

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziky

Mapování distribuce barviva v polymeru pomocí
Ramanovy mikrospektroskopie

Bakalářská práce

Autor: Martin Neumann
Studijní program: B0533A110005 - Fyzikálně-
technická měření a výpočetní
technika
Studijní obor: Fyzikálně-technická měření a
výpočetní technika
Vedoucí práce: Mgr. Jan Loskot, Ph.D.

Zadání bakalářské práce

Autor: Martin Neumann

Studium: S20FY003BK

Studijní program: B0533A110005 Fyzikálně-technická měření a výpočetní technika

Studijní obor: Fyzikálně-technická měření a výpočetní technika

Název bakalářské práce: **Mapování distribuce barviva v polymeru pomocí Ramanovy mikrospektroskopie**

Název bakalářské práce AJ: Mapping of dye distribution in a polymer by Raman microspectroscopy

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem práce je změřit plošné rozložení barviva Solvent Violet 13 ve vlákně polymeru polydioxanon. Vlákná z tohoto polymeru, obarvená zmíněným barviem, jsou využívána v medicíně jako biodegradabilní materiál. Student provede mapování povrchové vrstvy vlánka pomocí Ramanovy spektroskopie a v softwaru LabSpec 6 vyhodnotí rozložení barviva ve zkoumané oblasti.

Teoretická část práce bude obsahovat základy vibrační spektroskopie, popis Ramanova spektrometru a příklady využití Ramanovy spektroskopie ve vědě i v praxi.

Praktickým výstupem budou mapy distribuce barviva v polymeru s vysokým rozlišením (jednotky mikrometrů). Výsledky budou diskutovány s ohledem na dobu degradace měřeného polymeru.

E.Smith, G. Dent: Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach

Manuály ke spektrometru Horiba XploRA PLUS Confocal Raman Microscope

J. Chalmers, H.G.M. Edwards, M.D. Hargreaves (eds.): Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science

Zadávací pracoviště: Katedra fyziky,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: Mgr. Jan Loskot, Ph.D.

Oponent: Mgr. Zuzana Malá, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 11.8.2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny zdroje, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 5. 7. 2023

Martin Neumann

Poděkování:

Chtěl bych tímto poděkovat vedoucímu práce Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. a RNDr. Danielu Jezberovi za jejich ochotný přístup, cenné rady, trpělivost a veškerý čas strávený při konzultacích a revizích, které mi pomohly ke zdárnému dokončení této práce.

Anotace

NEUMANN, Martin. *Mapování distribuce barviva v polymeru pomocí Ramanovy mikrospektroskopie*. Hradec Králové, 2023. Bakalářská práce na Katedře fyziky Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Vedoucí práce Mgr. Jan Loskot, Ph.D., 39 s.

Práce je zaměřena na měření plošného rozložení barviva Solvent Violet 13 ve vlákně polymeru polydioxanon. Vlákná z tohoto polymeru obarvená zmíněným barvivem jsou využívána v medicíně jako biodegradabilní materiál. V teoretické části práce jsou popsány základy vibrační spektroskopie, princip Ramanova spektrometru a příklady využití Ramanovy spektroskopie ve vědě i v praxi. Experimentální část se věnuje mapování povrchové vrstvy vlákna pomocí Ramanovy spektroskopie a vyhodnocování rozložení barviva ve zkoumané oblasti s využitím softwaru LabSpec 6. Praktickým výstupem jsou mapy distribuce barviva v polymeru s vysokým rozlišením (jednotky mikrometrů). Výsledky měření jsou interpretovány, rovněž je provedeno porovnání různých druhů spektrálních map.

Klíčová slova

polydioxanon, barvivo Solvent Violet 13, Ramanova spektroskopie, Ramanův spektrometr, spektrální mapování

Annotation

NEUMANN, Martin. *Mapping of dye distribution in polymer by Raman microspectroscopy*. Bachelor thesis at the Department of Physics, Faculty of Science, University of Hradec Králové. Thesis supervisor Mgr. Jan Loskot, Ph.D., 39 p.

The work is focused on the measurement of the area distribution of the dye Solvent Violet 13 in a polydioxanone polymer fiber. Fibers of this polymer, dyed with the mentioned dye, are used in medicine as a biodegradable material. The theoretical part of the thesis describes the basics of vibrational spectroscopy, the principle of the Raman spectrometer, and examples of the use of Raman spectroscopy in science and practice. The experimental part is devoted to the mapping of the fiber surface layer using Raman spectroscopy and the evaluation of the dye distribution in the investigated area using LabSpec 6 software. The practical output is high-resolution (micrometers) maps of the dye distribution in the polymer. The results of the measurements are interpreted and a comparison of the different types of spectral maps is made.

Keywords

polydioxanone, Solvent Violet 13 dye, Raman spectroscopy, Raman spectrometer, spectral mapping

Obsah

Úvod.....	8
1 Ramanova spektroskopie.....	9
1.1 Historie.....	9
1.2 Fyzikální princip.....	11
1.3 Ramanův spektrometr.....	13
1.3.1 Disperzní spektrometr.....	14
1.3.2 Spektrometr s Fourierovou transformací.....	15
1.3.3 Obecné poznatky ohledně parametrů měření.....	16
1.4 Ramanovo spektrum.....	17
1.4.1 Obecně o Ramanově spektru.....	17
1.4.2 Fluorescence.....	19
1.5 Příklady použití Ramanovovy spektroskopie.....	21
2 Experimentální část.....	23
2.1 Polydioxanon.....	23
2.2 Použitý Ramanův mikrospektrometr a jeho kalibrace před měřením.....	24
2.3 Použitý vzorek a jeho příprava pro měření.....	26
2.4 Mapování Ramanových spekter.....	26
2.5 Vyhodnocení měření.....	27
Závěr.....	33
Seznam použité literatury.....	34
Příloha č.1 - oblast mapování.....	38

Úvod

Na konci dvacátých let dvacátého století došlo k objevu profesorem Chandrasekhara Venkata Ramanem, který spolu se sirem Kariamanickam Srinivasa Krišnem pozorovali jev neelastického rozptylu světla a z něj vzešel objev, který byl následně pojmenován jako Ramanovo spektrum [1, 2]. Ramanova spektroskopie (dále v textu jen RS) je stejně jako infračervená spektroskopie metodou vibrační spektroskopie [1].

Tento objev vedl k následnému vývoji měřících přístrojů a jejich aplikaci, které mají v dnešní době velmi široké spektrum využití. Stále dochází k výzkumu v různých odvětvích vyžadující chemickou a strukturální analýzu rozličných materiálů. Široké uplatnění nachází Ramanova spektroskopie např. v lékařství [3].

Dalším v dnešní době se stále vyvíjející oblastí jsou polymery a jejich použití v lékařství. Zde také stále dochází k výzkumu možnosti dalšího využití, například k 3D tisku vstřebatelných ortopedických implantátů z polydioxanonu [4]. V této práci byl zkoumán vzorek vlákna z polydioxanonu od firmy ELLA, která jej využívá pro stenty aplikované do těla pacientů, kde následně dochází k degradaci a k vstřebání tohoto polymeru. Práce je zaměřená na mapování barviva Solvent Violet 13, kterým je tento polymer obarven, pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Zaměření práce je na zjištění výskytu tohoto barviva v použitém vzorku.

Tato bakalářská práce je rozdělena do dvou kapitol. První kapitola popisuje Ramanovu spektroskopii a obsahuje pět podkapitol, ve kterých je popsána historie objevu Ramanovy spektroskopie, následně fyzikální princip, dále uvedení dvou typů nejvíce používaných spektrometrů a jejich princip. V dalších podkapitolách jsou uvedeny obecné poznatky ohledně parametrů měření a popis Ramanova spektra, včetně principu fluorescence, která nám ve značné míře může zkomplikovat samotné měření. Fluorescenci je potřeba brát v potaz před zahájením samotného měření, například provedením očištění vzorku od nečistot, aby nebyla naměřená data zkreslena. V poslední páté podkapitole jsou uvedeny příklady použití Ramanovy spektroskopie. Kapitola druhá je zaměřena na experimentální část a je rozdělena do pěti podkapitol. V první podkapitole je popsán polymer polydioxanon, který byl mapován Ramanovou mikrospektroskopií. V druhé podkapitole je uveden použitý přístroj XploRA PLUS od firmy HORIBA a jeho kalibrace před samotným měřením vzorku. V třetí podkapitole je popsán použitý vzorek a jeho příprava pro měření. Ve čtvrté podkapitole jsou jednotlivá změřená Ramanova spektra a v poslední páté podkapitole je vyhodnocení měření. V závěru této práce jsou pak uvedeny dosažené výsledky.

1 Ramanova spektroskopie

1.1 Historie

Ramanova spektroskopie se rozvíjí od 1. poloviny 20. století. Rozptyl monochromatického záření spojený se změnami frekvence byl předpovězen v roce 1923 Adolfem Gustavem Stephanem Smekalem, rakouským teoretickým fyzikem. [5]. Dalšími, kdo tento jev předpovídali byly Kramers, Heisenberg (1925), Schrödinger (1926) a Dirac (1927) [2].

První pozorování neelastického optického rozptylu bylo popsáno v Kalkatě indickým fyzikem Chandrasekhara Venkata Ramanem (viz obr. 1) společně se svými spolupracovníky Kariamanickam Srinivasa Krishnanem a Venkateswaranem. Téměř ve stejnou dobu byl tento objev učiněn i Landsbergem a Mandelstamem v Moskvě v roce 1928 [6, 7, 2].

O tomto objevu následně Raman a jeho spolupracovník Krishnan napsali krátký vědecký článek „A New Type of Secondary Radiation“ v časopise Nature 16. února 1928 a díky tomuto byl také první kdo publikoval spektra rozptýleného záření obsahující linie posunutých frekvencí [2].

Dva roky poté 11. prosince 1930 obdržel Raman za svoji práci Nobelovu cenu za obor spektrometrie [7]. Raman byl následně povýšen do šlechtického stavu. Další jmenování mimo Ramana Nobelovu cenu nezískali. V Indii je slaven národní den vědy 28. února jako upomínka na objev Ramanova jevu [8, 9].



Obrázek 1: Sir Chandrasekhara Venkata Raman (obrázek převzat z [8]).

První spektrometr (viz obrázek 2), na němž pozoroval Chandrasekhara Venkata Raman neelastický rozptyl, využíval sluneční záření zaostřené teleskopem. U cely s měřeným vzorkem byl na vstupu paprsku umístěn modrofialový filtr a na výstupu byl umístěn žlutozelený filtr. Pokud by nedocházelo k neelastickému rozptylu, nepronikalo by přes výstupní žluto zelený filtr žádné záření. Nicméně díky neelastickému rozptylu na vzorku došlo ke změně vlnové délky světla a bylo možné pozorovat procházející záření. Raman se spolupracovníkem Krishnanem byli schopni při použití tohoto přístroje detekovat Ramanovy linie pro přibližně 60 kapalin a plynů [2].



Obrázek 2: První Ramanův spektrometr (obrázek převzat z [10]).

Důležitým bodem, který znamenal posun v Ramanově spektroskopii, byl vynález laseru, který vynalezl T. Maiman v roce 1960. Díky tomu došlo k nahrazení používaných výbojek s rtuťovým obloukem za monochromatický silný zdroj záření, kterými byly lasery. Dalším posunem bylo nahrazení fotografických desek fotonásobiči. Skenovací mřížkové spektrometry nahradily používané hranolové spektrometry a také zavedení dvojných a trojných monochromátorů, včetně propracování techniky vzorkování a využití diodového pole a CCD čipů (charged-couple devices) vedlo k výraznému rozvoji Ramanovy spektroskopie [10].

