

# **Ramanova spektroskopie v bezpečnostních aplikacích**

Use of Raman spectroscopy in security applications

Ing. Pavla Polková

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta aplikované informatiky

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta aplikované informatiky

akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Ing. Pavla POLKOVÁ  
Osobní číslo: A09389  
Studijní program: N 3902 Inženýrská informatika  
Studijní obor: Bezpečnostní technologie, systémy a management

Téma práce: Ramanova spektroskopie v bezpečnostních aplikacích

Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se s principy Ramanovy spektroskopie a jejími aplikacemi.
2. Nastudujte ovládání přístroje určeného pro měření ramanovských spekter, který je k dispozici v laboratořích FAI UTB.
3. Vyberte oblast zaměření pro následnou studii.
4. Připravte vzorky a referenční materiály pro navržená měření.
5. Provedte posouzení vhodnosti aplikace Ramanovy spektroskopie v provedené analýze.
6. Navrhněte další oblasti použití s důrazem na bezpečnostní aplikace.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. Pitt G.D. at al.: Engineering aspects and applikations of the new Raman instrumentation. IEE Proc.-Sci. Meas. Technol. Vol.152 (2005), No6, pp. 241-318.
2. Candefjord S. at al.: Combining fibre optic Raman spectroscopy and Tamile resonance measurement for tissue charakterization, Meas. Sci. Technol. 21 (2010) 12581.
3. Journal of Raman Spectroscopy.
4. Firemní literatura fy Renishow.
5. Holeček M., Kochová P., Tonar Z.: Fyzika a živé struktury, odkud povstávají mechanické vlastnosti živé hmoty, Čs. Čas. Pro fyz. vol.60 (2010), 2, 88-97.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Vojtěch Křesálek, CSc.**

Ústav elektroniky a měření

Datum zadání diplomové práce:

**25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce:

**27. května 2011**

Ve Zlíně dne 25. února 2011

prof. Ing. Vladimír Vašek, CSc.  
*děkan*



doc. RNDr. Vojtěch Křesálek, CSc.  
*ředitel ústavu*

## ABSTRAKT

Táto práca popisuje Ramanovu spektroskopiu ako metódu analýzy a identifikácie látok so zameraním na bezpečnostné aplikácie. Teoretická časť je zameraná na popis princípov využitia elektromagnetického žiarenia v spektroskopických metódach. Ďalej sa pojednáva o špecifikách Ramanovej spektroskopie a jej možnostiach využitia v kriminalistickej expertíze a ďalších vedných disciplínach. V praktickej časti tejto diplomovej práce sú popísané merania Ramanových spektier vybraných vzoriek. Kapitola 6 je venovaná porovnaniu Ramanovej spektroskopie s FTIR spektroskopiu a v závere sú uvedené možnosti ďalších aplikácií v oblasti bezpečnostných technológií.

Kľúčové slová: spektroskopia, Ramanov mikroskop, kriminalistická expertíza, kyselina acetylsalicylová

## ABSTRACT

In this thesis there is description of Raman spectroscopy as a method for analysis and identification of materials for security application. There is basic information about electromagnetic emission for spectroscopy in theoretical part. Furthermore, the specific applications of the Raman spectroscopy in forensic science and other areas are discussed. In practical part of this diploma there is a principle of Raman spectra measuring of selected samples. Chapter 6 concludes comparison of Raman and FTIR spectroscopy. At the end, there are several more possibilities of use in security.

Keywords: spectroscopy, Raman microscope, forensic expertise, acidum acetylsalicylicum

Tu, na tomto mieste, by som chcela poďakovať mojej rodine a blízkym za podporu a zázemie, ktoré mi poskytovali počas celého môjho štúdia.

Veľká vďaka patrí vedúcemu diplomovej práce doc. RNDr. Vojtěchu Křesálkovi, CSc. za odborné vedenie a čas venovaný konzultáciám. Ďalej by som rada poďakovala prof. Ing. Lubomírovi Lapčíkovi, PhD za konštruktívne pripomienky pri písaní tejto práce a Mgr. Hane Vaškové za odbornú pomoc pri meraní v laboratóriu.

"The secret to creativity is knowing how to hide your sources."

[Albert Einstein]

**Prohlašuji, že**

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen v příruční knihovně Fakulty aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

**Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....  
podpis diplomanta

**OBSAH**

<b>ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTERAKCIE HMOTY S ELEKTROMAGNETICKÝM ŽIARENÍM .....</b>	<b>11</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA ELEKTROMAGNETICKÉHO ŽIARENIA.....	11
1.1.1 Vlnový model .....	12
1.1.2 Kvantový model.....	12
1.2 MOLEKULOVÉ SPEKTRÁ [5].....	15
1.2.1 Vibračné spektrum.....	15
1.2.2 Rotačné spektrum [8].....	17
1.2.3 Vibračno-rotačné spektrá .....	19
1.3 TYPY INTERAKCIÍ A INTENZITA SPEKTRÁLNYCH ČIAR.....	20
<b>2 RAMANOVA SPEKTROSKOPIA .....</b>	<b>22</b>
2.1 ROTAČNÉ RAMANOVE SPEKTRÁ.....	23
2.2 VIBRAČNÉ RAMANOVE SPEKTRÁ .....	24
<b>3 APLIKAČNÉ MOŽNOSTI RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE.....</b>	<b>26</b>
3.1 RAMANOVA SPEKTROSKOPIA V KRIMINALISTICKEJ EXPERTÍZE .....	27
3.2 KRIMINALISTICKÁ CHÉMIA .....	30
3.2.1 Skúmanie náterových hmôt a pigmentov .....	30
3.2.2 Reziduálne stopy strelného prachu.....	31
3.2.3 Skúmanie liečiv a drog .....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>34</b>
<b>4 STANOVENIE CIEĽOV EXPERIMENTÁLNEJ ČASTI.....</b>	<b>35</b>
<b>5 RAMANOV MIKROSKOP.....</b>	<b>36</b>
5.1 VÝBER A CHARAKTERISTIKA VZORIEK .....	37
5.2 POSTUP MERANIA RAMANOVÝCH SPEKTIER .....	40
5.3 MAPOVANIE POLYMORFNÝCH VZORIEK .....	45
<b>6 POROVNANIE RAMANOVEJ A FTIR SPEKTROSKOPIE.....</b>	<b>53</b>
6.1 FTIR SPEKTROSKOPIA KYSELINY ACETYLSALICYLOVEJ .....	54
<b>7 DISKUSIA .....</b>	<b>59</b>
7.1 ZHODNOTENIE VÝSLEDKOV PRAKTICKEJ ČASTI.....	59
7.2 TRENDY V RAMANOVEJ SPEKTROSKOPII .....	61
<b>ZÁVER .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>64</b>
<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>65</b>
<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A ZKRATIEK .....</b>	<b>67</b>

<b>ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>69</b>
<b>ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>71</b>
<b>ZOZNAM PRÍLOH .....</b>	<b>72</b>

## ÚVOD

Ramanova spektroskopie je jednou ze spektrofotometrických metod využívajících k analýze látek elektromagnetické záření. Vzhledem na technologický pokrok nachází Ramanova spektroskopie využití nejen v materiálových vědních disciplínách, ale i v farmaceutice, biomedicíně, mineralogii a v neposlední řadě v bezpečnostních aplikacích jako součást kriminalistické expertízy. Tu slouží jako kriminalisticko-technický prostředek k identifikaci a analýze neznámých látek.

Cílem mé práce bylo vypracovat ucelené studium teoretických principů a praktických aspektů Ramanovy spektroskopie. V experimentální části bylo nutné zvážit výběr vzorků na analýzu. Z praktických důvodů jsme zvolili běžně dostupné léčiva, přičemž jsme brali ohled i na složení léků. Ramanův mikroskop, který je k dispozici v laboratoriu na FAI UTB, disponuje dvěma knižnicemi a to knižnicou polymérních a forenzních látek, avšak pro účely této práce jsme naměřili referenční spektra jednotlivých chemických substancí, které tvoří složky v tabletech.

Poznámky shrnuté v této práci mohou být zdrojem informací a pomůckou při sestavování laboratorních úloh, které poslouží jako praktické ukázky z kriminalistické expertízy.

.

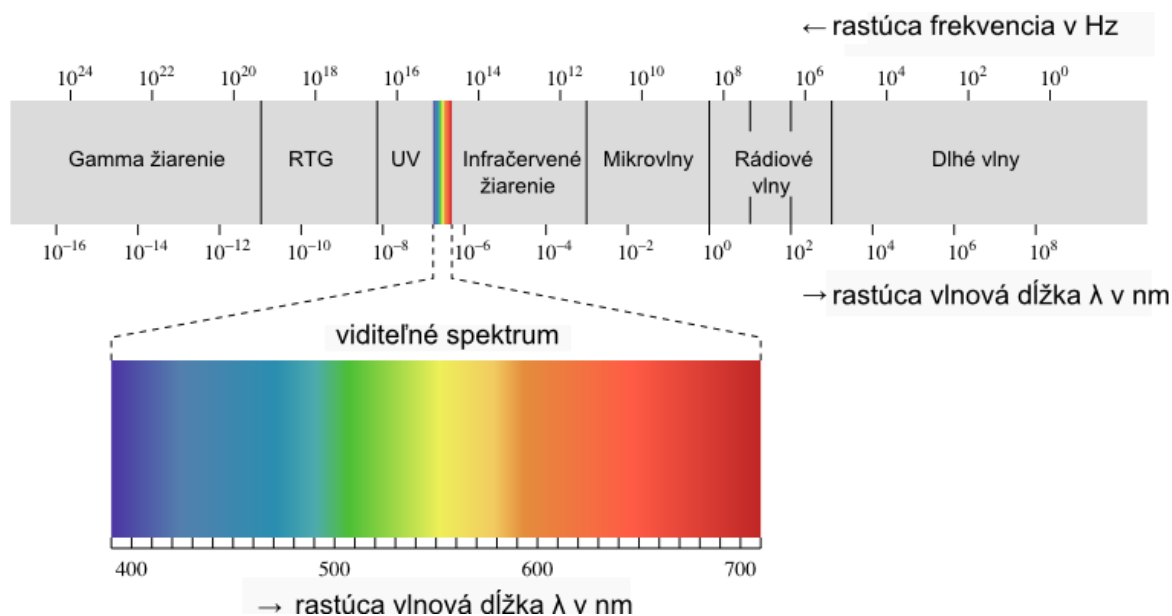
## **I. TEORETICKÁ ČASŤ**

# 1 INTERAKCIE HMOTY S ELEKTROMAGNETICKÝM ŽIARENÍM

Technologický pokrok na poli materiálových vied je možné využiť v najrôznejších oblastiach aplikovaného výskumu vrátane kriminalistických expertíz. Identifikácia neznámych látok úzko súvisí s poznaním ich molekulovej štruktúry. Významnou mierou k tomuto poznaniu prispieva obor spektroskopia, ktorý umožňuje získať podrobné informácie o štruktúre hmoty na základe interakcií s elektromagnetickým žiarením.

## 1.1 Charakteristika elektromagnetického žiarenia

Elektromagnetická vlna vzniká osciláciou elektrického a magnetického poľa. Všetky frekvencie, ktorými sú charakterizované elektromagnetické vlny, spoločne tvoria spektrum. Hoci je ľudské oko schopné vnímať len úzke spektrum frekvencií, ktoré sa javí na základe rozdielnej vlnovej dĺžky (interval 400-780 nm) ako farebné, elektromagnetické spektrum tvorí  $\gamma$ -žiarenie, röntgenové, ultrafialové, viditeľné a infračervené žiarenie, po ktorom nasleduje pásmo mikrovĺn, krátkych rádiových vln a nakoniec pásmo dlhých vln (Obr. 1).



Obr. 1. Rozdelenie elektromagnetického spektra [2]

Elektromagnetické žiarenie má tzv. duálnu povahu. To znamená, že vykazuje chovanie vlny a súčasne chovanie častice. Pre popis tohto vlnenia sa používa vlnový a časticový model.[1]

### 1.1.1 Vlnový model

Elektromagnetické žiarenie má tvar postupnej vlny takže oscilácie vlny sú kolmé k smeru prenosu energie. Významným činiteľom v povahe svetla je jeho frekvencia. Frekvencia vlny je miera oscilácie a je meraná v hertzoch, kde jeden hertz je rovný jednej oscilácii za sekundu. Ďalšou veličinou, ktorá určuje charakter vlny je vlnová dĺžka, ktorá označuje vzdialenosť dvoch najbližších bodov vlnenia, ktoré kmitajú vo fáze. Vzťah vlnovej dĺžky  $\lambda$  a frekvencie  $f$  vyjadruje rovnica:

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

- pričom  $c$  je rýchlosť svetla vo vákuu, prípadne rýchlosť šírenia elektromagnetických vln v inom skúmanom médiu. [3]
- hodnoty konštánt používaných v tejto práci sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

<b>c</b>	<b>rýchlosť svetla</b>	$2,997924 \cdot 10^8$	$m \cdot s^{-1}$
<b>h</b>	<b>Planckova konštanta</b>	$6,626176 \cdot 10^{-34}$	<b>J.s</b>
<b><math>N_A</math></b>	<b>Avogadrova konštanta</b>	$6,022045 \cdot 10^{23}$	$mol^{-1}$

Tab. 1. Vybrané fyzikálne veličiny [5]

### 1.1.2 Kvantový model

Vzhľadom na kvantovanie energie elektromagnetických interakcií, elektromagnetické vlny sú emitované a absorbujú diskkrétne množstvo energie, alebo kvantum, sú nazývané fotónmi. Pretože emitované fotóny sú absorbované nabitými časticami, vystupujú ako nosiči energie a sú pridružené k vlnám s frekvenciou odpovedajúcou energii.

Energia fotónu môže byť vyjadrená Planck -Einsteinovým vzťahom:

$$E = hf \quad (2)$$

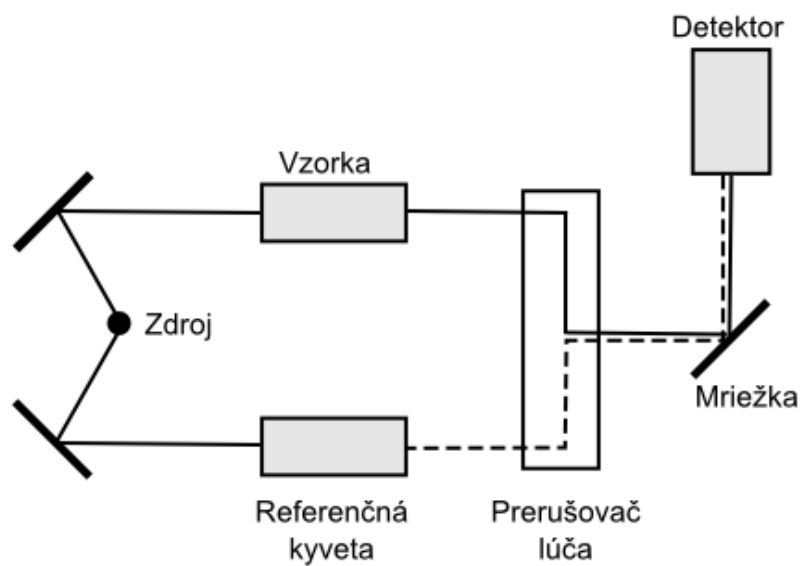
- kde  $E$  je energia fotónu,  $h$  je Planckova konštanta a  $f$  je frekvencia elektromagnetického žiarenia. Energia je vyjadrená jednotkami elektronvolt (eV).

Pri vhodných podmienkach sú molekuly a atómy schopné pohlcovať alebo vyžarovať elektromagnetické vlnenie určitých vlnových dĺžok. Elementárne častice sa nachádzajú len v určitých kvantových stavoch. Po prijatí energie fotónu – absorpcii, atóm prechádza do excitovaného stavu, takže jeho elektrón (alebo viac elektrónov) prejde z nižšej energetickej hladiny do vyššej energetickej hladiny. Naopak pri prechode elektrónov z vyššej hladiny do nižšej energetickej hladiny dochádza k vyžiareniu - emisii. Frekvencia pohlceného alebo vyžareného vlnenia závisí od rozdielu energií príslušných energetických stavov.

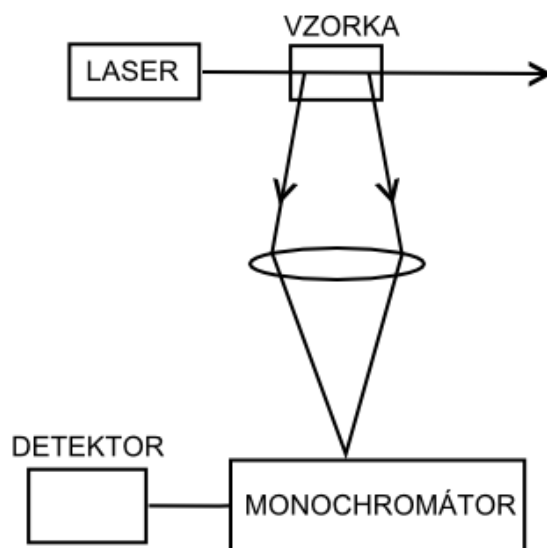
Podľa typu interakcie atómu alebo molekuly s elektromagnetickým vlnením rozdeľujeme metódy experimentálnej spektroskopie na:

- emisnú spektroskopiu,
- absorpčnú spektroskopiu.

Emisná a absorpčná spektroskopia poskytuje totožné informácie o rozdieloch energetických stavov, preto pri rozhodovaní o vhodnosti použitej metódy sú zohľadňované praktické faktory. Vo viditeľnej (VIS) a ultrafialovej (UV) oblasti je možné využiť emisnú spektroskopiu. Viac rozšírené je použitie absorpčných spektroskopických metód a to aj z dôvodu jednoduchšej interpretácie výsledných spektier. Schéma absorpčného spektrometra na obrázku (Obr. 2) predstavuje typické rozloženie prvkov v meracom prístroji. Naproti tomu ďalší obrázok (Obr. 3) predstavuje usporiadanie v Ramanovej spektroskopii, kde je rozptýlené žiarenie sledované v pravom uhle  $\theta$  dopadajúcemu žiareniu. [4]



Obr. 2. Bloková schéma absorpčního spektrometra [4]



Obr. 3. Blokové schéma Ramanovho spektrometra [4]

Pre pochopenie a vhodný výber spektroskopických metód je dôležité poznať teoretický základ týkajúci sa interakcií molekulových spektier a elektromagnetického žiarenia.

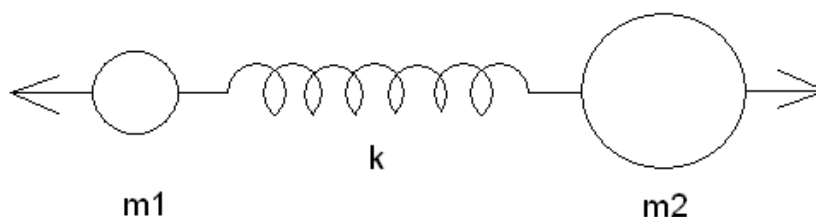
## 1.2 Molekulové spektrá [5]

Energetické stavy molekúl látok určuje nielen elektrónová konfigurácia ale aj vzájomný pohyb molekúl. Tieto pohyby sú charakterizované molekulovými spektrami, ktoré môžu byť:

- rotačné,
- vibračné,
- vibračne rotačné
- elektrónové.

### 1.2.1 Vibračné spektrum

Vibráciu molekuly zloženej z dvoch atómov si zjednodušene predstavujeme ako mechanický model pružinou spojených dvoch hmotných bodov (Obr. 4).



Obr. 4. Mechanický model vibrácie dvojatómovej molekuly[5]

Z kvantovej mechaniky pre vibračnú energiu harmonického oscilátora vyplýva:

$$E_{vib} = \left( v + \frac{1}{2} \right) h \tilde{\nu} c \quad (3)$$

kde:  $v$  je vibračné kvantové číslo, má hodnotu 0,1,2,3,....,

$\tilde{\nu}$  - je vlnočet [ $cm^{-1}$ ],

$h$  - Planckova konštanta,

$c$  - rýchlosť svetla.

V prípade klasického oscilátora sa amplitúda a energia postupne menia, na rozdiel od kvantového prístupu, kde sú energetické hladiny opísané kvantovými číslami. V najnižšom

možnom energetickom stave nemá energia nulovú hodnotu, ale nadobúda hodnotu  $\frac{1}{2}h\tilde{\nu}c$ .

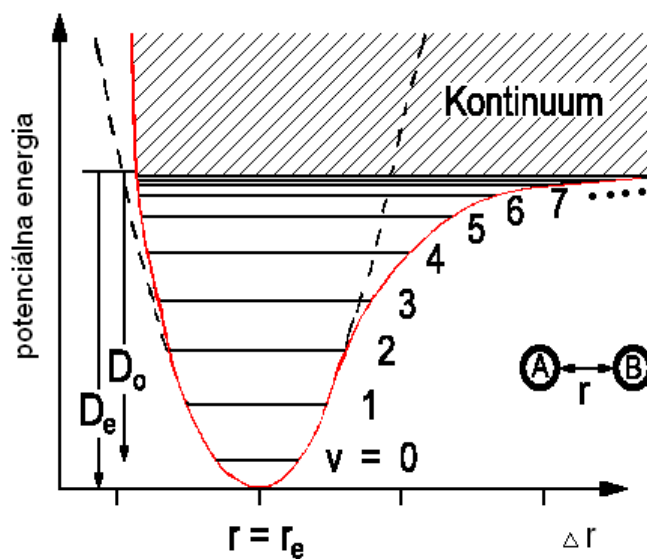
Táto hodnota je odvodená od teploty absolútnej nuly, pri ktorej translačný pohyb neexistuje.

Rozdiel medzi dvomi energetickými hladinami  $\nu_0 \rightarrow \nu_1$  je:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = hc\tilde{\nu}_0 \quad (4)$$

Z toho vyplýva, že energia medzi dvomi hladinami je ekvivalentná energii fotónu s vlnčtom  $\tilde{\nu}_0$ . Prechody  $\nu_0 \rightarrow \nu_1$  nazývame základnými prechodmi a predstavujú základné vibrácie na spektre. Prechody  $\nu_0 \rightarrow \nu_2$  sú tzv. vyššie prechody a prejavujú sa na spektre over tónmi.

