

基于最大似然法的共焦拉曼光谱成像方法

崔 晗¹, 王 允^{1*}, 邱丽荣¹, 赵维谦¹, 朱 恪²

1. 北京理工大学精密光电测试仪器及技术北京市重点实验室, 北京 100081

2. 中国科学院物理研究所, 北京 100190

摘 要 随着现代科技对纳米微观区域兴趣的增加, 如 DNA 测序、分子纳米器件微结构检测等, 其对拉曼光谱技术的空间分辨力提出了更高的要求, 而现有共焦拉曼光谱技术受自身原理限制, 空间分辨力已无法满足科学需求。针对这一问题, 在现有共焦拉曼光谱技术的基础上, 提出一种基于最大似然算法的共焦拉曼光谱成像方法。该方法将超分辨图像复原技术与共焦拉曼光谱技术相结合, 利用基于 Poisson-Markov 约束的最大似然超分辨复原算法对共焦拉曼光谱图像进行超分辨图像复原处理, 恢复图像高频成分, 进而改善共焦拉曼光谱系统的空间分辨能力, 实现超分辨成像。仿真分析和实验结果表明, 提出的基于最大似然算法的共焦拉曼光谱成像方法在不改变现有共焦拉曼光谱系统光学结构的前提下, 仅对单幅拉曼光谱图像进行超分辨图像复原处理, 即可将系统空间分辨力提高到 200 nm, 实现超分辨成像, 同时该方法具有较强的噪声抑制能力。该方法有效地提高了共焦拉曼光谱系统的空间分辨力, 为物理化学、材料科学等前沿领域中的高空间分辨微区光谱探测提供了一种新的途径, 是一种行之有效的高空间分辨的共焦拉曼光谱成像方法。

关键词 共焦拉曼; 最大似然; 超分辨; 图像复原

中图分类号: O433.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2017)05-1571-05

引 言

共焦拉曼光谱技术因继承了共焦显微技术和拉曼光谱技术的优点, 为样品无损检测及物质成分鉴别提供了一种强有力的手段, 在材料科学、医学、生物学等领域^[1-3]的微区探测中应用广泛。但受限于拉曼光谱微弱的信号, 共焦针孔尺寸不得不选择百微米量级, 导致现有共焦拉曼光谱系统无法兼顾系统空间分辨力与光谱探测灵敏度, 使共焦拉曼光谱探测技术的空间分辨力始终停留在微米或亚微米量级, 阻碍了其在高空间分辨微区光谱探测领域的进一步应用。因而, 提高共焦拉曼光谱系统的空间分辨力成为光谱探测领域的研究热点。

为改善共焦拉曼光谱系统的空间分辨能力, 众多学者做了很多有价值的研究工作。在远场条件下, 采用增大物镜数值孔径^[4]、结构光超分辨成像技术^[5]等方法提高共焦拉曼光谱系统空间分辨力。这些方法虽然改善了共焦拉曼光谱系统的空间分辨力, 但是降低了系统光谱探测灵敏度。在近场条

件下, 采用 TERS^[6], STM-TERS^[7]等方法改善系统空间分辨力。近场拉曼技术虽然将拉曼光谱系统的空间分辨力提高达到纳米量级, 但是对工作距要求严格。而超分辨图像复原技术的复原效果主要依赖于复原方法和退化图像的质量, 与成像系统无关, 因而, 为解决共焦拉曼光谱系统光谱探测灵敏度与空间分辨力无法兼顾的问题提供了一条新的解决途径。

超分辨图像复原方法最初由 Harris 和 Goodman^[8-9]提出, 该方法获得了良好的仿真结果, 但是在实际应用中并未取得理想结果。随后研究人员对其进行研究改进, 并提出了许多具有实用价值的复原方法, 如凸集投影法^[10]、反卷积算法^[11]。而 Duponchela 等^[12]在现有共焦拉曼光谱系统的条件下, 将超分辨图像复原技术与共焦拉曼光谱技术相结合, 采用 Tikhonov 正则化超分辨算法利用多幅低分辨力共焦拉曼光谱图像进行超分辨复原处理, 将系统空间分辨力提高到光学显微系统的衍射极限。该方法虽然兼顾了系统空间分辨力与光谱探测灵敏度, 但是在实际测试中由于无法保证图像序列间的亚像素配准, 因而导致图像复原质量降低。