1.2 Fyzikální princip

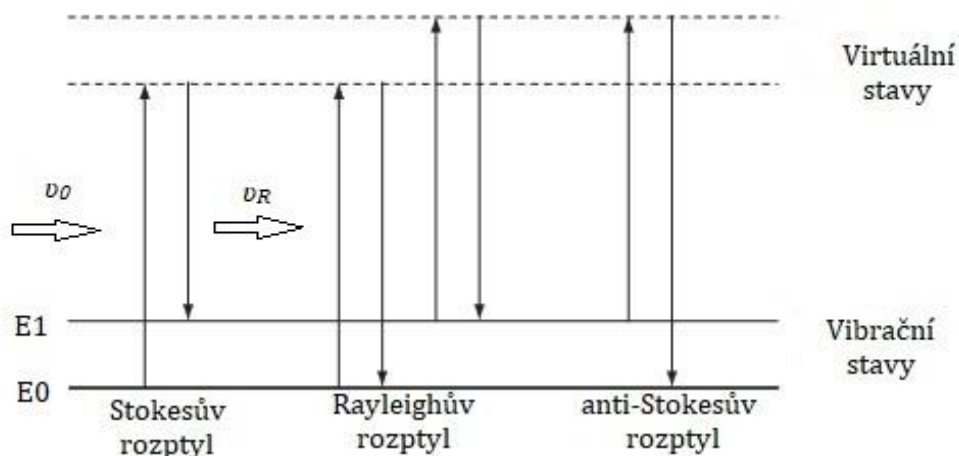
Ramanova spektroskopie se řadí do metod molekulové spektroskopie, kdy molekula podléhá přechodu ze stavu o vyšší energetické hladině E_1 do stavu nižší energetické hladiny E_0 , při čemž emituje přebytek energie ve formě fotonu. Sledujeme změny energetických stavů molekul zkoumáním frekvencí přítomných v záření rozptýleném molekulami. Pouze zhruba asi jeden foton z 10^7 dopadajících fotonů z excitačního záření interaguje s molekulami tak, že je část energie předána a je následně pozorována při nižší energii. Tento jev, kdy je vytvořeno záření o nižší frekvenci, je označován jako Stokesův rozptyl. V opačném případě, kdy naopak dopadající fotony přijímají energii od molekul a následně se tak objevuje záření o vyšších frekvencích, se nazývá anti-Stokesův rozptyl. V případě, kdy složka záření je rozptýlena beze změny, jedná se o Rayleighův rozptyl [11]. Tato metoda je založena na vzájemném působení molekul látek s elektromagnetickým zářením, při tomto dochází k přechodu přesně specifikovaných množství energie mezi látkou a zářením. Této metoda lze využít jak pro identifikaci látek, tak například i pro určení množství analyzované látky ve vzorku. Tato metoda se zejména využívá při analýze organických látek, avšak je používána i při dalších analýzách. V porovnání s klasickými chemickými metodami organické analýzy bývají spektrální měření velmi rychlé, naměřené spektrum navíc poskytuje celou řadu cenných informací o struktuře látek [12].

Podstatou Ramanova rozptylu je zářivý dvou-fotonový přechod mezi dvěma stacionárními rotačně-vibračními stavy molekuly, vyvolaný interakcí této molekuly s dopadajícím fotonem viz rovnice (1). Frekvence ν_0 dopadajícího záření musí splňovat podmínku

$$\nu_0 > \frac{|E_1 - E_0|}{h}, \quad (1)$$

kde E_0 a E_1 jsou energie počátečního a koncového stavu molekuly a $h \doteq 6,626 \cdot 10^{-34}$ J · s je Planckova konstanta. Změna rotačně-vibračního stavu molekuly provázená vyzářením fotonu rozptýleného záření o frekvenci ν_R , je schematicky naznačena na obrázku 3. Toto si lze představit jako současnou absorpci budícího fotonu molekulou, kde dochází k přechodu molekuly na virtuální energetickou hladinu a emisi sekundárního fotonu za splnění podmínky zachování energie viz rovnice (2) [6]:

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_1 - E_0). \quad (2)$$



Obrázek 3: Schéma dvoufotonových přechodů v molekule Ramanův (Stokesův a anti-Stokesův) a Rayleighův rozptyl při excitaci ve viditelné a blízké infračervené oblasti. \uparrow - značí absorpci fotonu spojenou s excitací molekuly do virtuálního stavu, \downarrow - značí emisi fotonu spojenou s návratem molekuly do některého z nižších energetických stavů (obrázek převzat z [13] a upraven).

Známe hned několik možností přechodu mezi energetickými stavy molekuly, jedná se například o normální a rezonanční Ramanův jev. Ramanův jev je možno popsat pomocí kvantové teorie, ale lze jeho základy vystihnout i v klasickém přiblížení. V klasickém přiblížení je dáno pro molekulu interagující se zářením, že v molekule je vyvolán dipólový moment \mathbf{p} [6]:

$$\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E} \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q \mathbf{E} (\cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t]) \quad (3)$$

kde:

ν_0 – frekvence budícího záření

ν_{vib} – vibrační frekvence

\mathbf{E} – vektor intenzity elektrického pole dopadajícího záření

q – vnitřní souřadnice molekuly

α – polarizovatelnost molekuly¹

¹ polarizovatelnost (polarizibilita) molekuly vyjadřuje míru deformovatelnosti elektronového obalu molekuly působením vnějšího elektrického pole.

Z uvedené rovnice vyplývá, že molekula emituje s nezměněnou frekvencí (ν_0 – Rayleighův rozptyl). Dále emituje záření s frekvencemi ($\nu_0 + \nu_{vib}$) a ($\nu_0 - \nu_{vib}$), které odpovídá Ramanovu rozptylu. Nižší frekvence ($\nu_0 - \nu_{vib}$) odpovídá tzv. Stokesovu rozptylu a vyšší frekvence ($\nu_0 + \nu_{vib}$) tzv. anti-Stokesovu rozptylu. Z této rovnice je zřejmé to, aby nastal Ramanův rozptyl, musí při vibračním pohybu docházet ke změně polarizovatelnosti molekuly, tj. musí platit

$$\frac{\partial \alpha}{\partial q} \neq 0. \quad (4)$$

Pokud by tato podmínka nebyla splněna, zůstal by v rovnici (3) nenulový pouze člen pro Rayleighův rozptyl. Rovnice (4) je označována za základní výběrové pravidlo pro Ramanovu spektroskopii, které je principiálně odlišné pro vibrační módy vznikající v infračervené spektroskopii, kde touto základní podmínkou je změna dipólového momentu během příslušného vibračního pohybu.

Pokud je daný vibrační mód Ramanovsky aktivní, lze v Ramanově spektru pozorovat dvě Ramanovy linie symetricky rozložené kolem linie Rayleighova rozptylu – ve Stokesově oblasti ($\nu_R = \nu_0 - \nu_{vib}$, tzv. Stokesovy linie) a v anti-Stokesově oblasti ($\nu_R = \nu_0 + \nu_{vib}$, tzv. anti-Stokesovy linie). Obvykle jsou však měřena spektra pouze v oblasti Stokesova rozptylu, protože anti-Stokesovy linie se vyznačují velmi nízkou intenzitou ve srovnání s liniemi Stokesovými [6 a 14].

1.3 Ramanův spektrometr

Pro Ramanovu spektroskopii se v dnešní době nejvíce používají disperzní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací. Hlavními částmi spektrometru jsou zdroj excitujícího záření (laser), vzorkový prostor (komora), sběrná optika, disperzní prvek (platí pro disperzní spektrometry) nebo interferometr (pro spektrometry s Fourierovou transformací), detektor [6]. Jako zdroje excitačního záření se používají různé typy laserů pracujících ve viditelné, blízké infračervené nebo i ultrafialové oblasti elektromagnetického vlnění. U spektrometrů může být použit jeden zdroj excitačního záření, nebo i více zdrojů excitačního záření různých vlnových délek [36].

Paprsek excitačního záření dopadá na vzorek, v němž vyvolává Ramanův a Rayleighův rozptyl. Z rozptýleného záření je odfiltrováno Rayleighovo záření a propuštěné Ramanovo záření je následně detekováno. Na základě takto získaného signálu je vykresleno Ramanovo spektrum vzorku (viz dále v textu) [12].

1.3.1 Disperzní spektrometr

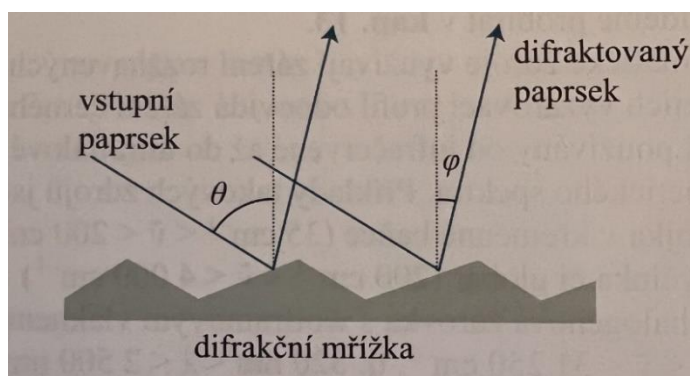
U disperzního spektrometru dopadá záření vyvolané excitačním laserem na disperzní prvek, kde je prostorově rozloženo podle vlnových délek a následně dopadá na mnohokanálový CCD (Charge-coupled device – snímač s nábojovou vazbou [15]) detektor (viz schéma na obrázku 6A) [12 a 16]. Jako zdroj excitačního záření bývají nejčastěji používány lasery pracující v ultrafialové až viditelné oblasti spektra s vlnovými délkami například 780 nm, 633 nm, 532 nm a 473 nm [17].

Disperzní prvek ve většině disperzních spektrometrů pracujících v ultrafialové, viditelné a blízké infračervené oblasti spektra je difrakční mřížka. Ta je tvořena skleněnou nebo keramickou deskou, v které jsou vytvořeny jemné, pravidelné drážky pokryté reflexním povlakem. Mřížka způsobuje interferenci odražených vln od jejího povrchu, přičemž konstruktivní interference se objeví, když je splněna podmínka

$$n\lambda = d (\sin \theta - \sin \varphi). \quad (5)$$

kde $n = 1, 2, \dots$ je řád difrakce, λ je vlnová délka difraktovaného záření, d je vzdálenost mezi vrypy (drážkami v mřížce), θ je úhel dopadajícího paprsku a φ je úhel, pod kterým se objeví difrakční paprsek (viz obrázek 4). Z rovnice (5) vyplývá, že interferenčním maximům pro různé vlnové délky odpovídají různé hodnoty φ difraktovaných paprsků. To vede k prostorovému rozložení dopadajícího záření podle vlnových délek.

Následkem tohoto rozloženého záření dopadá na každou z oddělených oblastí detektoru pouze záření v úzkém intervalu vlnových délek. Díky tomuto lze snímat závislost intenzity záření na jeho vlnové délce [11].



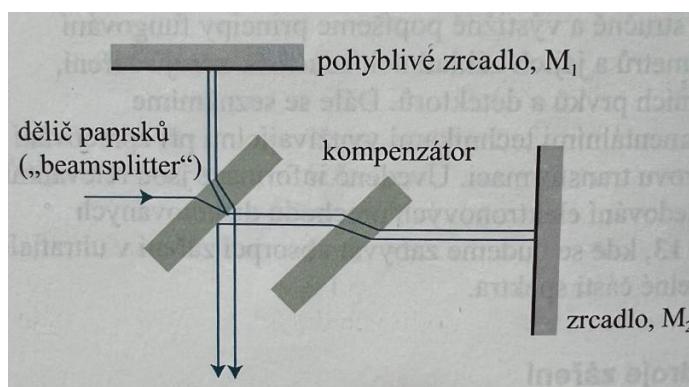
Obrázek 4: Difrakční mřížka sloužící k rozkladu dopadajícího záření na spektrum. Polychromatický paprsek dopadá pod úhlem θ na povrch mřížky, φ značí úhel, pod kterým vystupuje difraktovaný paprsek (obrázek převzat z [11] a upraven).

1.3.2 Spektrometr s Fourierovou transformací

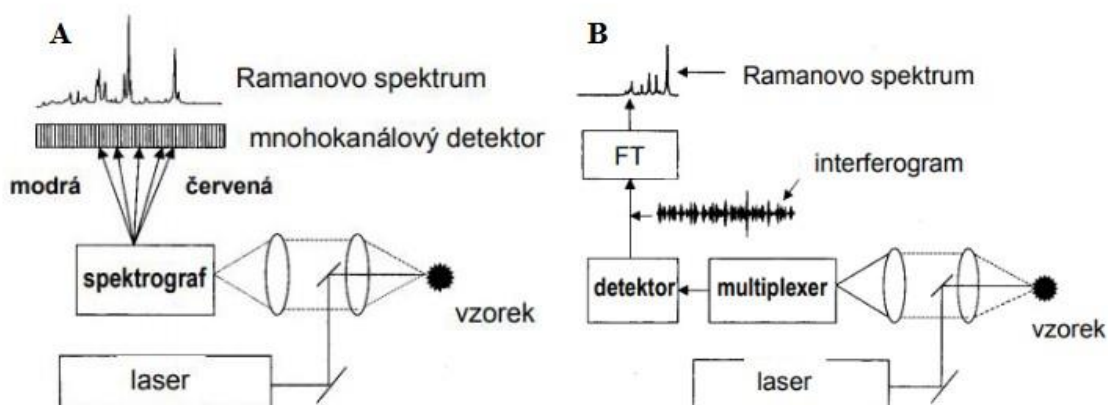
Druhým typem Ramanovy spektroskopie jsou spektrometry s Fourierovou transformací, využívající místo disperzní mřížky Michelsonův interferometr [18] (viz schéma na obrázku 6B), jehož úkolem je rozdělit vstupní paprsek na dva navzájem ekvivalentní paprsky, které se šíří po různých trajektoriích a poté jsou opět spojeny.

