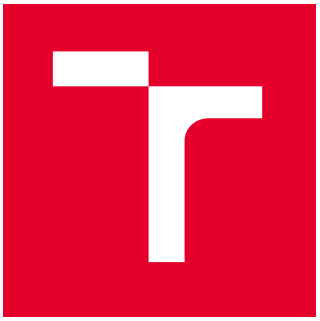


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

APLIKACE KOVOVÝCH TENKÝCH VRSTEV JAKO VNITŘNÍHO STANDARDU PRO ANALÝZY BIOLOGICKÝCH TKÁNÍ METODOU LIBS

APPLICATION OF METAL THIN FILMS AS AN INTERNAL STANDARD FOR LIBS ANALYSIS OF BIOLOGICAL TISSUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Šimon Juračka**

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Hana Kopřivová**

SUPERVISOR

BRNO 2024

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

Zadání bakalářské práce

Ústav:	Ústav fyzikálního inženýrství
Student:	**Šimon Juračka**
Studijní program:	Fyzikální inženýrství a nanotechnologie
Studijní obor:	bez specializace
Vedoucí práce:	**Ing. Hana Kopřivová**
Akademický rok:	2023/24

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 bakalářské práce:

Aplikace kovových tenkých vrstev jako vnitřního standardu pro analýzy biologických tkání metodou LIBS

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) je kvazi–destruktivní optická emisní analytická metoda s rozsáhlými možnostmi prvkové analýzy. Tato technika je známá svou rychlostí analýz v rozsahu kHz, schopností analyzovat několik prvků současně a schopností mapovat povrch vzorku s rozlišením v rozsahu mikrometrů.
V posledních letech se tato metoda široce uplatňuje v semikvantitativních analýzách biologických měkkých tkání, kde jsou výsledkem analýz mapy prostorových distribucí biogenních prvků. Momentálně nejpoužívanějším standardem pro potlačení matričního jevu u biologických matric analyzovaných pomocí techniky LIBS je uhlík (C I 247 nm). Bylo však zjištěno, že standardizace podle prvku přítomného jak v matrici, tak v materiálu, v němž je vzorek uložen, není optimální. Proto je nutné zavést novou metodiku pro vnitřní standard, který není přítomen v analyzované matrici. Z tohoto důvodu se bakalářská práce bude zabývat optimalizací tenkých vrstev kovů na biologických měkkých tkáních, zejména zlata, s ohledem na LIBS analýzu. Součástí práce bude i srovnání reálných vzorků lidských nádorů kůže s kovovou vrstvou a bez kovové vrstvy.

Cíle bakalářské práce:

1) Literární rešerše současné literatury na dané téma.
2) Optimalizace tloušťky tenké kovové vrstvy pro analýzu metodou LIBS na biologické měkké matrici.
3) Aplikace tenkých kovových vrstev při analýze nádorových tkání.
4) Zpracování a vyhodnocení získaných dat.

Seznam doporučené literatury:

GALBÁCS, Gábor (ed.). Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences. Cham: Springer International Publishing, 2022. ISBN 978-3-031-14501-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-031-14502-5.

MELIKECHI, Noureddine. Optical Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnostics. WORLD SCIENTIFIC, 2023. ISBN 978-981-12-5895-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1142/12907.

LIMBECK, A.; BRUNNBAUER, L.; LOHNINGER, H.; POŘÍZKA, P.; MODLITBOVÁ, P. et al. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. Analytica Chimica Acta. 2021, roč. 1147, s. 72-98. ISSN 00032670. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.054.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2023/24

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc. ředitel ústavu	doc. Ing. Jiří Hlinka, Ph.D. děkan fakulty

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá nalezením nového vnitřního standardu pro analýzu LIBS biologických měkkých tkání a optimalizací parametrů pro tento typ analýz. Cílem této práce je vytvořit novou metodu standardizace, která by dokázala výrazně elimininovat vlivy matričního efektu, a v této souvislosti by tak nahradila uhlík, jenž se pro tento účel používá. Nový vnitřní standard bude vybrán z pětice kovů, které budou naneseny na povrchu vzorků myších jater. Optimalizace parametrů bude provedena pomocí implementace částí Bayesovské optimalizace, přičemž oba experimenty jsou v ohledech LIBS analýz dosud téměř nevyzkoušeny a v budoucnu by mohly přinést zajímavé podklady pro navazující výzkum nejen v oblasti biozobrazování.

Abstract

This bachelor thesis deals with finding a new internal standard for LIBS analysis of biological soft tissues and optimizing parameters for this type of analysis. The aim of this thesis is to develop a new standardisation method that can significantly eliminate matrix effects, thus replacing the carbon used for this purpose. The new internal standard will be selected from five metals that will be deposited on the surface of mouse liver samples. The optimization of the parameters will be performed by implementing parts of Bayesian optimization. Both experiments are still almost untested in terms of LIBS analyses and could provide interesting grounds for future follow-up research not only in the field of bioimaging.

Klíčová slova

spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS), měkké tkáně, Bayesovská optimalizace, standardizace

Keywords

laser – induced breakdown spectroscopy (LIBS), soft tissues, Bayesian optimization, standardization

Citace

JURAČKA, Šimon. *Aplikace kovových tenkých vrstev jako vnitřního standardu pro analýzy biologických tkání metodou LIBS* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-24]. Dostupné z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/157998. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce Hana Kopřivová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně s využitím odborné literatury, vědeckých článků a dalších zdrojů, které jsem na konci této práce řádně citoval.

……....

Šimon Juračka

Poděkování

Tímto bych rád velice poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Haně Kopřivové za její čas, odborné vedení a cenné rady, které mně byly poskytovány během psaní bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jakubovi Vrábelovi za poskytnutí konzultací a pomoci při zpracování bakalářské práce.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1 Spektroskopie 8
2.1.1 Optická emisní spektroskopie 8
2.2 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu 9
2.2.1 Historie a vývoj metody LIBS 9
2.2.2 Princip metody LIBS 9
2.2.3 Laserem buzené plazma 10
2.2.4 Instrumentace 11
2.2.5 Možnosti analýzy 14
2.2.6 Srovnání metody LIBS s ostatními spektroskopickými metodami 15
2.2.7 Bayesovská optimalizace 15
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 18
3.1 Optimalizace LIBS na měkkých tkáních 18
3.2 Analýza metodou LA-ICP-MS s použitím vnitřního standardu 19
3.3 Bayesovská optimalizace při LIBS analýze 21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 24
4.1 Příprava vzorků 24
4.1.1 Vzorky myších jater zalité v parafínu 24
4.2 Pokrytí vzorků kovovou vrstvou 24
4.3 Analýza vzorků pomocí techniky LIBS 25
4.3.1 Popis měřicí sestavy 25
4.3.2 Postup měření 26
4.3.3 Zpracovávání dat z LIBS analýzy 26
4.4 Optimalizace parametrů 28
5 VÝSLEDKY A DISKUZE 31
5.1 Výběr kovu jako nového vnitřního standardu 31
5.1.1 Analýza SNR spektrálních čar kovů a statistika rozprášení 32
5.1.2 Analýza SNR pro spektrální čáry biogenních prvků a stabilita signálu 35
5.2 Optimální parametry získané z optimalizace 39
6 ZÁVĚR 43
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 45

1 ÚVOD

Jednou z aplikací metody LIBS je analýza měkkých biologických tkání. Hlavní úloha tkví ve vizualizaci struktury tkáně z hlediska jednotlivých biogenních prvků a ve vytvoření prostorových map zobrazujících rozložení těchto prvků v měkké tkáni. Tímto způsobem lze rozlišovat různé vzorky biologických tkání, například zdravou lidskou tkáň od té, která byla zasažena nádorovým onemocněním. Biozobrazování by tudíž mohlo vést k zavedení zcela nového diagnostického aparátu. V této souvislosti je při analýze přítomen vnitřní standard, tj. tenká vrstva prvku na povrchu vzorku, jehož podstatou je potlačení tzv. matričního jevu, který výrazně ovlivňuje získaný signál při měření. Důležitým nástrojem při analýze LIBS měkkých tkání je také optimalizace parametrů. Ta může při správném nastavení celý proces významně urychlit. Zefektivnit tak nejen samotné měření, ale rovněž zpracování výsledků.

Tato bakalářská práce se zabývá nalezením nového vnitřního standardu, jenž by výrazně pomohl snížit projevy matričního efektu. K tomuto účelu byla vybrána pětice kovů, které se v měkké biologické tkáni přirozeně nevyskytují anebo pouze ve spotovém množství, které není možné pomocí techniky LIBS detekovat. Tyto kovy byly naneseny na povrch myších jater zalitých v parafínu k provedení příslušných experimentů. Optimalizace parametrů byla provedena pomocí Bayesovské optimalizace, která je v oblasti analýzy LIBS dosud téměř nevyzkoušenou disciplínou. Nově vybraný vnitřní standard, jenž vzejde ze série experimentů, a optimalizované parametry mohou být využity při další analýze měkkých tkání (např. nádorů lidské kůže).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Spektroskopie

Spektroskopii lze definovat jako vědeckou disciplínu, která se zabývá zkoumáním absorpce a emise elektromagnetického záření při interakci světla a látky. Později byla tato definice navíc rozšířena o studium vzájemného působení mezi částicemi jako jsou elektrony, protony nebo ionty a jejich interakci s ostatními částicemi [1].

Spektroskopie sehrála velmi důležitou roli při rozvoji několika fundamentálních fyzikálních oblastí vzniklých ve 20. století. Můžeme mezi ně zařadit kvantovou mechaniku, Einsteinovu speciální a obecnou teorii relativity a kvantovou elektrodynamiku. S jejími aplikacemi se můžeme setkat i ve forenzním inženýrství, kontrole kvality nebo astronomii [1,2].

Základy analytické spektroskopie položil objev německého fyzika Gustava R. Kirchhoffa, který odhalil, že každá chemicky čistá látka má své vlastní charakteristické spektrum. Před ním provedl sérii pokusů s hranolovým spektroskopem další německý fyzik Joseph von Fraunhofer. Fraunhofer, vycházející z experimentů britského vědce Williama Wollastona, na základě pozorování elektromagnetického záření Slunce objevil, že spektrum nepřechází hladce z jedné barvy do druhé. Obsahuje ale mnoho tmavých čar, což značí, že světlo chybí při určitých vlnových délkách kvůli absorpci. Tyto tmavé čáry byly později označeny jako absorpční spektrum [1,2].

Záření může být při kontaktu s látkou buď absorbováno, vyzařováno nebo rozptýleno, proto lze dělení spektroskopických metod rozdělit do tří hlavních kategorií. Mezi tyto kategorie patří spektroskopie emisní, spektroskopie absorpční a spektroskopie rozptylová [3]. Do základních spektroskopických metod dále patří rentgenová absorpční spektroskopie, Ramanova spektroskopie, infračervená spektroskopie, atomová spektroskopie a řada dalších. Tyto metody se mezi sebou především liší způsobem, jakým interagují s látkou a rozsahem elektromagnetického spektra [4].

2.1.1 Optická emisní spektroskopie

Mezi spolehlivé a rozsáhle využívané analytické spektroskopické metody můžeme zařadit optickou emisní spektroskopii, zkráceně OES (z anglického *Optical Emission Specrometry*), [5]. Tato technika se využívá v metalurgii, při analýze vzácných prvků, systémech využívajících plazma v průmyslovém prostředí, analýze lidských vlasů a nehtů a v mnoha dalších oblastech [6].

Princip této metody je založen na detekci fotonů vzniklých přechody valenčních elektronů z vyšších energetických stavů na stavy s nižší energií. K excitaci valenčních elektronů atomu dochází při dodání energie do systému, např. při použití tepelného záření. Zdrojem elektromagnetického záření jsou emitované atomy nebo ionty v excitovaném stavu, přičemž toto záření vzniká jejich deexcitací. Vzniklé emisní spektrum má čárový charakter, neboli při daných vlnových délkách jsou zaznamenávány spektrální čáry příslušné jednotlivým přechodům. Zároveň platí, že počet čar ve spektru roste s počtem elektronů na valenčních hladinách. Tyto spektrální čáry jsou nezbytným nástrojem pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Jejich poloha ve spektru (vlnová délka emitovaného záření) charakterizují prvky přítomné ve vzorku a jejich intenzita udává koncentraci prvku v daném vzorku. Nejintenzivnější čáry ve spektru jsou rezonanční, které odpovídají přechodům do základního

stavu [7]. Elektromagnetické spektrum, se kterým technika OES pracuje, zahrnuje část ultrafialového záření a viditelné spektrum. V rámci vlnových délek to odpovídá rozmezí přibližně 130 až 800 nm [8].

2.2 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu, zkr. LIBS (z anglického *Laser–Induced Breakdown Spectroscopy)*, je metodou atomové emisní spektroskopie. Tato kvazi-destruktivní analytická technika funguje na principu rozboru elektromagnetického záření, které je emitováno mikroplazmatem vzniklého při interakci zkoumané látky s laserovým paprskem [9]. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu nabízí širokou škálu potenciálních aplikací díky svým jedinečným vlastnostem, jako je bezkontaktní analýza, rychlost analýzy nebo minimální či žádná příprava vzorku [10]. Je to univerzální a výkonná metoda, která je schopna poskytovat data o elementárním složení prakticky jakéhokoliv materiálu téměř bez destruktivního vlivu [11].

2.2.1 Historie a vývoj metody LIBS

Vznik metody LIBS se úzce pojí s vynálezem a zdokonalením laseru v druhé polovině 20. století, přestože teoretické základy principu laseru stanovil konceptem stimulované emise Albert Einstein již v roce 1917. Laserem buzené plazma bylo pozorováno krátce po sestrojení prvního rubínového laseru v roce 1960. V 70. a 80. letech minulého století se začalo rozvíjet množství aplikací LIBS zejména pro terénní a laboratorní praktiky. Objevuje se rovněž první použití této techniky v souvislosti s výzkumem vesmíru, kdy měla poskytnout chemické analýzy kosmických objektů jako jsou asteroidy, komety atd. Paralelně s rozšiřováním pole působnosti se začala rozvíjet i instrumentace, která byla zpočátku vyvíjena pro konkrétní aplikace jednotlivých laboratoří pracujících v této oblasti. Posléze vznikají už i komerčně dostupné LIBS nástroje určené k specifickému použití, jak je známe dnes [12].

2.2.2 Princip metody LIBS

Při analýze pevného materiálu je laserový pulz fokusován na povrch pevného vzorku, u kapalných vzorků je paprsek laseru zaostřen do objemu vzorku. Aby mohlo dojít k interakci mezi laserem a zkoumanou látkou, kdy tato interakce vede ke vzniku mikroplazmatu, musí být dosaženo dostatečně velkého výkonu použitého záření. Výkon takového laseru na ozářenou plochu se pohybuje přibližně v jednotkách GW/cm^2. Ultrafialová a viditelná část spektra ze záření emitovaného mikroplazmatem je posléze spektrálně rozlišena a zaznamenána pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vzorku. V případě konvenčních LIBS přístrojů je délka pulsu laseru v řádu několika nanosekund [13,14].

Jakmile laserový pulz dopadne na povrch vzorku, dochází k rapidnímu zvýšení teploty materiálu v ohniskovém bodě v důsledku absorpce fotonů. Za méně než jednu nanosekundu teplota dosáhne bodu varu a inicializuje se vypuštění páry vzorku, drobných fragmentů a částic. Celý tento proces je rovněž znám jako laserová ablace. Obecně vzato odpařování materiálu a formování mikroplazmatu probíhá během počáteční fáze laserového pulzu, zatímco zbytek energie laseru je absorbován odpařovaným materiálem, výsledkem čehož je vytvoření zářivého plazmatu. Při dostatečně vysoké hustotě energie laseru každý laserový pulz odpaří nebo ablatuje malé množství materiálu, čímž vytvoří plazmatický oblak. Tento ablační oblak je zformován takovou rychlostí, že se setkává s koncem laserového pulsu, proto laser nadále ohřívá ablatovanou část materiálu, což vede k velmi vysokým teplotám, které mohou přesáhnout

hranici 20 000 K. Tato teplota je dostatečně vysoká k tomu, aby vyvolala termální atomizaci, excitaci a ionizaci materiálu nacházejícího se v ablačním oblaku. Během velmi krátké doby (v řádech několika nanosekund) se tak oblak změní v plazma. Toto mikroplazma poté začne emitovat silné záření, které je charakteristické pro jeho chemické složení, přičemž zkoumání emisního spektra umožňuje využití tohoto procesu pro analytické účely ve spektroskopii [13,14].

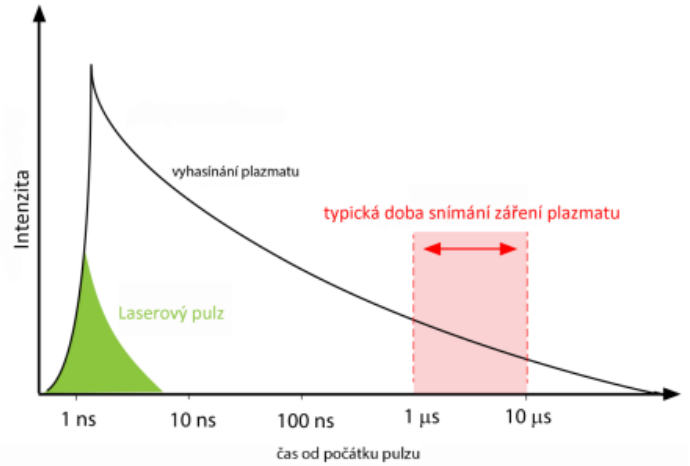
Po ukončení laserového pulzu se plazma začne rychle ochlazovat v důsledku absence dodávané energie. Toto plazma o vysokém tlaku se pak dále rozšiřuje do okolního prostředí (obvykle vzduchu), což vyvolá vznik tlakové vlny šířící se do okolí. Tato interakce s okolním prostředím rovněž přispívá k rychlému rozpadu plazmatu. Typická doba trvání plazmatu vyvolaného laserovým paprskem se pohybuje přibližně mezi 100 ns a několika desítkami μs v závislosti na experimentálních podmínkách. Během fáze ochlazování a expanze ablačního oblaku dochází ke kondenzaci materiálu a opětovnému dopadu na vzorek ve formě mikro – a nano kapek nebo částic, pokud měření není prováděno ve vakuu. U pevného vzorku tento proces zanechá na povrchu malý kráter s průměrem větším, než je bod dopadu laseru a s hloubkou měřitelnou v řádech μm [13].

2.2.3 Laserem buzené plazma

Plazma často bývá označeno jako čtvrté skupenství hmoty [15]. Lze ho definovat jako soubor nabitých i neutrálních částic v různých kvantových stavech, o němž platí, že jeho prostorový náboj je přibližně roven nule. Tuto vlastnost označujeme jako kvazineutralita. Částicemi v této definici se rozumí nejen elementární částice, jako jsou např. elektrony, ale i ionty, neutrální atomy, molekuly [16].

Interakce mezi laserovým paprskem a materiálem je složitý proces závislý na mnoha charakteristikách jak laseru, tak i dané látky [17]. Na počátku této posloupnosti událostí stojí rozpad materiálu, kdy dochází k lokálnímu ohřevu a vzniku vysokotlaké páry, zatímco je vytvořena rázová vlna šířící se nadzvukovou rychlostí, jakmile se pára šíří do okolí. Evoluce plazmatu od tohoto okamžiku může záviset na řadě faktorů, například na intenzitě záření laseru ($W.m^{-2}$), složení páry, složení či tlaku atmosféry obklopující vzorek či vlnové délce laseru. Rozpad látky, který nastává v počáteční fázi po zásahu laserovým pulzem (až v řádech několika ps), je docílen, když hustota volných nosičů (elektronů) dosáhne hodnoty přibližně 10^{18} cm^{-3}. Existence takového množství volných elektronů poskytuje vysokou absorbanci v plazmatu, což umožňuje jeho rozšíření ve směru paprsku, jenž jej udržuje po zbytek trvání laserového pulzu. Po tom, co je vytvořeno emitující plazma, ztrácí ablační oblak na rychlosti šíření v důsledku srážek s okolním plynem a zpomaluje se na rychlost blízké rychlosti zvuku. Plazma se poté ochladí samoabsorpcí a rekombinací mezi elektrony a ionty. Typický čas, který uplyne od zahájení procesu formování plazmatu krátce po dopadu laserového pulzu na povrch vzorku, až po jeho zánik, se pohybuje od několika desetin mikrosekund do několika milisekund [18].

Časový vývoj plazmatu je dalším důležitým parametrem metody LIBS, jelikož vlastnosti plazmatu buzeného laserem se v čase rychle mění. Těsně po interakci laserového paprsku s povrchem materiálu je plazma vysoce ionizováno. V záření plazmatu kvůli tomu převládá kontinuální záření vyvolané především brzdným zářením a rekombinací. Po přibližně stovkách ns začnou v plazmatu převažovat procesy relaxace excitovaných atomů a iontů. Ve spektru dochází k výskytu ostrých spektrálních čar. Tyto dvě fáze se v průběhu časového vývoje života plazmatu vzájemně překrývají [19], [20], [21].



Obrázek č. 1: Průběh celkové intenzity záření plazmatu v závislosti na čase [22].

2.2.4 Instrumentace

Standardní LIBS aparatura sestává z několika základních součástí. Těmito součástmi rozumíme především pulzní laser, zaostřovací optiku, sběrnou optiku a spektrometr obsahující detektor synchronizovaný s laserovým pulzem. Ačkoliv je sestava typického LIBS zařízení relativně jednoduchá, jsou kladeny vysoké nároky na provozní parametry jednotlivých komponent. Rozvoj LIBS a jeho aplikací je silně závislý na pokroku v oblasti vývoje pulzních laserů, spektrometrů a detektorů. K vytvoření plazmatu na většině vzorků jsou nezbytné takové pulzní lasery, které jsou schopné dosáhnout vysoké hustoty výkonu. Rozsah vlnových délek se pohybuje od ultrafialového záření po infračervené záření, trvání pulsu od femtosekund po nanosekundy, a energie pulsu je běžně v rozmezí jednotek µJ až po stovky mJ [19, 23].

