

红外光谱图像技术及其在生物学研究中的应用*

吉海彦 严衍禄

(中国农业大学基础科技学院 北京 100094)

摘要 文章介绍了红外光谱图像技术;介绍了用焦平面阵列检测器、步进扫描傅里叶变换光谱仪、红外显微镜、分束器构成的红外光谱图像硬件系统及信息提取的软件方法;给出了用红外光谱图像分析猴脑组织中蛋白质和磷脂差异、残留在人胸部组织中的硅酮、水稻叶片等3个在生物学研究中的应用实例;指出了红外光谱图像技术进一步的发展方向是采用同步辐射作为光源、依靠数学算法提高分辨率和发展空间化学计量学来提取空间信息。

关键词 红外光谱图像,焦平面阵列检测器,同步辐射

INFRARED SPECTROSCOPIC IMAGING AND ITS APPLICATIONS IN BIOLOGY

Ji Hai-Yan YAN Yan-Lu

(College of Basic Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Infrared spectroscopic imaging is reviewed. The hardware system, consisting of a focal plane array detector, step-scan Fourier transform infrared spectrometer, infrared microscope, and image formation lens, and the information extraction software are described. Examples of applications in biology are given. Future developments of this technique include adopting synchrotron radiation as the optical source, employing mathematic methods to increase resolution, and developing spatial chemometrics to obtain spatial information.

Key words infrared spectroscopic imaging, focal plane array detector, synchrotron radiation

1 引言

传统的光谱分析只能得到分析对象空间各点的平均光谱,从而得到对象空间平均的结构和组成,因此通常只能用于均匀物的分析,但是物体特别是生物体的各种复杂功能主要还决定于空间各个层次的结构,例如细胞与组织的功能决定于空间微米和亚微米尺度的空间结构。近年来发展的图像分析可以得到空间分布的信息,但只是形象的信息,不能得到结构和组成的信息。把光谱分析技术和图像技术结合到一起,得到光谱图像即物体空间各个点的光谱,通过对各个点的光谱分析就能得到空间物体各点的结构和组成,这将对材料科学特别是生物科学的研究产生革命性的变化。

红外光谱成像是了解复杂物质的空间分布和分子组成的强有力方法。例如在生物领域,光谱图像特

别适合于非侵害生物物理分析和生物医学诊断。红外和近红外成像的主要目标有两个:一是同时产生高的光谱分辨和准确性,这可与专用的光谱仪相比较;二是产生高的空间分辨和图像保真性,这可与通常的数字成像相比较。

光谱成像的主要困难在于空间光谱的采集以及大信息量的处理(二维光谱成像的信息量是常规光谱的 10^6 倍)。由于二维面阵列检测器的出现与应用,以及微机性能价格比的大幅度提高,目前成像处理已经可以在微机上实现。因此,90年代中期以来光谱成像研究有了突破,光谱成像的研究有了迅猛的发展。在近3年的匹兹堡分析化学与应用光谱会议以及国际近红外光谱学术会议上,光谱成像都成为热点。

* 1999-06-30收到初稿,1999-11-29修回

2 红外光谱图像技术发展概况

红外光谱图像技术是在傅里叶变换红外显微镜和步进扫描干涉仪技术的基础上发展起来的微区分析技术.红外光谱图像技术的发展经历了3个阶段:第一阶段为红外显微镜,或称为红外显微光谱法,它是将光学显微镜配以红外检测器,与红外光谱仪联用,或作为红外光谱仪的附件,用来扫描微量物质或微区样品的一个点,得到单点的红外光谱,不具有扫描样品整个微区的红外图像功能.第二阶段为80年代发展起来的“画地图”——mapping方式,它利用自动显微镜载物台逐点移动样品,逐点测定其红外光谱,进行红外图像分析.该技术使用单通道检测器,只能逐点扫描,其数据采集时间很长,一般需要数小时之久.此外,在数据采集过程中,傅里叶变换红外光谱仪和红外显微镜必须处于稳定的工作状态.第三阶段为1996年推出的焦平面阵列检测技术,它由焦平面阵列检测器、红外显微镜、步进扫描傅里叶变换红外光谱仪组成.它不再需要移动样品载物台来完成红外光谱的采集,且可对较大面积的样品进行红外图像分析.

3 实现红外光谱图像的软硬件方法

随着焦平面阵列检测器、可调光学滤光片、价格不断下降的计算机硬件和专用软件的使用和发展,

使得各种近红外、中红外成像技术从新奇状态转变为比较实用的分析工具.对振动光谱成像,当前硬件和软件的许多发展已使仪器不仅能采集到所产生的大量数据,而且能用一种方法来处理信息,即使得用户“看见”样品的化学成分,而不需求助于手工分析每个特定光谱.