V nejjednodušším případě se jeden paprsek odráží od pevného zrcadla a jeho dráha se nemění. Druhý paprsek se odráží od pohyblivého zrcadla, takže jeho dráha je proměnná. Díky tomuto můžeme měřit dráhový rozdíl mezi paprsky (viz obrázek 5). Když paprsky rekombinují, projeví se mezi nimi dráhový rozdíl, takže se střídavě prolínají konstruktivně a destruktivně v závislosti na aktuální hodnotě dráhového rozdílu. Interferometr tak „převádí“ složku o určité vlnové délce ve vstupním signálu na proměnnou změnu intenzity záření dopadajícího na detektor. Následně se převádí takto získaný signál z detektoru pomocí matematické úpravy Fourierovou transformací na počítači propojeném se spektrometrem. Výstupem této operace je pro uživatele jedno paprskové spektrum sledovaného vzorku [11].

Zdrojem excitačního záření bývá laser o vlnové délce ležící v blízké infračervené oblasti (např. 1064 nm Nd:YAG laser – neodymem dopovaný yttrito-hlinitý granát) [15 a 17].



Obrázek 5: Michelsonův interferometr se znázorněním dráhy dvou ekvivalentních paprsků, které se šíří po různých trajektoriích (obrázek převzat z [11] a upraven).



Obrázek 6: (A) Disperzní Ramanův spektrometr s CCD detektorem,

(B) Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací.

(Obrázek převzat z [16] a upraven).

1.3.3 Obecné poznatky ohledně parametrů měření

Konkrétní nastavení spektrometru, umístění vzorku, nastavení výkonu laseru, doby měření signálu a dalších parametrů je významně odlišné pro instrumentaci jednotlivých přístrojů různých výrobců. Také závisí na povaze studovaného materiálu a na požadavku ohledně kvality výsledného spektra. Například pro biologické vzorky mohou být použita jiná nastavení než pro anorganické materiály [15].

Obecně lze říct, že vyšší výkon laseru, kratší vlnové délky excitačního záření a delší doba měření více zahřívají vzorek, čímž zvyšují riziko tepelné destrukce nebo degradace vzorku. S kratší vlnovou délkou budícího laseru také obvykle roste nebezpečí vzniku fluorescence, kterou přiblížím dále v textu. Při analýze citlivých materiálů, např. biologických tkání je vhodné začít měření s nižším výkonem laseru a krátkou dobou měření, postupně můžeme oba tyto parametry zvyšovat. Výsledkem tohoto přístupu by mělo být dosažení dostatečného poměru signálu k šumu. Aby nedocházelo k poškození nebo zničení vzorku vlivem jeho přílišného zahřívání, můžeme vzorek podložit materiálem zlepšujícím odvod tepla, např. alobalem [15].

Při Ramanově mapování a zobrazování se používá i spojení Ramanova spektrometru s mikroskopem. V tomto případě hovoříme o Ramanově mikrospektrometru. Tohoto lze využít i pro analýzu malých vzorků o rozměrech řádově v mikrometrech, v některých speciálních případech jako je aplikace hrotem zesíleného Ramanova rozptylu (tzv. TERS – Tip Enhanced Raman Spectroscopy), který se běžně nepoužívá a nalézá uplatnění spíše pro výzkumné účely, se dostáváme až k řádům nanometrů [15].

Při použití Ramanova mikrospektrometru, můžeme mikroskopem identifikovat neznámé částice, vlasové nebo velmi malé nečistoty v pevných vzorcích nebo kapalinách a také provádět tzv. spektrální mapování vzorků. Spektrální mapování spočívá v tom, že na povrchu měřeného vzorku se změní spektra v definovaných bodech s pravidelnými rozestupy. Pokud měřené body leží na přímce, hovoříme o liniovém mapování vzorku. Tímto postupem lze například snadno odhalit gradient koncentrace jedné složky vzorku, například pokud sledujeme její průnik do jiné složky [15]. Podobně lze provést i mapování vzorku do hloubky, tj. měřit spektra i pod jeho povrchem.

Pokud jsou body pro měření rozmístěné v mřížce definované na povrchu vzorku po části nebo po celém povrchu, hovoříme o mapování plošném. Tento postup má zásadní význam u vzorků, kde je potřeba sledovat homogenitu povrchu, plošnou distribuci chemicky odlišných složek a podobně [15].

1.4 Ramanovo spektrum

1.4.1 Obecně o Ramanově spektru

Ramanova spektroskopie nám umožňuje identifikaci neznámých vzorků na základě sledování frekvence molekulových vibrací ve vzorku. Každá molekula či její část (funkční skupina) vibruje s určitou charakteristickou frekvencí [15].

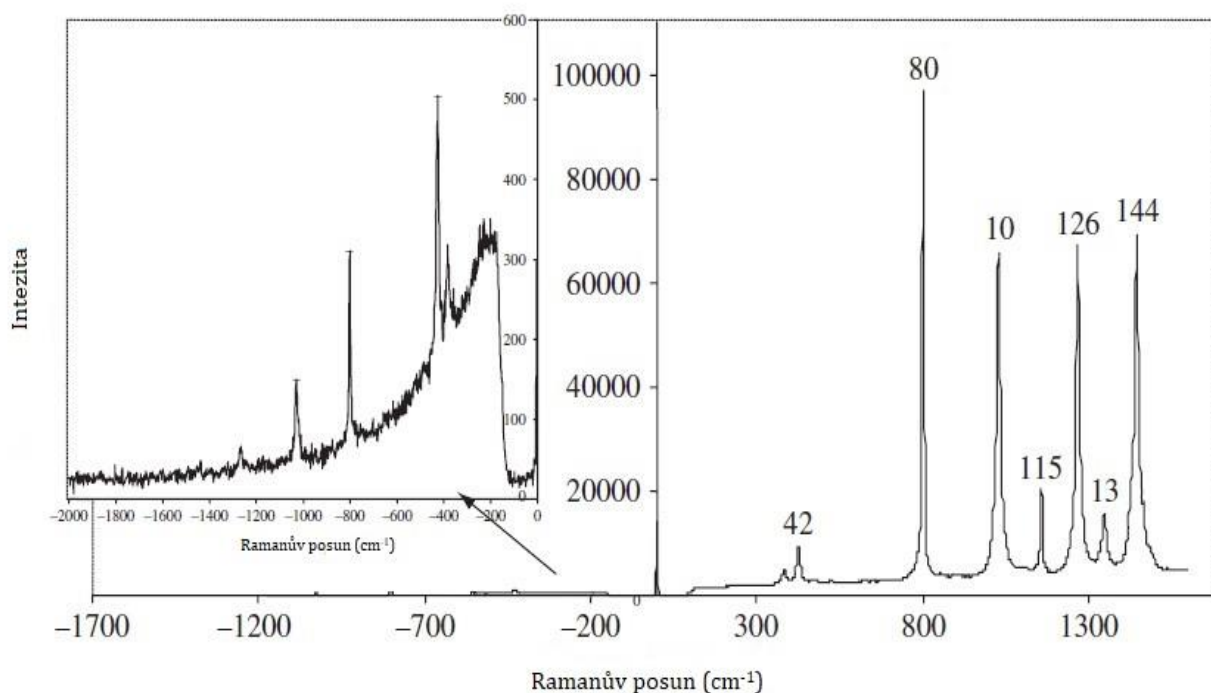
Ramanovo spektrum zachycuje závislost intenzity detekovaného Ramanova záření na takzvaném Ramanově posunu, který znamená rozdíl mezi frekvencí Ramanova záření a frekvencí budícího záření. Hodnota Ramanova posunu je dána rozdílem energií rotačně-vibračních stavů, mezi nimiž dochází k přechodu [12].

Na obrázku 7 je zobrazeno spektrum Stokesova a anti-Stokesova rozptylu změřené na vzorku cyklohexanu. Na vodorovné ose jsou uvedeny hodnoty vlnočtu Ramanova posunu (vlnočť je definován jako převrácená hodnota vlnové délky). Ramanův posun se v praxi vyjadřuje v jednotkách cm^{-1} . Svislá osa udává intenzitu změřeného Ramanova signálu. Intenzita se obvykle vyjadřuje jako počet detekovaných fotonů pro odpovídající Ramanův posun, případně se přepočítává na relativní jednotky s rozsahem např. od 0 do 1 [13]. Ramanovo spektrum obvykle obsahuje několik maxim, které se nazývají peaky, viz obrázek 7. Polohy peaků nám udávají hodnoty jednotlivých energetických přechodů mezi vibračními (rotačně-vibračními) stavy molekul vzorku [12].

Podobně jako je u prvků znám pojem alotropie, kdy se prvek může vyskytovat v různých strukturních modifikacích, např. uhlík ve formě grafitu a diamantu, tak i molekuly mohou krystalizovat v různých strukturách, které jsou často diametrálně odlišné svými fyzikálními vlastnostmi. Jednotlivé krystalové struktury mají obvykle různou velikost povrchu, tvrdost a rychlost rozpouštění. Protože prostorové uspořádání funkčních skupin je v krystalových mřížkách různých látek odlišné, liší

se i okolí vazeb funkčních skupin a tím dochází k ovlivnění frekvence vibrace vazby. U krystalických látek se v oblasti nízkých vlnočtů také objevují vibrace krystalové mřížky. Rozdíly v Ramanových spektrech nemusí být dány pouze odlišným chemickým složením vzorků, ale také jejich rozdílnou krystalovou strukturou [15].

Rozdíly mezi spektry jednotlivých látek mohou být různě velké. Někdy se jedná o výraznou změnu poloh některých spektrálních pásů, jindy se může odlišná látka ve spektru projevit pouze nepatrnou změnou změřeného spektra v oblasti některého z pásů [15].



Obrázek 7: Stokesův (v oblasti kladných hodnot Ramanova posunu) a anti-Stokesův (v oblasti záporných hodnot Ramanova posunu) rozptyl pro cyklohexan. Pro lepší znázornění anti-Stokesova spektra, je ve výřezu spektra v levé horní části obrázku změněno měřítko svislé osy. „Peak“ Rayleighova rozptylu (ležící na vlnočtu 0 cm⁻¹) není v tomto grafu zobrazen (obrázek převzat z [13] a upraven).

1.4.2 Fluorescence

Fluorescence je velmi silná emise fotonů, která se může vyskytovat současně s Ramanovým rozptylem. Signál vytvářený fluorescencí může mít až o několik řádů vyšší intenzitu než Ramanův signál, proto může snadno „překrýt“ požadované Ramanovo spektrum [19].

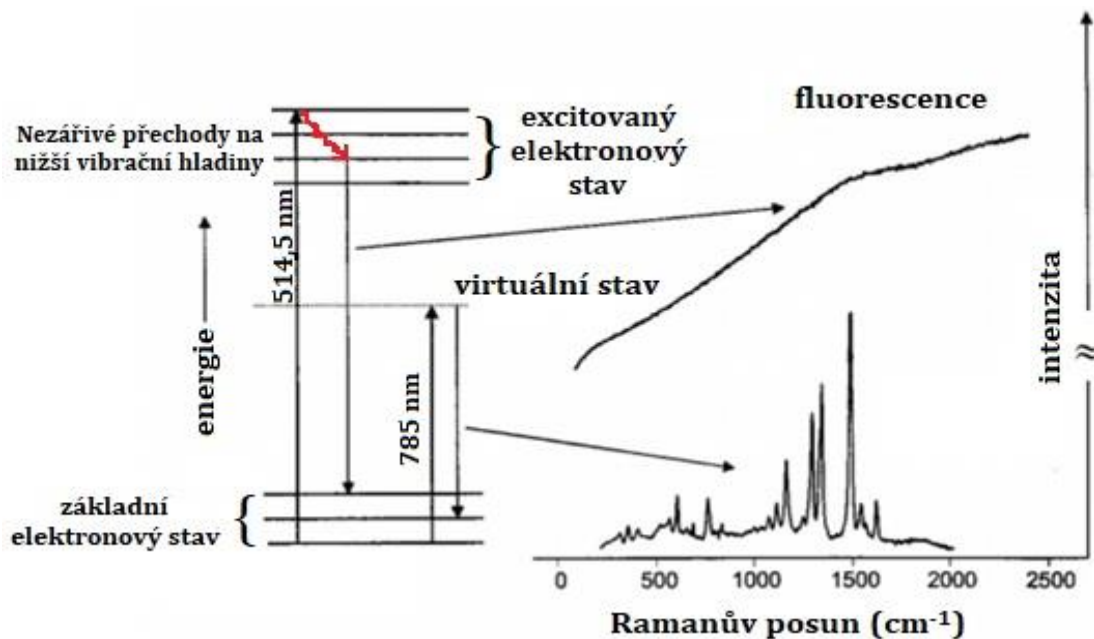
Mechanismus fluorescence lze popsat zjednodušeně, že energie dodaná excitačním laserem způsobí přechod molekuly ze základního energetického stavu do elektronově i vibračně excitovaného stavu (viz obr. 8 vlevo). Molekula je na této vyšší energetické hladině nestabilní, následně tedy přechází do nižšího vibračního stavu (při zachování excitovaného elektronového stavu), jak je možné vidět v horní části obrázku 8 vlevo. Tyto přechody mezi energetickými hladinami jsou nezářivé. Z nejnižší vibrační hladiny excitovaného elektronového stavu poté molekula přechází do základního elektronového stavu, přičemž dochází k vyzáření fluorescenčního fotonu [20].