Na obrázku (Obr. 5) vidíme závislosť energie od zmeny medzijadrovej vzdialenosti  $\Delta r$ , pričom červená krivka znázorňuje priebeh pri anharmonickej oscilácii a prerušovaná čierna čiara predstavuje harmonický oscilátor.

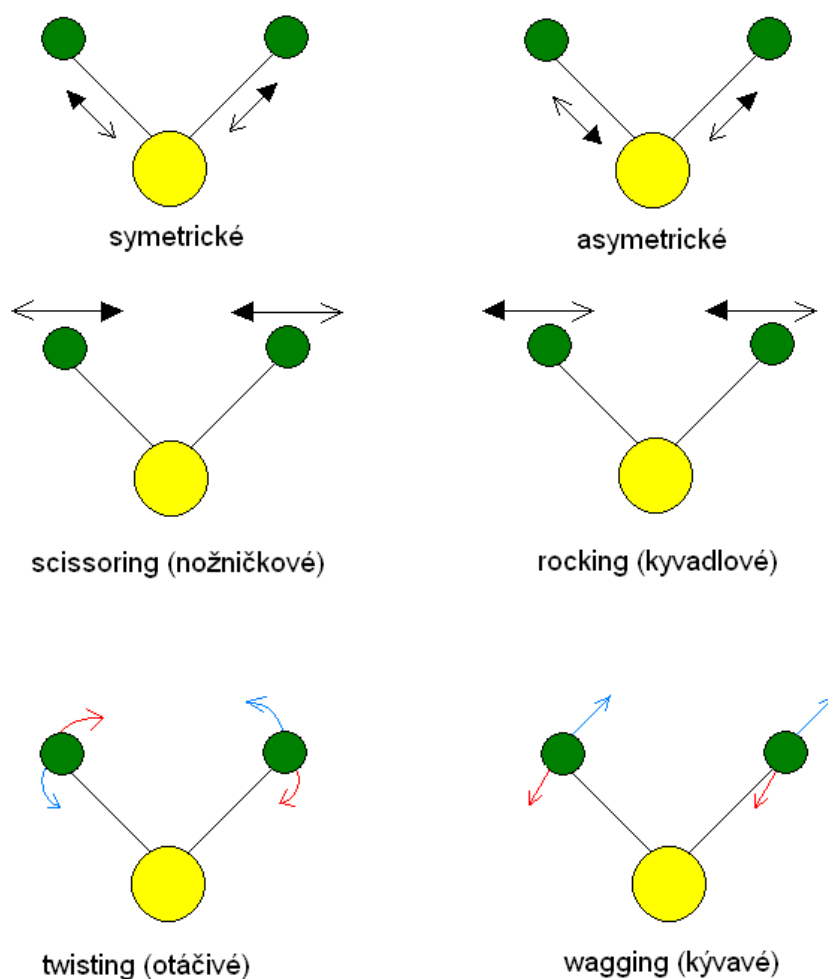


Obr. 5. Vibračné energetické hladiny dvojatómovej molekuly [6]

Vzťah energie pre anharmonických vibrácií, ktoré sú charakteristické pre reálnu molekulu je:

$$E_{vib} = hc \left[ \tilde{\nu}_0 \left( v + \frac{1}{2} \right) - x\tilde{\nu}_0 \left( v + \frac{1}{2} \right)^2 + \dots \right] \quad (5)$$

V prípade, že chceme skúmať molekuly zložené z viac ako dvoch atómov, počet vibrácií bude závisieť na počte väzieb v molekule. Taktiež záleží na tom, či sa jedná o lineárnu alebo nelineárnu molekulu. Pre lepšie pochopenie vibrácií viacatómových molekúl, si ich predstavujeme ako množinu oscilátorov, ktoré sú spojené a navzájom sa ovplyvňujú.



Obr. 6. Príklady vibračných foriem pre trojatómovú molekulu [7]

### 1.2.2 Rotačné spektrum [8]

Ďalším vzájomným pohybom molekúl, ktorý má vplyv na celkový energetický stav molekuly, je pohyb rotačný. Pri zmene rotačného pohybu vzniká rotačné spektrum. To sa

nachádza v ďalekej infračervenej oblasti a zasahuje až do oblasti rádiových vln. Podľa klasickej mechaniky je energia rotujúcej molekuly daná vzťahom:

$$E_r = \frac{1}{2} I \omega^2 \quad (6)$$

kde  $I$  je moment zotrvačnosti :

$$I = m_1 r_1^2 + m_2 r_2^2 = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} r^2 = \mu \cdot r^2 \quad (7)$$

pričom:  $I$  : moment zotrvačnosti

$\omega$  : uhlová rýchlosť

$m_1, m_2$  : hmotnosť atómu

$r$  : vzdialenosť atómov

$\mu$ : redukovaná hmotnosť.

Z hľadiska kvantovej mechaniky vychádza hodnota energie rotujúceho systému zo Schrödingerovej rovnice:

$$E_r = \frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J+1) \quad (8)$$

$J$  je rotačné kvantové číslo, ktoré nadobúda hodnoty kladných celých čísel vrátane nuly. Je dôležité poznať dve veci:

- Molekula v základnom stave nemá žiadnu rotačnú energiu.
- Rotačné kvantá sú tým menšie, čím väčší je moment zotrvačnosti  $I = \mu \cdot r^2$ .

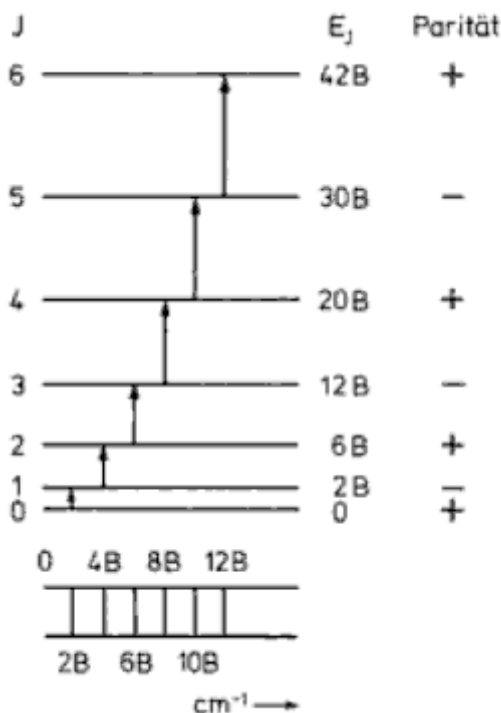
Energetickú hladinu rotácie ďalej vyjadrujeme pomocou rovnice:

$$F(J) = \frac{E_r}{h \cdot c} = \frac{h}{8\pi^2 c \cdot I} J(J+1) \quad (9)$$

Výraz  $\frac{h}{8\pi^2 \cdot c \cdot I}$  sa rovná empirickej rotačnej konštante  $B$ . Pre dve po sebe nasledujúce energetické hladiny s rastúcim rotačným kvantovým číslom platí vzťah:

$$\Delta F = 2B(J+1) \quad (10)$$

Pre prechod medzi rotačnými hladinami platí výberové pravidlo, ktoré povoľuje len také prechody, pri ktorých sa rotačné kvantové číslo  $J$  zmení o hodnotu  $\pm 1$ . Prechody znázorňuje obrázok (Obr. 7).



Obr. 7. Energetické hladiny rotačných spektier [9]

### 1.2.3 Vibračno-rotačné spektrá

Vibračné a rotačné pohyby prebiehajú v molekule súčasne. Vibračné spektrum totiž vzniká dôsledkom prechodu medzi rotačnými energetickými hladinami, ktoré prináležia vibračným energetickým hladinám. Spektrum sa teda javí ako vibračno-rotačné a vyjadrenie celkovej energie molekuly je nasledovné:

$$E_{vr} = (v + \frac{1}{2})h\nu_0 + BhcJ(J + 1) \quad (11)$$

Jedná sa o súčet energie vibračnej a rotačnej. Pre dovolené prechody platí súčasne výberové pravidlo rotačného kvantového čísla a pravidlo vibračného kvantového čísla. Dovoľené prechody teda sú také, pri ktorých  $\Delta J = \pm 1$  a  $\Delta v = \pm 1$ . [10]

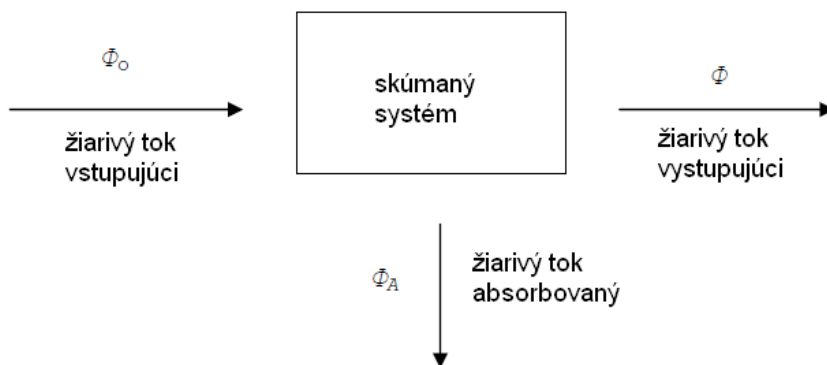
### 1.3 Typy interakcií a intenzita spektrálnych čiar

Po vystavení skúmanej látky elektromagnetickému žiareniu o rôznych frekvenciách môže byť absorbovaná energia spotrebovaná na tieto interakcie:

- prechod elektrónov tvoriacich chemické väzby , resp. voľné elektrónové páry do vyšších energetických hladín (excitovaný stav);
- zvýšenie vibračnej energie chemických väzieb;
- zvýšenie rotačnej energie molekuly. [11]

Schopnosť skúmaných molekúl pohlcovať elektromagnetické žiarenia závisí od jeho frekvencie, vlnočtu, vlnovej dĺžky a energie samotného žiarenia, ktorému je molekula vystavená. Každá molekula je schopná absorbovať žiarenie o konkrétnej vlnovej dĺžke a energii – jedná sa o diskretnú hodnotu energie. Preto neexistuje žiadna spektroskopická metóda, ktorá by bola univerzálna pre všetky látky.

Svetlo dopadajúce na látku môže byť odrazené, prepustené, môže sa lámať a rozptyľovať alebo môže byť makroskopickou sústavou prepustené.



Obr. 8. Znážornenie absorpcie svetla sústavou [5]

Pomer intenzity žiarenia s určitou frekvenciou po prechode vzorkou  $\Phi$  k intenzite dopadajúceho žiarenia  $\Phi_0$  sa nazýva transmitancia vzorky  $T$  pri danej frekvencii. Veličina absorbancia  $A$  vyjadruje mieru absorpcie žiarenia látky a jedná sa o bezrozmernú veličinu

rovnako ako je transmitancia. Prehľad vzťahov a príslušných jednotiek nájdeme v nasledujúcej tabuľke (Tab. 2):

Symbol veličiny	Názov	Definícia	Jednotky a rozmer
A	absorbancia	$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi}$	bez rozmeru
T	vnútorná transmitancia	$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$	bez rozmeru
f	frekvencia	$f = \frac{c}{\lambda}$	Hz
$\tilde{\nu}$	vlnočet	$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$	$\text{cm}^{-1}, \text{m}^{-1}$
$\Phi_0, \Phi$	svetelný tok (vstupujúci a vystupujúci)		W
$\lambda$	vlnová dĺžka		nm, $\mu\text{m}$

Tab. 2. Prehľad vzťahov a veličín používaných v spektrofotometrii [12]

Experimentálne bolo zistené, že intenzita žiarenia po prechode vzorky sa mení s dĺžkou  $l$  a s molárnou koncentráciou absorbujúcej látky  $[J]$  podľa *Lambert-Beerovho zákona*:

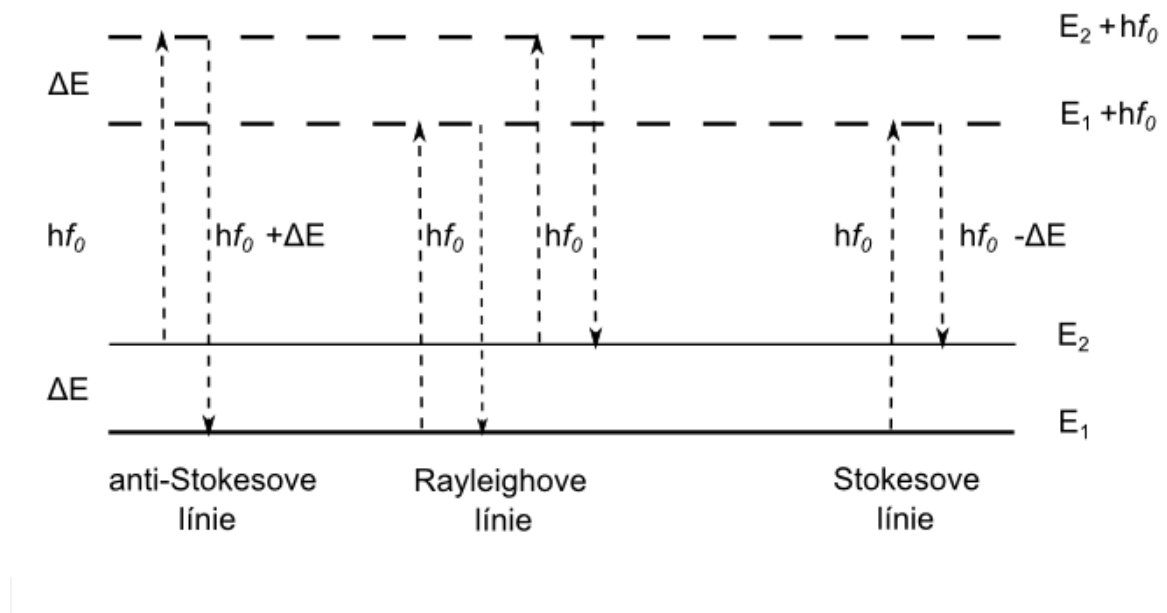
$$\Phi = \Phi_0 10^{-\varepsilon[J]l} \quad (12)$$

Veličina  $\varepsilon$  sa nazýva molárny absorpčný koeficient, jeho hodnota závisí od frekvencie dopadajúceho žiarenia a je najväčší v oblasti najintenzívnejšej absorpcie. Rozmery sú  $1/(\text{koncentrácia} \times \text{dĺžka})$  štandardne  $[\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$ . Lambert-Beerov zákon môžeme vyjadriť pomocou absorbancie [4]:

$$A = \varepsilon[J]l \quad (13)$$

## 2 RAMANOVA SPEKTROSKOPIA

Vibračne rotačné prechody je možné skúmať dvomi spôsobmi a to priamym pozorovaním v infračervenej oblasti a tiež štúdiom rozptylu svetla. V Ramanovej spektroskopii sa energetické hladiny molekúl skúmajú analýzou frekvencií prítomných v žiarení rozptýlenom týmito molekulami. V experimente prechádza dopadajúci monochromatický lúč cez vzorku a sledované je žiarenie rozptýlené v kolmom smere na dopadajúci lúč. Približne jeden z  $10^7$  dopadajúcich fotónov sa zrazí s molekulou tak, že jej odovzdá časť svojej energie a rozptýli sa s nižšou energiou. Rozptýlené fotóny tvoria žiarenie s nižšou frekvenciou ako je frekvencia dopadajúceho žiarenia – jedná sa o Stokesovo žiarenie zo vzorky. Iné dopadajúce fotóny sú schopné pohltiť energiu už excitovaných molekúl a objaví sa žiarenie s vyššou frekvenciou – anti-Stokesovo žiarenie. Časť žiarenia rozptýlená bez zmeny frekvencie sa nazýva Rayleighovo žiarenie. Nasledujúci obrázok (Obr. 9) znázorňuje rozloženie troch typov línií na základe absorbovanej a emitovanej energie fotónov.[4]



Obr. 9. Schematické zobrazenie rozptylu svetla v Ramanovej spektroskopii[13]

V prípade, že  $f_0$  je frekvencia dopadajúceho svetla, energia svetelného kvanta je  $hf_0$  (rovnica 2). Pri interakcii excitačného žiarenia s molekulou v ľubovoľnom stacionárnom stave s energiami  $E_1$  a  $E_2$ , energia týchto molekúl sa zvýši na  $E_1+hf_0$  a  $E_2+hf_0$ . Pokiaľ sú tieto excitované energetické stavy nestabilné dôjde k rozptylu svetla prechodom molekuly na nižšiu stabilnú energetickú hladinu. Ak sa molekula vráti do pôvodného stavu vyžiari pritom znovu kvantum  $hf_0$  a frekvencia rozptýleného vlnenia sa nezmení (Rayleighov rozptyl). Molekula môže taktiež prejsť na iný stacionárny stav, než aký mala pred excitáciou, za týchto okolností odovzdá alebo odoberie časť energie svetelnému kvantu. Frekvencia svetelného kvanta sa tým zmení podľa rovníc:

$$(E_1 - E_2)/h = \Delta E/h \quad (14)$$

$$(E_2 - E_1)/h = -\Delta E/h \quad (15)$$

a to v závislosti na pôvodnom energetickom stave molekuly  $E_1$  a  $E_2$  (Obr. 9) a v spektre rozptýleného svetla sa objaví excitačná línia aj línia s frekvenciou  $f_0+\Delta E/h$  a  $f_0 - \Delta E/h$ . Ako Ramanove frekvencie sú reprezentované ako absolútne hodnoty rozdielov frekvencií excitačnej línie  $f_0$  a posunutých línií, tzn.

$$f_R = \frac{\Delta E}{h} \quad (16)$$

Ako znázorňuje obrázok (Obr.6), línie posunuté od excitačnej línie smerom k väčším vlnovým dĺžkam sú nazývané Stokesove línie, naopak línie smerom k menším vlnovým dĺžkam sú anti-Stokesove línie. V prípade, že dva stacionárne stavy o energii  $E_1$  a  $E_2$  odpovedajú dvom rôznym vibračným stavom molekuly, príslušná Ramanova frekvencia  $f_R$  odpovedá hodnote frekvencie vlnenia, ktoré bolo možné pozorovať pri prechode medzi týmito stavmi v infračervenej oblasti elektromagnetického spektra. [13]

## 2.1 Rotačné Ramanove spektrá

Ako už bolo zmienené v predchádzajúcej kapitole (0) aby molekula prešla do vyššieho rotačného stavu musí splniť tzv. výberové pravidlo. Všeobecné výberové pravidlo pre rotačné Ramanove prechody je, že molekula musí byť anizotropne polarizovateľná. Túto vlastnosť majú všetky lineárne a dvojatómové molekuly a preto sú aktívne v rotačných Ramanových spektrách. Túto špecifickú vlastnosť molekúl sme schopní využiť pri štúdiu

molekul, ktoré nevykazujú aktivitu pri použití mikrovlnnej spektroskopie. Špecifickými výberovými pravidlami pre rotačnú Ramanovu spektroskopiu sú:

$$\text{Lineárne rotory: } \Delta J = 0, \pm 2$$

$$\text{Symetrické rotory: } \Delta J = 0, \pm 1, \pm 2; \Delta K = 0 \quad (17)$$

## 2.2 Vibračné Ramanove spektrá

Polarizovateľnosť molekuly by sa mala meniť s vibráciami molekuly, tak znie výberové pravidlo pre vibračné Ramanove prechody. Dvojatómové molekuly sa pri vibrácii roztáhujú a sťahujú, čím sa mení vplyv jadier na elektróny. Tieto zmeny stavu molekuly sú príčinou jej polarizovateľnosti. Vo vibračných Ramanových spektrách sú aktívne heteronukleárne aj homonukleárne dvojatómové molekuly takže informácie získané z vibračného Ramanovho spektra dopĺňajú informácie získané z infračervenej spektroskopie. Špecifické výberové pravidlo pre Ramanove vibračné prechody je:

$$\Delta v = \pm 1 \quad (18)$$

Stokesove línie sú tie, pre ktoré platí  $c$  a majú nižšiu frekvenciu ako je frekvencia dopadajúceho žiarenia. Anti-Stokesove línie sú tie, pre ktoré naopak platí  $\Delta v = -1$  a majú frekvenciu vyššiu ako je frekvencia dopadajúceho žiarenia.

V spektrách v plynnej fáze sa tieto línie prejavajú odlišnou štruktúrou, ktorá vzniká zo súbežných rotačných prechodov. Rotačné prechody sprevádzajú vibračnú excitáciu. Výberové pravidlá sú  $\Delta J = 0, \pm 2$  (rovnako ako v čisto rotačných Ramanových spektrách) a tak vznikli vety O, Q a S:

$$\text{veta O: } \Delta J = -2; f_O(J) = f_i - f - 2B + 4BJ$$

$$\text{veta Q: } \Delta J = 0; f_Q(J) = f_i - f$$

$$\text{veta S: } \Delta J = +2; f_S(J) = f_i - f - 6B - 4BJ \quad (19)$$

Oproti infračervenej spektroskopii je veta Q pozorovateľná pri všetkých lineárnych molekulách.

Vibračné Ramanove spektra dopĺňajú informácie z infračervenej spektroskopie, pretože sa prejavajú aj homonukleárne dvojatómové molekuly. Takto získané informácie je možné využiť pre určenie:

- silových konštánt,
- disociačnej energie,
- väzbovej dĺžky.

Pre viacatómové molekuly platí, na rozdiel od dvojatómových, že majú väčší počet vibračných módo, pretože sa vibráciami menia všetky väzby a uhly v molekule.

Pre molekulu zloženú z  $N$ -atómov, má  $3N$  stupňov voľnosti. Kombináciou čistého posuvu a rotáciou celej molekuly ostáva  $3N-6$  nezávislých vibračných módo pre nelineárnu molekulu a  $3N-5$  nezávislých vibračných módo pre lineárnu molekulu.[14]

V prípade, že je vibrácia sprevádzaná zmenou polarizovateľnosti, prejavujú sa v Ramanových spektrách normálne módy vibrácií molekúl ako aktívne. Pri určovaní aktívneho módu sa riadime vylučovacím pravidlom, ktoré hovorí, že ak má molekula stred symetrie, tak žiadny mód nemôže byť súčasne aktívny v infračervenom a v Ramanovom spektre. Zároveň však vibračný mód môže byť neaktívny v oboch spektrách.[4]

### 3 APLIKAČNÉ MOŽNOSTI RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE

Ramanova spektroskopia je metóda spektrálnej analýzy využívajúca elektromagnetické žiarenie k analýze vibračných energetických stavov skúmaných látok. Vyhodnotenie súborov špičiek (peaks), ktoré sa rovnajú charakteristickým vibračným frekvenciám, umožní identifikáciu materiálu a to za využitia databáz alebo referenčných spektier. Oblasť využitia Ramanovej spektroskopie sa v poslednej dobe výrazne rozšírila vzhľadom k technologickému pokroku a taktiež dostupnosti prístrojov na trhu. Pre lepšiu predstavu je nižšie uvedený prehľad vybraných možností aplikácií, ďalej bude bližšie rozobraná problematika Ramanovej spektroskopie ako metódy využívanej v kriminalistickej expertíze.