Laser

Laser (z anglického *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*) je zařízení, které stimuluje atomy nebo molekuly k vyzáření světla o určité vlnové délce, přičemž toto světlo zesiluje. Obvykle produkuje velmi úzký paprsek záření [24]. Každé takovéto zařízení se skládá ze tří základních součástí. Těmi jsou laserové médium, zdroj energie a optický rezonátor [25]. Unikátní vlastnosti laserového světla našly s postupem času širokou škálu praktických aplikací, mezi které můžeme zařadit průmyslové odvětví, jako jsou telekomunikace, výroba, medicína a fotonika. Typy laserů lze kategorizovat mnoha různými způsoby; například z hlediska spektrálního rozsahu (UV, IČ, VIS), časového režimu (kontinuální, pulzní, kvazikontinuální), čerpání energie (opticky, elektricky, chemicky, termodynamicky) nebo aktivního prostředí (pevnolátkové, kapalinové, plynné či plazmové) [26].

Pulzní laser

Pulzní laser je typ laseru, jenž nevyzařuje světlo jako souvislý proud, ale ve formě krátkých světelných pulzů s vysokým výkonem [27]. Většinou se délka těchto pulzů pohybuje v rozmezí 0,5 až 500 ns v případě nanosekundových pulzů. Toto nastavení je velmi užitečné pro experimenty, které jsou sledovány s vysokým rozlišením v čase, zejména pak pro širokou škálu výrobních procesů souvisejících s ablací. Tyto lasery jsou velmi výkonné, což umožňuje ablativní zpracování materiálů [28]. V praxi se nejčastěji používají nanosekundové Nd: YAG lasery, které ve svém základním uspořádání emitují záření o vlnové délce 1064 nm [19]. K ablaci jsou také často využívány excimerové lasery [28]. Vlnová délka laseru ovlivňuje hloubku průniku do materiálu a současně hloubku ablace v daném místě (v závislosti na typu

materiálu). Hloubka pronikání do určitých materiálu (např. u kovů to neplatí) je větší při použití laseru s vyšší vlnovou délkou, tudíž při použití laseru s vlnovou délkou 1064 nm lze očekávat hlubší pronikání do vzorku než při použití kratších vlnových délek, jako je třeba 532 nm, 355 nm nebo 266 nm, což jsou další typicky aplikované vlnové délky. Jedná se zároveň o druhou, třetí a čtvrtou harmonickou frekvenci. Harmonické frekvence udávají celočíselné násobky základní frekvence, která v tomto případě odpovídá vlnové délce 1064 nm. To také naznačuje, že hmotnost materiálu ablatovaného za jeden pulz se zvyšuje s rostoucí vlnovou délkou pulzního laseru. Vlnová délka laseru navíc silně ovlivňuje množství a velikost vyprodukovaných nanočástic [29].

Optický systém

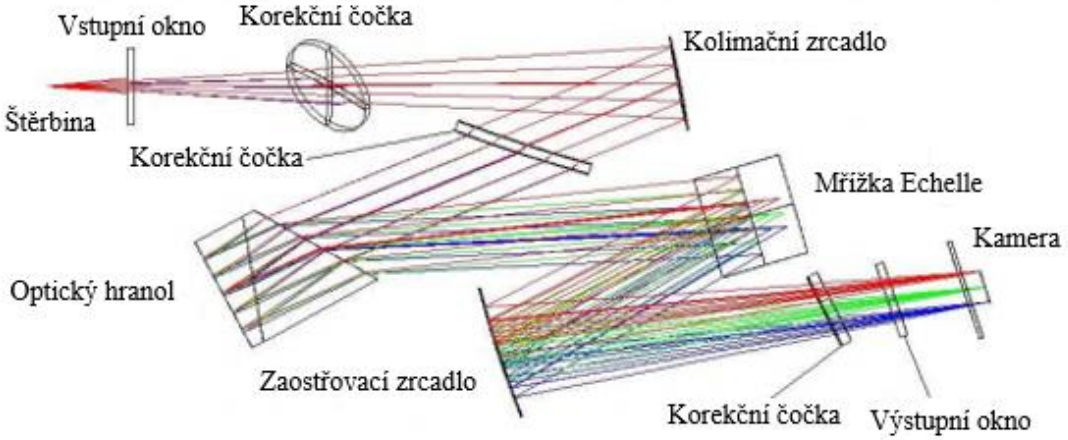
Optický podsystém LIBS zařízení má dvě hlavní části. Tou první je zaostřovací optika, jejímž účelem je navést laserový paprsek na vzorek a zaostřit ho na dostatečně malý bod tak, aby se zvýšila intenzita záření na úroveň potřebnou pro laserovou ablaci [13]. Fokusovací optika u nejzákladnějších LIBS systémů zahrnuje jedinou čočku s pevnou ohniskovou vzdáleností, přičemž paprsek dopadá na povrch vzorku kolmo. Běžné je také použití mikroskopických objektivů s malým zvětšením, dlouhou pracovní vzdáleností a vysokou odolností proti poškození [30]. S různými typy objektivů se lze setkat u sofistikovanějších systémů, kde tyto objektivy umožňují homogenizaci laserového paprsku nebo možnost volby průměru ozařované plochy. Ve speciálních případech může být použito i optické vlákno pro vedení laserového pulzu ke vzorku [19].

Druhou částí optického subsystému rozumíme sběrnou optiku. Tato nezbytná součást LIBS aparatury slouží k efektivnímu transportu emitovaného záření mikroplazmatu na štěrbinu spektrometru. V jednoduchých systémech lze tento transport provést pomocí jednoduché čočky [19]. Vzhledem k tomu, že světelná emise plazmatu není orientovaná, musí být shromážděna pod co největším pevným úhlem, což znamená, že jsou obvykle používány relativně velké sběrné čočky nebo zrcadla [13]. Existují dvě standardní geometrie sběru světla. Jednou z nich je koaxiální s dopadajícím laserovým paprskem, přičemž tento sběr světla je kompaktnější a je vhodnější pro analýzy s rozlišením hloubky, ale je také náchylnější k samoabsorpci, což může vést ke zhoršení linearity kalibračních křivek. Druhou metodou je sběr světla pod bočním úhlem 45°. Použití velkého sběrného úhlu vede ke zvyšování citlivosti. Tento typ sběru světla je sice ekonomičtějším a v jistých ohledech flexibilnějším řešením, ale na druhou stranu trpí větším rozptylem signálu způsobeným nestabilitou polohy plazmového materiálu [30]. Sbírané světlo, které je již kolimované zrcadlem, lze pak zaostřit na vstupní štěrbinu spektrometru, přičemž je vhodné použít reflexní optický prvek, aby se zabránilo chromatické aberaci. I v tomto případě mohou být využita optická vlákna, což je velmi praktické z hlediska sestavení systému, ale jejich použití přináší další značné ztráty citlivosti, zejména pak v UV oblasti [31].

Spektrometry

Důležitou složkou detekčního uspořádání je spektrometr. Ten slouží k rozložení nashromážděného emisního záření na vlnové délky. Toto záření je pak zaznamenáno jako intenzitní spektrum, které představuje unikátní chemickou charakteristiku každého materiálu [32]. V systémech LIBS jsou již po mnoho let intenzivně využívány spektrometry založené na různých uspořádáních difrakčních mřížek, čoček a zrcadel, jako jsou klasické spektrometry Czerny-Turner nebo polychromátory typu Paschen-Runge. V posledních letech se začíná stále

více využívat druh spektrometru, který je již od 90. let 20. století používán v jiných technikách atomové emisní spektroskopie, nazývaný spektrometr Echelle [18]. Nejrozšířenějším konvenčním spektrometrem se stal monochromátor Czerny-Turner, který poskytuje informace o relativně úzkých spektrálních intervalech v závislosti na délce optické dráhy a typu difrakční mřížky. Naproti tomu spektrometry typu Echelle nabízí lepší spektrální rozlišení ve srovnání s ostatními spektrometry, avšak mají malé clonové číslo, což vede k použití optických zesilovačů k získání čitelného signálu na snímači. Tyto zesilovače zvyšují náklady a složitost přístroje, ale zároveň umožňují získávat signál za velmi krátkou dobu (v řádech nanosekund) [33].



Obrázek č. 2: Uspořádání spektrometru Echelle typu Mechelle 5000 [34].

Detektory

Detektory zaznamenávají intenzitu světla v závislosti na vlnové délce, což umožňuje vytvoření charakteristického spektra pro analyzovanou matrici. Jejich schopnost rozlišovat různé vlnové délky je nezbytná pro analýzu emisních čar řady chemických prvků v materiálu [33]. V počátečních fázích byla jako detektor používána fotografická destička, což mělo výhodu širokého rozsahu vlnových délek s relativně nízkými náklady, ale nevýhodu v časové náročnosti a nízké reprodukovatelnosti. Fotografický detekční systém byl postupně nahrazen detektory pro spektrálně rozlišenou emisi, jako jsou fotomultiplikační trubice (PMT), fotodiodová pole (PDA) nebo polovodičové CCD detektory. Právě tyto detektory získávají v posledních letech značnou popularitu [17].

CCD senzory (z anglického *Charge-Coupled Device*) fungují na základním principu převodu světelné energie na elektrickou. Toto zařízení detekuje fotony, přeměňuje je na fotoelektrony a přesouvá elektrický náboj. CCD na bázi křemíku poskytují nízkou úroveň šumu a vysokou citlivost na energii dopadajícího záření v US, VIS a NIR oblasti [35, 36, 31]. Specifickým případem senzoru CCD je ICCD (z anglického *Intensified Charge-Coupled Device*) nebo EMCCD (z anglického *Electron-Multiplying Charge-Coupled Device*). Tyto dva detektory jsou schopny zvyšovat počet elektronů a poskytují vysokou citlivost [37].

V neposlední řadě mohou být použity CMOS senzory (z anglického *Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*), které nabízí levnější výrobu, nízkou spotřebu energie, nižší napájecí napětí a jednodušší elektronický systém [35].

2.2.5 Možnosti analýzy

Metoda LIBS je uznávanou analytickou technikou v oblasti atomové spektroskopie a je ceněna pro svoje rozsáhlé analytické a technické vlastnosti. Tato rychlá, všestranná a bezkontaktní technika je schopna poskytovat jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu pro prakticky jakýkoliv vzorek (jinak tomu je např. u biologických tkání, kde je kvantitativní analýza velmi obtížně proveditelná) [30]. Hlavními přednostmi, které z LIBS činí velmi výkonný a atraktivní nástroj, jsou analýza materiálu v reálném čase v laboratoři nebo v místě výskytu daného vzorku či jevu (měření *in situ*) a simultánní detekce většího množství prvků. Oproti konvenčním technikám má horší detekční limity a její přesnost je nižší. Je rovněž nutné dodržovat bezpečností opatření týkajících se ochrany zraku proti vysokoenergiovým pulzům laseru [38].

Kvalitativní analýza

Pomocí kvalitativní analýzy lze klasifikovat a rozlišovat prvkové složení různých typů materiálů. Protože je sada emisních čar jedinečná pro každý prvek, spektrum plazmatu zobrazuje elementární složení vzorku a může být použito pro jeho určení [39]. Nicméně pro mnoho aplikací není znalost celkového elementárního složení postačující. U heterogenních vzorků může být navíc užitečná informace o prostorovém rozložení prvků. Z LIBS se stala velmi užitečná technika pro studium prvkového zobrazování, jelikož tato metoda umožňuje spojit získané informace o složení s prostorovými souřadnicemi zkoumaného vzorku [30]. Proto našla využití pro mapování prvkového složení v mnoha odvětvích jako je výzkum rostlin [40], dentální aplikace [41], analýza zvířecích tkání [42], členění hornin a minerálů [43] nebo archeologie [44]. Při mapování prvkového rozložení pomocí metody LIBS je klíčové použití motorizovaného stolku, na který je vzorek uložen, přičemž tento stolek zajišťuje posunutí vzorku mezi jednotlivými laserovými pulzy o konstantní velikost (krok). Toto posunutí je možné provést v osách x, y, a z, pokud je uskutečňována analýza i s ohledem na hloubku. Prostorové rozlišení se pohybuje v řádech μm, proto musí být dosaženo poměrně vysoké opakovací frekvence laseru (řádově v desítkách Hz) [30].

Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza stanovuje koncentrace jednotlivých chemických prvků v analyzovaném vzorku. Zatímco kvalitativní analýza dokáže rozpoznat přítomnost určitých prvků na základě jejich charakteristických spektrálních čar, kvantitativní analýza poskytuje informace o koncentraci těchto prvků [45]. Kvantitativní aspekty metody LIBS lze obecně považovat za její mírnou slabinu, především pak kvůli složité povaze interakcí laseru se vzorkem, která závisí jak na charakteristikách laseru, tak na vlastnostech materiálu vzorku [46]. I přesto však tato technika prokázala, že dokáže provádět kvantitativní analýzu na úrovni požadované pro specifický analytický úkol. Takže hlavní překážkou nemusí být to, že LIBS nedokáže dostatečně provádět kvantitativní analýzu, ale spíše to, jak udělat z LIBS metodu tak přesnou a spolehlivou jako ostatní spektroskopické metody [47]. Kvantitativní analýzu v rámci LIBS lze provést na základě použití kalibračních křivek, známe-li relativní intenzity spektrálních čar určitého prvku nebo bezkalibrační metodou známou jako CF-LIBS (z anglického *calibration-free LIBS*) [48].

2.2.6 Srovnání metody LIBS s ostatními spektroskopickými metodami

Během posledních několika desetiletí bylo vyvinuto mnoho analytických technik, mezi které patří optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES, z anglického *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*), atomová absorpční spektroskopie (AAS, z anglického *Atomic Absorption Spectroscopy*), rentgenová fluorescenční spektroskopie (XRF, z anglického *X-ray fluorescence*) nebo energiově disperzní rentgenová spektroskopie (EDX, z anglického *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*). Všechny tyto spektroskopické metody jsou využívány k analýze složení různých materiálů ve vzorku [49].

Tabulka č.1: Srovnání parametrů spektroskopických technik s uvedením jejich výhod a nevýhod, převzato z [49].

Spektroskopická metoda	**Příprava vzorku**	**Mez detekce**	**Přesnost**	**Výhody**	**Nevýhody**
AAS	Vyžadována atomizace a rozpuštění vzorku	0,003 – 20 ppm	1–2 %	Vysoká přesnost, dobrá mez detekce	Komplexní příprava vzorku, časově náročné
ICP-AES	Vyžadováno rozpuštění vzorku	10 ppb	1–5 %	Vysoká přesnost, dobrá mez detekce	Komplexní příprava vzorku, výskyt spektrální interference
XRF	Není vyžadována příprava vzorku	ppm - %	3–23 %	Není vyžadována příprava vzorku, rychlá detekce	Nízká přesnost, horší mez detekce
EDX	Žádná/malá příprava vzorku	1000–3000 ppm	Až 95 %	Jednoduchá příprava vzorku, vysoká přesnost	Výskyt matričního jevu, překrývání spektrálních čar
LIBS	Žádná/malá příprava vzorku	ppm - %	5–20 %	Žádná/malá příprava vzorku, rychlá detekce a měření *in situ*	Nízká přesnost, horší mez detekce

2.2.7 Bayesovská optimalizace

Úlohy spojené s optimalizací jsou široce zastoupeny v mnoha vědeckých a průmyslových odvětvích, jako jsou umělá inteligence, bioinformatika, softwarové inženýrství, plánování, výroba a ekonomika. Optimalizaci lze zjednodušeně popsat jako sekvenci rozhodnutí. V každé iteraci musíme totiž zvolit, kde provedeme další pozorování, a poté na základě výsledku

rozhodnout, zda ukončíme výpočet či nikoliv. Protože jsou výsledky těchto rozhodnutí ovlivňovány studovaným systémem, úspěch optimalizace tkví v efektivním rozhodování. Velká část aplikací vyžaduje optimalizaci účelových funkcí, které jsou zatíženy šumem, jsou výpočtově náročné, nelze je analyticky vyjádřit nebo vůbec neznáme jejich tvar. Pro tento účel byla vytvořena řada optimalizačních algoritmů, jež ovšem obvykle vyžadují velký počet iterací. Bayesovská optimalizační metoda naproti tomu dokáže výpočetní čas podstatně zkrátit, přičemž používá pravděpodobnostní přístup k sestrojení tzv. surrogate modelu (aproximativní model nahrazující skutečnou účelovou funkci) předem neznámých funkcí [50], [51]. Je speciálním případem nelineární optimalizace, kde algoritmus rozhoduje, který bod zkoumat jako další na základě analýzy distribuce funkcí, například Gaussovského procesu nebo jiného surrogate modelu. Rozhodování se provádí na základě určitého kritéria nazvaného jako akviziční funkce [52]. Úlohou akviziční funkce je hledání optima, přičemž platí, že vysoká hodnota akvizice odpovídá potenciálně vysokým hodnotám účelové funkce, ať už proto, že predikce je významná, nebo je velká nejistota, nebo obojí. Maximalizace akviziční funkce se používá k výběru dalšího bodu, ve kterém bude funkce vyhodnocena. Název Bayesovy optimalizační metody je odvozen od slavné Bayesovy věty, podle níž je aposteriorní hustota modelu (ale i teorie či hypotézy) M za podmínky pozorování E úměrná pravděpodobnosti pozorování E za předpokladu modelu M (též označováno jako věrohodnostní funkce) násobenou apriorní hustotou modelu M [53].

$$P(M|E) \propto P(E|M)P(M) \tag{2.1}$$

Ve vzorci (2.1) $P(M|E)$ představuje aposteriorní hustotu pravděpodobnosti, $P(E|M)$ pravděpodobnostní model (věrohodnostní funkci) a $P(M)$ apriorní hustotu pravděpodobnosti.

Nechť $f: \chi \to \mathbb{R}$ je funkce na kompaktní podmnožině $\chi \subseteq \mathbb{R}^d$. Řešíme následující optimalizační problém, přičemž funkci f nazveme účelovou funkcí a hledáme její globální maximum [54].

$$\boldsymbol{x}^* = arg\max_{x \in \chi} f(\boldsymbol{x}) \tag{2.2}$$

První omezení spočívá v tom, že oproti běžnějšímu využití minimalizace, se budeme zabývat formou problému vyžadující maximalizaci. Tu u reálné funkce lze vyjádřit jako minimalizaci transformované funkce [53].

$$g(x) = -f(x) \tag{2.3}$$

Rovněž předpokládáme, že účelová funkce splňuje podmínku Lipschitzovské spojitosti. To znamená, že existuje konstanta C taková, že $\forall x_1, x_2 \in \chi$ platí:

$$\|f(x_1) - f(x_2)\| \leq C\|x_1 - x_2\| \tag{2.4}$$

kde konstanta C je obvykle neznámá a $\|\cdot\|$ je norma v euklidovském prostoru. Lipschitzovská spojitost zajišťuje hladkost a předvídatelnost účelové funkce, což umožnuje efektivní modelování optimalizačního procesu [53].

Účelem Bayesovské optimalizace je vytvoření pravděpodobnostního modelu pro účelovou funkci. Pravděpodobnostní model nejprve odhadneme pomocí apriorního rozdělení. V každém kroku optimalizace na základě získaných hodnot funkce f aktualizujeme toto apriorní rozdělení pomocí Bayesova vztahu, čímž obdržíme aposteriorní rozdělení, které kvantifikuje náš aktualizovaný odhad o neznámé účelové funkci. Jestliže označíme vstupy a spočítané hodnoty funkce f jako $D_{1:t} = \{\boldsymbol{x}_{1:t}, y_{1:t}\}$, kde index 1:t představuje posloupnost všech bodů od prvního

až po t-tý, apriorní hustota pravděpodobnosti $P(f)$ spojená s věrohodnostní funkcí $P(D_{1:t}|f)$ nám pomůže definovat aposteriorní hustotu pro funkci f s využitím Bayesovy věty v následujícím tvaru [55, 56].

$$P(f|D_{1:t}) \propto P(D_{1:t}|f)P(f) \tag{2.5}$$

Gaussovské procesy jsou nejčastěji používané pravděpodobnostní surrogate modely pro aproximaci skutečných objektivních funkcí v bayesovské optimalizaci. Jsou definované funkcí středních hodnot $\mu(\cdot)$ a kovarianční funkcí $\kappa(\cdot,\cdot)$ [55]. Za předpokladu konečné sady vstupů $x_{1:t}$, kde $x_i \in \mathbb{R}^d$, obdržíme výraz:

$$f(\boldsymbol{x}_{1:t})|\boldsymbol{\theta} \sim N\left(\boldsymbol{m}(\boldsymbol{x}_{1:t}), \boldsymbol{K}^{\theta}(\boldsymbol{x}_{1:t}, \boldsymbol{x}_{1:t})\right) \tag{2.6}$$

kde $\boldsymbol{K}^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}_{1:t}, \boldsymbol{x}_{1:t})_{i,j} = k^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}_i, \boldsymbol{x}_j)$ značí kovarianční matici (s parametrem $\boldsymbol{\theta}$) a $\boldsymbol{m}(\boldsymbol{x}_{1:t})_i = m(\boldsymbol{x}_i)$ vektor středních hodnot. Nejčastěji používanými kovariančními funkcemi (rovněž kovarianční jádro neboli *kernel*) jsou čtvercový exponenciální (Gaussovský) kernel (z anglického *Squared Exponential Kernel*) a Matérn kernel. U těchto kernelů je třeba specifikovat parametry, jako je délková škála nebo rozptyl. Jestliže x a x' představují vstupy dvou bodů, pak lze čtvercový exponenciální kernel definovat pomocí vztahu:

$$k_{SE}^{\theta}(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{x'}) = \sigma_f^2 \, exp\left(-\frac{(x - x')^2}{2l^2}\right) \tag{2.7}$$

kde l je délková škála a σ_f^2 celkový rozptyl [54].

