

LAPPEENRANNAN-LAHDEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

School of Engineering Science

Laskennallisen tekniikan koulutusohjelma

Kandidaatintyö

Hanna Makkonen

Kvantitatiivinen koherentti Raman-mikroskopia: hyperspektrikuvan analysointi

Ohjaaja: Tutkijaopettaja Erik Vartiainen

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan-Lahden teknillinen yliopisto

School of Engineering Science

Laskennallisen tekniikan koulutusohjelma

Hanna Makkonen

Kvantitatiivinen koherentti Raman-mikroskopia: hyperspektrikuva-analysointi

Kandidaatintyö

2021

31 sivua, 12 kuvaa, 3 liitettä

Ohjaaja: Tutkijaopettaja Erik Vartiainen

Avainsanat: cars; raman-spektroskopia; raman-sironta; hyperspektrikuva; kvantitatiivinen; proteiinipisara;

Kandidaatintyön tavoitteena oli perehtyä koherenttiin anti-Stokes Raman-mikrospektroskopiaan (CARS) sekä sen hyödyntämiseen hyperspektrikuva-analyysissä. Kirjallisuuskatsauksessa esitellään Raman-sironnan sekä CARS-mikrospektroskopian teoriaa. Lisäksi tutustutaan maksimientropiamenetelmän (MEM) käyttöön vaihelaskennassa ja wavelet-prisma-hajotelman (WP) soveltamiseen CARS-spektrin taustakorjauksessa.

Hyperspektrikuva-analysointia demonstroitii MATLAB-ohjelmiston avulla. Aineistona käytettiin hyperspektrikuva-analyysissä, joka oli mitattu proteiinipisaroista CARS-menetelmällä. Datasta muodostettiin hiili-vetyä sisältävien konsentraatioita havainnollistava kuva. Lisäksi esiteltiin WP-hajotelman soveltamista taustakorjauksessa.

CARS-mikrospektroskopia on erittäin toimiva kuvantamismenetelmä esimerkiksi biologisten näytteiden kvantitatiivisissa analyysissä, etenkin menetelmän loistavan spatiaalisen resoluution ansiosta. CARS on nopea ja merkkiaineeton tapa selvittää kvantitatiivista tietoa molekyylien vibraatiotilojen perusteella mitatun spektrin perusteella. WP-hajotelma ja MEM ovat hyvin käyttökelpoisia CARS-spektrien matemaattisessa käsittelyssä.

Sisällys

Symboli- ja lyhenneluettelo	5
1 JOHDANTO	6
1.1 Tausta	6
1.2 Työn tavoitteet ja rajaus	6
1.3 Työn rakenne	7
2 RAMAN-SPEKTROSKOPIA	8
2.1 Raman-sironta	8
2.2 CARS	10
3 MATEMAATTISET MENETELMÄT	15
3.1 Taustakorjaus	15
3.2 Vaihelaskenta	18
4 AINEISTO JA OHJELMISTOT	21
5 ESIMERKKI HYPERSPEKTRIKUVAN ANALYSOINNISTA	22
5.1 CARS-spektrit	22
5.2 Raman-spektrit	25
5.3 WP-hajotelma	27
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	29
LÄHTEET	30

KUVAT	32
LIITTEET	33
Liite 1. CARS-spektrien käsittelyyn käytetty MATLAB-koodi	33
Liite 2. Raman-spektrien käsittelyyn käytetty MATLAB-koodi	33
Liite 3. WP-hajotelmaan käytetty MATLAB-koodi	33

Symboli- ja lyhenneluettelo

ω	Taajuus
$\chi^{(3)}$	Kolmannen kertaluvun sähköinen susceptibiliteetti
Γ	Viivanleveys
θ	Vaihekulma
λ	Aallonpituus
ε	Taustavirhe
ε_0	Tyhjiön permittiivisyys
$\psi_{j,k}$	Wavelet-funktio
ϕ	Taustatermin vaihe
ψ	ME-vaihe
β	ME-kerroin
A	Amplitudi
A_J	Approksimaatiokomponentti
a	Skaalauskerroin
b	Translaatiokerroin
$d(j,k)$	Yksityiskohtakomponentti
E	Sähkökentän voimakkuus
I	Intensiteetti
N	Siroajien lukumäärä tilavuusyksikköä kohti
P	Polarisoituma
$S(\omega)$	Normitettu CARS-spektri
t	aika
CARS	Koherentti anti-Stokes Raman-sironta
MEM	Maksimientropiamenetelmä
WP	Wavelet-prisma (hajotelma)

1 JOHDANTO

1.1 Tausta

Valtaosalla mikroskopian tutkimusmenetelmistä mitataan tutkittavan näytteen kvalitatiivisia ominaisuuksia. Useiden tutkimuskysymysten ratkaisemiseksi tarvitaan kuitenkin kvantitatiivista tietoa näytteen ainesosien konsentraatioista. Raman-spektroskopiolla on ollut hyvin merkittävä rooli kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien kehityksessä. Raman-spektroskopia perustuu molekyylien vibraatiotiloihin, joita virittämällä voidaan mitata molekyylille ominainen Raman-spektri. Spektristä voidaan tunnistaa näytteeseen komponentit sekä niiden konsentraatiot. [13]

Koherentti anti-Stokes Raman-mikrospektroskopia (CARS) on yksi useista Raman-spektroskopian varianteista. CARS-mikrospektroskopiassa hyödynnetään useamman laserpulssin tuottamaa merkittävästi voimakkaampaa koherenttia CARS-signaalia. CARS on perinteistä Raman-mikroskopiaa monimutkaisempi ja kalliimpi menetelmä. Sen edut ovat kuitenkin monissa tilanteissa niin merkittäviä, että CARS-mikrospektroskopian suosio kasvaa kiihtyvään tahtiin. Eräs CARS-mikrospektroskopian eduista kvantitatiivisena kuvantamismenetelmänä on sen merkkiaineettomuus. Näytteeseen ei tarvitse lisätä merkkiainetta, joka voisi muuttaa näytteen rakennetta, joten CARS on erittäin käyttökelpoinen menetelmä esimerkiksi biolääketieteellisessä tutkimuksessa. [4]

CARS ei kuitenkaan ole yhtä suoraviivaisesti kvantitatiivinen ja kemiallisesti spesifi menetelmä kuin perinteinen Raman-spektroskopia, sillä CARS-spektristä ei yleensä voida suoraan nähdä kvantitatiivista tietoa. Tämän takia on kehitetty erilaisia matemaattisia ja kokeellisia menetelmiä, joilla CARS-spektristä voidaan laskea Raman-spektri ja siten selvittää ainesosien konsentraatiot. Eräs vaihtoehto Raman-spektrin laskemiseen on suorittaa CARS-spektrille taustakorjaus ja vaiheenpalautus. Molempiin vaiheisiin on kehitetty lukuisia eri menetelmiä. Taustakorjauksessa voidaan hyödyntää esimerkiksi wavelet-muunnokseen perustuvaa wavelet-prisma-hajotelmaa ja vaihelaskennassa niin kutsuttua maksimientropiamenetelmää, joka on lähtöisin informaatioteoriasta. [4] [1]

1.2 Työn tavoitteet ja rajaus

Työn tavoitteena on tutustua CARS-mikrospektroskopiaan kvantitatiivisena kuvantamismenetelmänä sekä hyperspektrikuvan analysointiin. Lisäksi työssä tarkastellaan CARS-spektrin

vaiheenpalautukseen ja taustakorjaukseen tarvittavia matemaattisia menetelmiä. Tarkoituksena on demonstroida CARS-menetelmällä mitatun hyperspektrikuvan analysointia muodostamalla näytteen komponenttien konsentraatioita havainnollistava kuva.

Työ on rajattu siten, että aineistona käytetään proteiinipisaroista CARS-mikrospektroskopiolla mitattua hyperspektrikuva. Jokaisen kuvapikselin sisältämästä spektristä lasketaan konsentraation keskiarvo. Tämän perusteella piirretään kuva, josta nähdään proteiinien CH-sidosten konsentraatio jokaisessa pikselissä. Spektridatan käsittely sekä kuvien piirtäminen suoritetaan MATLAB-ohjelmistolla. Taustakorjauksen osalta tutustutaan wavelet-prismahajotelman (WP) soveltamiseen ja vaihelaskennassa maksimientropiamenetelmän (MEM) hyödyntämiseen.

1.3 Työn rakenne

Työn ensimmäisessä teoriaosiossa käydään läpi Raman-sironnan ja Raman-spektroskopian teoriaa klassisen fysiikan näkökulmasta. Tämän jälkeen perehdytään tarkemmin CARS-mikrospektroskopian teoriaan sekä sen etuihin ja ongelmakohtiin. Matemaattiset menetelmät -luku keskittyy CARS-spektrin taustakorjaukseen ja wavelet-muunnoksen sekä WP-hajotelman teoriaan. Lisäksi luvussa käsitellään vaihelaskentaa ja maksimientropiamenetelmää.

Käytännön osuudessa esitellään esimerkki hyperspektrikuvan analysoinnista. Ensin tutustutaan proteiinipisaroista mitattuun aineistoon sekä spektrien käsittelyssä hyödynnettyihin MATLAB-ohjelmiin. Viimeisenä esitetään aineistosta laskettuja kuvia ja kuvaajia. Lopuksi pohditaan johtopäätöksiä.

2 RAMAN-SPEKTROSKOPIA

Raman-spektroskopiaa on hyödynnetty hyvin laajasti tieteellisessä tutkimuksessa, sillä se on suhteellisen halpa, nopea ja merkkiaineeton metodi, jolla voidaan tunnistaa tutkittava aine Raman-spektrissä näkyvien piikkien perusteella. Menetelmän käyttökelpoisuutta lisää se, että koejärjestelyissä voidaan yleensä käyttää valonlähdettä näkyvän tai lähi-infrapunavalon alueelta, jolta löytyvät myös parhaat detektorit [4]. Eri Raman-tekniikoita on sovellettu monipuolisesti etenkin materiaalitekniikassa, biologiassa sekä lääketieteessä, sillä molekyylien vibraatiotilojen perusteella voidaan helposti muun muassa määrittää tutkittavan näytteen rakenne tai konsentraatio. Raman-spektroskopiaa on sovellettu jopa rikostutkimuksessa ja nanoteknologiassa. Lasereiden ja muiden tutkimuslaitteiden sekä datan analysointimetodien kehittyessä, Raman-sirontaan perustuvat tutkimusmenetelmät kehittyvät kiihtyvään tahtiin. [3]

