©2015《中国激光》杂志社

组织荧光光谱检测系统校准方法研究

张元志[1] 潘 亮[2] 王贻坤[1,2] 侯华毅[1] 朱 灵[1,2] 王 安[1] 刘 勇[1,2]

[1]中国科学院合肥物质科学研究院,安徽 合肥 230031

[2]皖江新兴产业技术发展中心,安徽 铜陵 244000

摘要 组织荧光光谱技术可用来定量测量组织生物化学性质及组织结构的变化,进而实现疾病早期诊断。为提高组织荧光光谱检测的准确性,提出了组织荧光光谱检测系统校准流程及具体实现方法,包括激发光强校准、传输光路传光效率校准、探测模块波长校准和非线性校准、系统光谱响应校准、暗背景扣除、光谱平滑。搭建三套组织荧光光谱检测系统,并分别对荧光标准板和人体皮肤组织进行实验测试,结果显示未校准时三套系统对同一荧光板和同一受试者的荧光强度测量结果变异系数分别为7.4%和10.4%,校准后变异系数分别为0.9%和2.0%。

关键词 医用光学; 组织荧光; 光谱校准; 无创检测

中图分类号 R318.5 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP52.081701

Calibration for Tissue Fluorescence Spectroscopy System

Zhang Yuanzhi[1] Pan Liang[2] Wang Yikun[1,2] Hou Huayi[1] Zhu Ling[1,2] Wang An[1] Liu Yong[1,2]

[1]*Hefei Institute of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui* 230031, *China*

[2]*Wanjiang Center for Development of Emerging Industrial Technology, Tongling, Anhui* 244000, *China*

Abstract Fluorescence spectroscopy provides a noninvasive method to quantify biochemical and structural changes in tissues and it is regarded as an early subtle indicator of disease or injury. One challenge facing the rapid growth of fluorescence application is the inability to insure the accuracy of fluorescence measurements. The calibration protocols that include excitation energy calibration, collection efficiency calibration, wavelength calibration, system nonlinearity calibration, system response calibration, background subtraction and spectrum signal filtering, for optical instruments that ensure measurement accuracy are proposed. Three fluorescence spectroscopy systems are built and the fluorescence spectra of fluorescence standard and human skin are collected. The result shows that the spectrum intensity variation coefficient among these systems for the same reference standard is 7.4% and for the same human skin is 10.4% before calibration. By comparison, the spectrum intensity variation coefficients after calibration are 0.9% and 2.0%, respectively.

Key words medical optics; tissue fluorescence; spectrum calibration; non-invasive detection

OCIS codes 170.3890; 170.4580; 170.6280; 170.6510; 170.6930

1 引 言

与传统技术相比,运用光学技术进行疾病诊断具有无创、实时的显著优点[1-2]。光学检测系统多通过生物组织的吸收、散射或荧光特性检测,进而达到疾病诊断评估的目的[3-4]。其中,组织荧光光谱因对组织内部微环境高度敏感,具有极高的灵敏度而被广泛关注[5]。

组织荧光光谱包含荧光波长和强度信息,能有效反映生物组织荧光特性[6]。其中波长信息反映组织内部荧光团种类,强度信息反映荧光团浓度。目前,荧光光谱技术已被应用于多种疾病的诊断评估。如癌症

收稿日期: 2014-11-20; **收到修改稿日期**: 2015-04-02; **网络出版日期**: 2015-07-16

基金项目: 安徽省科技攻关计划(1301042121)、皖江中心创新基金(WJZXJJ201202)

作者简介: 张元志(1988—),男,博士研究生,主要从事生物医学光子学中组织荧光光谱复原及分类算法等方面的研究。E-mail: yzzhang@aiofm.ac.cn

导师简介: 刘 勇(1969—),男,博士,研究员,主要从事生物医学光子学、检测技术与自动化等方面的研究。E-mail: Liuyongcas@gmail.com(通信联系人)

