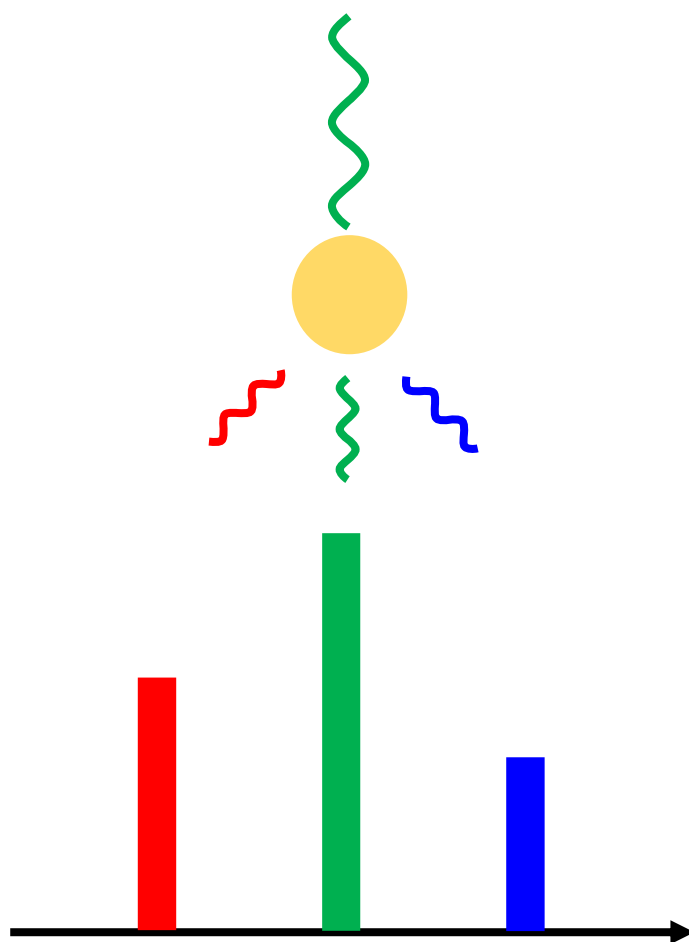


**Е.Э. ПОПОВ, В.В. ВИТКИН**

**ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**



Санкт-Петербург  
2022

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**Е.Э. Попов, В.В. Виткин**

## **Лазерная спектроскопия биологических объектов**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлению подготовки 16.04.01 «Техническая физика» в качестве учебно-  
методического пособия для реализации основных профессиональных  
образовательных программ высшего образования магистратуры

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург  
2022

Е.Э. Попов, В.В. Виткин. Лазерная спектроскопия биологических объектов  
Учебное пособие. – СПб: Университет ИТМО, 2022. – 46 с.

Рассматривается метод исследования свойств биологических материалов и выдыхаемого воздуха человеком.

Учебное пособие предназначено для магистрантов, обучающихся по направлению подготовки 16.04.01 «Техническая физика» в качестве учебно-методического пособия для реализации основных профессиональных образовательных программ высшего образования магистратуры в рамках образовательной программы «Лазерные и синхротронные технологии мегасайенс/Megascience laser and synchrotron technologies». Материал может быть также рекомендован для студентов старших курсов физико-технических специальностей для закрепления и применения знаний, полученных на лекциях, практических занятиях и во время самостоятельной работы. Настоящие работы посвящены изучению основ рамановской спектроскопии, а также методам характеристики вещества. Данное учебно-методическое пособие является основой для изучения дисциплины «Лазерная спектроскопия биологических объектов/Laser spectroscopy of biological objects». В учебно-методическом пособии дана теоретическая справка к лабораторным работам.

Учебно-методическое пособие к выполнению лабораторных работ подготовлено в Институте перспективных систем передачи данных.



**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2022

© Е.Э. Попов, В.В. Виткин, 2022

## Оглавление

Введение .....	4
Лабораторная работа №1. Измерение рамановских спектров чистых газов	
1.1. Краткая теоретическая справка .....	8
1.2. Описание экспериментальной установки .....	11
1.3. Порядок выполнения работы .....	12
1.4. Обработка результатов .....	14
1.5. Требования к отчету .....	14
1.6. Контрольные вопросы .....	14
Лабораторная работа №2. Измерение рамановских спектров выдыхаемого человеком воздуха	
2.1. Краткая теоретическая справка .....	15
2.2. Порядок выполнения работы .....	16
2.3. Требования к отчету .....	17
2.4. Контрольные вопросы .....	17
Лабораторная работа №3. Обработка рамановских спектров выдыхаемого человеком воздуха, определение величины $\delta^{13}\text{C}$	
3.1. Краткая теоретическая справка .....	18
3.2. Порядок выполнения работы .....	22
3.3. Требования к отчету .....	22
3.4. Контрольные вопросы .....	22
Лабораторная работа №4. Измерение рамановских спектров биологических образцов	
4.1. Краткая теоретическая справка .....	23
4.2. Порядок выполнения работы .....	25
4.3. Требования к отчету .....	25
4.4. Контрольные вопросы .....	26
Лабораторная работа №5. Машинное обучение при обработке рамановских спектров	
5.1. Краткая теоретическая справка .....	27
5.2. Порядок выполнения работы .....	30
5.3. Требования к отчету .....	30
5.4. Контрольные вопросы .....	30
Рекомендуемая литература .....	31
Приложение А. Работа с установкой .....	32
Приложение Б. Требования к оформлению отчета .....	41

## Введение

Представленные в сборнике лабораторные работы предлагаются студентам, обучающимся по направлению подготовки 16.04.01 «Техническая физика» для получения базовых и расширенных знаний об основах рамановской спектроскопии, а также о способах анализа и методах характеристики вещества. Данное учебно - методическое пособие является основой для изучения дисциплины «Лазерная спектроскопия биологических объектов». Выполнение лабораторных работ позволит понять принцип анализа вещества методом комбинационного рассеяния света.

Каждая лабораторная работа содержит *цель, основные сведения о предмете работы, описание задействованного оборудования, схему проведения работы, контрольные вопросы и задания*. Для того, чтобы не повторять написанное ранее описание лабораторной установки содержится в приложении 1. Схема лабораторной работы представлена этапами, соблюдение последовательности которых является обязательным для усвоения материала. Лабораторная работа считается выполненной при условии проведения каждого этапа работы и предоставления отчета.

**Отчет к лабораторной работе** должен содержать отчетные листы по каждому этапу работы. Пример оформления отчета к лабораторной работе содержится в приложении 2. После каждого этапа студент составляет протокол наблюдений и визирует его у преподавателя. В отчет следует включить цель работы, схемы задействованных установок с описанием функциональных узлов, ответы на контрольные вопросы и задания.

Для успешной подготовки отчета к лабораторной работе рекомендуется использовать дополнительную (рекомендуемую) литературу.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КРС, рамановская спектроскопия) по механизму является методом колебательной спектроскопии (туда же относится и инфракрасная спектроскопия) и основывается на рассеянии излучения на молекулах исследуемого вещества. Данный метод позволяет наблюдать колебания связей в молекулах вещества, а наборы уникальных пиков в спектре, полученных в результате исследования, позволяют идентифицировать исследуемое вещество, если его колебательный спектр заранее известен. Также возможно изучение симметрии и структурных характеристик неизученных молекул. В 1928 году сэр Раман открыл явление неупругого рассеяния света, благодаря которому и появилась возможность неразрушающего химического анализа вещества. Первоначально в экспериментах использовалось излучение ртутных ламп, но с изобретением лазера возможности рамановской спектроскопии значительно расширились, открыв возможность применения её в решении различных измерительных задач. В рамановской спектроскопии образец облучается монохроматическим светом, большая часть рассеянного образцом излучения (~99%) будет иметь ту же частоту, что и падающее излучение. Тем не менее, некоторое количество излучения, рассеянного образцом, имеет частоту,

смещенную по отношению к частоте исходного монохроматического излучения. Характерное количество фотонов рассеянного излучения, испытывающего сдвиг частоты, это 1 из  $10^{10}$  падающих на молекулу фотонов.

Важно отметить, что сдвиг частоты может быть как в положительную, так и отрицательную стороны от частоты падающего излучения, т. е., фотон может передавать часть энергии молекуле, и молекула может передавать часть энергии падающему фотону. Если энергия фотона после рассеяния на молекуле уменьшилась, т. е. его частота уменьшилась тоже, то это стоксово рассеяние, если наоборот, то антистоксово (см. рисунок 0.1).

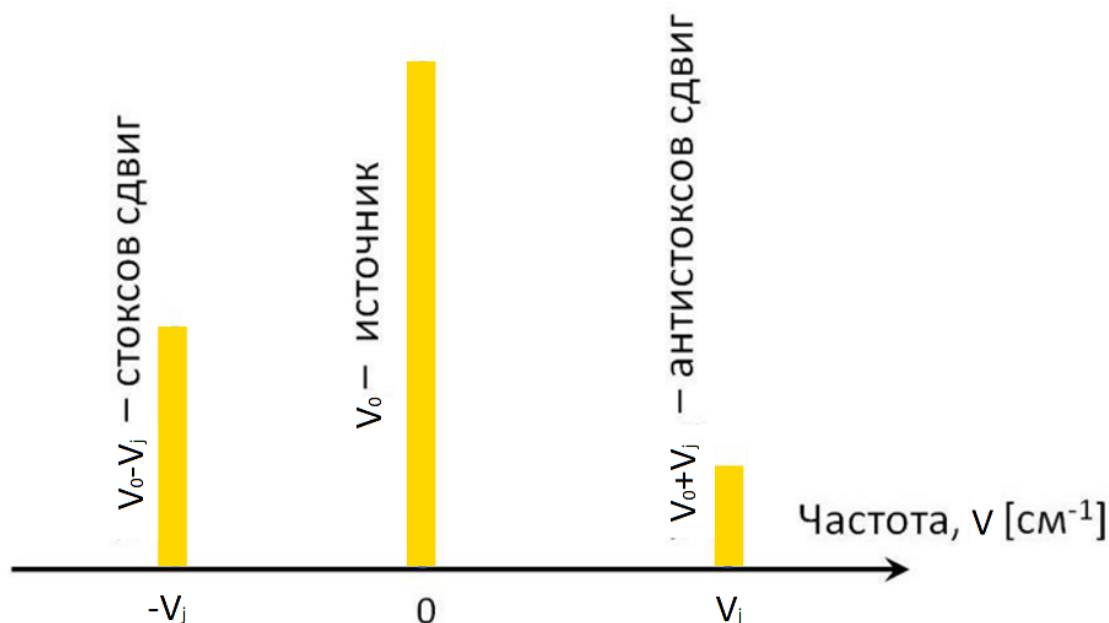


Рисунок 0.1 – Схематическое изображение спектра излучения

Соотношение между стоксовыми и антистоксовыми компонентами может быть вычислено по формуле:

$$\frac{I_R(\nu_0 + \nu_j)}{I_R(\nu_0 - \nu_j)} = \frac{(\nu_0 + \nu_j)^4}{(\nu_0 - \nu_j)^4} \exp\left(-\frac{h\nu_j}{kT}\right), \quad (0.1)$$

где  $I_R$  — интенсивность,  $\nu_0$  — частота источника излучения,  $(\nu_0 + \nu_j)$  — антистоксова компонента,  $(\nu_0 - \nu_j)$  — стоксова компонента,  $h$  — постоянная Планка,  $\nu_j$  — частота сдвига,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура.

Важным замечанием является то, что интенсивность антистоксовой компоненты зависит от населённости первого вибрационного уровня, вследствие чего интенсивность данной компоненты зависит от температуры среды, которая влияет на распределение Больцмана.