Možnosti využitia Ramanovej spektroskopie v jednotlivých vedných oboroch sú:

#### I. BIOMEDICÍNA

- detekcia a skúmanie rakovinových buniek,
- sledovanie zmien v bunkách, napr. obsah vody,
- štúdium DNA – analýza nukleotidov a aromatických aminokyselín,

#### II. FARMÁCIA

- analýza zloženia liečiv – aktívnych a pomocných látok,
- identifikácia prímiesí v liečivách,
- rozloženie zložiek v liečive, zisťovanie nehomogenít,
- analýza liekov v konečnej podobe tabliet skrz obal,

#### III. UMENIE

- identifikácia pigmentov na maľbách, spisoch, keramike a papyruse,
- overovanie pravosti umeleckých diel,
- využitie pri výbere vhodnej reštaurátorskej techniky,

#### IV. DRAHOKAMY, DIAMANTY, MINERÁLY

- identifikácia a certifikácia kvality drahých kameňov,

#### V. KONTROLA KVALITY POLOVODIČOVÝCH SÚČIASTOK

## VI. FORÉNZNE VEDY

- kriminalisticko-technický prostriedok pri znaleckom skúmaní vecných dôkazov a stôp,
- skúmanie atramentov a overovanie pravosti dokumentov,
- analýza farieb, náterov a pigmentov,
- detekcia reziduálnych zvyškov strelného prachu,
- identifikácia liečiv a narkotík,
- detekcia výbušnín.[15]

Ako môžeme vidieť v uvedenom prehľade, aplikačné možnosti sú naozaj široké. Táto práca je zameraná na bezpečnostné aplikácie Ramanovej spektroskopie, čomu odpovedajú aplikácie vo forenzných vedách a hlavne v kriminalistickej chémii. Kriminalistickú chémiu zaradujeme medzi kriminalistickú techniku, ktorá využíva poznatky z obcej chémie pre potreby kriminalistickej expertízy.

### 3.1 Ramanova spektroskopia v kriminalistickej expertíze

Ako definuje Jiří Strauss v *Slovníku kriminalistických pojmů*, kriminalistická expertíza je kriminalistická metoda, ktorá sa zaoberá skúmaním, odhaľovaním, zaist'ovaním a objasnením kriminalisticky relevantných skutočností potrebných pri dokazovaní v trestnom riadení. Táto metóda využíva znalosti, techniky a prostriedky z mnohých oblastí vedy. Na expertíznom skúmaní sa podieľajú kvalifikovaní špecialisti a podľa oblasti záujmu sú aplikované špecializované kriminalistické techniky a metódy. V tomto procese je možné využívať odborných znalostí expertov z Odborov kriminalistickej techniky a expertíz krajských riaditeľstiev Policie České republiky, prípadne expertov z Kriminalistického ústavu Policie ČR Praha. Taktiež môžu odborníci vystupovať ako konzultanti pri vyšetrovaní a objasňovaní trestnej činnosti v špeciálnej oblasti, ktorá sa dotýka odbornej problematiky, napr. technológia výroby, manipulácia s nebezpečnými látkami a podobne. Kriminalistický expert má príslušnú kvalifikáciu, špecializáciu a musí disponovať oprávnením k expertíznej činnosti. Vystupuje po predvolaní orgánmi činných v trestnom riadení po zložení znaleckého sľubu ako súdny znalec. Jeho úlohou je odborne objasniť skutočnosti, ktoré majú význam pre trestné riadenie.

Experti k svojej činnosti využívajú fyzikálne, fyzikálne -chemické a chemické metódy a k tomu odpovedajúce prostriedky. Vedecko-technický pokrok umožňuje zdokonaľovať technické metódy a zároveň rozširuje oblasť ich použitia. V mnohých profesiách je nepredstaviteľné, pracovať bez najmodernejšieho vybavenia. Činnosť policajných orgánov by nebola dostatočne účinná bez využívania najnovších technických metód a prostriedkov. Vzhľadom na to, že zločinecké zoskupenia často využívajú k protispoločenskej aktivite najmodernejšie vybavenie, je nutné, aby orgány činné v trestnom konaní volili adekvátne postupy s využitím všetkých dostupných technológií. [16]

V kriminalistickej praxi sú využívané špeciálne metódy, ktoré sú využívané aj inými vedami a tiež špecifické kriminalisticko-technické metódy, ktoré sú aplikované prevažne v kriminalistike a boli vypracované práve pre potreby kriminalistov (napr. metódy skúmania obrazcov papilárnych línií, metódy skúmania ručného a strojového písma, niektoré metódy balistického skúmania a pod.). Zvolenej metóde odpovedajú kriminalisticko-technické prostriedky, čiže technické zariadenia, prístroje, materiály, nástroje, postupy, spôsoby a pravidlá ich použitia. [17]

Z hľadiska vzniku a charakteru klasifikujeme kriminalisticko-technické prostriedky do nasledujúcich skupín:

- prostriedky obecné používané v technike – stereomikroskop, biologický mikroskop,
- upravené prostriedky na kriminalistické využitie – komparačný mikroskop,
- prostriedky špeciálne zhotovené ku kriminalistickému využitiu – počítačové systémy.

Podľa použitia kriminalisticko-technického prostriedku v procese odhaľovania, vyšetrovania a prevencie protiprávnej činnosti sa delia na:

- technické prostriedky, ktoré slúžia k vyhľadávaniu kriminalisticko-technických stôp a ich znakov (napr. detektor kovov),
- technické prostriedky používané na fixáciu a zaistenie stôp (fotografické prístroje, meracie prístroje, materiály a pomôcky k zhotovovaniu odliatkov stôp...),

- technické prostriedky využívané pri znaleckom skúmaní vecných dôkazov a stôp (optické zariadenia pre vizuálne skúmanie, prostriedky umožňujúce fotografické, fyzikálne, chemické, metalografické skúmanie),
- komplexné jednotky – kriminalistické laboratórium.

Pri dodržaní ustanovení stanovených platným trestným poriadkom je možné použiť informácie získané pomocou kriminalisticko-technickým metód, prostriedkov a postupov ako pramene dôkazov. Technické metódy kriminalistickej praxe je možné charakterizovať podľa princípu, ktorý je použitý, na:

- optické metódy,
- metódy skúmania stôp v neviditeľnom elektromagnetickom spektre,
- metódy skúmania stôp s využitím vlastností jadrového žiarenia,
- chemické a fyzikálne chemické metódy.[17]

Optické metódy skúmania stôp využíva najstaršie techniky ako je zväčšovanie pomocou lupy alebo rôznych druhov mikroskopov. Výhodou týchto metód je, že nedochádza k zasahovaniu do dôkazného materiálu, ktoré by mohlo znehodnotiť stopy a tým aj znemožniť ďalšie skúmanie. Preto je optickým metódam dávaná prednosť pred inými metódami, ktoré môžu mať deštruktívny charakter. Zväčšenie pozorovaného objektu umožňuje dôkladne preskúmať, analyzovať a vyhodnotiť aj najmenšie mikrostopy, nerovnosti a štruktúru povrchu.

Metódy spektrálnej analýzy sú využívané pri skúmaní stôp a vecných dôkazov v neviditeľnom elektromagnetickom spektre. Ako už bolo uvedené v prvej kapitole, každá látka vykazuje určitú špecifickú schopnosť absorbovať alebo emitovať elektromagnetické vlnenie o charakteristickej vlnovej dĺžke. Táto vlastnosť je využívaná v viacerých metódach.

### 3.2 Kriminalistická chémia

Spektrum metód využívaných v kriminalistickej chémii je široké. Okrem jednoduchých kvapkových a skúmvkových metód sú využívané aj sofistikované zložité postupy, ktoré vyžadujú prístrojové vybavenie a počítačové vyhodnocovacie programy. Metódy môžu mať deštruktívny alebo nedeštruktívny charakter. Zároveň sa líši množstvo vzorky potrebné na danú analýzu. Preto závisí od skúseností a profesionálnych znalostí expertov akú metódu kriminalistickej chémie zvolia. Vybrané oblasti kriminalistickej expertízy, v ktorých je možné využiť Ramanovu spektroskopiu sú napríklad:

- skúmanie náterových hmôt a pigmentov;
- detekcia reziduálnych zvyškov strelného prachu;
- detekcia výbušnín;
- skúmanie drog a liečiv;

#### 3.2.1 Skúmanie náterových hmôt a pigmentov

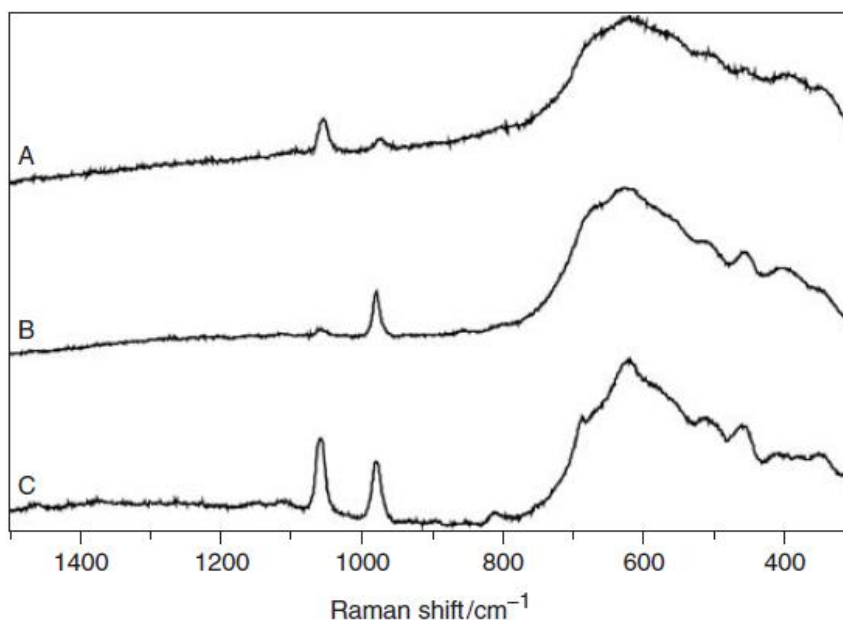
V kriminalistickej praxi sa využíva skúmanie náterov najmä pri riešení dopravných nehôd, krádeží vlámaním a tiež pri vyšetrovaní prípadov ilegálnych grafitov. Pri dopravných nehodách sa jedná o analýzu úlomkov náterových systémov a oterov náterových hmôt na rôznych objektoch. Rovnako pri vyšetrovaní vlámaní slúžia ako dôkazy drobné úlomky farby alebo zostane farba zachytená na použitých nástrojoch.

Kriminalistické skúmanie náterových materiálov slúži vo väčšina prípadov len k určení skupinovej príslušnosti. Sme schopný zistiť zloženie, chemické a fyzikálne vlastnosti, typické použitie a pod. V prípade, že disponujeme dvomi vzorkami z rozdielnych miest (miesto nehody a úlomok z poškodenej karosérie automobilu) je možné potvrdiť alebo vylúčiť zhodu. Medzi typické skúmanie v tejto oblasti patrí vizuálne porovnávanie, ktoré umožňuje určiť farbu a odtieň náterovej hmoty a porovnať vzorku s referenčným materiálom. Ďalšou metódou je mikroskopické skúmanie objektu, pričom hodnotíme vzhľad povrchu, prítomnosť prasklín, prítomnosť nečistôt alebo štruktúru jednotlivých vrstiev. Skúšky rozpustnosti majú obmedzené použitie a umožňujú orientačne určenie druhu a charakter náterovej hmoty. V neposlednej rade významné miesto medzi metódami zastávajú spektrofotometrické metódy. K účelu jednoznačnej identifikácie druhu náterovej

hmoty je možné použiť Ramanovu spektroskopiu, ktorá má viacero predností oproti klasickej IČ spektroskopii.[17]

### 3.2.2 Reziduálne stopy strelného prachu

Výstrel zo zbrane zanechá na oblečení páchatel'a a jeho rukách zvyškové stopy, ktoré sú pôvodom z nábojky väčšiny nábojníc, a to v dosahu do 1 metra. Tieto zvyšky pozostávajúce z nesférických častíc, môžu byť merané priamo na oblečení podozrivého pomocou Ramanovho mikroskopu, alebo odobrané vzorky putujú na SEM analýzu. Rezíduá môžu obsahovať častice strelného prachu, uhlíkaté sadze, dusičnany a dusitany, zlúčeniny bária a antimónu. Základ strelného prachu tvorí nitrocelulóza alebo nitroglycerín. Rezíduá nemajú tendenciu k degradácii v čase, takže získané vzorky z podozrivých objektov preukážu prítomnosť zvyškov strelného prachu. Táto oblasť kriminalistickej chémie si vyžaduje odborné znalosti a rovnako vysoko kvalifikovanú prácu expertov, ktorý dokážu pochopiť a interpretovať výsledky analýz. Vzorky získané z miesta činu môžu byť kontaminované napríklad krvou alebo inými nečistotami.



Obr. 10. Ramanove spektra troch častíc zvyškov strelného prachu[15]

Veľmi efektívne sa javí kombinácia techniky Ramanovej spektroskopie a SEM analýzy v oblasti identifikácie rezíduí strelného prachu. V zahraničných publikáciách sú popísané

štúdie, ktoré poskytujú cenné informácie o možnostiach využitia Ramanovho mikroskopu v tejto oblasti kriminalistickej expertízy. Na obrázku (Obr. 10) vidíme Ramanove spektra troch častíc rezíduí strelného prachu, ktoré študoval *J. Yarwood* na *Sheffield Hallam University, UK*. Častice vykazujú prítomnosť oxidu barnatého ( $\text{BaO}$ ) a uhličitanu barnatého ( $\text{BaCO}_3$ ). S použitím samotnej SEM analýzy by nebolo možná presná špecifikácia vzoriek.[15]

### 3.2.3 Skúmanie liečiv a drog

Kriminalisti prichádzajú do styku s liečivami a drogami v mnohých prípadoch, či už sa jedná o úmyselné alebo neúmyselné otravy, vraždy, samovraždy, prípady toxikománie a pod. Zároveň však môže ísť vyšetovanie prípadov trestnej činnosti výroby, pašovania a predaja narkotík. Identifikácia pašovaných substancií ako amfetamín, kokaín a heroín je veľmi dôležitá pre protidrogové jednotky. Rovnako je dôležitá identifikácia prekursorov drog tzn. chemických látok, ktoré sú používané k výrobe omamných alebo psychotropných látok, aditívnych prísad do tabliet a riediacich prísad ( tzv. *cutting agents*), ktoré sú používané na zníženie koncentrácie účinnej drogy. Znalosť týchto látok dokáže prezradiť výrobcu, miesto výroby a transportnú trasu. Štandardné analytické metódy zahŕňujú kombinácie chromatografie a kapilárnej elektroforézy. V mnohých ohľadoch je ale Ramanova spektroskopia jednoduchšia a rýchlejšia, preto býva rovnako implementovaná do súboru identifikačných metód. Výhody Ramanovej spektroskopie pri identifikácii drog a liečiv sú:

- Meranie môže byť prevádzané s prenosnou Ramanovou jednotkou a pomocou sondy z optického káblu.
- V Ramanovom mikroskope môže byť identifikovaná vzorka skrz priehľadnú obal, čím zabránime priamemu kontaktu a krížovej kontaminácii identifikovanej látky.
- Forénzne laboratória uprednostňujú Ramanovu spektroskopiu vzhľadom na to, že chromatografické metódy trvajú príliš dlho.
- Mapovaním vybraných oblastí vzoriek je možné získať informácie o zložení polymorfnej vzorky a identifikovať jednotlivé zložky systému.
- Nový software pre spektrálnu analýzu a možnosť kombinácie viacerých laserov zdokonaľuje analýzu a identifikáciu zadržaných drog. [15]

Z praktických dôvodov sa v experimentálnej časti zaoberáme analýzou ľahko dostupných farmaceutických preparátov. Pre názornú ukážku využitia Ramanovej spektroskopii tiež k identifikácii narkotík, v prílohovej časti tejto práce uvádzame spektrá drog, ktoré boli publikované v odbornej literatúre.

## **II. PRAKTICKÁ ČASŤ**

## 4 STANOVENIE CIEĽOV EXPERIMENTÁLNEJ ČASTI

V praktickej časti diplomovej práce boli študované vybrané vzorky pomocou Ramanovej spektroskopie. Pomocou inVia Reflex Ramanovho mikroskopu boli namerané spektrá liečiv, v ktorých je účinnou látkou kyselina acetylsalicylová (*lat. acidum acetylsalicylicum*).

Cieľom tejto časti diplomovej práce je:

- oboznámiť sa s možnosťami a funkciami Ramanovho mikroskopu inVia od firmy Renishaw a vybrať vhodnú oblasť pre následnú štúdiu;
- pripraviť vybrané vzorky a referenčné materiály na meranie Ramanovych spektier;
- vyhodnotiť získané údaje a posúdiť vhodnosť aplikácie Ramanovej spektroskopie v danej analýze;

Popisy meraní spoločne s výsledkami sú uvedené v nasledujúcich kapitolách. V závere praktickej časti tejto diplomovej práce sú formou diskusie zhodnotené viaceré aspekty realizovaných meraní a navrhnuté ďalšie možnosti použitia tejto metódy s ohľadom na bezpečnostné aplikácie.

## 5 RAMANOV MIKROSKOP

V praktickej časti diplomovej časti sme pracovali s Ramanovým mikroskopom inVia Reflex od firmy Renishaw (Obr. 11). Jedná sa o systém kombinujúci Ramanov spektrometer s integrovaným mikroskopom, ktorý umožňuje konfokálne meranie s vysokým rozlíšením. Podporuje pripojenie viacerých excitačných laserov, medzi ktorými si užívateľ vyberá pomocou automatického prepínania. Ramanova mikroskop, ktorý je k dispozícii v laboratóriu FAI UTB disponuje zatiaľ len jedným laserom s excitačnou vlnovou dĺžkou 514nm. Tento prístroj je schopný pracovať v rôznych skenovacích snímacích režimoch s vysokou citlivosťou, pričom nastavenie je možné cez počítačové rozhranie pomocou softwaru WiRE™ 3.0.



Obr. 11. Ramanov mikroskop inVia Reflex značky Renishaw[19]

Ramanov mikroskop obsahuje tieto časti:

- zdroj monochromatického svetla – laser s vlnovou dĺžkou 514nm,
- mikroskop, ktorý zabezpečuje osvetlenie vzorky a zachytáva rozptýlené svetlo,
- filtre, ktoré odfiltrujú celé svetelné spektrum okrem úzkeho zväzku potrebného k Ramanovmu rozptylu – holografické a dielektrické filtre,

- difrakčná mriežka rozdeľuje rozptýlené Ramanove svetlo do jednotlivých vlnových dĺžok,
- CCD kamera je citlivá na detekciu rozptýleného svetla,
- PC - kontrola prístroja, nastavenia, analýza a ukladanie dát.

## 5.1 Výber a charakteristika vzoriek

Ako už bolo spomenuté, pri Ramanovej spektroskopii pomocou laseru snímame vibračné energetické hladiny molekúl. Ramanove spektrum nám poskytne súbor pík, ktoré korešpondujú s charakteristickými vibračnými energiami materiálu. Ide o tzv. odtlačok prstu (z angl. *fingerprint*), ktorý slúži k identifikácii látky hľadaním v databáze alebo porovnaním s referenčným spektrom.

Ramanova spektroskopia nachádza uplatnenie v mnohých oblastiach vedy, výskumu a tiež v priemysle. Významné postavenie má v kriminalistickej expertíze ako je pojednané v Kapitole 3 a je možné ju využiť k identifikácii liečiv a narkotík. Z pragmatických dôvodov sme pre praktickú štúdiu zvolili bežne dostupné liečivá.

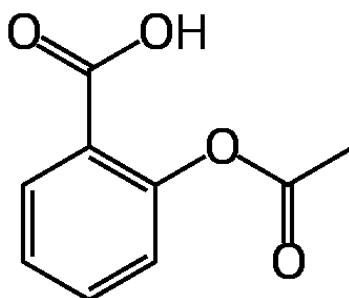
Komerčný názov lieku	Účinné látky	Pomocné látky
<i>Acylpyrin</i> ®	kyselina acetylsalicylová	zemiakový škrob mastenec
<i>Aspirin</i> ®-C	kyselina acetylsalicylová kyselina askorbová	kyselina citrónová dihydrogén-citronan sodný uhličitan sodný hydrogénuhličitan sodný
<i>Paralen</i> ®	paracetamol	kukuričný škrob polyvinylpyrolidon 30 kyselina steárová sodná soľ kroskarmelózy

Tab. 3. Zloženie liekov vybraných na Ramanovu spektroskopiu

Okrem komerčných produktov (*Acylpyrin*®, *Aspirin*®-C, *Paralen*®) bolo potrebné získať jednotlivé zložky každého lieku vo forme čistých chemických látok, ktorých spektrá

použijeme ako referenčné pre následnú analýzu. Zloženie analyzovaných liekov vidíme v tabuľke (Tab. 3). V mnohých liekoch sa ako pomocná látka používa oxid titaničitý  $\text{TiO}_2$  známy taktiež ako titanová bieloba a preto sme sa rozhodli nasnímať jeho Ramanove spektrum.