早期诊断[7]中,因组织癌变会使荧光团发生变化,波长信息被广泛使用;光动力治疗放射量测量[8]、手术指导[9]等领域中,主要关注荧光团浓度,此时荧光强度准确测量更为重要。荧光光谱测量的准确性直接关系到荧光团种类或浓度检测的准确性,进而影响最终检测评估结果。

要实现组织荧光光谱准确测量,保证同一检测系统在不同使用环境以及不同检测系统在同一使用环境中检测结果的可比性,必须对光谱检测系统进行严密的校准操作[10-11]。本文提出了组织荧光光谱检测系统校准流程,给出每个步骤的具体实现方法,包括激发光强校准、传输光路传光效率校准、探测模块波长校准和非线性校准、系统光谱响应校准、暗背景扣除、光谱平滑。搭建、校准了三套基于光纤探头结构的组织荧光光谱检测系统,并通过荧光标准物和人体皮肤组织进行实验验证。

2 系统设计

搭建的组织荧光光谱检测系统结构如图1所示[12],主要包含光源模块、传输光路、探测模块、信号分析与处理模块。光源模块包括用于荧光激发的激发光源和用于产生组织漫反射光谱的宽带光源。其中,组织漫反射光谱主要用于补偿组织吸收、散射造成的荧光光谱畸变,从测量的原始荧光光谱中复原组织固有荧光光谱。激发光源可根据需要选择,系统中采用的是近紫外发光二极管(LED);宽带光源采用多LED阵列组成,光谱范围覆盖了荧光发射波段。传输光路主要由3×1型光纤束构成,分别连接激发光源、宽带光源、探测模块以及待测组织。探测模块采用光纤光谱仪,其探测器为线性硅电荷耦合元件(CCD)阵列。信号分析与处理单元是包含光谱测量过程控制、信号处理以及结果显示等软件程序的计算机。

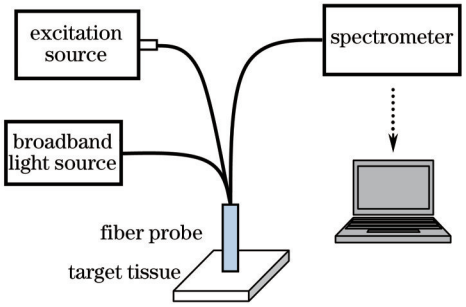

图1 组织荧光光谱检测系统结构示意图

Fig.1 Structural diagram of fluorescence scanning system

在组织荧光光谱测量过程中,检测系统的荧光信号输出S可表示为[10]

$$S(\lambda_x,\lambda_m)=I(\lambda_x)\psi(d)T_s(\lambda_m)F(\lambda_x,\lambda_m)\Delta\lambda\Delta t\,, \tag{1}$$

$$\begin{cases}\psi(d)=A(d)\Omega(d)\\ T_s(\lambda_m)=\gamma Q(\lambda_m)T(\lambda_m)\\ F(\lambda_x,\lambda_m)=\varepsilon(\lambda_x)\Phi(\lambda_x)s(\lambda_x,\lambda_m)c\end{cases}, \tag{2}$$

式中$I(\lambda_x)$表示激发光强,$\psi(d)$表示光纤探头收集效率,$T_s(\lambda_m)$表示系统传输函数,$F(\lambda_x,\lambda_m)$表示逸出组织的荧光,$\Delta\lambda$为探测器相邻像素上的波长间隔,Δt为探测器积分时间,λ_x、λ_m分别表示激发波长与荧光发射波长,$A(d)$表示光纤探头有效收集区域面积,$\Omega(d)$为光纤探头收集立体角,d为光纤探头端面到待测组织的距离,γ为探测器放大率,$Q(\lambda_m)$为探测器量子效率,$T(\lambda_m)$为光学系统传递函数,$\varepsilon(\lambda_x)$为摩尔消光系数,$\Phi(\lambda_x)$为荧光量子产率,$s(\lambda_x,\lambda_m)$为归一化函数,c为荧光团浓度。

