

# 基于主成分分析-二阶导数光谱成像的 红外显微图像分析

杨秀坤<sup>1</sup> 钟明亮<sup>1,2</sup> 景晓军<sup>2</sup> 张尚迪<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 哈尔滨工程大学信息与通信工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

<sup>2</sup> 北京邮电大学信息与通信工程学院, 北京 100876

**摘要** 红外显微成像技术将红外光谱技术和显微技术相结合,不仅可以提供测试样品的光谱信息而且能够提供测试样品的空间分布信息。然而复杂样品的红外显微图像谱峰重叠严重,无法直接获得目标组分的分布信息。将因子分析与光谱分离技术相结合提出了主成分分析-二阶导数光谱成像方法。通过兔子动脉红外显微图像中胆固醇分布的成像实验,验证该方法的可行性和有效性。实验结果表明,该方法可以提高光谱分辨率,挖掘隐藏在重叠谱峰中的有用信息,是一种有效的红外显微图像分析方法。

**关键词** 显微;红外显微成像;主成分分析;二阶导数;光谱成像

**中图分类号** O657.33 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.0711001

## FTIR Microscopic Image Analysis Based on Principal Component Analysis-2<sup>nd</sup> Derivative Spectral Imaging

Yang Xiukun<sup>1</sup> Zhong Mingliang<sup>1,2</sup> Jing Xiaojun<sup>2</sup> Zhang Shangdi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Information and Communication Engineering, Harbin Engineering University,  
Harbin, Heilongjiang 150001, China

<sup>2</sup> School of Information and Communication Engineering, Beijing University of Posts and Telecommunication,  
Beijing 100876, China

**Abstract** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) microscopic imaging technology combines infrared ray spectroscopy with microscopy, so that not only spectral information but also space distribution of sample can be provided. However, because severe peak overlapping exists in the FTIR microscopic image of complex samples, distribution information of the target chemical compound cannot be displayed directly. To overcome the drawbacks, a method of principal component analysis-2<sup>nd</sup> derivative spectral imaging, combining factor analysis and the spectral unmixing technology is developed. Image analysis of distribution of cholesterol in rabbit arteries with FTIR microscopic imaging technology verifies the feasibility and effectiveness of the proposed method. The experimental results show that the proposed method is an effective method to improve the spectral resolution and find the useful information hidden in overlapping spectral peak.

**Key words** microscopy; Fourier transform infrared spectroscopy microscopic imaging; principal component analysis; 2<sup>nd</sup> derivative; spectral imaging

**OCIS codes** 110.3080; 170.1580; 300.6340

## 1 引 言

红外显微成像技术是一种将红外光谱技术和显微技术相结合的快速、直接、绿色的微区分析技术,

能够在不破坏样品原始结构的前提下深入微观世界,探测生物组织、高分子聚合物等样本的化学组分,具有较高的空间分辨率和光谱分辨率,因而被广

**收稿日期**: 2012-01-09; **收到修改稿日期**: 2012-02-14

**基金项目**: 国家自然科学基金(61143008)和黑龙江省自然科学基金(ZD200915)资助课题。

**作者简介**: 杨秀坤(1971—),女,博士,教授,主要从事图像处理、模式识别和多光谱检测等方面的研究。

E-mail: yangxiukun@hrbeu.edu.cn

泛用于医学<sup>[1]</sup>、生物学<sup>[2]</sup>、食品安全<sup>[3]</sup>和地球科学<sup>[4]</sup>等领域。

红外显微图像由成千上万的光谱组成,包含了海量的成分、浓度、分布等信息。光谱中不同成分的特征吸收峰重叠严重,很难找到一个专属于某种组分的特征峰,那些含量较少的组分则无法通过特征峰成像的方式来获得分布信息<sup>[5]</sup>。因此,如何从多种组分吸收峰重叠的红外显微图像中获得特定组分分布图像成为制约红外显微图像分析技术发展的主要因素。

