

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА РАМАНОВСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ WITec ARYRON

Ч.Диинг, У.Шмит, О.Холрихер, Х.Фишер
WITec (Ulm, Germany)
harald.fischer@witec.de

Представлена новая технология автоматизированной рамановской микроскопии, позволяющая сделать ее более простой и доступной без какого-либо снижения качества результатов исследований. Конфокальная рамановская микроскопия (КРМ) используется для характеристики химического состава и молекулярного строения твердых и жидких материалов. Она представляет собой метод получения изображений с высоким разрешением, предел которого ограничивается лишь дифракцией (приблизительно $\lambda/2$ при длине волны возбуждения большей 200 нм). Не требуя какой-либо специальной пробоподготовки, например, с помощью метящих красителей, рамановская микроскопия позволяет отчетливо визуализировать в образцах отдельные химические компоненты и их пространственное распределение. Это становится возможным благодаря тому, что системы КРМ способны, не разрезая объекты, исследовать их послойным сканированием вдоль вертикальной оси Z. На основе этого с высоким разрешением создаются профили по глубине и трехмерные изображения.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНФОКАЛЬНЫХ РАМАНОВСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

При получении конфокальных рамановских изображений объединяются возможности конфокального микроскопа и высокочувствительного рамановского спектрометра. Благодаря этому, получаемые образы объектов не ограничиваются только их поверхностью, но включают создание профилей по глубине и трехмерных видов, получаемых, как правило, с очень хорошим соотношением сигнал-шум и высокой контрастностью. В КРМ полный рамановский спектр записывается с помощью 256 линий, каждая из которых состоит из 256 пикселей. Интерпретируя такой "мультиспектральный" файл, соответствующее программное обеспечение способно представить картину распределения различных видов молекул в образце.

АВТОМАТИЗАЦИЯ РАМАНОВСКОЙ МИКРОСКОПИИ

В КРМ для получения результатов высокого качества критически важна настройка инструмента.

В традиционно используемых системах, как правило, требуется ручная настройка прибора и подбор оптических компонентов. Преимущество кнопочных систем состоит в резком сокращении времени, необходимого для ознакомления с работой прибора. С помощью системы аругон вручную производится только загрузка образца и выбор объектива. Значения всех остальных функций (таких как выбор и изменение длины волны возбуждения, регулировка мощности лазера, позиционирование и фокусировка образца, калибровка и максимизация сигнала) можно просто задать на экране компьютера перед началом работы – прибор без какого-либо стороннего вмешательства автоматически настроит все компоненты. Все установленные параметры записываются во время измерения и могут быть вызваны вновь для обеспечения воспроизводимости.

Микроскоп стандартно оснащается рамановским спектрометром UHTS 300 для работ в видимой области. Однако теперь также доступны модели UHTS 400 для красного и инфракрасного диапазона и UHTS 600, большое фокусное расстоя-