**Kyselina acetylsalicylová** (lat. *acidum acetylsalicylicum*) je aromatická karboxylová kyselina (Obr. 12). Za normálnych podmienok je forme bielej kryštalickej látky. Je len mierne rozpustná vo vode. Vo farmácií je využívaná ako analgetikum (účinná proti bolesti), antipyretikum( účinná proti horúčke) a antiflogistikum (protizápalový účinok). Kyselina acetylsalicylová je najstaršie synteticky pripravené liečivo, ktoré sa dodnes používa. Okrem spomínaných účinkov má tiež antikoagulačné vlastnosti, čiže znižuje zrážanlivosť krvi. Predávkovanie kyselinou acetylsalicylovou môže viesť až k smrti. Príznakmi otravy môže byť pískanie v ušiach, hypoglykémia, zrýchlené dýchanie, nepravidelný tep, halucinácie, kŕče až upadnutie do kómy. [21]

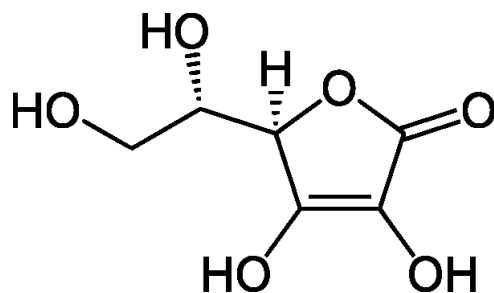


Obr. 12. Štruktúrny vzorec kyseliny acetylsalicylovej[21]

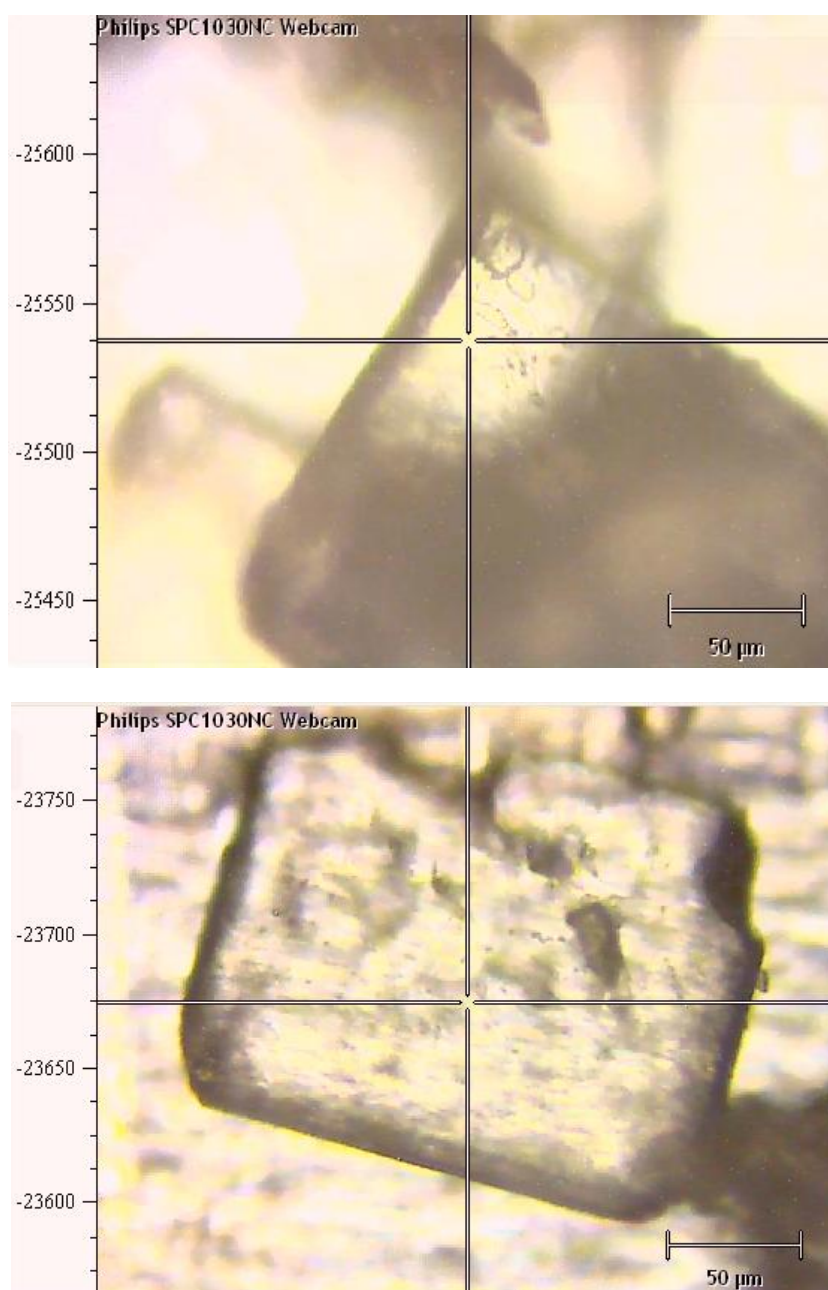
**Kyselina askorbová** (lat. *acidum ascorbicum*) označovaná ako vitamín C, je organická kyselina, ktorá je za normálnych podmienok vo forme bielej až žltej kryštalickej látky. Kyselina askorbová je rozpustná vo vode, a je náchylná k oxidácii.

Vitamín C človek nie je schopný syntetizovať vo svojom tele, preto musí byť prijímaný v potrave. Nedostatok vitamínu C sa prejavuje oslabením obranyschopnosti organizmu, anémiou, kazeníím zubov a v extrémnom prípade spôsobuje chorobu zvanú skorbut.[22]

Na obrázku je štruktúra molekuly kyseliny askorbovej (Obr. 13). Pomocou kamery Ramanovho mikroskopu sme nasníмали kryštály vitamínu C (Obr. 14).



Obr. 13. Štruktúrny vzorec kyseliny askorbovej[22]

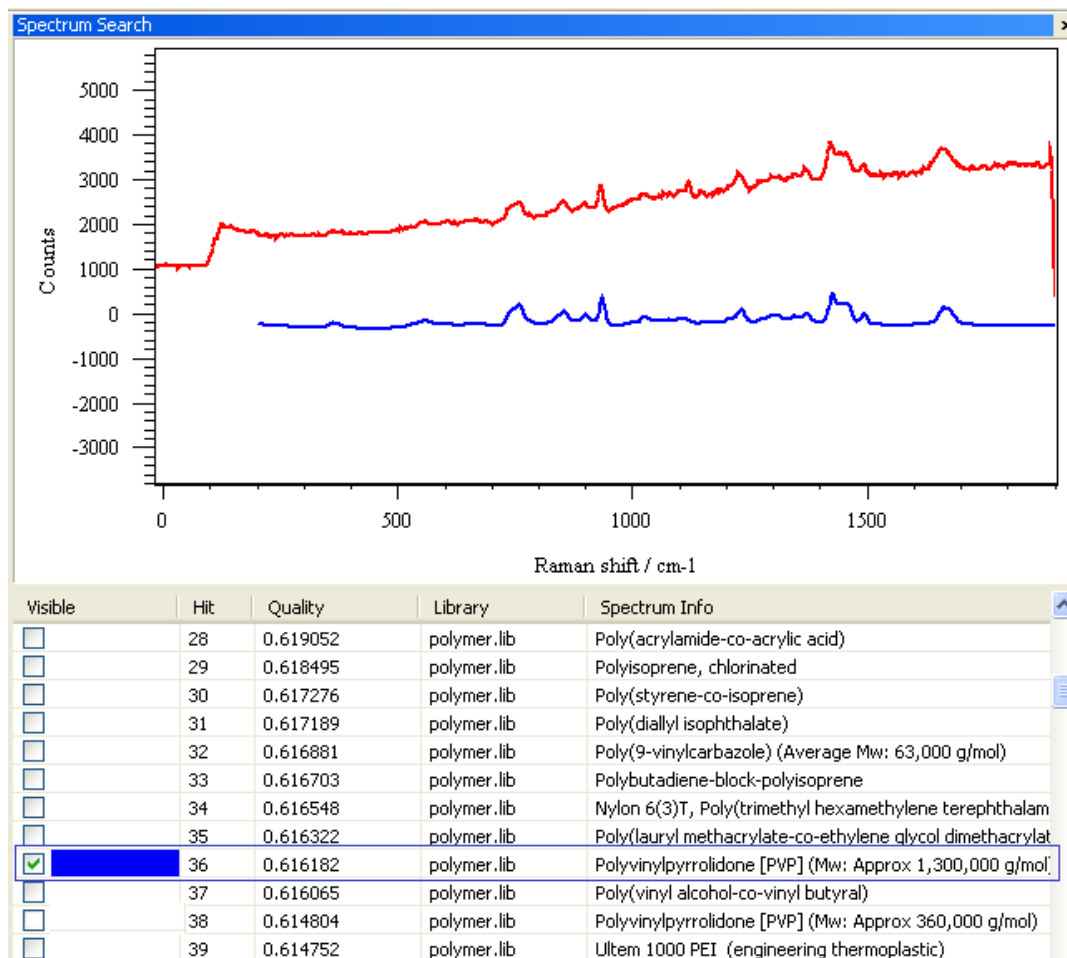


Obr. 14. Kryštály kyseliny askorbovej snímané kamerou Ramanovho mikroskopu

## 5.2 Postup merania Ramanových spektier

Na základe teoretických poznatkov o Ramanovej spektroskopii a naštudovaní manuálu k Ramanovmu mikroskopu inVia Reflex od firmy Renishaw sme zmerali spektrá vybraných vzoriek. Postup merania je kvôli lepšej prehľadnosti uvedený v bodoch:

1. Pred začiatkom merania spustíme na počítači program WiRE™ 3.0, ktorý umožňuje nastavovanie parametrov a ovládanie Ramanovho mikroskopu.
2. Malé množstvo vzorky nasypeme na kovovú doštičku a upevníme do držiaku mikroskopu.
3. V programe WiRE™ 3.0 zapneme CCD kameru a pomocou ovládacích prvkov na mikroskope zaostríme objektív na časticu alebo plochu vzorky. Podľa potreby vyberieme typ zväčšenia.
4. Na jemnejšie zaostrovanie a posuv využívame pripojený joystick. Na obrazovke vidíme v jednom z okien snímanú plochu.
5. Po zaostrení obrazu nastavujeme v programe parametre merania: typ snímania static/extend, počet akumulácií (scanov), expozičný čas a výkon laseru.
6. Zapneme laser a stlačením ikonky RUN spustíme meranie. Na obrazovke v ďalšom okne sa vykresľuje Ramanove spektrum analyzovanej látky.
7. Počas merania je vhodné pracovať s minimom svetla v miestnosti, pretože žiarivky môžu ovplyvniť výsledky.
8. Výsledné spektrum je možné upravovať priamo v programe:
  - funkcia SMOOTH vyhladzuje krivku;
  - nastavenie vzhľadu – názov grafu, osí, veľkosť grafu;
  - zobrazenie jednej alebo viacerých kriviek;
  - zobrazenie hodnôt jednotlivých pík.
9. Namerané spektrá porovnávame s referenčnými spektrami v nahraných knižniciach (Obr. 15), ktoré je možné dokupovať a tým rozšíriť možnosti analýzy. V našom laboratóriu boli dostupné dve knižnice: knižnica polymérov a knižnica forenzných látok. Taktiež je možné vytvoriť si vlastnú knižnicu podľa zamýšľaného použitia.



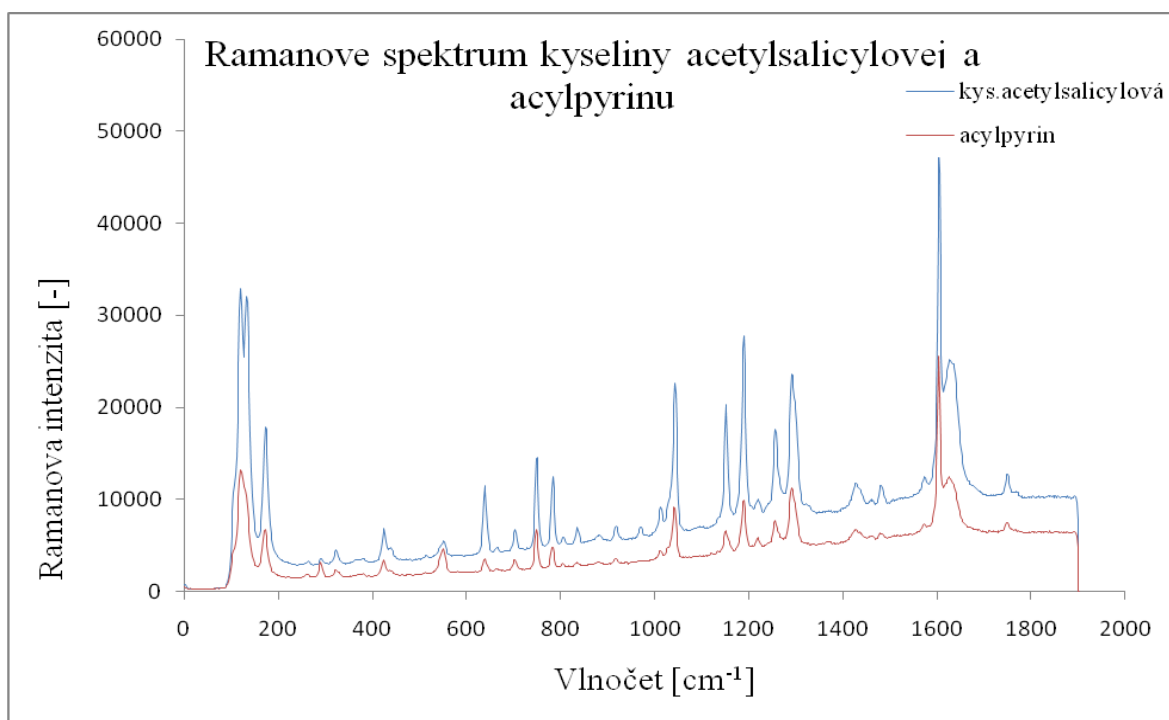
Obr. 15. Príklad výsledku porovnávania pozorovaného spektra (červená krivka) so spektrami uloženými v knižnici

Uvedený príklad zhody nameraného spektra a referenčného spektra v databázy polymérnych látok (Obr. 15) bol najlepší výsledok porovnávania spektier pomocou nahraných knižníc. Jedná sa o pomocnú látku polyvinylpyrrolidon 30, ktorá je obsiahnutá v tabletke Paralen®, známy pod komerčným názvom Povidón 30.

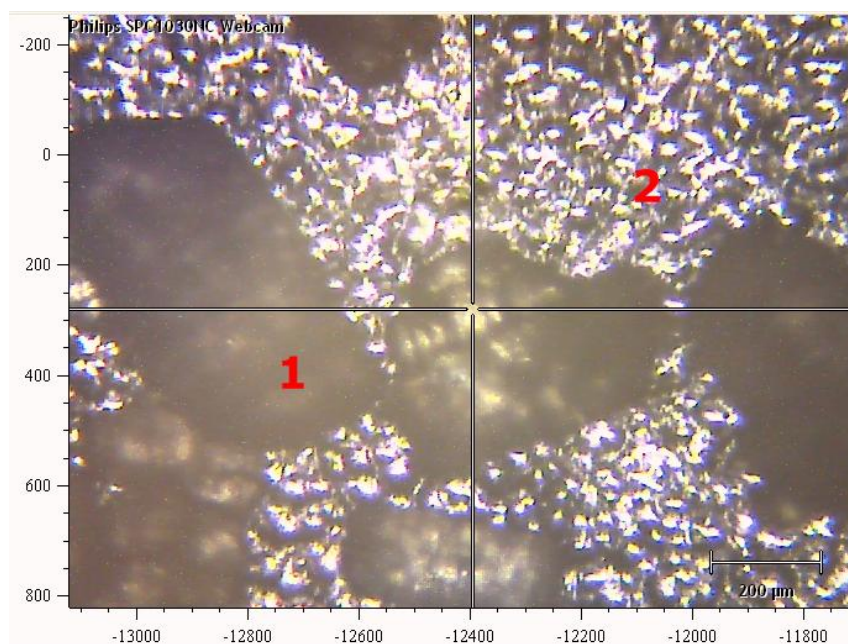
Na obrázku, ktorý je prezentovaný v tejto práci (Obr. 16) je možné vidieť, že na Ramanovom spektre tabletky Acylpyrin® sa prejavujú píky v rovnakých oblastiach vlnočtov ako u kyseliny acetylsalicylovej. Z toho môžeme usudzovať, že pomocné látky obsiahnuté v tabletke nevykazujú tak výrazné spektrum, ktoré by sa prejavili v spektre tabletky.

Výhodou Ramanovej spektroskopie je to, že molekuly vody sú v tejto oblasti vlnočtov neviditeľné, to znamená, že sme schopný merať spektra vzoriek na vzduchu aj pod vodnou hladinou alebo vo forme vodného roztoku. Na nižšie uvedenom obrázku (Obr. 18) vidíme porovnanie dvoch spektier kyseliny acetylsalicylovej meraných pri odlišných podmienkach

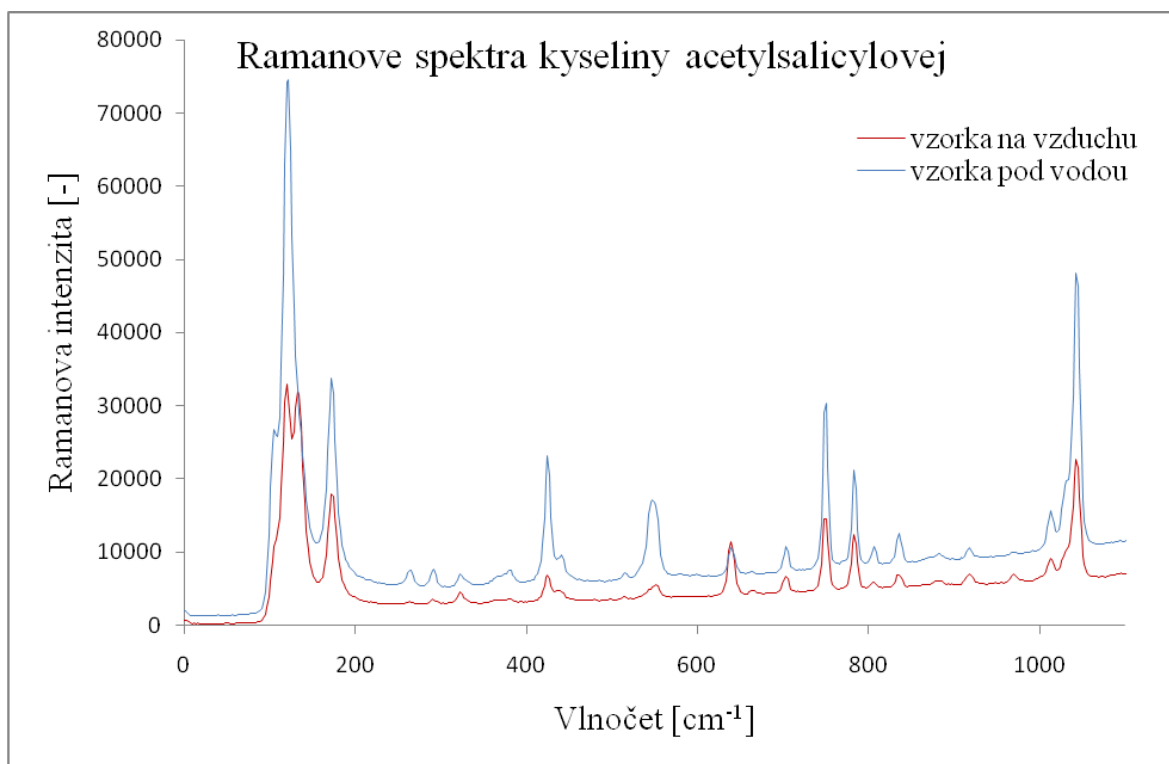
(bez/za přítomnosti vody). Rozdíl je jen v Ramanově intenzitě odezvy molekuly avšak poloha píků nie je výrazne odlišná.



