

LASEREM INDUKOVANÁ FLUORESCENCE

Vítězslav Otruba

Atomová fluorescence

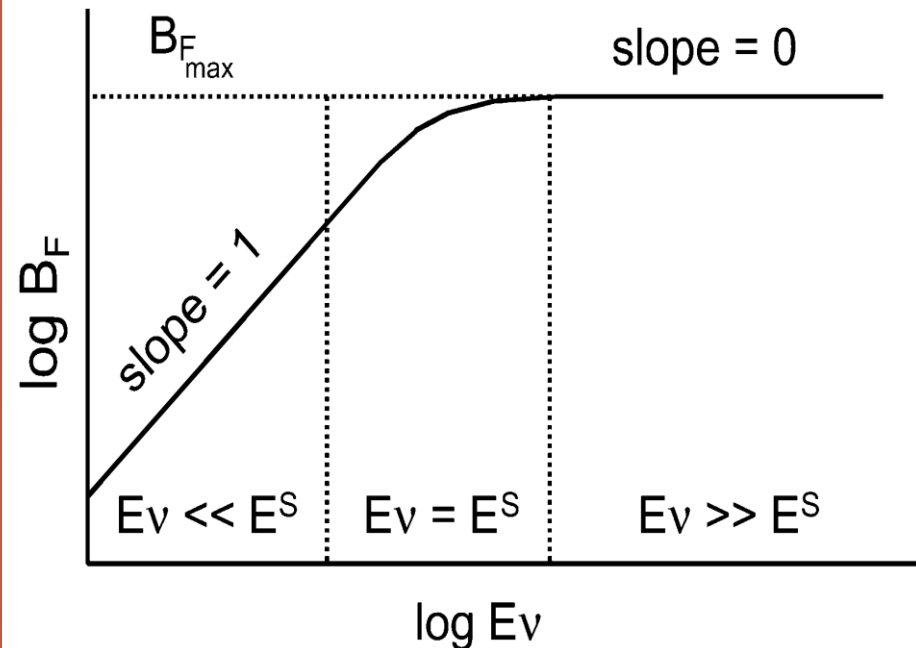
Základní vztahy

$$\Psi_{fl} = \frac{1}{2\pi} h\nu A_{10} n_1$$

$$n_1 = B_{01} \rho(\nu) n_0$$

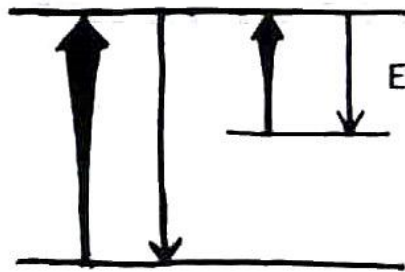
$$\Psi_{fl} = \frac{1}{2\pi} h\nu A_{10} B_{01} \rho(\nu) n_0$$

Vliv saturace



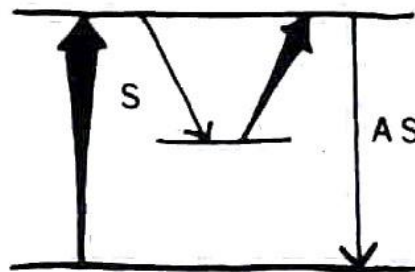
Buzení fluorescence

TYPES OF AF TRANSITIONS



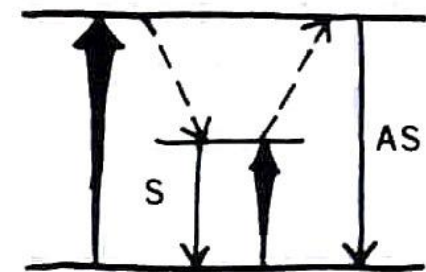
RESONANCE

(i)



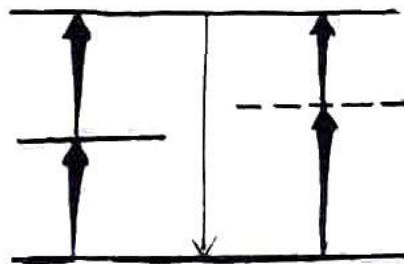
DIRECT LINE

(ii)



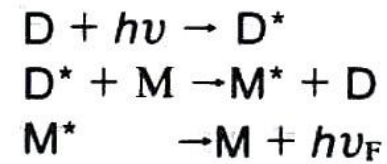
STEPWISE LINE

(iii)



TWO PHOTON

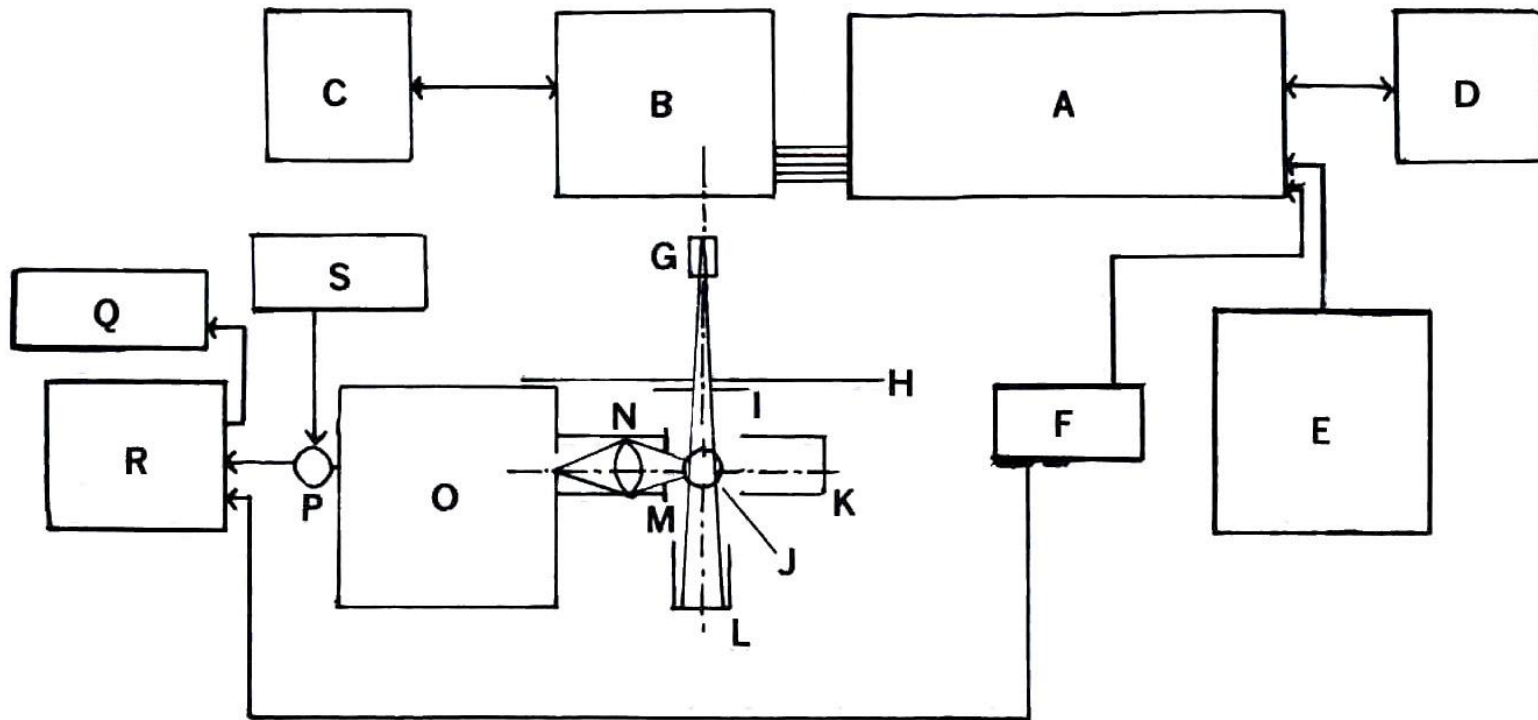
(iv)



SENSITIZED

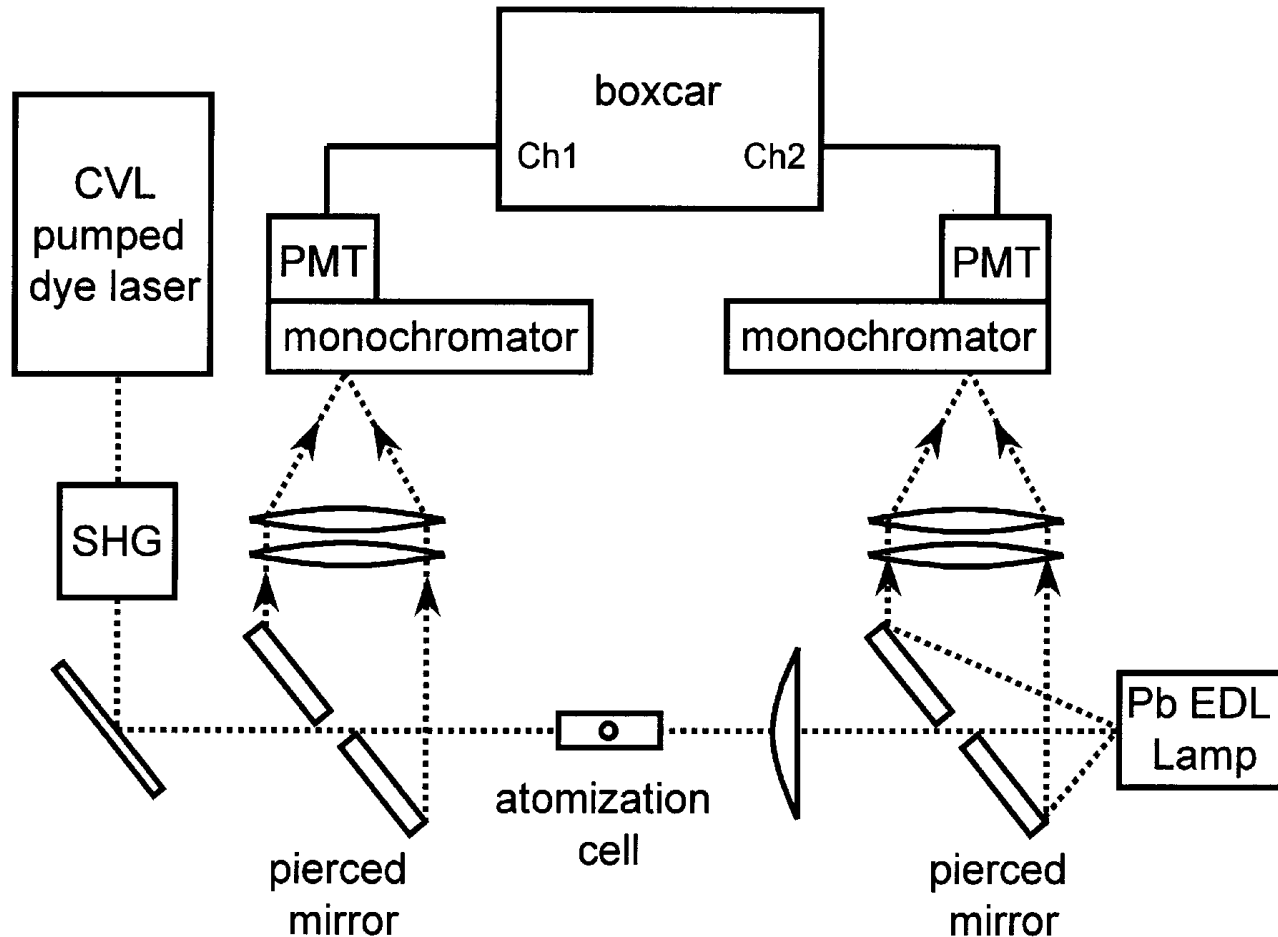
(v)

Schematický diagram spektrometru



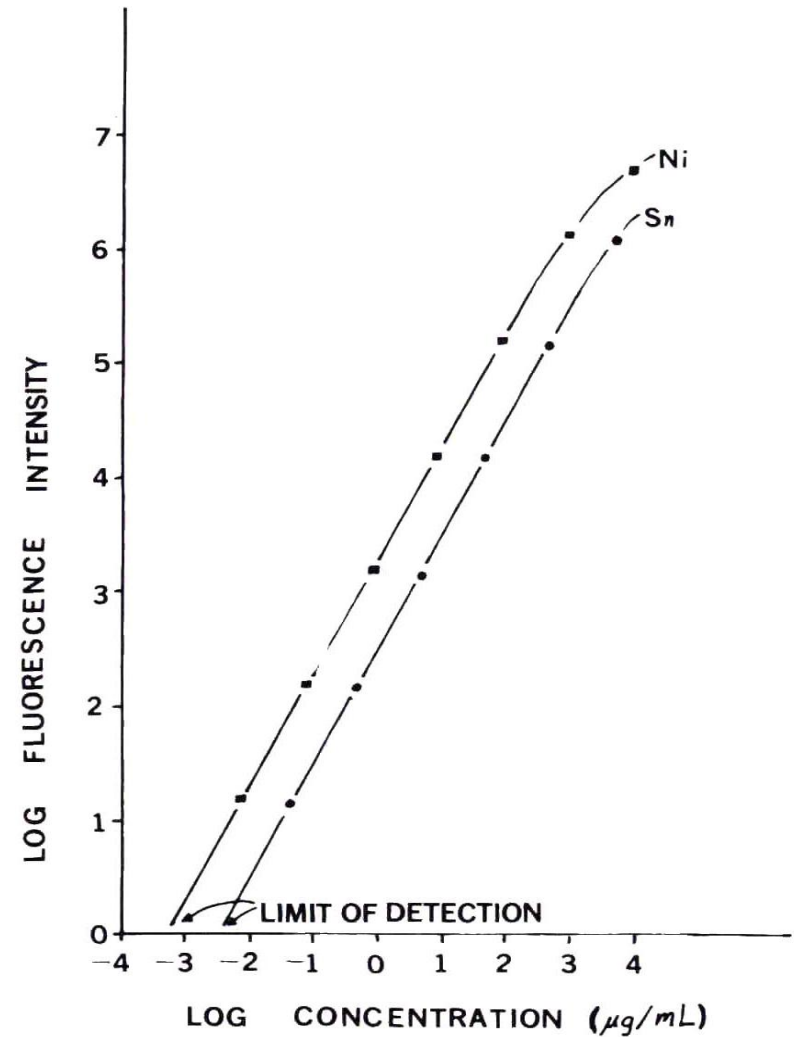
Schematic diagram of laser-excited atomic fluorescence flame spectrometry system:
 A, N₂ laser; B, dye laser; C, dye laser control unit; D, vacuum pump; E, N₂ laser power supply; F, trigger source; G, beam expander; H, panel; I, diaphragm; J, burner/nebulizer; K, light trap; L, light trap; M, diaphragm; N, light baffle and lens; O, monochromator; P, photomultiplier detector; Q, recorder; R, boxcar integrator; S, photo multiplier power supply.