(1)式和(2)式表明,对于确定的荧光团,系统输出的荧光信号与激发光强、光纤探头收集效率、系统传递函数以及荧光团浓度成正比。在组织荧光光谱定量测量进而反演荧光团浓度前,必须对激发光强、探头收集效率、系统传递函数等进行校准。

3 系统校准

为保证检测系统光谱测量的准确性,在进行光谱测量前需先对系统进行整体校准[11]。设计的组织荧光光谱检测系统校准流程如图2所示。

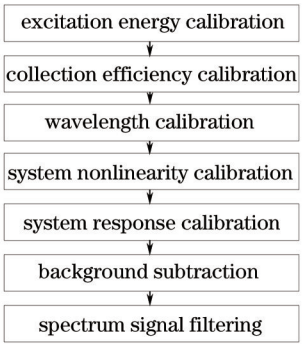

图2 组织荧光光谱检测系统校准流程

Fig.2 Calibration flow chart of fluorescence scanning system

3.1 激发光强校正

将荧光标准板放置于组织荧光光谱检测系统的光纤探头端面,通过调节激发光源的驱动电流来改变激发光功率,可得到如图3所示结果。可见,荧光光强与激发光功率呈线性相关。

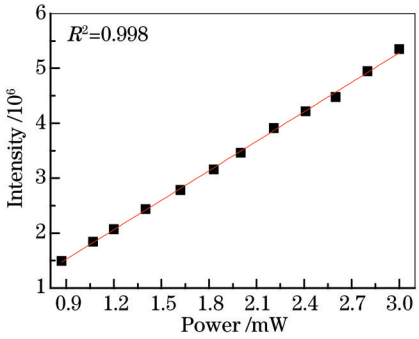

图3 激发光功率与荧光光强的关系

Fig.3 Relationship between excitation power and fluorescence intensity

在实际光谱测量过程中,激发光强度可能会因为驱动电流波动或使用环境变化而出现一定的波动,进而造成荧光光谱出现波动。为消除激发光强度波动带来的干扰,可以通过设计某种光学结构,分出一部分激发光作为参考光,在进行荧光光谱测量的同时,通过实时监测参考光的强度波动来反映激发光强的波动,并将检测到的荧光光谱对相应的激发光强度做归一化处理。

3.2 光纤探头收集效率测量

在该系统中,光纤探头结构及光纤探头端面到被测组织的距离均已固定,由(2)式可知,此时光纤探头收集效率为一个常数,在校准过程中可以不予考虑。但如果涉及到不同的光纤探头与被测组织的距离,则需校正光纤探头收集效率对测量结果的影响。光纤探头收集效率很难直接测量,只能通过荧光特性已知的荧光标准板进行间接测量,计算方法如(3)~(5)式所示:

$$S_{\mathrm{R}}(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})=I(\lambda_{\mathrm{x}})\psi(d)T_{\mathrm{s}}(\lambda_{\mathrm{m}},\omega)F_{\mathrm{R}}(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})\Delta\lambda\Delta t\,, \tag{3}$$

$$S(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})=I(\lambda_{\mathrm{x}})\psi(d)T_{\mathrm{s}}(\lambda_{\mathrm{m}},\omega)F(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})\Delta\lambda\Delta t\,, \tag{4}$$

$$F(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})=\frac{S(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})}{S_{\mathrm{R}}(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})}F_{\mathrm{R}}(\lambda_{\mathrm{x}},\lambda_{\mathrm{m}})\,, \tag{5}$$

式中下标R表示荧光标准板。

3.3 探测模块波长定标

探测模块是对光成分进行定量检测的单元,通过色散成像,探测模块中每个像素都接收到一个特定波长的光强信号。波长定标的本质是利用标准物质特征谱线建立波长与像素的关系,常用的标准物质是低压汞灯。利用低压汞灯特征谱线波长与其在检测系统中对应像素点位置建立一个多项式关系,再利用多项式拟合的方法将整个像素映射到波长上。探测模块像素与波长对应关系为

$$W=A_0+A_1P+A_2P^2+A_3P^3\,, \tag{6}$$

式中 P 表示探测模块中各像素的位置，W 表示该像素对应的波长，A_0 表示信号探测单元中第一个像素对应的波长，A_1、A_2、A_3 分别为一次系数、二次系数和三次系数。