采用碲化铟(InSb)焦平面阵列检测器,步进扫描傅里叶变换红外光谱仪、红外显微镜及KBr或CaF₂分束器,可构成红外和近红外成像的硬件系统,其工作范围为1.0—5.5 μm (10000—1818 cm^{-1}).此硬件系统的原理如图1所示,步进扫描成像系统采集的多维数据集、数据处理和特征提取方法如图2所示,图像和光谱之间的关系如图3所示.

实现红外成像的物理原理见图1.当光源发出的光到达分束器后被分成两部分,其中一部分达到固定镜后返回,另一部分到达动镜后返回.因这两束光来自同一个光源,是相干光,当它们相遇时,就要产生干涉.由于固定镜位置不变,经固定镜反射的光束的光程不变,而动镜在不断改变位置,则经动镜反射的光束的光程在不断改变.于是,这两束光的光程差随着动镜的移动而改变,因而其干涉强度随着动镜的移动而改变其强弱.当动镜处于某一位置时,若采用常规的检测器时,就得到一个干涉强度值;当动镜移动一个来回时,就得到一个干涉图.在图1中,采用焦平面阵列检测器,在动镜移动的每一个位置,它检测的不再是一个干涉强度值,而是一个干涉图

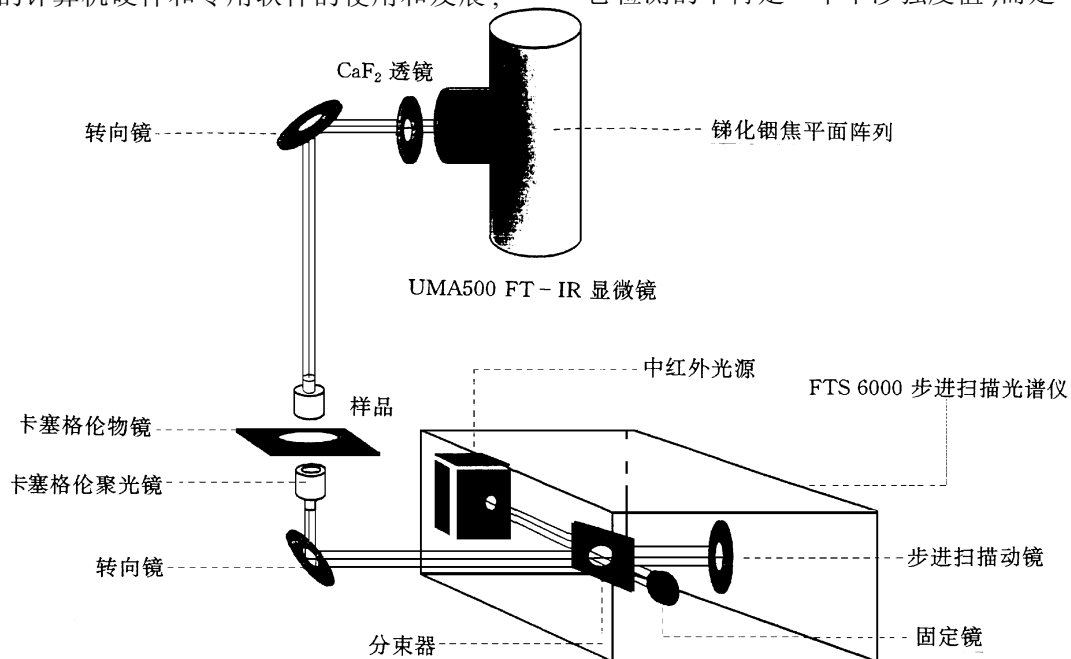


图1 红外和近红外图像系统的原理图

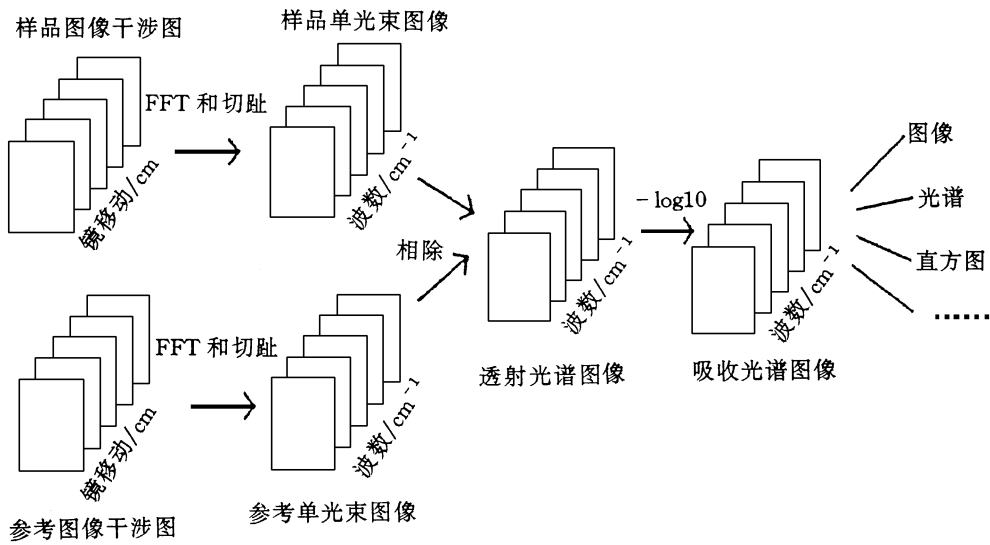


图2 步进扫描成像系统采集的多维数据集、数据处理和特征提取方法

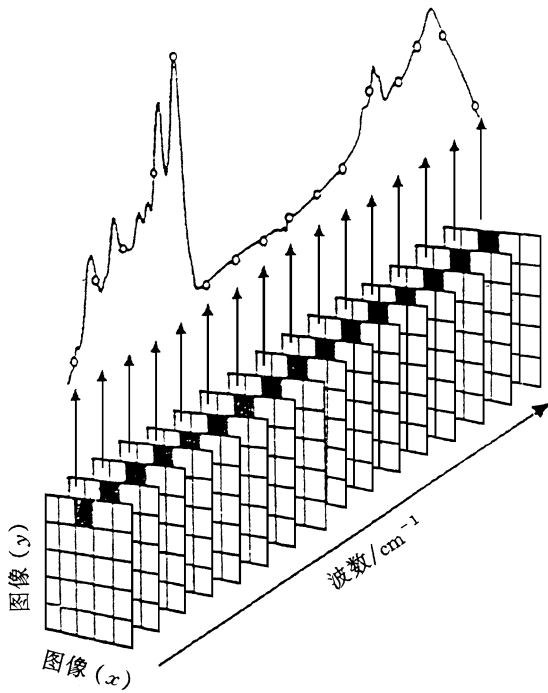


图3 图像和光谱之间的关系