Для большего понимания природы рамановского рассеяния необходимо рассмотреть влияние собственных колебаний молекулы на поляризуемость среды ( $\alpha$ ).

$$P = \alpha E, \quad (0.2)$$

где  $P$  - вектор поляризации,  $E$  - напряжённость внешнего электрического поля.

Падающая электромагнитная волна описывается выражением:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t), \quad (0.3)$$

где  $\nu_0$  - частота лазерного излучения,  $t$  - время.

Выражение для собственных колебательных частот молекулы ( $Q_j$ ):

$$Q = Q_j^0 \cos(2\pi\nu_j t), \quad (0.4)$$

где  $\nu_j$  - частота собственных колебаний  $j$ -ой моды молекулы.

Модуляция поляризуемости среды собственными колебательными частотами молекулы:

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_j} \right) Q_j + \dots, \quad (0.5)$$

Подставляя всё в выражение (0.2) и применяя выражение для произведения косинусов, получим выражение для поляризации молекулы:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + E_0 Q_j^0 \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_j} \right) \frac{\cos(2\pi[\nu_0 t + \nu_j]t) + \cos(2\pi[\nu_0 - \nu_j]t)}{2}, \quad (0.6)$$

Выражение (0.6) демонстрирует возможность сдвига частоты рассеянного излучения как с увеличением частоты, так и с её уменьшением. Важным замечанием является то, что для наличия сдвига частоты необходимо, чтобы поляризуемость среды зависела от собственных колебаний.

Рассеянное от образца излучение раскладывают в спектр с помощью спектрально селективирующих элементов, где различные спектральные компоненты разделяются по пространству (монохроматоры на основе дифракционной решётки), либо с помощью Раман-Фурье спектроскопии. Наиболее часто применяют монохроматоры на основе дифракционных решёток. После разложения излучения в спектр его необходимо зарегистрировать с помощью приёмника.

В качестве приемников излучения используют ССД (ПЗС) детекторы. Такие детекторы представляют собой двумерную матрицу светочувствительных элементов (пикселей). Каждый пиксель работает как индивидуальный детектор, что позволяет регистрировать каждую рассеянную длину волны одной или группой близкорасположенных пикселей. ССД детекторы имеют отклик по широкому диапазону длин волн (400 – 1000 нм).

Важно упомянуть о шумах приёмника. Для фотодиодных приёмников характерны следующие виды шума: шумы темнового тока; шум фототока (дробовый шум); тепловой шум и др.

Темновой ток возникает в связи с генерацией носителей заряда в полупроводниковой структуре за счёт тепловой генерации. Определяется источником питания, в котором может присутствовать темновой ток, который попадает в схему и искажает результаты измерений.

Дробовый шум связан с флуктуациями числа носителей заряда, связанными с их дискретностью. В основе механизмов появления дробового шума лежат квантовые процессы. Существует вероятность появления частиц, которые переводят атом в возбуждённое состояние. Спектр дробового шума равномерный. Для вычисления дисперсии тока дробового шума в полосе  $\Delta f$  применяют формулу Шоттки.

Тепловой шум обусловлен тепловым движением носителей заряда в проводнике, в результате чего на концах проводника возникает флуктуирующая разность потенциалов. Спектр теплового шума равномерный. Для вычисления дисперсии напряжения теплового шума в полосе  $\Delta f$  применяют формулу Найквиста.

Генерационно-рекомбинационный шум связан с флуктуацией числа и времени жизни носителей заряда. Процесс генерации и рекомбинации носителей заряда имеет вероятностный характер. Генерационно-рекомбинационный шум зависит от концентрации, времени жизни носителей заряда, пропорционален напряжению питания, а также зависит от темнового сопротивления фоторезистора и сопротивления нагрузки.

Токовый шум зависит от состояния поверхности и технологии изготовления фоточувствительного слоя, от качества изготовления контактов и токов утечки.



## Лабораторная работа № 1. Измерение рамановских спектров чистых газов

1. Цель работы: освоить основные принципы экспериментальных измерений спектров комбинационного рассеяния чистых газов

2. Задачи:

1. Познакомиться с устройством рамановского спектрометра;
2. Ознакомиться с характеристиками рамановского спектра;
3. Познакомиться с порядком и на практике освоить измерения рамановских спектров газовых смесей;
4. Измерить рамановские спектры чистых газов при различной длительности экспозиции, давлении;
5. Определить функциональную зависимость интенсивности рамановского спектра от длительности экспозиции, давления;
6. Определить особенности влияния длительности экспозиции, давления газовой смеси на характеристики получаемых спектров

### 1.1. Краткая теоретическая справка

Спектроскопия КРС позволяет анализировать химический состав исследуемого образца.

Измерение интенсивности полос в спектрах КРС позволяют проводить количественный анализ и изучать кинетику химических реакций.

Комбинационное рассеяние – это процесс, в котором участвует два фотона. Падающий фотон  $\hbar\omega_0$  поглощается молекулой, которая возбуждается до некоего «виртуального» состояния и испускает рассеянный фотон  $\hbar\omega$ .



Рисунок 1.1 – Схема уровней энергии и переходов, отвечающих процессам неупругого (рамановского) и упругого (рэлеевского) рассеяния света, внизу - соответствующий им спектр

До взаимодействия с фотоном молекула вещества находится в основном, стабильном состоянии. При взаимодействии с молекулами фотоны рассеиваются. Рассеяние может быть упругим и неупругим. В случае, если рассеяние упругое, фотоны отклоняются от направления движения, не отдавая энергию, то есть без изменения частоты и  $\hbar\omega = \hbar\omega_0$ . Данный вид рассеяние – рэлеевское рассеяние – возникает как при динамических (флуктуация плотности жидкости, газа), так и при статических (в твердых телах) неоднородностях. Однако может произойти так, что при взаимодействии с молекулой фотон потеряет часть энергии на величину  $\hbar\omega_M$ , которая соответствует разнице между колебательными уровнями энергии разрешенных состояний.

Появление колебательных уровней можно объяснить колебаниями ядер атомов относительно своего положения равновесия и вращением молекулы или, другими словами, колебанием ядер атомов относительно движения молекулы, а также движением электронов вокруг ядер атомов. Излучение, рассеянное с частотой меньшей, чем у падающего фотона, называется стоксовым излучением, а излучение с большей частотой называется антистоксовым.

В получаемом спектре за «ноль» принимают частоту рэлеевского рассеяния, то есть частоту падающего света (например, излучения лазерного источника), а частоту рамановской линии получают вычитанием частоты стоксовой (антистоксовой) линии из частоты рэлеевского излучения. Полученное значение называется волновым числом и выражается в обратных сантиметрах ( $\text{см}^{-1}$ ). Поскольку спектры рамановского рассеяния света очень чувствительны к природе химических связей в материалах, то каждое вещество обладает своим собственным спектром рамановского рассеяния. Например, на рисунке 1.2 представлен спектр рамановского рассеяния для образца газа  $^{12}\text{CO}_2$ .

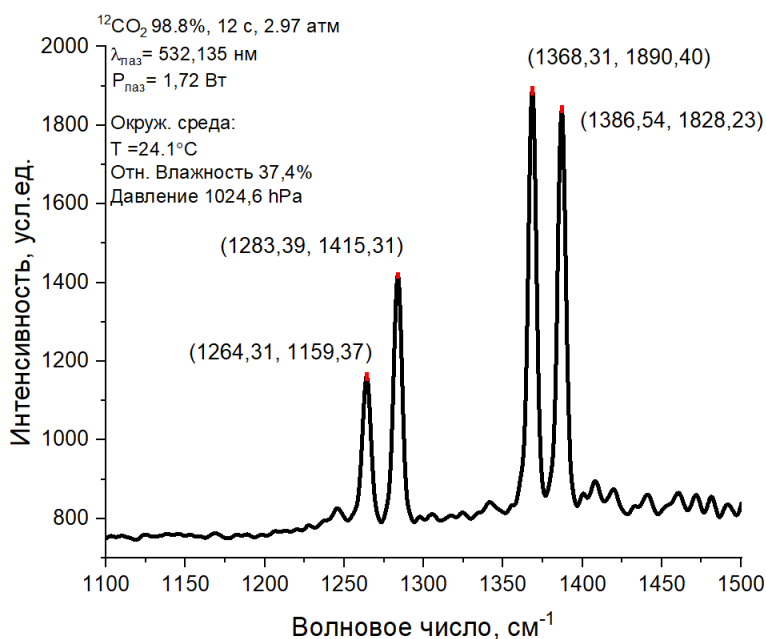


Рисунок 1.2 – Рамановский спектр образца газа  $^{12}\text{CO}_2$

По своей природе интенсивность комбинационного (рамановского) рассеяния света зависит от ряда факторов:

1) интенсивность зондирующего лазерного излучения (чем больше фотонов приходит в единицу времени в единицу объёма - тем больше фотонов рассеянного излучения образуется);

2) концентрация молекул (чем больше частиц в единице объёма, тем больше фотонов рассеянного излучения образуется);

3) сечение комбинационного рассеяния (характеризует вероятность взаимодействия фотона и атома при которой генерируется фотон излучения комбинационного рассеяния);

4) длина трассы взаимодействия зондирующего излучения (ограничена полем зрения оптической системы приёмника, но имеет место быть на всём протяжении лазерного пучка).

Функционально описанную зависимость можно представить в виде выражения:

$$I_R = I_D \beta D_{mol} d_z, \quad (1.1)$$

где  $I_D$  – интенсивность зондирующего излучения в фотонах на квадратный сантиметр за секунду,  $D_{mol}$  – концентрация молекул ( $1/\text{см}^3$ );  $d_z$  – длина трассы взаимодействия зондирующего излучения (м);  $\beta$  – сечение взаимодействия рамановского излучения, которое равняется ( $\text{см}^2/(\text{ср} \times \text{шт})$ ).

Рассмотрим влияние температуры, давления на интенсивность излучения комбинационного рассеяния. Концентрация молекул связана с массой газа, объёмом кюветы, молярной массой и числом Авогадро следующим отношением:

$$D_{mol} = \frac{m N_a}{M V}, \quad (1.2)$$

где  $m$  – масса газа,  $N_a$  – число Авогадро,  $M$  – молярная масса газа и  $V$  – объём кюветы.

Масса исследуемого образца определяется из уравнения состояния идеального газа (2) на примере  $^{12}\text{CO}_2$ :

$$m = \frac{P_g V M}{R_g T_g}, \quad (1.3)$$

где  $P_g$  – давление газа (30 атм),  $M$  – молярная масса газа (45 г/моль),  $R_g$  – универсальная газовая постоянная,  $T_g$  – температура газа в кювете (295 К),  $V$  – объём кюветы ( $1 \text{ см}^3$ ).

Таким образом, на значение интенсивности излучения комбинационного рассеяния света оказывают влияние условия измерения: температура, давление. Стоит заметить, что значительное изменение давления технически проще реализуемо, чем изменение температуры, при котором будет наблюдаться такое же изменение интенсивности рассеянного излучения.

### 1.2. Описание экспериментальной установки

В качестве экспериментальной установки выступает многофункциональный рамановский газоанализатор (МРГ), схема установки приведена на рисунке 1.3. Принцип работы МРГ основан на рамановской спектроскопии – образец облучается интенсивным лазерным излучением, после чего рассеянное излучение регистрируется при помощи спектрометра. В результате получаем спектр, на котором наблюдаются характерные интенсивные полосы исследуемого вещества благодаря рамановскому рассеянию.