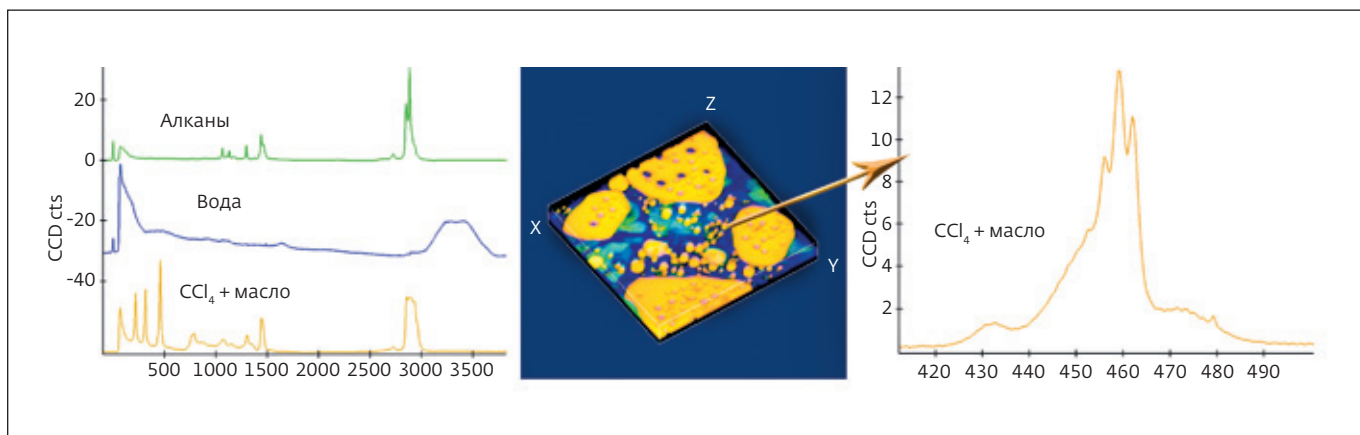


Рис.1. Конфокальное рамановское отображение с высоким разрешением эталонного вещества CCl_4 в эмульсии вода-масло-алканы. Слева: рамановский спектр эмульсии. В центре: трехмерное конфокальное рамановское изображение полученной эмульсии: алканы (зеленый цвет), вода (синий) и CCl_4 в масле (желтый). Параметры изображения: $200 \times 200 \times 20$ пикселей, область сканирования $100 \times 100 \times 10$ мкм³; время интегрирования по спектру 0,06 с, длина волны возбуждения лазера 532 нм. Справа: одна капля CCl_4 в масле была проанализирована более детально с помощью дифракционной решетки с большей разрешающей способностью (полученный спектр показывает три отдельных пика в области 460 рад·1/см). Это общепринятый показатель качества в высокоразрешающей рамановской спектроскопии

ние которой позволяет добиться чрезвычайно высокого спектрального разрешения. Общим для всех приборов является оптическая схема, позволяющая получать высококачественные рамановские спектры за счет высокой светопередачи, трехпозиционной дифракционной решетки для обеспечения гибкости измерений, а также набора различных записывающих ПЗС-матриц. Особое внимание уделено возможности регулировать мощность лазера подобрать ее таким образом, чтобы при максимальной интенсивности светового потока избежать изменения или повреждения образца. Такая регулировка производится с точностью до 0,1 мВт. При этом все фактические значения непрерывно фиксируются, чтобы после подбора иметь возможность использовать их повторно.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРЕХМЕРНОГО РАМАНОВСКОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ ЭМУЛЬСИИ С CCl_4

В качестве стандартного вещества в рамановской спектроскопии используется четыреххлористый углерод (CCl_4). В приведенных исследованиях CCl_4 эмульгировали в смеси алканов, воды и масла с целью продемонстрировать, насколько спектроскопия высокого разрешения сочетается с высоким разрешением изображений. Такое трехмерное рамановское изображение представлено на рис.1. Оно демонстрирует пространственное распределение компонентов эмульсии, в которой CCl_4 полно-

стью растворен в масляной фазе. Более детальное исследование капли масла с помощью дифракционной решетки с большей разрешающей способностью позволило отобразить структуры с размерами меньше одного микрометра. В полученном изображении достигаемое спектральное разрешение настолько велико, что область вблизи волнового числа 460 представлена в виде трех отдельных пиков. Эти полосы комбинационного рассеяния CCl_4 являются эталонными в высокоразрешающей рамановской спектроскопии.

МЕЛЧАЙШАЯ ДЕТАЛИЗАЦИЯ РАМАНОВСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Объем данных, получаемых в процессе подобных исследований, огромен. Поэтому существенное значение имеет производительность программного обеспечения для быстрой обработки и преобразования значений, описывающих сложные пространственные образы. Таким инструментом, который позволяет записывать и производить анализ нескольких миллионов спектров, является программный пакет WITec FOUR suite. Например, показанное на рис.2 еще одно изображение эмульсии вода-алканы-масло- CCl_4 соответствует площади 1000×1000 мкм² и описывается с помощью 16,8 млн. спектров (пикселей). Оценить полноту представления данных о распределении компонентов можно, сравнив левое и правое изображения. Слева две очень маленькие области