系统中激发和发射波段覆盖350~600 nm，在此范围内校准光源(HG-1汞-氩波长校准光源，Ocean Optical，美国)一共有7条特征谱线，分别为365.02、404.66、407.78、435.83、546.07、576.96、579.07 nm。选择其中分布较为均匀的5条谱线365.02、407.78、435.83、546.07、579.07 nm作为参考。将校准光源固定在组织光谱检测系统光纤探头收集端面，经过重复光谱采集，结果如表1所示。

表1 波长与像素的对应关系

Table 1 Relationship between wavelength and pixel

	Wavelength /nm	Pixel					
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	Average
λ_1	365.02	477	477	477	477	477	477
λ_2	407.78	580	581	582	581	581	581
λ_3	435.83	650	650	650	650	650	650
λ_4	546.07	931	930	930	929	930	930
λ_5	579.07	1016	1016	1016	1016	1016	1016

根据表1中标准波长与像素的对应关系，根据多项式拟合，可求得(6)式中各系数分别为 $A_0=156.6$，$A_1=0.4601$，$A_2=-5.347\times10^{-5}$，$A_3=9.641\times10^{-9}$。此时，可根据(6)式计算探测模块中每个像素对应的波长，实现波长定标。

3.4 探测模块非线性校准

探测模块光强信号的调制是通过调节积分时间来实现的。积分时间增长意味着探测器光电流积分转换的时间增大，从而导致输出信号强度增加。

探测模块非线性校准过程中，将荧光标准板放置于光纤探头端面，在不同积分时间下检测荧光光谱，得到图4所示的积分时间与输出信号强度的对应关系。从图中可看出，输出信号强度与积分时间显现出很好的线性关系，无需增益非线性校正。然而，对于某些存在增益非线性的光谱检测系统，电荷的存储和转移会有一定的损失，输出信号强度并不与积分时间存在线性关系，需要根据积分时间与输出信号强度拟合得到的线性关系和实际非线性关系计算增益非线性校正系数，并在光谱测量过程中根据使用的积分时间来选择相应的校正系数进行校正。

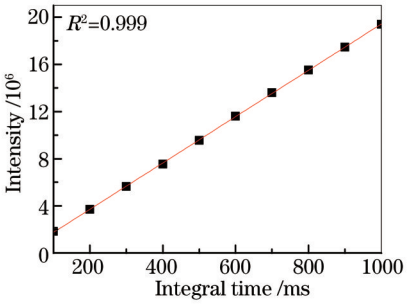

图4 积分时间与输出信号强度的关系

Fig.4 Relationship between intensity and integral time

3.5 系统光谱响应校准

光学滤光片和传输光路等对波长的选择特性，以及探测模块光栅的差异和不同像素之间光谱响应的差异，都会造成荧光光谱形状和强度产生畸变。要实现组织荧光的准确测量，不仅需要波长定标，还需要精确的系统光谱响应校准[13-14]。系统响应校准是建立标准光谱辐照度与检测系统数字化输出信号之间的定量关系。如(2)式所示，系统传递函数很难通过直接测量得到，但可借助光辐射已知的黑体辐射光源间接获取。具体公式为

$$T_s(\lambda)=S_R(\lambda)/E_R(\lambda), \tag{7}$$

式中 $E_R(\lambda)$ 为标准光源辐射强度，$S_R(\lambda)$ 为测量得到的标准光源光谱。进行光谱响应校准时，将已知辐射输

出的卤钨灯标准光源(HL-2000-CAL辐射定标光源,Ocean Optical,美国)固定在光纤探头端面,通过系统输出与光源实际输出比较,即可得到系统光谱响应校准曲线。

