



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU JAKO TECHNIKA PRO PRVKOVOU ANALÝZU MĚKKÝCH BIOLOGICKÝCH TKÁNÍ

LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY AS A TECHNIQUE FOR ELEMENTAL ANALYSIS OF
SOFT BIOLOGICAL TISSUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vojtěch Fedra

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1908/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Vojtěch Fedra**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu jako technika pro prvkovou analýzu měkkých biologických tkání

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární rešerši na téma využití spektroskopie laserem buzeného plazmatu v prvkové analýze měkkých tkání.
2. Prostudujte téma interakce laseru s biologickou měkkou tkání.
3. Optimalizujte parametry měření měkkých tkání pomocí metody LIBS.
4. Zpracujte a vyhodnoťte výsledky LIBS analýzy.
5. Stanovte optimální parametry pro jednotlivé vlnové délky laseru a vzájemně je porovnejte.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Vojtěch Fedra
student

doc. Ing. Zdenka Kozáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací vybraných parametrů měření pro analýzu měkkých tkání pomocí spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Technikou LIBS byly zkoumány hodnoty SNR (poměr signál/šum pro spektrální iontovou čáru Ca II 393,37 nm) pro různé kombinace nastavení. Pro analýzy byl vybrán laser o vlnové délce 266 nm a laser o vlnové délce 1064 nm, různé hodnoty energie pulzu laseru, času zpoždění sběru signálu a pro různou atmosféru v ablační komoře (bez a s ofukem vzorku proudem argonu). Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím laseru s vlnovou délkou 1064 nm a aplikací ofuku vzorku argonem, což vedlo k výraznému zlepšení SNR. Výsledky práce jsou užitečné pro další výzkum v oblasti analýzy měkkých tkání pomocí metody LIBS.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the optimization of selected measurement parameters for soft tissue analysis using the laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) method. The SNR values (signal-to-noise ratio for spectral ion line Ca II 393,37 nm) were investigated by the LIBS technique for a combination of settings. For the analyses, a laser with a wavelength of 266 nm and a laser with a wavelength of 1064 nm, different values of laser pulse energy, gate delay and for different atmosphere in the ablation chamber (without and with argon purge) were selected. The best results were obtained by using a 1064 nm laser and with argon purge, which led to a significant improvement in SNR. The results of the work are useful for further analysis of soft tissues using the LIBS method.

KLÍČOVÁ SLOVA

LIBS, optimalizace, nanosekundový laser, myší játra

KEYWORDS

LIBS, optimization, nanosecond laser, mouse liver

FEDRA, Vojtěch. *Spektroskopie laserem buzeného plazmatu jako technika pro prvkovou analýzu měkkých biologických tkání*. Brno, 2024. 38 s. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156162>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

V první řadě bych chtěl velmi poděkovat Ing. Haně Kopřivové za její pomoc, odborné rady a věnovaný čas během psaní této bakalářské práce. Také bych rád poděkoval své vedoucí práce, doc. Ing. Zdence Kozákové, Ph.D., za ochotu a cenné připomínky. Poděkování patří i doc. Ing. Pavlovi Pořízkovi, Ph.D. za jeho konzultace a také Ing. Petrovi Šperkovi, Ph.D. za pomoc při měření na profilometru. Na závěr bych chtěl poděkovat rodině a přátelům za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Spektroskopie	8
2.1.1	Optická emisní spektroskopie	9
2.2	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu	10
2.2.1	Princip metody	10
2.2.2	Instrumentace.....	11
2.2.3	Aplikace LIBS	12
2.2.4	Biomedicínské využití LIBS	13
2.3	Interakce biologické tkáně s laserem	14
2.3.1	Měkké tkáně	15
2.3.2	Analýza měkkých tkání pomocí LIBS.....	16
2.3.3	Optimalizace interakce biologické tkáně s laserem	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Příprava vzorků.....	19
3.1.1	Zkoumané vzorky	19
3.2	Použité přístroje a software	20
3.3	Měření pomocí metody LIBS	20
3.3.1	Instrumentace.....	20
3.3.2	Pracovní postup.....	21
3.3.3	Zpracování dat	22
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1	Vlnová délka 266 nm	24
4.1.1	Ofuk vzorku argonem.....	24
4.1.2	Laboratorní podmínky	26
4.2	Vlnová délka 1064 nm	28
4.2.1	Ofuk vzorku argonem.....	28
4.2.2	Laboratorní podmínky	30

4.3	Optimální nastavení	33
5	ZÁVĚR	34
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	35
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	38

1 ÚVOD

Biologické měkké tkáně představují komplexní systémy, jejichž složení a struktura jsou hlavními, a tedy klíčovými faktory pro pochopení různých fyziologických procesů. Další důležitou roli znamenají také pro případnou diagnostiku patologických stavů. Vzhledem k jejich heterogenitě a složité povaze je analýza biologických měkkých tkání dlouhodobou výzvou pro vědce a výzkumníky v oblasti biomedicíny a biochemie. V tomto kontextu se spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) jeví jako slibná technika pro rychlou a přesnou prvkovou analýzu biologických tkání.

LIBS, metoda založená na principu excitace a emise elektromagnetického záření z plazmatu generovaného laserovým impulzem, nabízí několik zásadních výhod pro analýzu biologických vzorků, a tedy i měkkých tkání. Jednou z hlavních výhod je krátká časová náročnost měření, které trvá v řádech sekund. Další neméně důležitou výhodou je fakt, že se jedná o metodu, jež dokáže zobrazovat prvkové mapy, které slouží k vizualizaci distribuce prvků v biologických tkáních.

Cílem této bakalářské práce je identifikovat a optimalizovat experimentální podmínky pro měření měkkých biologických tkání metodou LIBS. Práce se v teoretické části zaměří na základní informace o metodě LIBS a také na zhodnocení dosavadních výzkumných studií a experimentů v této oblasti, s důrazem na nalezení optimálních parametrů laserového systému. Nalezení optimálních parametrů, jako je například energie pulzu, vlnová délka laseru nebo časování sběru dat, vede k maximalizaci citlivosti a přesnosti analýzy.

Tato práce přináší přehled současného stavu poznání v oblasti aplikace LIBS pro analýzu biologických měkkých tkání. Závěry této práce by mohly poskytnout cenný příspěvek k rozvoji techniky LIBS jako významného nástroje pro prvkovou analýzu měkkých biologických tkání s potenciálem využití v diagnostických aplikacích v biomedicině.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Spektroskopie

Spektroskopie je definována jako věda, která se zabývá interakcemi mezi světlem neboli elektromagnetickým zářením a hmotou. Elektromagnetické záření je popisováno jako vlnění magnetického a elektrického pole, kdy vektory těchto složek jsou na sebe kolmé. Elektromagnetické vlnění se dělí podle velikosti vlnových délek na různé druhy, mezi kterými nejsou ostré hranice a přechody mezi nimi jsou plynulé (γ – gama, RTG – rentgenové, UV – ultrafialové, VIS – viditelné, IR – infračervené, mikrovlnné a rádiové záření). Výsledkem spektroskopických měření je spektrum čili závislost intenzity elektromagnetického záření na vlnové délce [1].

Spektroskopické metody lze dělit podle různých aspektů. Nejzákladnějším dělením spektroskopických metod je na spektrální a nespektrální metody, kdy u nespektrálních metod nedochází k výměně energie. Pozoruje se změna některých vlastností záření (změny rychlosti záření, otáčení roviny polarizovaného světla, rozptyl záření), tudíž nevzniká spektrum. Příkladem může být refraktometrie, polarimetrie apod. U spektrálních metod již dochází k výměně energie a výsledkem je spektrum. Ovšem nejpodstatnějším dělením spektrálních metod je na techniky absorpční a emisní. Mezi další dělení patří podle typu přenosu energie mezi fotonem a analyzovanou matricí (Tabulka 1) nebo podle typu zkoumaných částic se také může dále dělit na atomovou spektroskopii a molekulovou spektroskopii. Právě atomová emisní spektroskopie neboli optická emisní spektroskopie je pro tuto bakalářskou práci důležitá, neboť se pod ní řadí spektroskopie laserem buzeného plazmatu [2].

Interakce záření s hmotou se využívá k získání kvalitativních i kvantitativních informací o vzorku. Analyt je původně ve svém nejnižším energetickém stavu (základní stav) a po dodání energie v různé formě (tepla, světla, elektrické energie, chemické reakce atd.) přejde analyt do vyššího energetického neboli do excitovaného stavu. Velikost energie, kterou látka je schopna absorbovat, je přesně kvantována v závislosti na elektronové konfiguraci látky. Měření elektromagnetického záření emitovaného při návratu do základního stavu nebo měření množství elektromagnetického záření absorbovaného potažmo rozptýleného v důsledku excitace jsou získány informace o analytu [2] [3].

Tyto spektroskopické techniky tedy slouží k popisu struktury zkoumaných látek s vysokou citlivostí, a proto mají široké uplatnění nejen v analytické chemii. Velký význam mají také například ve fyzice, biologii, medicíně, potravinářství a v mnoha dalších technických vědách [1].

Tabulka 1: Rozdělení spektroskopických metod zahrnujících výměnu energie mezi fotonem a vzorkem [3].

Typ přenosu energie	Region v elektromagnetickém spektru (rozsah vlnových délek)	Spektroskopická metoda
absorpce	γ záření ($\lambda < 1$ pm)	Mossbauerova spektrometrie
	RTG záření (1 pm – 10 nm)	RTG spektrometrie
	UV-VIS (10 nm – 790 nm)	UV-VIS spektrometrie
	IR (780 nm – 0,3 mm)	Infračervená spektrometrie
	mikrovlnné záření (0,03 mm – 1 m)	Ramanova spektrometrie
	rádiové vlny (1 m – 30 km)	Elektronová paramagnetická rezonance
Nukleární magnetická rezonance		
emise (tepelná excitace)	UV-VIS (10 nm – 790 nm)	Optická emisní spektrometrie
fotoluminiscence	RTG záření (1 pm – 10 nm)	RTG fluorescence
	UV-VIS (10 nm – 790 nm)	Fluorescenční spektrometrie
		Fosforescenční spektrometrie
	Atomová fluorescenční spektrometrie	
chemiluminiscence	UV-VIS (10 nm – 790 nm)	Chemiluminiscenční metody

2.1.1 Optická emisní spektroskopie

Optická emisní spektroskopie (OES – *Optical Emission Spectrometry*) nebo také atomová emisní spektroskopie (AES – *Atomic Emission Spectrometry*) je jedna ze základních spektroskopických metod chemické analýzy. Tato analytická metoda je založena na principu sledování emise elektromagnetického záření vzorku při přechodu z excitovaného stavu do základního. Výsledkem AES je emisní spektrum s čárovým charakterem, který je charakteristický pro daný prvek (vlnové délky čar jsou tabelovány). Počet čar ve spektru roste s počtem elektronů na valenčních hladinách [2].

Analyt je potřeba atomizovat a excitovat, čehož lze dosáhnout pomocí budících zdrojů, které předávají analytu energii, nejčastěji tepelnou nebo elektrickou energii. Právě podle typu

budících zdrojů se rozlišují různé typy OES jako například AES s indukčně vázaným plazmatem nebo spektroskopie laserem buzeného plazmatu. Doba životnosti systému v excitovaném stavu je krátká, a proto velmi rychle následuje deexcitace, kdy se systém navrací do stavu s nižší energií emisí kvanta energie odpovídající rozdílu energetických hladin. Vyzářené elektromagnetické záření slouží k charakterizaci zkoumaného systému [4].

Pomocí analytických čar, které jsou charakteristické pro každý prvek, se vyhodnocuje buď kvalitativní anebo kvantitativní analýza podle intenzity emitovaného záření. Kvalitativní analýza se provádí pomocí polohy spektrálních čar (polohy vlnové délky) a kvantitativní analýza se provádí pomocí metody kalibrační křivky, která udává intenzitu emitovaného záření v závislosti na koncentraci [2].

Dříve se metody optické emisní spektroskopie používaly převážně ke stanovení nekovových prvků jako je fosfor nebo uhlík. Dnes se používají například k detekci různých chemických látek a stopových prvků (odpadní vody, analýza biologických materiálů, kontrola výrobků...) [2].

2.2 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (zkráceně LIBS – *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) je analytická metoda, která spadá pod AES a jejímž budícím zdrojem je vysoce energetický laser (laserový pulz). Jedná se o velmi citlivou analýzu a zároveň dochází pouze k minimálnímu poškození analytu [5].

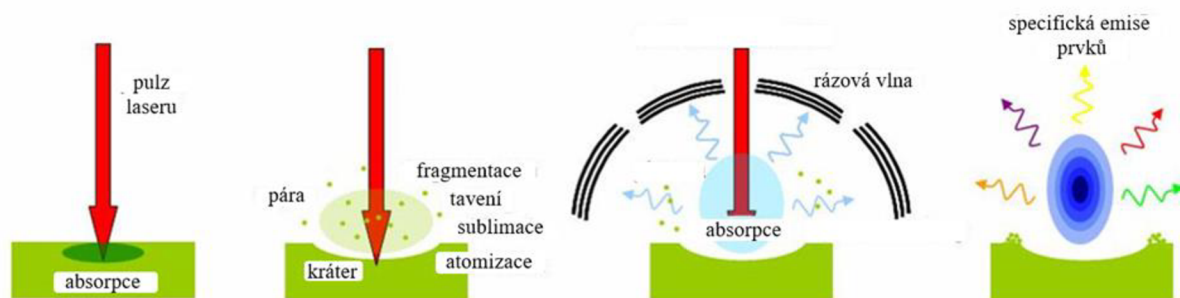
LIBS je poměrně novodobá metoda, která vznikla pár let po sestrojení prvního laseru, jenž byl sestaven v roce 1960. Je tedy logické, že stále dochází k různým inovacím této techniky. Například dochází ke kombinování laserové ablace s dalšími různými analytickými metodami. Často používaná kombinovaná metoda je laserová ablace s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu (LA-ICP-MS – *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) [6],[5].

