

LASER INDUCED FLUORESCENCE

Vítězslav Otruba

Atomic fluorescence

- Atomic fluorescence
- Energy yield of fluorescence χ_F
- Quantum efficiency of fluorescence Φ_F

$$\chi_F = \frac{E_{emit}}{E_{abs}} \leq 1 \quad \Phi_F = \frac{N_{emit}}{N_{abs}}$$

- Fluorescence quenching: collision of excited atoms with other atomized particles - transmission of E without photon emission.
- Fluorescence scattering: on non-vaporised particles in an atomizer and on the spectrometer optics.

Atomic fluorescence

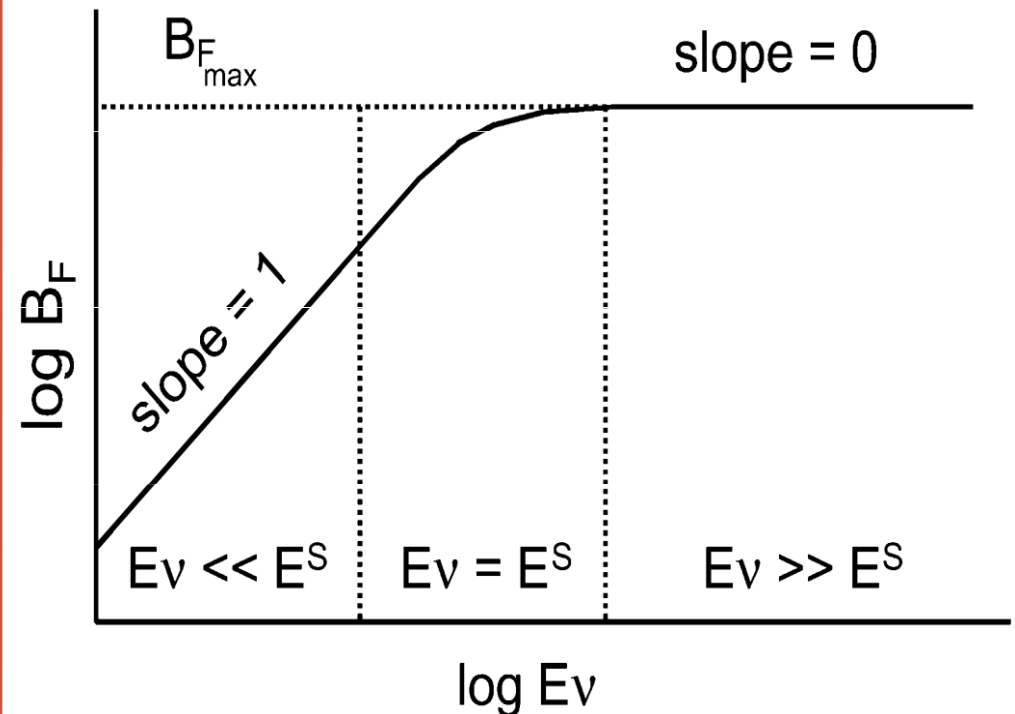
Basic relationships

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

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

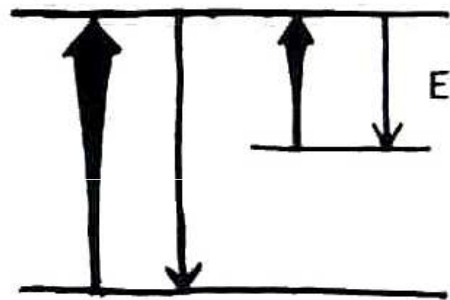
$$\Psi_{fl} = \frac{1}{2\pi} h\nu A_{10} B_{01} \rho(\nu) n_0$$

Influence of saturation



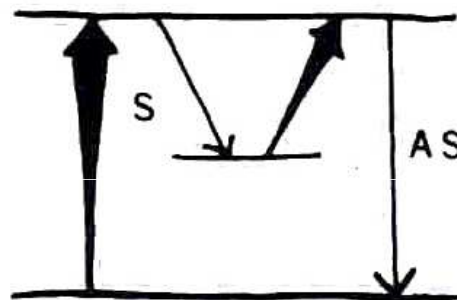
Fluorescence excitation

TYPES OF AF TRANSITIONS



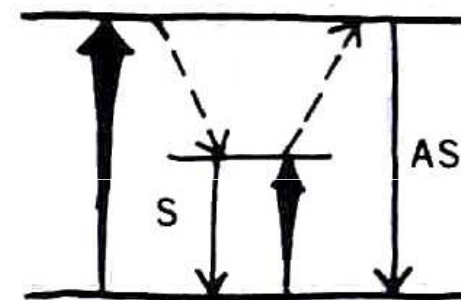
RESONANCE

(i)



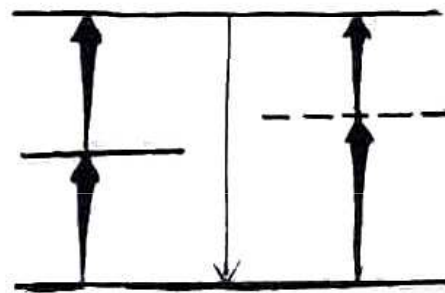
DIRECT LINE

(ii)



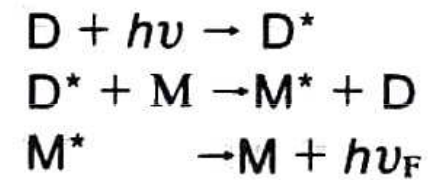
STEPWISE LINE

(iii)



TWO PHOTON

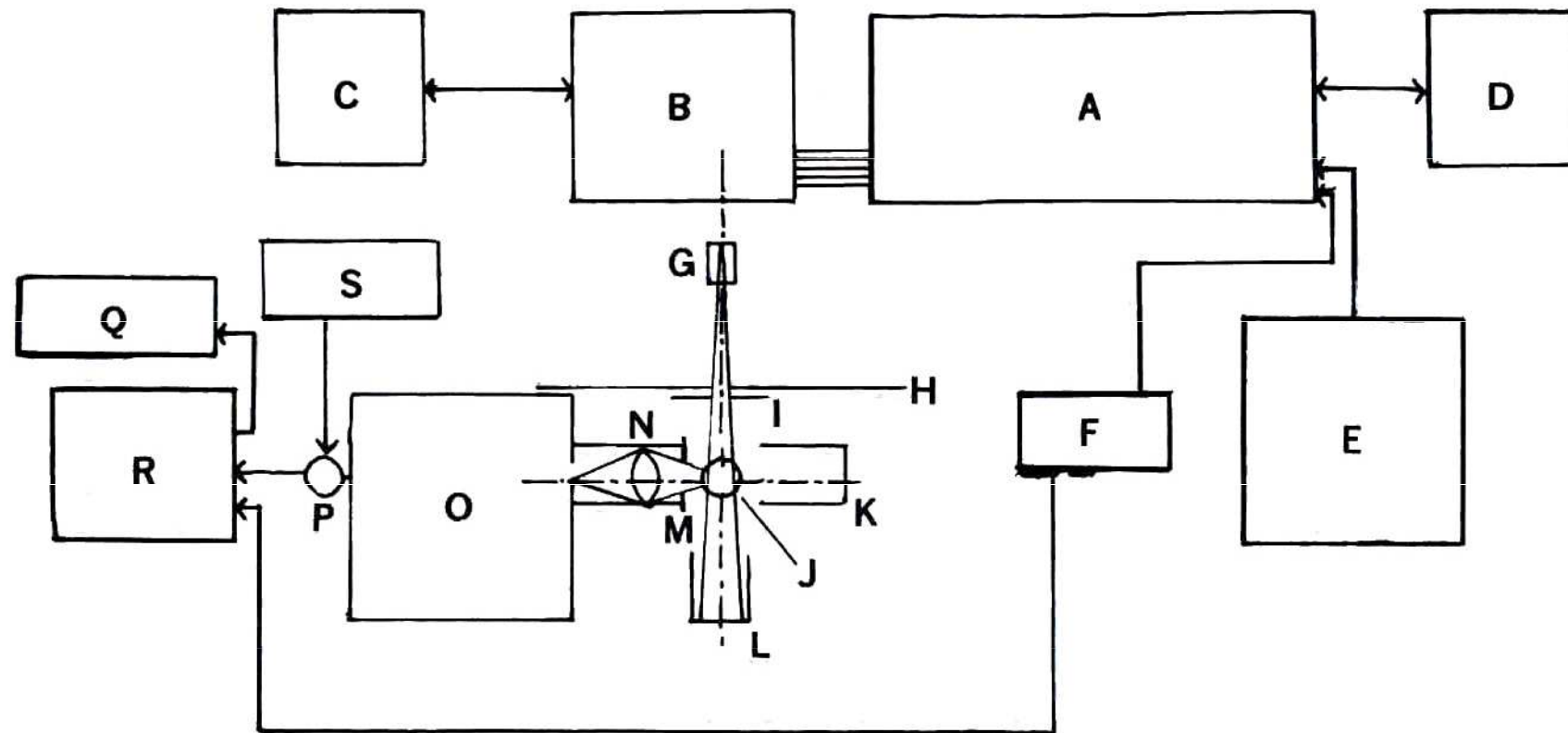
(iv)