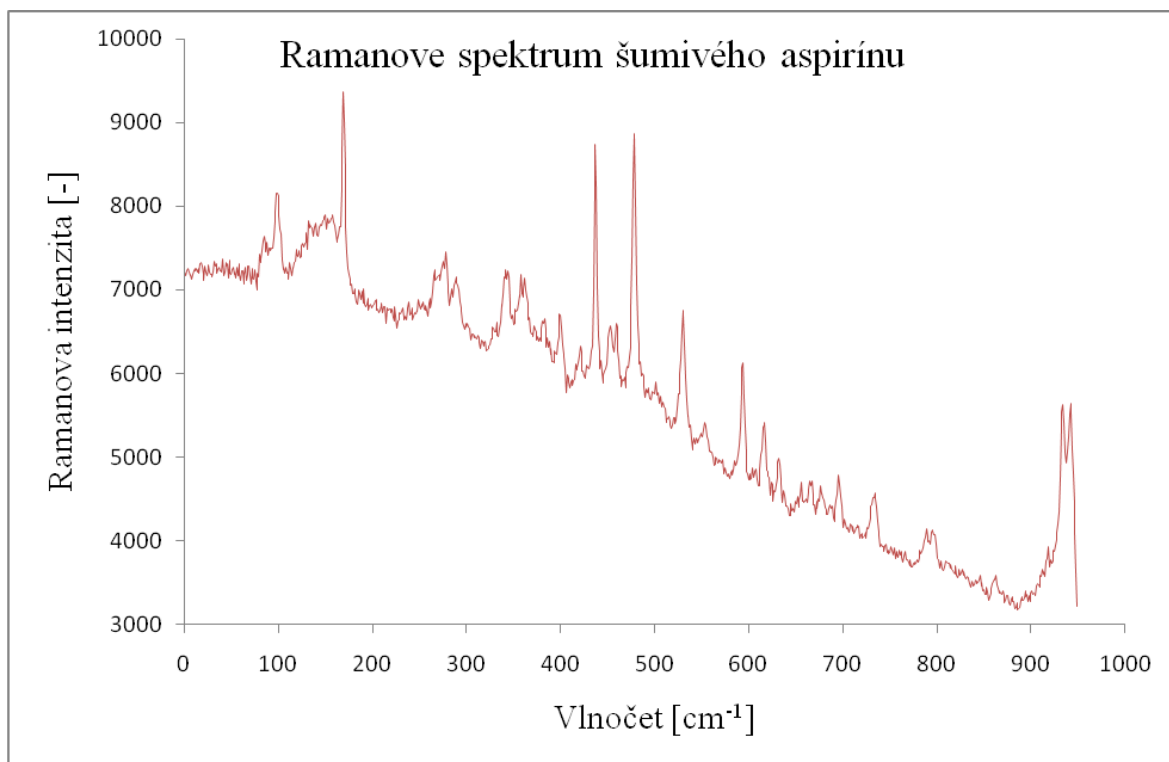
Obr. 16. Porovnanie výsledných spektier tablety Acylpyrinu<sup>®</sup> a čistej kyseliny acetylsalicylovej



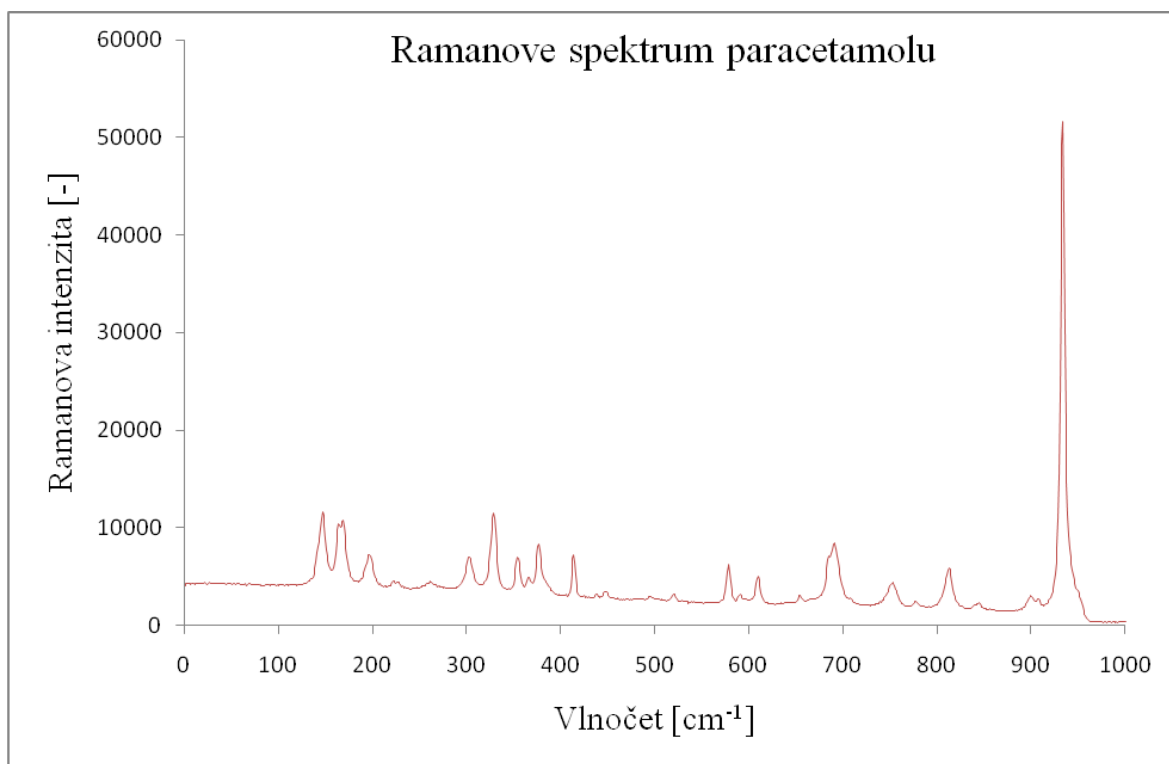
Obr. 17. Kryštály kyseliny acetylsalicylovej vo vode snímané kamerou Ramanovho mikroskopu. 1- kryštál, 2 – destilovaná voda



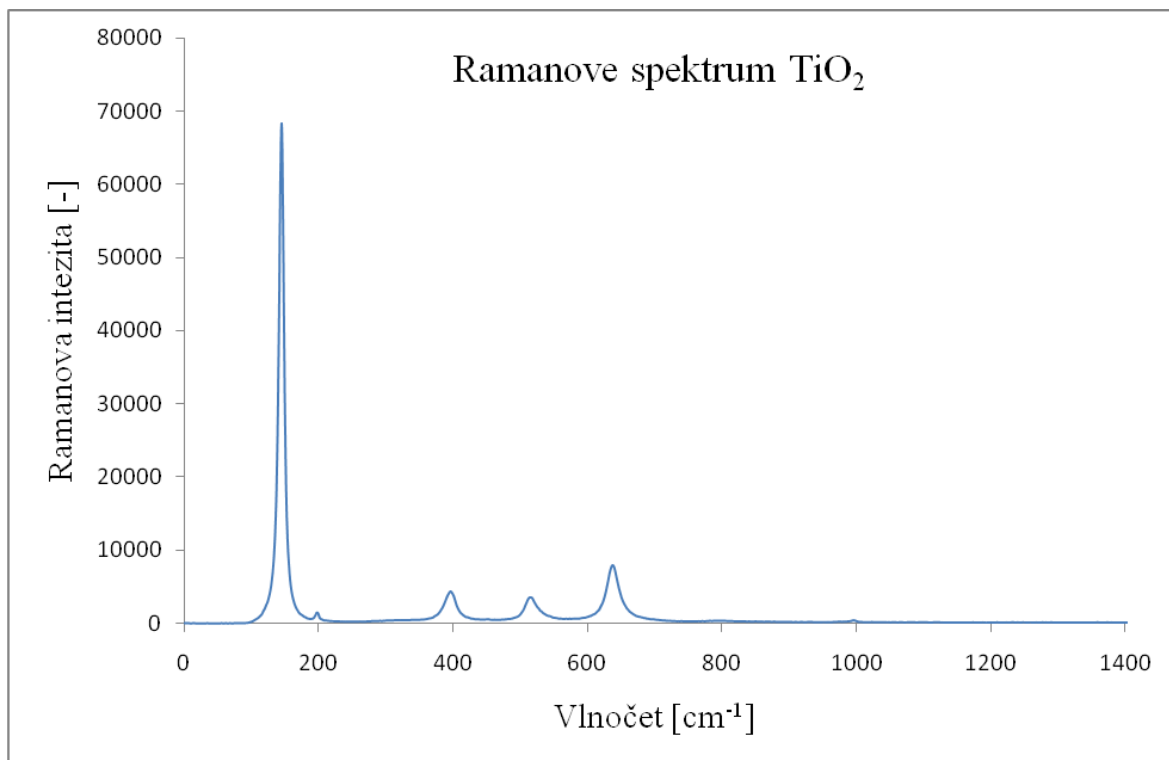
Obr. 18. Porovnanie spektier kyseliny acetylsalicylovej meraných na vzduchu a vo vode



Obr. 19. Ramanove spektrum tablety Aspirinu<sup>®</sup>-C



Obr. 20. Ramanove spektrum paracetamolu obsiahnutého v tablete Paralenu<sup>®</sup>

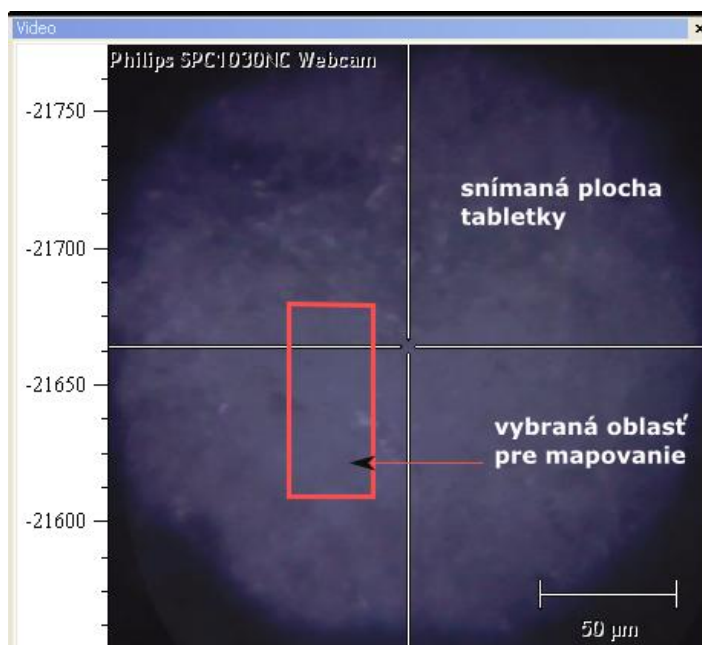


Obr. 21. Ramanove spektrum anorganickej látky – oxidu titaničitého

### 5.3 Mapovanie polymorfných vzoriek

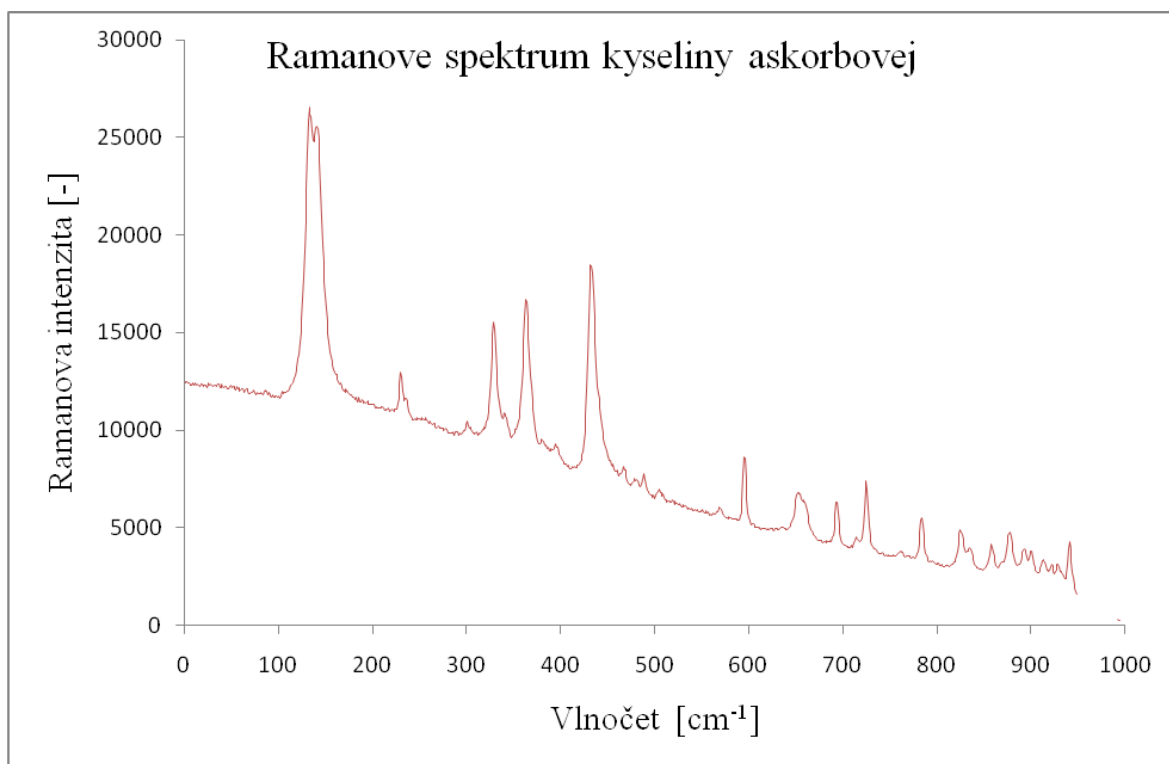
Funkcia mapovania umožňuje užívateľovi analyzovať vzorku, ktorá je zložená z viacerých zložiek. V našej práci sme zvolili tabletu Aspirin®-C. Výsledkom je grafické znázornenie rozloženia jednotlivých zložiek v systéme. Postup merania je popísaný v nasledujúcich bodoch.

1. Tabletku upevníme do držiaka mikroskopu a pomocou optiky mikroskopu zaostříme na povrch tablety a vyberieme oblasť, ktorú chceme mapovať (Obr. 22).

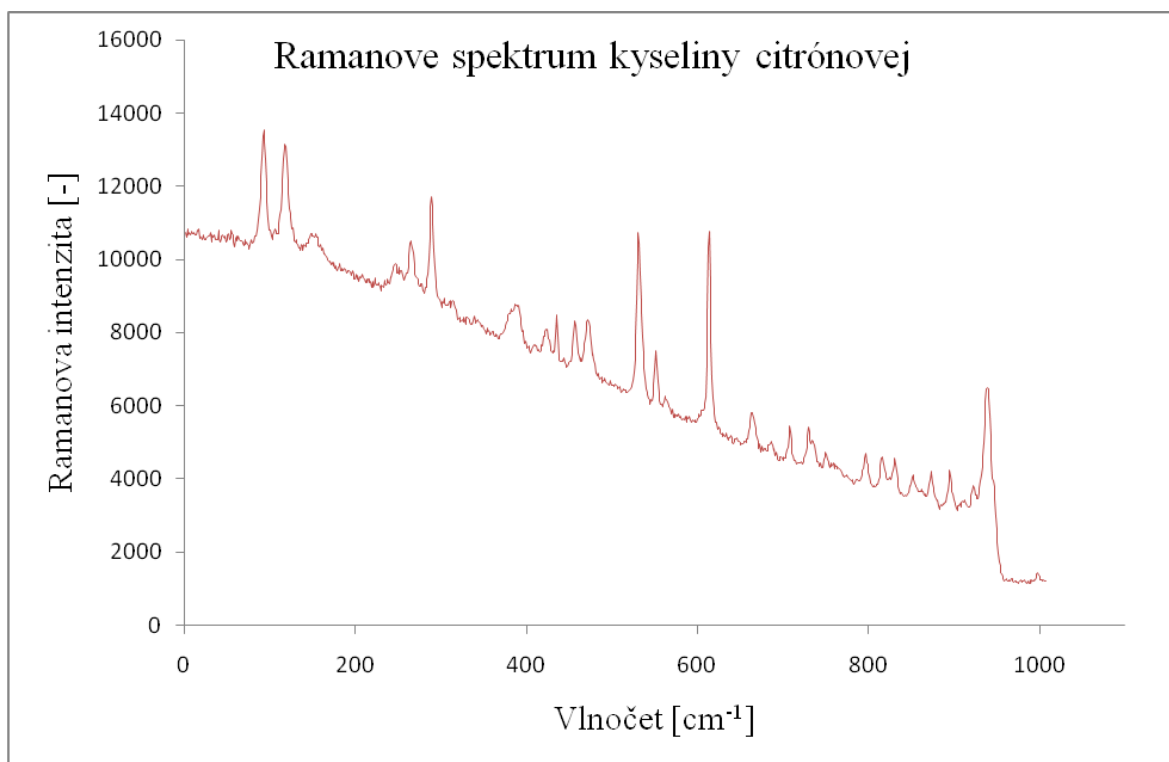


Obr. 22. Výber plochy k analýze zloženia mapovaním

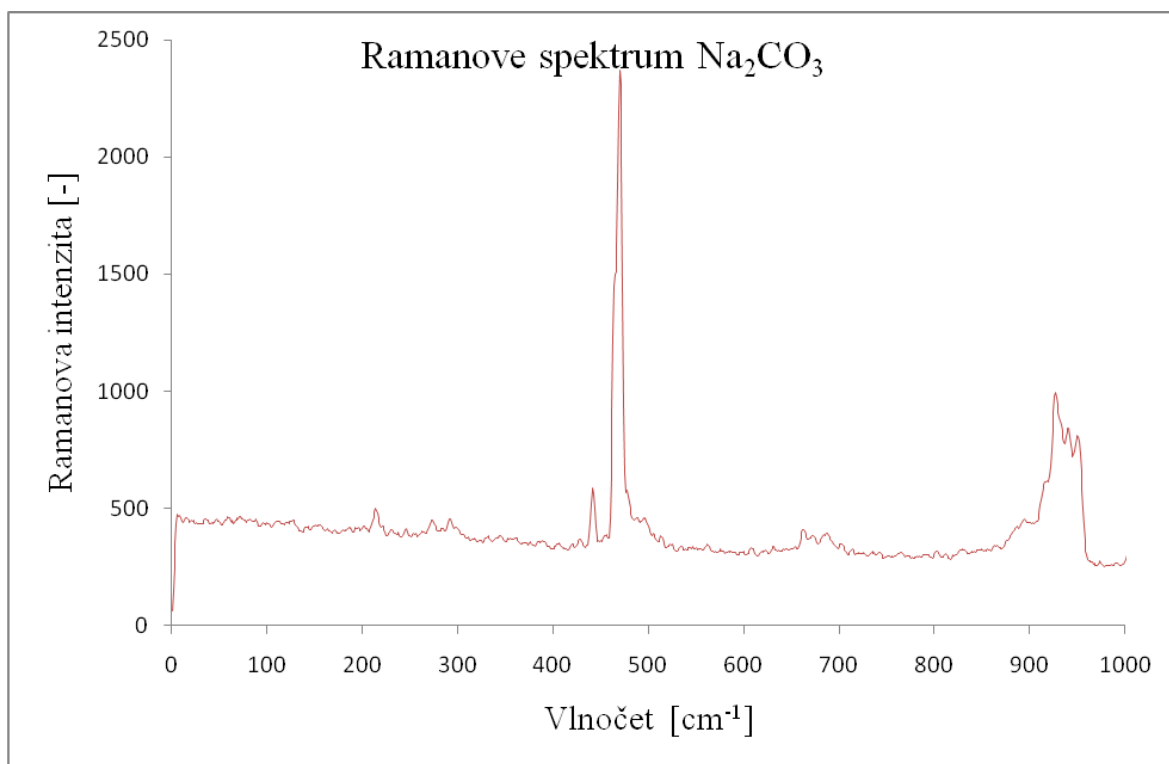
2. K mapovaniu je nutné poznať zloženie tabletky a disponovať spektrami zložiek v čistom stave. Tieto spektrá nahráme ako referenčné a laser postupne prechádza jednotlivými plochami – na ktoré sme pri nastavovaní rozdelili analyzovanú oblasť – a vyhodnocuje zhodu s referenčnými spektrami (Obr. 23 - Obr. 26 a Obr. 40).



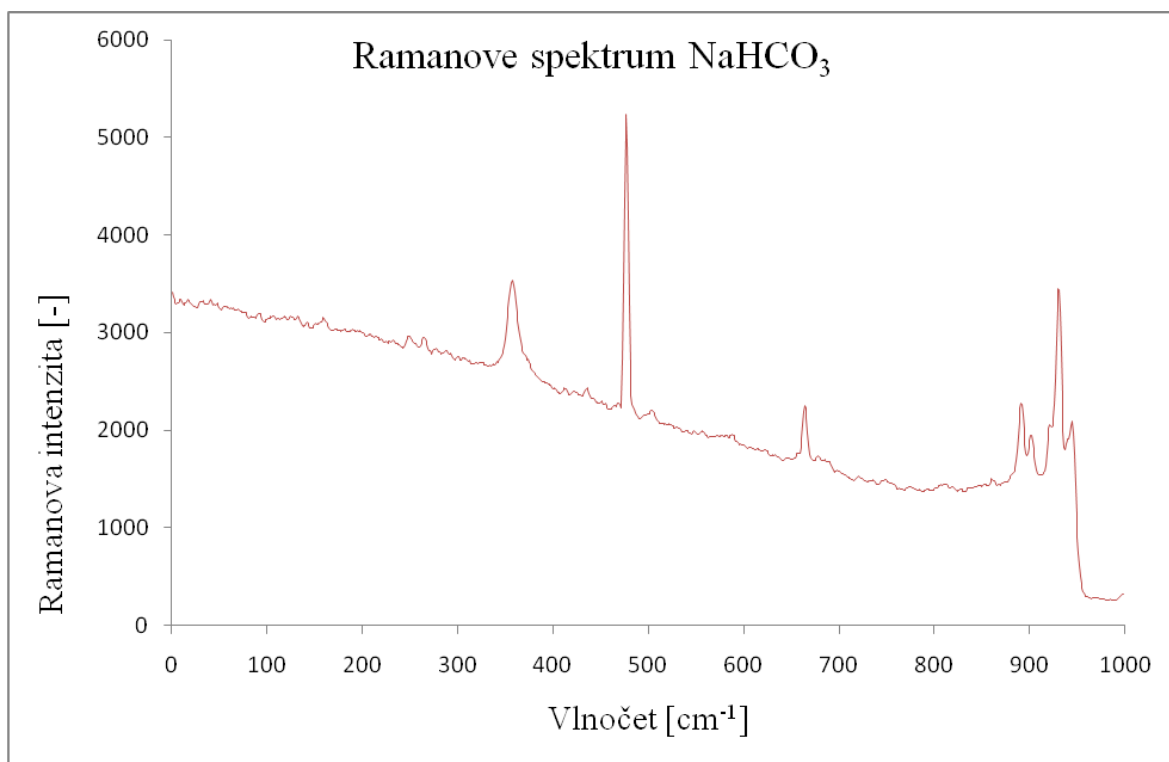
Obr. 23. Referenčné spektrum kyseliny askorbovej



