

干烟叶的显微近红外图像分析*

王冬^{1**} 闵顺耕^{1***} 丁云生^{2****} 叶升锋¹ 段佳¹

(1. 中国农业大学理学院应用化学系 北京 100193)

(2. 云南省烟草公司大理州公司 大理 671000)

摘要 采集干烟叶的显微近红外图像,并用主成分分析方法和相关光谱成像的方式对其进行图像分解,并且比较2种图像分解方法的特点。结果表明,对于干烟叶样品的显微近红外图像采用主成分分析的方法提取其特征向量,并将第二主成分特征向量与淀粉的近红外光谱对比,特征向量与标准物质光谱的相关系数达到0.9779,表明第二主成分的特征向量主要源于淀粉,第二主成分得分值图像主要代表干烟叶中淀粉的分布;干烟叶的淀粉相关光谱成像图和第二主成分得分值图像的分布形状和趋势基本一致。

关键词 近红外显微镜 近红外图像 化学成像

引言

微区分析(Microanalysis)或微区痕量分析(Micro Scale Trace Analysis of Micro-Trace Analysis)一直是分析化学领域一个具有挑战性的课题。显微镜(或显微技术)在微区分析中占有很重要的地位,已深入到分析化学的各个领域。

近红外显微镜把光束聚焦到几个微米的面积上,显微近红外图像技术可以观测到位于样品表面下至少100 μm深处的细胞。由于近红外光对玻璃和石英材料是透明,因此即使在近红外区使用普通的物镜时,成像性能也不会受影响。

显微近红外图像技术同时具有以下特点:(1)无需切片,抛光和其它处理;(2)强穿透能力,固体样品大于300 μm,组织以厘米计;(3)水的干扰小,可以对鲜活组织和溶液中的细胞样品直接测定;(4)成像仪器可以测定的区域非常大,一般可达到1 cm²以上,并且可以适应粗糙表面的样品;(5)非接触性、非破坏性测试。

由于近红外光谱的谱峰重叠严重,特征性不强,因此,很难找到一个专属于某化合物的特征峰,也就是说,近红外光谱图像很大意义上是多种成分的复合图像,即使单一波长,也是多种官能团信息的叠加,从而导致无法直接对特定化合物成像,也就无从知道该化合物在样品中的分布情况。要获得单一成分的图像就必须从多种官能团的复合信息中提取和分离出单一成分的光谱特征信息,并以该特征

信息进行成像,才能从多种成分复合图像中分解得到单一成分的图像。

目前近红外显微成像技术还局限于总吸收图成像和单一波长的化学成像,仍然是多组分成像,并没有进行光谱剥离,成像的准确性还有待于进一步证实。基于多元分析的光谱剥离化学成像技术的研究仅有少数报道。J. R. Barkshire等^[1]采用主成分分析技术提取与特定元素相关的主成分(特征向量),成功地对不同元素的分布进行超显微成像,获得单个元素分布的化学成像;Fiona Clarke^[2]采用偏最小二乘法(PLS)提取与药片有效成分相关的各个主成分(Loadings),对药片样品进行近红外显微成像,获得药片有效成分分布的化学成像。但是由于主成分特征向量有多个,采用哪一个特征向量做化学成像还有待研究。

本文采用主成分分析方法对干烟叶的显微近红外图像进行分析,采用相关光谱成像法对干烟叶中的淀粉成分进行成像分析,并比较2种图像处理方法的结果。

1 实验部分

1.1 实验仪器及参数

Perkin Elmer Spectrum ONE NTS 傅立叶变换近红外光谱仪(美国,Perkin Elmer);Perkin Elmer Spectrum Spotlight 傅立叶变换近红外图像系统(美国,Perkin Elmer)。

以透射方式采集干烟叶的显微近红外图像,成

*基金项目:本文系国家自然科学基金资助项目,基金号:20575076

**王冬,男,博士研究生,研究专业:近红外光谱分析/显微近红外成像分析,Email:nirphd@yahoo.cn,Tel.010-62733091

***通讯作者:闵顺耕,男,1963.5-,教授,博士生导师,Email:mingg@263.net,Tel.62733091

****共同联系人:丁云生,女,农艺师,Tel.0872-2201668

像面积约 $5000 \times 5000 \mu\text{m}$, 空间分辨率 $25 \times 25 \mu\text{m}$, 波数分辨率为 64 cm^{-1} , 波数范围 $7800 \sim 2400 \text{ cm}^{-1}$ 。

