃宗定, 等). *Acta Optica Sinica(光学学报)*, 2013, 33(2): 0230002-1.
- [60] JIA Nan-nan, JI Jiang, GAO Peng-fei, et al(贾南南, 季 江, 高鹏飞, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2015, 35(5): 1271.
- [61] Hirirshfeld T, Chase B. *Applied Spectroscopy*, 1986, 40(2): 133.
- [62] Asher S. A. *Analytical Chemistry*, 1993, 65(2): 59.

- [63] ZOU Wen-long, CAI Zhi-jian, WU Jian-hong(邹文龙, 蔡志坚, 吴建宏). *Optical Instruments(光学仪器)*, 2010, 32(5): 89.
- [64] ZHANG Yan, YIN Li-hui, FENG Fan(张 雁, 尹利辉, 冯 芳). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志)*, 2009, 29(7): 1236.
- [65] XU Yong-jian, LUO Rong-hui, GUO Mao-tian, et al(许永建, 罗荣辉, 郭茂田, 等). *Laser Journal(激光杂志)*, 2007, 28(2): 13.
- [66] Charlotte Eliasson, Neil A Macleod, Linda C Jayes, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47(9): 221.

Latest Methods of Fluorescence Suppression in Raman Spectroscopy

WANG Huan^{1,2}, WANG Yong-zhi¹, ZHAO Yu¹, ZHU Li¹, YIN Li-hui^{1*}

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Raman spectroscopy provides the fingerprint of the molecules, and is an important and powerful technique for analyzing the chemical composition of biological or non-biological samples. However, in many cases, the existence of the concurrent fluorescence background seriously interferes with Raman measurements. The excitation laser induced fluorescence intensity can be sometimes several orders of magnitudes higher than that of the Raman scattering signals. Such fluorescence backgrounds must be suppressed during the measurement in that Raman spectral fingerprints have to be measured accurately with high signal-to-noise ratio. A variety of techniques have been explored in researches and practical applications for this purpose. In present scientific researches, common methods include Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Fourier Transform Raman Spectroscopy, micro-Raman Techniques and High Temperature Raman Spectroscopy Techniques. All these solve the problems such as fluorescence interference and insensitivity, which greatly expands the application range of Raman spectroscopy. These techniques may be generally grouped into the categories of physical/chemical, optical properties, chemometric methods and other unconventional methods. This review briefly describes the fundamental principle and implementation of each group of the methods, and makes comparison between those major categories of techniques.

Keywords Spectrum analysis; Raman; Fluorescence suppression; Signal to noise ratio

(Received Dec. 23, 2015; accepted Apr. 11, 2016)

* Corresponding author