Kalibrace vlnových délek



Koncentrační závislost

- Analytical growth curves
- nickel fluorescence excited at 300.249 nm and measured at approximately 342 nm
- tin fluorescence excited at 300.914 nm and measured at 317.5 nm.



LAF přehled

Detekční limity a lineární dynamický rozsah stanovení v plameni acetylen – vzduch

Element	Ex/FI, nm ^a	AF ^b	LoD ^c , ng-mL ⁻¹	LDR ^d
Ag	328.1	RF	4	4.2
Al	394.4/396.1	S-DLF	0.6	5.7
Ba	553.7	RF	8	5
Bi	306.8	RF	3	5.2
Ca	422.7	RF	0.01	5
Cd	228.8	RF	8	3.5
Co	357.5/347.4	AS-DLF	19	5
Cr	359.3	RF	1	5.5
Cu	324.7	RF	1	5
Fe	296.7/373.5	S-DLF	0.06	6
Ga	403.3/417.2	S-DLF	0.9	5.4
In	410.4/451.1	S-DLF	0.2	6.2
Li	670.8	RF	0.5	4.3
Mg	285.2	RF	0.009	6
Mn	279.5	RF	0.4	5.4
Mo	390.3	RF	12	4.9
Na	589.0	RF	0.1	5.7
Ni	300.2/~342	S-DLF/S-SLF	0.5	6
Pb	283.3/405.8	S-DLF	1.3	6
Sr	460.7	RF	0.15	5
Sn	300.9/317.5	S-DLF	3	5
Ti	365.4	RF	2	5.2
Tl	377.6	RF	4	4.9
V	370.4/411.2	E-S-SLF	30	4.5

^aEx/FI = excitation wavelength/fluorescence wavelength (if different than excitation wavelength).

^bRF = resonance fluorescence; S-DLF = Stokes direct line fluorescence; AS-DLF = anti-Stokes direct line fluorescence; E-S-SLF = excited Stokes stepwise line fluorescence; S-SLF = Stokes stepwise line fluorescence.

^cLoD = limit of detection.

^dLDR = linear dynamic range (order of magnitude).

LAF - ICP

Element	DL LAF-ICP (ppb)	DL OES-ICP (ppb)
Al	0,08	8
B	1	2
Ba	0,05	0,5
Ga	0,1	30
Mo	0,2	2
Pb	0,1	30
Si	0,1	10
Sn	0,3	30
Tl	0,3	50

LAF – Noble metals

Element	Excitation (nm)	Emission (nm)	DL – AF (ppb)	DL – ICP (ppb)
Ru	287	366	2	30
Pd	324	340	0,1	2
Ir	266	407	0,9	20
Pt	266	270	0,07	1
Au	267	243	0,8	1

LAF - ETA

Element	DL abs (pg)	DL conc. (pg/ml)
Ag	0,03	1
Co	0,02	1
Cs	0,5	10
Cu	0,01	0,1
Ir	1	50
Fe	0,002	0,1
Na	0,1	5
Pb	0,0002	0,01
Tl	0,005	0,03
Zn	0,03	0,1

Tříhladinový systém

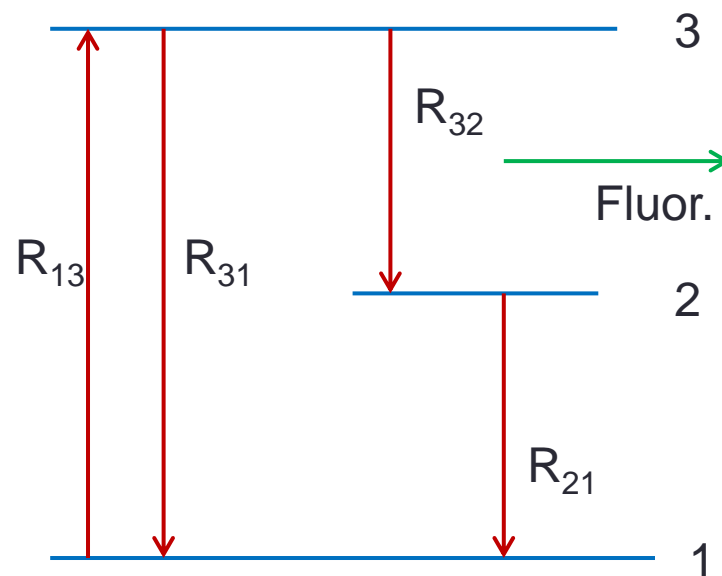
Za předpokladu, že spektrální šířka absorpčního profilu hladin je menší než spektrální šířka budícího záření, platí:

$$\frac{dn_1}{dt} = -n_1(R_{12} + R_{13}) + n_2 R_{21} + n_3 R_{31}$$

$$\frac{dn_2}{dt} = n_1 R_{12} - n_2(R_{21} + R_{23}) + n_3 R_{32}$$

$$\frac{dn_3}{dt} = n_1 R_{13} + n_2 R_{23} - n_3(R_{31} + R_{32})$$

kde R_{ij} jsou rychlosti excitace a deexcitace příslušných hladin zahrnující radiační a srážkové procesy.



Čerpání 1 – 3:

$$R_{12} = R_{23} = 0; R_{31} = \rho B_{31} + A_{31} + Z_{31}$$

$$R_{13} = \rho B_{13}; R_{21} = Z_{21}; R_{32} = A_{32} + Z_{32}$$

Detekce olova v plynné fázi

Tříhladinový systém, hladina 2
metastabilní:

1-3: $6p^2\ ^3P_0 - 7s^3\ ^0P_1$ (283,31 nm)

3-2: $7s^3\ ^0P_1 - 6p^2\ ^3P_2$ (405,78 nm)

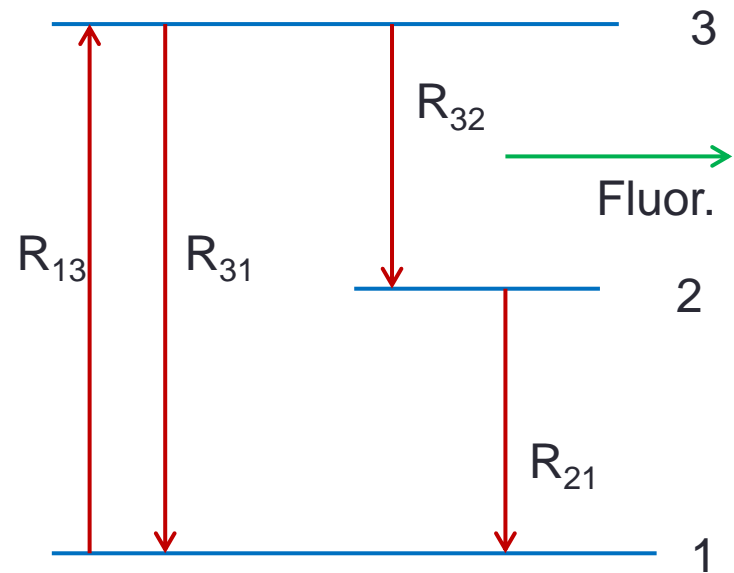
$R_{21} \cong 5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ($A_{21} \approx 1,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$)

$A_{31} = 6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$

$A_{32} = 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$

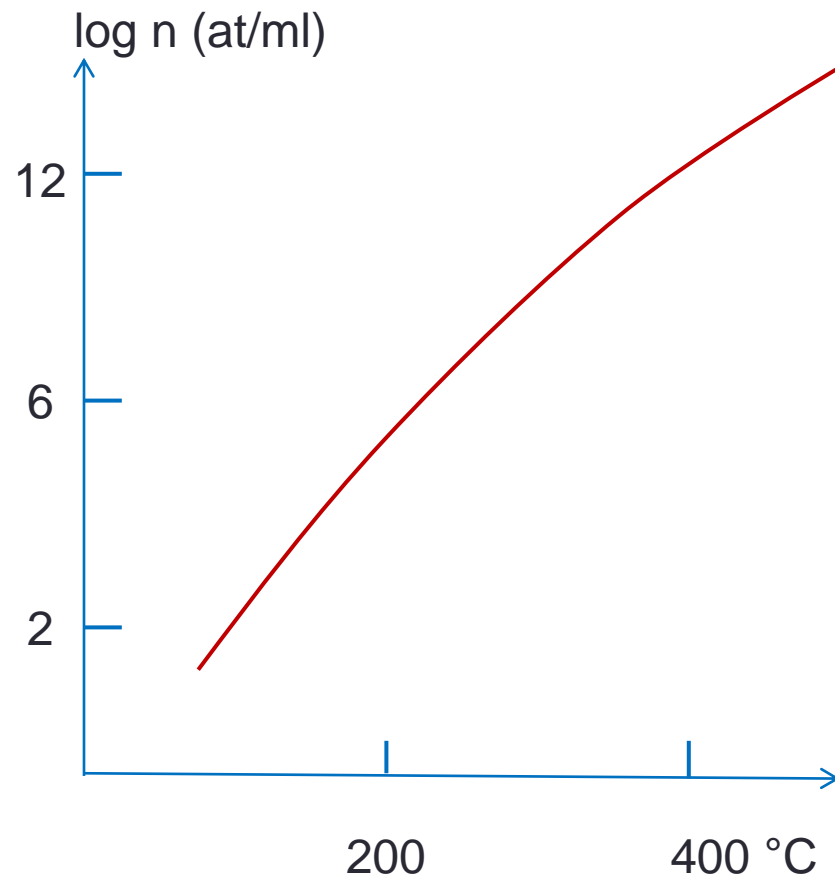
V případě saturačního výkonu
laseru:

$$N_{fl} \approx n_0 \frac{A_{32}}{A_{32} + Z_{32}}$$



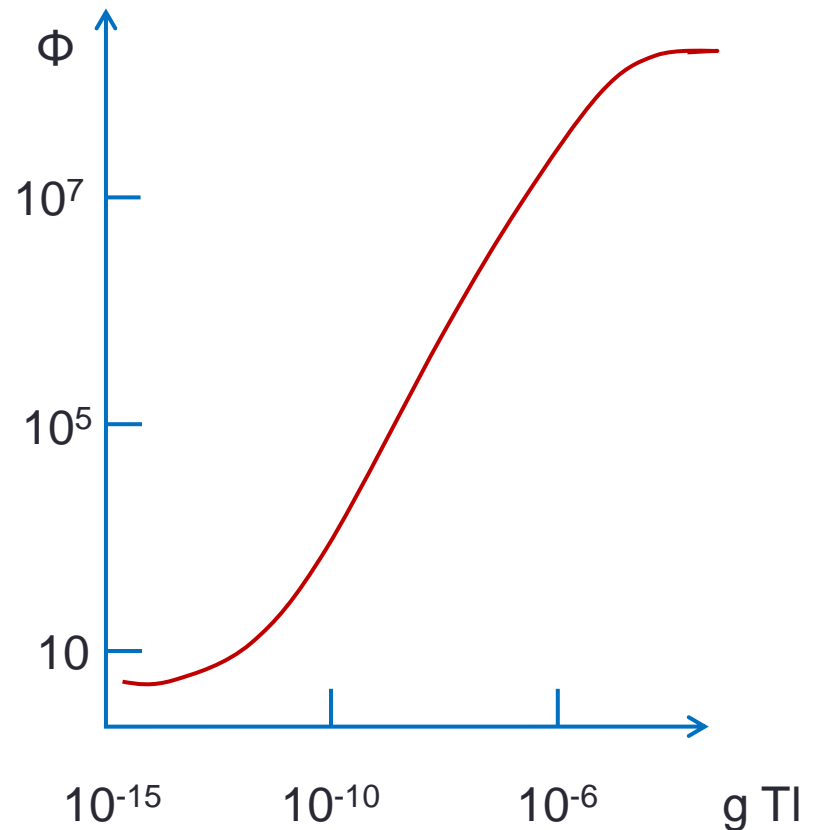
Detekce olova v plynné fázi

- $P_{LAS} \approx 2 \text{ kWcm}^{-2}$
- $\Delta\lambda = 0,02 \text{ nm}$
- $\tau = 5 \text{ ns}$
- $\Omega = 0,16 \text{ sr}$
- $f/D = 1 : 2,5$
- $F = 50 \text{ Hz}$
- $t_{int} = 15 \text{ s}$
- MD = 30 atomů Pb