Z důvodu vysoké intenzity fluorescenčního záření může docházet ke zkreslení, někdy až dokonce ke znehodnocení naměřených dat. Existuje však i metoda nazývaná fluorescenční spektroskopie, v níž je fluorescence naopak využívána pro zkoumání vzorků [20].

Fluorescence vzniká především při použití laserů pracujících v modré a zelené oblasti viditelného záření. Při stoupající energii laseru, a tedy kratší vlnové délce, se zvyšuje pravděpodobnost fluorescence [21].

Lasery s excitačními vlnovými délkami okolo 514 nm až 650 nm (tyto se používají u disperzních Ramanových spektrometrů) vytvářejí silnější fluorescenční pozadí než lasery pracující v blízké infračervené oblasti. Při použití infračervených laserů fluorescence ustupuje nebo úplně zmizí, jelikož energie jejich fotonů nemusí vést k excitaci molekul do vyššího elektronového stavu, která je spojena se vznikem fluorescence [16 a 18].

Na obrázku 8 vpravo je uvedeno Ramanovo spektrum nezatížené fluorescencí a spektrum znehodnocené fluorescenčním zářením. Při použití zdroje excitačního záření o vlnové délce 785 nm nenastal přechod elektronů vzorku do vyšších energetických stavů, a tedy nedošlo ke vzniku fluorescence. Naopak fotony laserového záření o vlnové délce 514,5 nm měly dostatečnou energii k vybuzení elektronů do vyšších energetických stavů. Při následných přechodech těchto elektronů na nižší elektronovou hladinu dochází k emisi fotonů fluorescenčního záření [16].



Obrázek 8: Výskyt fluorescence při různých excitačních vlnových délkách laseru (obrázek převzat z [16] a upraven).

Fluorescence se vyskytuje u organických materiálů, ale i u některých anorganických materiálů [21]. Může být způsobena i nečistotami obsaženými ve vzorku. Takto vznikající fluorescenci lze do určité míry eliminovat tím, že bude vzorek vystaven ozáření excitačním laserem po delší časový úsek s nastaveným vyšším výkonem. Cílem tohoto kroku je snížení obsahu nečistot ve vzorku jejich tzv. „vypálením“. Tato doba „vypalování“ se může pohybovat od několika sekund až po hodiny, v závislosti na fluorescenčním materiálu v konkrétním vzorku [19].

Jelikož intenzita Ramanova rozptylu klesá se čtvrtou mocninou excitační vlnové délky, může použití delší vlnové délky vést k nižším intenzitám spektrálních pásů. Nicméně výhodou je, že se u většiny vzorků sníží fluorescence [16 a 18].

1.5 Příklady použití Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie v obecné rovině nabízí široké využití možnosti uplatnění ve výzkumu, průmyslu, zdravotnictví a i v dalších oblastech lidské činnosti. Podle oblasti využití je možno si vybrat z různých uživatelských provedení Ramanova spektrometru. Existují přístroje pro výzkumné laboratoře, pro rutinní měření například v průmyslu, ale také snadno přenosné spektrometry pro měření v terénu.

V klinických, medicínských a biologických aplikacích se využívá Ramanova spektroskopie hlavně pro její neinvazivnost, nedestruktivnost a rychlost, s kterou lze provést analýzu tkání [15].

Ramanova spektroskopie je např. testována pro možnost včasného odhalení melanomu pokožky analýzou pigmentových znamének. Dále je vyvíjena metoda pro analýzu tělísek rakoviny prsu přímo v lidském těle a rozlišení nádorové tkáně od zdravé [15]. Ramanova spektroskopie se využívá i při nejrůznějších analýzách jiných biologických tkání a jejich interakcí s léčivy nebo chemikáliemi. Pomocí Ramanovy spektroskopie jsou prováděny také analýzy tělních tekutin, které mají vést ke včasnému odhalení různých chorob lidského organismu. Probíhá též studium interakcí nukleových kyselin nebo jiných molekul běžně se vyskytujících v organismu s cizorodými látkami, jak žádoucími (například léky), tak nežádoucími (například jedy v roztoku) [2, 22].

Ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu je Ramanova spektroskopie využívána pro analýzu vstupních materiálů i kontrolu kvality hotových výrobků [15]. V potravinářství se pak používá při analýze přírodních vzorků, jako je ovoce a zelenina nebo produktů z potravin (med, mošty, kakao, maso, barviva a podobně) [22].

Ve farmaceutickém průmyslu se používá Ramanova spektroskopie v rámci výzkumu mikročástic, kdy při použití kombinace softwarového nástroje pro automatickou analýzu částic s Ramanovým mikroskopem umožňuje nalézt a klasifikovat částice dle fyzikálních vlastností před tím, než jsou chemicky identifikovány podle jejich Ramanových spekter [23]. Dále se Ramanova spektroskopie využívá při určování padělků léků nebo pro detekci nehomogenit v tabletách [15].

Ramanova spektroskopie má také široké využití v chemickém průmyslu a výzkumu [15]. Změřená spektra lze porovnávat se spektry uloženými v databázích Ramanových spekter a díky tomu je v některých případech možné identifikovat látku přítomnou ve zkoumaném vzorku. Tento typ analýzy lze aplikovat i na vzorky, které obsahují více chemických složek. V některých případech je dokonce možné pomocí matematicko-statistických metod odhadnout podíl jednotlivých složek obsažených ve vícesložkovém vzorku [24].

Metodou RS je prováděna rovněž analýza minerálů a hornin pozemského i mimozemského původu [2]. Lze zmínit například měření vzorků hornin na Antarktidě pod ledem nebo umístění Ramanových spektrometrů na sondách vysílaných na jiné planety a další vesmírná tělesa [15].

V elektrotechnice je Ramanova spektroskopie uplatňována při výrobě polovodičů nebo při kontrole pokovení povrchu spojů a při zjišťování, zda nemají nehomogenní povrch [15].

Díky tomu, že se jedná o nedestruktivní techniku, je RS oblíbená při zkoumání předmětů kulturního dědictví, jako jsou obrazy (včetně detekce pravosti obrazů), malby na stěnách i v jeskyních, oděvy a další [15]. Na konci 19. století a v první polovině 20. století došlo díky rozvoji vědy k používání polymerních materiálů, které se používaly jako náhražky přírodních materiálů (například celuloid namísto slonoviny nebo želvoviny a první umělá vlákna jako náhražka hedvábí). V muzeích se můžeme setkat s polymery jako s pomocnými materiály (např. plní funkci laků, ochranných fólií, obalových materiálů, atd.) ale také s exponáty vyrobenými ze syntetických polymerů. Tyto syntetické materiály se staly součástí řady sbírek, ať se jedná o sbírky umělecké (obrazy, plastiky), uměleckoprůmyslové (design, textil) nebo technické (součásti strojů a přístrojů).

O složení i původu materiálů nemáme vždy jasno, o exponátech máme někdy jen kusé a nedostatečné informace, včetně informací o jejich složení. V těchto případech lze s menšími či většími obtížemi aplikovat Ramanovu spektroskopii a tím získat bližší poznatky o složení zkoumaných předmětů [37]. Zde uvedu například ověření pravosti mapy Vinlandu, jež měla dokázat objevení Ameriky Vikingy před Kryštofem Kolumbem [2].

Ramanova spektroskopie je hojně rozšířena i u záchranných složek, ve forenzních vědách a u ozbrojených složek. Provádí se například testování alkoholických nápojů na přítomnost metanolu. Je možné odhalovat zakázané a nebezpečné materiály při pašování, někdy dokonce bez nutnosti otevírat nádobu, ve které jsou přepravovány (měřením Ramanových spekter přes průhledný obal) [2]. Hasiči mohou analyzovat Ramanovými spektrometry povahu látek, které jsou nalezeny rozsypané či rozlité při různých haváriích nebo případně v nelegálních skladech [15].

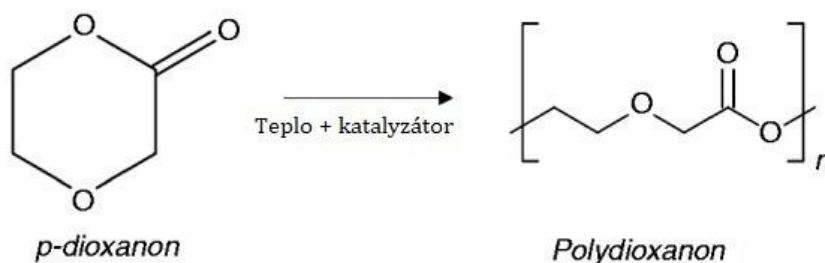
2 Experimentální část

„... experimentální fyzik by si měl zachovat nestrannost. Není nic horšího, než když experimentátor chce prokázat teorii. Musíte být zcela objektivní.“

- Jerome Isaac Friedman [25].

2.1 Polydioxanon (PDO)

Jedná se o polymer, který je vysoce krystalický, bio-absorbovatelný, měkký a s teplotou skelného přechodu okolo $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Monomerem tohoto polymeru je 2-dioxanon, vytvořený reakcí kyseliny monochloroctové s disodiem glykoxidu. Polymerace probíhá v přítomnosti organických katalyzátorů jako diethylzinek nebo zirkonium acetylacetonát při pokojové teplotě. Strukturu PDO ukazuje obrázek 9.



Obrázek 9: Chemická struktura monomeru p-dioxanonu a polymeru polydioxanonu (obrázek převzat z [26] a upraven).

Polydioxanon je materiál, k jehož depolymerizaci dochází již při teplotě okolo ($130 - 190\text{ }^{\circ}\text{C}$). Z tohoto důvodu je nutné jej zpracovávat za co nejnižších teplot, aby se zabránilo depolymeraci zpět na paradioksan [27].

Díky své biokompatibilitě byl polydioxanon v roce 1999 Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv schválen pro použití v medicínských aplikacích. Původně byl používán převážně jako šicí materiál, v dnešní době je již využíván i ve tkáňovém inženýrství, v ortopedii, v plastické chirurgii, pro kardiovaskulární aplikace (např. cévní náhrady), dále pro fixaci zlomenin nebo pro cílené dodání léčiv [28, 29].

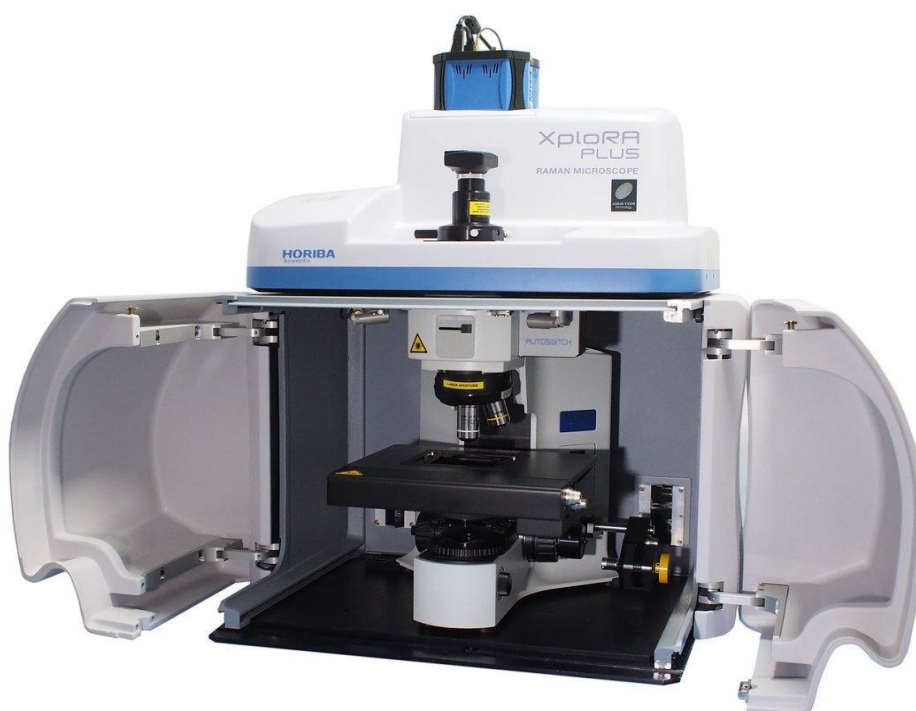
Vlákna vyrobená z polydioxanonu jsou používána v medicíně pro výrobu biodegradabilních chirurgických nití, stentů atd. [30]. Určitou nevýhodou je, že PDO nelze jednoduše zobrazit pomocí rentgenového záření, proto výrobci používají různé značící doplňky, například zlaté kontrastní značky, které slouží pro identifikaci tohoto materiálu například v těle [31].

