

Spektroskopia i Mikroskopia Ramana

SKRYPT DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH

Agnieszka Drózd

KATEDRA FIZYKI MEDYCZNEJ I BIOFIZYKI, WFIIS | AGH

1.	Wstęp.....	3
2.	Podstawy fizyczne metody	4
2.1.	Rozpraszanie promieniowania	4
2.2.	Widmo Ramana – opis matematyczny zjawiska fizycznego	6
2.3.	Intensywność promieniowania rozproszonego	8
3.	Mikroskop Ramana	10
3.1.	Budowa spektrometru Ramana	10
3.2.	Spektralna zdolność rozdzielcza	11
3.3.	Przestrzenna zdolność rozdzielcza	12
3.4.	Konfokalny mikroskop Ramanowski	12
3.5.	Źródła promieniowania	13
3.6.	Wymagania dotyczące analizowanych próbek	15
3.7.	Mikroskop Ramanowski WITec Alpha300R.....	15
4.	Spektroskopia Ramana	17
4.1.	Informacja zawarta w widmie Ramana	17
4.2.	Analiza i interpretacja widm	17
4.3.	Opis ćwiczenia	17
4.3.1.	Badane próbki	18
4.3.2.	Optymalizacja warunków pomiaru:	18
4.3.3.	Identyfikacja pasm w widmach Ramana wybranych substancji.....	19
4.3.4.	Sprawozdanie.....	21
4.3.5.	Przykład analizy widm Ramana w Orange Data Mining	21
5.	Mikroskopia Ramana	29
5.1.	Analiza danych hiperspektralnych.....	29
5.1.1.	Mapy biochemiczne	29
5.1.2.	Analiza klastrowa obrazów Ramana	30
5.1.3.	Profile głębokościowe	31
5.2.	Opis ćwiczenia	31
5.3.	Badane próbki	31
5.4.	Warunki pomiarowe.....	32

5.5.	Analiza danych pomiarowych	32
5.6.	Sprawozdanie.....	33
6.	Programy pomocne w analizie ramanowskiej.....	34
7.	Literatura	35

1. Wstęp

Zjawisko rozpraszania ramanowskiego zostało po raz pierwszy opisane w 1923 roku przez A. Smekala. Doświadczalnie jego istnienie potwierdził Ch. Raman w 1928 roku, za co w 1930 roku otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki. Efekt Ramana opiera się na zjawisku przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi lub rotacyjnymi cząstek na skutek nieelastycznego rozpraszania światła. Po tym, jak światło monochromatyczne oddziałuje z próbką, bardzo mała jego część zmienia swoją długość fali.

Odkrycie i zrozumienie efektu Raman otworzyło drzwi do nowego rodzaju spektroskopii. Jednak metoda ta zyskała na popularności dopiero po odkryciu lasera, gdyż spektroskopia Raman wymaga światła monochromatycznego.

W ten sposób próbka jest napromieniowana laserem, a część rozproszonego światła jest analizowana za pomocą spektrografu (technologia dyspersyjna lub FT). Na koniec otrzymujemy widmo Ramana, które pokazuje nam charakterystyczne sygnały tj. "pasma" dla badanego materiału. Widma ramanowskie dostarczają informacji o strukturze molekularnej badanej substancji.

2. Podstawy fizyczne metody

2.1. Rozpraszanie promieniowania

Molekuła jest zbiorem ładunków dodatnich (zręby atomowe) i ujemnych (elektrony walencyjne), z którymi oddziałuje składowa elektryczna promieniowania elektromagnetycznego. Indukuje ona w molekułe moment dipolowy μ_{ind} proporcjonalny do natężenia E składowej elektrycznej pola elektromagnetycznego, przy czym współczynnikiem proporcjonalności jest polaryzowalność molekuły α :

$$\mu_{ind} = \alpha E$$

Polaryzowalność to potencjalna zdolność elektronów do przemieszczania się względem jądra w polu elektrycznym. Jest ona tym większa, im słabiej związane są elektrony walencyjne ze szkieletem zrębów atomowych (im bardziej są ruchliwe elektrony w molekułe).

Natężenie składowej elektrycznej promieniowania zmienia się periodycznie z czasem:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

Gdzie E_0 jest amplitudą natężenia E , a ν_0 jest częstotliwością promieniowania. Z powyższych wzorów wynika, że moment dipolowy musi drgać z częstotliwością ν_0 :

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

Każdy drgający dipol staje się źródłem promieniowania o intensywności I proporcjonalnej do kwadratu jego amplitudy M_{ind} i do czwartej potęgi częstotliwości jego drgań:

$$I \sim M_{ind}^2 \nu_0^4$$

Gdzie:

$$M_{ind} = \alpha E_0$$

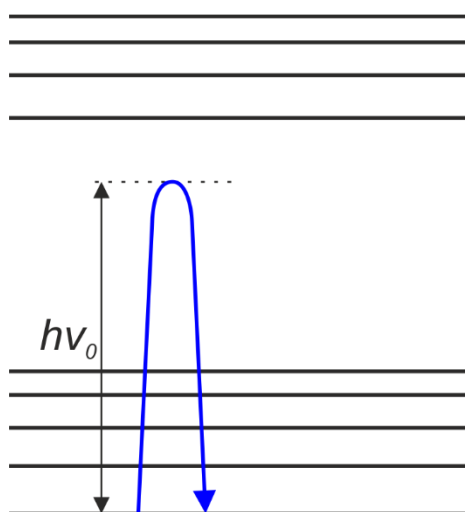
Zatem molekuła jako drgający dipol stanie się źródłem promieniowania wysyłanego we wszystkich kierunkach przestrzeni, a intensywność tego promieniowania:

$$I \sim \alpha^2 E_0^2 \nu_0^4$$

Opisywane zjawisko nazywamy rozpraszaniem promieniowania. Promieniowanie rozproszone ma taką samą częstotliwość ν_0 jak promieniowanie padające. Rozpraszanie tego typu nazywamy rozpraszaniem Rayleigha.

Nie istnieją molekuły o zerowej polaryzowalności, zatem w każdej sytuacji promieniowanie oddziałuje z molekułami. Jeżeli w wiązce promieniowania elektromagnetycznego nie ma fotonów o energii odpowiadającej odstępom między poziomami energetycznymi (czyli takich, które mogą zostać zaabsorbowane) to fotony te ulegają rozproszeniu we wszystkich kierunkach.

Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie rozproszenia Rayleigha w układzie poziomów energetycznych molekuly.



Rysunek 1 Rozproszenie Rayleigha

Foton o energii $h\nu_0$ nie pasuje do poziomów energetycznych molekuly. Nie jest spełniona reguła wyboru $h\nu_0 = \Delta E$, zatem taki foton nie może zostać przez nią zaabsorbowany. Jednak foton ten oddziałuje z molekulą w wyniku czego zmieniony zostanie kierunek jego biegu, a molekula powraca na ten sam poziom energetyczny.

Warto wyjaśnić, czym dla obserwatora różni się rozproszenie od absorpcji. Z wiązki fotonów o różnych wartościach ν wszystkie rodzaje fotonów są rozpraszane, natomiast te spełniające regułę wyboru $h\nu = \Delta E$ ulegają absorpcji. Ubytek fotonów na skutek rozproszenia nie powoduje zabarwienia substancji, natomiast absorpcja, która jest procesem wybiórczym, nadaje jej zabarwienie. Zabarwienie obserwowane jest dopełnieniem barwy promieniowania absorbowanego.

Co ważne, prawdopodobieństwo rozproszenia promieniowania jest ok 3-4 rzędy wielkości mniejsze od prawdopodobieństwa absorpcji. Dlatego rozpatrując prawo Lamberta-Beera jako opis zjawiska absorpcji:

$$I = I_0 e^{-\epsilon c l}$$

gdzie: I – intensywność promieniowania, które przeszło przez próbkę, I_0 – intensywność promieniowania padającego, ϵ – molowy współczynnik absorpcji, c – stężenie molowe molekuł absorbujących, l – grubość próbki

zakładamy, że intensywność promieniowania padającego I_0 w przypadku fotonów nie ulegających absorpcji nie zmienia się po przejściu przez próbkę i $I = I_0$. Ubytek promieniowania wskutek rozproszenia jest zatem pomijalnie mały.

2.2. Widmo Ramana – opis matematyczny zjawiska fizycznego

W widmie promieniowania rozproszonego, oprócz fotonów o częstotliwości ν_0 pojawiają się również fotony o częstotliwościach $\nu_0 \pm \nu$. Mechanizm powstawania widma ramanowskiego opisuje teoria polaryzowalności Placzka. Jak już wiemy, indukowany przez promieniowanie drgający moment dipolowy jest zależny od polaryzowalności molekuly α :

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

W czasie drgania normalnego periodycznie zmienia się siła wiązania elektronów w molekule. Zatem polaryzowalność można przedstawić jako funkcję współrzędnej normalnej drgania:

$$\alpha = f(q)$$

Nie znamy postaci tej funkcji, rozwijamy ją zatem w szereg Maclaurina, zakładając, że wychylenie q jest bliskie zeru. Dla dwuatomowej molekuly o jednej współrzędnej normalnej otrzymujemy:

$$\alpha(q) = \alpha_{q=0} + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_{q=0} q + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\alpha}{dq^2}\right)_{q=0} q^2 + \dots$$

Pozostawiamy dwa pierwsze wyrazy, a dalsze odrzucamy (przybliżenie harmoniczne). Wychylenie q zmienia się periodycznie z czasem:

$$q = Q \cos(2\pi\nu t)$$

Zatem w przybliżeniu harmonicznym:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 Q \cos(2\pi\nu t)$$

gdzie ν jest częstotliwością drgania normalnego, a Q jego amplitudą. Z powyższego wzoru wynika, że polaryzowalność zmienia się z częstotliwością drgania normalnego ν , ale jedynie wtedy, gdy $\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0$ jest różne od zera. Po podstawieniu zależności na α do wzoru na μ_{ind} otrzymamy:

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 Q E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu t)$$

Zastosowanie w w/w równaniu tożsamości trygonometrycznej:

$$\cos(\alpha) \cos(\beta) = \frac{1}{2} \cos(\alpha - \beta) + \frac{1}{2} \cos(\alpha + \beta)$$

proceedzi do ostatecznego wzoru na μ_{ind} , który pozwala wytłumaczyć zjawisko Ramana:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q E_0 \cos 2\pi(\nu_0 - \nu)t + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q E_0 \cos 2\pi(\nu_0 + \nu)t$$

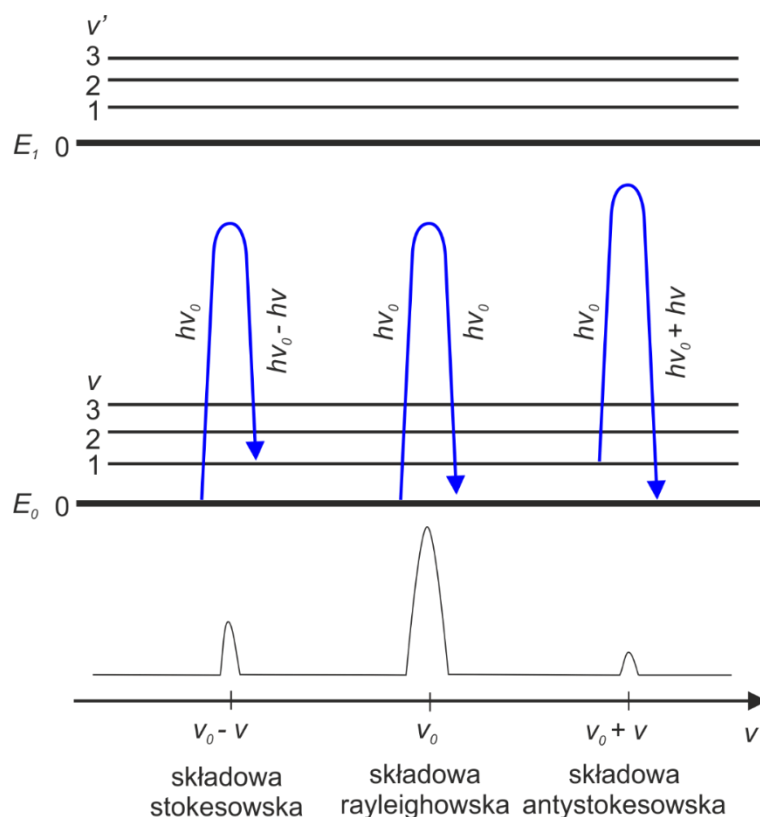
Drgający indukowany moment dipolowy ma trzy składowe o częstotliwościach ν_0 , $\nu_0 - \nu$ i $\nu_0 + \nu$. Taki dipol wysyła w przestrzeń fale o trzech częstotliwościach, z których jedna odpowiada częstotliwości ν_0 promieniowania wzbudzającego, druga jest różnicą ν_0 i częstotliwości drgania normalnego ν , a trzecia ich sumą. Można zatem powiedzieć, że promieniowanie wzbudzające o częstotliwości ν_0 zostaje zmodulowane przez częstotliwości drgań normalnych molekuł, z którymi oddziałuje.