2.2.1 Princip metody

Analýza pomocí LIBS je založena na interakci laserového pulzu s analyzovaným materiálem. Laserový paprsek je zaměřen na povrch vzorku, což vyvolá v krátkém čase značnou depozici energie (ozáření neboli výkon na jednotku plochy). Tato fokusace laseru vede k laserové ablaci [5].

Laserové ablaci je proces, který závisí na vlastnostech laserového paprsku, konfiguraci laserového systému a na optických a tepelných vlastnostech materiálu substrátu. Jakmile laserové záření dopadne na povrch substrátu, tak substrát absorbuje energii získanou z fotonů, a to způsobí prudkou generaci tepla, které se přenáší do blízkého okolí materiálu. Teplo způsobí odpaření substrátu a vznik ablačního kráteru. Odpařený materiál dá za vznik rázové vlně, kdy je nadále osvětlován laserovým pulzem, což vyvolá silné zahřívání, ionizaci a tvorbu plazmatu. Plazmový oblak je charakterizován rychlou expanzí a následným ochlazováním, při kterém dochází k deexcitaci částic a s tím související emisí fotonů [7]. Proces laserové ablaci je znázorněn na Obrázku 1.

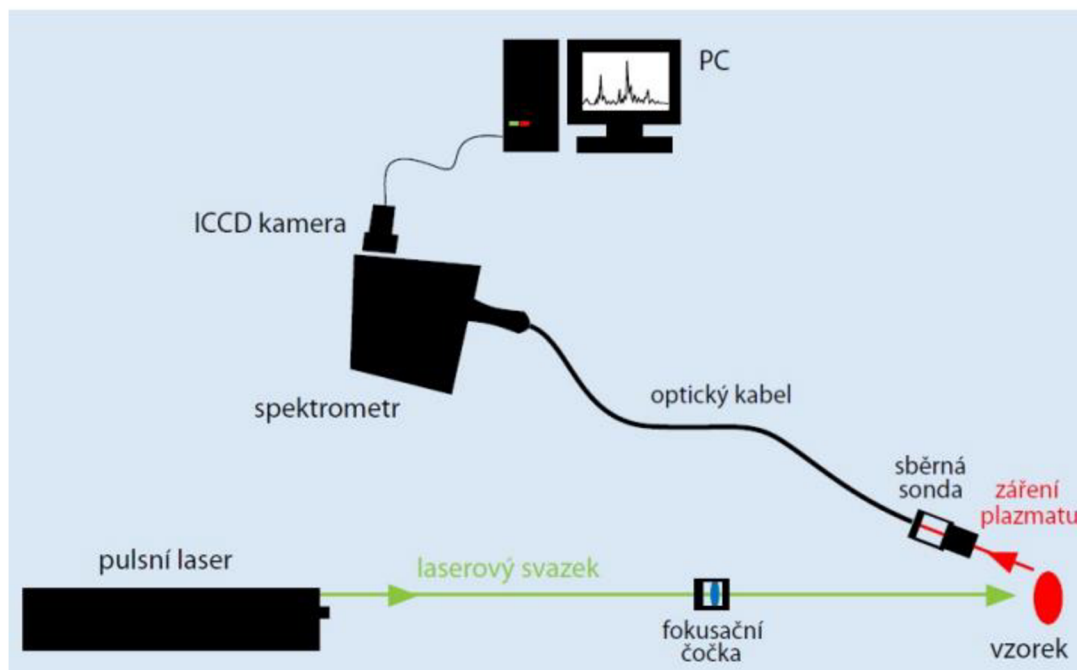
Tyto emise jsou zpracovány v měřícím systému, jejímž výsledkem jsou spektrální emisní čáry, jejichž charakteristiky a související energetické hladiny jsou pro každý atom charakteristické. Sběr záření z plazmatu a analýza jeho spektra tak umožňuje z databází produkovaných emisních čar identifikovat prvky přítomné v plazmatu, a tedy i v analyzovaném vzorku. Podle intenzity záření dané atomové čáry lze pak u některých materiálů zjistit také koncentraci jednotlivých prvků v analytu [8].



Obrázek 1: Schéma principu metody LIBS [9]

2.2.2 Instrumentace

Aparatura LIBS je v porovnání s již zmíněnými kombinovanými analytickými metodami na sestavení jednodušší, a tím pádem i z ekonomického hlediska levnější. Základ aparatury je tvořen čtyřmi objekty: pulzní laser, zaostřovací optika, snímací optika a spektrometr vybavený detektorem synchronizovaným s laserovým pulzem (viz Obrázek 2) [5].



Obrázek 2: Aparatura LIBS [5]

Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) slouží jako optický zdroj emitující úzký svazek fotonů. Významnými vlastnostmi laserového záření jsou jeho

koherentnost, vysoká intenzita a monochromaticnost, což znamená, že vyzařované elektromagnetické záření má jednu stejnou vlnovou délku. Lasery se dělí podle různých kritérií jako například podle režimu na kontinuální nebo pulzní a také například podle typu aktivního prostředí (pevná látka, kapalina nebo plyn) [8]. Nejpoužívanějším typem pevnolátkového laseru je Nd:YAG laser (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ – aktivním materiálem je izotropní krystal yttrito-hlinitého granátu dopovaný ionty neodymu). Nd:YAG lasery obvykle emitují světlo s vlnovou délkou 1064 nm, tedy v infračervené oblasti. Ve výsledném záření se nachází i vlnová délka poloviční, 532 nm, tj. druhá harmonická frekvence, kterou lze docílit použitím speciálních krystalů, a tímto způsobem mohou vzniknout i další vyšší harmonické frekvence laseru (např. čtvrtá harmonická – 266 nm) [10].

Zaostření laserového paprsku na vzorek je docíleno pomocí fokusační optiky, což v nejjednodušším případě může zajišťovat fokusační čočka. Samozřejmě existují i složitější aparatury, při kterých se využívají speciální objektivy, které jsou schopny nastavit různý průměr ozařované plochy. V mobilních přístrojích se lze setkat s vedením laserového pulzu ke vzorku pomocí optického vlákna [5].

Snímací optika slouží k přenosu emitovaného elektromagnetického záření plazmatu do spektrometru. Toho lze opět docílit pouhou čočkou, avšak používanější způsob je aplikace zrcadel s otvorem a k nim zakomponována jednoduchá čočka. Další možností je pomocí vláknové optiky, která má vysokou účinnost transportu záření. Proto je možná realizace stejného optického vlákna pro přívod laserového pulzu na vzorek i pro přívod emitovaného záření do spektrometru [5].

Detekce u LIBS je mírně komplikovanější, protože je nezbytné, aby celý systém byl přesně časově synchronizován. Tento systém detekce se skládá ze dvou částí: spektrometru a detektoru. Spektrometr je zařízení, které rozkládá světlo emitované mikroplazmatem. Existují různé modely spektrometrů (např. Pachen-Runge nebo Echelle). Ovšem nejčastěji využívaný je u LIBS spektrometr typu Czerny-Turner. Tento spektrometr se skládá ze vstupní štěrbinou, dvou zrcadel a difrakční mřížky. Světlo prochází vstupní štěrbinou a dostává se k prvnímu zrcadlu, které světlo kolimuje, a to přímo na mřížku. Světlo se odráží pod různými úhly v závislosti na jeho vlnové délce. Druhé zrcadlo soustředí světlo na ohniskovou rovinu, za kterou je umístěn detektor. Volba detektorů používaných v LIBS je různá a závisí na aplikaci nebo analýze, kterou je třeba provést [8]. Častá bývá kombinace spektrometru s polovodičovými detektory, převážně se jedná o CCD detektory (*Charge Coupled Devices*), které mají zvýšenou citlivost na energii emitovaného záření a tuto energii přeměňují na elektrický signál, nebo o CMOS detektory (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*), které jsou méně citlivé na světlo, což může u špatně osvětlených objektů vést k vzniku velmi tmavého obrazu plného šumu [5].

2.2.3 Aplikace LIBS

Metoda LIBS má hned několik důležitých výhod, díky kterým má široké uplatnění ve výzkumu. Mezi hlavní patří možnost detekce prvků, a to současně během jednoho měření, které je poměrně krátké a rychlé (v závislosti na velikosti vzorku). Další výhodou je vysoká selektivita

a citlivost, jejíž mez detekce dosahuje v řádech 10^{-6} . Tato technika je schopna analyzovat jak pevné látky, tak kapaliny i plyny a přístrojové vybavení může být plně mobilní. Na druhou stranu nevýhodami je, že se jedná o mikro destruktivní metodu, tedy dochází k poškození zkoumaného materiálu laserem. Dalším problémem je reprodukovatelnost, protože tvorba plazmatu je náhodný proces, který je velmi závislý na podmínkách a na stavu povrchu materiálu. V neposlední řadě hraje nebezpečnou roli laserový paprsek, který při zásahu lidského oka může způsobit trvalé poškození zraku [8], [11].

Analytické techniky založené na laserové ablacii, které umožňují přímou analýzu materiálů bez nutných rozsáhlých úprav, se využívají například ve zkoumání geologických materiálů. Studování geologických materiálů má svůj význam v paleoklimatologii, mineralogii a archeologii. Metoda LIBS se používá ke stanovení obsahu prvků nejen v minerálech, ale také v uměleckých malbách, zbraních, sochách, keramice a dalších různých předmětech. LIBS se také používá v kosmickém sektoru k analýze hornin na planetě Mars [8], [11].

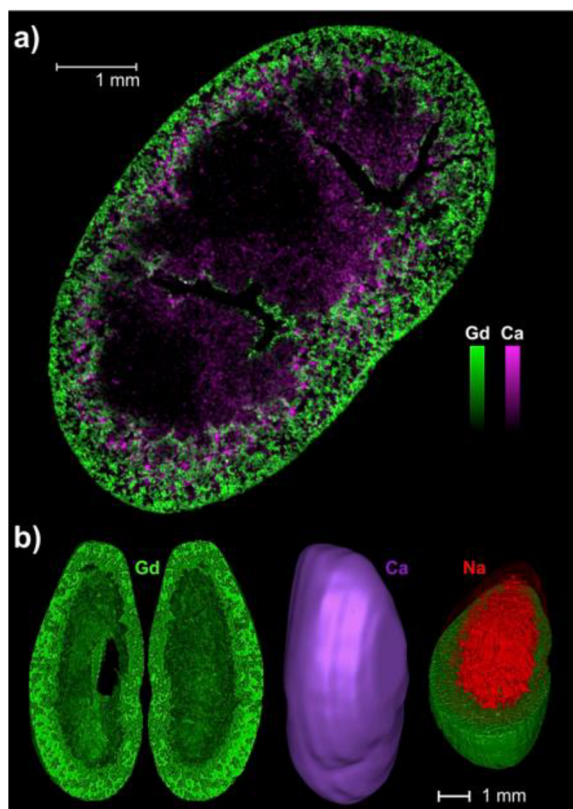
Další významnou aplikací spektroskopie laserem buzeného plazmatu je v průmyslu. Časté využití bývá monitorování v metalurgii například při výrobě oceli. Využívá se zde rychlé analýzy s dálkovou detekcí. Metoda LIBS je schopná i hloubkové analýzy vrstevnatých materiálů tak, že laserový paprsek je aplikován stále do stejného místa [5].

Své uplatnění si technologie LIBS našla v zemědělství, kde dochází ke stanovení úrodnosti půdy zjištěním obsahu živin, i potravinářství, kde umožnila detekovat exogenní cukry v medu. V technologiích životního prostředí se využívá k monitorování čistoty ovzduší, například emisí průmyslových zařízení jako jsou sklárny nebo výroba kovů [11].

2.2.4 Biomedicínské využití LIBS

Biomedicínské využití je jedna z nejnovějších aplikací metody LIBS, která je schopna analyzovat chemické složení biologických vzorků (živočišné tekutiny, kosti, tkáně i zuby). Velmi časté využití této techniky je zobrazování distribuce chemických prvků pomocí mapování zkoumaného biomateriálu (Obrázek 3). Mapa je získána z kontinuálního měření vzorku po celém povrchu a následnou vizualizací jednotlivých prvků. Metoda LIBS je výhodná pro biomedicínské aplikace z důvodu, že není potřeba vzorek před měřením nijak výrazně upravovat [11].

Při analýze živočišných tkání bylo zjištěno, že lze pomocí této metody detekovat biogenní prvky jako jsou draslík, sodík, vápník a hořčík. To vedlo k dalším výzkumům, které se zabývaly například zkoumáním těchto prvků v maligní tkáni a normální zdravé tkáni. Bylo zjištěno, že koncentrační poměry prvků v nádorových a normálních buňkách se výrazně lišily, především poměr vápníku a draslíku a také množství hořčíku. Tudíž může metoda LIBS být teoreticky použita jako diagnostický nástroj pro detekci rakoviny [12].



Obrázek 3: Příklady prvkových map pomocí metody LIBS z biomedicíny. a) 2D zobrazení distribuce Gd a Ca v myších ledvinách. b) 3D zobrazení distribuce Gd, Ca a Na v myších ledvinách [11].