Biodegradace vláken z polydioxanonu je závislá na více faktorech. PDO hydrolyticky degraduje, což vede k jeho rozpadu a následnému vstřebání, přičemž tyto procesy jsou netoxické. Hodnota pH ovlivňuje proces degradace, při vyšším pH je degradace pomalejší, při nižším pH je degradace rychlejší.

Polydioxanon je v přirozené podobě bezbarvý, avšak tato vlastnost je nepraktická, jelikož je hůře vidět v případě použití v medicíně. Proto bývá do PDO určeného pro lékařské účely přimícháváno barvivo [32, 33].

2.2 Použitý Ramanův mikrospektrometr a jeho kalibrace před měřením

Analýza vzorků byla provedena na Ramanově mikrospektrometru XploRA PLUS od firmy HORIBA, viz obrázek 10. Výňatek z technické specifikace tohoto spektrometru je uveden v tabulce 1, která vychází z informací uvedených na oficiální webové stránce výrobce [34].

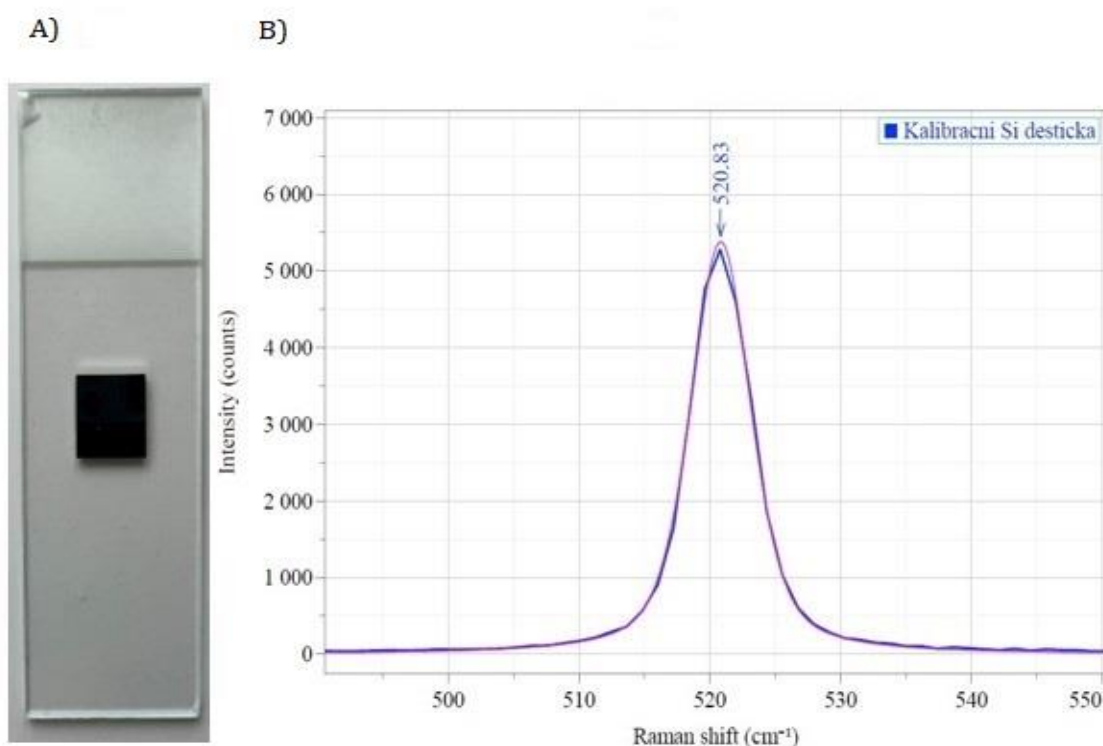


Obrázek 10: Ramanův spektrometr XploRA PLUS (obrázek převzat z [34]).

Tabulka 1 – Specifikace a parametry XploRA PLUS

Parametr/specifikum	Hodnota
Rozlišení konfokálního zobrazení	0,5 μm
Vlnové délky budících laserů	638 nm, 785 nm
Mikroskopický stolek	motorizovaný, polohovatelný ve směrech X, Y, Z s přesností 0,1 μm
Objektivy	5 \times , 10 \times , 20 \times , 50 \times , 100 \times
Difrakční mřížky	600, 1200, 1800 vrypů/mm
Detektor	Polovodičový CCD detektor Syncerity OE (1024 \times 256)
Software pro ovládání a zpracování dat	LabSpec 6

Před zahájením měření vzorku byla provedena kalibrace přístroje pomocí kalibrační křemíkové destičky. Autorem změřená poloha kalibračního peaku ve spektru křemíkové destičky byla 520,83 cm^{-1} . Fotografie kalibrační křemíkové destičky a naměřené kalibrační spektrum jsou na obrázku 11.

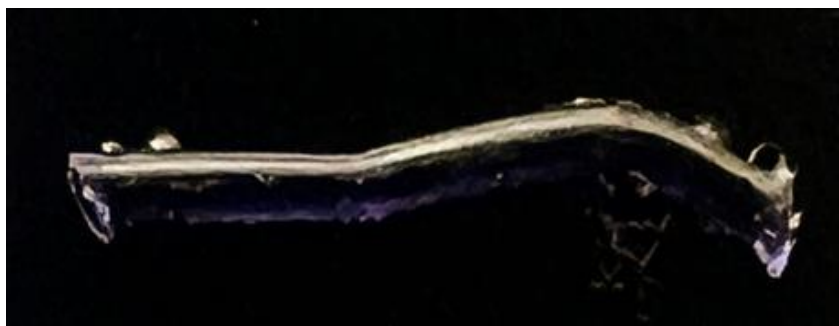


Obrázek 11: A) kalibrační křemíková destička na podložním sklíčku, B) změřené spektrum kalibrační křemíkové destičky (modrá křivka) a modelové (teoretické) spektrum kalibrační křemíkové destičky (fialová křivka). Na rozdíl od modelového spektra nemá změřené spektrum hladký průběh, ale má podobu lomené čáry. Důvodem je omezené spektrální rozlišení, dané především použitou difrakční mřížkou (obrázek je vlastní prací autora).

2.3 Použitý vzorek a jeho příprava pro měření

Zkoumaný vzorek (viz obrázek 12) byl odebrán ze stentu vyrobeného z polydioxanonu, dodaného firmou ELLA-CS. Jedná se o unikátní samoexpandabilní biodegradabilní stent, který se v lidském těle rozloží obvykle za 3-4 měsíce po implantaci [31]. Tento stent, upletený z PDO vlákna, je obarven barvivem Solvent Violet 13, které je v průběhu degradace vyplavováno z polydioxanonu [33].

Stent byl po dobu 16 týdnů vystaven působení roztoku simulované tělní tekutiny (Phosphate Buffered Saline, PBS). Tímto bylo dosaženo jeho částečné degradace.



Obrázek 12: Vzorek extrudovaného vlákna polydioxanonu, uměle degradovaného 16 týdnů působením roztoku simulujícího podmínky v lidském těle (obrázek je vlastní prací autora).

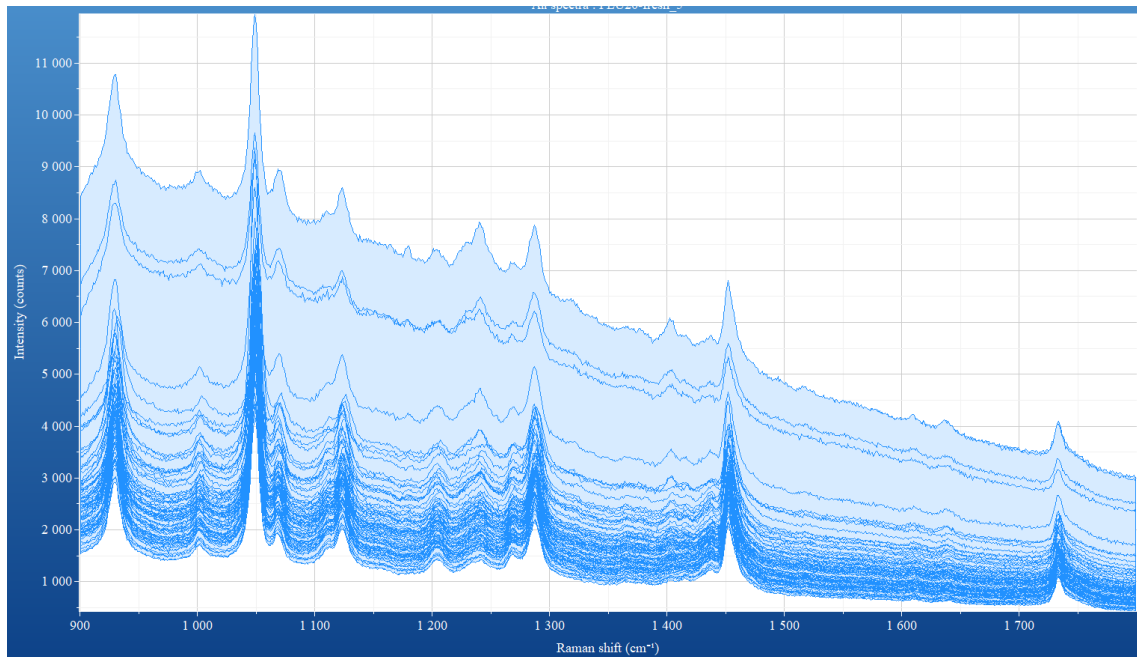
2.4 Mapování Ramanových spekter

Ramanovská analýza byla provedena pomocí objektivu s 10× zvětšením. Byl použit budící laser o vlnové délce 785 nm, která patří do blízké infračervené oblasti spektra. Maximální výkon budícího laseru je 40 mW, při tomto měření však byl omezen na 50 %, aby bylo sníženo riziko tepelného poškození vzorku. Byla použita difrakční mřížka s 1200 vrypů na 1 mm. Tato difrakční mřížka poskytuje spektrální rozlišení cca 1 cm^{-1} .

Vzorek vlákna vystřižený ze stentu byl přilepený oboustrannou lepící páskou na podložní sklíčko, které poté bylo umístěno na mikroskopický stolek ve vzorkové komoře mikrospektrometru. Mapována byla obdélníková oblast na povrchu vlákna polydioxanonu, přičemž jednotlivá spektra byla měřena v mřížce o velikosti 15 × 20 bodů viz příloha č. 1. Měřící rozsah na ose x byl od -29,9 μm do 24,1 μm , s krokem mezi jednotlivými body cca 3,9 μm a na ose y byl rozsah měření od -55,7 μm do 18,3 μm , s krokem mezi jednotlivými body rovněž cca 3,9 μm . Počet měření jejichž výsledky se průměrují pro získání jednoho spektra (tzv. počet akumulací), byl nastaven na hodnotu 5. Doba měření jedné akumulace byla 10 sekund. Spektrální rozsah měření byl od 900 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} . Získaná spektra byla následně zpracována s využitím softwaru LabSpec 6.

