

Řešitel (jméno vč. titulů)	Václav Petrák, <i>Ing., Ph.D.</i>
Název projektu	Ramanova spektroskopie pro biomedicínské aplikace
Katedra (pracoviště) FBMI	Katedra přírodovědných oborů
Adresa pracoviště	náměstí Sítňá 3105, Kročehlavy, 272 01 Kladno
E-mail adresa	vaclav.petrak@fbmi.cvut.cz
Telefon	725 878 390

Laboratorní úlohy

Experimentální úloha 1: Základní charakterizace látek

Laboratorní měření

- Vyberte si vzorky alespoň 5 chemikálií v uzavřených kyvetách. Zaznamenejte si označení.
- Umístěte vzorek do držáku kyvet a pomocí programu *Spectrum Analyzer*, který ovládá Ramanův spektrometr změřte spektrum s akvizičním časem 1 minuta.
- Spektra si uložte pod vhodným názvem a výsledek exportujte do CSV.

Zpracování dat

- Spektra si načtěte do programu dle Vaší preference, ve kterém budete data dále zpracovávat. Data lze zpracovat například v programech Matlab, R, nebo Python. Začátečníci mohou využít MS Excel.
- Spektra normalizujte, tak aby maximální hodnota ve spektru byla 0 a maximální hodnota 1.
- Spektra si zobrazte a porovnejte s referenčními spektry která jsou k dispozici pro dané látky. Odečtěte vlnové píky spektra

Otázky a diskuse

- 1) Mají některé materiály stejné píky? Jaké části spektra se naopak liší?
- 2) Zkuste vyhledat jakým funkčním skupinám odpovídají píky ve spektru a výsledky porovnejte se strukturou molekuly.
- 3) Zkuste vymyslet, pro jaké aplikace lze využít identifikaci látek na základě Ramanova spektra. Uvažujte i situaci kdy máte pevný vzorek a můžete povrch mapovat (získat spektrum z libovolného bodu)

Experimentální úloha 2: Identifikace neznámé látky

Laboratorní měření

- Vyberte si vzorky označené ethanol, methanol, isopropyl alcohol, aceton a čtyři kyvetách označené jako A, B, C a D.
- Umístěte vzorek do držáku kyvet a pomocí programu *Spectrum Analyzer*, který ovládá Ramanův spektrometru změřte spektrum s akvizičním časem 1 minuta.
- Spektra si uložte pod vhodným názvem a výsledek exportujte do CSV.

Zpracování dat

- Spektra si načtěte do programu dle Vaší preference, ve kterém budete data dále zpracovávat. Data lze zpracovat například v programech Matlab, R, nebo Python. Začátečníci mohou využít MS Excel.
- Spektra normalizujte, tak aby maximální hodnota ve spektru byla 0 a maximální hodnota 1.
- Zobrazte každé spektrum si zobrazte samostatně.
- Zkuste určit jaká látka je v kyvetách A až D.
- Zobrazte spektrum dané látky a spektrum látky z dané kyvety v jednom spektru.

Otázky a diskuse

- 1) Podařilo se Vám identifikovat všechny látky? Jak velkou důvěru máte ve výsledky?
- 2) Zamyslete se, v jakých aplikacích by se dala využít identifikace neznámých látek pomocí Ramanovy spektroskopie.

Experimentální úloha 3: Vliv doby akvizice na spektrum

Laboratorní měření

- Pro laboratorní úlohu si zvolte dva typy chemikálií v připravených kyvetách, například etanol a metanol.
- Umístěte vzorek do držáku kyvet a pomocí programu *Spectrum Analyzer*, který ovládá Ramanův spektrometr, změřte spektrum s akvizičním časem:
 - 5 sekund
 - 15 sekund
 - 30 sekund
 - 1 minuta
 - 5 minut
- Spektra si uložte pod vhodným názvem (například etanol_5sec) a výsledek exportujte do CSV.