3.6 暗背景扣除

组织荧光光谱检测系统暗背景是指在无外界信号光入射的情况下系统检测到的噪声信号,主要来源于探测模块的暗电流。暗背景大小与系统积分时间和探测模块的实际工作温度相关。对于荧光光谱检测系统,在进行暗背景测量时,需保证测量暗背景和测量目标信号时所采用的积分时间相同,同时保证暗背景测量与目标信号测量时间间隔很短,测量温度基本一致。将测量得到的目标信号减去相应波长的暗背景信号,即可实现暗背景扣除。

3.7 光谱平滑

探测模块输出的组织荧光光谱和漫反射光谱信号以及暗背景中都会叠加许多随机噪声,主要表现为光谱曲线上附带多毛刺,影响光谱测量的准确性。实际测量过程中,考虑到暗背景强度在波长方向上表现为一条水平基线,且强度较低,毛刺较多,采用50点移动平均平滑,确保暗背景曲线光滑;为了保证在消除随机噪声的同时不丢失荧光光谱和漫反射光谱中的有用信息,采用10点Savitzky-Golay算法实现荧光光谱和漫反射光谱的平滑。

4 实验结果分析与讨论

搭建了三套基于光纤探头的组织荧光光谱检测系统,并按照上述校准流程对各系统进行校准实验,结果如图5、6所示。

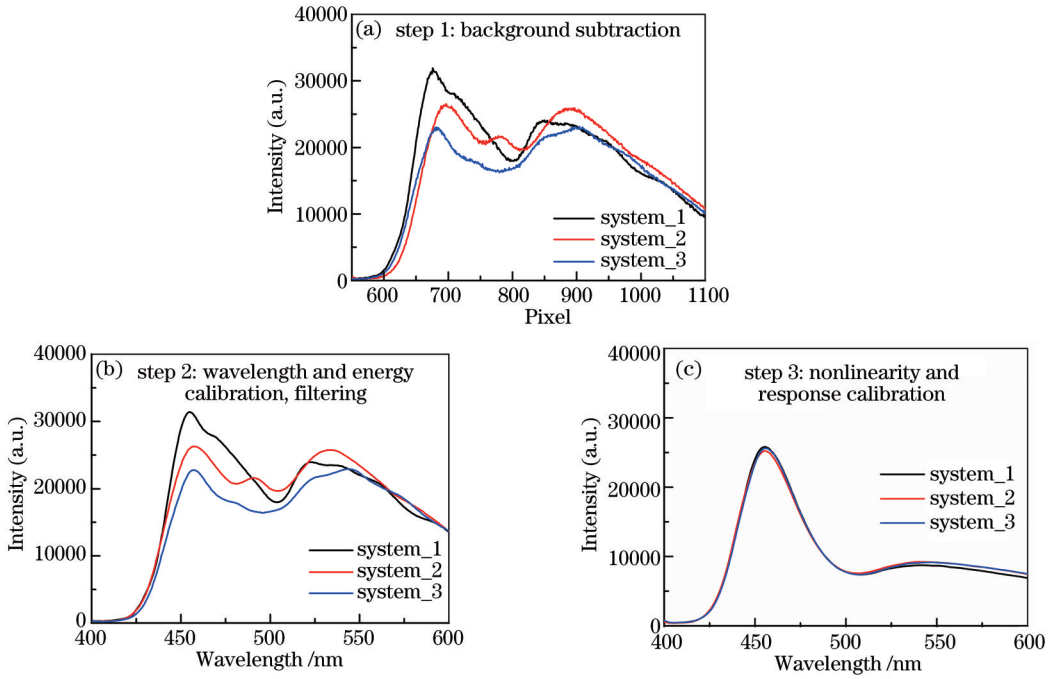

图5 校准前后荧光标准板荧光光谱

Fig.5 Fluorescence spectra of fluorescence standard before and after calibration

图5(a)为三套系统检测同一荧光标准板得到的原始荧光光谱曲线;图5(b)为原始荧光光谱经过波长校准、激发光强校准以及光谱平滑后的光谱曲线;图5(c)显示了进一步进行光谱响应校准后得到的荧光光谱。可见,采用三套系统对同一荧光标准物进行测量时,得到的原始荧光光谱存在明显差异,无论是光谱形状还是光谱强度都无法重合;经过波长校准、激发光强校准以及光谱平滑后,荧光光谱差异有一定改善,但依然没有重合;直到完成光谱响应校准后,三套系统测量得到的荧光光谱形状和强度才趋于重合。