收稿日期: 2016-05-05, 修订日期: 2016-10-20

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金项目(51422501), 国家自然科学基金项目(61475020), 国家自然科学基金重点基金项目(51535002), 国家重大科学仪器设备开发专项(NIP)课题(2011YQ04013607)资助

作者简介: 崔 晗, 1990 年生, 北京理工大学光电学院博士研究生 e-mail: cuih1990@gmail.com

* 通讯联系人 e-mail: alotrabbits@163.com

基于上述情况,本文提出一种基于 Poisson-Markov 约束的最大似然法超分辨复原^[13]共焦拉曼光谱成像方法。该方法将超分辨图像复原技术与共焦拉曼光谱成像技术相结合,在不改变光学成像系统前提下,仅需对单幅共焦拉曼光谱图像进行超分辨图像复原处理,将系统空间分辨力提高到 200 nm,同时兼顾了系统空间分辨力与光谱探测灵敏度,实现共焦拉曼光谱系统的高空间分辨成像。

1 图像复原原理

超分辨图像复原技术的主要目的是恢复物体高频信息,其根据系统的非负性和有界性,复原退化图像的高频分量,进而实现系统高空间分辨成像。

进行超分辨图像复原处理,首先要获得共焦拉曼光谱图像。假设共焦拉曼光谱系统为理想共焦非相干成像系统,其成像如式(1)所示

$$I_{CRM}(x, y) = H(x, y) \otimes O_i(x, y) \quad (1)$$

这里, $O_i(x, y)$ 为物函数, \otimes 代表卷积操作符, H 为系统点扩散函数(PSF), 定义如式(2)

$$h_i(x, y) = |h_1(M_1x, M_1y)|^2 \cdot$$

$$\iint_{-\infty}^{\infty} |h_2(x + M_2x_1, y + M_2y_1)|^2 D(x_1, y_1) dx_1 dy_1 \quad (2)$$

其中, h_1 和 h_2 分别为成像透镜和探测透镜的三维点扩散函数, x_1 和 y_1 为探测空间的径向坐标, $D(x_1, y_1)$ 为探测器函数。

最大似然算法由于可以扩展图像带宽,具有超分辨能力,易于实施等特点而应用广泛,但是该方法在图像复原过程中会引入振荡条纹,并且对于含有噪声的图像不能取得理想的复原效果,而 Markov 随机场模型由于充分考虑每个像素关于其邻近像素的条件分布,可以有效解决图像复原过程中恢复图像细节与抑制噪声的矛盾。因而,为了克服最大似然算法的问题, Su 等^[11]引入 Markov 随机场模型,提出图像复原能力更强的基于 Poisson-Markov 约束的最大似然(MPML)算法,该算法可以在保护图像边缘的同时抑制噪

声,有效提高图像分辨力。

因而,本文采用 MPML 算法对由式(1)获得的共焦拉曼光谱图像进行超分辨图像复原处理,其迭代公式为

$$f_{ij}^{n+1} = f^n \left[\left(\frac{g_{ij}}{(H \otimes f^n)_{ij}} \right) * H_{ij} - \alpha \frac{\partial}{\partial f_{ij}^n} U(f^n) \right]^p \quad (3)$$

其中, $*$ 是相关算子, g 是退化图像, f 是目标图像, H 是系统的 PSF, α 是平衡参数, p 是用于控制算法收敛特性和收敛速度的控制参数。 $U(f)$ 是能量函数,其惩罚函数采用 Geman-McClure 模型,该模型可以有效抑制振铃和噪声,保护图像边缘,增强图像细节的复原效果。

2 噪声抑制仿真分析

在实际共焦拉曼光谱系统中,影响图像质量的因素除系统 PSF 展宽外,还有系统噪声。因而,需要对本文所采用的超分辨图像复原算法在共焦拉曼光谱系统中的噪声抑制能力进行仿真分析。

系统的主要噪声源有光电子噪声和电子热噪声,可用高斯噪声表示。因而,本文采用对因系统 PSF 展宽得到的模糊图像加入高斯噪声的图像作为退化图像,对其进行超分辨图像复原处理,以验证所使用图像复原算法在共焦拉曼光谱系统中的有效性。

进行超分辨图像复原仿真时,所用系统参数与实验所用系统参数相同,仿真图片尺寸为 512×512 像素、灰度级为 256,仿真结果如图 1 所示,其中, I_d 为退化图像, I_R 为复原图像。