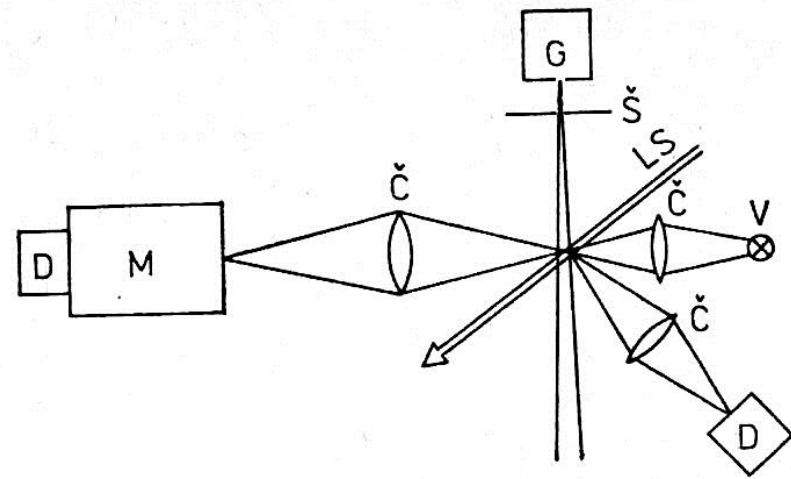
LAF v grafitové kyvetě - TI

- $\lambda_{\text{exc}} = 276,8 \text{ nm}$,
- $\lambda_{\text{fl}} = 352,9 + 351,9 \text{ nm}$
- Laser barvivový,
2. harmonická
- Buzení dusíkový laser
- $P_{\text{las}} = 150 \text{ nJ}$, $\tau = 5 \text{ ns}$,
 $\Delta\lambda = 0,01 \text{ nm}$
- RSD: 0,5 pg TI 9%; 50 pg
TI 6%, 500 pg TI 4%



Atomární svazky – absorpce a fluorescence

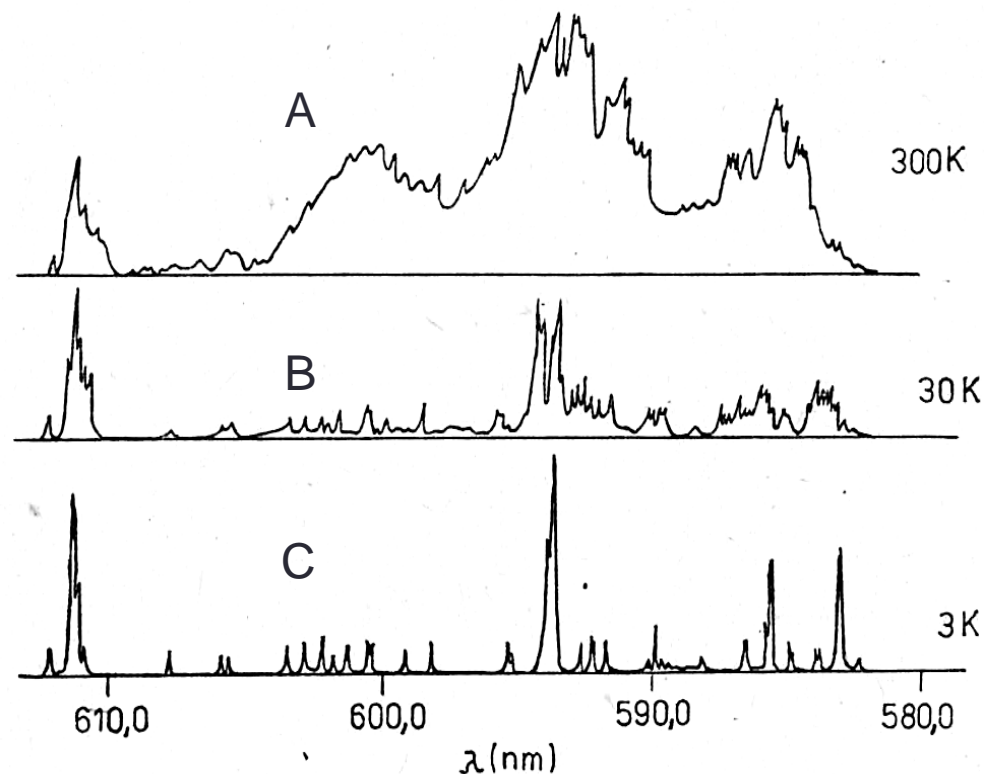
- Svazek atomů či molekul expandující do vysokého vakua ve formě paprsku má ve směru kolmém na pohyb částic teplotu blížíící se 0K. Pomocí fluorescence je možné (nepřímo) měřit absorpční spektrum. Přímé měření absorpce je obtížné díky nízké koncentraci měřených částic.



LS — laserový svazek
 frekvenčně stabilizovaného
 laseru, *G* — generátor
 atomového svazku,
Š — štěrbina, *Č* — čočka,
V — výbojka,
M — monochromátor,
D — detektor

Absorpční a fluorescenční spektrum NO_2

- A – absorpční spektrum měřené v kyvetě
- B – fluorescenční spektrum měřené v molekulárním svazku při teplotě 30 K
- C – fluorescenční spektrum měřené při teplotě 3 K v přítomnosti Ar jako nárazníkového plynu



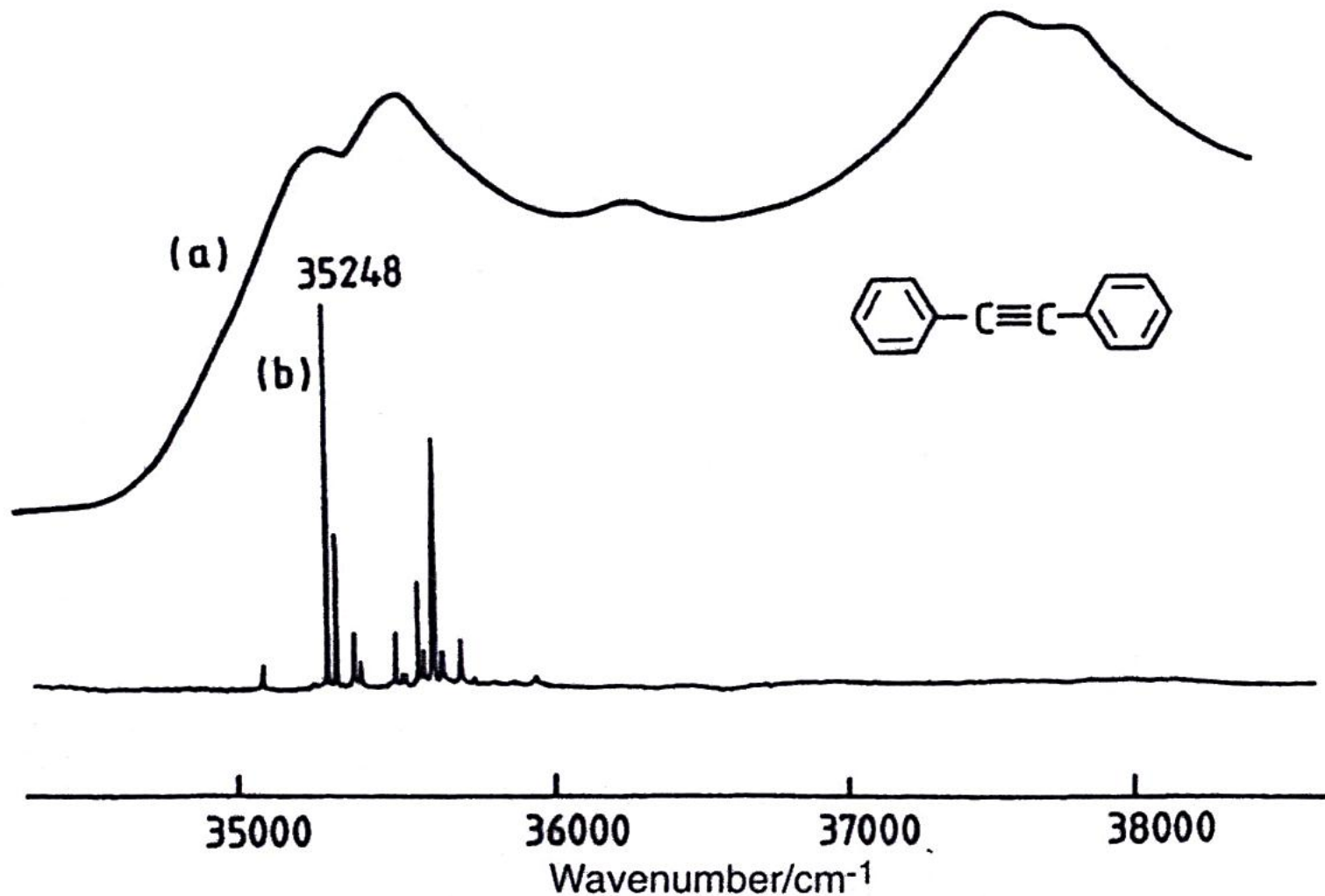
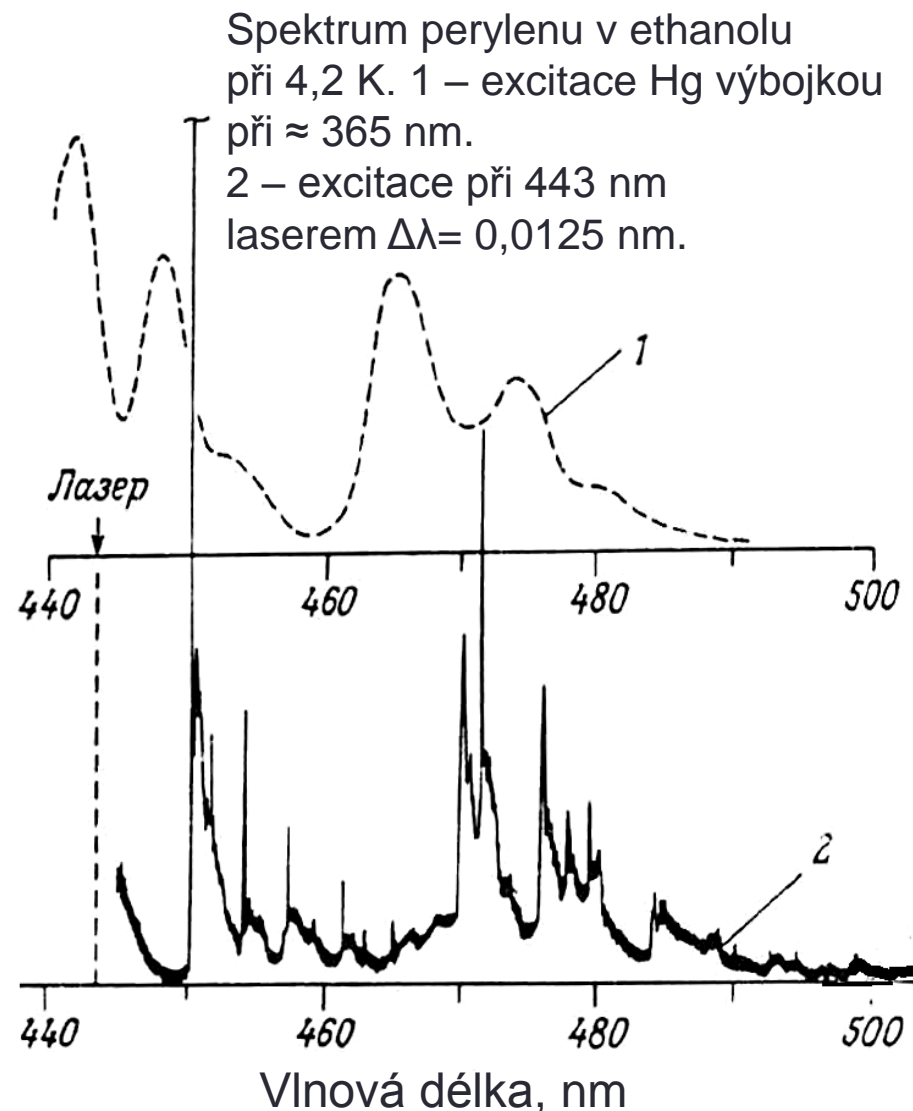


Fig. 4.14 Excitation spectra of diphenyl acetylene: (a) Normal vapour-phase spectrum; (b) Supersonic jet spectrum (cooling achieved by a modest four atmospheres excess pressure in a helium carrier gas). Reprinted with permission from [8]

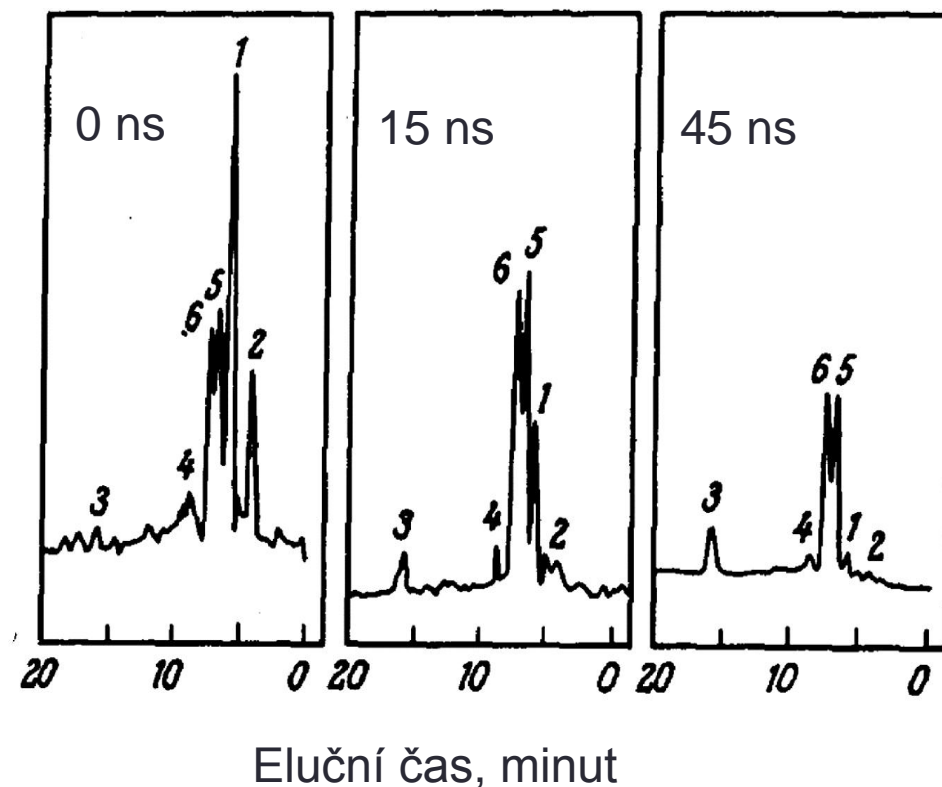
Excitace molekulové fluorescence

- Nevýhodou klasických excitačních širokopásmových zdrojů záření je současná excitace většího počtu vyšších energetických hladin, z nichž dochází na celé řadě přechodů ke spontánnímu vyzařování.
- V případě laserem vzbuzené fluorescence (LIF, laser induced fluorescence) se obvykle excituje jen jedna horní hladina.