近年来,人们把主成分分析(PCA)<sup>[6~8]</sup>、偏最小二乘法<sup>[9]</sup>和多元曲线分辨-交替最小二乘法<sup>[10]</sup>等算法应用于红外显微光谱图像的处理上。其中主成分分析是一种常用的最优化方法,无需先验知识,可以降低数据维数,简化数据,揭示复杂数据背后的简单结构;可以用少量载荷光谱和得分图来描述原始红外显微图像,同时获得样品的显微结构特征和化学组分信息。主成分成像是基于光谱变化来提取主成分,能在一定程度上滤除噪声,消除冗余信息,但不能解决光谱的叠加问题。导数法<sup>[11]</sup>光谱分离技术虽然可以用于分离重叠的谱峰,但由于求导将进一步放大噪声信号,要求原始红外显微图像的光谱有较高的信噪比。

因此如何能在去除噪声和冗余信息的同时分离重叠的谱峰,成为特定组分分布信息提取的关键。

## 2 主成分分析-二阶导数光谱法

针对因子分析和导数光谱法的不足,本文将因子分析和光谱分离技术相结合提出了主成分分析-二阶导数光谱法。该方法不仅具有主成分分析保留有用信息、滤除噪声、去除冗余信息的优点,同时还具备二阶导数光谱提高分辨率,挖掘隐藏在重叠吸收峰中目标组分信息的能力,主要由主成分分析、二阶导数处理和特征峰成像三部分构成。

### 2.1 主成分分析

红外显微图像中任意一个像素的光谱浓度值由各个组分纯光谱浓度的加权和得到,每个像素的浓度值因所含成分不同而各不相同,但构成整个光谱图像组分的纯光谱都一样<sup>[12]</sup>。主成分分析可以将红外光谱数据分解为载荷光谱(loadings)以及得分图(score)。载荷光谱具有与纯光谱相近的特征峰位和峰形,可以看作是抽象的纯光谱,对应的得分图像可以用于代表与载荷光谱最相关物质的分布趋势,可以看作抽象的浓度分布图。

对主成分分析得到的载荷光谱和得分图进行分析,确定与样品组分相关的载荷光谱和得分图数量,并利用这些载荷光谱和得分图重构样品红外显微图像。

### 2.2 二阶导数光谱

导数光谱也叫微分光谱,是对原始光谱数据进行微分处理而得到的吸光度对波长(或波数)的变化率曲线。导数光谱既可以消除基线漂移或平缓背景干扰的影响,也可以提供比原光谱更高的分辨率和更清晰的光谱轮廓变化。尤其是二阶导数红外光谱的半峰全宽只有原谱图半峰全宽的1/3左右,能够容易地分辨强峰两侧的小肩峰,因而常用于复杂混合物样本的鉴别<sup>[5,13]</sup>。对于红外显微图像的每一个光谱进行二阶导数,可以分辨光谱的重叠峰,发掘那些被隐藏的有用信息。

### 2.3 特征峰成像

化合物中官能团(或化学键)的存在与红外光谱图上的吸收峰的出现相对应,通过一些有代表性的吸收峰可以确定目标组分是否存在。对目标组分特征峰成像,可以获得目标组分的分布信息。

## 3 结果与讨论

### 3.1 实验数据

本文实验数据是由美国 Perkin Elmer 公司生产的傅里叶变换红外/近红外成像系统 Spotlight 400 提供的兔子动脉血管中红外显微图像。数据处理与仿真主要基于 Matlab7.11 以及 PE 公司红外显微图像处理软件平台。

图 1(a)、(b)分别为兔子动脉可见光图像和中红外显微图像的总吸收图。成像面积约为  $3600 \mu\text{m} \times 5200 \mu\text{m}$ ,空间分辨率  $25 \mu\text{m}$ ,共有 29952 pixel。光谱分辨率  $4 \text{ cm}^{-1}$ ,波数范围  $4000 \sim 720 \text{ cm}^{-1}$ ,共有 821 个波段。