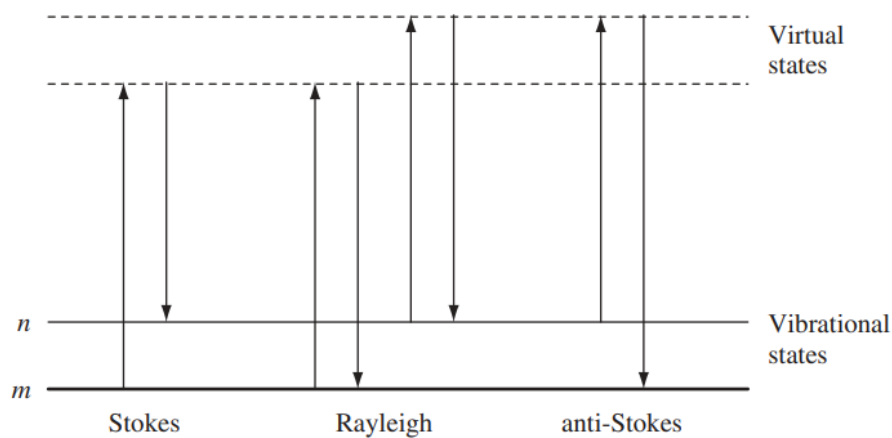
2.1 Raman-sironta

Perinteinen spontaani Raman-spektroskopia sekä kaikki sen variantit perustuvat Raman-sirontaan. Sähkömagneettinen säteily voi sirotta molekyylistä elastisesti tai epäelastisesti, jos absorptiota ei tapahdu. Raman-sironta on lineaarinen optinen ilmiö, jossa materiaaliin osuva monokromaattinen valo siroaa epäelastisesti, jolloin valon taajuus muuttuu. Siroavien fotonien taajuuden (ja samalla energian) muutokset riippuvat molekyylin vibraatiotiloista. Vibraatiotilat ovat molekyylin elektronisten energiatilojen alitiloja. Ilmiön havaitsi ensimmäistä kertaa C. V. Raman vuonna 1928. [10]

Raman-sironta perustuu elektronipilven polaroitumiseen. Näytteeseen tuleva valo polarisoi molekyylin elektronipilveä ja virittää molekyylin virtuaaliselle vibraatiotilalle. Virtuaalitatilat ovat vibraatiotiloja, jotka ovat ylempien vibraatiotilojen välissä, eivätkä ne ole pysyviä tiloja. Raman-sironta on epäelastista, sillä sirontaan liittyy elektronipilven lisäksi molekyylin liikettä. Energiaa siirtyy joko molekyylistä foniin tai fotonista molekyyliin, mikä nähdään sironneen säteilyn taajuuden muutoksena eli Raman-spektrissä. [13]

Kuvassa 1 havainnollistetaan Raman-sirontan eri muotoja sekä Rayleigh'n sirontaa. Molekyyliin osuva foton virittää molekyylin hetkeksi virtuaaliselle vibraatiotilalle. Elastista sirontaa, jossa fotonin taajuus pysyy samana, kutsutaan Rayleigh'n sironnaksi. Rayleigh'n sironta näkyy kuvassa 1 tilanteena, jossa molekyyli virittyy perustilalta virtuaaliselle vibraatiotilalle ja takaisin perustilaan. Raman-sironta jaetaan kahteen eri luokkaan molekyylin vi-

ritystilojen ja törmäävän fotonin energian muutosten perusteella. Stokes-sironnaksi kutsutaan sellaista sirontaa, jossa siroavan fotonin taajuus on pienempi kuin molekyyliin osuneen fotonin taajuus, eli fotoni luovuttaa energiaa. Tällöin molekyyli on aluksi perustilassa ja purkautuu virtuaalitalasta ensimmäiseen viritystilaan. Stokes-sironnan vastakohta on niin kutsuttu anti-Stokes-sironta, jossa sironneen fotonin taajuus on suurempi kuin molekyyliin törmänneen fotonin taajuus, eli fotoni on saanut lisää energiaa. Tässä tapauksessa molekyyli on jo aluksi jollakin viritystilalla, kuten kuvassa 1 ensimmäisellä viritystilalla, ja siirtyy sitten virtuaalitalan kautta perustilalle. [10]



Kuva 1. Molekyylin vibraatiotilat ja sironta. [13]

Raman-sironnassa tapahtuva taajuuden muutos voidaan kirjoittaa

$$\omega_S = \omega_1 \pm \omega_M, \quad (1)$$

missä ω_S kuvaa sironneen fotonin kulmataajuutta, ω_1 molekyyliin osuneen fotonin kulmataajuutta ja ω_M viritystilojen välistä kulmataajuutta. Kuvan 1 tilanteessa taajuus ω_M olisi tilojen m ja n välinen energia. Taajuus ω_1 ei saa vastata viritystilojen tajuuksien erotusta, jotta molekyyli virittyy vain tilapäiselle virtuaalitalalle eikä absorptiota tapahdu. [10]

Spontaani Raman-sironta on erittäin heikkoa, sillä vain osa näytteeseen osuvasta valosta siroaa, ja valtaosa sironnasta on Rayleigh'n sirontaa. Vain yhdelle $10^6 - 10^8$ siroavasta fotonista tapahtuu Raman-sironta. Lisäksi anti-Stokes-sironta on huoneenlämmössä selvästi Stokes-sirontaa heikompaa. Tämä johtuu siitä, että huoneenlämmössä suurin osa molekyyleistä on yleensä perusvibraatiotilassa, mutta anti-Stokes-sirontaa varten vaaditaan ylemmälle vibraatiotilalle virittynyt molekyyli. Raman-sironta on lisäksi luonnostaan epäkoherenttia, jolloin

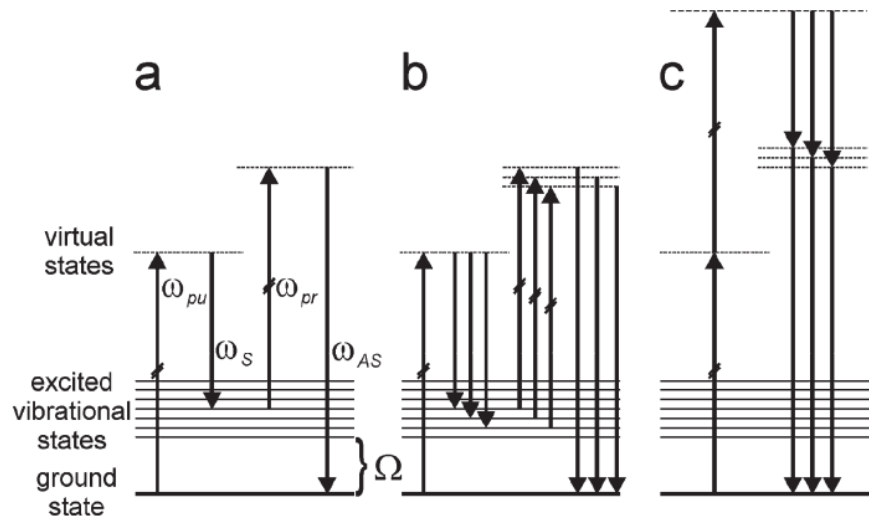
säteily siroaa satunnaisesti eri suuntiin. Epäkoherentti sironta saattaa tehdä signaalin havaitsemisesta työläämpää. [13]

Heikon Raman-signaalin lisäksi yksi spontaanin Raman-spektroskopian suurimmista ongelmista on fluoresenssi. Fluoresenssi on usein Raman-sirontaa merkittävästi voimakkaampi, sillä se on paljon todennäköisempi ilmiö kuin Raman-sironta. Fluoresenssi voi peittää alleen Raman-signaalin ja häiritä signaali-kohinasuhdetta. Lisäksi fluoresenssi voi vaikeuttaa Raman-pektrin taustakorjausta. [9] Spontaanin Raman-spektroskopiaan perustuvia menetelmiä on kehitetty jo ainakin 25 muun muassa edellä mainittujen ongelmien välttämiseksi. [10]. Eri varianttien tarkoituksena on esimerkiksi vahvistaa Raman-signaalia, kiertää fluoresenssin aiheuttamat häiriöt, nopeuttaa spektrin hankintaa tai parantaa menetelmän herkkyyttä. Usein jokin tietty Raman-menetelmä on kehitetty esimerkiksi tietynlaisen materiaalin tutkimista varten tai jonkin spesifin ominaisuuden mittausta varten. [6]

2.2 CARS

Koherentti anti-Stokes Raman-sironta (CARS) mikrospektroskopia on Raman-spektroskopian variantti. Muita koherentteja Raman-spektroskopian variantteja ovat esimerkiksi koherentti Stokes Raman-sironta sekä stimuloitu Raman-sironta. CARS-mikrospektroskopia on kolmannen kertaluvun epälineaarinen neliaaltosekoitus-prosessi, jossa näytteeseen kohdistetaan kolme eri laserpulssia molekyylien vibraatiotilojen virittämiseksi. Suurin ero spontaanin Raman-spektroskopian kanssa on se, että CARS-menetelmässä hyödynnetään anti-Stokes Raman-sirontaa eikä Stokes-sirontaa. [1]

Kuvassa 2 havainnollistetaan molekyylin vibraatiotilojen muutoksia CARS-prosessin aikana. Tutkittavan molekyylin oletetaan olevan perustilassa ja näytteeseen kohdistetaan samanaikaisesti pumppu-pulssilaser taajuudella ω_{pu} sekä Stokes-laser taajuudella ω_S , kuten kuvan 2 a-kohdassa [4]. Näiden herätelasereiden lineaarikombinaatio virittää molekyylin virtuaalitalalle. Näytteeseen kohdistetaan myös toinen probe-pulssilaser taajuudella ω_{pr} . Mittausjärjestelyissä käytetään yleensä samaa pulssilaseria pump- ja probe-laserina. Siten tarvitaan vain Stokes-laser ja yksi pulssilaser ja $\omega_{pu} = \omega_{pr}$. Probe-pulssi virittää molekyylin vielä ylemmälle virtuaaliselle vibraatiotilalle. Virtuaalitalat eivät ole pysyviä tiloja, joten molekyylin tila purkautuu takaisin perustilalle ja emittoi koherenttia anti-Stokes-säteilyä eli CARS-signaalia taajuudella $\omega_{AS} = 2\omega_{pu} - \omega_S$. [1]



Kuva 2. Molekyylin vibraatiotilat. a) resonanssi CARS b) laajakaistainen CARS c) resonoimaton CARS. [4]

Hyperspektraalisessa kuvantamisessa käytetään niin kutsuttua laajakaistaista CARS-mikrospektroskopiaa. Tekniikka vastaa muuten yllä kuvattua monokromaattista CARS-menetelmää, mutta yksitaajuuksisen Stokes-laserin sijasta käytetään useita taajuuksia sisältävää laajakaistaista Stokes-laseria. Kuvan 2 b-kohdassa havainnollistetaan molekyylin vibraatiotiloja sekä useita herätesignaaleja laajakaistaisessa CARS-mikrospektroskopiassa. Laajakaistaisessa CARS-mikrospektroskopiassa voidaan siis samanaikaisesti käsitellä suuren taajuusalueen vibraatiotiloja. Menetelmällä saavutetaan parempi spatiaalinen resoluutio sekä korkeampi signaali-kohinasuhde lyhyemmässä ajassa kuin esimerkiksi spontaanilla Raman-spektroskopiolla. Lisäksi laajakaistaisella CARS-menetelmällä saadaan näyteaineesta merkittävästi enemmän tietoa sekä tarkempaa kvantitatiivista informaatiota kuin yhden taajuuden menetelmällä. [1] Monokromaattinen ja laajakaistainen CARS-mikrospektroskopia kuitenkin täydentävät toisiaan, sillä monokromaattinen CARS voi olla laajakaistaista hyödyllisempi esimerkiksi silloin, kun tavoitena on kuva, josta voidaan havaita näytteen vibraatiotilojen keskinäisiä eroja. Laajakaistaisessa CARS-mikrospektroskopiassa käytetyt tehokkaat laserit saattavat myös vahingoittaa tietynlaisia näytteitä. Yleensä laajakaistainen CARS-mikrospektroskopia on kuitenkin selkeästi tehokkaampi menetelmä, vaikka se onkin hieman monokromaattista metodia hitaampi. [4]

Raman-ilmiön aiheuttaa tulevan sähkökentän indusoima lineaarinen polarisoituma

$P(t) = \varepsilon_0 \chi E(t)$, missä ε_0 on tyhjiön permittiivisyys, χ materiaalin sähköinen susceptibiliteetti ja $E(t)$ on sähkökentän voimakkuus. CARS on epälineaarinen prosessi, jossa käytetään voimakkaampia valonlähteitä. Tarpeeksi voimakkaat sähkökentät indusoivat materiaaliin epälineaarisia polarisoitumia, jotka eivät enää riipu lineaarisesti sähkökentästä $E(t)$.