Předpokládáme, že pozorování funkce v libovolném bodě x_t jsou zkreslena šumem σ-sub-gaussovského typu, tj. $y_t = f(x_t) + \varepsilon_t$. Teoretické výsledky se zabývají tímto obecným typem šumu, který zahrnuje symetrický gaussovský a Bernoulliho šum. Nicméně pro názornější vysvětlení se zaměříme na snadno zvladatelný případ gaussovského šumu $\varepsilon_t \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ [50, 51].

Na základě vstupních parametrů $D_t = \{x_{1:t}, y_{1:t}\}$ je sdružené rozdělení pozorovaných hodnot y a predikovaných hodnot $f(x)$ po zavedení šumu σ_ε^2 dáno:

$$\begin{bmatrix} \boldsymbol{y}_{1:t} \\ f(\boldsymbol{x}) \end{bmatrix} \Big| \, \boldsymbol{\theta} \sim N\left(0, \begin{bmatrix} \boldsymbol{K}_t^{\boldsymbol{\theta}} + \sigma_\varepsilon^2 \boldsymbol{I} & \boldsymbol{k}_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}) \\ \boldsymbol{k}_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x})^T & \kappa^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{x}) \end{bmatrix}\right) \tag{2.8}$$

kde $\boldsymbol{K}_t^{\boldsymbol{\theta}} = \boldsymbol{K}^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}_{1:t}, \boldsymbol{x}_{1:t})$ a $\boldsymbol{k}_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}) = \boldsymbol{k}^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}_{1:t}, \boldsymbol{x})$ [55]. Rovněž platí, že pro libovolný vstupní bod $\boldsymbol{x}$ je prediktivní aposteriorní rozdělení normální (Gaussovské) a je plně určeno střední hodnotou a kovariancí, přičemž $f(\boldsymbol{x})|D_t, \boldsymbol{\theta} \sim N(\mu_t(\boldsymbol{x}; \boldsymbol{\theta}), \sigma_t(\boldsymbol{x}; \boldsymbol{\theta}))^2$, kde

$$\mu_t(\boldsymbol{x}; \boldsymbol{\theta}) = E[f(\boldsymbol{x})|D_t] = \boldsymbol{k}_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x})^T \left(\boldsymbol{K}_t^{\boldsymbol{\theta}} + \sigma_\varepsilon^2 \boldsymbol{I}\right)^{-1} \boldsymbol{y}_{1:t} \tag{2.9}$$

$$K_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{x'}) = E[f(\boldsymbol{x}) f(\boldsymbol{x'})|D_t] = \kappa^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{x'}) - \boldsymbol{k}_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x})^T \left(\boldsymbol{K}_t^{\boldsymbol{\theta}} + \sigma_\varepsilon^2 \boldsymbol{I}\right)^{-1} \boldsymbol{k}_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x'}) \tag{2.10}$$

$$\sigma_t(\boldsymbol{x}; \boldsymbol{\theta})^2 = K_t^{\boldsymbol{\theta}}(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{x}) \tag{2.11}$$

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu se v průběhu let stala účinnou metodou detekce prvků, která se rychle rozvíjí pro použití v různých aplikacích, včetně biomedicínského odvětví. Tato technika v sobě ukrývá značný potenciál pro analýzu molekulárně složitých klinických vzorků, jako jsou měkké tkáně člověka, a může se tak stát mocným nástrojem při diagnostice rakoviny nebo laserové chirurgii [57]. Změny ve výskytu prvků nebo změny jejich koncentrací v měkkých tkáních jsou běžně vyhodnocovány a přinášejí nové poznatky v biologickém výzkumu. Nicméně je nezbytné zmínit skutečnost, že proces laserové ablace u biologických tkání představuje složitý problém často vyžadující náročnou optimalizaci, kterou může být například přidání vhodného vnitřního standardu na povrch vzorku [58]. Účelem této kapitoly je přiblížení dané problematiky pomocí již existujících vědeckých studií, jež se měřením měkkých tkání a optimalizací u systému LIBS či LA-ICP-MS zabývaly.

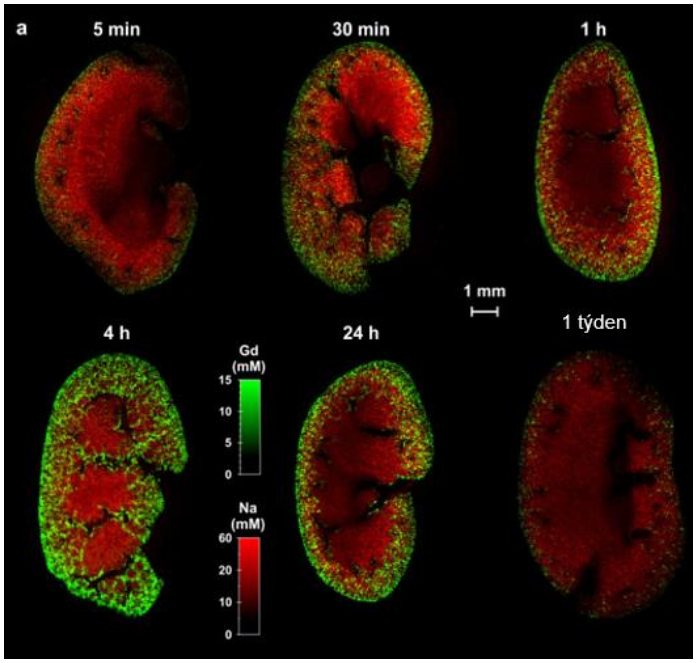
3.1 Optimalizace LIBS na měkkých tkáních

Vědecká studie publikovaná A. Šindelářovou a kol. popisuje metodiku při analýze měkkých tkání technikou spektroskopie laserem buzeného plazmatu. Práce byla zaměřena na optimalizaci systému LIBS pro měření měkkých tkání, přičemž jako vzorky byly použity myší ledviny zalité v parafínu. Jako vnitřní standard na povrchu měkkých tkání zde byl aplikován roztok zinku (10 µl; 1,53 mmol/l). Experimentální aparatura pro LIBS analýzu sestávala Nd: YAG laseru s použitou vlnovou délkou 532 nm, trváním jednoho laserového pulzu 10 ns a skenovací rychlostí 20 Hz. Veškerá měření byla prováděna s plynovým ofukem (argon nebo vzduch). Prostorové rozlišení bylo nastaveno na 100 µm. V experimentu byl využit spektrometr typu Czerny-Turner a detekce se uskutečňovala pomocí sCMOS detektoru. Pro porovnání naměřených dat byla použita metoda SNR (z anglického *Signal-to-noise ratio*), tedy poměr signálu a šumu. Signál byl vybrán jako maximální intenzita zkoumané spektrální čáry ve vybraném rozsahu a šum byl určen jako standardní odchylka všech bodů v rozsahu pozadí. Mezi parametry příslušející optimalizaci se objevila energie laserového pulzu (10 mJ až 30 mJ, s krokem 10 mJ), doba zpoždění sběru signálu (250 ns až 3000 ns), míra zaostření laseru (-300 µm až 300 µm, s krokem 150 µm) a vliv závislosti na atmosféře. Analýza získaných dat umožnila porovnávat jednotlivé úpravy experimentálních parametrů prostřednictvím změn signál-šum (SNR) pro vybrané zinkové spektrální čáry. Výzkum ukázal, že vliv těchto parametrů na detekci analytů je v případě vzorku myších ledvin významný [58].

Mezi výzkumné týmy zabývající se potencionálním využitím LIBS jako nástroje pro biozobrazování biologických tkání, patří skupina kolem francouzského vědce Vincenta Motto-Rose. Ve studii pod vedením L. Sancey je popsán výzkum myších ledvin zalitých v epoxidové pryskyřici, přičemž prvkové rozložení bylo mapováno s rozlišením 10 µm a detekčním limitem v řádu ppm pro analýzu organických nanočástic. K vyvolání laserové ablace sloužil Nd: YAG laser s vlnovou délkou 266 nm, s trváním laserového pulzu 5 ns a skenovací frekvencí 10 Hz. K zaostření paprsku posloužil objektiv s 15x zvětšením. Pro detekci signálu byl využit spektrometr typu Czerny-Turner vybavený ICCD kamerou. Experimenty byly prováděny v proudu argonu pro zlepšení poměru signál/šum. Nejprve bylo optimalizováno nastavení laseru vzhledem k energii laserových pulzů a vlastnostem zaostření laseru. Podle očekávání se velikost kráterů zvětšovala s rostoucí energií laseru, na rozdíl od hodnot SNR, které dosáhly maxima pro energie v rozsahu 0,7 mJ až 1,7 mJ. Příliš nízká energie nedokázala poskytnout dostatečnou energii k excitaci, zatímco příliš vysoká energie způsobila zvýšení úrovně

kontinuální emise, což představuje další zdroj šumu. Velikost kráterů a odpovídající intenzity spekter se ukázaly stabilní pro zaostření laseru v polohách ±25 µm na obou stranách povrchu vzorku [59].

Studie byla zaměřena výhradně na detekci čtyř chemických prvků. Dva byly obsaženy přímo v měkké tkáni (Fe, Na), zatímco prvky gadolinium (Gd) a křemík (Si) byly myším podávány intravenózně ve formě nanočástic. Měření byla provedena po různých časových intervalech podání nanočástic myším. Pro vyhodnocení kinetiky eliminace nanočástic z ledvin byly vzorky sbírány v různých časových intervalech po podání (od 5 minut do 1 týdne) a byly snímány pro Gd a Na. Sodík byl homogenně distribuován po celé ledvině nezávisle na uplynulém čase od podání nanočástic. Ukázalo se, že nanočástice dosáhly ledvin velice rychle, protože signál gadolinia bylo možné detekovat již pět minut po nitrožilním podání. Proces eliminace se projevoval vzrůstajícím signálem gadolinia, který dosáhl maxima čtyři hodiny po podání, následovaný postupným poklesem. Po týdnu byla většina signálu eliminována, což značí efektivní eliminaci částic z těla [59].



Obrázek č. 3: Mapa prostorové akumulace Gd (zelená) a Na (červená) s postupujícím časem od podání nanočástic při analýze LIBS. Převzato z [59].

3.2 Analýza metodou LA-ICP-MS s použitím vnitřního standardu

Laserová ablace (z anglického *Laser Ablation*, LA) v kombinaci s hmotnostní spektroskopií indukčně vázaného plazmatu (z anglického *Inductively coupled plasma mass spektrometry*, ICP-MS) je analytická technika pro přímou prvkovou analýzu pevných vzorků. Tato metoda umožňuje provádět mikroanalýzu, hloubkovou profilovou analýzu nebo 2D mapování chemických prvků. Mezi další výhodné vlastnosti patří minimální příprava vzorků, získání informací o izotopovém zastoupení a možnost analýzy jak vodivých, tak nevodivých materiálů. Tato metoda se sice řadí mezi techniky využívající k analýze laserovou ablaci, ovšem oproti spektroskopii laserem buzeného plazmatu pracuje na jiném principu. Jelikož však u metody LIBS nebyla analýza měkkých tkání s kovovými vrstvami na povrchu dosud provedena, věnuje se tato část rešerše použití vnitřního standardu právě u metody LA-ICP-MS i kvůli její podobnosti s technikou LIBS [60].

V hmotnostní spektroskopii indukčně vázaného plazmatu (ICP-MS) se vnitřní standardizace používá ke korekci nestabilit přístroje a fluktuací signálu způsobených změnami v matrici vzorku nebo jinými interakcemi, které nejsou spojené se spektrálními vlastnostmi analytu. Standardizace by tedy měla přinést zlepšení přesnosti měření za předpokladu, že je vnitřní standard správně vybrán. Volbou vhodných vnitřních standardů se zabývala experimentální práce F. Vanhaeckeho a kol. Pro studium volby vnitřního standardu s ohledem na adekvátní korekci nespektrálních interferencí bylo vybráno několik syntetických matric (kyselá matrice, organická matrice, matrice s vysokým obsahem rozpuštěných látek) a jedna přírodní matrice obsahující mořskou vodu. Do těchto matric byla přidána řada prvků o dané koncentraci (100 µg/l) rozložených po celém hmotnostním rozsahu. Vzniklý roztok každé zkoumané matrice byl srovnáván s roztokem obsahujícím tytéž prvky o stejné koncentraci v kyselině dusičné, která sloužila jako referenční matrice. Měření probíhalo v režimu hmotnostního skenování dat. Rovněž byl proveden postup, při kterém byly sledovány signály dvou prvků, jež jsou monitorovány v párech. Jeden prvek byl vybrán a považován za analytický pro celý průběh experimentu a byl pozorován společně s každým zkoumaným vnitřním standardem [61].

Důkladné pozorování matricového efektu prokázalo jak potlačení signálu, tak jeho zvýšení. Ukázalo se, že pro všechny typy pozorovaných matric závisí potlačení nebo zvýšení signálu na nukleonovém čísle sledovaného nuklidu, přičemž lehčí nuklidy byly potlačeny více než ty těžké. Přesná korekce je možná pouze tehdy, pokud je vybraný vnitřní standard s ohledem na nukleonové číslo co nejbližší sledovaným prvkům. Jestliže jsou prvky rozptýleny v širokém rozsahu atomových hmotností, nelze si vystačit s jedním vnitřním standardem, ale musí být použity různé. Pro posouzení využití vnitřního standardu jako nástroje pro zlepšení měření byl použit postup, kde byl jeden prvek určen jako analytický, zatímco ostatní prvky byly postupně vybrány jako vnitřní standard. Pro každý vnitřní standard byl vypočten poměr vybraný prvek/vnitřní standard a byly spočteny jak standardní odchylky (SD), tak relativní standardní odchylky (RSD). Tento postup byl aplikován pro každý prvek zvolený jako vnitřní standard a získaná RSD byla porovnána s RSD signálu vybraného prvku, aby se ověřilo, zda použití vnitřního standardu přináší zlepšení. Výsledky ukázaly, že při použití režimu hromadného skenování hmotností je hmotnost vnitřního standardu zásadní. Čím blíže je hmotnost vnitřního standardu k hmotnosti vybraného prvku, tím větší je zlepšení přesnosti měření [61].

Studie publikovaná I. Konzovou a kol. představuje vývoj nové metodologie korekce s použitím vnitřního standardu pro kvalitativní prvkové zobrazování pomocí techniky LA-ICP-MS s využitím tkáňových řezů jako modelu. Výzkum byl založen na depozici tenké homogenní vrstvy zlata na povrch tkáně a použití signálu ^{197}Au jako vnitřního standardu pro normalizaci. Jako modelová tkáň byl použit strukturně složitý biologický vzorek, konkrétně řez lidského oka zalitého v parafínu. Bylo zkoumáno rozložení izotopů kovů (^{24}Mg, ^{56}Fe, ^{63}Cu) ve strukturách přední části oka. Jelikož je základním požadavkem pro spolehlivou LA-ICP-MS analýzu kompletní ablace matrice vzorku, musela být zvolena optimální tloušťka řezu lidské tkáně. Proto byly zkoumány různé tloušťky řezů v rozmezí 10 µm až 160 µm. Krátery vzniklé na vzorcích po analýze byly následně vizualizovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií generující 3D obrazy povrchu vzorků. Z výsledků bylo patrné, že kompletní ablaci materiálu lze dosáhnout pouze v případě řezů s tloušťkou menší než 20 µm. Na základě tohoto zjištění byly všechny experimenty provedeny s tkáňovými řezy o tloušťce 15 µm. Aby bylo experimentálně prokázáno, že při optimalizovaných parametrech je intenzita signálu měřená pro izotop zlata ^{197}Au stabilní, došlo k analýze skleněného referenčního materiálu (NIST-612) pokrytého tenkým filmem zlata. Intenzity signálů pro cílové prvky a vnitřní standard byly

vykresleny jako funkce času a jako poměr cílových prvků ku ^{197}Au. Relativní standardní odchylka byla určena na méně než 20 %, přičemž se mírně lišila v závislosti na analyzovaném prvku a na nastavení hmotnostního spektrometru [62].

Pro experiment byla vybrána oblast vzorku o velikosti přibližně 10 mm^2 obsahující různé tkáňové struktury, jež se liší morfologií, molekulárním složení, obsahem vody či obsahem pevných látek. Kromě použití vnitřního standardu ^{197}Au byla rovněž provedena korekce pomocí izotopu uhlíku ^{13}C. Když byly získané signální intenzity korigovány odpovídající intenzitou signálu ^{13}C, vyskytl se značný úbytek v rozlišení struktury. Porovnáním map rozložení chemických prvků získaných po použití ^{13}C jako vnitřního standardu pro normalizaci signálu s těmi získanými po korekci ^{197}Au bylo zjištěno, že sledované izotopy ^{24}Mg, ^{56}Fe, ^{63}Cu jsou v tkáni distribuovány odlišně v závislosti na volbě vnitřního standardu. Později bylo ověřeno, že změny pozorované v intenzitách signálů při použití ^{197}Au nebyly způsobeny akumulací zlata v různých oblastech očních tkání, ale změnami v samotném procesu ablace, jenž závisí na složení vzorku u každé struktury. Analytický potenciál přístupu s použitím ^{197}Au jako vnitřního standardu byl otestován vůči vzorkům, které žádnou vrstvou pokryty nebyly. Ty vykazovaly velké rozdíly v absolutních intenzitách signálů, naopak při použití zlata jako vnitřního standardu došlo k významnému poklesu rozdílů v relativních intenzitách signálů [62].

Další z vědeckých týmů, zabývajících se aplikací zlata jako vnitřního standardu, je skupina pod vedením A. Limbecka z Technické univerzity ve Vídni. Ve své práci popisuje použití zlata jako vnitřního standardu pro využití v kvantitativních zobrazovacích experimentech. Experiment byl prováděn na vzorcích natištěných na různých organických matricích, jež mohou sloužit jako vhodná alternativa k tkáňovým řezům nebo jiným biologickým materiálům. Tisk vzorků proběhl na třech různých typech papíru, kterými byly kancelářský papír, lesklý inkoustový papír a průsvitný film pro inkoustový tisk. Energie laseru (s vlnovou délkou 213 nm) byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo úplné ablace materiálu. Pro spolehlivé použití musela být deponovaná vrstva zlata homogenně rozložena na povrchu vzorku. Aby bylo zajištěno, že depozice zlata je nezávislá na různých matricích, bylo zlato napařováno na fotopapír a průsvitný film. Po uskutečnění potřebné analýzy výsledky naznačovaly, že rozložení zlata je homogenní na různých matricích, což z něj činí vhodnou volbu pro vnitřní standard z hlediska depozice materiálu [63].

Studie došla k závěru, že tenké vrstvy zlata jsou vhodným interním standardem pro zobrazovací experimenty na vzorcích, které jsou podobné biologickým preparátům z hlediska materiálových vlastností. Metoda standardizace zlatem se po důkladném testování ukázala být cenným nástrojem pro zlepšení výsledků v zobrazovacích experimentech s LA-ICP-MS. Bylo prokázáno, že normalizace pomocí zlata umožňuje kompenzovat chyby způsobené přístrojem během měřicí doby, snižuje rozdíly v signálech způsobené matricí nebo usnadňuje porovnání experimentů provedených v různých časech. Jelikož standardizace tenkými vrstvami zlata rovněž kompenzuje rozdíly v absorpci související s matricí, odpadá nutnost využití vnitřních standardů, jež se vyznačují podobnými chemickými vlastnostmi jako analyzované vzorky. Tato metoda nejen zvyšuje spolehlivost výsledků, ale také snižuje náročnost při přípravě vnitřních standardů [63].

3.3 Bayesovská optimalizace při LIBS analýze

Bayesovskou optimalizaci založenou na Gaussovských procesech (GPR) při LIBS analýze jako první aplikoval T. Sato a kol. Studie se zabývala optimalizací podmínek laserové ablace pro

LIBS měření. Konkrétně se jednalo o optimalizaci podmínek pro vysoce citlivou detekci povrchové kontaminace, přičemž pro optimalizaci byly využity tři experimentální parametry – energie laserového pulsu, výška motorizovaného stolku (výška, ve které je umístěn vzorek, jenž je ablatován laserovým paprskem) a výška detekce (výška, ve které je umístěn detekční systém). Jako cílová proměnná byla definována reciproká hodnota limitu detekce (LOD, z anglického *Limit of detection*). Práce popisuje využití hliníkových slitin jako substrátu, na kterém byl rozprášen křemíkový olej zředěný n-hexanem. Experimentální uspořádání sestávalo z Nd: YAG laseru s vlnovou délkou 266 nm, délkou laserového pulzu 8 ns a skenovací rychlostí 5-8 Hz. Pro proces Bayesovské optimalizace posloužil CMOS spektrometr, pro konečné vyhodnocení limitu detekce byl namísto něj použit detekční systém složený z dvoukanálového spektrometru a kamery ICCD [64].