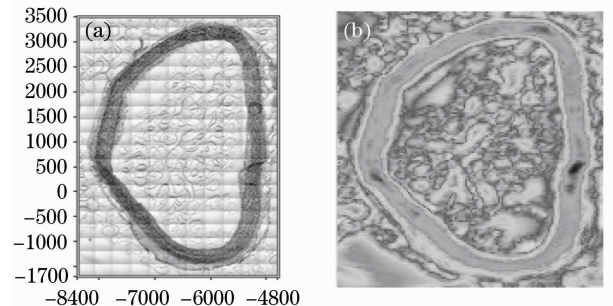


图 1 (a)可见光图;(b)总吸收图

Fig. 1 (a) Visible image; (b) total absorption image

### 3.2 目标组分的分布信息提取

在动脉粥样硬化的发生与发展过程中,胆固醇起着重要作用。对动脉中胆固醇分布的研究,可以为动脉粥样硬化做出早期诊断,为客观准确地评价动脉粥样硬化的程度提供依据,具有重要的临床意义。因此,本文分别采用传统特征峰成像、ChemiMap 成像、主成分成像以及主成分分析-二阶导数光谱法对动脉胆固醇的 4 个特征峰:2924、2868、1464、1056  $\text{cm}^{-1}$  进行成像。

胆固醇标样的红外光谱如图 2 所示,其中特征峰 2950~2850  $\text{cm}^{-1}$  区域为脂肪族甲基亚甲基的伸缩振动,主存在于胆固醇、长链酰基和其他含链烷的脂类中;1460  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收带为二甲脂 C-H 弯曲;1057  $\text{cm}^{-1}$  为 C-O 的伸缩振动<sup>[14]</sup>。

#### 1) 特征峰成像

对动脉胆固醇特征峰直接进行成像,结果如图 3

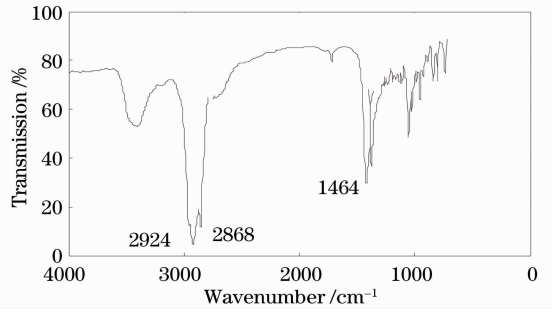


图 2 胆固醇标准红外光谱图

所示。图 3 中在动脉壁上均无胆固醇斑块分布。

#### 2) ChemiMap 成像

ChemiMap 成像<sup>[15]</sup>主要是通过选定目标组分特征峰上的两个基点进行峰面积积分,提高图像强度以获得目标组分的分布信息。本文使用 PE 公司的 Spotlight 软件中 ChemiMap function 来实现。

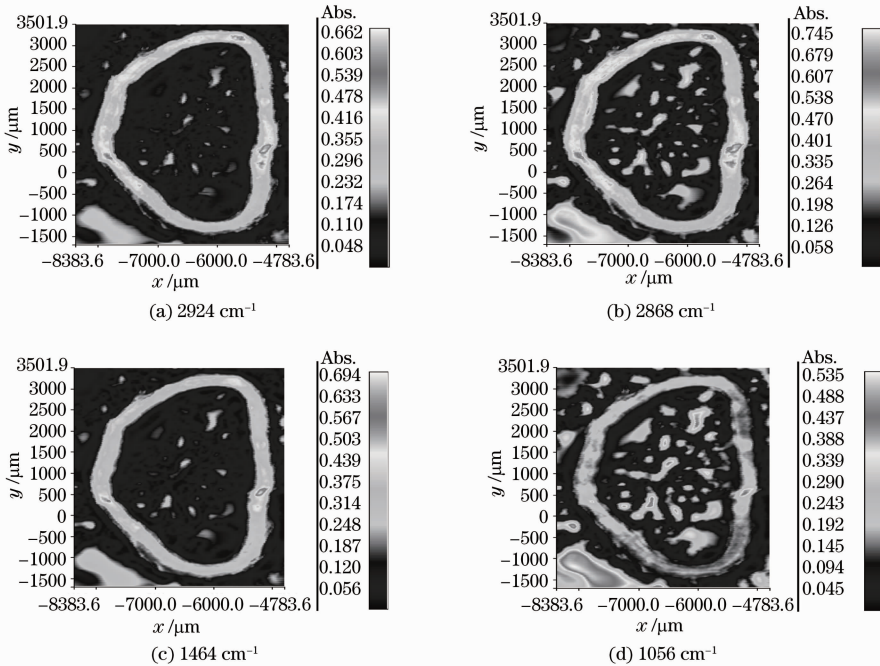


图 3 胆固醇特征峰成像

Fig. 3 Imaging intensity maps of cholesterol

如图 4 为 ChemiMap 成像结果,图 4 均在动脉壁有胆固醇斑块分布,其中图 4(b)、(c)受背景影响较小,胆固醇分布效果比图 4(a)、(d)的分布效果好。