CARS-ilmiön voidaan ajatella johtuvat kolmannen kertaluvun epälinearisesta polarisoitumasta $P^{(3)}$. Tämän polarisoituman suuruuden määrää tulevan sähkökentän E voimakkuus sekä kolmannen kertaluvun sähköisen susceptibiliteetin $\chi^{(3)}$ amplitudi. Sähkökentän E aiheuttavat Stokes-laser ja pulssilaserit, joiden ominaisuudet määrätään koejärjestelyissä. CARS-mikrospektroskopiassa on siis hyödyllistä tarkastella susceptibileettia $\chi^{(3)}$, sillä se kuvaa näyteaineen ominaisuuksia. [1] Laajakaistaisen mittauksen CARS-intensiteettiä kuvaa yhtälö

$$I_{CARS}(\omega_{AS}) \propto |P^{(3)}(\omega_{AS})|^2 = \varepsilon_0 |E_{pu}|^2 |E_{pr}|^2 |E_S(\omega_{AS})|^2 |\chi^{(3)}(-\omega_{AS}; \omega_{pu}, -\omega_S, \omega_{pr})|^2, \quad (2)$$

missä E_{pu} , E_{pr} ja E_S ovat pulssilasereiden ja Stokes-laserin sähkökentät [17].

Susceptibiliteetti koostuu resonanssitermistä $\chi_R^{(3)}$ sekä taustatermistä $\chi_{NR}^{(3)}$. Termi $\chi_R^{(3)}$ kuvaa vibraatioresonansseja. Resonanssi saadaan aikaan, kun pump- ja Stokes-laserin taajuuksien erotus vastaa molekyylin vibraatiotilan taajuutta Ω eli $\omega_{pump} - \omega_{Stokes} = \Omega$, kuten kuvassa 2 a ja b. Resonanssitermi sisältää kvantitatiivisen ja kemiallisesti spesifin tiedon näytteen molekyyleistä. Taustatermi $\chi_{NR}^{(3)}$ riippuu vain näytteen sähköisistä ominaisuuksista eikä vibraatiotiloista. $\chi_{NR}^{(3)}$ on reaali ja taajuudesta riippumaton. Kuvan 2 c-kohdassa havainnollistetaan resonanssitermin siirtymää, joka ei tuota anti-Stokes-sirontaa vaan aiheuttaa taustasignaalia. $\chi_{NR}^{(3)}$ kuitenkin vaikuttaa CARS-signaaliin, sillä heterogeenisen näytteen eri komponenteilla on erilaiset polaroituvuudet ja siten taustatermin suuruus vaihtelee. CARS-signaali I_{CARS} riippuu susceptibiliteetin resonanssitermistä sekä taustatermistä [4]:

$$I_{CARS} \propto |\chi^{(3)}(\omega)|^2 = |\chi_{NR}^{(3)}|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re}[\chi_R^{(3)}] + |\chi_R^{(3)}|^2. \quad (3)$$

Yhtälöstä 3 nähdään, että kvantitatiivisen tiedon sisältävää termiä $\chi_R^{(3)}$ ei voida erottaa taustasta $\chi_{NR}^{(3)}$ pelkällä taustakorjauksella, sillä taustatermi vaikuttaa CARS-intensiteettiin, eikä I_{CARS} korreloi lineaarisesti konsentraation kanssa. [1]

Yksittäistä molekyyllissä tapahtuva värähtelyresonanssi $\chi_R^{(3)}$ voidaan kirjoittaa

$$\chi_R^{(3)} = \frac{NA}{\Omega - (\omega_{pu} - \omega_S) - i\Gamma}, \quad (4)$$

missä A on vibraatiomoodin amplitudi, Ω taajuus, Γ viivanleveys ja N siroajien määrä tilavuusyksikköä kohti [12].

Lisäksi spontaanin Raman-sironnan intensiteetti riippuu samoista muuttujista seuraavasti

$$I_{Raman} \propto \frac{NA\Gamma}{(\Omega - \omega_0)^2 + \Gamma^2}, \quad (5)$$

missä ω_0 on valonlähteen taajuus [1].

Yhtälöiden 4 ja 5 avulla voidaan siten osoittaa, että CARS-signaalin $\chi_R^{(3)}$ on verrannollinen saman näytteen Raman-intensiteetin kanssa [1]:

$$\text{Im}[\chi_R^{(3)}] = \frac{NA\Gamma}{(\Omega - (\omega_{pu} - \omega_S))^2 - \Gamma^2}. \quad (6)$$

Voidaan siis osoittaa, että $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ sisältää kvantitatiivisen ja kemiallisesti spesifin informaation. Siten erottamalla $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ CARS-spektristä ja rekonstruoimalla Raman-spektri, saadaan näytteestä kvantitatiivista tietoa ilman taustatermin häiriötä. $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ termin avulla CARS-mikrospektroskopian tuloksia voidaan myös helposti verrata näytteestä mitattuihin Raman-spektreihin. Lisäksi $\chi_{NR}^{(3)}$ termin reaalin luonteen ansiosta, $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ voidaan hankkia pelkän CARS-signaalin vaiheen avulla. Suskeptibiliteetin resonanssitermin imaginääriosan suhdetta CARS-spektrin vaiheeseen θ voidaan kuvata yhtälöllä

$$\text{Im}[\chi_R^{(3)}] = |\chi^{(3)}| \sin \theta \propto \sqrt{I_{CARS}} \sin \theta, \quad (7)$$

missä I_{CARS} CARS-intensiteetti. [4]

CARS-spektrin kvantitatiivisen tiedon erottamista varten on kehitetty useita matemaattisia ja kokeellisia menetelmiä. Taustaa $\chi_{NR}^{(3)}$ on yritetty esimerkiksi vaimentaa erilaisilla mittausmenetelmillä, mutta yleensä se johtaa myös CARS-signaalin vaimenemiseen [8]. Käytännössä menetelmät perustuvat joko CARS-signaalin resonanssitermin ja taustatermin erotteluun tai vaiheen θ määrittämiseen. Resonanssitermi ja taustatermi voidaan erottaa esimerkiksi intensiteetin kalibroinnilla tai spektrin huippujen sovituksella. Vaiheen mittauksessa voidaan hyödyntää esimerkiksi interferometri CARS-menetelmää. On mahdollista selvittää vaihe myös matemaattisesti jollakin vaihelasketamenetelmällä, kuten aikatazon Kramers-Kronig metodia tai maksimientropiamenetelmää soveltaen. Jokaisella lähestymistavalla on omat etunsa ja hahtansa. [4]

CARS-mikrospektroskopia täyttää molemmat hyvän kvantitatiivisen kuvantamismenetelmän kriteereistä: CARS on kemiallisesti spesifi ja sen signaali riippuu näytteen konsentraatiosta. Lisäksi menetelmä on merkkiaineeton. [4] CARS on monissa tapauksissa

merkittävästi parempi kuvantamismenetelmä kuin spontaani Raman-sironta, vaikka CARS-laitteistot ovat monimutkaisempia ja kalliimpia. CARS on nopeampi ja herkempi menetelmä, mutta yksi tärkeimmistä CARS-mikrospektroskopian eduista on merkittävästi parempi spatiaalinen resoluutio. CARS-signaalin resoluutio on diffraktiorajoitteinen, joten erotuskyky riippuu lähes kokonaan herätesignaalin aallonpituudesta, eli resoluutio on $\frac{\lambda}{2}$. Spontaani Raman-sironta on lineaarinen menetelmä eikä riipu herätesignaalin intensiteetistä yhtä voimakkaasti kuin CARS, joten sen spatiaalinen resoluutio on huomattavasti alhaisempi. Lisäksi CARS-mikrospektroskopian avulla saadaan tuotettua huomattavasti vahvempaa signaalia, ja anti-Stokes-sironnalla vältetään fluoresenssin haitat. CARS-mittausten avulla voidaan tutkia mokekyilien ominaisuuksia monipuolisemmin sekä yksityiskohtaisemmin kuin perinteisen Raman-spektroskopian avulla. [1]

3 MATEMAATTISET MENETELMÄT

3.1 Taustakorjaus

CARS-mikrospektroskopian hyödyntämistä kvantitatiivisena kuvantamismenetelmänä vaikeuttavat mittausolosuhteista aiheutuvat virheet CARS-spektrissä. Nämä virheet vääristävät CARS-spektrin sekä CARS-spektristä lasketun Raman-spektrin viivamuotoja, jolloin ei välttämättä saada luotettavia kvantitatiivisia tuloksia. [7]

Ideaalitapauksessa kokeellisista olosuhteista riippumaton CARS-spektri saadaan yksinkertaisesti normittamalla mitattu CARS-intensiteetti. Normitus tapahtuu jakamalla CARS-spektri $I_{CARS}^{sample}(\omega)$ identtisissä olosuhteissa mitatulla referenssispektrillä $I_{CARS}^{ref}(\omega)$. Tällöin oletetaan, että referenssispektri riippuu vain susceptibiliteetin taustatermistä, jolloin $\chi_{ref}^{(3)} = \chi_{ref,NR}^{(3)}$. Lopputuloksena on yhtälön

$$S(\omega) = \frac{I_{CARS}^{sample}}{I_{CARS}^{ref}} = \frac{|\chi^{(3)}(\omega)|^2}{|\chi_{NR,ref}^{(3)}(\omega)|^2} = |\chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)}(\omega)|^2 \quad (8)$$

mukainen normitettu CARS-spektri $S(\omega)$, missä $\chi_{NR}^{(3)}$ ja $\chi_R^{(3)}$ ovat mitatun CARS-spektrin susceptibiliteetit jaettuna referenssispektrin susceptibiliteetilla $\chi_{ref,NR}^{(3)}$. Termi $\chi_{ref,NR}^{(3)}$ on vakio. Näin normitetusta CARS-spektristä $S(\omega)$ on eliminoitu mittauksista aiheutuvat tekijät, ja $S(\omega)$ riippuu vain näytteen värähtelyominaisuuksista. Raman-spektri saadaan nyt helposti muodostettua erottamalla spektristä $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ vaihelaskennan avulla. [7]

Todellisuudessa kokeellisia artefakteja ei saada eliminoitua pelkästään normittamalla mitattu spektri. Koeolosuhteet eivät koskaan ole täydelliset, joten referenssispektriä ei voida mitata täysin identtisissä olosuhteissa I_{CARS}^{sample} -spektrin kanssa. I_{CARS}^{ref} ei siten riipu ainoastaan resonoimattomasta kolmannen kertaluvun susceptibiliteetistä $\chi_{ref}^{(3)}$. [7] Lisäksi laajakaistaisen Stokes-laserin pulsseissa saattaa esiintyä taajuuden muutoksia, jotka aiheuttavat CARS-spektriin hitaasti vaihtelevia modulaatiovirheitä. [2] Edellä mainitut virhelähteet on hyvä yhdistää yhdeksi kokonaisvirheeksi $\varepsilon(\omega)$. Normitettu CARS-spektri $S_{exp}(\omega)$ voidaan kirjoittaa

$$S_{exp}(\omega) = \varepsilon(\omega)S(\omega), \quad (9)$$

missä $S(\omega)$ on taustakorjattu CARS-spektri.