Jako vstup pro optimalizaci byly použity hodnoty výšky detekce od -2,0 do 2,0 mm s 0,5 mm krokem, hodnoty energie pulsu 2,5 mJ až 8,0 mJ s krokem 0,5 mJ a hodnoty výšky umístění vzorku 5,75 mm až 15,25 mm s krokem 0,5 mm, což by ve výsledku znamenalo celkem 2160 kombinací k měření. Byl proveden komplexní proces optimalizace LIBS měření za účelem dosažení co nejnižšího limitu detekce. Nejprve bylo vygenerováno 40 počátečních experimentálních podmínek, na základě kterých byl trénován GPR model. Postupně byly vybírány další experimentální podmínky, přičemž v každé iteraci procesu optimalizace bylo provedeno několik měření. Během 16 kol optimalizačního procesu bylo uskutečněno celkem 173 experimentů, které pokrývaly 91 experimentálních podmínek. Výsledky naznačují, že nadměrná variabilita v hodnotách LOD byla korigována opakovanými experimenty. Na základě této optimalizace bylo specifikováno šest experimentálních podmínek pro určení limitu detekce s různými povrchovými koncentracemi. To umožnilo získat hodnoty limitu detekce v úzkém rozmezí. Nakonec vyhodnocení limitu detekce prostřednictvím LIBS s využitím detekčního systému ICCD dokázalo určit nejnižší hodnotu LOD. Z provedených optimalizačních procesů bylo zřejmé, že výpočetní čas lze takto snížit i o 80 % [64]

Vědecká publikace G. Songa popisuje navržení algoritmu pro optimalizaci klasifikačního modelu pro rozpoznávání hornin využívající analýzu LIBS a 1DCNN (1D konvoluční neuronová síť, z anglického *1D convolutional neural networks*). V důsledku toho byl v této práci navržen vylepšený algoritmus Bayesovské optimalizace. Ve srovnání s jinými algoritmy umožňuje vylepšená metoda této optimalizace snížit výpočetní čas o zhruba 65 %. Experimentální sestava se skládala z Nd: YAG laseru s vlnovou délkou 1064 nm, dobou trvání laserového pulzu 7 ns a skenovací rychlostí 8 Hz. Použitý pulzní laser pracoval s energií 35 mJ, přičemž signál byl sbírán pomocí optického vlákna a přiveden do 8kanálového spektrometru vybaveného detektorem CCD. Pro analýzu bylo vybráno několik různých typů sedimentárních hornin. Pro odstranění prachu a jiných enviromentálních vlivů byly na vzorky aplikovány čistící laserové impulzy. Pro eliminaci heterogenity hornin bylo provedeno 40 laserových ozáření a anomální spektra byla odstraněna na základě statistické analýzy, což vedlo k získání 960 souborů spektrálních dat [65].

Pro klasifikaci byly použity metody využívající PCA jako redukci dimenzionality dat (z anglického *Principal component analysis*) a klasifikátory jako SVM (z anglického *Support vector machine*) a již zmíněné CNN, optimalizované pomocí bayesovské optimalizace. Experimentální výsledky z této práce ukázaly, že technologie LIBS, kombinovaná s klasifikačním modelem CNN, nepotřebuje vybírat optimální kombinaci pro předzpracování dat a vylepšený algoritmus bayesovské optimalizace může dosáhnout vysoké přesnosti a rychlé

klasifikace mezi horninami. Díky globální dynamické optimalizaci byl modelovací čas vylepšeného algoritmu bayesovské optimalizace výrazně snížen, což vedlo k výrazně vyšší přesnosti a zlepšení efektivity klasifikace hornin [65].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Příprava vzorků

Jednou z nejčastěji uváděných výhod týkajících se techniky LIBS je skutečnost, že není vyžadována příprava vzorku. Jestliže se ovšem jedná o studii biologických tkání, jež se vyznačují heterogenní strukturou, důkladnou přípravu vzorků nelze opominout. Biologické tkáně mohou mít různé optické vlastnosti, které ovlivňují interakci laserového svazku se vzorkem a výsledné měření. Vzorky jsou často zafixovány, což umožňuje zachování určité orientace, lepší manipulaci, snadnější skladování či udržení jejich integrity během procesu analýzy. Rovněž se klade důraz na to, aby preparát nebyl kontaminován [66].

4.1.1 Vzorky myších jater zalité v parafínu

Kovové vrstvy byly naneseny na myší játra zalitá v parafínu. Ta byla použita z důvodu, jelikož mají fyziologicky podobný charakter jako lidské orgány. Jejich další nespornou výhodou je to, že jsou snadno dostupná a z dostupných biologických matric mají pravděpodobně největší homogenitu a velikost [67].

Vzorky myších jater byly připraveny na základě spolupráce s Akademií věd České republiky. Pokusné myši byly usmrceny odpovídající metodou cervikální dislokace, posléze podstoupily odběr jater a dalších orgánů sloužících pro navazující výzkum, přičemž všechny úkony byly provedeny podle protokolů a pravidel stanovených Společností pro vědu o laboratorních zvířatech a Ústavu živočišné fyziologie a genetiky (ÚŽFG).

Tkáně jsou nejprve podrobeny fixaci ve 4% roztoku formaldehydu po dobu minimálně jednoho dne. Poté se tkáně proplachují destilovanou vodou, aby došlo k vymytí formaldehydu. Je využíváno principu zalévání prosycením odvodněné tkáně rozehřátým parafínem při teplotě 56 °C až 58 °C, jenž sestává ze čtyř kroků. Zpočátku jsou tkáně odvodňovány etanolovou řadou (30% etanol 3 hod., 50% etanol 3 hod., 70% etanol 12 hod., 80% etanol 1 hod., 95% etanol 1 hod., 100% etanol 1 hod.), následuje prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín n (xylen I 1 hod., xylen II 1 hod., xylen III 1 hod.). Třetí fáze technologického postupu se skládá z prosycení tkáně parafínem m (parafín I 1 hod., parafín II 12 hod., parafín III 1 hod., parafín IV 1 hod.). Závěrečným krokem je ponoření a nastavení tkáně do parafínu, po němž následuje tuhnutí. Následující den je parafínový odlitek obsahující vzorek přemístěn do lednice a vyjmut z nerezové formy, která byla použita k zalití. Pak už je daný vzorek jen zarovnán pomocí posuvného mikrotomu do požadované roviny tak, aby byl připraven pro analýzu LIBS.

4.2 Pokrytí vzorků kovovou vrstvou

K depozici tenkých vrstev kovů na povrch vzorku bylo použito zařízení Leica EM ACE600 Sputter Coater (Leica Microsystems, Německo). Základním principem je využití tzv. *sputteringu*, při kterém jsou atomy vyraženy z povrchu cílového materiálu (terče, z anglického slova *target*) pomocí bombardování iontů s vysokou energií. Tyto vyražené atomy pak putují ke vzorku, kde vytvoří tenkou vrstvu [68, 69]. Myší játra zalitá v parafínu byla pokryta vrstvami pěti kovů: Cr, Ti, Ni, W a Au. Tyto kovy byly vybrány na základě dostupnosti v instituci CEITEC VUT, Brno a z důvodu toho, že tyto prvky se běžně nevyskytují v měkkých tkáních.

Obrázek č. 4: Sputter coater Leica EM ACE600 [68] a chromový terč použitý k pokovování.

4.3 Analýza vzorků pomocí techniky LIBS

Veškerá měření i následná zpracování dat byla provedena v laboratořích Fakulty strojního inženýrství VUT/CEITEC VUT ve skupině Laserové spektroskopie.

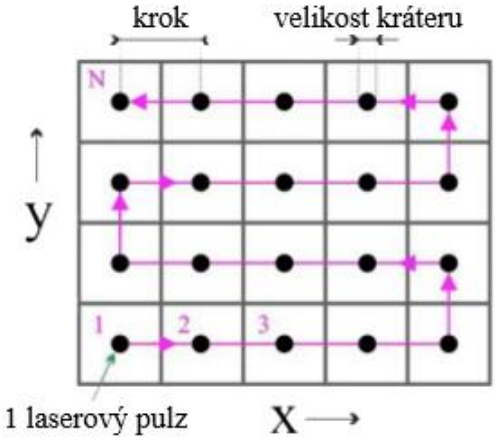
4.3.1 Popis měřicí sestavy

LIBS analýza měkkých tkání byla prováděna pomocí přístroje FireFly, jenž byl vyvinut společností Lightigo v Brně. Zařízení, které se kromě studia biologických materiálů dá využít i na výzkum kovů, plastů či geologických vzorků, obsahuje motorizovaný stolek s možností pohybu ve třech směrech (osy x, y, z). Součástí je i možnost na odsávání nečistot vzniklých při laserové ablaci nebo ofuk plynem (Ar, He). Pro samotný proces ablace materiálu je použit pulzní nanosekundový Nd:YAG laser s délkou pulzu 5 ns a skenovací rychlostí až 100 Hz. Uživatel si může vybrat mezi třemi různými vlnovými délkami paprsku laseru (1064 nm s maximální energií 20 mJ, 532 nm s maximální energií 15 mJ, 266 nm s maximální energií 5 mJ). Fokusování laserového paprsku je zajištěno objektivem s hloubkou ostrosti (f = 75 mm) nebo asférickým objektivem s ohniskovou vzdáleností (f = 20 mm). Rozložení emisního záření na vlnové délky obstarává spektrometr typu Czerny-Turner s oblastí sběru od 190 do 860 nm a vysokou rozlišovací schopností (rozlišení <0,05 nm). K zaznamenání intenzity světla jsou využity detektory typu CCD/CMOS. Toto zařízení se dále vyznačuje parametry, jako je limit detekce v rozsahu od 1 do 100 ppm (z anglického *parts per million*), prostorové rozlišení v rozmezí 10–150 µm nebo skenovací oblast o velikosti 100x100 mm [70].

Obrázek č. 5: Měřicí sestava FireFly od firmy Lightigo a ablační komora s motorizovaným stolkem [70].

4.3.2 Postup měření

Pokovené vzorky byly analyzovány dvěma metodami. Nejprve byl laser nastaven do módu *line*, kdy laserové pulzy vytvoří řadu kráterů na povrchu vzorku za sebou tak, že dochází k analýze konkrétních bodů předem vybraných v oblasti vzorku. Druhý způsob spočíval v tzv. rychlém mapování (z anglického *fast mapping*) v kontinuálním režimu. V tomto nastavení se vzorek pohybuje ve směru osy x, přičemž rychlost tohoto přesunu je synchronizována s frekvencí laserových pulzu. Po dokončení pohybu v jedné ose je vzorek přesunut ve směru osy y, kde učiní jeden krok při zachování specifikované délky kroku a posléze se opět vrátí k pohybu ve směru osy x, čímž vzniká nový řádek analyzovaných bodů. Oba tyto módy jsou zajištěny díky pohybu motorizovaného stolku, jenž se dokáže pohybovat až ve třech směrech. Délka kroku, která odpovídá vzdálenosti mezi dvěma za sebou jdoucími laserovými pulzy, určuje prostorové rozlišení. Toto rozlišení je výrazně ovlivněno poškozením vzorku po interakci laseru s povrchem [65].



Obrázek č. 6: Schéma principu rychlého mapování v kontinuálním režimu.

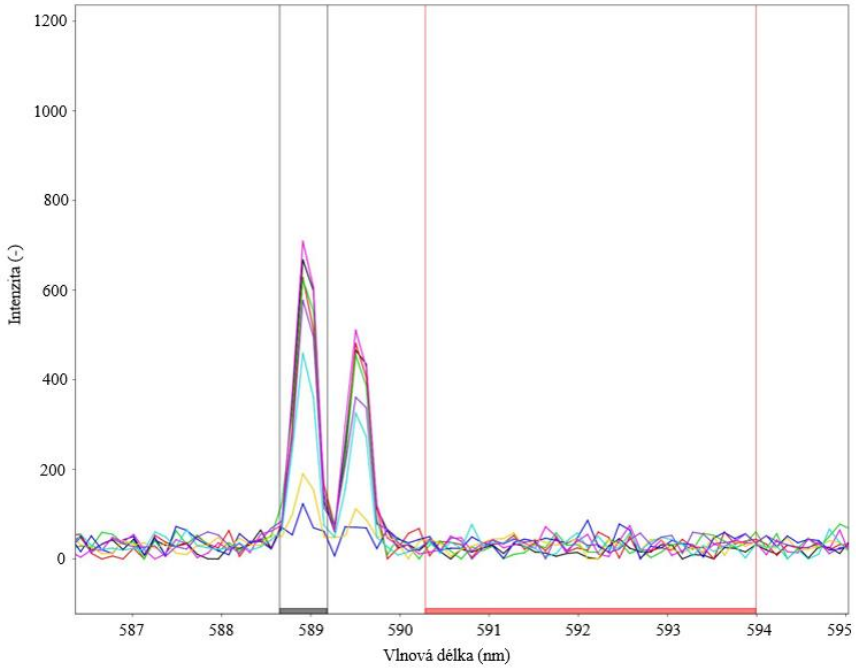
4.3.3 Zpracovávání dat z LIBS analýzy

Pro vyhodnocení spektrálních dat získaných z přístroje FireFly byly použity programy LIBS Analyzer a MS OFFICE Excel. Pomocí softwaru LIBS Analyzer byly spočítány hodnoty poměru signálu k šumu SNR (průměrná hodnota a směrodatná odchylka) pro každý vzorek pokovovaný jinou tenkou vrstvou. Tato analýza byla uskutečněna jak pro spektrální čáry jednotlivých kovů, tak i pro emisní spektrální čáry vápníku a sodíku. Konkrétně byla analýza provedena na iontové a atomové spektrální čáře vápníku a atomové spektrální čáře sodíku (uvedeno v Tabulce č.2). Tyto prvky byly vybrány na základě toho, že jsou ve vysoké koncentraci obsaženy ve zkoumané biologické matrici a lze je velmi dobře detekovat. Porovnání obdržených hodnot SNR vzorků s vrstvou a vzorků bez kovové vrstvy lze využít k získání informace o tom, jak daná vrstva buď zesiluje nebo zeslabuje výslednou intenzitu signálu. Pro identifikaci jednotlivých spektrálních čar byla využita internetová databáze emisních spektrálních čar NIST. Přehled spektrálních čar a jejich parametrů je zobrazen v následující tabulce [71].

Tabulka č. 2: Přehled použitých spektrálních čar s příslušnými charakteristikami (λ – vlnová délka, A_{ki} – Einsteinův koeficient, E_i a E_k – spodní a horní hranice ionizační energie), převzato z [71].

Prvek	λ (nm)	A_{ki} (s^{-1})	E_i (eV)	E_k (eV)
Ca I	422,67	$2{,}18 \cdot 10^8$	0,00	2,93
Ca II	393,00	$1{,}47 \cdot 10^8$	0,00	3,15
Na I	589,00	$6{,}16 \cdot 10^7$	0,00	2,10
Cr I	520,60	$5{,}14 \cdot 10^7$	0,94	3,32
Ti II	334,90	$1{,}61 \cdot 10^8$	0,61	4,31
Ni I	352,44	$1{,}00 \cdot 10^8$	0,03	3,54
W I	429,46	$1{,}24 \cdot 10^7$	0,37	3,25
Au I	242,80	$1{,}99 \cdot 10^8$	0,00	5,11

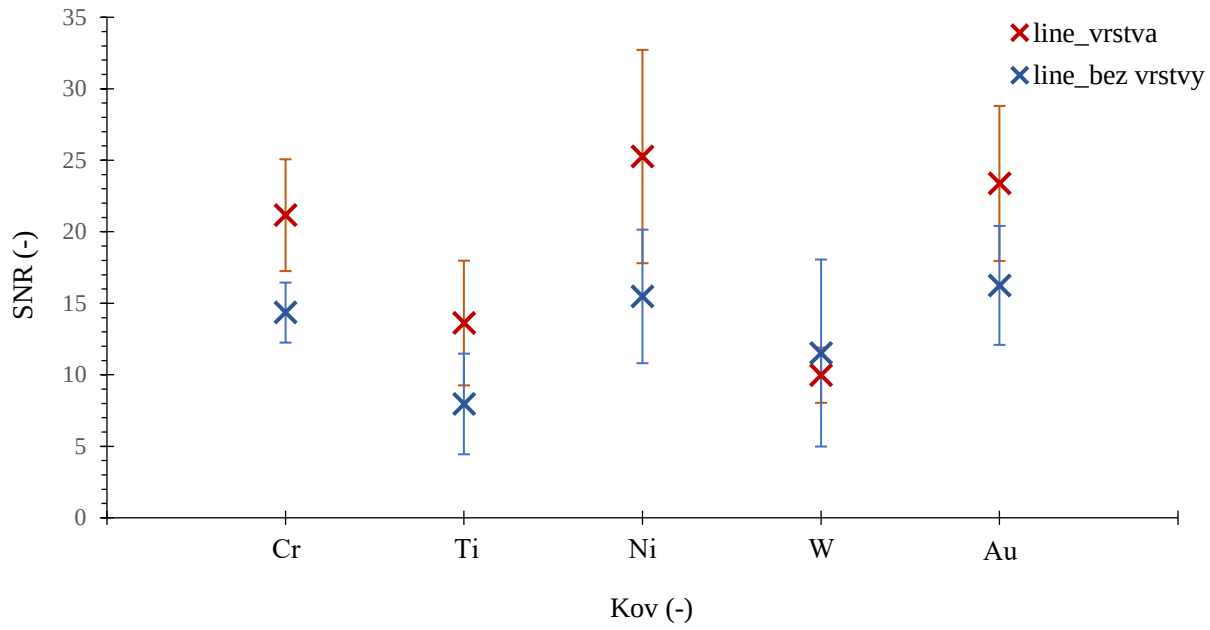
Při analýze SNR (z anglického *Signal-to-noise ratio*) rozumíme signálem maximální intenzitu dané spektrální čáry a šumem označujeme pozadí spektra v okolí některé ze spektrálních čar, přičemž představuje měřitelné fluktuace nebo náhodné variace v intenzitě signálu.



Obrázek č. 7: Ukázka výběru signálu a šumu k analýze SNR pro spektrální čáru Ca II 393 nm v programu LIBS Analyzer.

Výsledky SNR experimentu určily, které prvky z pětice zvolených kovů by mohly představovat vhodné kandidáty pro nový vnitřní standard. Pro tento účel byly rovněž změřeny velikosti rozprášení kolem vzniklého kráteru po dopadu laserového pulzu, jelikož menší rozprášení může vést k lepšímu prostorovému rozlišení, což umožňuje detailnější analýzu různých oblastí vzorku.

Je důležité poznamenat, že získaná spektrální data byla před výpočty SNR průměrů a směrodatných odchylek zbavena o jistou část dat z důvodu nestejnoměrné velikosti energie laserových pulzů, kdy laser na počátku nemá takovou energii jako při zbytku analýzy. Tento postup byl aplikován jak na hodnoty získané pomocí módu *line*, tak i na ty obdržené pomocí rychlého mapování. Získané hodnoty z programu LIBS Analyzer byly převedeny do MS Excel, kde probíhala tvorba grafů a redukce dat.



Obrázek č. 8: Spočítané průměry a příslušné směrodatné odchylky SNR získané z módu line pro spektrální čáru Ca I 422,64 nm. Modré body a úsečky představují vzorky bez vrstvy, červeně označené zase vzorky s vrstvou.

Při zpracování hodnot signálů a poměrů mezi vzorky s vrstvou a vzorky bez tenkých vrstev bylo SNR vyhodnocováno především na základě použití rychlého mapování. U módu *line* zbylo po odstranění jistého počtu dat (po důkladném uvážení vždy pět prvních hodnot) průměrně kolem 15 hodnot, zatímco u rychlého mapování bylo kvůli poměrně velké fluktuaci LIBS signálu způsobené nestabilitou laseru nutné provést pro zpřesnění dat odstranění odlehlých hodnot, tzv. outlier filtering (25 % nejvyšších a 25 % nejnižších dat).

4.4 Optimalizace parametrů

Pro optimalizaci parametrů byl vytvořen skript pomocí programovacího jazyka Python. Tento kód byl převzat od odborného školitele, přičemž do tohoto kódu byla nahrána data naměřená speciálně pro tento účel. Tím bylo provedení optimalizace tří parametrů, konkrétně energie laserového pulzu (s počátečními hodnotami 4,5 mJ, 3,75 mJ, 3 mJ), zpoždění sběru signálu – GD (0,1 µs, 0,5 µs, 0,9 µs, 1,3 µs) a tloušťka vrstvy (7nm, 14 nm, 21 nm, 28 nm, 35 nm). Z těchto naměřených dat lze posléze obdržet trojici optimálních parametrů, které mohou být později použity na vytvoření mřížky parametrů s jemnějším krokem, což vede ke zlepšení celého procesu optimalizace. Hlavním účelem je nalézt optimální trojici parametrů, kterou algoritmus vybere na základě nejlepší predikované hodnoty poměru signálu k šumu (SNR). Je nutné poznamenat, že daný kód implementuje některé prvky používané v Bayesovské optimalizaci, ale neobsahuje celý proces. Jedná se spíše o úvodní krok, který zahrnuje Gaussovské procesy v regresi (z anglického *Gaussian Process Regression*) k modelování vztahu mezi vstupními a výstupními proměnnými, a následně využívá k vyhodnocení funkci očekávaného zlepšení. Bayesovská optimalizace obvykle zahrnuje několik dalších kroků, mezi které patří aktualizace modelu, výběr nových bodů nebo opakování procesu, dokud není dosaženo maximálního počtu iterací nebo dosažení určité hodnoty výkonu modelu.

Pro výpočet SNR bylo nezbytné načíst příslušná spektrální data, která byla navíc upravena. Z 265 spekter, která vyšla z každé kombinace naměřených parametrů, bylo 50 spekter s nejvyššími intenzitami odstraněno a následujících 50 bylo zprůměrováno za účelem co nejpřesnějšího výpočtu SNR. Pro tuto úlohu byly zvoleny spektrální čáry vápníku (atomová spektrální čára vápníku Ca I 422,67 nm a iontová spektrální čára vápníku 393,37 nm) a odpovídající pozadí. Jako signál byla zvolena maximální intenzita dané spektrální čáry odečtená o hodnotu signálu bodu vybraného v blízkosti tohoto intenzitního píku. Šum byl dále definován jako standardní odchylka intenzity signálu v oblasti, kde se nenachází žádné spektrální čáry. To lze vyjádřit podle následujícího vzorce:

$$N = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(B_i - \bar{B})^2} \tag{4.1}$$

kde n značí počet prvků v oblasti šumu, B_i je hodnota v i-tém bodě oblasti šumu a $\bar{B}$ je průměrná hodnota intenzity signálu v oblasti šumu [72].

