

文章编号 1004-924X(2015)05-1240-06

静态显微光谱成像系统的研制

齐敏珺*, 王新全, 于翠荣, 潘冬宁, 夏玮玮
(青岛市光电工程技术研究院, 山东 青岛 266109)

摘要:提出一种基于液晶可调谐滤光片(LCTF)的显微光谱成像系统。介绍了系统的结构原理和实现方式,完成了原理样机的研制,并给出了实验结果。基于模块化的设计思想,通过标准 C 转接口与显微镜视频接口连接实现了显微光谱成像。采用 LCTF 作为分光元件,实现了较宽波长范围内通过电调谐方式来控制透过波长,系统具有无运动部件、调谐速度快且可通过编程灵活选择波长的优点。采用完全对称的中继光学结构,将 LCTF 置于准直光路中消除可能由 LCTF 引起的像差;开发了光谱图像采集与分析软件,实现了光谱图像采集的有序控制和数据分析。研制了原理样机,并对头发纤维和南瓜茎纵切片进行了显微光谱成像实验。实验在 400~720 nm 每隔 10 nm 采集一幅图像组成数据立方体,通过光谱分析实现了对头发纤维不同来源的区分以及对南瓜茎不同染色部位的提取。实验结果表明:提出的系统能够进行显微光谱成像,获得的数据质量良好,扩展了传统显微成像技术的功能和应用。

关键词:光谱成像;显微成像;液晶可调谐滤光片

中图分类号:TH744.1;TH742.9 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20152305.1240

Development of static microscopic spectral imaging system

QI Min-jun*, WANG Xin-quan, YU Cui-rong, PAN Dong-ning, XIA Wei-wei

(Qingdao Academy for Opto-electronics Engineering, Qingdao 266109, China)

* Corresponding author, E-mail: qiminjunl23@qq.com

Abstract: A microscopic spectral imaging system was proposed based on a Liquid Crystal Tunable Filter (LCTF). The systemic structure principle and operating method were introduced and a prototype was developed. Using the idea of modular design, a spectral imaging module was developed to cooperate with a microscope by connecting a standard C switch interface and a microscopic video interface. The LCTF was used as light filter in the spectral imaging module to select the light of certain wavelength by an electrical tuning mode. Without moving parts in the system, it could offer a faster tuning speed and could select wavelength by programming in flexibility. Then, the LCTF was placed in the collimated path to eliminate the possible aberrations. Furthermore, the software for image collection and analysis was developed to perform the order control and data analysis for the spectral images. The prototype was completed and microscopic spectral imaging experiment was performed for hair fibers and longitudinal sections of pumpkin stem. The spectral images with wavelength varied from 400 nm to 720 nm in 10 nm intervals were obtained. The results show that different origins of hair fibers have been distinguished and also different parts of longitudinal sections of pumpkin stem are extracted. The proposed system completes microscopic spectral imaging and

收稿日期:2015-01-07;修订日期:2015-02-12.

基金项目:中国科学院院地合作项目(No. 2012-01);青岛市民生科技计划资助项目(No. 13-1-3-115-nsh)

collects good quality data, by which the function and application areas of the traditional microscope have been extended.

Key words: spectral imaging; microscopic imaging; Ligned Crystal Tunable Filter(LCTF)

1 引言

由于传统显微成像技术只能提供被观测物的形态学计量,不能进一步给出物质的组成成分信息,因此这种成像方法已不能满足显微成像领域应用发展的新要求,而如何提供被观测样本的化学或生化成分的定量分布图像及其变化信息成为了当前显微技术研究的热点。显微光谱成像技术是在传统显微成像技术的基础上,结合目前发展迅速的光谱成像理论得到的一种新型光学探测技术。它是光谱分析技术和显微成像技术的有机结合,可以同时提供二维空间信息和一维光谱信息,配合一定的模式识别算法,能够实现物质组成成份定性、定量、定位的综合指标分析。显微光谱成像作为一项新型的综合交叉技术,具有极其重要的学术和应用价值,在生物医学、纳米材料、刑事分析及法医学等领域具有广阔的应用前景^[1-5]。

