



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

VYUŽITÍ METOD LASEROVÉ SPEKTROSKOPIE K DIAGNOSTICE BIOLOGICKÝCH VZORKŮ: KOMBINACE RAMANOVSKÉ SPEKTROSKOPIE A SPEKTROMETRIE LASEREM INDUKOVANÉHO PLAZMATU

UTILIZATION OF LASER SPECTROMETRY FOR INVESTIGATION OF BIOLOGICAL
SAMPLES: COMBINATION OF RAMAN SPECTROSCOPY AND LASER-INDUCED
BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

BC. JAN KOUŘIL

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MGR. OTA SAMER, DR.

BRNO 2012

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Jan Kouřil

který/která studuje v **magisterském navazujícím studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Využití metod laserové spektroskopie k diagnostice biologických vzorků: kombinace ramanovské spektroskopie a Spektrometrie laserem indukovaného mikroplazmatu (LIBS)

v anglickém jazyce:

Utilization of laser spectrometry for investigation of biological samples: combination of Raman spectroscopy and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Ramanovská spektroskopie je nedestruktivní technika, která je založena na osvětlení vzorku zářením o určité vlnové délce a následnou detekcí záření na jiných vlnových délkách, vzniklého rozptylem ve vzorku (posuv vlnových délek je závislý na vlastnostech vzorku). Ramanovská spektroskopie poskytuje pouze informace o chemických vazbách daného vzorku. V případě komplexních biologických vzorků je v některých případech žádoucí získat/doplnit informaci o prvkovém složení preparátu. To znamená, například určit přítomnost základních biologických stavebních prvků jako P, Ca, Fe, K a Mg. Pro účely prvkové analýzy se nabízí spektroskopie laserem buzeného plazmatu, označovaná ve zkratce LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy), která využívá pulzní lasery. Hlavním úkolem navržené práce je kombinace výše zmíněných technik, dle zadaných cílů projektu, a jejich aplikace na vybrané biologické vzorky, například k odlišení mikroorganismů tvořících biofilm od organismů, které biofilm nevytvářejí.

Cíle diplomové práce:

1. Provést analýzu (rešerši) základního stavu obou technik aplikovaných na biologické vzorky.
2. Provést měření pomocí ramanovské spektroskopie a LIBS na vybraných mikroorganismech.
3. Provést porovnání obou technik.
4. Pomocí statistického algoritmu aplikovaného na spektra (ramanovská i LIBS) odlišit podobné mikroorganismy.

Seznam odborné literatury:

[1] Miziolek, A. et al: Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), Fundamentals and applications. Cambridge University Press, 2006.

[2] Smith, E. et al: Modern Raman spectroscopy – a practical approach. John Wiley and Sons, 2008.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ota Samek, Dr.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2011/2012.

V Brně, dne 24. 11. 2011

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
Ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá metodami spektroskopie laserem buzeného plazmatu a ramanovské spektroskopie při analýze řasy *Trachydiscus minutus*, do jejíž kultivační lázně byly přidány roztoky síranu měďnatého s různou koncentrací. První část práce je věnována fyzikálním principům a výsledkům měření spektroskopie laserem buzeného plazmatu, druhá část práce pojednává o metodě ramanovské spektroskopie.

Klíčová slova

spektroskopie laserem indukovaného plazmatu, jednopulzní LIBS, dvoupulzní LIBS, *Trachydiscus minutus*, Ramanova spektroskopie

Summary

This diploma thesis deals with two spectroscopic methods - laser induced breakdown spectroscopy and Raman spectroscopy. These methods were used for analysis of alga *Trachydiscus minutus*, which was cultivated in copper sulfate solutions of various concentrations. First part of this thesis is dedicated to physics and measurements of laser induced breakdown spectroscopy, second part deals with Raman spectroscopy

Keywords

laser induced breakdown spectroscopy, single pulse LIBS, double pulse LIBS, *Trachydiscus minutus*, Raman spectroscopy

KOUŘIL, J. *Využití metod laserové spektroskopie k diagnostice biologických vzorků: kombinace ramanovské spektroskopie a Spektrometrie laserem indukovaného mikroplazmatu (LIBS)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 84 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Ota Samek, Dr.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením
Mgr. Oty Samka, Dr. a že veškerá použitá literatura je uvedena v seznamu zdrojů.

Jan Kouřil

Děkuji vedoucímu práce Mgr. Otovi Samkovi, Dr. za vedení, korekturu a dodání vzorků, za obrázky aparatury vděčím ing. Janu Novotnému. Ing. Pavlovi Pořízkovi a zejména Ing. Davidu Procházkovi děkuji za pomoc při měření a vyhodnocování výsledků a doc. Ing. Jozefu Kaiserovi, Ph. D. za záštitu celé práce. Také děkuji rodičům, přítelkyni a všem ostatním, kteří mě podporovali během studia.

Jan Kouřil

Obsah

1	Úvod	10
2	Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)	12
2.1	Fyzikální základy metody LIBS	13
2.1.1	Tvorba plazmatu	13
2.1.2	Plazma po dopadu laserového pulzu	18
2.1.3	Termodynamická rovnováha v plazmatu	25
2.1.4	Určování elektronové hustoty a teploty plazmatu	27
2.2	Analýza spektra	32
2.2.1	Kvalitativní analýza	32
2.2.2	Použití více pulzů	35
2.3	Popis aparatury	37
2.3.1	Analýza z pevné fáze	37
2.3.2	Analýza z proudu vody	40
2.3.3	Softwarové vybavení	41
3	Příprava vzorků pro LIBS a ramanovskou spektroskopii	42
4	Měření LIBS	43
4.1	Optimalizace energie laseru a nastavení spektrometru	43
4.2	Charakteristika plazmatu	45
4.2.1	Výpočet teploty	45
4.2.2	Stanovení elektronové hustoty	49
4.2.3	Určení platnosti LTE	51
4.3	Stanovení kalibračních křivek pomocí $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	51
4.3.1	Kalibrační křivky pro ablaci z pevné fáze	53
4.3.2	Kalibrační křivky pro ablaci z proudu vody	57

4.4	Chemická analýza metodou emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP - OES).....	60
4.5	Kvalitativní chemická analýza metodou LIBS.....	61
4.6	Určení obsahu mědi v řase pomocí LIBS.....	63
4.6.1	Detekční limit a limit kvantifikace metody LIBS.....	65
4.6.2	Kalibrační křivky pro určení obsahu mědi v řase kombinací ICP a LIBS.....	66
4.7	Optimalizace aparatury pro ablaci z proudu vody.....	67
5	Ramanova spektroskopie.....	68
5.1	Princip ramanovské spektroskopie.....	69
5.2	Popis aparatury pro ramanovskou spektroskopii.....	72
6	Měření pomocí ramanovské spektroskopie.....	74
7	Závěr.....	76
8	Literatura.....	78

1 Úvod

V dnešní době se stále více diskutuje problém znečišťování životního prostředí vlivem industrializace. Nechtěným vedlejším produktem průmyslu je kontaminace vodních toků a půdy těžkými kovy, jako je olovo, měď, chrom apod. Často dosahuje koncentrace polutantů neúnosných hodnot. Proto jsou vyvíjeny stále nové metody, pomocí kterých by bylo možné obsah škodlivých látek v životním prostředí kontrolovat, a postupy, jak situaci vrátit do původního stavu. Nejšetnější metodou je fytoremediace, při níž se využívá akumulace škodlivých látek v různých částech rostlin.

Pro monitoring těžkých kovů v prostředí je potřeba rychlé, přesné analytické metody, která nevyžaduje složitou přípravu vzorku a umožňuje detekovat i velmi malé koncentrace. Je také žádoucí, aby tato metoda umožňovala jak analýzu pevných látek (např. tkání rostlin) tak i kapalin (odpadní vody). Metoda spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) tyto nároky splňuje, a proto je v poslední době intenzivně pro tyto aplikace testována a používána [1], [2]. Většinou se však jedná o analýzu z pevné fáze. Při analýze roztoků lze využít ablaci z objemu, povrchu [3], či z laminárního proudu [4], [5]. Byla také zkoumána možnost kapalně vzorky zmrazit [6] a vyhnout se tak problémům, spojeným s analýzou z kapalně fáze, jako je rozstříkávání či zkrácení doby, vhodné pro pozorování plazmatu.

Při použití LIBS získáme informaci o prvkovém složení vzorků, po kalibraci lze určovat jejich hmotnostní zastoupení. Je žádoucí tuto informaci doplnit o znalost chemických vazeb v analytu. Pro tyto účely lze využít Ramanovu spektroskopii, jejíž instrumentace se LIBS v mnohém podobá. Ramanova spektroskopie již byla v minulosti využita k detekci mastných kyselin v roztocích řas [7] a určování jejich nasycenosti [8].

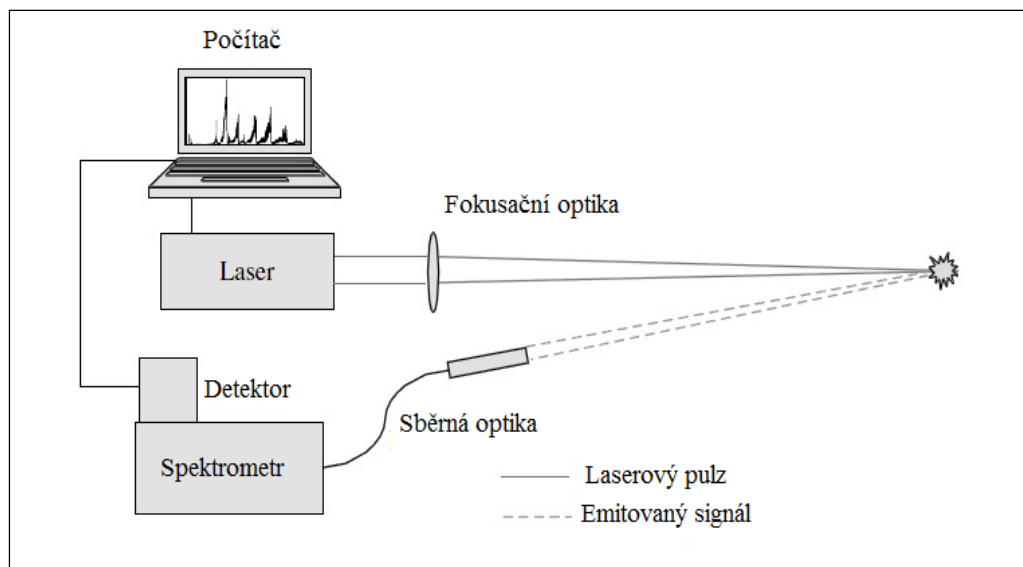
Tato práce se zabývá využitím kombinace dvou výše zmíněných spektroskopických metod při analýze řasy *Trachydiscus minutus*, jejichž kultivační roztoky byly kontaminovány různou koncentrací síranu měďnatého. Na tuto řasu se v současné době soustředí pozornost z hlediska jejího využití v generaci biopaliv a získávání nenasyčených mastných kyselin pro potravinářské účely (především omega 3). Další možnost využití této řasy spočívá ve zmíněném biologickém čištění (bioremediaci) půdy a odpadních vod.

Metodou jednopulzní a dvoupulzní LIBS analýzy biofilmů jsem byla určena přítomnost mědi a ostatních chemických prvků v řase, zároveň byla optimalizována aparatura pro ablací z proudu vody. Pomocí ramanovské spektroskopie byly sledovány změny v obsahu životně důležitých látek v buňkách řasy při zvyšování koncentrace mědi v živném roztoku.

2 Laser–Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)

Spektroskopie laserem indukovaného plasmatu (LIBS) bývá v literatuře taktéž označována jako LIPS (laser-induced plasma spectroscopy) nebo LSS (laser-induced spark spectroscopy). Je to spektroskopická technika využívající k analýze vzorků pulzní lasery s nízkou energií (řádově 10^0 - 10^2 mJ), které po fokusaci pulzů čočkou na povrch vzorku část vzorku odpaří a utvoří plazma.

Toto plazma po dobu svého života emituje elektromagnetické záření, obsahující informaci o složení vzorku, teplotě plazmatu a jeho elektronové hustotě. Část vyzářeného světla je ve vhodný časový okamžik přivedena (např. pomocí optického kabelu) do spektrometru, kde je světlo rozloženo na jednotlivé vlnové délky a detektor (CCD čip) tuto informaci o intenzitě světla převede do digitální formy. Výsledný signál je poté zobrazen na monitoru počítače. Základní schéma aparatury pro LIBS je zobrazeno na obr. 1.



Obr. 1 Schéma aparatury LIBS. Převzato a upraveno z [9] str. 3

Velkou výhodou LIBS je značná šíře jejího uplatnění vyplývající z relativní jednoduchosti této metody, velké flexibility uspořádání aparatury a absence potřeby vzorky před měřením speciálně připravovat. V podstatě kterýkoliv typ materiálu může být pomocí LIBS analyzován, ať už v normální atmosféře, vakuu, či ponořený v kapalině. Lze analyzovat pevné látky, kapaliny, aerosoly i plyny.

Díky těmto vlastnostem můžeme metodu LIBS použít při studiu kovových slitin, analýze historických vzorků, půdy, rostlin, plodů, sedimentů, výbušnin apod. Při použití dálkové laserové spektroskopie (remote LIBS) můžeme získávat informace o vzorcích z těžko přístupných či nebezpečných míst (jaderné reaktory apod.).

Kompletnější výčet aplikací metody LIBS nalezneme např. v [9] str. 3, [10] str. 5, [11], [12]. Metoda LIBS může být vhodně zkombinována s jinými spektroskopickými technikami, které využívají laserů, například s LIF (laser-induced fluorescence) nebo s ramanovskou spektroskopií.

2.1 Fyzikální základy metody LIBS

2.1.1 Tvorba plazmatu

LIBS využívá k tvorbě plazmatu pulzní lasery o konstantní frekvenci pulzů. Průměr laserového svazku v ohnisku je po fokusaci čočkou velmi malý (řádově μm), čímž je dosaženo intenzity záření v jednotkách až desítkách GW/cm^2 . Po dopadu laserového pulzu na vzorek dojde k předání energie, čímž dojde na povrchu vzorku ke vzniku plazmatu, což bývá označováno jako průraz (breakdown). Plazma potom expanduje kolmo k povrchu s rychlostí cca 10^6 cm/s s charakteristickým praskavým zvukem. Teplota a elektronová hustota v mikroplazmatu se pohybuje od 6000 – 20000 K, resp. 10^{17} – 10^{19} $\text{elektronů}/\text{cm}^3$.

Hodnoty energie, potřebné k průrazu, se výrazně liší v závislosti na typu vzorku, jeho teplotě a okolní atmosféře. Vliv má také vlnová délka použitého laseru a délka trvání pulzu. Empiricky zjištěné energie průrazu jsou tabelovány např. v [9] str. 38. Obecně platí, že materiály v pevném skupenství je snadnější přeměnit na plazma, než kapaliny a plyny – hustota materiálu je rozhodujícím faktorem. Interakce laserového pulzu se vzorkem je komplexní proces, který je pro případ pevných látek popsán následujícím schématem [13].

LASEROVÝ PULZ → VZOREK (pevná fáze) → ZAHŘÍVÁNÍ (tavení) → ODPAŘOVÁNÍ (tvorba volných atomů) → EXCITACE (tvorba excitovaných atomů) → IONIZACE (tvorba iontů)

2.1.1.1 Zahřátí a natavení vzorku

Po absorpci fotonů laserového pulzu procesem inverzního brzdného záření (inverse Bremstrahlung) předají vodivostní elektrony pomocí velkého počtu srážek energií iontům v mřížce. Tím se začne povrch vzorku vysokou rychlostí zahřívát (přibližně kolem 10^{10} Ks^{-1}) [13] a dojde k natavení vzorku.

2.1.1.2 Odpařování (Ablace)

Teplota povrchu vzorku dále narůstá, až dojde k překročení skupenského tepla varu pro daný materiál. Kvůli rychlému nárůstu teploty povrchu nemůže být teplo dostatečně rychle odváděno a dojde k odpaření části materiálu. Materiál se může ablatovat ve formě atomů, molekul nebo shluků částic. Proces odpařování se liší podle druhu materiálu, použité vlnové délky laserového záření a délky pulzu. Při použití laserového pulzu s vlnovou délkou větší než $1 \mu\text{m}$ ablace probíhá třemi způsoby

- Odpařování
- Var (Boiling)
- Fázová exploze (Phase explosion)

Při procesu odpařování laserový pulz postupně látku ohřeje, zkapalní a odpaří. Odpařování je jednoduchý přechod materiálu z pevného a kapalného skupenství do skupenství plynného.

Při varu se tvoří na povrchu materiálu bubliny, které jsou následně zahřáty na vyšší teplotu než je teplota varu pro danou látku a atomy začnou difundovat zpět do materiálu nebo směrem od povrchu. Hloubka termální difuze se pohybuje v řádech mikrometrů, kráter po odpaření je větší a ablatovaný materiál se hromadí podél jeho okraje.

Fázová exploze je určitým druhem varu, kdy dojde k zahřátí materiálu nad kritickou teplotu a materiál je vytlačen ve formě páry nebo kapének.

Procesy odpařování, varu a fázové exploze vyžadují delší dobu interakce laserového pulzu materiálem a jsou proto dominantní pro delší laserové pulzy.

Aby k odpaření materiálu vůbec došlo, je třeba, aby dodané teplo překročilo skupenské teplo vypařování pro daný materiál. Pro minimální intenzitu laseru, potřebnou k tomuto procesu, platí rovnice [13], [9] str. 43.

$$I_{\min} = \rho L_v \sqrt{\frac{\kappa}{\Delta t}},$$

kde ρ je hustota materiálu, L_v je jeho měrné skupenské teplo varu, κ je koeficient termodifúze a Δt je délka laserového pulzu. I_{\min} je tedy závislá na délce laserového pulzu.

Maximální hmotnost materiálu odpařeného laserovým pulzem o energii E je dána rovnicí [13], [9] str. 44.

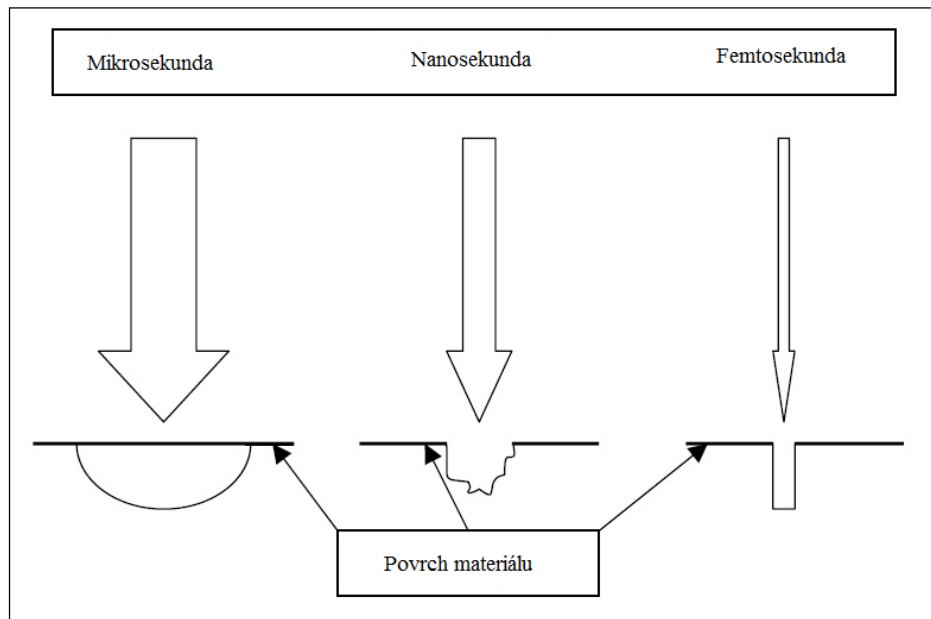
$$M = \frac{E(1-R)}{[C_p(T_b - T_0) + L_v]},$$

kde R je odrazivost povrchu pro vlnovou délku laseru, C_p je tepelná kapacita, T_b teplota varu v kelvinech, T_0 je teplota okolí v kelvinech a L_v je měrné skupenské teplo varu.

Pokud je použit laser s velice krátkou délkou pulzu (v řádech ps a fs), dominantním procesem při odpařování se stává coulombovská exploze (coulomb explosion), při níž elektrony nemají dostatek času odevzdat získanou termální energii mřížce. Nejdříve dojde k uvolnění elektronů z materiálu pomocí multifotonové ionizace. Pokud nejsou uvolněné elektrony rychle nahrazeny, vzorek se začne na povrchu kladně nabíjet a ionty jsou z mřížky vytlačeny pomocí coulombických sil s kinetickou energií řádově 10^2 eV. Tento jev je častější u dielektrických materiálů, jelikož nahrazování elektronů zde probíhá pomaleji kvůli nižšímu počtu volných elektronů.

Skládá-li se vzorek z více prvků, nemusí odpařená část svým složením odpovídat složení vzorku. Pokud na vzorek působíme energií, větší než skupenské teplo varu všech obsažených prvků, můžeme selektivnímu odpařování zamezit. Bylo experimentálně zjištěno, že při použití nanosekundových pulzů o intenzitě $>10^9$ W/cm² tlak na povrchu substrátu zabrání ablaci, dokud nedojde k překročení kritické teploty a tím se selektivnímu odpařování zamezí.

Na obr. 2 je zachycen vliv délky pulzu laseru na tvar kráteru.

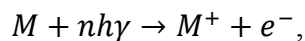


Obr. 2 Vliv délky trvání pulzu laseru na tvar kráteru. Převzato a upraveno [9] str. 44

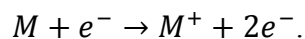
2.1.1.3 Excitace, ionizace a průraz

Ke tvorbě plazmatu, ať už v plynu či v pevné fázi, je potřeba volných elektronů. Tyto elektrony mohou být uvolněny např. kosmickým zářením, přirozenou radioaktivitou země nebo nšjčastěji fotony laserového svazku. Dva hlavní mechanismy, podílející se na generování plazmatu, jsou multifotonová a kaskádová (lavinová) ionizace. Bez multifotonových efektů by k přímé ionizaci např. plynů nemohlo dojít. Příklad je uvedený v [9] str. 36; ionizační potenciál molekuly O_2 resp. N_2 je 12,2 eV, resp. 15,6 eV. Vlnovým délkám laseru Nd:YAG na hodnotách 1064, 532 a 266 nm odpovídá energie fotonů 1,25; 2,33 a 4,7 eV.

Intenzita laserového záření v řádech 10^{10} W/cm² je dostatečná k multifotonové ionizaci a to i přes malý účinný průřez vhodný pro vyvolání tohoto typu ionizace. Proces multifotonové ionizace je popsán rovnicí



kde M je atom, M^+ jednonásobně ionizovaný atom, e^- elektron, n je počet fotonů s frekvencí ν , h je Planckova konstanta. Při multifotonové ionizaci dojde k absorpci n fotonů, čímž se vytvoří volné elektrony (tzv. seed electrons). Určitý počet elektronů, daný Maxwellovým rozdělením, (viz kapitola 2.1.3) bude mít dostatečnou energii k ionizaci neutrálních atomů či molekul podle rovnice



Tímto procesem dojde k nárůstu počtu volných elektronů, které jsou urychlovány elektromagnetickým polem laserového svazku, a ionizace narůstá.

Elektrony získávají energii trojnými srážkami s neutrálními atomy a fotony mechanismem inverzní brzdné absorpce (inverse Bremsstrahlung). Vlivem srážek se rozdělení jejich energií posouvá k vyšším hodnotám a elektrony tak mohou ionizovat další neutrální atomy; dochází k lavinové ionizaci a k průrazu (breakdown).

Přítomnost nehomogenit s nižším ionizačním potenciálem přispívá k nastartování průrazu, protože v těchto místech snadněji dochází k multifotonové ionizaci. K vytvoření plazmatu dochází jednodušeji u prostředí absorbujících laserové záření než u prostředí pro vlnovou délku laseru transparentních. Stanovit hodnotu energie průrazu je obtížné, protože závisí jak na vlastnostech zkoumané látky tak laserového pulzu (trvání pulzu, vlnová délka laseru). Pro určité materiály jsou přibližné hodnoty známy a tabelovány. Pokud je ale hodnota energie průrazu v pro experiment důležitým faktorem (např. laserová chirurgie oka [14]), měla by být určena empiricky pro danou laboratorní sestavu a vzorek.

Často bývá hodnota průrazové energie určena odpovídající intenzitou elektrického pole. Vztah mezi intenzitou záření a elektrickým polem je dán rovnicí [9] str. 38:

$$I = c\epsilon_0 \langle E^2 \rangle = 2,6 \cdot 10^{-3} E^2,$$

kde I je intenzita záření ve W/cm^2 , $\langle E^2 \rangle$ je časová střední hodnota kvadrátu amplitudy intenzity elektrického pole ve V/cm , c je rychlost světla a ϵ_0 je permitivita vakua.

2.1.1.4 Průraz v kapalinách

Výzkum jevů spojených s interací laserového svazku s kapalinami pokročil zejména díky širokému použití laserů v medicínské praxi. Vysoká intenzita laserového záření zapříčiňuje změnu orientace molekul kapaliny, její smršťování, filamentaci laseru a generaci bílého světla [15]. Před dosažením prahové hodnoty průlomu dochází v kapalinách ke koherentnímu rozptylu světla (ramanovský a brillouinovský rozptyl), samofokusaci svazku, ohřívání kapaliny a produkci elektronů fotolýzou vody. Při použití dostatečně vysoké energie laseru pak dochází k multifotonové a následně kaskádové ionizaci a tvorbě plazmatu, jako v pevných látkách.