V případě Gaussovských procesů v regresi byl nejprve definován kernel, jenž byl vytvořen součinem dvou částí. První je konstatní kernel a druhý je kernel založený na radiálně bázové funkci RBF (z anglického *Radial basis function*). Konstantní kernel se často využívá jako doplněk k ostatním kernelovým funkcím, přičemž závisí na jediném hyperparametru [73]. Kernel založený na radiálně bázové funkci, jinak také zvaný Gaussovský kernel, obsahuje parametr délkové škály, který určuje, jak rychle se kernel mění se vzdáleností mezi body v prostoru dat. Následně byl inicializován Gaussovský proces v regresi s tímto definovaným kernelem. Byla rovněž nadefinována mřížka hyperparametrů, která byla využita při hledání optimálních hodnot kernelu, kterými byly nastavení parametru u konstantního kernelu a délková škála u RBF kernelu. Algoritmus určil tyto hodnoty při každé aktualizaci jinak, což je ovšem u této metody očekáváný výsledek. Je však nutné poznamenat, že ladění hodnot pro parametr konstantního kernelu i délkové škály RBF kernelu proběhlo manuálně, tudíž výsledek nemusí představovat ideální nastavení pro hledání optimálních parametrů.

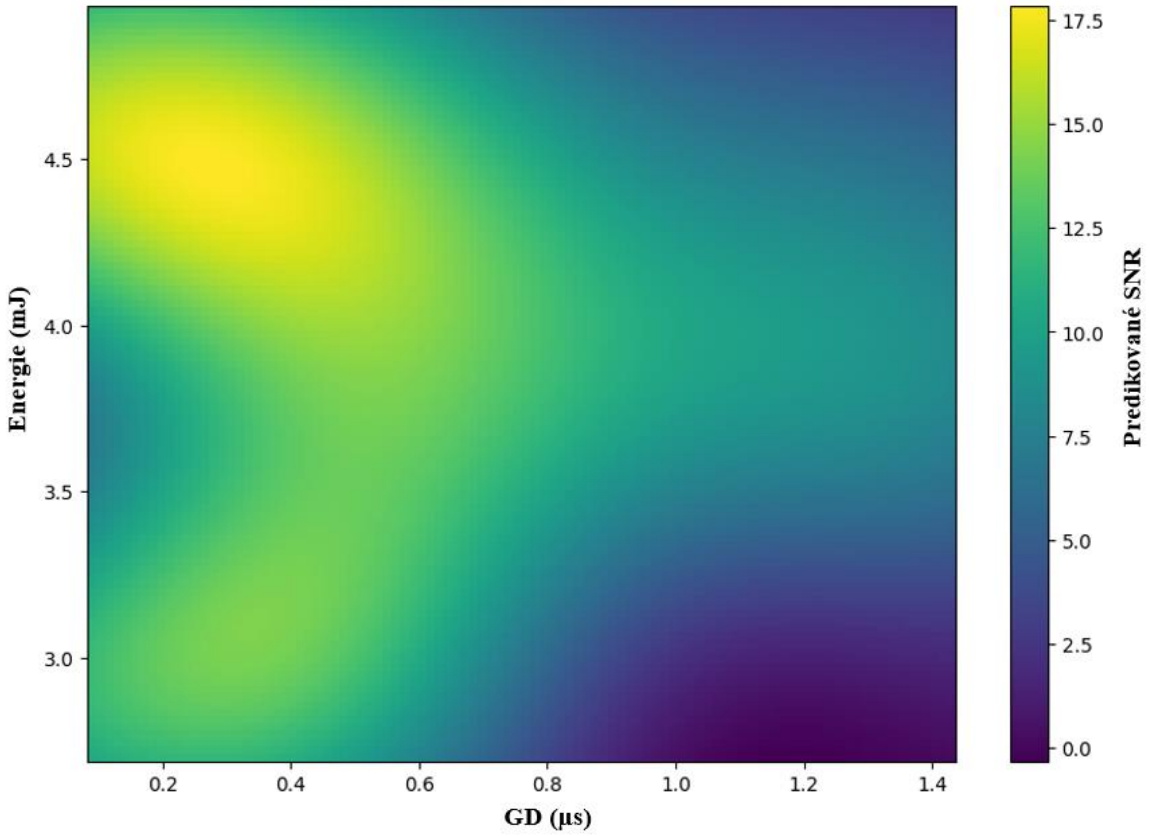
Akviziční funkce byla zvolena v podobě očekávaného zlepšení (z anglického *Expected Improvement*), což je metoda, která rozhoduje o tom, kde v prostoru parametrů provést další vyhodnocení. Tuto akviziční funkci lze matematicky vyjádřit následovně:

$$EI(x) = \big(\mu(x) - f(x^+)\big)\Phi\left(\frac{\mu(x) - f(x^+)}{\sigma(x)}\right) + \sigma(x)\varphi\left(\frac{\mu(x) - f(x^+)}{\sigma(x)}\right) \tag{4.2}$$

kde $\mu(x)$ představuje střední hodnotu predikce funkce v bodě x, $\sigma(x)$ je standardní odchylka predikce v bodě x, $f(x^+)$ označuje maximální hodnotu účelové funkce, Φ je kumulativní distribuční funkce normálního rozdělení a φ popisuje hustotu pravděpodobnosti normálního rozdělení [74].

Následně byla data rozdělena na vstupní a výstupní proměnné. Mezi vstupní proměnné byly zařazeny parametry k optimalizaci, tedy tloušťka vrstvy, zpoždění sběru signálu – GD a energie. Jako výstupní proměnná sloužila hodnota SNR. K natrénování modelu a vytváření predikcí byl definován kernel (opět kombinací Gaussovského a konstantního kernelu) s již optimalizovanými parametry získanými v předchozí části. Model je trénován na

standardizovaných trénovacích datech, přičemž tato trénovací data obsahují hodnoty parametrů tloušťky vrstvy, energie a zpoždění sběru signálu – GD. Tento model je rovněž použit k predikci hodnot SNR a jejich standardních odchylek pro trénovací data. Predikce hodnot SNR a jejich standardních odchylek probíhala za použití jemné 3D mřížky parametrů, která obsahovala kombinaci všech vstupních proměnných. V této jemné mřížce proběhl také výpočet očekávaného zlepšení pro všechny body v této mřížce. V tomto případě výpočet očekávaného zlepšení obsahuje skutečné hodnoty SNR ve vstupních datech, předpovězené hodnoty SNR na jemné mřížce, které vrátil GPR model a standardní odchylky předpovězených hodnot.



Obrázek č. 9: Ukázka predikce hodnot SNR pro tloušťku vrstvy 6,30 nm.

Obrázek č. 9 zobrazuje teplotní mapu predikovaného SNR pro tloušťku vrstvy 6,30 nm. Jak je názorně vidět, tak nejvyšší hodnotu SNR model predikoval pro energii zhruba 4,5 mJ a hodnotu zpoždění sběru signálu 0,28 µs.

Algoritmus rovněž obsahuje implementaci pro identifikaci lokálních maxim v poli predikcí SNR, přičemž bylo zajištěno, aby žádná dvě maxima neležela příliš blízko sebe. Stejný postup byl zaveden i v poli očekávaného zlepšení. Lokální maxima v tomto případě představují kombinace parametrů, kde je očekáváno největší zlepšení na základě aktuálních predikcí modelu. Toto lokální maximum obsahující trojici parametrů (tloušťka vrstvy, doba zpoždění sběru – GD, energie) bylo posléze vybráno jako místo, kolem kterého proběhlo vytvoření nové mřížky parametrů. S těmito novými parametry byl pak proveden úplně stejný postup, kdy tato data byla opět vyhodnocena pomocí tohoto algoritmu za získání nové trojice optimálních parametrů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

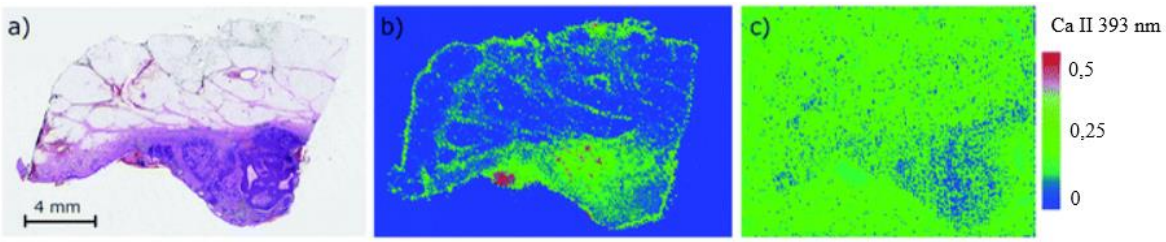
Experimentální parametry pro analýzu myších jater byly určeny následovně. Energie laserových pulzů byla nastavena na maximální hodnotu 5 mJ pro vlnovou délku 266 nm. Tloušťka kovové vrstvy na povrchu vzorku byla nastavena na hodnotu, aby skrz ni laserový pulz spolehlivě prošel, v případě tohoto měření 10 nm. Poslední parametr, jenž byl pro analýzu definován, bylo zpoždění sběru signálu – GD (z anglického *gate delay*), jehož velikost byla nastavena na 0 s.

Tabulka č. 3: Přehled experimentálních parametrů použitých při analýze myších jater

Experimentální parametry	
Energie	5 mJ
Vlnová délka laseru	266 nm
Tloušťka vrstvy	10 nm
Gate delay	0 s

5.1 Výběr kovu jako nového vnitřního standardu

V posledních letech se LIBS stala široce používanou analytickou technikou při analýze měkkých biologických tkání, protože poskytuje vizualizaci struktury tkáně z hlediska jednotlivých biogenních prvků (Ca, Na, K, Mg a P) a umožňuje vytváření prostorových map zobrazujících distribuci těchto chemických prvků. Použitím biozobrazování je možné například rozlišit různé vrstvy vzorků lidské kůže díky jejich odlišnému složení. Dokonce je možné odlišit zdravou lidskou kůži od nádorové tkáně pomocí semi-kvantitativního zobrazování. V této souvislosti by biozobrazování vzorků mohlo vést k vytvoření zcela nového diagnostického aparátu [75, 76].

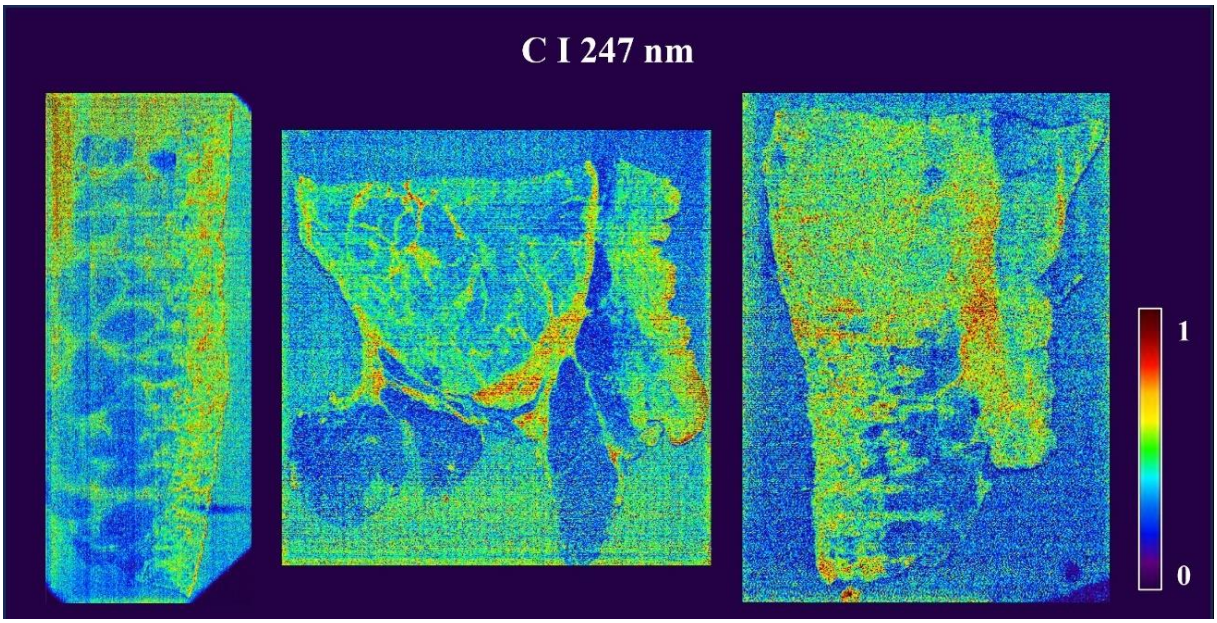


Obrázek č. 10: Analýza vzorků bazocelulárního karcinomu zobrazeného na histologickém snímku (a) z hlediska rozložení uhlíkových spektrálních čar: (b) tkáňový blok a (c) tenký řez o tloušťce 10 µm analyzované s optimalizovanými LIBS parametry, převzato z [75].

Pro standardizaci měkkých tkání je nejčastěji využívaná spektrální čára uhlíku (C I 247 nm). Standardizace se provádí k snížení fluktuací signálu získaného během biozobrazování pomocí metody LIBS. Tyto fluktuace mohou být způsobeny variacemi v energii laseru, defokusací laseru nebo nízkou efektivitou při sběru světla. Nicméně hlavní příčinou fluktuací je nehomogenita nebo změna morfologických vlastností vzorku, což představuje zásadní problém při analýze biologických tkání [77].

Uhlík je prvek, jenž je široce zastoupen jak ve zkoumané tkáni, tak v parafínu, do kterého je vzorek vložen. V souvislosti s používáním uhlíkové spektrální čáry jako vnitřního standardu se nicméně objevilo několik nestálostí, které naznačují, že tento prvek by nemusel být jako vnitřní standard pro měkké tkáně zcela ideální. Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, biologické

tkáně se vyznačují velmi složitou povrchovou strukturou, přičemž vykazují silnou nehomogenitu. Technika LIBS je rovněž citlivá na matriční efekty z mnoha důvodů, mezi které lze zařadit i vliv okolní matrice (v tomto měření byl využit parafín), ve kterém je uhlík obsažen ve značném množství, což ovlivňuje emisní spektrální čáry. Tyto matriční efekty vedou k nekonzistentnímu signálu výrazně ovlivňující přesnost měření. Vzhledem k faktu, že jsou vzorky umístěné v parafínu, může parafín ovlivnit množství uhlíku v okrajových částech vzorku, nebo jestliže je vzorek velmi tenký, dochází k ablaci parafínové složky pod vzorkem. Významným omezením je, že daný vnitřní standard by měl být po povrchu rozložen homogenně, a navíc by měl být pod vlivem podobných fyzikálních a chemických vlastností jako analyt, aby byl stejně postižen možnými fluktuacemi během měření [66, 13]. Jak je patrné z následujícího Obrázku č. 11, že uhlík tyto podmínky nesplňuje.

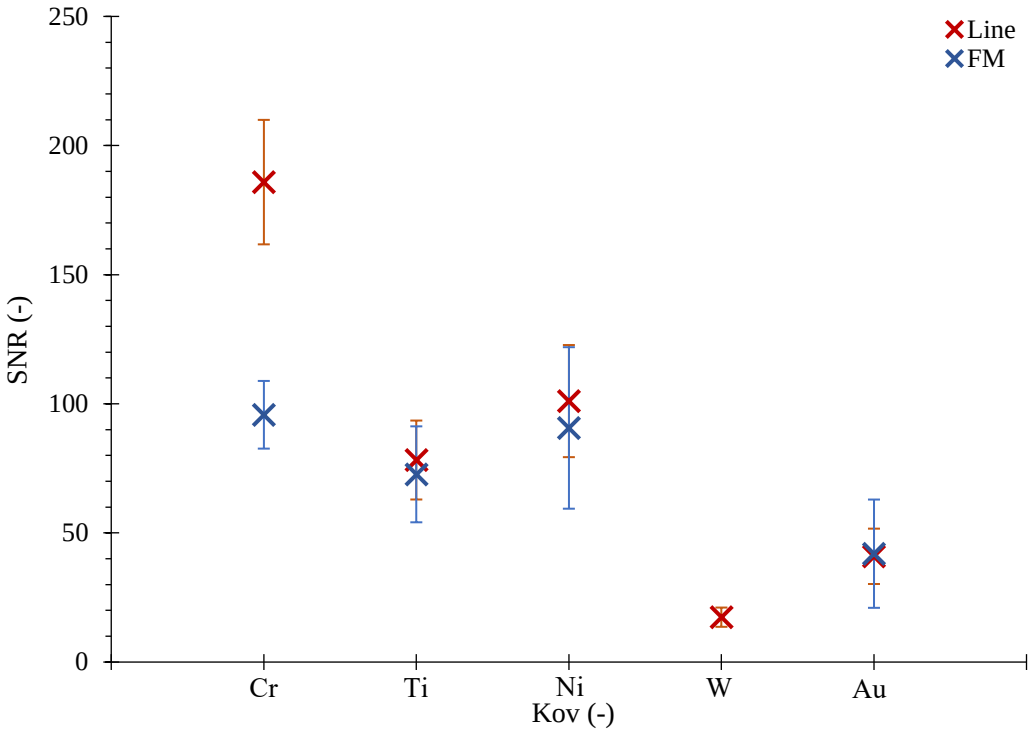


Obrázek č. 11: Mapy prostorových distribucí uhlíku pro nádorové vzorky, převzato z [13].

5.1.1 Analýza SNR spektrálních čar kovů a statistika rozprášení

Pro stanovení hodnot SNR spektrálních čar jednotlivých kovů použitých k vytvoření tenkých vrstev na povrchu vzorku myších jater byla data získána jak pomocí módu *line*, tak s využitím rychlého mapování v kontinuálním režimu. Kvůli poměrně velké fluktuaci LIBS signálu způsobené nestabilitou laseru bylo nutné provést pro zpřesnění dat odstranění odlehlých hodnot, tzv. outlier filtering (25 % nejvyšších a 25 % nejnižších dat).

Výsledná analýza SNR byla zpracována do grafu, kde jsou porovnány všechny kovy pro oba dva módy měření. Je nutné poznamenat, že wolfram má v přiloženém grafu pouze výsledek pro analýzu v módu *line*. To je způsobeno špatným vyjmutím příslušných spektrálních dat pro metodu rychlého mapování z počítače, avšak již předchozí analýzy ukázaly, že tento chemický prvek je při daném experimentální nastavení špatně detekovatelný, tudíž s ním nebylo ani možné počítat jako s potencionálním novým vnitřním standardem. Analýza SNR je znázorněna v grafu na následujícím Obrázku č. 12.

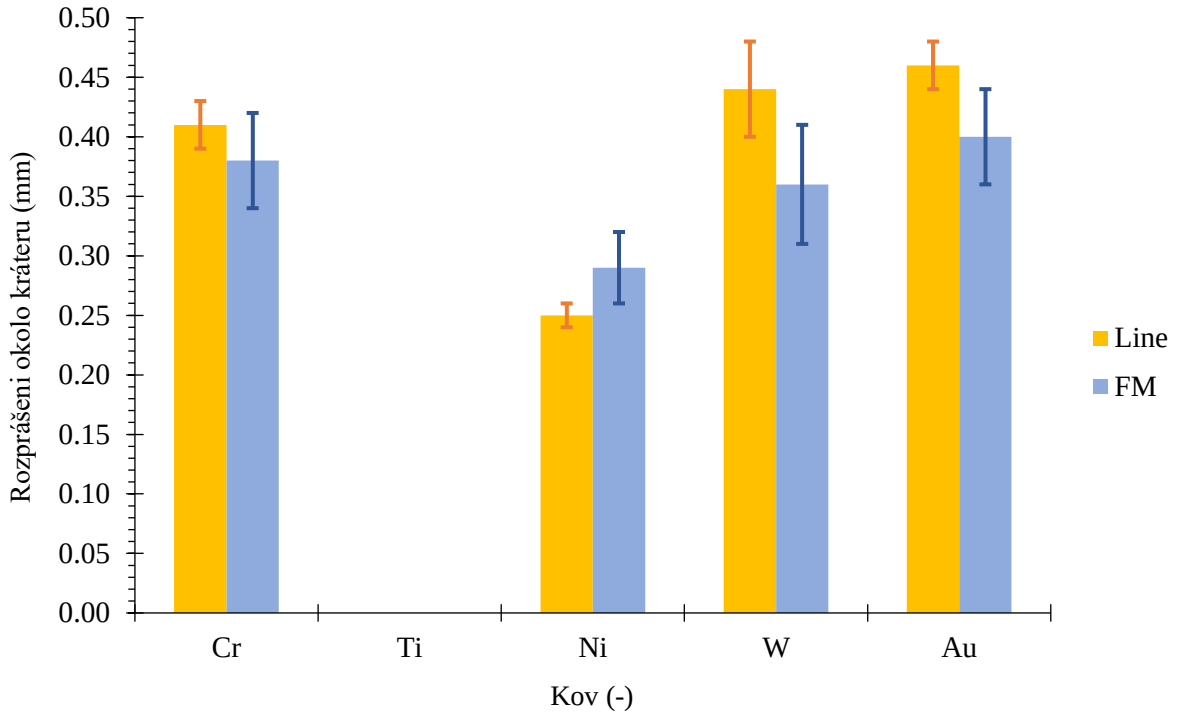


Obrázek č. 12: SNR vyhodnocení kovů s příslušnými směrodatnými odchylkami pro metody line a fast mapping.