Z powyższego wzoru wynika, że warunkiem pojawienia się pasma ramanowskiego w widmie jest zmiana polaryzowalności molekuły.

Jeżeli pochodna $\frac{d\alpha}{dq} = 0$, to w widmie pojawi się tylko pasmo rayleighowskie. W widmie IR z kolei aktywne są tylko te drgania, dla których zmienia się moment dipolowy molekuły. Różne reguły wyboru dla widma IR i Ramana powodują, że niektóre drgania nieaktywne w podczerwieni mogą być aktywne w widmie Ramana i na odwrót.

Rysunek 2 przedstawia rozpraszanie Ramana na schemacie poziomów energetycznych.

Fotony promieniowania padającego o częstotliwości ν_0 nie pasują do poziomów energetycznych molekuły, mogą więc być tylko rozpraszane. Jeżeli molekuła po



Rysunek 2 Przejścia ramanowskie między poziomami energetycznymi molekuły dwuatomowej oraz odpowiadające im widmo Ramana; E_0 i E_1 – podstawowy i wzbudzony poziom elektronowy; ν i ν' – poziomy oscylacyjne należące do poziomów elektronowych E_0 i E_1

oddziaływaniu z promieniowaniem powróci na ten sam poziom, mamy do czynienia z klasycznym rozpraszaniem Rayleigha, a częstotliwość fotonu pozostaje niezmienną.

W sytuacji, gdy molekula w wyniku oddziaływania z promieniowaniem przeniesie się na wyższy poziom oscylacyjny, energia fotonu zmniejszy się o różnicę energii poziomów oscylacyjnych $h\nu$. Na skutek tego zjawiska w widmie Ramana otrzymamy pasmo stockesowskie, oddalone od rayleighowskiego o częstotliwość oscylacji ν .

Jeżeli przed oddziaływaniem z promieniowaniem molekula znajdowała się na wzbudzonym poziomie oscylacyjnym, istnieje duże prawdopodobieństwo, że oddziaływanie przeniesie ją na podstawowy (zerowy) poziom oscylacyjny. Rozproszony w ten sposób foton jest zwiększony o różnicę energii $h\nu$ poziomów oscylacyjnych i powoduje powstanie w widmie pasma przesuniętego względem rayleighowskiego o ν , ale w przeciwną stronę niż pasmo stockesowskie – jest to tzw. pasmo antystokesowskie.

2.3. Intensywność promieniowania rozproszonego

Pamiętając, że:

$$I \sim M_{ind}^2 \nu_0^4$$

możemy określić stosunki intensywności trzech w/w składowych w widmie:

$$I_R \sim \alpha_0^2 E_0^2 \nu_0^4$$

$$I_S \sim \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0^2 Q^2 E_0^2 (\nu_0 - \nu)^4$$

$$I_{AS} \sim \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0^2 Q^2 E_0^2 (\nu_0 + \nu)^4$$

$$\frac{I_S}{I_R} = \frac{\left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0^2 Q^2 E_0^2 (\nu_0 - \nu)^4}{\alpha_0^2 E_0^2 \nu_0^4} \approx 10^{-3}$$

Jeżeli widmo Ramana wzbudzone jest promieniowaniem widzialnym lub nadfioletem to $\nu_0 \gg \nu$ i w przybliżeniu $\nu_0 - \nu \approx \nu_0$ – dlatego stosunek 4-tych potęg w powyższym wyrażeniu nie odbiega znacznie od jedności. Z kolei $\left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0$ jest zwykle znacznie mniejsze od α_0 , a w dodatku amplituda wychylenia Q jest wielkością bardzo małą. W rezultacie pasma stockesowskie są ok. 1000 razy słabsze od rayleighowskiego.

W stanie równowagi termicznej na wzbudzonym poziomie oscylacyjnym jest znacznie mniej molekuł niż na podstawowym, przez co przejścia antystokesowskie będą znacznie

rzadsze niż stockesowskie. Obsadzenie poziomów energetycznych molekuly jest opisane funkcją rozkładu energii Boltzmana:

$$\frac{n_w}{n_n} = \exp\left(-\frac{E_w - E_n}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{h\nu}{kT}\right)$$

Gdzie n_w/n_n jest stosunkiem liczby molekuł na wyższym E_w i niższym E_n poziomie energetycznym, czyli tzw. stosunkiem obsadzeni poziomów energetycznych w temperaturze T .

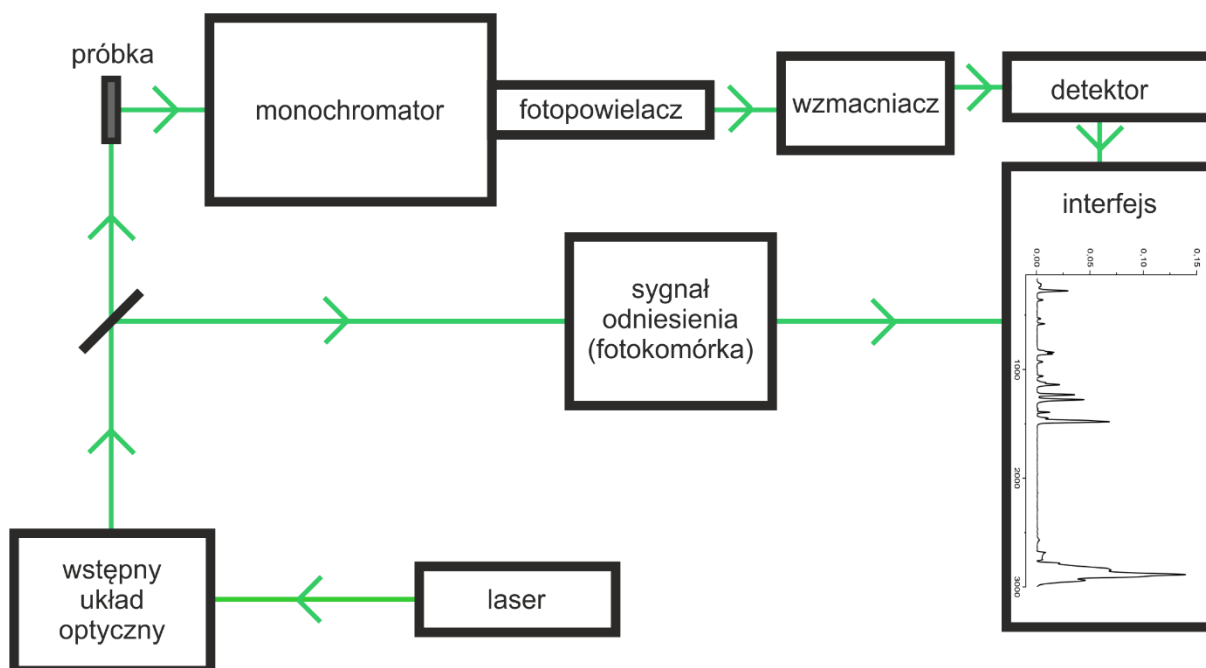
$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \frac{\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0^2 Q^2 E_0^2 (\nu_0 + \nu)^4}{\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0^2 Q^2 E_0^2 (\nu_0 - \nu)^4} \exp\left(-\frac{h\nu}{kT}\right) = \frac{(\nu_0 + \nu)^4}{(\nu_0 - \nu)^4} \exp\left(-\frac{h\nu}{kT}\right)$$

Ponieważ $\nu_0 \gg \nu$, więc $\left(\frac{\nu_0 + \nu}{\nu_0 - \nu}\right)^4 \approx 1$, a o stosunku intensywności $\frac{I_{AS}}{I_S}$ decyduje stosunek obsadzeni poziomów oscylacyjnych. W praktyce pasma antystokesowskie obserwujemy tylko w przypadku bardzo małych częstotliwości oscylacji ν . Przy większych ν obsadzenie wzbudzonego poziomu oscylacyjnego staje się znikomo małe w normalnej temperaturze i pasm antystokesowskich nie można zaobserwować.

3. Mikroskop Ramana

3.1. Budowa spektrometru Ramana

Nieodłączną częścią mikroskopu Ramana jest spektrometr. Poglądowy schemat budowy spektrometru ramanowskiego przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3 Ideowy schemat budowy spektrometru Ramana

Promieniowanie lasera trafia to wstępnego monochromatora (układu pryzmatów), którego zadaniem jest odizolowanie monochromatycznego promieniowania o wybranej długości fali od świecenia plazmy laserowej i ewentualnych słabszych linii o innych długościach fali. Następnie promieniowanie trafia na zwierciadło prawie przezroczyste, na którym niewielka jego części jest odbijana w kierunku fotokomórki, która wytwarza sygnał odniesienia, który będzie następnie przetwarzany przez interfejs.

Główna wiązka promieniowania kierowana jest na badaną próbkę, w której ulega rozproszeniu. Wiązka promieniowania rozproszonego zbierana jest na wejściowej szczeliny monochromatora głównego. Monochromator to układ optyczny służący do skanowania widma (ciągła zmiana długości fali w wybranym zakresie promieniowania). Jest stosowany w dyspersyjnych spektrometrach Ramana. Konstrukcja monochromatorów jest taka sama dla całego zakresu światła, a różnica dotyczy materiału, z którego wykonane są poszczególne elementy (szczeliny, soczewki, lustra,

okienka, siatki dyfrakcyjne czy pryzmaty). W budowie monochromatora możemy wyróżnić:

- szczelinę wejściową, przez którą prostopadle wpada wiązka światła
- zestawu soczewek lub luster zbierających, które wytwarzają równoległy promień
- siatki dyfrakcyjnej, która rozdziela promieniowanie na jego składowe
- elementu zbierającego, który zamienia obraz na szczelinie wejściowej na obraz na płaszczyźnie ogniskowej
- szczeliny wyjściowej, która rozdziela dany zakres promieniowania elektromagnetycznego.

Zasadniczym elementem monochromatora jest siatka dyfrakcyjna, czyli płytka z układem równoległych szczelin. Wiązka światła padająca na szczeliny ulega ugięciu, czyli dyfrakcji. Liczba nacięć na 1 mm długości wynosi zazwyczaj 300-2000 dla zakresu UV i Vis oraz 10-200 dla IR. Zmiana rozdzielczości spektralnej spektrometrów wymaga zmiany siatki dyfrakcyjnej i rekalkulacji instrumentu.