1.2 实验方法

将烤烟干烟叶上下分别垫滤纸, 夹在两张厚玻璃板中间压数日直到将烤烟干烟叶表面压平整。取面积约 1 cm^2 的干烟叶样品, 放在载玻片上, 用聚苯乙烯膜封住干烟叶样品表面以防止叶片在实验过程中脱水卷曲。

2 结果与讨论

2.1 对干烟叶显微近红外图像进行主成分分析

干烟叶的可见光图像和显微近红外图像总吸收图 (见图 1)。

为提高光谱的信噪比, 将干烟叶显微近红外图像中的光谱做 5 点平滑处理, 由平滑后光谱得到的总吸收图 (见图 2A)。取波数范围 $7000 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 的近红外区的干烟叶显微近红外图像 (见图 2B)。

对图 2B 中的 39800 张近红外光谱进行主成分分析, 主成分数选取 20 个。主成分分析的载荷向量及相应的得分值图像 (见图 3, 4)。从图 3 中可以看出, 第 12 个特征载荷向量以后的主要信息为噪声。

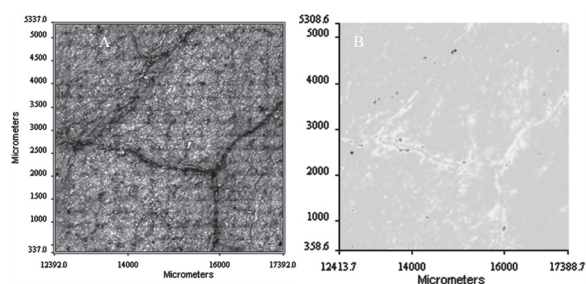


图 1 干烟叶的可见光图像 (A) 和显微近红外图像的总吸收图像 (B)

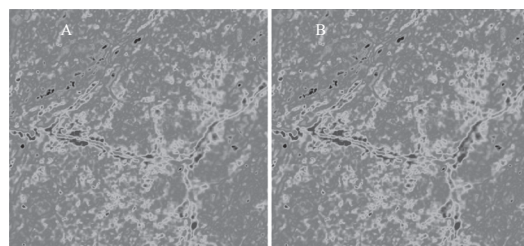


图 2 经过 5 点平滑处理的干烟叶显微近红外图像 (A) 和波数范围 $7000 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 的干烟叶显微近红外图像 (B)

比较第二主成分的特征向量和烟草淀粉的近红外光谱 (见图 5)。从图 5 可见, 第二特征向量与淀粉的近红外光谱有较高的相似程度, 相关系数达到 0.9779, 说明第二主成分的信息主要源于淀粉、糖类及碳水化合物, 因此第二主成分得分值图像主