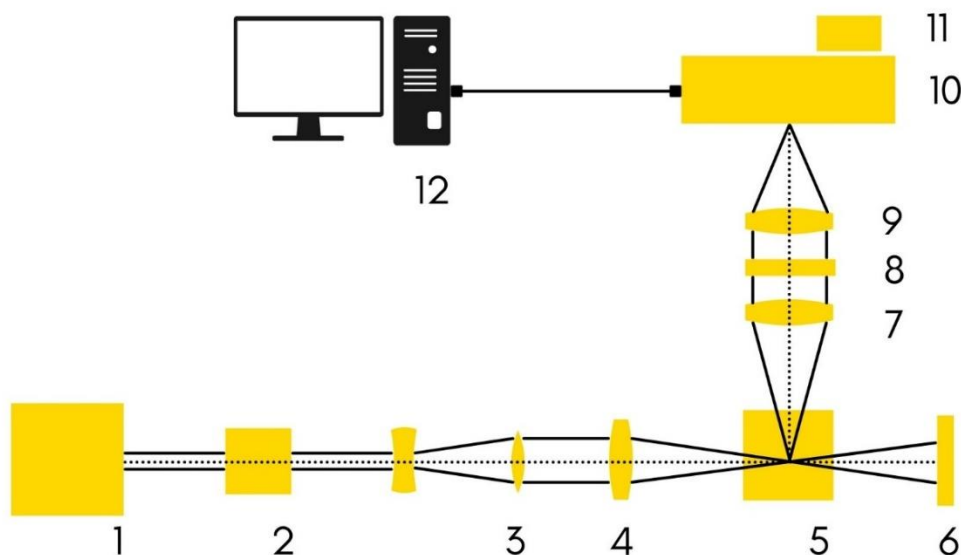


Рисунок 1.3 – Схема многофункционального рамановского газоанализатора:

1 – Nd:YAG лазер; 2 – изолятор Фарадея, 3 – расширитель пучка, 4 – фокусирующий объектив, 5 – газовая кювета, 6 – поглотитель лазерного излучения, 7 – собирающий объектив, 8 – edge-фильтр, 9 – фокусирующий объектив, 10 – монохроматор, 11 – ПЗС камера, 12 – ПК

В качестве источника возбуждения используется твердотельный лазер с непрерывной диодной накачкой (MSL-R-532, CNI-Lasers), излучающий ~5 Вт линейно поляризованного излучения на длине волны 532 нм. Для того, чтобы защитить источник излучения от обратно рассеянного света на выходе из лазера установлен изолятор Фарадея. Возбуждающее излучение проходит телескопическую систему, состоящую из расширителя пучка Vega×7 (Edmund

Optics) и специально разработанной линзы, осуществляющей фокусировку в газовую кювету. Измеренный методом оптического ножа размер пятна в фокусе составил менее 10 мкм с пиковой интенсивностью лазерного излучения около 10 МВт/см<sup>2</sup>.

Рассеянное рамановское излучение собирается с помощью ахроматической дублетной линзы ( $f = 55,9$  мм), после чего осуществляется фильтрация рэлеевского рассеянного света с помощью пары фильтров (излучение на длине волны 532 нм уменьшается на 11 порядков). Еще одна ахроматическая дублетная линза ( $f = 80,6$  мм) используется для проекции рамановского излучения на входную щель спектрометра.

Спектрометр разработан по схеме Черни-Тернера и имеет дифракционную решетку с разрешением 1800 штрихов на мм и длиной волны блеска 500 нм. Для регистрации спектров используется камера (Hamamatsu) с КМОП-матрицей разрешением 2048×122 пикселей (размер одного пикселя 12×12 мкм), которая охлаждается элементом Пельтье до  $-40^{\circ}\text{C}$ . Время экспозиции можно варьировать от 10 мкс до 10 мин. Спектральный диапазон одного прохода устройства составляет 35 нм (0,017 нм на пиксель), что варьируется в пределах 530÷635 нм.

### **1.3. Порядок выполнения работы**

Лабораторная работа будет проводиться на установке, подготовленной преподавателем.

1. Включить установку и запустить ПО.

Порядок включения установки и запуска ПО приведён в приложении А.

2. Установить положение решётки на 574,53 нм, что соответствует положению наиболее интенсивного пика, соответствующего сдвигу  $1388\text{ см}^{-1}$  комбинационного рассеяния излучения для молекулы  $^{12}\text{CO}_2$ .

Порядок установки положения решётки приведён в приложении А.

3. Проведение измерений

Необходимо провести измерения согласно таблице с режимами измерения.

Измерения проводятся в соответствии с порядком проведения измерений, приведенном в приложении Б.

Таблица 1.1 - режимы измерения

№ режима п/п	Значение давления, атм.	Значение длительности экспозиции, с
1	8	20 с
2		10 с
3		1 с
4		0,1 с
5	6	20 с
6		10 с
7		1 с
8		0,1 с
9	4	20 с
10		10 с
11		1 с
12		0,1 с
13	2	20 с
14		10 с
15		1 с
16		0,1 с

4. По результатам измерения каждого очередного режима необходимо заполнить таблицу 1.2.

Под интенсивностью сигнала понимать значение интенсивности пика излучения комбинационного рассеяния. Под уровнем фонового сигнала понимать среднее значение шумового сигнала в спектральной области без пиков комбинационного рассеяния.

Таблица 1.2 - Результаты измерений

№ режима п/п	Интенсивность сигнала	Уровень фонового сигнала
1		

...		
16		

#### **1.4. Обработка результатов**

1. Построить графическую зависимость влияния давления на интенсивность рассеянного излучения.
2. Построить графическую зависимость влияния длительности экспозиции на интенсивность рассеянного излучения.
3. Построить графическую зависимость влияния давления на уровень фонового сигнала.
4. Построить графическую зависимость влияния длительности экспозиции на уровень фонового сигнала.
5. Построить графическую зависимость влияния давления на отношение сигнал/шум.
6. Построить графическую зависимость влияния длительности экспозиции на отношение сигнал/шум.

#### **1.5. Требования к отчету**

Отчет необходимо оформить в соответствии с приложением Б.

#### **1.6. Контрольные вопросы**

1. Что такое комбинационное рассеяния света?
2. Каковы отличия между рэлеевским и комбинационным рассеянием света?
2. Что означают термины «стоксовы» и «антистоксовы» компоненты? Как они формируются?
3. Можно ли зарегистрировать комбинационное рассеяние при возбуждении лазером, излучающим на длине волны, отличающейся от используемого в данной лабораторной установке? Как будет отличаться положение линий КРС в этом случае?
4. Какие свойства окружающей среды и как влияют на интенсивность рамановского рассеяния?
5. Как длительность экспозиции приёмника рассеянного излучения влияет на интенсивность регистрируемого сигнала рамановского рассеяния?

## Лабораторная работа №2. Измерение рамановских спектров выдыхаемого человеком воздуха

Цель работы: ознакомиться с методом измерения спектров комбинационного рассеяния выдыхаемого человеком воздуха

Задачи:

1. Познакомиться с составом вдыхаемого и выдыхаемого человеком воздуха;
2. Определить спектральный диапазон, в котором расположены спектральные пики рамановского рассеяния составляющих выдыхаемого человеком воздуха;
3. Провести измерение рамановского спектра выдыхаемого человеком воздуха;
4. По измеренным спектрам определить газовые компоненты в выдыхаемом воздухе.

### 2.1. Краткая теоретическая справка

Важнейшим фактором существования живого организма является газообмен с окружающей средой. В основе такого газообмена лежит поглощение кислорода и выделение паров воды и углекислого газа, происходящие при внешнем дыхании, которые обусловлены энергозатратами организма. Такие процессы настолько интенсивны, что изменения концентрации  $O_2$  и  $CO_2$  вследствие дыхания достигают нескольких процентов ( $> 3\%$ ) от суммарного состава выдыхаемого воздуха.

Также в выдыхаемом воздухе содержится некоторое количество других достаточно легких газообразных соединений, которые образуются в меньшем количестве в организме, поэтому присутствуют, например, в выдыхаемом воздухе в виде следов. Они продуцируются в результате разнообразных процессов, связанных с регулированием скоростей биохимических реакций, передачей информации, обновлением или изменением структур организма и течением патологических процессов, и, чтобы избежать накопления, должны быть выведены из организма.

На данный момент известно, что в образце выдыхаемого воздуха человеком содержится более 3000 различных веществ, в основном это летучие органические соединения. Их содержание может говорить о наличии у человека различных заболеваний (астма, диабет, рак). Для исследования и выявления подобных примесей используют различные методы характеристики образцов, включая оптические методы, в том числе и спектроскопию комбинационного рассеяния. Это объясняется тем, что взаимодействие фотонов и молекул вызывает сдвиг частоты рассеянного света относительно частоты падающего на молекулу излучения. Кроме того, интенсивность спектра позволяет оценить объёмную долю рассеивающих молекул.

Как уже было сказано выше, при исследовании газообмена человека наиболее актуален анализ следов газообразных веществ в выдыхаемом воздухе, так как анатомическое строение легких специально приспособлено для высокоэффективного обмена газами между воздухом и кровью. Спектр



веществ, следы которых обнаруживаются в выдыхаемом воздухе, простирается от двухатомных молекул типа водорода ( $H_2$ ), оксидов углерода (CO) и азота (NO) до многоатомных алифатических и ароматических углеводородов.

К газовым средам относятся: атмосферный воздух, выдыхаемый и альвеолярный воздух (таблица 2.1). Газовая смесь в альвеолах, участвующих в газообмене, обычно называется альвеолярным воздухом или альвеолярной смесью газов.

Таблица 2.1 – Процентное содержание газов в разных газовых средах

Газ	O <sub>2</sub> , %	CO <sub>2</sub> , %	NO, %	CH <sub>4</sub> , %
Вдыхаемый воздух	20,94	0,03	79,03	0,0001879 %
Выдыхаемый воздух	16,30	4,00	79,70	0.0010
Альвеолярный воздух	14,50	5,50	80,00	0.0012

Следует отметить, что в выдыхаемом воздухе количество углекислого газа меньше, а кислорода больше, чем в альвеолярном. Это связано с тем, что при выдохе к альвеолярному воздуху присоединяется воздух мертвого пространства, содержащий меньшее количество углекислого газа и большее количество кислорода.

## 2.2. Порядок выполнения работы

К выполнению работы допускаются только студенты, заполнившие таблицу по форме таблицы 2.2, значение длины волны лазерного излучения принять равным 532,1 нм.

Таблица 2.2 - Перечень газовых составляющих человеческого выдоха

№ п/п	Наименование	Обозначение	Положение пиков рамановского рассеяние см <sup>-1</sup> /нм	Ссылка на источник
1				
...				

Лабораторная работа будет проводиться на установке, подготовленной преподавателем.

1. Включить установку и запустить ПО.

Порядок включения установки и запуска ПО приведён в приложении А. Описание установки представлено в лабораторной работе №1 в пункте 1.2. Разбить полученный диапазон на участки по 20 нм так, чтобы по крайней мере 1 пик находился в центральной области.

2. Собрать образцы выдоха с помощью специального пробоотборника.
3. Подсоединить пробоотборник к вентилю -«Вход» пробоотборник и провести измерения.

4. В качестве центральной длины для каждого нового измерения указать центральную длину волны очередного диапазона.

Длительность экспозиции для каждого диапазона необходимо установить экспериментально: увеличивая её постепенно: 1с, 5 с, 25 с, 50 с, 100 с, 360 с, пока интенсивность максимального из пиков не будет составлять 0,85 от максимального значения интенсивности на вертикальной шкале.

Порядок проведения измерений приведён в приложении Б.

5. По результатам измерения каждого очередного режима необходимо заполнить таблицу 2.3

Таблица 2.3

№ п/п	Наименование компонента	Положение пика	Интенсивность
1			
...			

### 2.3. Требования к отчету

Отчет необходимо оформить в соответствии с приложением Б.