Pokud se jedná o vodu [16], hodnota prahové energie pro průraz je daleko vyšší než teoreticky odvozená hodnota, pokud použitá vlnová délka spadá do transparentní části spektra vody (např. druhá harmonická vlnová délka Nd:YAG laseru na 532 nm). V tomto případě je velká část energie laseru převedena na nelineární jevy. Zbytek energie laseru produkuje množství elektronů a dochází k jejich solvataci (atrakce

elektronů molekulami vody). Při hydratačním procesu se snižuje kinetická energie elektronů, získaná absorpcí fotonů laseru, a tím dojde ke zvýšení prahové energie průrazu. Energie potřebná k ionizaci molekuly vody a hydrataci nabitých částic je 5,8 eV. K hydrataci elektronů dochází velice rychle (10^{-13} s). Volné elektrony absorbují dopadající fotony v časech srovnatelných s délkou fotolytického procesu. Jakmile k průrazu pomocí srážek elektronů s neutrály dojde, utvoří se plazma s vysokým stupněm ionizace (koncentrace elektronů je $10^{18} - 10^{20} \text{ cm}^{-3}$).

Tyto komplexní procesy objasňují velký interval intenzit laseru potřebných pro průraz ve vodě a v kapalinách obecně, který je v řádech $10^9 - 10^{12} \text{ W/cm}^2$. Laserem indukované volné elektrony způsobují silné zvýšení polarizovatelnosti média a před započítím průlomu dochází k silnému stimulovanému Ramanovu rozptylu.

Samostatnou kapitolou jsou průrazové jevy v aerosolech [9] str. 40. Zde jsou parametry ovlivňujícími průraz složení v aerosolu zejména podíl vody ve směsi, hustota rozptýlených částic, jejich tvar a dále typ okolní atmosféry. Někdy se při ablaci z pevné fáze mohou objevit jevy spojené s indukcí plazmatu v aerosolech pokud částice ablatované pulzem absorbují laserové záření a zabrání tak tvorbě plazmatu až na povrchu vzorku.

2.1.2 Plazma po dopadu laserového pulzu

Při dostatečné energii laseru přední strana pulzu zahřeje, roztaví a odpaří část povrchu vzorku a vznikne plazma. Díky nízkému stupni ionizace laserový svazek prostupuje plazmatem až jeho povrch. Ještě v průběhu laserového pulzu se však může stát, pokud je jeho energie dostatečná, že se plazma stane pro laser neprůhledným – laserové záření je absorbováno tenkou, částečně ionizovanou vrstvou mezi povrchem a oblakem odpařené látky. Laser tedy předává energii pouze vrchní vrstvě a ablace materiálu už se děje pouze zprostředkovaně pomocí vytvořeného mikroplazmatu.

Tento jev nastane, pokud frekvence plazmatu bude vyšší než frekvence laseru $\omega_p > \omega_l$, nebo v případě, že elektronová hustota v částečně ionizované vrstvě překročí jistou kritickou hodnotu, danou vztahem [13]

$$N_C = 1,09 \cdot 10^{15} \lambda^{-2} \text{ cm}^{-3},$$

kde λ je vlnová délka laseru. Tedy při použití vlnové délky $10 \mu\text{m}$ je odpovídající kritická elektronová hustota $10^{19}/\text{cm}^3$, pro $\lambda = 1 \mu\text{m}$ je to $10^{21}/\text{cm}^3$ a pro 250 nm je tato hodnota $1,6 \cdot 10^{22}/\text{cm}^3$.

Kromě mechanismu inverzního brzděného záření přispívá k fotoionizaci plazmatu také interakce laserového záření s povrchem plazmatu. Tento proces je důležitý před začátkem samotné expanze plazmatu. Jakmile již plazma expanduje, dochází ke snížení elektronové hustoty; klesne až pod hodnotu N_c a tím se stane plazmový oblak pro laser opět transparentním. Tento proces se při expanzi plazmatu stále opakuje. Plazma většinou expanduje nadzvukovou rychlostí ($\sim 10^6$ cm/s). Vytvoří se rázová vlna šířící se okolní atmosférou. Rázová vlna okolní plyn zahřívává a způsobuje v něm změny tlaku. Může dojít k ionizaci plynu a následné rekombinaci s elektrony a ionty plazmatu. To má za následek nepřesnosti při stanovování složení materiálu. Bylo navrženo několik modelů [17], které berou v úvahu chemické reakce plazmatu s okolním plynem. Podle tlaku okolního plynu může expanze plazmatu probíhat třemi způsoby:

- free flow režim - tlak okolní atmosféry je nízký, expanze plazmatu probíhá adiabaticky a ablatovaný materiál nereaguje s okolním plynem,
- kolizní režim - probíhá za vyšších tlaků, než předchozí, odpařené částice se sráží s molekulami plynu a tvoří rázovou vlnu,
- režim termalizace - za vysokých tlaků dochází k silnému stlačení expandujícího plazmatu a částice materiálu se mísí s molekulami okolního plynu.

V případě kolizního režimu a režimu termalizace dojde k vytvoření rázové vlny, na jejímž čele dochází k výměně energie a částic mezi plazmatem a okolním plynem. Kromě rázové vlny vzniká tedy i tzv. absorpční vlna. Parametry této vlny závisí na intenzitě, průřezu laserového svazku a vlastnostech plynu. Jsou možné tři typy absorpčních vln [18]:

- laserem podporované hoření (Laser Supported Combustion - LSC),
- laserem podporovaná detonace (Laser Supported Detonation - LSD),
- laserem podporované záření (Laser Supported Radiation - LSR).

LSC vlna se utváří při nízké intenzitě laseru (~ 10 MW/cm²) a postupuje podobně jako v případě deflagrace (podzvukové spalování, kdy se teplo šíří tepelnou vodivostí). Ionizace plynu způsobená plazmatem v případě LSC není dostatečná k odstínění laserového svazku. Absorpční vlna odděluje plazma od okolního plynu a postupuje pomaleji než vlna rázová.

Pro hodnoty intenzity v řádech 10^1 - 10^3 MW/cm² již zahřátý ionizovaný plyn pohlcuje laserové záření a vzniká LSD vlna. Tato vlna se šíří stejně rychle, jako rázová

vlna (detonace je nadzvukové spalování). Pokud je intenzita větší než několik GW/cm^2 , okolní plyn se zahřeje okamžitě a vytvořená LSR vlna postupuje před rázovou vlnou.

Po ukončení laserového pulzu není již rekombinace vyvažována fotoionizací, plazma slábne a vyhasíná. Dynamikou plazmatu se podrobněji zabývá např. [19].

2.1.2.1 Optická hustota, stínění

Pro analýzu emisních spekter má zásadní význam optická hustota plazmatu. Plazma je opticky tenké (a tedy pro analýzu vhodné), pokud se z něj záření šíří se zanedbatelnou absorpcí a rozptylem. Intenzita záření emitovaného plazmatem je dána rovnicí [9] str.30:

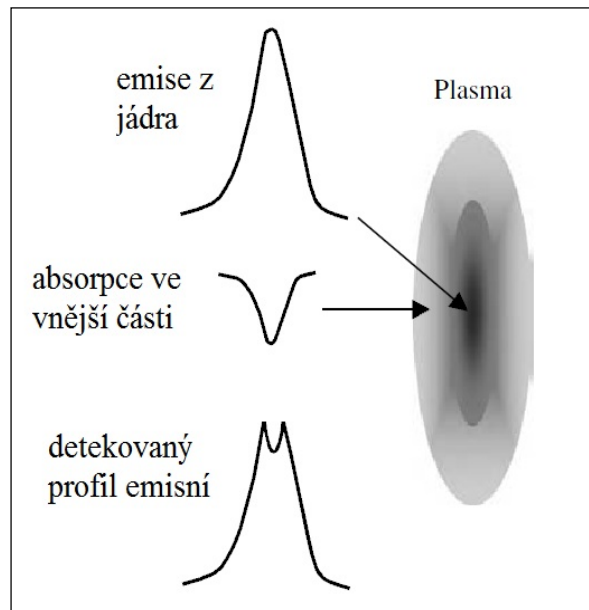
$$I(\lambda) = [\varepsilon(\lambda) / \alpha(\lambda)] \{1 - \exp[-\alpha(\lambda)L]\},$$

kde ε je emisivita, α absorpční koeficient (cm^{-1}) a L je rozměr plazmatu ve směru pozorování. Pokud je α malé, dostaneme podmínku pro opticky tenké plazma

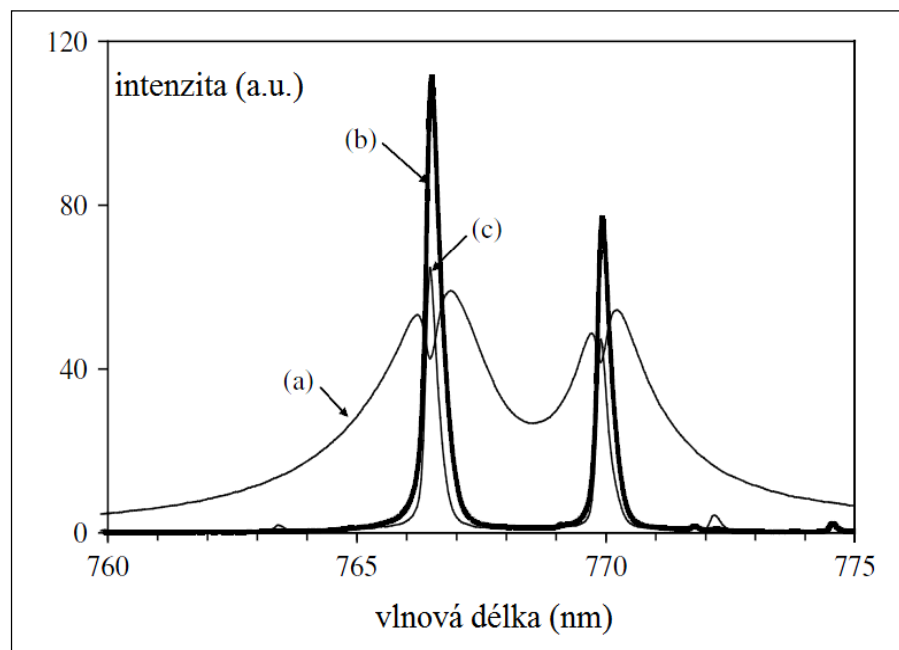
$$I(\lambda) = [\varepsilon(\lambda) / \alpha(\lambda)] [\alpha(\lambda)L] \approx \varepsilon(\lambda)L$$

Existuje několik způsobů kontroly, zda je plazma opticky tenké. Charakteristické spektrální čáry pro chemické prvky mají teoreticky i experimentálně stanovené hodnoty relativní intenzity, tabelované např. v databázi NIST [20]. Pokud k absorpci záření dochází, budou se naměřené hodnoty od tabelovaných lišit. Spektrální čáry s vysokou intenzitou budou mít ploché vrcholy nebo budou mít jejich píky na hodnotě centrální vlnové délky proláklínu (viz obr. 3).

Většinou k selfabsorpci dochází u vzorků s vysokým zastoupením jednoho prvku. Spektrální emise přechodu atomu mezi stavy je kvantována a tudíž má nejvyšší pravděpodobnost danou energií absorbovat jiný atom téhož prvku. Záření z vnitřní části plazmatu je tak absorbováno ve vnějším obalu (obr. 4). Zde je teplota plazmatu nižší než ve středu a tudíž se zde více atomů či iontů nachází na základní energiové hladině. Při analýze spektra důležité vybírat takové emisní čáry, u kterých je selfabsorpc minimální (tedy nikoliv rezonanční čáry, které odpovídají přechodu na základní hladinu energie).



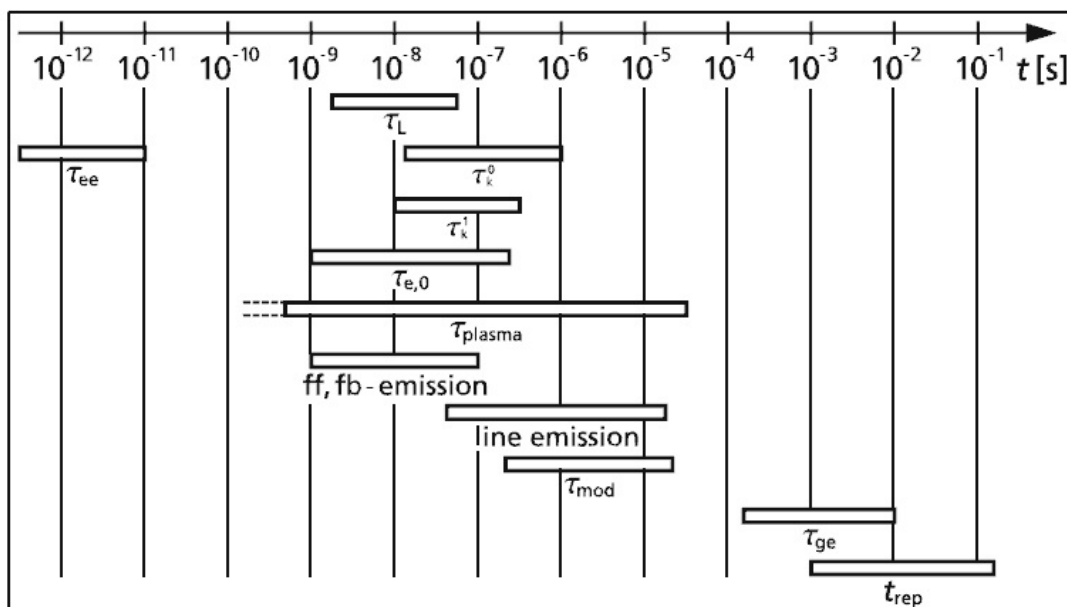
Obr. 3 Původ jevu selfabsorpce, převzato z [9] str. 110



Obr. 4 Příklad silné selfabsorpce ve spektru plazmatu vytvořeného stlačením práškovém chloridu draselného. Píky odpovídají silné emisi atomů draslíku při různých hodnotách tlaku a) 580 b) 7 c) 0,0001 Torr. Převzato z [9] str. 110

2.1.2.2 Časový vývoj plazmatu a emisních spekter

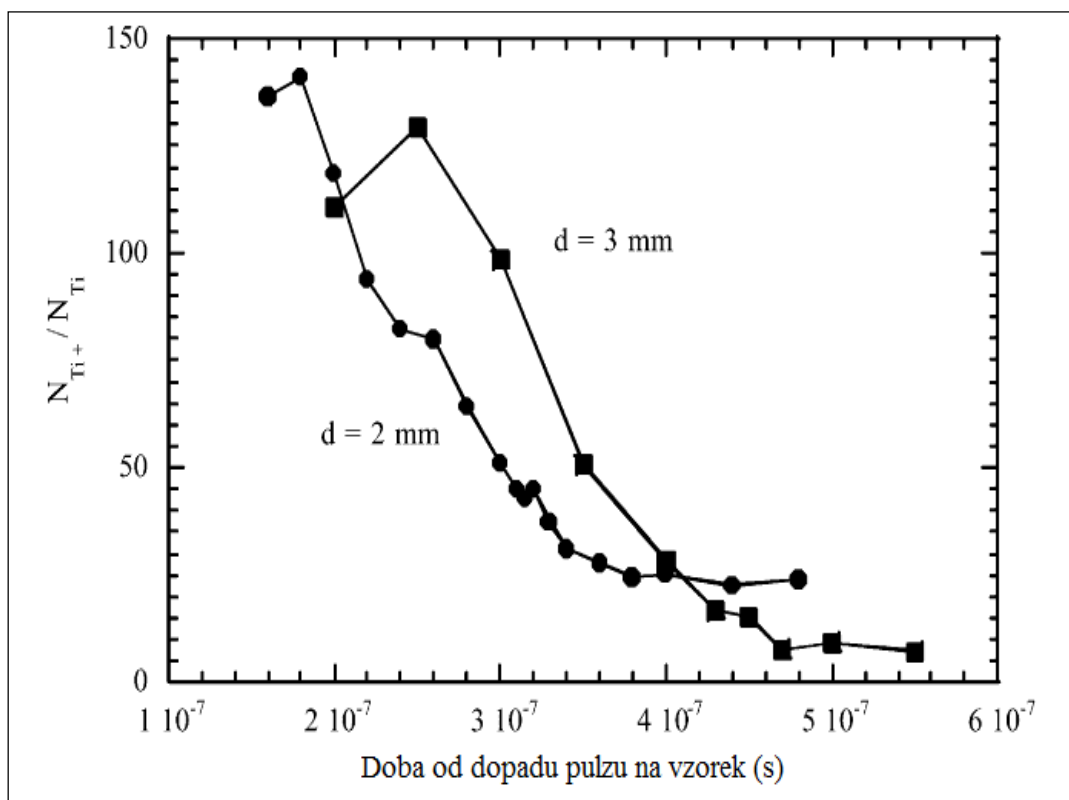
Plazma pro LIBS indukované laserovým pulzem (trvání řádově 10^0 - 10^1 ns) je nestacionární. Jeho parametry se v závislosti na čase rychle mění. Po dopadu laserového pulzu na povrch se v plazmatu začne několik typů procesů. Shrnutí těchto procesů je na obr. 5 [10] str. 169:



Obr. 5 Časové intervaly jednotlivých procesů při časovém vývoji plazmatu pro LIBS. Vysvětlivky: τ_L ...délka laserového pulzu, τ_{ee} ...relaxační doba při srážkách elektronů, τ_k^0 ...relaxační doba pro interakci elektron-neutrál, τ_k^1 ...relaxační doba pro interakci elektron-iont, $\tau_{e,0}$...časový interval pro populaci energiových hladin podle Boltzmannovy distribuce, τ_{plasma} ...doba života plazmatu, ff...free-free interakce elektronů, fb...free-bound interakce elektronů při rekombinaci s ionty, τ_{mod} ...časová konstanta, odpovídající intervalům mezi laserovými pulzy při použití více pulzů, line emission...časový interval čarové emise atomů a iontů, τ_{ge} ...časová konstanta pro reakci plazmatu s plynem (gas exchange time - doba od konce předchozího pulzu, kdy se ablatovaný materiál rozptýluje v plynu) a τ_{rep} ... frekvence laserových pulzů. Převzato z [10] str. 169

Po ionizaci ablatovaného materiálu v plazmatu dominují elektronové kolize přičemž relaxační doba elektronů τ_{ee} se pohybuje v řádech pikosekund. Výměna kinetické energie srážkami s neutrálními atomy τ_k^0 a ionty τ_k^1 probíhá déle. V čase $\tau_{e,0}$ může být určena hustota populace jednotlivých energiových hladin atomů pomocí Boltzmannovy distribuce. Doba života plazmatu τ_{plasma} je řádově 10^1 μ s.

Zpočátku je plazma silně ionizováno. V krátkém časovém intervalu po zázehu plazmatu v jeho emisním spektru dominuje kontinuální záření. Kontinuum odpovídá buď brzděnému záření uvolněnému při srážkách volných elektronů (free-free interakce), nebo fotonům emitovaným při rekombinaci elektronů s ionty (free-bound interakce). Po čase stupeň ionizace slábne (viz obr. 6), dokud plazma nevyhasne.

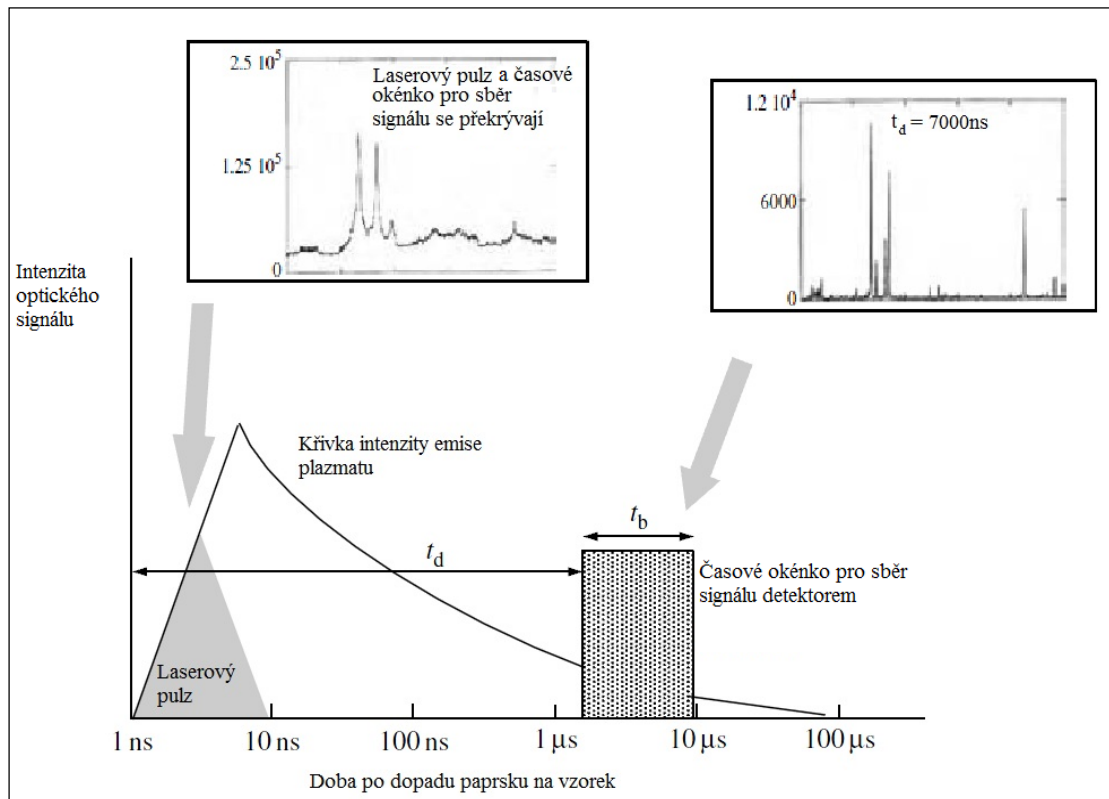


Obr. 6 Časový vývoj ionizace plazmatu, měřeno při vzdálenosti 2 a 3 mm od vzorku. Vzorek je titan, tlak okolní atmosféry 10^{-5} Torr. Délka pulzu je 30 ns a jeho intenzita 5 J/cm^2 . Převzato a upraveno z [21]

Kontinuální část spektra není pro kvalitativní (prvkovou) analýzu použitelná; je třeba zachytit časový interval, kdy dostatečně intenzivní záření emitují relaxující atomy a ionty. Kontinuální záření slábne v závislosti na čase daleko rychleji, než čarová emise atomů a iontů. Při měřeních je důležité nastavit vhodný okamžik pro začátek sběru záření optikou a dobu, po kterou se budou spektra integrovat (časové okénko).

Optimální parametry časových konstant se liší podle druhu experimentu. Obecně platí, že do časů v řádech desítek až stovek nanosekund po dopadu svazku na vzorek se ve spektru atomové emisní čáry neobjevují. Při většině měření se proto volí pro začátek sběru signálu doba v rozmezí $0,5 - 2 \mu\text{s}$ od dopadu pulzu na povrch. V časech nad $10 \mu\text{s}$ je již intenzita emisních čar příliš slabá.

Na dobu života plazmatu a časový vývoj výše popsaných procesů má vliv jak okolní atmosféra (při nižších tlacích se zkracuje), tak teplota a elektronová hustota plazmatu. Samostatnou kapitolou je časový vývoj plazmatu v kapalinách za normálního tlaku a za zvýšených tlaků. Vliv nastavení časových parametrů na získané spektrum při použití jednoho pulzu ukazuje obr.7:



Obr. 7 Vliv nastavení časových konstant na naměřené spektrum; t_d ...doba mezi dopadem laseru na vzorek a otevřením clony detektoru, t_b ...délka časového okénka detektoru při sběru signálu. Převzato a upraveno z [9] str. 47

Při použití více laserových pulzů (double pulse LIBS, multiple pulse LIBS - viz 2.2.3) má vliv nejen energie jednotlivých pulzů, ale i délka časového intervalu mezi nimi a proto je vhodné tyto parametry před měřením optimalizovat.

2.1.3 Termodynamická rovnováha v plazmatu

Při popisování plazmatu, jakožto uskupení elektronů a kladně nabitých iontů, můžeme určit jeho parametry (populace jednotlivých energiových hladin, rozdělení rychlostí částic), pokud známe teplotu plazmatu. Pojem teploty však předpokládá termodynamickou rovnováhu mezi jeho jednotlivými částmi, která není pro celý v celém objemu plazmatu dodržena. Zavádí se tedy pojem lokální termodynamická rovnováha - LTE (local thermodynamic equilibrium). LTE omezuje požadavek termodynamické rovnováhy na určitou malou oblast.

Stanovení platnosti LTE je komplexní problém. V praxi se většinou používá McWhirterovo kritérium, které je považováno za dostatečující k rozhodnutí o splnění podmínky LTE. Toto kritérium stanovuje prahovou hodnotu pro elektronovou hustotu N_e v plazmatu, při jejímž překročení je podmínka LTE splněna

$$N_e (cm^{-3}) > 1,6 \cdot 10^{12} T^{\frac{1}{2}} (\Delta E)^3,$$

kde T je teplota v kelvinech, ΔE je maximální rozdíl energie mezi jednotlivými hladinami (většinou mezi základní a první excitovanou hladinou) vyjádřený v eV. O problematice správnosti tohoto kritéria pojednává [22]. Pokud je tedy toto kritérium splněno, můžeme k popisu plazmatu použít následující distribuční funkce (ASDF funkce - atomic state distribution functions). Jedná se o:

- Maxwellovu distribuční funkci pro rychlost částic

$$f_M = \left(\frac{m_e}{2\pi kT} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left(\frac{-m_e v^2}{2kT} \right),$$

kde m_e je hmotnost elektronu, v jeho rychlost, T je teplota v kelvinech a k Boltzmannova konstanta

- Boltzmannovu distribuční funkci pro populaci jednotlivých energiových hladin, vztaženou k základnímu energiovému stavu

$$N_j = N_0 \frac{g_j}{Z(T)} \exp\left(-\frac{E_j}{kT} \right),$$

kde N_0 je celková populace emitujících atomů/iontů, N_j hustota populace excitovaných atomů/iontů, g_j je degenerace (statistická váha) hladiny s energií E_j , $Z(T)$ je partiční funkce pro danou teplotu v kelvinech. Pro relativní populaci obecných hladin i, j platí vztah [9] str. 32:

$$\frac{N_j}{N_i} = \frac{g_j}{g_i} \exp\left(-\frac{(E_j - E_i)}{kT}\right),$$

kde $N_{i,j}$ je populace hladiny s energií $E_{i,j}$ se statistickou váhou $g_{i,j}$.

