



Univerzita Palackého
v Olomouci

Motivace pro vývoj komerčního Ramanova spektrometru

Josef Kapitán
kapitan@optics.upol.cz



Obsah

- Ramanův jev a Ramanova spektroskopie
- Optická aktivita
- Ramanova optická aktivita (ROA) – uplatnění a význam
- Vývoj ROA spektrometru a první dosažené výsledky
- Komercializace ROA spektrometru





Univerzita Palackého
v Olomouci

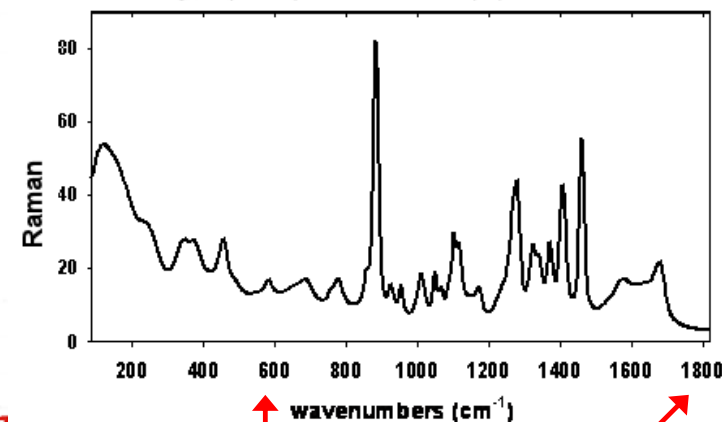
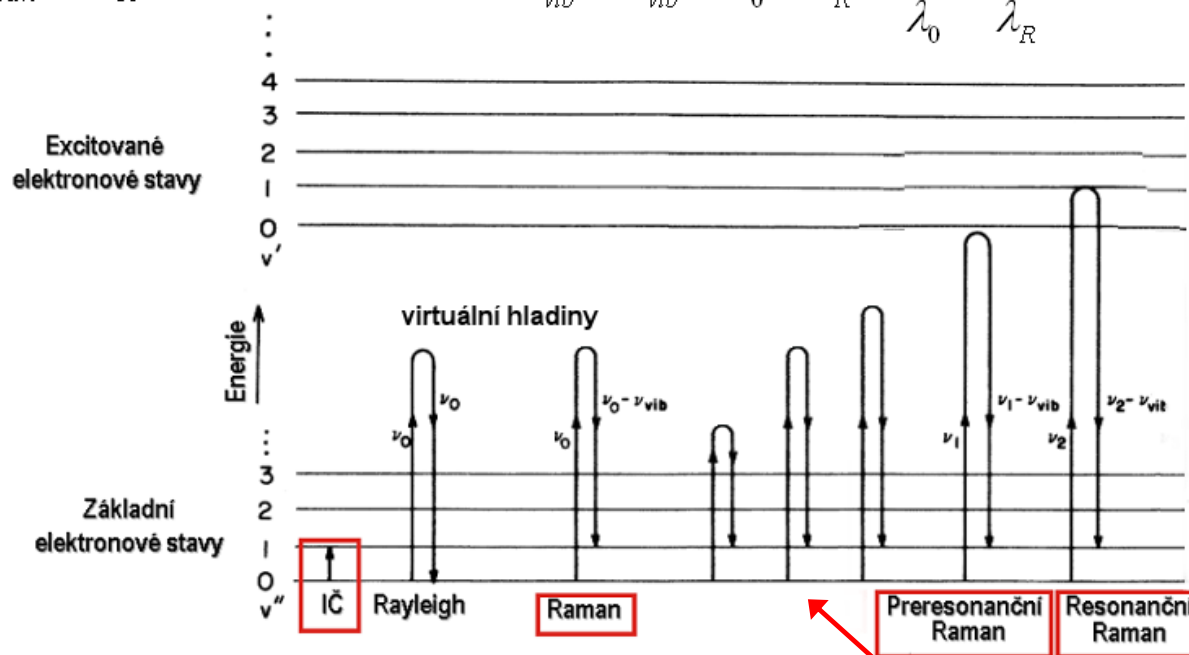
Ramanova spektroskopie

$$I_{\text{Raman}} \sim \bar{\nu}_R^4$$

$$\Delta E_{\text{vib}} \sim \bar{\nu}_{\text{vib}} = \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_R = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda_R}$$



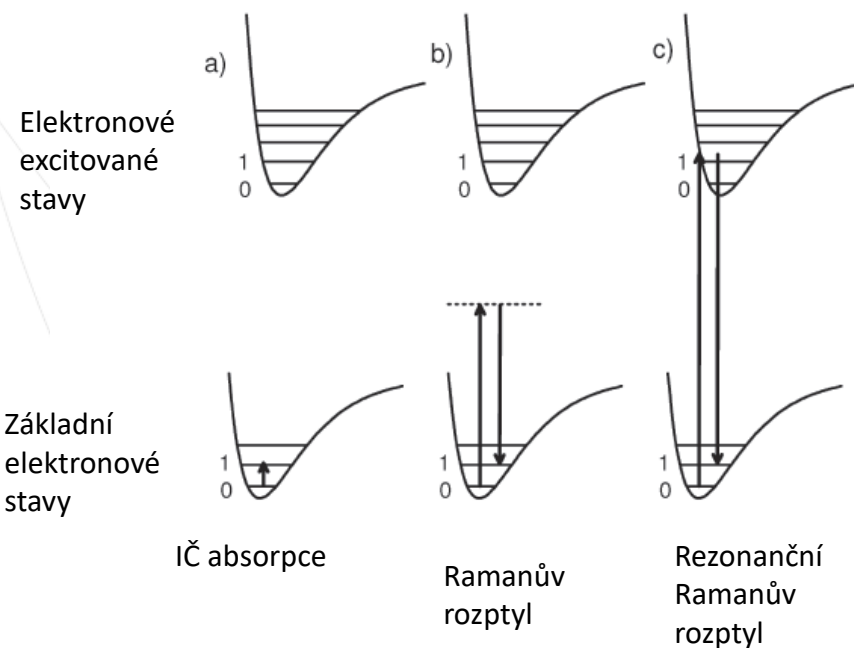
Ala-Ala



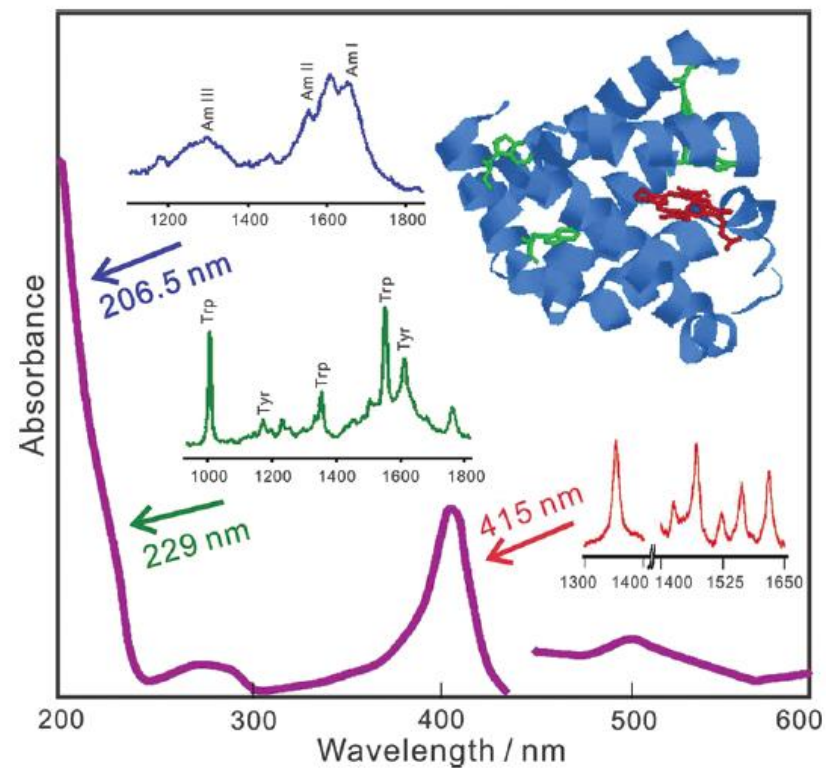
Rozsah vlnových délek Ramanova rozptylu
pro různé excitační vlnové délky (λ_0)

λ_0	$\nu_{\text{vib}} = 600 \text{ cm}^{-1}$	$\nu_{\text{vib}} = 1800 \text{ cm}^{-1}$
1064	1137	1316
532	550	588
356	364	380
229	232	239

Ramanova spektroskopie



Ramanova spektra myoglobinu



- rezonanční zesílení Ramanova signálu chromoforu o několik řádů



Univerzita Palackého
v Olomouci

Historie objevu Ramanova rozptylu

1923 – A. Smekal: teoretická předpověď
neelastického rozptylu fotonů

Adolf Smekal



1928 – Objev of Ramanova rozptylu
21 Feb – G. Landsberg &
L. Mandelstam
28 Feb – C. V. Raman & K. S. Krishnan

**Chandrasekhara
Venkata Raman**



1930 – Nobelova cena za fyziku: C. V. Raman

Georg Placzek

1934 – G. Placzek: kompletní teorie
Ramanova rozptylu na základě
kvantové mechaniky





Univerzita Palackého
v Olomouci

Historie objevu Ramanova rozptylu



Adolf Smekal

Olomouc
1911-12



**Chandrasekhara
Venkata Raman**



Georg Placzek

Brno
nar. 1905





Univerzita Palackého
v Olomouci

Experimentální podmínky Ramanovy spektroskopie

Spektra měřená v době objevu (1930-60)

- Spektrální rozlišení: 10 cm^{-1}
- Objem vzorku: 1 litr
- Doba expozice: cca 40 hodin

Spektra měřená dnes (lasery, citlivé detektory, ...)

