

ELIMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN ESPECTROS RAMAN MEDIANTE TECNICAS FFT

O.Latorre, M.J.Soneira, J.M.Yufero y S.Ruiz-Moreno
Dpto. de Teoría de la Señal y Comunicaciones
E.T.S.I. Telecomunicación de Barcelona
Universitat Politècnica de Catalunya
Campus Norte, UPC. Módulo D5, 08080 Barcelona
c/ Sor Eulalia de Anzizu, s/n.
Tel.: 401 64 48, Fax: 401 64 47, E-mail: linjgf@tsc.upc.es

ABSTRACT

The use of Edge Detection method in combination with fast fourier transform filtering techniques for fluorescence reduction is presented. This technique allow us to obtain the fluorescence spectrum contained in the Raman spectrum analyzed and so, to determine in a systematic way, both the cutoff frequency of the high pass filter that reduces the fluorescence and the Raman peaks positions which contain the necessary information to pigment identification.

1. INTRODUCCIÓN

La espectroscopía Raman juega un papel muy importante en la identificación de los pigmentos que componen una obra de arte, pero su aplicabilidad se ve limitada por la fluorescencia que presentan ciertos materiales al ser iluminados por el haz de un laser. La fluorescencia es un ruido que puede ser $10^6 - 10^8$ veces más intenso que la señal Raman y consecuentemente enmascararla por completo no permitiendo la identificación correcta del pigmento en estudio. Muchas son las técnicas ideadas para reducir la fluorescencia o extraer la información Raman contenida en ella. Una de las más recientes es la aplicación de técnicas de procesamiento de señal standard para la discriminación entre señal Raman y fluorescencia. Ello es posible gracias a la diferencia entre las bandas espectrales que ambas señales ocupan, en concreto, la fluorescencia es una señal de banda óptica muy ancha mientras que la señal Raman es de banda muy estrecha. De manera que el filtrado de las componentes de baja frecuencia en el dominio de Fourier del espectro analizado reduce, de forma efectiva, el ruido de fluorescencia.

Además del ruido de fluorescencia, debido al proceso de fotodetección, el ruido shot generado en el receptor también afecta negativamente a la señal Raman, siendo necesaria su reducción.

En esta comunicación se describe un método para eliminar la fluorescencia basado en el filtrado en el dominio de Fourier (FFT) del espectro investigado previa reducción del ruido shot mediante el filtrado paso bajo del mismo.

2. TÉCNICA DE REDUCCIÓN DE FLUORESCENCIA

Entre las técnicas utilizadas para la eliminación de la fluorescencia cabe destacar dos [1]: el método de Edge Detection, también conocido como First Derivative Spectroscopy, y las técnicas tradicionales de filtrado digital. Aunque cada una de ellas constituye por si misma una forma de reducir la fluorescencia, la aplicación conjunta de ambas nos permite obtener resultados más precisos. Así, con el filtrado digital se obtienen mejores resultados pero la determinación de la frecuencia de corte de la fluorescencia representa un problema a resolver. En esta comunicación se presenta una solución que utiliza el método de Edge Detection para determinar la frecuencia de corte del filtro digital que se empleará para reducir la fluorescencia del espectro Raman en estudio.

Antes de aplicar el método Edge-Detection es necesario "suavizar" el espectro reduciendo el ruido shot que presenta mejorando la relación señal a ruido. Un filtro paso bajo realiza esta función. Para determinar la frecuencia de corte óptima de dicho filtro es necesario conocer previamente la anchura espectral de la señal Raman. Varias son las soluciones a este problema [2][3][4], aunque en el caso de señales Raman con picos estrechos o con mucho ruido ninguna se muestra eficaz. En esta comunicación se presenta otra solución, más robusta en tales circunstancias, utilizando dos filtros denominados Savitzky y Golay [5] y la ventana de Papoulis. El primero obtiene una mayor resolución de los picos mientras que el segundo reduce mejor el ruido shot.

Con el fin de conocer la anchura espectral de la fluorescencia, se utiliza el método Edge-detection. Dicho método realiza en primer lugar la derivada del espectro óptico bajo análisis lo cual equivale a un filtrado lineal paso alto que elimina parte de la fluorescencia contenida en él. En segundo lugar, mediante el algoritmo de Marquart [6] se ajusta el espectro con picos lorentzianos derivados que simulan los picos Raman. Así, se tiene una primera estimación de la posición, anchura e intensidad de los picos Raman del espectro estudiado. Con estos parámetros se genera, considerando picos lorentzianos, un espectro Raman ideal el cual se resta del experimental obteniéndose el espectro de la fluorescencia. Mediante su FFT se estima su anchura espectral y por tanto se determina la frecuencia de corte del filtro paso alto que eliminará la fluorescencia del espectro analizado. Repitiendo el algoritmo de Marquardt sobre el espectro filtrado se obtendrá un espectro Raman más preciso que permitirá identificar el pigmento en estudio.