Obr. 24. Referenčné spektrum kyseliny citrónovej

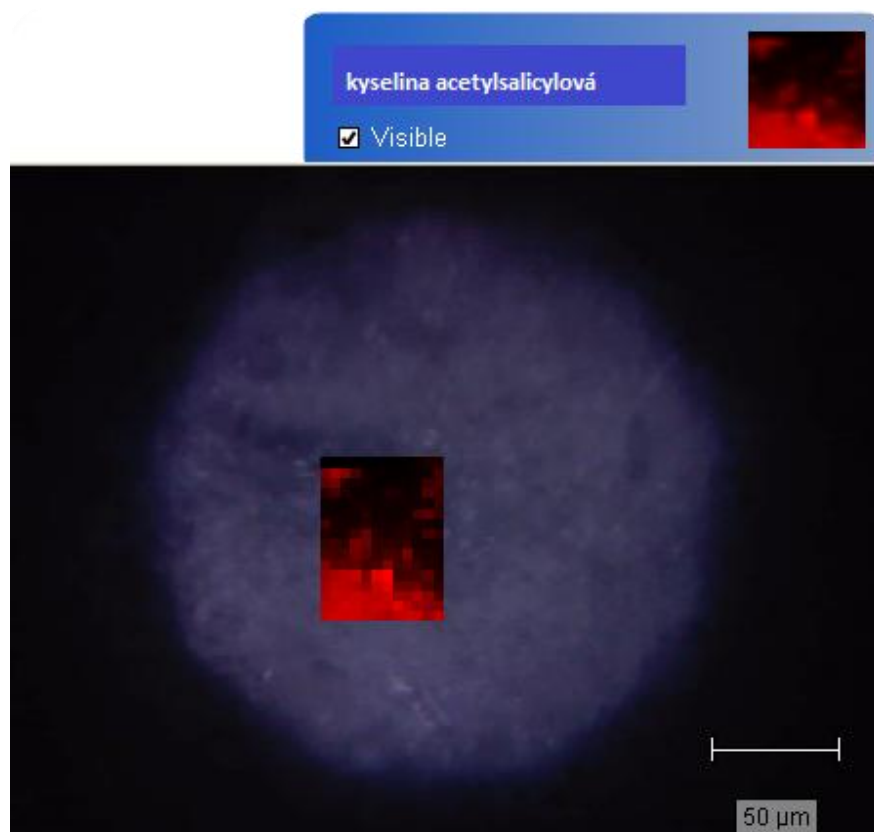


Obr. 25. Referenčné spektrum uhličitanu sodného

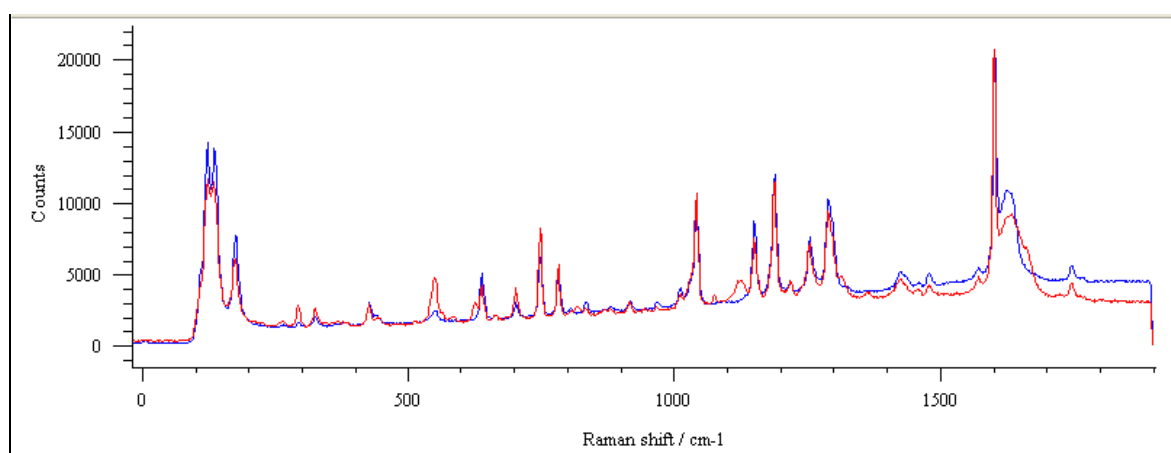


Obr. 26. Referenčné spektrum hydrogén uhličitanu sodného

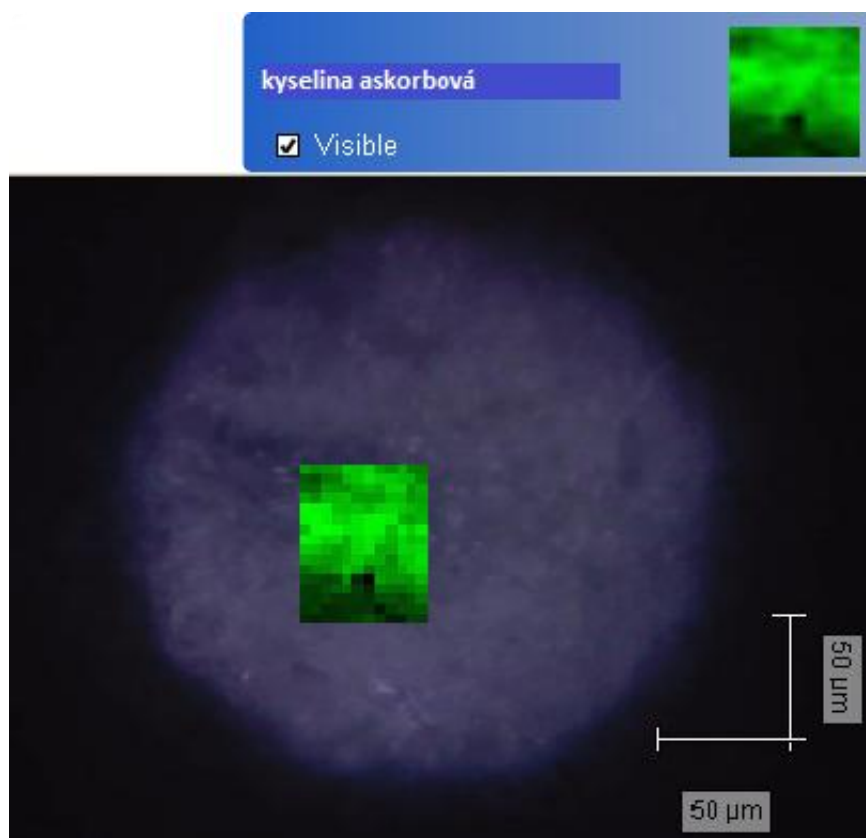
3. Výsledná mapa poskytuje informace o zastúpení každej zložky naprieč skúmanou oblasťou tabletky. Tieto informácie sú zobrazované pomocou farebnej škály. Každéj látke je priradená farba a jej odtiene odrážajú percentuálnu zhodu referenčného spektra s nameraným spektrom tablety v mieste snímania.



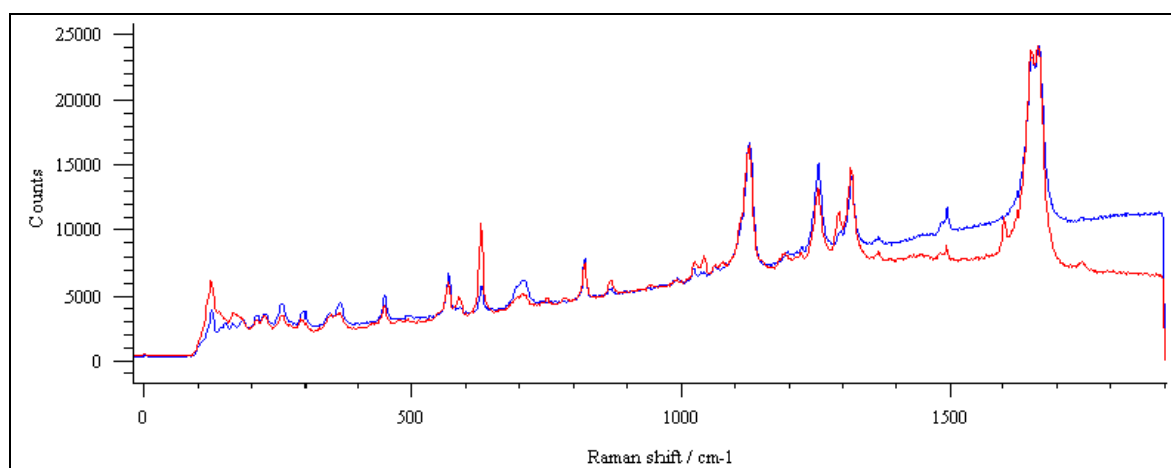
Obr. 27. Rozloženie kyseliny acetylsalicylovej v mapovanej oblasti tabletky Aspirin®-C



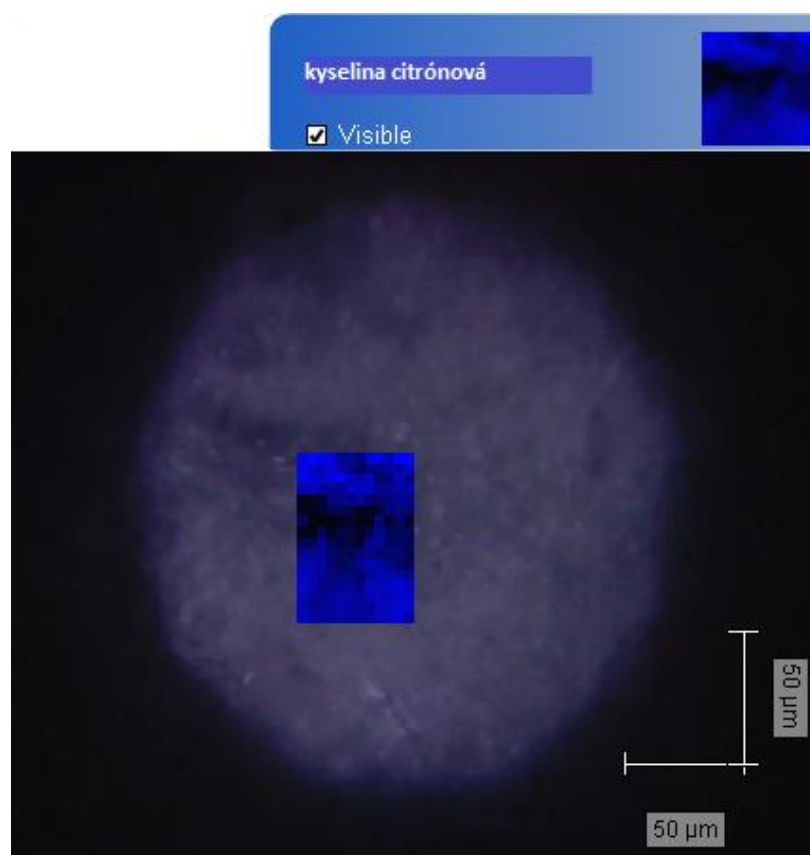
Obr. 28. Porovnanie referenčného spektra kys. acetylsalicylovej(modrá krivka) a spektra tabletky v mieste najväčšej zhody (červená krivka)



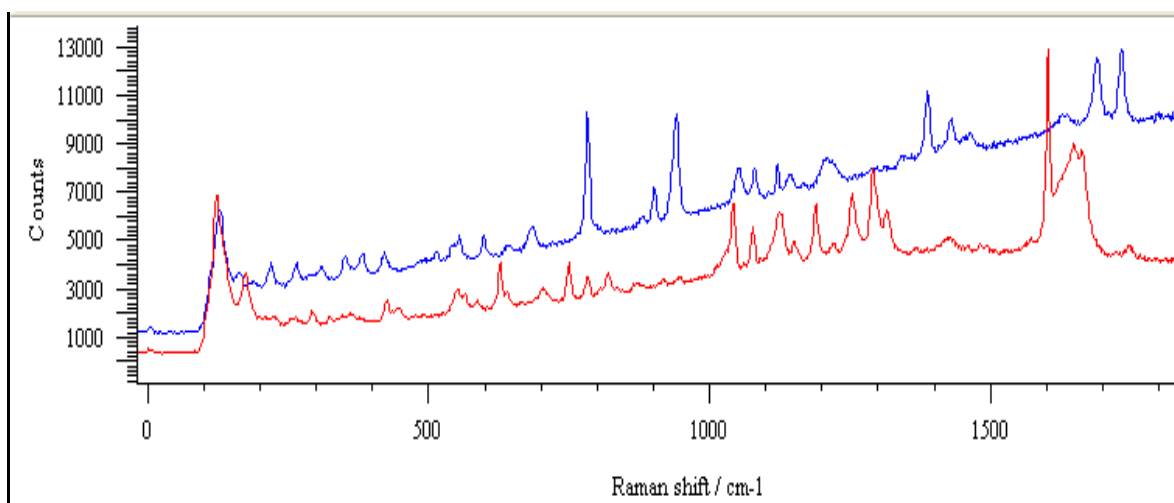
Obr. 29. Rozloženie kyseliny askorbovej v mapovanej oblasti tabletky Aspirin®-C



Obr. 30. Porovnanie referenčného spektra kys. askorbovej (modrá krivka) a spektra tabletky v mieste najväčšej zhody (červená krivka)

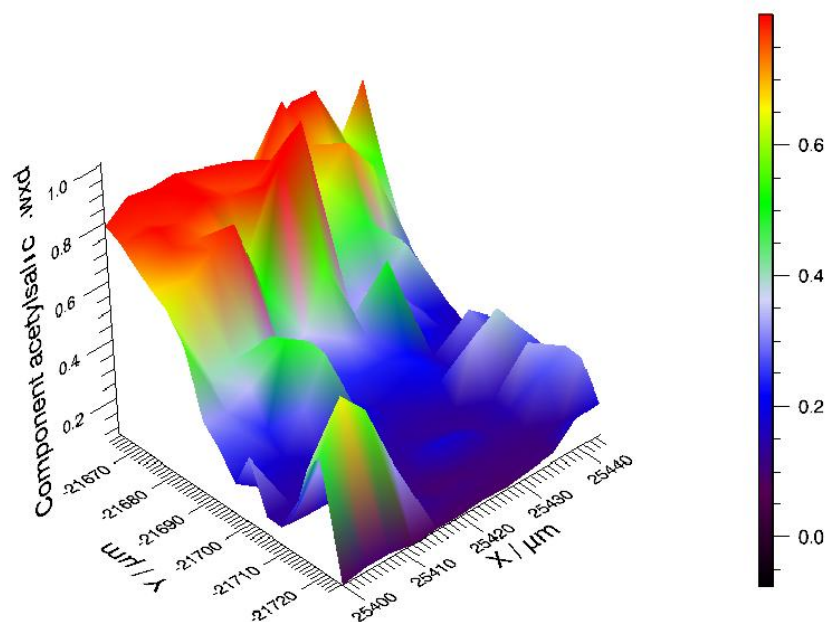


Obr. 31. Rozloženie kyseliny citrónovej v mapovanej oblasti tabletky Aspirin®-C

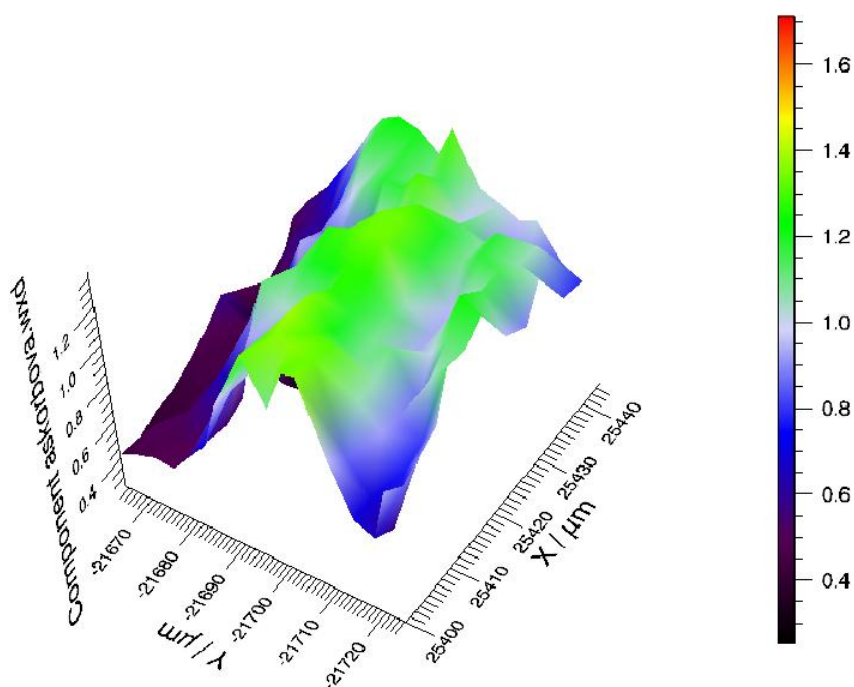


Obr. 32. Porovnanie referenčného spektra kys. citrónovej (modrá krivka) a spektra tabletky v mieste najväčšej zhody (červená krivka)

4. Výsledky môžu byť prezentované farebnou mapou v 2D, 3D grafom a tiež dvojicou spektier, ktoré znázorňujú referenčné spektrum a spektrum tablety v snímanej oblasti.



Obr. 33. Grafické 3D- znázornenie zastúpenia kyseliny acetylsalicylovej v analyzovanej oblasti



Obr. 34. Grafické 3D- znázornenie zastúpenia kyseliny askorbovej v analyzovanej oblasti

5. Aspekty, ktoré majú vplyv na výsledky mapovania:

- čistota jednotlivých zložiek tzn. kvalita nameraných referenčných spektier;
- rozmery siete – analyzovaná oblasť je rozdelená na mriežku, pričom čím je väčšia hustota mriežky, tým presnejšie výsledky získame;
- čas potrebný k analýze je závislý na veľkosti plochy a hustote mriežky, tzn. čím je mriežka hustejšia, tým si vyžaduje meranie viac času;
- výkon laseru, počet scanov – akumulácii a expozičný čas, zároveň by malo byť meranie realizované pri rovnakých podmienkach aké boli nastavené pri meraní referenčných spektier.

## 6 POROVNANIE RAMANOVEJ A FTIR SPEKTROSKOPIE

Ramanova spektroskopia je podobná spektroskopii infračervenej (IR alebo FT-IR) použitím obidvoch získame informácie o vibráciách molekúl. Avšak vzhľadom na rozdielne výberové pravidlá u každej techniky sa navzájom dopĺňujú. Citlivosť funkčných skupín je rozdielna a preto v oblastiach, kde Ramanova spektroskopia vykazuje silné píky, sa pri použití IR spektroskopie prejavujú slabé a naopak. Ramanova spektroskopia je citlivá k symetrickým vibráciám a k násobným väzbám. Zmena polarizovateľnosti väzby počas vibrácie je nevyhnutná pre aktiváciu Ramanovho zväzku. Preto funkčné skupiny ako  $C=C$  alebo  $C-C$  vykazujú silné píky a plne symetrické vibrácie aromatických zlúčenín sú ľahko pozorovateľné. IR spektroskopia vyžaduje zmenu dipólového momentu počas absorpcie, aby boli vibrácie aktívne. Väčší dôraz sa kladie na relatívnu elektronegativitu atómov nachádzajúcich sa vo vnútri funkčnej skupiny. Z tohto dôvodu sú ľahko pozorovateľné polárne skupiny ako halogénové deriváty uhlíku alebo väzby  $C=O$ . [20]

Vzorku kyseliny acetylsalicylovej sme analyzovali pomocou spektroskopickej metódy merania IČ spektier. Meranie prebiehalo na prístroji FTIR-86001 PC od firmy Shimadzu (Obr. 35). Prístroj je vybavený vyhodnocovacou technikou Fourierovej transformácie a disponuje možnosťami kvalitatívnej aj kvantitatívnej analýzy. Pre účely tejto práce bolo zvolené kvalitatívne vyhodnotenie vybranej vzorky.



Obr. 35. Prístroj FTIR-86001 PC od firmy Shimadzu

## 6.1 FTIR spektroskopia kyseliny acetylsalicylovej

Pri meraní IČ spektier je možné pracovať dvomi spôsobmi:

- ATR – spektrálna analýza tenkých filmov,
- KBr technika – spektrálna analýza práškových vzoriek.

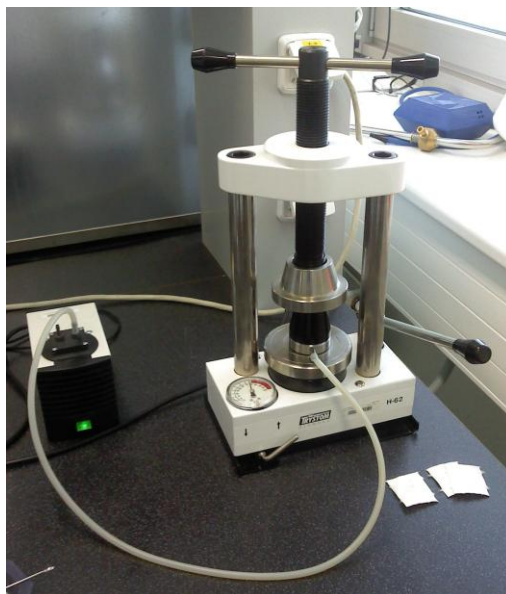
V našom prípade sme použili techniku KBr. Táto metóda je používaná pri meraní vzoriek v práškovej forme pričom bromid draselný - KBr vystupuje ako matrica v tablete. Postup merania je nasledovný:

1. Pred začiatkom merania je nutné vysušiť vzorky a rovnako aj KBr.
2. V achátovej miske (Obr. 36) rozotrieme matricu KBr na jemný prášok a pridáme v pomere 1:10 prípadne 1:100 vzorku. Následne zmes v achátovej miske homogenizujeme.



Obr. 36. Achátová miska s KBr

3. Prášok vložíme do špeciálneho lisu (Obr. 37), ktorým zlisujeme vzorku do formy tablety.
4. Lisovanie prebieha vo vákuu z dôvodu eliminácie vzdušnej vlhkosti. Ďalej je v lise nastavený tlak na 75kPa.



*Obr. 37. Zapojený lis na tabletovanie vzoriek*

5. Po uplynutí dostatočnej doby (cca.4-5min.) odpojíme vákuum, vypneme lis a vyberieme opatrne tabletu. Ak bolo tabletovanie úspešné, KBr by malo byť priehľadné a viditeľné by mali byť len častice analyzovanej vzorky.
6. Tabletku uchytíme do nosnej doštičky.



*Obr. 38. Nosná doštička s tabletkou KBr*

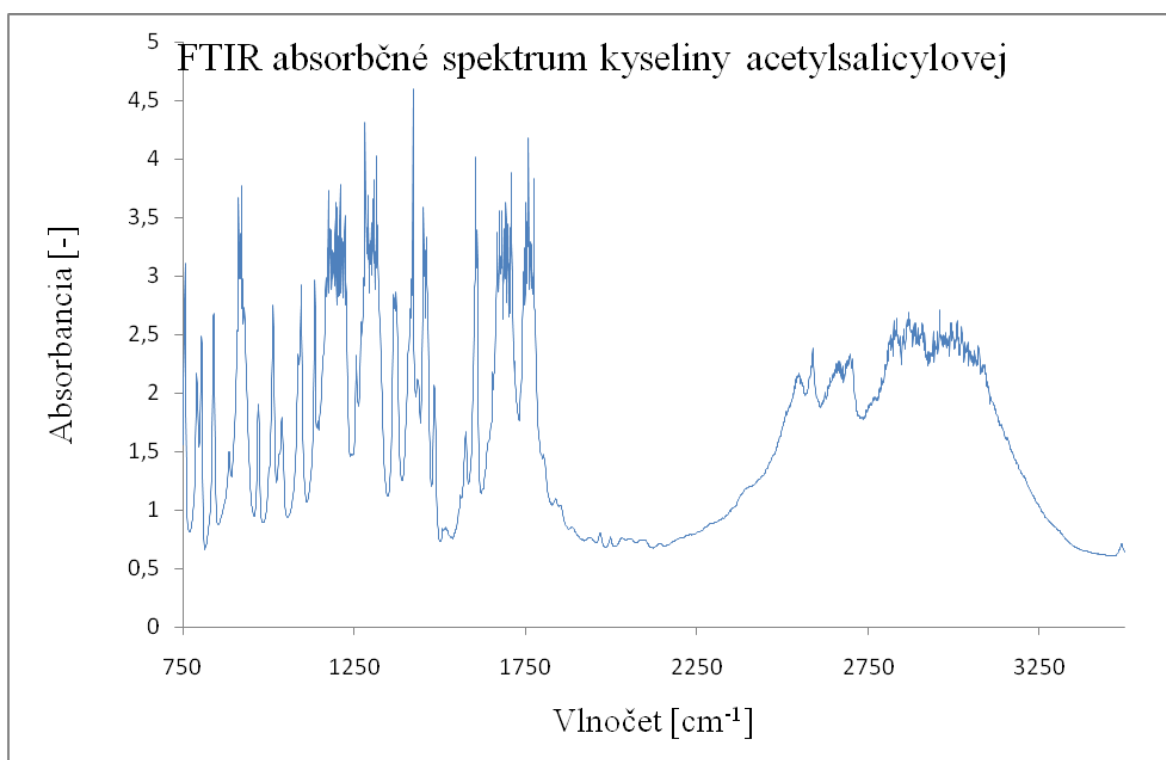
7. Počas doby lisovania je potrebné zmerať pozadie tzn. odmerať spektrum bez vzorky v komore – vlhkosť v miestnosti, prítomnosť prachových častíc atd. Na rozdiel od Ramanovej spektroskopie nie je voda v IR spektroskopii neviditeľná a prejavuje sa v spektre ako skupina píkov v oblasti  $3000\text{ cm}^{-1}$ .

