

文章编号:1004-4213(2011)06-0860-5

一种中药荧光指纹图谱的光谱图像构建方法

王琳¹, 庞其昌¹, 马骥², 赵静³, 胡翠英⁴, 李子雷¹, 李启湛¹, 崔代军¹

(1 暨南大学 广东省高等学校光电信息与传感技术重点实验室, 广州 510630)

(2 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515)

(3 华南农业大学 应用物理系, 广州 510640)

(4 暨南大学 物理系, 广州 510630)

摘 要:利用液晶光谱仪通过光谱成像法对黄柏和人参总皂甙进行了荧光光谱图像检测, 采用滤波器与像素点定位联用的方法提取有效像素点, 获取它们的荧光光谱图像, 绘制了相应的中药荧光指纹图谱. 结合欧氏距离的判定方法, 将滤波器与像素点定位联用法、像素点优选法和背景差分算法所得的荧光指纹图谱进行比较, 三种方法的差异由小到大的排序为滤波器与像素点定位联用法, 背景差分算法, 像素点优选法. 说明滤波器与像素点定位联用法所得荧光指纹图谱稳定性最好, 谱线最优. 实验结果表明该方法可以用于构建中药荧光指纹图谱, 从而提出了一种新的用于中药指纹图谱构建中提取有效像素点的可行方法.

关键词:光谱成像; 荧光光谱; 中药指纹图谱; 数据处理

中图分类号: TH74; O433

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20114006.0860

0 引言

光谱成像法作为中药检测与鉴别的一种新手段, 具有简便、实用、检测成本低、检测过程无损快速等优点. 它对于中药材的质量检测、药品的等级划分具有重要的意义, 在中药活性成分的定性定量分析方面也具有广阔的应用前景^[1-2].

光谱成像分析法检测中药材是光谱分析技术和图像分析技术二者的结合, 该方法不仅具有光谱分辨能力还具有空间分辨能力. 中药成分极其复杂, 单一指标并不能完全反应整体药性. 构建中药指纹图谱可以对中药材进行宏观综合的检测分析, 目前已成为国内外普遍公认的鉴别中药材的最有效手段之一. 药材被纳入日、韩等国家质量标准管理体系中, 要求中药材成品的指纹图谱与标准指纹图谱相一致^[3-4]. 中药荧光指纹图谱采用现代信息技术采集获取中药材光谱信息, 利用得到的光谱信息构建出中药材的特征指纹图谱, 并用其对中药材进行真伪鉴别, 品质评价等工作. 而对于中药材的指纹图谱获取, 不同的构建方法和不同光谱范围(如可见和红外)所构建的指纹图谱形态不同. 其核心技术就是中药材光谱立方体图像的获取及光谱图像的数据处

理. 其中, 有效像素点的提取是构建指纹图谱中光谱图像进行处理与分析问题的基础, 是光谱数据信息处理的关键. 如何正确地提取有效像素点, 直接关系到指纹图谱的精确度、稳定性、重现性. 目前从整体上看, 针对中药指纹图谱的获取方法和图像的数据处理软件的研究还缺少科学化、规范化的分析检测手段^[5]. 本文采用紫外光激发中药材发出荧光, 利用光谱成像分析法检测其荧光光谱图像, 提出了一种新的有效像素点提取方法即滤波器与像素点定位联用法. 该方法能准确地反映物质的整体信息, 光谱稳定性好, 并且精确度高、选择性强、样品用量少, 且无损, 可以更好地满足中药指纹图谱构建的要求^[6-8].

1 荧光光谱成像检测原理

当紫外光照射到某些物质的时候, 这些物质会发出各种颜色和不同强度的可见光, 即荧光. 荧光现象与这些物质的分子结构及组份含量有关. 荧光物质的分子结构不同, 发射荧光的波长不同, 据此可对物质进行定性鉴定; 荧光物质的含量不同, 发射荧光的强度也不同, 据此可对物质进行定量分析. 利用这种现象对物质进行检测的方法称为荧光分析法. 将激发光均匀照射在被测物上, 对发射的荧光进行光

基金项目: 国家自然科学基金(No. 60908038)和广州市农业科技计划项目(No. GZCQC1002FG08015)资助

第一作者: 王琳(1985-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为光谱图像检测. Email: wlhgnc@163.com

导师(通讯作者): 庞其昌(1951-), 男, 教授, 主要研究方向为光电检测和信息技术. Email: tpqch@jnu.edu.cn

收稿日期: 2010-09-08; 修回日期: 2011-04-29

谱分光,同时以波长序列记录被测物二维空间的激发光强,最后视频采集卡采集被测物按波长顺序排列的光谱图像,即被测物的荧光光谱立方体,其原理如图 1.