Zpracování dat

- Spektra si načtěte do programu dle Vaší preference, ve kterém budete data dále zpracovávat. Data lze zpracovat například v programech Matlab, R, nebo Python. Začátečníci mohou využít MS Excel.
- Spektra normalizujte, tak aby maximální hodnota ve spektru byla 0 a maximální hodnota 1.
- Pokud je součástí spektra i nežádoucí pozadí (baseline), je nutné ho vhodným způsobem odečíst.
- Zobrazte vhodným způsobem spektra.

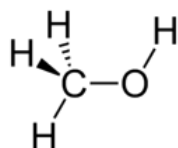
Diskuse

- 1) Na základě změřených výsledků diskutujte, jaký má vliv akviziční čas na kvalitu spektra.
- 2) Jedním ze způsobů, jak zvýšit kvalitu záznamu při stejném akvizičním čase je zvýšení intenzity laseru. Jaká rizika sebou ale nese zvýšení intenzity laseru?
- 3) Popište, jakými parametry by se

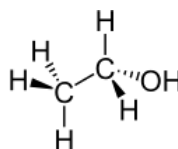
Experimentální úloha 4: Kvantifikace obsahu methanolu v ethanolu

Úvod

Detekce malých množství metanolu v ethanolu je vynikající demonstrací schopností Ramanovy spektroskopie, protože tyto dvě molekuly jsou si chemicky extrémně podobné a chovají se téměř identicky. To ztěžuje rozlišování mezi těmito dvěma molekulami pomocí tradičních laboratorních technik bez drahého vybavení, jako jsou chromatografy. Destilace je pravděpodobně jediný efektivní způsob, jak oddělit metanol od ethanolu. Strukturní vzorec methanolu (MeOH) a ethanolu (EtOH) je uveden na obrázku níže. Záměna těchto dvou může mít smrtelné následky, protože etanol se konzumuje jako lihovina, zatímco metanol je jedovatý,



Methanol



Ethanol

Přestože chemické chování těchto dvou molekul je téměř totožné, mají různé vibrační módy v důsledku přítomnosti (nebo nepřítomnosti) skupiny –CH₂–. Tento rozdíl ve vibračních režimech je patrný v Ramanově spektroskopii.

Laboratorní měření

- Pro laboratorní úlohu si vyberte vzorky čistého ethanolu a metanolu a pak vzorky s různým poměrem ethanolu a metanolu
- Umístěte vzorek do držáku kyvet a pomocí programu *Spectrum Analyzer*, který ovládá Ramanův spektrometr, změřte spektrum s akvizičním časem 1 minuta.
- Spektra si uložte pod vhodným názvem a výsledek exportujte do CSV.

Zpracování dat

- Spektra si načtěte do programu dle Vaší preference, ve kterém budete data dále zpracovávat. Data lze zpracovat například v programech Matlab, R, nebo Python. Začátečníci mohou využít MS Excel.
- Spektra normalizujte, tak aby maximální hodnota ve spektru byla 0 a maximální hodnota 1.
- Pokud je součástí spektra i nežádoucí pozadí (baseline), je nutné ho vhodným způsobem odečíst.
- Zobrazte si spektrum ethanolu a metanolu.

- Identifikujte, jaké části spektra jsou podobné a jaké unikátní. Identifikujte unikátní píky.
- Zobraďte spektra směsí etanolu a metanolu. Odečtěte poměr intenzity signálu v oblastech unikátních píků.
- Vytvořte graf závislosti poměru etanolu a metanolu na poměru intenzity signálu v oblastech unikátních píků.

Diskuse

- 1) Jaký
- 2) Jedním ze způsobů, jak zvýšit kvalitu záznamu při stejném akvizičním čase je zvýšení intenzity laseru. Jaká rizika sebou ale nese zvýšení intenzity laseru?
- 3) Popište, jakými parametry by se

Experimentální úloha 5: Vliv luminiscence

Laboratorní měření

- 1) Pro laboratorní úlohu si zvolte dva typy chemikálií v připravených kyvetách, například etanol a metanol.
- 2) Umístěte vzorek do držáku kyvet a pomocí programu *Spectrum Analyzer*, který ovládá Ramanův spektrometr, změřte spektrum s akvizičním časem:
 - a. 5 sekund
 - b. 15 sekund
 - c. 30 sekund
 - d. 1 minuta
 - e. 5 minut
- 3) Spektra si uložte pod vhodným názvem (například etanol_5sec) a výsledek exportujte do CSV.