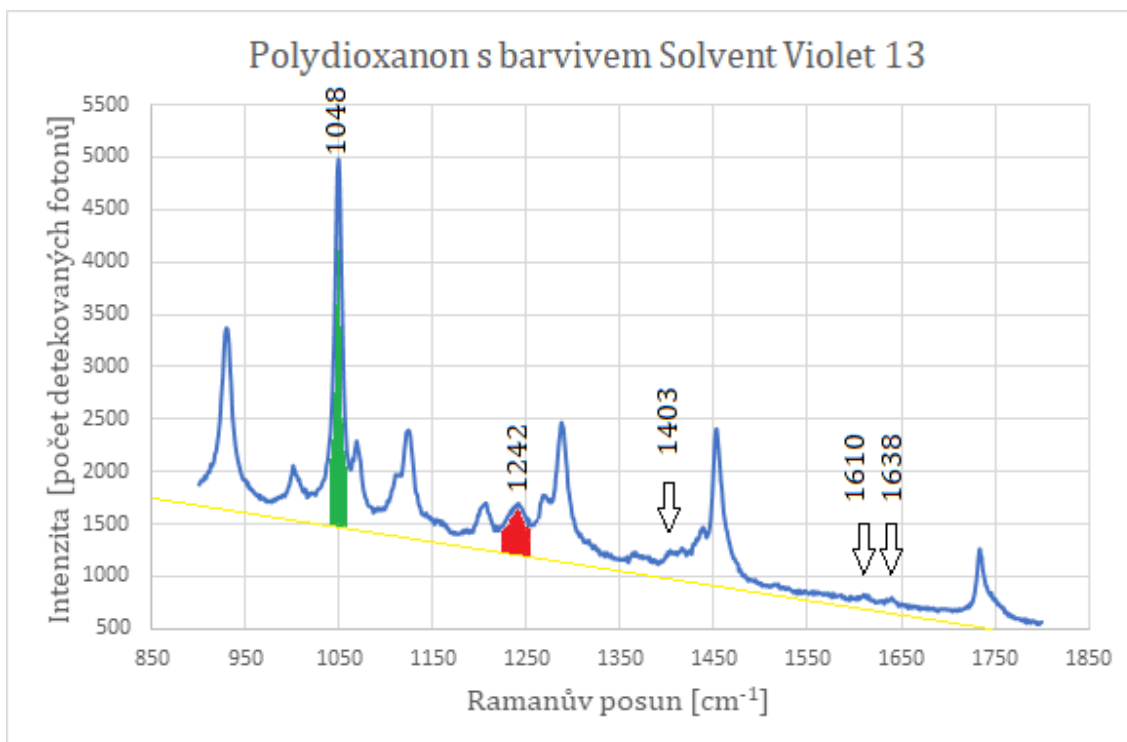
2.5 Vyhodnocení měření

Na obrázku 13 jsou zobrazena všechna Ramanova spektra zkoumaného vzorku získána při mapování, bez dalších úprav.



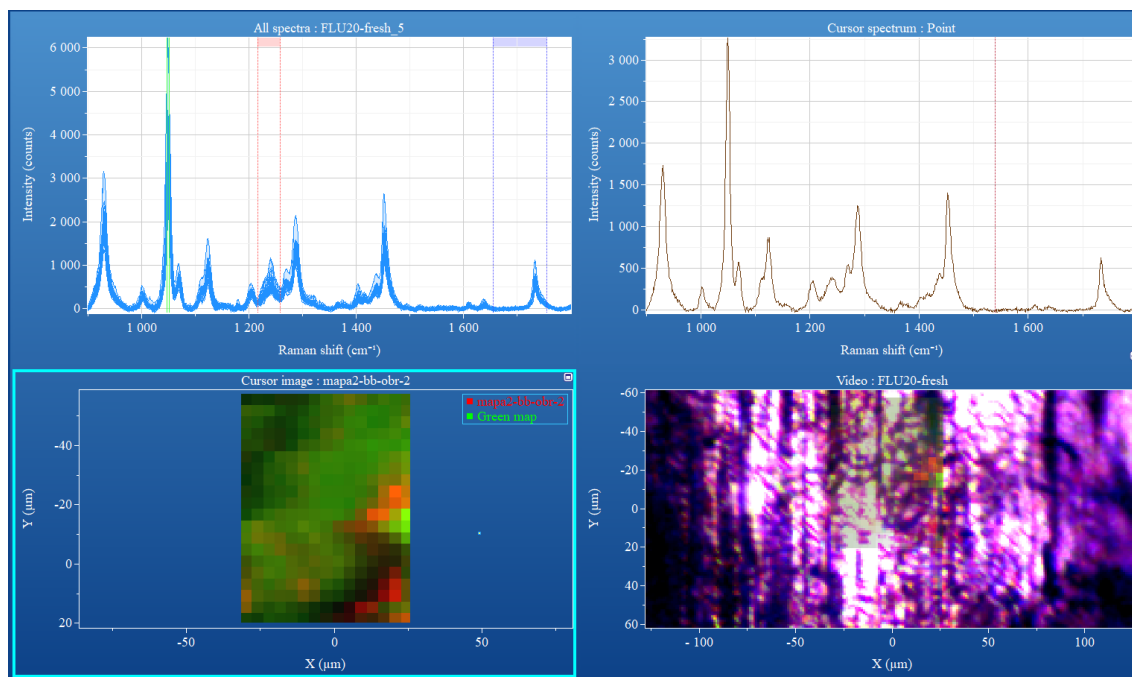
Obrázek 13: změřená Ramanova spektra polydioxanonu s barvivem Solvent Violet 13 (před korekcí základní čáry).

Pomocí softwaru LabSpec 6 byla v jednotlivých změřených spektrech provedena korekce základní čáry (tzv. baseline) [35]. Základní čára vybraného ukázkového spektra je znázorněna na obrázku 14. Korekce základní čáry spočívá v „odstranění“ plochy, která je v grafu spektra pod touto čarou. To je realizováno odečtením příslušných hodnot intenzity v jednotlivých změřených bodech spektra. Touto úpravou se naměřená spektra stala lépe vzájemně porovnatelnými a vhodnějšími pro analýzu distribuce barviva Solvent Violet 13 na povrchu vzorku.



Obrázek 14: Ukázkový graf spektra degradovaného stentu vykreslený v programu Excel z naměřených dat. Žlutou barvou vyznačena korekce základní čáry (tzv. base line), zelenou barvou zvýrazněná oblast peaku polydioxanonu a červenou barvou zvýrazněná oblast peaku barviva Solvent Violet 13 (obrázek je vlastní prací autora).

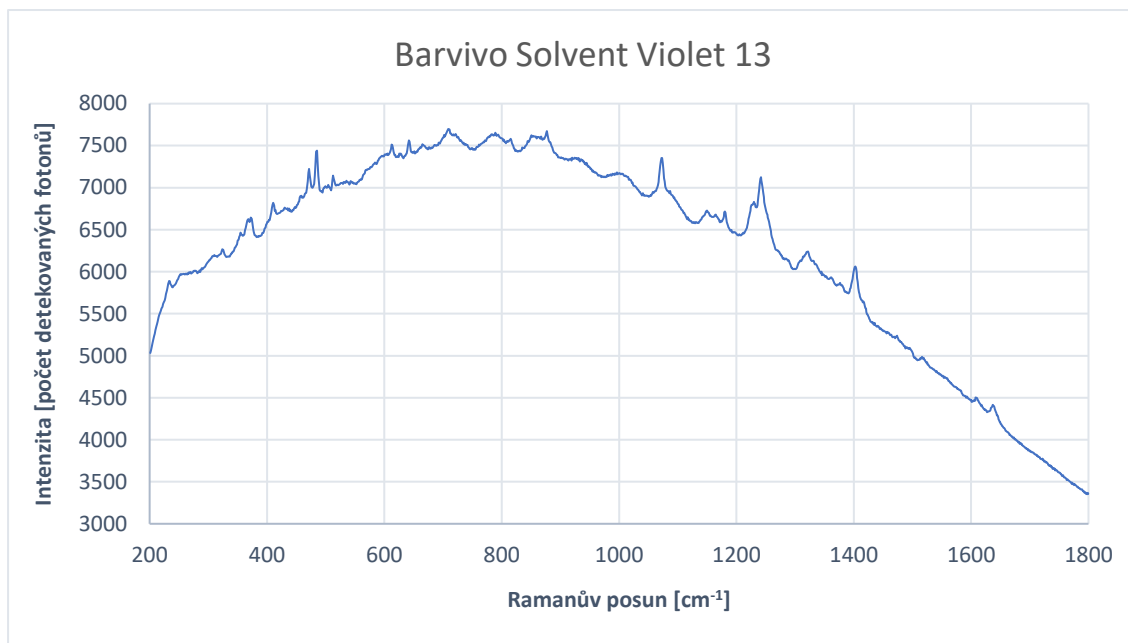
Spektra po korekci základní čáry jsou vyobrazena v levé horní části obrázku 15. Jedno samostatně náhodně vybrané spektrum je v pravé horní části. Pravá dolní část obrázku ukazuje optický snímek části povrchu vzorku s vyznačenou oblastí spektrálního mapování. V levé dolní části obrázku je jednoduchá spektrální mapa (podrobnosti viz níže). Vyhodnocována byla oblast spekter ohraničená vlnočty od 1020 cm⁻¹ do 1260 cm⁻¹, ve které leží výrazné peaky PDO i barviva, vhodné pro tvorbu spektrální mapy.



Obrázek 15: Základní okno „projektu“ v softwaru LabSpec 6, zobrazuje oblast měření, změřená spektra a spektrální mapu.

Hlavním výstupem měření jsou spektrální mapy viz obrázky 15, 17 a 18. V programu LabSpec 6 bylo vytvořeno několik druhů spektrálních map měřené oblasti. Pro tvorbu spektrálních map byl vybrán peak v oblasti Ramanova posunu cca 1048 cm^{-1} náležící polydioxanonu a druhý peak nacházející se v oblasti Ramanova posunu cca 1242 cm^{-1} náležící barviva Solvent Violet 13. V obrázku 15 vlevo nahoře jsou tyto peaky vyznačeny zelenou barvou (PDO) a červenou barvou (barvivo Solvent Violet 13).

Peak 1048 cm^{-1} a 1242 cm^{-1} jsou vyznačeny také v obrázku 14. Mimo ně jsou v tomto obrázku ještě označeny šipkou další peaky v polohách 1403 , 1610 a 1638 cm^{-1} , které také reprezentují výskyt barviva, ale nebyly předmětem tohoto zkoumání. Ramanovo spektrum samotného barviva Solvent Violet 13 je uvedeno na obrázku 16.



Obrázek 16: Ramanovo spektrum barviva Solvent Violet 13. Ve spektru je zřetelně vidět vliv fluorescence (základní linie spektra je vysoko nad vodorovnou osou grafu a vykazuje tvar typický pro fluorescenci).

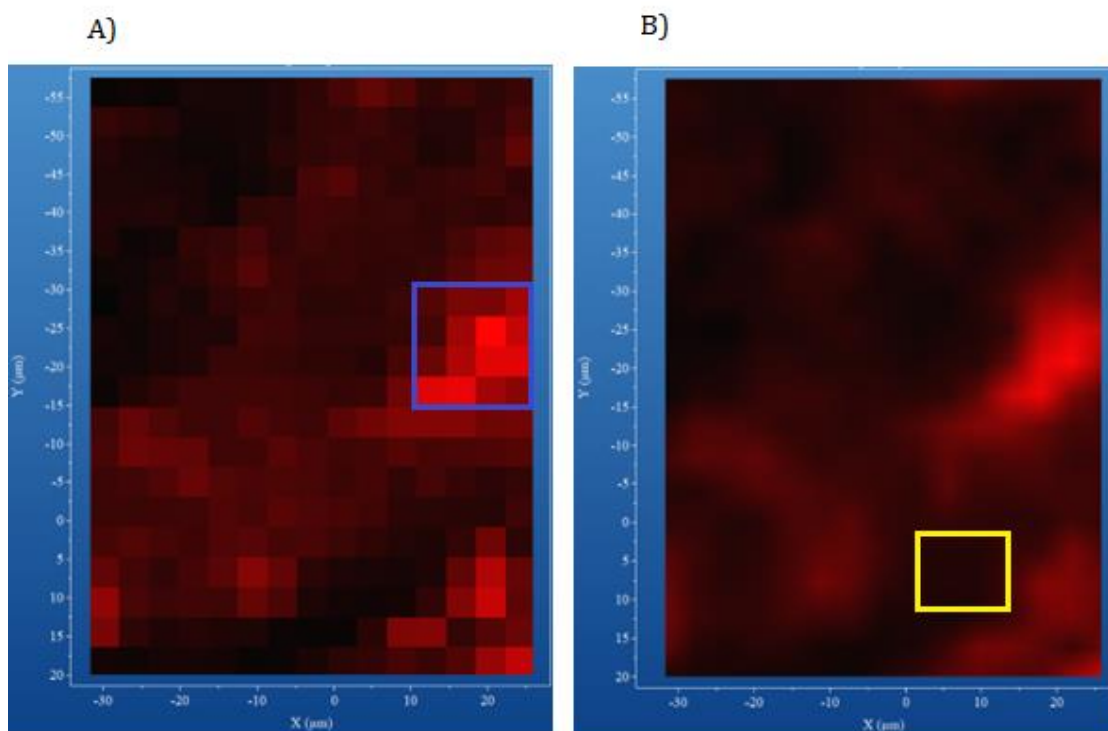
Pro výpočet spektrálních map, byly v tomto případě použity nikoliv hodnoty výšek uvedených peaků 1048 cm^{-1} a 1242 cm^{-1} , ale obsahy ploch pod nimi. Vybraná analyzovaná plocha peaku PDO je v grafu na obrázku 14 vyznačena zelenou barvou a plocha peaku barviva Solvent Violet 13 červenou barvou.