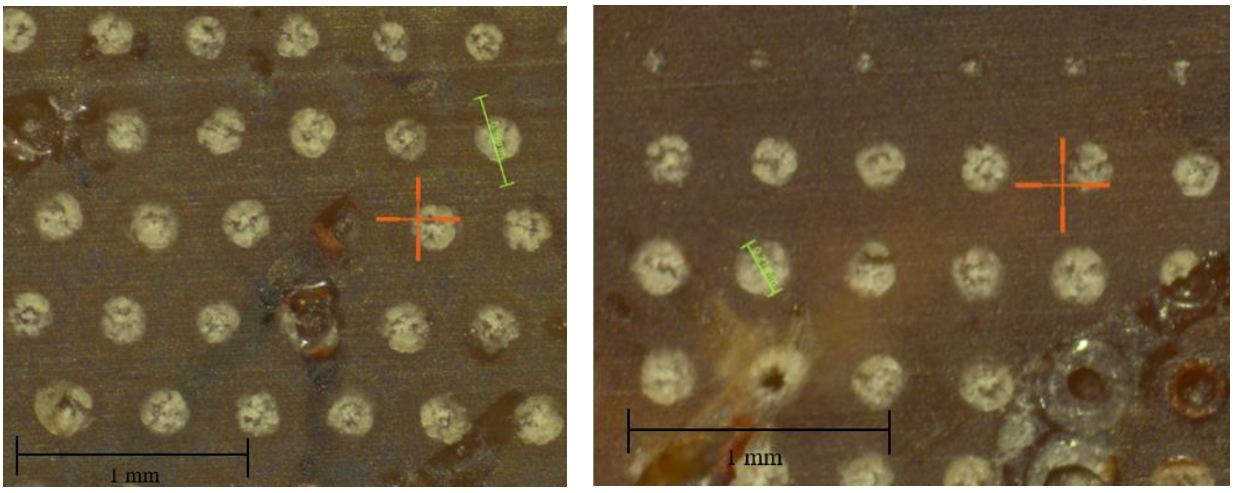
Hodnoty získané z módu *line* jsou v grafu zobrazeny červenou barvou, výsledky získané z analýzy provedené rychlým mapováním jsou označeny modře. Z obrázku je zřejmé, že wolfram bylo možné detekovat ze všech prvků nejhůře. U zlata se výsledky pro oba módy měření prakticky shodovaly, z hlediska výsledné hodnoty SNR však zaostává za zbylou trojící prvků. Nejvyšších hodnot SNR dosáhl chrom, který ovšem vykazuje velké rozdíly v porovnání výsledků pro *line* a rychlé mapování. Titan a nikl se z této analýzy jeví nejvhodněji, jelikož jejich SNR je poměrně vysoké a téměř se shoduje pro oba módy měření.

Další zajímavou charakteristikou je velikost rozprášení kolem vzniklého kráteru po dopadu laserového pulzu. Ta je pro analýzu SNR nesmírně důležitá, protože na ní závisí rozlišení při mapování měkkých tkání. Platí, že čím menší je velikost rozprášení kolem vzniklého kráteru, tím lepší je prostorové rozlišení, což umožňuje detailnější analýzu různých oblastí vzorku s menšími rozměry. Na následujícím obrázku je znázorněna statistická analýza pro jednotlivé kovy z hlediska velikosti (průměru) rozprášení u metod *line* a rychlého mapování.

Obrázek č. 13 jasně poukazuje, že u titanu nedošlo k vůbec žádnému rozprášení. Tato skutečnost by mohla být zapříčiněna tím, že titan má relativně vysokou tepelnou vodivost, což se projevuje rychlým odvodem tepla. To může způsobit rychlé ochlazení povrchu, a tedy i snížení pravděpodobnosti tání, rozprašování. Vliv jistě má i adheze titanu na vzorku. Nejvyšší průměrné hodnoty velikosti rozprášení pro obě metody měření dosahovalo zlato. Velmi podobně dopadly výsledky pro wolfram a chrom, přičemž hodnoty u wolframu se vyznačovaly největšími směrodatnými odchylkami. Poměrně dobře vyšly velikosti rozprášení u niklu, jehož průměrné výsledné hodnoty pro *line* i rychlé mapování se pohybují pod 0,30 mm. Z prvků, které nějaké rozprášení vykázaly, navíc rovněž disponuje nejmenšími směrodatnými odchylkami.



Obrázek č. 13: Analýza velikosti rozprášení pro jednotlivé kovy metodou line a fast mapping.



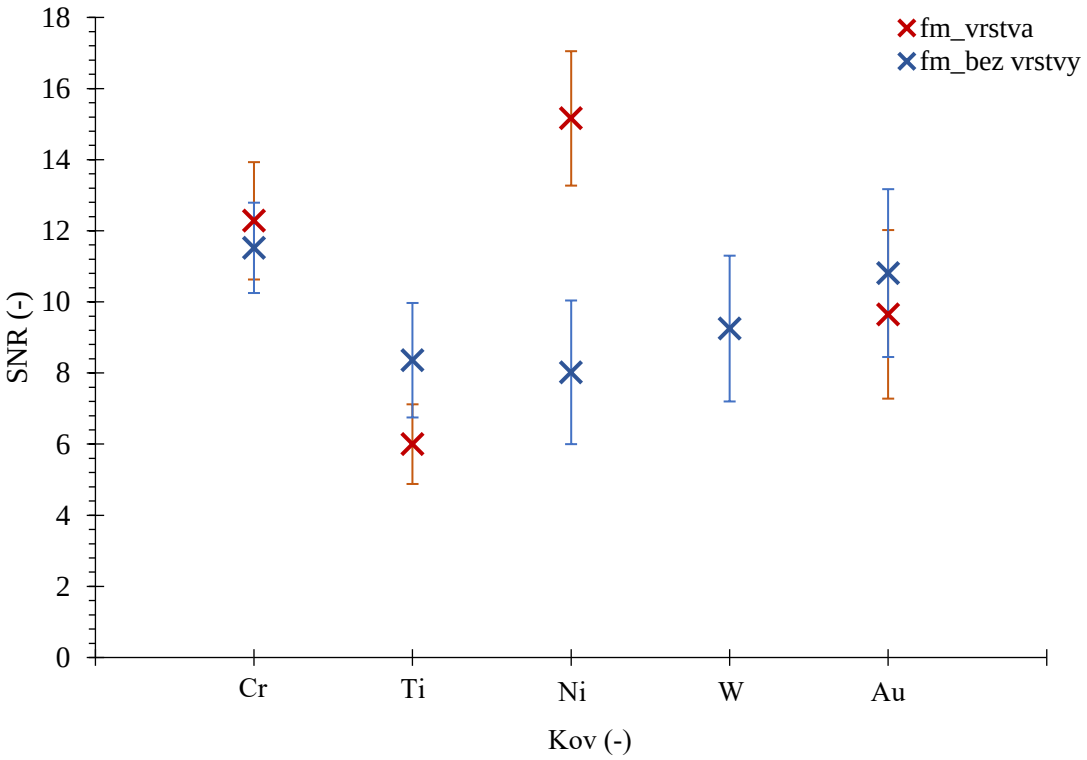
Obrázek č. 14: Analýza velikosti rozprášení u chromu (vlevo) a titanu (vpravo).

Na předchozích obrázcích je názorně vidět srovnání kovu s velkou mírou rozprášení, tedy chromu, a titanu, jenž žádné rozprášení neindikuje. Na fotografii s chromem je průměr rozprášení změřen na 0,39 mm, zatímco u titanu, kde se žádné rozprášení neobjevuje, je pouze zaznačen údaj 0,21 mm, což ovšem jenom značí průměr kráteru vytvořeného laserovým pulzem.

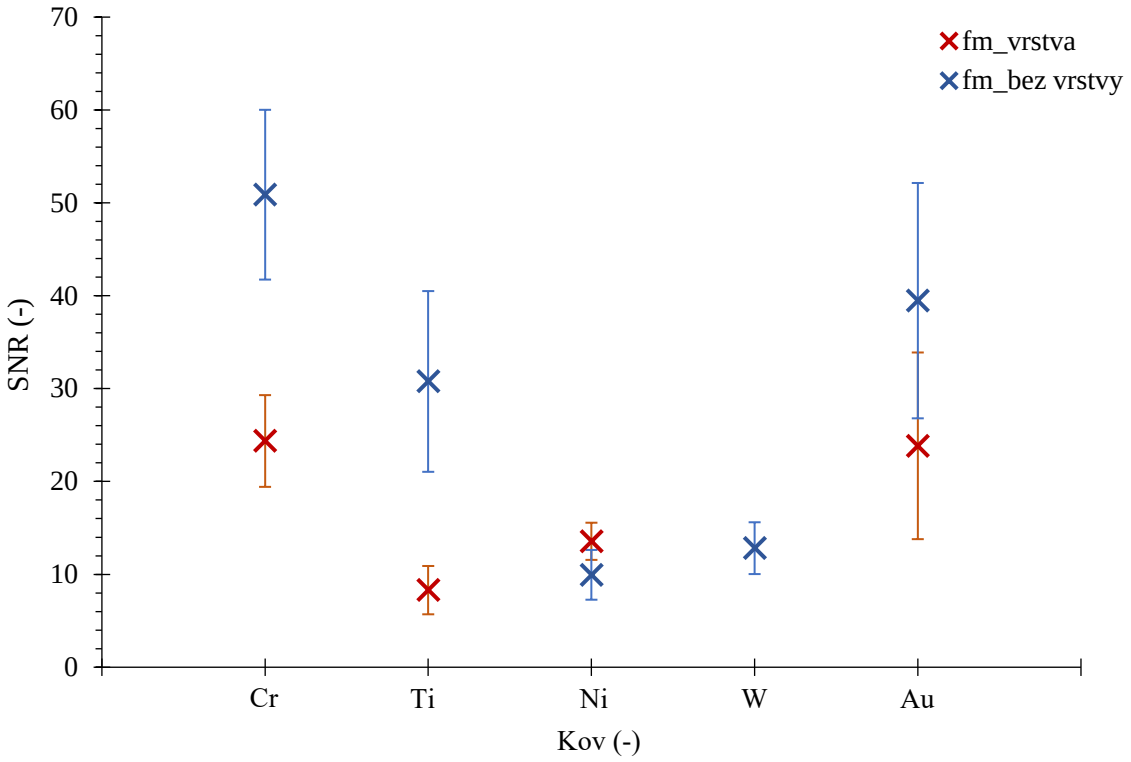
Co se týče samotného výběru kovu jako nového vnitřního standardu, lze po analýze výsledků z těchto dvou měření usoudit, že nejlépe se jeví titan a nikl. Důležitým parametrem je ovšem také velikost signálu spektrálních čar biogenních prvků, než jsou samotné kovy.

5.1.2 Analýza SNR pro spektrální čáry biogenních prvků a stabilita signálu

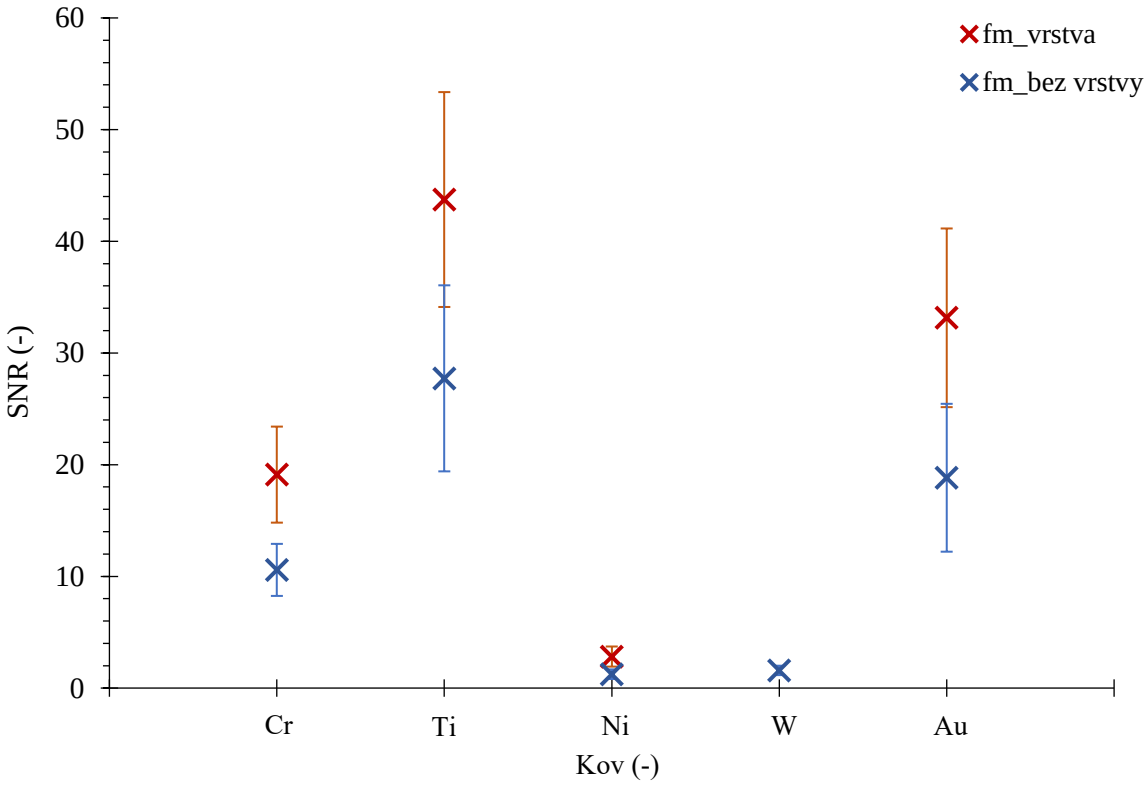
V této analýze podobně jako u spektrálních čar jednotlivých kovů byla pozornost zaměřena na výpočet hodnot SNR, tentokrát však pouze metodou rychlého mapování. Ta byla provedena jak pro vzorky pokryté tenkou kovovou vrstvou, tak i pro vzorky bez pokovování. Vybrané emisní spektrální čáry pro toto měření byly atomové spektrální čáry pro vápník a sodík (Ca I 422,67 nm, Na I 589,00 nm) a iontová spektrální čára vápníku (Ca II 393,37 nm). Tyto spektrální čáry byly vybrány na základě širokého zastoupení prvků v pozorované matrici, kde se dají dobře detekovat. Na základě této analýzy byly vytvořeny grafy, které názorně zobrazují porovnání velikosti signálu v závislosti na použitém kovu. Pro srovnání nechybí hodnoty SNR pro vzorky bez kovových vrstev. Je nutné poznamenat, že měření pro jednotlivé kovy proběhlo na odlišných vzorcích (celkem pět vzorků myších jater), které například v závislosti na složení mohou poskytovat mírně odlišné hodnoty signálů. Výsledná analýza je zobrazena v grafech na Obrázcích 15,16 a 17.



Obrázek č. 15: SNR analýza (*Signal-to-noise ratio*) a příslušné směrodatné odchylky kovů pro spektrální čáru Ca I 422,67 nm metodou rychlého mapování. Modré body a úsečky představují vzorky bez vrstvy, červeně označené zase vzorky s vrstvou.



Obrázek č. 16: SNR analýza (Signal-to-noise ratio) a příslušné směrodatné odchylky kovů pro spektrální čáru Ca II 393 nm metodou rychlého mapování. Modré body a úsečky představují vzorky bez vrstvy, červeně označené zase vzorky s vrstvou.



Obrázek č. 17: SNR analýza (Signal-to-noise ratio) a příslušné směrodatné odchylky kovů pro spektrální čáru Na I 589 nm metodou rychlého mapování. Modré body a úsečky představují vzorky bez vrstvy, červeně označené zase vzorky s vrstvou.

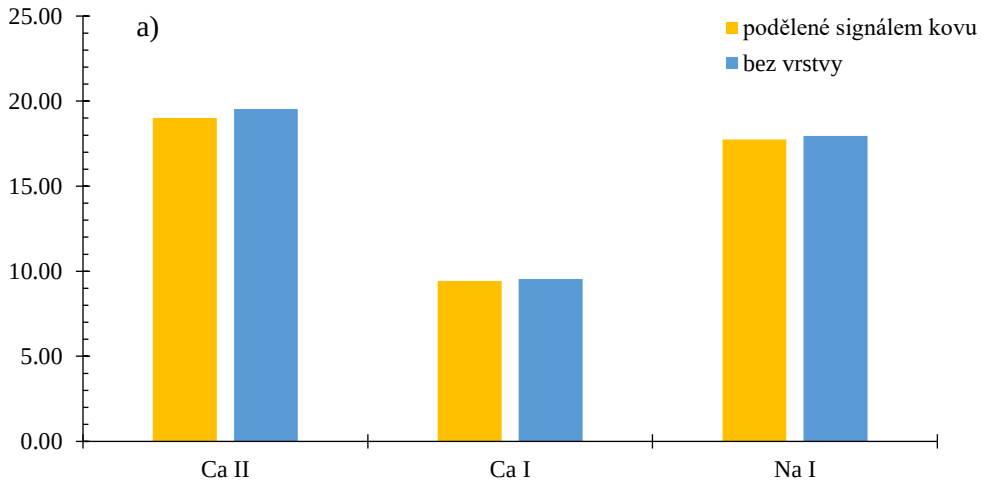
Pro zjištění, jak moc daná vrstva ovlivňuje (zesiluje/zeslabuje) získaný signál, byly spočítány podíly hodnot SNR pro biogenní prvky, kde v čitateli vystupuje hodnota SNR pro vzorek bez vrstvy a ve jmenovateli hodnota SNR pro pokovený vzorek. Výsledky těchto poměrů pro jednotlivé spektrální čáry jsou vypsány v následující tabulce.

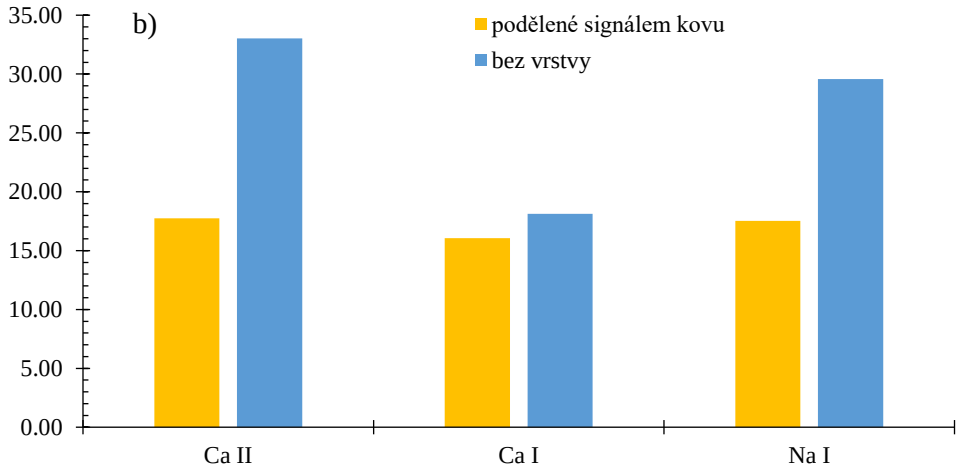
Tabulka č. 4: Vypočítané podíly hodnot SNR (vzorek bez vrstvy/vzorek s vrstvou) při využití metody rychlého mapování.

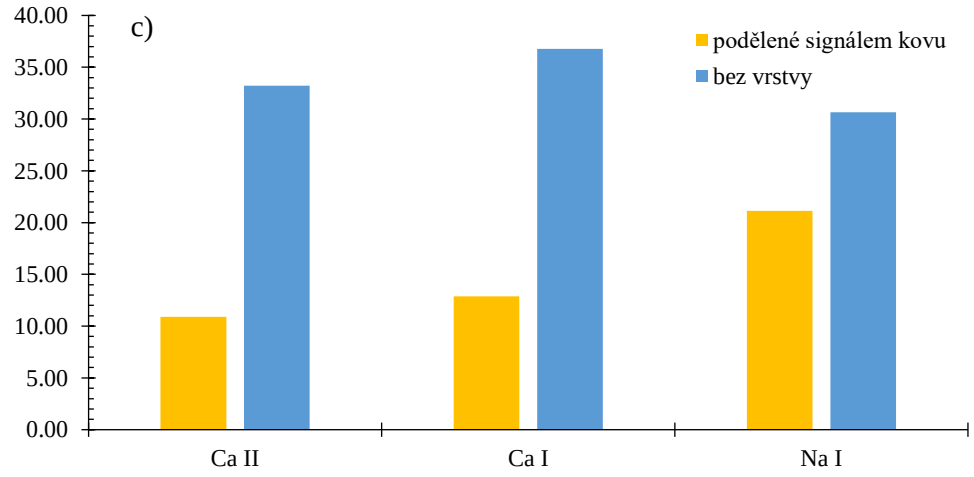
	Ca I 422 nm	Ca II 393 nm	Na I 589 nm
Cr	0,938	2,089	0,554
Ti	1,393	3,707	0,634
Ni	0,529	0,733	0,440
W	-	-	-
Au	1,120	1,656	0,568

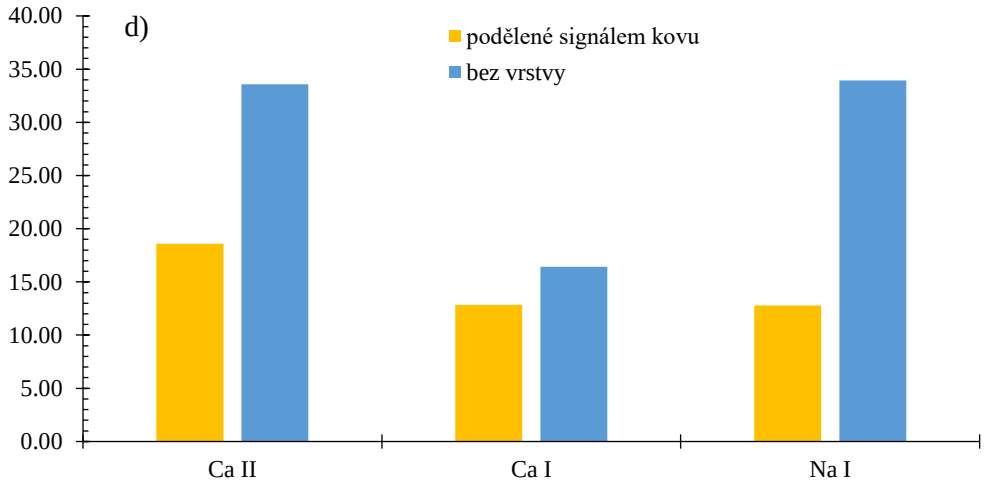
Jak z grafů, tak z Tabulky č. 4 je vidět, že aplikace tenké kovové vrstvy na povrch vzorku může mít za následek výrazné zesílení signálu, jak je tomu například u niklu. Tento chemický prvek jako jediný vykazoval zesílení signálu pro všechny použité spektrální čáry. U ostatních prvků došlo k zesílení či zeslabení v závislosti na použité spektrální čáře. Zajímavé je porovnání atomové a iontové spektrální čáry pro vápník, kde atomová spektrální čára Ca I 422 nm poskytuje lepší výsledky u všech kovů než iontová spektrální čára Ca II 393 nm. Ta zesílení vykazuje pouze u niklu, přičemž například u titanu došlo skoro k čtyřnásobnému zeslabení signálu. Jak je dále z tabulky patrné, atomová spektrální čára Na I 589 nm poskytla znatelné zesílení signálu u všech analyzovaných prvků. Také stojí za zmínku, že výsledné hodnoty SNR pro tuto spektrální čáru byly vyšší u všech prvků pro vzorky s tenkou vrstvou než u vzorků bez vrstvy. U spektrálních čar vápníků se tento jev nevyskytuje, tam je hodnota SNR vzorků s vrstvou vyšší pouze u niklu pro obě spektrální čáry a chrom u atomové spektrální čáry. K tomuto úkazu může přispívat několik fyzikálních jevů, např. energie potřebná k excitaci. U atomové spektrální čáry vápníku Ca I 422,67 nm je tato energie 2,93 eV, u iontové čáry Ca I 393 nm tato hodnota činí 3,15 eV a u atomové čáry sodíku Na I 589 nm 2,10 eV [71].