### 2.4. Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип газообмена?
2. Каким образом можно оценить наличие, или отсутствие вещества по спектрам рамановского рассеяния?
3. Чем отличаются атмосферный воздух, выдыхаемый и альвеолярный воздух?
4. В какой газовой среде (альвеолярной или выдыхаемом воздухе) количество углекислого газа меньше?
5. Какие характерные особенности спектра рамановского рассеяния имеют такие вещества, как диоксид углерода, метан, азот?
6. Чем отличаются спектры рамановского рассеяния атмосферного воздуха, выдыхаемого и альвеолярного воздуха?

### Лабораторная работа №3.

#### Обработка рамановских спектров выдыхаемого человеком воздуха, определение величины $\delta^{13}C$

Цель: познакомиться с практическими применениями рамановской спектроскопии на примере определения величины  $\delta^{13}C$ .

Задачи:

1. Определить калибровочную функцию рамановского спектрометра;
2. Познакомиться с понятиями изотополог;
3. Познакомиться с определением величины  $\delta^{13}C$ ;
4. По результатам лабораторной №2 определить величину  $\delta^{13}C$  в выдохе человека.

#### 3.1. Краткая теоретическая справка

Углерод имеет два стабильных изотопа —  $^{12}C$  (углерод-12) и  $^{13}C$  (углерод-13). Известны также 13 радиоактивных изотопов углерода (от  $^8C$  до  $^{22}C$ ), из которых один —  $^{14}C$  (углерод-14) — встречается в природе (его содержание в атмосферном углероде около  $10^{-12}$ ). На процессах образования и распада углерода-14 основан метод радиоуглеродного датирования, широко применяющийся в геологии и археологии.

В таблице 3.1 приведены области использования изотопов углерода  $^{12}C$  и  $^{13}C$ . Изотоп углерода  $^{13}C$  отличается от привычного изотопа  $^{12}C$  тем, что у него в ядре есть лишний нейтрон ( $N^{12}C(n^0) = 6$ ,  $N^{13}C(n^0) = 7$ ) и оно чуть тяжелее ( $m_{12C} \equiv 12$ ,  $m_{13C} = 13.003$ ). В природе он часто встречается наряду с изотопом  $^{12}C$ , но доля его  $\approx 1\%$ . По содержанию изотопа  $^{13}C$  можно определить, в какой части земного шара рос тот или иной продукт.

Для медицинских исследований, в частности по определению отношения объёмных долей изотопологов, необходим препарат, содержащий в себе углерод-13. Препарат, в результате деятельности микробиоты в организме, увеличивает объёмную долю изотополога  $^{13}CO_2$ , в том числе в газовой фазе. Кровь переносит молекулы углекислого газа в легкие, и его можно зарегистрировать в выдохе с помощью методов оптической спектроскопии.

Сравнение объёмной доли  $^{13}CO_2$  в выдохе пациента до и после приема  $^{13}C$ -препарата позволяет сделать вывод не только о наличии заболевания, но и о том, насколько тяжело оно протекает. Данный метод используется в различных тестах, к примеру, в урезанных дыхательных тестах для определения патогена *Helicobacter pylori* в желудочно кишечном тракте человека.

Таблица 1 – Области применения исследования изотопов углерода

Изотоп	Области применения
$^{12}C$	-Атом углерда-12 получил атомный вес точно 12,000000000 и используется в качестве основы, на которой определяется атомный вес других изотопов

$^{13}\text{C}$	<p>-Диагностирование заболеваний желудочно-кишечного тракта (в т. ч. диагностика инфекции <i>Helicobacter pylori</i> в желудке), печени (например, диагностика печёночной недостаточности), эндокринных, нарушений обмена веществ, повышенного содержания стероидных гормонов, лейкемии, миеломы, дефицита витамина В2;</p> <p>-Исследования механизмов биохимических реакций в биологии и сельском хозяйстве;</p> <p>-В ядерно-магнитной резонансной томографии (ЯМР-томографии);</p> <p>-Для производства радиоизотопа азот-13 (<math>^{13}\text{N}</math>), используемый в позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ);</p> <p>-Фундаментальные исследования в органической химии, исследования метаболизма, молекулярных структур, геофизические исследования и анализ механизмов загрязнения атмосферы Земли</p>
-----------------	---

Тесты на основе углеродного анализа точны и специфичны, то есть можно идентифицировать состояние каждого конкретного органа. Варианты различных биомаркеров представлены на рисунке 3.1.



Рисунок 3.1 – Примеры диагностических тестов с помощью препаратов, меченных изотопом  $^{13}\text{C}$

Определяемой характеристикой изотопного состава углерода является рекомендуемая IUPAC величина  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ :

$$c = \frac{R(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})_P - R(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}}{R(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} \cdot 1000\text{‰}, \quad (3.1)$$

где  $R(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})_P = \frac{N(^{13}\text{C})_P}{N(^{12}\text{C})_P}$  – отношение изотопов в образце P,

$N(^{13}\text{C})_P$  – число изотопов  $^{13}\text{C}$  в образце P,  
 $N(^{12}\text{C})_P$  – число изотопов  $^{12}\text{C}$  в образце P,  
 $R(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})_{VPDB}$  – отношение изотопов в международном эталоне PDB, в настоящее время функции которого выполняет VPDB.

VPDB – международная шкала, реализуемая посредством двух стандартных образцов NBS 19 и LSVEC. Значения отношения изотопов  $\delta^{13}\text{C}_{VPDB}$ , в образцах NBS 19 и LSVEC приняты равными +1,95 и -46,6 ‰ соответственно по международному соглашению. Значения  $\delta^{13}\text{C}_{VPDB}$ , как правило, приводятся в ‰. Для обозначения отношения изотопов  $R(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})_{VPDB}$  допускается использовать запись  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

### $\delta^{13}\text{C}$ при анализе

В медицинских исследованиях на определение *Helicobacter pylori*, согласно утверждённой методике, применяется сравнение отношения концентрации  $^{13}\text{C}$  к концентрации  $^{12}\text{C}$  в газовой пробе, взятой до принятия препарата, с газовой пробой, взятой после принятия препарата., т. е. формула 3.1 примет вид:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})_{\text{после}} - R(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})_{\text{до}}}{R(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})_{\text{до}}} \cdot 1000\text{‰}, \quad (3.2)$$

Поскольку необходимо вычислить отношение концентраций, то самым очевидным способом является сравнение интенсивности пиков рамановского рассеяния на полученном спектре. Однако такой подход не обладает достаточной точностью. Так, необходимо точно знать сечение рамановского рассеяния для конкретного изотополога, чтобы установить их верное соотношение. Интенсивность рамановского рассеяния может быть вычислена по формуле:

$$I_R = I_D \beta D_{mol} dz, \quad (3.3)$$

где  $I_D$  – интенсивность зондирующего излучения в фотонах на квадратный сантиметр за секунду,  $D_{mol}$  – концентрация молекул ( $1/\text{см}^3$ );  $dz$  – длина трассы взаимодействия зондирующего излучения (м);  $\beta$  – сечение взаимодействия рамановского излучения, которое равняется/(ср×шт) - оптическое свойство излучения позволяющее определить количество фотонов рамановского рассеяния при равномерном освещении образца лазерным излучением.

При измерении одной газовой пробы одинаковыми будут интенсивность зондирующего излучения и длина трассы взаимодействия зондирующего излучения, поэтому необходимо учесть значение сечения рамановского рассеяния при проведении измерений.

Важно отметить, что, поскольку в спектрах рассеяния наблюдается, как правило, не один пик, то такое сечение необходимо вычислить для каждого пика.

Спектры рамановского рассеяния выдыхаемого человеком воздуха, чистых газов  $^{12}\text{CO}_2$ ,  $^{13}\text{CO}_2$  приведены на рисунке 3.2.

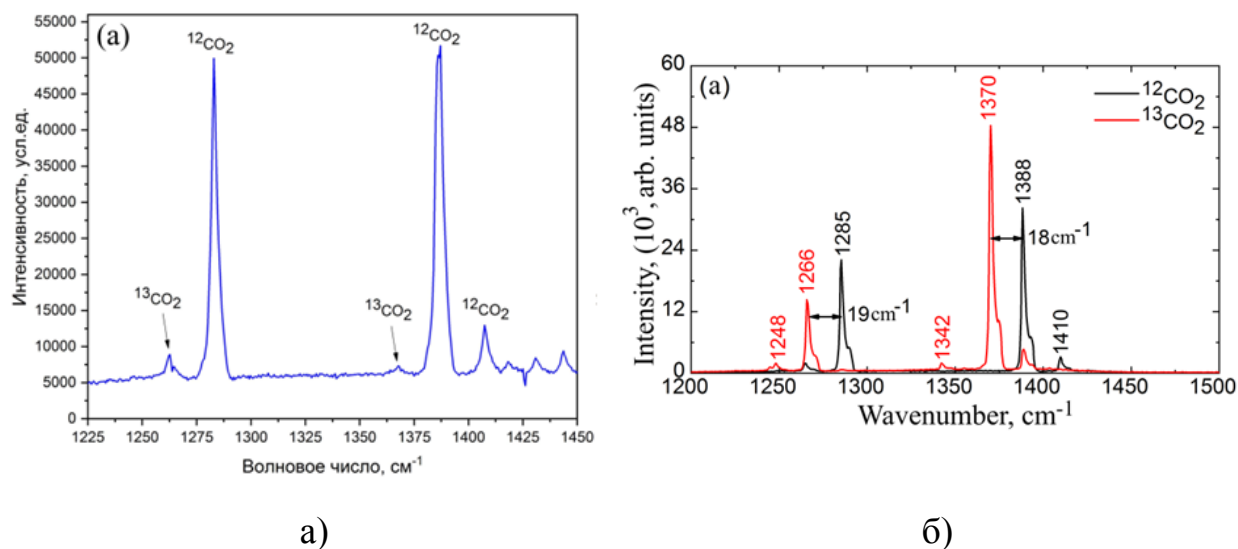


Рисунок 3.2 – Спектры рамановского рассеяния: а) выдыхаемого человеком воздуха; б) чистых газов.

Как видно из рисунка 3.2а в выдыхаемом человеком воздухе содержится как изотополог  $^{12}\text{CO}_2$ , так и изотополог  $^{13}\text{CO}_2$ . Причём концентрация изотополога  $^{13}\text{CO}_2$  значительно ниже. Более подробные цифры по концентрации изотопологов в выдыхаемом человеком воздухе рассмотрены в следующем разделе. Из рисунка 3.2б видно, что наиболее интенсивные линии  $^{12}\text{CO}_2$  –  $1285\text{ см}^{-1}$  и  $1388\text{ см}^{-1}$ , наиболее интенсивные линии  $^{13}\text{CO}_2$  –  $1266\text{ см}^{-1}$  и  $1370\text{ см}^{-1}$ .

Для определения соотношения изотопологов в газовых пробах выдыхаемого человеком воздуха были выбраны линии: для  $^{12}\text{CO}_2$  –  $1388\text{ см}^{-1}$ , для  $^{13}\text{CO}_2$  –  $1370\text{ см}^{-1}$ . Данные пики расположены на достаточном удалении друг от друга и не оказывают взаимного влияния, это одни из наиболее интенсивных спектральных линий.

Рамановское рассеяние  $\text{CO}_2$  хорошо изучено, вычислено сечение для пика с положением на  $1388\text{ см}^{-1}$ . По результатам различных исследований значение сечения колеблется в пределах от  $2,6$  до  $5,3 \times 10^{-31}$ ,  $\text{см}^2/\text{ср}$ . Такой большой разброс значения в  $100\%$  негативно сказывается на возможности проведения относительных измерений.