从图 1 可以看出,当 SNR=30 dB 时,图像低频信息复原效果良好,小部分高频信息被恢复;当 SNR=40 dB 时,低频信息复原效果良好,高频信息复原能力增加;当 SNR=50 dB 时,低频信息几乎完全被复原,绝大部分高频信息被恢复,复原效果良好。因而,该算法几乎可以完全恢复低频信息,只能恢复部分高频信息,并且随着系统信噪比增加,高频信息复原能力也在逐渐增加。

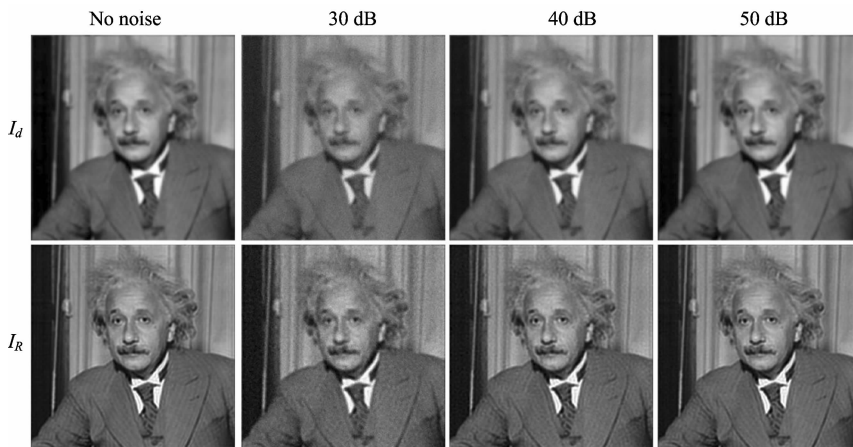


图 1 量化噪声图像复原仿真图

Fig. 1 Simulation results of super-resolution restoration image with quantization noise

本文采用均方差(MSE)、峰值信噪比(PSNR)和改善信噪比(ISNR)三种客观评价标准对图 1 中复原图像质量进行表征, 评价结果如表 1 所示, 其中 MSE_d 和 MSE_r 分别为退化图像和复原图像的均方差, $PSNR_d$ 和 $PSNR_r$ 分别为退化图像和复原图像的峰值信噪比, ISNR 为复原图像的改进信噪比。从表 1 中可以看出, 随着信噪比的增大, 复原图像 MSE 逐渐变小, PSNR 逐渐变大, 表明与退化图像相比, 复原图像越来越逼近高分辨力的目标图像; ISNR 始终大于 0, 表明与退化图像相比, 复原图像质量得到改善, 并且随着信噪比的增大, 改善程度逐渐增大, 算法的图像复原能力增强。

表 1 复原图像质量评价

Table 1 Simulation of restored image quality index

	MSE_d	MSE_r	$PSNR_d$	$PSNR_r$	ISNR
No noise	18×10^{-4}	7.4×10^{-4}	27.511 1	31.320 9	3.809 8
30 dB	28×10^{-4}	21×10^{-4}	25.579 2	26.727 3	1.141 8
40 dB	19×10^{-4}	10×10^{-4}	27.272 3	30.003 4	2.731 2
50 dB	18×10^{-4}	7.9×10^{-4}	27.487 2	31.049 2	3.562 1

从图 1 和表 1 中可以看出, 相比于退化图像, 复原图像有效地减少并消除了振荡条纹和噪声, 增强了图像细节的复原, 本文所用的 MPML 超分辨图像复原算法, 可以对图像噪声进行有效的抑制, 尤其当系统信噪比 > 40 dB 时, 超分辨图像复原效果显著。

3 实验部分

依照共焦拉曼光谱技术原理, 本课题组自行搭建了共焦

拉曼光谱仪。其中, 选用波长为 532 nm 的激光器做为激发光源, 选用 Olympus 公司 $100\times$ (NA=0.9) 的显微物镜做为聚焦物镜, 选用 Semrock 公司滤光片分离拉曼光谱与瑞利光, 光谱 CCD 选用 Andor 公司的背照射型 CCD, XY 二维扫描台选用 PI(Physik Instrumente)公司的压电驱动高精度电动二维平移台。