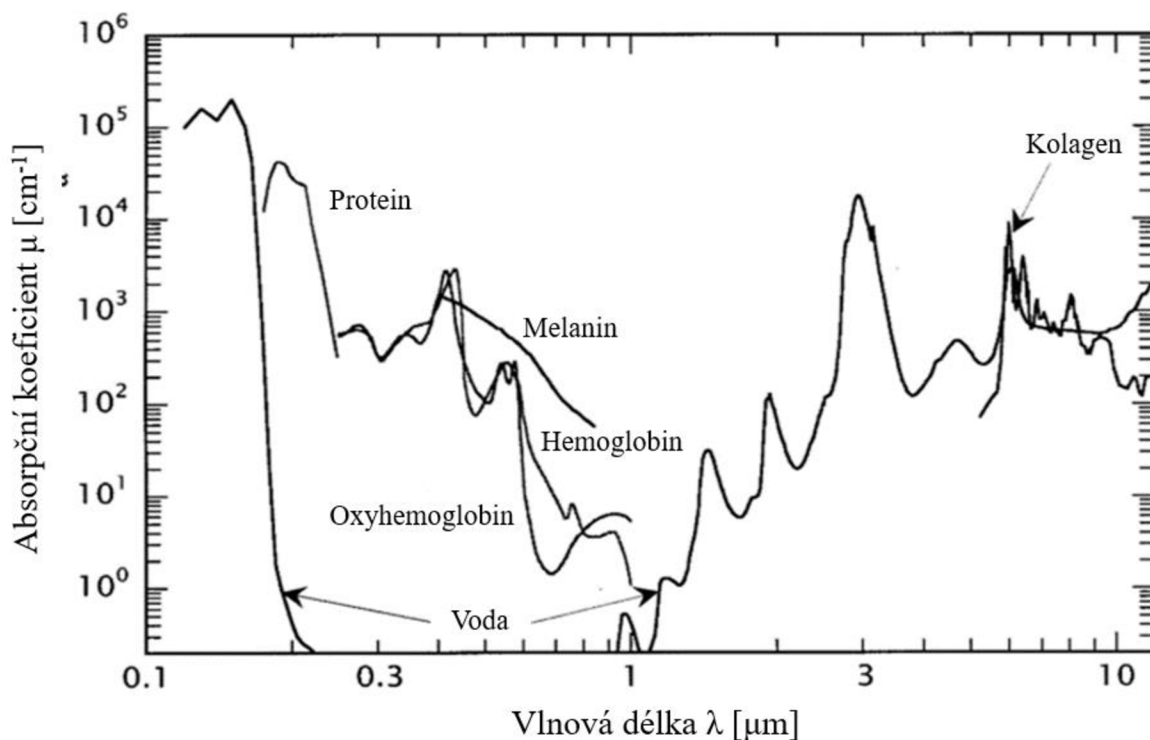
2.3 Interakce biologické tkáně s laserem

Laserová technologie zaznamenala v posledních desetiletích velký pokrok, a díky tomu se stala významným nástrojem v mnoha oblastech lékařství a vědeckého výzkumu. Schopnost laserů cíleně a přesně interagovat s biologickými tkáněmi otevřela dveře k řadě inovativních léčebných postupů, diagnostických metod a výzkumných aplikací [13].

Interakce světla s biologickými tkáněmi může mít různé dopady v závislosti na typu světla, vlnové délce, intenzitě, čase expozice, a proto je tento jev velmi komplexní a zahrnuje různé fyzikální a biologické procesy. Biologické tkáně se skládají ze stovek různých typů molekul (proteiny, voda, DNA, lipidy atd.). Různé molekuly absorbují rozdílnou charakteristickou vlnovou délku (viz Obrázek 4) a také různé molekuly se chovají odlišně poté, co absorbují záření [14], [15].

Využití laseru v medicíně v rámci tzv. fototerapie má široké uplatnění již několik desítek let. Mezi nejznámější operační zákroky spojené s laserem jistě patří korekce vad zraku, avšak využití laseru je mnohem širší. V medicíně se lasery dělí podle výkonu na neinvazivní (terapeutické) a invazivní (chirurgické). Velmi často využívaná je například laserová chirurgie, kde laser funguje na principu odpařování kapaliny z měkké tkáně nebo na principu destrukce molekulárních vazeb látek, které tvoří měkkou tkáň. Laserová chirurgie je využívána v klinické praxi díky jejím mnoha výhodám, především díky silné hemostatické účinnosti a snížení zánětu, bolesti a dalších negativních postoperativních účinků [16].

Velmi obecně lze říct, že kvalita interakce laseru s tkáněmi je určena optickými vlastnostmi zkoumané tkáně a parametry laserového záření. Optické vlastnosti závisí na strukturním složení tkáně a nejdůležitější parametr, který je právě dán strukturou látky a je závislý na vlnové délce, je absorpční koeficient. Běžně je absorpční koeficient tkáňových materiálů nejnižší v intervalu infračerveného záření a stoupá v intervalu ultrafialového záření (viz Obrázek 4). Jak je z obrázku patrné, každá látka má absorpční rozmezí jiné, a proto je velmi důležité zvolit laser s odpovídající vlnovou délkou. Generování harmonických frekvencí laseru je možností, jak změnit vlnovou délku pulzního laseru, ale je to poměrně nákladné. Také zmíněná změna vlnové délky laseru vede k výraznému snížení maximálního výkonu pulzu, což může způsobit, že při nedostatečné energii nedojde k ablaci tkáně [17].



Obrázek 4: Závislost absorpčního koeficientu na vlnové délce pro různé složky tkáni [15]

Měkké tkáně jsou tvořeny převážně vodou, která má vysoký nárůst absorpčního koeficientu v IR a UV rozsahu. Tomuto rozsahu právě odpovídá základní (1064 nm) a čtvrtá harmonická (266 nm) vlnová délka laseru Nd:YAG [15].

2.3.1 Měkké tkáně

Měkké tkáně patří mezi základní skupinu tkání, která spojuje, podporuje a chrání naše lidské tělo a biologické struktury jako například orgány. Na rozdíl od ostatních tkání, je to rozsáhlý biologický materiál, v němž jsou buňky odděleny extracelulárním materiálem. Pojivové tkáně lze odlišit od tvrdých tkání, což jsou například kosti, pro jejich vysokou pružnost a měkké mechanické vlastnosti [15], [18].

Mezi hlavní příklady měkkých pojivových tkání spadají šlachy, vazy, cévy, kůže, kloubní chrupavky a mnoho dalších. Měkké vazivové tkáně jsou komplexní kompozitní struktury vyztužené vlákny. Jejich mechanické chování silně ovlivňuje koncentrace a strukturální uspořádání hlavních složek, jako jsou kolagen a elastin, hydratovaná matrice proteoglykanů a mnoho dalších. Významnou roli také hraje, kde se měkká tkáň vyskytuje v organismu a jaká je její příslušná funkce [18].

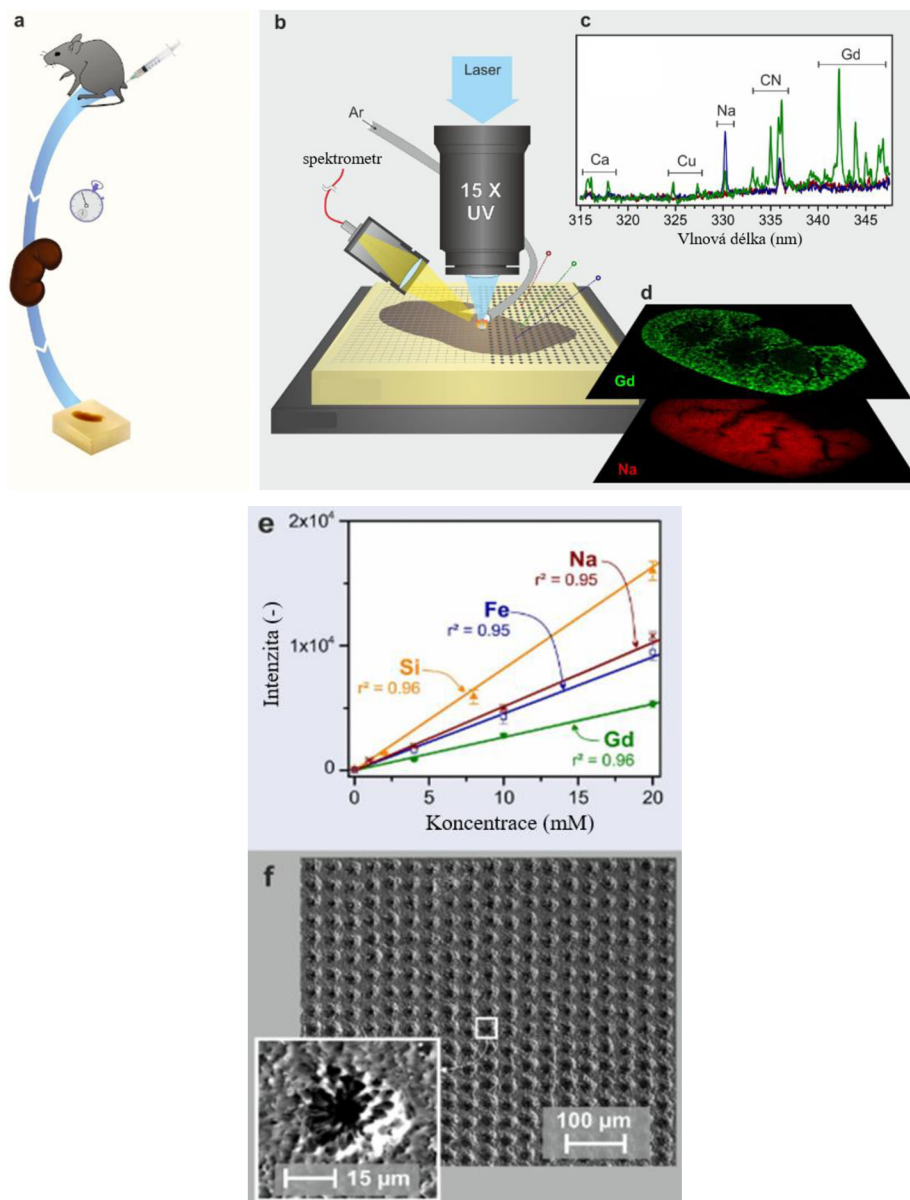
Z mechanického hlediska se měkké tkáně chovají anizotropně díky svým vláknům, což znamená, že vlákna mají tendenci mít preferované směry. A jak již bylo zmíněno dříve, mechanické vlastnosti záleží na mnoha faktorech, a to i fyzikálních a chemických (teplota, osmotický tlak, pH...). Z mikroskopického hlediska se jedná o nehomogenní materiály z důvodu jejich rozmanitého složení [18].

2.3.2 Analýza měkkých tkání pomocí LIBS

Technika LIBS má silný potenciál pro analýzu molekulárně složitých klinických vzorků, jako jsou právě například lidské a zvířecí měkké tkáně. Aplikace a analýza měkkých tkání lze z širšího hlediska rozdělit na patologické diagnostiky a fyziologické detekce. Patologické detekční metody zjišťují rozdíl mezi maligními a normálními tkáněmi a fyziologické detekce zase zjišťují různé typy tkání. Patologická diagnostika byla již zmíněna v kapitole 2.2.4, kde byla řeč o diferenciaci mezi maligními a normálními tkáněmi. Co se týká fyziologické detekce, tak bylo provedeno několik studií klasifikace měkkých i tvrdých tkání z různých oblastí organismu s cílem identifikovat různé typy tkání. Drtivá většina těchto studií byla úspěšná a podařilo se rozlišit různé typy tkání, avšak zatím neexistují žádná měření in vivo, ale i přes to byl vyvinut postup pro získání zpětné vazby během laserové operace [19].

Analýza měkkých tkání pomocí LIBS je také výhodná z hlediska vyžadovaného množství vzorku, kdy stačí pro analýzu pouze femtogramy až nanogramy materiálu. Ve srovnání s jinými analytickými metodami (např. spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem), kde dochází k rozkladu vzorku a jsou potom potřeba mikrogramy až miligramy zkoumaného materiálu [20]. Souhrnný proces analýzy měkkých tkání je zobrazen pomocí Obrázku 5. Nevýhodou pro LIBS analýzu je nehomogenita biologických vzorků, která velmi výrazně ovlivňuje reprodukovatelnost výsledků, proto je nutné pro získání spolehlivých kvantitativních výsledků udržet jednotné a stabilní experimentální podmínky. [20].

I když se jedná o mikro destruktivní analýzu, je stále zapotřebí tento faktor poškození biologické tkáně brát v potaz. Krátery, které vznikají na měkké tkáni po zaostření a vystřelení laseru (laserové ablaci), mají velikost v řádech mikrometrů (Obrázek 5–f). Velikost a hloubka vzniklých kráterů závisí především na energii laserového paprsku a počtu pulzů laseru [21].



Obrázek 5: Souhrnný proces analýzy měkkých tkání [21]. a) Odběr vzorků tkání a jejich vložení do pryskyřice. b) Schematický pohled na experiment metodou LIBS. c) Příklad jednoho emisního spektra zaznamenaného v třech různých oblastech vzorku. d) Příklad 2D obrazů relativního zastoupení pro Gd a Na. e) Kalibrační měření mezi intenzitami a koncentracemi pro zkoumané prvky. f) Snímky kráterů.