Byla rovněž provedena analýza, ze které byly nejdříve získány hodnoty intenzit biogenních prvků pro vzorky bez kovové vrstvy, posléze byly vyhodnoceny i intenzity biogenních prvků pro vzorky s tenkou kovovou vrstvou. Ty byly poděleny velikostí signálu pro jednotlivé kovy, aby došlo k normalizaci naměřeného signálu, což může odstranit vlivy, jako jsou fluktuace intenzity laserového paprsku, změny vlastností vzorku nebo nestálosti v detekčním zařízení. Z těchto hodnot byly spočítány relativní směrodatné odchylky (RSD z anglického *Relative standard deviation*) pro každou spektrální čáru, aby bylo vidět, jak použitá vrstva zajistí stabilnější signál. Relativní směrodatné odchylky jsou v grafech na Obrázcích č. 18 zobrazeny na ose y, přičemž tyto hodnoty jsou zde vyjádřeny v procentech. K tomuto účelu byly vytvořeny sloupcové grafy, kde modré sloupce představují velikost relativních směrodatných odchylek pro signály vzorků bez vrstvy, a žluté sloupce zase ukazují velikost relativní směrodatné odchylky pro signály vzorků s vrstvami podělenými signály příslušných kovů.


a)
podělené signálem kovu
bez vrstvy
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
Ca II
Ca I
Na I


b)
podělené signálem kovu
bez vrstvy
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
Ca II
Ca I
Na I


c)
podělené signálem kovu
bez vrstvy
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
Ca II
Ca I
Na I



Obrázek č. 18: Sloupcové grafy znázorňující velikost relativní směrodatné odchylky (RSD) intenzit vyjádřené v procentech pro vzorky bez vrstev (modře) a vzorky s vrstvami podělené signály příslušných kovů (žlutě) pro jednotlivé spektrální čáry u a) chromu, b) titanu, c) niklu, d) zlata.

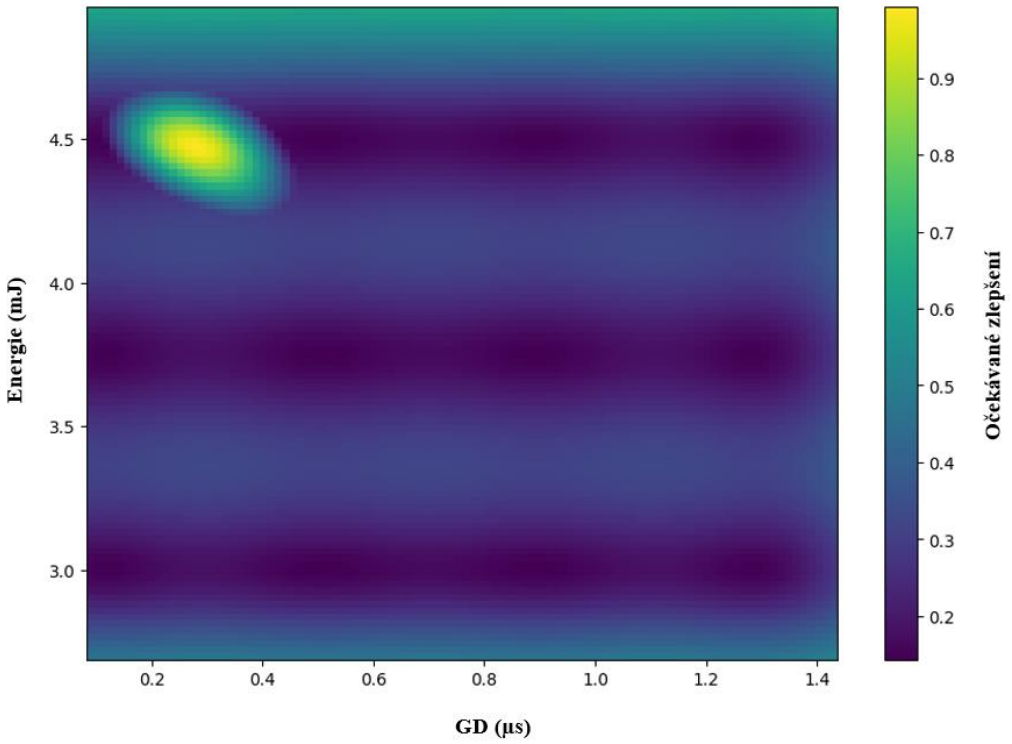
Ze sloupcových grafů je názorně vidět, že přidání vrstvy poskytlo výrazné zlepšení (pokles relativní standardní odchylky) pro všechny spektrální čáry u niklu. Vrstva titanu a zlata na povrchu vzorku rovněž přinesla snížení relativní standardní odchylky, zatímco kovová vrstva chromu způsobila minimální zlepšení.

Na základě všech uskutečněných měření týkajících se výpočtů poměrů signálů k šumu, analýz intenzit jednotlivých spektrálních čar a rozboru rozprášení vytvořeného kolem kráterů vzniklých po dopadu laserového pulzu, bylo rozhodnuto, že chemické prvky, které nejlépe vyhovují podstatě vnitřního standardu, jsou titan a nikl. Tyto kovy by mohly v budoucnu zaujmout místo pro potenciální standardizaci měkkých tkání, a nahradit tak spektrální čáru uhlíku, která se již jeví jako nedostatečná. Pro optimalizaci parametrů v tomto experimentu byl nakonec vybrán titan.

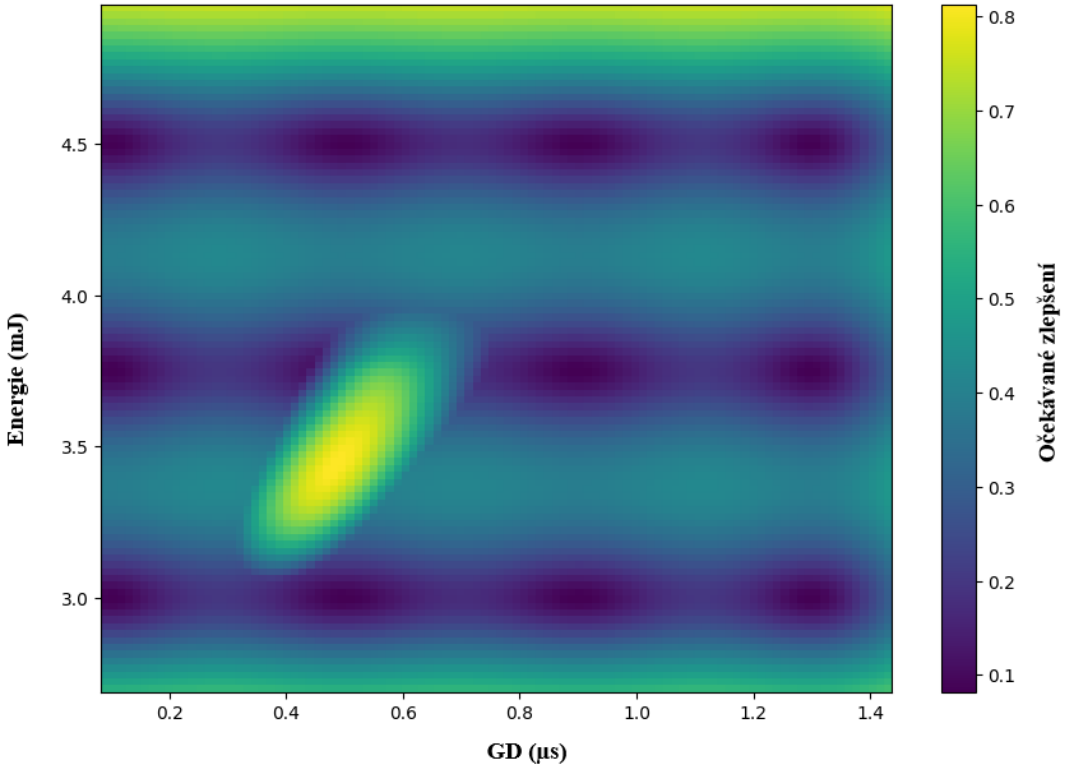
5.2 Optimální parametry získané z optimalizace

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.4, vstupními daty do optimalizace byly hodnoty tří parametrů. Energie laserového pulzu (s hodnotami 4,5 mJ, 3,75 mJ, 3 mJ), zpoždění sběru signálu – GD (0,1 µs, 0,5 µs, 0,9 µs, 1,3 µs) a tloušťka vrstvy titanu (7 nm, 14 nm, 21 nm, 28 nm, 35 nm). Po spuštění algoritmu bylo dosaženo pro spektrální čáru Ca II 393 nm následujícího výsledku (Obrázek č. 19). Bylo vyhodnoceno, že místo lokálního maxima v poli očekávaného zlepšení ukázalo na trojici parametrů: tloušťka vrstvy - 6,3 nm, zpoždění sběru signálu – GD - 0,28 µs a energie laserového pulzu 4,47 mJ. Tloušťka tenké vrstvy 6,3 nm se sice nevyskytuje v původních naměřených datech, avšak pole pro predikce SNR i pro určení nejlepšího očekávaného zlepšení byla zvětšena o jistou hodnotu v případě, že by se optimální parametry nacházely i mimo škálu naměřených hodnot. Trojice optimalizovaných parametrů poukazuje na to, že ideálním nastavením je tedy zvolení nejtenčí možné vrstvy s prakticky maximální možnou energií. Volba této kombinace parametrů může znamenat, že laserový pulz bude schopen přes tenčí vrstvu proniknout hlouběji do materiálu, a poskytnout tak lepší účinnost procesu laserové ablace. Na následujícím obrázku je zobrazena teplotní mapa pro očekávané zlepšení právě pro vybranou tloušťku 6,30 nm, kde je názorně vyznačena oblast s nejlepším

očekávaným zlepšením, odkud i pochází trojice optimalizovaných parametrů získaných na základě určení lokálního maxima v této oblasti.



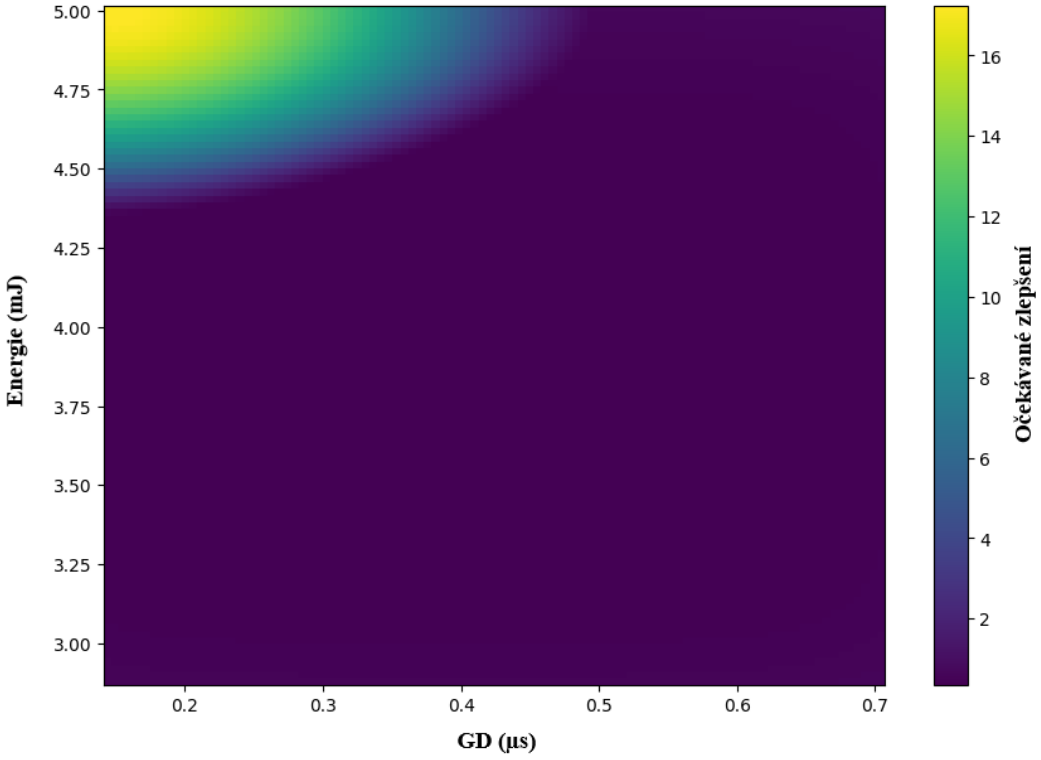
Obrázek č. 19: 2D mapa představující očekávané zlepšení pro tloušťku 6,30 nm u spektrální čáry Ca II 393 nm.



Obrázek č. 20: 2D mapa představující očekávané zlepšení pro tloušťku 6,30 nm u spektrální čáry Ca I 422 nm.

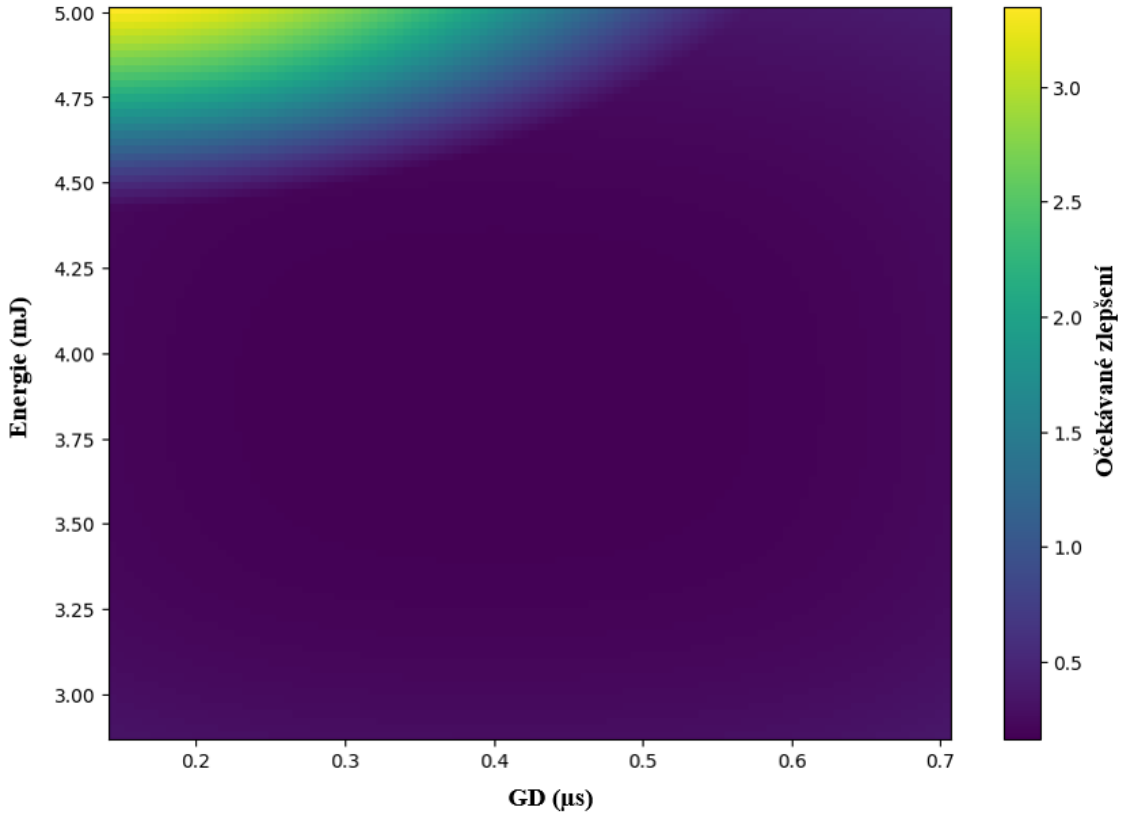
Z Obrázku č. 20 je patrné, že pro spektrální čáru Ca II 422,67 nm se oblast největšího očekávaného zlepšení, tedy i lokální maximum oproti analýze u spektrální čáry Ca I 393 nm, objevila v jiném místě teplotní mapy. To znamená, že optimální parametry s výjimkou tloušťky vrstvy mají jiné hodnoty. Konkrétně jsou následující: tloušťka vrstvy - 6,3 nm, zpoždění sběru signálu – GD - 0,48 µs a energie laserového pulzu - 3,43 mJ.

Na základě vyhodnocení očekávaného zlepšení u spektrální čáry Ca II 393 nm a Ca 422,67 nm byla vytvořena mřížka s jemnějším krokem kolem oblastí, kde bylo očekávané zlepšení největší. Tentokrát byly vstupní parametry zvoleny následovně: tloušťka vrstvy (5,5 nm, 7,15 nm, 8,9 nm), energie laserového pulzu (3,2 mJ, 3,65 mJ, 4,1 mJ, 4,55 mJ) a doba zpoždění sběru – GD (0,16 µs, 0,32 µs, 0,48 µs, 0,64 µs). Opět bylo provedeno vyhodnocení pomocí stejného algoritmu a ten jako novou trojici optimálních parametrů tentokrát zvolil tloušťku vrstvy 8,80 nm, zpoždění sběru signálu – GD - 0,15 µs a energii laserového pulzu 4,98 mJ pro spektrální čáru Ca II 393 nm.



Obrázek č. 21: 2D mapa představující očekávané zlepšení pro tloušťku 8,80 nm u spektrální čáry Ca II 393 nm.

Tentýž postup byl proveden pro spektrální čáru Ca I 422,67 nm. Oproti spektrální čáře Ca II 393 nm nedosahuje maximum očekávaného zlepšení zdaleka tak vysoké hodnoty. Algoritmus našel optimální parametry v této podobě: tloušťka vrstvy 8,80 nm, zpoždění sběru signálu – GD - 0,14 µs a energie laserového pulzu 5,0 mJ. Lze vidět, že v tomto případě je rozdíl oproti spektrální čáře Ca II 393 nm minimální.



Obrázek č. 22: 2D mapa představující očekávané zlepšení pro tloušťku 8,80 nm u spektrální čáry Ca II 422,67 nm.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala hledáním nového vnitřního standardu pro analýzu LIBS měkkých tkání a optimalizací parametrů při této analýze. Jelikož je aplikace kovových tenkých vrstev při analýze LIBS měkkých tkání dosud neprozkoumanou disciplínou, může tato nově nalezená metoda standardizace přinést zcela nový postup při měření biologických měkkých tkání a nahradit tak uhlík, který se již jeví jako nedostatečný. Optimalizace parametrů byla provedena pomocí implementace částí Bayesovské optimalizace. Tato metoda optimalizace parametrů je v souvislosti s analýzou LIBS také nepříliš využívanou technikou, přičemž použití Bayesovské optimalizace u analýzy LIBS měkkých tkání nebylo dosud provedeno.