Virhetermin poistamista varten, on hyödyllistä ottaa yhtälöstä 9 logaritmi

$$\ln S_{exp}(\omega) = \ln \varepsilon(\omega) + \ln S(\omega), \quad (10)$$

jolloin virheestä ε tulee summautuva ja helpommin eroteltava. [7]

Wavelet-prisma-hajotelma (WP-hajotelma) on todettu erittäin hyödylliseksi menetelmäksi, jonka avulla on mahdollista määrittää ja poistaa virhetermi $\varepsilon(\omega)$ [7]. WP-hajotelma perustuu niin kutsuttuun wavelet-muunnokseen. Wavelet-muunnos on hyvin samanlainen kuin signaalinkäsittelyssä paljon käytetty Fourier-muunnos, jossa alkuperäinen signaali voidaan esittää siniaaltojen summana. Wavelet-muunnoksessa taas kantafunktiot ovat siniaaltojen sijasta wavelet-funktioita. Waveletit muodostetaan niin kutsutun emo-waveletin

$$\psi_{a,b}(\omega) = \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{\omega - b}{a}\right) \quad (11)$$

avulla sekä määrittämällä skaalaus- ja translaatiokerroimet a ja b . Skaalauskerroin määrää aallon ”puristuman” ja translaatiokerroin kuvaa aallon ajallista sijainta. [5]

Waveletit mahdollistavat sekä nopeasti että hitaasti vaihtelevien ominaisuuksien kuvaamisen [7]. Waveletit eroavat siniaalloista myös siten, että ne ovat lokalisoituneita eivätkä jatkuvia. Ne ovat käytännössä lyhyitä oskillaatioita, joiden amplitudi on muualla nol-la. Wavelet-muunnos mahdollistaa signaalin analysoinnin sekä taajuus- että aikatasossa. Wavelet-muunnoksen resoluutiota kuitenkin rajoittaa Heisenbergin epätarkkuusperiaate; samalla taajuusalueella ei saada samanaikaisesti hyvää aika- ja taajuusresoluutiota. Korkeilla taajuuksilla aikaresoluutio on hyvä, sillä mittauspisteitä on enemmän samalla aikavälillä verrattuna matalampiin taajuuksiin. Matalilla taajuuksilla taas taajuusresoluutio on parempi, mutta aikaresoluutio heikkenee. [5]

Taustakorjauksessa ja monissa muissa wavelet-muunnoksen käytännön sovelluksissa käytetään diskreettiä wavelet-muunnosta. Diskreetissä muunnoksessa käytetään näytteistettyjä skaalaus- ja translaatioparametrejä, jotka ovat muotoa $a = 2^j$ ja $b = 2^j k$. Siten yhtälö 11 voidaan kirjoittaa

$$\psi_{j,k}(\omega) = 2^{-j/2} \psi(2^{-j} \omega - k), \quad (12)$$

missä parametri j kuvaa skaalaa ja k siirtymää ($j, k \in \mathbb{Z}$). [7]

Diskreetin wavelet-muunnoksen avulla logaritmisesta spektristä $\ln S_{exp}(\omega)$ voidaan muodostaa ortogonaalinen wavelet-hajotelma [7]:

$$\ln[S_{exp}(\omega)] = \sum_{j=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} d(j,k)\psi_{j,k}(\omega). \quad (13)$$

Niin kutstutut yksityiskohtakomponentit

$$d(j,k) = \int_{2^j k}^{2^j(k+1)} \ln[S_{exp}(\omega)]\psi_{j,k}(\omega) \quad (14)$$

ovat spektrin $\ln S_{exp}(\omega)$ diskreettejä wavelet-muunnoksia, joilla on määrätty taajuuskaistan leveys ja siirtymä. [7]

Tavallinen diskreetti wavelet-muunnos ei kuitenkaan ole aikainvariantti, mikä voi hankaloittaa taustakorjausta. Muunnetun signaalin wavelet-kerrointen resoluutio heikkenee, eikä välttämättä voida tarkasti määrittää, mitkä taajuuskomponentit kuuluvat poistettavaan taustasignaaliin. Tämän ongelman korjaamista varten on kehitetty aiemmin mainittu WP-hajotelma. WP-hajotelma hyödyntää Mallat-algoritmia [11] sekä tietynlaista wavelet-menettelmää signaalin uudelleen rakentamiseksi. [7]

Kohinan poiston jälkeen halutaan rekonstruoida alkuperäinen signaali kohinattomasta spektristä. WP-hajotelmalla tämä rekonstruointi suoritetaan erikseen jokaisella skaalalla j . WP-hajotelma jakaa alkuperäisen signaalin prismamaisesti taajuuden perusteella. Hajotelman avulla on mahdollista jakaa signaali taajuuskomponentteihin siten, että resoluutio pysyy samana kuin alkuperäisessä signaalissa, toisin kuin wavelet-muunnoksella. Taustakorjauksessa ehtona on, että virheelliset taajuudet löytyvät enimmäkseen matalalta taajuusalueelta, informatiivinen signaali keskialueelta ja kohina korkeilta taajuuksilta. Lisäksi näiden eri komponenttien ei tulisi vaikuttaa toisiinsa, jotta ne olisivat lineaarisesti summautuvia. [14]

WP-hajotelman avulla logaritminen spektri $\ln S_{exp}(\omega)$ voidaan kirjoittaa keskenään ortogonaalisten komponenttien summana eli wavelet-prisma-spektreinä [7]:

$$\ln[S_{exp}(\omega)] = \sum_{j \leq J} D_j(\omega) + A_J(\omega). \quad (15)$$

$D_j(\omega)$ termi sisältää yksityiskohtakomponentit (DC) ja $A_J(\omega)$ approksimaatiokomponentin, joka kuvaa yksityiskohtakomponenttien siirtymää. WP-spektri on järjestetty hierarkisesti siten, että $D_1(\omega)$ vastaa korkeinta taajuusaluetta ja $A_J(\omega)$ vastaa matalinta taajuusaluetta. Ta-

voitteena on valita skaalojen kokonaismäärää kuvaava parametri J tarpeeksi korkeaksi siten, että approksimaatiokomponentti on lähes vakio. [7]

Kohinaa on yleensä korkeimmilla taajuuksilla, joten kaikista alimmat yksityiskohtakomponentit koostuvat kohinasta $[\ln S_{exp}(\omega)]_{noise}$. Informaation sisältävää signaalia $[\ln S_{exp}(\omega)]_{signal}$ taas kuvaavat seuraavaksi alimmat komponentit. Ylimmän asteen yksityiskohtakomponentit koostuvat yleensä modulaatiovirheestä $\ln \varepsilon(\omega)$. Viimeisenä, matalimmalla taajuusalueella, on approksimaatiokomponentti A_J eli DC-siirtymä $[\ln S_{exp}(\omega)]_{DC}$. Tämän perusteella spektrin komponentit voidaan kirjoittaa summaksi [7]:

$$S_{exp}(\omega) = [\ln S_{exp}(\omega)]_{noise} + [\ln S_{exp}(\omega)]_{signal} + \ln \varepsilon(\omega) + [\ln S_{exp}(\omega)]_{DC}. \quad (16)$$

Virhetermi $\varepsilon(\omega)$ voidaan siis ilmaista wavelet-prisma-hajotelman avulla muodossa

$$\varepsilon(\omega) = \exp \{ \sum_{j=n}^J D_j(\omega) \}, \quad (17)$$

missä n on ylimmän taajuuden virhetermiin kuuluva yksityiskohtakomponentti. Nyt hitaasti muuttuva modulaatiovirhe on helppo poistaa spektristä ja korjattu CARS-spektri saadaan yhtälön 9 ja 10 avulla. Haluttaessa voidaan myös poistaa kohina samalla tavalla [7].

WP-hajotelma on siis todettu erittäin hyödylliseksi menetelmäksi kokeellisten modulaatiovirheiden poistamisessa esimerkiksi eri sokeriliuosten CARS-spektrien taustakorjauksessa. Menetelmän etuna on myös sen soveltuvuus kaikenmuotoisten hitaasti muuttuvien virhetermien eliminoimisessa sekä sen tarkkuus myös pienillä signaali-kohinasuhteilla. Lisäksi menetelmä ei vaadi ennakkotietoa tai oletuksia näytteestä tai virhetermistä. [7]

3.2 Vaihelaskenta

Yleensä CARS-spektristä on tavoitteena selvittää Raman-spektrin kanssa verrannollinen $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ -spektri, jos halutaan kvantitatiivista tietoa näytteestä. $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ on mahdollista selvittää, jos värähtelyspektrin vaihe tunnetaan. Usein optiikassa kuitenkin törmätään niin kutsuttuun vaiheongelmaan, joka johtuu siitä että mittauslaitteilla voidaan mitata vain säteilyn intensiteettiä, jolloin vaiheinformaatio jää havaitsematta. [1]

Vaihespektri on kuitenkin mahdollista laskea intensiteettispektristä tai mitata kokeellisesti. Kaksi yleisintä matemaattista menetelmää ovat aikatazon Kramers-Kronig-muunnos (TD-

KK) sekä maksimientropiamenetelmä (MEM). MEM on yleensä TD-KK-menetelmää parempi ratkaisu, sillä se ei vaadi ennakkotietoa tai oletuksia näytteestä taustatermistä. Lisäksi menetelmän avulla voidaan samalla poistaa korkeataajuuksista kohinaa. [4]

MEM perustuu maksimientropiaperiaatteeseen, jonka mukaan epätäydellisestä infomaatiosta tehtyjen johtopäätösten tulisi perustua todennäköisyysjakaumaan, jolla on suurin mahdollinen entropia. [15] ME-menetelmän avulla voidaan approksimoida CARS-spektrin vaihefunktio $\theta = \arg\{\chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)}\}$. CARS-viivamuotoon sovitetaan ME-malli

$$S(\omega) = \left| \frac{\beta}{1 + \sum_{k=1}^M a_k e^{-2\pi i k \omega}} \right|^2 = \left| \frac{\beta}{A_M(\omega)} \right|^2, \quad (18)$$

missä kertoimet a_k ja $|\beta|$ ovat ME-kertoimia [16] ω on normitettu taajuus

$$\omega = \frac{\omega_{CARS} - \omega_{min}}{\omega_{max} - \omega_{min}}, \quad (19)$$

missä $\omega_{min} = \min\{\omega_{CARS}\}$ ja $\omega_{max} = \max\{\omega_{CARS}\}$. [17]