Zpracování dat

- 3) Spektra si načtěte do programu dle Vaší preference, ve kterém budete data dále zpracovávat. Data lze zpracovat například v programech Matlab, R, nebo Python. Začátečníci mohou využít MS Excel.
- 4) Spektra normalizujte, tak aby maximální hodnota ve spektru byla 0 a maximální hodnota 1.
- 5) Pokud je součástí spektra i nežádoucí pozadí (baseline), je nutné ho vhodným způsobem odečíst.
- 6) Zobrazte vhodným způsobem spektra.

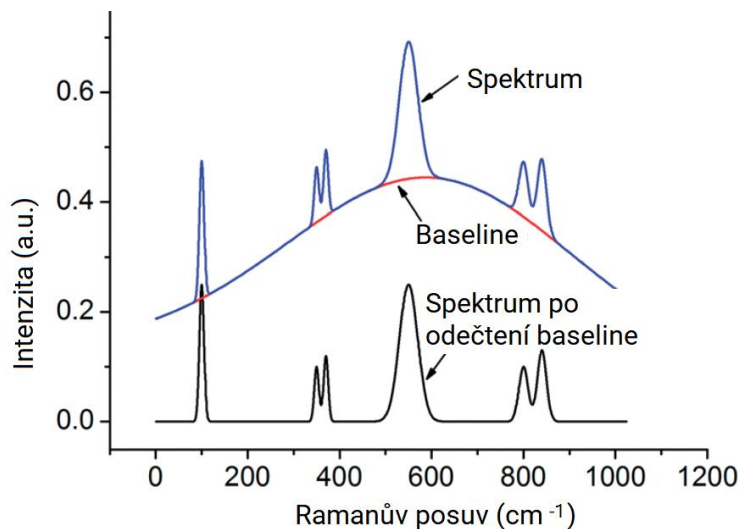
Diskuse

- 4) Na základě změřených výsledků diskutujte, jaký má vliv akviziční čas na kvalitu spektra.
- 5) Jedním ze způsobů, jak zvýšit kvalitu záznamu při stejném akvizičním čase je zvýšení intenzity laseru. Jaká rizika sebou ale nese zvýšení intenzity laseru?
- 6) Popište, jakými parametry by se

Úloha na zpracování dat 1: Odečtení pozadí

Úvod

Ramanova spektroskopie je rychlá analytická technologie a poskytuje podrobné spektroskopické informace složení materiálu. Je široce používán v potravinářství, materiálech, chemii, biochemii a dalších oborech pro kvalitativní nebo kvantitativní analytické účely. U mnoha typů Ramanových měření se však obvykle vyskytuje i nežádoucích prvky, jako je šum pozadí z držáku vzorku, přístroje a samotného vzorku. Jedná se o takzvanou *baseline*, na které je superponováno samostatné spektrum (užitečná informace). Přítomnost baseline ve spektru může k překročení detekčního limitu detektoru a tím ke znehodnocení měření. Proto se u měření snažíme přítomnost baseline eliminovat, například tím že jako držák vzorku využijeme materiál, který není luminiscenční. Také měříme v temné místnosti, aby se na detektor nedostalo okolní světlo. V některých případech ale přítomnosti baseline nelze zabránit. Pokud je zdrojem nežádoucího signálu samotný studovaný materiál nebo jeho zdroj nelze odstranit, je žádoucí baseline odstranit při zpracování dat. Správná korekce baselinie umožňuje odčíst hodnoty píků ve spektru a dovoluje snadno porovnat spektra mezi sebou. Odečtení pozadí bývá prvním krokem v analýze spektra. Identifikace baseline ve spektru je netriviální úloha, která může vést ke zkreslené výsledku. Dalším krokem ve zpracování dat bývá normalizace dat.