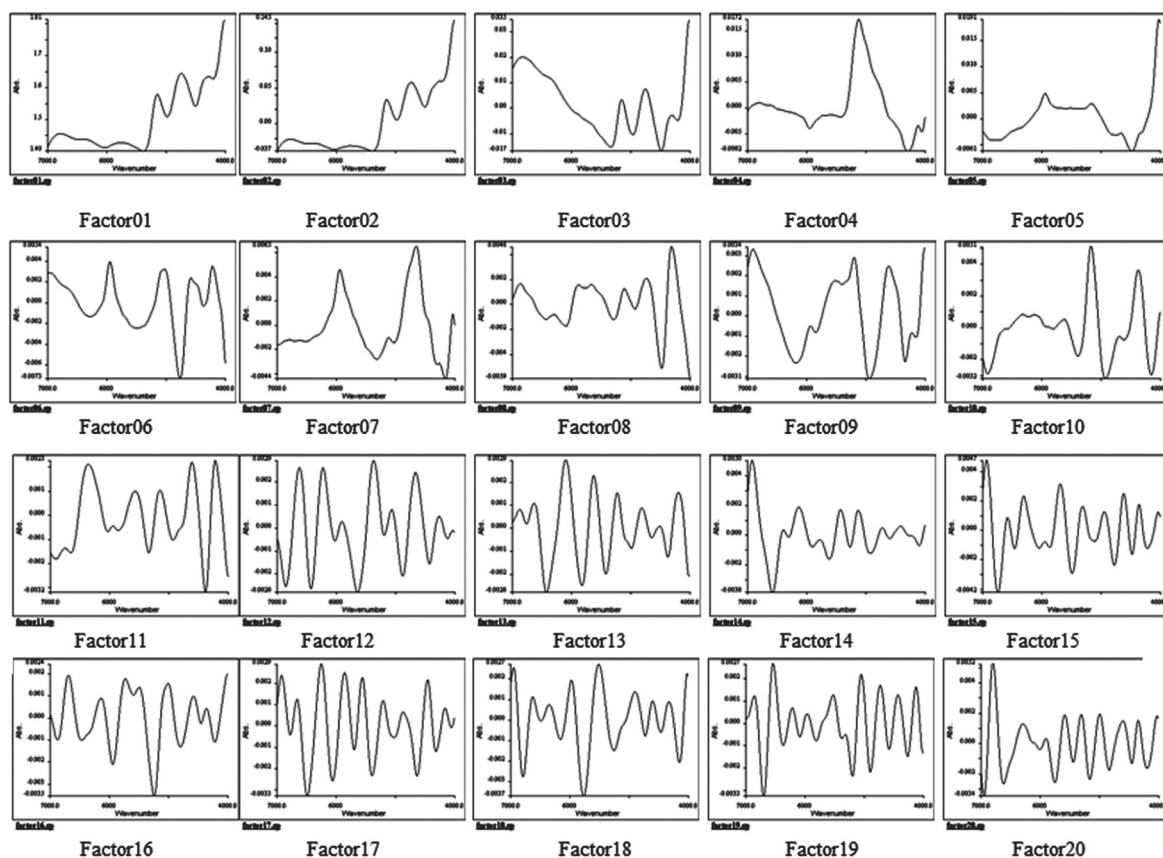


图 3 干烟叶各主成分特征向量

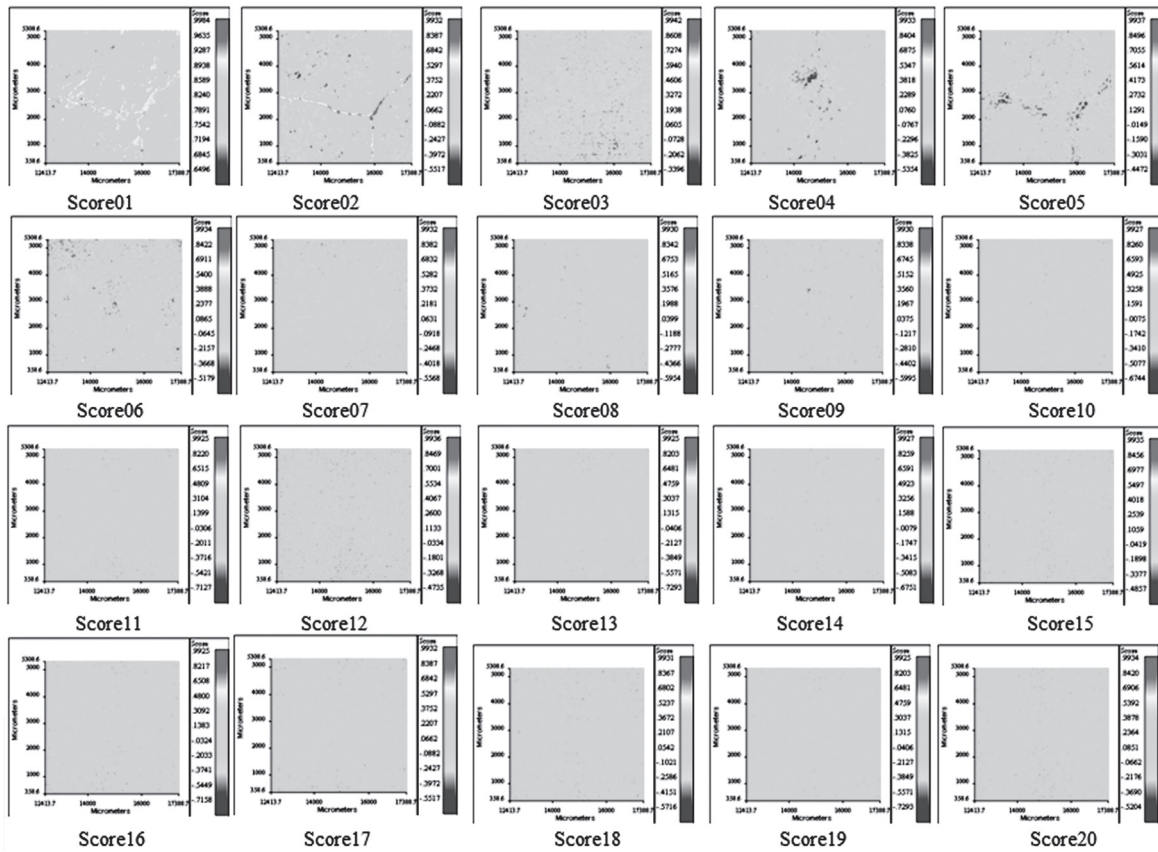


图 4 干烟叶各主成分得分值图像

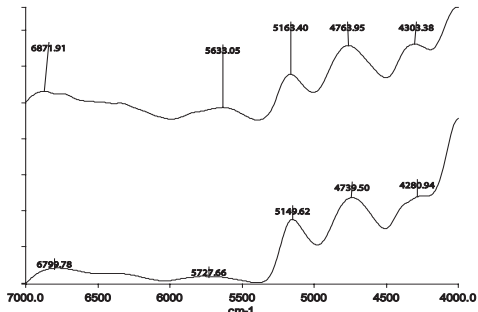


图 5 干烟叶的第二主成分特征向量 (I) 和淀粉的近红外光谱 (II)

要代表干烟叶中淀粉、糖类及碳水化合物的分布^[2]。
2.2 对干烟叶显微近红外图像进行相关光谱图像处理

相关光谱图像处理方式 (compare correlation) 是显微近红外图像分析中常用的一种成像方式。这种成像方式以某一条近红外光谱为标准, 计算出显微近红外图像上每一个像素点的近红外光谱与此标准近红外光谱的相关系数, 再以相关系数成像。

