

基于谱域光学相干反射测量术的生物组织折射率测量技术

刘智 朱永凯

(南京航空航天大学测试工程系, 江苏 南京 210016)

摘要 提出了基于谱域光学相干反射法的生物组织折射率测量技术,设计了共光路干涉结构,提高了测量速度,抗干扰能力强。中心波长为 850 nm 的宽带光源发射的光经 Y 型耦合器传输到样品端,由样品散(反)射后,回射入样品臂,经 Y 型耦合器传输到光谱分析系统,使用计算机虚拟仪器完成系统构建与优化。编写快速傅里叶变换程序进行信号分析。使用标准 K9 玻璃样片作为样品进行验证,实验误差为 0.29%。实际测量了黄瓜浅表切片在 850 nm 波长处的折射率,测量时间小于 1 min。

关键词 光学测量;生物组织;折射率;谱域光学相干反射测量术;傅里叶变换

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP49.041202

Measurement of the Refractive Index of Bio-Tissues Based on Spectral Domain Optical Coherence Reflectometry

Liu Zhi Zhu Yongkai

(Department of Measuring and Testing Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing, Jiangsu 210016, China)

Abstract We present a method for measuring the refractive index of bio-tissues based on spectral domain optical coherence reflectometry (SD-OCR). Common-path method is used to simplify the system structure and improve the measuring speed. It has a strong anti-interference ability. Broadband light (central wavelength 850 nm) is transmitted through the Y-coupler and scattered (reflected) back to the spectrum analyzing system by the specimen through the sample arm and the Y-coupler. The system construction and optimization are then realized by virtual instruments. Fast Fourier transformation (FFT) is employed to analyze signals. This theory is verified by a standard K9 glass sample and the results show that the experimental error is 0.29%. The refractive index of a cucumber superficial slice at 850 nm is measured and the measuring time is less than 1 min.

Key words optical measurement; biological tissues; refractive index; spectral domain optical coherence reflectometry (SD-OCR); Fourier transformation

OCIS codes 120.3890; 030.1670; 170.6510; 300.6300

1 引言

折射率是反映生物组织光学性质的主要参数之一,因此,折射率的测量技术有重要地位。传统的折射率测量方法如临界法、内反射法和透射法等,大部分操作比较复杂,自动化测量的实现难度较高,且不适用于对生物组织折射率的测量^[1]。

光学低相干技术的出现为位移(距离)的测量提供了一种新方法。光学低相干干涉术采用宽谱光源,具有相干长度短的特性,可实现绝对测量。1984年, Bosselmann 等^[2]首先报道了基于低相干干涉技术的位移

收稿日期: 2011-09-13; **收到修改稿日期**: 2011-11-02; **网络出版日期**: 2012-01-19

基金项目: 南京航空航天大学基本科研业务费专项科研项目(NS2011017)资助课题。

作者简介: 刘智(1984—),男,硕士研究生,主要从事光学测试方面的研究。E-mail: liuzhiren2003@126.com

导师简介: 朱永凯(1975—),男,副教授,硕士生导师,主要从事光学测试和生物医学工程等方面的研究。

E-mail: zykjiangsu@163.com

传感系统,利用白光干涉测量技术实现了对可以转换成位移量的物理量的测量,而且具有非常高的测量精度。在随后的几年中,又有基于低相干干涉原理的传感器被应用于压力^[3~5]、温度^[6~9]和应变^[10,11]测量的报道。与此同时,伴随着近代光纤通信技术和光纤传感技术的出现,光纤低相干干涉技术开始出现与发展。该技术最初主要用于测量光通信系统中的背向瑞利散射,确定光纤的损耗特性及缺陷的位置^[12],分辨率在15~40 μm之间。

由于低相干技术具有高精度、无损测量等优势,被认为在生物医学领域具有较大的应用潜力。在测量生物组织折射率的研究中,目前主要运用光学相干层析(OCT)技术建立测量系统,通过参考臂的移动确定样品上下表面的位置。王新宇等^[13]利用时域OCT系统,基于改进的光程匹配法,在850 nm和1300 nm波长下测量了标准的熔石英和新鲜黄瓜浅表组织的折射率,精度较高,测量时间较短。但是该研究采用了异光路结构,抗外界干扰能力差,且需要移动参考臂,易产生运动干扰。