Pozn.: V levé horní části obrázku 15 si lze všimnout i výrazného peaku ohraničeného modrým sloupcem (v oblasti vlnočtů nad 1650 cm^{-1}), který však není předmětem této práce. Program LabSpec 6 totiž umožňuje vytvoření spektrálních map až ze tří různých oblastí spektra. Pro tuto práci byly využity pouze dvě oblasti, odpovídající PDO a barviva Solvent Violet 13.

Jednobarevná spektrální mapa rozložení barviva byla vytvořena tak, že každému jejímu „pixelu“ (tj. barevnému čtverci) byla přiřazena hodnota jasu odvozená z plochy peaku barviva ve spektru změřeném v odpovídající oblasti mapování. Výsledná mapa analyzované oblasti je uvedena na obrázku 17 A. Na ní je vidět, že v oblasti vymezené na ose x souřadnicemi cca $10,0\text{ }\mu\text{m}$ až $25,0\text{ }\mu\text{m}$ a na ose y souřadnicemi cca $-15,0\text{ }\mu\text{m}$ až $-30,0\text{ }\mu\text{m}$ (v obrázku 17 A zvýrazněná modrým obdélníkem), byla změřena spektra s největšími plochami peaků barviva Solvent Violet 13 (v této oblasti jsou „pixely“ o nejvyšším jasu). Z toho by se dalo vyvodit, že v této oblasti vzorku je nejvyšší podíl barviva.

Na obrázku 17 B je zobrazena spektrální mapa, která se od mapy na obrázku 17 A liší tím, že zde byla použita funkce pro vyhlazení obrazu. Při vyhlazování byly hodnoty jasu v jednotlivých obrazových bodech interpolovány tak, že výsledný

obraz je graficky lépe čitelný, protože neobsahuje „skokové“ přechody mezi různými úrovněmi jasu.



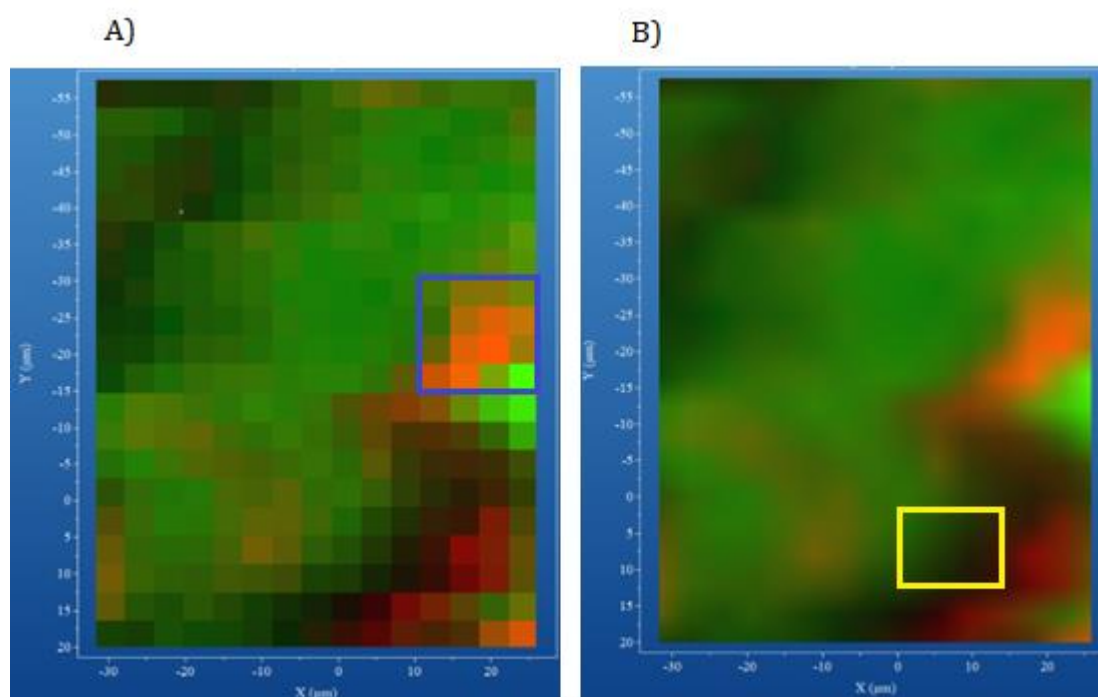
Obrázek 17: Jednoduché spektrální mapy zachycující rozložení barviva Solvent Violet 13 na povrchu degradovaného stentu (obrázek je vlastní prací autora).

- A) Mapa bez použití funkce pro vyhlazení obrazu.
- B) Mapa s použitím funkce pro vyhlazení obrazu.

Určitou nevýhodou jednobarevných spektrálních map může být to, že v nich není zohledněna intenzita jednotlivých spekter. Tmavší oblasti takové mapy tedy mohou reprezentovat nejen nižší podíl barviva, ale také pouze výskyt spekter o celkově nižší intenzitě. Z tohoto důvodu byly vytvořeny následující dvoubarevné mapy, které využívají nejen peak barviva, ale i peak PDO.

Dvoubarevné spektrální mapy jsou uvedeny na obrázku 18. Zobrazují rozložení barviva ve stejné oblasti vzorku degradovaného polydioxanonu jako mapy na obr. 17. Barvivo Solvent Violet 13 zde opět přísluší červená barva, zatímco polydioxanonu přísluší barva zelená. Barevný odstín každého čtverce, ze kterých je vytvořena mapa na obrázku 18 A, je odvozen z poměru plochy peaku PDO a plochy peaku barviva ve spektru změřeném v odpovídajícím bodu mapování. Hodnoty jasu vyjadřují velikost ploch vyhodnocovaných peaků, obdobně jako je tomu v případě jednobarevných spektrálních map. Na obrázku 18 B je zobrazena spektrální mapa, která byla vyhlazena pomocí programu LabSpec 6.

Na obrázku spektrální mapy před vyhlazením (obr. 18 A) je opět vidět, že modře vyznačená oblast obsahuje čtverce o vysokých hodnotách jasu. Ve dvoubarevné mapě je však možno pozorovat, že část této oblasti je zbarvená do červena a její druhá část je zbarvená do zelena. Čtverce s odstíny do červena odpovídají vyšším koncentracím barviva, zatímco v místech zeleně zbarvených čtverců se vyskytovaly vyšší koncentrace PDO na úkor barviva. Na tomto případu je patrné, že dvoubarevné spektrální mapy umožňují rozlišit oblasti vzorku s rozdílným chemickým složením lépe než mapy jednobarevné.



Obrázek 18: Spektrální mapy povrchu stentu využívající míchání dvou barev – zelené pro polydioxanon a červené pro barvivo Solvent Violet 13 (obrázek je vlastní prací autora).

A) Mapa bez použití funkce pro vyhlazení obrazu.

B) Mapa s použitím funkce pro vyhlazení obrazu.

Na dvoubarevné vyhlazené mapě (obr. 18 B) jsou dobře viditelné také tmavší oblasti, ve kterých byla změřena Ramanova spektra s nižšími intenzitami. Ukázková část takového regionu je vyznačena žlutým obdélníkem. Stejná oblast je pro porovnání zvýrazněna i v jednobarevné vyhlazené mapě (obr. 17 B). Z jednobarevné mapy však nelze spolehlivě vyčíst, zda nízké hodnoty jasu jsou způsobeny nízkými intenzitami celých spekter, nebo malým obsahem barviva (a tedy „pouze“ menšími plochami peaků barviva).

Závěr

Tato bakalářská práce se věnovala aplikaci metody spektrálního mapování pomocí Ramanova mikrospektrometru s využitím specializovaného softwaru pro vyhodnocování spektrálních dat. Zvolená metoda byla vyzkoušena pro studium plošného rozložení barviva Solvent Violet 13 v povrchové vrstvě vlákna biodegradabilního polymeru PDO uměle degradovaného v simulované tělní tekutině po dobu 16 týdnů. Ramanovým mikrospektrometrem XploRa PLUS od firmy HORIBA a softwaru LabSpec 6 bylo změřeno celkem 300 Ramanových spekter v obdélníkové mřížce. Následnou úpravou pomocí softwaru LabSpec 6 byla spektrální data převedena a upravena do grafické podoby – tzv. spektrálních map.

Ve změřených spektrech se projevovalo fluorescenční záření, ale provedením korekce základních čar (tzv. base line) byl efekt fluorescence výrazně potlačen. Díky tomuto bylo možné přesněji vykreslit spektrální mapy. Ve změřených spektrech byly identifikovány peaky náležící barvivu Solvent Violet 13 a díky tomu lze konstatovat, že barvivo se v použitém vzorku vyskytuje. Ze spektrálních map bylo možno pozorovat především plošné rozložení barviva v měřené oblasti (viz příloha č.1).

Ze spektrálních map bylo možné vyčíst, že barvivo v měřené oblasti je rozloženo nerovnoměrně. Z toho lze usuzovat, že v průběhu degradace je barvivo vyplavováno ze stentu různou měrou z různých částí oblastí použitého vzorku. Tento jev je nejlépe možné pozorovat ve dvoubarevných spektrálních mapách. Tyto spektrální mapy pro účel tohoto výzkumu můžeme považovat za vhodnější než mapy jednobarevné.

Při svém výzkumu jsem měl možnost si prohlédnout i další vzorky z polydioxanonu v různých stupních uměle vyvolané degradace. Na základě mnou provedeného měření a poznatků o Ramanově spektroskopii, které jsem během svého studia získal, mohu konstatovat, že obsah barviva Solvent Violet 13 v PDO klesá s rostoucí délkou degradace. Pouhým okem je možné vidět úbytek barviva, který se projevuje „vyblednutím“ materiálu. Čím déle je vzorek degradován, tím je úbytek barviva znatelnější. Kvantitativní analýza úbytku barviva pro různé doby degradace by mohla být námětem pro další výzkum pomocí Ramanova spektrometru.

Použité zdroje:

- [1] KOPLÍK, Richard. *Infračervená a Ramanova spektroskopie*. Praha, (2014), Odborná studijní opora. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. [online]. [cit. 13.3.2023] Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplikr/7 FA IR Raman 2014.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/7_FA_IR_Raman_2014.pdf).
- [2] MARTINEC, Marek. *Praktické aplikace a didaktické využití Ramanovy spektroskopie*. Plzeň, 2014. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni, Pedagogická fakulta, katedra chemie.
- [3] NICOLET CZ. *Výzkum imunoterapie pomocí Ramanovy spektroskopie*. [online]. [cit. 15.4.2023]. Dostupné z: <https://nicoletcz.cz/aplikace/veda-vyzkum-skolstvi/vyzkum-imunoterapie-pomoci-ramanovy-spektroskopie/>
- [4] BLATOŇOVÁ, Kateřina. *Studie využití chirurgického monofilamentu z polydioxanonu pro 3D tisk vstřebatelných ortopedických implantátů*. Liberec, 2022. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. [online]. [cit. 10.3.2023]. Dostupné z: [https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/163481 /Diplomka stag.pdf](https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/163481/Diplomka_stag.pdf)
- [5] FORMAN, Paul. *Smekal, Adolf Gustav Stephan*. [online]. [cit. 28.4.2023]. Dostupné z: <https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/smekal-adolf-gustav-stephan>
- [6] DENDISOVÁ, Marcela. ŽVÁTORA, Pavel. MATĚJKA, Pavel. *Ramanova spektrometrie*. Praha. 2011. Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav analytické chemie. [online]. [cit. 16.03.2023]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>
- [7] SODOMKA, Lubomír. SODOMKOVÁ, Markéta. SODOMKOVÁ, Magdalena. *Kronika Nobelových cen II*. Liberec: Adhesiv, 2002. ISBN 80-238-9205-5.
- [8] Autor neznámý. *Nobel Lectures, Physics 1922-1941*. Amsterdam. 1965. Elsevier Publishing Company. ISBN: 9781483222486
- [9] CHAUDHARY, Višnu. *Národní den vědy 2022 Datum, téma, historie, význam, důležitost, oslavy a další*. Unique news Publication by MaxFate Private Limited. 2022. [online]. [cit. 16.03.2023]. Dostupné z: <https://www.uniquenewsonline.com/national-science-day-2022-date-theme/>
- [10] FRAN, Adar. DELHAYE, Michel. DASILVA, Edouard. *Evolution of instrumentation for Detection of the Raman Effect as Driven by Available and by Developing Applications*. Journal of Chemical Education. 2007. roč. 84, č. 1, s. 50-60. DOI: 10.1021/ed084p50.
- [11] ATKINS, P. W. DE PAULA, Julio. *Fyzikální chemie*. Praha. 2013. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [12] LOSKOT, Jan. *Moderní měřicí technika a modelování ve vysokoškolské výuce fyzikálně-technických oborů*. Hradec Králové, 2019. Disertační práce. Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta. [online]. [cit. 03.04.2023]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/w0a7jf/STAG92961.pdf>