SENSITIZED

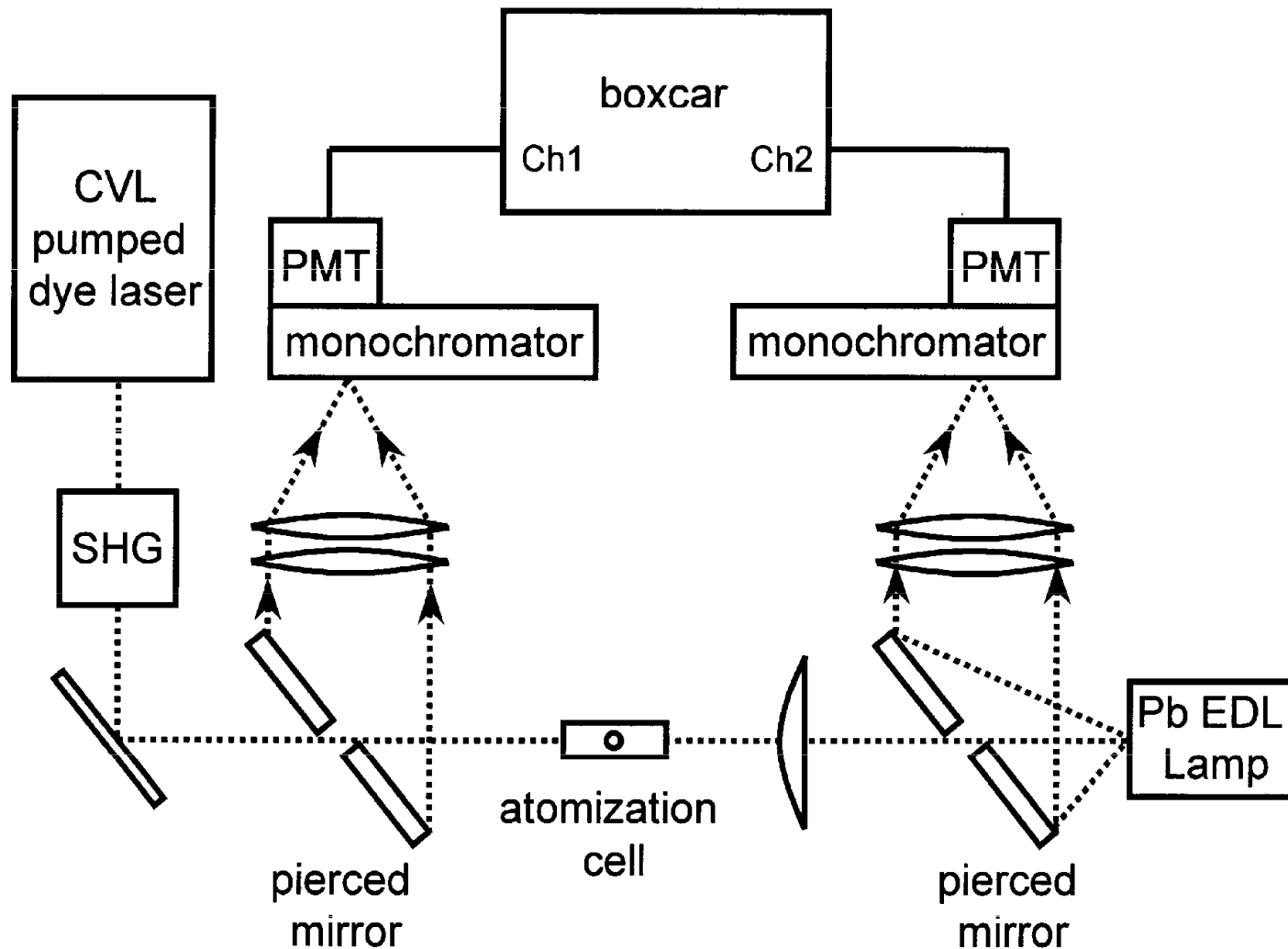
(v)