为了增强干涉系统的抗干扰能力,提高检测速度和精度,共光路的谱域光学相干反射技术(SD-OCR)被用于生物组织折射率的检测。

2 谱域光学相干反射术基本理论

以迈克耳孙干涉仪为模型来分析SD-OCR的工作原理。如图1所示,宽带光源出射的光经过分束器后被分为两束,一束照射样品,称为样品光,而另一束为参考光。认为光源为理想宽带点光源并忽略偏振,参考光经平面镜反射后,其中任一频率的单色光可以表示为 $E_c \exp(i2kl)$,其中 E_c 为参考光的振幅, $k=2\pi/\lambda$ 表示波数, $2l$ 为参考臂的光程。而样品光在样品的不同深度 x 处形成后向散射光,沿入射光路返回,是不同深度处后向散射光的叠加。返回的样品光和参考光叠加后形成干涉信号,并由光谱仪接收,其干涉光谱 $I(\omega)$ 可以表示为^[14]

$$I(\omega) = \Phi(\omega) \left| E_c \exp(i2kl) + \int_0^{\infty} a(x) \exp\{i2k[l + n(x)x]\} dx \right|^2, \quad (1)$$

式中 $\Phi(\omega)$ 是光源的光谱密度函数, $n(x)$ 和 $a(x)$ 分别为在样品深度 x 处的折射率和后向散射光的振幅, $2[l + n(x)x]$ 为样品深度 x 处所对应的光程长度。

由于仅是光程差影响最后结果,因此可以令绝对光程 $l=0$,参考光的振幅 $E_c=1$,且样品折射率均匀。假设 $a(-x)$ 与 $a(x)$ 关于 $x=0$ 对称,可用 $\bar{a}(x)$ 代替 $a(x)$,其中 $\bar{a}(x) = a(x) + a(-x)$,代入(1)式并展开得到^[1]

$$I(\omega) = \Phi(\omega) \left[1 + \int_{-\infty}^{\infty} \bar{a}(x) \cos(2knx) dx + \frac{1}{4} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \bar{a}(x) \bar{a}(x') \cos[2kn(x-x')] dx dx' \right]. \quad (2)$$

式中包含三个部分的和,分别对应干涉光谱中三个不同的成分:第一项是参考光的自相关谱;第二项是样品光与参考光的互相关谱;第三项是样品光的自相关谱,主要是样品不同深度处的后向散射光的互相关。第二、三项都包含了不同深度处样品光的后向散射信号,由于通常 $a(x) \ll E_c$,第二项信号的探测难度要小于第三项,因此之前的研究主要是对式中第二项信号进行分析和处理。而本系统的不同之处在于是对第三项信号进行处理,采用共光路设计,取消了参考臂,在简化了硬件系统结构的同时也消除了参考臂一端带来的噪声,且对信号进行频域分析,有利于微弱信号的获取。

光谱仪探测到的干涉信号包含了样品不同深度的后向散射信息,不同频率的信号对应样品的不同深度。因此,对(2)式第三项进行波数空间的傅里叶变换,可以求得样品不同深度后向散射的强度分布:

$$H(x) = \mathcal{F}[\Phi(\omega)] \otimes [a(x-x') + a(x'-x)] = \mathcal{F}[\Phi(\omega)] \otimes \bar{a}(x-x'). \quad (3)$$

系统性能参数主要包括理论分辨率和理论探测深度。光源的性能决定了系统的理论分辨率^[15]:

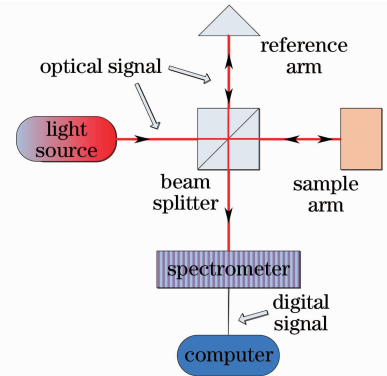


图1 迈克耳孙干涉仪原理图

Fig. 1 Principle of Michelson interferometer

$$\sigma = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda}, \quad (4)$$

式中 λ_0 表示光源的中心波长, $\Delta \lambda$ 为带宽(半峰全宽, FWHM)。而 SD-OCR 理论测量深度在波长空间表示为^[16]

$$D_{\max} = \frac{1}{4n} \frac{\lambda_0^2}{R_\lambda}, \quad (5)$$

式中 R_λ 表示光谱仪以波长表示的分辨率。由此可知, 系统探测深度是由光源和光谱仪性能共同决定的。需要指出的是, 实际的探测深度要小于理论的探测深度。光在样品中由于散射的作用损耗得很快, 深度越深, 光谱仪探测的难度就会越大, 通常在到达理论探测深度之前光谱仪就已经不能做出响应, 因此需要在实验中关注实际的探测深度。

3 实验系统

根据 SD-OCR 原理搭建实验平台, 主光路采用光纤式结构。其硬件装置主要包括光源、 2×1 光纤耦合器、样品臂、光谱探测模块和计算机几个部分, 图 2 为实验装置简图。所用光源为超辐射发光二极管 (SLD), 中心波长 849.5 nm, 波长范围 810~880 nm, FWHM 为 23.5 nm。光谱仪部分设计主要是通过使用分光器件(衍射光栅)对干涉信号进行分光, 进而得到不同波长的干涉光谱, 再通过线阵 CCD 接收, 进行数模转换以后上传给上位机。其中线阵 CCD 采用 Thorlabs 公司的 LC1-USB 型线阵 CCD 相机, 像元数 3000, 分辨率达到 0.055 nm。

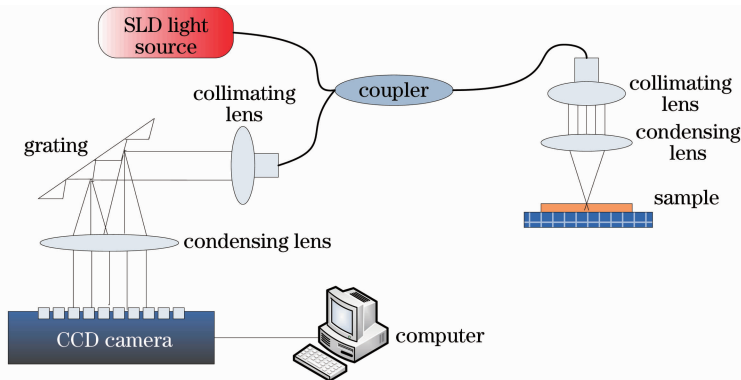


图 2 实验装置简图

Fig. 2 Diagram of the experimental setup

由于本装置光谱探测模块采用的是光栅分光、线阵 CCD 相机进行探测的硬件结构, 环境光会影响 CCD 接受信号, 且光栅的入射角度、聚焦透镜焦距是否落于 CCD 面板上等都会影响到最终的结果, 因此对光束入射光栅的角度、聚焦透镜的位置等进行了优化^[16], 使光谱探测达到最优效果, 提高了系统的信噪比。

样品臂的设计如图 3 所示, A 为经过加工的载物平台, 由抗腐蚀玻璃材质制成, 在其上表面开一凹槽, 凹槽深度为 D , 约为 0.8 mm, 凹槽中可以放入样品, 样品下表面贴紧载玻片上表面。设切片厚度为 d , 且 $d < D$ 。然后在凹槽上盖上盖玻片, 并放置于载物台上就可以开始进行测量。