Альтернатива относительным — измерения абсолютных значений и построения калибровочной функции газоанализатора. Для калибровочной функции необходимо выполнить несколько измерений в начале, в конце и в середине измеряемого диапазона объёмных долей. Для аттестации приборов обычно используют стандартные образцы - СО. СО представляют собой газовые смеси, в которых объёмная доля вещества известна с высокой точностью, а оборудование, на котором проходило приготовление смеси, подтверждение её характеристик может быть прослежено по государственной поверочной схеме к первичному эталону. К примеру, газоанализатор, на

котором проводятся измерения, прослеживается до государственного первичного эталона молярной доли и массовой концентрации - ГЭТ 154–2019.

При калибровке проводится несколько измерений каждой газовой смеси - обычно от 10 до 100 раз. Результаты измерений приводятся к одному значению давления, температуры, длительности экспозиции, мощности лазерного излучения. Затем полученные результаты наносятся на график, где по горизонтальной оси отложена объёмная доля, а по вертикальной оси - интенсивность сигнала. Важно отметить, что для каждого прибора калибровочная функция - своя, так как на интенсивность сигнала будут влиять характеристики составных частей прибора (оптические компоненты, приёмник излучения, источник излучения). Также хотелось бы отметить, что при измерении калибровочной функции важно учитывать шумы, влияющие на работу ПЗС детектора, например, СКО шума, статистический шум, нелинейный эффекты, космические лучи, темновой шум и посторонний сигнал.

### **3.2. Порядок выполнения работы**

Работа выполняется с применением программного обеспечения, установленного на ПК, к которому подключена лабораторная установка.

Включение лабораторной установки, ПО проводить в соответствии с приложением А. Описание экспериментальной установке представлено в лабораторной работе №1 в пункте 1.2.

1. Произвести калибровку в автоматическом режиме: перейти в необходимое окно и выполнить последовательность действий в соответствии с приложением Б

2. Записать получившиеся значения точек (x,y), уравнение функции, которое приведено в программе, определить коэффициент детерминации ( $R^2$  — R-квадрат).

3. В окне МРГ по измерению концентрации вставить ссылки на спектр выдыхаемого воздуха, т. е., пики диоксида углерода. Произвести запись вычисленной концентрации.

4. Произвести теоретический расчет величины  $\delta^{13}C$  по формуле (за основу взять стандартное отношение  $\delta^{13}C$ ).

5. Открыть другое окно программы, выбрать “рассчитать величину  $\delta^{13}C$ ” и сравнить с теоретическими.

### **3.3. Требования к отчету**

Отчет необходимо оформить в соответствии с приложением Б.

### **3.4. Контрольные вопросы**

1. Какие изотопы углерода изучают в медицинских приложениях?
2. Что такое  $\delta^{13}C$ ?
3. Какую газовую компоненту выдыхаемого воздуха изучают для определения заболеваний человека?
4. Какие свойства газовой пробы и как влияют на интенсивность рамановского рассеяния?

5. Какие технические характеристики газоанализатора и как влияют на его калибровочную функцию?

#### Лабораторная работа №4.

##### Измерение рамановских спектров биологических образцов

Цель: изучить особенности измерения спектров рамановского рассеяния биологических образцов.

Задачи:

1. определить влияние длины волны лазера на характеристики спектров рамановского рассеяния биологических образцов;
2. измерить спектр рамановского рассеяния биологического образца.

#### 4.1. Краткая теоретическая справка

При экспериментальных исследованиях спектра рамановского рассеяния света стоит учитывать, что поток рассеянного излучения составляет малую долю от падающего излучения ( $10^{-5} \div 10^{-7}$ ), следовательно, случайное попадание света, рассеянного упруго (рэлеевского) даст большой вклад в детектируемый сигнал.

Поэтому для регистрации спектров рамановского рассеяния необходимо, чтобы уровень рэлеевского излучения был низким, а мощность зондирующего пучка была не менее десятка мВт.

Для того, чтобы уменьшить вклад от упругого рассеяния используются двойные или тройные монохроматоры, либо «Edge»-фильтр, который пропускает излучение с длиной волны больше заданной. Также используется «notch»-фильтр, который не пропускает длины волн в заданном узком диапазоне спектра. Фильтры должны согласовываться со спектром излучения используемого лазера.

Так как сигнал КРС довольно слабый, то часто необходимое условие регистрации спектра – увеличенное время накопления сигнала (длительность экспозиции), порядка десятков секунд, что требует охлаждения фотоприемника.

Обычно в современных рамановских спектрометрах используются твердотельные лазеры с длинами волн 532, 785, 830 и 1064 нм, а также газовые лазеры, к примеру, He-Ne, с длиной волны 632,8 нм. Интенсивность рамановского рассеяния ( $I_R$ ) зависит от частоты лазерного излучения ( $\nu_0$ ) следующим образом:

$$I_R = I_0 \sigma_j^0 (\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_j)^4 D d_z \quad (4.1)$$

здесь  $I_0$  – мощность лазерного излучения,  $\sigma_j^0$  – частотно независимое сечение рассеяния,  $D$  – концентрация молекул,  $d_z$  – длина оптического пути лазера в образце. Таким образом, увеличение частоты (уменьшение длины волны) лазерного излучения приводит к увеличению интенсивности рамановского сигнала.

Хотелось бы отметить, что интенсивность антистоксова рассеяния меньше интенсивности стоксова на несколько порядков.



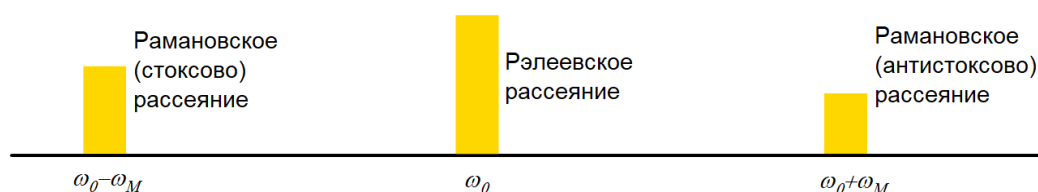


Рисунок 4.1 – Спектр, соответствующий процессам неупругого (рамановского) и упругого (рэлеевского) рассеяния света

Интенсивность рассеяния линейно возрастает с увеличением мощности лазера. Отношение интенсивности антистоксовой линии к стоксовой определяется отношением населенностей основного и возбужденного уровней вследствие того, что вероятность рассеяния пропорциональна числу рассеивающих молекул.

Малую интенсивность антистоксовой компоненты можно объяснить малой населенностью возбужденных уровней при комнатной температуре. При увеличении температуры возрастает и интенсивность.

### Биологический образец

С точки зрения оптики различные биологические ткани и жидкости (кровь, лимфа, слюна и т.д) можно разделить на два класса:

1. Сильно рассеивающие (непрозрачные) биоткани и жидкости – кожа, мозг, стенки сосудов и т.д. Оптические свойства таких образцов могут быть описаны в рамках многократного рассеяния скалярных или векторных волн в случайно-неоднородной поглощающей среде.

2. Слаборассеивающие (прозрачные) биоткани и жидкости – роговица, хрусталик, слезная жидкость. Свойства данных образцов можно описать в рамках однократного рассеяния (или рассеяния малой кратности) в упорядоченной среде с плотноупакованными центрами поглощения или рассеяния.

Стоит отметить, что некоторые колебания могут возбуждаться как при поглощении, так и при рамановском рассеянии, другие же только при одном из этих процессов. Активность колебания при рамановском рассеянии возникает благодаря изменениям поляризуемости. Следовательно, по поляризационному состоянию падающего и рассеянного света можно получить информацию о симметрии молекулы.

Метод рамановского рассеяния обладает некоторыми характеристиками, которые делают его особенно подходящим для исследований сильно рассеивающих биотканей как *in vitro*, так и *in vivo*.

При анализе различных типов тканей применяют различные оптические схемы. Для прозрачных образцов объектив, собирающий рамановское рассеяние, устанавливают за образцом (собирается рассеяние сонаправленное с лазерным излучением). Для рассеивающих образцов применяют конфокальную оптическую схему, в которой объектив, фокусирующий лазерное излучение, и объектив, собирающий рассеянное излучение, устанавливают с одной стороны от образца (собирается излучение

направленное в противоположном направлении от направления лазерного излучения).

Биологические образцы могут содержать воду, белки, иммуноглобулины, гликопротеины, бактерицидные белки, клеточные элементы, и другие вещества. Такие биологические молекулы хорошо поглощают в УФ и видимой области спектра. Часть поглощённой энергии излучения идёт на нагрев образца, а часть высвобождается за счёт люминисценции. Спектр люминисценции содержит излучение с частотами фотонов, образующихся при переходе молекулы, атома из возбуждённого состояния в основное состояние. Спектр люминисценции находится в области с большей длиной волны, чем длина волны поглощённого излучения. Излучение люминисценции повышает уровень шума на приёмнике и также может по интенсивности превосходить рамановское рассеяние, что приводит к невозможности проведения измерения спектров рамановского рассеяния биологического образца. Для уменьшения влияния люминисценции, при исследовании биологических образцов, применяют лазеры с длиной волны 633, 785, 830 и 1064 нм.

#### 4.2. Порядок выполнения работы

Работа выполняется с применением программного обеспечения, установленного на ПК, к которому подключена лабораторная установка.

Включение лабораторной установки, ПО проводить в соответствии с приложением А. Описание лабораторной установки представлено в лабораторной работе №1 в пункте 1.2.

1. Установить кювету с подготовленным образцом на предметный столик.
2. Включить установку и запустить ПО.
3. Настроить длительность экспозиции так, чтобы максимальное значение рамановского сигнала находилось в пределах от 50% до 80% максимального диапазона приёмника.
4. Снять спектр рамановского рассеяния не менее 10 раз.
5. Занести в таблицу по 1 пики рамановского рассеяния.

Таблица 5.1 - Положение пиков рамановского рассеяния биологического образца

№ п/п	Положение пиков рамановского рассеяние см <sup>-1</sup> /нм
1	
...	

#### 4.3. Требования к отчету

Отчет необходимо оформить в соответствии с приложением Б.

#### 4.4. Контрольные вопросы

1. Какие свойства биологических образцов влияют на выбор лазерного источника излучения?

2. Какая из компонент рамановского рассеяния лежит в области спектра люминисценции образца?
3. Какая из компонент рамановского рассеяния наиболее/наименее интенсивна и почему?
4. Какие особенности имеет спектр рамановского рассеяния биологического образца?
5. Как можно уменьшить влияние люминисценции на спектр рамановского рассеяния?

## Лабораторная работа №5.

### Машинное обучение при обработке рамановских спектров

Цель: освоить основы применения машинного обучения для обработки рамановских спектров.

Задачи:

1. Познакомиться с основными функциями, применяемыми в машинном обучении для обработки рамановских спектров биологических образцов;
2. Провести обработку полученных в лабораторной №4 результатов измерений с помощью методов машинного обучения.

#### 5.1. Краткая теоретическая справка

Комбинационное рассеяние света (раман-спектроскопия) представляет собой оптический метод характеристики вещества. Для точного анализа и исключения ошибок измерения используются различные методы обработки полученных данных, для разработки точных моделей, которые впоследствии могут быть использованы вместе с инструментами *in vivo* для проведения оценки состояния выдыхаемого воздуха или других образцов для различных биологических и медицинских применений.

В спектроскопии определение пиков с большой точностью может оказать значительное влияние на надежность результатов, а соответственно, на определение содержания следов определенного типа следов в выдыхаемом воздухе. В случае отсутствия надежной и подробной базы данных, охватывающей большинство известных спектральных пиков, точная идентификация химического состава образца является трудоемкой задачей.