- Sahu rovnici pro popis ionizace

$$\frac{N_{o,ii}}{N_{o,i}} = \frac{2}{N_e} \left(\frac{2\pi m_e k \cdot T}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{Z_{II}(T)}{Z_I(T)} \exp\left(-\frac{E_i}{kT}\right),$$

kde $N_{o,ii}$ je hustota populace iontů v základním energiovém stavu, $N_{o,i}$ je hustota populace atomů v základním energiovém stavu, m_e hmotnost elektronu, N_e elektronová hustota plazmatu, Z_I resp. Z_{II} příslušné partiční funkce pro atomy, resp. ionty a E_i je ionizační energie v eV.

- Planckovo rozdělení popisující interakci mezi zářením a hmotou [23]

$$u_\lambda(\lambda, T) = \frac{8\pi hc}{\lambda^5} \frac{1}{\exp\left(\frac{hc}{\lambda kT}\right) - 1},$$

kde λ je vlnová délka emitovaného záření a u_λ je objemová spektrální hustota energie.

Všechna tato rozdělení jsou charakterizována stejnou teplotou. Dominantním jevem v plazmatu jsou elektronové srážky, jež jsou popsány prvními třemi distribucemi. Předpokládáme, že výměna kinetické energie mezi částicemi, excitace a deexcitace atomů a iontů i procesy ionizace a rekombinace jsou v plazmatu navzájem v rovnováze. Aby byl tento předpoklad správný, musí platit dvě věci; a) procesy ionizace a rekombinace musí probíhat mnohem rychleji než expanze plazmatu a b) částice (atomy, ionty, elektrony) musí mít lokálně stejnou teplotu. Jelikož z plazmatu uniká energie ve formě záření, plazma nemůže být v termodynamické rovnováze nikdy. Vyzářená energie je však zanedbatelná vůči energiím, které se v systému vymění ostatními procesy.

Bylo dokázáno, jak teoreticky, tak prakticky [24], že indukované plazma při typickém měření LIBS (intenzita záření $I > 1 \text{ GW/cm}^2$) podmínky LTE nesplňuje dokonale, ale nachází se v kvazi-rovnovážném stavu. Odchylku od rovnováhy způsobují rozdílné časy ionizace a rekombinace ($t_{\text{ion}} > t_{\text{rekomb}}$). Tento rozdíl při reálném experimentu způsobí zmenšení poměru mezi atomy a ionty v plazmatu oproti

teoretickým výpočtům, které předpokládají rovnovážný stav. Důsledkem toho je nižší experimentálně určená teplota plazmatu.

V atomových distribučních funkcích vystupuje kromě teploty také elektronová hustota plazmatu. O metodách určování parametrů plazmatu pojednává následující kapitola.

2.1.4 Určování elektronové hustoty a teploty plazmatu

2.1.4.1 Elektronová hustota plazmatu

Při vhodně zvoleném nastavení parametrů měření (viz kapitola časový vývoj plazmatu) se ve spektru objeví atomové emisní čáry atomů a iontů odpovídající prvkům obsaženým ve zkoumaném vzorku. Kromě složení vzorku lze z ploch jednotlivých píků určit teplotu plazmatu. Z tloušťky píků a relativního posunutí jejich středů vzhledem k tabelovaným hodnotám lze stanovit elektronovou hustotu.

Mimo určování elektronové hustoty plazmatu ze spektrálních čar se ještě v praxi používají např. Langmuirova sonda a Thompsonův rozptyl. Přehled těchto metod najdeme v [9] str. 45. Zde se omezíme pouze na výpočet elektronové hustoty ze šířky charakteristických emisních čar. Tento výpočet je možné provádět, je-li dodržen předpoklad pro lokální termodynamickou rovnováhu (viz předchozí kapitola). Na rozšiřování emisních čar se podílí několik mechanismů, které mění zároveň i profil píků. Výsledná šířka píků a jejich tvar pak závisí na součtu příspěvků jednotlivých mechanismů rozšiřování. Mezi tyto patří

- přirozené rozšíření (natural broadening) - je dané konečnou dobou života jednotlivých excitovaných stavů. Ta způsobuje vznik rozptylu v energiích přechodů mezi stavy podle Heisenbergova principu neurčitosti,
- rezonanční rozšíření - objevuje se, pokud je jedna z hladin dipólově spřažena se základním stavem,
- van der Waalovo rozšíření - vzniká při interakci excitovaného atomu s atomem v základním stavu, na kterém je indukovaný dipól.

Vliv těchto mechanismů na rozšíření čar můžeme většinou zanedbat [9] str. 47. Následující tři mechanismy jsou v praxi dominantní

Dopplerovo rozšíření

Toto rozšíření je způsobeno relativním pohybem emitujících částic vzhledem k detektoru. Jeho velikost závisí na hmotnosti částice a její teplotě podle rovnice

$$\Delta\lambda_D = 7,2 \cdot 10^{-7} \sqrt{\frac{T}{M}} \lambda_0,$$

kde T je teplota emitující částice v kelvinech, M její hmotnost a λ_0 centrální vlnová délka emisní čáry. Pro částice s větší hmotností je tedy dopplerovský efekt menší. Při teplotách plazmatu v řádech 10^4 K a centrálních vlnových délkách ve viditelném nebo blízkém UV spektru je velikost Dopplerova rozšíření v řádech tisíců nm a proto jej můžeme zanedbat. V případě plazmatu s vícenásobnou ionizací a nízkou hustotou však jeho příspěvek k šířce čar zanedbat nemůžeme [25].

Starkovo (kolizní) rozšíření

Pro plazma s vysokou elektronovou hustotou je nejdominantnějším jevem Starkovo rozšíření. Je zapříčiněno především kolizemi emitujících částic s elektrony a menší míře s ionty. Tyto srážky mají za následek rozšíření emisních čar a posun centrální vlnové délky píků. Oba jevy jsou závislé silně na elektronové hustotě a slabě na elektronové teplotě. Podle typu emitující částice se uplatňují dva druhy Starkova jevu. Pro systémy s jedním elektronem (např. atomy vodíku) mluvíme o lineárním Starkově jevu, kdy posuny ve vlnové délce (energii) fotonů závisí na síle elektrického pole lineárně [13]

$$N_e = C(N_e, T) \Delta\lambda^{\frac{3}{2}},$$

kde N_e je elektronová hustota, hodnoty koeficientu C jsou tabelovány a $\Delta\lambda$ je rozšíření spektrální čáry způsobené Starkovým jevem. V případě atomů a iontů s více elektrony se uplatňuje kvadratický Starkův jev, kdy posun energie závisí na druhé mocnině intenzity elektrického pole a rozšíření spektrálních čar je dáno rovnicí

$$\Delta\lambda \approx 2 \left[1 + 1,75 \cdot 10^{-4} N_e^{\frac{1}{4}} \alpha (1 - 0,068 N_e^{\frac{1}{6}} T^{-\frac{1}{2}}) \right] \frac{w N_e}{10^{16} \text{ cm}^{-3}},$$

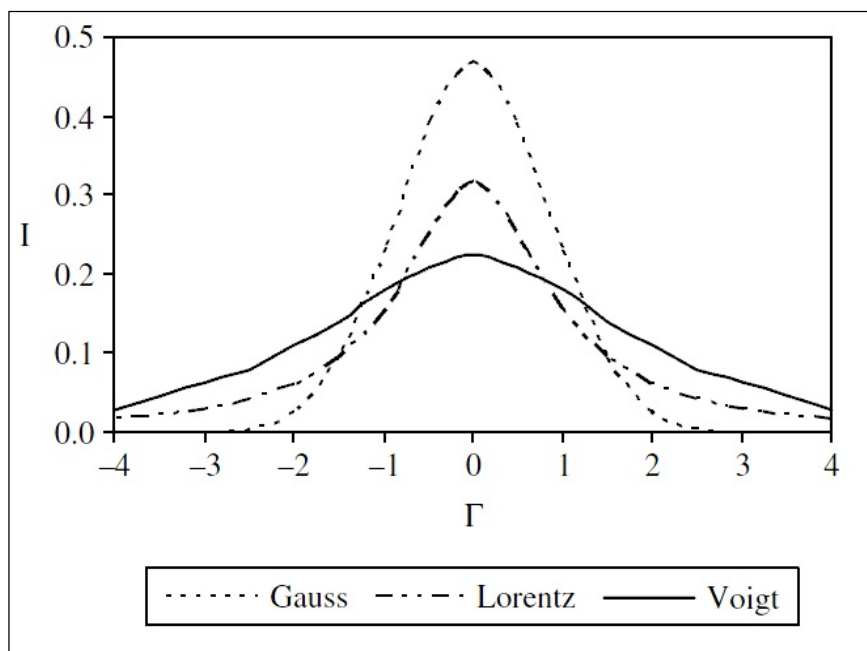
kde $\Delta\lambda$ je rozšíření spektrální čáry, způsobené Starkovým jevem, N_e je elektronová hustota, w a α jsou tabelované koeficienty.

Druhý člen v hranaté závorce, který odpovídá příspěvku iontů k rozšíření, můžeme zanedbat. Předchozí rovnice se redukuje do tvaru

$$\Delta\lambda = \frac{2wN_e}{10^{16} \text{ cm}^{-3}},$$

ze které můžeme při znalosti šířky spektrálních čar vypočítat elektronovou hustotu.

Starkův jev mění profil emisních čar na lorentzovský, zatímco Dopplerovo rozšíření způsobuje u píků profil gaussovský. Konvolucí těchto dvou tvarů dostaneme tzv. Voigtův profil (obr. 8), jehož tvar se mění podle míry příspěvku Starkova a Dopplerova jevu. Který z těchto jevů je pro dané měření dominantní, zjistíme z tabelovaných hodnot parametrů měření [9] str. 28. Ve většině případů se méně intenzivně projevuje Dopplerův jev, a proto můžeme gaussovský příspěvek ke tvaru emisních čar zanedbat a prohlásit píky za lorentzovské.



Obr. 8 Typy profilů emisních čar, převzato z [26]

Instrumentální rozšíření

Mechanismem, který nemůžeme nikdy zanedbat, je rozšíření spektrálních čar vlivem aparatury (spektrometru). Příspěvek tohoto jevu můžeme určit pokud zaznamenáme referenční spektrum např. halogenové výbojky nebo neonové lampy. Instrumentální rozšíření přispívá ke gaussovskému tvaru píku.

Po nafitování píků ve spektrech měřeného vzorku vhodnou funkcí dostaneme jejich šířku v polovině výšky (FWHM - full width at half maximum). Tato hodnota je součtem příspěvků od Dopplerova, Starkova a instrumentálního rozšíření

$$W_{FWHM} = W_{Doppler} + W_{Stark} + W_{instrumental}.$$

Při určování elektronové hustoty je třeba od celkového rozšíření tedy nejprve Dopplerovo a instrumentální rozšíření odečíst a počítat jen s příspěvkem vlivem Starkova jevu, který je dán elektronovou hustotou plazmatu.

2.1.4.2 Teplota plazmatu

Metoda Boltzmannova grafu

K určení elektronové teploty plazmatu je možné použít několik metod. Nejrozšířenější je metoda Boltzmannova grafu, která vychází ze znalosti intenzit alespoň dvou emisních čar pro stejný prvek. Intenzita spektrálních čar je dána rovnicí

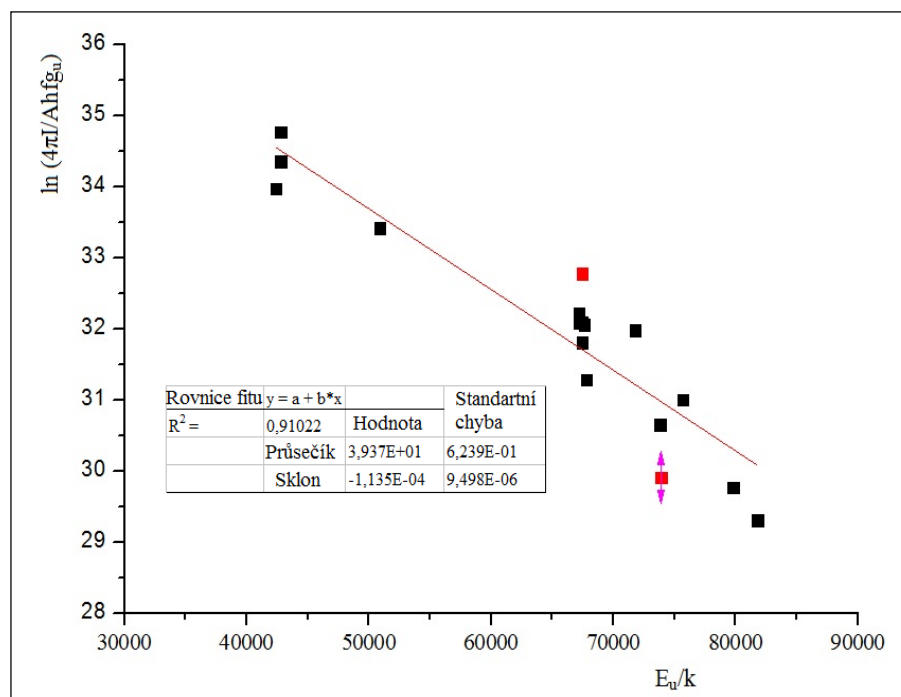
$$I = \frac{1}{4\pi} AhfGN_j,$$

kde A je Einsteinův koeficient spontánní emise, h je Planckova konstanta, f frekvence emitovaného záření, N_j je hustota populace excitovaného stavu a G je instrumentální faktor. V instrumentálním faktoru je zahrnuta efektivita sběru záření optikou a optické vlastnosti sestavy jako celku.

Intenzitu píku určíme z jeho maximální hodnoty, popřípadě plochy. Hustota populace excitovaných částic je dána Boltzmannovou distribucí (viz kapitola termodynamická rovnováha v plazmatu). Po dosazení rovnice pro intenzitu píků do Boltzmannovy distribuce a zlogaritmování celého výrazu dostaneme vztah

$$\ln\left(\frac{I4\pi}{Ahfg_j}\right) = -\frac{E_j}{kT} + \ln\left(\frac{GN_0}{Z(T)}\right).$$

Při znalosti intenzit alespoň dvou píků, kterým náleží hodnoty energie excitovaného stavu E_j , můžeme do grafu vynést závislost levé strany rovnice na teplotě. Dostaneme tak body, které proložíme křivkou lineární závislosti. Sklon této křivky odpovídá převrácené hodnotě elektronové teploty plazmatu (obr. 9).



Obr. 9 Boltzmannův graf pro výpočet teploty. Jednotlivé body v grafu odpovídají píkům téhož prvku se stejnou ionizací. Teplota je určena převrácenou hodnotou sklonu křivky lineární závislosti a má hodnotu 8806 ± 675 K. Vzorek je slitina železa při atmosférickém tlaku. Měřeno v rámci projektu Erasmus na fakultě chemie univerzity v Bari, Itálie

Linearita fitu je také jedním ze způsobů kontroly splnění podmínky lokální termodynamické rovnováhy (viz kapitola termodynamická rovnováha v plazmatu). Hodnoty koeficientu spontánní emise A jsou tabelovány, partiční funkci $Z(T)$ pro určení teploty znát nemusíme. Pro výpočet teploty je vhodné volit spektrální čáry, které mají co nejvíce rozdílné hodnoty E_j . Tím budou mít jednotlivé body v Boltzmannově grafu větší rozestupy, čímž dojde ke zmenšení chyby při určení teploty. Při volbě píků je třeba, aby odpovídaly emisi částic stejného prvku se stejným stupněm ionizace (např. všechny píky musí odpovídat emisi atomů železa v základním stavu Fe I).

Iontovou teplotu lze určit pomocí Sahovy-Boltzmannovy rovnice, která využívá znalosti dvou spektrálních čar téhož prvku, každá pro různou ionizaci. Byly vytvořeny i metody, které k určení teploty používají více prvků s rozdílnými stupni ionizace [27], ale těmi se zde zabývat nebudeme.

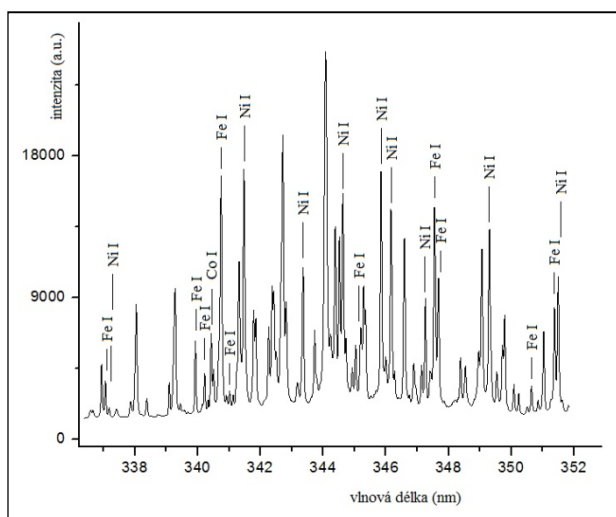
2.2 Analýza spektra

Ke kvalitativní analýze využijeme charakteristických spektrálních čar jednotlivých chemických prvků. Pokud chceme určit procentuální zastoupení jednotlivých prvků ve vzorku, musíme provést kvantitativní analýzu.

2.2.1 Kvalitativní analýza

Je vhodné přibližně odhadnout složení vzorku, neboť při použití spektrometru s vysokým rozlišením se ve spektrech objeví velké množství emisních čar (obr. 10). Pro určení, o který prvek se jedná, využijeme tabulek (např. [20], [28]), kde jsou relativní intenzity a polohy jednotlivých spektrálních čar uvedeny. Další určující charakteristikou je koeficient spontánní emise; čím vyšší má hodnotu, tím pravděpodobněji se daná spektrální čára ve spektru objeví. Stejně tak musíme zvážit stupeň ionizace plazmatu. Při atmosférických podmínkách a použití laseru s typickou hodnotou energií pro LIBS se vyšší ionizační stupně neutvoří.

Pokud se ve spektru objeví výrazná spektrální čára prvku, můžeme předpokládat, že pro daný prvek se objeví i ostatní spektrální čáry s podobnou relativní intenzitou a koeficientem spontánní emise (např. pro vápník se při výskytu silné spektrální čáry na hodnotě 393,3 nm vždy vyskytne i čára na hodnotě 396,9 nm). Kvalitativní analýza není exaktní proces a roli zde hrají zkušenosti a podmínky při experimentu.

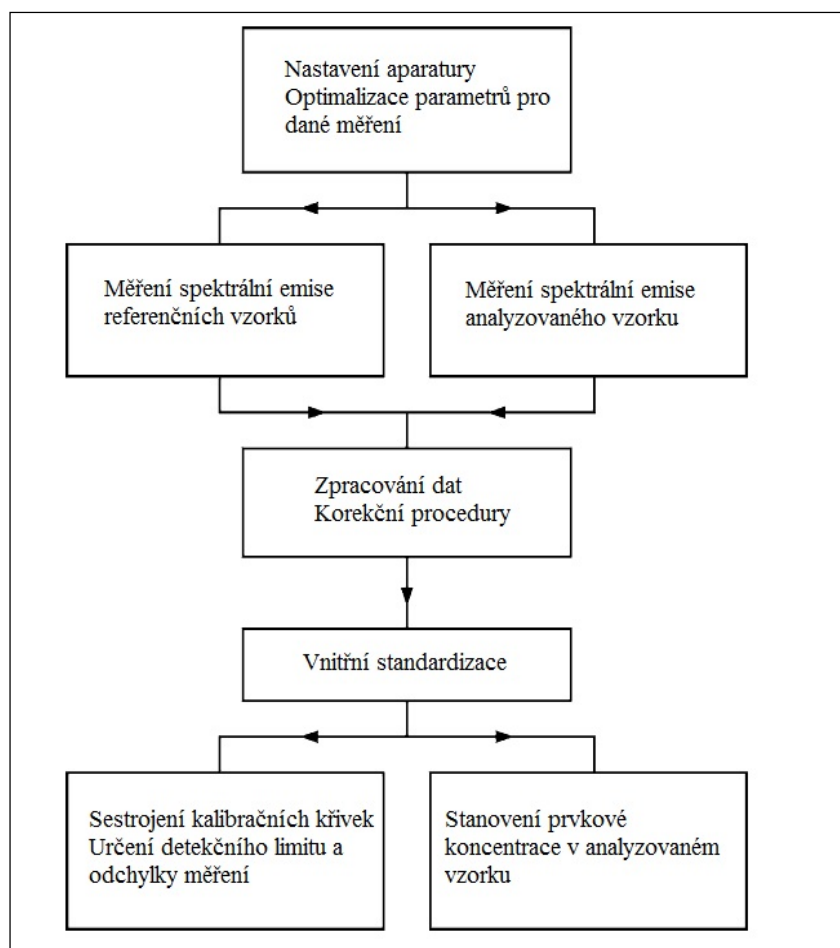


Obr. 10 Kvalitativní analýza spektra železného meteoritu, výstup programu Origin. Měřeno v rámci programu Erasmus na fakultě chemie univerzity v Bari, Itálie

Kvalitativní analýza je definovaná jako určení koncentrací jednotlivých prvků ve studovaném vzorku. Zaměříme se na analýzu využívající kalibrační křivky. Byly vyvinuty i bezkalibrační metody určování koncentrace prvků (CF LIBS – calibration free LIBS), jejich přesnost je však horší, než při použití kalibračních křivek [10] str. 214.

Metoda kalibračních křivek

Při využití této metody sestrojíme křivku vyjadřující závislost mezi naměřenou intenzitou emisních čar daného prvku a jeho hmotnostním zastoupením ve vzorku. Celý proces určení koncentrace prvku je popsán na obr. 11.



Obr. 11 Blokový diagram postupu určování prvkové koncentrace pomocí kalibračních křivek. Převzato a upraveno z [10] str. 208

Na začátku měření je třeba vhodně určit parametry nastavení aparatury s ohledem na druh měření (délka pulzu laseru, doba mezi pulzy, jejich energie, časové okénko sběru signálu apod.).

Následně vybereme vhodné referenční vzorky a změření intenzity jejich signálu. Kalibrační standardy by měly mít koncentrace zkoumaného prvku v rozmezí podobném jako analyzovaný vzorek a měly by vzorku co nejvíce odpovídat svým typem (např. při měření obsahu těžkých kovů v půdě vytvoříme kalibrační standardy přidáním přesně odměřeného množství kovu do čisté půdy). Tím minimalizujeme vliv matričních efektů na měření [9] str. 113.

Následuje měření analyzovaného vzorku při zachování stejných podmínek jako při měření kalibračních vzorků. Minimalizujeme tak rozdíl v instrumentálních faktorech u obou měření.

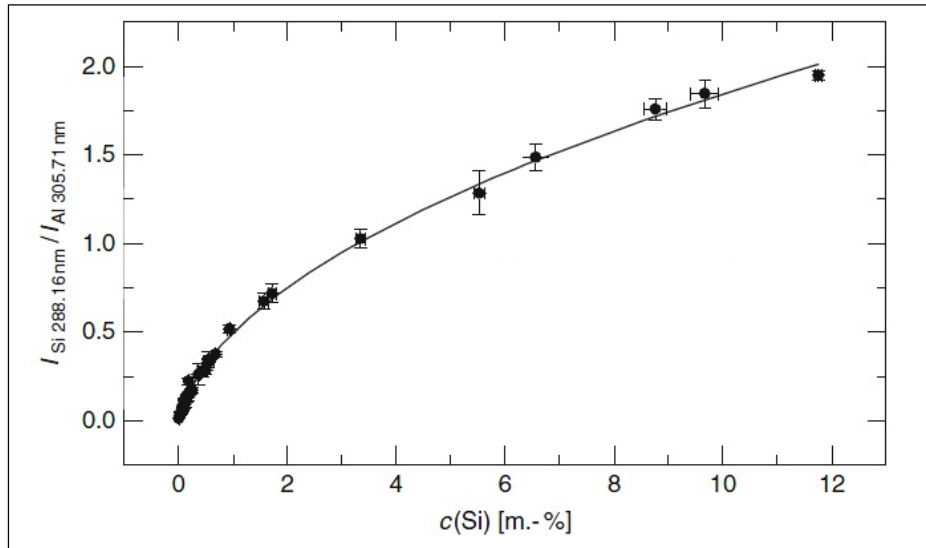
Při procesu vnitřní standardizace odstraňujeme nepřesnosti vzniklé fluktuací energie laseru, rozdílností tvaru povrchu atd. Absolutní hodnotu naměřené intenzity zkoumaného prvku vztáhneme k intenzitě dominantního prvku ve vzorku:

$$Q_{a,d} = \frac{I_a}{I_d},$$

kde I_a je intenzita analyzovaného prvku a I_d intenzita dominantního prvku. Vnitřní standardizaci provedeme pro spektra referenčních vzorků i pro spektra analyzovaného vzorku a dále pracujeme místo absolutních intenzit s hodnotami $Q_{a,d}$. Dominantní prvek musí být tedy obsažen v referenčních i zkoumaných vzorcích. Emisní čáry s intenzitou I_d musí být vhodně zvoleny (bez selfabsorpce a překryvu).

V grafu závislosti intenzity signálu na koncentraci prvku dostaneme pro každý referenční vzorek jeden bod. Takto získanými body proložíme kalibrační křivku. V ideálním případě bude křivka lineární a zdvojnásobení koncentrace prvku bude odpovídat dvojnásobnému signálu. V praxi jsou často kalibrační křivky určeny různými funkcemi (odmocninná, obecně mocninná závislost apod.). Nelinearitou křivek se zabývá např. [29], [30].