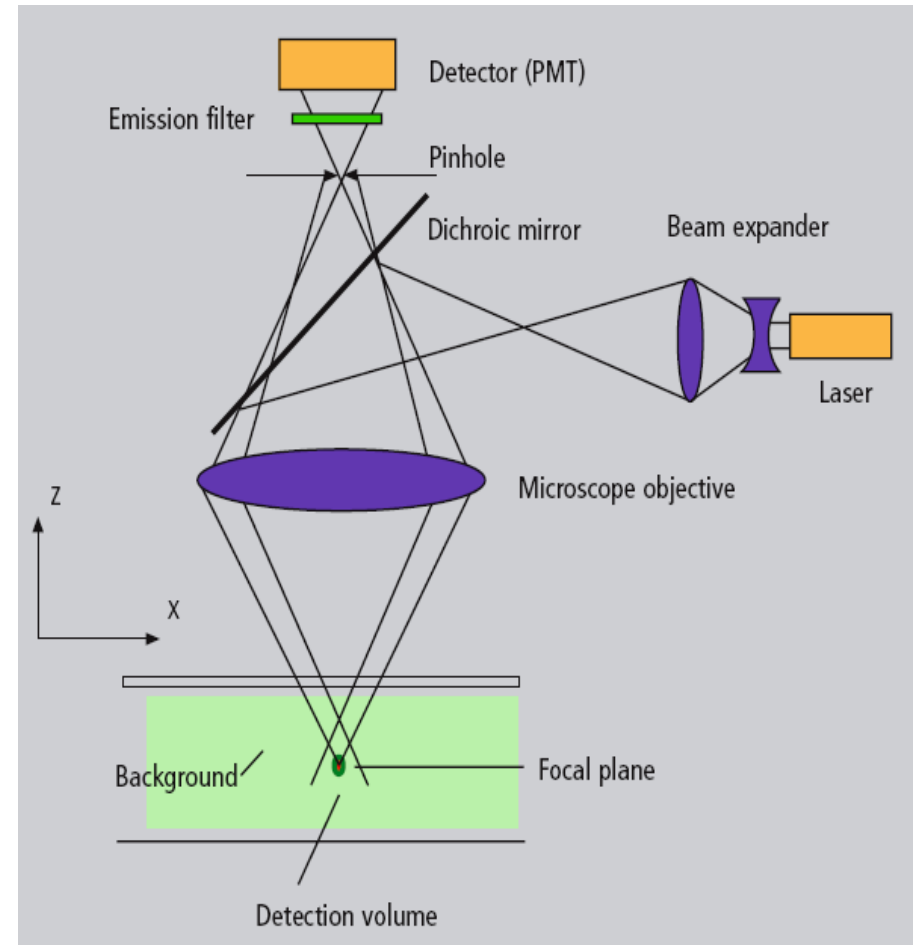
Časově rozlišená fluorescence

- Různá doba života excitovaných stavů u různých molekul dovoluje při použití časově rozlišené fluorescence zvýšit selektivitu detekce např. u kapalinové chromatografie, ale i v řadě dalších aplikací, především ve fluorescenční mikroskopii.
- Na obr. je ilustrována změna fluorescenčního spektra fluorescenčního detektoru v HPLC.
- 1-antracen, 2-azulen, 3-1,12-benzperylen, 4-chrysen, 5-fluoranten, 6-pyren

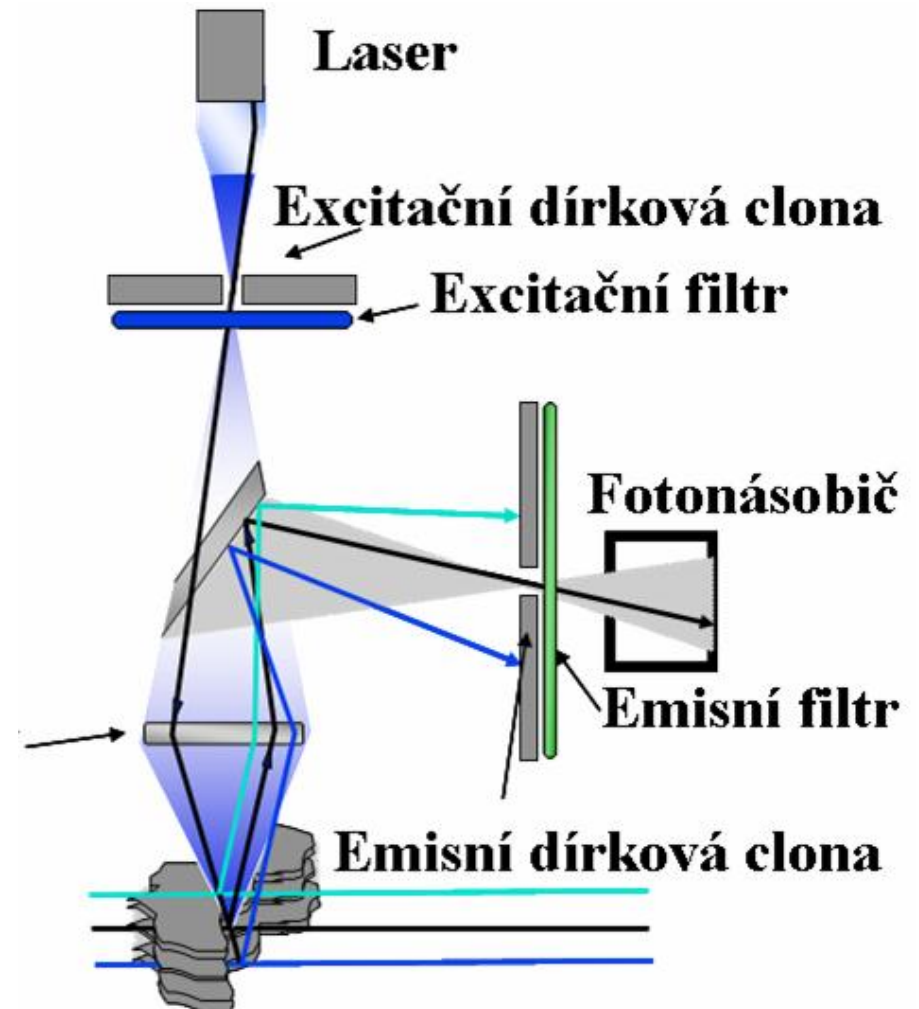
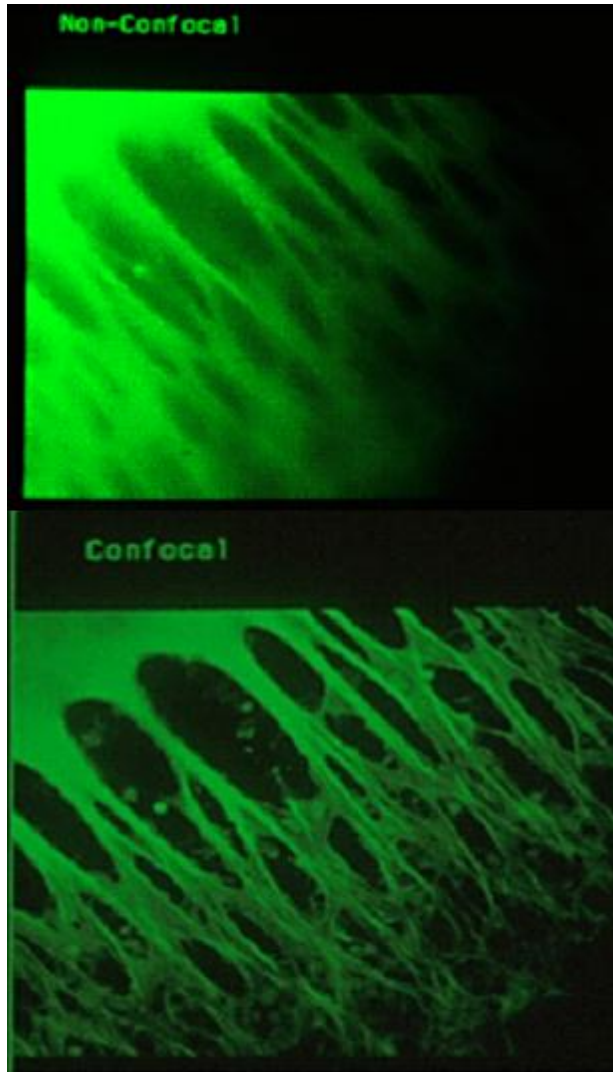


Konfokální mikroskopie

- **Odlišnosti konfokálního způsobu od klasického SM**
- osvětlen je jen jeden bod a signály od okolních bodů (vedle, pod a nad) jsou omezeny otvorem – eliminační aperturou
- režim osvětlení: epi (reflexní) nebo fluo – (fluorescenční)
- **konfokální kondenzor = objektiv** (méně odrazů)
- skenování: rozmítání laserového svazku, příčné posouvání vzorku před objektivem, případně posouvání objektivu nad vzorkem
- konfokální obrazy jsou vždy zaostřené a představují optické řezy vzorkem (pro $\lambda = 488 \text{ nm}$ tloušťka = $0,4 \mu\text{m}$)



Konfokální mikrofleurimetrie



Dvoufotonový mikroskop

- *Dvoufotonový mikroskop* je nový typ optického mikroskopu. Poprvé jej r. 1990 představili američtí vědci v čele s Watem W. Webbem z Cornellovy univerzity v Ithace. Podobně jako „klasický“ konfokální mikroskop umožňuje zobrazovat tenké optické řezy tlustším vzorkem, jeho princip je však odlišný. Místo jednofotonové excitace využívá speciální laser k excitaci dvěma fotony, které jsou absorbovány téměř současně, s šířkou pulzu řádově pouhých 100 femtosekund. Pravděpodobnost dvoufotonové excitace je úměrná druhé mocnině intenzity excitačního pole. Je nejvyšší v rovině zaostření, a proto k získání obrazů optických řezů vzorkem nepotřebujeme konfokální clonku. Mezi výhody dvoufotonové mikroskopie ve srovnání s mikroskopií konfokální patří například větší hloubka proostření (až do 400 μm), a to i u vzorků, jejichž povrchové vrstvy silně fluoreskují, dále pak zvýšený podíl signálu vůči šumu, tedy i kontrastnější zobrazení, zejména v hlubších vrstvách vzorku.

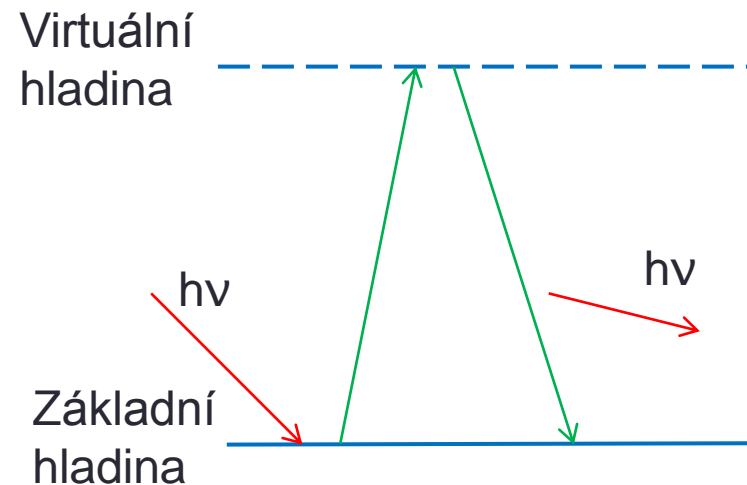
Rozptyl záření

- Rozptyl budícího záření ve fluorescenční spektrometrii je obvykle základní faktor limitující mez detekce, a to:
 - Rayleighův rozptyl je pružný rozptyl na částicích menších než vlnová délka primárního záření
 - Mieho rozptyl je pružný rozptyl na částicích větších než vlnová délka primárního záření
 - Rozptyl nekoherentní (nepružný) – rozptýlené záření má jinou vlnovou délku než záření primární
 - Fluorescence molekul
 - Ramanův rozptyl
 - Rezonanční fluorescence
 - Rozptyl záření na měřící instrumentaci

Rayleighův rozptyl

- Tento rozptyl nastává na částicích podstatně menších než je vlnová délka dopadajícího záření.
- Lord Rayleigh objasnil, že rozptylující částice nejsou nezbytné, protože i nejjistší látky mají drobné fluktuace indexu lomu, což může rozptylovat světlo. Také ukázal, že poměr intenzity rozptýleného světla I_S a dopadajícího světla I_0 je nepřímo úměrný čtvrté mocnině vlnové délky λ :