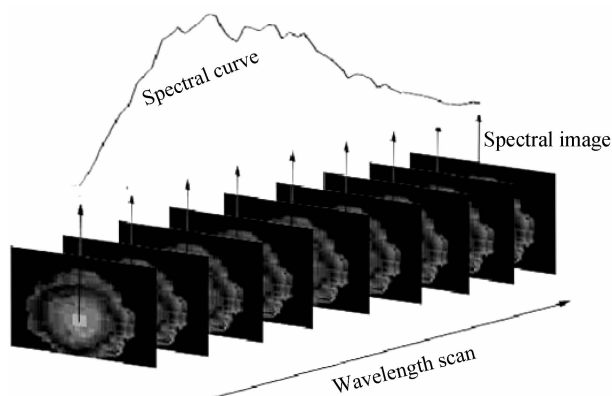


图 1 荧光光谱成像示意图

Fig. 1 Schematic diagram of fluorescence spectral imaging

对光谱立方体提取有效像素点,经过初步数据处理后,取每张图片中有效像素点所对应灰度的平均值,然后以波长为横坐标,荧光强度为纵坐标,构建出中药荧光指纹图谱.此外,可在光谱立方体中选取相应的某一点或某个典型的区域,绘制中药特征光谱曲线.将其与对应的中药荧光指纹图谱比较,所得特征峰位置相同,特征峰强度不同.根据荧光分析法原理可以推断,峰值位置高,荧光强,所对应部位的有效物质含量多;峰值位置低,荧光弱,所对应部位的有效物质含量少^[9].

荧光光谱成像法用于中药检测,一方面是可以分辨出不同种类的中药,鉴别中药的真伪;另一方面是可以区分同一中药的某些成分在不同药用部位或不同组织结构的空间相对分布,评价中药品质的优劣.

2 实验仪器

2.1 仪器设备

实验中使用的液晶荧光光谱仪,其主要器件包括紫外光源、液晶滤光器、面阵 CCD、视频采集卡、图像处理软件等.其中,主要仪器是 VariSpec 电可调液晶滤光片(Liquid Crystal Tunable Filters, LCTFs),其空间分辨率为 $4\ 000 \times 4\ 000$,最高光谱分辨率 $0.5\ \text{nm}$,光谱带宽 $10\ \text{nm}$ (最大透过功率一半时的谱宽),光谱范围为 $400 \sim 720\ \text{nm}$,由主机的 USB 接口直接供电进行控制,响应时间为 $50\ \text{ms}$.液晶光谱仪是无运动部件,通过自动调节液晶滤光器的透过波长即可获得被测中药材的连续光谱图像,进而得到被测中药材的光谱立方体.光谱成像系统示意图如图 2.

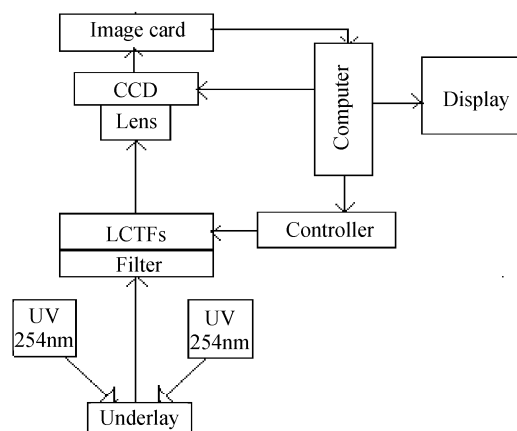


图 2 装置原理框图

Fig. 2 Block diagram of the instrument

2.2 实验样品

中药材的有效成分可大体分为生物碱类、皂甙类、酮类等,其中多种具有荧光效应.实验选取黄柏和人参总皂甙进行检测.现代药理化学研究表明黄柏含多种生物碱,主要活性成分为小檗碱(Berberine)其紫外光源照射下产生荧光强度较强,易氧化.中药西洋参的主要药用成分是人参总皂甙(Saponins of panax ginseng).