Schematic diagram of the spectrometer



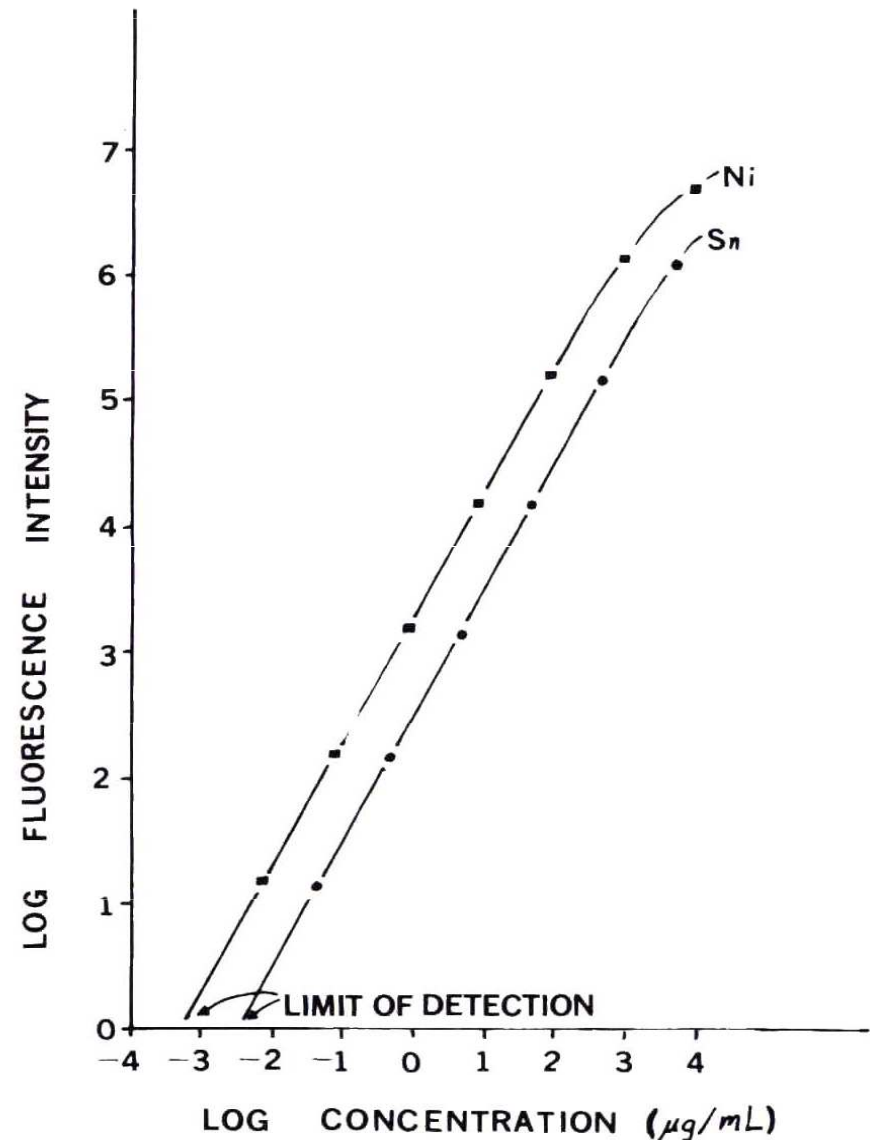
Schematic diagram of laser-excited atomic fluorescence flame spectrometry system: A, N₂ laser; B, dye laser; C, dye laser control unit; D, vacuum pump; E, N₂ laser power supply; F, trigger source; G, beam expander; H, panel; I, diaphragm; J, burner/nebulizer; K, light trap; L, light trap; M, diaphragm;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

Calibration of wavelengths



Concentration dependence

- 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 overview

Detection limits and linear dynamic range of determination in acetylene-air flame

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

Three-level system

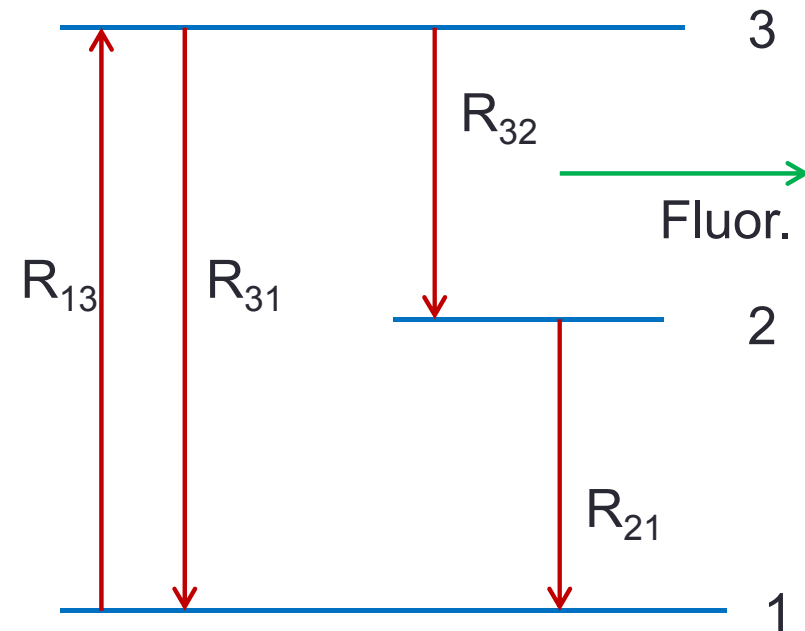
Assuming that the spectral width of the absorption profile of the levels is less than the spectral width of the excitation radiation, the following applies:

$$dn_1/dt = -n_1(R_{12} + R_{13}) + n_2R_{21} + n_3R_{31}$$

$$dn_2/dt = n_1R_{12} - n_2(R_{21} + R_{23}) + n_3R_{32}$$

$$dn_3/dt = n_1R_{13} + n_2R_{23} - n_3(R_{31} + R_{32})$$

where R_{ij} are the excitation and deexcitation rates of the individual levels including radiation and collision processes.



Pumping 1 – 3:

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

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

Detection of lead in gas phase

• Three-level system, level 2 metastable:

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)

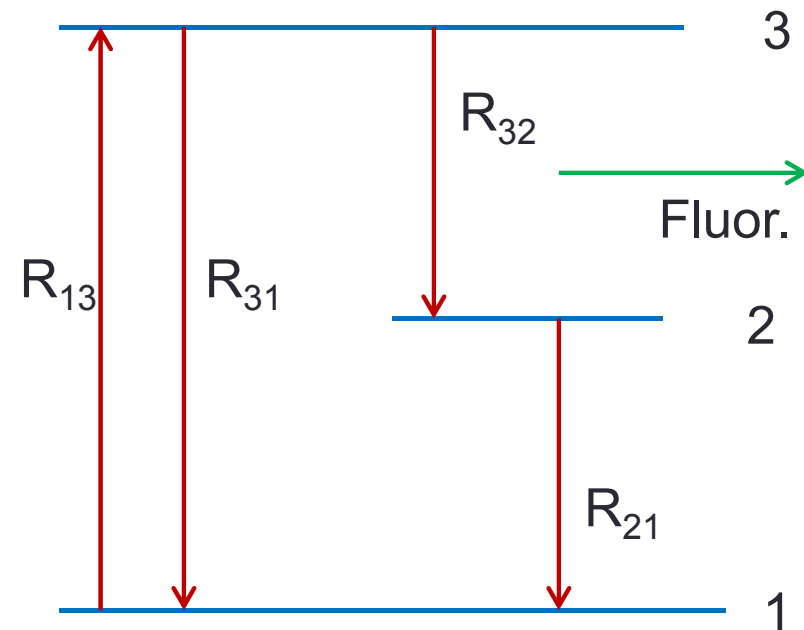
$R_{21} \cong 5 \cdot 10^4 \text{s}^{-1}$ ($A_{21} \approx 1,8 \cdot 10^5 \text{s}^{-1}$)