#### 3) 主成分成像

主成分成像是通过对主成分分析重构的红外光谱进行特征峰成像来实现。图 5 为 PCA 分解得到的前八帧得分图。

图 5(e)、(f)、(g)均在动脉壁上有明显的斑块物

质存在。将图 5(e)、(f)、(g)对应的载荷光谱 factor05、factor06、factor07 与胆固醇标准光谱进行比较,如图 6 所示。图 6 中载荷光谱 factor05、factor06、factor07 均含有 2924、2868、1464、1056  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰,与胆固醇特征峰相同,因而动脉壁上的斑块物质为胆固醇。取与样品组分相关的前 7 个载荷光谱与得分图重构红外显微图像。对重构红外显微图像的胆固醇特征峰进行成像如图 7 所示。图 7 中均不能观察到胆固醇在动脉壁上的分布。

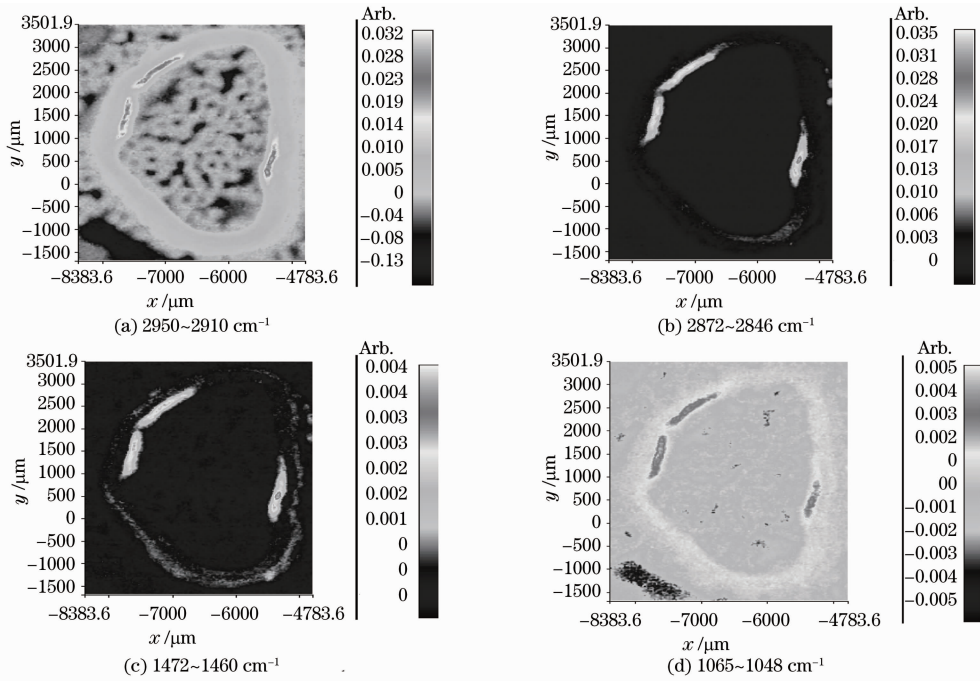


图 4 ChemiMap 成像  
Fig. 4 ChemiMap imaging

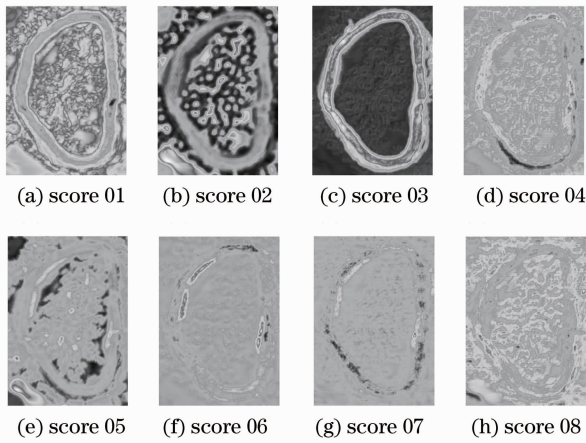


图 5 PCA 得分图  
Fig. 5 Scores of PCA

4) 主成分分析-二阶导数光谱成像