2.3.3 Optimalizace interakce biologické tkáně s laserem

Optimalizace interakce biologické tkáně s laserem je velmi důležitá před zahájením měření LIBS, protože díky ní zjistíme nejvhodnější parametry a docílíme tak kvalitnějších výsledků. Z tohoto důvodu se optimalizací zabývalo a stále zabývá široká škála studií, které porovnávají různé důležité aspekty instrumentace (např. vlnová délka laseru, délka pulzu laseru...).

Porovnání základní a čtvrté harmonické vlnové délky nanosekundového pulzního Nd:YAG laseru (1064 vs 266 nm) při ablaci myších ledvin, které byly dopovány nanočásticemi, bylo

předmětem jedné studie . Výsledky této studie ukázaly na výhodné použití 1064 nm pro ablaci měkkých tkání, protože poskytovala reprodukovatelnější ablaci a menší velikost průměru kráteru. Tyto výsledky jsou vysvětleny tím, že tkáň je více transparentní pro blízké IR záření, takže tkáň je nepřímo ablatována plazmatem generovaném na podkladu. Další nevýhodou 266 nm je fakt, že zvýšená absorpce UV záření tkání může vést k poškození tkáně v širším rozsahu [22].

Jiná studie je podobná předchozí zmíněné studii, avšak se liší typem laseru. Pro optimalizaci byl použit femtosekundový laser. Pro LIBS analýzu myšího melanomu byly zvoleny vlnové délky laseru 343 a 1030 nm. Jejich srovnání ukázalo podobné výsledky jako u nanosekundového laseru – vlnová délka 343 nm (UV) vykazovala vyšší fluktuaace v důsledku a vlnová délka 1030 nm (IR) měla opět tendenci nepřímé ablace tkáně plazmatem vzniklým na podkladu [23].

Optimalizace vlnové délky pulzu laseru (UV, VIS nebo IR) a trvání pulzu (fs, ps a ns) je náročná kvůli složitostem v instrumentaci. Na druhou stranu optimalizace dalších experimentálních parametrů (např. energie laserového pulsu, zaostření, čas zpoždění detektoru) je výrazně snazší, a proto byla předmětem zkoumání ve většině studiích zabývajících se metodou LIBS [17].

Konkrétním příkladem jedné takové studie je studie zabývající se více prvkovým biozobrazováním měkkých tkání pomocí metody LIBS, kde při optimalizaci metody bylo potřeba najít správný kompromis mezi citlivostí a rozlišením. Toho bylo docíleno pomocí nalezení nejvyššího poměru signálu k šumu (SNR – *Signal to Noise Ratio*), tedy nastavení s nejlepšími výsledky. Optimalizace se tedy především nejvíce zaměřovala na poměr signálu k šumu a na tvar a velikost vzniklého ablačního kráteru [21].

Jiná studie zabývající se především metodikou interního standardu také popisuje průběh optimalizace. Opět bere jako hlavní kritérium parametr SNR. Oproti předchozí studii popisuje optimalizaci metody více aspekty. Bere v úvahu zaostření ablační čočky, čas zpoždění detektoru, energii laserového pulsu a typu atmosféry. Bylo zjištěno, že jejich vliv na detekci signálu měkkých tkání je významný a jako optimální parametry byly zvoleny následující data: energie 20 mJ, čas zpoždění detektoru 0,5 μ s, rozostření 150 μ m pod povrchem vzorku a ofuk argonem. Nutno podotknout, že se jednalo o laser s vlnovou délkou 532 nm a vzorky myších ledvin byly upravovány tak, aby koncentrace zinku, který byl vybrán jako porovnávací prvek k optimalizaci, byla ve všech místech analytu totožná [24].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

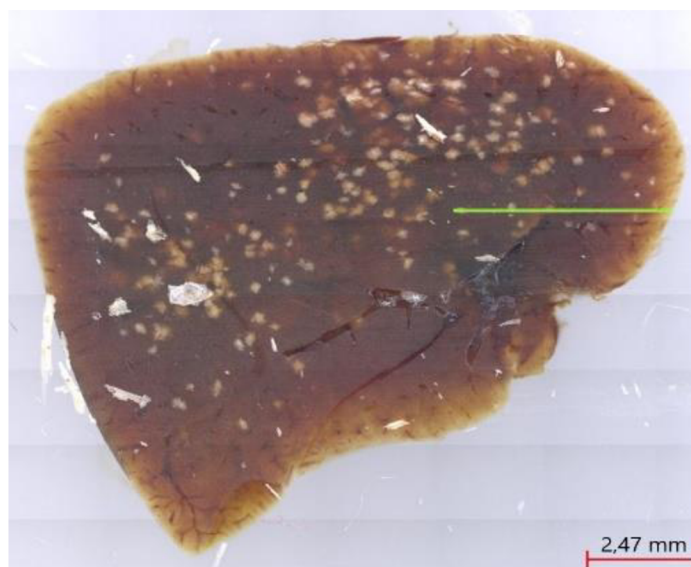
3.1 Příprava vzorků

Mnoho vědeckých článků nepřikládá přípravě vzorků pro LIBS analýzu náležitou pozornost a tvrdí, že není potřeba vzorek před měřením nijak výrazně upravovat (například již zmíněný článek v kapitole 2.2.4). Nicméně při analýze biologických tkání je precizní příprava vzorků poměrně důležitá, protože samotná LIBS analýza se zakládá na optické emisi plazmatu vytvořeného interakcí laseru právě s povrchem vzorku. Pro správné výsledky je tedy důležitá fixace vzorku, která usnadňuje manipulaci, přepravu, skladování a taktéž zajišťuje jeho rovný povrch. Často se biologické vzorky fixují do epoxidové pryskyřice nebo do parafínu. Zalítí do parafínu má velkou výhodu, protože za předpokladu dostatečné šířky vzorku je možné vzorek znovu analyzovat i po odkrojení mikrotomem poškozené části vzorku způsobené laserem [25].

3.1.1 Zkoumané vzorky

Jako příklad živočišných měkkých tkání byly zvoleny matrice myších jater, na kterých probíhala všechna měření (viz Obrázek 6). Myší játra byla vybrána z důvodu, že by měly představovat nejvíce homogenní biologické matrice měkkých tkání. Jedná se o vzorky zalité v parafínu, které byly získány ve spolupráci s Akademií věd České republiky. Všechny úkony byly provedeny podle protokolů a pravidel stanovených Společností pro vědu o laboratorních zvířatech a Ústavu živočišné fyziologie a genetiky (ÚŽFG).

Na fixaci tkáně po vyjmutí z usmrcené myši se používá 4% formaldehyd, který se nechá působit aspoň 24 hodin. Následuje cca 12hodinové promývání destilovanou vodou, poté dochází k poměrně složitému procesu zalévání vzorku parafínem, který zahrnuje odvodnění tkáně, prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín a prosycení tkáně parafínem. Po ztuhnutí parafínu se vzorek skladuje v chladničce. Závěrečný úkon před samotným měřením představuje seříznutí vzorku do roviny pomocí posuvného mikrotomu.



Obrázek 6: Vzorek myších jater zalitých v parafínu.

3.2 Použité přístroje a software

- FireFly LIBS systém, Lightigo Brno, Česká republika
- Posuvný mikrotom, HM 430, Thermo Fisher Scientific, UK
- Optický profilometr Bruker ContourGT-X, Bruker, Germany
- FireFly Navigator, Lightigo, Brno, Česká republika
- LIBS Analyzer, CEITEC VUT, Brno, Česká republika
- Bruker 64Vision, Bruker, Germany
- Origin, Origin Lab, USA
- MS Office

3.3 Měření pomocí metody LIBS

Veškeré měření a zpracování dat na tuto bakalářskou práci bylo provedeno v prostorách Středoevropského technologického institutu (CEITEC BUT) a Fakulty strojního inženýrství VUT v Brně.

3.3.1 Instrumentace

FireFly LIBS systém

K analýze měkkých tkání metodou LIBS byl využíván přístroj FireFly LIBS systém (viz Obrázek 7). Jedná se o analytický přístroj specializovaný na rychlou víceprvkovou analýzu. Přístroj disponuje pohyblivým stolem (3 osy), motorizovanými objektivy, pulzním Nd:YAG ablačním laserem (5 ns pulzy, rychlost 50 Hz) s možností změny vlnové délky (1 064 nm, 532 nm a 266 nm), 4 spektrometry s rozsahem 190–263 nm, 260–370 nm, 460–689 nm, 690–589 nm; (typu Czerny-Turner), detektory (typu CCD/CMOS) a možností změny atmosféry (např. ofuk argonem). Limit detekce přístroje je 1 až 100 ppm s prostorovým rozlišením 10 až 150 μm a skenovací oblastí až 100×100 mm [26].



Obrázek 7: Měřicí systém FireFly [26]

Optický profilometr Bruker ContourGT-X

Pro povrchovou analýzu vzorků s vysokým rozlišením (v nanometrovém měřítku na povrchu s vysokými konturami) byl využíván optický mikroskop ContourGT-X (viz Obrázek 8). Tento přístroj využívá technologii na principu skenovací interferometrie, která umožňuje získání velmi přesných 3D obrazů povrchů vzorků. Zařízení se skládá z naklápějícího stolu a naklápějící hlavy, která má otočný adaptér s různými objektivy. Zařízení je vybaveno funkcemi automatického měření, což umožňuje poměrně snadné a rychlé získání údajů o povrchu vzorků [27].



Obrázek 8: Optický profilometr Bruker ContourGT-X [27]

3.3.2 Pracovní postup

Pracovní postup pro analýzu pomocí laserové spektroskopie začíná výběrem vhodného pulzního laseru s ohledem na požadované vlastnosti. Poté následuje příprava vzorku, kde je důležité zajistit čistotu, rovnou plochu a správné umístění vzorku do aparatury pro LIBS analýzu.

Dalším krokem je nastavení provozních podmínek aparatury, což zahrnuje volbu vlnové délky (λ) a energii pulzu laseru (E), což je zásadní pro vytvoření a udržení plazmatu. Dalšími parametry, které mají vliv na výsledek získaného signálu, jsou čas zpoždění sběru signálu tzv. *gate delay* (GD), okolní atmosféra v ablační komoře, rozostření a velikost vzniklých kráterů. Rozostření v našem případě je automatický, a proto není potřeba optimalizace.

Dále byly nastavené parametry, které se týkají prostorové vzdálenosti mezi jednotlivými výstřely laseru a počet výstřelů laseru. Analýza měkkých tkání probíhala bodovou metodou, to znamená, že se vždy analyzuje konkrétní bod analytu a po posunutí vzorku o předem nastavený rozměr dochází k opakované analýze. Jinou metodou, která je rychlejší, je rychlé mapování (tzv. *fast mapping*), kdy pohyb vzorku je kontinuální a výstřely laseru jsou synchronizovány s motorizovaným stolcem [28].

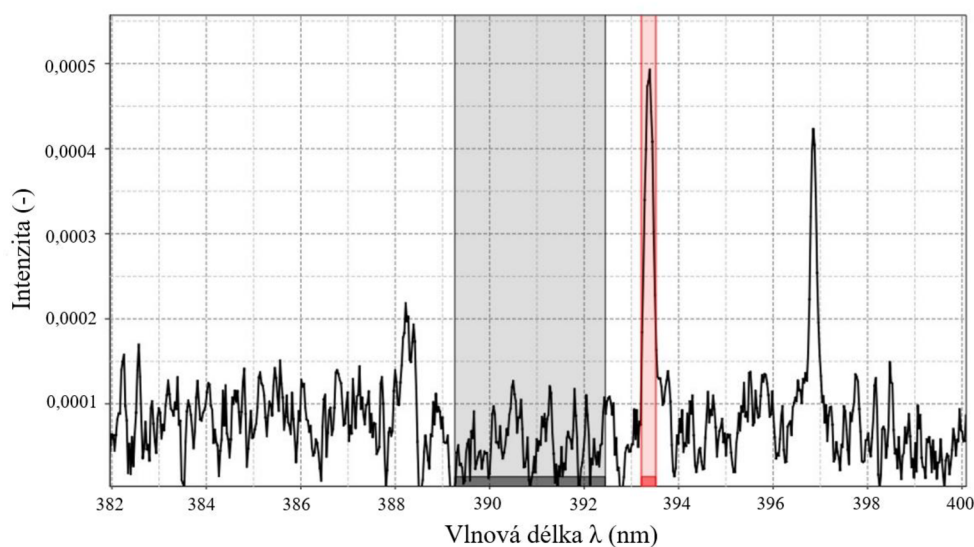
Po nastavení provozních podmínek je prováděna samotná laserová ablace vzorku, vzniká plazma a dochází k tvorbě ablačních kráterů, které obsahují informace nezbytné k analýze. Následně se tedy provádí spektroskopická analýza emisních signálů z laserem indukovaného plazmatu, zaměřující se na identifikaci chemických prvků. Výsledky analýzy jsou následně zpracovány a vyhodnoceny v softwaru LIBS Analyzer.

Dále byla prováděna měření velikosti a hloubky vzniklých kráterů pomocí profilometru na Fakultě strojního inženýrství v Brně (VUT FSI). Byly proměřeny krátery pro všechny měřené energie pulzu laseru, okolní atmosféry a různé vlnové délky, přičemž různé hodnoty času zpoždění sběru signálu na velikost kráteru vliv nemají, a tudíž nebyly měřeny. Jako software pro vizualizaci a zpracování dat byl použit software Vision64.