Promieniowanie po wyjściu z monochromatora trafia na fotopowielacz, gdzie zostaje przekształcone na sygnał elektryczny (fotoprąd). Sygnał z fotopowielacza zostaje wzmocniony we wzmacniaczu a następnie trafia do detektora. Za pomocą dedykowanego interfejsu (oprogramowanie) sygnały z próbki i sygnał odniesienia z fotokomórki są przetwarzane na widmo ramanowskie.

Detektory stosowane w dyspersyjnych spektrometrach Ramana to najczęściej kamery CCD. Jest to dwuwymiarowy układ diod, odczytujący każdą składową rozdzielonego w monochromatorze światła, która pada na jedną kolumnę, dostarczając informacji o natężeniu i długości fali.

Dzięki zastosowaniu technologii światłowodowej można wyprowadzić światło laserowe poza spektrometr i rejestrować widmo z odległości nawet kilku metrów, co umożliwiło skonstruowanie mikroskopów Ramana.

3.2. Spektralna zdolność rozdzielcza

Spektralna zdolność rozdzielcza (rozdzielczość spektralna) to zdolność układu spektroskopowego do rozdzielania (różnicowania) sąsiadujących pików. Konfokalne układy Ramana mają rozdzielczość widmową, która jest przede wszystkim definiowana przez:

- Ogniskową spektrometru (im dłuższa ogniskowa, tym wyższa rozdzielczość widmowa)
- Siatkę dyfrakcyjną (im większa gęstość rowków, tym wyższa rozdzielczość widmowa)
- Rozmiar piksela w kamerze CCD (im mniejsze piksele, tym wyższa rozdzielczość widmowa)
- Szczelinę wejściową lub otwór pinhole (im mniejsza szczelina/otworek, tym wyższa rozdzielczość widmowa)

- Zachowanie kształtu linii (=jakość obrazowania) spektrometru.

Rozdzielczość spektralną można określić eksperymentalnie, np. mierząc rozdzielczość pików na znanych próbkach odniesienia. Próbką często wykorzystywaną do demonstracji rozdzielczości widmowej jest na przykład CCl_4 .

Naturalne szerokości linii Ramana są zwykle większe niż 3 cm^{-1} . Dlatego rozdzielczość widmowa w zakresie 1 cm^{-1} jest wystarczająca dla większości próbek.

3.3. Przestrzenna zdolność rozdzielcza

Przestrzenna zdolność rozdzielcza (rozdzielczość przestrzenna) konwencjonalnego mikroskopu szerokokątnego, jak również konfokalnego, zależy od apertury numerycznej (NA) obiektywu i długości fali wzbudzenia λ . Definiuje najmniejszą odległość między dwoma obiektami, przy której można rozróżnić je jako oddzielne. Ponadto rozdzielczość przestrzenna może być oceniana w kategoriach rozdzielczości bocznej (kierunek x-y) i rozdzielczości głębokości (kierunek z).

Rozdzielczość boczna (lateralna): Teoretyczną rozdzielczość boczną układu mikroskopowego można oszacować za pomocą kryterium Rayleigha. W przypadku mikroskopów konfokalnych o wysokiej NA rozdzielczość boczna jest proporcjonalna do λ/NA . Konfokalny mikroskop obrazowania ramanowskiego może osiągnąć rozdzielczość boczną 250–300 nm.

Rozdzielczość głębokościowa: Rozdzielczość głębi mikroskopu konfokalnego jest proporcjonalna do λ/NA^2 . Konfokalny mikroskop obrazowania ramanowskiego może osiągnąć rozdzielczość głębokości $1\text{ }\mu\text{m}$ lub mniejszą.

3.4. Konfokalny mikroskop Ramanowski

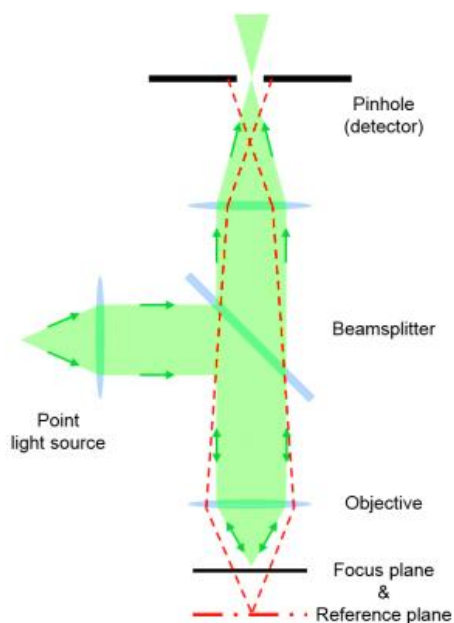
Celem mikroskopii konfokalnej jest tłumienie światła z płaszczyzn spoza ogniska. Realizowane jest to po pierwsze przez oświetlenie punktowe w płaszczyźnie ogniskowej, a po drugie przez otwór w płaszczyźnie sprzężonej ścieżki detekcji wiązki.

Dzięki oświetleniu punktowemu i punktowej detekcji, w danym momencie rejestrowana jest informacja tylko z jednego punktu. Aby uzyskać obraz, próbka jest skanowana punkt po punkcie i linia po linii.

Zalety mikroskopii konfokalnej w porównaniu do tradycyjnej mikroskopii o szerokim polu to poprawiona rozdzielczość w płaszczyźnie bocznej, wysoka zdolność rozróżniania w kierunku osiowym, zmniejszone tło sygnału oraz możliwość zbierania seryjnych przekrojów optycznych z różnych płaszczyzn ogniskowych w celu generowania profili głębokościowych lub obrazów 3D.

Rozmiar otworu (pinhole) jest kompromisem między rozdzielczością a przepustowością sygnału. Z jednej strony sygnał powinien być tak wysoki, jak to możliwe, podczas gdy z drugiej strony rozdzielczość przestrzenna również powinna być tak dobra, jak to możliwe. Mały otwór mocno zwiększa głębokość, a także rozdzielczość boczną. Jednak sygnał docierający do detektora jest słabszy.

Technika konfokalnego obrazowania Ramana łączy spektroskopię Ramana z mikroskopią konfokalną, pozyskując informacje o pełnym widmie Ramana w każdym pikselu obrazu. W ten sposób wykrywany i obrazowany jest przestrzenny rozkład składników chemicznych w próbce. Konfokalne mikroskopy Ramana o wysokiej rozdzielczości osiągają rozdzielczość boczną przy granicy dyfrakcji ($\sim \lambda/NA$; typowo 250–300 nm dla długości fali wzbudzenia 532 nm i obiektywu 100x 0,9 NA). Ponadto konfiguracja mikroskopu konfokalnego charakteryzuje się doskonałą rozdzielczością głębokościową (poniżej 1 μm) i umożliwia generowanie obrazów 3D Ramana i profili głębokościowych.



Rysunek 4 Zasada mikroskopii konfokalnej

3.5. Źródła promieniowania

W spektroskopii Ramana wykorzystuje się promieniowanie monochromatyczne, najczęściej z obszaru widzialnego lub nadfioletowego. Widmo Ramana jest widmem rozproszenia, zatem najwygodniej jest prowadzić jego obserwację pod kątem 90° do kierunku padania promieniowania wzbudzającego, chociaż stosowane są również inne kąty obserwacji tj. 180° i 0° . Ten ostatni spotyka się często w mikroskopii Ramana. Intensywność promieniowania rozproszonego jest 4-8 rzędów wielkości mniejsza od intensywności promieniowania wzbudzającego. Zatem, aby uzyskać mierzalny strumień fotonów rozproszenia ramanowskiego musimy stosować do wzbudzenia bardzo silne źródła promieniowania i bardzo czułe układy detekcyjne.

Przełomem w rozwoju spektroskopii Ramana było wprowadzenie do wzbudzania widma laserów, które odznaczają się dużą monochromatycznością promieniowania i bardzo dużą intensywnością. W dodatku promieniowanie laserowe jest spolaryzowane, co ułatwia określenie stopnia depolaryzacji pasm ramanowskich.

Zazwyczaj stosuje się lasery o działaniu ciągłym, gazowe lub barwnikowe. Najpopularniejszy w spektroskopii Ramana jonowy laser argonowy ma moc sumaryczną około 4 W, z czego 1,4 W przypada na zieloną linię (513,5 nm), a 1,3 W na niebieską linię

(488 nm). W tym obszarze długości fali wzbudzana jest często fluorescencja utrudniająca (ale nie zawsze uniemożliwiająca) obserwację widma Ramana. Fluorescencji można uniknąć stosując laser helowo-neonowy o mocy zaledwie kilkudziesięciu mW w obszarze światła czerwonego (632 nm) lub laser Nd:YAG (granad itrowo-glinowy domieszkowany jonami Nd³⁺) o mocy kilku wat w obszarze bliskiej podczerwieni (1064 nm).

Laser stosowany w mikroskopii ramanowskiej powinien mieć następujące cechy:

- Kształt wiązki gaussowskiej (pojedynczy tryb podłużny TEM₀₀), dzięki czemu można ją skupić na miejscu ograniczonym dyfrakcją
- Wąski kształt linii znacznie poniżej 1 cm⁻¹, aby uniknąć poszerzenia linii ramanowskich
- Stabilną częstotliwość (odchylenia < 0,01 cm⁻¹), aby umożliwić pomiary naprężeń z dużą dokładnością
- Stabilną intensywność (< 1-2% wahań mocy), aby umożliwić dokładne i porównywalne pomiary stężeń
- Polaryzacja liniowa, umożliwiająca obserwację właściwości próbki zależnych od polaryzacji.

Długość fali lasera warunkuje wynik pomiaru i uzyskiwane informacje. Wpływa ona na:

- Sygnał Ramana: Intensywność rozpraszania Ramana jest proporcjonalna do ν^4 , gdzie ν jest częstotliwością promieniowania lasera wzbudzającego, tj. niższa długość fali wzbudzenia prowadzi do wyższych sygnałów Ramana.

$$I \sim M_{ind}^2 \nu_0^4$$

- Sygnał fluorescencji: Wiele próbek wykazuje silną fluorescencję po wzbudzeniu w obszarze UV lub widzialnym niebieskim i niską fluorescencję po wzbudzeniu w obszarze czerwonym lub NIR widma. Sygnał fluorescencji jest stosunkowo silny i może przestaniać słabszy sygnał Ramana.
- Rozdzielczość przestrzenna: Im krótsza długość fali wzbudzenia, tym wyższa rozdzielczość przestrzenna. Uwaga: W przypadku rozdzielczości przestrzennej należy również wziąć pod uwagę NA obiektywu.
- Uszkodzenie próbki: W przypadku krótkich długości fal wysoka energia fotonów może spowodować uszkodzenie próbki przy niższej mocy lasera niż w przypadku dłuższych długości fal.

Tabela 1 Porównanie laserów stosowanych w spektroskopii Ramana

Rodzaj lasera	Długość fali (nm)	Moc lasera (mW)	Obszar widmowy	Zalety	Wady
Argonowy (Ar ⁺)	488, 514.5	10-500	VIS Niebieski, zielony	Wysoka stabilność, szerokie zastosowanie	Ryzyko fluorescencji, duży pobór mocy
Nd:YVO ₄	532	10-1000	VIS Zielony	Wysoka moc, dobra rozdzielczość spektralna	Może indukować fluorescencję w próbkach organicznych, wrażliwy na stabilność termiczną
Kryptonowy (Kr ⁺)	530.9, 647.1	50-300	VIS Zielony, czerwony	Kilka długości fali z jednego źródła	Wysoki koszt eksploatacji, problemy ze stabilnością
Helowo-neonowy (He-Ne)	632.8	0.5-50	VIS Czerwony	Stabilny, niski koszt, łatwa obsługa	Niska moc, ograniczona czułość
Diodowy (DL)	785, 830	50-500	NIR	Kompaktowy, niska fluorescencja w materiałach organicznych	Słabsza intensywność sygnału Ramana, mniejsza rozdzielczość spektralna
Nd:YAG	1064	100-2000	IR	Idealny do próbek z silną fluorescencją	Wysoka cena, mniejsza czułość Ramana

3.6. Wymagania dotyczące analizowanych próbek

Analizy Ramana można wykonywać na różnych próbkach, takich jak gazy, ciecze, proszki i ciała stałe. Tylko czyste metale mogą sprawiać trudności ze względu na fakt, że ich drgania są nieaktywne w widmie Ramana.