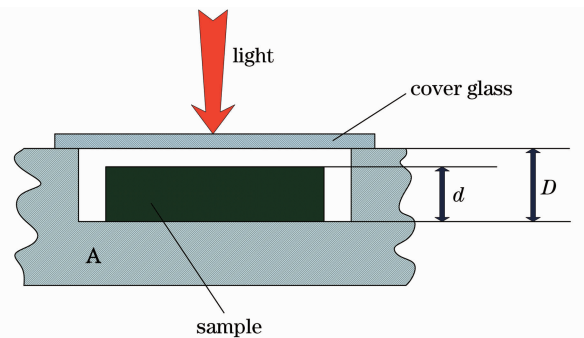


图 3 样品台设计示意图

Fig. 3 Design scheme of the sample platform

测量得到光谱后进行傅里叶变换, 其频谱如图 4(a) 所示, L_1 反映盖玻片下表面位置, L_2 反映样品上表面位置, 而 L_3 则反映样品下表面(载玻片上表面)的位置。其后将样品移走, 测量得到盖玻片和载玻片的后向散射光谱, 并进行傅里叶变换, 频谱如图 4(b) 所示, L'_1 反映盖玻片下表面位置, L'_3 反映载玻片上表面位置。需

要注意的是 L'_1 尖峰左边还有一个比较大的尖峰,这是由盖玻片下表面和凹槽上表面反射光相互干涉产生,由于是将盖玻片上表面作为参考的零光程点,所以这个尖峰是作为干扰信号而存在的。由于空气折射率 $n_0 \approx 1$,这里令 $n_0 = 1$,由(4)式可以得到样品厚度 d 和折射率 n 的表达式为

$$d = \frac{(L'_3 - L'_1) - (L_2 - L_1)}{2}, \quad (6)$$

$$n = \frac{L_3 - L_2}{(L'_3 - L'_1) - (L_2 - L_1)}. \quad (7)$$

一次信号采集所获得的信号经过傅里叶变换后得到的频谱图含有很多随机噪声,而需要的信息往往被湮没在噪声当中。对信号进行多次采集,并对其频谱求有效值平均(均方根值,RMS)可很好地解决随机噪声带来的干扰问题。实验中得到的频谱图(如图4所示)是对20次采集的数据求RMS的结果,可以明显分辨出有用信号,随机噪声被抑制到可以接受的程度。

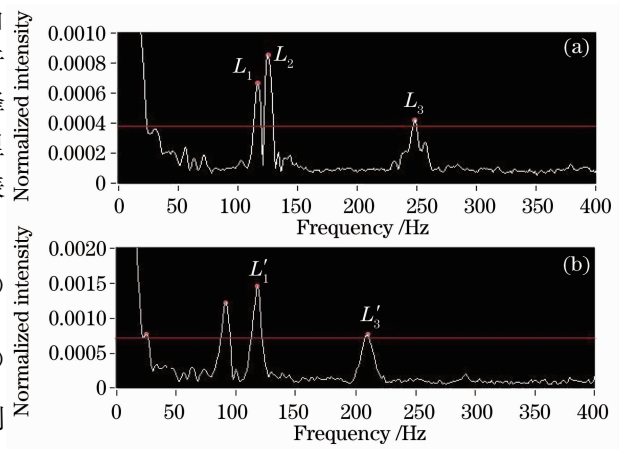


图4 样品放置前后测量结果

Fig. 4 Measurement results (a) before and (b) after the sample is placed

4 实验结果与讨论

利用搭建的SD-OCR系统进行测量。由于光源采用中心波长849.5 nm,FWHM为23.5 nm的SLD光源,且光谱仪分辨率为0.055 nm,若设样品折射率为1.5,那么根据(4),(5)式,可以得到本系统的理论分辨率 $\sigma = 13.5 \mu\text{m}$,理论探测深度 $D_{\text{max}} = 2.187 \text{ mm}$ 。

使用标准K9玻璃片作为样品(用精度0.01 mm的千分尺测量样品厚度 $d_0 = 0.530 \text{ mm}$,符合系统探测深度要求)对系统性能进行了验证实验。测量了10组折射率数据,如表1所示。

表1 测得的玻片样品折射率

Table 1 Measurement results of glass slip sample's refractive index

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	1.503	1.505	1.500	1.509	1.502	1.501	1.507	1.511	1.502	1.506