3. RESULTADOS

Para experimentar esta técnica de reducción de fluorescencia varios espectros fueron analizados. Entre los cuales hemos escogido el formado por azul de ultramar y amarillo de cadmio por ser uno de los más representativos.

La figura 1 muestra el espectro original tal y como fue obtenido en el laboratorio. En él puede observarse una fuerte banda de fluorescencia presente en todas las frecuencias ópticas. La posición de dichos picos dentro del espectro óptico contiene la única información necesaria para identificar el compuesto en estudio. La tabla 1 recoge la posición teórica de los picos Raman.

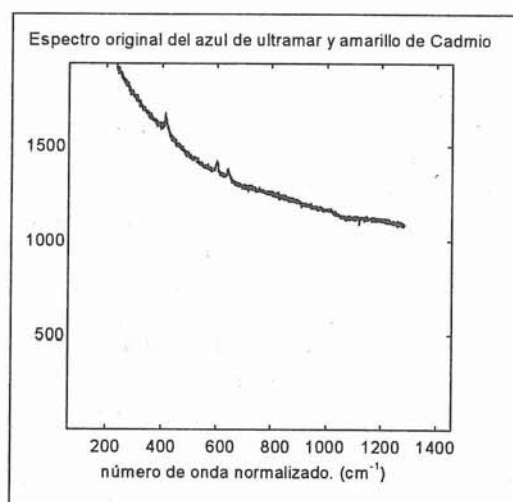


Figura 1

Tabla 1. Posición relativa de los picos.

| | | |
|--------------------|-------------------|------|
| Azul de ultramar | 543s ¹ | |
| Amarillo de Cadmio | 305s | 609s |

En este espectro fue filtrado el ruido shot, previa determinación de su frecuencia de corte mediante el algoritmo propuesto en esta comunicación (también puede utilizarse el de Bush [4]), y filtrado mediante Savitzky-Golay y Papoulis. Los efectos de ambos filtros sobre el espectro pueden compararse en las figuras 2.a y 2.b. Debido a que los picos de los dos espectros están suficientemente separados entre sí como para no tener problemas con la resolución, los experimentos detallados en adelante fueron llevados a cabo mediante la ventana de Papoulis, la cual permite un mejor filtrado del ruido.

Con el algoritmo de Marquardt se obtuvieron los parámetros que mejor se ajustan al espectro derivado, tabla 2.

¹ s (strong) significa que el pico es fuerte.

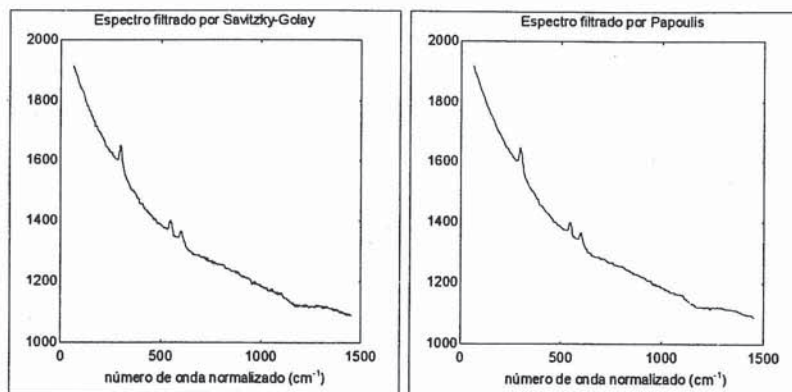


Figura 2.a

Figura 2.b

Tabla 2. Parámetros intermedios obtenidos mediante Marquardt².

| | Posición | Anchura | Intensidad |
|--------------------|----------|---------|------------|
| Azul de ultramar | 546.47 | 17.07 | 47.31 |
| Amarillo de Cadmio | 297.17 | 17.78 | 81.82 |
| | 600.42 | 20.95 | 42.07 |