实验样品是黄柏对照品(批号:121510-200702 由中国药品生物制品检定所提供),人参总皂甙标准品(批号:1553-200201 由中国药品生物制品检定所提供).

2.3 滤光器与像素点定位联用法

获取荧光指纹图谱的主要任务是去除光谱图像中的背景以及噪音,提取有效像素点,使所得荧光指纹图谱更准确、可靠、稳定.本文提出的用滤光器与像素点定位联用来确定荧光指纹图谱中有效像素点的方法,其处理过程是首先使用光谱维带通滤波器进行初步去噪,再定位有效像素,最后构建荧光指纹图谱^[10-12].

采用滤波法对图像进行预处理.考查噪音在光谱立方体中的亮度可以发现,噪音在每一帧中的亮度变化不是很明显,即亮度随波长的改变可以近似看作是常量.首先设计带通滤波器,从光谱立方体中最暗的一帧图像找出亮点的灰度阈值,设计低通滤波器;最亮的一帧图像找出暗点的灰度阈值,设计高通滤波器.去除噪点后,定位有效像素点.从第一帧图像开始进行逐行扫描,当满足阈值要求时记录该点的坐标,进行有效像素点定位跟踪,并将单帧图像有效像素点的选择结果应用于整个光谱立方体中.其表达式为

$$G(\mathbf{r}, \lambda) = \begin{cases} f(\mathbf{r}, \lambda) \cdots \cdots M_{\min} \leq \alpha \text{ and } M_{\max} \geq \beta \\ 0 \cdots \cdots \text{others} \end{cases} \quad (1)$$

式中, $G(\mathbf{r}, \lambda)$ 为去除噪点后的光谱立方体图像, $f(\mathbf{r}, \lambda)$ 为所拍摄的光谱立方体图像, M_{\min} 为光谱立方体中最暗的一帧图像, α 是低通滤波的灰度阈值, M_{\max} 为光谱立方体中最亮、对比度最强的一帧图像, β 是高通滤波的灰度阈值. α, β 受实验系统参量的影响, 具体值由经验值来选定. 对黄柏图像采用滤波器和像素点定位联用法所得的有效像素点如图 3 和图 4.

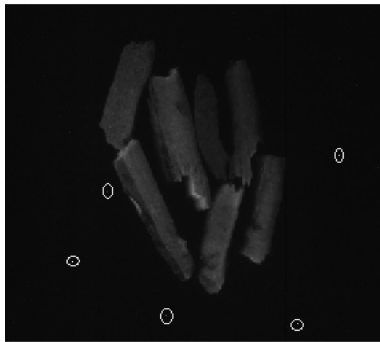


图 3 原始图像
Fig. 3 Original imaging

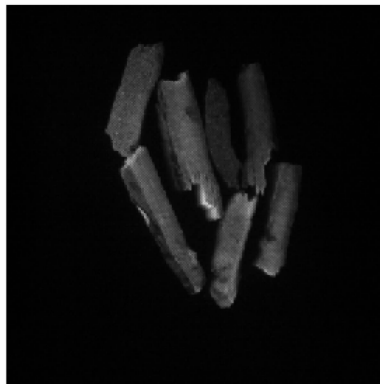


图 4 有效像素图像
Fig. 4 Effective pixels' imaging

2.4 中药荧光指纹图谱的构建

构建中药荧光指纹图谱时, 以波长为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 则

$$\overline{I(\lambda)} = \frac{\sum_{n=1}^N I_n(\lambda)}{N} \quad (2)$$

式中 N 为有效像素的个数, $I_n(\lambda)$ 为任意有效像素的荧光强度, $\overline{I(\lambda)}$ 即为所构建的荧光指纹图谱. 一般地, 相同检品、相同实验条件下理论上构建的指纹图谱差异应尽量小, 采用合适的构建方法所得的实验数据差异越小, 稳定性越好. 在中药荧光指纹图谱中, 光谱图像构建方法优劣的评判是以构建中药指纹图谱的稳定性为依据的.