3.3.3 Zpracování dat

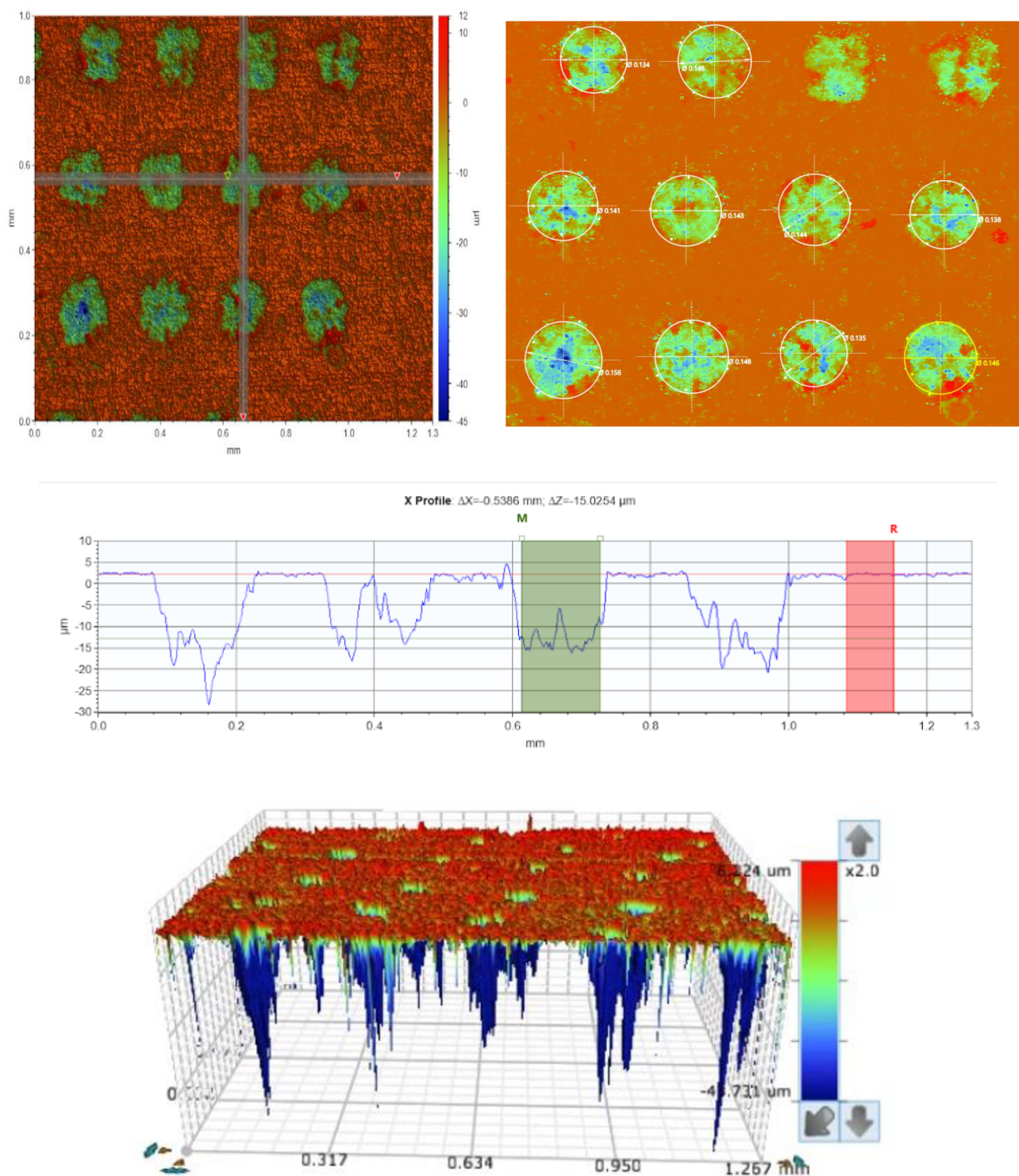
Veškeré zpracování spektroskopických dat bylo provedeno v softwaru LIBS Analyzer. Nejdříve došlo k nahrání souborů do softwaru a následnému odfiltrování dat, kdy bylo vždy prvních 5 spekter pro všechna měření odstraněno z důvodu nestabilní velikosti energie laseru při prvotních výstřelech (u větších rozměrů měření bylo vždy odstraněno prvních 5 spekter získaných z výstřelů na začátku každého nového řádku). Dále byly v tomto softwaru každému měření přiděleny hodnoty energie a času zpoždění pro sběr dat, aby mohlo dojít k dalšímu zpracování dat, která byla potřeba pro analýzu poměru signálu ku šumu (SNR analýza). Proběhlo také odstranění odlehlých hodnot, kdy bylo odebráno 10 % nejnižších a 10 % nejvyšších hodnot (u větších rozměrů měření bylo vždy odstraněno 25 % nejnižších a 25 % nejvyšších hodnot).

Jako zastupitele signálu, tedy spektrální čáry (tzv. *peak*) pro analýzu SNR, byla zvolena iontová čára vápníku (Ca II 393,37 nm). Přesně se jednalo o rozmezí vlnové délky 393,22–393,55 nm, kdy pro výpočet SNR byla použita plocha pod křivkou spektrální čáry. Jako šum byl zvolen interval vlnových délek kolem vrcholu Ca II a to přesně 389,27–392,46 nm (viz Obrázek 9).



Obrázek 9: Příklad získaného spektra pro analýzu SNR – červená oblast znázorňuje spektrální čáru analyzovaného prvku (signál) a černá oblast tzv. noise (šum).

Zpracování dat získaných při měření na profilometru bylo provedeno v softwaru Vision64, kde po drobné úpravě roviny vzorku v tomto softwaru byly měřeny průměry alespoň 10 kráterů pro každou energii, ze kterých byl následně vypočítán průměr. Dále byly získány i hloubky kráterů, kdy opět byl vybrán pro každou energii soubor obsahující aspoň 10 kráterů (Obrázek 10).



Obrázek 10: Příklad odečítání velikosti a hloubky kráterů pomocí softwaru Vision 64.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro nalezení optimálních parametrů na sestavě FireFly pro analýzu myších jater metodou LIBS byly zvoleny 2 vlnové délky nanosekundového laseru, a to základní 1064 nm a čtvrtá harmonická frekvence laseru 266 nm. Druhá harmonická frekvence laseru (532 nm) nebyla měřena z důvodu nízkého absorpčního koeficientu měkkých tkání při této vlnové délce (viz kapitola 2.3).

U obou vlnových délek byly měřeny různé hodnoty energií a čas zpoždění sběru signálu (GD). U vlnové délky 266 nm se jednalo o interval 2,5 až 5 mJ s krokem 0,5 mJ a u vlnové délky 1064 nm o interval 3 až 20 mJ s krokem 1 mJ. Čas zpoždění sběru signálu byl měřen pro každou energii zvlášť a interval, který byl měřen, byl 0 μs až 1 μs. Některé intervaly GD se snižovaly v závislosti na tom, zda byl pozorován ještě nějaký signál u předcházejícího měření s nižším GD, anebo pokud naopak byl stále signál dostatečný, tak se interval zvyšoval. Všechna výše popsaná měření byla realizována bez ofuku plynem, tedy v atmosféře, a také s ofukem vzorku argonem (8 dm³/min) jakožto inertním plynem.

U všech měření byla provedena SNR (signál/šum) analýza (ze spektrální čáry vápníku Ca II 393,37 nm), přičemž důležitou roli pro porovnání jednotlivých nastavení představuje vypočítaný parametr plošná hustota výkonu laseru (intenzita ozařování jednotkové plochy, anglicky *irradiance*), která v sobě zahrnuje také velikost kráterů vzniklých při měření. Obecně platí, že čím menší je velikost kráterů, tím výhodnější pro potencionální mapování měkkých tkání pomocí techniky LIBS, protože je poté možné vylepšit prostorové rozlišení. Výpočet tohoto parametru je následující:

$$\theta_e = \frac{E}{t} \quad (1)$$

$$I_e = \frac{E}{S \cdot t}, \quad (2)$$

kde I_e ...intenzita ozařování (W/cm²), E ... energie pulzního laseru (J), S ... plocha kráteru (cm²), t ... délka pulzu laseru (s) a θ_e ...zářivý tok (W; J/s) [29].

4.1 Vlnová délka 266 nm

4.1.1 Ofuk vzorku argonem

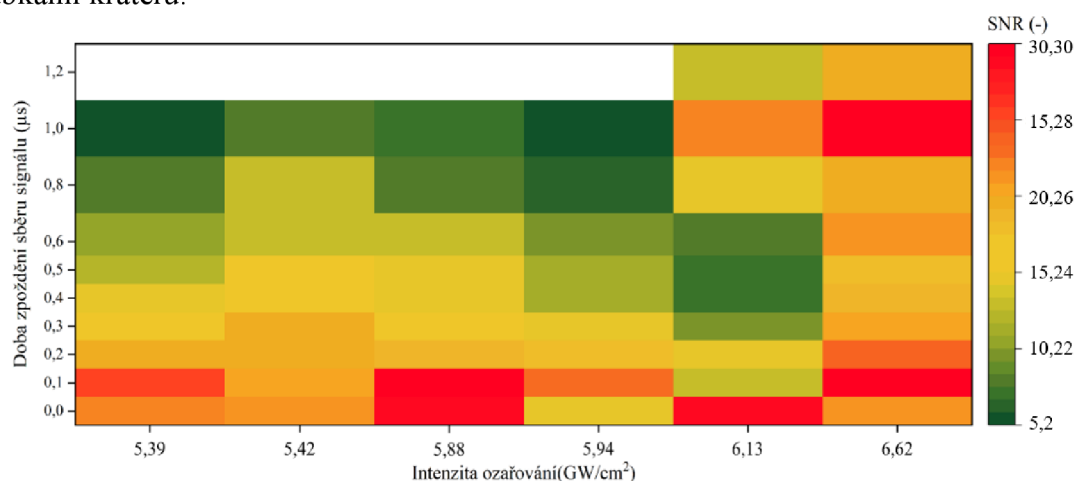
Pro znázornění výsledků byly zvoleny teplotní mapy (tzv. *heatmaps*), na kterých jsou na ose x vyneseny vypočítané hodnoty intenzit ozařování (GW/cm²) a na ose y čas zpoždění sběru signálu (μs). Hodnoty SNR jsou znázorněny pomocí barevné škály přiložené vedle teplotní mapy. Zelené hodnoty znamenají nízký poměr signálu ku šumu, jeho zvýšení pak charakterizuje žlutá až červená barva. Bílé plochy odpovídají hodnotám GD, u kterých nebylo provedeno měření.

Z výsledků SNR analýzy znázorněné pomocí teplotní mapy (Obrázek 11) je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo pro nejvyšší intenzitu ozařování, která v tomto případě zároveň odpovídá nejvyšší energii pulzu laseru (Tabulka 2). Co se týká parametru času

zpoždění sběru signálu, nejvyšší hodnoty SNR vykazovaly při nejnižších hodnotách (0 μ s a 0,1 μ s) a také kolem 1 μ s.

Teplotní mapa relativních směrodatných odchylek (Obrázek 12) ukazuje, že nejvyšší relativní odchylku vykazují vyšší hodnoty intenzity ozařování i GD, přičemž je důležité zmínit oblast odpovídající GD 1 μ s a intenzitě ozařování 6,13 GW/cm^2 , protože hodnota relativní směrodatné odchylky je větší než 2. Tato chyba byla způsobena především malým souborem spekter pro SNR analýzu (15 spekter), kdy více výrazně odlehých hodnot ovlivnily výslednou hodnotu. Tuto oblast v Obrázku 11 nelze tedy brát za vypovídající. Aby se předešlo podobné chybě a byly získány lepší výsledky, tak byly vybrány nejvíce vyhovující parametry z teplotních map, které byly znovu proměřeny, avšak už se jednalo o soubor obsahující přibližně 300 spekter.

Z Tabulky 2 lze také pozorovat klesající trend při snižování energie pulzu laseru u velikostí kráterů i hloubky kráterů. Nejedná se však o pravidelné rozdíly jak mezi velikostmi, tak mezi hloubkami kráterů.



Obrázek 11: Závislost SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 266 nm a ofuk vzorku argonem zobrazena pomocí teplotní mapy.

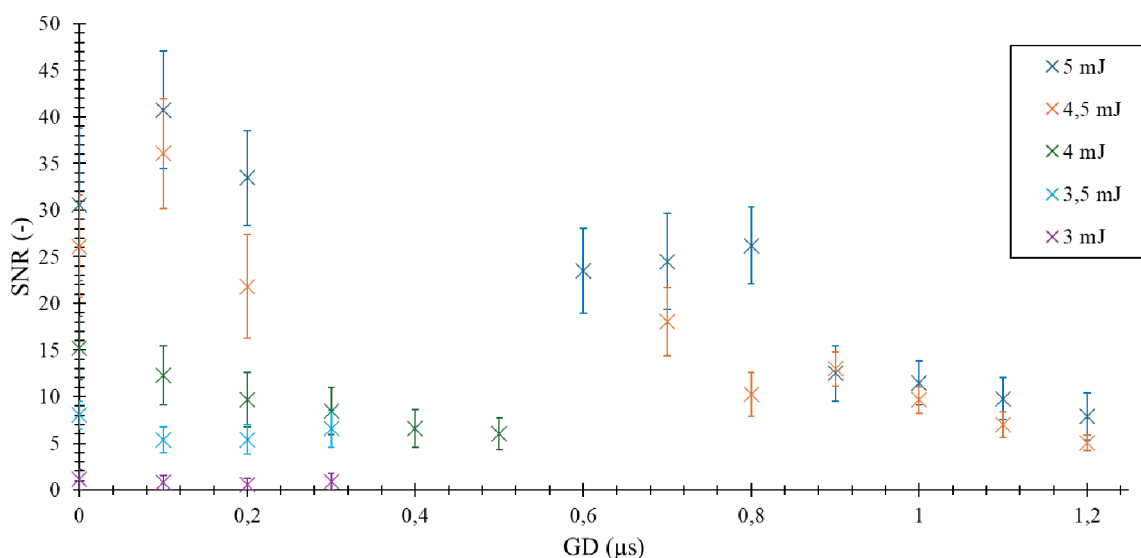


Obrázek 12: Závislost relativní směrodatné odchylky (RSD) SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 266 nm a ofuk vzorku argonem zobrazena pomocí teplotní mapy.