ME-kertoimet ratkaistaan Toeplitz-matriisista

$$\begin{bmatrix} C_0 & C_1^* & \dots & C_M^* \\ C_1 & C_0 & \dots & C_{M-1}^* \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_M & C_{M-1} & \dots & C_0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ a_1 \\ \vdots \\ a_M \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} |\beta|^2 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (20)$$

missä kertoimet C_m ovat CARS-viivamuodon diskreettejä Fourier-muunnoksia normitetuilta taajuuksilta $\omega_j = \frac{j}{L}$, $j = 0, 1, \dots, L$ [17] :

$$C_m = L^{-1} \sum_{j=0}^{L-1} S(\omega_j) e^{(2\pi i m \omega_j)}. \quad (21)$$

ME-metodia hyödyntäen CARS-spektrin vaihe θ voidaan approksimoida mittaustuloksista lasketun ME-vaihefunktion $\psi(\omega) = \arg\{A_M(\omega)\}$ sekä taustatermin vaiheen $\varphi(\omega)$ avulla. ME-vaihe liittyy siis yhtälön 18 termiin A_M ja sisältää samat spektriominaisuudet kuin CARS-spektrin vaihe $\theta(\omega)$. Virhevaihe sisältää vaihefunktion $\theta(\omega)$ hitaasti muuttuvan taustavaiheen, ja se voidaan määrittellä oikean vaiheen sekä ME-vaiheen erotuksena:

$$\varphi(\omega) = \theta(\omega) - \psi(\omega). \quad (22)$$

ME-vaiheen ja virhevaiheen avulla yhtälö 18 voidaan kirjoittaa muotoon

$$\chi_{NR} + \chi_R = \sqrt{S(\omega)} e^{i\theta(\omega)} \cong \frac{|\beta| e^{i\theta(\omega)}}{|A_M(\omega)|} = \frac{|\beta| e^{i\theta(\omega) - i\psi(\omega)}}{|A_M(\omega) e^{-i\psi(\omega)}|} = \frac{|\beta| e^{i\varphi(\omega)}}{A_M^*(\omega)}, \quad (23)$$

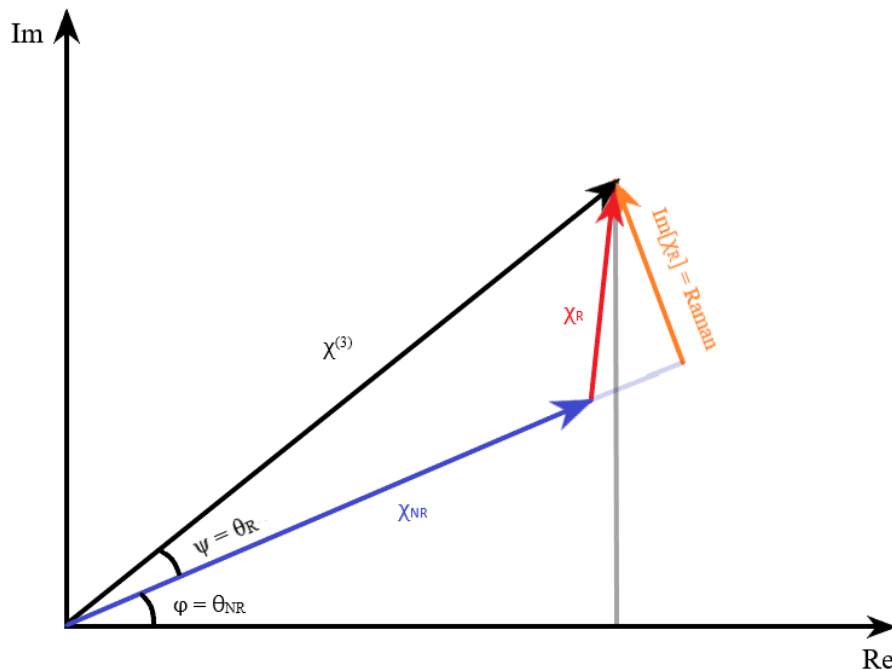
jossa ainoa tuntematon termi on nyt $\varphi(\omega)$. [17]

ME-mallin avulla vaiheen $\theta(\omega)$ selvittämiseksi riittää siten vain virhevaiheen $\varphi(\omega)$ ratkaiseminen eli ME-vaihespektrin $\psi(\omega)$ taustakorjaus. CARS-spektrin resonanssitermin imaginääriosia $\text{Im}[\chi_R^{(3)}(\omega)]$, ja samalla Raman-spektri, saadaan taustakorjatun $\psi(\omega)$ avulla yhtälöstä

$$\text{Im}[\chi_R^{(3)}(\omega)] = \sqrt{S(\omega)} \sin(\theta(\omega)), \quad (24)$$

missä $\theta(\omega) \approx \psi(\omega) + \varphi(\omega)$ ja $S(\omega)$ on taustakorjattu CARS-spektri. Taustakorjauksessa voidaan käyttää esimerkiksi WP-hajotelmaa. [7]

Kuva 3 havainnollistaa CARS-spektrin vaihetta tyypillisessä tapauksessa, jossa resonanssitermin χ_R lisäksi esiintyy taustasignaalia χ_{NR} . Kulma θ_R kuvaa resonanssi CARS-signaalin vaihetta, joka vaihelaskennalla approksimoimaan ME-vaiheen ψ avulla. Kulma φ vastaa taustatermin vaihetta.



Kuva 3. CARS-spektrin vaihe resonanssissa.

4 AINEISTO JA OHJELMISTOT

Työssä käytettiin esimerkkinä laajakaistaisella CARS-menetelmällä proteiinipisaroista mitattua hyperspektridataa. Kuva oli 36x36 kuvapikselin kokoinen, ja jokainen pikseli sisälsi 1024 CARS-spektrin intensiteettiarvoa. Hyperspektrikuvan pikseleiden CARS-spektrit oli tallennettu kaksiulotteiseen matriisiin käsittelyä varten.

Spektrejä analysoitiin MATLAB R2019b-työkalun avulla. Työssä käytetyt MATLAB-koodit löytyvät liitteistä. Pixel_spectrum -ohjelma antaa halutusta kuvapikselistä CARS-spektrin sekä luo kuvia raa'asta datasta sekä normitetusta CARS-datasta. Ohjelma tarvitsee hyperspektrikuvan datan lisäksi spektrien aaltolukuarvot, referenssispektrin sekä niin kutsutun pimeävirta-spektrin.

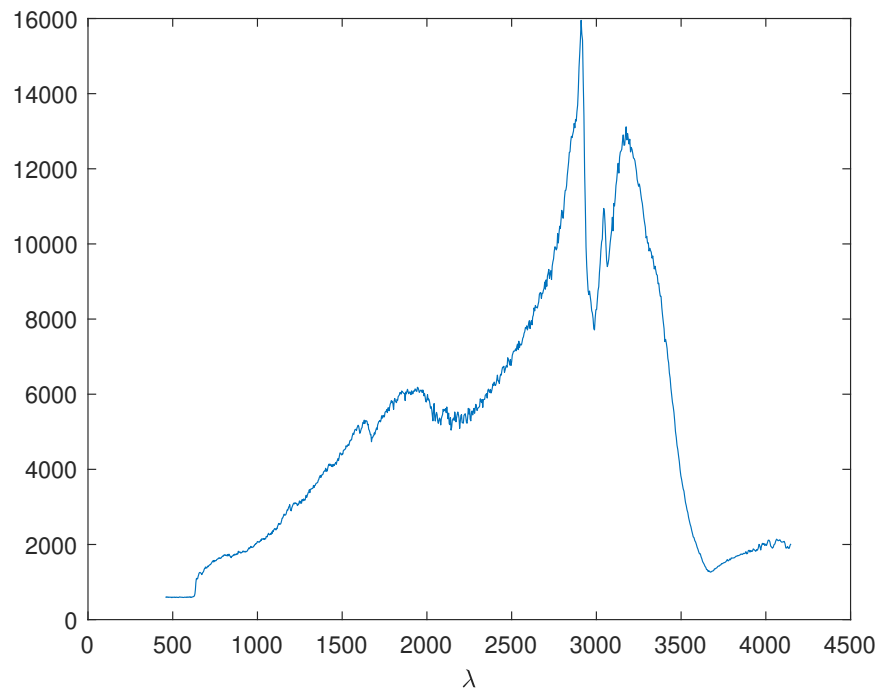
Vastaava Pixel_Raman -ohjelma muodostaa vastaavan Raman-spektrin summaamalla jokaisen pikselin Raman-spektrin arvot yhteen ja luo konsentraatiokartan. Tämä menetelmä ei välttämättä toimisi kaikissa tapauksissa, mutta esimerkkinä käytetyn datan spektriipiikki on niin selkeä, että konsentraatio voidaan yhtä hyvin määrittää tällä summalla piikin korkeuden sijaan. Ohjelma käyttää normitetuista CARS-spektreistä laskettua Raman-spektridataa sekä spektrien aaltolukuarvoja.

WP-hajotelman soveltamista hyödynnettiin MATLAB-ohjelmistoa, jossa WP-hajotelma suoritettiin Daubechies-waveletien avulla. Ohjelma jakaa spektrin haluttuun määrään komponentteja, poistaa virhetermiin kuuluvat komponentit sekä piirtää alkuperäisen spektrin, korjatun spektrin ja WP-komponentit.