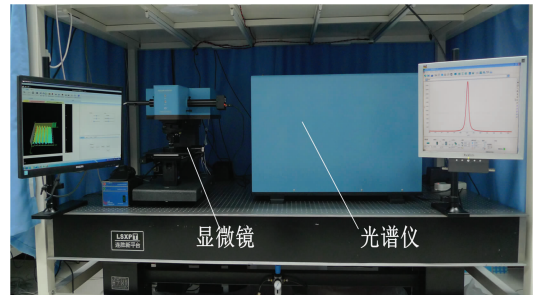


图 2 共焦拉曼光谱系统

Fig. 2 Homemade confocal Raman microscopy system

实验所用样品采用电子束光刻技术制备而成, 图形为周期 200 nm 的台阶。样品基底为拉曼光谱效应明显的 Si, 样品图形材料为 PMMA。本文获得的拉曼光谱图像为对 Si 的 520.7 cm^{-1} 拉曼峰进行光谱成像所得。

4 结果与讨论

图 3 是利用图 2 构建的共焦拉曼光谱系统对实验样品进行成像所获得的光谱图像。其中, 图像尺寸为 60×30 像素, X 和 Y 方向扫描间隔分别为 15nm, 图中每个像素分别代表 15 nm。

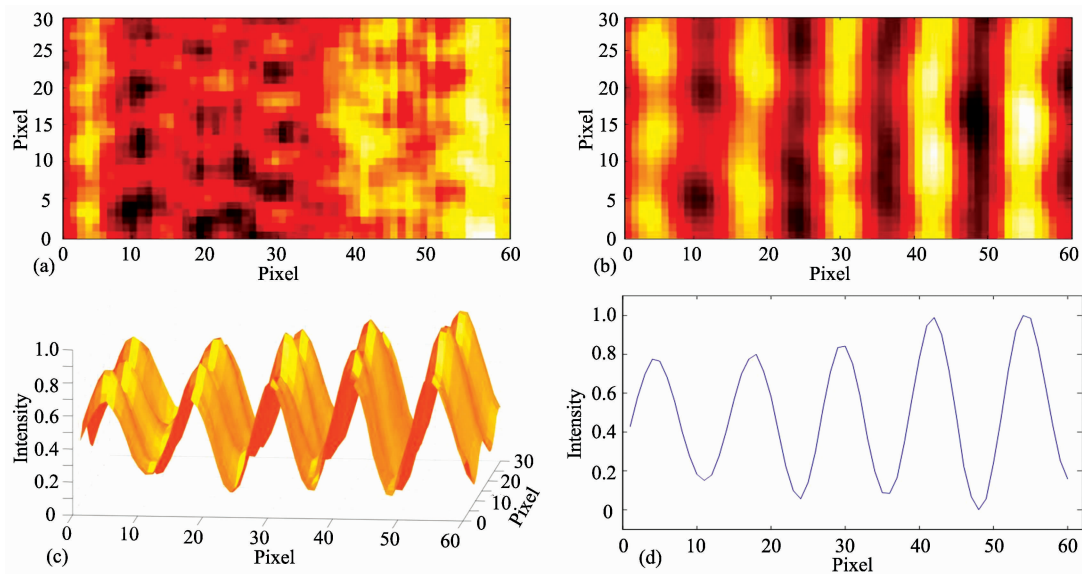


图 3 超分辨图像复原实验结果

(a): 实验采集结果, 拉曼峰@ 520.7 cm^{-1} 成像结果; (b): 复原图; (c): 复原图三维图; (d) 图(b)图像截面轮廓图

Fig. 3 Super-resolution image restoration result

(a): Degraded image (mapping @ 520.7 cm^{-1}); (b): Restored image;

(c): Three-dimensional restored image; (d): Representative cross-sectional line profiles taken in (b)

从图 3(a)中可以看出,实验系统获得的结果不能反映样品形貌,无法分辨周期为 200 nm 的实验样品,而图 3(b)所示的复原图像,在经过超分辨图像复原处理后,基本可以反映样品的轮廓形貌,图像信噪比大幅提升,边缘清晰度得到改善。从图 3(d)中可以看出图形基本轮廓,成功分辨出周期 200 nm 样品形貌。因而,如图 3(d)所示,经过超分辨图像复原后,共焦拉曼光谱系统可以分辨周期为 200 nm 的样品,系统空间分辨力达到 200 nm。图 3(c)为复原图像的三维图。

共焦拉曼光谱系统理论空间分辨力可通过式(4)获得,经计算可知,本实验系统理论空间分辨力为 254 nm。

$$R = \frac{0.43\lambda}{NA} \quad (4)$$

根据图 3 和公式(4)可知,经过超分辨图像复原后,共焦拉曼光谱系统空间分辨力达到 200 nm,突破了共焦拉曼光谱系统空间分辨力的理论极限,实现了系统的超分辨成像。