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

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

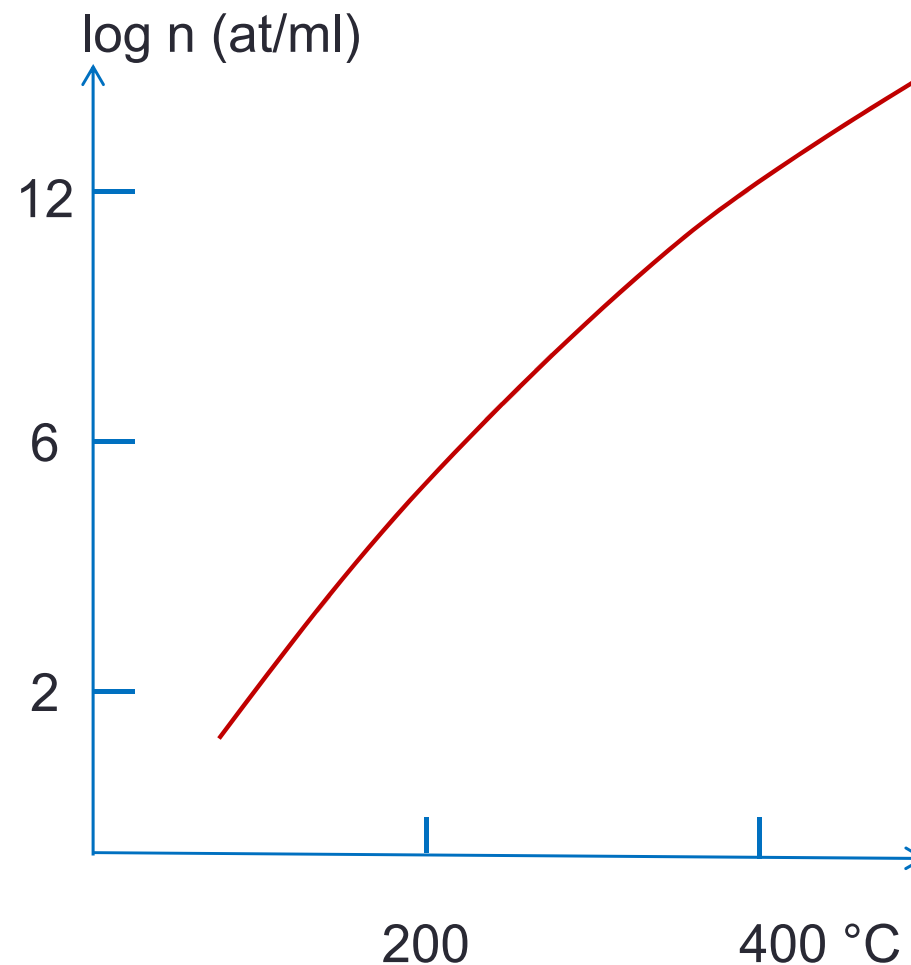
In case of laser saturation power:

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



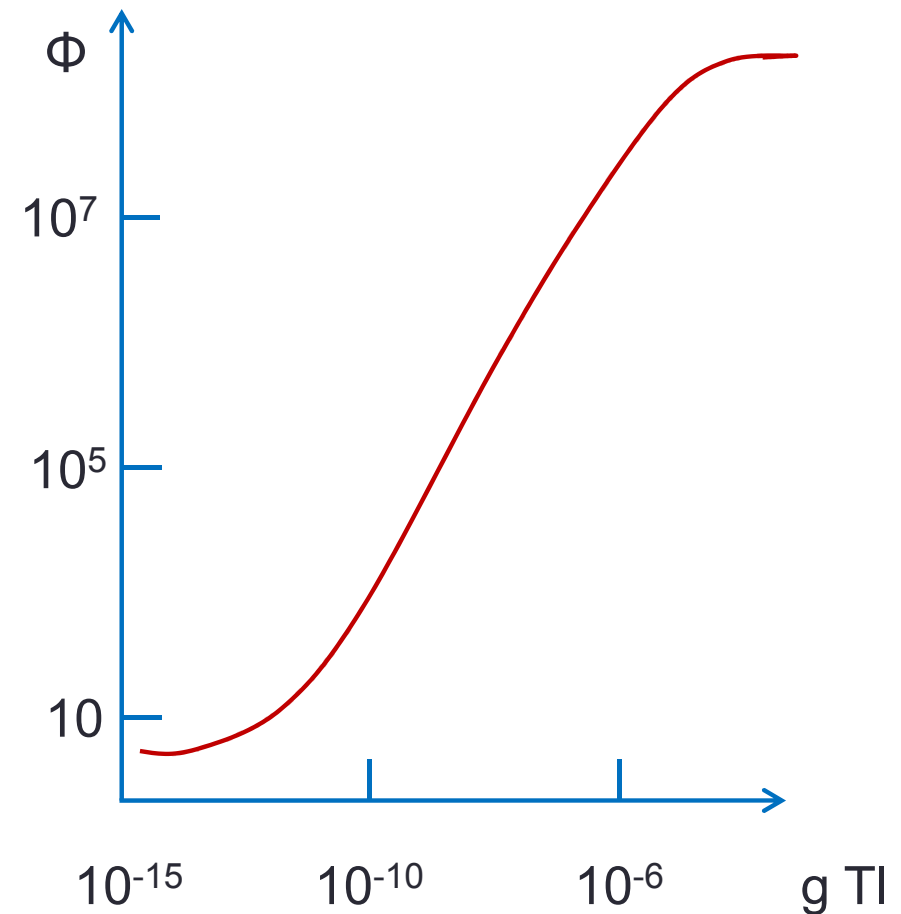
Detection of lead in gas phase

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



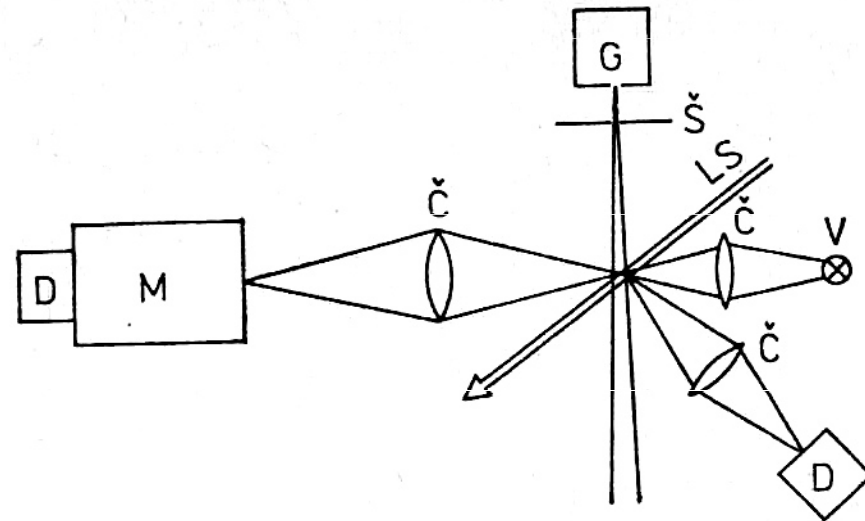
LAF in graphite cuvette - TI

- $\lambda_{\text{exc}} = 276,8 \text{ nm}$,
- $\lambda_{\text{fl}} = 352,9 + 351,9 \text{ nm}$
- Dye laser,
2. harmonic
- Pumping - nitrogen 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%