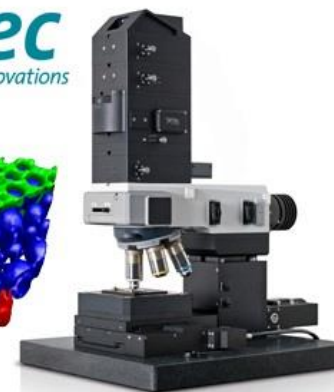
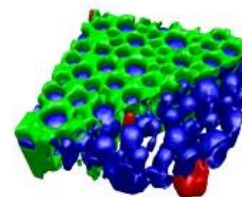
- Spektrální rozlišení: 5 cm^{-1} ($0,1$ až 10 cm^{-1})
- Objem vzorku: typicky 1 nanolitr (mikroskopie $<10^{-15} \text{ L}$)
- Doba expozice: $0,1 \text{ s}$ (možné studium ps-fs jevů)

Ruční spektrometry



Ramanův mikroskop

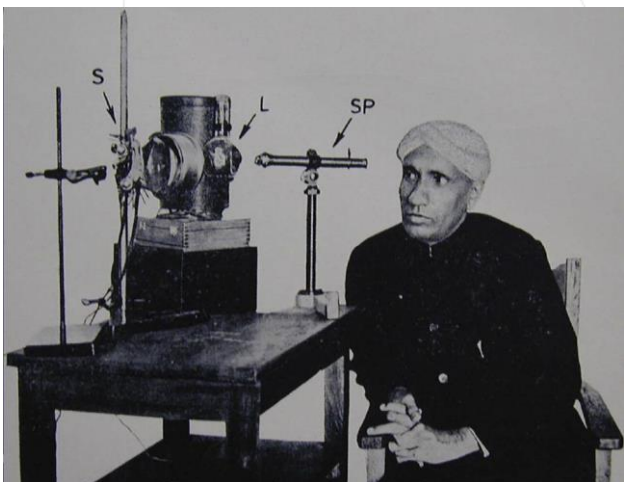
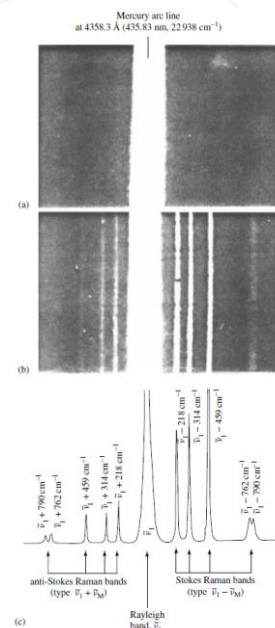
WITec
focus innovations



ThermoFisher
SCIENTIFIC



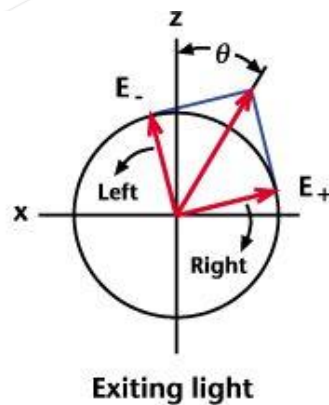
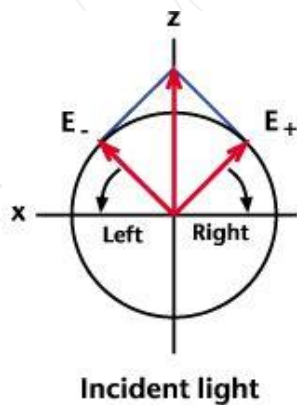
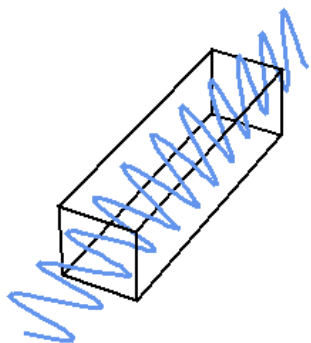
Standardní technika v oblasti analytické chemie a materiálových věd





Optická aktivita

Opticky aktivní systém – stáčí rovinu lineárně polarizovaného svazku (optická rotace)



$$\theta = \frac{\pi d}{\lambda} (n_R - n_L)$$

Optická aktivita (obecně):

– rozdílná odezva vůči levo a pravotočivě polarizovanému záření



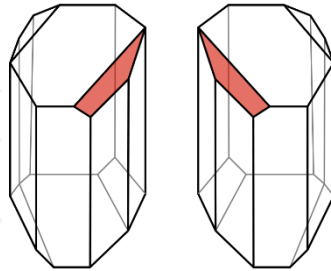
Univerzita Palackého
v Olomouci

Opticky aktivní látky – chiralita

Louis Pasteur (1848):

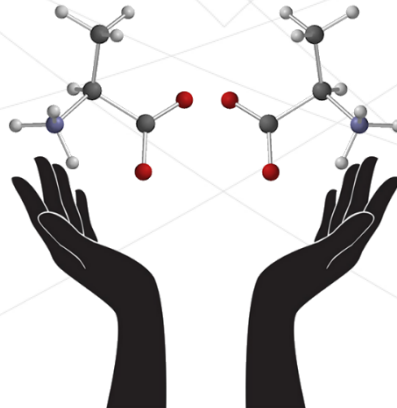
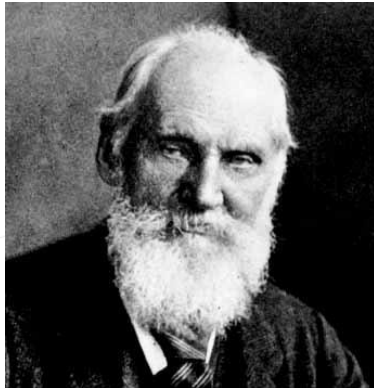


Molekuly, které jsou si navzájem zrcadlovými obrazy vykazují optickou rotaci stejné velikosti ale opačného znaménka



Krystaly kyseliny vinné

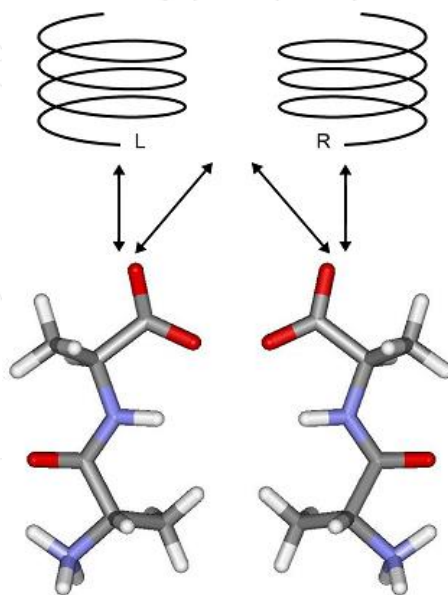
Lord Kelvin (William Thompson), definice chirality (1904):



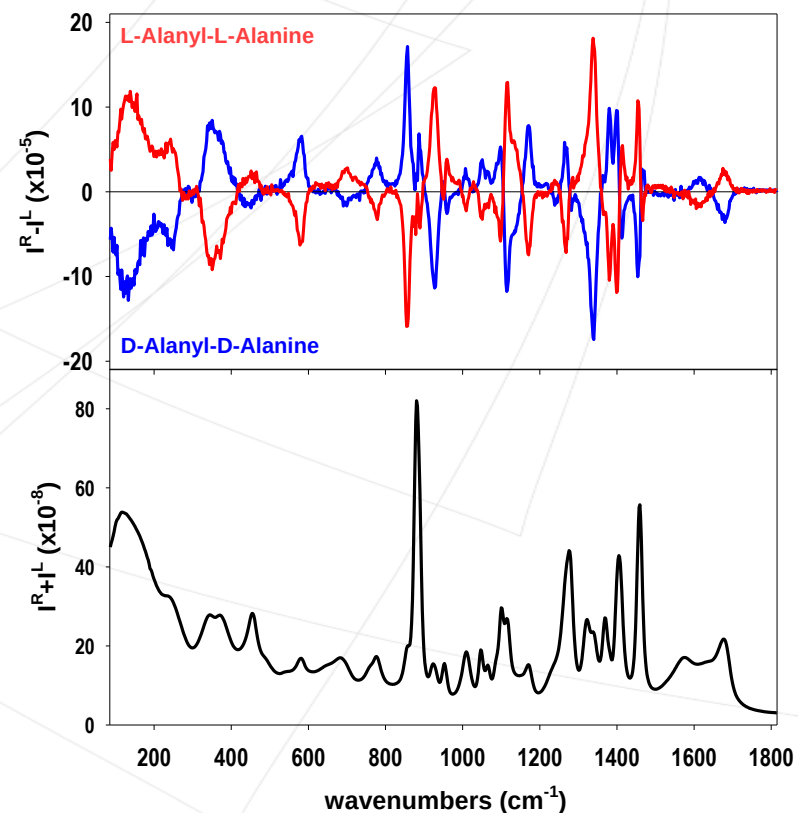
Jakýkoli geometrický útvar nebo skupinu bodů nazývám chirální a říkám, že vykazuje chiralitu, pokud se jeho obraz v rovinném zrcadle nemůže shodovat sám se sebou.

Ramanova optická aktivita

- měří **malou změnu** Ramanova signálu při interakci chirálních molekul s levo- a pravotočivě kruhově polarizovaným zářením
- umožňuje určit absolutní konfiguraci,
- poskytuje informace o prostorovém uspořádání chirálních molekul v roztoku



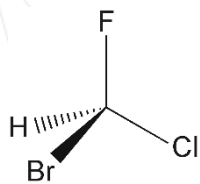
L-alanyl-L-alanine D-alanyl-D-alanine



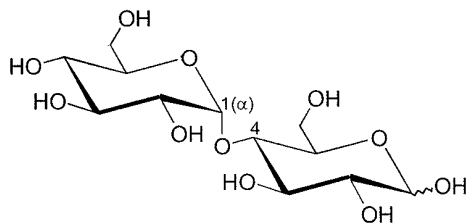


Univerzita Palackého
v Olomouci

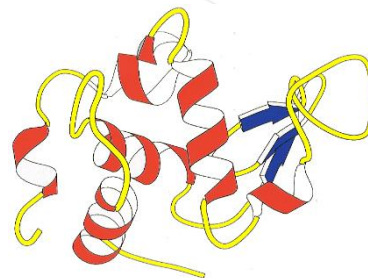
Ramanova optická aktivita – využití



jednoduché
organické
molekuly



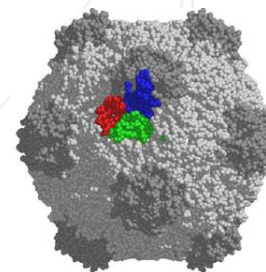
složitější
molekulární
systémy



proteiny



nukleové
kyseliny



viry

Využití: - od výzkumu (řešení základního problému strukturní biologie)

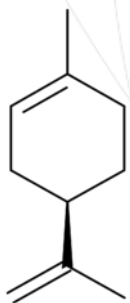
- po farmaceutický průmysl (stanovení enantiomerního přebytku chirálních léčiv)



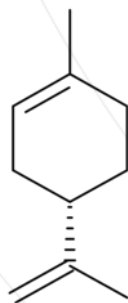
Univerzita Palackého
v Olomouci

Určování absolutní konfigurace - zásadní úloha farmaceutického průmyslu

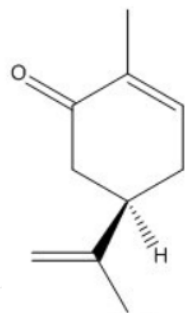
Příklady:



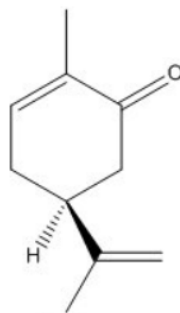
R-(+)-Limonene
pomeranč



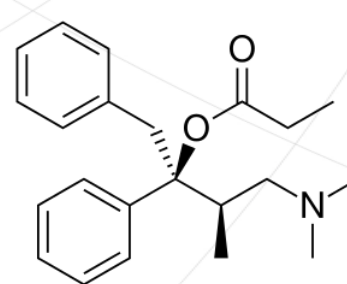
S-(-)-Limonene
citron



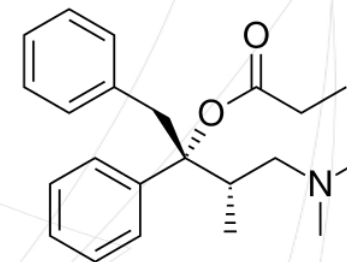
R-(-)-Carvone
máta peprná



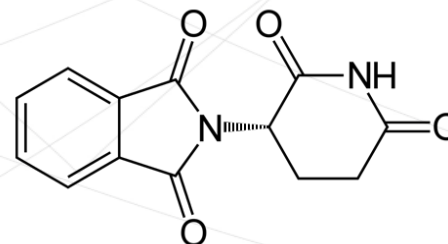
S-(+)-Carvone
kmín



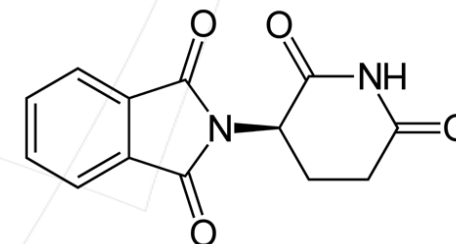
Dextropropoxyphene (Darvon)
- prostředek proti bolesti



Levopropoxyphene (Novrad)
- prostředek proti kašli



S-(-)-Thalidomide
- teratogen
- karcinogen



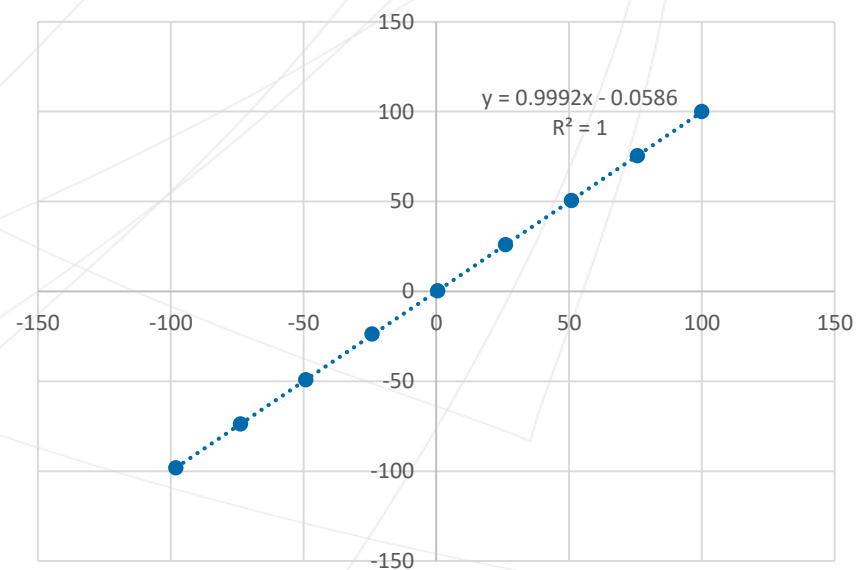
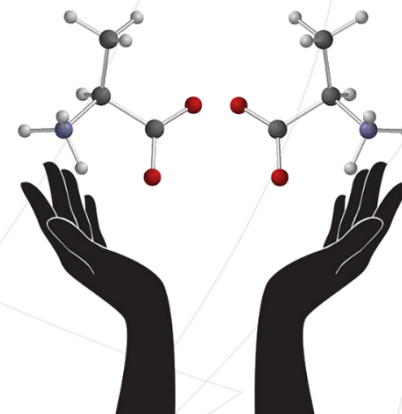
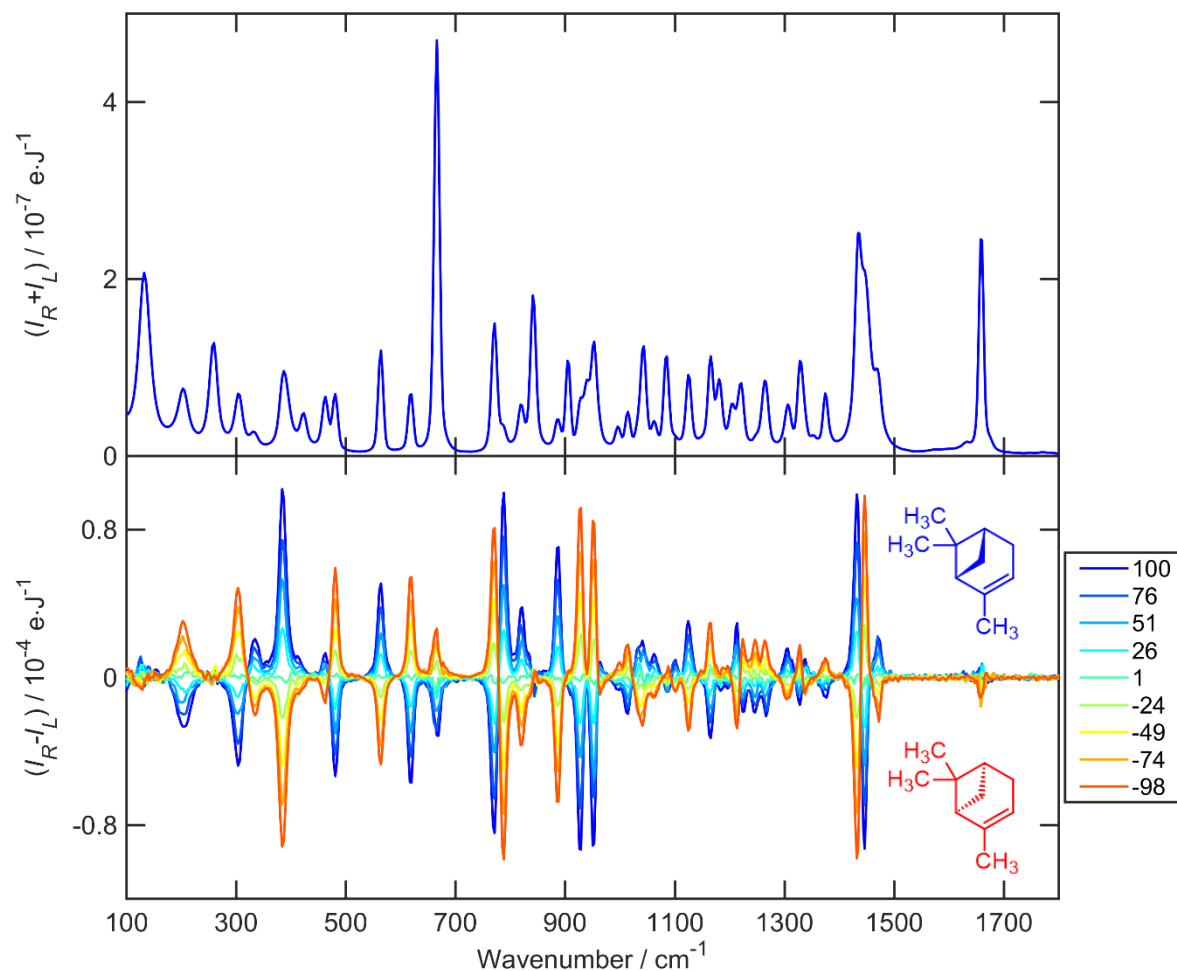
R-(+)-Thalidomide
- uspávací látka
- hypnotikum



Univerzita Palackého
v Olomouci

Určování enantiomerního přebytku

Určování enantiomerního přebytku α -pinenu



- přesnost (správnost) určení enantiomerního přebytku pomocí ROA $< 0,3\%$

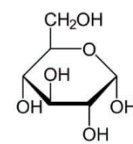
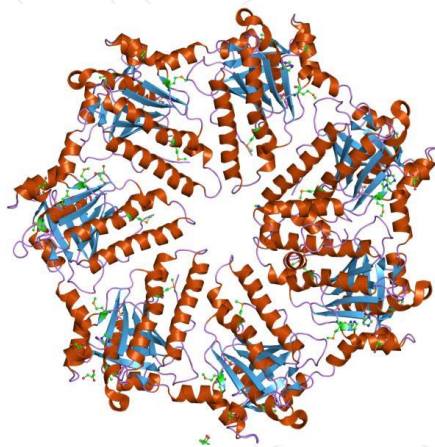


Univerzita Palackého
v Olomouci

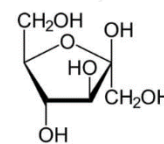
Homochiralita

L-aminokyseliny → bílkoviny

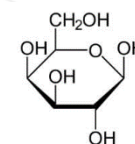
D-cukry → nukleové kyseliny



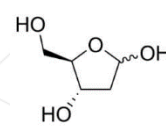
D-Glucose



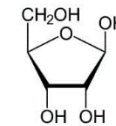
D-Fructose



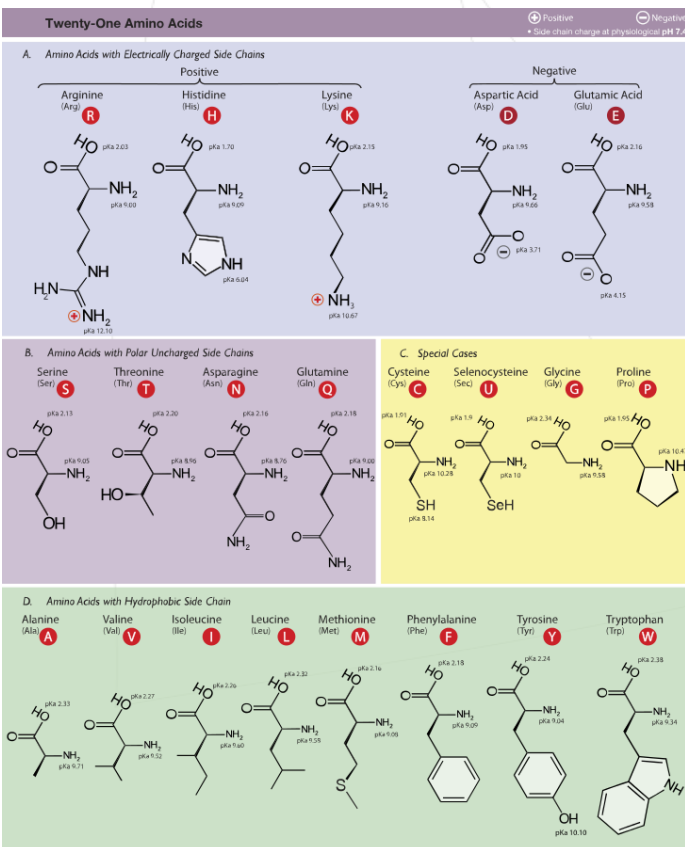
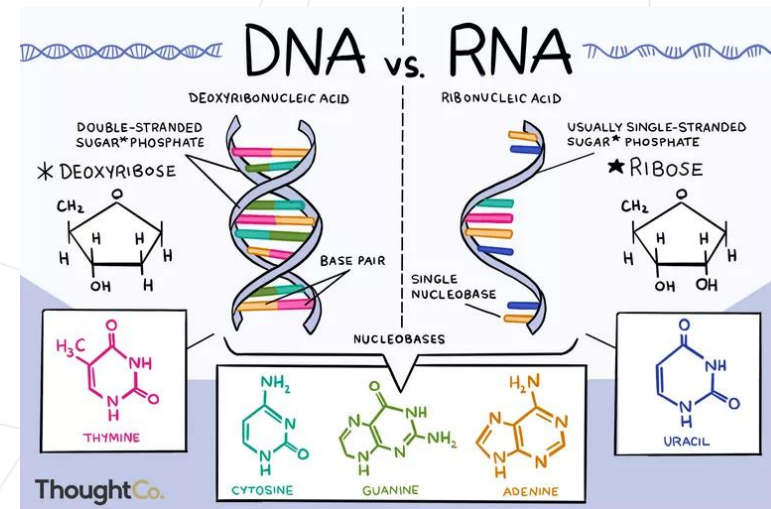
D-Galactose