Hasta aquí el método Edge Detection. El error medio en la posición de los picos puede mejorarse aplicando el filtrado digital. Con los parámetros iniciales obtenidos se generó su correspondiente espectro ideal que se restó del espectro original obteniendo así la curva de la fluorescencia, figura 3. Una vez conocida dicha curva, realizamos su FFT y obtenemos la frecuencia de corte que aplicaremos al filtro paso alto. La gráfica 4 muestra el espectro obtenido una vez filtrado. Los picos más sobresalientes corresponden a los picos Raman de interés. No debe preocuparnos, una vez llegados a este punto, obtener un espectro con amplitudes más reducidas o incluso negativas. Toda la información se encuentra todavía en ellas (posición, anchura y altura de los picos Raman). Lo realmente importante es que este espectro no contine prácticamente fluorescencia. Sería el análogo al espectro derivado en el método Edge Detection, pero mejorado en el sentido de que ahora el filtrado ha sido más efectivo (el anterior era un filtro lineal).



Figura 3

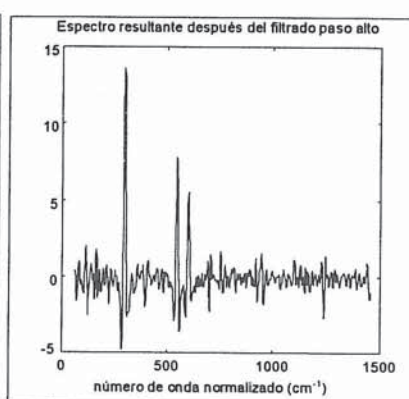


Figura 4

Tabla 4.a. Parámetros finales obtenidos por Marquardt.

| | Posición | Anchura | Intensidad |
|--------------------|----------|---------|------------|
| Azul de ultramar | 550.30 | 16.64 | 33.02 |
| Amarillo de Cadmio | 301.31 | 16.15 | 89.01 |
| | 604.58 | 18.23 | 49.90 |

² La posición y la anchura están dadas en cm^{-1} , la intensidad en fotones por segundo.

Tabla 4.b. Evolución de los parámetros y error medio.

| | Originales | Edge Detection | Edge Detection y Filtrado digital |
|-----------------------|------------|----------------|-----------------------------------|
| Azul de ultramar | 543 | 546.47 | 550.30 |
| Amarillo de Cadmio | 305 | 297.7 | 301.31 |
| | 609 | 600.42 | 604.58 |
| Error medio | - | ±6.63 | ±5.14 |
| Mejora en la posición | - | - | 22.5% |

La tabla 4.a muestra los nuevos parámetros una vez aplicado el algoritmo de Marquardt en el primer espectro. El error medio ha mejorado como ya habíamos predicho. La tabla 4.b recoge una comparativa de todos los parámetros y de su error medio.

4. CONCLUSIÓN

Los resultados muestran una mejoría respecto a la utilización del Edge Detection y el filtrado digital por separado. Aún así, estos pueden mejorarse en gran medida utilizando un filtro paso alto distinto al que nosotros hemos utilizado, un Chebychew de orden uno y con rizado en la banda de paso de 1dB. El paso siguiente será probar nuevos filtros como filtros exponenciales o de Bessel.

En definitiva, la técnica propuesta para reducir fluorescencia permite obtener mediante el procesado de la señal, de una forma precisa y sistemática, la información Raman necesaria para identificar un pigmento.

5. REFERENCIAS

- [1] P.A.Mosier-Boss, S.H.Lieberman, R.Newbery, *Fluorescence Rejection in Raman Spectroscopy by Shifted-Spectra, Edge Detection and FFT Filtering Techniques*. Applied Spectroscopy, Vol.49, p.p.630-638, 1995.
- [2] G:Horlick, *Digital Data Handling of Spectra Utilizing Fourier Transformations*. Analytical Chemistry, Vol.44, No.6, p.p.943-947, May 1972.
- [3] T.A.Maldacker, J.E.Davis, L.B.Rogers, *Analytical Chemistry*, Vol.46, p.p.637, 1974.
- [4] C.A.Bush, *Fourier Method for Digital Data Smoothing in Circular Dichroism Spectrometry*. Analytical Chemistry, Vol.46, No.7, p.p.890-895, June 1974.
- [5] A.Savitzky, M.J.E.Golay, *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry, Vol.36, No.8, p.p.1627-1639, July 1964.
- [6] D.W.Matquardt, *An Algorithm for Least Squares Estimation of Nonlinear Parameters*. Journal Society for Industrial and Applied Mathematics, Vol.2, No.2, p.p.431-441, June 1963.