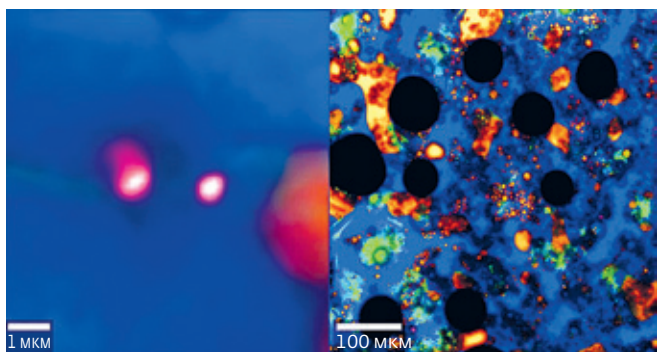


Рис.2. Рамановские изображения "HD"-качества, полученные для эмульсии, из смеси воды-алканов-масла- CCl_4 ; содержат 16,8 млн. спектров (пикселей): алканы (зеленый цвет), вода (синий) и CCl_4 в масле (желтый). Справа: общий вид $1 \times 1 \text{ мм}^2$. Слева: вид двух областей изображения, масштабно увеличенных до разрешения, ограниченного дифракцией

находятся в поле зрения без дополнительной детализации. Картина справа получена путем простого масштабирования наблюдаемой картины. Как итог, рамановское изображение "HD"-качества показывает мельчайшие особенности образца в поперечном сечении с разрешением, ограниченным лишь дифракцией.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МАЗИ ДЕКСПАНТЕНОЛ

При исследовании распределения химических компонентов для автоматизации процесса также

могут использоваться и статистические методы. Например, такой метод, как кластерный анализ, позволяет просто и быстро извлекать спектральные характеристики, а статистический анализ гистограммы дает дополнительные возможности для четкого анализа данных, описывающих изображение. Это продемонстрировано на примере двух образцов мазей для заживления ран, содержащих декспантенол и применяемых для лечения кожи и глаз (рис.3). В полученных изображениях наглядно видна разница в концентрации отдельных компонентов.

При первоначальном представлении, усредненном по всей наблюдаемой области, рамановское изображение двух мазей выглядит очень похожим (данные не показаны). Небольшие различия обнаруживаются, если для освещения образца использовать лазер с большим пятном возбуждения. Только в этом случае латеральное разрешение позволяет выявить и статистически описать индивидуальные особенности объектов исследования. Для анализа гистограммы строился график зависимости числа пикселей, соответствующих каждому компоненту, от измеренной величины интенсивности его сигнала, позволяющей оценить содержание вещества в препарате. Результат представлен на рис.4. Видно, что в зависимости от области применения лекарственного средства соотношение между компонентами смеси различно. Например, в случае мази для глаз в ней в среднем содержится меньше масла и больше воды. Подобные результаты имеют