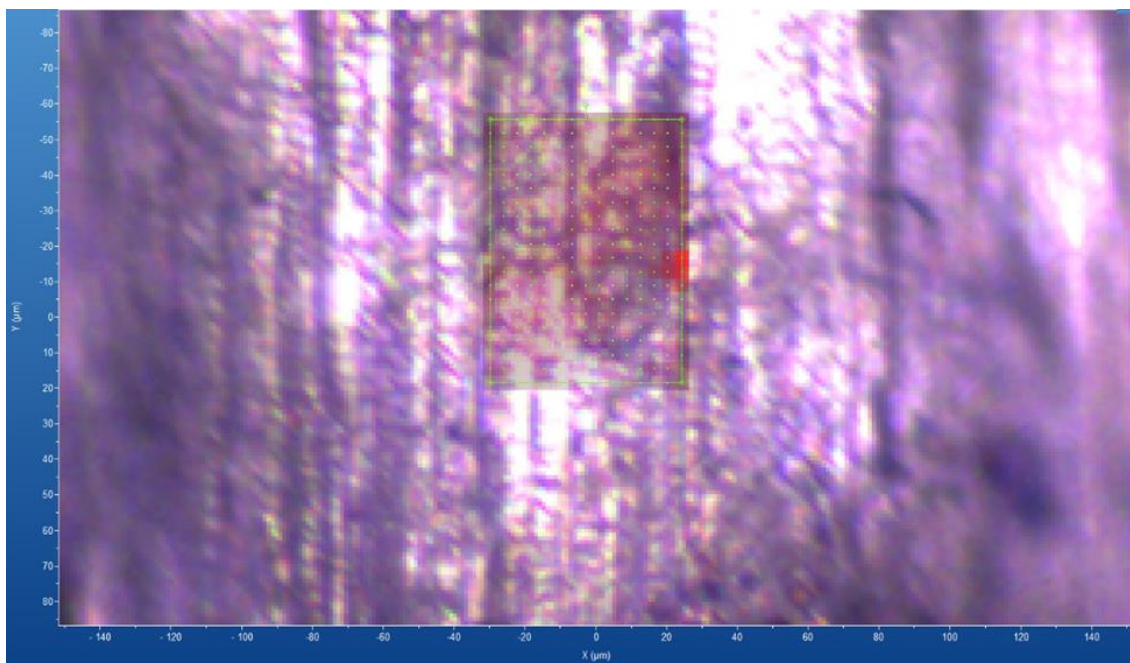
- [13] SMITH, Ewen. DENT, Geoffrey. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester (West Sussex): Wiley, John. 2005. ISBN 0-471-49794-0.
- [14] JANDERA, Pavel. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*. Vyd. 2. Pardubice. 2006. Univerzita Pardubice. ISBN 80-7194-906-x.
- [15] ČÁSLAVSKÝ, Josef. GEORG, Jiří. ŠEVČÍK, Kamil. *Organická analýza*. Český Těšín: 2 THETA, 2022, ISBN 978-80-88279-17-4.
- [16] MCGREERY, Richard L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. New York. 2000. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9780471252870.
- [17] NOVOTNÁ, Radka. ŠILHA, Tomáš. TRÁVNÍČEK Zdeněk. *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc. 2011. Učební text. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. [online]. [cit. 16.02.2023].
Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni_materialy/Spektralni_metody.pdf
- [18] SVÁROVSKÝ, Michal. *Ramanova spektroskopie pro detekci kontrabandu*. Praha. 2021. Bakalářská práce. AMBIS vysoká škola, a.s. – Bezpečnostní management v regionech. [online]. [cit. 16.02.2023]. Dostupné z: https://is.ambis.cz/th/tzpkv/Bakalarska_prace_Ramanova_spektroskopie_pro_detekci_kontrabandu.pdf
- [19] MALTAŞ, Derya Cebeci. AMOTZ, Dor Ben. ALAM, Md Anik. WANG, Ping. PINAL, Rodolfo. *Photobleaching profile of Raman peaks and fluorescence background*. (2017), European pharmaceutical review. [online]. [cit. 16.02.2023]. Dostupné z: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/70503/raman-peaks-fluorescence-background/>
- [20] Praus, Petr. VONTOROVÁ, Jiřina. *Analytická chemie II*. Ostrava. 2015. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, Katedra chemie. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [21] EDWARDS, H. G. M. CHELMERS, J. M. *Raman spectroscopy in archeology and history*. 2005. str. 48-51. The Royal Society of Chemistry. ISBN: 0-85404-522-8.
- [22] BERÁNKOVÁ, Barbora. *Využití Ramanovy spektroskopie a ramanovské pinzety k analýze a izolaci PHA produkujících bakterií*. Brno. 2019. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. [online]. [cit. 10.03.2023]. Dostupné z: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=188686
- [23] Přeložil: Černík, Marek z podkladů firmy WITec, *Variace Ramanova zobrazování ve farmaceutickém výzkumu*. Chemagazín - 5, ročník XXXI, 2021. [online]. [cit. 5.05.2023]. Dostupné z: https://chemagazin.cz/content/id_magazines_pdf/26.pdf
- [24] CHALMERS, M. John. EDWARDS, G. M. Howell. Hargreaves, D. Michael. *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. Chichester. 2012. Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-74906-7.

- [25] LÁŽŇOVSKÝ, Matouš. *Nobelista Jerome Friedman: příroda je jednodušší, než si fyzici myslí*. [online]. Technet.idnes.cz. 2015. [online]. [cit. 16.4.2023]. Dostupné z: https://www.idnes.cz/technet/veda/udaje-z-lhc-higgsova-osonu.A151021_144915_veda_mla
- [26] MARTINS, Joana A. LACH, Antonina A. MORRIS, Hayley L. CARR, Andrew J. MOUTHUY, Pierre-Alexis. *Polydioxanone implants: A systematic review on safety and performance in patients*. (26 November 2019). Journal of Biomaterials Applications. 34 (7): 902–916. [online]. [cit. 8.5.2023]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7044756/>
- [27] NEČASOVÁ, Veronika. *Bioresorbovatelné polymery pro zdravotnické aplikace*. Zlín, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. [online]. [cit. 8.5.2023]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/25274/ne%c4%8dasov%c3%a1_2013_bp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [28] BOLAND, E. D. COLEMAN, B. D. BARNES, C. P. SIMSPON, D. G. WNEK, G. E. BOWLIN, G. L. *Electrospinning polydioxanone for biomedical applications*. Acta Biomaterialia. 2005. 1(1), 115–123. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2004.09.003
- [29] OULEHLOVÁ, Zuzana. *Vývoj planárních nanovlákných vrstev pro nové aplikace v gastrointestinální chirurgii*. Liberec, 2020. Diplomová práce. Technická univerzita Liberec. [online]. [cit. 8.5.2023]. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/159766>
- [30] GROLICH, Tomáš. *Benigní stenózy biliárního traktu – nové možnosti léčby*. Brno. 2015. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. [online]. [cit. 20.6.2023]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/0o1j0i/>
- [31] ELLA-CS, s.r.o.; BD STENT; [online]. [cit. 27.5.2023]. Dostupné z: <https://ellacs.cz/bd-stent>
- [32] ALBERTINI, J. G. *Surgical Pearl: Gentian violet-dyed sutures improve intraoperative visualization*. Journal of the American Academy of Dermatology. 2001, Vol. 45, Issue 3, 453-455. DOI: 10.1067/mjd.2001.113472
- [33] Loskot, J. Jezbera, D. Bezrouk, A. Doležal, R. Andrýs, R. Francová, V. Miškář, D. Myslivcová Fučíková, A. *Raman Spectroscopy as a Novel Method for the Characterization of Polydioxanone Medical Stents Biodegradation*. Materials. 2021. Vol. 14, Issue 18, 5462. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14185462>
- [34] HORIBA Scientific. *XploRA™ PLUS*. [online]. [cit. 7.6.2023]. Dostupné z: <https://www.horiba.com/cze/scientific/products/detail/action/show/Product/xploratm-plus-1528/>
- [35] PAVELKA, Vít. *Pokročilé techniky přípravy koloidních roztoků nanočástic ušlechtilých kovů*. Brno. 2018. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. [online]. [cit. 7.6.2023]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/r3u1w/dipMBF.pdf>

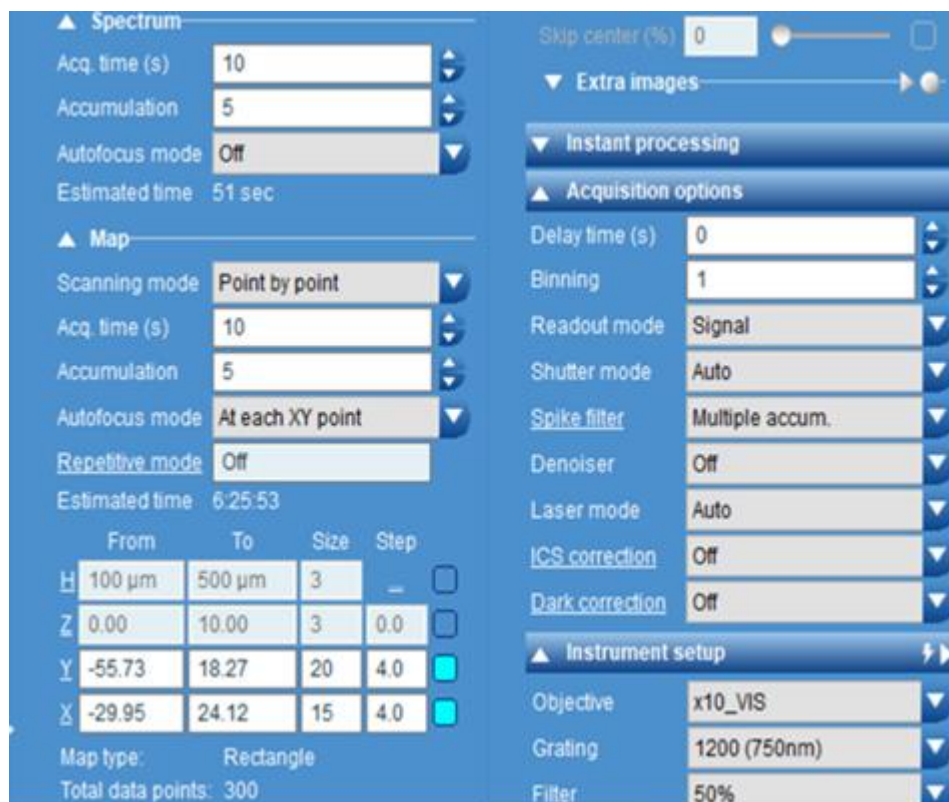
[36] NĚMCOVÁ, Irena. RYCHLOVSKÝ, Petr. ČERMÁKOVÁ, Ludmila. *Spektrometrické analytické metody*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-586-8.

[37] KOPECKÁ, Ivana. *Identifikace materiálů sbírkových předmětů ze syntetických polymer*. Fórum pro konzervátory – restaurátory. Národní technické museum. 2021, vol. XI, No. 1. [online]. [cit. 28.5.2023]. Dostupné z: https://mck.technicalmuseum.cz/wp-content/uploads/2021/10/03_Ivana-Kopecka.pdf

Oblast mapování Ramanových spekter a ukázka nastavení parametrů měření.



Obrázek P1: Oblast mapování Ramanových spekter na povrchu PDO vlákna. Je možné zde vidět optický snímek části vlákna, pořízený přímo Ramanovým mikrospektrometrem. Mapování spekter bylo provedeno v bodech mřížky, která je v tomto obrázku vykreslena zelenou barvou.



Obrázek P2: Ukázka nastavení parametrů měření Ramanových spekter v programu LabSpec 6.