对表中数据求平均,可得 $\bar{n} = 1.505$,随机误差不超过0.006,合成不确定度为0.005,最终得到的实验结果为 $n = 1.505 \pm 0.005$ 。可见系统测量的精度还是比较令人满意的。通过理论计算,可知K9玻璃在 $\lambda = 850 \text{ nm}$ 时的理论折射率为1.5094。测量数据的平均值与理论值的偏差为0.29%,测量值比标准折射率小,说明存在系统误差。一方面,本系统的理论分辨率 $\sigma = 13.5 \mu\text{m}$,也就是说测量得到的厚度数据为 $13.5 \mu\text{m}$ 的倍数,理论上系统测得的数据应为 $526.5 \mu\text{m}$,比样品 $530 \mu\text{m}$ 的测量厚度小 $3.5 \mu\text{m}$,所以实际测得的数据小于理论值。另一方面,经过对实验所用光源进行光谱标定,光源中心波长与其标称的849.5 nm有偏差,实际的中心波长要大于850 nm,而波长越长,介质的折射率越低。在整个实验系统的搭建过程中,即使是进行了优化设计,光路的设置在理论上也很难达到最佳,且各部件特别是光谱探测模块光路裸露在外,容易受到外部自然杂散光以及自然振动的影响,从而产生随机误差,影响测量结果。

在使用K9玻璃作为样品进行实验并验证了系统可行性的基础上,还对新鲜黄瓜浅表组织不同深度处切片的折射率进行了测量。样品切片的制备方法是使用两片双面刀片贴紧竖切黄瓜浅表,两层刀片之间就会得到黄瓜浅表组织的切片样品。对制得的切片厚度进行测量,在0.2~0.4 mm之间,切面面积不大于 1 cm^2 ,并且对黄瓜浅表组织进行横向切片,认为同一切片样品的折射率是均匀的。由于SD-OCR系统具有快速测量的特性,从开始切片到对制得的样品切片进行测量,整个过程大约只使用了1 min的时间,保证了不至于因为组织脱水而严重影响测量结果。由于黄瓜浅表组织为非均匀折射率介质,因此从其不同深度处制得3个切片样品(面积约 0.5 cm^2),并对每个切片在5个不同的位置分别进行了测量。每个位置测量10次取中均值,并求其不确定度。得到的结果如表2所示。

表 2 黄瓜浅表组织不同深度处切片测量结果

Table 2 Measurement results of cucumber's superficial tissue slice in different depths

Group	1	2	3	4	5
n_1	1.359 ± 0.006	1.360 ± 0.005	1.362 ± 0.006	1.361 ± 0.004	1.360 ± 0.006
n_2	1.354 ± 0.006	1.356 ± 0.003	1.355 ± 0.005	1.352 ± 0.006	1.354 ± 0.004
n_3	1.350 ± 0.004	1.349 ± 0.005	1.347 ± 0.006	1.350 ± 0.005	1.348 ± 0.004

表中 n_1, n_2, n_3 分别代表深度由浅及深的三个切片的折射率测量结果。可见实验系统能够较准确地测得黄瓜浅表组织在不同深度处的折射率。另外从表中不同深度处黄瓜浅表组织的折射率结果来看,其折射率随着深度的加大而降低。因此,对于不同层次间折射率非均匀的组织样品,可通过对多层切片分别进行测量的方法来得到,进而绘制出生物组织不同深度处的折射率变化曲线。

5 结 论

利用设计的 SD-OCR 折射率测量系统可以快速地测得透明、半透明介质的折射率。在测量 K9 玻璃样品折射率的验证实验中,实际测量时间控制在了 1 min 之内,系统精度达到了 10^{-3} 。与双臂频域 OCT 系统相比,本系统采用共光路干涉结构,抗干扰能力强。对硬件的操作只需放入与取出样品,方便快捷,有实现集成化、嵌入式的潜力。由于测量时间短,减少了样品在空气中暴露的时间,并且测量时只需要极少量且上下表面平整的样品切片就可以进行。对于含水量高(制成切片后易脱水)、半透明且不同层次间折射率非均匀的生物组织折射率的测量,本系统有较大优势,可以较准确地测量不同深度、不同层次以及不同部位的生物组织样品切片的折射率。