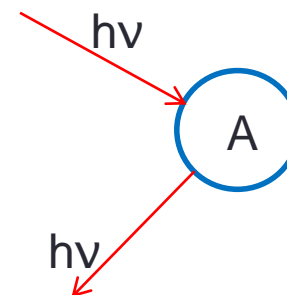
$$\frac{I_S}{I_0} = \frac{\textit{konst}}{\lambda^4}$$



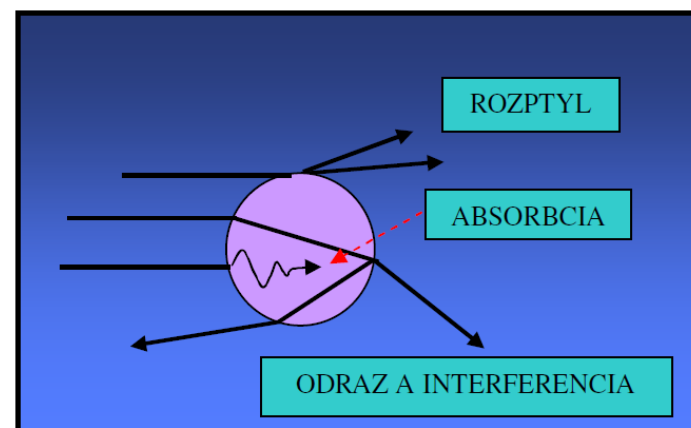
$$e_R \approx 10^{-10} e_A$$

Mieho rozptyl

- Když se velikost částic přiblíží a nakonec přesáhne vlnovou délku světla λ , Rayleighův přístup se již nedá použít. Pro kulaté částice se dá použít teorie odvozená v roce 1908 německým fyzikem G. Miem.
- Mieova teorie předpokládá, že každá částice, na kterou dopadne světlo, že každá částice, na kterou dopadne světlo, se chová jako rezonanční oscilátor, při čemž bere do úvahy, že při interakci paprskem dochází k rozptylu, odrazu, absorpci, lomu a interferenci světla.



$$\varnothing A \geq \lambda_{hv}$$

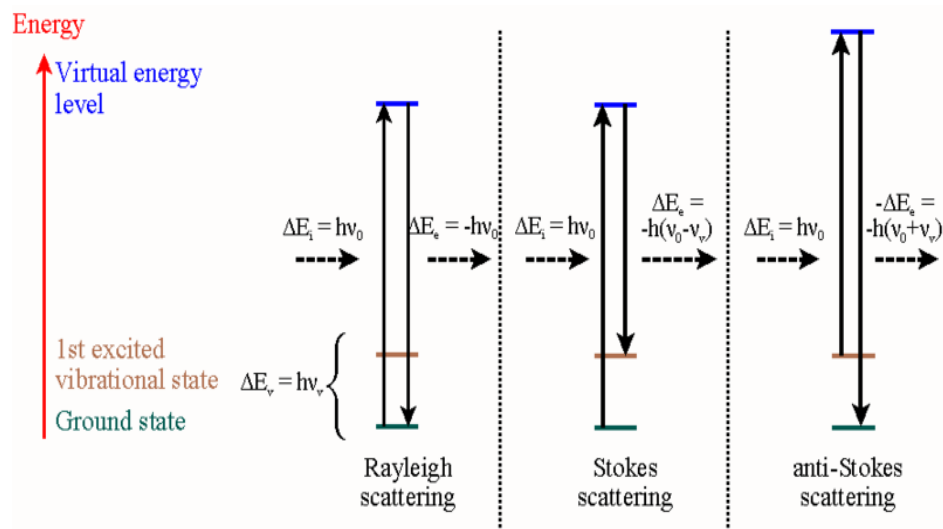


Ramanův rozptyl

- Nepružný Ramanův rozptyl vzniká při interakci mezi fotony dopadajícího záření s vibračními nebo rotačními stavy atomů nebo molekul, kdy rozptýlené záření má jinou vlnovou délku než dopadající záření:

$$E = \hbar\omega \pm \Omega$$

kde Ω odpovídá energetickému rozdílu kvantových hladin dané látky.



$$e_R \approx 10^{-15} e_A$$

Fluorescence molekul

- Fluorescence molekul může být velmi rušivý jev, poněvadž fluorescenční spektrum může pokrývat velký rozsah vlnových délek – až stovky nm.

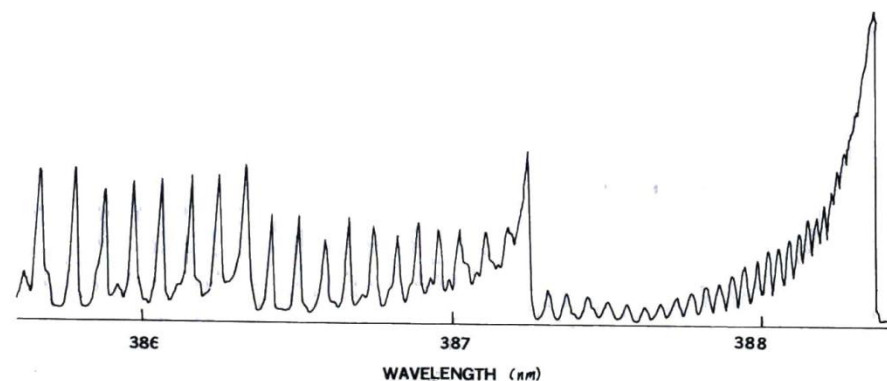
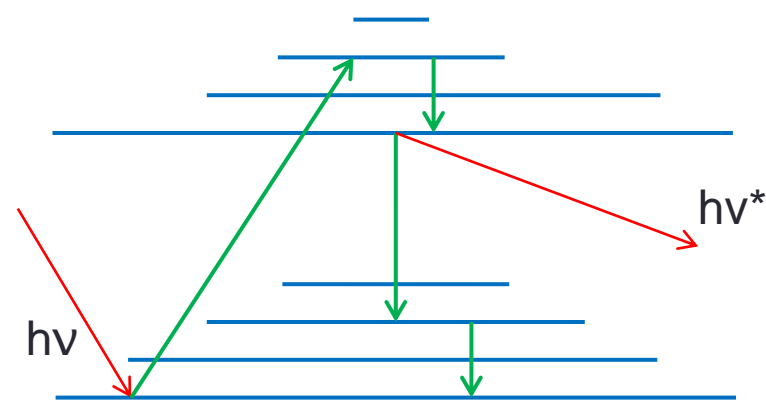


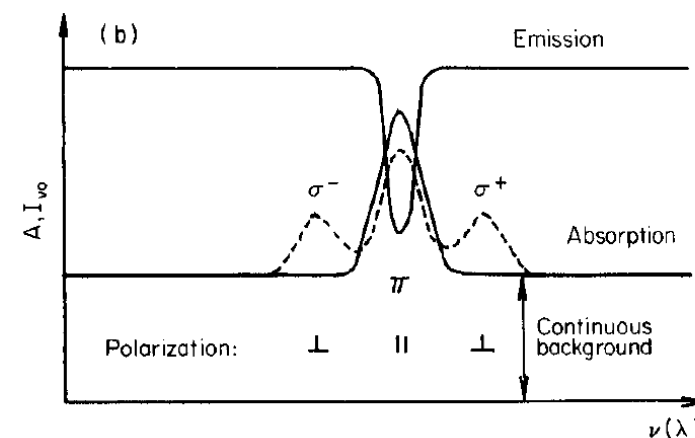
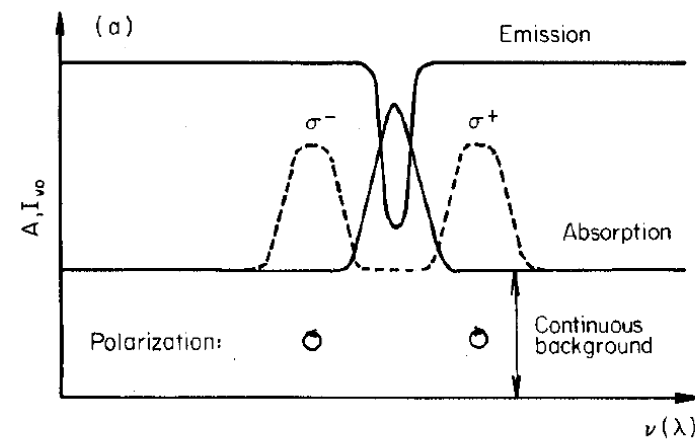
FIG. 5. Excitation spectrum of CN in a nitrous oxide-acetylene flame: $\lambda_n = 385.5$ nm, $400 \mu\text{m}$ slit width, 385–389 nm wavelength range, BBQ dye.

Korekce pozadí

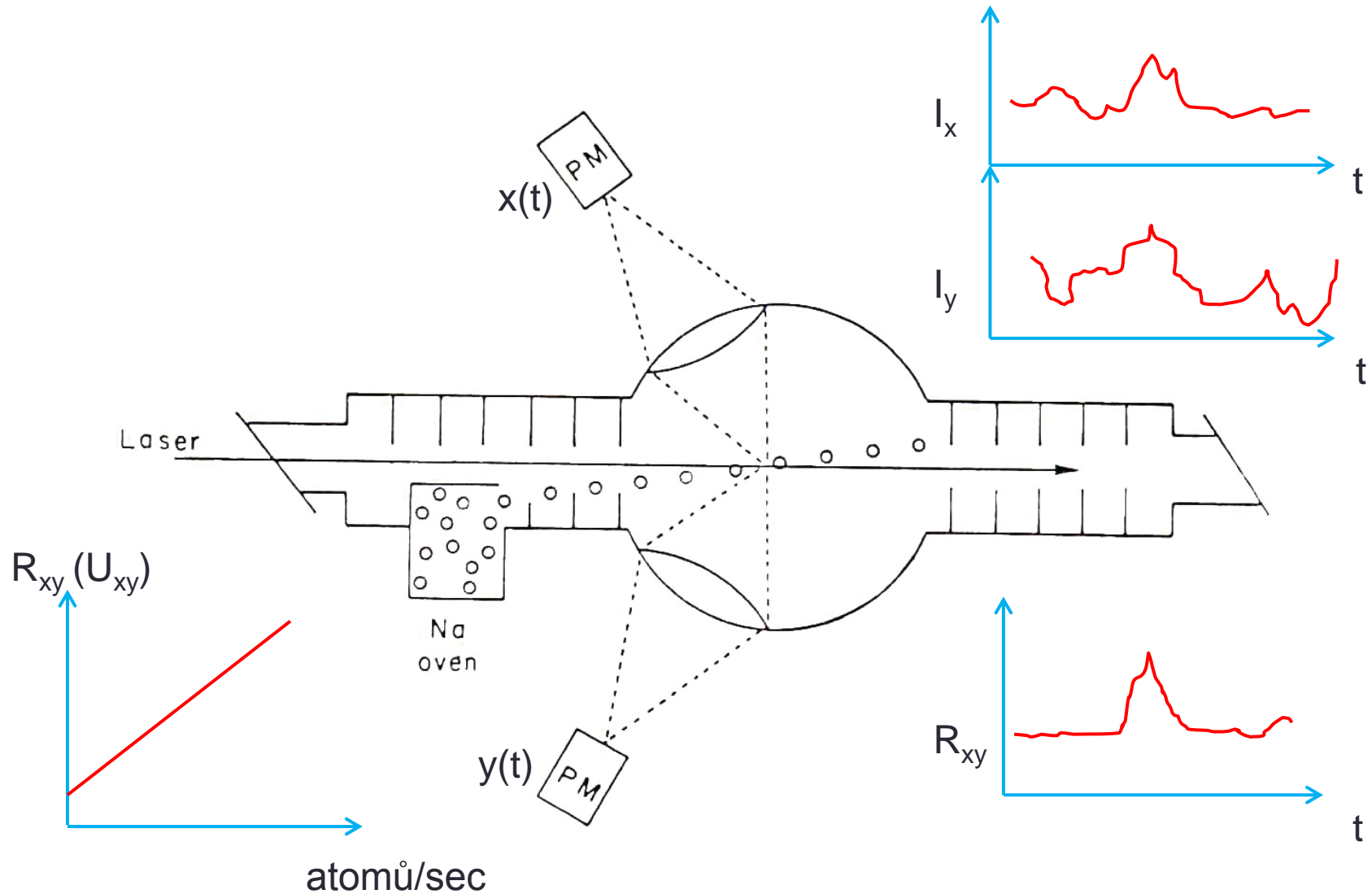
- Korekce signálu na rozptýlené záření, resp. snížení rozptýleného záření, dovoluje snížit mez detekce až o několik řádů. Optimální je měření fluorescence na jiném přechodu, než na kterém probíhá excitace. Další možnosti jsou:
 - Využití Zeemanova jevu – štěpení absorpční čáry v magnetickém poli
 - Skenování pomocí laditelného laseru – měření rozptylu v okolí fluorescenční čáry.
 - Periodické rozmítání emisní čáry budícího laseru v kombinaci s frekvenčně selektivní detekcí (např. lock-in)
 - Využití časově rozlišené fluorescence
 - Multikanálová detekce

Korekce pozadí Zeemanovým jevem

- V proměnném magnetickém poli se mění absorpční profil spektrální čáry, kterou excitujeme pro měření fluorescence. V případě dokonalého štěpení čáry měříme v přítomnosti magnetického pole pouze rozptýlené záření. Pokud dokonalé štěpení absorpčního profilu nenastává (v praxi téměř vždy), pak fluorescenční signál kolísá v rytmu změn magnetického pole a tuto frekvenci je možné dobře oddělit od konstantního signálu rozptýleného záření.
- Molekulová spektra některých molekul, např. O_2 , NO , ClO_2 , NO_2 , jsou v magnetickém poli také modulována, takže Zeemanův jev ke korekci jejich fluorescence není možné použít.