Atomic beams - absorption and fluorescence

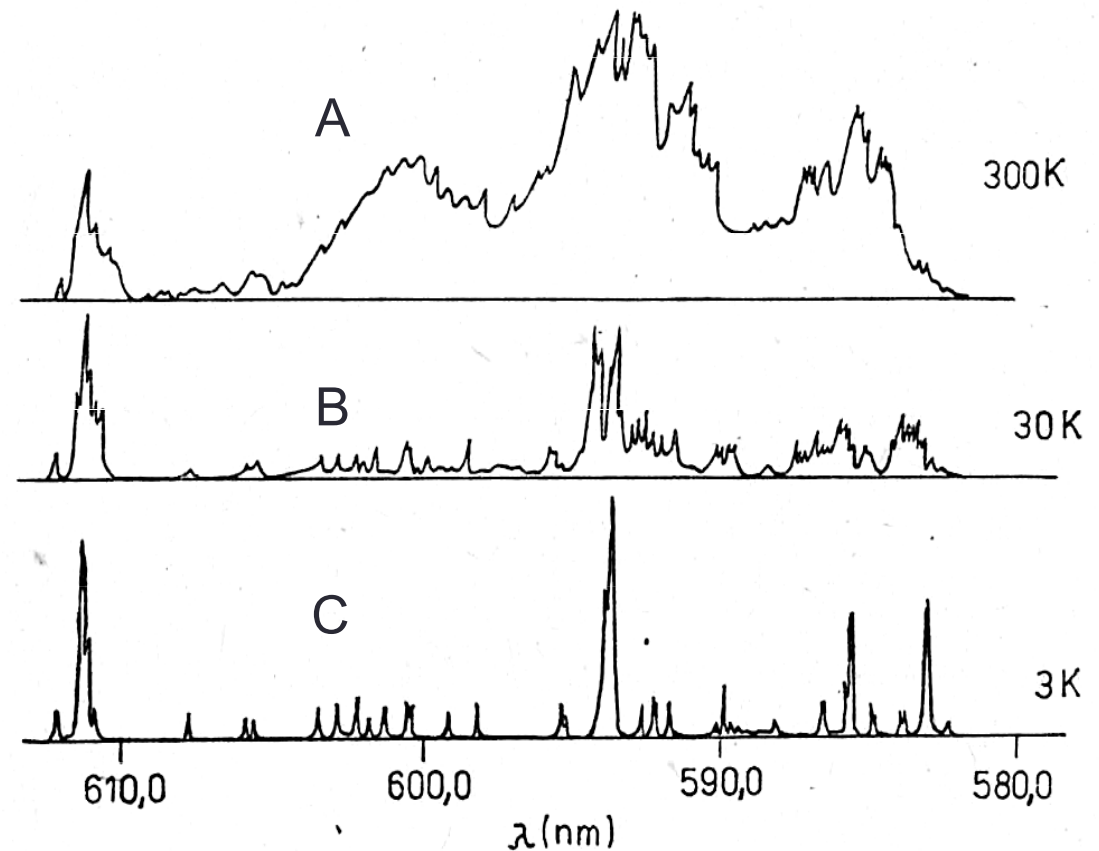
- A flow of atoms or molecules expanding into a high vacuum in the form of a beam has a temperature close to 0K in the direction perpendicular to the movement of the particles. The absorption spectrum can be measured (indirectly) by fluorescence. Direct measurement of absorption is difficult due to the low concentration of measured particles.



LS frequency stabilised laser beam
 G - atom beam generator
 Š - slit
 Č - lens
 V - discharge lamp
 M - monochromator
 D - detector

Absorption and fluorescence spectrum of NO_2

- A – absorption spectrum measured in a cuvette
- B - fluorescence spectrum measured in the molecular beam at 30 K
- C – fluorescence spectrum measured at 3 K in the presence of Ar as buffer gas



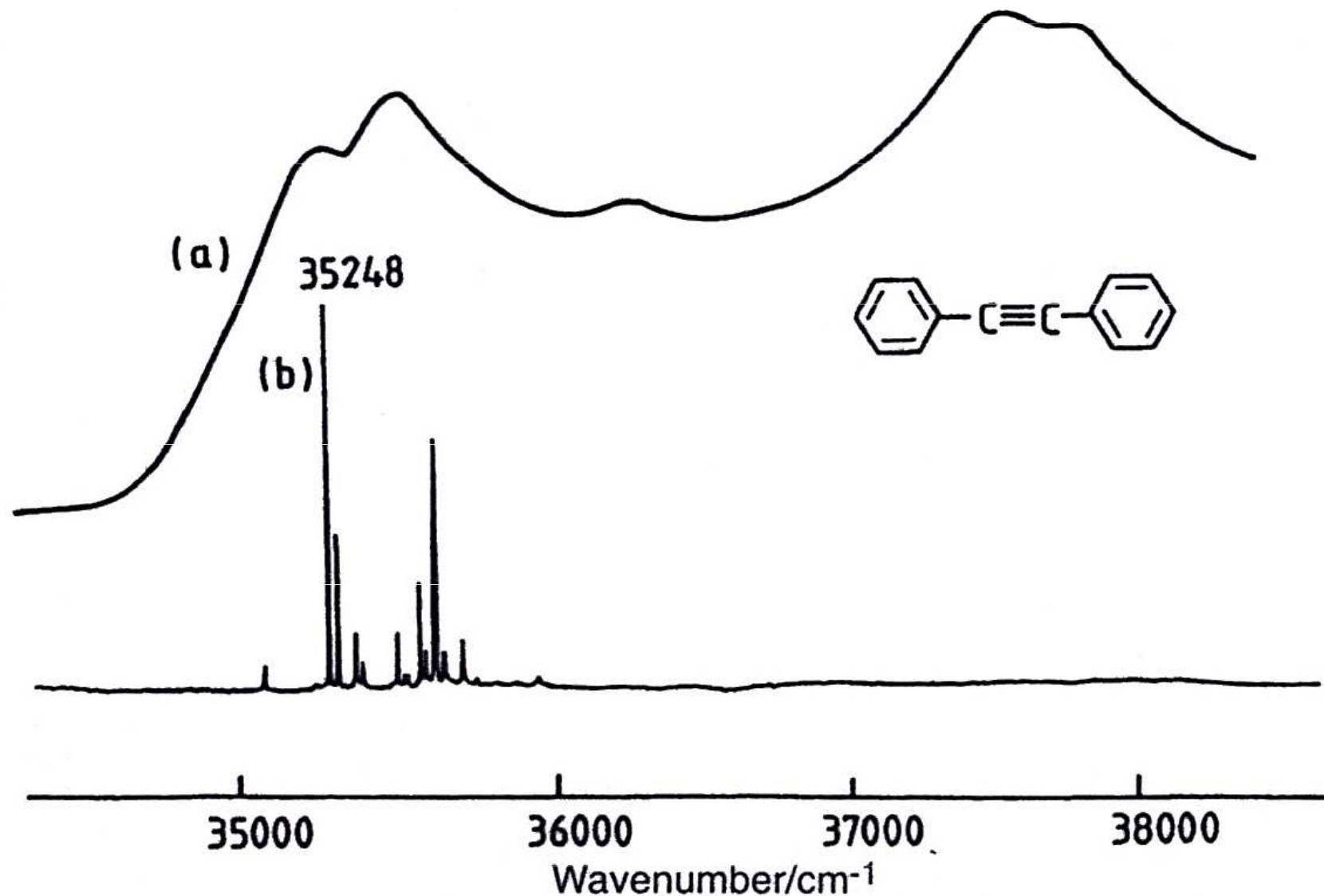
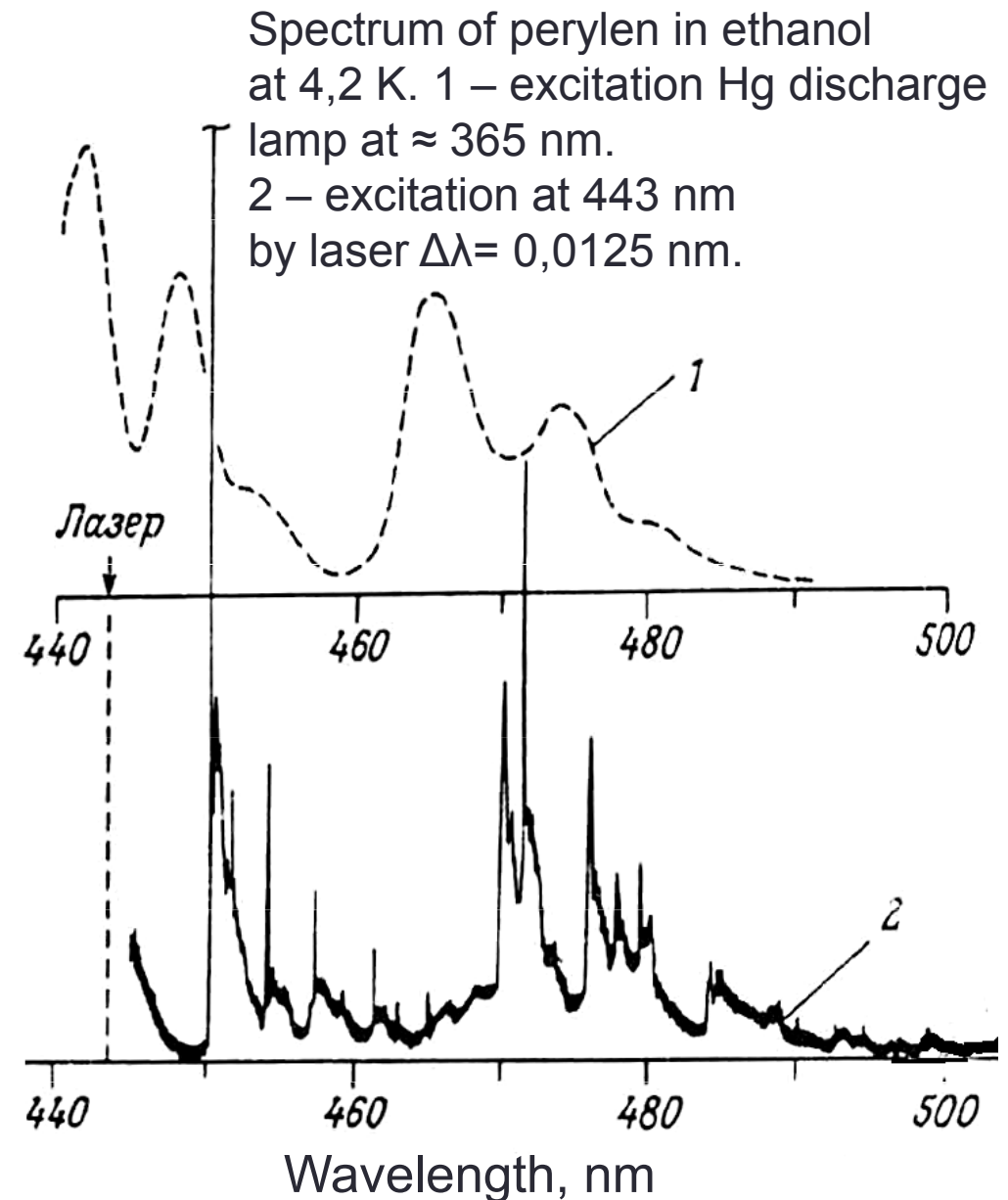