Pro zvolení vhodné fitovací funkce se používá Mandelův test [10] str. 219. Typická kalibrační křivka s odmocninnou závislostí je na obr. 12. Směrnice přímky v bodě odpovídajícímu střední koncentraci se nazývá citlivost kalibrační křivky $m = \Delta c_L / \Delta x_L$. Detekční limit je definovaný [9] str. 115 jako nejmenší koncentrace c_L , jejíž intenzitu signálu x_L jsme schopni detekovat s rozumnou přesností. Hodnota x_L je dána vztahem $x_L = x_{bi} + k s_{bi}$, kde x_{bi} je střední hodnota intenzity při měření materiálu s nulovou koncentrací, s_{bi} je standardní odchylka tohoto měření a k je faktor přesnosti, který zvolíme.



Obr. 12 Kalibrační křivka s odmocninnou závislostí pro obsah křemíku v hliníku. Převzato a upraveno z [10] str. 214

2.2.2 Použití více pulzů

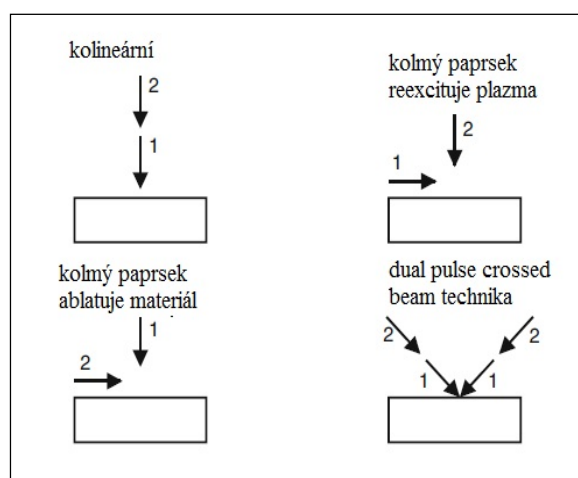
Nejčastější variantou metody LIBS je dvoupulzní (DP LIBS - double pulse LIBS) uspořádání. Pokud k tvorbě plazmatu použijeme dva laserové pulzy, odpařování materiálu a jeho následná excitace mohou být optimalizovány zvlášť.

Po dopadu prvního pulzu dochází k ablaci materiálu a expanzi plazmatu, jak je popsáno v kapitole 2.1.1 a 2.1.2. Následně dopadne na povrch druhý pulz a plazma je reexcitováno. Tím se doba vyzařování čarových spekter prodlouží a kontinuum ve odstraní. Při použití dvou pulzů tak dojde k nárůstu intenzity signálu, a tím ke zlepšení detekčního limitu.

Oba pulzy mají délku v rozmezí 5 - 30 ns a jejich vzájemná prodleva je 10^{-1} μ s - 10^2 μ s. První (ablační) pulz mívá energii v řádech jednotek až desítek mJ. Druhý pulz (excitační) pak energii dvojnásobně až pětinašobně větší. Oproti technice jednoho pulzu (SP LIBS - single pulse LIBS) při použití stejné energie dojde k odpaření menšího množství materiálu ze vzorku; tvoří se menší krátery a metoda není tolik destruktivní [31]. Díky tomu můžeme vytvářet mapy procentuálního zastoupení prvků ve vzorku s vyšším rozlišením. Technika dvoupulzního LIBSu se začala používat a stále používá při analýze vzorků pod vodou, popisem metody DP a SP LIBS při použití v kapalinách se zabývá např. [15].

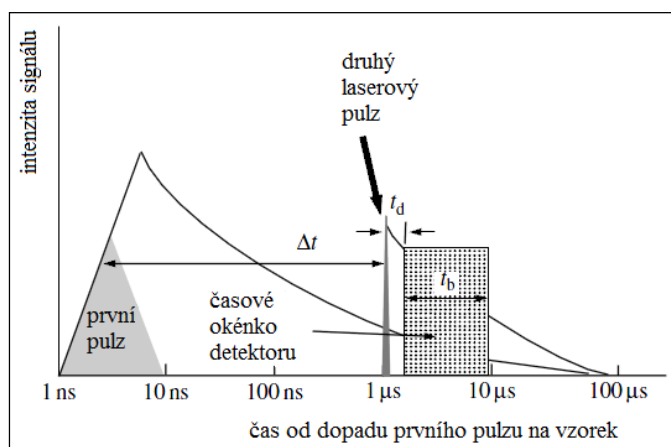
Pro techniku DP LIBS se používá několika typů uspořádání, které ilustruje obr. 13.

- oba pulzy jsou generované stejným laserem,
- pulzy jsou generované dvěma lasery, optické dráhy laserových paprsků jsou vzájemně kolineární,
- paprsky jsou vzájemně kolmé, jeden dopadá kolmo na povrch a druhý rovnoběžně s povrchem, přičemž:
 - rovnoběžný paprsek dopadá na vzorek jako první a ablatuje materiál,
 - rovnoběžný paprsek dopadá na povrch jako druhý a reexcituje ablatovaný materiál,
- pulz prvního laseru je rozdělen na dva paprsky, které dopadají na vzorek pod úhlem 45° , a druhý pulz následuje stejnou trajektorii (dual pulse crossed beam).



Obr. 13 Ilustrace vzájemné orientace paprsků. Čísla značí pořadí, v jakém paprsky dopadají na vzorek. Převzato a upraveno z [10] str. 84

Vzájemné načasování jednotlivých pulzů a detekčního okénka přibližuje obr. 14:



Obr. 14 Načasování laserových pulzů a pozorovacího okénka detektoru při experimentu s DP LIBS. Časová prodleva mezi pulzy je Δt , doba od začátku druhého pulzu je t_d a délka pozorovacího okénka je t_b . Převzato a upraveno z [9] str. 48

2.3 Popis aparatury

V rámci práce byly prováděny dva druhy experimentu; analýza biofilmu, který vznikl zaschnutím roztoku s řasou na papíře (tedy ablace z pevné fáze) a ablace řasy z proudu vody.

2.3.1 Analýza z pevné fáze

Uspořádání aparatury pro ablaci z pevné fáze je znázorněna na obr. 15. Byla použita technika jednoho pulzu (SP LIBS) i dvou pulzů (DP LIBS). V případě SP i DP měření byl ablatujícím laserem LQ 529a (SOLAR, BY). Jedná se o pevnolátkový pulzní laser, který jako aktivní prostředí používá izotropní krystal yttrium aluminium granátu, který je dopovaný ionty neodymu (Nd:YAF laser). Jako budící element je použita xenonová výbojka. Svazek laseru má tzv. flat top profil.

Laser Solar je vybaven Q-spínačem, což znamená, že využívá elektrooptický modulátor, který laserové záření polarizuje. Polarizační destička zabraňuje záření proniknout zpět do aktivního prostředí a způsobit lavinovou deexcitaci. Aktivní prostředí je stále buzeno výbojkou, čímž dochází k nárůstu inverzní populace až do určité kritické hodnoty. Potom je Q-spínač vypnut a dojde k vyslání pulzu. Jeho intenzita je několikanásobně větší, než kdyby laser fungoval v režimu kontinuálního vyzařování.

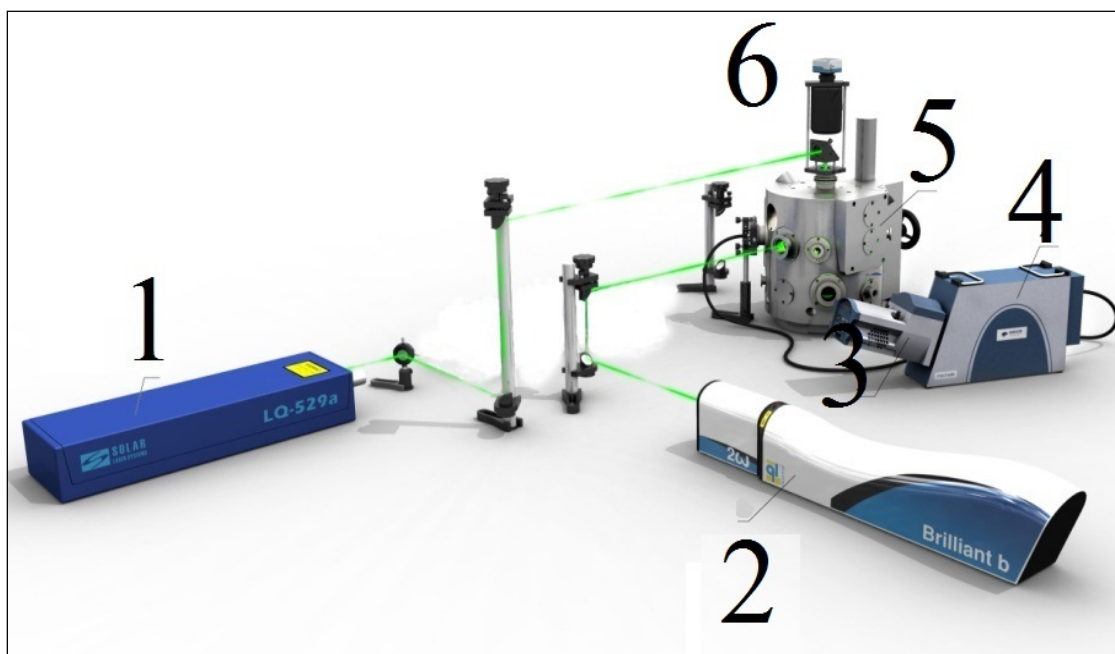
Laser pracuje s frekvencí buzení 5 Hz nebo 10 Hz. Délka pulzu je v intervalu 10 - 13 ns. Svazek z primárního (ablačního) laseru byl přiveden kolmo na povrch vzorku přes triplet s ohniskovou délkou 30 mm. Maximální energie laseru Solar je 500/280 mJ pro vlnové délky 1064/532 nm, pro experiment byla použita druhá harmonická vlnová délka 532 nm.

Při DP LIBS byl jako reexcitační laser použit taktéž Nd:YAG laser typu Brilliant B (QUANTEL, FR) s Q-spínačem. Svazek laseru byl přivedený na povrch soustavou zrcadel a čočkou s ohniskovou vzdáleností 40 mm. Laser Brilliant pracoval na základní vlnové délce 1064 nm s dobou trvání pulzu 6 ns a frekvencí flashlampy 10Hz. Maximální energie laseru Brilliant je 850/400 mJ pro vlnové délky 1064/532 nm. Kromě fundamentální vlnové délky 1064 nm jsou k dispozici také moduly pro generaci druhé (532 nm), třetí (355 nm) a čtvrté (266 nm) harmonické frekvence.

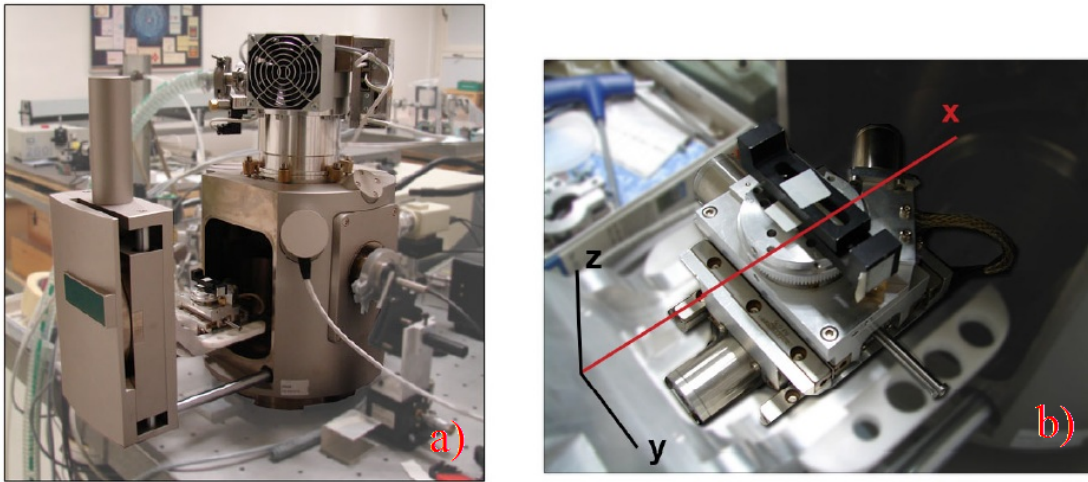
Svazky ablatujícího a excitačního laseru byly při dopadu na povrch vzorku vzájemně kolmé. Energie obou laserů je dána jak zpožděním Q-spínače, tak vlnovou délkou laserů a frekvencí buzení. Byla provedena měření pro různé energie primárního a sekundárního svazku.

Vzorek byl umístěn ve speciálně upravené ablační komoře. Jedná se o vakuovou komoru LM firmy TESCAN, která se používá u rastrovacích elektronových mikroskopů typu VEGA. Proces ablace byl sledován CCD kamerou umístěnou vně komory. Manipulátor umožňuje posuv v osách x, y, z (minimální délka kroku 2 μm) v rozsahu 80x60x47 mm (obr. 16). Ke komoře je připojena difúzní a turbomolekulární pumpa, umožňující vzorek měřit ve vakuu či v atmosféře plynů (argon, helium, dusík) při různých tlacích.

Horní vstup do komory (viz obr. 15) je vybaven objektivem se zoomem a CCD kamerou, která má s primárním laserovým svazkem (Solar) společnou fokusační optiku. Při zaostření kamery na povrch se tak zároveň zaostřuje i samotný laserový svazek. Ostření je ovládáno automaticky softwarem.



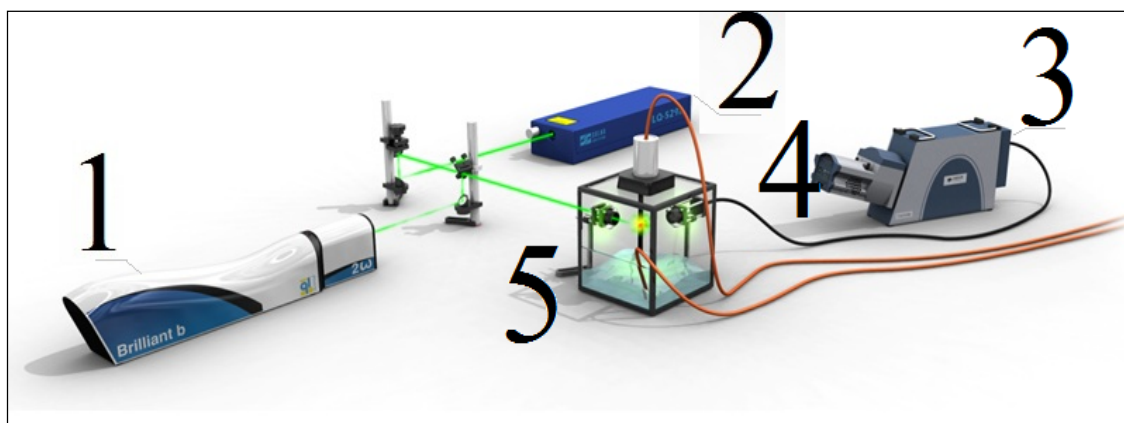
Obr. 15 Aparatura pro měření z pevné fáze (biofilm). 1 - Ablací laser Nd:YAG LQ 529a (SOLAR, BY), 532 nm, frekvence pulzů 10Hz, délka pulzu 8 ns, 2 - Excitační laser Nd:YAG Brilliant B (QUANTEL, FR), 1064 nm, frekvence pulzů 10Hz, délka pulzu 6 ns, 3 - ICCD de detektor Andor iStar 734, 4 - Spektrometr Andor Mechelle 5000, 5 - Ablací komora (Tescan a.s. CZ) s mikroposuvem, 6 - CCD kamera pro pozorování povrchu vzorku při ablaci



Obr. 16 a) komora pro ablaci z pevné fáze b) detail mechanického stolku s vyznačenými osami.

2.3.2 Analýza z proudu vody

Při analýze z proudu vody je ablační komora nahrazena skleněným akváriem, v němž je umístěna kádinka s roztokem (viz obr. 17). Proudění vody zajišťuje peristaltická pumpa (PCD 81, Kouřil, CZ) se střední hodnotou výkonu čerpání 500 ml/min. Tenký proud vody vhodný pro měření byl tvořen upravenou tryskou (viz kapitola 4.6), která byla připevněna k mikroposuvu (ThorLabs, US) s osami x, y v rovině stolu. Laserové svazky ablačního a excitačního laseru byly přivedeny do proudu vody optickým systémem (ThorLabs, US/Newport, UK). Jejich trajektorie byly vzájemně kolineární a oba svazky byly fokusovány do proudu vody čočkou s ohniskovou délkou 75 mm.



Obr. 17 Aparatura pro měření z proudu vody. 1 - Excitační laser Nd:YAG Brilliant B (QUANTEL, FR), 1064 nm, frekvence pulzů 10Hz, délka pulzu 6 ns, 2 - Ablací laser Nd:YAG LQ 529a (SOLAR, BY), 532 nm, frekvence pulzů 10Hz, délka pulzu 8 ns, 3 - Spektrometr Andor Mechelle 50005, 4 - ICCD de detektor Andor iStar 734, - Akvárium

Záření vycházející z plazmatu je při ablaci z vodního proudu i z pevné fáze sbíráno UV-NIR achromatickým kolimátorem CC52 (ANDOR, UK), odkud je vedeno přes optický kabel (průměr 25 μm) na vstup spektrometru. Jedná se spektrometr v echelle konfiguraci (Mechelle ME5000, ANDOR, UK), který k rozkladu světla využívá dvojité hranol a difrakční mřížku. Pracuje v rozsahu vlnových délek 200 - 975 nm s přesností lepší než 0,05 nm.

Rozložené světlo je zaznamenáno ICCD kamerou iStar 734i (ANDOR, UK). Tato kamera je schopná pracovat s časováním v jednotkách ns. Čip kamery je chlazen kvůli snížení šumu až na teplotu -30°C . Oba lasery včetně ICCD kamery byly ovládány externím spínačem (DG 535 Delay Generator, Stanford Research Systems, US) se čtyřmi nezávislými kanály a časovým rozlišením 5 ps. Měření je z velké části ovládáno softwarově.

2.3.3 Softwarové vybavení

Program LIBS3D

V prostředí programu LIBS3D lze měnit následující parametry měření:

- zpoždění Q-spínače, čímž se mění energie jednotlivých pulzů laseru,
- časový interval mezi oběma pulzy,
- časovou prodlevu mezi jednotlivými měřeními,
- parametry rastrování při měření v komoře (počet pulzů na kráter, počet kráterů, v osách x,y),
- fokusaci CCD kamery na povrch vzorku,
- přepínání mezi single pulse/double pulse LIBS.

Pomocí CCD kamery a programu LIBS3D lze při ablaci v komoře kontrolovat analyzovanou část vzorku, velikost kráterů apod. Program zajišťuje fokusaci laserového svazku na povrch vzorku před každým výstřelem laseru.

Program Solis

Program Solis slouží k ovládání spektrometru a je dodáván společně s ním. V tomto programu se nastavuje zejména:

- čas začátku sběru signálu detektorem,
- délka časového okénka sběru,
- typ zpracování signálu (akumulace signálu po několika výstřelech, kinetická série, korekce pozadí atd.),
- počet akumulací k vykreslení jenoho spektra,
- zesílení signálu ICCD kamery (Gain level).

Výstupem programu Solis je naměřené spektrum, které se dále zpracovává pomocí vhodného analytického programu (Origin, Excel...).

3 Příprava vzorků pro LIBS a ramanovskou spektroskopií

Řasy byly získány ze sbírky autotrofních organismů (CCALA- Culture Collection of Autotrophic Organisms) Botanického ústavu akademie věd ČR. *Trachydiscus minutus* (Bourelly) byl pěstován v 300 ml kádinkách při pokojové teplotě (22°C) v kultivačním roztoku, jehož složení je uvedeno v tabulce 1. Intenzita osvětlení se pohybovala v rozmezí 100 - 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Kultivační aparatura se skládala z kónických 1000 ml Pyrex nádob utěsněných vatovou zátkou. Osvětlení zajišťovaly dvě standardní bílé 40W zářivky. O optimalizaci podmínek pro pěstování řasy *Trachydiscus minutus* je pojednáno v [32], [33], o jejím biologickém zařazení, struktuře a kompozici potom v [34].

Do kádinek s řasami byly přidány roztoky CuSO_4 o různé koncentraci (5; 10; 50; 100; 200 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v poměru 1:1000, čemuž odpovídá koncentrace mědi 3, 7, 34, 67 a 133 ppm. Takto vzniklé roztoky byly inkubovány po dobu 24 hodin za občasného protřepání. Usazené řasy byly poté promyty destilovanou vodou a odděleny pomocí centrifugy a následně rozmíchány v odměřeném množství destilované vody. Při měření LIBS z proudu vody se pracovalo přímo s roztokem, pro analýzu z pevné fáze byly roztoky nanесeny kapátkem na tvrdý kartonový papír a ponechány při pokojových podmínkách po dobu 48 hodin, čímž došlo k odpaření vody a na povrchu papíru vznikla vrstva biofilmu.

komponent	koncentrace (mg/l)
N	150
P_2O_5	50
K_2O	300
MgO	30
SO_3	75
B	0,3
Cu	0,1
Fe	0,7
Mn	0,4
Mo	0,04
Zn	0,3

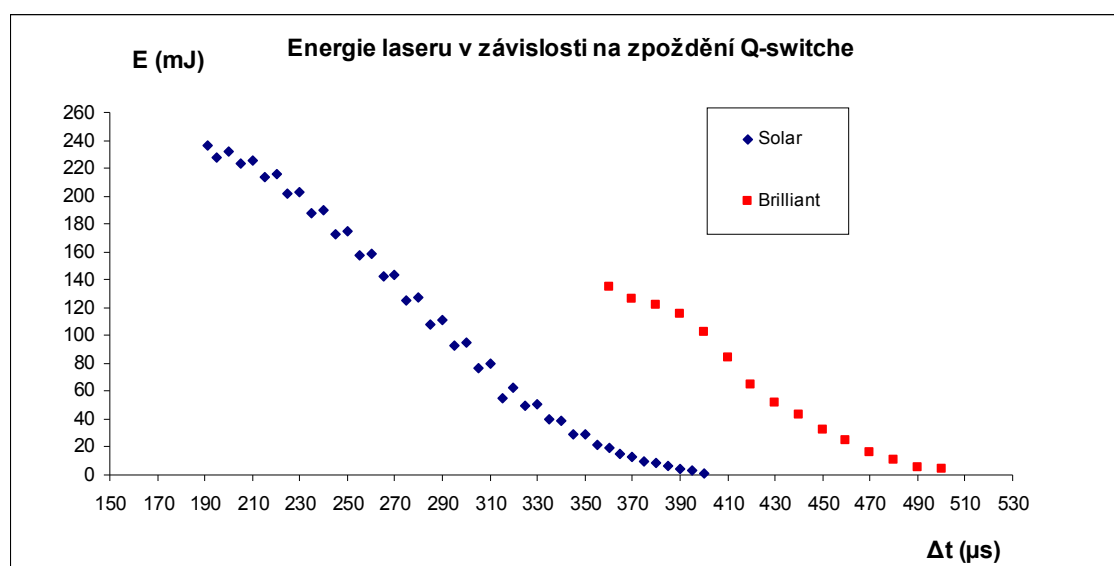
Tabulka 1 Složení kultivačního roztoku

4 Měření LIBS

Měření vzorků řas bylo prováděno v laboratoři laserové spektroskopie na VUT v Brně. Při měření z pevné fáze byly analyzovány biofilmy, a to pomocí jednoho a dvou pulzů. Při analýze řas v proudu vody byla použita pouze dvoupulzní technika. Úkolem těchto měření bylo stanovit chemické složení řasy, pokusit se určit zastoupení mědi v řase při použití metody kalibračních křivek a dále optimalizovat aparaturu pro měření řas v proudu vody.

4.1 Optimalizace energie laseru a nastavení spektrometru

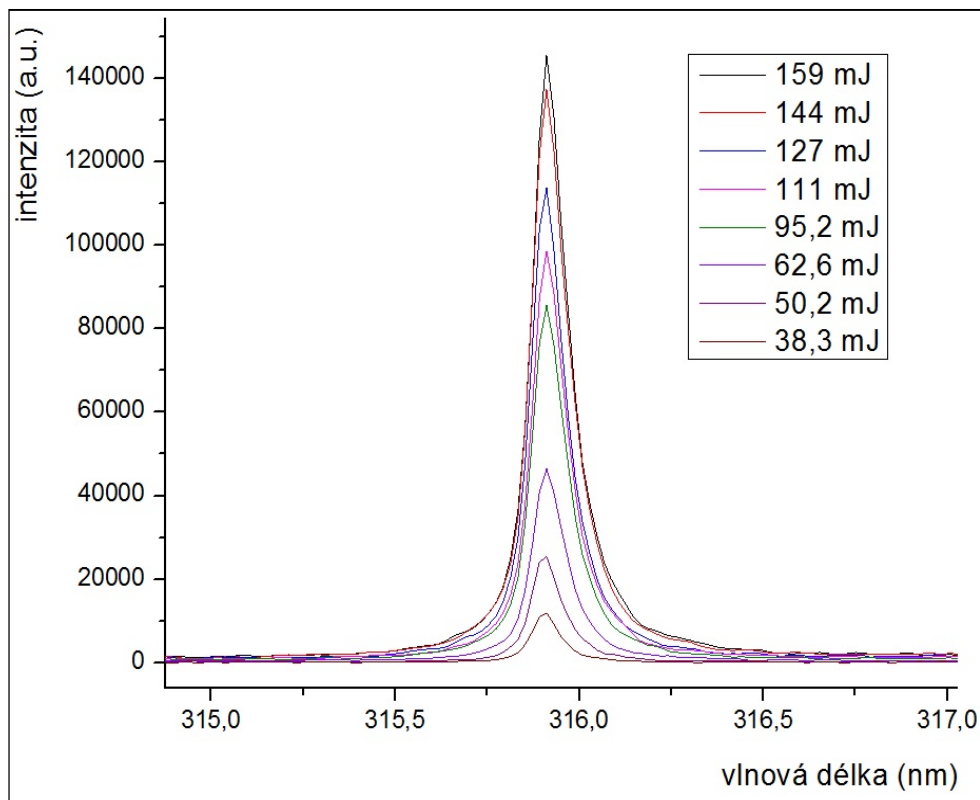
Jako primární (ablační) laser byl při všech měřeních použit laser Solar operující na vlnové délce 532 nm s frekvencí buzení 10 Hz. Závislost mezi zpožděním Q-spínače a energií svazku je znázorněna v grafu na obr. 18. Délka časového okénka pro sběr signálu byla u všech měření stejná - 16 μs a časový okamžik pro zahájení sběru signálu byl nastaven jak u SP tak u DP na 1,5 μs po dopadu ablačního (SP) nebo excitačního (DP) pulzu na vzorek. Zesílení CCD kamery (Gain Level) bylo nastaveno na hodnotu 100 u ablace z pevné fáze a 150 při analýze z proudu vody. Všechna spektra byla získána metodou akumulace signálu. Počet akumulací k vykreslení jednoho spektra činil 30 u analýzy z pevné fáze a 100 u analýzy z kapaliny. Čip ICCD kamery bych chlazen na teplotu -20°C .