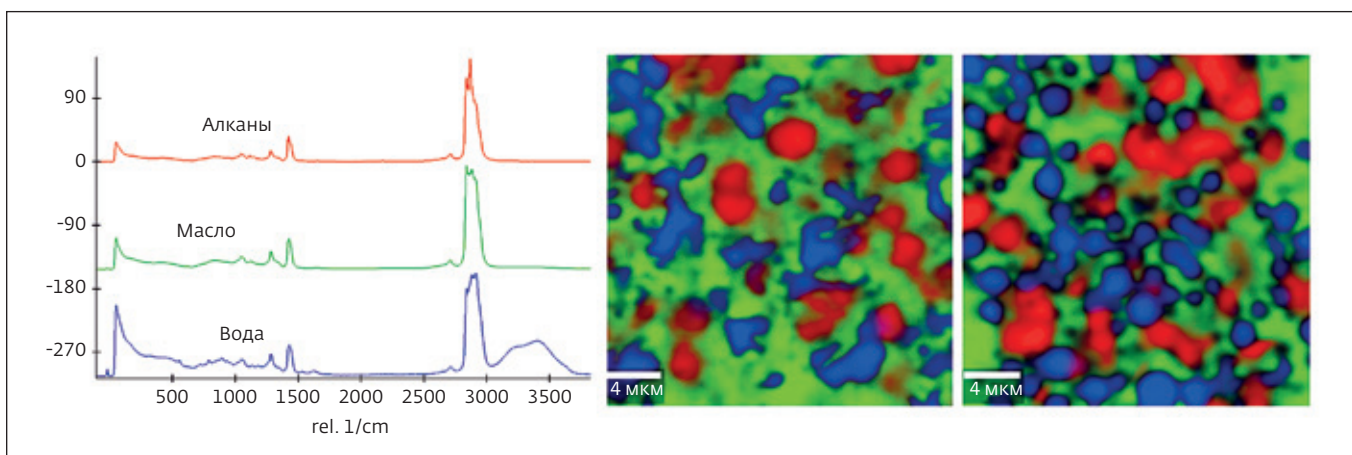


Рис.3. Конфокальные рамановские изображения мазей, содержащих декспантенол и предназначенных для различных областей применения. Слева: рамановский спектр мазей для кожи и глаз, содержащих, соответственно, алканы (красный цвет), масло (зеленый) и воду (синий). В центре: рамановское изображение масла для кожи. Справа: рамановское изображение масла для глаз. Параметры изображений: $25 \times 25 \text{ мкм}^2$, 150×150 спектр/пиксел, время интегрирования 0,05 с, лазер 532 нм, 25 мВт, УНТС 600

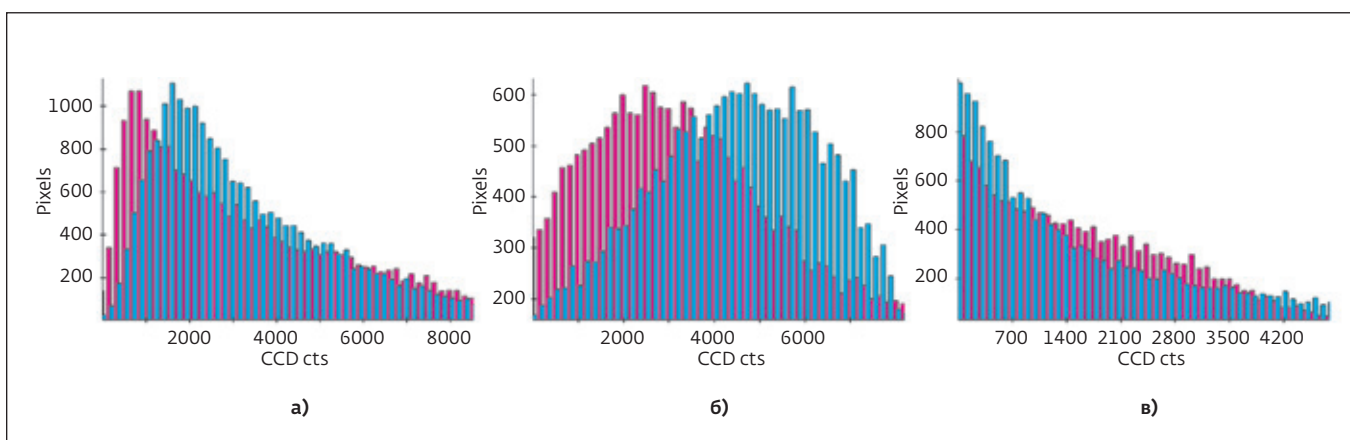


Рис.4. Гистограмма распределения интенсивности отдельных компонентов (а – алканы, б – масло, в – вода) в декспантенол-содержащих мазях, применяемых для лечения ран (голубой – для кожи, пурпурный – для глаз)

значение для разработчиков продукта, поскольку позволяют улучшить его свойства.

ВЫВОДЫ

В этой статье мы показали, что автоматизированная система получения рамановских изображений WITec аругон обеспечивает простоту ее использования без какого-либо снижения качества результатов

исследований. При этом высокое пространственное разрешение полученных изображений сочетается со спектрами высокого разрешения, что было продемонстрировано на примере эмульсии с CCl_4 . А существующие программные средства позволяют анализировать большие объемы получаемых данных, производить их статистическую оценку и представлять в мельчайших подробностях.