Fig. 4.14 Excitation spectra of diphenyl acetylene: (a) Normal vapour-phase spectrum; (b) Supersonic jet spectrum (cooling achieved by a modest four atmospheres excess pressure in a helium carrier gas). Reprinted with permission from [8]

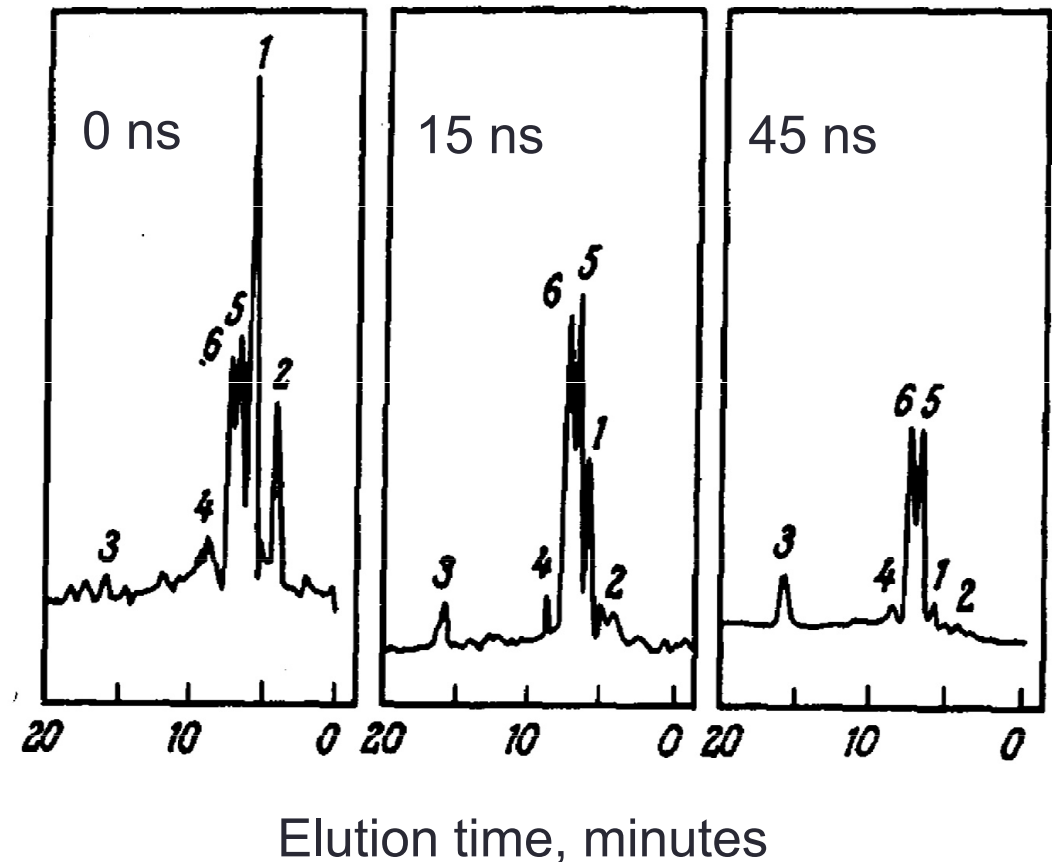
Excitation of molecular fluorescence

- The disadvantage of classical excitation broadband radiation sources is the simultaneous excitation of a larger number of higher energy levels, from which spontaneous radiation occurs at many transitions.
- In the case of laser induced fluorescence (LIF), only one upper level is usually excited.