D-Deoxyribose



D-Ribose



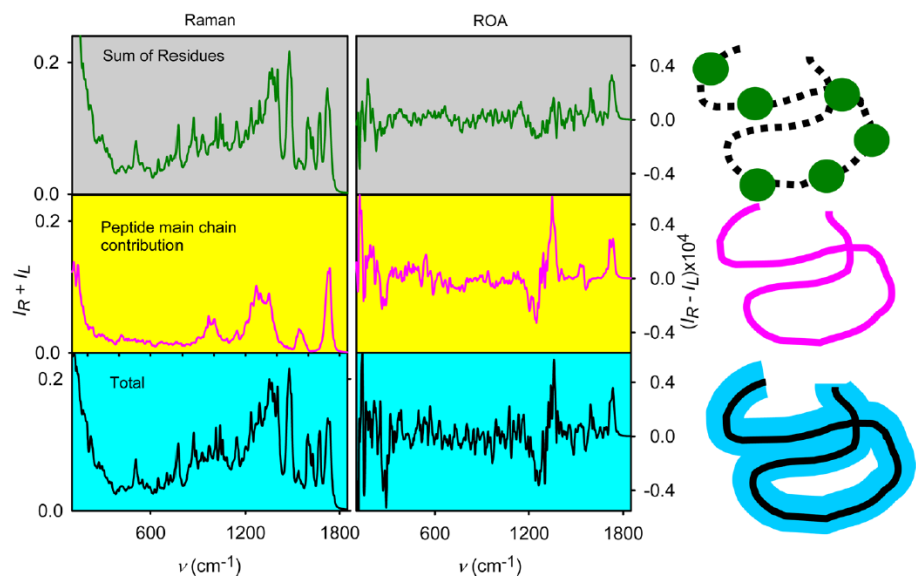


Univerzita Palackého
v Olomouci

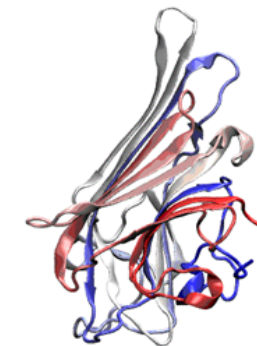
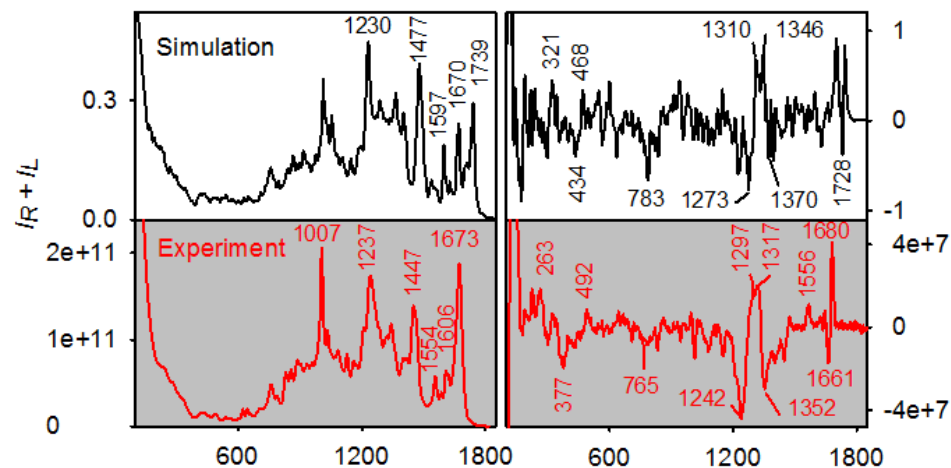
Studium struktury proteinů

- kvantově chemické simulace (~ 10 tis. atomů)

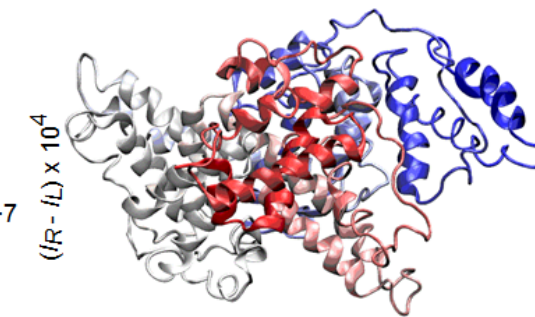
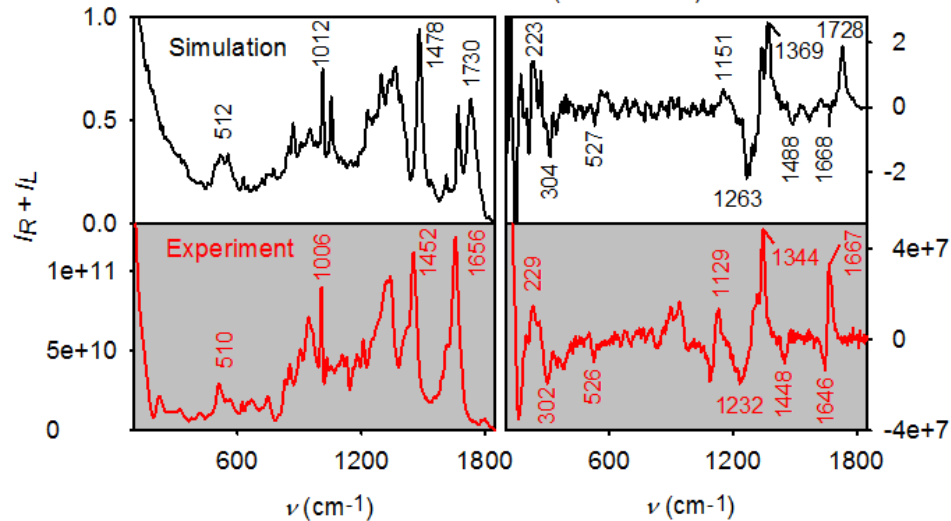
α -lactalbumin



Concavalin A (46% β -sheet)



Human serum albumin (46% α -helix)

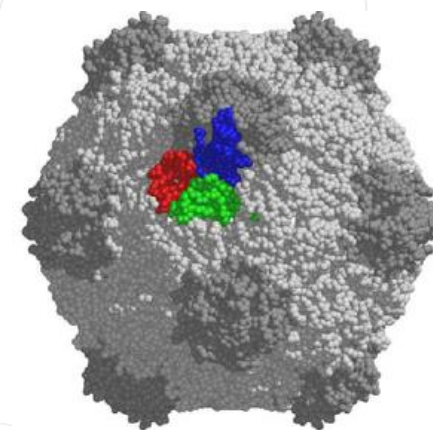
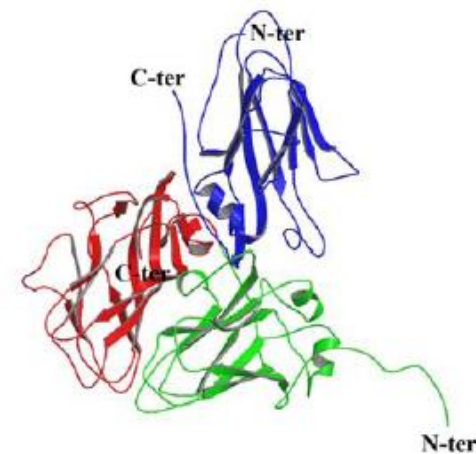
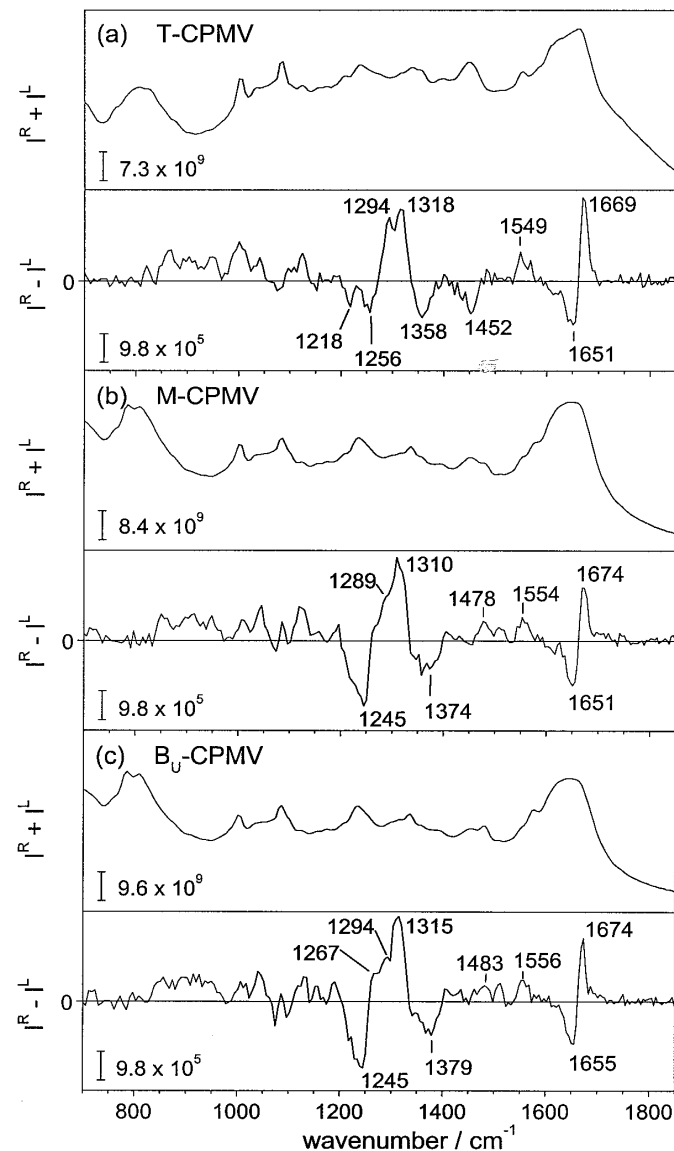
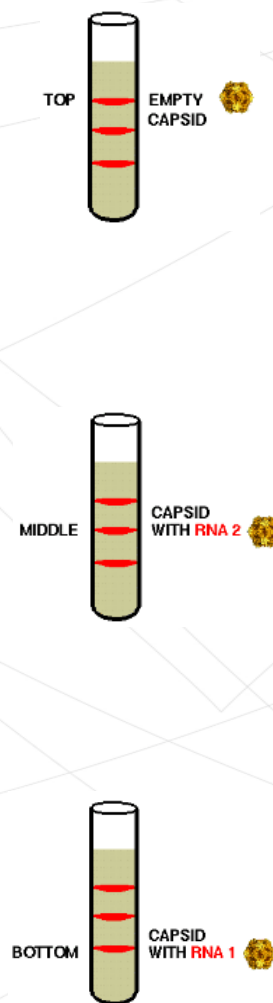




Univerzita Palackého
v Olomouci

Studium struktury virů

Virus vignové mozaiky
(Cowpea Mosaic Virus - CPMV)



Blanch *et al.*, 2002. *J. Gen. Virol.* **83**, 2593.