Obrázek Spektrum se zvýrazněnou baseline. Po odečtení baseline získáváme jen píky Ramanova spektra se kterými můžeme dále pracovat.

Postup

- Z Vámi naměřených dat identifikujte ty s největší baseline.
- Ve vámi zvoleném programu vyberte z dat pouze oblast, která obsahuje užitečný signál (píky). Zbytek spektra ořízněte.
- Na data fituje
 - 1) Křivku lineární regrese
 - 2) Polynom (vyzkoušejte několik řádů)
- Nafitovanou křivku odečtěte
- Výsledek zobrazte.

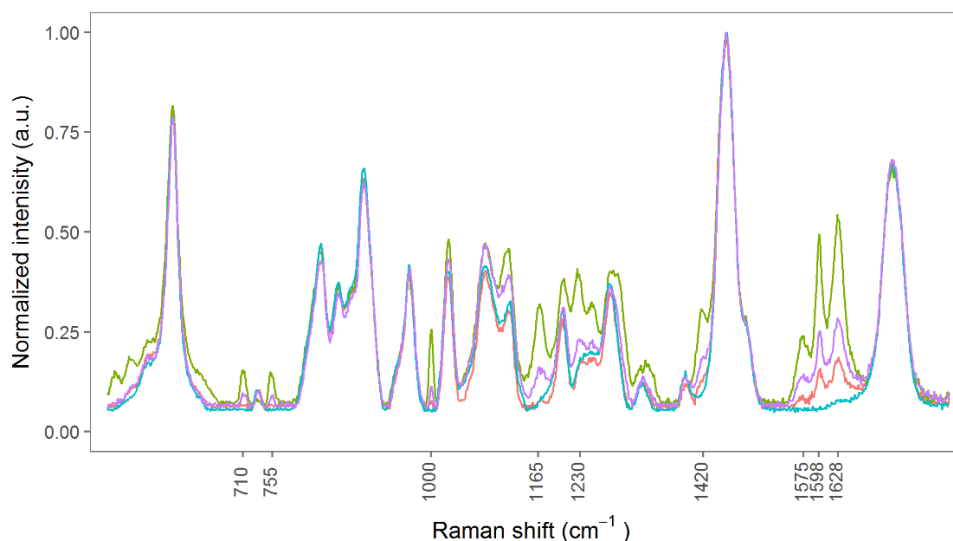
Diskuse

- 1) Jak dobře daná křivka reprezentuje baseline?
- 2) Jak může odečet baseline zkreslit výsledek?
- 3) Vyhledejte, jakým způsobem lze odečíst baseline. Diskutujte vhodnost použití jednotlivých přístupů pro Vaše data.