Zasadniczo nie jest wymagane przygotowanie próbki (takie jak barwienie lub rozcinanie), a pomiary spektroskopowe Ramana można wykonywać *in situ*, *in vitro* i *in vivo*.

Maksymalny rozmiar próbki odpowiedni do obrazowania Ramana zależy od możliwości mikroskopu Ramana, a maksymalny zakres skanowania zależy od zintegrowanego stolika skanującego. Zazwyczaj można badać obszary próbek od 200 x 200 μm^2 do 50 x 50 mm^2 . W przypadku wystarczająco przezroczystej próbki możliwe są również skany głębokości w kierunku z.

W badaniach z wykorzystaniem spektroskopii Ramana należy wykorzystywać podłoża (szkietka) dedykowane do tej techniki np. CaF₂ lub MirrIR.

3.7. Mikroskop Ramanowski WITec Alpha300R

Najważniejsze możliwości:

- Obrazowanie Ramana – mapy hiperspektralne: rejestracja pełnego widma Ramana w każdym pikselu obrazu
- Skanowanie płaszczyznowe (w kierunku x-y) i w głąb próbki (w kierunku z) z ręcznym pozycjonowaniem próbki

- Stosy obrazów: konfokalne obrazowanie Ramana w 3D
- Rejestracja widma Ramana w pojedynczym punkcie
- Profilowanie głębokościowe w pojedynczym punkcie
- Mikroskopia jasnego pola.

Podstawowe parametry:

- Lasery: 532 nm, 488 nm
- Regulacja mocy laserów; 0.1-10 mW
- Obiektywy:

Obiektyw	Dystans pracy (WD)	Apertura
Zeiss 10x	9.3 mm	0.25
Zeiss 20x	2.2 mm	0.5
Zeiss 50x	0.6 mm	0.8
Zeiss 100x	1 mm	0.9
Zeiss imersyjny 63x	2.1 mm	1

- Kamera spektralna CCD 1024x127 pikseli, temperatura pracy -60 st C
- Siatka dyfrakcyjna VIS: 600 g/mm i 1800 g/mm.

4. Spektroskopia Ramana

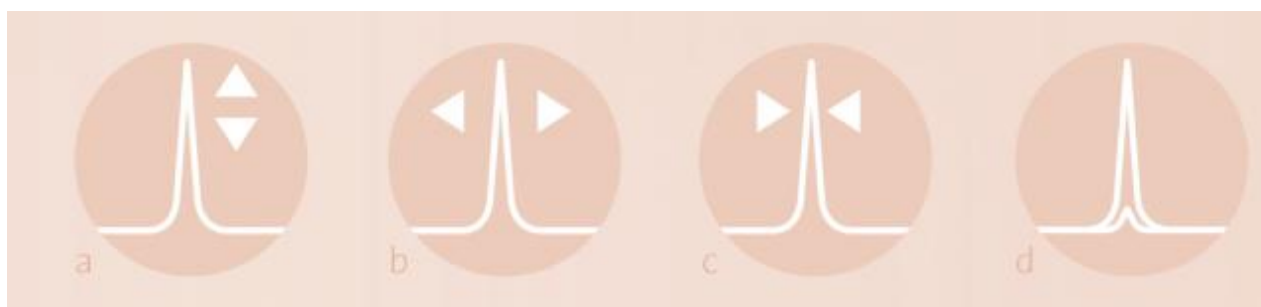
4.1. Informacja zawarta w widmie Ramana

Widmo Ramana to unikalny odcisk palca materiału. Może dostarczyć informacji jakościowych i ilościowych.

Pasma przesunięte do wyższych liczb falowych (blue shifted) nazywane są pasmami antystokesowskimi Ramana, a te przesunięte do niższych liczb falowych (red shifted) nazywane są pasmami stokesowskimi Ramana. Zazwyczaj intensywności pasm Ramana stokesowskich są intensywniejsze i dlatego są wykorzystywane do analizy jakościowej i ilościowej.

Poniżej wymieniono informacje, które można uzyskać z widma Ramana:

- Intensywność pików daje informacje o ilości określonego związku (a)
- Przesunięcie pików może zidentyfikować stany naprężeń i odkształceń (b)
- Szerokość pików ujawnia stopień krystaliczności (c)
- Stan polaryzacji dostarcza informacji na temat symetrii i orientacji kryształu (d).



4.2. Analiza i interpretacja widm

Analiza i interpretacja widm Ramana polega na identyfikacji pasm charakterystycznych dla drgań cząsteczkowych, które pojawiają się w wyniku nieelastycznego rozpraszania światła. Kluczowym etapem jest przypisanie obserwowanych pasm ramanowskich do konkretnych wiązań chemicznych lub grup funkcyjnych. Następnie ocenia się intensywność i kształt pasm, co może dostarczyć informacji o stężeniu, krystaliczności, oddziaływaniach międzycząsteczkowych czy strukturze badanego materiału. W przypadku analizy ilościowej porównuje się intensywności pasm, a w badaniach mapowania chemicznego analizuje się rozmieszczenie poszczególnych sygnałów w próbce.

4.3. Opis ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką spektroskopii Ramana poprzez analizę widm wybranych układów modelowych. W ramach ćwiczenia uczestnicy dokonają pomiaru widm ramanowskich dla prostych związków chemicznych, co pozwoli na

identyfikację charakterystycznych pasm oraz określenie ich zależności od struktury badanych substancji. Analizie poddany zostanie wpływ kluczowych parametrów pomiarowych, takich jak moc oraz długość fali lasera, na uzyskane widma.

Podczas ćwiczenia uczestnicy zdobędą praktyczne umiejętności w zakresie pracy ze spektrometrem Ramana, interpretacji widm oraz optymalizacji warunków eksperymentalnych w celu uzyskania jak najbardziej wiarygodnych i precyzyjnych wyników.

4.3.1. Badane próbki

Podczas laboratoriów będziemy mierzyć widma ramanowskie prostych związków i mieszanin chemicznych takich jak:

- kreatyna
- fosfokreatyna
- wybrane polimery syntetyczne (PP, PS, PET etc).

Studenci mogą również sami zaproponować substancje, których widma chcieliby zmierzyć np. (kosmetyki, suplementy diety itp. – preferowane substancje stałe, lite lub sypkie).

4.3.2. Optymalizacja warunków pomiaru:

Pierwszym etapem ćwiczenia będzie zbadanie wpływu warunków pomiarowych na jakość otrzymywanych widm Ramana. W tym celu widma wybranych substancji zostaną zmierzone przy różnych warunkach pomiarowych. Rozpatrywany będzie wpływ:

- A. Długości lasera (532 nm, 488 nm)
- B. Mocy lasera (zmienność w zakresie 0.5-10 mW)
- C. Czasu akwizycji pojedynczego widma (0.5s, 1s, 2s, 3s)
- D. Liczby akumulacji na pojedyncze widmo (1, 3, 10, 20, 30).

Ćwiczenie to ma na celu optymalizację warunków pomiarowych, czyli dobranie takich parametrów pomiaru, aby uzyskane widma Ramana charakteryzowały się jak najwyższą jakością, tj. wysokim stosunkiem sygnału do szumu, dobrą rozdzielczością spektralną oraz minimalizacją wpływu zakłóceń i fluorescencji. Ostatecznym celem jest wyznaczenie optymalnych ustawień umożliwiających precyzyjną i powtarzalną analizę składu chemicznego badanych substancji przy jednoczesnym zminimalizowaniu czasu pomiaru.

Aby usprawnić przebieg ćwiczeń, proces optymalizacji warunków podzielony zostanie na następujące etapy:

- I. Porównanie wpływu mocy lasera – dla lasera 532 nm, 10 akumulacji i 0.5s czasu integracji należy zmierzyć widma przy rosnących mocach lasera 0.5 mW,

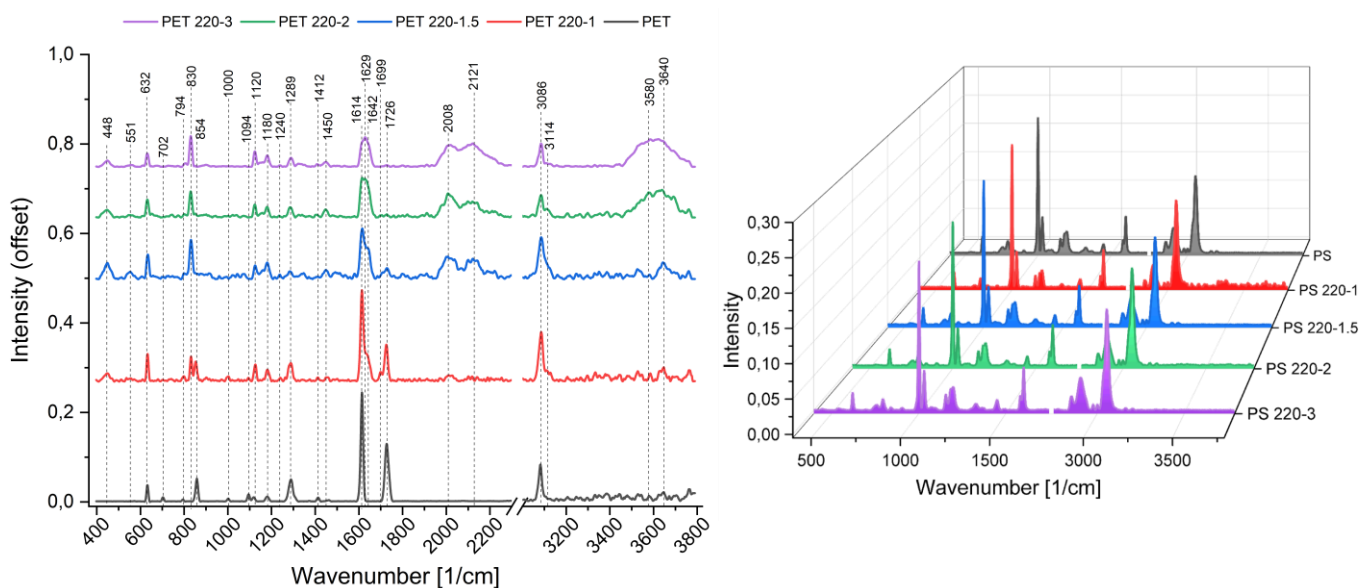
- 1mW, 3mW, 5mW, 7mW i 10 mW. Uwaga: jeżeli dla danej mocy lasera próbka ulegnie zwęgleniu, nie zwiększamy dalej mocy lasera.
- II. Porównanie wpływu liczby akumulacji – dla lasera 532 nm, 0.5s czasu integracji oraz mocy lasera 0.5mW i 10mW (lub maksymalnej możliwej) należy zmierzyć kolejno widma przy rosnącej liczbie 1, 3, 10, 20, 30 akumulacji.
 - III. Porównanie wpływu czasu integracji pojedynczego widma – dla lasera 532 nm, 10 akumulacji oraz mocy lasera 0.5mW i 10 mW należy zmierzyć kolejno widma przy rosnącym czasie integracji 0.5s, 1s, 2s, 3s.
 - IV. Porównanie wpływu długości fali lasera – ten punkt jest realizowany jako ostatni, ze względu na konieczność ponownej kalibracji mikroskopu po zmianie lasera z 532nm na 488nm. Dla badanych próbek, do porównania wpływu długości fali lasera, zebrać widma przy 10 mW (lub maksymalnej możliwej mocy), 10 akumulacjach i 0.5s czasie integracji.