使用三套系统对人体前臂内侧的皮肤组织荧光光谱进行采集,光谱曲线如图6所示。其中图6(a)为系统校准前,三套系统在同一受试者同一部位采集得到的荧光光谱,图6(b)为经过系统校准后的受试者组织荧光光谱。图6(a)显示未校准时,系统1采集的荧光光谱在430、455、490和520 nm附近各存在一个峰值,系

统2采集的荧光光谱仅在490 nm和510 nm附近存在峰值，系统3采集的荧光光谱则在455 nm和510 nm处存在峰值，并且三套系统相应峰值强度各不相同；图6(b)显示经过校准后，三套系统检测到的光谱曲线均在455、490和510 nm附近存在波峰，且光谱曲线基本重合。

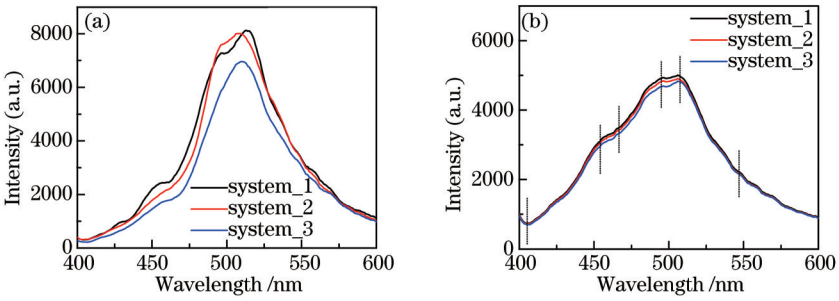

图6 校准前后人体皮肤组织荧光光谱

Fig.6 Fluorescence spectra of skin tissue before and after calibration

具体结果如表2所示，其中Peak1表示光谱曲线中400~500 nm波段内的包络，Peak2表示光谱曲线中500~600 nm波段内的包络，Integral area为400~600 nm范围内光谱曲线的积分面积。图5(a)显示的结果未经过波长定标，故未参与统计。对比图5(b)、(c)的统计结果可以看出，图5(c)中两个波峰位置以及相应峰值强度的变异系数(CV)分别为0.1%、1.2%、0.6%、2.9%，都明显低于图5(b)中的0.3%、16.1%、1.9%、5.9%。图5(c)中光谱积分面积变异系数为0.9%，较之于图5(b)中的光谱积分面积变异系数7.4%也有显著改善。此外，对人体组织荧光光谱进行测量时，图6(a)中荧光光谱曲线积分面积变异系数为10.4%，图6(b)系统校准完成后光谱曲线积分面积变异系数为2.0%。

表2 组织荧光光谱检测系统校准效果

Table 2 Calibration performance of fluorescence standard and skin fluorescence spectra

Figure	Peak1				Peak2				Integral area	
	Wavelength		Intensity		Wavelength		Intensity			
	Average	CV	Average	CV	Average	CV	Average	CV	Average	CV
5(b)	456.5	0.3%	26813	16.1%	533.0	1.9%	24208	5.9%	8749380	7.4%
5(c)	455.8	0.1%	25543	1.2%	542.3	0.6%	9041	2.9%	5006573	0.9%
6(a)	--	--	--	--	--	--	--	--	620248	10.4%
6(b)	--	--	--	--	--	--	--	--	516480	2.0%

5 结 论

提出了包括激发光强校准、传光效率校准、探测模块波长校准和非线性校准、系统光谱响应校准、暗背景扣除、光谱平滑的组织荧光光谱检测系统校准流程，详细介绍了每个步骤的具体实现方法。搭建了三套组织荧光光谱检测系统，并通过荧光标准板和人体皮肤进行了实验验证，结果表明组织荧光光谱检测校准能有效消除系统之间的差异，增强不同系统光谱测量结果的可比性，对促进组织荧光光谱技术在疾病诊断评估中的应用具有重要意义。

参 考 文 献

1 Bradley R S, Thorniley M S. A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2006, 3(6): 1-13.

2 Su Ya, Meng Zhuo, Wang Longzhi, *et al.*. Correlation analysis and calibration of noninvasive blood glucose monitoring *in vivo* with optical coherence tomography[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(7): 0704002.
苏 亚, 孟 卓, 王龙志, 等. 光学相干层析无创血糖检测中相关性分析及标定[J]. 中国激光, 2014, 41(7): 0704002.