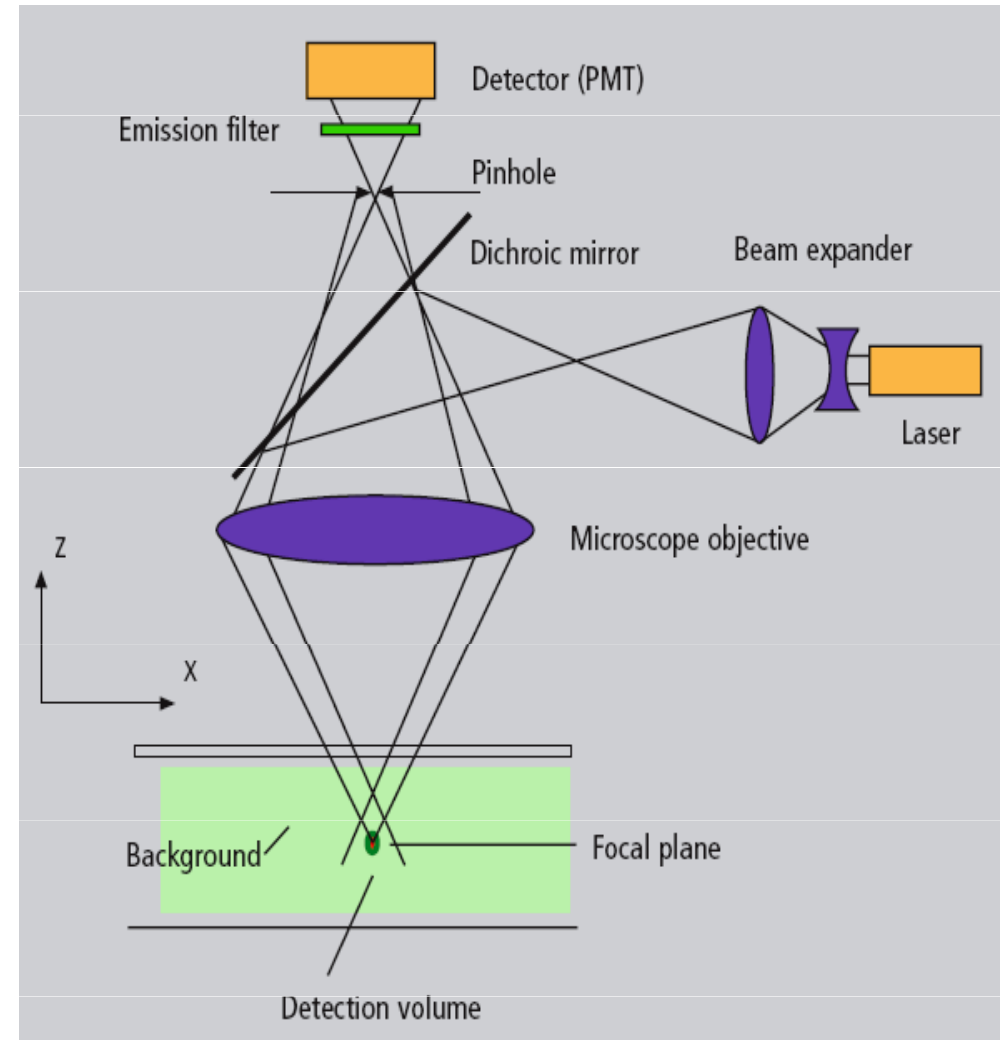
Time resolved fluorescence

- The different lifetime of excited states of different molecules allows, by using time resolved fluorescence, to increase the selectivity of detection, eg in liquid chromatography, but also in many other applications, especially in fluorescence microscopy.
- Fig. illustrates the change in fluorescence spectrum of a fluorescence detector in HPLC.
- 1-antracen, 2-azulen, 3-1,12-benzperylene, 4-chrysen, 5-fluoranthen, 6-pyren



Confocal microscopy

- **Differences of the confocal way from the classical OM**
- only one point is illuminated and signals from surrounding points (next, below and above) are limited by an aperture - elimination aperture
- lighting mode: epi (reflective) or fluo - (fluorescent)
- **confocal condenser = lens** (less reflection)
- scanning: laser beam sweeping, transverse shifting of the sample in front of the lens, eventually shifting of the lens over the sample
- confocal images are always in focus and represent optical sections of the sample (for $\lambda = 488 \text{ nm}$ thickness = $0,4 \mu\text{m}$)



Confocal microfluorimetry

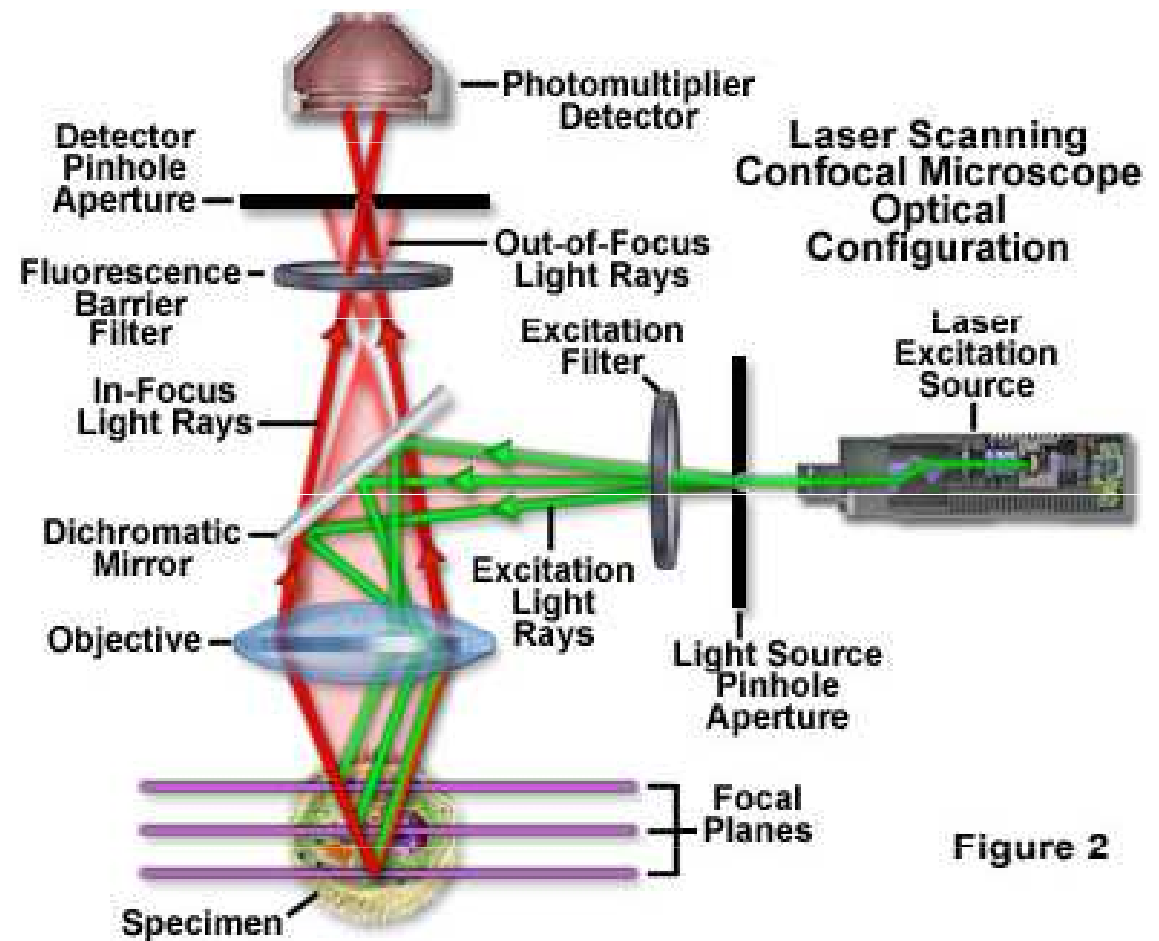
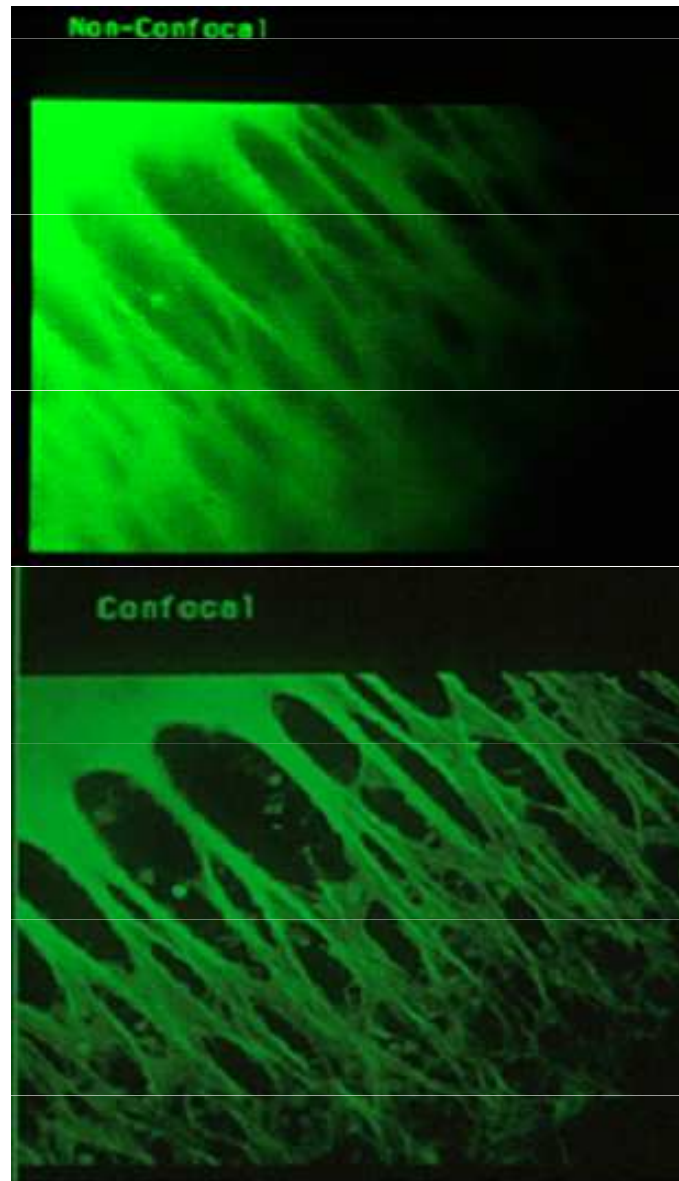