4.3.3. Identyfikacja pasm w widmach Ramana wybranych substancji

Studenci będą mieli za zadanie identyfikację głównych pasm Ramanowskich w widmach badanych substancji. W tym celu należy:

- A. Opracować odpowiednio widma, przeprowadzając niezbędne korekcje (np. korekcja pików kosmicznych CRR, korekcja linii bazowej, wygładzanie filtrem Savitzky-Golaya, ewentualnie normalizacja)
- B. Wyrysować widma w dowolnym programie (excel, Orange Data Mining, origin etc)
- C. Zaznaczyć na widmach pasma absorpcji
- D. Przypisać pasmom absorpcji drgania wiązań, od których pochodzą (tabelka).

Przykładowy sposób prezentacji widm Ramana pokazano na rysunku 5.

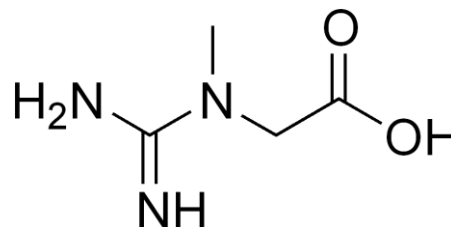


Rysunek 5 Przykładowe widma Ramana dla PET i PS. Wykresy wykonano w programie Origin

Tabela 2 Przykładowa tabela do identyfikacji pasm Ramana.

Pasmo [rel.1/cm]	Pochodzenie
2911	ν C-H w CH_2

Pochodzenie pików (rodzaje drgań i wiązania, od których pochodzą) interpretujemy w oparciu o dostępną literaturę oraz wiedzę na temat wiązań obecnych w badanej substancji. Na przykład kreatyna ma w swojej strukturze chemicznej pewne charakterystyczne wiązania jak np. C=NH, C-N, C=O, OH, C-OH, C-C, N-H i właśnie drgania tych wiązań należy powiązać z pikami obecnymi w widmie.



Rysunek 6 Struktura chemiczna kreatyny

W identyfikacji pasm Ramana przydatne mogą być następujące pozycje:

Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. In Journal of Raman Spectroscopy. <https://doi.org/10.1002/jrs.1238>

Praca zbiorowa pod red. Kamilli Małek (2016). Spektroskopia oscylacyjna – od teorii do praktyki, PWN

<https://www.chemicalbook.com/>

oraz wszelkie artykuły naukowe dotyczące zastosowania spektroskopii Ramana w badania analizowanych substancji, które można znaleźć np. w bazie PubMed.

4.3.4. Sprawozdanie

1. Temat sprawozdania.
2. Cel ćwiczenia.
3. Wstęp – kilka zdań o metodzie oraz ciekawe zastosowania spektroskopii Ramana (podać źródła), wszystko max na 1 str A4.
4. Przebieg ćwiczenia – kilka informacji o aparaturze, co mierzyliśmy, jakie warunki pomiarowe przyjęto, jak przetwarzano widma.
5. Wyniki:
 - a. Dla każdej z wybranych substancji porównać widma uzyskane:
 - Dla różnych mocy lasera – jak moc lasera wpływa na widmo? Porównać intensywność widm i wpływ szumu na czytelność widma (stosunek sygnału do szumu SNR)
 - Dla różnych liczb akumulacji przy skrajnych mocach lasera – w którym przypadku zwiększenie liczby akumulacji ma większe znaczenie?
 - Dla różnych czasów integracji pojedynczych widm przy skrajnych mocach lasera – jak czas integracji wpływa na intensywność widma i SNR? Przy której mocy lasera zwiększanie czasu integracji ma większe znaczenie?
 - Dla różnych długości fali lasera – należy zwrócić uwagę na intensywność i strukturę widma (obecność pików, różnice w intensywnościach i położeniu pików, obecność fluorescencji).
Porównania należy skomentować, zwracając uwagę na stosunek sygnału do szumu, rozdzielczość spektralną, intensywność sygnału, obecność i wpływ fluorescencji, palenie próbki przez laser, czas pomiaru itp.
 - b. Na podstawie pkt. a wytypować optymalne warunki pomiarowe dla wybranej substancji – optymalne warunki pomiaru to takie, przy których uzyskujemy czytelne (o dobrej intensywności i niskim szumie) widmo w możliwie najkrótszym czasie (przy jak najmniejszych liczbach i czasie akumulacji).
 - c. Wyrysować widma badanych substancji i zaznaczyć na nich pasma ramanowskie.
 - d. Zidentyfikować obecne w widmach pasma Ramana (podać źródła literaturowe/internetowe na podstawie których dokonano identyfikacji).
6. Wnioski.

4.3.5. Przykład analizy widm Ramana w Orange Data Mining

Orange Data Mining – program jest darmowy <https://orangedatamining.com/>, ma wiele funkcjonalności pomocnych w analizie różnego rodzaju danych w tym map hiperspektralnych i widm. Do analizy danych spektroskopowych należy zainstalować nakładkę (Oprions→add-ons) „Spectroscopy”. Na YouTube dostępnych jest wiele

filmików instruktarzowych, pozwalających zapoznać się z działaniem programu:

<https://www.youtube.com/channel/UClKKWBe2SCAEyv7ZNGhle4g>

https://www.youtube.com/playlist?list=PLmNPvQr9Tf-bPWjDJvJBPZJ6us_KTAD5T

Poniżej przedstawione zostały przykładowe workflowy do analizy danych. Workflow pokazuje przebieg analizy – są to widgety (narzędzia) odpowiedzialne za poszczególne funkcjonalności, połączone łańcuchami. Dwukrotne kliknięcie w widжет, czy też łańcuch pozwala zarządzać opcjami przetwarzania danych. Poszczególne widgety oraz całe workflowy można kopiować, aby załadować do nich nowe dane.

Przydatne widżety



Multifile

Ładowanie wielu plików widm



Edit Domain (5)

Edytowanie nazw plików i etykiet, definiowanie rodzaju zmiennych (liczbowe, tekstowe, kategorialne, czasowe)



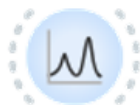
Select Columns (6)

Określanie zmiennej wg której chcemy segregować dane, usuwanie zbędnych zmiennych



Data Table (8)

Wyświetlanie danych w formie tabeli



Spectra (14)

Wyświetlanie i edycja graficzna widm



Preprocess Spectra (8)

Przetwarzanie i korekcja widm



Integrate Spectra

Obliczanie intensywności powierzchni pików



Average Spectra (2)

Uśrednianie widm



Concatenate (1)