Например, из литературы известно, что эффективность анализа спектрограмм и обнаружения типовых для, например, опухолевой ткани изменений, достигаемая с помощью различных методов обработки сигналов, различается. Сообщается, что метод главных компонент (PCA – principal component analysis) вместе с методом опорных векторов (SVM – support vector machine) дает наибольшую точность (99,9%), затем комбинация PCA и искусственных нейронных сетей дает точность в 98%, и логистический регрессионный анализ (LRA) показывает 97%.

Так, обработка сигналов должна включать в себя несколько этапов: предварительная обработка спектра (в основном для удаления паразитных элементов), представление спектра в необходимом для дальнейшего изучения виде, выявление определенных особенностей, удаление ошибок, затем отбор и классификация особенностей.

Математически спектр КРС можно рассмотреть как вектор в N-мерном пространстве. Его размерность определяется количеством значений в диапазоне спектра. Каждая ось в N-мерном пространстве отвечает за один элемент в векторе. Для того, чтобы уменьшить размерность вектора, используют PCA метод (суть метода заключается в вычислении ковариационной матрицы для уменьшения избыточности данных и максимизации дисперсии).

Для сравнения спектров между собой необходимо вычислить расстояние между ними. Для этого используют функции расстояния. Помимо Евклидова расстояния, используют картирование по спектральному углу (SAM – spectral angle mapper), где для сравнения используется угол между векторами.

$$p(x, x') = \cos^{-1} \left( \frac{\sum_i^n x_i x'_i}{(\sum_i^n x_i^2) \sum_i^n x_i'^2} \right). \quad (5.1)$$

Основные библиотеки для языка Python, которые будут необходимы для обучения обработке спектров рамановского рассеяния:

- 1) **sklearn**;
- 2) **numpy**;
- 3) **pandas**;
- 4) **tpot**;
- 5) **glob**.

**Функция sklearn.decomposition.PCA.** Данная функция применяется при анализе главных компонент - PCA (от англ. - principal component analysis). Функция осуществляет уменьшение линейной размерности данных с использованием разложения данных по сингулярным значениям для проецирования их в пространство более низкой размерности. Входные данные центрируются, но не масштабируются для каждой функции перед применением разложения на сингулярные вектора - SVD (от англ. - singular vector decomposition). В зависимости от представления входных данных и количества компонент, которое необходимо найти, функция использует либо функцию “numpy.linalg.svd”, либо применяет метод упрощённого разложения на сингулярные вектора, предложенный Halko в 2009 году. Также присутствует возможность применения ARPACK-реализации упрощённого разложения на сингулярные вектора. На рисунке 5.1. представлены зависимости двух компонент.

### **Функция sklearn.preprocessing.StandardScaler**

Нормализация функций производится путем удаления среднего и масштабирования до значения дисперсии исследуемой величины.

Нормализация данных часто применяется при использовании методов машинного обучения. К примеру, некоторые функции алгоритмов обучения работают с функциями, данные которых расположены вблизи 0. Так как не все функции могут быть стандартными, к примеру, нормальное распределение может не быть стандартным, т.е. его математическое ожидание не равно нулю, а его дисперсия не равна единице. К примеру, если какая-то функция с дисперсией больше, чем у других функций, то она начинает доминировать над целевой функцией и не позволяет системе обучаться на прочих функциях.

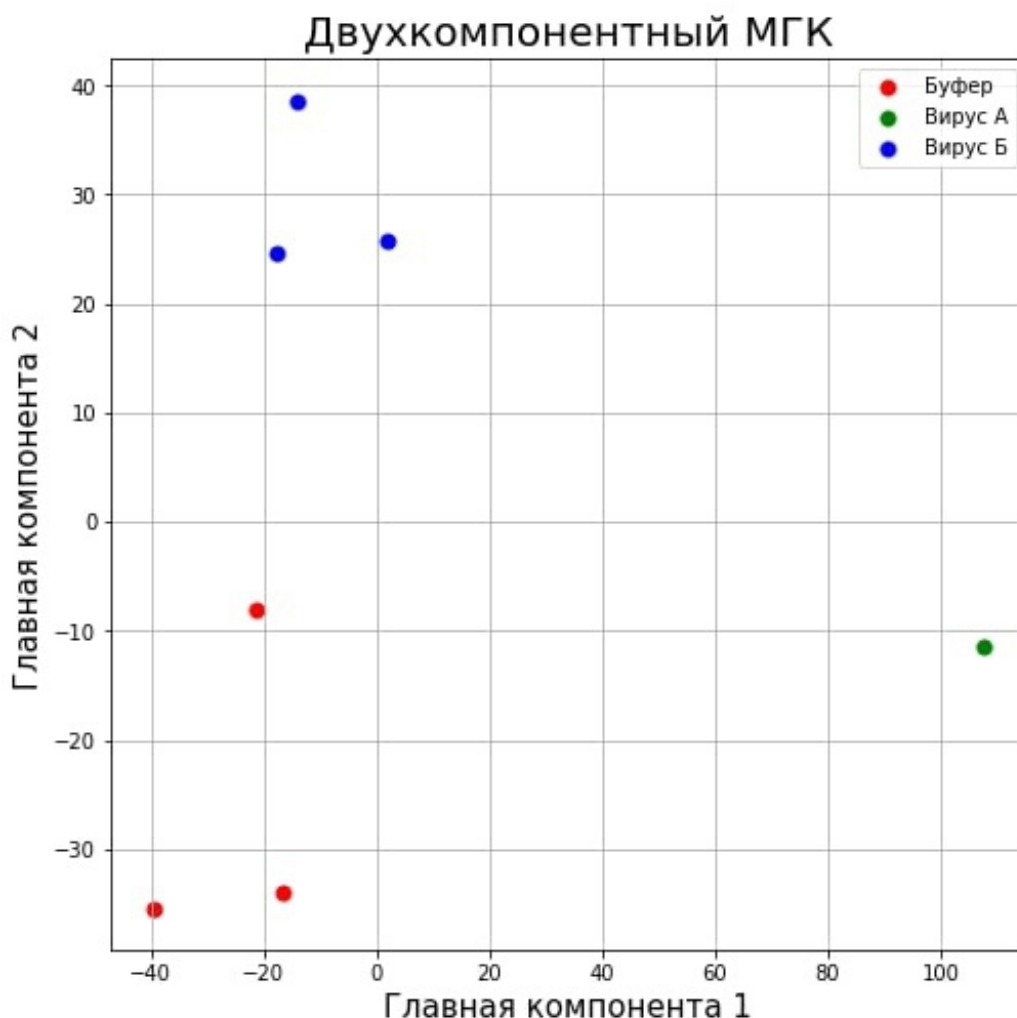


Рисунок 5.1. Метод главных компонент

**Функция `pandas.concat`** позволяет объединять объекты вдоль одной из осей.

**Функция `sklearn.svm.SVC`** позволяет осуществлять классификацию С-опорных векторов. Реализация основана на библиотеке `libsvm`. Время аппроксимация увеличивается квадратично в зависимости от количества отсчетов и может оказаться слишком долгим за пределами десятков тысяч отсчетов. Для больших наборов данных предпочтительнее использовать функции `LinearSVC` или `SGDClassifier`. Поддержка мультиклассов осуществляется по схеме «один против одного».

**Функция `pandas.DataFrame`** позволяет создавать двумерные, изменяемые по размеру неоднородные данные в табличном представлении. Структура данных также содержит оси (строки и столбцы). Арифметические операции выравниваются по меткам строк и столбцов. Может рассматриваться как контейнер типа `dict` для объектов `Series`. Является ядром `pandas`, также как **series** (используется для работы с последовательностью одномерных данных). **DataFrame** позволяет использовать многомерные **series**.

## 5.2. Порядок выполнения лабораторной работы

Работа выполняется с применением программного обеспечения, установленного на ПК, к которому подключена лабораторная установка.

Включение лабораторной установки, ПО проводить в соответствии с приложением А.

Описание лабораторной установки представлено в лабораторной работе №1 в пункте 1.2.

1. Включить установку и запустить ПО.
2. Перейти в режим анализа спектров рамановского рассеяния биологических образцов.
3. Для обработки выбрать файлы, полученные в результате измерения в четвёртой лабораторной.
4. Запустить обработку выбранных спектров.
5. Выписать значения пиков рамановского рассеяния, заполнить таблицу, по примеру таблицы 5.1
6. Сравнить полученные результаты с результатами, полученными в четвёртой лабораторной работе.

Таблица 5.1 - Положение пиков рамановского рассеяния биологического образца

№ п/п	Положение пиков рамановского рассеяние см <sup>-1</sup> /нм
1	
...	

## 5.3. Требования к отчету

Отчет необходимо оформить в соответствии с приложением Б.

## 5.4. Контрольные вопросы

1. Расскажите о принципе идентификации химического состава с помощью комбинационного рассеяния света.
2. Назовите основные принципы машинного обучения.
3. Назовите этапы обработки сигналов. Какие возникают особенности в спектре?
4. Какие методы обработки сигналов существуют? В чем их различия?
5. Как сравнить спектры между собой?

### **Рекомендуемая литература**

1. Беккер Ю. Спектроскопия. Москва: Техносфера, 2009.
2. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. Москва: Техносфера, 2007.
3. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. Москва: Мир, 2003.
4. Бенуэлл К. Основы молекулярной спектроскопии: Пер. с англ. М.: Мир, 1985. 384 с.
5. Бахшиев Н. Г. Введение в молекулярную спектроскопию: Учеб. пособие. 2-е изд., испр. и доп. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1987. 216 с



**Приложение А**  
**Работа с установкой**

### **Включение установки**

1. Запустить персональный компьютер, нажав на кнопку включения.
2. Включить спектральный модуль, для чего необходимо перевести его сетевой выключатель в положение «ON». При этом должна включиться подсветка сетевого выключателя и раздаться короткий звуковой сигнал, оповещающий об успешном окончании процедуры самодиагностики.
3. Включить фотоприёмный модуль, для чего необходимо перевести его сетевой выключатель в положение «ON». При этом должна включиться подсветка сетевого выключателя и раздаться короткий звуковой сигнал, оповещающий об успешном окончании процедуры самодиагностики.
4. Включить блок-системы охлаждения блока излучения, переведя сетевой выключатель в положении «ON», в результате должна загореться зелёная подсветка сетевого выключателя и загореться красный индикатор, расположенный над сетевым выключателем.
5. Спустя 5 секунд на индикаторе температуры охлаждающей жидкости, расположенным справа от сетевого выключателя, должно высветиться значение температуры охлаждающей жидкости. Нужно убедиться, чтобы температура составляла 22°C.

**ВНИМАНИЕ! Включать блок излучения при температуре охлаждающей жидкости находящейся не в пределе от 21,5°C до 22,5°C строго запрещается.**

6. Если температура охлаждающей жидкости не соответствует требуемому значению, нужно убедиться, что температура охлаждающей жидкости приближается к заданному диапазону с течением времени. Если это не происходит, то необходимо с помощью кнопок на панели индикатора температуры установить целевую температуру 22°C с помощью кнопок «верх»/«низ» (рисунок 1). Время достижения целевой температуры зависит от условий окружающей среды, но не должно превышать 15 минут. Если при правильно установленной целевой температуры превышает 15 минут, необходимо произвести выключение ИС в порядке действий, обратном порядку включения.

7. При успешном выполнении п 1.7 необходимо произвести включение блока питания лазера, переведя сетевой выключатель в положении «ON». При этом должна загореться зелёная подсветка выключателя и через две секунды должен загореться красный индикатор «Power».

8. При успешном выполнении п 1.7 необходимо произвести включение блока питания лазера, переведя сетевой выключатель в положении «ON». При этом должна загореться зелёная подсветка выключателя и через две секунды должен загореться красный индикатор «Power».