参 考 文 献

- 1 Ye Qing, Li Fuxing, Liu Yu *et al.*. Refractive index measurement of bio-tissue based on Fourier domain optical coherence tomography[J]. *J. Optoelectron. • Laser*, 2009, **20**(1): 126~129
- 2 叶青,李福新,刘宇等.基于频域 OCT 的生物组织折射率测量研究[J].*光电子·激光*, 2009, **20**(1): 126~129
- 3 T. Bosselmann, R. Ulrich. High-accuracy position-sensing with fiber-coupled white-light interferometers[C]. Proc. 2nd International Conference on Optical Fiber Sensors, 1984. 361~364
- 4 G. Boheim. Fiber-linked interferometric pressure sensor[J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 1987, **58**(9): 1655~1659
- 5 M. T. Velluet, P. Graindorge, H. J. Arditty. Fiber optic pressure sensor using white-light interferometry[C]. *SPIE*, 1987, **838**: 78~83
- 6 D. Trouchet, B. Laloux, P. Graindorge. Prototype industrial multi-parameter FO sensor using white light interferometry [C]. Proc. 6th International Conference on Optical Fiber Sensors, 1989. 227~233
- 7 G. Boheim. Fiber optic thermometer using semiconductor etalon sensor[J]. *Electron. Lett.*, 1986, **22**(5): 238~239
- 8 J. C. Harl, E. W. Saaski, G. L. Mitchell. Fiber optic temperature sensor using spectral modulation[C]. *SPIE*, 1987, **838**: 257~261
- 9 A. D. Kersey, A. Dandridge. Dual-wavelength approach to interferometric sensing[C]. *SPIE*, 1987, **798**: 176~181
- 10 F. Farahi, T. P. Newson, J. D. C. Jones *et al.*. Coherence multiplexing of remote fiber Fabry-Perot sensing system[J]. *Opt. Commun.*, 1988, **65**(5): 319~321
- 11 V. Gusmeroli, P. Vavassori, M. Martinelli. A coherence-multiplexed quasi-distributed polarimetric sensor suitable for structural monitoring[C]. Proc. 6th International Conference on Optical Fiber Sensors, 1989. 513~518
- 12 G. Kotrotsios, O. Parriaux. White light interferometry for distributed sensing on dual mode fibers monitoring[C]. Proc. 6th International Conference on Optical Fiber Sensors, 1989. 568~574
- 13 Chen Qingshan. Research on Fiber Low-Coherence Interferometry and Its Application[D]. Beijing: Beijing University of Posts and Telecommunications, 2009
- 14 陈青山. 光纤低相干干涉测量技术及其应用研究[D]. 北京:北京邮电大学, 2009
- 15 Wang Xingyu, Zhang Chunping, Zhang Lianshun *et al.*. A simple method for refractive index measurement of bio-tissue [J]. *J. Optoelectron. • Laser*, 2002, **13**(9): 976~978
- 16 王新宇,张春平,张连顺等.生物组织折射率测量的一种简便方法[J].*光电子·激光*, 2002, **13**(9): 976~978
- 17 Gerd Häusler, Michael Walter Lindner. Coherence radar and spectral radar: new tools for dermatological diagnosis[J]. *J.*

- Biomed. , 1998, **3**(1): 21~31
- 15 Joseph M. Schmitt. Optical coherence tomography: a review[J]. *IEEE J. Sel. Topics Quant. Electron.*, 1999, **5**(4): 1205~1209
- 16 Dai Heng. Research on Technology of Biosensors Based on the Analysis of Interference Spectrum[D]. Nanjing: Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, 2010
- 戴 恒. 基于干涉光谱分析的生物传感技术研究[D]. 南京: 南京航空航天大学, 2010