Univerzita Palackého
v Olomouci

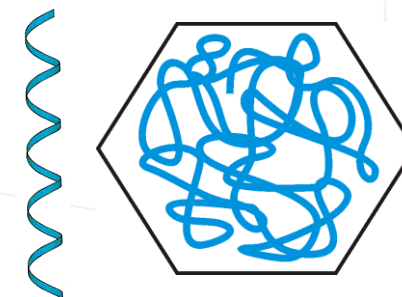
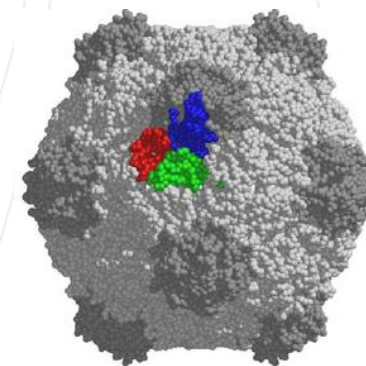
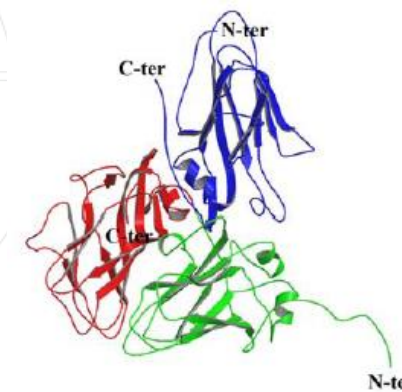
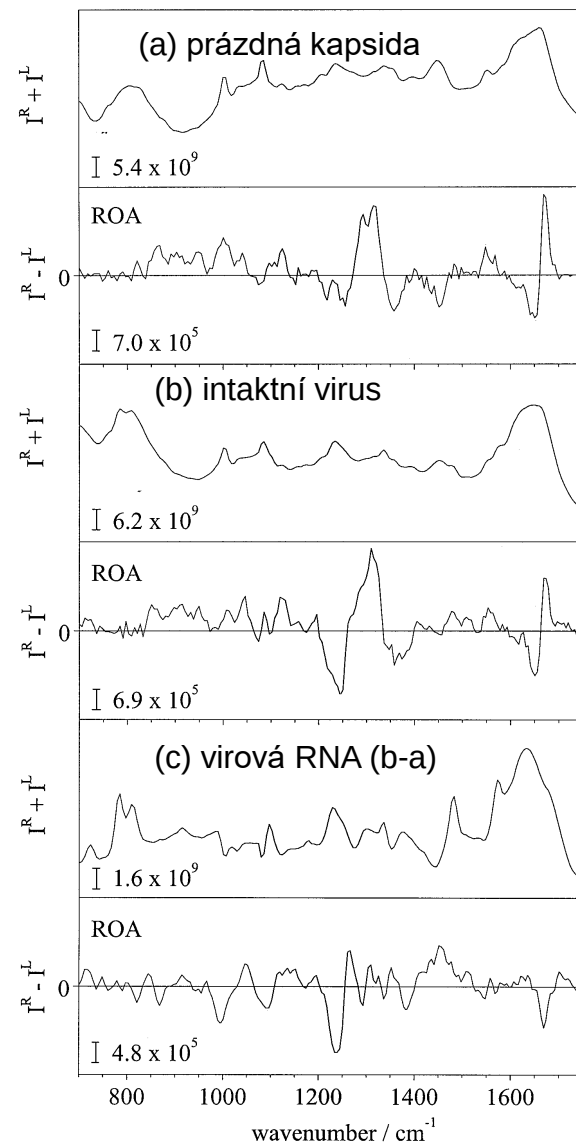
Studium struktury virů

Virus vignové mozaiky (Cowpea Mosaic Virus - CPMV)

ROA poskytuje informace:

- o struktuře proteinů tvořících kapsidu: β -skládaný list
- o struktuře jádra nukleové kyseliny: **jednovláknová šroubovice RNA typu A!**

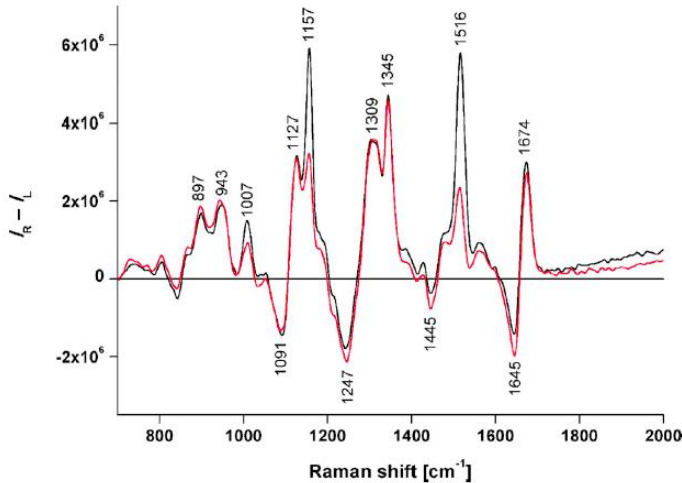
Blanch *et al.*, 2002. *J. Gen. Virol.* **83**, 2593.





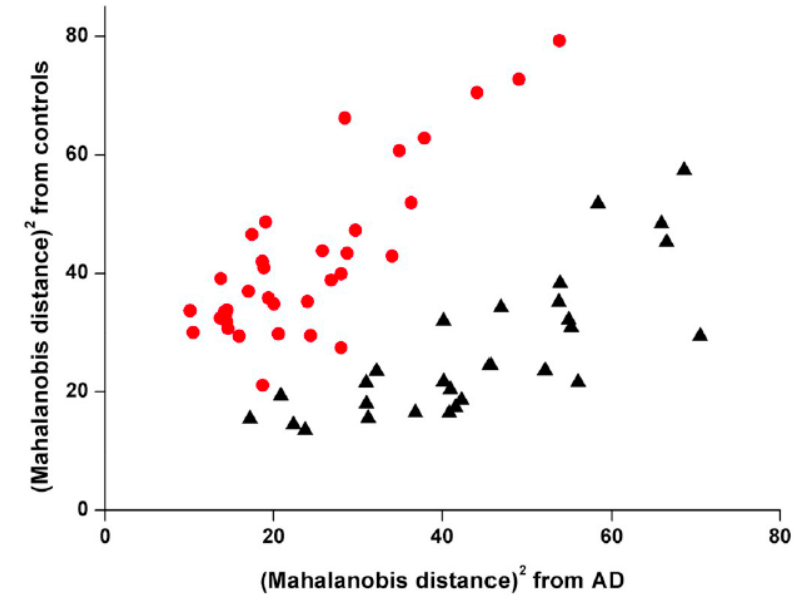
Univerzita Palackého
v Olomouci

Klinická diagnostika nemocí



ROA spektra plazmatu krve
pacientů s AD (červeně) a
zdravých kontrol (černě)

- rozlišení pacientů od zdravých kontrol
na základě spekter:
sensitivita 94%, specificita 84%



References:

1. Setnička, V. and L. Habartová, Chiroptical Spectroscopy of Biofluids, in Chiral Analysis, P.A. Polavarapu, Editor. 2018. p. 429-465.
2. Habartová, L., et al., Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer. Chirality, 2018. 30: p. 581-591.
3. Habartová, L., et al., Blood-based molecular signature of Alzheimer's disease via spectroscopy and metabolomics. Clin. Biochem., 2019. 72: p. 58-63.
4. Hruběšová, K., et al., Search for biomarkers of Alzheimer's disease: Recent insights, current challenges and future prospects. Clin. Biochem., 2019. 72: p. 39-51.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometr pro měření ROA

Cíl:

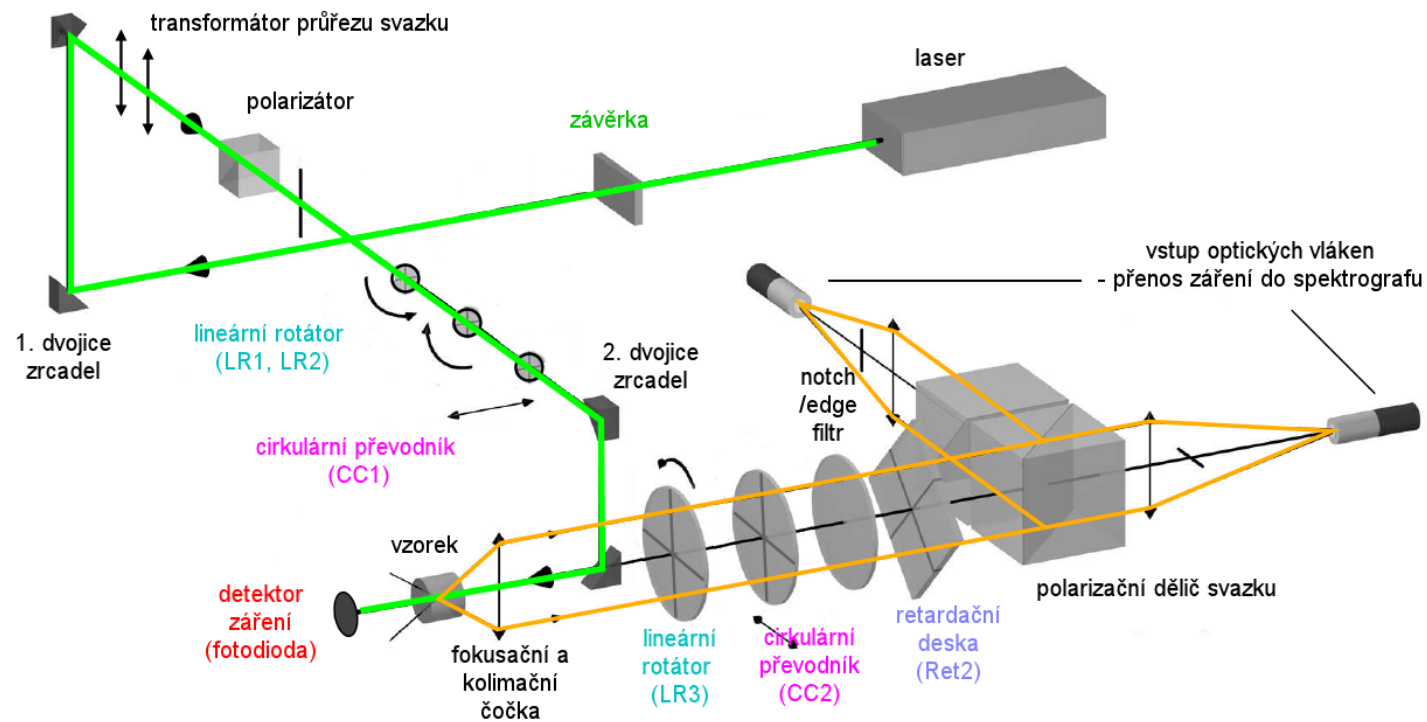
Realizovat spektrometr pro měření Ramanovy optické aktivity pro:

- průmyslové aplikace (farmaceutický průmysl, medicínské aplikace)
- základní výzkum

Vlastnosti spektrometru:

- použitelnost v průmyslovém a medicínském prostředí (bez potřeby čistých prostor a vysoce stabilní teploty)
- spektra prostá artefaktů
- spolehlivost
- servisovatelnost (ideálně se vzdáleným přístupem) – vnitřní diagnostika
- lepší parametry získaných dat: spektrální rozsah, vyšší poměr signál:šum

Spektrometr pro měření ROA



Rozdíl v intenzitě kruhově polarizovaných složek:

$$CID = \frac{I(R) - I(L)}{I(R) + I(L)} \sim 10^{-4} - 10^{-5}$$

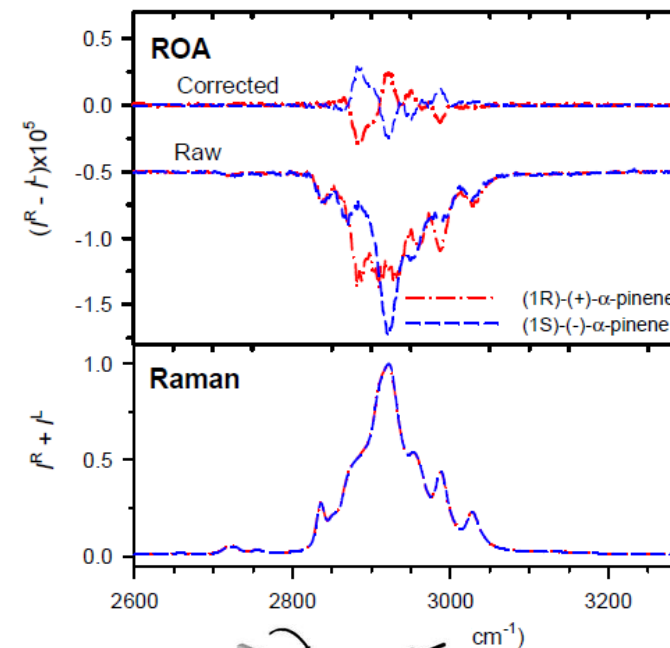
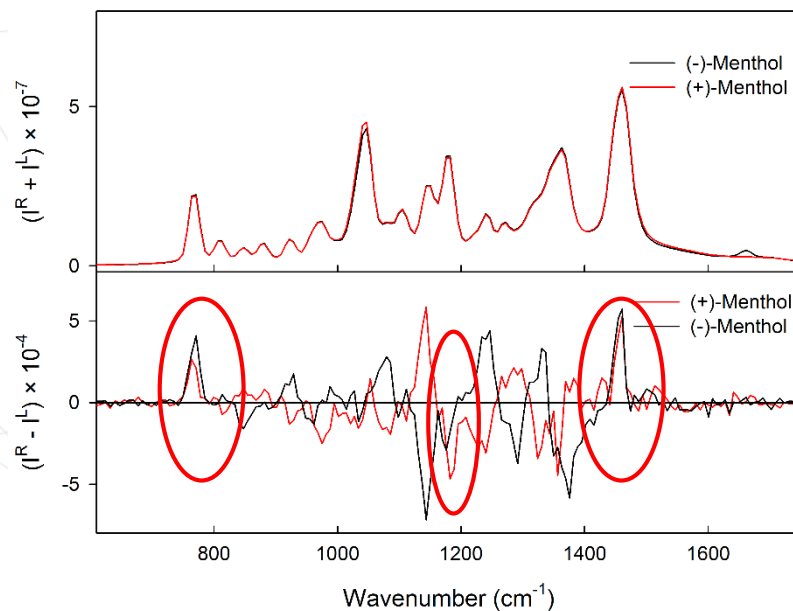
- nutno eliminovat systematické chyby (artefakty)



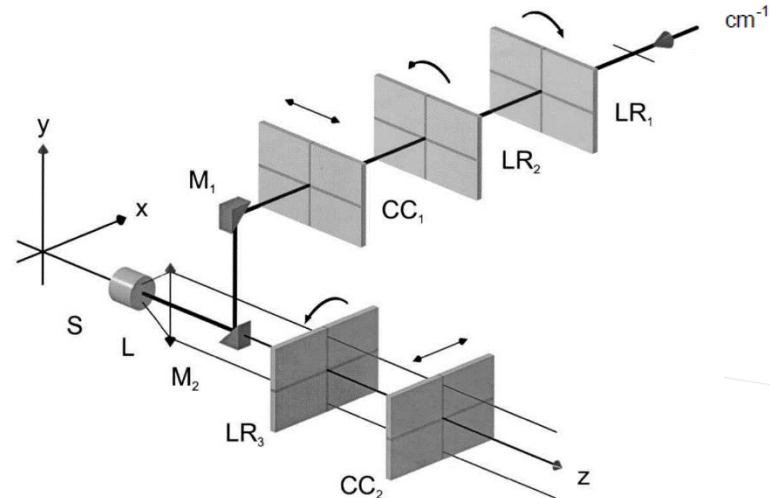
Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometr pro měření ROA

Systematické chyby - artefakty



Řešení – generace virtuálních enantiomerů optickou cestou





Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometr pro měření ROA

Projekt: Centrum digitální optiky (2012-19)

Pracovní balíček: Digitální Ramanova spektroskopie

T A
Č R

Program **Centra kompetence**

Projekt TE01020229 (Centrum digitální optiky) je řešen s finanční podporou TA ČR



Katedra optiky



Projekt: Centrum elektronové a fotonové optiky (2019-22)

Dílčí projekt: Rozšíření možností Ramanova spektrometru



Katedra optiky



Institute
of Scientific
Instruments
AS CR, v.v.i.

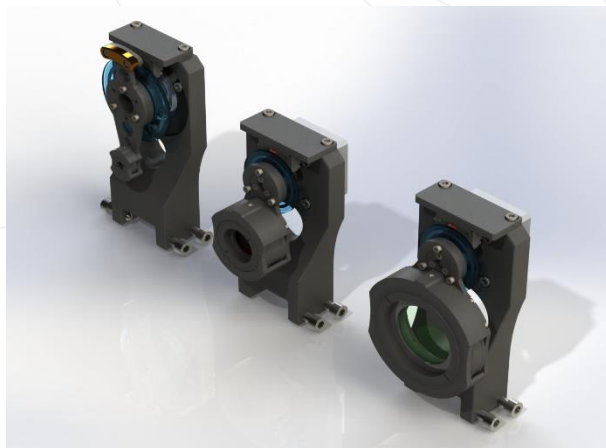




Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometr pro měření ROA

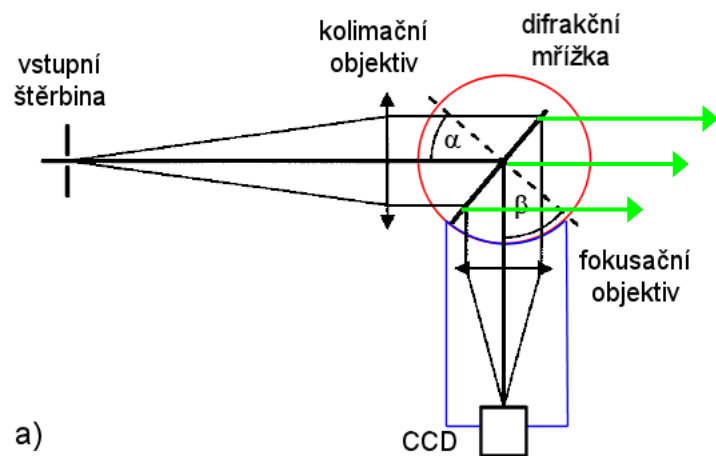
Vývoj motorizovaných polohovacích zařízení pro optické aplikace





Spektrometr pro měření ROA

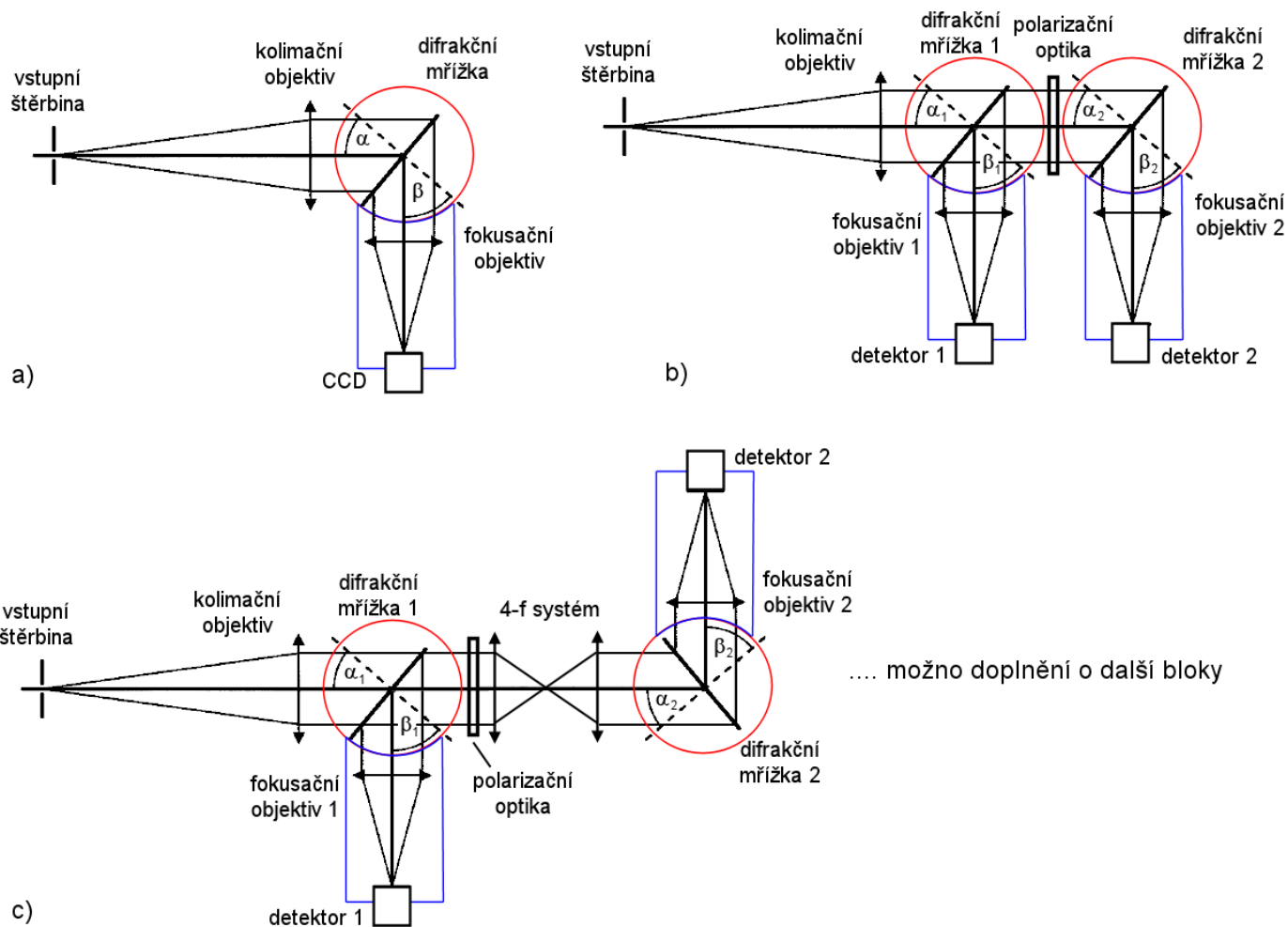
Vývoj spektrografu (spektrálního analyzátoru) se zvýšenou účinností detekce