Tabulka 2: Velikosti kráterů, hloubka kráterů a vypočítaná intenzita ozařování pro vlnovou délku 266 nm a při ofuku vzorku argonem.

Energie pulzu laseru (mJ)	Velikost kráterů (mm)	Hloubka kráterů (μm)	Intenzita ozařování (GW/cm^2)
5	0,139	13,7	6,62
4,5	0,137	12,7	6,13
4	0,132	12,6	5,88
3,5	0,129	10,4	5,39
3	0,119	9,8	5,42
2,5	0,104	7,2	5,94

Výsledky větších souborů spekter (300 spekter, ze kterých bylo 25 % nejvyšších a nejnižších hodnot odstraněno) byly znázorněny pomocí bodového grafu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchylky jako závislost signál/šum (SNR) na času zpoždění sběru dat (GD). Z Obrázku 13 lze vyhodnotit optimální nastavení pro vlnovou délku 266 nm s ofukem argonu jako následující: energie pulzu laseru je 5 mJ a GD je 0,1 μs . Hodnota SNR tohoto nastavení odpovídá 41.

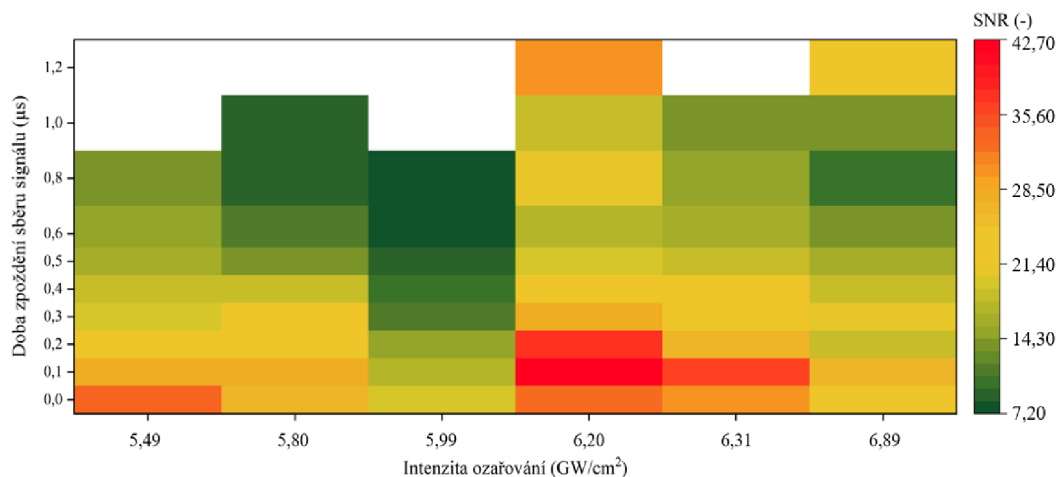


Obrázek 13: Závislost SNR na době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 266 nm a ofuk vzorku argonem.

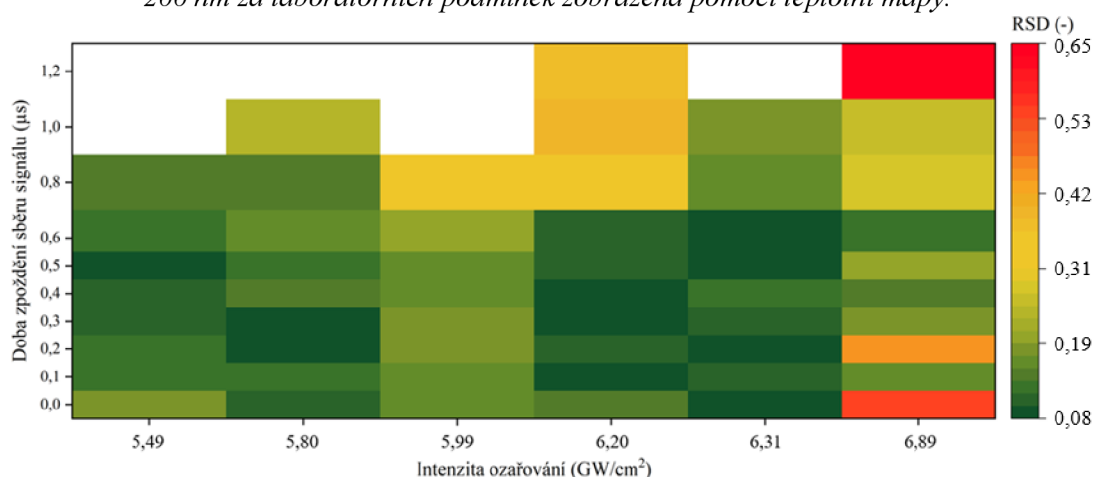
4.1.2 Laboratorní podmínky

Teplotní mapa SNR analýzy v laboratorních podmínkách bez ofuku vzorku argonem (Obrázek 14) nám opět ukazuje naoranžovělé až červené oblasti, které odpovídají nejvyšším hodnotám SNR, a tedy nejvíce vyhovujícím parametrům pro měření měkkých tkání. Tyto oblasti jsou opět nejpočetnější u nižších hodnot doby zpoždění sběru signálu (0 μs až 0,2 μs). Nejlepší výsledky odpovídají hodnotám intenzitě ozařování 6,20 GW/cm^2 . Tentokrát se sice nejedná o nejvyšší hodnotu intenzity ozařování, ale opět se jedná o nejvyšší energii pulzu laseru 5 mJ (viz Tabulka 3).

Relativní směrodatné odchylky hodnot SNR (Obrázek 15) byly největší při vyšších hodnotách GD a také při nejvyšší intenzitě ozařování. Avšak jejich hodnoty nebyly tak velké jako v případě ofuku vzorku argonem, nejvyšší hodnota relativní směrodatné odchylky měla hodnotu 0,65. Z tohoto důvodu byl vybrán menší počet možných optimálních parametrů pro podrobnější analýzu.



Obrázek 14: Závislost SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 266 nm za laboratorních podmínek zobrazena pomocí teplotní mapy.

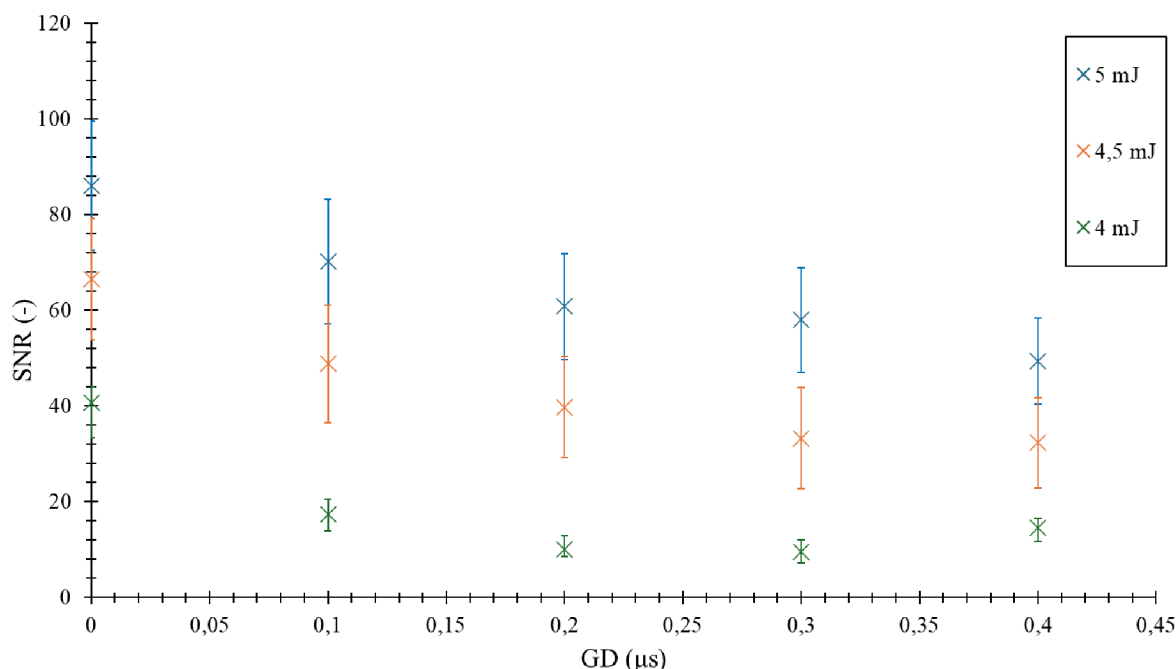


Obrázek 15: Závislost relativní směrodatné odchylky (RSD) SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 266 nm za laboratorních podmínek zobrazena pomocí teplotní mapy.

Tabulka 3: Velikosti kráterů, hloubka kráterů a intenzita ozařování pro vlnovou délku 266 nm za laboratorních podmínek.

Energie pulzu laseru (mJ)	Velikost kráterů (mm)	Hloubka kráterů (μm)	Intenzita ozařování (GW/cm ²)
5	0,143	14,8	6,20
4,5	0,129	12,5	6,89
4	0,127	11,2	6,31
3,5	0,124	8,6	5,80
3	0,118	8,0	5,49
2,5	0,103	7,1	5,99

Obrázek 16 zobrazuje závislost SNR na GD a jako optimální nastavení u vlnové délky 266 nm za laboratorních podmínek vychází energie pulzu laseru 5 mJ a čas zpoždění sběru signálu 0 μ s. Hodnota SNR při tomto nastavení byla 86. Graf ukazuje poměrně jednoznačnou tendenci klesání hodnot SNR se zvyšující se hodnotou GD. U této vlnové délky tedy vychází vyšší hodnota SNR pro laboratorní podmínky než při ofuku vzorku argonem.



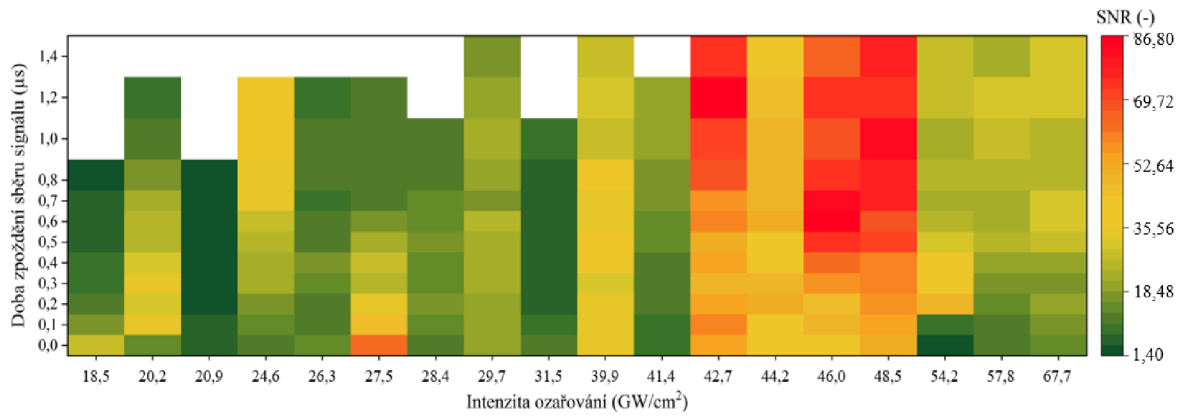
Obrázek 16: Závislost SNR na době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 266 nm za laboratorních podmínek.

4.2 Vlnová délka 1064 nm

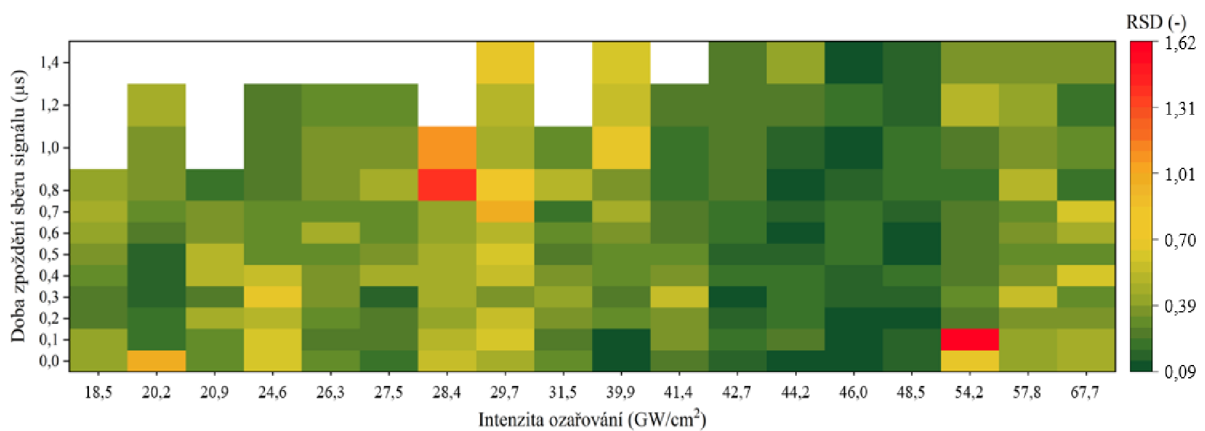
4.2.1 Ofuk vzorku argonem

V případě vlnové délky laseru 1064 nm a ofuku vzorku argonem bylo zjištěno z hodnot SNR znázorněných pomocí teplotních map (Obrázek 17), že nejlepším výsledkům odpovídají intenzity ozařování v intervalu 42,7 až 48,5 GW/cm^2 . V tomto intervalu hodnoty SNR byly celkově nejvyšší pro různé hodnoty času zpoždění sběru dat a se vzrůstajícími časy GD byly vyšší hodnoty SNR. Z Tabulka 4 vidíme, že se jednalo o energie pulzu laseru 14 až 17 mJ.