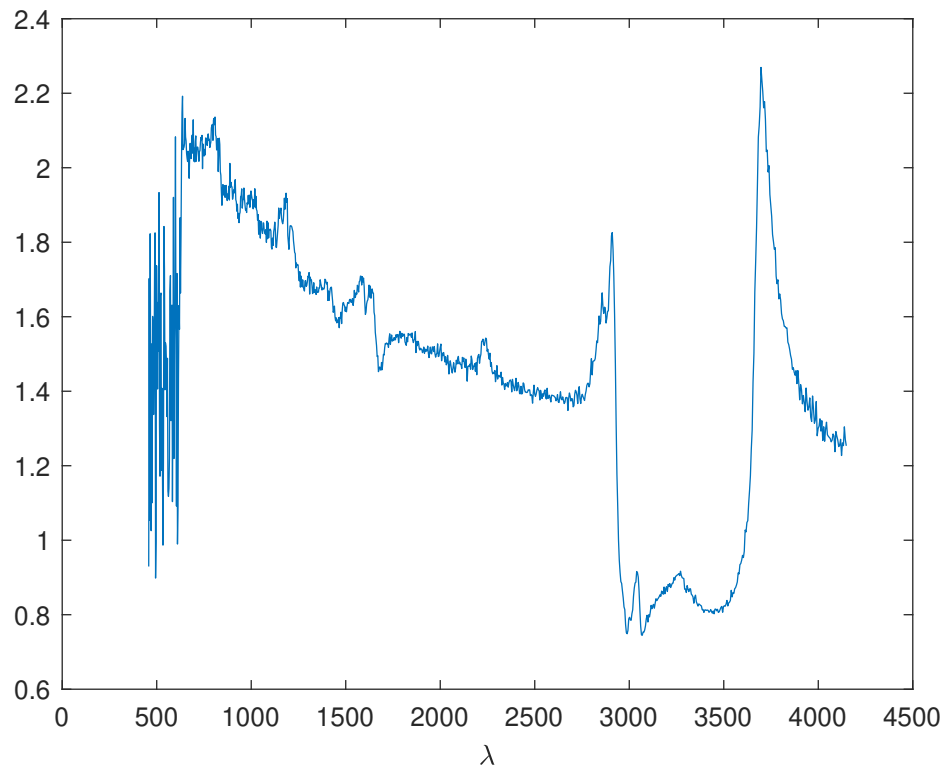
5 ESIMERKKI HYPERSPEKTRIKUVAN ANALYSOINNISTA

5.1 CARS-spektrit

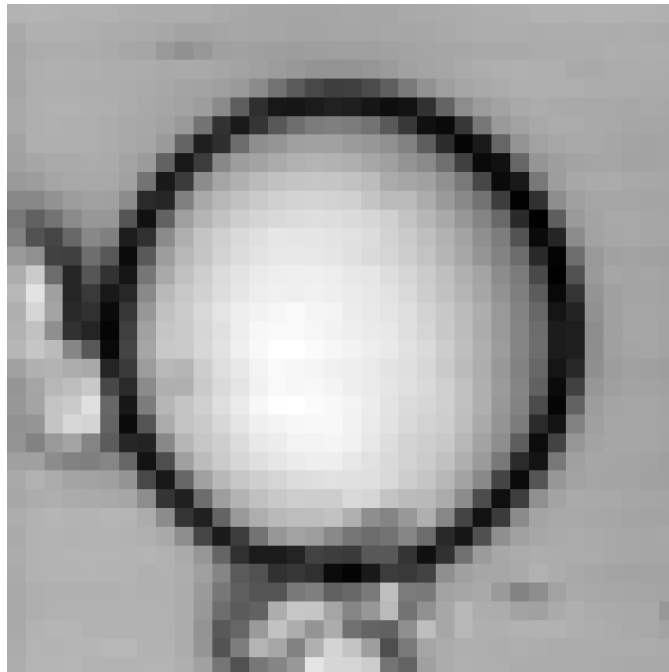
Hyperspektrikuvan analysointia havainnollistettiin piirtämällä värikartat CARS-spektrien sekä Raman-spektrien perusteella. Lisäksi piirettiin yksittäisen pikselin raaka CARS-spektri, normitettu CARS-spektri sekä Raman-spektri esimerkiksi. Kuvasta 6 nähdään alkuperäisestä CARS-spektristä muodostettu kuva proteiinipisarasta. Alkuperäiseen kuvaan 6 on lisätty selkeyttävä värikartta kuvassa 7. Kuvassa 8 on normitetuista CARS-spektreistä muodostettu värikartta.



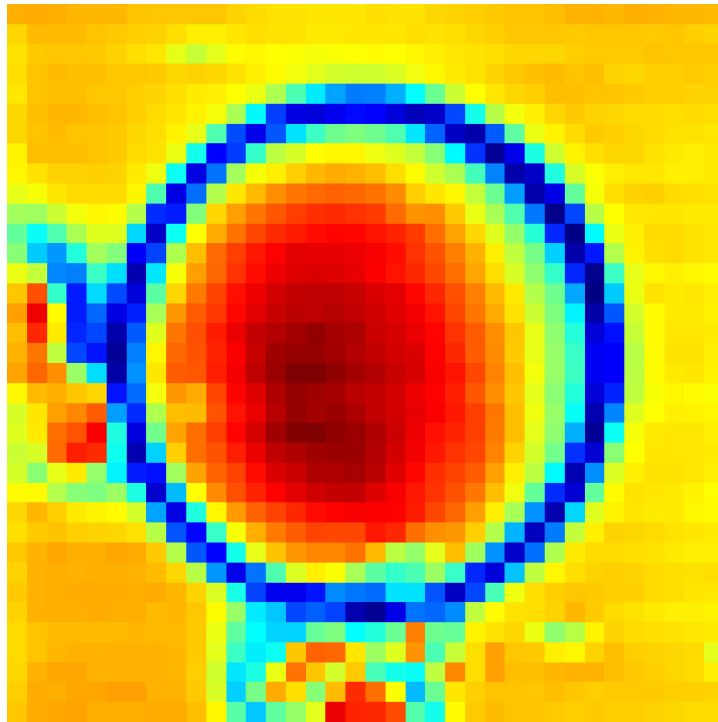
Kuva 4. Raaka CARS-spektri pikselistä $x = 16$, $y = 20$.



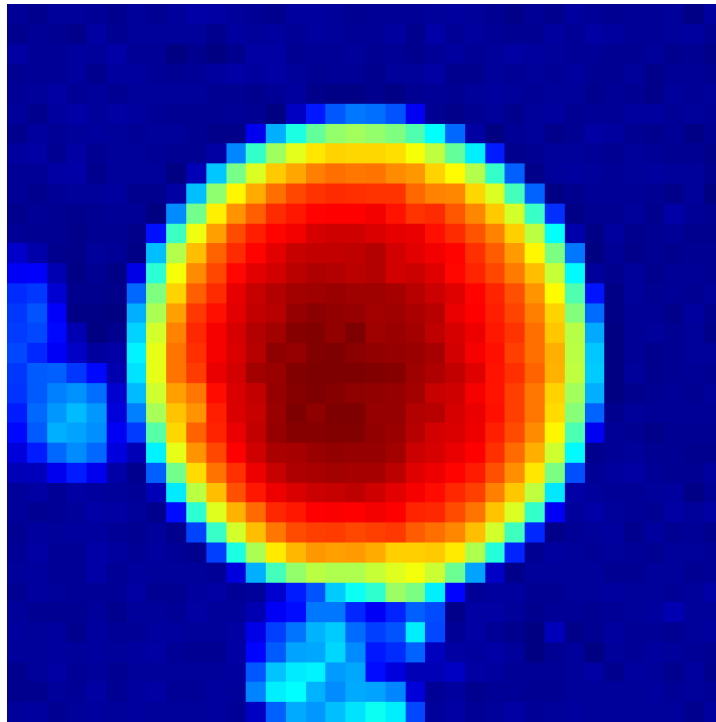
Kuva 5. Normitettu CARS-spektri pikselistä $x = 16, y = 20$.



Kuva 6. Alkuperäisestä CARS-datasta muodostettu hyperspektrikuva.



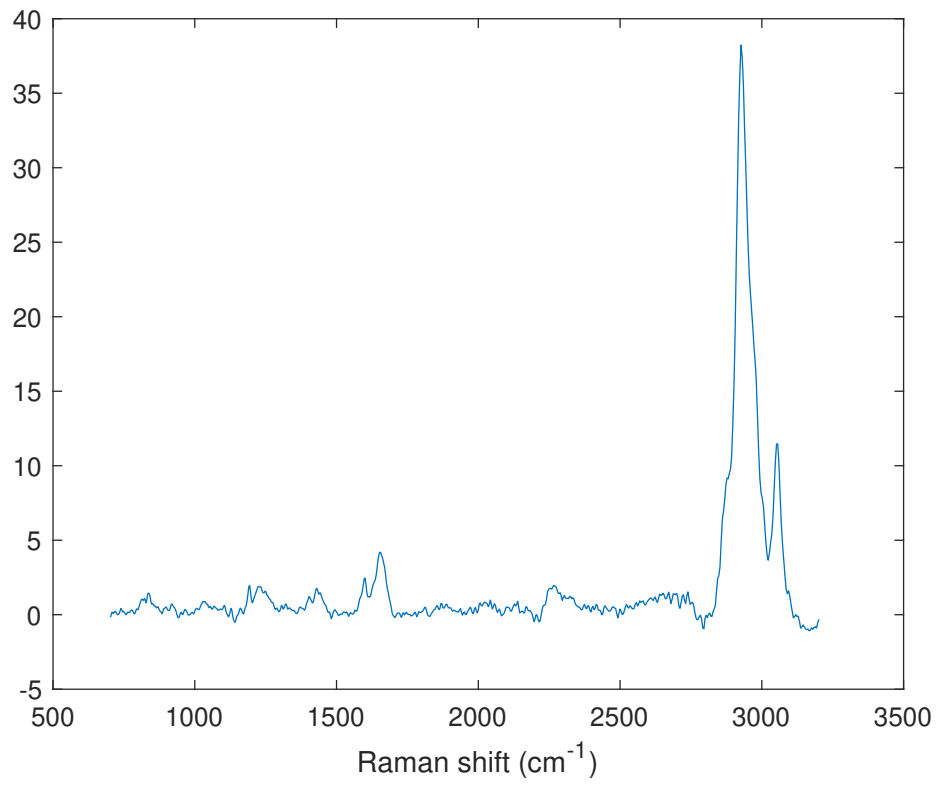
Kuva 7. Alkuperäisestä CARS-datasta muodostettu värikartta.



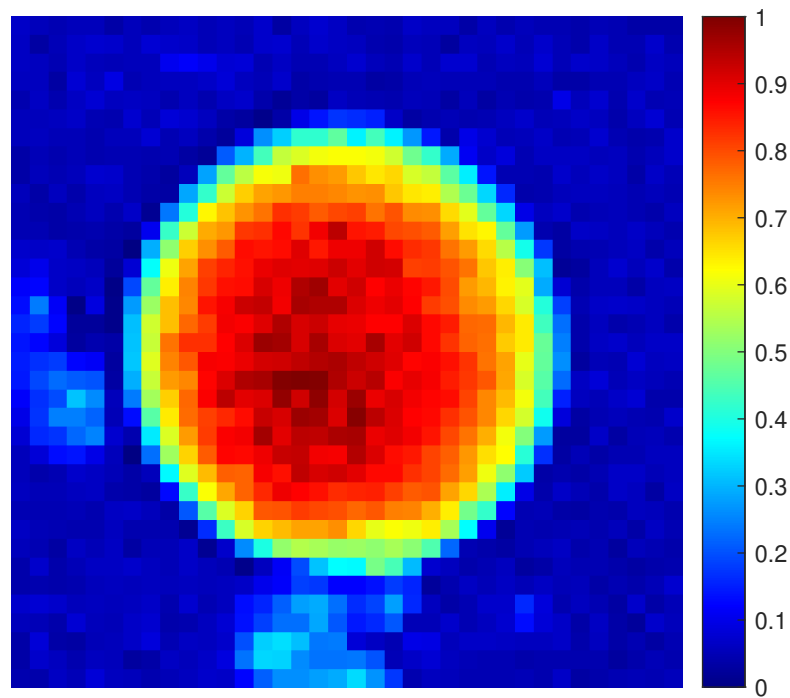
Kuva 8. Normitetuista CARS-spektreistä muodostettu värikartta.

5.2 Raman-spektrit

Normitetuista CARS-spektreistä lasketuista Raman-spektreistä muodostettiin kuva 10. Kuva havainnollistaa hiili-vetysidosten konsentraatiota värikartan avulla. Hiili-vetysidosten konsentraatio on suurin punaisella merkityillä alueilla ja pienin sinisillä alueilla.