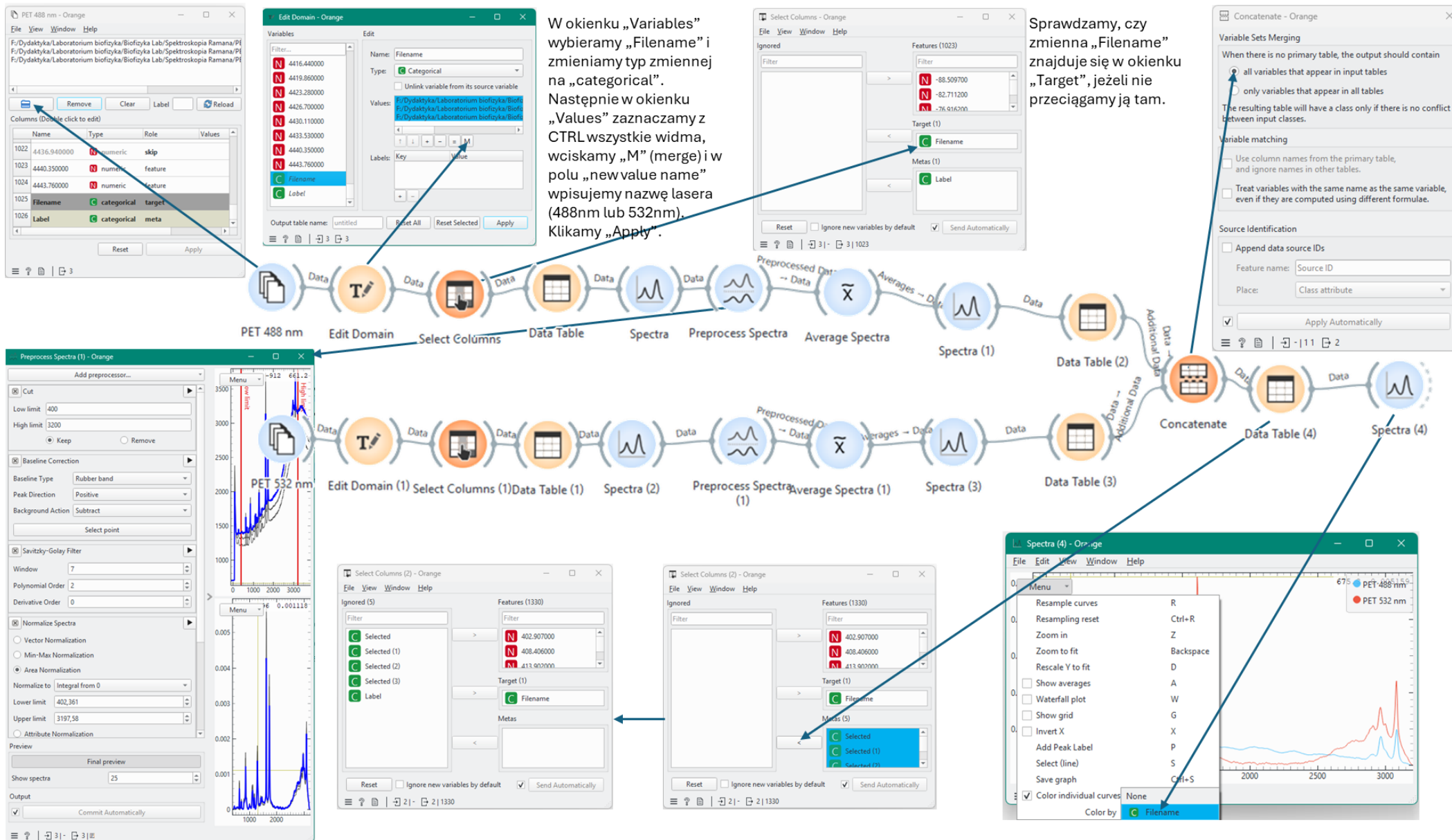
Łączenie danych



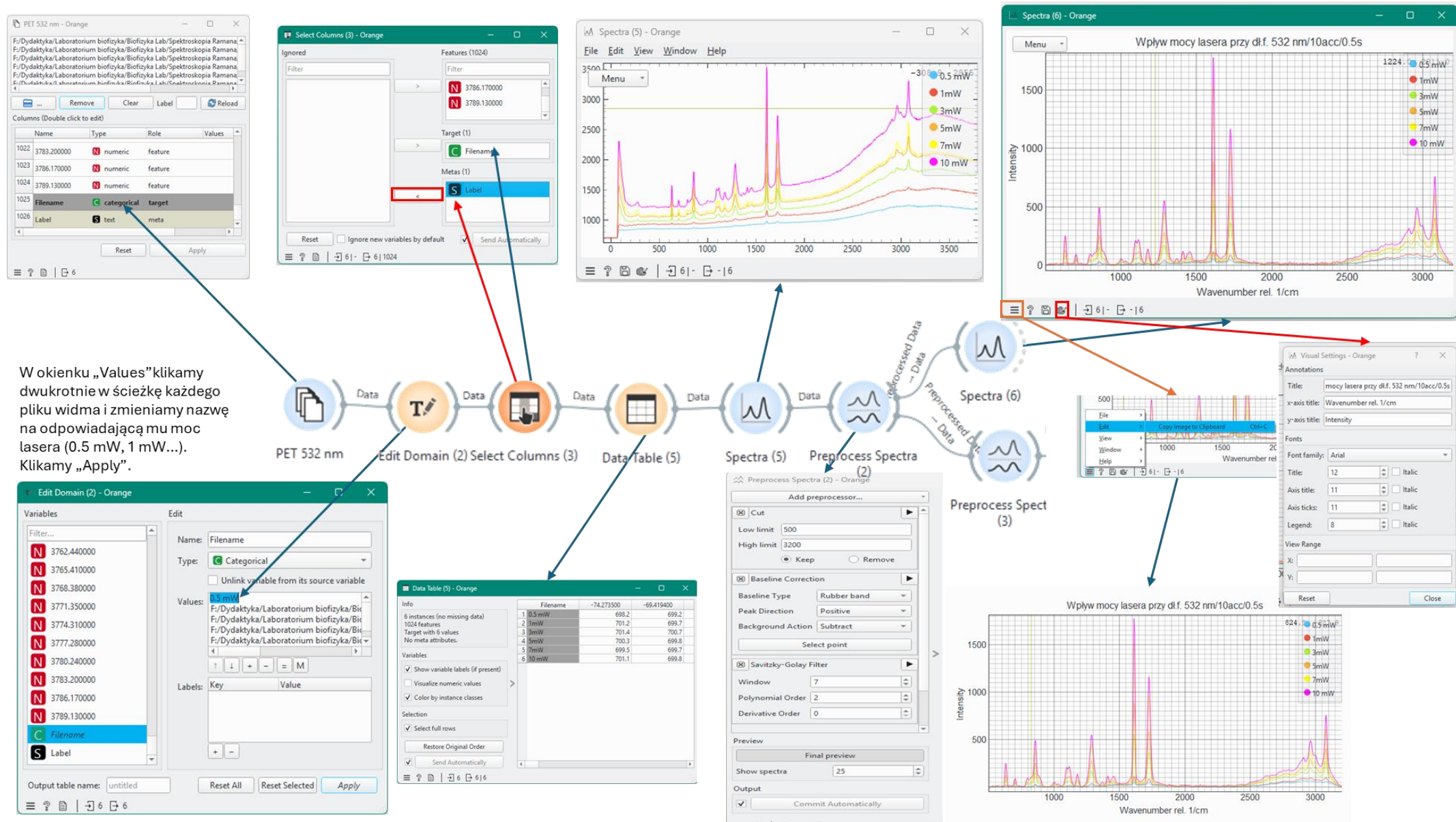
Save Data

Zapis danych

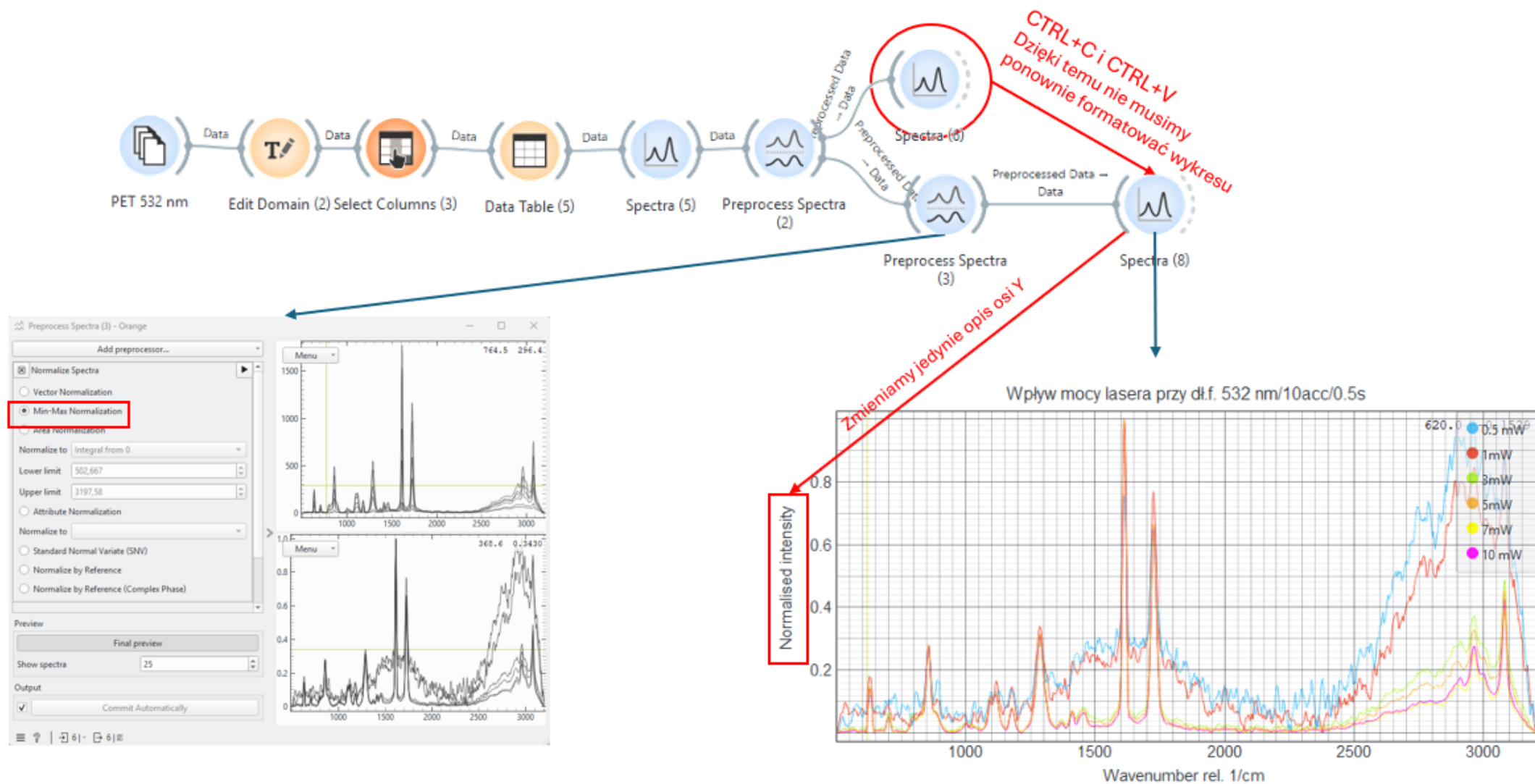
Porównanie widm zebranych przy różnych długościach fali lasera – porównujemy widma znormalizowane wektorowo



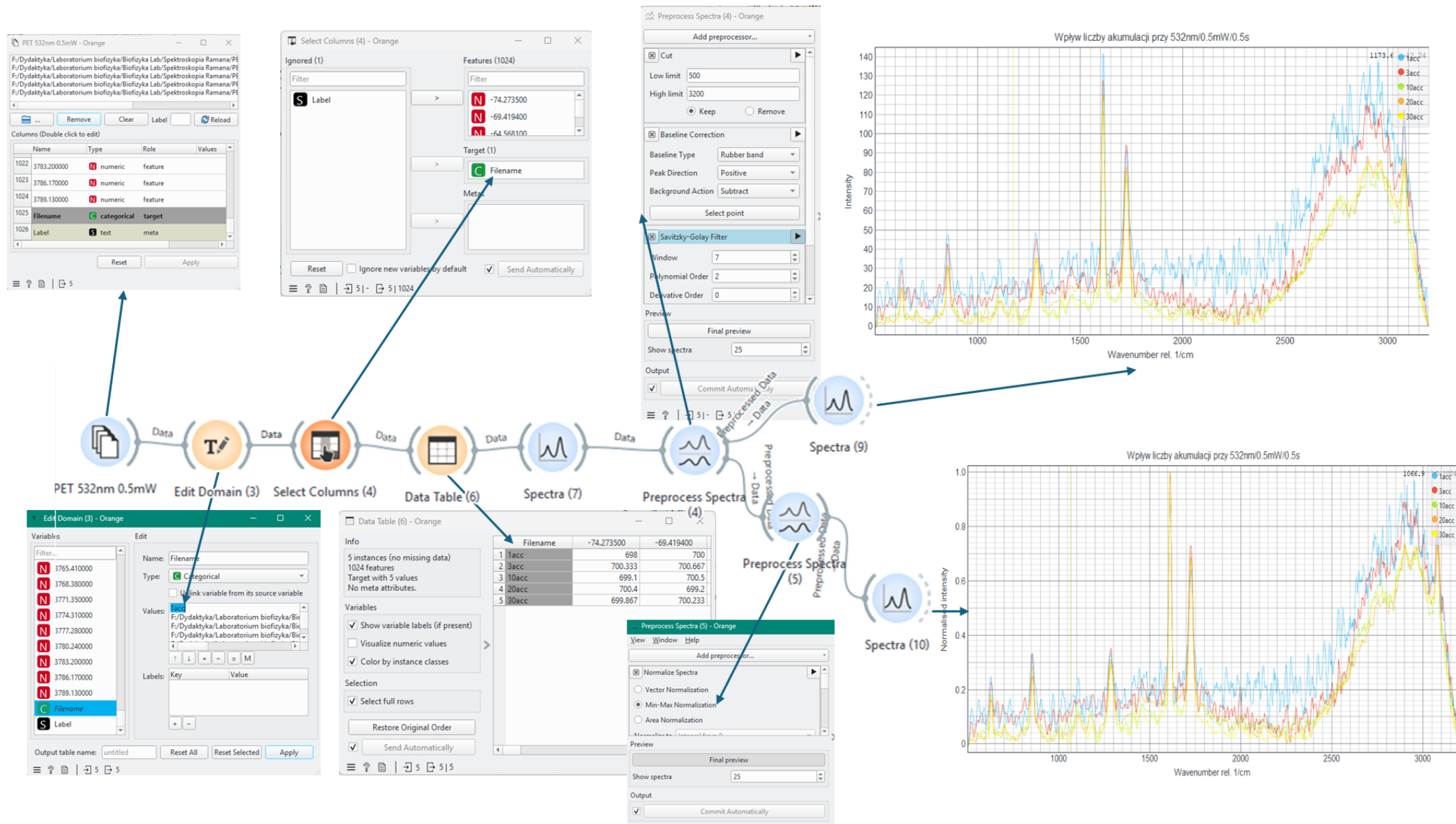
Porównanie widm zebranych przy różnych mocach lasera – porównujemy zarówno widma nieznormalizowane (wpływ na intensywność sygnału), jak i znormalizowane min-max (wpływ na jakość sygnału – stosunek sygnału do szumu SNR)



Normalizacja widm uzyskanych przy różnych mocach lasera (kontynuacja poprzedniego workflow) – porównanie jakości sygnału (SNR)



Porównanie widm zebranych przy różnych liczbach akumulacji – porównujemy widma znormalizowane min-max



Porównanie widm zebranych przy różnych czasach integracji – porównujemy zarówno widma nieznormalizowane (intensywność) jak i znormalizowane min-max (wpływ na ANR)



5. Mikroskopia Ramana

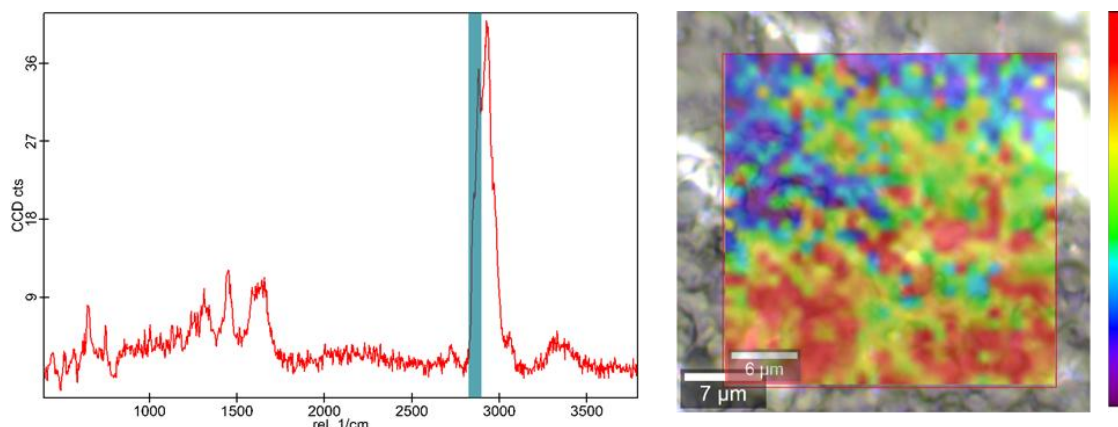
Mikroskopia Ramana to technika analityczna łącząca mikroskopię optyczną ze spektroskopią ramanowską. Umożliwia uzyskanie informacji o strukturze chemicznej, składzie oraz rozmieszczeniu substancji w próbce z wysoką rozdzielczością przestrzenną. Dzięki zastosowaniu mikroskopu możliwa jest precyzyjna analiza próbek zarówno punktowo, jak i w formie map chemicznych, tworzonych poprzez skanowanie rastrowe punkt po punkcie. Każdy punkt takiej mapy zawiera odrębne, pełne widmo ramanowskie, co pozwala na uzyskanie tzw. map hipspektralnych. Analiza poszczególnych pasm ramanowskich umożliwia określenie dystrybucji wybranych wiązań chemicznych oraz związanych z nimi cząsteczek w próbce.