Teplotní mapa relativních směrodatných odchylek (Obrázek 18) ukazuje, že nejvyšší hodnoty RSD patří hodnotám, u kterých je hodnota SNR malá, a proto relativní směrodatná odchylka velká. Na zmíněné oblasti, která odpovídá nejlepším výsledkům, nejsou viditelné žádné velké rozdíly mezi hodnotami relativních směrodatných odchylek.



Obrázek 17: Závislost SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 1064 nm za ofuku vzorku argonem zobrazena pomocí teplotní mapy.



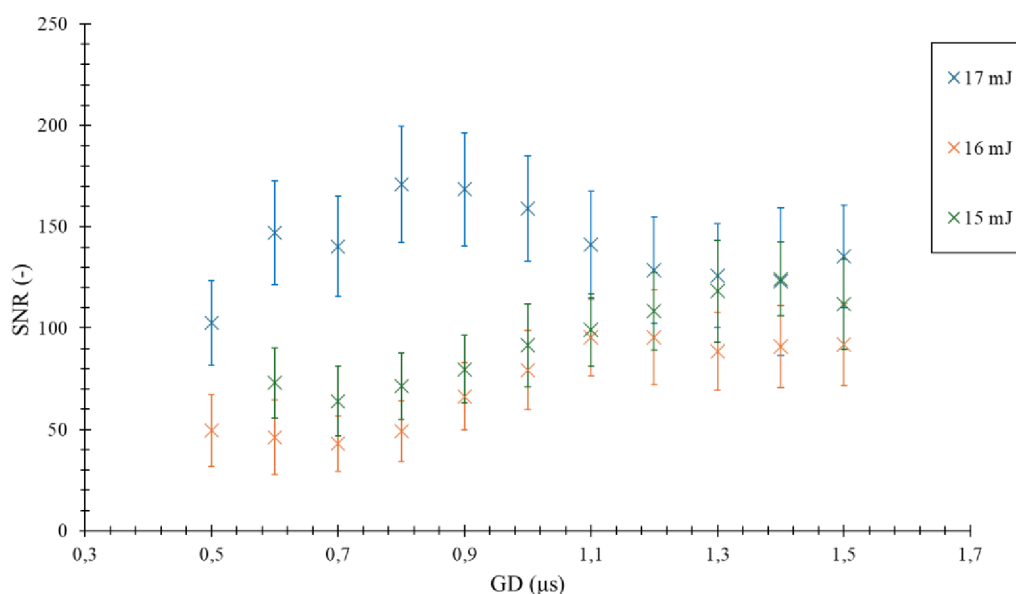
Obrázek 18: Závislost relativní směrodatné odchylky (RSD) SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 1064 nm za ofuku vzorku argonem zobrazena pomocí teplotní mapy.

V Tabulce 4 je znázorněno, že hodnoty velikosti a ani hloubky kráterů neklesají se snižující se hodnotou energie pulzu laseru. To znamená, že se nejedná o stejný případ jako to bylo v případě použití laseru s vlnovou délkou 266 nm. Především velikosti kráterů jsou velmi podobné ve velkém rozsahu energií a rozdíly jsou minimální. Během měření byly patrné velké rozdíly způsobených především nehomogenitou měkkých tkání.

Obrázek 19 ukazuje optimální nastavení pro analýzu měkkých tkání za ofuku vzorku argonem a s vlnovou délkou laseru 1064 nm. Tomuto nastavení odpovídají parametry energie laserového pulzu 17 mJ a čas zpoždění sběru signálu 0,8 μ s. Oproti ostatním energiím pulzu laseru je rozdílný trend v okolí této hodnoty času zpoždění sběru dat. Ve vyšších hodnotách GD už je rozdíl nepatrný. Směrodatné odchylky znázorněné jako chybové úsečky jsou sice nejvyšší u tohoto optimálního nastavení, avšak to je způsobeno právě velmi vysokou hodnotou SNR. Hodnota SNR při optimálním nastavení dosahuje hodnotu 170.

Tabulka 4: Velikosti kráterů, hloubka kráterů a intenzita ozařování pro vlnovou délku 1064 nm a při ofuku vzorku argonem.

Energie pulzu laseru (mJ)	Velikost kráterů (mm)	Hloubka kráterů (μm)	Intenzita ozařování (GW/cm ²)
3	0,061	12,9	20,87
4	0,074	12,6	18,45
5	0,064	11,7	31,48
6	0,076	13,2	26,31
7	0,066	8,5	41,42
8	0,086	14,6	27,54
9	0,107	15,1	20,17
10	0,102	15,1	24,57
11	0,099	15,2	28,41
12	0,101	14,4	29,72
13	0,091	15,8	39,89
14	0,090	16,5	44,21
15	0,095	16,4	42,68
16	0,094	16,4	46,01
17	0,095	16,9	48,48
18	0,082	15,9	67,67
19	0,092	16,9	57,79
20	0,097	20,8	54,24

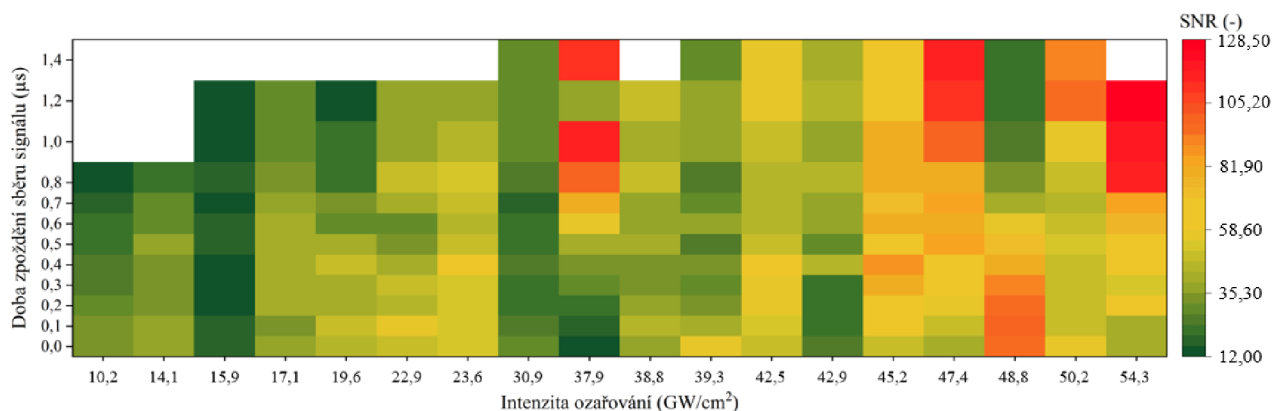


Obrázek 19: Závislost SNR na době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 1064 nm a ofuk vzorku argonem.

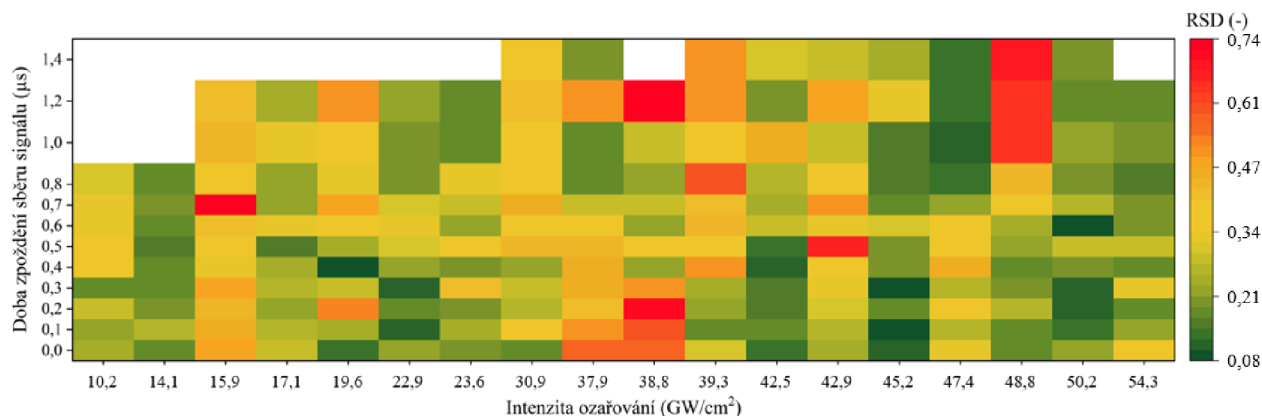
4.2.2 Laboratorní podmínky

Za laboratorních podmínek vyšla SNR analýza (Obrázek 20) pro vlnovou délku laseru 1064 nm opět mnohem lépe pro hodnoty s delšími časy zpoždění sběru signálu. Jediná výjimka

nejlepších výsledků je při intenzitě ozařování $48,8 \text{ GW/cm}^2$, kdy jich bylo dosaženo při kratší době zpoždění sběru signálu do $0,4 \mu\text{s}$. Stejně jako při ofuku vzorku argonem se jedná o interval energií pulzu laseru 14 až 17 mJ a ještě navíc rozšířen o energii 18 mJ. Hodnoty relativních směrodatných odchylek (Obrázek 21) jsou stejně jako v případě ofuku vzorku argonem největší u nejnižších hodnot SNR. Zajímavá je skutečnost, že hodnoty relativních směrodatných odchylek za laboratorních podmínek jsou nižší než při ofuku analytu argonem, stejně jako tomu bylo u vlnové délky 266 nm .



Obrázek 20: Závislost SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 1064 nm za laboratorních podmínek zobrazena pomocí teplotní mapy.



Obrázek 21: Závislost relativní směrodatné odchylky (RSD) SNR na intenzitě ozařování a době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 1064 nm za laboratorních podmínek zobrazena pomocí teplotní mapy.

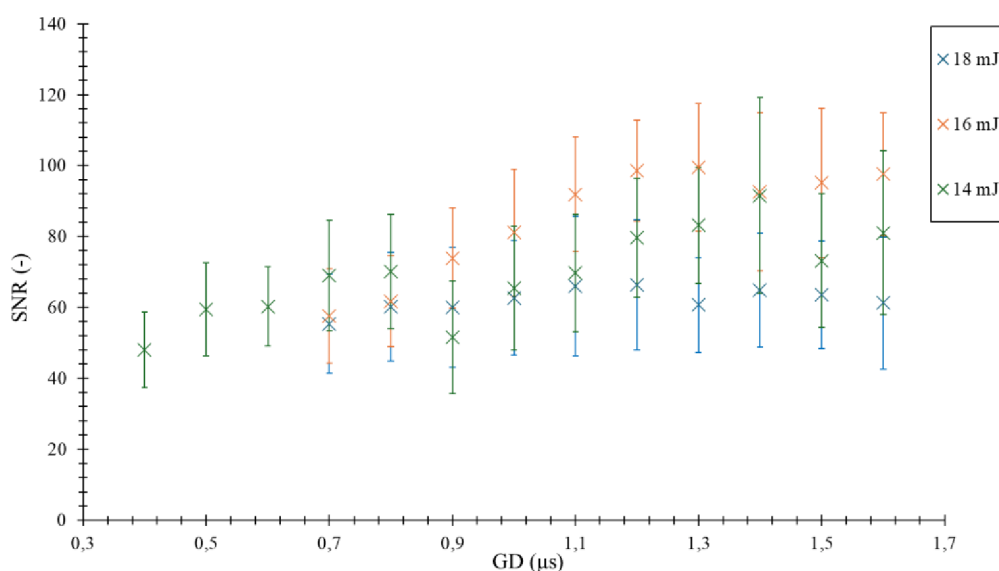
Ohledně velikosti a hloubky vzniklých kráterů (Tabulka 5) lze konstatovat téměř to samé jako při ofuku vzorku argonem. Velikosti a hloubky kráterů neklesají se snižující se hodnotou energie pulzu laseru a jedná se spíše o náhodný trend.

V tomto případě se jeví jako optimální nastavení pro laser s vlnovou délkou 1064 nm za laboratorních podmínek energie pulzu laseru 16 mJ a čas zpoždění sběru dat $1,2 \mu\text{s}$. Obrázek 22 ukazuje rostoucí tendenci hodnot SNR se zvyšující se hodnotou zpoždění času sběru signálu až do doby $1,2 \mu\text{s}$, po které se zvyšující se dobou dochází k poklesu hodnot SNR. Zbylé dvě energie pulzu laseru nemají tuto tendenci tak výraznou a jejich hodnoty SNR jsou

téměř totožné pro jiné hodnoty času zpoždění sběru signálu. Hodnota SNR při optimálním nastavení činí přibližně 90. Tentokrát tedy byla hodnota SNR při ofuku vzorku argonem výrazně vyšší než při laboratorních podmínkách.