根据分光器件的不同,显微光谱成像仪器可分为色散型、干涉分光型和滤光片型等^[6]。色散型主要包括棱镜和光栅分光,其主要缺点是系统信噪比受狭缝的限制,狭缝越窄,光谱分辨率越高,但系统接收到的能量也随之降低^[7]。干涉分光型主要包括基于 Michelson 干涉仪的动镜型和基于变形 Sagnac 干涉仪的空间调制型。前者主要应用于红外显微方面,光谱分辨率以及灵敏度较高,但缺点是结构较复杂,不适合测量快速变化的光谱,有移动部件,系统对振动等反应敏感;后者无运动部件,其光谱分辨率与狭缝宽度无关,但设计时横向剪切仪的剪切量决定了最大光程差,限制了光谱分辨率。滤光片型主要包括声光可调谐滤波器(Acousto-Optic Tunable Filter, AOTF)和液晶可调谐滤光器(Liquid Crystal Tunable Filter, LCTF)^[8-10]。AOTF 的光谱分辨率在某些范围很高,但是 AOTF 滤光有一定的色散,会造成成像模糊,从而不利于光谱成像,特别是对色散要求严格的显微光谱成像,需要进一步研究相应的补偿和改善方法以提高成像的光谱分辨率和空间分辨率。LCTF 基于偏振光的干涉原理制成,

可以在较宽的范围内控制透过的波长,实现对入射光的滤波功能^[9]。LCTF 比较容易与显微镜集成,而且无机械移动部件,波长调节速度快、灵活性高。

本文提出一种基于 LCTF 的显微光谱成像系统,介绍了系统结构原理和实现方式,并完成了原理样机的研制和测试。

2 系统的构成及其工作原理

2.1 系统设计思想

在设计显微光谱成像系统时,主要采用模块化的设计思想,在尽可能保持现有商用显微镜产品结构不变的基础上增加光谱成像模块,从而实现光谱数据的获取功能,使系统具有更好的移植性和稳定性。

由于显微镜是带有光源的主动光学系统,通常有两种系统结构可供选择^[11]:一种是在前光学系统进行光谱分光,即采用波长调谐的照明光源,照明光源以一定时间间隔进行连续或非连续的波长扫描,采集在每一个预定的波长处得到一个灰度图像,对所有预定波长扫描后便构成光谱图像立方体。这种方法的优点是不用在成像光路中插入任何光学和机械元件,因而不会增加额外的光学像差。但缺点是需要改变现有显微镜的光源结构,并且不适合荧光应用,因为照明光源会激发出连续谱段的荧光,不能达到分光的目的;另一种结构是在后光学系统,即显微成像光束中进行光谱分光。本文采用后一种结构形式,这种方式保留了显微镜原有的照明光路,并且可用于明场和荧光显微光谱成像。

2.2 显微光谱成像系统的硬件构成

图 1 为显微光谱成像系统的原理框图。它主要由显微镜系统、分光系统、成像系统和计算机系统等组成。显微镜系统选择现货商品,一般主要由照明系统、载物台、物镜和视频接口等组成。分光系统由中继镜前、后组和分光元件组成。成像系统主要由 CCD 相机构成。计算机系统由 CPU、硬盘、内存和 USB 等硬件及其上安装的光谱图像采

集与分析软件构成。使用时,由显微镜系统放大目标,由分光系统进行光谱分光,由成像系统获取图像数据,由计算机系统采集与分析数据。

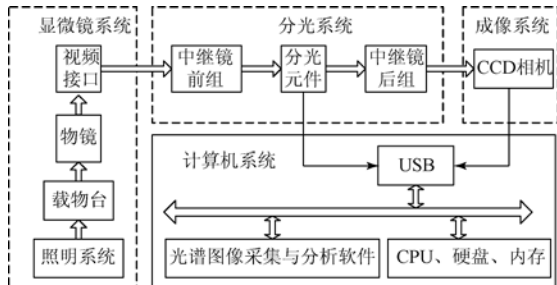


图 1 显微光谱成像系统的结构原理图

Fig. 1 Schematic diagram of spectral imaging microscope

2.3 显微光谱成像系统的工作原理

该系统的基本工作原理为:照明系统下处于显微镜载物台上的样品发出的物光通过物镜,经标准 C 转接口与分光系统的中继镜前组连接,中继镜前组后的准直光路中放置的分光元件进行分光,分光后的光束再经中继镜后组成像于 CCD 相机的感光面上,通过图像采集卡采集成像光谱图像序列。分光元件和 CCD 相机由计算机上安装的光谱图像采集与分析软件控制,能实现有序的波长切换和相应的光谱图像采集。数据采集完毕后,再利用软件对采集图像进行查看和分析处理,获得最终的光谱图像数据分析结果。