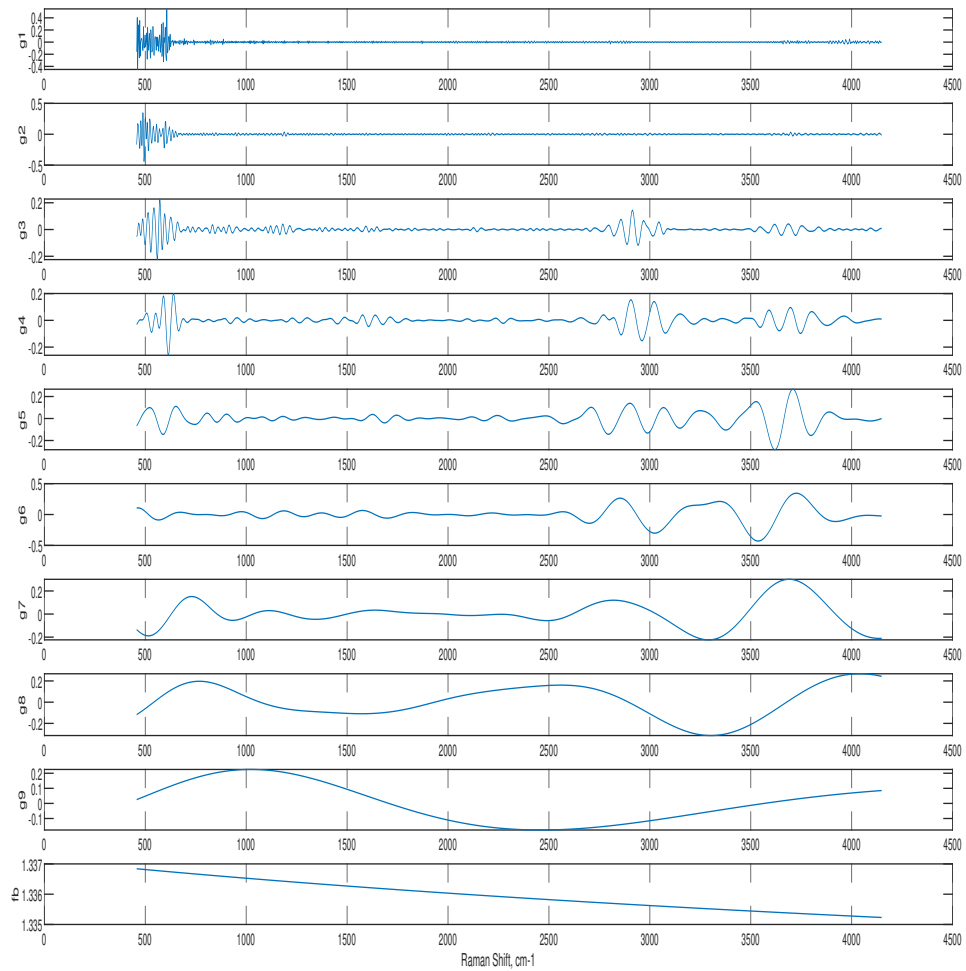
Kuva 9. Pikselin $x = 16$, $y = 20$ Raman-spektri.



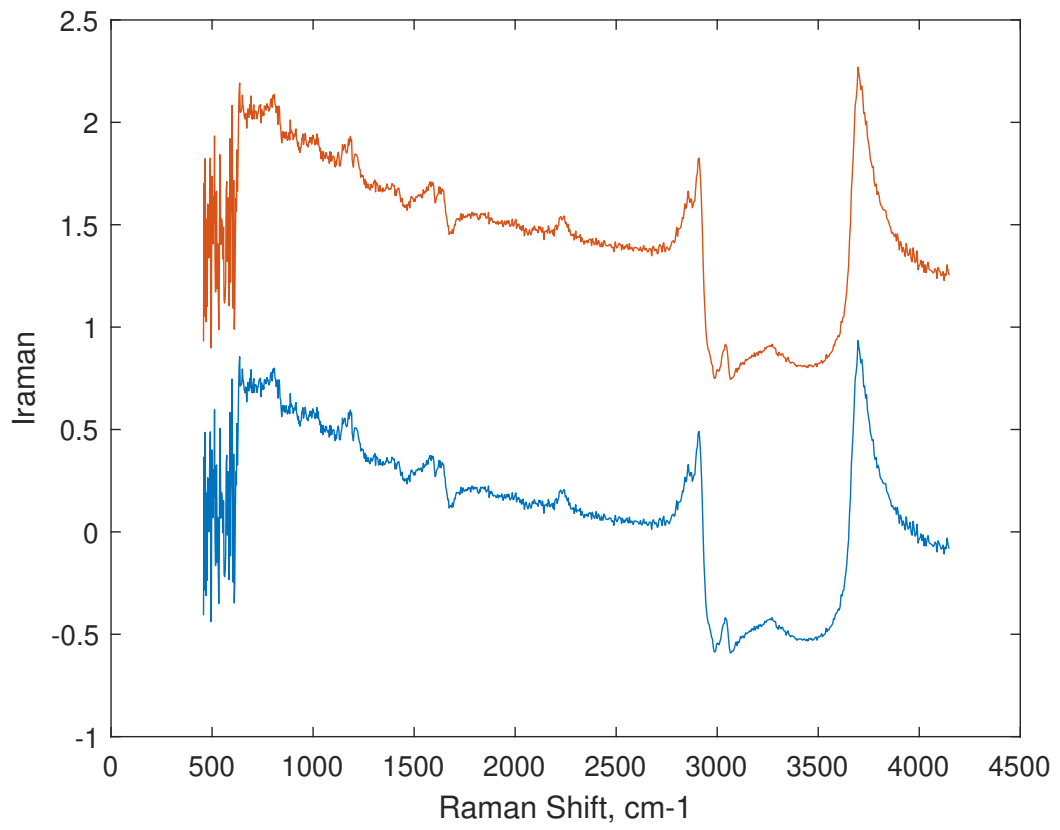
Kuva 10. Raman-spektreistä muodostettu värikartta.

5.3 WP-hajotelma

Wavelet-prisma-hajotelmalla jaetun CARS-spektrin ensimmäiset 9 komponenttia g_i ja kaikista alin komponentti fb näkyvät kuvassa 11. Kuvaan 12 on piirretty pikselin $x = 16$, $y = 17$ alkuperäinen normitettu CARS-spektri oranssilla sekä taustakorjattu CARS-spektri sinisellä.



Kuva 11. WP-hajotelma pikselin $x = 16$, $y = 20$ CARS-spektristä.



Kuva 12. WP-hajotelmalla korjattu pikselin $x = 16$, $y = 20$ CARS-spektri

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn tarkoituksena oli tutustua CARS-mikrospektroskopiaan kvantitatiivisena kuvantamismenetelmänä sekä tutkia WP-hajotelman ja ME-menetelmän toimivuutta spektridatan analysoinnissa. Kirjallisuuden sekä esimerkkiaineiston analysoinnin perusteella voidaan todeta, että CARS on erittäin hyödyllinen kvantitatiivinen kuvantamismenetelmä esimerkiksi monimutkaisten biologisten näytteiden kuvantamisessa. CARS-mikrospektroskopian avulla voidaan määrittää tutkittavan aineen Raman-spektri ja siten saada kvantitatiivista tietoa näytteestä.

Proteiinipisaroista mitatun spektridatan perusteella piirrettyjen kuvaajien ja värikarttojen perusteella on selvää, että CARS-spektrit vaativat paljon käsittelyä, jotta niistä voidaan erottaa Raman-spektri. Vertaamalla kuvaa 8 ja 10 kuitenkin havaitaan, että tässä tapauksessa myös normitettu CARS-spektri voi antaa osviittaa näyteaineen konsentraatioista. Hiilivetyosidosten suurimmat ja alhaisimmat konsentraatiot erottuvat hyvin selvästi jo normitetusta CARS-spektristä.

WP-hajotelma ja MEM on todettu tutkimuksissa erittäin käyttökelpoisiksi menetelmiksi CARS-spektrien taustakorjauksessa sekä vaihelaskennassa. Molempien menetelmien yksi suurimmista eduista on se, että analysoitavasta näytteestä tai datasta ei tarvita ennakkotietoa. WP-hajotelman yksi kehityskohde on kuitenkin WP-komponenttien luokittelu. Tällä hetkellä kohinakomponentit, signaalikomponentit ja taustakomponentit erotetaan toisistaan lähinnä silmämääräisesti. Tulevaisuudessa olisi hyvä kehittää jonkinlainen algoritmi, joka osaa luokitella eri komponentit automaattisesti.

Lähteet

- [1] Ji-Xin Cheng ja Xiaoliang Sunney Xie (Eds.) *Coherent Raman Scattering Microscopy*. Boca Raton: CRC Press, 2012. ISBN: 9780429193675.
- [2] Ji-xin Cheng, Andreas Volkmer, Lewis D. Book ja X. Sunney Xie. ”Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy and Study of Lipid Vesicles”. *The Journal of Physical Chemistry B* 106.34 (2002), s. 8493–8498. DOI: 10.1021/jp025771z.
- [3] Ruchita S Das ja Y.K Agrawal. ”Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications”. *Vibrational spectroscopy* 57.2 (2011), s. 163–176. ISSN: 0924-2031.
- [4] James P. R. Day, Katrin F. Domke, Gianluca Rago, Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, Erik M. Vartiainen ja Mischa Bonn. ”Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy”. *The Journal of Physical Chemistry B* 115.24 (2011). PMID: 21526785, s. 7713–7725. DOI: 10.1021/jp200606e.
- [5] Lokenath Debnath. *Wavelet Transforms and Their Applications*. 2nd ed. 2015. Boston, MA: Birkhäuser Boston, 2015. ISBN: 9780817684181.
- [6] Robin R. Jones, David C. Hooper, Liwu Zhang, Daniel Wolverson ja Ventsislav K. Valev. ”Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers”. *Nanoscale Research Letters* 14.1 (heinäkuu 2019), s. 231. DOI: 10.1186/s11671-019-3039-2.
- [7] Yelena Kan, Lasse Lensu, Gregor Hehl, Andreas Volkmer ja Erik M. Vartiainen. ”Wavelet prism decomposition analysis applied to CARS spectroscopy: a tool for accurate and quantitative extraction of resonant vibrational responses”. *Opt. Express* 24.11 (toukokuu 2016), s. 11905–11916. DOI: 10.1364/OE.24.011905.
- [8] Hideaki Kano, Hiroki Segawa, Masanari Okuno, Philippe Leproux ja Vincent Couderc. ”Hyperspectral coherent Raman imaging – principle, theory, instrumentation, and applications to life sciences”. *Journal of Raman Spectroscopy* 47.1 (2016), s. 116–123. DOI: <https://doi.org/10.1002/jrs.4853>.

- [9] Juha Kostamovaara, Jussi Tenhunen, Martin Kögler, Ilkka Nissinen, Jan Nissinen ja Pekka Keränen. "Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD". *Opt. Express* 21.25 (joulukuu 2013), s. 31632–31645. DOI: 10.1364/OE.21.031632.
- [10] Derek A. Long. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. Chichester: Wiley, 2002.
- [11] S. G. Mallat. "A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation". *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 11.7 (1989), s. 674–693. DOI: 10.1109/34.192463.
- [12] Y. R. Shen. *The principles of nonlinear optics*. New York: Wiley, 1984. ISBN: 9780471430803.
- [13] Ewen Smith ja Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. Chichester: Wiley, 2005.
- [14] Hu-Wei Tan ja Steven D Brown. "Wavelet analysis applied to removing non-constant, varying spectroscopic background in multivariate calibration". eng. *Journal of chemometrics* 16.5 (2002), s. 228–240.
- [15] Erik Vartiainen ja Kai Peiponen. "Optical and terahertz spectra analysis by the maximum entropy method". *Reports on Progress in Physics*. 76 (toukokuu 2013), s. 066401. DOI: 10.1088/0034-4885/76/6/066401.
- [16] Erik M. Vartiainen. "Phase retrieval approach for coherent anti-Stokes Raman scattering spectrum analysis". *J. Opt. Soc. Am. B* 9.8 (elokuu 1992), s. 1209–1214. DOI: 10.1364/JOSAB.9.001209.
- [17] Erik M. Vartiainen, Hilde A. Rinia, Michiel Müller ja Mischa Bonn. "Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra". *Opt. Express* 14.8 (huhtikuu 2006), s. 3622–3630. DOI: 10.1364/OE.14.003622.