Tabulka 5: Velikosti kráterů, hloubka kráterů a intenzita ozařování pro vlnovou délku 1064 nm za laboratorních podmínek.

Energie pulzu laseru (mJ)	Velikost kráterů (mm)	Hloubka kráterů (μm)	Intenzita ozařování (GW/cm^2)
3	0,087	12,9	10,16
4	0,085	16,1	14,07
5	0,09	12,8	15,86
6	0,088	13,9	19,6
7	0,102	17,5	17,1
8	0,094	15	22,86
9	0,099	14,1	23,62
10	0,081	12,7	38,79
11	0,095	13	30,91
12	0,084	12,5	42,9
13	0,092	15,5	39,28
14	0,097	16	37,89
15	0,089	15	48,77
16	0,087	15,3	54,33
17	0,101	16,6	42,52
18	0,098	17,4	47,44
19	0,104	17,7	45,17
20	0,101	16,5	50,22



Obrázek 22: Závislost SNR na době zpoždění sběru signálu pro vlnovou délku 1064 nm za laboratorních podmínek.

4.3 Optimální nastavení

Závěrečná Tabulka 6 shrnuje základní parametry optimálního nastavení měření metodou LIBS a základní charakteristiku těchto parametrů. Největší možná energie pulzu laseru byla optimální pro laser s vlnovou délkou 266 nm a to v obou případech, jak za ofuku vzorku argonem, tak za laboratorních podmínek. U laseru s vlnovou délkou 1064 nm už se nejednalo o nejvyšší možnou energii pulzu, ale o energii laseru pulzu 17 mJ pro ofuk vzorku argonem a 16 mJ pro měření při laboratorních podmínkách.

Časy zpoždění sběru signálu jsou podstatně vyšší u laseru s vlnovou délkou 1064 nm než u laseru s vlnovou délkou 266 nm a to z důvodu, že energie pulzu laseru s vlnovou délkou 1064 nm je větší než u laseru 266 nm, což způsobuje vznik plazmatu o větší teplotě a zároveň s delší životností plazmatu. Tato energie pulzu laseru má vliv i na intenzitu pozadí (šumu), kdy u laseru s vlnovou délkou 266 nm není tak velká jako u laseru o vlnové délce 1064 nm.

Velikost průměru kráterů pro optimální nastavení je výrazně rozdílná pro laser s vlnovou délkou 1064 a 266 nm. Výsledky korelují s již dříve zmíněnými studiemi, kdy velikost průměru kráterů je vyšší u laseru s vlnovou délkou 266 nm a zase naopak hloubka kráterů je nižší. Intenzita ozařování je z důvodu vyšší energie pulzu a menší velikosti průměru kráterů výrazně vyšší u laseru s vlnovou délkou 1064 nm.

Ohledně pro nás nejdůležitějšího parametru hodnoty SNR lze konstatovat, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití laseru s vlnovou délkou 1064 nm a ofuku vzorku argonem. Rozdíl mezi ostatními variantami je téměř dvojnásobný, což je signifikantní rozdíl.

Tabulka 6: Parametry metody LIBS a jejich charakteristika odpovídající optimálním nastavením za různých podmínek.

Parametry		Energie pulzu laseru (mJ)	Čas zpoždění sběru signálu (μs)	Velikost průměru kráterů (mm)	Hloubka kráterů (μm)	SNR (-)	Směrodatná odchylka SNR (-)	Intenzita ozařování (GW/cm ²)
Ofuk vzorku argonem	266 nm	5	0,1	0,139	13,7	41	6	6,62
	1064 nm	17	0,8	0,095	16,9	170	30	48,48
Laboratorní podmínky	266 nm	5	0	0,143	14,8	86	14	6,2
	1064 nm	16	1,2	0,087	15,3	92	16	54,33

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zaměřila na optimalizaci parametrů pro měření měkkých biologických tkání pomocí metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Významem této optimalizace je zjištění optimálního nastavení pro analýzu měkkých tkání, jelikož tyto analýzy mohou vést k odhalení různých onemocnění například rakoviny kůže. Hlavním cílem práce tedy bylo optimalizovat experimentální podmínky, které výrazně ovlivňují citlivost a přesnost této metody.

Jako modelové matrice měkkých tkání byla zvolena myší játra zalitá v parafínu, jakožto modelové matrice. Optimalizace porovnávala laser o vlnové délce 266 nm a laser o vlnové délce 1064 nm. Dále byla zvolena různá atmosféra pro analýzu, kdy kromě laboratorních podmínek probíhala i měření za použití ofuku vzorku argonem. Mezi další optimalizované parametry patřily energie pulzu laseru, čas zpoždění sběru signálu a velikost ablačního kráteru. Výsledky měření byly zpracovány pomocí SNR analýzy (poměr signálu ku šumu) a následně vzájemně porovnány.

Optimální nastavení ze všech kombinací bylo docíleno při měření laserem o vlnové délce 1064 nm, energií pulzu laseru 17 mJ, času zpoždění sběru signálu 0,8 μ s a ofuku vzorku argonem. Při tomto nastavení hodnota SNR dosahovala 170 ± 30 . Při porovnání s velmi podobným nastavením, ale bez ofuku vzorku argonem, bylo dosaženo výrazně nižší hodnoty SNR, která činila 92 ± 16 .

Cíle této bakalářské práce byly splněny. Vzhledem k tomu, že popularita metody LIBS stále roste a její potenciál pro prvkovou analýzu měkkých tkání je velký, tak následný výzkum se bude zabývat dalším zdokonalováním této metody.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of Instrumental Analysis*. Seventh Edition. Cengage Learning, 2018. ISBN 978-1-305-57721-3.
- [2] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [3] HARVEY, David. DEPAUW UNIVERSITY. Analytical Chemistry. *LibreTexts* [online]. 2016 [cit. 2023-12-18]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/10%3A_Spectroscopic_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/10%3A_Spectroscopic_Methods)
- [4] CHU, S., J. D. GRAYBEAL, J. O. STONE a G. S. HURST. Spectroscopy. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2023 [cit. 2023-12-18]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/spectroscopy>
- [5] KAISER, Jozef. *Spektroskopie laserem buzeného plazmatu: Laser-induced breakdown spectroscopy : teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru aplikovaná fyzika*. Brno: VUTIUM, 2012. ISBN 978-80-214-4423-2.
- [6] RADZIEMSKI, Leon J. From LASER to LIBS, the path of technology development. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2002, **2002**(57), 1109-1113 [cit. 2023-12-19]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00052-6](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00052-6)
- [7] AHMED, Naveed, Saied DARWISH a Abdulrehman M. ALAHMARI. Laser Ablation and Laser-Hybrid Ablation Processes: A Review. *Materials and Manufacturing Processes* [online]. 2015, 2015-07-06, **31**(9), 1121-1142 [cit. 2024-05-06]. ISSN 1042-6914. Dostupné z: [doi:10.1080/10426914.2015.1048359](https://doi.org/10.1080/10426914.2015.1048359)
- [8] MPUTU KANYINDA, Jean-Noël, Arthur KANIKI TSHAMALA a Jean-Marc BAELE. LIBS Technology and its Application: Overview of the Different Research Areas. *Journal of Environmental Science and Public Health* [online]. 2020, **2020**(4), 134-149 [cit. 2023-12-19]. Dostupné z: [doi:10.26502/jesph.96120090](https://doi.org/10.26502/jesph.96120090)
- [9] REHSE, Steve. What is LIBS? *University of Windsor* [online]. [cit. 2024-05-09]. Dostupné z: <https://www.uwindsor.ca/people/rehse/299/lib>
- [10] Nd:YAG laser. *Scientificlib*. (n.d.) [online]. 2014 [cit. 2024-02-04]. Dostupné z: <https://www.scientificlib.com/en/Physics/Laser/NdYAGLaser.html>
- [11] HAHN, David W. a Nicoló OMENETTO. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part II: review of instrumental and methodological approaches to material analysis and

- applications to different fields. *Applied Spectroscopy* [online]. 2012, **2012**(6), 347-419 [cit. 2023-12-20]. Dostupné z: doi:10.1366/11-06574
- [12] SINGH, Vivek Kumar a Awadhesh Kumar RAI. Prospects for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review. *Lasers in Medical Science* [online]. 2011, **26**(5), 673-687 [cit. 2023-12-22]. ISSN 0268-8921. Dostupné z: doi:10.1007/s10103-011-0921-2
- [13] NIEMZ, Markolf H. *Laser-tissue interactions* [online]. 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007 [cit. 2024-01-06]. ISBN 3-540-42763-5. Dostupné z: https://www.academia.edu/36381264/_Markolf_H_Niemz_Laser_tissue_interactions_fund_BookSee_org_pdf
- [14] BEN, Cox. Introduction to laser-tissue interactions. *PHAS* [online]. 2007, **2007**(4886), 1-61 [cit. 2024-01-06]. Dostupné z: databáze <https://scholar.google.com/>
- [15] VOGEL, Alfred a Vasan VENUGOPALAN. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chemical Reviews* [online]. 2003, 2003-02-01, **103**(2), 577-644 [cit. 2024-04-05]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr010379n
- [16] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. *Medicínská biofyzika*. 2. Praha: Grada, 2019. ISBN 978-80-247-1152-2.
- [17] POŘÍZKA, Pavel, Pavlína MODLITBOVÁ a Jozef KAISER. Imaging of Biological Tissues. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2022, 2022, 139-164 [cit. 2024-04-07]. ISBN 978-3-031-14501-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-031-14502-5_6
- [18] HOLZAPFEL, Gerhard A. Biomechanics of soft tissue. In: *The handbook of materials behavior models* [online]. 7th. 2000, s. 1049-1063 [cit. 2024-01-07].
- [19] WANG, Qianqian, Wenting XIANGLI, Geer TENG, Xutai CUI a Kai WEI. A brief review of laser-induced breakdown spectroscopy for human and animal soft tissues: pathological diagnosis and physiological detection. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2021, 2021-03-16, **56**(3), 221-241 [cit. 2024-01-08]. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704928.2020.1791151
- [20] KASEM, M.A., J.J. GONZALEZ, R.E. RUSSO a M.A. HARITH. LIBS analysis of artificial calcified tissues matrices. *Talanta* [online]. 2013, **108**, 53-58 [cit. 2024-01-19]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.02.062

- [21] SANCEY, L., V. MOTTO-ROS, B. BUSSER, et al. Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. *Scientific Reports* [online]. 2014, 2014-12-17, **4**(1) [cit. 2024-01-19]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep06065
- [22] MOTTO-ROS, V., L. SANCEY, X.C. WANG, et al. Mapping nanoparticles injected into a biological tissue using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2013, **87**, 168-174 [cit. 2024-04-07]. ISSN 05848547. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854713001237>
- [23] CHOI, Jang-Hee, Sungho SHIN, Youngmin MOON, Jung Hyun HAN, Euseok HWANG a Sungho JEONG. High spatial resolution imaging of melanoma tissue by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2021, **179** [cit. 2024-04-07]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2021.106090
- [24] ŠINDELÁŘOVÁ, Anna, Pavel POŘÍZKA, Pavlína MODLITBOVÁ, et al. Methodology for the Implementation of Internal Standard to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Analysis of Soft Tissues. *Sensors* [online]. 2021, **21**(3) [cit. 2024-04-07]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21030900
- [25] JANTZI, Sarah C., Vincent MOTTO-ROS, Florian TRICHARD, Yuri MARKUSHIN, Nouredine MELIKECHI a Alessandro DE GIACOMO. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2016, **115**, 52-63 [cit. 2024-04-20]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.11.002
- [26] *LIGHTIGO* [online]. [cit. 2024-04-20]. Dostupné z: <https://lightigo.com/>
- [27] Bruker Contour GT-X. *Blue-scientific* [online]. 2021 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: <https://blue-scientific.com/bruker-nano-surface-analysis-nordic/bruker-contour-gt-x/>
- [28] LIMBECK, A., L. BRUNNBAUER, H. LOHNINGER, et al. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, **1147**, 72-98 [cit. 2024-04-28]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2020.12.054
- [29] SALEH, B. E. A. a M. C. TEICH, 2019. Fundamentals of Photonics. 3rd edition. John Wiley. ISBN 9781119506874.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

zkratka/symbol	význam
AES	Atomová emisní spektroskopie; <i>Atomic Emission Spectrometry</i>
CCD	Zařízení s vázanými náboji, <i>Charged Coupled Device</i>
CMOS	Komplementární polovodič na bázi oxidu kovů, <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina; <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E	Energie pulzu laseru
GD	Čas zpoždění sběru dat detektorem; <i>Gate Delay</i>
IR	Infračervené záření, <i>Infrared</i>
LA-ICP-MS	Laserová ablace s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu; <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
LIBS	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu, <i>Laser-induced Breakdown Spectroscopy</i>
Nd:YAG	krystal yttrito-hlinitého granátu dopovaný ionty neodymu; <i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>
OES	Optická emisní spektroskopie; <i>Optical Emission Spectrometry</i>
ppm	Částic na milion, <i>Parts Per Million</i>
RSD	Relativní směrodatná odchylka
RTG	Rentgenové záření
SNR	Poměr signálu ku šumu, <i>Signal to Noise Ratio</i>
UV	Ultrafialové záření, <i>Ultraviolet</i>
ÚŽFG	Ústavu živočišné fyziologie a genetiky
VIS	Viditelné, <i>Visible</i>
γ	Gama záření
λ	Vlnová délka
2D	Dvoudimenzionální
3D	Trojdimenzionální