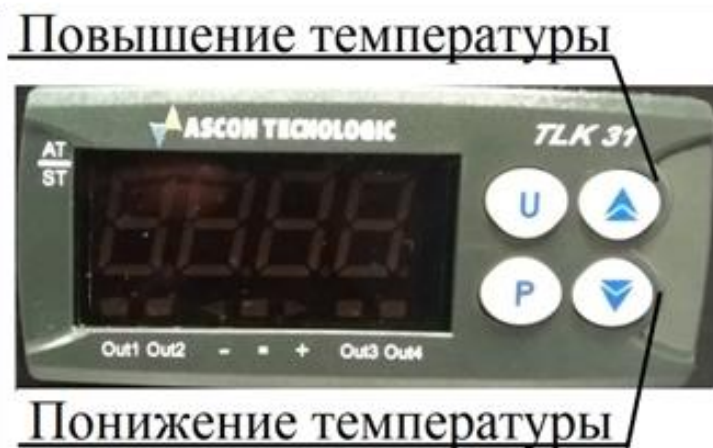


Рисунок 1 – Индикатор температуры охлаждающей жидкости

9. При успешном выполнении п. 1.8 необходимо повернуть ключ на передней панели блока питания по часовой стрелке в положении «ON». Через десять секунд появится лазерное излучение. Необходимо подождать 15 минут, прежде чем выходные характеристики излучения блока излучения достигнут паспортного значения.

10. Произвести включение блока питания лазера, переведя сетевой выключатель в положение «ON». При этом должна загореться зелёная подсветка выключателя и через 2 секунды должен загореться красный индикатор «Power».

11. Повернуть ключ на передней панели блока питания по часовой стрелке в положение «ON». Через 10 секунд появится лазерное излучение. Необходимо подождать 30 минут, прежде чем выходные характеристики излучения блока излучения достигнут паспортного значения.

12. Дождаться появления зелёной индикации показателя «МРГ готов к работе» в поле «Готовность» в ПО ЭО МРГ.

13. Включить питание вакуумного насоса.

14. Последовательно открыть вентили НАСОС, ТОНК.РЕГУЛ., ВЫХ.КЮВЕТЫ и ВХ.КЮВЕТЫ для создания в кювете пониженного давления и очистки газовой схемы от загрязнения.

15. Подождать 10 минут, после чего закрыть вентиль ВХ.КЮВЕТЫ.

**Процедура очистки газовой схемы** (проводится при необходимости измерения новой газовой смеси).

1. Удостовериться, что редуктор закрыт, после чего открыть вентиль ВХ.КЮВЕТЫ.

2. Открыть вентили ВЫХ.КЮВЕТЫ, ТОНК.РЕГУЛ. и СБРОС для сброса избыточного давления в газовой схеме (до 1 атм).

3. Закрыть вентиль СБРОС.

4. Открыть вентиль НАСОС.

5. Включить вакуумный насос.

6. Подождать 60 секунд.
7. В основном окне ПО ЭО МРГ убедиться, что установившееся в кювете давление составляет не более  $10^{-3}$  мм рт.ст.
8. Последовательно закрыть вентили ВХ.КЮВЕТЫ, ВЫХ.КЮВЕТЫ, ТОНК.РЕГУЛ. и НАСОС.
9. Выключить вакуумный насос, тем самым завершив процедуру очистки.

### **Порядок подключения и отключения баллона с газовой смесью.**

#### **Порядок подключения баллона.**

1. Убедиться, что все вентили редуктора закрыты.
2. С помощью накидной гайки подсоединить баллон с газовой смесью к редуктору
3. Открыть вентиль ВХ.КЮВЕТЫ для возможности запуска газовой смеси в кювету.
4. Открыть запорный вентиль на газовом баллоне.
5. Открыть входной вентиль редуктора.
6. Создать необходимое давление в газовой кювете.
7. Закрыть входной вентиль редуктора.
8. Открыть выходной вентиль тонкой регулировки редуктора.
9. Дождаться, когда давление в редукторе и в кювете выровняется (стрелка манометра редуктора остановится).
10. Закрыть выходной вентиль тонкой регулировки редуктора.

#### **Порядок отключения баллона**

1. Закрыть вентили редуктора и вентиль ВХ.КЮВЕТЫ
2. Закрыть запорный вентиль баллона.
3. Открутить накидную гайку.
4. Отсоединить баллон от редуктора.
5. Порядок заполнения кюветы исследуемым газом.
6. Проверить, что вентили ВХ.КЮВЕТЫ, ВЫХ.КЮВЕТЫ, НАСОС, СБРОС и ТОНК.РЕГУЛ. закрыты.
7. Подключить к редуктору газовый баллон, содержащий исследуемый газ, согласно пункту «Порядок подключения баллона».
8. Плавно открыть вентиль баллона.
9. Убедиться в установлении требуемого давления на манометре редуктора.
10. Закрыть вентиль баллона.
11. Открыть вентиль ВХ.КЮВЕТЫ
12. Плавно открыть вентиль редуктора до установления в кювете требуемого давления.

13. Последовательно закрыть вентиль редуктора и вентиль ВХ.КЮВЕТЫ.
14. В случае давления в кювете выше требуемого необходимо:
15. Проверить, что вентили ВХ.КЮВЕТЫ, ВЫХ.КЮВЕТЫ, НАСОС, СБРОС и ТОНК.РЕГУЛ. закрыты.
16. Открыть вентиль СБРОС.
17. Открыть вентиль ВЫХ.КЮВЕТЫ.
18. Закрыть вентиль ВЫХ.КЮВЕТЫ.
19. Если давление в кювете выше требуемого, открыть вентиль ТОНК.РЕГУЛ., после чего закрыть вентиль ТОНК.РЕГУЛ. и повторить п.п.2.3.7.9.1 - 2.3.7.9.4.
20. Если давление в кювете ниже требуемого, путем плавного открытия вентиля ТОНК.РЕГУЛ. выпустить небольшое количество газа, после чего закрыть вентиль ТОНК.РЕГУЛ. и открыть вентиль ВЫХ.КЮВЕТЫ.
21. Закрыть вентили «ТОНК.РЕГУЛ.», а также вентили ВХ.КЮВЕТЫ, ВЫХ.КЮВЕТЫ и НАСОС.

### Запуск ПО

1. Запустить ПК, и наведением указателя на ярлык программы и двойным нажатием левой кнопки ручного манипулятора типа «мышь» (далее – ЛКМ), запустить ПО ЭО МРГ.

При запуске программы открывается основное графическое окно ПО ЭО МРГ. Оно служит для мониторинга состояния и проверки работоспособности подсистем и датчиков ЭО МРГ с цветовой индикацией.

В основной области экрана находятся кнопки вызова соответствующих режимов: «Калибровка», «Измерения» и «Режим ИС». Внешний вид основного графического окна представлен на рисунке 5.

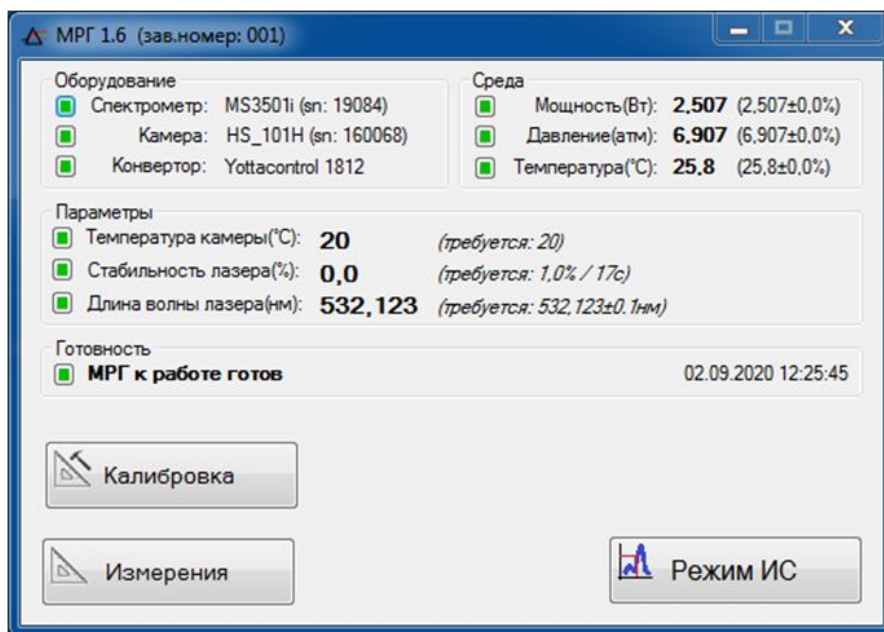


Рисунок 5 – Внешний вид основного графического окна

В окне режима «Калибровка» расположены области «Параметры измерения», «Результат измерения» и «Калибровка». Внешний вид окна «Калибровка» соответствует рисунку 6.

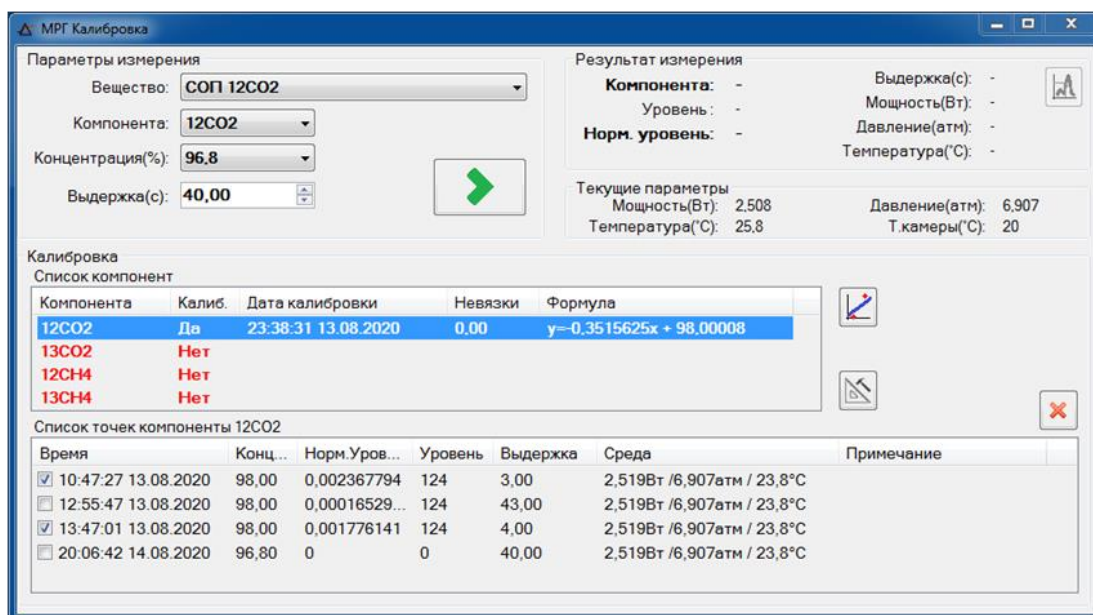


Рисунок 6 – Внешний вид окна «Калибровка»

В окне режима «Измерения» расположены области для осуществления настройки и измерения концентрации изотопов  $^{12}\text{CO}_2$ ,  $^{13}\text{CO}_2$ ,  $^{12}\text{CH}_4$ ,  $^{13}\text{CH}_4$  в газовых смесях, а также область с результатами измерений и возможностью сохранения результатов. Внешний вид окна «Измерения» соответствует рисунку 7.