První část práce týkající se výběru nového vnitřního standardu zahrnovala provedení měření na vzorcích pokrytých kovovými vrstvami. Byla vybrána pětice kovů (Cr, Ti, Ni, W, Au), které byly použity k pokovování vzorků myších jater zalitých v parafínu. Myší játra byla vybrána na základě velikosti, snadné dostupnosti a homogenity. Měření probíhalo na přístroji LIBS FireFly, přičemž experimentální parametry byly nastaveny na následující hodnoty. K analýze byl použit laser s vlnovou délkou 266 nm, energií laserového pulzu 5 mJ a zpožděním sběru signálu – GD 0 s. Kovová vrstva na povrchu vzorku byla nastavena na 10 nm. Data z měření byla vyhodnocována pomocí poměru signálu k šumu (SNR). Byly spočteny hodnoty SNR jednak pro spektrální čáry jednotlivých kovů, tak i pro spektrální čáry biogenních prvků hojně se vyskytujících v matrici. Konkrétně se jednalo o atomové a iontové spektrální čáry vápníku (Ca I 422,67 nm, Ca II 393 nm) a atomovou spektrální čáru sodíku (Na I 589 nm). Tyto analýzy poukázaly na kovy, které jsou v matrici dobře detekovatelné a které poskytují nejlepší signál. Ze všech analýz byly vytvořeny grafy obsahující průměrné hodnoty SNR pro každý prvek s příslušnými směrodatnými odchylkami. Zajímavé výsledky poskytlo rovněž měření velikosti rozprášení kolem kráterů vzniklých po dopadu laserového pulzu. To může výrazně ovlivnit kvalitu prostorového rozlišení při mapování měkkých tkání. Při pozorování bylo zjištěno, že titan se jako jediný z vybraných prvků vůbec nerozprašuje. Na základě všech provedených experimentů a analýz bylo rozhodnuto, že kovy, které by mohly být využity při vytvoření nové metody standardizace pro LIBS analýzu měkkých tkání, jsou titan a nikl. Tento závěr plyne především z výsledků analýz, kde se oba tyto prvky jevily lépe než ostatní, ať už z hlediska detekce, ovlivňování signálu, stability dat či velikosti rozprášení, kdy nikl měl po titanu nejmenší rozprášení ze zbylých kovů.

Druhá část zahrnovala implementaci částí Bayesovské optimalizace k nalezení tří optimálních parametrů, které by mohly být použity při LIBS analýze měkkých tkání. Těmito optimalizovanými parametry byly tloušťka vrstvy titanu, energie laserového pulzu a zpoždění sběru signálu – GD. Algoritmus obsahuje fragmenty nezbytné pro tuto optimalizaci, jako jsou Gaussovské procesy nebo akviziční funkce. Ta byla v tomto experimentu zastoupena v podobě očekávaného zlepšení. Toto očekávané zlepšení bylo spočítáno na základě skutečných a predikovaných hodnot SNR. Nejprve byla do algoritmu nahrána data z měření s větším krokem mezi jednotlivými hodnotami. Pro výpočet SNR byly vybrány spektrální čáry vápníku (Ca I 422,67, Ca II 393,37 nm). Optimální parametry náležely lokálnímu maximu v oblasti s nejvyšším očekávaným zlepšením. Po vyhodnocení byla vytvořena nová mřížka parametrů, která vznikla kolem oblastí s nejvyšším očekávaným zlepšením pro obě použité spektrální čáry. Tato mřížka s již jemnějším krokem byla použita k dalšímu měření a data z tohoto měření byla opět použita při nové optimalizaci.

V bakalářské práci bylo dosaženo některých zajímavých výsledků. Nalezení nového vnitřního standardu by mohlo v budoucnu přispět ke vzniku nové metodiky pro standardizaci biologických měkkých tkání, a výrazně tak eliminovat efekty matričního jevu. To by mohlo vést k lepším výsledkům v biozobrazování a zavedení nového diagnostického aparátu. Využitím této metody optimalizace parametrů lze dosáhnout menší časové náročnosti a zefektivnit celý průběh analýzy. Oba tyto experimenty mohou přinést zajímavé podklady pro navazující výzkum, přičemž kovové vrstvy na površích biologických matric při LIBS analýze a optimalizace parametrů využívající Bayesovskou optimalizaci jsou v tomto ohledu zcela průkopnické.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] HURST, G. S.; GRAYBEAL J.D.; STONE O.J. a CHU S. Spectroscopy. Encyclopedia Britannica. Edinburgh, VB: Encyclopedia Britannica [online], 2020 Dostupné z: https://www.britannica.com/science/spectroscopy

[2] History of spectroscopy. *Kruess* [online]. 2024. Dostupné z: https://www.kruess.com/en/campus/spectroscopy/history-of-spectroscopy/

[3] PANDEY A. Spectroscopy: Introduction, principles, types and applications. *Microbiology Notes* [online]. 2020. Dostupné z: https://microbiologynotes.org/spectroscopy-introduction-principles-types-and-applications/

[4] HARVEY A. Overview of Spectroscopy. *Chemistry LibreTexts* [online]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/10%3A_Spectroscopic_Methods/10.01%3A_Overview_of_Spectroscopy

[5] What is Optical Emission Spectroscopy (OES)? *AZoM* [online]. 2018. Dostupné z: https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=15632

[6] HUDSON, S. W.; CRAPARO, J.; DE SARO, R. a APELIAN, D. Applications of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) in Molten Metal Processing. *Metallurgical and Materials Transactions B* [online]. 2017, roč. 48, č. 5, s. 2731-2742 [cit. 2024-05-22] ISSN 1073-5615. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11663-017-1032-7

[7] HERMAN, I. P. Optical Emission Spectroscopy. *Optical Diagnostics for Thin Film Processing* [online]. Elsevier, 1996, s. 157-213 [cit. 2024-05-22]. ISBN 9780123420701. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-012342070-1/50007-3

[8] SANDERS W. Optical Emission Spectroscopy Overview. *Hitachi High Tech Analytical Science* [online]. 2017. Dostupné z: https://hha.hitachi-hightech.com/en/blogs-events/blogs/2017/10/25/optical-emission-spectroscopy-(oes)/

[9] KAISER, J.; NOVOTNÝ, K; MARTIN, M., Z.; HRDLIČKA, A.; MALINA, R. et al. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy—Biological applications. *Surface Science Reports* [online]. 2012, roč. 67, č. 11-12, s. 233-243 [cit. 2024-05-22] ISSN 01675729. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2012.09.001

[10] CREMERS, D. a CHINNI, R. C. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2009, roč. 44, č. 6, s. 457-506 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0570-4928. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/05704920903058755

[11] GALBÁCS, G. A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2015, č. 407(25), s. 7537-7562 [cit. 2024-05-22]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015 8855-3

[12] RADZIEMSKI, L. a CREMERS, D. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic*

Spectroscopy [online]. 2013, roč. 87, s. 3-10. [cit. 2024-05-22]. ISSN 05848547. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.05.013

[13] POŘÍZKA, P.; MODLITBOVÁ, P. a KAISER, J. Imaging of Biological Tissues. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences* [online]. Cham: Springer International Publishing. 2022, s. 139-164 [cit. 2024-05-22]. ISBN 978-3-031-14501-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-031-14502-5_6

[14] THAKUR, S. N. a SINGH, J. P. Fundamentals of LIBS and recent developments. In: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* [online]. Elsevier, 2020, s. 3-22. [cit. 2024-05-22]. ISBN 9780128188293. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818829-3.00001-0

[15] KULHÁNEK, P. *Úvod do teorie plazmatu*. Praha: AGA, 2011. ISBN 978-80904582 2-2

[16] Úvod do fyziky plazmatu. *Plazma* [online]. Dostupné z: https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/s4r/plazma/.

[17] RAI, V. N. a THAKUR, S. N. Instrumentation for LIBS and recent advances. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* [online]. Elsevier, 2020, s. 107-136 [cit. 2024-05-22]. ISBN 9780128188293. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818829-3.00005-8

[18] PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L. M C. a GONZAGA, F. B. Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2007, roč. 18, č. 3, s. 463-512 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0103-5053. Dostupné z: https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000300002

[19] KAISER, J. *Spektroskopie laserem buzeného plazmatu: Laser-induced breakdown spectroscopy: teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru aplikovaná fyzika*. Brno: VUTIUM, 2012. ISBN 978-80-214-4423-2.

[20] MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V. a SCHECHTER, I. Plasma morphology Cambridge University Press, 2006, s. 40-121 [cit. 2024-05-22]. ISBN 9780511541261. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/CBO9780511541261.003

[21] THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Bremsstrahlung. *Encyclopaedia Britannica* [online]. 2018. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/bremsstrahlung

[22] NOVOTNÝ, K.; KAISER, J.; HRDLIČKA, A.; MALINA, R.; VÉMOLA, T.; PROCHAZKA, D.; NOVOTNÝ, J.; KANICKÝ, V. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Československý časopis pro fyziku, 2010, roč. 60, č. 4–5, s. 280-285. ISSN: 0009–0700

[23] NOVOTNÝ, J.; NOVOTNÝ K.; PROCHÁZKA D.; HRDLIČKA A. a KAISER J. Two dimensional elemental mapping by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectroscopy europe* [online]. 2014, roč. 26, č. 6, s. 6-10 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0966-0941. Dostupné z: https://www.spectroscopyeurope.com/article/two-dimensional-elemental-mapping-laser-induced-breakdown-spectroscopy

[24] HECHT, J. Laser | Definition, Acronym, Principle, Applications, & Types. *Encyclopedia Britannica* [online]. Dostupné z. https://www.britannica.com/technology/laser

[25] Laser | Types and Components of Laser. Electrical 4 U [online]. Dostupné z: https://www.electrical4u.com/laser-types-and-components-of-laser/?utm_content=cmp-true

[26] QUIMBY, R. S. a POWELL, R. C. Types of Lasers. *Springer Handbook of Atomic, Molecular, and Optical Physics*. *Springer Handbooks* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2023, s. 1081-1095 [cit. 2024-05-22]. ISBN 978-3-030-73892-1. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-030-73893-8_75

[27] PASCHOTTA, R. Pulsed lasers. *RP Photonics AG* [online]. 2024. Dostupné z: https://www.rp-photonics.com/pulsed_lasers.html

[28] Lasers: Understanding the Basics. *Photonics Marketplace* [online]. Dostupné z: https://www.photonics.com/Articles/Lasers_Understanding_the_Basics/a25161

[29] THEERTHAGIRI, J.; KARUPPASAMY, K.; LEE, S.; SHWETHARANI, R.; KIM, H. et al. Fundamentals and comprehensive insights on pulsed laser synthesis of advanced materials for diverse photo – and electrocatalytic applications. *Light: Science & Applications* [online]. 2022, roč. 11, č. 1 [cit. 2024-05-22]. ISSN 2047-7538. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41377-022-00904-7

[30] GALBÁCS, G. A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2015, č. 407(25), s. 7537-7562 [cit. 2024-05-22]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015 8855-3

[31] LIMBECK, A.; BRUNNBAUER, L.; LOHNINGER, H.; POŘÍZKA, P.; MODLITBOVÁ, P. et al. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, roč. 1147, s. 72-98 [cit. 2024-05-22]. ISSN 00032670. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.054

[32] HARMON, R. S. a SENESI, G. S. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy – A geochemical tool for the 21st century. *Applied Geochemistry* [online]. 2021, roč. 128 [cit. 2024-05-22] ISSN 08832927. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104929

[33] PALLESCHI, V. Laser-induced breakdown spectroscopy: principles of the technique and future trends. *ChemTexts* [online]. 2020, roč. 6, č. 2 [cit. 2024-05-22]. ISSN 2199-3793. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s40828-020-00114-x

[34] Overview of Echelle Spectograph Flexible Spectroscopy Tool. *Oxford Instruments* [online]. Dostupné z: https://andor.oxinst.com/learning/view/article/echelle-spectrographs-a-flexible-tool-for-spectroscopy

[35] CCD vs. CMOS-srovnání senzorů. W-TECHNIKA [online]. Dostupné z: https://www.w-technika.cz/ccd-vs-cmos-srovnani-senzoru/

[36] Silicon-Based CCD Sensor Technology: The Basics. *Teledyne Princeton Instruments* [online]. Dostupné z: https://www.princetoninstruments.com/learn/camera-fundamentals/ccd-the-basics

[37] ICCD and emICCD Cameras: The Basic Educational Notes: ICCD Sensors. TELEDYNE: *Teledyne Princeton Instruments* [online]. Dostupné z: https://www.princetoninstruments.com/learn/camera-fundamentals/iccd-and-emiccd basics

[38] SINGH, V. K. a RAI, A. K. Prospects for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review. *Lasers in Medical Science* [online]. 2011, roč. 26, č. 5, s. 673-687 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0268-8921. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10103-011-0921-2

[39] ZHANG, Y.; ZHANG, T. a LI, H. Application of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in environmental monitoring. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2021, roč. 181 [cit. 2024-05-22]. ISSN 05848547. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sab.2021.106218

[40] MODLITBOVÁ, P.; POŘÍZKA, P. a KAISER, J. Laser-induced breakdown spectroscopy as a promising tool in the elemental bioimaging of plant tissues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, roč. 122 [cit. 2024-05-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115729

[41] SASAZAWA, S.; KAKINO, S. a MATSUURA, Y. Optical-fiber-based laser-induced breakdown spectroscopy for detection of early caries. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2015, roč. 20, č. 6 [cit. 2024-05-22]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.6.065002

[42] SANTOS, D.; SAMAD, R. E.; TREVIZAN, L. C.; DE FREITAS, A. Z.; VIEIRA, N. D. et al. Evaluation of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Animal Tissues. *Applied Spectroscopy* [online]. 2008, roč. 62, č. 10, s. 1137-1143 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0003-7028. Dostupné z: https://doi.org/10.1366/000370208786049105

[43] HARMON, R. S. a SENESI, G. S. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy – A geochemical tool for the 21st century. *Applied Geochemistry* [online]. 2021, roč. 128 [cit. 2024-05-22]. ISSN 08832927. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104929

[44] GAUDIUSO, R. Laser-induced breakdown spectroscopy in cultural heritage science. *Spectroscopy, Diffraction and Tomography in Art and Heritage Science* [online]. Elsevier, 2021, s. 209-251 [cit. 2024-05-22]. ISBN 9780128188606. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818860-6.00002-7

[45] NOLL, R. Quantitative Analysis. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, s. 207-220 [cit. 2024-05-22]. ISBN 978-3-642-20667-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-20668-9_11

[46] VAN DEN EYNDE, S.; DÍAZ-ROMERO, D. J.; ZAPLANA, I. a PEETERS, J. Deep learning regression for quantitative LIBS analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic*

Spectroscopy [online]. 2023, roč. 202 [cit. 2024-05-22]. ISSN 05848547. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sab.2023.106634

[47] HAHN, D. W. a OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Applied Spectroscopy* [online]. 2012, roč. 66, č. 4, s. 347-419 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0003-7028. Dostupné z: https://doi.org/10.1366/11-06574

[48] YANG, J.; LI, X.; XU, J. a MA, X. A Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (CF-LIBS) Quantitative Analysis Method Based on the Auto-Selection of an Internal Reference Line and Optimized Estimation of Plasma Temperature. *Applied Spectroscopy* [online]. 2018, roč. 72, č. 1, s. 129-140 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0003-7028. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/0003702817734293

[49] HUSSAIN SHAH, S. K.; IQBAL, J.; AHMAD, P.; KHANDAKER, M. U.; HAQ, S. et al. Laser induced breakdown spectroscopy methods and applications: A comprehensive review. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 2020, roč. 170 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0969806X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.108666

[50] WANG, X.; JIN, Y.; SCHMITT, S. a OLHOFER, M. Recent Advances in Bayesian Optimization. *ACM Computing Surveys* [online]. 2023, roč. 55, č. 13s, s. 1-36 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0360-0300. Dostupné z: https://doi.org/10.1145/3582078

[51] GARNETT, R. Introduction. Online. In: *Bayesian Optimization*. Cambridge University Press, 2023, s. 1-14 [cit. 2024-05-22]. ISBN 9781108348973. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/9781108348973.002

[52] MARTINEZ-CANTIN, R. BayesOpt: A Bayesian Optimization Library for Nonlinear Optimization, Experimental Design and Bandits. *Journal of Machine Learning Research* [online]. 2014, roč. 15, s. 3915−3919 [cit. 2024-05-22]. Dostupné z: https://dl.acm.org/doi/10.5555/2627435.2750364

[53] BROCHU, E.; CORA, V. a DE FREITAS, N. A Tutorial on Bayesian Optimization of Expensive Cost Functions, with Application to Active User Modeling and Hierarchical Reinforcement Learning. Online. 2010. Dostupné z: https://arxiv.org/abs/1012.2599

[54] WANG, Z.; HUTTER, F.; ZOGHI, M.; MATHESON, D. a DE FREITAS, N. Bayesian Optimization in a Billion Dimensions via Random Embeddings. Online. 2013. Dostupné z: https://arxiv.org/abs/1301.1942v2

[55] WANG, Z. a DE FREITAS, N. Theoretical Analysis of Bayesian Optimisation with Unknown Gaussian Process Hyper-Parameters. Online. 2014. Dostupné z: https://arxiv.org/abs/1406.7758v1

[56] SWERSKY, K.; SNOEK, J. a ADAMS, R. P. Multi-Task Bayesian Optimization. Online. 2013. Dostupné z: https://www.semanticscholar.org/paper/Multi-Task-Bayesian-Optimization-Swersky-Snoek/35e7925616123355a232231deb2182fb38663214

[57] WANG, Q.; XIANGLI, W.; TENG, G.; CUI, X. a WEI, K. A brief review of laser-induced breakdown spectroscopy for human and animal soft tissues: pathological diagnosis and physiological detection *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2021, roč. 56, č. 3, s. 221-241 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0570-4928. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1791151

[58] ŠINDELÁŘOVÁ, A; POŘÍZKA, P; MODLITBOVÁ, P; VRLÍKOVÁ, L.; KISS, K. et al. Methodology for the Implementation of Internal Standard to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Analysis of Soft Tissues. *Sensors* [online]. 2021, roč. 21, č. 3 [cit. 2024-05-22]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/s21030900

[59] SANCEY, L.; MOTTO-ROS, V.; BUSSER, B.; KOTB, S.; BENOIT, J. M. et al. Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. *Scientific Reports* [online]. 2014, roč. 4, č. 1 [cit. 2024-05-22]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/srep06065

[60] LIMBECK, A.; GALLER, P.; BONTA, M.; BAUER, G.; NISCHKAUER, W. et al. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, roč. 407, č. 22, s. 6593-6617 [cit. 2024-05-22]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00216-015-8858-0

[61] VANHAECKE, F. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta* [online]. Roč. 39, č. 7, s. 737-742 [cit. 2024-05-22]. ISSN 00399140. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0039-9140(92)80088-U

[62] KONZ, I.; FERNÁNDEZ, B.; FERNÁNDEZ, M. L.; PEREIRO, R.; GONZÁLEZ, H. et al. Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, roč. 405, č. 10, s. 3091-3096 [cit. 2024-05-22]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00216-013-6778-4

[63] BONTA, M.; LOHNINGER, H.; MARCHETTI-DESCHMANN, M. a LIMBECK, A. Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments. *The Analyst* [online]. 2014, roč. 139, č. 6 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/c3an01511d

[64] SATO, T.; TASHIRO, K.; KAWAGUCHI, Y.; OHMURA, H. a AKIYAMA, H. Bayesian optimization of the conditions for highly sensitive detection of surface contamination by laser-induced breakdown spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2023, roč. 38, č. 11, s. 2458-2467 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0267-9477. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/D3JA00195D

[65] JOLIVET, L.; LEPRINCE, M.; MONCAYO, S.; SORBIER, L.; LIENEMANN, C. P. et al. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, roč. 151, s. 41-53 [cit. 2024-05-22]. ISSN 05848547. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.11.008

[66] JANTZI, S. C.; MOTTO-ROS, V.; TRICHARD, F.; MARKUSHIN, Y.; MELIKECHI, N. et al. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. Online. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2016, roč. 115, s. 52-63 [cit. 2024-05-22]. ISSN 05848547. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.11.002

[67] GRÜNEBERG, H. Biology of the Laboratory Mouse. *Nature* [online]. 1942, roč. 150, č. 3795, s. 101-102 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/150101a0.

[68] Leica EM ACE600 High Vacuum Sputter Coater. *Leica Microsystems* [online]. Dostupné z: https://www.leica-microsystems.com/products/sample-preparation-for-electron-microscopy/p/leica-em-ace600/

[69] DEPLA, D.; MAHIEU, S. a GREENE, J.E. Sputter Deposition Processes. *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings* [online]. Elsevier, 2010, s. 253-29 [cit. 2024-05-22]. ISBN 9780815520313. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2031-3.00005-3

[70] FireFly: Rapid Multi-Elemental Analysis and Chemical Imaging. LIGHTIGO [online]. Dostupné z: https://lightigo.com/firefly/

[71] NIST: National Institute of Standards and Technology [online]. Dostupné z: https://www.nist.gov/

[72] How to calculate signal to noise Ratio. HORIBA [online]. Dostupné z: https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/how-to-calculate-signal-to-noise-ratio/

[73] BECKERS, T. An Introduction to Gaussian Process Models. Online. 2021. Dostupné z: https://arxiv.org/abs/2102.05497

[74] KAMPERIS, S. Acquisition functions in Bayesian Optimization. *Let's talk about science!* [online]. Dostupné z: https://ekamperi.github.io/machine%20learning/2021/06/11/acquisition-functions.html

[75] KISS, K.; ŠINDELÁŘOVÁ, A.; KRBAL, L.; STEJSKAL, V.; MRÁZOVÁ, K. et al. Imaging margins of skin tumors using laser-induced breakdown spectroscopy and machine learning. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2021, roč. 36, č. 5, s. 909-916 [cit. 2024-05-22]. ISSN 0267-9477. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/D0JA00469C

[76] KHAN, M. N.; WANG, Q.; IDREES, B. S.; XIANGLI, W.; TENG, G. et al. A Review on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Different Cancers Diagnosis and Classification. *Frontiers in Physics* [online]. 2022, roč. 10 [cit. 2024-05-22] ISSN 2296-424X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fphy.2022.821057

[77] BRUNNBAUER, L.; GAJARSKA, Z.; LOHNINGER, H. a LIMBECK, A. A critical review of recent trends in sample classification using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2023, roč. 159 [cit. 2024-05-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116859