Obr. 18 Energie svazku laseru jako funkce zpoždění Q-spínače

Na začátku měření bylo nutné stanovit optimální energii laseru pro ablaci materiálu. Při použití příliš malých energií se snižuje intenzita spektra, a tím i detekční limit metody. Taktéž klesá teplota a elektronová hustota plazmatu, a po překročení určité hranice přestává být splněna podmínka lokální termodynamické rovnováhy - LTE (viz kapitola 2.1.3). Při nižších energiích (< 30 mJ) dosahuje fluktuace mezi energiemi jednotlivých pulzů až 10 %, čímž vnáší další chybu do měření. Zvýšením energie nad 150 mJ se fluktuace sníží pod 2 %. Při měření je dobré vyvarovat se použití příliš vysokých energií laseru, jelikož při nich v plazmatu dochází ke stínění laserového svazku a zamezení jeho dopadu na vzorek. Také hrozí riziko ablatování čoček a znehodnocení spektra jeho saturací.

Intenzitu spektra pro různé energie ablačního pulzu znázorňuje obr. 19. Pro měření je (při splnění podmínky LTE a zachování vysoké intenzity) dostačující energie 95,2 mJ. Ta odpovídá spoždění Q-spínače 300 μ s u laseru Solar. Tato energie byla použita pro všechna zbývající měření s jedním pulzem.



Obr. 19 Intenzita spektra pro různé energie ablačního pulzu

Při použití DP LIBS je optimalizace nastavení aparatury složitější. Přibude parametr energie druhého laseru a vzájemné prodlevy laserů. Naše nastavení proto vycházelo z již dříve provedené optimalizace [35]. U dvoupulzní techniky sloužil jako sekundární (excitační) laser Brilliant na vlnové délce 1064 nm s frekvencí buzení 10 Hz.

Po provedení několika zkušebních měření byla optimální časová prodleva mezi oběma lasery stanovena na 1,5 μs , energie ablačního pulzu na 19,1 mJ (Q-spínač Solar 360 μs), excitačního pulzu na 126 mJ (Q-spínač Solar 370 μs) pro měření biofilmů. Pro analýzu z proudu vody byla energie prvního pulzu zvýšena na 95,2 mJ (Q-spínač Solar 300 μs), energie druhého pulzu se neměnila.

4.2 Charakteristika plazmatu

4.2.1 Výpočet teploty

Po zvolení vhodné energie laserového pulzu je třeba určit teplotu a elektronovou hustotu plazmatu, která této energii odpovídá. Popis určování těchto parametrů je popsán v kapitole 2.1.4. Pro určení elektronové teploty jsme použili metody Boltzmannova grafu, která vychází z rovnice:

$$\ln\left(\frac{I4\pi}{Ahfg_j}\right) = -\frac{E_j}{kT} + \ln\left(\frac{GN_0}{Z(T)}\right),$$

kde I je intenzita spektrální čáry, A je Einsteinův koeficient spontánní emise, h je Planckova konstanta, f frekvence emitovaného záření, G je instrumentální faktor, N_0 je celková populace emitujících atomů/iontů, g_j je degenerace (statistická váha) hladiny s energií E_j , $Z(T)$ je partiční funkce pro danou teplotu T v kelvinech a k je Boltzmannova konstanta.

spektrální čára (nm)	E_j (cm^{-1})	g_j	A (s^{-1})	E_j (J)
Ca I				
430,25	38551	5	1,36E+08	7,66E-19
430,774	38417	1	1,99E+08	7,63E-19
504,162	41679	3	3,30E+07	8,28E-19
518,885	42919	5	4,00E+07	8,52E-19
610,272	31539	3	9,60E+06	6,26E-19
612,222	31539	3	2,87E+07	6,26E-19
487,813	42343	7	1,88E+07	8,41E-19
558,197	38259	7	6,00E+06	7,60E-19
559,447	38219	5	3,80E+07	7,59E-19
559,849	38192	3	4,30E+07	7,58E-19

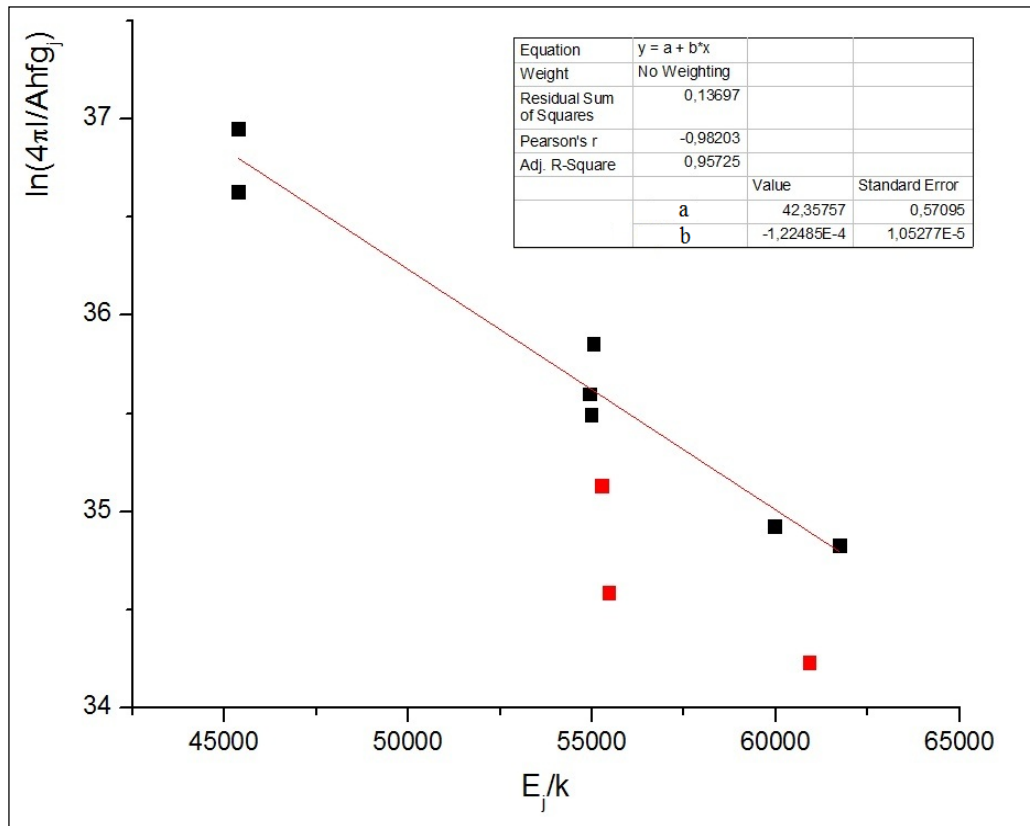
Tabulka 2 Parametry spektrálních čar pro výpočet teploty SP a DP LIBS. Získáno z [20]

Jako intenzita spektrálních čar byla vzata plocha píku. Píky byly fitovány bez výjimky Lorentzovou funkcí, která je dána formulí

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2},$$

kde y_0 je hodnota pozadí, A je plocha píku, w je jeho pološířka a x_c centrální vlnová délka. Spektrální čáry použité k vykreslení Boltzmannova grafu a jejich parametry jsou v tabulce 2. Tyto emisní čáry byly použity k určení teploty u SP i DP měření.

SP LIBS teplota

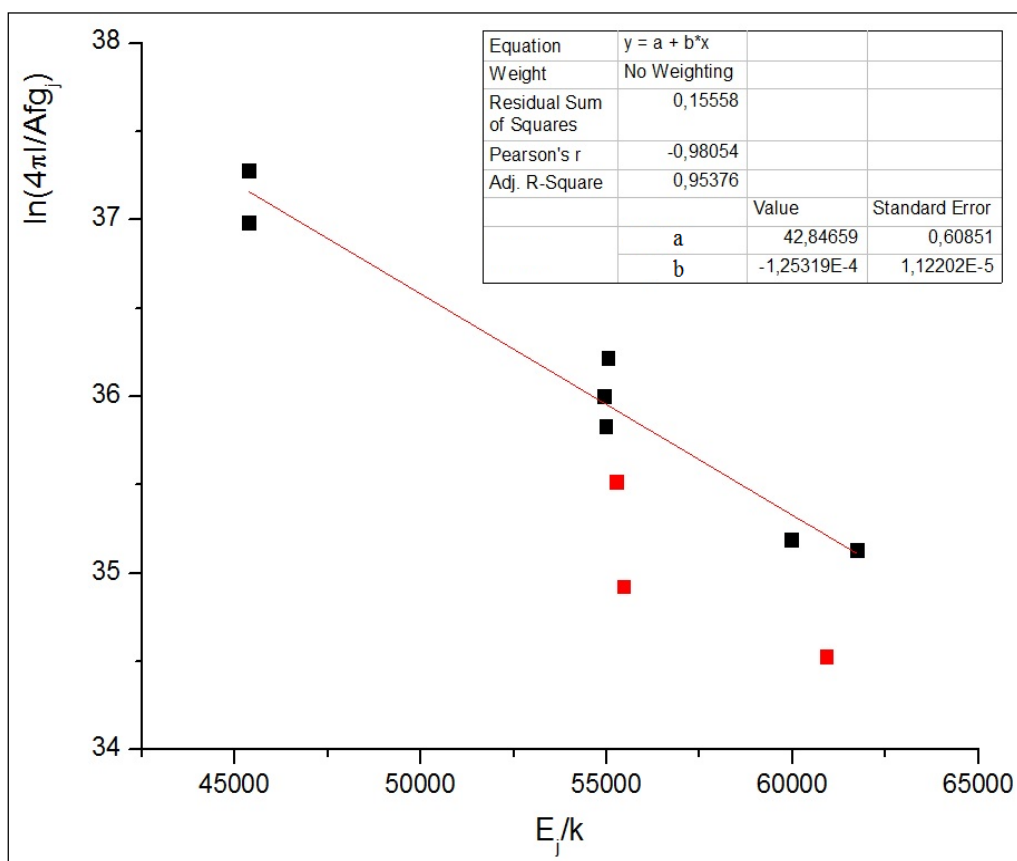


Obr. 20 Výpočet teploty Boltzmannovým grafem u SP LIBS. Červené hodnoty byly při fitování lineární funkce vynechány. Hodnota koeficientu spolehlivosti je $R^2 = 0,96$. Směrnice lineární závislosti odpovídá teplotě 8200 ± 700 K.

Po analýze dalších dvou spekter, odpovídajících stejné energii laseru (95,2 mJ) byly určeny teploty 8500 ± 700 K a 8400 ± 900 K. Poměrně velká chyba při určování teploty touto metodou (10-15%) je v praxi běžná. Bývá způsobena především nejistotou u Einsteinova koeficientu spontánní emise A, která může nabývat až 50%.

Pro spektra z obrázku 19 se elektronová teplota plazmatu pohybuje v rozmezí 8700 ± 900 K (při energii 159 mJ) a 7900 ± 800 K (při energii 38,3 mJ). Poměrně malý rozdíl v teplotách je způsoben matricí - jedná se o ablaci z kartonového papíru. Při měření kovových vzorků stejnou metodou na těžce sestavě se pohybují rozdíly teplot pro stejný interval energií laseru kolem hodnoty 2000 K [31].

DP LIBS teplota

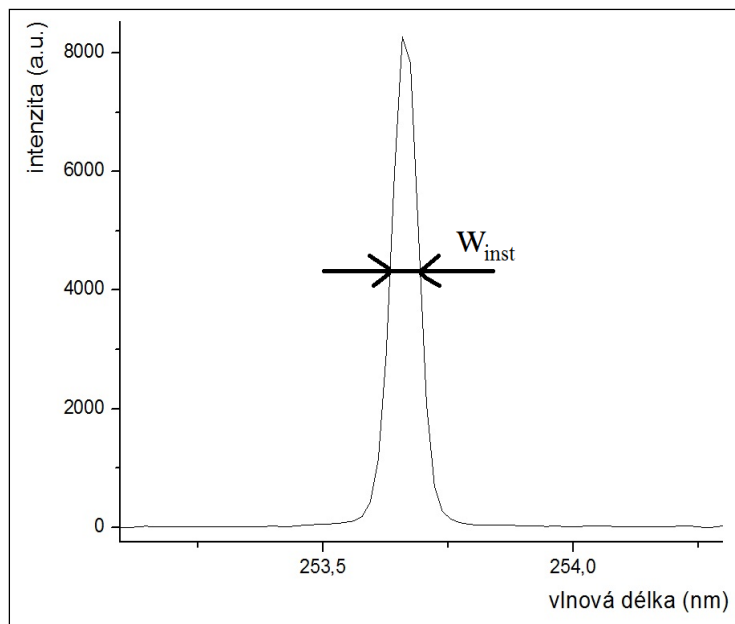


Obr. 21 Výpočet teploty Boltzmannovým grafem u DP LIBS. Červené hodnoty byly při fitování lineární funkce vynechány. Hodnota koeficientu spolehlivosti je $R^2 = 0,95$. Směrnice lineární závislosti odpovídá teplotě 8000 ± 700 K. Dalšími měřeními se stejnou hodnotou energie obou pulzů (19,1 mJ a 126 mJ) byly zjištěny teploty 8100 ± 750 K a 8500 ± 900 K.

Elektronovou teplotu plazmatu při ablaci z proudu vody nelze pro nedostatek pík ve spektru určit metodou Boltzmannova grafu. Z tohoto důvodu se pro určení iontové teploty používá výpočet ze Sahovy - Boltzmannovy rovnice [36] pomocí vodíkových čar H_β 486,13 nm a H_γ 434,04 nm. Tyto píky však nejsou ve spektru dostatečně rozlišeny (obr. 34 a 35) a proto se teplotu plazmatu při ablaci z proudu vody nepodařilo určit.

4.2.2 Stanovení elektronové hustoty

Dalším důležitým parametrem plazmatu je jeho elektronová hustota. Metoda jejího určování je popsána v kapitole viz kapitola 2.1.4. Nejdříve jsme určili rozšíření čar vlivem aparatury pomocí Hg - Ar výbojky, viz obr. 22. Instrumentální rozšíření bylo stanoveno průměrem ze tří spekter výbojky, $w_{inst} = (50,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ nm.



Obr. 22 Určení instrumentálního rozšiřování čar w_{inst} ze spektra Hg - Ar výbojky, $w_{inst} = (50,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ nm

Při práci s tabulkami parametrů w je elektronová hustota je dána vztahem:

$$N_e = \frac{w_{Stark} \cdot N_{eRef}}{w_{ref}},$$

kde w_{Stark} je rozšíření čáry vlivem Starkova jevu, N_{eRef} je referenční elektronová hustota při referenčním rozšíření spektrální čáry w_{Ref} [37].

Pro stanovení Starkova rozšíření jsme volili atomové spektrální čáry mědi v případě ablace z pevné fáze, pro kapaliny navíc atomové čáry dusíku a iontovou emisní čáru vápníku. Hodnotu rozšiřování spektrálních čar vlivem Starkova jevu jsme určili jako:

$$w_{stark} = w_{total} - w_{inst},$$

kde w_{total} je celkové rozšíření čáry a w_{inst} rozšíření čáry vlivem instrumentace.

SP LIBS ablace z pevné fáze

spektrální čára (nm)	w _{Stark} (nm)	w _{Ref} (nm)	N _{eRef} (cm ⁻³)	N _e (cm ⁻³)
Cu I				
324,7	0,01883	0,0095	6,60E+16	1,31E+17
	0,01488	0,0095	6,60E+16	1,31E+17
	0,0193	0,0095	6,60E+16	1,03E+17
	0,01614	0,0095	6,60E+16	1,34E+17

Tabulka 3 Různé hodnoty Starkova rozšíření v tabulce odpovídají jednotlivým měřením. Vypočítaná elektronová hustota pro hodnotu energie ablačního pulzu 95,2 mJ je $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$

DP LIBS ablace z pevné fáze

spektrální čára (nm)	w _{Stark} (nm)	w _{Ref} (nm)	N _{eRef} (cm ⁻³)	N _e (cm ⁻³)
Cu I				
324,7	0,02245	0,0095	6,60E+16	1,56E+17
	0,01893	0,0095	6,60E+16	1,32E+17
	0,01947	0,0095	6,60E+16	1,35E+17
	0,01852	0,0095	6,60E+16	1,29E+17

Tabulka 4 Různé hodnoty Starkova rozšíření v tabulce odpovídají jednotlivým měřením. Vypočítaná elektronová hustota pro hodnotu energie ablačního pulzu 19,1 mJ a excitačního pulzu 126 mJ je $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$

DP LIBS ablace z proudu vody

spektrální čára (nm)	w _{Stark} (nm)	w _{Ref} (nm)	N _{eRef} (cm ⁻³)	N _e (cm ⁻³)	
Cu I	324,7	0,03971	0,0095	6,60E+16	2,76E+17
Ca II	393,3	0,03673	0,0286	1,76E+17	2,26E+17
N I	742,44	0,19122	0,149	1,61E+17	2,07E+17
	744,22	0,19935	0,149	1,61E+17	2,15E+17
	746,83	0,22631	0,152	1,61E+17	2,40E+17

Tabulka 5 Vypočítaná elektronová hustota pro hodnotu energie ablačního pulzu 95,2 mJ a excitačního pulzu 126 mJ je $(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$

4.2.3 Určení platnosti LTE

Po získání teploty a elektronové hustoty plazmatu lze určit, zda platí předpoklad lokální termodynamické rovnováhy (2.1.3). Ten je dán rovnicí:

$$N_e(\text{cm}^{-3}) > 1,6 \cdot 10^{12} T^{\frac{1}{2}} (\Delta E)^3,$$

kde T je teplota v kelvinech, ΔE je rozdíl energií základní a první excitované hladiny, vyjádřený v eV. Ve spektru je nejvíce zastoupen vápník, hodnota ΔE tedy odpovídá přechodu vápníkového atomu ze základního do excitovaného stavu (spektrální čára Ca I 422,673 nm).

SP LIBS ablace z pevné fáze

Pro případ ($\Delta E = 2,93 \text{ eV}$, $T = 8400 \text{ K}$, $N_e = 1,2 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-3}$) platí nerovnice:

$$1,2 \cdot 10^{17} > 3,7 \cdot 10^{15},$$

předpoklad lokální termodynamické rovnováhy je splněn.

DP LIBS ablace z pevné fáze

Pro případ ($\Delta E = 2,93 \text{ eV}$, $T = 8000 \text{ K}$, $N_e = 1,3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-3}$) platí nerovnice:

$$1,3 \cdot 10^{17} > 3,6 \cdot 10^{15},$$

předpoklad lokální termodynamické rovnováhy je splněn.

4.3 Stanovení kalibračních křivek pomocí $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Kvantitativní analýzu vzorků lze provádět několika způsoby. Nejužívanější a nejpřesnější je metoda kalibračních křivek (viz kapitola 2.2.2). Při určování kalibračních křivek je třeba, aby kalibrační vzorky měly stejnou matici jako zkoumané vzorky. Proto pro analýzu biofilmu z povrchu papíru byly homogenní roztoky se známou koncentrací Cu (viz tabulka 6) nanášeny na povrch papíru ve formě kapek a ponechány, dokud se voda neodpařila. Při analýze z proudu vody jsme pracovali přímo s kalibračními roztoky.

kalibrační roztok	koncentrace Cu (ppm)
1	5
2	10
3	50
4	100
5	200
6	500
7	1000

Tabulka 6 Přehled kalibračních roztoků pro kvantitativní analýzu

Pro sestavení kalibračních křivek pro měď byly použity atomové spektrální čáry Cu I 324,7 a Cu I 327,4. Pro normování jejich intenzit byly použity spektrální čáry v tabulce 7. Tímto postupem jsme získali několik kalibračních křivek. Spektrální čáry pro kalibraci byly záměrně voleny tak, aby obsahovaly jak atomovou rezonanční čáru, tak iontové čáry. Pro konstrukci některých kalibračních křivek lze též užít normalizaci absolutní intenzity k průměrné hodnotě pozadí či použít přímo absolutní intenzity bez normování.

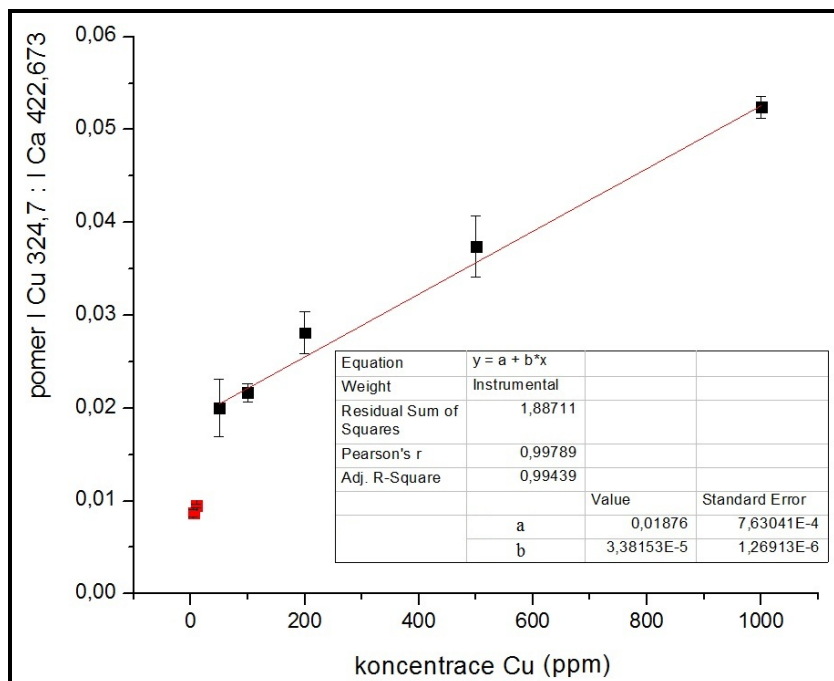
Jednotlivé body v grafech kalibračních křivek jsou vždy dány průměrem normovaných intenzit z 3-5 naměřených spekter.

		spektrální čára (nm)	E_i (cm ⁻¹)	E_j (cm ⁻¹)	A (s ⁻¹)
ablace z pevné fáze	Ca I	422,673	0	23652	2,18E+08
	Ca II	315,887	25191	56839	3,10E+08
		373,69	25414	52166	1,70E+08
		396,84	0	25191	1,40E+08
ablace z proudu vody	H I	656,277	82259	97492	2,24E+07
	O I	844,676	76794	88630	3,22E+07
	N II	635,76	187437	203162	2,68E+07

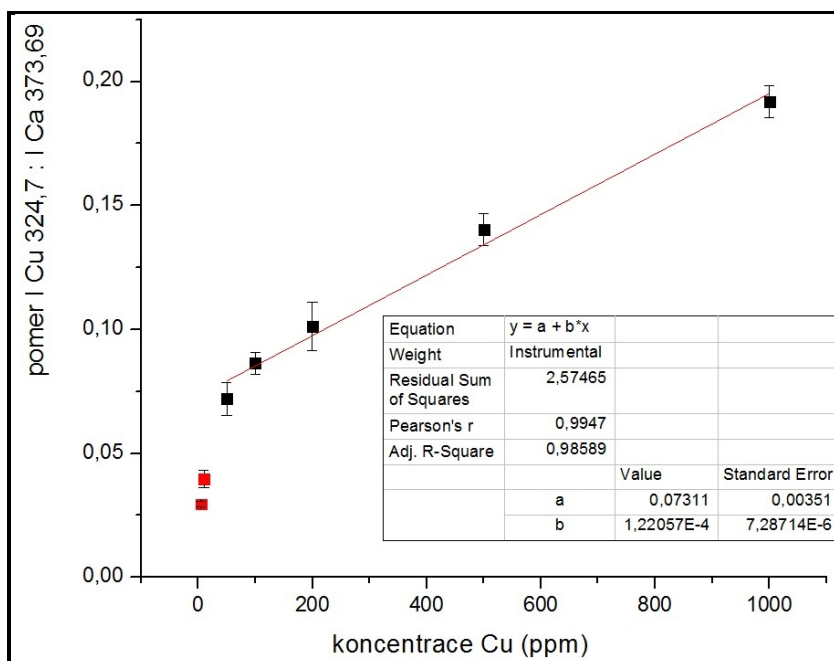
Tabulka 7 Přehled spektrálních čar použitých k normování absolutní intenzity čar mědi při analýze z pevné fáze a z proudu vody