Detekce jednotlivých atomů



Nejběžnější náhodné procesy:

- **Gaussovský proces (spojitá proměnná)**
 - Brownův pohyb,
 - difúze,
 - rychlost molekul,
 - šíření tepla,
 - šum v elektr. Obvodech,
 - fluktuace tlaku,
 - elektrická intenzita světla
- **Poissonovský proces (diskrétní proměnná)**
 - radioaktivní rozpad,
 - pojišťovací události,
 - poruchy, zmetky,
 - dopravní zácpy,
 - fluktuace hustoty atomů (molekul),
 - výstřelový šum,
 - fotodetekce,
 - standardní kvantový šum

Korelace náhodných veličin

- Střední hodnota $\langle xy \rangle$ součinu dvou **nezávislých veličin** je rovna součinu jejich středních hodnot $\langle x \rangle \langle y \rangle \rightarrow \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle = 0$
- Míra závislosti neboli **korelace** $C(x;y)$ je definována vztahem:

$$C(x;y) \equiv \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle$$

Korelace fluktuací $C(\Delta x; \Delta y)$:

$$\Delta x \equiv x - \langle x \rangle; \Delta y \equiv y - \langle y \rangle$$

jsou fluktuace příslušných veličin a jelikož

$$\langle \Delta x \rangle = 0; \langle \Delta y \rangle = 0$$

Bude $C(\Delta x; \Delta y) = \langle \Delta x \cdot \Delta y \rangle - \langle \Delta x \rangle \langle \Delta y \rangle = \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle$ a tedy

$$C(\Delta x; \Delta y) = C(x;y)$$

Diskrétní náhodný proces

pravděpodobnost impulzu je úměrná času

→ **Poissonovský proces**

$$p(n) \approx \langle n \rangle^n / n!$$

Poissonovský proces $\langle (\Delta n)^2 \rangle = \langle n \rangle$



Chaotický proces $\langle (\Delta n)^2 \rangle > \langle n \rangle$ (shlukování impulzů)

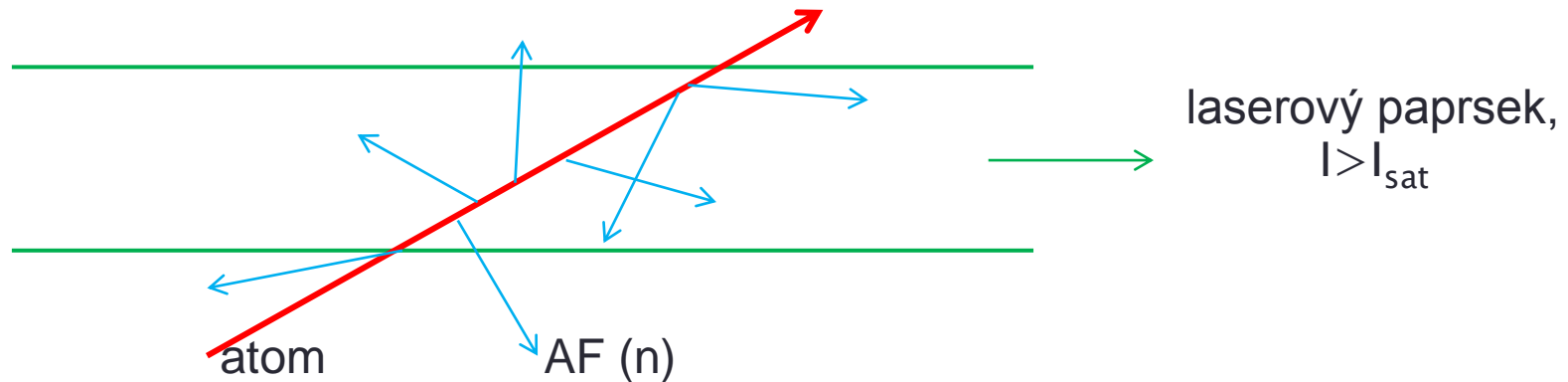


Deterministický proces $\langle (\Delta n)^2 \rangle = 0$ (antishlukování impulzů $\langle (\Delta n)^2 \rangle < \langle n \rangle$)



→ čas

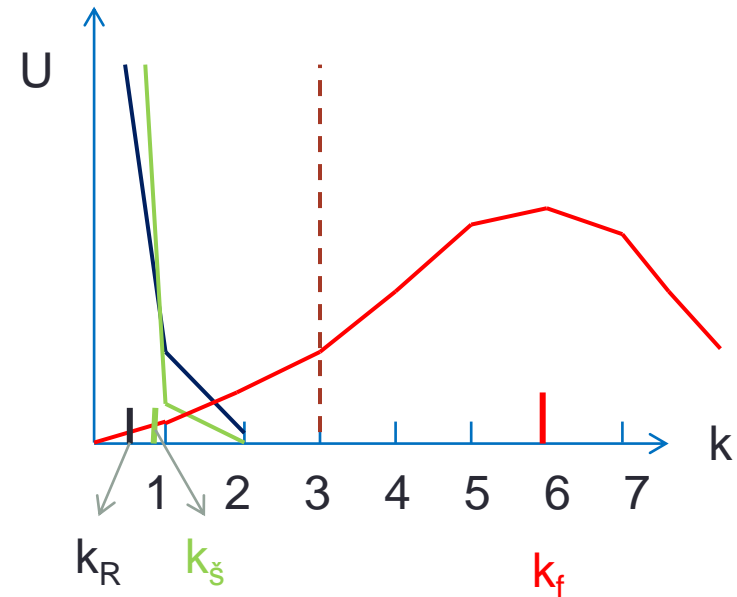
Detekce jednotlivých atomů



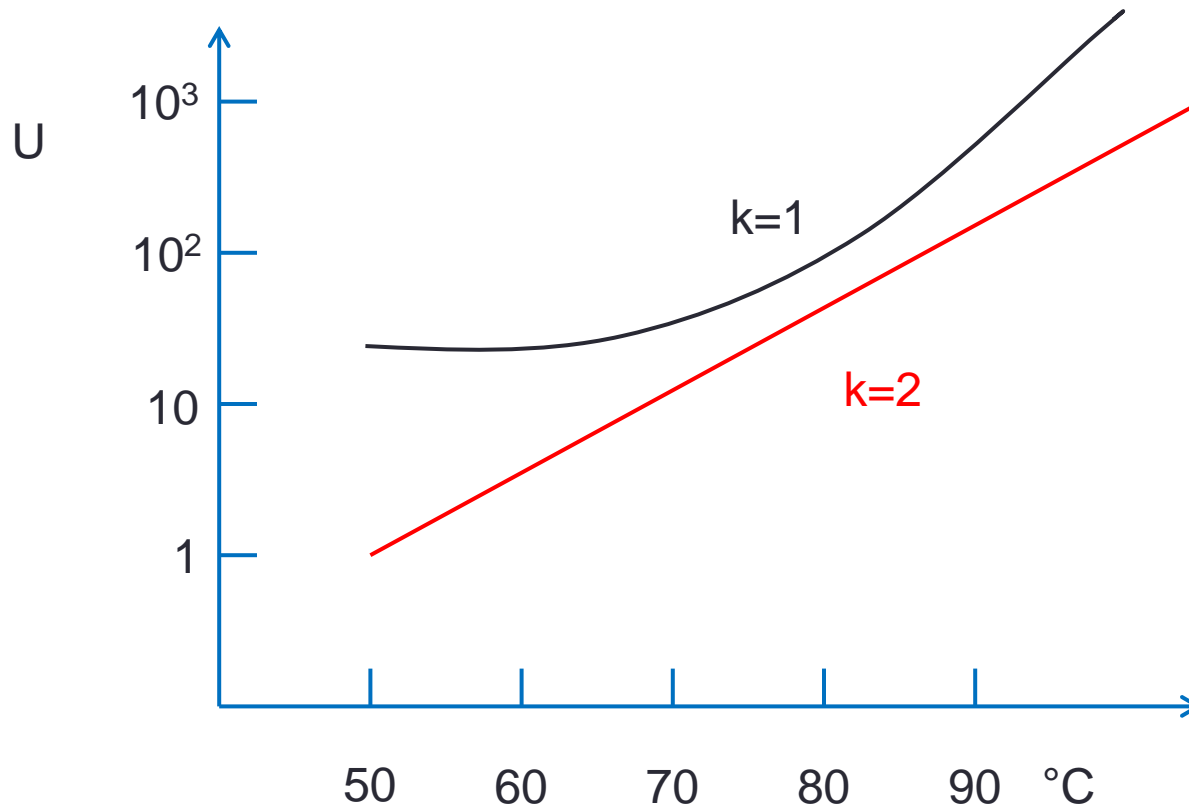
$$\bar{n} = \frac{\tau_{tr}}{2\tau_{sp}}$$

$$\bar{k} = \eta \bar{n}$$

$$W = (k, \bar{k}) = \frac{\exp(-\bar{k})}{k!} \bar{k}^k$$

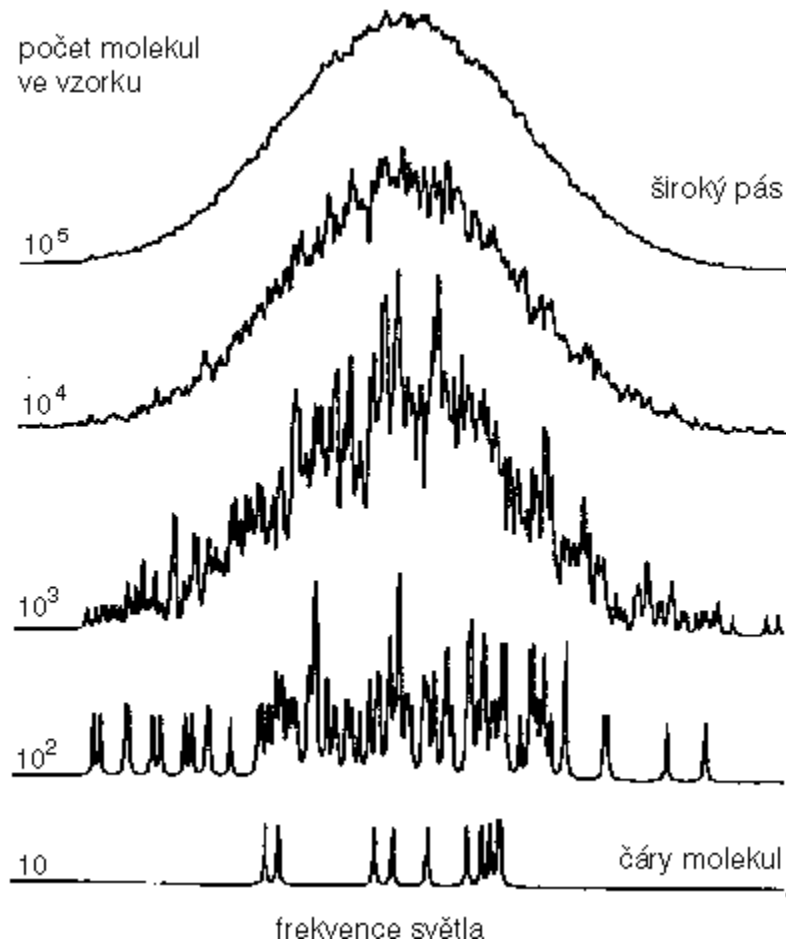


Detekce sodíkových atomů



$P = 0,8 \text{ [Na/s]}$ $P = 0,4 \text{ [Na/s]}$

Spektroskopie jednotlivých molekul



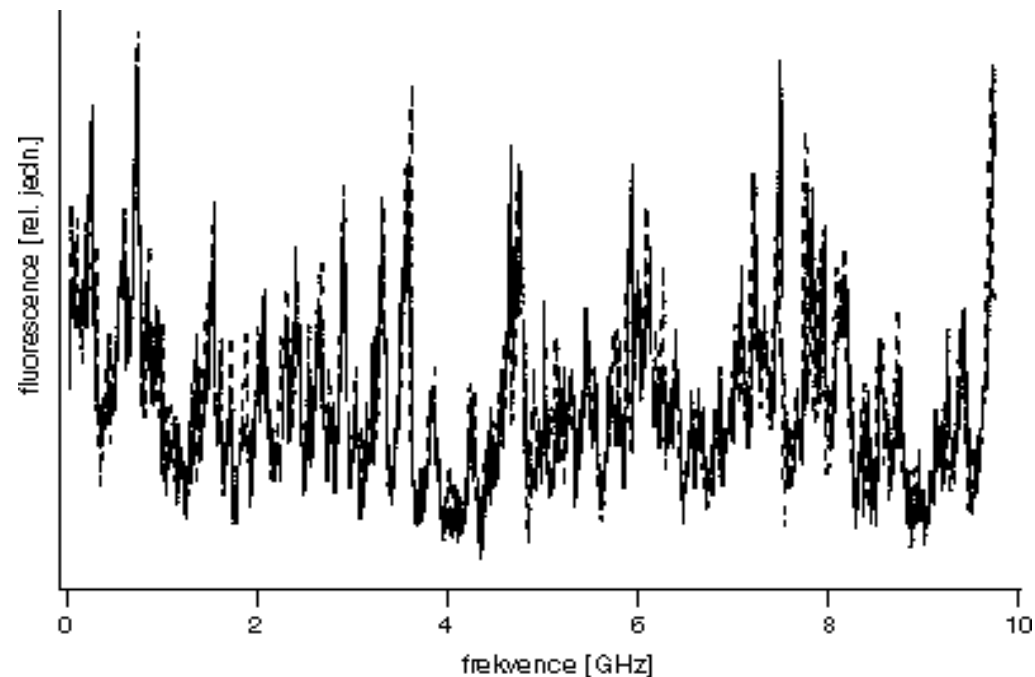
- Je-li ve vzorku 10^5 molekul, dostáváme široký pás, často nazývaný nehomogenně rozšířený pás.
- Snížíme-li počet molekul na 10^3 , pás zůstává široký a objevuje se jemná statistická struktura.
- Je-li 10 molekul ve vzorku, napočítáme ve spektru 10 dobře rozlišených spektrálních čar.
- Laser zaostříme na mikrometrový průměr při koncentraci vzorku 10^{-7} mol/l.