下面用相关光谱成像方式对干烟叶的显微近红外图像进行成像并且与第二主成分得分值图像做比较。以分析纯淀粉的近红外光谱为标准光谱, 相关光谱成像图的波数范围选取 $7000\sim 4000\text{cm}^{-1}$ (见图 6)。从图 6 中可以看到, 淀粉的相关光谱成像图的

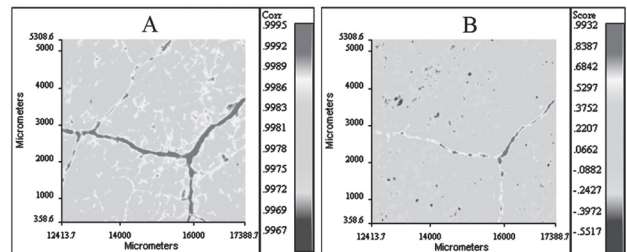


图 6 干烟叶用淀粉做相关光谱成像图 (A) 和 PCA 法第二主成分得分值图像 (B)

分布和 PCA 法中第二主成分得分值图像的分布形状基本一致。

用相关光谱成像方式还可以得到另一些成分的相关光谱成像图。分别用烟碱、葡萄糖、纤维、蛋白质和果糖的近红外光谱作为标准光谱, 选取波数范围 $7000\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 做相关光谱成像图 (见图 7)。淀粉、烟碱、葡萄糖、显微的相关系数在 0.99 以上, 成像结果较可靠, 单蛋白质的相关系数在 0.959 ~ 0.972 之间, 图像的正确性有待其它方法的验证。