4.3.1 Kalibrační křivky pro ablaci z pevné fáze

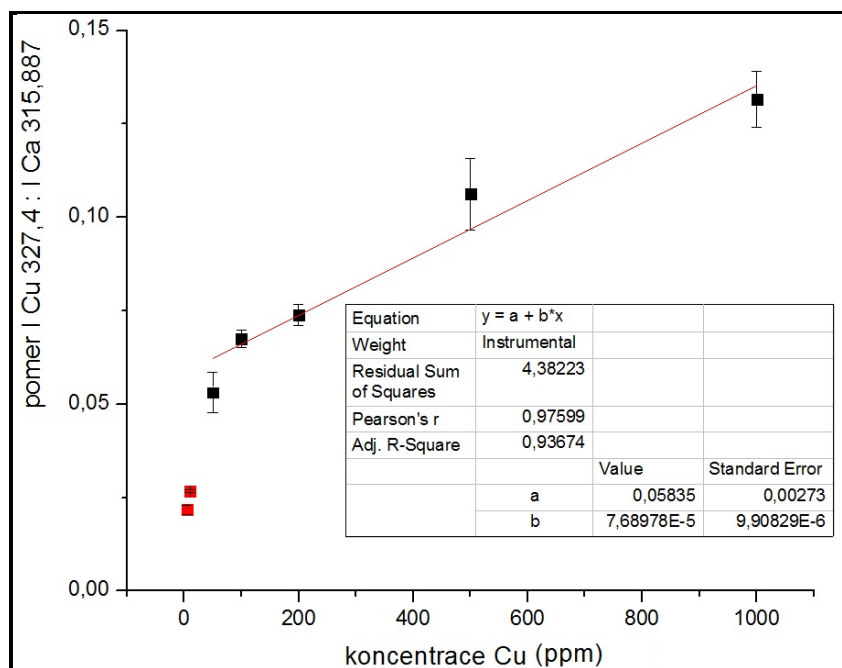
SP LIBS



Obř. 23 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm, jejíž intenzita je normovaná k rezonanční čáře vápníku Ca I 422,673 nm. Hodnota koeficientu spolehlivosti je $R^2 = 0,99$. Kalibrační křivka má pro tento případ tvar přímky. Červené body byly při fitu vynechány



Obř. 24 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm normovanou k čáře vápníku Ca II 373,69 nm. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,99$. Červené body byly při fitu vynechány

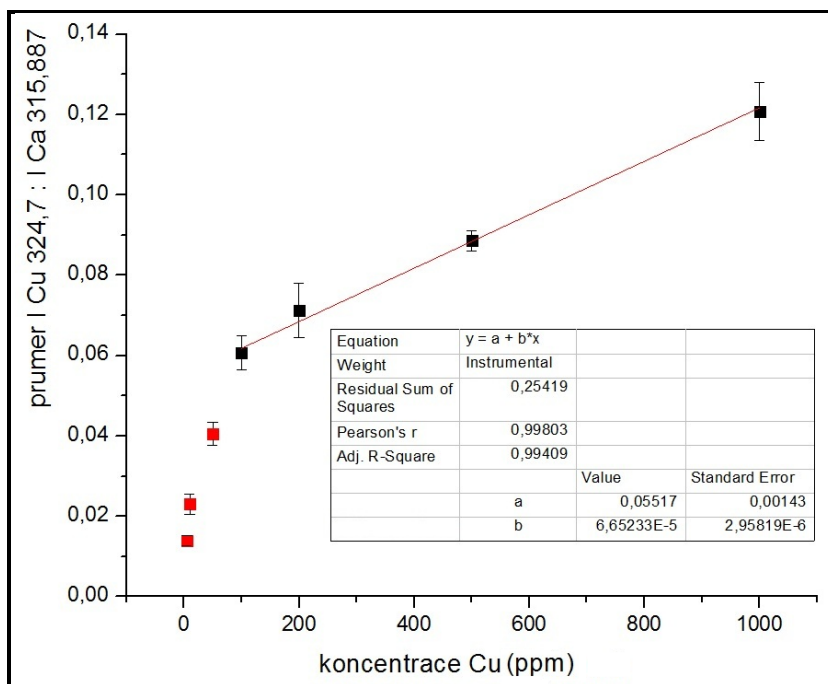


Obr. 25 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 327,4 nm normovanou k čáře vápníku Ca II 315,887 nm. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,94$. Červené body byly při fitu vynechány

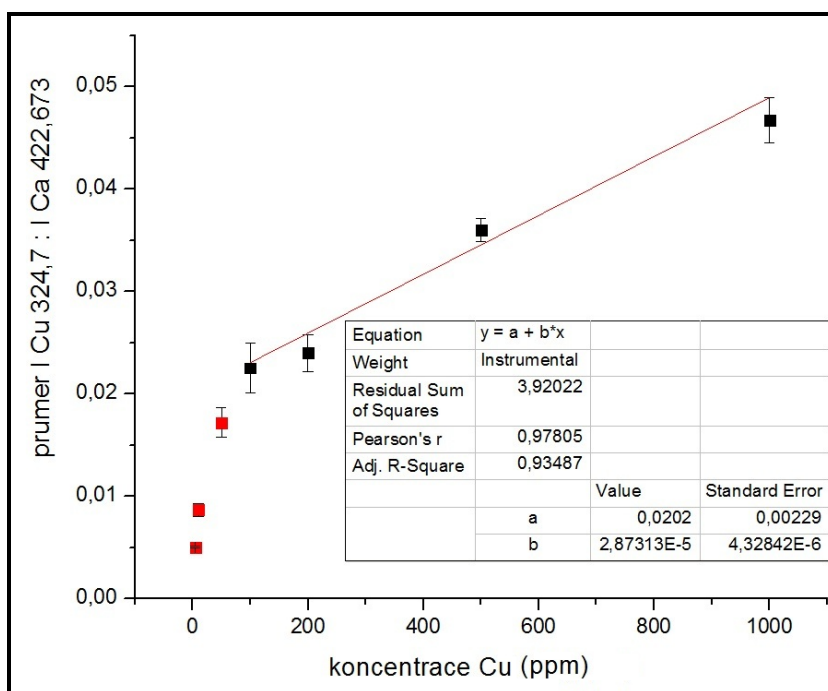
Zbývající kalibrační křivky mají podobný průběh jako výše uvedené. V případě vykreslení grafu pomocí absolutních intenzit čar mědi jsou hodnoty zatíženy větší chybou (neeliminuje se fluktuační energie laseru a ostatní faktory jako v případě normování), a tudíž je lepší intenzity normovat.

U všech tří uvedených kalibračních křivek byly vynechány body odpovídající koncentraci 5 a 10 ppm Cu v roztoku. Při takto nízkých koncentracích přestává být kalibrační křivka lineární z důvodu chyby při určování intenzity [9] str. 108, proto nejsou hodnoty lineárního fitu přes celou oblast koncentrací pro velmi nízké koncentrace použitelné. Pokud bychom chtěli stanovit parametry fitu pro tuto oblast, museli bychom v grafu vyloučit zbylé body odpovídající koncentracím větším než 10 ppm Cu. Nelinearita kalibračních křivek mědi i ostatních prvků bývá v praxi běžným jevem [38] a ne vždy se jí lze zbavit vhodným normováním.

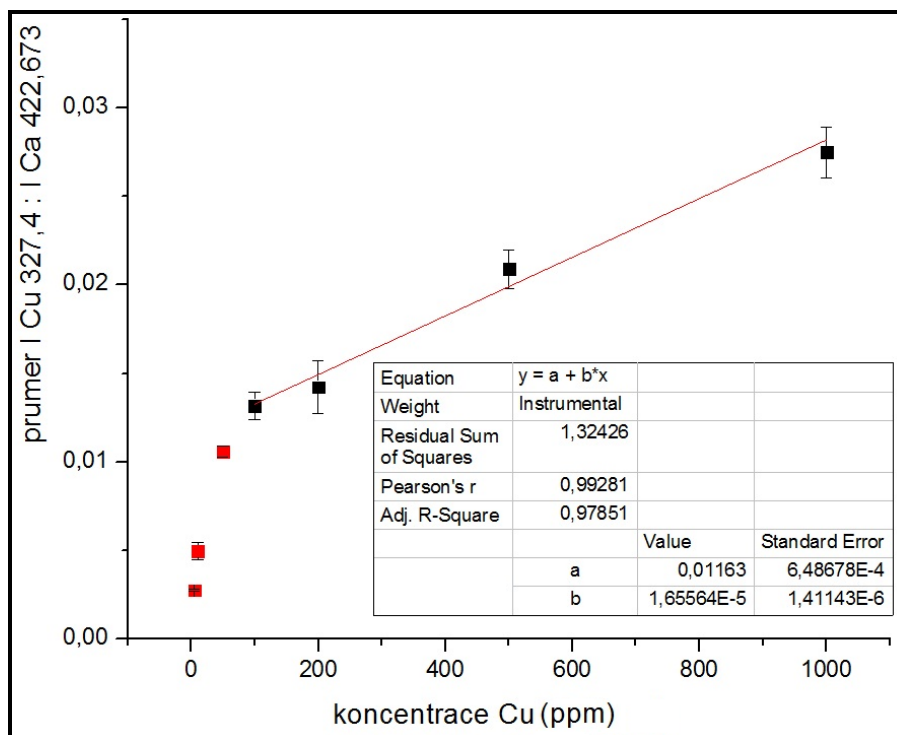
DP LIBS



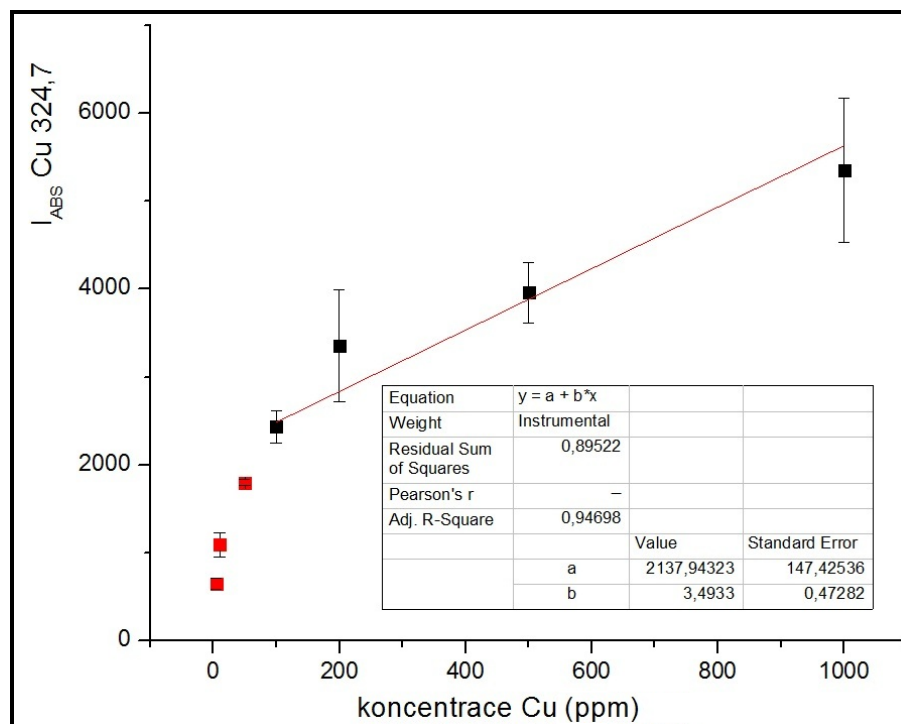
Obr. 26 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm normovanou k čáře vápníku Ca II 315,887 nm. Koefficient spolehlivosti je $R^2 = 0,99$. Červené body byly při fitu vynechány



Obr. 27 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm normovanou k rezonanční čáře vápníku Ca I 422,673 nm. Koefficient spolehlivosti je $R^2 = 0,93$. Červené body byly při fitu vynechány



Obr. 28 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 327,4 nm normovanou k rezonanční čáře vápníku Ca I 422,673 nm. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,98$. Červené body byly při fitu vynechány



Obr. 29 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm při použití absolutních hodnot intenzity. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,95$. Červené body byly při fitu vynechány

Při DP LIBSu dochází ke zmenšení chyby při určování intenzit (viz obr. 26 – obr. 29). Hodnoty intenzity, odpovídající koncentraci 50 ppm Cu jsou určeny přesněji. Při použití absolutních hodnot intenzity Cu I 324,7 nm jsou hodnoty intenzit zejména pro vyšší koncentrace zatíženy velkou chybou (viz obr. 29), proto je lepší použít metody normování intenzit.

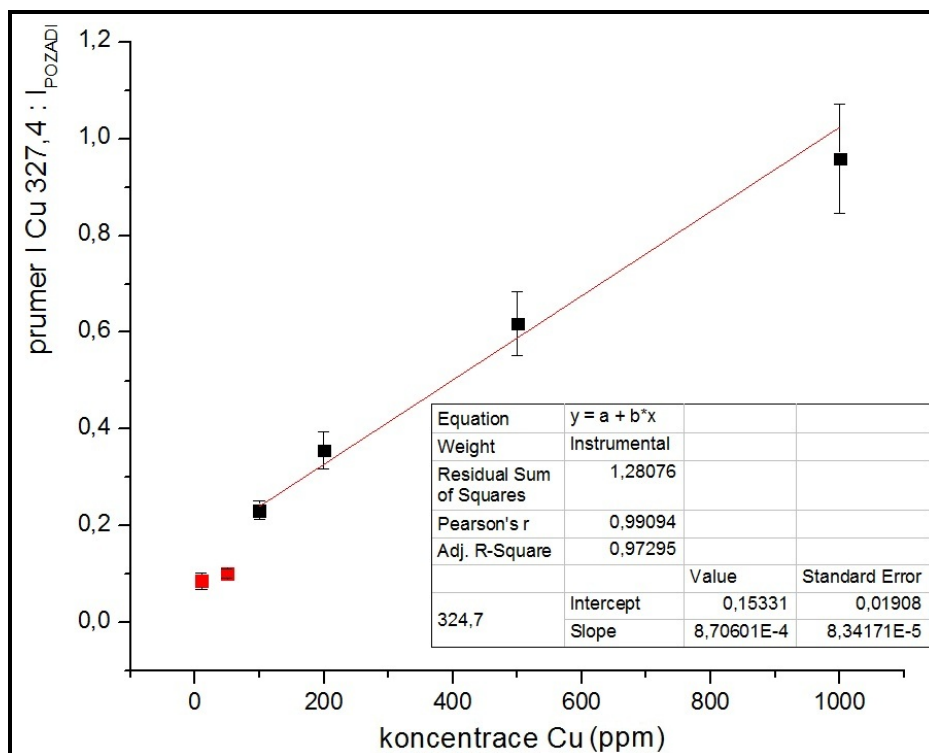
4.3.2 Kalibrační křivky pro ablaci z proudu vody

DP LIBS

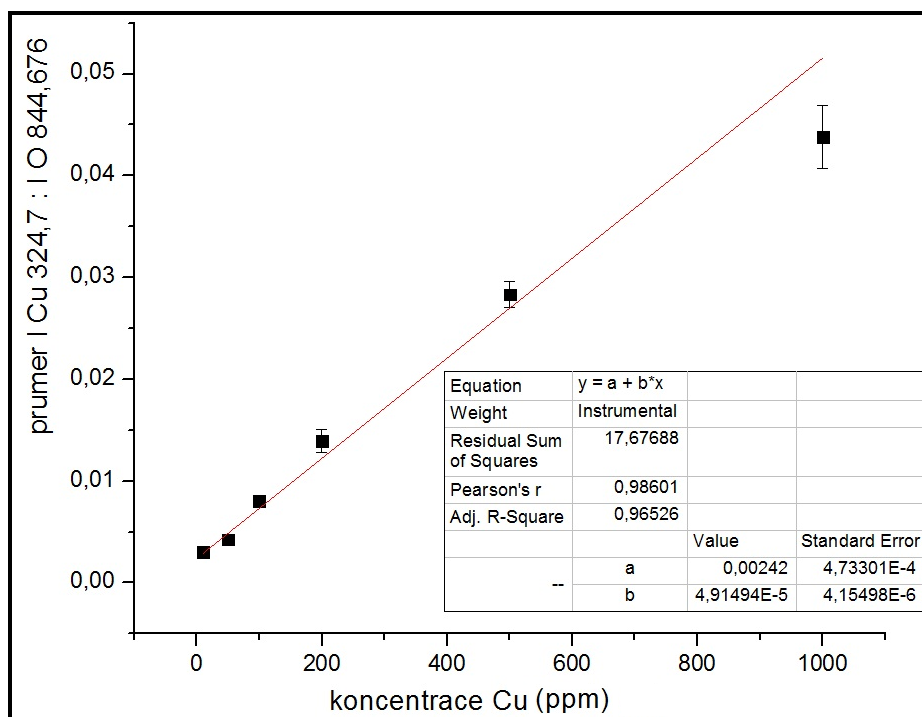
Při ablaci z proudu vody byla použita vyšší energie než při ablaci biofilmu z papíru (viz tabulka 8). Lišily se i parametry spektrometru (viz kapitola 4.1). Kvůli nedostatku píků ve spektru vhodných k normování intenzity mědi byla použita metoda normování vůči pozadí (obr. 30). Po zprůměrování více spekter bylo použito k vykreslení kalibrační přímky i absolutní intenzity píků mědi Cu I 324,7 nm (obr. 32). Pík mědi na hodnotě Cu I 327,4 nm byl ve spektru často nepřítomen či špatně rozlišen, proto pro tuto spektrální čáru kalibrační křivky stanoveny nebyly. Z měření byl kvůli slabé intenzitě píků mědi vyřazen i kalibrační roztok s koncentrací 5 ppm Cu.

laser	energie laseru (mJ)		
	ablace z pevné látky		ablace z proudu vody
	SP	DP	DP
Solar (532 nm)	95,2	19,1	95,2
Brilliant (1064 nm)	x	126	126

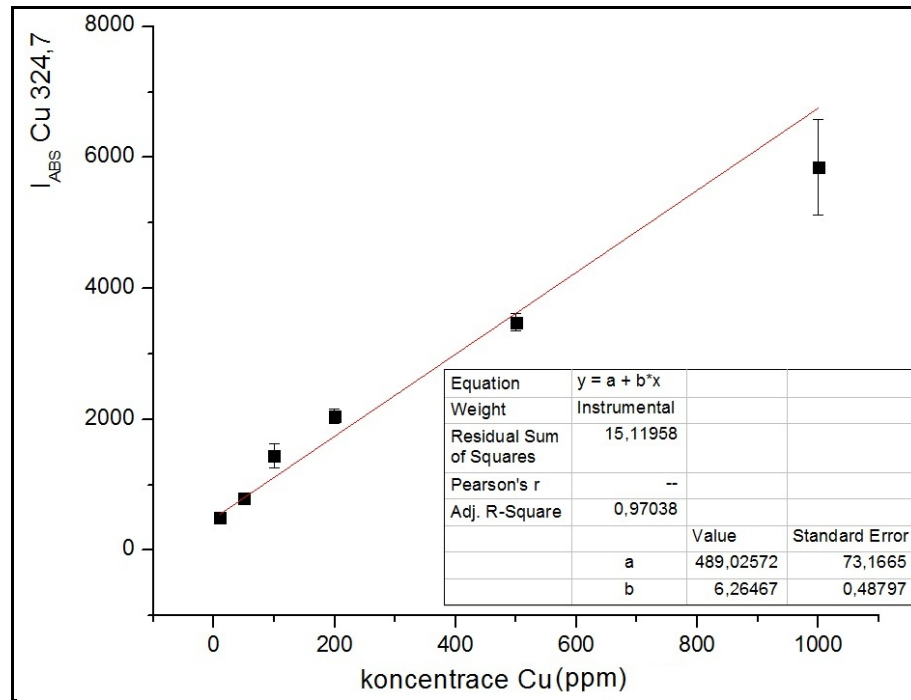
Tabulka 8 Hodnoty energie laserů pro ablaci z pevné fáze a proudu vody



Obr. 30 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 327,4 nm normovanou k průměrné hodnotě pozadí. Červené body byly při fitu vynechány. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,97$.



Obr. 31 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 327,4 nm normovanou k čáře O I 844,676 nm. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,97$.



Obř. 32 Kalibrační křivka mědi pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm při použití absolutních hodnot intenzity. Koeficient spolehlivosti je $R^2 = 0,97$.

4.4 Chemická analýza metodou emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP - OES)

Pro kvalitativní analýzu roztoků řas s CuSO_4 bylo provedeno kontrolní měření metodou emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

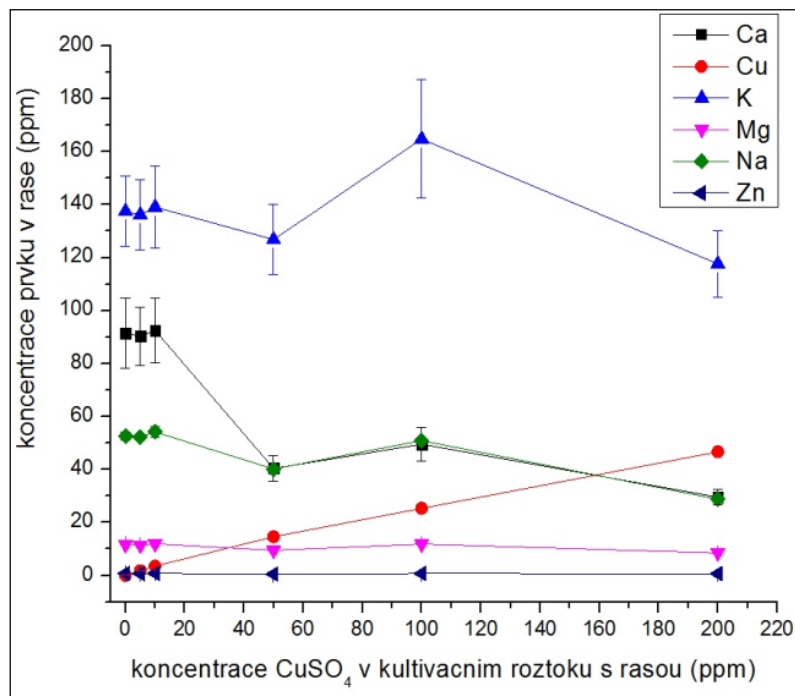
Jedná se o spektroskopickou metodu, která k detekci a stanovení koncentrace prvků ve vzorku využívá emisní spektra odpovídající deexcitaci atomů a iontů. Pracuje tedy na podobném principu jako LIBS. Pomocí ICP-OES lze analyzovat vzorky v pevné, kapalně i plynné fázi. Mezi výhody této metody patří nižší detekční limit než u LIBS (řádově až 10^0 ppb) a možnost pracovat s velkým rozsahem koncentrací (stovky ppm).

Analýza řas byla provedena z kapalně fáze. Zastoupení jednotlivých prvků v řase pro různé koncentrace přidaného roztoku síranu měďnatého do kultivační lázně je uvedeno v tabulce 9.

vlnová délka (nm)		koncentrace CuSO_4 v kultivačním roztoku s řasou (ppm)					
		0	5	10	50	100	200
		koncentrace jednotlivých prvků v řase (ppm)					
Ca	396,8	82,1	82,6	83,7	37,0	45,1	27,6
	422,6	100,8	98,0	101,2	43,9	53,9	31,6
Cu	324,7	0,1	1,8	3,6	14,9	25,8	47,5
	327,4	0,1	1,8	3,5	14,3	24,9	45,9
K	766,4	128,2	126,8	128,1	117,5	148,9	108,8
	769,8	146,8	145,5	150,1	136,2	180,7	126,6
Mg	280,2	11,5	11,3	12,0	9,5	11,7	8,6
	285,2	11,7	11,5	12,0	9,5	12,0	8,4
Na	588,9	51,4	51,4	52,7	40,1	50,0	29,1
	589,5	53,7	53,1	55,7	40,3	51,8	28,5
Zn	334,5	0,7	0,7	0,8	0,5	0,7	0,7
	481,0	0,8	0,7	0,8	0,5	0,7	0,6

Tabulka 9 Koncentrace jednotlivých prvků v řase při přidání různých koncentrací CuSO_4 do kultivační lázně. Stanoveno metodou ICP-OES

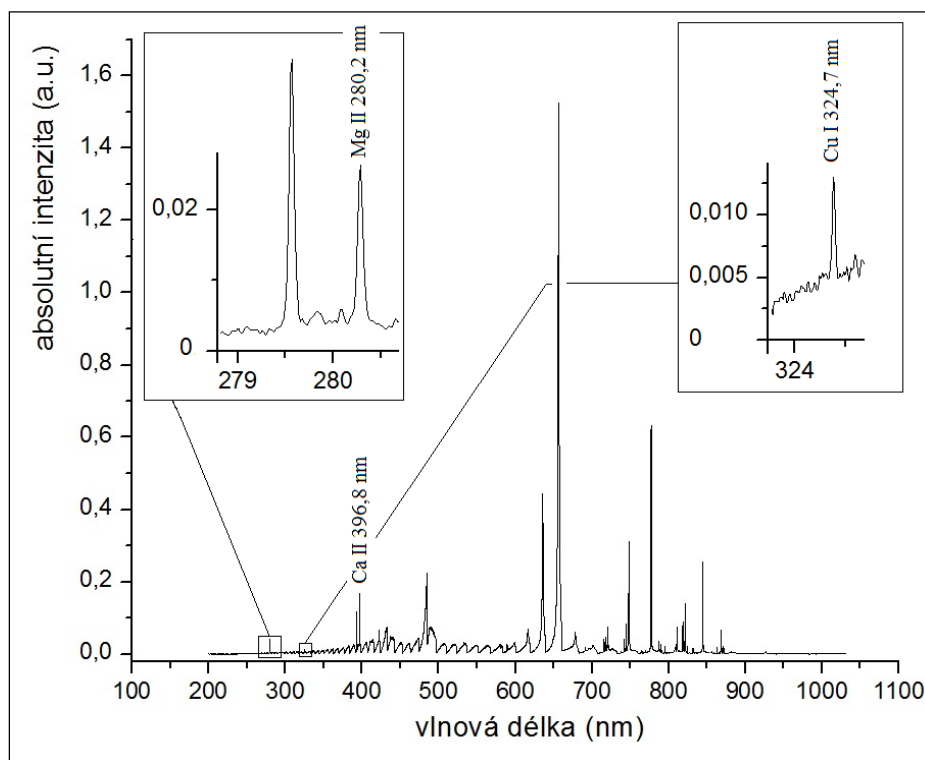
Závislost koncentrace jednotlivých prvků v řase na koncentraci CuSO_4 v kultivačním roztoku je pro data z tabulky zobrazena v grafu na obr. 33. Z grafu vidíme, že při zvyšování koncentrace CuSO_4 v kultivačním roztoku obsah mědi v řase lineárně roste (červené body).