3 显微光谱成像系统的关键设计

3.1 分光设计

分光系统是光谱成像仪的核心,它将光束按照波长进行细分,从而获得光谱图像。分光系统决定了系统的光谱范围、光谱分辨率和空间分辨率,光谱和空间维数据的采集方式以及光学系统的形式。本文采用滤光片型分光方式,该类型光谱成像不需要目标与光谱仪的相对运动,具有较高的空间分辨率,能够获得最佳的光谱和空间配准,并且光谱谱段范围可调。

系统采用 LCTF 作为分光元件。LCTF 是一种电调谐滤光片,通过改变驱动电压来调谐透过波长,从而实现静态光谱成像。基于 LCTF 的分光系统的工作光谱为 400~720 nm,半峰全宽(Full Width Half Maximum,FWHM)为 10 nm,

工作孔径为 20 mm,通过电调谐可获得 400~720 nm 内任意中心波长的 FWHM 为 10 nm 的透过率曲线。图 2 为该 LCTF 在 400~720 nm 间隔 10 nm 的各中心波长的光谱透过率曲线,在 720 nm 处的透过率最高,接近 60%,而在 400 nm 处不到 10%,这种状态限制了可见光光谱的动态范围,在应用中需要通过增加曝光时间的方式来补偿。LCTF 通过 USB 接口与计算机连接,实现指令的发送和供电。

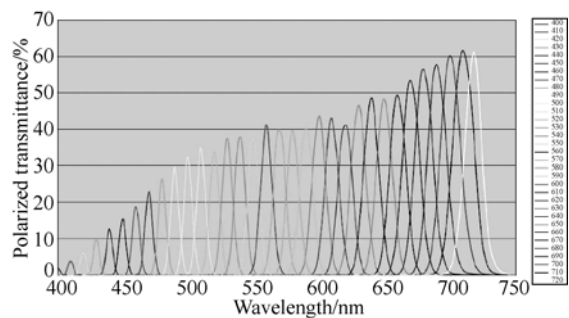


图 2 LCTF 的透过率曲线

Fig. 2 Transmittance curves of LCTF

3.2 中继光学设计

系统中显微镜可采用尼康、奥林巴斯、徕卡、蔡司等主流显微镜;光谱成像模块采用标准 C 接口,通过机械转接口与显微镜视频接口对接实现显微光谱成像。标准 C 接口的机械端面与面阵探测器靶面的距离小于 LCTF 的机械厚度,因此无法将 LCTF 直接放置在成像光路中。为了提供足够的空间放置 LCTF,需要设计中继光学系统。文献[12]中已有的中继光学设计将分光组件放置于非平行光路中,但这样会破坏原有成像镜头的成像性能,最为明显的是产生色差,也就是不同波长的光的成像点位置不一致,从而导致光谱图像在不同谱段不一致,影响光谱成像效果。即使将分光组件置于平行光路中^[13],也会由于中继镜为通用镜头而出现光学参数不匹配的问题,使成像质量难以控制,像面亮度不均匀,仍然会产生较为严重的色差。而另外一些中继光学设计只对与之配套的前置成像镜头有效,采用其它前置成像镜头时难以保证成像质量。

为了解决上述问题,本文采用一种同时物方远心和像方远心光路的可见光谱段复消色差中继成像镜组。该镜组采用完全对称的结构,分为中

中继镜前组和后组,自动校正彗差、畸变和垂轴色差。前组和后组之间为准直光路,用于放置LCTF,将LCTF视为一平行玻璃板,可以消除由LCTF引起的色差。中继镜组的 optical 设计如图3所示,放大率为1。这种设计可与不同后工作距的前置光学镜头组合使用,且前后镜组使用同一种镜头,加工成本更低,装配调试更加容易。

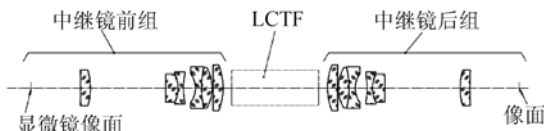


图3 中继光学系统设计

Fig. 3 Design of relay optical system

3.3 成像与图像采集设计

放置于显微镜载物台上的测试样本在照明系统下,经无限远校正物镜成像于无穷远,再经过像面与中继镜前组的物方焦面重合的管镜成像,LCTF在中继镜前组后的平行光路中可实现电调谐透过波长。经过滤光的光束再经中继镜后组成像于后焦面上,CCD相机的感光面与该像面重合,可接收单谱段光谱图像。CCD相机选用Sony公司生产的高性能140万像素CCD图像传感器ICX285。该探测器为 $1\,392 \times 1\,040$ 感光像素的面阵CCD器件,光谱响应覆盖 $400 \sim 720\text{ nm}$ 。