Experimentální požadavky

- Bude světlo vyzážené jednou molekulou dost silné na to, abychom ho dokázali zaregistrovat?
- Světlo musíme zachytit co nejučinněji – nejlépe tak, že vzorek umístíme do ohniska parabolického zrcadla nebo objektivu mikroskopu.
- použít co nejcitlivější detektor světla, nejlépe fotonásobič a čítač fotonů. I tak ale zaregistrujeme přinejlepším několik procent vyzáženého světla. A vzhledem k tomu, že na výstupu z detektoru bychom potřebovali detegovat aspoň stovky impulzů za sekundu, abychom světlo molekuly odlišili od pozadí, musí být molekula schopna vyzářit za stejnou dobu desetitisíce (10^4) fotonů, aniž by při tom prodělala jakoukoli změnu. A aby pozadí bylo co nejnižší, musí molekula měřící laserové světlo také účinně pohlcovat. Z toho všeho se nám pomalu rýsují vlastnosti, jaké bude muset molekula mít: vysoký absorpční průřez, vysoký kvantový výtěžek fluorescence, vysokou stabilitu a zanedbatelné obsazování tripletního stavu. To jsou poměrně přísné požadavky, které doposud splňuje několik málo aromatických uhlovodíků. Nejčastěji se pro spektroskopii používají pentacen a terrylen.
- Zkusme tedy shrnout experimentální podmínky: potřebujeme měřit zředěný roztok (o koncentraci nejvýše 10^{-7} mol/l) vhodně vybraných molekul při nízké teplotě (nejlépe pod 2 K). Signál musíme sbírat optikou s vysokou numerickou aperturou a detegovat velmi citlivým detektorem. A potřebujeme měřit excitační spektra, tzn. budeme sledovat, jakou frekvenci má světlo, které molekula pohltí, tím, že budeme registrovat světlo, které molekula po pohlcení vyzáří.

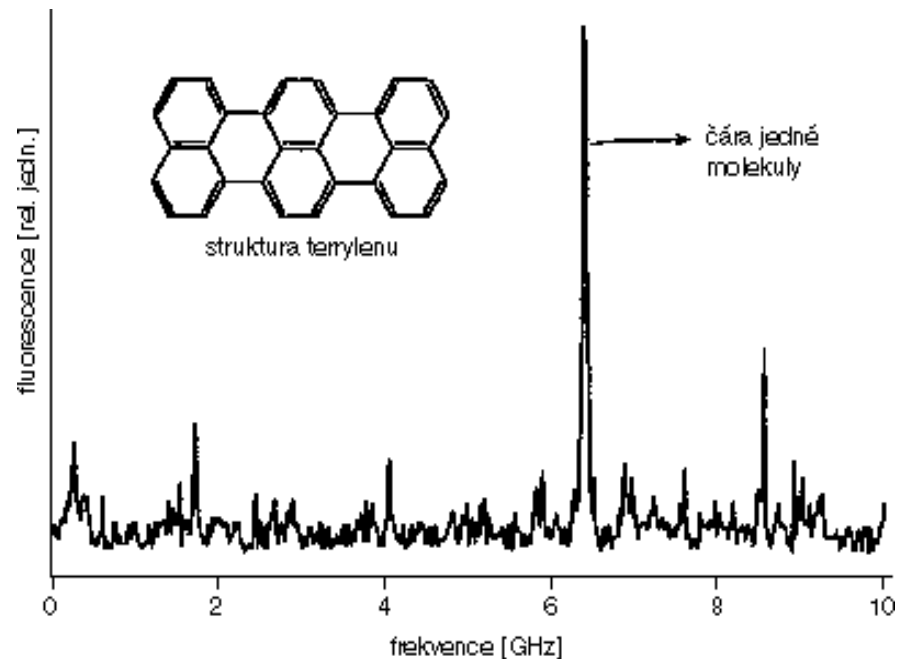
Reprodukovatelnost spekter

- Vezměme organickou látku terrylen a rozpustíme ji v normálním alkanu (např. dodekan) na koncentraci 10^{-7} mol/l. Na obr. vidíme spektrum takového vzorku, které na první pohled vypadá spíš jako chaotický šum. Ve skutečnosti jde o dvě různá spektra měřená hned po sobě, která se téměř dokonale překrývají. Podíváme-li se na obrázek, připomene nám to prostřední spektrum – ano, jde o jemnou statistickou strukturu. Molekuly v krystalu zamrzly chaoticky a výsledkem je značně rozdílný počet molekul na jednotlivých frekvencích.



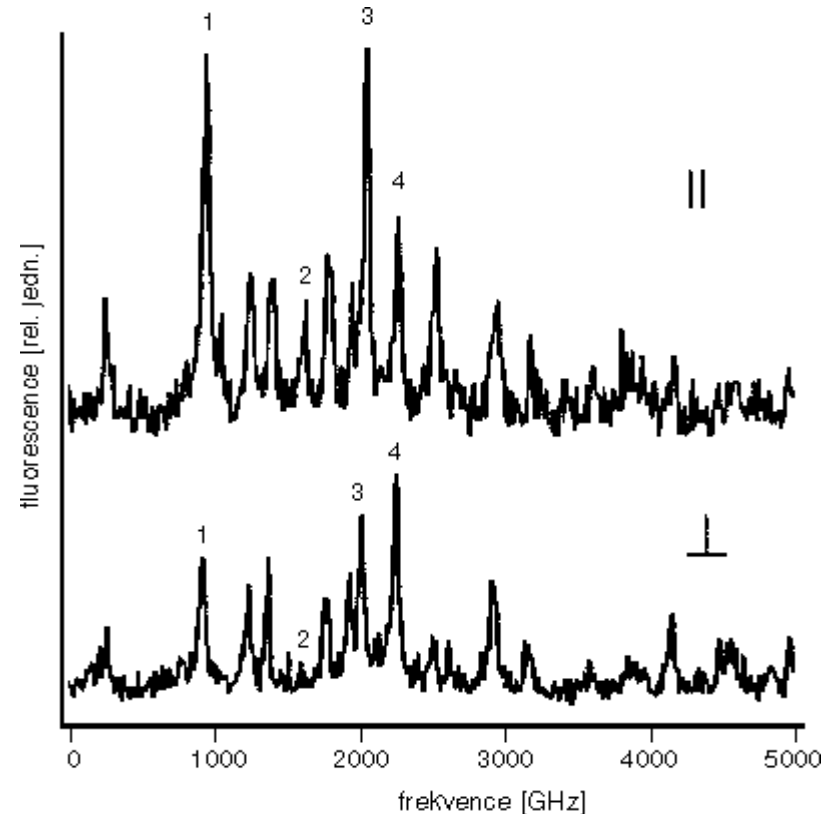
Spektrum jedné molekuly

- Přeladíme tedy frekvenci světla laseru na okraj širokého pásu – tam můžeme jednotlivé čáry rozlišit. Pak celému spektru dominuje jedna úzká intenzivní čára, která pochází od jedné molekuly.



Orientace molekul v krystalu

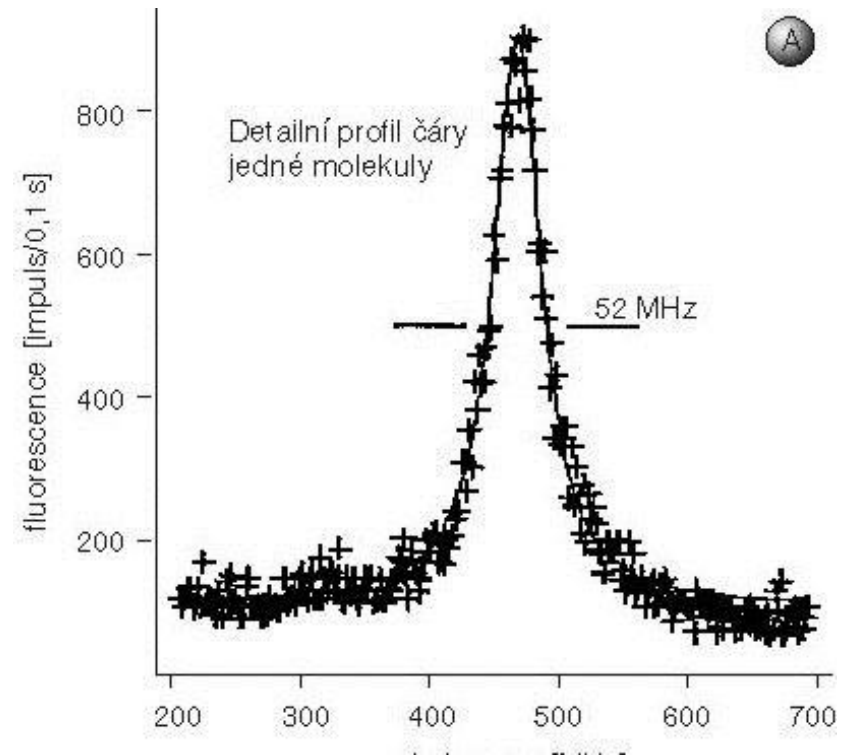
- dvě spektra celé série čar jednotlivých molekul, přitom každá z nich je jinak intenzivní
- ne všechny molekuly se nalézají přímo v bodě největšího zaostření laserového paprsku
- Další příčinou je, že záření laseru je polarizované. Polarizované světlo nejlépe pohlcují molekuly jejichž dipólové momenty přechodu jsou orientovány rovnoběžně s rovinou polarizace laserového světla. Naopak molekuly, které jsou orientovány kolmo k této rovině, nepohlcují světlo vůbec.
- Při měření spekter byl použit analyzátor. Ten nám umožňuje zjistit, jak je polarizované světlo, které molekuly vyzařují. Opět nejlépe zaregistrujeme molekuly, jejichž vyzářené světlo je polarizované rovnoběžně s rovinou analyzátoru, kdežto ty, jejichž rovina polarizace je kolmá k analyzátoru, nezaregistrujeme vůbec.
- Spektra se liší tím, že jedno je změřeno s analyzátozem rovnoběžným s rovinou polarizace laseru, druhé s analyzátozem kolmo k polarizaci laseru. Jak se tedy mění intenzity jednotlivých čar?
- Čára číslo 1 a 3 jsou v dolním spektru méně než poloviční, čára 2 zmizela úplně a čára 4 zůstala stejná. Co nám to říká o orientaci molekul? Molekula 2 musí být rovnoběžná s rovinou polarizace laseru, molekula 4 s ní svírá úhel přibližně 45 stupňů, a molekuly 1 a 3 úhly mezi 0 a 45 stupni..
- V každém případě nám obr. ukazuje jednu z možností této metody – dokážeme poměrně přesně měřit orientaci jednotlivých molekul ve vzorku!



Polarizační spektra jednotlivých molekul. Intenzita jednotlivých čar se mění při změně orientace roviny analyzátoru ze směru rovnoběžného s rovinou polarizace laserového světla (horní spektrum) do směru kolmého (dolní spektrum). Terrylen v dodekanu, teplota 1,6 K.

Emisní profil fluorescence

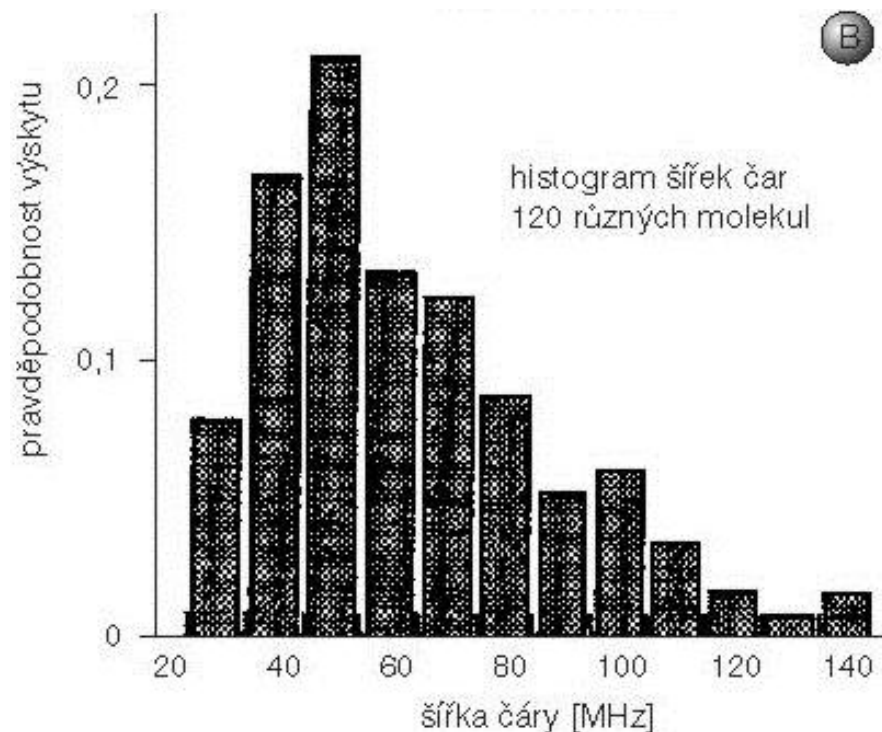
- Na obr. je detailně změřena čára jedné molekuly. Má lorentzovský profil, jak to předpovídá kvantová teorie, a je to také jeden z argumentů, proč jde právě o jednu molekulu a ne o více. Čára na obr. má šířku 52 MHz. Tady se znovu obrátíme ke kvantové teorii, jejíž princip neurčitosti nám říká, že šířka čáry je nepřímo úměrná době života vybuzeného stavu molekuly. Doba života vybuzeného stavu se dá přímo změřit a pro terrylen vychází 3,8 ns, a měla by být pro všechny molekuly stejná. Z toho pak snadno spočítáme, že všechny molekuly by měly mít stejné spektrální čáry o šířce 42 MHz.