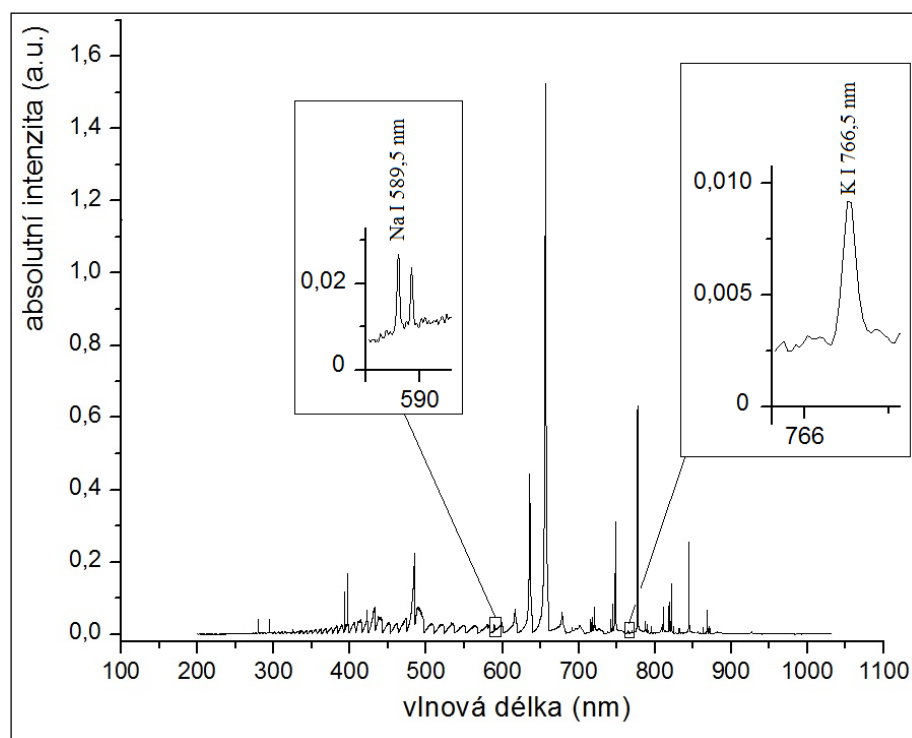
Obr. 33 Závislost koncentrace jednotlivých prvků v řase na koncentraci CuSO_4 v kultivační lázni pro data z tabulky 9

4.5 Kvalitativní chemická analýza metodou LIBS

Při kvalitativní analýze roztoků s řasami pomocí LIBS bylo měření provedeno v proudě vody pomocí DP. Ve spektrech (obr. 34 a 35) se objevily všechny prvky z tabulky 9, kromě zinku, který je zastoupen pouze v nepatrném množství, které je výrazně pod detekčním limitem metody LIBS. Neurčené spektrální čáry na obr. 34 a 35 odpovídají vodíku, kyslíku a dusíku.



Obr. 34 Kvalitativní analýza roztoku pomocí metody LIBS. Spektrum odpovídá řase, jejíž kultivační roztok (tabulka 1) byl kontaminován 200 ppm CuSO_4 . Ve spektru jsou patrné píky hořčíku, mědi a vápníku. Intenzita spektra se pohybovala v řádech $10^5 - 10^6$ a.u.



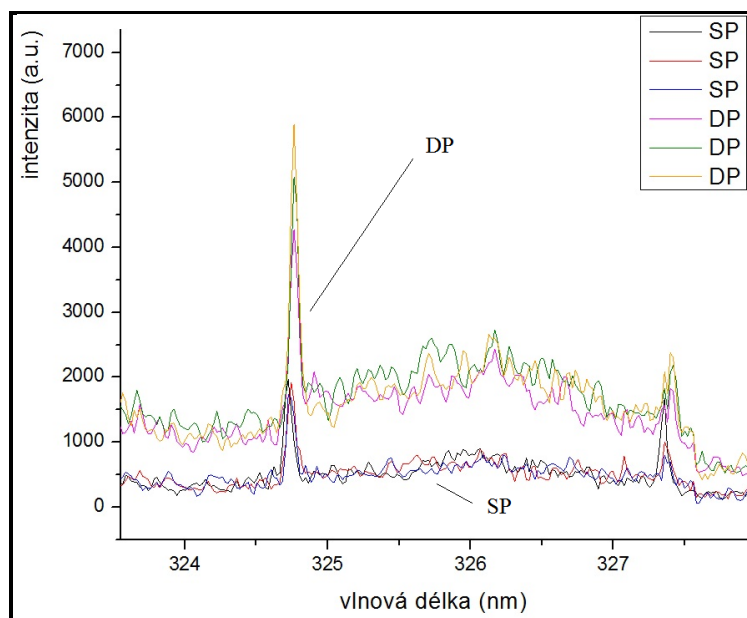
Obr. 35 Kvalitativní analýza roztoku pomocí metody LIBS. Spektrum odpovídá řase, v jejímž kultivačním roztoku (tabulka 1) bylo přidáno 200 ppm CuSO_4 . Ve spektru jsou patrné píky sodíku a draslíku. Intenzita spektra se pohybovala v řádech $10^5 - 10^6$ a.u.

4.6 Určení obsahu mědi v řase pomocí LIBS

Pro určení obsahu mědi v řase byly sestaveny kalibrační křivky pro ablaci z pevné fáze pomocí jednoho a dvou pulzů. Pro ablaci z proudu vody byly použity dva pulzy. Jako referenční vzorky byly použity homogenní roztoky CuSO_4 (tabulka 6).

Roztoky s řasami, u nichž chceme obsah mědi zjišťovat, ovšem homogenní nejsou. Jednotlivé buňky řasy obsahující měď mají rozměr cca 10 - 20 μm , a navíc tendenci se shlukovat. Dalším problémem je fakt, že pro kalibrační roztoky se koncentrace Cu pohybovala od 5 - 1000 ppm, kdežto skutečný obsah mědi v řase v rozmezí 2 - 45 ppm (tabulka 9).

Pro měď dochází kolem hodnoty 100 ppm při ablaci z pevné fáze u kalibračních křivek ke změně průběhu. Pro nižší hodnoty koncentrace křivka zřejmě není lineární (obr. 23 – obr. 29). U roztoků s mědí se průběh kalibrační funkce také kolem hodnoty 100 ppm prudce mění (obr. 30 – obr. 32). Při určování obsahu mědi v řase proto musela být většina bodů v grafech (koncentrace nad 10 ppm) při stanovení kalibrační křivky vynechána. Při ablaci biofilmů s nízkou koncentrací mědi (5-15 ppm) jedním pulzem nebyly píky mědi (324,7 nm a 327,4 nm) v získaných spektrech dobře rozlišeny. Při použití dvou pulzů dojde k výraznému zlepšení v poměru signál/šum. Pro stejnou koncentraci mědi naměříme výrazně kvalitnější spektrum (obr. 36). Spektrální čára Cu I 327,4 nm není dobře rozlišena ani u DP, proto nebyla pro kvantitativní analýzu použita.



Obr. 36 Srovnání částí spekter při SP a DP analýze biofilmu s řasou při koncentraci 2 ppm mědi v řase (5 ppm mědi v kultivačním roztoku)

Výsledky výpočtu koncentrace mědi v řase při použití DP LIBS a spektrální čáry mědi Cu I 324,7 nm jsou uvedeny v tabulce 10. Při určování nejistot byla vzata v úvahu pouze nepřesnost při měření intenzity, jelikož kalibrační přímky byly určeny pouze pomocí dvou bodů (odpovídající koncentraci 5 a 10 ppm Cu v kalibračním roztoku) a tudíž nebyly zatíženy chybou.

Cu v živném roztoku (ppm)	Cu v řase pomocí ICP (ppm)	určení koncentrace Cu v řase pomocí DP LIBS (ppm)			
		spektrální čára Cu I kalibrovaná k čáře vápníku na			
		Ca II 315 nm	Ca II 373 nm	Ca II 396 nm	Ca II 422 nm
3	1,8	1*	1*	2*	2*
7	3,6	3*	3*	4*	4*
33	14,9	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1*	9 ± 1
67	25,8	25 ± 6	24 ± 6	23 ± 4	19 ± 4
133	47,5	37 ± 2	35 ± 2	34 ± 1	30 ± 2

Tabulka 10 Výpočet koncentrace mědi v řase pomocí ablace biofilmu technikou DP LIBS při užití spektrální čáry Cu I 324,7 nm. Hodnoty označené * jsou pod limitem kvantifikace, a tudíž pouze přibližné.

Pro určení zastoupení mědi v řase při ablaci z vody byly použity kalibrační křivky pro absolutní intenzity Cu I 324,7 nm (obr. 32) a intenzity těže spektrální čáry, normované hodnotou pozadí. U čar H I 656,277 a O I 844,676 dochází zřejmě k selfabsorpci, a proto nebyly k výpočtu použity. Výsledky výpočtu pro ablaci z proudu vody jsou zaneseny do tabulky 11. Nižší koncentrace než 15 ppm se nepodařilo při ablaci z vody rozumně detekovat.

Cu v živném roztoku (ppm)	Cu v řase pomocí ICP (ppm)	kalibrace k pozadí (ppm)	absolutní hodnoty intenzit (ppm)
133	47,5	55 ± 12	43 ± 18

Tabulka 11 Výpočet koncentrace Cu v řase při ablaci z proudu vody za použití kalibrace spektrálních čar k pozadí a bez kalibrace při použití absolutních hodnot intenzit

4.6.1 Detekční limit a limit kvantifikace metody LIBS

Při výpočtech obsahu mědi v řase se ukázala jako nejpřesnější metoda ablace biofilmu pomocí dvojitého pulzu. Pro tuto metodu byl proto určen limit detekce a kvantifikace.

Limit detekce je dán rovnicí [39], [40]:

$$LOD = \frac{k \cdot s_D}{m},$$

kde s_D je standardní je standardní odchylka při měření vzorku s nulovou koncentrací daného prvku, m je směrnice kalibrační křivky v polovině intervalu koncentrací a k je volený koeficient. Volba $k = 3$ odpovídá 90% spolehlivosti. Limit kvantifikace je v [9] str. 115 dán vztahem:

$$LOQ = 3,3 \cdot LOD.$$

Detekční limity a limity kvantifikace pro spektrální čáru Cu I 324,7 nm normovanou k různým emisním čarám vápníku shrnuje tabulka 12

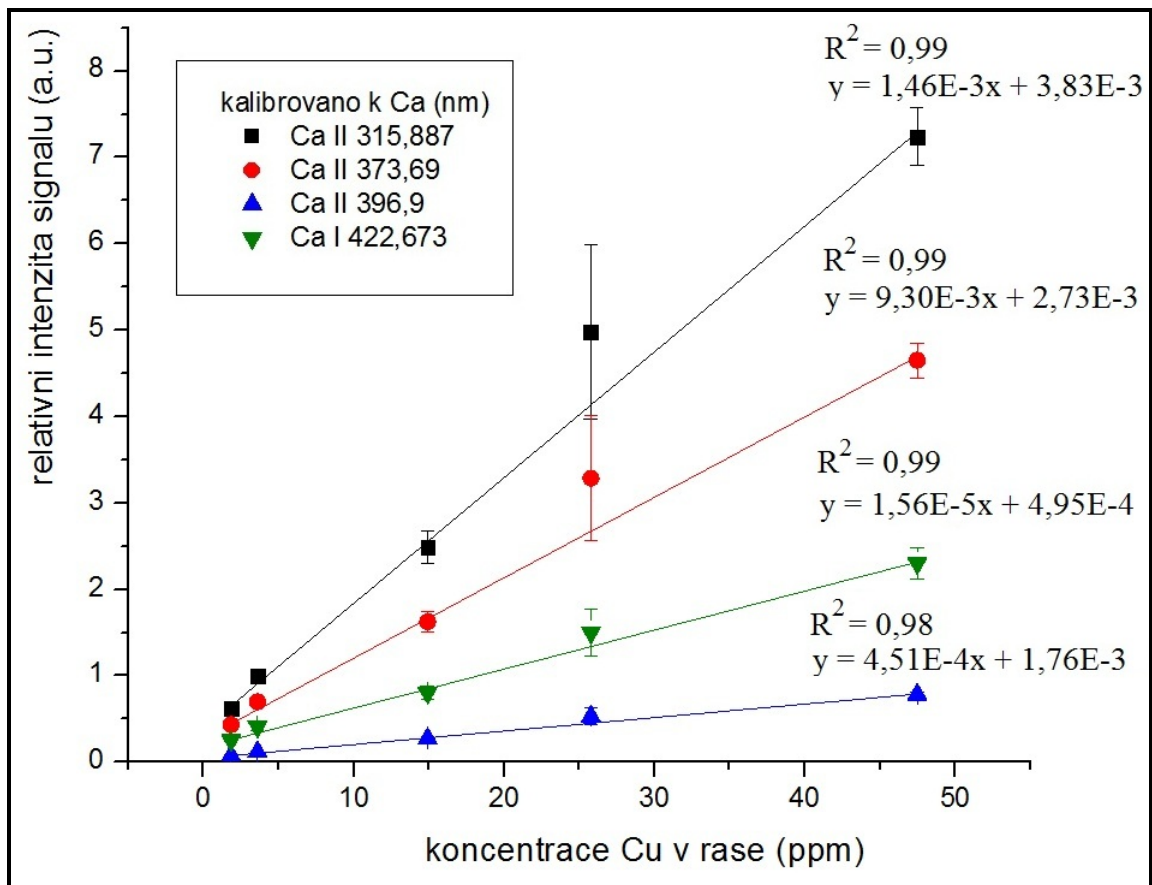
spektrální čára pro normování intenzity Cu	vlnová délka (nm)	směrnice kalibrační křivky m	odchylka s_D při nulové koncentraci	detekční limit (ppm)	limit kvantifikace (ppm)
Ca II	315,91	1,83E-03	8,99E-04	1,5	4,9
	373,69	1,24E-03	6,35E-04	1,5	5,1
	396,3	2,16E-04	4,10E-04	5,7	18,8
Ca I	422,673	7,32E-04	6,72E-04	2,8	9,1

Tabulka 12 Detekční limit a limit kvantifikace pro DP ablaci z pevné fáze

4.6.2 Kalibrační křivky pro určení obsahu mědi v řase kombinací ICP a LIBS

Jestliže vyneseme do grafu intenzitu signálu pro spektrální čáry mědi v závislosti na skutečném obsahu mědi v řase stanoveném metodou ICP můžeme vzniklé křivky použít pro určení koncentrace mědi v neznámém roztoku s řasami *Trachydiscus minutus* (obr. 37). Takto získané kalibrační křivky jsou při určování koncentrace mědi přesnější než křivky získané při použití referenčních roztoků CuSO_4 , neboť je v nich zahrnuta jak nehomogenita roztoku, tak matriční vlivy řasy na spektrum.

Z obr. 33 vidíme lineární závislost mezi obsahem mědi v kultivačním roztoku a obsahem mědi absorbovaným buňkami řasy. Lze tedy určit i obsah mědi v prostředí, kde se řasa vyvíjela. Uvedené závislosti platí pro rozsahy koncentrací mědi v řase 2-50 ppm.



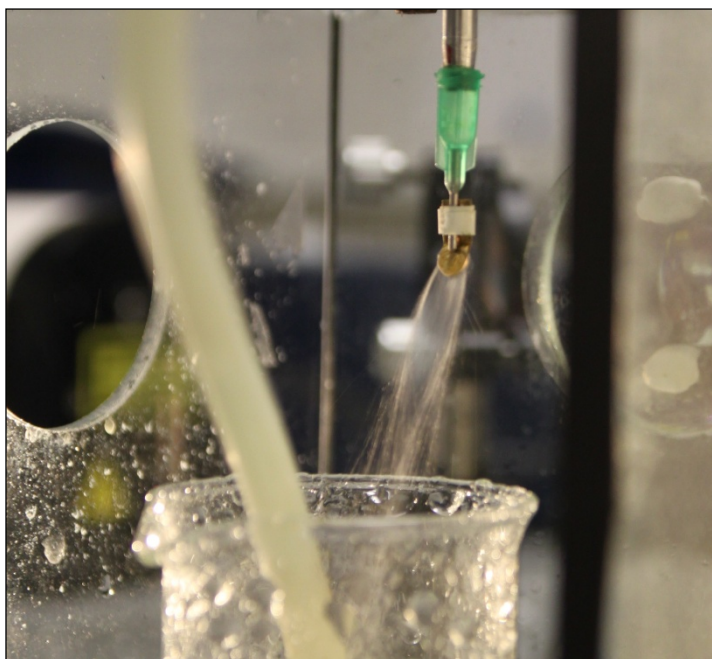
Obr. 37 Kalibrační křivky pro stanovení obsahu mědi v roztoku řasy *Trachydiscus minutus*

4.7 Optimalizace aparatury pro ablaci z proudu vody

Pokud chceme analyzovat kapaliny, nabízí se pro metodu LIBS několik možností. Laser může být fokusován na povrch či do objemu nepohyblivé kapaliny, do oblaku vytvořeného aerosolu či kolmo do proudu kapaliny vytvářeného tryskou. Při ablaci z povrchu kapaliny dochází k roztříku, který může degradovat optické povrchy. Proto je nutné umístit trysku do akvária a signál sbírat kolimátorem přes sklo (viz obr. 17).

Model pohyblivého průrazu byl nejdříve navržen v [41]. Při použití trysek dochází k maximalizaci signálu, jestliže je laser fokusován několik mm za stěnu proudu [42]. Tato hodnota je navíc závislá na energii laseru. Maximální hodnota intenzity jako funkce defokusace laseru je úzce spojená s funkcí efektivního objemu. Efektivní objem je objem kapaliny, v kterém je překročena prahová intenzita záření, potřebná pro průraz. Postup při určování optimální hodnoty defokusace je naznačen v [42].

Dosavadní metody předpokládaly ablaci homogenních roztoků. Roztoky s řasami ovšem homogenní nejsou. Bylo proto nutné navrhnout trysku tak, aby se neucpávala a proudící kapalina byla co nejrovnoměrněji rozptýlena. Byly provedeny experimentální měření se stékáním kapaliny po smáčivém i nescháčivém povrchu, jako nejlepší se nakonec ukázala varianta na obr. 38. Modelováním tvaru trysek pro maximalizaci signálu se zabývá [43].



Obr. 38 Modifikace trysek pro ablaci z proudu vody

5 Ramanovská spektroskopie

Ramanova spektroskopie (RS) je optická spektroskopická metoda, při níž se identifikují jak organické, tak anorganické látky pomocí vibračních spekter, která jsou pro každou látku typická. Přestože fyzikální princip metody je známý téměř devadesát let, v poslední době se metoda teprve začíná prosazovat v řadě unikátních aplikací a to v důsledku rozvoje citlivých detektorů záření.

RS vychází z detekce neelastického rozptylu části záření v ultrafialové, viditelné a blízké infračervené oblasti molekulami vzorku. Rozdíl energie dopadajícího a rozptýleného záření vždy odpovídá vibračním přechodům v molekule vzorku a intenzita nepružně rozptýleného světla je úměrná změně polarizovatelnosti molekuly při interakci s fotony budícího zdroje (většinou laser ve viditelném oblasti). Analýza trvající řádově minuty umožňuje identifikovat chemické vazby a odlišit vzorky s různým složením, přičemž ozářený objem vzorku určuje prostorové rozlišení, s jakým lze tyto informace získávat.

Ramanovská spektroskopie je významnou analytickou metodou, která nachází uplatnění v mnoha oborech jako je chemie, mikrobiologie, fyzika povrchů, biochemie a medicína [44]. Vzorky pro RS mohou být v mnoha podobách; pevné látky, kapaliny či páry o různé teplotě, mikroskopické částice či povrchy, přičemž k provedení měření stačí malé množství vzorku. Možné aplikace lze shrnout do následujících:

- a) rozpoznávání jednotlivých druhů mikroorganismů nebo typů biologických vzorků,
- b) rozlišování různých biofilmů v reálném čase,
- c) nedestruktivní analýza chemického složení např. farmaceutických výrobků a kontrola např. pravosti léků v reálném čase,
- d) rozpoznávání nádorových a zdravých tkání/buněk; nabízí se tak jako unikátní diagnostický nástroj pro onkologii,
- e) tvorba chemické mapy povrchů a identifikace nanostruktur,
- f) ramanovskou pinzetou je možné manipulovat s mikroorganismy volně plovoucími v kapalině.

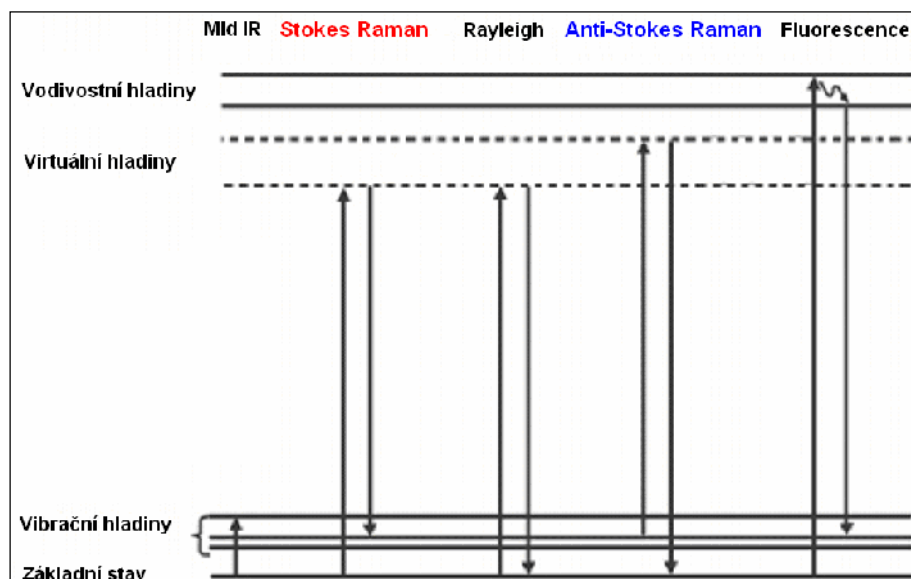
Jedním z problémů ramanovské spektroskopie je degradace vzorku (např. při fokusaci manipulačního laseru na jednotlivé buňky tkání) a fluorescence, která často přehluší slabý ramanovský signál.

5.1 Princip ramanovské spektroskopie

Při interakci světla s hmotou mohou být fotony absorbovány, rozptýleny či projít materiálem beze změny. Proces absorpce vyžaduje, aby energie fotonu odpovídala energii přechodu mezi dvěma energiovými hladinami. Oproti tomu rozptyl může nastat i v případě, kdy si energie neodpovídají. Při průchodu světelné vlny kolem molekuly dochází k její interakci s elektrony. Může dojít k polarizaci a tím přechodu systému na konfiguraci s vyšší energií. Tato konfigurace se nazývá virtuální, a má velice krátkou dobu života, protože je nestabilní. Dochází k vyzáření absorbovaného fotonu ve formě rozptýleného záření.

Tento proces se od absorpce liší v tom, že nedojde k excitování molekuly na vyšší energiovou hladinu, ale ke změně uspořádání systému jádra a elektronů. Také doba života virtuálního stavu je značně kratší, než u procesu absorpce ($<1\text{ps}$). Energie nového uspořádání závisí na vlastnostech látky a intenzitě dopadajícího záření.

Existují dva typy rozptylu (obr. 39). Při Rayleighově rozptylu dochází k relaxaci elektronového oblaku tak rychle, že nedojde k posunu jader v reakci na nové rovnovážné uspořádání systému. Při relaxaci dochází k vyzáření fotonů se stejnou vlnovou délkou (energií, frekvencí) jako má dopadající záření - elastický rozptyl. Tento rozptyl je při interakci světla s hmotou dominantní. Nepružný Ramanův rozptyl je daleko méně častý (jeden z $10^6 - 10^8$ fotonů je rozptýlen ramanovsky). Při něm dochází k pohybu jader zároveň s interakcí fotonů a elektronů. Pokud je molekula na základní energiové hladině, rozptýlené světlo bude mít delší vlnovou délku (Stokesův rozptyl). Pokud je molekula před dopadem záření vibračně excitovaná a klesne do nižšího energiového stavu, rozptýlené světlo bude mít větší energii než budící (Anti-Stokesův rozptyl).



Obr. 39 Typy rozptylů. Převzato z [45]

Poměr intenzit Stokesova a Anti - Stokesova rozptylu lze zjistit z počtu molekul, nacházejících se na základní a vibračně excitované hladině. Tento počet je dán Boltzmannovým rozdělením. Pro intenzity potom platí vztah:

$$\frac{I_a}{I_s} = \left(\frac{\nu_{vib} + \nu}{\nu_{vib} - \nu} \right)^4 \exp\left(\frac{-h\nu_{vib}}{kT} \right),$$

kde ν_{vib} značí vibrační frekvenci molekuly, ν frekvenci dopadajícího záření, I_a intenzitu Anti-Stokesova rozptylu a I_s intenzitu Stokesova rozptylu. Při pokojových teplotách je mnohem častější Stokesův rozptyl.