Úloha na zpracování dat 2: Normalizace spektra

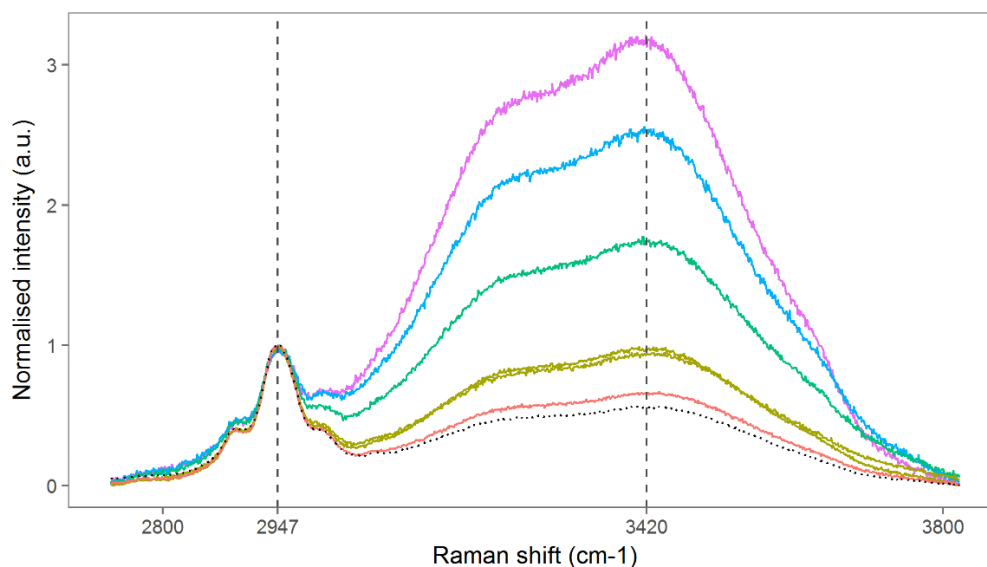
Úvod

Intenzita signálu při Ramanově spektroskopii je velmi proměnlivá. Závisí na výkonu laseru (který může kolísat), době akumulace signálu, orientaci vzorku (které může být proměnlivá), ostření, drobných změnách v nastavení optiky a jiných faktorech. Obvykle se tedy intenzita signálu neměří v absolutně, ale signál se normalizuje. Existuje několik přístupů k normalizaci. Nejjednodušší a často dostačující metodou je Min/Max normalizace, která posouvá minimální hodnotu ve spektrech na pozici 0 a hodnota 1 je přiřazena maximální intenzitě ve spektru. Díky normalizaci je možné snadno porovnat několik spekter, jak je patrné na obrázku níže. Na ose x se uvádí, že intenzita je normalizovaná. Jako jednotky se použijí *arbitrary units (a.u.)*



Obrázek 1 Normalizace metodou Min/Max umožňuje porovnat několik spekter.

Další možností je normalizovat data podle hodnoty určitého píku. V tomto případě se minimální hodnota ve spektrech posouvá na pozici 0 a hodnota 1 je přiřazena maximální intenzitě zvoleného píku.



Obrázek 2 Příklad normalizace spekter dle píku s intenzitou 2947 cm⁻¹

Postup

- Vyberte alespoň dva záznamy ze stejného vzorky.
- Vzorky normalizujte metodou Min-Max
 - 1) Nalezněte minimální hodnotu ve spektru a minimální hodnotu **odečtěte** ve všech bodech spektra.
 - 2) Poté nalezněte maximální hodnotu v již upraveném spektru a maximální hodnotu vydělte všechny body spektra.
- Vzorky normalizujte dle zvoleného píku.
 - 1) Nalezněte minimální hodnotu ve spektru a minimální hodnotu **odečtěte** ve všech bodech spektra.
 - 2) Poté zvolte pík, podle kterého chcete normalizovat a nalezněte maximální hodnotu v oblasti kde spektra kde se nachází vrchol Vámi zvoleného píku. Identifikovanou hodnotu vydělte všechny body spektra.