Detailně změřený tvar čáry jedné molekuly, naznačený křížky. Plná čára představuje proložení změřeného spektra lorentzovskou funkcí

Šířky čar

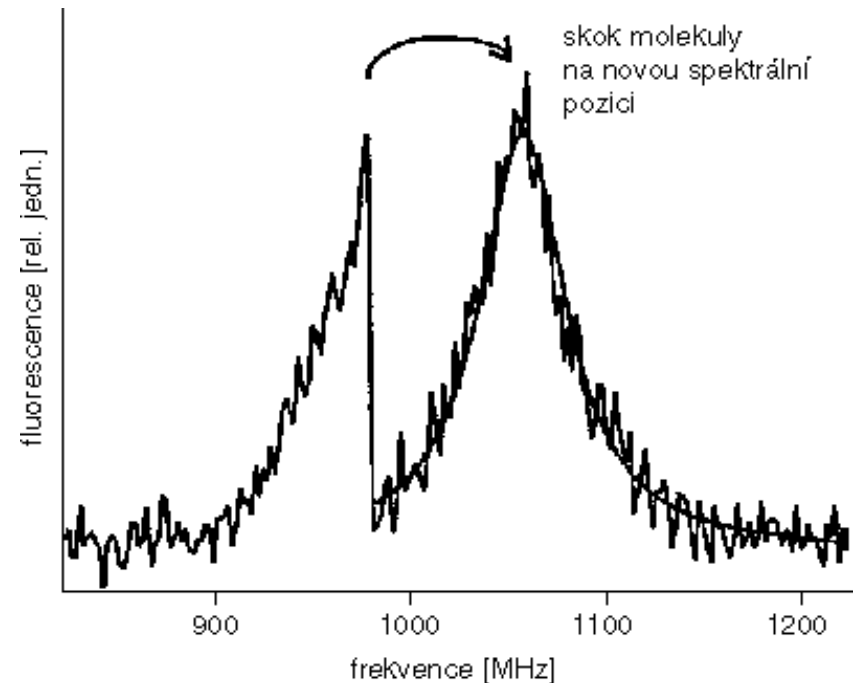
- Histogram ukazuje, s jakou pravděpodobností se ve spektrech vyskytly čáry s danou šířkou, že proti očekávání byla většina čar širších než 42 MHz. Během měření spektra se krystal nepatrně mění, je v neustálém pohybu i když měříme při teplotách 1,6 K. Neustálé nepatrné změny struktury krystalu ovlivňují energetické hladiny molekul.



Histogram rozdělení šírek čar 120 molekul

Přeladování frekvence molekuly

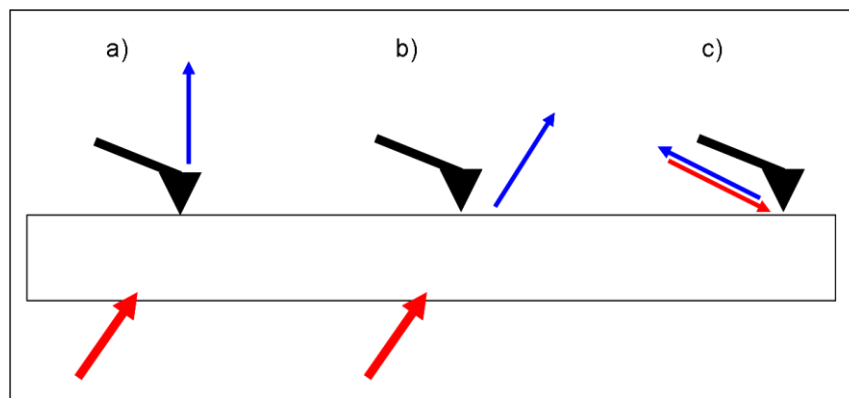
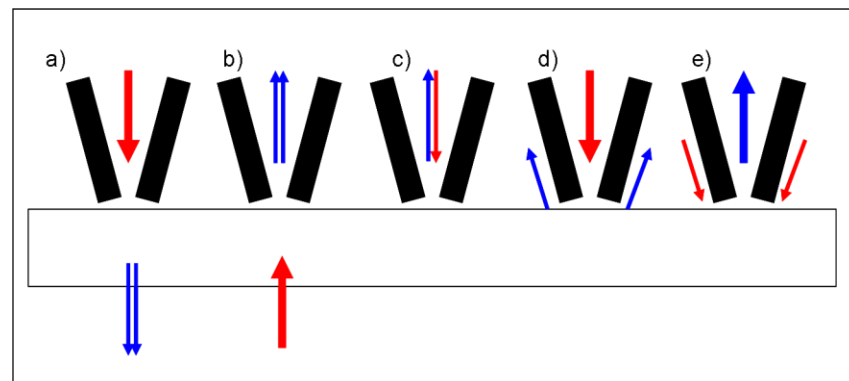
- Změny okolí měřené molekuly ovlivňují samozřejmě její energetické hladiny a tedy i frekvenci vyzářeného světla. Pokud tyto změny nastávají podstatně rychleji, než dokážeme změřit čáru, měříme vlastně jakousi obálku různě pozměněných čar. Histogramy nám pak mohou říci hodně o dynamice krystalů, ale i skel nebo polymerů za nízkých teplot.



Spektrální skok čáry jedné molekuly pozorovaný během měření spektra. Čára na nové pozici je opět proložena lorentzovskou funkcí

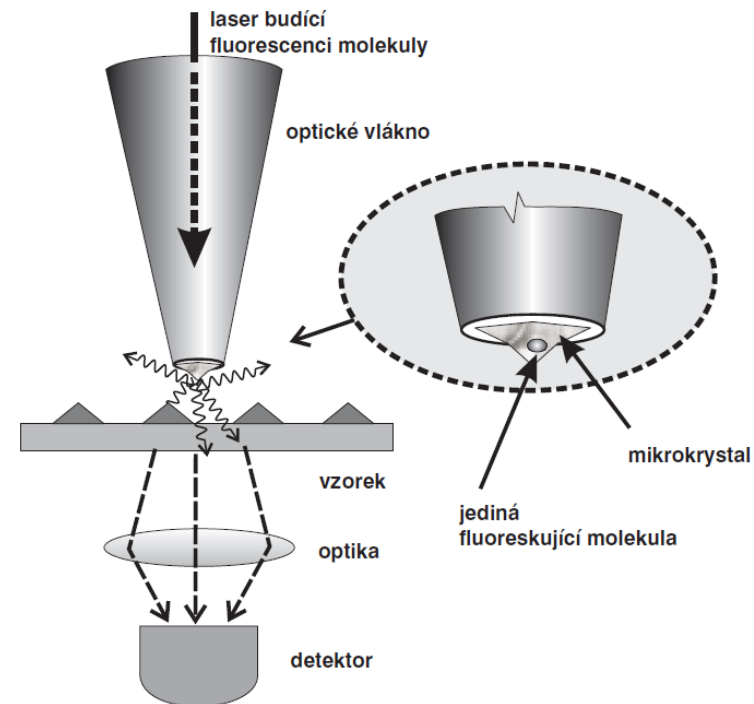
SNOM (scanning near-field optical microscope)

- Studium rozličných vzorků běžnou optickou mikroskopií naráží na neúprosnou mez rozlišení (plynoucí z vlnové povahy světla) – ohybový (difrakční) limit, jenž omezuje nejmenší vzdálenost dvou bodů, které ještě mohou být odlišeny, na zhruba polovinu vlnové délky použitého světla.
- Toto omezení je možné obejít u mikroskopu pracujícího v blízkém optickém poli (scanning near-field optical microscope – SNOM), který je variantou jiných skenujících (či správněji řádkujících) mikroskopů (STM – skenující tunelovací mikroskop, AFM – mikroskop atomárních sil aj.).



Fluorescenční SNOM

J. Michaelis s kolegy z Univerzity v Kostnici (Nature 405,325–327, 2000) sestavili první zařízení tohoto typu. Využili své zkušenosti se spektroskopií jednotlivých molekul a jako vhodný světelný zdroj zvolili molekulu terylenu. K jeho uchycení použili mikrokrystal p-terpenylu obsahující nepatrnou příměs terylenu (jednu molekulu na 10 milionů molekul krystalu). Z mikronových krystalků byl vybrán jeden s vhodnou fluorescencí právě jedné molekuly terylenu a opatrně přilepen na konec zašpičatěného optického vlákna. Vláknko pak bylo připevněno jako hrot do skenujícího mikroskopu pracujícího za teploty 1,4 K. Terylen byl excitován laserovým paprskem účinně budící fluorescenci molekuly terylenu, jako pokusný vzorek posloužily 25 nm velké hliníkové ostrůvky uspořádané v pravidelné mřížce na skleněné destičce. Jedna molekula osvětlovala postupně vzorek a procházející světlo bylo detegováno lavinovou fotodiodou.



Fotonásobiče - rušivé vlivy

- **Teplota** – termoemise z fotokatody – chlazení na -20°C až -40°C u multialkalických katod, na -160°C u typů AgO-Cs
- **Magnetické pole** – deformace dráhy elektronů v PM – stínění slitiny typu pemalloy
- **Elektrické pole** – deformace dráhy elektronů v PM – Faradayovo stínění
- **Radioaktivita** – záření konstrukčních materiálů, především skla (např. draslík), výběr neaktivních materiálů pro výrobu
- **Kosmické záření** – spršky částic z atmosféry. Stínění, vyloučení chybových signálů korelací s referenčním PM.
- **Helium** – difuze přes sklo. Vyloučení He z atmosféry (GC), výměna PM.

Šum

- Je udáván obvykle jako střední kvadratická hodnota fluktuace signálu (I, U, R, Q,...):

$$\bar{I}_R = \sqrt{\frac{1}{T} \int_0^T [I_S(t) - \bar{I}_S]^2 dt}$$

a je závislý na šířce pásma měřených frekvencí Δf :

$$\bar{I}_R \approx \sqrt{\Delta f}$$

NEP (noise equivalent power)

- Je definován jako šumový výkon detektoru pro frekvenční pásmo $\Delta f = 1$ Hz:

$$NEP = \frac{\overline{P_R}}{\sqrt{\Delta f}} \quad [WHz^{-2}]$$

- NEP* (specifický NEP) je definován jako ekvivalentní šumový výkon vztažený na jednotkovou plochu A fotodetektoru:

$$NEP^* = \frac{NEP}{\sqrt{A}}$$

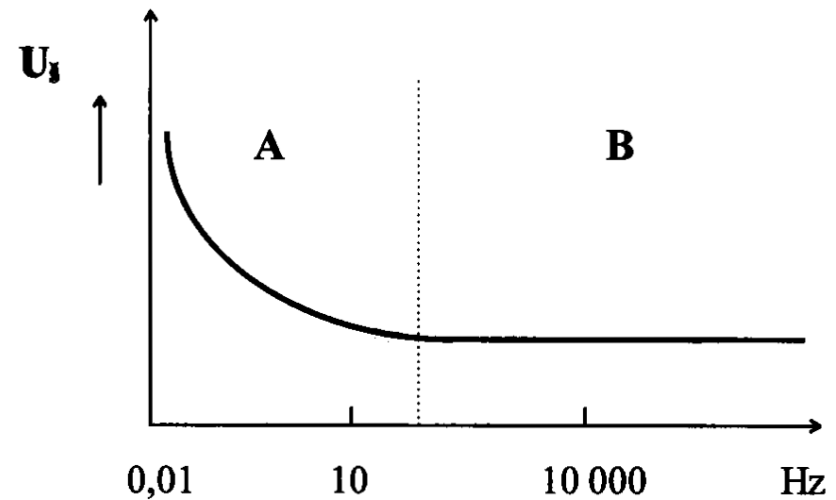
Frekvenční spektrum šumu

- Oblast A: Růžový (pink noise) šum $1/f$

$$\int_0^{\infty} U_R(t) dt \geq 0$$

Oblast B: Bílý šum
(white noise):

$$\int_0^{\infty} U_R(t) dt = 0$$



Čítač fotonů

- Signál se nejprve zesílí, komparátorem se oddělí pulsy s dostatečnou amplitudou od šumu. Impulsy je pak možno počítat běžným čítačem nebo zaznamenávat počítačem. Tato metoda je složitější než analogové měření, ale dosahuje většího odstupu šumu a stability.
- Fotokatoda a dynody vlivem tepelných kmitů mřížky emitují elektrony i když zrovna nedopadá žádné záření. Vzniká tak výstřelový šum. Odpovídající střední hodnota anodového proudu se pak nazývá temný proud nebo proud za tmy. Pokud je nežádoucí elektron emitován na některé z dalších dynod, nedojde k plnému zesílení a výsledný impuls má zdatelně menší amplitudu než impuls vyvolaný fotonem. Pokud využíváme režim čítání fotonů, nastavíme komparátor tak, aby na tyto menší impulsy nereagoval.