对兔子动脉进行主成分分析-二阶导数光谱成像分析,结果如图 8 所示。图 8 中均在动脉壁上有胆固醇斑块分布,且胆固醇分布情况与 ChemiMap 成像、主成分分析得到的胆固醇得分图分布情况相似。

3.3 结果分析

在兔子动脉胆固醇分布信息提取中,特征峰成像和主成分成像不能获得胆固醇分布信息,ChemiMap 成像和主成分分析-二阶导数光谱成像均能够得到胆固醇分布信息。这是由于兔子动脉样品中的红外显微图像的光谱吸收峰重叠严重,胆固醇的特征峰专

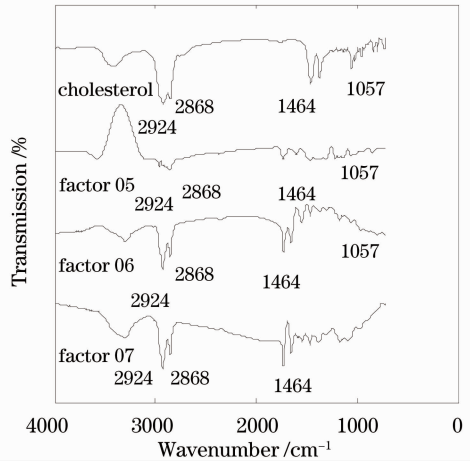


图 6 胆固醇标准光谱与载荷图的比较  
Fig. 6 Comparison between standard IR spectra of cholesterol and loadings

属性不强,容易被动脉分布信息覆盖,而特征峰成像和主成分成像均不能分辨重叠谱峰。虽然主成分成像可以通过重构红外显微图像消除噪音和冗余信息的干扰,但仍然无法挖掘隐藏在重叠峰里的目标组分的分布信息,因而特征峰成像和主成分成像均不能得到胆固醇的分布信息。ChemiMap 成像并不能分离重叠的吸收峰,它是通过调整基点的位置,在一定程度上避免重叠峰上其他组分的干扰,突出目标组分,获得目标组分的分布信息。主成分分析-二阶导数光谱成像可以利用主成分分析保留与样品组分相关的信息并去除噪声和冗余信息,同时利用二阶导数提高谱