图像采集由计算机软件控制完成,每设定一次LCTF的透过波长,同时控制CCD相机采集一幅图像,直到采集完所有预设谱段的光谱图像后打包存储于硬盘。通过软件可设定扫描图像序列的波段范围和扫描步长,为了获取每个谱段大动态范围和高信噪比的图像,采用自适应曝光算法自动计算并设置各个谱段的最佳曝光时间。

3.4 光谱图像采集与分析软件

光谱图像采集与分析软件控制显微光谱成像仪获取光谱图像数据,对高光谱数据进行快速处理,通过对被测目标进行形态与光谱分析,高效识别、侦测出肉眼难以区分的物质,进而实现定性、定量与定位分析。软件支持BSQ、图像序列、标准图像格式等多种类型的文件,提供了光谱图、三维图像等丰富的数据查看工具,同时提供了光谱解混合、光谱分类、图像处理等多种数据分析工具,显示及分析结果可保存为标准图像格式进行输出。软件界面如图4所示。

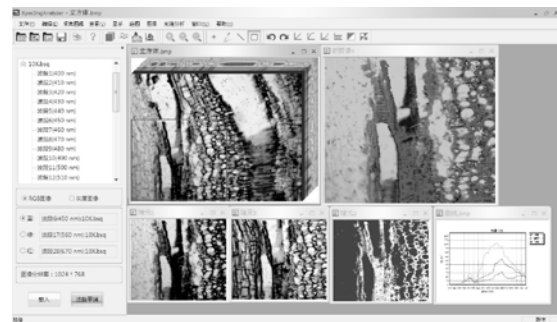


图4 光谱图像采集与分析软件

Fig. 4 Interface of spectral image acquisition and analysis software

4 实验与结果

采用显微光谱成像系统获取了头发纤维的光谱显微图像,其中LCTF从 400 nm 调谐到 720 nm ,步长为 10 nm ,共采集33幅光谱显微图像。图5为从中抽取的 $480, 520, 580$ 和 680 nm 4个谱段采集的原始图像,图像质量良好,图6为由33幅光谱显微图像组成的数据立方体,图7为3根头发纤维各自的光谱曲线。由图7可见,头发纤维A和头发纤维B的光谱曲线几乎重合,而头发纤维C的光谱曲线略有差异。利用光谱图像分析软件对采集的数据立方体进行光谱分析,具体处理过程如下:选择图6中方框区域进行自动解混合分析,得到自动提取的不同来源头发纤维端元对应的丰度图像(见8(a)和8(b)),利用假彩色图像合成功能合成丰度图像,最终得到图像如图8(c)所示(彩图见期刊电子版)。结果显示:头发纤维A与头发纤维B来自同一个人,在结果中显示为相同的颜色;头发纤维C来自另一个人,结果中显示为另一颜色。这可应用于刑事物证无损分析中的同一认定。

另外,采用显微光谱成像系统获取了南瓜茎纵切样本的光谱图像,图9中显示幅度是 $800\text{ pixel} \times 600\text{ pixel}$,显微镜放大率为 $100 \times$,利用光谱图像分析软件的自动解混功能对采集的数据立方体进行纯光谱提取和解混处理,能够分离植物茎切片上的不同染色部位(如图9所示)。这种光谱成像目标提取技术可应用于荧光多标记共定位、眼底病变检测等需要分离混叠光谱或区分颜色谱微小差异的生物学领域。