využití záření nultého difrakčního řádu

Spektrometr pro měření ROA

Vývoj spektrografu (spektrálního analyzátoru) se zvýšenou účinností detekce





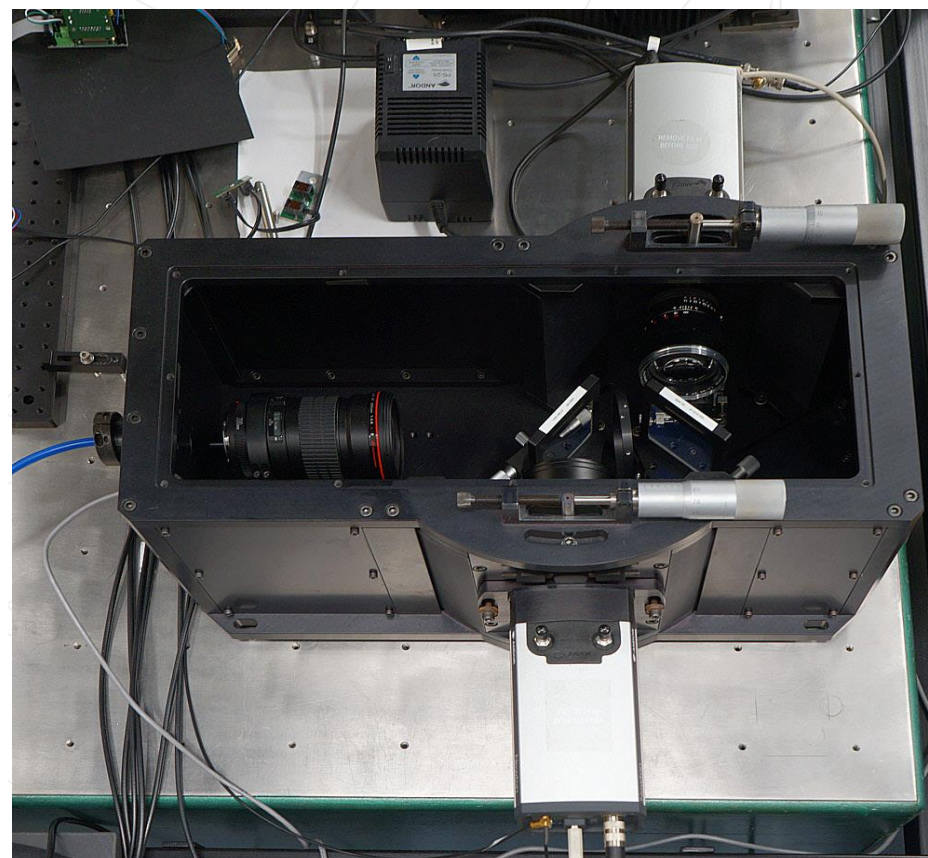
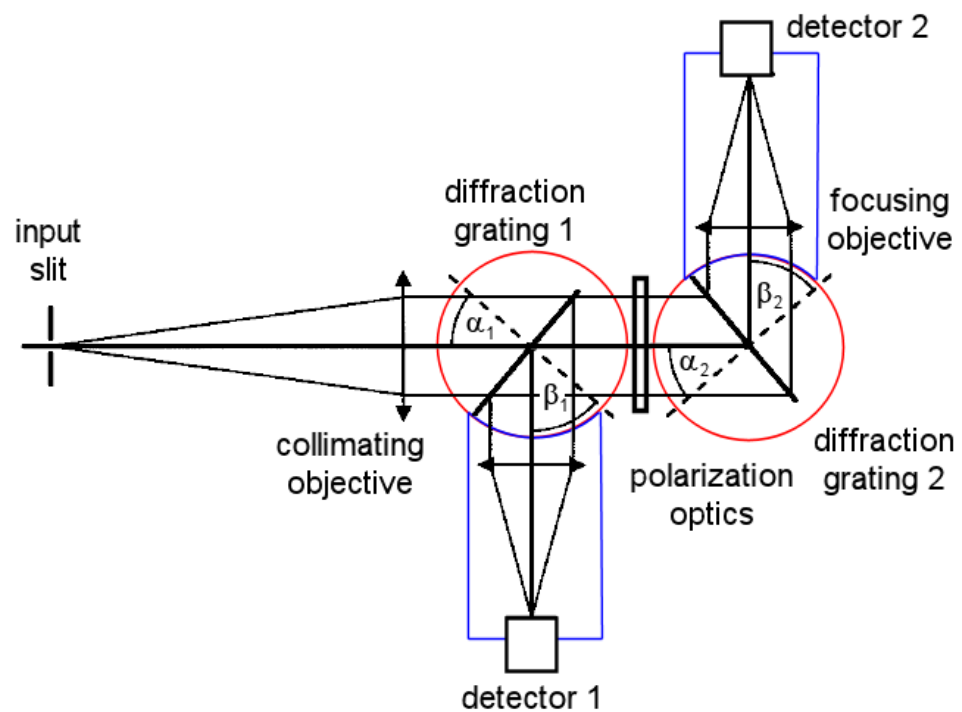
Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometr pro měření ROA

Vývoj spektrografu (spektrálního analyzátoru)
se zvýšenou účinností detekce



Katedra optiky





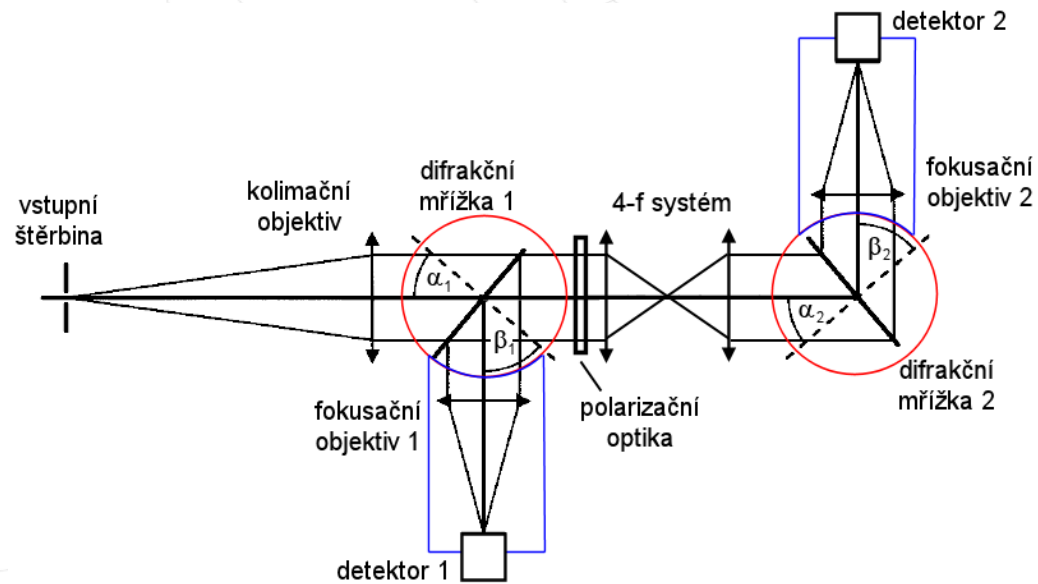
Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometr pro měření ROA

Vývoj spektrografu (spektrálního analyzátoru)
se zvýšenou účinností detekce



Katedra optiky





Univerzita Palackého
v Olomouci

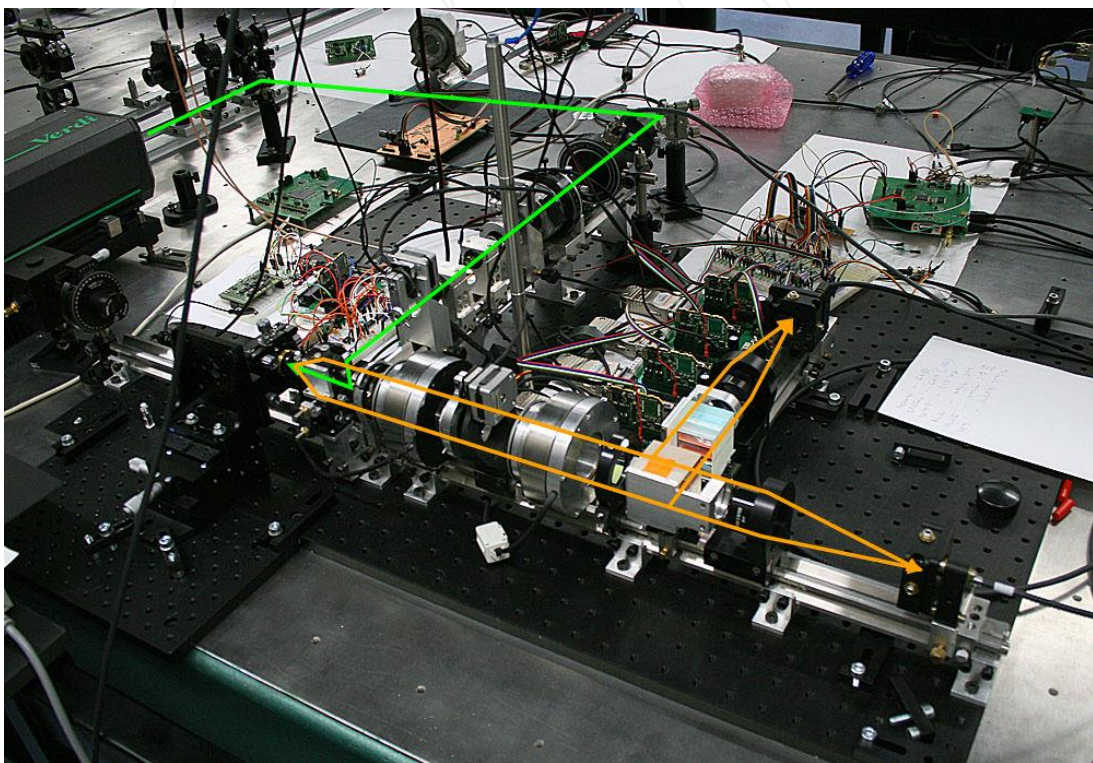


Katedra optiky

Spektrometr pro měření ROA

me opta

ZEBR[®]



Laboratorní sestava na optickém stole (2016)



1. funkční vzorek pro průmyslové aplikace (2018)



2. funkční vzorek pro průmyslové aplikace (2021)

Our team

Presented Raman optical activity Spectrometer is based on Werner Hug's design further developed by Department of Optics at Palacký University Olomouc in collaboration with Czech companies ZEBR and Meopta – optika.