3 实验结果和比较分析

3.1 不同有效像素点提取方法比较

利用像素点优选法、背景差分算法和滤波器与像素点定位联用法这三种不同有效像素点的提取方法分别对黄柏和人参总皂甙绘制其中药荧光指纹图谱. 将五次实验的指纹图谱绘制在同一坐标系中, 由实验图像处理得出的中药荧光指纹图谱按拍摄次数强度顺次下降. 荧光强度高的中药指纹图谱尤为明显, 以黄柏为例, 实验结果如图 5 到图 7.

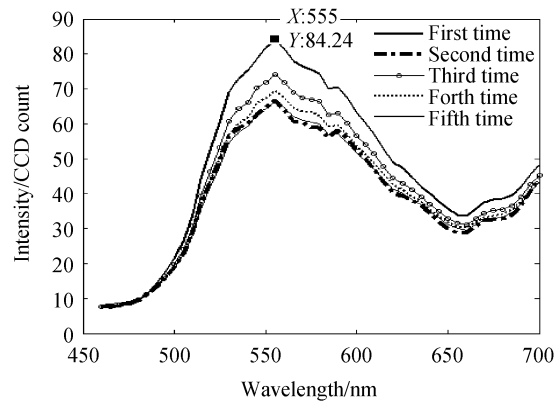


图 5 像素点优选法
Fig. 5 Optimization of pixels

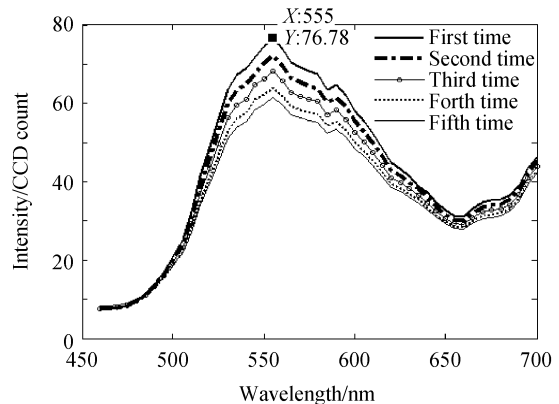


图 6 背景差分算法
Fig. 6 Background differencing

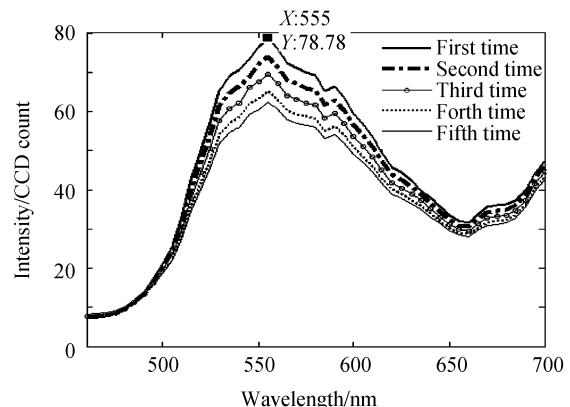


图 7 滤波器与像素点定位联用法
Fig. 7 Combination of filter and localizing pixels

图 5 像素点优选法,即先在图像中直接选择有效像素点分布比较好的 20×20 区域,然后用点检测模板去噪,将检测出的所有噪点置零,最后所得非零像素点区域就是有效像素点区域^[13].该方法处理程序简单、运算速度快,但所得荧光指纹图谱和其它两种方法稍有差异,典型的如图 5 中第二次实验的曲线(黑色粗线条)滑落到底部.这种现象是由于人工选取像素点在一定程度上具有局限性,如果在获取的光谱图像中适当多取几个区域再求平均,这种差异就会消除.

图 6 背景差分算法将获取的光谱立方体当作运动图像检测,不含运动目标的一帧图像作为背景图像,用当前帧图像与背景图像进行差分来得到运动目标区域^[14-15].由于减掉背景图像,所得曲线的荧光强度顺次不变,但整体灰度值有所下降,最高峰值为 76.78(像素点优选法为 84.24,滤波器与像素点定位联用法为 78.78).

图 7 滤波器与像素点定位联用法,即先滤波去噪,再定位有效像素点,最后获取中药荧光指纹图谱,所得光谱曲线的稳定性更好.实验结果五条曲线的吻合程度非常好,多次实验结果都很稳定.由此可见,滤波器与像素点定位联用法整体效果最优.