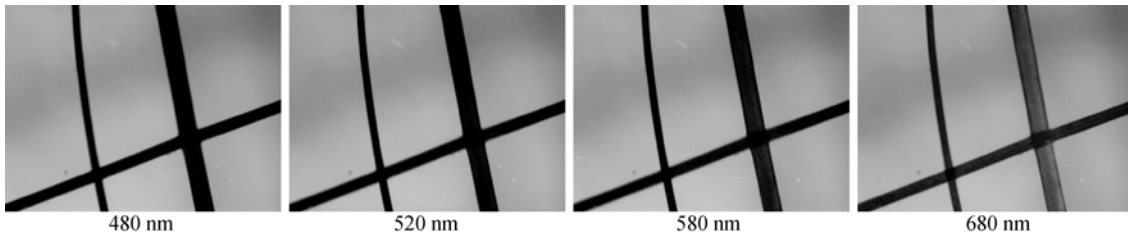


图 5 单波段图像

Fig. 5 Spectral images

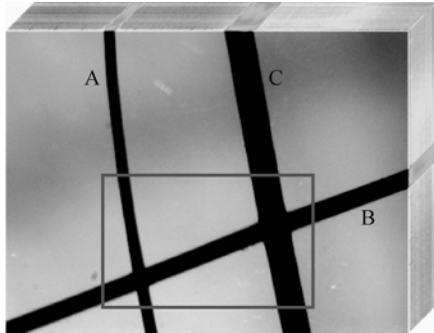


图 6 数据立方体

Fig. 6 Data cube

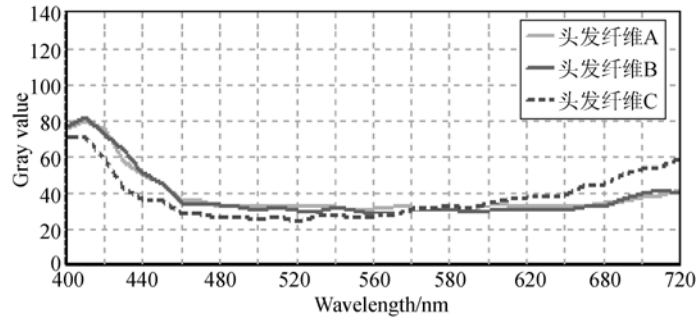
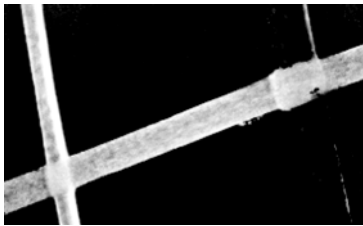


图 7 反射光谱曲线

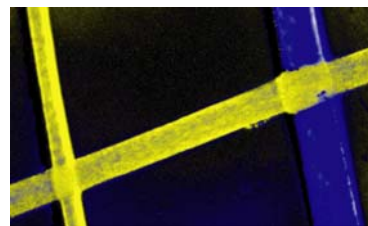
Fig. 7 Reflectance spectra of various fibers



(a) 头发纤维 I
(a) Hair fiber I



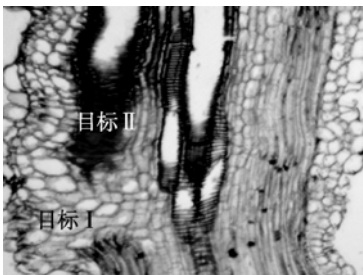
(b) 头发纤维 II
(b) Hair fiber II



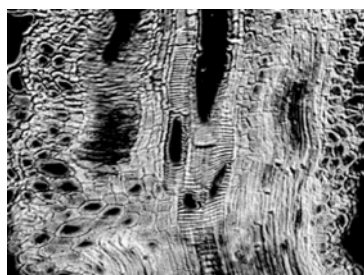
(c) 假彩色合成图像
(c) False color image

图 8 光谱图像分析结果

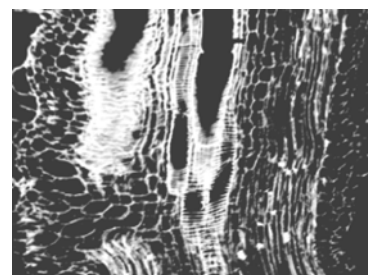
Fig. 8 Analysis results of spectral images



(a) 南瓜茎纵切样本
(a) Longitudinal section of pumpkin stem



(b) 提取出的目标 I
(b) Extraction of object I



(c) 提取出的目标 II
(c) Extraction of object II

图 9 光谱成像分析技术分离不同目标

Fig. 9 Extraction of different objects by spectral imaging analysis

5 结 论

本文基于模块化的设计思想,采用具有视频

接口的商品显微镜,通过标准 C 转接口与光谱成像模块连接实现了显微光谱成像系统。其中,光谱成像模块采用 LCTF 作为分光元件,可以在较

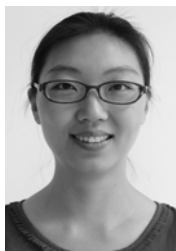
宽的范围内通过电调谐方式控制透过波长,具有无运动部件、调谐速度快且波长可编程灵活选择等优点。系统体积小、功耗低,使用软件配合完成光谱图像采集与分析,具有较好的稳定性、实用性和通用性。通过实验获取了可见光 400~720 nm