Faculty
of Science
Palacký University
Olomouc

Department of Optics has more than 40 years of tradition of outstanding research in optics and its members conduct cutting edge theoretical and experimental research in optical quantum information processing, quantum optics, quantum tomography, wave-front sensitive detection methods, digital holography, non-diffracting optical beams, optical signal processing and spectroscopy. The Department is a major optical research centre in the Czech Republic.



The company of ZEBR is known worldwide as a producer of automated machines for the shading industry. Regarding research and development, the company is involved in a whole range of activities, oriented mainly to automation and fine mechanics. ZEBR offers its long-term experience in the field of precision machining, controlling position, perfect realization of individual components and functional design.



Meopta is an international company with a long rich tradition of developing, manufacturing and assembling world class optical, opto-mechanical and optoelectronic products. From precision medical and scientific instruments to digital cinematic projectors, aerospace technologies, military and consumer sports optics. Meopta's unparalleled experience allows it to design, engineer and manufacture a diverse array of high-quality products across a broad spectrum of markets and industries, making it a global leader in the optical field.

Department of Optics
Palacký University Olomouc
17. listopadu 12
77146 Olomouc
Czech Republic
<http://optics.upol.cz/en/>



Faculty
of Science
Palacký University
Olomouc



Examples

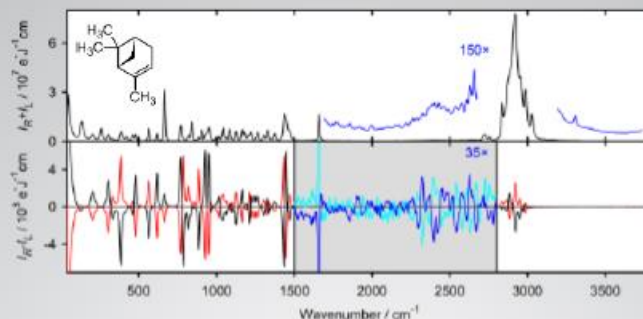


Figure 1. Raman and ROA spectra of α -pinene enantiomers recorded in extended spectral range 40 – 3800 cm^{-1} . Almost perfect mirror symmetry spectra were obtained even for strongly polarized Raman bands. Due to high signal-to-noise ratio ROA overtone and combination (anharmonic) vibrations in 1800 – 2800 cm^{-1} spectral range were observed for the first time.

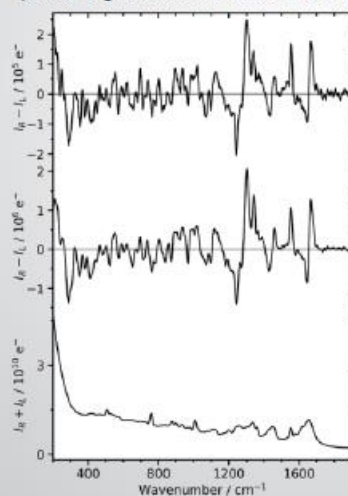


Figure 2. Raman and ROA back-scattering spectra of lysozyme dissolved in water at concentration 70 mg/mL. Exposure time: 15 min (top) and 120 min (middle and bottom), laser power at sample was 650 mW. Spectra are smoothed with third order, nine-point Savitzky-Golay filter.

References

- [1] P. Michal, R. Čelechovský, M. Dudka, J. Kapitán, M. Vůjtek, M. Berešová, J. Šebestík, K. Thangavel, P. Bouř: Vibrational Optical Activity of Intermolecular, Overtone, and Combination Bands: 2-Chloropropionitrile and α -Pinene. *J. Phys. Chem. B*, 2019, 123, 2147–2156.
- [2] M. Hope, J. Šebestík, J. Kapitán, P. Bouř: Understanding CH-Stretching Raman Optical Activity in Ala-Ala Dipeptides. *J. Phys. Chem. A*, 2020, 124, 674–683.
- [3] V. Palivec, P. Michal, J. Kapitán, H. Martinez-Seara, P. Bouř: Raman Optical Activity of Glucose and Sorbose in Extended Wavenumber Range. *ChemPhysChem*, 2020, 21, 1272–1279.

Raman Optical Activity Spectrometer



[Prototype photo]

Contact: Department of Optics
Palacký University Olomouc
17. listopadu 12
77146 Olomouc
Czech Republic
email: kapitan@optics.upol.cz



Raman optical activity

Raman optical activity (ROA) spectroscopy is a sensitive analytical technique that measures small difference in Raman scattering of chiral molecules in response to right and left circularly polarized light.

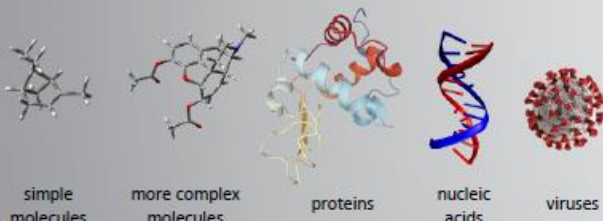


Main applications of Raman optical activity

a) Determination of absolute configuration and enantiomeric excess

Determination of absolute configuration and enantiomeric excess is a major topic in the pharmaceutical industry. ROA is the most sensitive analytical method with high accuracy of determination of enantiomeric excess (0.2%).

b) Research on the structure of biologically interesting molecules



- Haesler, J.; Schindelholt, I.; Riguet, E.; Bochet, C. G.; Hug, W., Absolute configuration of chirally deuterated neopentane. *Nature*, 2007. 446: p. 526-529.
- Polavarapu, P.A.; Santoro, E., Vibrational optical activity for structural characterization of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 2020. 37: p. 1661-1699.
- Kessler, J.; Kapitán, J. and Bouf, P., First-Principles Predictions of Vibrational Raman Optical Activity of Globular Proteins. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015. 6: p. 3314-3319.
- Blanch, E.W.; Hecht, L. and Barron, L.D., Vibrational Raman optical activity of proteins, nucleic acids, and viruses. *Methods*, 2003. 29: p. 196-209.

c) Great potential in the field of clinical diagnostics of diseases

ROA spectrometer is a promising diagnostic tool suitable for industrial and medical use:

- Setnička, V. and Habartová, L., Chiroptical Spectroscopy of Biofluids, in *Chiral Analysis*, P.A. Polavarapu, Editor. 2018. p. 429-465.
- Habartová, L., et al., Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer. *Chirality*, 2018. 30: p. 581-591.
- Habartová, L., et al., Blood-based molecular signature of Alzheimer's disease via spectroscopy and metabolomics. *Clin. Biochem.*, 2019. 72: p. 58-63.
- Hruběšová, K., et al., Search for biomarkers of Alzheimer's disease: Recent insights, current challenges and future prospects. *Clin. Biochem.*, 2019. 72: p. 39-51.



Specifications

Spectrometer

Excitation wavelength	532 nm
Laser power at sample	< 1.5 W
Spectral range	50 – 4500 cm ⁻¹
Spectral resolution	< 7 cm ⁻¹ for 50 – 2400 cm ⁻¹ < 10 cm ⁻¹ for 2400 – 4500 cm ⁻¹
Scattering geometry	back-scattering
Modulation scheme	SCP, ICP, DCP _I , DCP _{II}
Wavenumber calibration	automatic, no customer handling of calibration source needed

Detectors

Detector type	spectroscopic CCD, 1024 × 255 pixels
Detector temperature	down to -100 °C, stabilized
Quantum efficiency	> 85 % in spectral range 500 – 700 nm
Binning	flexible and automatically adjustable to minimize readout noise
Gain	selectable

Control system

PC	industrial type, integrated
OS	Windows 10 Pro
Monitor and keyboard position	adjustable
External control	full, via TeamViewer
Backup	hot swap technology

Instrument layout

Layout	single unit
External size W × D × H	870 × 1100 × 1500 mm
Weight	< 500 kg
Support	stable legs, wheels for easy transport
Power supply backup	fully integrated UPS with safety features
Safety	optional laser interlocks

Support

Warranty	2 years, extension available
Software support and upgrades	2 years, extension available



Specifications

Requirements

Power supply	220 – 240 V, 110 V available upon request
Input power	< 1000 W
External UPS	not required
Pressurized air	min. 6 bar, external compressor available upon request
Ethernet connection	for optional external control
Outside temperature stabilization	within 3 °C
Clean room environment	not required

Optional additions

Spectrometer options

Spectral range	selectable upon request
Spectral resolution	selectable upon request
Additional polarization options	linearly polarized Raman

Sample

Reduced sample volumes	< 2 µL
Cell type	capillary, micro-cell, various designs
Multiple sample	automatic motorized positioning, 5 sample positions
Motorized sample positioning	xyz range 20 mm

Temperature controlled sample holder

Temperature range	0 – 100 °C
Temperature accuracy	< 1 °C
Temperature set-point resolution	0.1 °C
Sample volume	< 70 µL
Number of sample cells included	4
Sample space environment	purged with clean dry air
Condensation temperature	-20 °C
Laser damage prevention	yes, automatic laser power monitoring

Calibration

Intensity calibration	external calibration unit, full integration
Calibration source	black-body type

Please contact us for more information and a quote.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Poděkování



Katedra optiky



**Radek Čelechovský
Michal Dudka
Milan Vůjtek
Pavel Michal
Jana Hudecová**

**Jan Vlček
Radek Jánský
František Zelinka
Jakub Vážný
Lukáš Kapitán
Lukáš Kapitán Jr.**

**Daniel Vacula
Zdeněk Lošťák
Antonín Pochylý
Vlastimil Svoboda
Jiří Jankuj
Václav Pekař
David Škoda
Jiří Kyvalský
Jan Mach
Rostislav Lochman
Pavčina Provazníková
Petr Přikryl
Roman Burianec
Miroslav Strejček
a další**