Úloha na zpracování dat 3: Přepočet vlnočtu na vlnovou délku

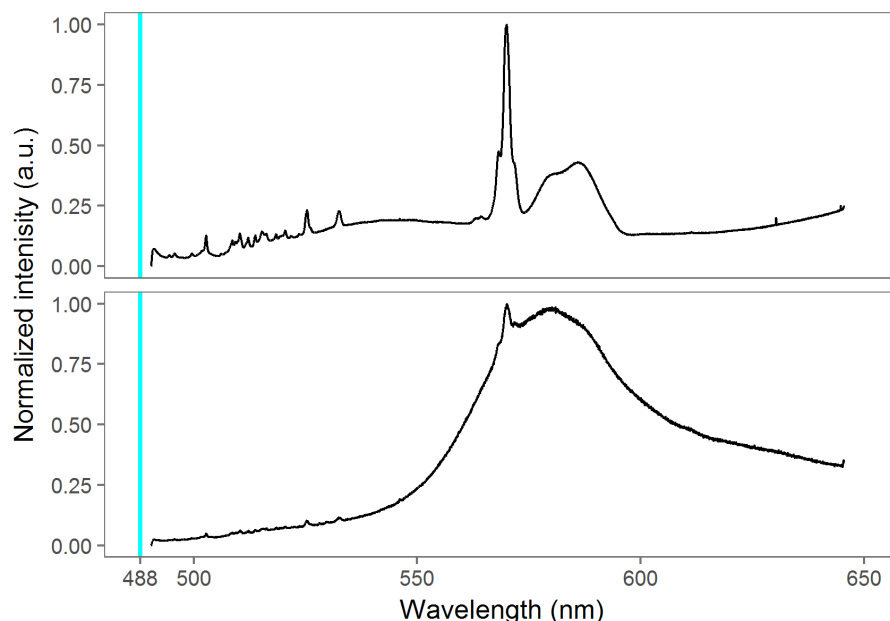
Úvod

Data v Ramanově spektroskopii jsou standardně zaznamenávána ve vlnočtech relativně k excitačnímu paprsku. Zajímá nás fluorescence pozadí, z exprese je vhodné vyjádřit měřítko v absolutní vlnové délce

$$\sigma_{Raman}[cm^{-1}] = \frac{10^7}{\lambda_{exc}[nm]} - \frac{10^7}{\lambda_{scattered}[nm]} \quad (1)$$

, kde σ_{Raman} je vlnové číslo zaznamenaného signálu, λ_{exc} je vlnová délka excitace $\lambda_{scattered}$ je vlnová délka rozptýleného světla.

Tento vzorec byl použit k přepočtu měřítka na obrázku níže, kde je silný fluorescenční rušení.



Obrázek 3 Ramanův spektroskop může být použita jako fluorescenční spektroskop. Vlnová délka excitace 488 nm je označena modrou čarou. Osa x byla přepočítána na absolutní vlnovou délku pro lepší posouzení fluorescenčního spektra

Postup

- Vyberte libovolné spektrum.
- Přepočítejte vlnočty na vlnovou délku dle vzorce (1) v úvodní části této úlohy.
- Zobrazte spektrum s vlnovou délkou na ose y.

Diskuse

- 1) Proč se v Ramanově spektroskopii používá vlnočty, a ne vlnová délka? (Informaci si vyhledejte)
- 2) Jak by se změnila vlnová délka v grafu pro jinou excitaci?

Úloha na zpracování dat 4: Vyhlazení signálu

Úvod

Pokud je spektrum zatíženo vysokým šumem v signálu, může překryt užitečný informační obsah. Je žádoucí upravit experimentální podmínky (zvýšit výkon laseru, dobu záznamu, typ čočky, chlazení detektoru kapalným dusíkem) pro získání čistého signálu s vysokým poměrem signálu k nosu. Pokud to není možné, vyhlazení signálu může pomoci odhalit požadované informace. Protože šum v signálu má vysokou frekvenci, je potlačení šumu obvykle realizováno pomocí vysokofrekvenčního filtrování (klouzavý průměr, pohyblivý medián, filtr založený na fft, Savitzky - Golayův filtr). Filtrovat je potřeba opatrně, protože filtrování může snadno pozměnit nebo odstranit užitečný signál, který nese informaci. Pro kontrolu je důležité zobrazit si původní a filtrovaný signál v jednom obrázku.

Alternativou k vyhlazení signálu může být průměrování spekter. (Pokud je k dispozici více záznamů).

Postup

- Vyberte si spektrum s velkým šumem.
- V MS Excel můžete v grafu aplikovat klouzavý průměr. Experimentujte s nastavením filtru a zvolte velikost filtru, která je podle Vás optimální. Filtr by měl redukovat šum ale jen minimálně zkreslovat užitečný signál. Můžete využít i jiný program.
- Zobrazte původní a filtrované spektrum.
- V programu Matlab, R nebo Python zkuste aplikovat jiné typy filtrů.

Diskuse

- Jaký má efekt filtru pozorujete na spektru?
- K jakému zkreslení užitečného signálu může při vyhlazení spektra dojít?