像, 包含有 $i \times j$ 个干涉强度值 (例 $i = j = 128$)。若步进扫描动镜共移动了 N 个位置 (N 步), 则可得到 N 个干涉图像 (每个干涉图像含有 $i \times j$ 个干涉强度值)。对这 N 个干涉图像进行快速傅里叶变换, 就得到在不同波数处的一系列光谱图像 (每个光谱图像含有 $i \times j$ 个光谱强度值)。对不同波数处的所有光谱图像 (由 x 方向和 y 方向所构成的平面, 见图 3), 都取相同坐标 (i, j) 点的光谱强度值, 就得到光谱图像中该位置点的光谱 (由 y 方向和波数方向所构成的平面, 见图 3)。当 $i = j = 128$ 时, 得到

16384 条光谱。综上所述, 采用这种方法, 在同一个波数点处, 得到一个光谱图像 (含有 $i \times j$ 个光谱强度值); 而在所有光谱图像的另一位置处, 得到一条光谱 (光谱强度与波数的关系)。

4 红外光谱图像技术在生物学研究中的应用

红外和近红外成像可应用于任何非均匀样品或系统, 如杂质、沾污物、腐蚀、老化、生物、农业、生物医学、药物、固体和半导体材料、聚合物等。下面给出红外光谱图像技术在生物学中的几个应用。

4.1 猴脑组织中蛋白质和磷脂的分析

Lewis^[1] 等运用焦平面阵列红外图像装置研究猴脑组织的化学成像, 观察到猴脑组织中蛋白质和磷脂分布的差异。图 4 中左边的图分别显示了猴脑组织在 3300cm^{-1} 和 2920cm^{-1} 处的红外图像; 右边

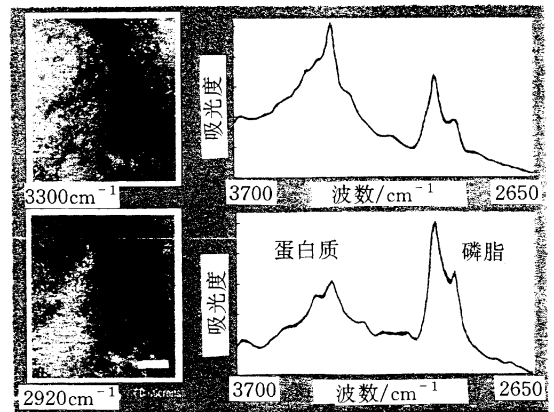


图4 猴脑切片的傅里叶变换红外图像和光谱

的图分别显示了在猴脑组织两个不同位置处的红外光谱,可见其蛋白质和磷脂的比例不同.