K tomu, aby byla látka ramanovsky aktivní, je třeba, aby se při průběhu rozptylu mohla měnit její polarizovatelnost. Tato veličina vyjadřuje, jak lehce může být elektronový mrak molekuly zdeformován vlivem vnějšího elektromagnetického pole. Toto pole indukuje v molekule dipólový moment P :

$$\vec{P} = \alpha \vec{E},$$

kde α je polarizovatelnost molekuly a \vec{E} intenzita vnějšího pole. Hodnota koeficientu α závisí na vzdálenosti valenčních elektronů od jádra a na delokalizaci elektronů. Jednotkou polarizovatelnosti je cm^2V^{-1} . Elektrické pole vyzařované zdrojem je časově závislé:

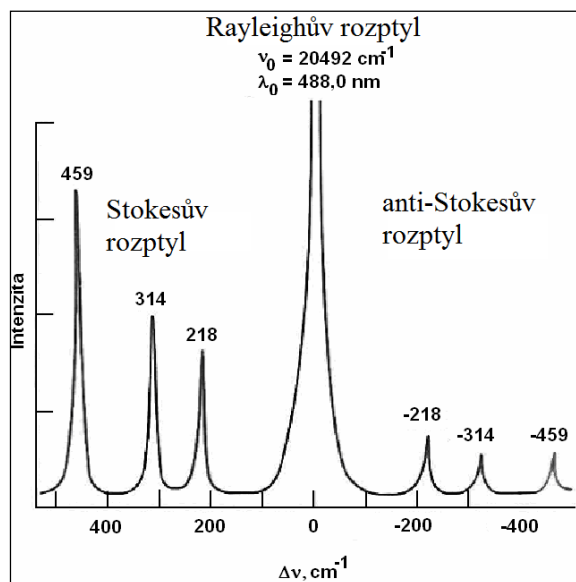
$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_e t),$$

kde \vec{E}_0 je amplituda elektrického pole a ν_e je frekvence záření.

Polarizovatelnost vibrující molekuly je tedy také časově závislá veličina:

$$\alpha = \alpha_0 + \alpha_{vib} \cos(2\pi\nu_{vib} t),$$

kde ν_{vib} je vibrační frekvence molekuly. Pro každou ramanovsky aktivní vibrační hladinu molekuly existuje spektrum ve Stokesově i v Anti - Stokesově oblasti. Většinou se měří pouze spektrum pro Stokesův rozptyl (je výraznější – viz obr. 40).

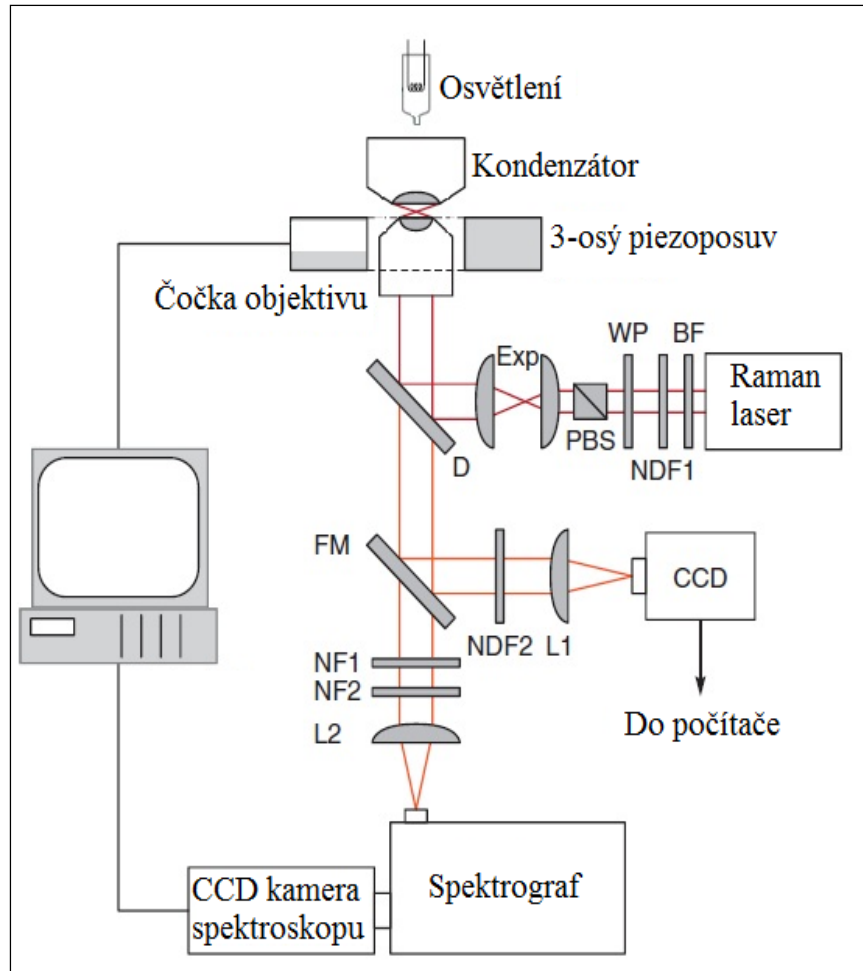


Obr. 40 Typické ramanovské spektrum CCl_4 , Ar^+ laser na 488 nm. Převzato a upraveno z [45]

Ramanovo spektrum představuje závislost intenzity rozptylu (osa y) na vlnočtu (jednotka cm^{-1}), který odpovídá rozdílu energií mezi rozptýleným a excitačním zářením. Vlastnost píku v ramanovském spektru je dána počtem vibrujících molekul ve vzorku, jejich prostorovým uspořádáním a polarizovatelností. Ze spekter spekter se dá provádět kvalitativní i kvantitativní analýza a pomocí časově závislých měření sledovat chemické procesy.

5.2 Popis aparatury pro ramanovskou spektroskopii

Popis a odůvodnění volby jednotlivých komponent používaných při RS nalezneme např. v [46]. Naše měření byla prováděna na nekomerčním zařízení zkonstruovaném na Ústavu přístrojové techniky v Brně. Schéma aparatury je znázorněno na obr. 41. Aparatura byla podobná, jako v [7], [8]



Obr.41 Schematický obrázek experimentální sestavy pro ramanovskou mikrospektroskopii umožňující analýzu jednotlivých buněk. BF - filtr propouštějící záření ramanovského laseru ($785 \pm 3\text{nm}$), D - dichroické zrcátko, EXP - optika pro rozšíření paprsku, FM - překlápěcí zrcátko, L1, L2 - čočky, NDF1, NDF2 - filtry s neutrální hustotou, NF1, NF2 - notch filtry, PBS - polarizační dělič svazku, WP - půlvlnná destička. Převzato a upraveno ze [7], [8]

K minimalizaci nechtěné fluorescence a poškození vzorku při experimentu má ramanovský laser vlnou délku v blízké infračervené oblasti. Svazek laseru (Ti:Sapphire, $\lambda=785\text{ nm}$, průměr svazku $0,6\text{ mm}$) nejdříve prošel přes filtr vlnových délek (BF filtr, propustný pro vlnovou délku $785 \pm 3\text{nm}$). Průměr svazku byl nejdříve 2x zvětšen optikou pro rozšíření paprsku a přiveden do objektivu přes dichroické zrcátko (LPD01-785RS, Semrock).

K nastavení energie laseru byly použity dva filtry s plynule proměnnou neutrální hustotou (Thorlabs), půlvlnná destička a polarizační dělič svazku. Maximální energie laserového svazku dopadajícího na vzorek byla cca 60 mW. K fokusaci excitačního svazku sloužila vodní imerzní čočka objektivu (Olympus UPLSAPO 60×, NA 1.20) optimalizovaná pro infračervenou oblast. Čočka byla uchycena k hliníkovému rámu s piezoposuvem ve třech osách (P-517.3CL, Physik Instrumente). Při experimentu byla kapka roztoku s řasou umístěna pod krycím sklíčkem. Jednotlivé buňky řasy byly chyceny do svazku ramanovského excitačního laseru.

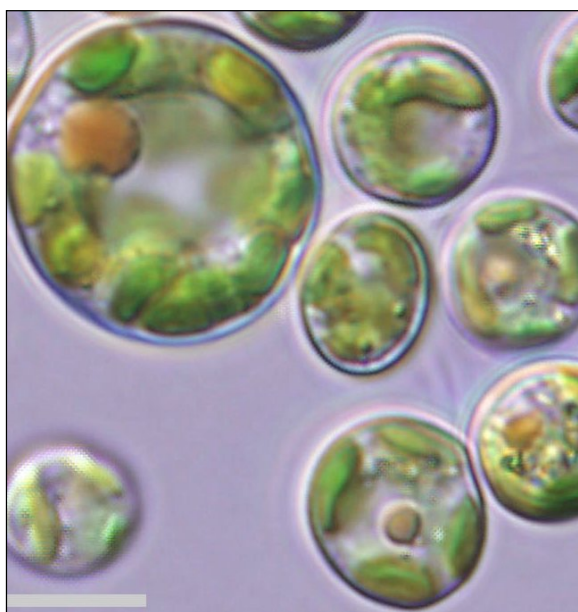
Rozptýlené světlo bylo sbíráno čočkou a fokusováno na štěrbinu spektrografu (ohnisková vzdálenost 300 mm, $f/3.9$; SpectraPro 2300i, PI Acton). K disperzi světla používá spektrograf difrakční mřížku 600 vrypů/mm. Pro odfiltrování pružně rozptýleného záření z excitačního laseru byly použity dva hranové filtry (ZX000626, Iridian). Světelné spektrum převádí do digitální podoby spektroskopická CCD kamera, která je chlazená kapalným dusíkem (Spec-10:100BR/LN, Princeton Instruments).

K zaznamenání spekter slouží kontrolní program (WinSpec). K odfiltrování pozadí se používá procedura naprogramovaná v prostředí MatLab.

6 Měření pomocí ramanovské spektroskopie

Jak bylo řečeno v úvodu, úkolem ramanovské spektroskopie při analýze řasy *Trachydiscus minutus* (obr. 42) bylo sledovat stav indikátorů životaschopnosti buňky, pokud je vystavená působení toxických látek.

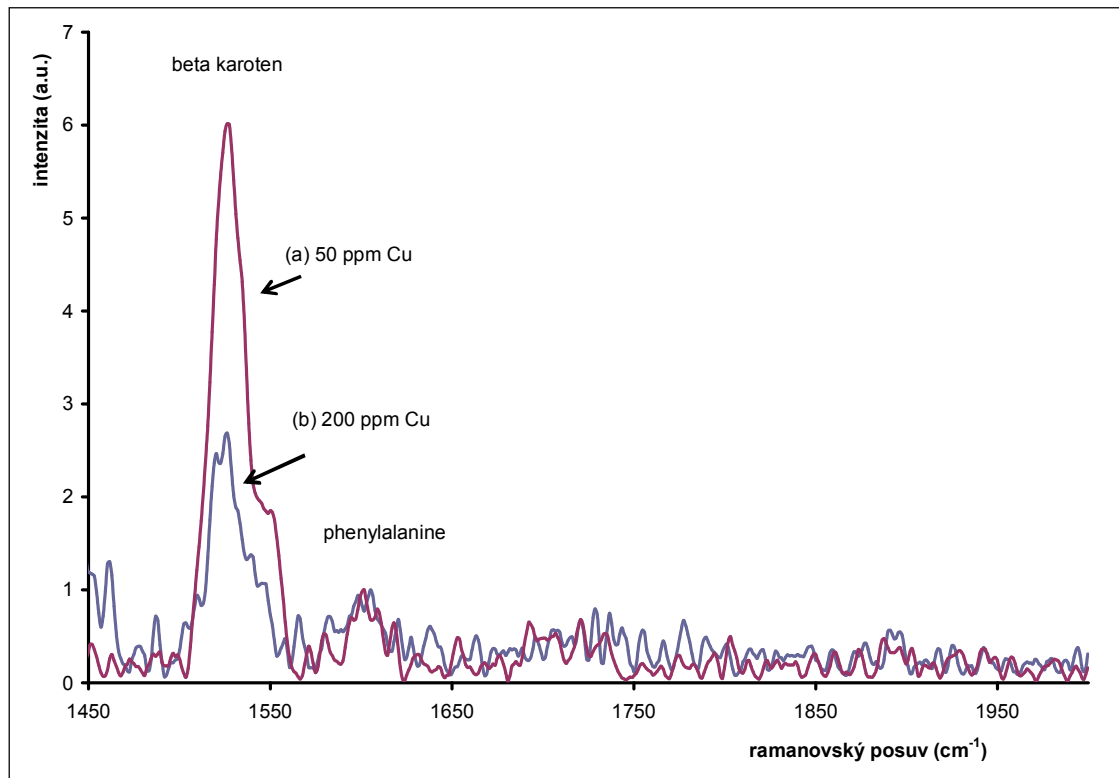
Vhodný kandidát pro bioremediaci musí splňovat základní podmínku – buňka musí být schopna do určité míry akumulovat jedovaté látky obsažené v kontaminovaném prostředí. K akumulaci přitom může docházet na povrchu i uvnitř buňky. Pomocí ramanovské spektroskopie lze zjistit, jestli při akumulaci toxických látek buňka mění chemické složení. Jedním z ukazatelů fyziologického stavu buňky je betakaroten. Při vyšších koncentracích toxických látek může buňka degradovat a umírat – množství betakarotenu uvnitř buňky se bude snižovat. Je tedy potřebné zjistit akumulční hranice u různých toxických prvků. V tomto ohledu Ramanova spektroskopie doplňuje metodu LIBS. Pomocí techniky LIBS je možné zjistit koncentrace toxických prvků v buňkách a ramanovskou spektroskopií jejich fyziologický stav.



Obr. 42 Mikroskopický snímek řasy *Trachydiscus minutus*. Měřítko v levém dolním rohu vymezuje 10 μm .

Trachydiscus minutus byl kultivován společně s přidáním množstvím CuSO_4 způsobem popsaným v kapitole 3. Pro měření byly vybrány tři koncentrace CuSO_4 v živném roztoku – 50, 100 a 200 ppm. Výsledky měření pro 50 a 200 ppm CuSO_4 jsou uvedeny

na obr. 43. Je zde patrný pokles intenzity u betakarotenu (1525 cm^{-1}) pro vyšší koncentraci Cu v živném roztoku. Tento pokles (zde vyjádřený poklesem intenzity ramanovské čáry) zřejmě naznačuje postupnou degradaci buňky následkem toxických dávek Cu, jímž byla buňka vystavena při kultivačním procesu.



Obr. 43 Vybraná část ramanovského spektra zobrazující intenzitu spektrální čáry betakarotenu (1525 cm^{-1}) pro dva vzorky řas. Vzorek (a) odpovídá koncentraci 50 mg/l CuSO_4 ; vzorek (b) koncentraci 200 mg/l CuSO_4 v kultivačním roztoku. Spektra byla normalizována na spektrální čáru phenylalaninu (1605 cm^{-1}). Phenylalanin je základní stavební látka buňek

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zkombinovat metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu a ramanovské spektroskopie při studiu řasy *Trachydiscus minutus*.

Pomocí měření LIBS byla provedena prvková analýza různě kontaminovaných řas, které byly ablatované z pevné (biofilm na papíru) a kapalné (laminární proudění přes trysku) fáze při použití jedno- i dvoupulzní techniky. Pro jednotlivé přístupy byly spčítány parametry plazmatu. Pro analýzu z proudu vody byl zkoumán problém tvorby dostatečně tenké vodní stěny a doposud používané trysky byly modifikovány tak, aby bylo měření konzistentní. Pro kvantitativní analýzu, která měla za úkol stanovit koncentraci mědi v buňkách řasy, byly sestaveny jednotlivé kalibrační křivky pomocí referenčních roztoků s obsahem CuSO_4 v rozsahu 5 - 1000 ppm. Pro kontrolu byly zkoumané vzorky analyzovány metodou emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Po vyhodnocení naměřených dat se ukázalo, že nejpřesnější metodou pro určování koncentrace mědi je ablace biofilmu dvojíým pulzem a pro tuto metodu byly spočteny teoretické detekční a kvantifikační limity.

Do budoucna by bylo žádoucí prozkoumat kalibrační závislost mědi pro rozsah 2 - 100 ppm, neboť v této oblasti vykazují kalibrační křivky nelineární závislost. Skutečný obsah mědi v řase stanovený metodou ICP-OES nebyl před měřeními LIBS znám, a proto bylo použito zbytečně velkého rozsahu koncentrací u referenčních roztoků. Následkem toho musely být kalibrační závislosti určeny pouze dvěma body, což má jistě dopad na směrodatnost výsledných hodnot. Nicméně kalibrační křivky z obr. 37 mohou být použity při studiu vzorků řasy, kontaminované při růstu neznámou koncentrací síranu měďnatého v rozsahu 5 - 200 ppm. V této oblasti obsah mědi v řase s rostoucí kontaminací prostředí lineárně narůstá, viz obr. 33.

Ramanovská měření prováděná na řase *Trachydiscus minutus* ukazují, že je možné určit obsah betakarotenu v daných buňkách vystavených toxickému stresu. Byla sledována reakce řas na různý obsah mědi v kultivačním roztoku (50, 100, 200 ppm) a jejich fyziologický stav. Experimenty ukazují, že pro vyšší koncentrace je dávka Cu již vysoce toxická – obsah betakarotenu v buňce prudce klesá. V dalších plánovaných pokusech je zapotřebí provést měření pro širší rozsah koncentrací mědi a to až do úplné buněčné degradace, a tímto určit akumulaci mez pro danou řasu.

Je také žádoucí vybrat další řasové kandidáty a provést srovnávací měření akumulčních schopností i pro další těžké kovy.

Na základech kombinovaného měření provedeného metodou LIBS a ramanovskou spektroskopií může být vybrán vhodný kandidát pro bioremedaci toxických látek z kapalného prostředí. Výsledky měření budou prezentovány na konferenci SPIE v září 2012 [47].

8 Literatura

- [1] KAISER, J., GALIOVÁ M.: Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 2009, Issue 64, p. 67-73
- [2] KAISER, J., GALIOVÁ M.: *Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Applied Physics* 2008, Issue 93, p. 917-922
- [3] KOPP, R., SCHERBAUM, F.J.: *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) as an analytical tool for the detection of metal ions in aqueous solutions*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1996, Issue 355, p. 16-20
- [4] SAMEK, O., BEDDOWS D.C.S.: *Application of laser-induced breakdown spectroscopy to in situ analysis of liquid samples*, *Optical Engineering* 2000, Issue 39, p. 2248-2262
- [5] NILESH, K.R., RAI, A.K.: *LIBS—An efficient approach for the determination of Cr in industrial wastewater*, *Journal of Hazardous Materials* 2008, Issue 150, p. 835–838
- [6] CÁRECES, J.O., TORNERO LOPÉZ, J.: *Quantitative analysis of trace metal ions in ice using laser-induced breakdown spectroscopy*, *Spectrochimica Acta Part B* 2009, Issue 56, p. 831-838
- [7] SAMEK, O., ZEMÁNEK, P.: *Characterization of oil-producing microalgae using Raman spectroscopy*, *Laser Physics Letters* 2011, No. 10, p. 701-709
- [8] SAMEK, O., JONÁŠ, A.: *Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo*, *Sensors* 2010, Issue 10, p. 8635-8651

-
- [9] CREMERS, D. A., RADZIEMSKI, L. J.: *Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy*, Wiley 2006
- [10] NOLL, R.: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Fundamentals and Applications*, Springer 2012
- [11] GAUDIUSO, R., DELL' AGLIO, M.: *Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Elemental Analysis in Environmental, Cultural Heritage and Space Applications: A Review of Methods and Results*, Sensors 2010, Issue 10, p. 7434-7468
- [12] NOVOTNÝ, K., KAISER, J.:K: *Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS)*, Československý časopis pro fyziku 2010, Vydání 60, str. 280-285
- [13] SAMEK, O., LIŠKA, M.: *Využití laserových ablací pro materiálovou analýzu: integrace LIFS a LIBS*, Jemná mechanika a optika 1998, Vydání 4, str. 123-129
- [14] MIZIOLEK, A., PALLESCHI, V., SCHECTER, I.: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) Fundamentals and Applications*, Cambridge University Press 2006
- [15] DE GIACOMO, A., DELL' AGLIO, M.: *From single pulse to double pulse ns-Laser Induced Breakdown Spectroscopy under water: Elemental analysis of aqueous solutions and submerged solid samples*, Spectrochimica Acta Part B 2007, Issue 62, p. 721-738
- [16] NOACK, J., VOGEL, A.: *Laser-Induced Plasma Formation in Water at Nanosecond to Femtosecond Time Scales: Calculation of Thresholds, Absorption Coefficients and Energy Density*, Journal of Quantum Electronics 1999, Vol. 35, p. 1156-1167
- [17] COLONNA, G., CASAVOLA, A.: *Modelling of LIBS plasma expansion*, Spectrochimica Acta Part B 2001, Issue 56, p. 567-586

-
- [18] RADZIEMSKI, L.J., CREMERS D.A.: *Laser-induced plasma and applications*, Marcel Dekker 1989
- [19] ARNOLD, N., GRUBER, J.: *Spherical expansion of the vapor plume into ambient gas: an analytical model*, Applied Physics 1999, Issue A69, p. 87-93
- [20] Dostupný z WWW:
<http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html>
Citováno 20. 5. 2012
- [21] CAPITELLI, M., CASAVOLA, A.: *Laser-induced plasma expansion: theoretical and experimental aspects*, Spectrochimica Acta Part B 2004, Issue 59, p. 271-289
- [22] CRISTOFORETTI, G., DE GIACOMO, A.: *Local Thermodynamic Equilibrium in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Beyond the McWhirter criterion*, Spectrochimica Acta Part B 2010, Issue 65, p. 86–95
- [23] CANIOU, J.: *Passive infrared detection*, Kluwer Academic Publishers 1999
- [24] CAPITELLI, F., CAPITELLI, M.: *Non-equilibrium and equilibrium problems in laser-induced plasmas*, Spectrochimica Acta Part B 2000, Issue 55, p. 559-574
- [25] SHERBINI, A.M., HEGAZY, H.: *Measurement of electron density utilizing the H_{α} -line from laser produced plasma in air*, Spectrochimica Acta Part B 2006, Issue 61, p. 532-539
- [26] GRIEM, H.: *Principles of Plasma Spectroscopy*, Cambridge University Press 1997
- [27] AGUILERA, J.A., ARAGÓN, C.: *Multi-element Saha-Boltzmann plots in laser-induced plasmas*, Spectrochimica Acta Part B 2007, Issue 62, p. 378-385

[28] Dostupný z WWW:

<<http://www.cfa.harvard.edu/amp/ampdata/kurucz23/sekur.html>>

Citováno 20. 5. 2012

[29] MARGETIC V., NIEMAX, K.: *A study of non-linear calibration graphs for brass with femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy*, Spectrochimica Acta Part B 2001, Issue 56, p. 1003-1010

[30] DAVIES, C.M., TELLE, H.H.: *Quantitative analysis using remote laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS)*, Spectrochimica Acta Part B 1995, Issue 50, p. 1059-1075

[31] POŘÍZKA, P.: *Srovnání kvantitativního měření ocelových standardů dvoupulzní a jednopulzní LIBS*, Vysoké učení technické v Brně 2010, Fakulta strojního inženýrství, 2010, 42 stran, vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jozef Kaiser, Ph.D.

[32] GIGOVA, L., IVANOVA N.: *Response of Trachydiscus Minutus (XANTHOPHYCEAE) to temperature and light*, Journal of Phycology 2012, Issue 48, p. 85-93

[33] ILIEV, I., PETKOV, G.: *The alga Trachydiscus Minutus (PSEUDOSTAURASTRUM MINUTUM): Growth and Composition*, General and Applied Plant Physiology 2010, Volume 36 (3-4), p. 222-231

[34] PŘIBYL, P., ELIÁŠ, M.: *Zoosporogenesis, morphology, ultrastructure, pigment composition and phylogenetic position of Trachydiscus Minutus (EUSTIGMATOPHYCEAE, HETEROKONTOPHYTA)*, Journal of Phycology 2012, Issue 48, p. 231-242

[35] PROCHÁZKA, D.: *Stanovení optimálních experimentálních parametrů pro laserovou spektrometrii (LIBS) vybraných vzorků rostlin*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008, 45 s, vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jozef Kaiser, Ph.D.

-
- [36] ARAGÓN, C., AGUILERA, J. A.: *Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods*, *Spectrochimica Acta Part B* 2008, Issue 63, p. 893-916
- [37] KONJEVIĆ, N., LESAGE, A.: *Experimental Stark Widths and Shifts for Spectral Lines of Neutral and Ionized Atoms*, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 2002, Vol. 31, No. 3, p. 819-927
- [38] LAZIC, V., BARBINI, R.: *Self-absorption model in quantitative laser induced breakdown spectroscopy measurements on soils and sediments*, *Spectrochimica Acta Part B* 2001, Issue 56, p. 807-820
- [39] MOHAMED, Y.W.F.: *Improved LIBS limit of detection of Be, Mg, Si, Mn, Fe and Cu in aluminum alloy samples using a portable Echelle spectrometer with ICCD camera*, *Optics & Laser Technology* 2008, Issue 40, p. 30-38
- [40] LONG, G.L., WINEFORDNER, J.D.: *Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition*, *Analytical Chemistry* 1983, Volume 55, No. 7, p. 712-724
- [41] RAIZER, Y.P., *Soviet Physics-Uspekhi* 1966, Issue 8, p. 650
- [42] YAROSHCHYK, P., MORRISON R.J.S.: *Theoretical modeling of optimal focusing conditions using laser-induced breakdown spectroscopy in liquid jets*, *Applied Spectroscopy* 2004, Vol. 58, No. 11, p. 1353-1359
- [43] KUMAR, A., YUEH, F.Y.: *Double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy with liquid jets of different thicknesses*, *Applied Optics* 2003, Vol. 42, No. 30, p. 6047-6051
- [44] FERRARO, J.R., NAKAMOTO, K.: *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press 1994

-
- [45] MADĚRÁNKOVÁ, D.: *Analýza biologicky významných látek*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií 2008, 89 s, vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Roleček
- [46] SMITH, E., DENT, G.: *Modern Raman Spectroscopy-A Practical Approach*, Wiley 2005
- [47] XVIII CZECH-POLISH-SLOVAK OPTICAL CONFERENCE, September 3-7, 2012, Ostravice, Czech Republic