8. Nastavenie parametrov merania sme zvolili tak, ako vidíme v tabuľke (Tab. 4):

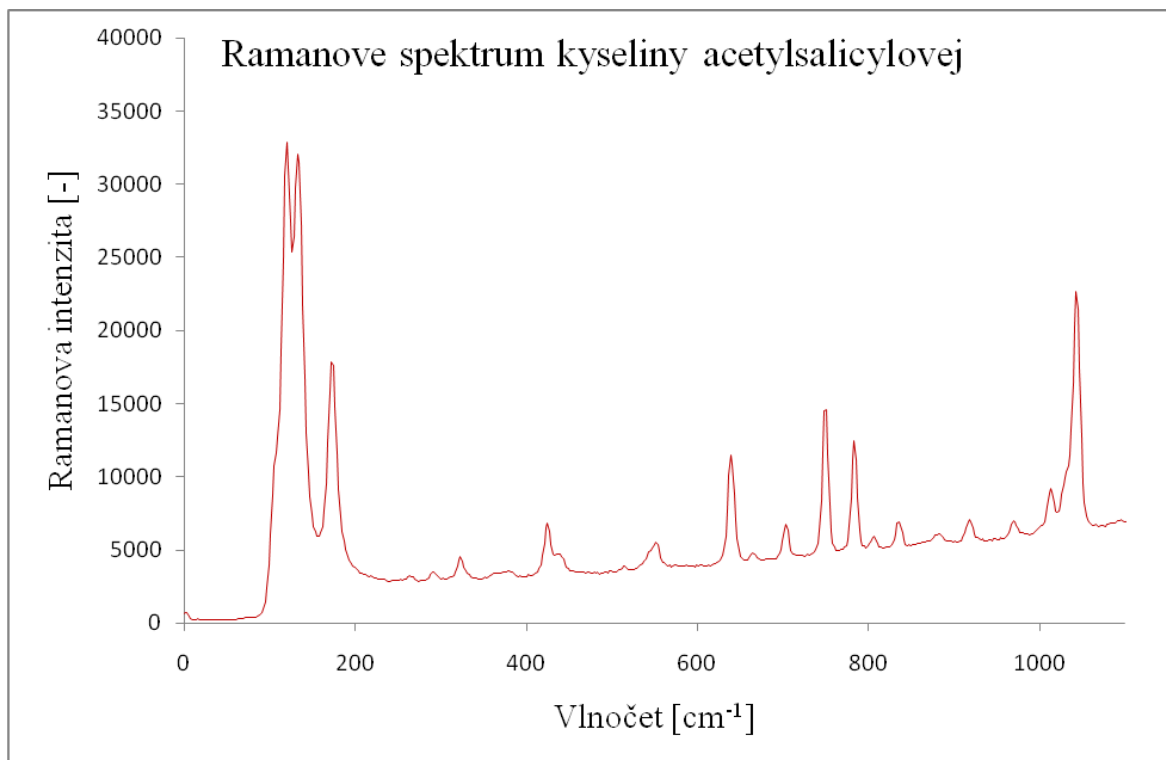
Vlnočť [cm <sup>-1</sup> ]:	750 - 3500
Počet scanov:	88
Rozlíšenie:	2

Tab. 4. Nastavenie parametrov FTIR spektroskopu

9. Vzorku uchytíme do komory spektrometru a uzavrieme. Po meraní vynesieme do grafu závislosť absorpcie na vlnočte. Výsledné absorpčné spektrum vidíme na obrázku (Obr. 39.). Pre porovnanie vidíme Ramanove spektrum na ďalšom grafe (Obr. 40)



Obr. 39. Priebeh absorpčného spektra FTIR tabletovej kyseliny acetylsalicylovej merané KBr technikou



Obr. 40. Spektrum kyseliny acetylsalicylovej meranej Ramanovým mikroskopom

Z praktických meraní je zrejmé, že Ramanova spektroskopia má oproti FTIR spektroskopii dve významné prednosti:

1. Ramanova spektroskopia nevyžaduje zložitú a precíznu prípravu vzoriek ako FTIR spektroskopia. Tým pádom je vhodnejšia aj pre menej skúseného pracovníka.
2. V Ramanovej spektroskopii nie je voda viditeľná, čiže sa v spektre neprejaví rušivé píky spôsobené okolitou vlhkosťou.

FTIR spektroskopia je veľmi náročná metóda, ktorá si vyžaduje skúsenosti a dôslednú prácu obzvlášť vo fáze prípravy vzoriek. V prípade, že sú vzorky v práškovej forme, je nutné ich homogenizovať s KBr a z vysušenej zmesi musíme pripraviť tabletu. K tomu je potrebné disponovať prístrojovým vybavením ako bolo popísané v postupe merania: achátová miska, forma na tabletu, lis, prístroj na vytvorenie vákua počas lisovania. Výsledky okrem vzdušnej vlhkosti môže ovplyvniť aj pot prenesený z prstov pracovníka, alebo intenzívne parfúmy aplikované tesne pred prácou v laboratóriu.

Nasledujúca tabuľka (Tab. 5) sumarizuje rozdiely medzi FTIR spektroskopiou a Ramanovou spektroskopiou, ktorej je venovaná pozornosť v tejto práci.

Infračervená spektroskopia	Ramanova spektroskopia
Zložitejšia príprava vzoriek - KBr technika, ATR technika.	Špeciálna príprava vzoriek nie je potrebná.
Detekcia absorpcie vyžaduje bodové a línárne detektory citlivé v oblasti IČ napr. Ge, InGaAs, HgCdTe, ktoré potrebujú chladenie dusíkom.	Disperzný Raman využíva vysoko citlivé kremíkové detektory - 2D CCD kameru s detekčným rozsahom do 1µm. Dostupné je termoelektrické chladenie do -70°C.
Systémy FTIR sú k dispozícii.	Systémy FT-Raman sú k dispozícii.
IČ spektroskopia je obmedzená ostrením pod 5µm.	Rozlíšenie Ramanovho mikroskopu do 1µm preto môžu byť detekované aj menšie častice.
Spektra sú ovplyvnené absorpciou vody.	Voda je v Ramanových spektrach neviditeľná, čo umožňuje meranie aj pod vodnou hladinou alebo analýzu vodných roztokov.
Je ťažké vykonávať merania na tenkých filmoch, s výnimkou absolútneho vnútorného odrazu alebo reflexnej absorpcie. Obe metódy však vyžadujú starostlivú prípravu povrchu	Merania na tenkých filmoch nie sú problematické a rovnako môžeme merať povrchové reakcie na elektródach. Použitím laseru s nízkym výkonom je minimalizované riziko zhorenia vzorky.
Problematické je získať spektrá pod 600 cm <sup>-1</sup> .	Spektrá získame v rozsahu 10 - 15,000 cm <sup>-1</sup> . Rozsah spektra závisí od excitačnej vlnovej dĺžky a je limitmi kremíkovými detektormi.
Je nutné, aby molekuly absorbovali fotóny.	Ramanove interakcie sú okamžité a rozptýl je neelastický. S najnovšími systémami môžeme sledovať rýchle reakcie.
Je problematické merať nepriehľadné a čierne vzorky.	Čierne a nepriehľadné materiály môžu byť merané.
Slabá citlivosť homopolárnych väzieb.	Homopolárne väzby vykazujú pomerne intenzívne píky.

Tab. 5. Porovnanie Ramanovej spektroskopie a infračervenej FTIR spektroskopie [15]

## 7 DISKUSIA

Táto kapitola je venovaná zhodnoteniu nameraných výsledkov. Ďalej je pojednané o súčasných trendoch v Ramanovej spektroskopii a na záver navrhujeme niekoľko aplikačných možností s ohľadom oblastí bezpečnostných technológií.

### 7.1 Zhodnotenie výsledkov praktickej časti

V experimentálnej časti tejto diplomovej práce sme sa venovali štúdiu vybraných vzoriek pomocou Ramanovej spektroskopie. Pred začiatkom samotných meraní bolo potrebné rozhodnúť s akými látkami budeme pracovať. Vzhľadom na aplikácie Ramanovej spektroskopie v oblasti identifikácie drog a liečiv boli vybrané komerčne vyrábané farmaceutické preparáty. Dôvody boli čisto pragmatické, jedná sa o lieky na voľný predaj, ktoré sú dostupné v každej lekární. Rovnako sme zohľadnili fakt, že chemické látky obsiahnuté v liekoch potrebujeme v čistej forme. Po dohode sme získali potrebné látky zo skladu chemikálií Fakulty technologickej. Boli vybrané nasledujúce liečivá: Acylpyrin<sup>®</sup>, Aspirin<sup>®</sup>-C, Paralen<sup>®</sup>. Okrem týchto látok boli použité chemické zlúčeniny: kyselina acetylsalicylová (Obr. 40), kyselina askorbová, kyselina citrónová, uhličitan sodný, hydrogén uhličitan sodný, polyvinylpyrrolidon a oxid titaničitý. Popri Ramanových spektrách spomenutých látok (Obr. 21, Obr. 23-Obr. 26), boli zmerané aj spektrá škrobu a oxidu kremičitého, tie však nemohli byť použité kvôli fluorescencii, ktorá prevládala nad Ramanovým efektom.

Na základe nameraných spektier sme overili prítomnosť účinnej látky v tabletách komerčných produktov (Obr. 16). Súčasne bolo uskutočnené meranie, ktoré dokázalo, že na Ramanove spektrum nemá zásadný vplyv prítomnosť vody, rozdiel je viditeľný na Ramanovej intenzite nie však v rozložení charakteristických pík (Obr. 18).

Porovnanie nameraných spektier so spektrami uloženými v knižniciach polymérnych látok a forenzných látok bolo naozaj úspešné len v prípade spektra polyvinylpyrrolidonu, ktorý je súčasťou tabliet Paralenu<sup>®</sup>. Nevýhodou knižníc je fakt, že užívateľ si nemôže sám pozrieť aké spektrá sú dostupné. Pri funkcii hľadania v databáze je ponúknutý zoznam spektier, ktoré vykazujú určitú podobnosť s nameraným spektrom. Preto je dobre využiteľná funkcia tvorby vlastnej databázy spektier.

Funkcia mapovania, ktorou disponuje systém Renishaw bola využitá v praktickej štúdií zloženia tablety Aspirin®-C. V tabletke sú podľa informácií od výrobcu prítomné 2 účinné látky: kyselina acetylsalicylová a kyselina askorbová a 4 pomocné látky. Spektrá každej chemikálie tvoriacej komponenty tabletky boli nasnímané, uložené a použité ako referenčné pre analýzu. Mapovanie polymorfných vzoriek považujeme za veľmi užitočnú funkciu, ktorá umožňuje zistiť zastúpenie jednotlivých zložiek v zvolenej oblasti. Výsledky sú ovplyvnené kvalitou referenčných spektier a zvolenými parametrami merania. Čím hustejšiu mriežku mapovanej oblasti zvolíme, tým sú získané informácie presnejšie. Tento typ merania vyžaduje dostatok času a trpezlivosti pri voľbe nastavení. Údaje získané mapovaním tabletky (Obr. 27-Obr. 31) boli graficky upravené a v tejto práci sú publikované výsledné rozloženia 3 najviac zastúpených zložiek. Výhodou softwarového vybavenia je možnosť interpretácie výsledkov formou 2D, 3D grafu alebo porovnaním dvojice spektier.

Súbor experimentov prezentovaných v praktickej časti tejto diplomovej práce uzatvára meranie absorpčného spektra kyseliny acetylsalicylovej metódou FTIR. Táto metóda bola zahrnutá z dôvodu porovnania s Ramanovou spektroskopiou (Obr. 39-Obr. 40). Rozdielne výberové pravidlá pre obidve metódy v praxi predstavujú možnosť vzájomnej kombinácie týchto techník s dosiahnutím kvalitných výsledkov.

Zhodnotením výsledkov meraní sme dospeli k záveru, že Ramanova spektroskopia predstavuje veľmi perspektívnu metódu identifikácie látok s nasledujúcimi výhodami:

- jedná sa o nedeštrukčnú a nekontaktnú metódu;
- nevyžaduje špeciálnu prípravu vzoriek, tzn. nedôjde k poškodeniu dôkazov;
- analýza vzoriek môže byť uskutočnená cez plastový alebo sklenený obal, čo zabráni kontaktu s neznámou látkou alebo jej kontaminácii;
- rovnako je možné analyzovať vodné roztoky, voda nie je viditeľná v Ramanovom spektre;
- študované vzorky môžu byť malých rozmerov ( $1\mu\text{m}$  -  $2\mu\text{m}$ );
- nízke frekvenčné posuny anorganických molekúl sa v spektrách prejavajú, takže Ramanova spektroskopia umožňuje štúdium napr. úlomkov náterov.

## 7.2 Trendy v Ramanovej spektroskopii

Nárast významu Ramanovej spektroskopie v súčasnej dobe ovplyvňujú tieto faktory:

- neustály rozvoj v technológiách a prístrojovom vybavení Ramanovej spektroskopie;
- možnosti analýzy molekúl a materiálov na nano-úrovni;
- progres vo výrobe a následnej kontrole nanomateriálov a nanoštruktúr;
- vývoj sofistikovanejších systémov po funkčnej aj dizajnovej stránke;
- zvyšovanie efektivity snímania v biomedicíne a diagnostike chorôb;
- rastúci počet publikovaných štúdií pevných aj kvapalných látok;
- možnosti využitia v teréne mimo laboratórium ako napr. skúmanie umeleckých diel, archeologických nálezov, identifikácia látok vo forenzných vedách a farmácii a to s využitím prenosného Ramanovho analyzátoru.

Od doby objavenia v roku 1928, je dnes Ramanova spektroskopia jednou z najviac sa rozvíjajúcich metód, ktorá je charakteristická vysokou citlivosťou vysokou informačnou hodnotou získaných údajov. Poskytuje informácie o molekulovej štruktúre hmoty skúmaných vzoriek a má prakticky neobmedzený rozsah materiálov, ktoré môžu byť analyzované. [23]

Impulzy k neustálemu zdokonaľovaniu systémov prichádzajú zároveň s najnovšími poznatkami na poli mechanických, optoelektrických a kontrolných expertíz. Oproti starším systémom tie najmodernejšie disponujú možnosťami automatického nastavovania parametrov, prepínania vlnových dĺžok a kalibrácie a sú vysoko stabilné. Trendom je uspokojiť potreby užívateľa a preto sú Ramanove spektrometry kombinovateľné i ďalšími meracími prístrojmi s cieľom zefektívniť a uľahčiť prácu pri identifikácii látok. Súčasne je zdokonaľované softwarové vybavenie, ktoré poskytuje veľké množstvo funkcií medzi inými knižnice spektier. Tie sú využívané k identifikácii a porovnávaniu nameraných spektier s referenčnými. V budúcnosti predpokladáme zlepšenie dostupnosti týchto knižníc aj pre menšie laboratória. [15]

Možnosti aplikácií v bezpečnostných technológiách sú široké. V kriminalistickej expertíze sa jedná predovšetkým o identifikáciu drog a liečiv, rezíduí strelného prachu, detekciu výbušnín a analýzu náterov a pigmentov. V tejto oblasti sa naskytá priestor pre ďalší

aplikovaný výskum na FAI UTB s využitím dostupného Ramanovho mikroskopu. Zdrojom informácií ohľadne najnovších výskumov v tejto oblasti môže byť odborný časopis *Journal of Raman spectroscopy*, ktorý sa špecializuje výhradne na Ramanovu spektroskopiu. Jednou z možností ďalšej experimentálnej práce by mohlo byť vytvorenie špecifickej databázy forenzných látok: pigmenty a atramenty, liečivá, organické a anorganické zlúčeniny. Zaujímavá by mohla byť spolupráca s odborníkmi z Kriminalistického ústavu v Prahe.

## ZÁVER

Ramanova spektroskopia, ktorej aplikačné možnosti sa v posledných rokoch rozšírili takmer do všetkých odvetví vedy, výskumu a priemyslu, našla svoje miesto aj v oblasti bezpečnostných technológií. Pre efektívne využitie tejto spektrofotometrickej metódy pri identifikácii látok a analýze molekulovej štruktúry je potrebné oboznámiť sa s podstatou interakcií elektromagnetického žiarenia s hmotou.

Teoretické princípy Ramanovej spektroskopie sme aplikovali do experimentálnej časti tejto práce, kde boli študované vybrané vzorky komerčných farmaceutických preparátov. Boli zmerané spektrá liečiv obsahujúcich kyselinu acetylsalicylovú. Taktiež boli zmerané spektrá čistých chemických látok, ktoré tvorili zložky týchto liečiv, tie poslúžili ako referenčné spektrá pri mapovaní polymorfnej vzorky (tableta Aspirin<sup>®</sup>-C).

Pri práci sme potvrdili náš počiatočný predpoklad o vhodnosti Ramanovej spektroskopie pre analýzu vybraných vzoriek. Fakt, že príprava vzoriek nie je náročná na čas, podmienky v laboratóriu a ani na špeciálne prístrojové vybavenie, bude určite zohľadnený pri výbere Ramanovej spektroskopie pred inými metódami.

Široká škála funkcií Ramanovho mikroskopu dostupného v laboratóriu FAI UTB predstavuje potenciál pre ďalšiu výskumnú činnosť v oblasti identifikácie látok. Jednou z možností by mohlo byť vytvorenie vlastnej knižnice spektier látok ako sú liečivá, narkotiká, farby a pigmenty, organické ale aj anorganické zlúčeniny.

## CONCLUSION

The Raman spectroscopy has found a wide range of applications in different science areas, research, industry and security in the past years. It is essential to know the basic information about interaction between electromagnetic emission and a sample for effective use of this spectroscopic method for substance identification and molecular structure analysis.

Theoretical principals of Raman spectroscopy were applied in experimental part of this diploma, where the selected samples of pharmaceuticals were studied. The spectra of pharmaceuticals containing acidum acetylsalicylicum were measured. The spectra of pure chemicals as components of selected samples were measured as well. They have found a good use as reference spectra for polymorphic sample mapping (Aspirin<sup>®</sup>-C pill).

This work has proven our previous assumption right that Raman spectroscopy is suitable method for analysis of selected samples. In fact, this method requires almost no sample preparation which is fast and with no special requirements for equipment and laboratory conditions. In many respects Raman spectroscopy is preferred over other methods.

Wide scale of Raman microscope functions available in FAI UTB labs has potential for further research in sample identification. A spectra database of substances like pharmaceuticals, narcotics, paints and pigments and organic or inorganic compounds could be created as well.

**ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY**

- [1] HALLIDAY, David; RESNICK, Robert; WALKER, Jearl. *Fyzika /Vysokoškolská učebnice obecné fyziky*. 1.vydanie. Brno : VUTIUM, 2000. Elektromagnetické vlny, s. 890-920. ISBN 80-214-1869.
- [2] < <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/20/EM-Spektrum.svg> >  
[on-line][cit.5.5.2011].
- [3] <<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>> [on-line][cit.10.5.2011].
- [4] ATKINS, P.W. *Fyzikálna chémia : Časť 2b*. 1.vydanie. Bratislava : Vydavateľstvo STU, 1999. Spektroskopia, s. 1-42. ISBN 80-227-1238-8.
- [5] POLKOVÁ, Pavla. *1-methoxypropanol jako nový typ rozpouštědla pro nitráty celulózy*. Zlín, 2010. 74 s. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

Zdroje:

- [6] <[http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap\\_III/vibra\\_1.gif](http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap_III/vibra_1.gif) > [on-line]  
[cit.10.5.2010]
- [7] <<http://www.ptli.com/testlopedia/images/FTIR-atomic-vibrations.jpg>> [on-line]  
[cit.10.5.2010]
- [8] GÜNZLER, H.; BÖCK, H. *IR-Spektroskopie : Eine Einführung*. Weinheim : Verlag Chemie, 1975. 363 s. ISBN 3-527-21043-1.
- [9] HAKEN.WOLF.*Molekülphysik und quantenchemie*. Springer. Berlin.5.vydanie. 2006. 530s. Dostupné z WWW: <http://books.google.com/>
- [10] MOORE, Walter J. *Fyzikální chemie*. Praha : SNTL, 1981. Spektroskopie a fotochemie, s. 740-760.
- [11] KOVÁČ, Štefan ; LEŠKO, Ján. *Spektrálne metódy v organickej chémii*. 1. Bratislava : ALFA, 1980. 486 s.
- [12] KALOUS, Vítěz . *Jak moderní chemie zkoumá strukturu molekul*. Praha : SNTL, 1983. Absorpce elektromagnetického záření, s. 14-17.