4.2 渗透于人乳腺组织中硅酮的分析

Kidder^[2]等利用焦平面阵列红外图像系统,研究丰乳剂对人体乳腺组织的影响,用该方法观察妇女乳腺组织中的丰乳剂等人工添加物引起的硅酮渗漏问题.图5显示了残留在人胸部组织中的硅酮的傅里叶变换红外化学图像和光谱.

4.3 水稻叶片的红外图像和光谱

图6给出了水稻叶片在 1642cm^{-1} 处的红外图像,及在十字虚线交叉处的红外光谱.

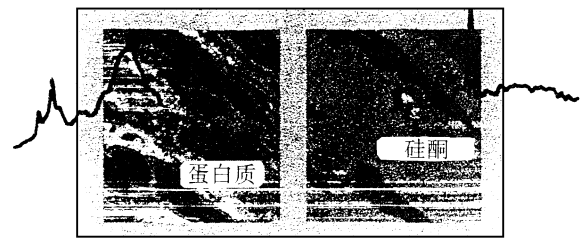


图5 残留在人胸部组织中的硅酮的傅里叶变换红外化学图像和光谱

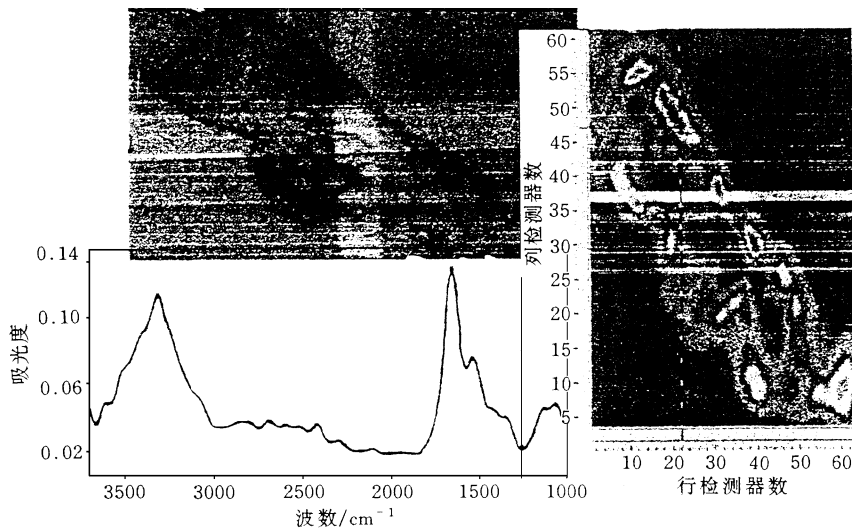


图6 水稻叶片的红外图像和光谱

5 红外光谱图像技术的进一步发展

目前,红外光谱图像技术的空间分辨率为 $3.5\mu\text{m}$,可分辨的样品面积为 $600 \times 600\mu\text{m}$,焦平面阵列的像素点可达到 128×128 个,在短时间内完成16384(128×128)条红外光谱的采集,分析时间约为7min.用InSb FPA时,光谱范围为 $1-5\mu\text{m}$ ($10000-2000\text{cm}^{-1}$);用MCT FPA时,光谱范围为 $2-10\mu\text{m}$ ($5000-1000\text{cm}^{-1}$).

红外光谱图像技术的将来发展目标是得到更高的光谱分辨率($1\mu\text{m}$),采用更大的焦平面阵列,操作更快速,能分析常规大小的样品(mm 或 cm 量级)等.

在红外光谱成像中,特别是在近红外成像中,由于吸收较小,所以光源强度是影响提高信噪比的主要因素.而在红外和近红外波段,同步辐射光的强度比黑体辐射强2-3个数量级,若将同步辐射光作为红外和近红外图像系统的光源,则能显著地提高图

像和光谱的信噪比,扩展成像系统的应用范围.如此改进,则近红外图像系统在生物学研究中将有广阔的应用前景,可简单列举如下:

(1) 籽粒微区的定量分析.在遗传育种中,对一些极其珍贵的种子,要求在不破坏其结构和生物特性的条件下,测量其单籽粒中某些成分的含量.采用同步辐射近红外成像系统,不仅可聚焦微小区域,而且采用的同步辐射光的能量足够强,可获得极高的信噪比.得到质量极好的图像和光谱后,进一步采用多元统计方法,即可进行定量分析.

(2) 生物组织中各成分的空间分布及定量测定.

(3) 细菌卵孢子的识别.

(4) 植物叶片不同部位的病毒鉴定.

(5) 动物的病害、生化指标测定.

光谱图像的进一步发展还存在一些技术上的难点:首先,要达到 $1\mu\text{m}$ 左右的分辨率的光谱图像信号强度极小,提高信噪比成为该技术的关键,用常规的光源有相当的困难,而利用同步辐射可以得到大

(下转第161页)