5.1. Analiza danych hipspektralnych

Mikroskop konfokalny Ramana skanuje próbkę punkt po punkcie i linia po linii, a w każdym pikselu obrazu uzyskuje się pełne widmo Ramana. Proces ten nazywa się również obrazowaniem hipspektralnym. Uzyskane pliki wielospektralne zawierają informacje o tysiącach do milionów widm Ramana. Pliki te są analizowane za pomocą oprogramowania w celu wygenerowania obrazu, który wyświetla rozkład przestrzenny składników chemicznych. Poprzez wykonanie stosu obrazów w różnych położeniach ogniskowych (w kierunku z) można tworzyć obrazy 3D.

5.1.1. Mapy biochemiczne

Tworzenie map biochemicznych jest jedną z podstawowych metod analizy danych hipspektralnych uzyskanych za pomocą mikroskopii Ramana. Dla każdego widma przypisanego do konkretnego piksela obrazu obliczane jest pole powierzchni wybranego piku (czyli integracja sygnału w określonym zakresie długości fal). W wyniku tego przetwarzania każdemu pikselowi przypisywana jest wartość liczbową, odpowiadającą intensywności danego pasma. Tak uzyskany obraz to tzw. mapa biochemiczna –



Rysunek 7 Przykładowe widmo Ramana z zaznaczonym mapowanym pasmem oraz wynik mapowania - mapa biochemiczna pasma nałożona na obraz mikroskopowy

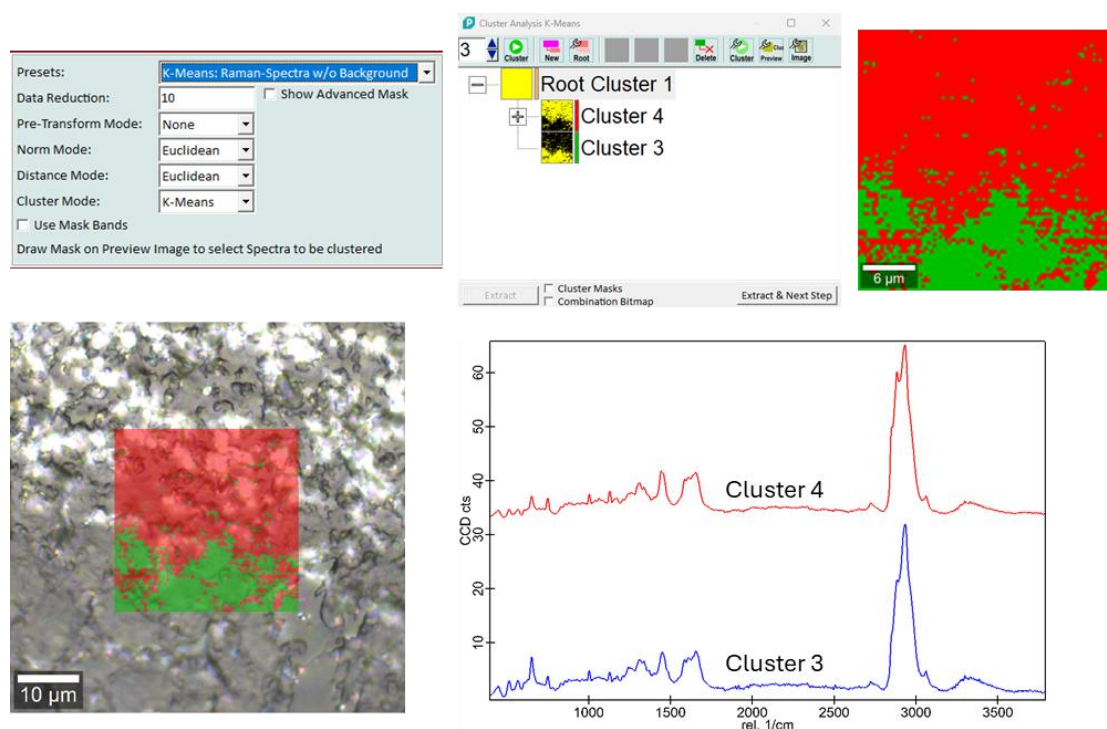
przedstawia przestrzenny rozkład zawartości związku chemicznego lub wiązania reprezentowanego przez analizowane pasmo Ramana.

5.1.2. Analiza klastrowa obrazów Ramana

Analiza klastrowa, inaczej nazywana analizą skupień, to metoda eksploracyjnej analizy danych, która polega na poszukiwaniu i wyodrębnianiu grup (klastrow) obiektów podobnych do siebie pod względem określonych cech. Celem tej analizy jest takie pogrupowanie obiektów, aby odległości (np. spektralne) między widmami w obrębie tego samego klastra były jak najmniejsze, a odległości między obiektami należącymi do różnych klastrów — jak największe. Dzięki temu uzyskane klastry charakteryzują się wysoką wewnętrzną spójnością i dużym zróżnicowaniem między sobą.

Jedną z najczęściej stosowanych metod analizy klastrowej jest algorytm k-średnich (k-means). Polega on na podziale zbioru danych na wcześniej zdefiniowaną liczbę klastrów (k), w taki sposób, aby każdy obiekt został przypisany do klastra o najbliższym środku (centroidzie). W trakcie działania algorytmu centroidy są iteracyjnie aktualizowane, a obiekty przypisywane na nowo, aż do osiągnięcia stabilności.

W analizie tej często wykorzystuje się odległość euklidesową, która mierzy "prostą" odległość między dwoma punktami w przestrzeni wielowymiarowej. Jest to jedna z najprostszych i najczęściej używanych metryk odległości, szczególnie w przypadku danych liczbowych i normalnie rozłożonych.

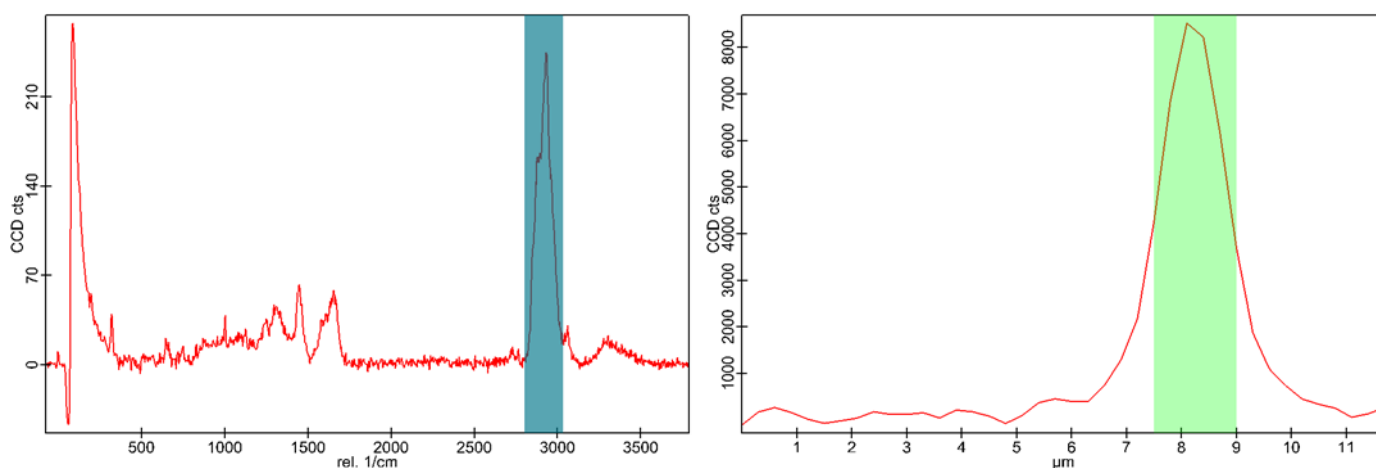


Rysunek 8 Przykład analizy klastrowej w programie WITec Project FIVE+

5.1.3. Profile głębokościowe

Dzięki konfokalności mikroskopu Ramana możliwe jest precyzyjne ogniskowanie wiązki laserowej na wybranej płaszczyźnie prostopadłej do osi propagacji światła. Ta właściwość pozwala na wykonywanie tzw. skanów głębokościowych (ang. depth profiling), czyli serii pomiarów w różnych warstwach próbki na różnych głębokościach. W efekcie można uzyskać informacje o rozkładzie intensywności wybranego pasma Ramana w głąb próbki, co umożliwia analizę struktury warstwowej i zmian biochemicznych w przekroju próbki.

Profilowanie głębokościowe może być również pomocne przy optymalnym ustawieniu ogniska wiązki laserowej, zapewniając największą czułość i dokładność detekcji.



Rysunek 9 Profilowane pasmo w widmie Ramanowskim oraz odpowiadający mu profil głębokościowy

5.2. Opis ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z techniką obrazowania ramanowskiego oraz jej zastosowaniem w analizie komórek i/lub tkanek zwierzęcych i innych materiałów. Metoda ta pozwala na uzyskanie informacji o składzie chemicznym i strukturze badanych próbek na poziomie mikroskopowym, bez konieczności stosowania znaczników fluorescencyjnych czy barwników. Dzięki właściwościom konfokalnym mikroskopu możliwe jest tworzenie dwu- i trójwymiarowych map oraz profili głębokościowych.