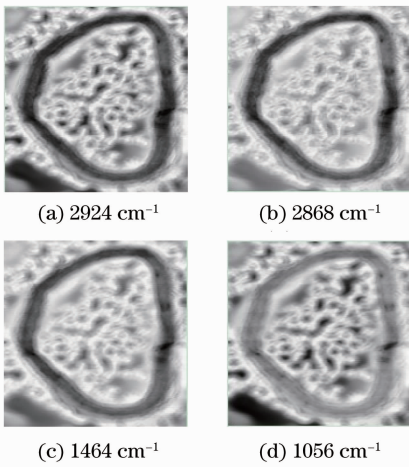


图7 主成分成像  
Fig.7 PCA imaging

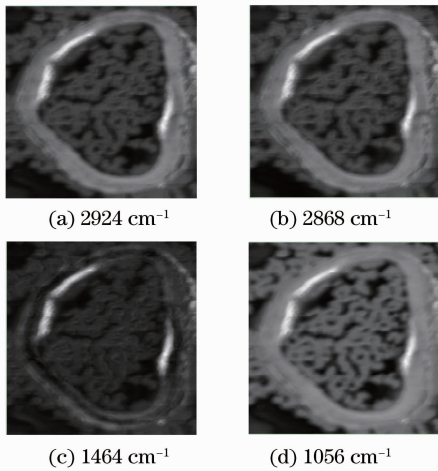


图8 主成分分析-二阶导数光谱成像  
Fig.8 PCA-2<sup>nd</sup> derivative spectral imaging

图的表观分辨率,增强埋藏于重叠峰中目标组分分布的信息表达。

虽然主成分分析-二阶导数光谱成像与ChemiMap成像均能获得目标组分的化学分布,但ChemiMap成像仅使用少量的光谱数据,无法获取红外显微图像中大量有用信息,同时ChemiMap成像还受选择基点的影响,要多次实验才能获得较好的实验结果。因此,主成分分析-二阶导数光谱法更加全面、准确,更适于红外显微图像分析。

## 4 结 论

将因子分析方法与光谱剥离技术相结合提出了主成分分析-二阶导数光谱法。该方法虽不能完全

分离所有的重叠峰,但在一定程度上提高了光谱分辨率,增强了埋藏于重叠峰里的信息表达,突出了目标组分的分布信息。如何能够更好地分离出单一组分的分布信息还有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 1 V. Untereiner, O. Piot, M. D. Diebold *et al.*. Optical diagnosis of peritoneal metastases by infrared microscopic imaging[J]. *Anal Bioanal Chem.*, 2009, **393**(6-7): 1619~1627
- 2 M. Huleihel, V. Pavlov, V. Erukhimovitch. The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity[J]. *J. Photochemistry and Photobiology B*, 2009, **96**(1): 17~23
- 3 A. Rohman, Sismindari, Y. Erwanto *et al.*. Analyses of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy [J]. *Meat Science*, 2011, **88**(1): 91~95
- 4 G. D. Ventura, F. Bellatreccia, B. Cesare *et al.*. FTIR microspectroscopy and SIMS study of water-poor cordierite from EI Hoyazo, Spain: Application to mineral and melt devolatilization[J]. *Lithos*, 2009, **113**(3-4): 498~506
- 5 Chen Jianbo. Methods and Application of Differentiation of Two-Dimensional Correlation Infrared Spectroscopy [D]. Beijing: Tsinghua University, 2010. 4~66  
陈建波. 二维相关红外光谱差异分析方法及其应用研究[D]. 北京: 清华大学, 2010. 4~66
- 6 A. Kohler, D. Bertrand, H. Martens *et al.*. Multivariate image analysis of a set of FTIR microspectroscopy images of aged bovine muscle tissue combining image and design information [J]. *Anal Bioanal Chem.*, 2007, **389**(46): 1143~1153
- 7 J. J. Liu, J. F. MacGregor. On the extraction of spectral and spatial information from images[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2007, **85**(1): 119~130
- 8 K. Thumanu, W. Tanthanuch, C. Lorthongpanich *et al.*. FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst [J]. *J. Molecular Structure*, 2009, **933**(1-3): 104~111
- 9 Xiaoyu Gu, Yan Wang, Huili Sun *et al.*. Measurement of borneol based on infrared spectrometry [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2005, **3**(2): 116~118
- 10 T. Azzouz, R. Tauler. Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples [J]. *Talanta*, 2008, **74**(5): 1201~1210
- 11 N. J. Crane, E. G. Bartick, R. S. Perlman *et al.*. Infrared spectroscopic imaging for noninvasive detection of latent fingerprints [J]. *J. Forensic Sic.*, 2007, **52**(1): 48~53
- 12 R. Salzer, H. W. Siesler. Infrared and Raman Spectroscopic Imaging [M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 66~95
- 13 Dong Wang, Zhihong Ma, Ligang Pan *et al.*. The application of 2<sup>nd</sup> derivative in NIR and MIR micro-imaging of two plastic materials [J]. *Advanced Materials Research*, 2011, **295-297**: 2607~2614
- 14 H. Y. Holman, K. A. Bjornstad, M. C. Martin *et al.*. Mid-infrared reflectivity of experimental atheromas [J]. *J. Biomedical Optics*, 2008, **13**(3): 030503
- 15 L. Hodgson. A Microdevice for the Improved Presentation of Biological Samples for MALDI-TOF Mass Spectrometry [D]. Australia: RMIT University, 2009. 120~126

栏目编辑: 韩 峰