3 Kim A, Roy M, Dadani F, *et al.*. A fiberoptic reflectance probe with multiple source-collector separations to increase the dynamic range of derived tissue optical absorption and scattering coefficients[J]. Optics Express, 2010, 18(6): 5580-5594.

4 Li Fei, Zhang Yuanzhi, Wang Yikun, *et al.*. Determination of optical parameters of turbid media based on real coded

genetic algorithm[J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(12): 1217001.
李 飞, 张元志, 王贻坤, 等. 基于实数遗传算法的混浊介质光学参数提取[J]. 光学学报, 2013, 33(12): 1217001.

5 Zeng H, Macaulay C, Mclean D I, *et al.*. The dynamics of laser-induced changes in human skin autofluorescence—experimental measurements and theoretical modeling[J]. Photochemistry Photobiology, 1998, 68(2): 227-236.

6 Yin Gaofang, Zhao Nanjing, Hu Li, *et al.*. Classified measurement of phytoplankton based on characteristic fluorescence of photosynthetic pigments[J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(9): 0930005.
殷高方, 赵南京, 胡 丽, 等. 基于色素特征荧光光谱的浮游植物分类测量方法[J]. 光学学报, 2014, 34(9): 0930005.

7 Mackinnon N, Vasefi F, Farkas D L. Toward *in-vivo* diagnosis of skin cancer using multimode imaging dermoscopy: (I) clinical system development and validation[C]. SPIE, 2014, 8947: 89470I.

8 Zeng H, Korbelik M, Mclean D I, *et al.*. Monitoring photoproduct formation and photobleaching by fluorescence spectroscopy has the potential to improve PDT dosimetry with a verteporfin-like photosensitizer[J]. Photochemistry Photobiology, 2002, 75(4): 398-405.

9 Valdés P A, Leblond F, Kim A, *et al.*. A spectrally constrained dual-band normalization technique for protoporphyrin IX quantification in fluorescence-guided surgery[J]. Optics Letters, 2012, 37(11): 1817-1819.

10 Zhao J, Lui H, Mclean D I, *et al.*. Toward instrument-independent quantitative measurement of fluorescence intensity in fiber-optic spectrometer systems[J]. Applied Optics, 2007, 46(29): 7132-7140.

11 Marin N M, Marckinnon N, MacAulay C, *et al.*. Calibration standards for multicenter clinical trials of fluorescence spectroscopy for *in vivo* diagnosis[J]. Journal of Biomedical Optics, 2006, 11(1): 014010.

12 Zhang Y, Zhu L, Wang Y, *et al.*. Classification of skin autofluorescence spectrum using support vector machine in type 2 diabetes screening[J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2013, 6(4): 1350036.

13 Liu Hongyuan, Wang Hengfei, Ma Shumin, *et al.*. A calibration equipment of responsivity non-uniformity for charge coupled devices[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(s1): s116003.
刘红元, 王恒飞, 马书民, 等. 一种 CCD 器件响应度非均匀性校准装置研制[J]. 中国激光, 2014, 41(s1): s116003.

14 Li Xiaojie, Ren Jianwei, Liu Hongxing, *et al.*. Spectral response testing and uncertainty evaluation of plane array CCD [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2014, 51(11): 111202.
李晓杰, 任建伟, 刘洪兴, 等. 面阵CCD光谱响应测试及不确定度评估[J]. 激光与光电子学进展, 2014, 51(11): 111202.

栏目编辑: 吴秀娟