Kuvat

1	Molekyylin vibraatiotilat ja sironta. [13]	9
2	Molekyylin vibraatiotilat. a) resonanssi CARS b) laajakaistainen CARS c) resonoimaton CARS. [4]	11
3	CARS-spektrin vaihe resonanssissa.	20
4	Raaka CARS-spektri pikselistä $x = 16, y = 20$	22
5	Normitettu CARS-spektri pikselistä $x = 16, y = 20$	23
6	Alkuperäisestä CARS-datasta muodostettu hyperspektrikuva.	23
7	Alkuperäisestä CARS-datasta muodostettu värikartta.	24
8	Normitetuista CARS-spektreistä muodostettu värikartta.	25
9	Pikselin $x = 16, y = 20$ Raman-spektri.	26
10	Raman-spektreistä muodostettu värikartta.	26
11	WP-hajotelma pikselin $x = 16, y = 20$ CARS-spektristä.	27
12	WP-hajotelmalla korjattu pikselin $x = 16, y = 20$ CARS-spektri	28

Liite 1. CARS-spektrien käsittelyyn käytetyt MATLAB-ohjelmat

```
clear all
close all
clc

% first we should define x and y
x=16;
y=20;

% recalling the function
% It will plot all of the images and turning on the data cursor for further
% exploration.
% The CARS RAW and Corrected spectrum illustrated.
% The data saved in a .txt and .xlsx file.

Pixel_Spectrum(x,y)
```

```
function Spectrum = Pixel_Spectrum(x,y)

%Wavelength data in nanometer
Wavelength = load('ramanshift_for_cars.txt');

% Reference Spectrum
REF_SPEC = load('REF_SPEC');

% Background Spectrum
BGND_SPEC = load('BGND_SPEC');

%Raw CARS data
CARS_RAW = load('cars_spectra_big_droplet.dat');

% Size of the image ( height = width )
SIZE = 36;
Num_Sample = 1024;
% Minimum intensity index
N_min = 253;
% Maximum intensity index
N_max = 273;
% reference intensity at minimum
R_min = REF_SPEC(N_min)- BGND_SPEC(N_min);
% reference intensity at maximum
R_max = REF_SPEC(N_max)- BGND_SPEC(N_max);
%
%
% Categorizing data into a shape like image (CARS_SPEC_PIX --> 30 x 30)
% which each pixel has a spectrum (A vector of 2000 elements)
for r = 1 : SIZE
    for c = 1 : SIZE
        CARS_SPEC_PIX{r,c} = CARS_RAW( r , Num_Sample * c - Num_Sample + 1 :
Num_Sample * c );
        I_rawmin{r,c} = CARS_RAW(r,Num_Sample * c - Num_Sample + N_min);
        I_rawmax{r,c} = CARS_RAW(r,Num_Sample * c - Num_Sample + N_max);
        I_min{r,c} = (I_rawmin{r,c} - BGND_SPEC(N_min))/R_min;
        I_max{r,c} = (I_rawmax{r,c} - BGND_SPEC(N_max))/R_max;
        DeltaI{r,c} = abs(I_max{r,c} - I_min{r,c});
        Beta{r,c} = sqrt(2 * (I_max{r,c} + I_min{r,c}));
```

Liite 2. Raman-spektrien käsittelyyn käytetyt MATLAB-ohjelmat

```
clear all
close all
clc

% first we should define x and y
x=16;
y=20;

% recalling the function
% It will plot all of the images and turning on the data cursor for further
% exploration.
% The CARS RAW and Corrected spectrum illustrated.
% The data saved in a .txt and .xlsx file.

Pixel_Raman(x,y)
```

```
function Spectrum = Pixel_Spectrum(x,y)

%Wavelength data in nanometer
Wavelength = load('ramanshift_for_cars.txt');

% Reference Spectrum
REF_SPEC = load('REF_SPEC');

% Background Spectrum
BGND_SPEC = load('BGND_SPEC');

%Raw CARS data
CARS_RAW = load('cars_spectra_big_droplet.dat');

% Size of the image ( height = width )
SIZE = 36;
Num_Sample = 1024;
% Minimum intensity index
N_min = 253;
% Maximum intensity index
N_max = 273;
% reference intensity at minimum
R_min = REF_SPEC(N_min) - BGND_SPEC(N_min);
% reference intensity at maximum
R_max = REF_SPEC(N_max) - BGND_SPEC(N_max);
%
```

```
% Categorizing data into a shape like image (CARS_SPEC_PIX --> 30 x 30)
% which each pixel has a spectrum (A vector of 2000 elements)
for r = 1 : SIZE
    for c = 1 : SIZE
        CARS_SPEC_PIX{r,c} = CARS_RAW( r , Num_Sample * c - Num_Sample + 1 :
Num_Sample * c );
        I_rawmin{r,c} = CARS_RAW(r,Num_Sample * c - Num_Sample + N_min);
        I_rawmax{r,c} = CARS_RAW(r,Num_Sample * c - Num_Sample + N_max);
        I_min{r,c} = (I_rawmin{r,c} - BGND_SPEC(N_min))/R_min;
        I_max{r,c} = (I_rawmax{r,c} - BGND_SPEC(N_max))/R_max;
        DeltaI{r,c} = abs(I_max{r,c} - I_min{r,c});
    end
end
```

Liite 2. Raman-spektrien käsittelyyn käytetyt MATLAB-ohjelmat

```
Beta{r,c} = sqrt(2 * (I_max{r,c} + I_min{r,c}));
Ampl{r,c} = DeltaI{r,c} / Beta{r,c};
end
end

% _____
% Making the RAW image



```

%pre-allocate
image_raw = ones(SIZE , SIZE) ;

for r = 1 : SIZE
 for c = 1 : SIZE
 image_raw (r , c) = sum(CARS_SPEC_PIX{r,c});
 end
end

% Normalizing the pixel values between 0 and 1 just for illustrating and
% finding the edges.
image_raw_n = mat2gray(image_raw);

% _____
% Correcting the CARS spectrum by Background and Reference

for r = 1 : SIZE
 for c = 1 : SIZE
 Corrected_CARS_Signal{r,c} = ((CARS_SPEC_PIX{r,c}'-
BGND_SPEC)./(REF_SPEC-BGND_SPEC))';
 end
end

% _____
% Making the corrected image

%pre-allocate
image_corrected = ones(SIZE , SIZE) ;

for r = 1 : SIZE
 for c = 1 : SIZE
 % image_corrected (r , c) = sum(Corrected_CARS_Signal{r,c});
 image_corrected (r , c) = Ampl{r,c};
 end
end

% Normalizing the pixel values between 0 and 1 just for illustrating and
% finding the edges.
image_corrected_n = mat2gray(image_corrected);

%Plotting the raw CARS image
figure
imshow(image_raw_n, [], 'InitialMagnification','fit')
colormap(jet(256));
%title('CARS raw image')

% Plotting the raw CARS image
figure
imshow(image_corrected_n, 'InitialMagnification','fit')
```


```

Liite 2. Raman-spektrien käsittelyyn käytetyt MATLAB-ohjelmat

```
colormap(jet(256));
%title('CARS corrected image')

figure
imshow(image_raw_n,[],'InitialMagnification','fit')
% colormap(jet(256));
%title('CARS raw image')

% Plotting the raw CARS image
figure
imshow(image_corrected_n,'InitialMagnification','fit')
% colormap(jet(256));
%title('CARS corrected image')

datacursormode on
% Click mouse on surface to display data cursor

Raw_spec = CARS_SPEC_PIX{x,y};
Raw_spec = Raw_spec';
Corrected_spec = Corrected_CARS_Signal{x,y};
Corrected_spec = Corrected_spec';
Result_Raw_spec = [Wavelength , Raw_spec];
Result_Corrected_spec = [Wavelength , Corrected_spec];

filename_RAW=strcat('CARS_RAW_Spec_x_',num2str(x),'y_',num2str(y),'.txt');
filename_Corrected=strcat('CARS_Corrected_Spec_x_',num2str(x),'y_',num2str(y),'.txt');
dlmwrite(filename_RAW,Result_Raw_spec,'delimiter','\t');
dlmwrite(filename_Corrected,Result_Corrected_spec,'delimiter','\t');
filename_RAW=strcat('CARS_RAW_Spec_x_',num2str(x),'y_',num2str(y),'.xlsx');
filename_Corrected=strcat('CARS_Corrected_Spec_x_',num2str(x),'y_',num2str(y),'.xlsx');
xlswrite(filename_RAW,Result_Raw_spec)
xlswrite(filename_Corrected,Result_Corrected_spec)

figure
%subplot(1,2,1)
plot(Wavelength,Raw_spec)
filename=strcat('CARS RAW SPECTRUM x=',num2str(x),'y=',num2str(y));
%title(filename)
xlabel('\lambda')
%subplot(1,2,2)
figure
plot(Wavelength,Corrected_spec)
filename=strcat('CARS CORRECTED SPECTRUM x=',num2str(x),'y=',num2str(y));
%title(filename)
xlabel('\lambda')

end
```

Liite 3. WP-hajotelmaan käytetty MATLAB-ohjelma

```
%Wavelet decomposition/reconstruction script

%Load file
%spectrum = dlmread('sample_spectrum.txt');
spectrum = xlsread('CARS_RAW_Spec_x_16y_20');

%Wavelet type
wwl = 'db16';

%Decomposition level
s = 15;

%Import file
x = spectrum (:, 1);
y = spectrum (:, 2);

%Detect array size
vecsize = size(x); vecsize = vecsize(1);

%Wavelet decomposition
[c,l] = wavedec (y,s, wwl);

%Detail coefficients vars
sdet = zeros(vecsize,s);
ans = zeros(vecsize,1);

%Reconstruction to detail components
for n=1:s
    sdet(:,n)= wrcoef ('d', c, l, wwl,n);
    ans=ans + sdet(:,n);
end

%Background reconstruction
bg = wrcoef ('a', c, l, wwl,n);

%Plot
subplot (10,1,1); plot (x,sdet (:,1)); ylabel ('g1');
subplot (10,1,2); plot (x,sdet (:,2)); ylabel ('g2');
subplot (10,1,3); plot (x,sdet (:,3)); ylabel ('g3');
subplot (10,1,4); plot (x,sdet (:,4)); ylabel ('g4');
subplot (10,1,5); plot (x,sdet (:,5)); ylabel ('g5');
subplot (10,1,6); plot (x,sdet (:,6)); ylabel ('g6');
subplot (10,1,7); plot (x,sdet (:,7)); ylabel ('g7');
subplot (10,1,8); plot (x,sdet (:,8)); ylabel ('g8');
subplot (10,1,9); plot (x,sdet (:,9)); ylabel ('g9');
subplot (10,1,10); plot (x,bg); ylabel ('fb'); xlabel ('Raman Shift, cm-1');

%Result without background
figure
plot (x,ans,x,y); xlabel ('Raman Shift, cm-1'); ylabel ('I raman');

%Save result
result = zeros(vecsize, s+2);
result(:,1)=x;
result(:,2:s+1)=sdet;
result(:,s+2)=bg;
dlmwrite('results.txt', result);
```