3.2 欧氏距离和标准差

取欧氏距离来描述中药荧光指纹图谱之间的相似性,设第一次拍摄中药荧光指纹图谱矩阵为 $X = (x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1n})$,第二次拍摄中药荧光指纹图谱矩阵为 $Y = (y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n})$.欧氏距离定义如式(3)

$$d = \sqrt{(X-Y)(X-Y)^T} \quad (3)$$

由式(3)计算任意两条荧光指纹图谱的欧氏距离得距离阵.定义五条曲线和平均曲线组成的六维数值矩阵中,欧氏距离最大值为 S_{\max} ,欧氏距离最小值为 S_{\min} ,计算最大值与最小值偏差.作出五条特征曲线的平均值,计算五条曲线的标准差作为量度曲线稳定性的指标.计算结果,黄柏对照品见表 1,人参总皂甙标准品见表 2.其中滤波器与像素点定位联用法的最大和最小值偏差及标准差最小.

表 1 比较三种方法黄柏荧光指纹图谱的欧氏距离

Table 1 Comparison of the three Euclidean distances of the cortex phellodendri

Distance	S_{\max}	S_{\min}	$S_{\max} - S_{\min}$	Standard deviation
Optimization of pixels	46.145 1	7.438 8	38.706 3	15.235 53
Background differencing	31.064 4	2.075 3	28.989 1	11.292 1
Combination of filter and localizing pixels	28.736 5	1.895 1	26.841 4	10.457 19

表 2 比较三种方法人参总皂甙荧光指纹图谱的欧氏距离
Table 2 Comparison of the three Euclidean distances of the saponins of panax ginseng

Distance	S_{\max}	S_{\min}	$S_{\max} - S_{\min}$	Standard deviation
Optimization of pixels	2.382 8	0.498 4	1.884 4	0.7370 13
Background differencing	1.958 3	0.411 0	1.547 3	0.569 4
Combination of filter and localizing pixels	1.971 9	0.682 0	1.289 9	0.5059 82

4 结论

用滤波器与像素点联用法来构建中药荧光指纹图谱,并结合其它二种数据处理方法比较发现,滤波器与像素点定位联用法获得的谱线准确性较高.通过欧氏距离计算最大和最小值偏差,以及标准差,结果显示三种方法的差异由小到大的顺序为:滤波器与像素点定位联用法 < 背景差分算法 < 像素点优选法.说明滤波器与像素点定位联用法所得荧光指纹图谱稳定性最好,谱线最优.该方法为中药指纹图谱的构建提供了可靠手段,有利于中药真伪鉴别、品质划分,避免性状鉴定的人为性和生物、色谱鉴别的复杂性,以便快速有效地控制中药质量,加快中药产业的现代化进程,进而使中药制品尽快打入国际市场.

参考文献

- [1] NOH H K, LU Ren-fu. Hyperspectral laser-induced fluorescence imaging for assessing apple fruit quality [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, **43**: 193-201.
- [2] 张贵军. 中药鉴定学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 35-39.
- [3] LI Ping, LIU Yao. Current research situation of traditional chinese medicine fingerprint spectrum and development trend [J]. *China Pharmaceuticals*, 2009, **18**(8): 19-20.
李萍, 刘耀. 中药指纹图谱的研究现状和发展趋势[J]. *中国药业*, 2009, **18**(8): 19-20.
- [4] XIAO Xiao-he, JIN Cheng, ZHAO Zhong-zhen, et al. Probe into innovation and development of pattern of quality control and evaluation for Chinese medicine [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2007, **32**(14): 1377-1381.
肖小河, 金城, 赵中振, 等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. *中国中药杂志*, 2007, **32**(14): 1377-1381.
- [5] KAWASE K, OGAWA Y, WATANABE Y. Non-destructive terahertz imaging of illicit drugs using spectral fingerprints[J]. *Optics Express*, 2003, **11**(20): 2550-2554.
- [6] LIU Zhi-ming, HU Bi-ru, WU Wen-jian, et al. Spectral imaging of green coating camouflage under hyperspectral detection[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, **38**(4): 885-890.
刘志明, 胡碧茹, 吴文健, 等. 高光谱探测绿色涂料伪装的光谱成像研究[J]. *光子学报*, 2009, **38**(4): 885-890.
- [7] ZHAO Jing, PANG Qi-chang, MA Ji, et al. Design of the continuous spectrum imaging apparatus based on LCTFs[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(4): 758-762.
赵静, 庞其昌, 马骥, 等. 基于液晶滤光器的连续光谱成像测试装置[J]. *光子学报*, 2008, **37**(4): 758-762.
- [8] ZHAO Jie-wen, ZHANG Hai-dong, LIU Mu-hua.