3 结论

对干烟叶样品的显微近红外图像采用主成分分析的方法提取其特征向量, 并将第二主成分特征向量与淀粉的近红外光谱做对比, 两组数据的相关系

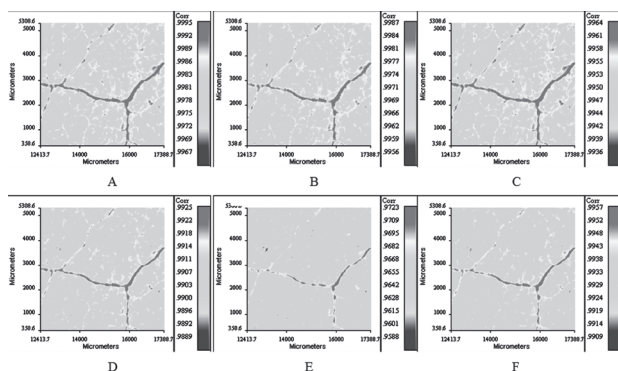


图7 干烟叶中不同化合物在7000~4000 cm^{-1} 波数范围内的相关光谱成像图

A. 淀粉; B. 烟碱; C. 葡萄糖; D. 纤维; E. 蛋白质; F. 果糖

数达到0.9779,表明第二主成分的信息主要源于淀粉、糖类及碳水化合物,第二主成分得分值图像主要代表干烟叶中的淀粉、糖类及碳水化合物的分布

趋势;将干烟叶样品的第二主成分得分值图像与干烟叶样品的淀粉相关光谱成像图进行对比,结果表明相关光谱成像图和相应的得分值图像的分布形状和趋势基本一致;对干烟叶中的淀粉、烟碱、葡萄糖、纤维、蛋白质和果糖做相关光谱成像图,确定干烟叶中的化学成分分布。

参考文献

- 1 J.R. Barkshire, P.G. Kenny, I.W. Fletcher, M. Prutton, Quantitative surface microanalysis of samples with extreme topography utilizing image interpretation by scatter diagrams and principal component analysis. *Ultramicroscopy*, 1996, 63: 193~203
- 2 Fiona Clarke, Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 2004, 34: 25~35

NIR micro-image analysis of tobacco dry leaf

Wang Dong¹ Min Shungeng¹ Ding Yunsheng² Ye Shengfeng¹ Duan Jia¹

(1. Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)

(2. Yunnan Tobacco Company Dali Branch, Dali 671000)

Abstract The near-infrared micro-image of tobacco dry leaf was collected. Principal component analysis and compared correlation imaging were used to process the NIR micro image. The result suggests that the PCA method was used to extract the eigen vectors from the NIR micro-image of the tobacco dry leaf, and the 2nd eigen vector was compared with the NIR spectrum of starch, whose correlation coefficient was high up to 0.9779, which suggested that the 2nd eigen vector was derived from starch mainly; the 2nd score image showed the distribution of starch in the tobacco dry leaf mainly; both the shape and trend of the 2nd score image and the compare correlation images were similar on the whole.

Key words Near-infrared microscope Near-infrared micro-image Chemical imaging

(上接第26页)

Determination of capsaicin in capsicum anuum by micellar electrokinetic chromatography

Liu Lihong Liu Juli

(School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

Abstract Objective: To develop a capillary electrophoresis (CE) method for the determination of capsaicin in *Capsicum anuum* and the separation of capsaicin and dihydrocapsaicin at the same time. Methods: Separation pattern is micellar electrokinetic chromatography (MEKC); the system of buffer contained 15mmol/L borax and 30mmol/L sodium dodecyl sulfate (SDS), the pH of buffer was 9.70, the running voltage was 20kV. RESULTS: The linear range of capsaicin was 1~400mg/L ($r=0.9996$), the average recovery rate was 97%~103% (RSD<5%). Conclusion: This method was simple, quick and accuracy. It was suitable to quantitative analysis of capsaicin in the extraction of *Capsaicin annuum* and separation of capsaicin and dihydrocapsaicin.

Key words Micellar electrokinetic chromatography Capsaicin Dihydrocapsaicin