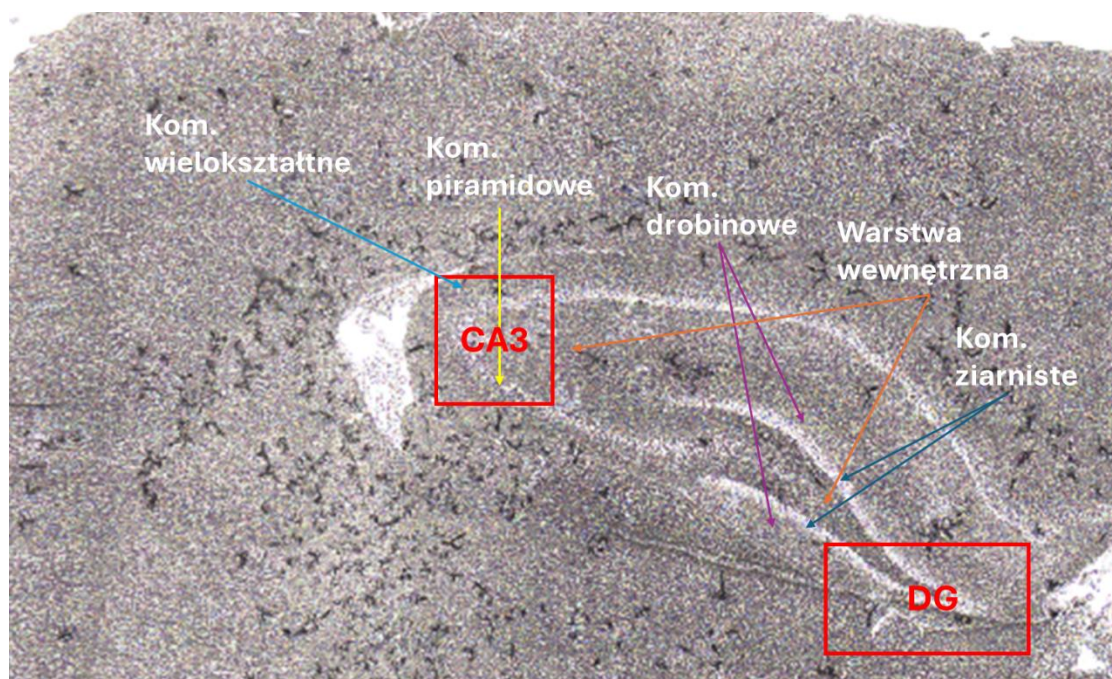
Ćwiczenie pozwoli studentom zdobyć praktyczne umiejętności w zakresie obsługi mikroskopu ramanowskiego, rejestracji i analizy map biochemicznych (w tym zaawansowanej analizy wielowymiarowej) oraz ich interpretacji w kontekście struktury badanych tkanek i/lub komórek.

5.3. Badane próbki

Materiałem badawczym podczas zajęć będzie cienki skrawek mózgu samca szczura szczepu Wistar w wieku 60 dni (grubość skrawka przed wysuszeniem: ok. 10 μm). Na preparacie widoczny jest hipokamp, wraz z jego charakterystyczną, warstwową

organizacją komórkową, obejmującą m.in. warstwę ziarnistą, drobinową, piramidową oraz warstwę włókien nerwowych (wewnętrzną).

W obrębie preparatu można również zaobserwować charakterystyczne inkluzje odpowiadające nagromadzeniom kreatyny i cholesterolu, szczególnie w rejonie kory mózgowej. Obecność tych struktur może być pomocna w analizie biochemicznej i identyfikacji konkretnych sygnałów w widmach Ramana.



Rysunek 10 Zdjęcie mikroskopowe wybranego obszaru badanej próbki z zaznaczonymi warstwami komórkowymi

5.4. Warunki pomiarowe

W ramach eksperymentu wykonane zostaną skany powierzchniowe, obejmujące dwie wybrane warstwy w obszarze hipokampa. Mapy hiperspektralne będą zbierane przy długości fali lasera 532 nm lub 488 nm oraz mocy do 5 mW z czasem integracji wynoszącym 0,5 s. Zmienną w eksperymencie będzie rozdzielczość przestrzenna, która przyjmie wartości 1 μm oraz 0,5 μm . Dzięki temu możliwe będzie ocenienie wpływu wielkości kroku skanowania na wyniki analizy. Zbadane zostaną również profile głębokościowe wybranych warstw komórkowych.

5.5. Analiza danych pomiarowych

Dla obydwu skanów przeprowadzone zostanie mapowanie chemiczne wybranych pasm absorpcji oraz analiza klastrowa. Studenci będą mieli za zadanie wskazać pasma, które pozwolą najskuteczniej rozróżnić warstwy komórkowe oraz ocenić znaczenie rozdzielczości przestrzennej w analizie obrazów Ramana. Przykładowa tabela z interpretacją widm Ramana tkanek/komórek zwierzęcych została przedstawiona poniżej.

Tabela 3 Pochodzenie pików w widmach Ramana tkanek i komórek zwierzęcych oraz ich potencjalne zastosowania diagnostyczne

Pasmo [cm ⁻¹]	Wiązanie / Wibracja	Przypisanie do cząsteczek	Zastosowania diagnostyczne
~720	Symetryczne drgania C–N	Fosfatydyloetanolamina (lipidy), DNA/RNA	Analiza składu błon komórkowych, detekcja zmian w metabolizmie
~785	Drgania pierścienia nukleotydów	Kwasy nukleinowe (DNA, RNA)	Wykrywanie proliferacji komórek, ocena aktywności jądrowej
~1003	Pierścień fenyłowy (C–C)	Fenylalanina (białka)	Marker ogólnej zawartości białek, wykrywanie zmian nowotworowych
~1085	C–C, C–O, P–O	Lipidy, cukry, kwasy nukleinowe	Ocena struktury błon, metabolizmu energetycznego
~1240–1270	Amid III (N–H, C–N)	Białka (struktur β i α)	Analiza zmian strukturalnych białek, wykrywanie denaturacji
~1300–1330	CH ₂ skręcanie i zginanie	Lipidy, białka	Wykrywanie zmian lipidowych, stanów zapalnych
~1445	CH ₂ zginanie (deformacja)	Lipidy, częściowo białka	Marker zawartości lipidów — np. w diagnostyce miażdżycy
~1580–1600	Drgania C=C, pierścienie aromatyczne	Tyrozyna, tryptofan (białka)	Identyfikacja struktur aromatycznych, stres oksydacyjny
~1655	Amid I (C=O)	Białka (struktur α-helikalnych)	Zmiany w strukturze drugorzędowej białek — np. w neurodegeneracji
~1740	C=O rozciąganie (estrów)	Lipidy (np. fosfolipidy)	Wykrywanie nagromadzenia lipidów, np. w stłuszczeniu wątroby
~2850–2885	Symetryczne i asymetryczne CH ₂	Lipidy (łańcuchy alifatyczne)	Ocenianie stopnia nasycenia lipidów, identyfikacja zmian metabolicznych
~2930–2950	CH ₃ (asymetryczne)	Białka, lipidy	Analiza stosunku białek do lipidów, monitoring apoptozy
~3010–3070	=C–H rozciąganie (nienasycone wiązania)	Nienasycone lipidy	Diagnostyka stresu oksydacyjnego, ocena stopnia nienasycenia

5.6. Sprawozdanie

1. Temat sprawozdania.
2. Cel ćwiczenia.
3. Wstęp – kilka zdań o metodzie oraz ciekawe zastosowania mikroskopii Ramana (podać źródła), wszystko max na 1 str A4.
4. Przebieg ćwiczenia:
 - rodzaj i pochodzenie próbki (np. skrawek hipokampa mózgu szczura Wistar),
 - przyjęte warunki pomiarowe (laser 532/488 nm, moc, czas integracji, rozdzielczość skanowania),
 - zastosowaną aparaturę (np. mikroskop WITec Alpha300R),
 - przebieg rejestracji skanów powierzchniowych i głębokościowych,
 - sposób przetwarzania danych (programy, korekcje widm, mapowanie pasm).
5. Wyniki:
 - Profile głębokościowe – porównać grubości warstw,

- Mapy biochemiczne:
 - Pokazać przykładowe mapy wybranych pasm Ramana (np. kreatyna, cholesterol, białka).
 - Zinterpretować rozkład sygnałów względem struktur anatomicznych próbki.
 - Analiza klastrowa:
 - Przedstawić wyniki segmentacji obrazów.
 - Opisać liczbę klastrów, ich charakterystykę oraz zgodność z anatomią próbki.
 - Wpływ rozdzielczości przestrzennej:
 - Porównać wyniki dla rozdzielczości 1 μm vs 0.5 μm .
 - Ocenić wpływ jakości obrazu na możliwość identyfikacji warstw.
 - Identyfikacja pasm Ramana*:
 - Przedstawić tabelę z głównymi pasmami identyfikowanymi w widmach analizowanych warstw komórkowych i ich pochodzeniem
 - Wskazać źródła wykorzystane do przypisania pasm (literatura, bazy danych).
6. Wnioski.
- Krótkie podsumowanie:
 - Co udało się osiągnąć?
 - Która rozdzielczość dała lepsze wyniki?
 - Jakie były ograniczenia (np. nakładanie się warstw komórkowych, fluorescencja, słaby sygnał)?
 - Ewentualne propozycje dalszych analiz.

6. Programy pomocne w analizie ramanowskiej

Wśród programów, które mogą pomóc w analizie widm i map ramanowskich można wymienić:

- **Orange Data Mining** – program jest darmowy <https://orangedatamining.com/>, ma wiele funkcjonalności pomocnych w analizie różnego rodzaju danych w tym map hipspektralnych i widm. Do analizy danych spektroskopowych należy zainstalować nakładkę (Oprions→add-ons) „Spectroscopy”. Na youTube dostępnych jest wiele filmików instruktarzowych, pozwalających zapoznać się z działaniem programu: <https://www.youtube.com/channel/UCIkKWBe2SCAEyv7ZNGhle4g>
https://www.youtube.com/playlist?list=PLmNPvQr9Tf-bPWjDJvJBPZJ6us_KTAD5T
- Origin – 30 dniowa wersja próbna dostępna na stronie dostawcy <https://www.origin.pl/?wersja-testowa-programu,9>, umożliwia pozyskiwanie, analizę i wizualizację danych pomiarowych. Możliwość tworzenia własnych procedur analiz lub skorzystania z wbudowanych funkcji przetwarzania danych. Obsługa wykresów dwu- i trójwymiarowych
- Surfer – dostępny dla Studentów AGH <https://cri.agh.edu.pl/oprogramowanie>, program do wizualizacji danych XYZ, dzięki czemu bywa najczęściej używany do tworzenia map i

modelowania powierzchni terenu, ale nie jest to jedyne zastosowanie tego programu. Wbudowany szeroki zestaw interpolacyjnych metod generowania regularnej siatki wartości, pozwala wybrać optymalny algorytm do charakteru danych wejściowych. Przydatny w wizualizacji map chemicznych uzyskanych w obrazowaniu Ramana

- Statistica – dostępna dla Studentów AGH <https://cri.agh.edu.pl/oprogramowanie>, zestaw narzędzi analizy, zarządzania i wizualizacji danych oraz metod data mining służący do statystycznej analizy danych, tworzenia wykresów, operowania na bazach danych, wykonywania transformacji danych i tworzenia aplikacji. W skład systemu wchodzi wszechstronny zestaw zaawansowanych procedur analitycznych, stosowanych w nauce, biznesie, technice oraz zgłębianiu danych

- Grapher – dostępny dla Studentów AGH <https://cri.agh.edu.pl/oprogramowanie>, program graficzny służący do tworzenia wysokiej jakości wykresów 2D i 3D. Oferuje możliwości tworzenia wielu rodzajów wykresów w ponad 70 dostępnych wariantach. Ich duży wybór pozwala na idealny dobór wykresu do posiadanych danych oraz potrzeb użytkownika.

7. Literatura

Niniejszy skrypt powstał w oparciu o następujące pozycje literaturowe i źródła internetowe:

Zbigniew Kęcki (1998). Podstawy spektroskopii molekularnej, Wydawnictwo Naukowe PWN

Praca zbiorowa pod red. Kamilli Małek (2016). Spektroskopia oscylacyjna – od teorii do praktyki, PWN

Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. In Journal of Raman Spectroscopy. <https://doi.org/10.1002/jrs.1238>

<https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-raman-spectroscopy/>

<https://raman.oxinst.com/learning/view/article/raman-knowledge-base>

https://www.mt.com/pl/pl/home/applications/L1_AutoChem_Applications/Raman-Spectroscopy.html

<https://www.bruker.com/pl/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-microscopes/what-is-raman-imaging.html>