波段、带宽为 10 nm 的光谱显微图像,成像质量好,利用光谱图像分析软件可对采集得到的数据立方体进行物质的分类、识别与提取。该光谱成像系统可应用于生物医药、刑事物证分析、材料分析、工业控制等领域。

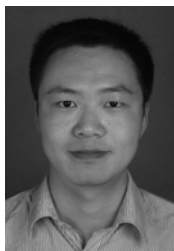
参考文献:

- [1] SCHULTZ R A, NIELSEN T, ZAVALETA J R, *et al.*. Hyperspectral imaging: a novel approach for microscopic analysis[J]. *Cytometry*, 2001, 43(4): 239-247.
- [2] AKBARI H, HALIQ L V, SCHUSTER D M, *et al.*. Hyperspectral imaging and quantitative analysis for prostate cancer detection[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(7):076005:1-10.
- [3] EDELMAN G J, GASTON E, van LEEUWEN T G, *et al.*. Hyperspectral imaging for non-contact analysis of forensic traces[J]. *Forensic Science International*, 2012, 223(1-3):28-39.
- [4] CRITES S T, LUCEY P G. Characterization of lunar soils using microscopic hyperspectral imaging [C]. *44th Lunar and Planetary Science Conference, Texas; LPSC*, 2013:2473.
- [5] 张运海, 杨皓旻, 孔晨曦. 激光扫描共聚焦光谱成像系统[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(6): 1446-1453. ZHANG Y H, YANG H M, KONG CH H. Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(6): 1446-1453. (in Chinese)
- [6] 苏星, 田维坚, 张淳民. 显微成像光谱仪技术的研究及应用[J]. *光学技术*, 2006, 32(6): 820-823. SU X, TIAN W J, ZHANG CH M. Research and application of microscopical imaging spectrometer[J]. *Optical Technique*, 2006, 32(6): 820-823. (in Chinese)
- [7] 肖功海, 舒嵘, 薛永祺. 显微高光谱成像系统的设计[J]. *光学精密工程*, 2004, 12(4): 367-372. XIAO G H, SHU R, XUE Y Q. Design of microscopic hyperspectral imaging system[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2004, 12(4): 367-372. (in Chinese)
- [8] 江益, 曾立波, 吴琼水, 等. 基于声光可调谐滤光器的显微光谱成像技术[J]. *光学技术*, 2005, 31(2): 193-195. JIANG Y, ZENG L B, WU Q SH, *et al.*. Microscopic spectral imaging based on an acousto-optic tunable filter[J]. *Optical Technique*, 2005, 31(2): 193-195. (in Chinese)
- [9] 王新全, 黄旻, 高晓惠, 等. 基于液晶可调谐滤光片的便携式多光谱成像仪[J]. *光子学报*, 2010, 39(1): 71-75. WANG X Q, HUANG M, GAO X H, *et al.*. Portable multispectral imager based on LCTF[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, 39(1): 71-75. (in Chinese)
- [10] 杜丽丽, 易维宁, 张冬英, 等. 基于液晶可调谐滤光片的多光谱图像采集系统[J]. *光学学报*, 2009, 29(1): 187-191. DU L L, YI W N, ZHANG D Y, *et al.*. Multi-spectral image acquisition system based on liquid crystal tunable filter [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, 29(1): 187-191. (in Chinese)
- [11] FAVREAU P F, HERNANDEZ C, HEASTER T, *et al.*. Excitation-scanning hyperspectral imaging microscope[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(4): 0460101.
- [12] 付强, 黄旻, 景娟娟, 等. 用于液晶可调谐滤光片型多光谱成像仪的中继成像系统设计[J]. *光学学报*, 2011, 31(10): 1022002. FU Q, HUANG M, JING J J, *et al.*. Relay lens design for an LCTF multi-spectral imager[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(10): 1022002. (in Chinese)
- [13] HOMMA K, SHINGU H, YAMANOTO H, *et al.*. Application of an imaging spectropolarimeter to agro-environmental sciences [J]. *SPIE*, 2004, 5234: 638-647.

作者简介:



齐敏珺(1985—),女,湖北荆门人,硕士,助理研究员,2007年、2010年于中国海洋大学分别获得学士、硕士学位,主要从事光谱成像技术的应用研究。E-mail: qiminjun123@qq.com



王新全(1982—),男,陕西汉中,博士,副研究员,2007年于北京理工大学获得硕士学位,2011年于中国科学院西安光学精密机械研究所获得博士学位,主要从事光谱成像技术的研究。E-mail: wangxq@qdaoe.cn

(版权所有 未经许可 不得转载)