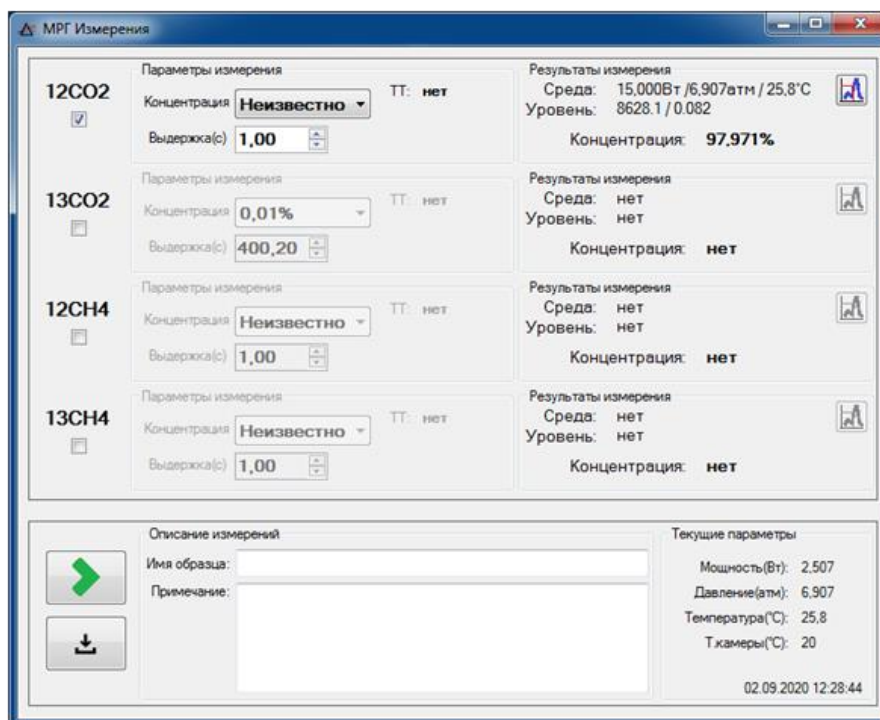


Рисунок 7 – Внешний вид окна вкладки «Измерение»

### **Настройка длительности экспозиции**

1. В окно «Выдержка---» ввести численное значение, для чего однократно нажать ЛКМ на полк ввода и с помощью клавиатуры ввести необходимо время. ВАЖНО! В качестве разделителя используется запятая.

2. Допускается установка длительности экспозиции с помощью кнопок



. Верхняя кнопка увеличивает длительность экспозиции, нижняя кнопка - уменьшает.

3. Нажать однократно ЛКМ в свободное поле окна программы.

### **Регулировка давления**

1. Давление в кювете регулируется с помощью вентиля ТОНК.РЕГУЛ.

2. Убедитесь, что насос отключен.

3. Убедитесь, что вентили НАСОС, ВХ.КЮВЕТЫ, ВЫХ.КЮВЕТЫ, ТОНК.РЕГУЛ, СБРОС закрыты (в закрытом положении ручка вентиля расположена перпендикулярно трубке транспортировки газовой смеси, для вентиля ТОНК.РЕГУЛ. Закрытое положение характерно невозможностью вращения вентиля по часовой стрелке).

4. Откройте вентиль ВЫХ.КЮВЕТЫ.

5. Новое давление будет отображаться в «Текущих параметрах», в строке «Давление».

6. Плавно вращая ручку вентиля ТОНК.РЕГУЛ. Установите значение давления в «Текущих параметрах», в строке «Давление» в пределах, указанных в очередной строке таблицы ХХ.

7. Закройте вентили ТОНК.РЕГУЛ., ВЫХ.КЮВЕТЫ.

8. Откройте вентиль СБРОС, повернув его так, чтобы ручка вентиля смотрела вдоль трубки транспортировки газовой смеси.

9. Закройте вентиль СБРОС

### **Проведение измерений**

1. Порядок действий при проведении измерений.

2. Включить ЭО МРГ согласно п.2.3.4 Руководства.

3. В главном графическом окне ПО ЭО МРГ проверить давление (при давлении свыше  $10^{-2}$  атм приостановить измерения, проверить вентили на наличие утечек и обратиться к разработчику системы), вентили ВХ.КЮВЕТЫ, ВЫХ.КЮВЕТЫ, НАСОС, СБРОС и ТОНК.РЕГУЛ. должны быть закрыты.

4. Подключить к редуктору газовый баллон с исследуемой смесью согласно п.2.3.6 Руководства.

5. Заполнить кювету исследуемой газовой смесью до необходимого давления согласно п.2.3.7 Руководства.

6. В главном графическом окне ПО ЭО МРГ нажатием на соответствующую кнопку открыть режим «Измерения».

7. Отметить в перечне компоненты, которые входят в состав измеряемой смеси.

8. В случае, если концентрация измеряемой компоненты известна, выбрать необходимое значение в выпадающем списке «Концентрация» в поле «Параметры измерения».

9. В случае, если концентрация измеряемой компоненты неизвестна, выбрать параметр «Неизвестно» в выпадающем списке «Концентрация» в поле «Параметры измерения» и вручную установить необходимую выдержку в поле «Выдержка».

10. Ввести наименование и химическую формулу измеряемого вещества в поле «Имя образца», при необходимости ввести дополнительную информацию об исследовании в поле «Примечание».

11. Нажать кнопку запуска измерения и следовать указаниям всплывающих окон.

а. При появлении всплывающего окна «Темновой ток не измерен. Выполнить измерение темнового тока?» выбрать вариант «Да».

б. При появлении всплывающего окна «Темновой ток измерен. Начать измерение калибровочной компоненты?» выбрать вариант «Да».

с. Всплывающее окно с текстом «Измерение завершено» свидетельствует об окончании процесса измерения.


12. Результаты измерений выводятся в поле «Результаты измерения» для соответствующих компонент.

При необходимости детального рассмотрения полученного спектра для выбранной компоненты нажать на кнопку с изображением графика, расположенную в правой части поля «Результаты измерения» – измеренный спектр откроется в Программном приложении для обработки экспериментальных данных исследовательского стенда (далее – ПО ИС), управление которым осуществляется согласно RU.СНАБ.00701-01 34 01.


13. Произвести сохранение протокола измерений путем нажатия на кнопку сохранения измерений.

14. По окончании измерения произвести очистку газовой схемы согласно п. «Очистка газовой схемы» настоящего приложения и при необходимости нового измерения осуществить замену баллона согласно п. «Замена баллона».

### **Сохранение результатов**

Результаты измерений выводятся в поле «Результаты измерений» для каждого отдельного изотополога. По нажатию ЛКМ на кнопку  записанный спектр измеренного изотополога открывается в программном приложении для обработки экспериментальных данных ИС.



По нажатию ЛКМ на кнопку  открывается окно с выбором места сохранения и наименования сохраняемого протокола измерений в виде \*.txt файла в формате кодировки ASCII (рисунок 1.8).

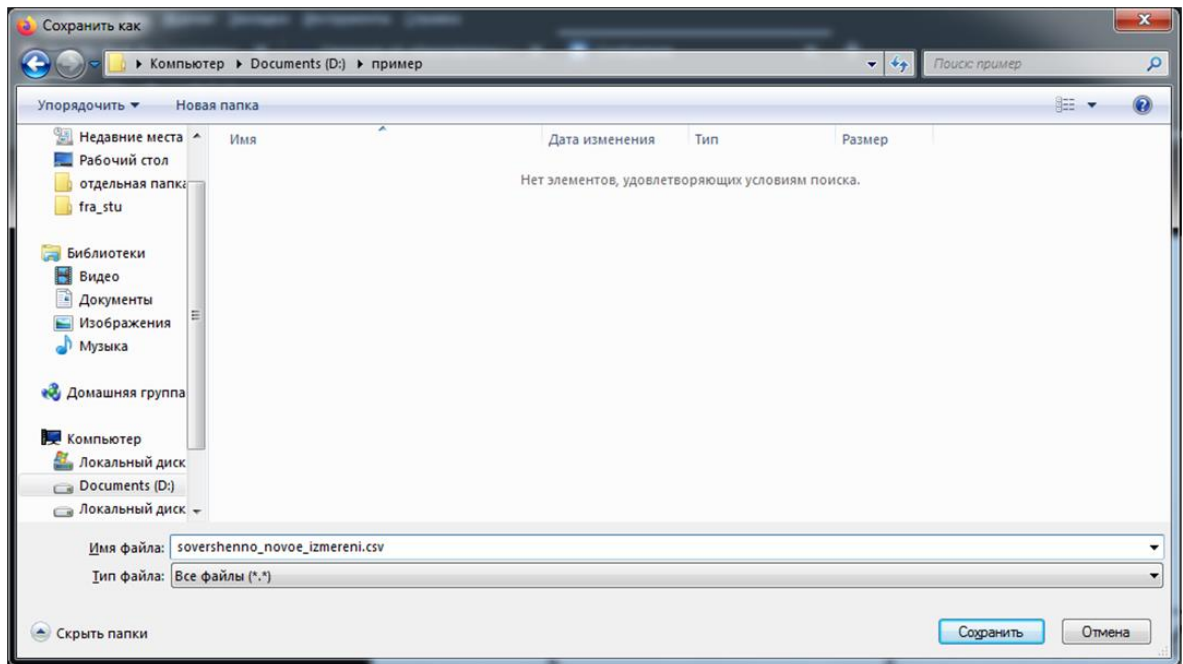


Рисунок 8 – Окно с выбором места сохранения и наименования сохраняемого файла

**Приложение Б**  
**Пример оформления отчета**

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования**

**«Национальный исследовательский университет ИТМО»**

**(титульный лист оформляется на отдельном листе)**

**ОТЧЕТ**

**ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ №1**

**«Название лабораторной работы согласно методическому пособию»**

**Выполнили:**

**А.А. Иванов** \_\_\_\_\_

**Проверил:**

**А.В. Иванов** \_\_\_\_\_

**Санкт-Петербург**

**2021**

(с новой страницы)

## **1. Цель**

В соответствии с методическими указаниями.

## **2. Задачи**

- 2.1. Ознакомиться с эффектом комбинационного рассеяния
- 2.2. ...

Задачи необходимо ставить в соответствии с ожидаемыми результатами выполнения лабораторной работы.

Задачи могут быть поставлены как теоретические (изучить, ознакомиться...), так и практические (получить, исследовать...).

Каждая поставленная задача должна быть выполнена, а процесс выполнения должен быть описан в разделе «Ход работы».

## **3. Краткие теоретические сведения**

- 3.1. Комбинационное рассеяние или эффект Рамана — это...
- 3.2. ...

В пунктах раздела «Краткие теоретические сведения» должны содержаться все пункты из раздела «Задачи», содержащие слова «изучить, ознакомиться...» однако, если раздел «Краткие теоретические сведения» будет содержать большее количество пунктов, то это будет приветствоваться.

## **4. Схема измерений**

Рисунок 1 — Схема измерений может быть скопирована из методических указаний

## **5. Ход работы**

- 5.1. ...
- 5.2. ...
- 5.3. ...
- 5.4. ...
- 5.5. ...

Пункты раздела «Ход работы» должны быть строго согласованы с поставленными задачами. Для теоретически изученных задач, описание которых вошло в раздел «Обзор литературы», в тексте соответствующего пункта раздела «Ход работы» можно ссылаться на пункт «Краткие теоретические сведения» БЕЗ необходимости дублирования информации.

## **6. Заключение**

В разделе «Заключение» не следует использовать рисунки и формулы, при необходимости на них нужно ссылаться в соответствующие пункты раздела «Ход работы».

Раздел «Заключение» должен содержать краткое описание всех результатов работы с авторскими комментариями для каждого результата. Объем данного раздела должен составлять примерно 500 слов.

## **7. Список использованных источников**

На каждый источник должна быть приведена ссылка в разделе «Обзор литературы». НЕ следует ссылаться на источники в других разделах.

Евгений Эдуардович Попов  
Владимир Владимирович Виткин

# **ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

**Учебно-методическое пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

**Редакционно-издательский отдел**  
**Университета ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49