- Preprocessing methods of near-infrared spectra for simplify in prediction model of sugar content of apples[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(1): 136-140.
- 赵杰文,张海东,刘木华.简化苹果糖度预测模型的近红外光谱预处理方法[J]. *光学学报*, 2006, **26**(1):136-140.
- [9] ZHAO Jing, PANG Qi-chang, MA Ji, *et al.* Identifying traditional chinese medicines by the chemical imaging device [J]. *IEEE*, 2008, **738**: 1636-1639.
- [10] ZHOU Zuo-feng, CAO Jian-zhong, CHENG Yuan-yuan, *et al.* New directional filter bank and its application in image denoising[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(2): 380-384.
- 周祚峰,曹剑中,程源源,等.新的方向滤波器组及其在图像去噪中的应用[J]. *光子学报*, 2010, **39**(2):380-384.
- [11] HOU Jian-hua, TIAN Jin-wen, LIU Jian. Analysis of the errors in locally adaptive wavelet domain wiener filter and image denoising[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(1): 188-191.
- 侯建华,田金文,柳健.小波域局部维纳滤波器估计误差分析及图像去噪[J]. *光子学报*, 2007, **36**(1):188-191.
- [12] ZHAO Yong-qiang, PAN Quan, ZHANG Hong-cai. A new spectral and panchromatic images fusion method[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(1): 180-183.
- 赵永强,潘泉,张洪才.一种新的全色图像与光谱图像融合方法研究[J]. *光子学报*, 2007, **36**(1):180-183.
- [13] LI Zi-lei, WANG Lin, PANG Qi-chang, *et al.* Panax quinguefolium's active ingredients detecting method based on LCTF spectrograph [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(12): 3622-3626.
- 李子雷,王琳,庞其昌,等.基于液晶光谱仪的西洋参品质荧光检测方法[J]. *光学学报*, 2010, **30**(12):3622-3626.
- [14] ZHU Ming-han, LUO Da-yong. Moving objects detection algorithm based on two consecutive frames subtraction and background subtraction [J]. *Computer Measurement & Control*, 2005, **13**(3): 215-217.
- 朱明早,罗大庸.帧间差分与背景差分相融合的运动目标检测算法[J]. *计算机测量与控制*, 2005, **13**(3):215-217.
- [15] WEI Ying-zhuo, ZHANG Shao-wu, LIU Yan-wei. Detecting fire smoke based on the multispectral image[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, **30**(4): 1061-1064.
- 卫颖卓,张绍武,刘彦伟.基于多光谱图像的烟雾检测[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, **30**(4):1061-1064.

A Spectral Image Constructing Method of TCM's Fluorescent Fingerprints

WANG Lin¹, PANG Qi-chang¹, MA Ji², ZHAO Jing³, HU Cui-ying⁴,
LI Zi-lei¹, LI Qi-zhan¹, CUI Dai-jun¹

(1 Key Laboratory of Optoelectronic Information and Sensing Technologies, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

(2 College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

(3 Department of Applied Physics, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(4 Department of Physics, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: In order to improve the stability of Traditional Chinese Medicine's fluorescence fingerprint spectra of constructing images and data processing efficiency, Liquid Crystal Spectrometer was used to detect spectral image of Cortex Phellodendri and Total Saponins of Panax Ginseng. Effective pixels were extracted using the combination of filter and localizing pixels means, besides, their pixels' spectral images were obtained to draw Traditional Chinese Medicine's fluorescent fingerprints correspondingly. Considering their Euclidean distance, when compared the three methods, the combination of filter and localizing pixels means has the best fluorescence fingerprint and spectral stability, followed by the background differencing, then is the optimization of pixels. By experimental results, it is revealed that spectral stability by this way is better and can be used to build Traditional Chinese Medicine's fluorescent fingerprints. Based on these points, a new approach used for collecting effective pixels during Traditional Chinese Medicine's fingerprints construction is proposed.

Key words: Spectral image; Fluorescent; Traditional Chinese Medicine's fingerprints; Spectral stability