References

- [1] Geraldine, Paulus L C, Lee K Y, et al. Scientific Reports, 2014, 4: 6865.
- [2] Lambert D, Muehlethaler C, Massonnet G, et al. Journal of Raman Spectroscopy, 2014, 45(11-12): 1285.
- [3] Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M, et al. Nature Protocols, 2012, 7: 1694.
- [4] Francois Courtecuisse, Céline Dietlin, Céline Croutxé-Barghorn, et al. Applied Spectroscopy, 2011, 65(10): 1126.
- [5] Watanabe K, Palonpon A F, Fujita K, et al. Nature Communications, 2015, 6: 10095.
- [6] Zhang S, Zhang Y, Dong Z, et al. Nature, 2013, 498: 82.
- [7] Jiang N, Foley E T, Klingsporn J M, et al. Nano Letters, 2012, 12(10): 5061.
- [8] Harris J L. Journal of the Optical Society of America, 1964, 54(7): 931.
- [9] Goodman J. Introduction to Fourier Optics(傅里叶光学导论). McGraw Hill, 1968.
- [10] Ludwig Ritschl, Frank Bergner, Christof Fleischmann, et al. Physics in Medicine and Biology, 2011, 56(6): 154.
- [11] Cynthia H McCollough, Shuai Leng, Johan Sunnegardh, et al. Medical Physics, 2013, 19(17): 16410.
- [12] Linnea Ahlinder, Susanne Wiklund Lindström, Christian Lejone, et al. Nanomaterials, 2016, 40: 061904.
- [13] SU Bing-hua, JIN Wei-qi(苏秉华, 金伟其). Acta Electronica Sinica(电子学报), 2003, 31(1): 41.

Confocal Raman Image Method with Maximum Likelihood Method

CUI Han¹, WANG Yun^{1*}, QIU Li-rong¹, ZHAO Wei-qian¹, ZHU Ke²

1. Beijing Key Lab for Precision Optoelectronic Measurement Instrument and Technology, School of Optoelectronics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China
2. Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract With the increasing interest in nano microscopic area, such as DNA sequencing, micro structure detection of molecular nano devices, a higher requirement for the spatial resolution of Raman spectroscopy is demanded. However, because of the weak Raman signal, the pinhole size of confocal Raman microscopy is usually a few hundreds microns to ensure a relatively higher spectrum throughput, but the large pinhole size limits the improvements of spatial resolution of confocal Raman spectroscopy. As a result, the conventional confocal Raman spectroscopy has been unable to meet the needs of science development. Therefore, a confocal Raman image method with Maximum Likelihood image restoration algorithm based on the conventional confocal Raman microscope is proposed. This method combines super-resolution image restoration technology and confocal Raman microscopy to realize super-resolution imaging, by using Maximum Likelihood image restoration algorithm based on Poisson-Markov model to conduct image restoration processing on the Raman image, and the high frequency information of the image is recovered, and then the spatial resolution of Raman image is improved and the super-resolution image is realized. Simulation analyses and experimental results indicate that the proposed confocal Raman image method with Maximum Likelihood image restoration algorithm

5 结 论

基于现有共焦拉曼光谱系统,结合实际需求,本文提出了一种基于 MPML 方法的共焦拉曼光谱成像新方法。实验和分析表明,该方法在不改变现有共焦拉曼光谱系统的光学结构和降低光谱探测灵敏度的前提下,仅对单幅拉曼光谱图像进行超分辨图像复原处理,可将共焦拉曼光谱系统空间分辨力提高到 200 nm,解决了共焦拉曼光谱系统无法兼顾系统空间分辨力和光谱探测灵敏度的矛盾。该超分辨图像复原共焦拉曼光谱成像方法的提出为共焦拉曼光谱技术空间分辨能力的改善提供了一条新途径,同时也为拉曼光谱技术在物理化学、材料科学、生物医学等领域的进一步应用提供了保证。

can improve the spatial resolution to 200 nm without losing any Raman spectral signal under the same condition with conventional confocal Raman microscopy, moreover it has strong noise suppression capability. In conclusion, the method can provide a new approach for material science, life sciences, biomedicine and other frontiers areas. This method is an effective confocal Raman image method with high spatial resolution.

Keywords Confocal Raman; Maximum Likelihood; Super-resolution; Image restoration

(Received May 5, 2016; accepted Oct. 20, 2016)

* Corresponding author