- [13] HORÁK, Milan; PAPOUŠEK, Dušan. *Infračervená spektra a struktura molekul : Použití vibrační spektroskopie při určování struktury molekul*. 1.vydání. Praha : Academia, 1976. 840 s. ISBN 509-21-857.
- [14] SIESLER, H.W.; HOLLAND-MORITZ, K. *Infrared and Raman Spectroscopy of Polymers*. New York : Marcel Dekker, Inc., 1980. 389 s. ISBN 0-8247-6935-X.
- [15] PITT, G.D., et al. *Engineering aspects and applications of the new Raman instrumentation*. IEE Proc.-Sci.Meas.Technol.. November 2005, Vol.152, s. 241-318.
- [16] STRAUS, Jiří; VAVERA, František. *Slovník kriminalistických pojmů a osobností*. Plzeň : Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2010. 349 s. ISBN 978-80-7380-258-5.
- [17] STRAUS, Jiří. *Kriminalistická technika*. 2., rozš. vyd. Plzeň : Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2008. 431 s. ISBN 978-80-7380-052-9
- [18] PORADA, Viktor. *Kriminalistika*. Brno : CERM, 2001. 746 s. ISBN 8072041940.
- [19] *Ramanův mikroskop inVia* <<http://www.renishaw.cz/cs/ramanuv-mikroskop-invia-6260>> [on-line] [cit.10.5.2011].
- [20] *Raman and FT-IR analysis of a forensic paint chip sample*. SPD/AN/104 Issue 1.0 September 2006. Dostupné z WWW: < [http://resources.renishaw.com/en/details/download\(10069\)](http://resources.renishaw.com/en/details/download(10069))> [on-line][cit.26.4.2011].
- [21] <[http://sk.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_acetylsalicylová](http://sk.wikipedia.org/wiki/Kyselina_acetylsalicylová)> [on-line] [cit. 26.4.2011]
- [22] <[http://sk.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_L-askorbová](http://sk.wikipedia.org/wiki/Kyselina_L-askorbová)> [on-line] [cit. 26.4.2011]
- [23] NAFIE, Laurence A. Recent advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy.Part IV. Journal of Raman spectroscopy [on-line]. 29.10.2010, 41, [cit. 23.5.2011]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jrs.2859/full>
- [24] WiRE 3.0 TM – Renishaw Raman spectroscopy software – Training manual

**ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A ZKRATIEK**

ATR	Attenuated Total Reflection Spectroscopy
A	Absorbancia
B	Empirická rotačná konštanta
c	Rýchlosť svetla
cm <sup>-1</sup>	Jednotka vlnočtu
m	Jednotka dĺžky (rovnako ako μm, nm, mm, cm)
E	Energia fotónu
E <sub>1,2</sub>	Energia molekuly v základnom a excitovanom stave
E <sub>e</sub>	Energia elektrónového spektra
E <sub>vib</sub>	Energia vibračného spektra
E <sub>rot</sub>	Energia rotačného spektra
ε	Molárny absorpčný koeficient
f, f <sub>R</sub>	Frekvencia, Ramanova frekvencia
FTIR	Fourier Transformation Infrared Spectroscopy
h	Planckova konštanta
Hz	Jednotka frekvencie [Hertz]
I, Φ	Intenzita žiarenia, žiarivý tok
IČ, IR	Označenie pre infračervené elektromagnetické žiarenie (z angl. <i>infrared</i> )
J	Rotačné kvantové číslo
m <sub>1,2</sub>	Hmotnosť (napr. atómu)
μ	Redukovaná hmotnosť
O,Q,S	Výberové pravidlá – vety - Ramanovej spektroskopii
Pa	Jednotka tlaku [Pascal] (rovnako ako kPa)

---

$r, \Delta r$	Polomer, vzdialenosť, zmena vzdialenosti
SEM	Scanning Electron Microscopy
T	Transmitancia
UV-VIS	Označenie ultrafialovej a viditeľnej časti svetelného spektra
$\lambda$	Vlnová dĺžka
$\tilde{\nu}$	Vlnočet
$\omega$	Uhlová rýchlosť

**ZOZNAM OBRÁZKOV**

Obr. 1. Rozdelenie elektromagnetického spektra [2] .....	11
Obr. 2. Bloková schéma absorpčného spektrometra [4].....	14
Obr. 3. Blokové schéma Ramanovho spektrometra [4].....	14
Obr. 4. Mechanický model vibrácie dvojatómovej molekuly[5].....	15
Obr. 5. Vibračné energetické hladiny dvojatómovej molekuly [6] .....	16
Obr. 6. Príklady vibračných foriem pre trojatómovú molekulu [7] .....	17
Obr. 7. Energetické hladiny rotačných spektier [9] .....	19
Obr. 8. Znázornenie absorpcie svetla sústavou [5].....	20
Obr. 9. Schematické zobrazenie rozptylu svetla v Ramanovej spektroskopii[12].....	22
Obr. 10. Ramanove spektra troch častíc zvyškov strelného prachu[15].....	31
Obr. 11. Ramanov mikroskop inVia Reflex značky Renishaw[18] .....	36
Obr. 12. Štruktúrny vzorec kyseliny acetylsalicylovej[21].....	38
Obr. 13. Štruktúrny vzorec kyseliny askorbovej[22].....	39
Obr. 14. Kryštály kyseliny askorbovej snímané kamerou Ramanovho mikroskopu.....	39
Obr. 15. Príklad výsledku porovnávania pozorovaného spektra (červená krivka) so spektrami uloženými v knižnici .....	41
Obr. 16. Porovnanie výsledných spektier tablety Acylpyrinu <sup>®</sup> a čistej kyseliny acetylsalicylovej.....	42
Obr. 17. Kryštály kyseliny acetylsalicylovej vo vode snímané kamerou .....	42
Obr. 18. Porovnanie spektier kyseliny acetylsalicylovej meraných na vzduchu a vo vode .....	43
Obr. 19. Ramanove spektrum tablety Aspirinu <sup>®</sup> -C.....	43
Obr. 20. Ramanove spektrum paracetamolu obsiahnutého v tablete Paralenu <sup>®</sup> .....	44
Obr. 21. Ramanove spektrum anorganického látky – oxidu titaničitého .....	44
Obr. 22. Výber plochy k analýze zloženia mapovaním.....	45
Obr. 23. Referenčné spektrum kyseliny askorbovej.....	46
Obr. 24. Referenčné spektrum kyseliny citrónovej.....	46
Obr. 25. Referenčné spektrum uhličitanu sodného .....	47
Obr. 26. Referenčné spektrum hydrogenu uhličitanu sodného.....	47
Obr. 27. Rozloženie kyseliny acetylsalicylovej v mapovanej oblasti.....	48

Obr. 28. Porovnanie referenčného spektra kys. acetylsalicylovej(modrá krivka) a spektra tabletky v mieste najväčšej zhody (červená krivka).....	48
Obr. 29. Rozloženie kyseliny askorbovej v mapovanej oblasti.....	49
Obr. 30. Porovnanie referenčného spektra kys. askorbovej (modrá krivka) a spektra tabletky v mieste najväčšej zhody(červená krivka).....	49
Obr. 31. Rozloženie kyseliny citrónovej v mapovanej oblasti.....	50
Obr. 32. Porovnanie referenčného spektra kys. citrónovej (modrá krivka) a spektra tabletky v mieste najväčšej zhody(červená krivka).....	50
Obr. 33. Grafické 3D- znázornenie zastúpenia kyseliny acetylsalicylovej v analyzovanej oblasti .....	51
Obr. 34. Grafické 3D- znázornenie zastúpenia kyseliny askorbovej v analyzovanej oblasti.....	51
Obr. 35. Prístroj FTIR-86001 PC od firmy Shimadzu .....	53
Obr. 36. Achátová miska s KBr .....	54
Obr. 37. Zapojený lis na tabletovanie vzoriek .....	55
Obr. 38. Nosná doštička s tabletkou KBr .....	55
Obr. 39. Priebeh absorpčného spektra FTIR tabletovanej kyseliny acetylsalicylovej merané KBr technikou .....	56
Obr. 40. Spektrum kyseliny acetylsalicylovej meranej Ramanovým mikroskopom.....	57

**ZOZNAM TABULIEK**

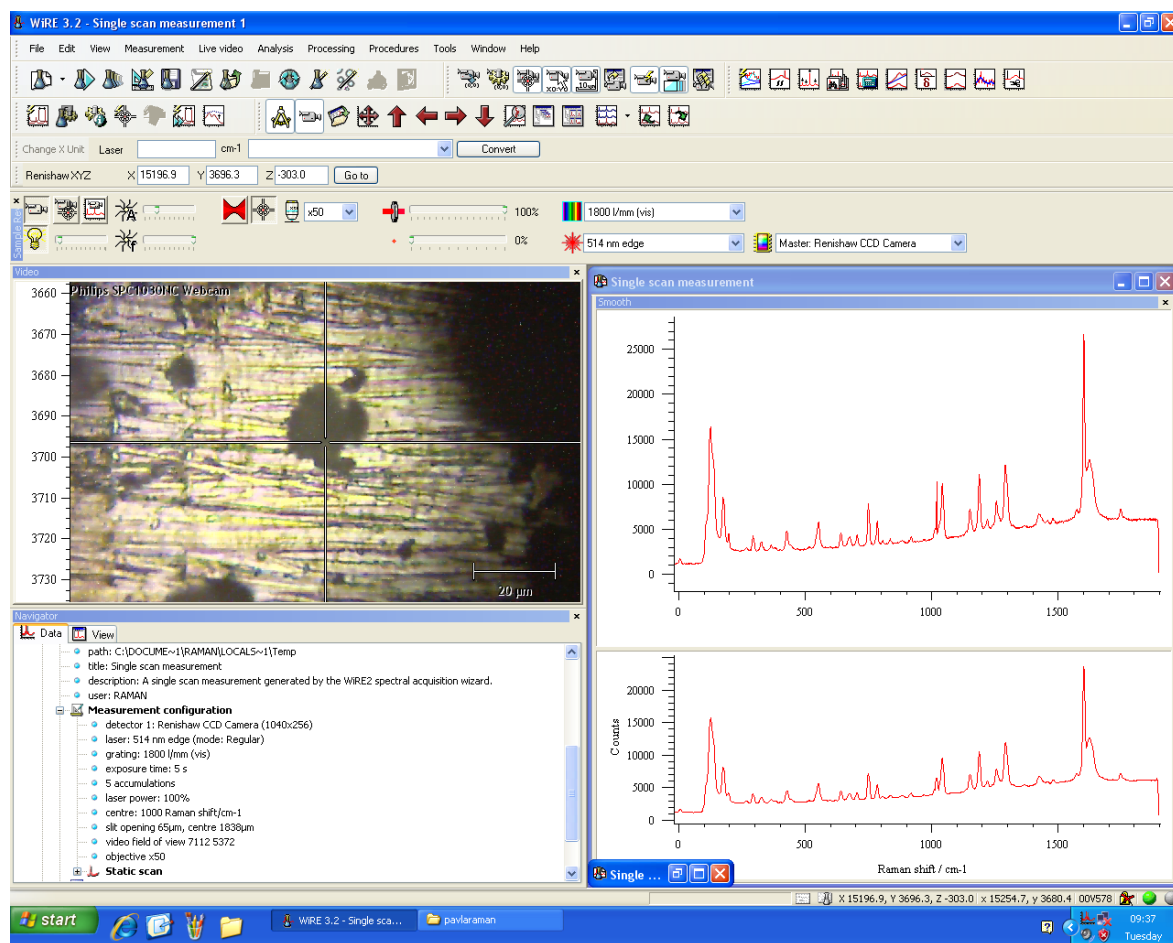
Tab. 1. Vybrané fyzikálne veličiny [5] .....	12
Tab. 2. Prehľad vzťahov a veličín používaných v spektrofotometrii [12].....	21
Tab. 3. Zloženie liekov vybraných na Ramanovu spektroskopiu .....	37
Tab. 4. Nastavenie parametrov FTIR spektroskopu.....	56
Tab. 5. Porovnanie Ramanovej spektroskopie a infračervenej FTIR spektroskopie [15] .....	58

## **ZOZNAM PRÍLOH**

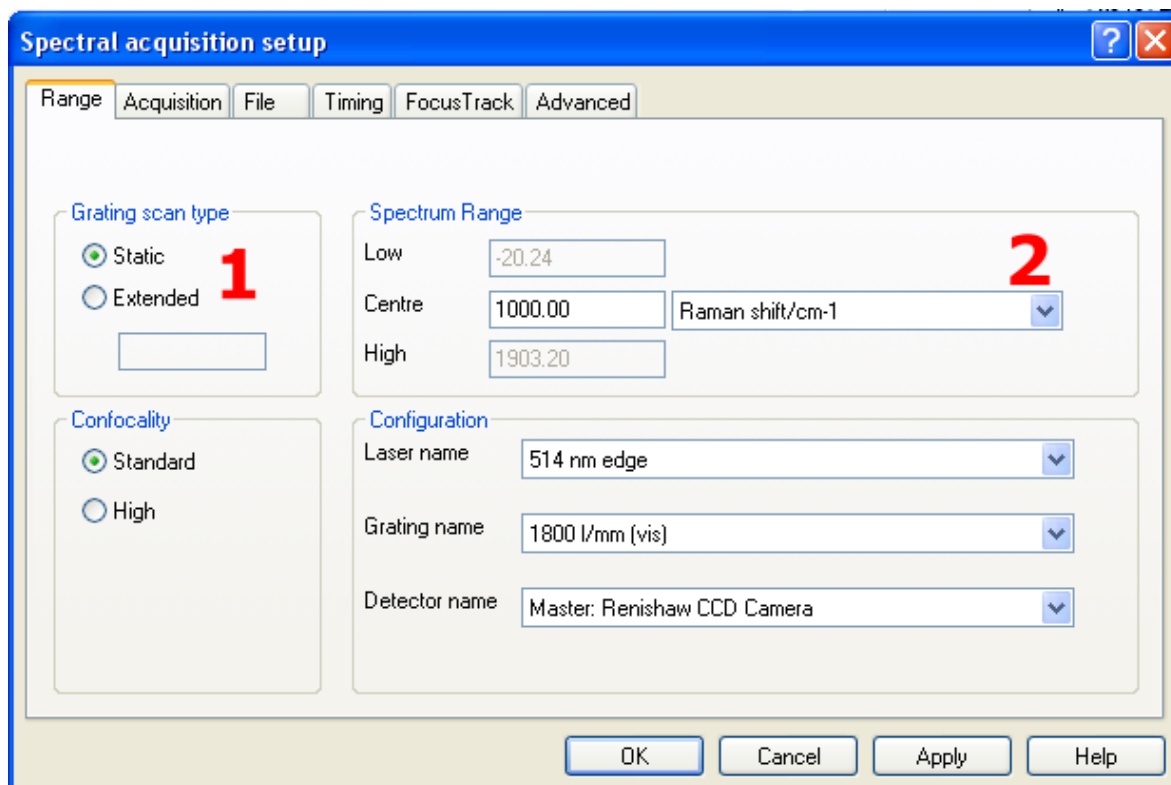
PRÍLOHA 1: Ukážky práce v programe WIRE 3.0

PRÍLOHA 2: Ramanove spektrá vybraných narkotík

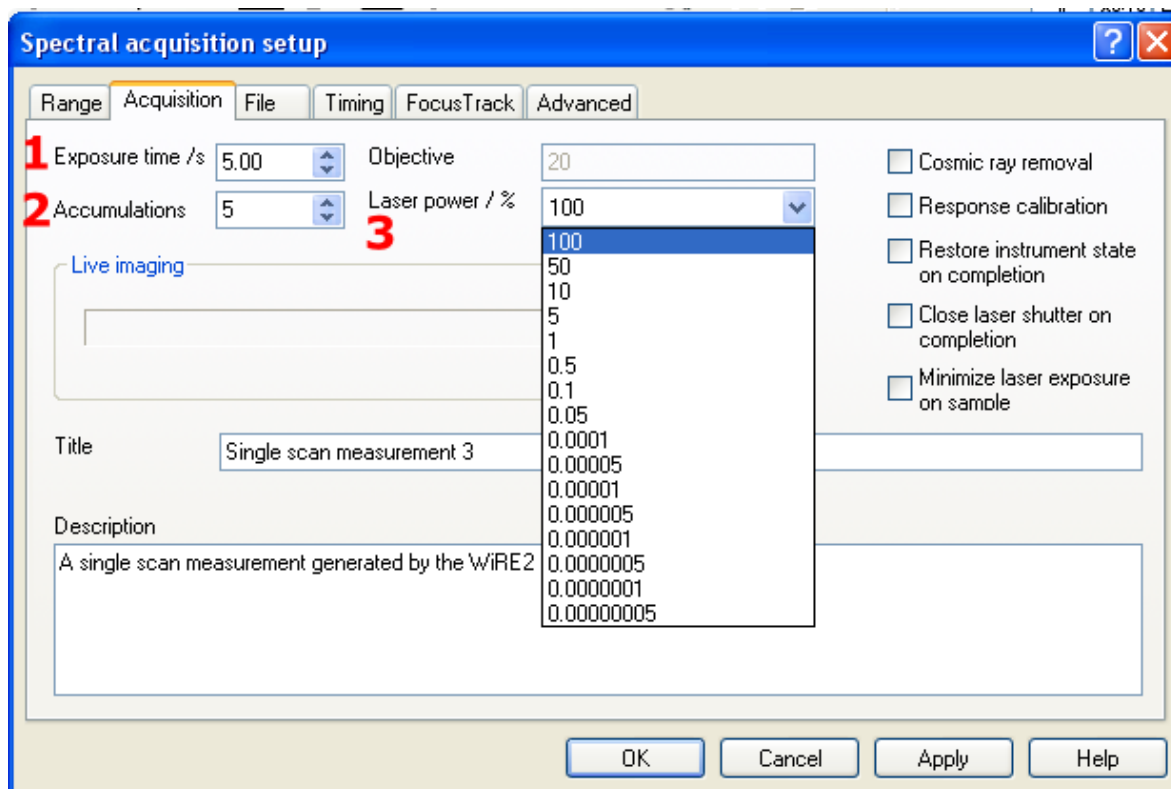
## PRÍLOHA 1: UKÁŽKY PRÁCE V PROGRAME WIRE 3.0



Obrázok 1. Pracovné prostredie softwaru WiRE 3.0 k obsluhu Ramanovho mikroskopu

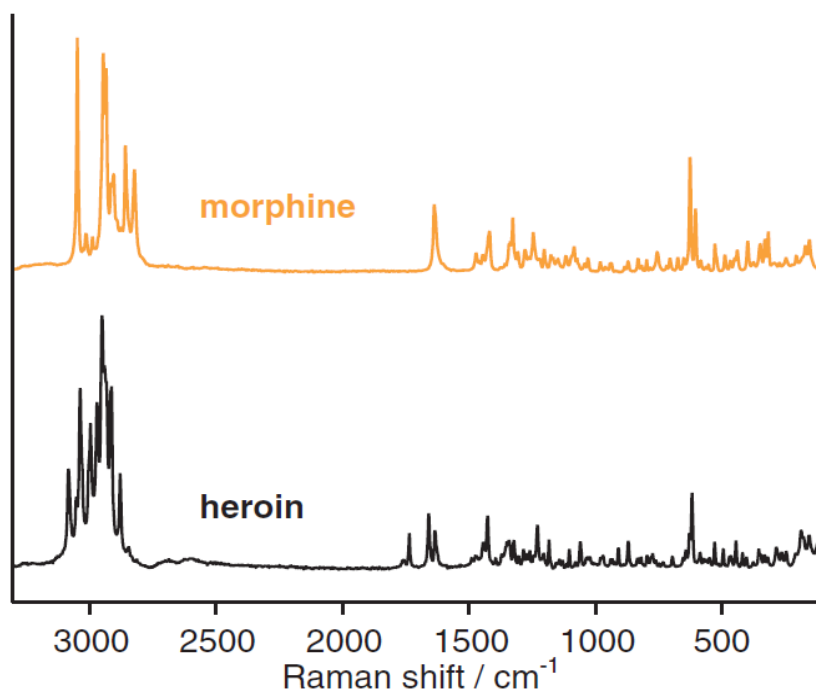
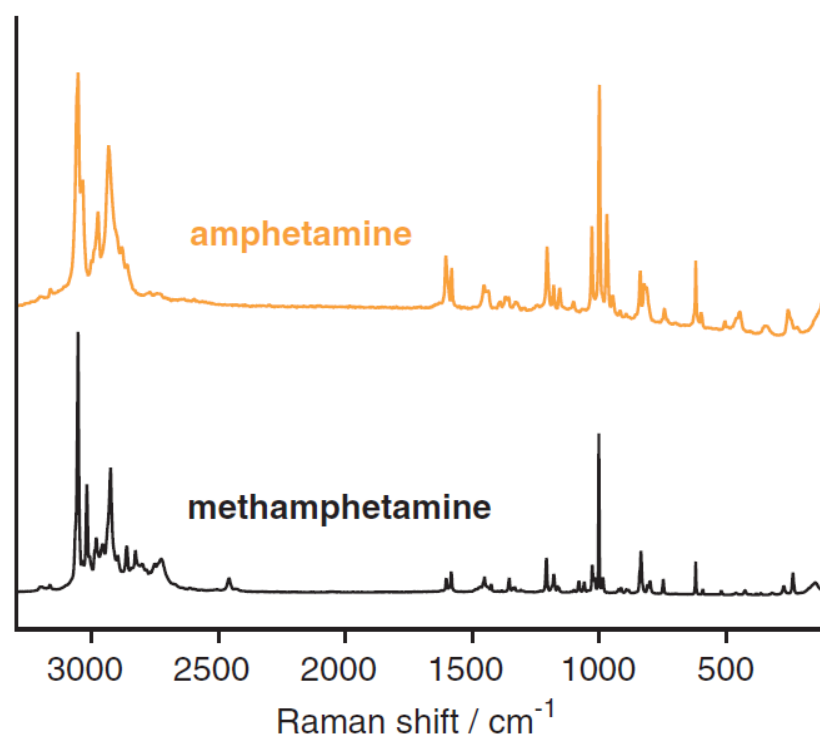


Obrázok 2. Nastavenie parametrov merania: 1- typ snímania, 2 rozsah vlnočtov



Obrázok 3. Nastavenie expozičného času (1) , počtu akumulácií – scanov (2) a výkonu laseru (3)

## PRÍLOHA 2: RAMANOVE SPEKTRÁ VYBRANÝCH NARKOTÍK



Zdroj: *Drug detection using Raman spectroscopy*. Informačný materiál od firmy Renishaw.

Dostupný z www: [http://resources.renishaw.com/en/details/download\(3949\)](http://resources.renishaw.com/en/details/download(3949))