Figure 2

Two-photon microscope

- *A two-photon microscope* is a new type of optical microscope. It was first introduced in 1990 by American scientists led by Watt W. Webb of Cornell University in Ithaca. Like the "classic" confocal microscope, it allows to display thin optical sections with a thicker sample, but its principle is different. Instead of single photon excitation, it uses a special laser to excite two photons that are absorbed almost simultaneously, with a pulse width of the order of only 100 femtoseconds. The probability of two-photon excitation is proportional to the square of the intensity of the excitation field. It is the highest in the plane of focus, so we do not need a confocal aperture to obtain the optical sectioned images of the sample. Advantages of two-photon microscopy compared to confocal microscopy include, for example, greater depth of focus (up to 400 μm), even for samples whose surface layers strongly fluoresce, as well as an increased signal-to-noise ratio, hence more contrast imaging, especially in deeper samples .

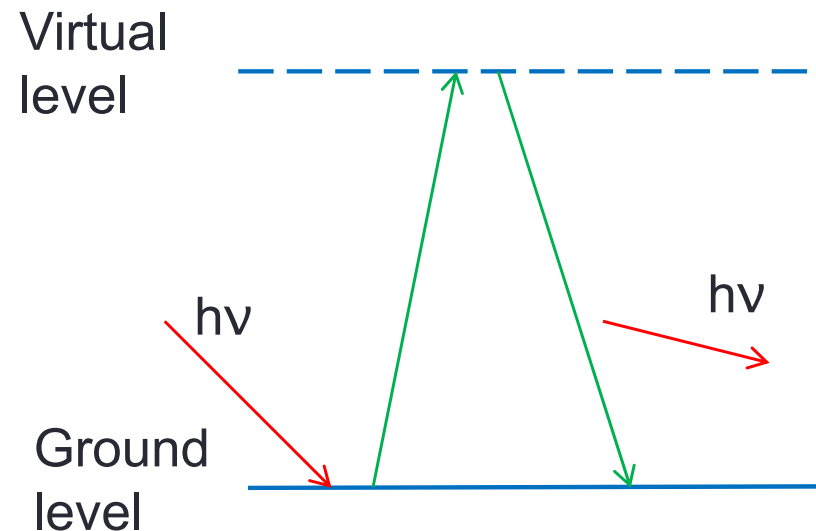
Radiation scattering

- The scattering of excitation radiation in fluorescence spectrometry is usually a fundamental factor limiting the detection limit, namely:
 - Rayleigh scattering is elastic scattering on particles smaller than the wavelength of primary radiation
 - Mie scattering is elastic scattering on particles larger than the wavelength of primary radiation
 - Incoherent (inelastic) scattering - scattered radiation has a different wavelength than primary radiation
 - Fluorescence of molecules
 - Raman scattering
 - Resonance fluorescence
 - Scattering of radiation on measuring instrumentation

Rayleigh scattering

- This scattering occurs on particles substantially smaller than the wavelength of incident radiation.
- Lord Rayleigh explained that scattering particles are not necessary because even the purest substances have slight fluctuations in the refractive index, which can scatter light. He also showed that the ratio of the scattered light intensity I_S to the incident light I_0 is inversely proportional to the fourth power of wavelength λ :

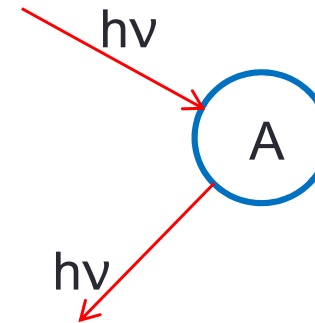
- $$\frac{I_S}{I_0} = \frac{\text{konst}}{\lambda^4}$$



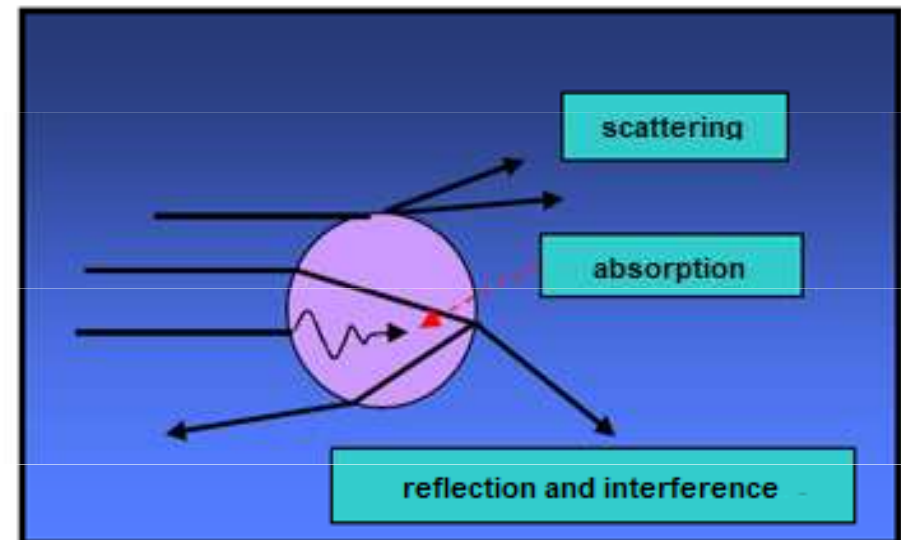
$$e_R \approx 10^{-10} e_A$$

Mie scattering

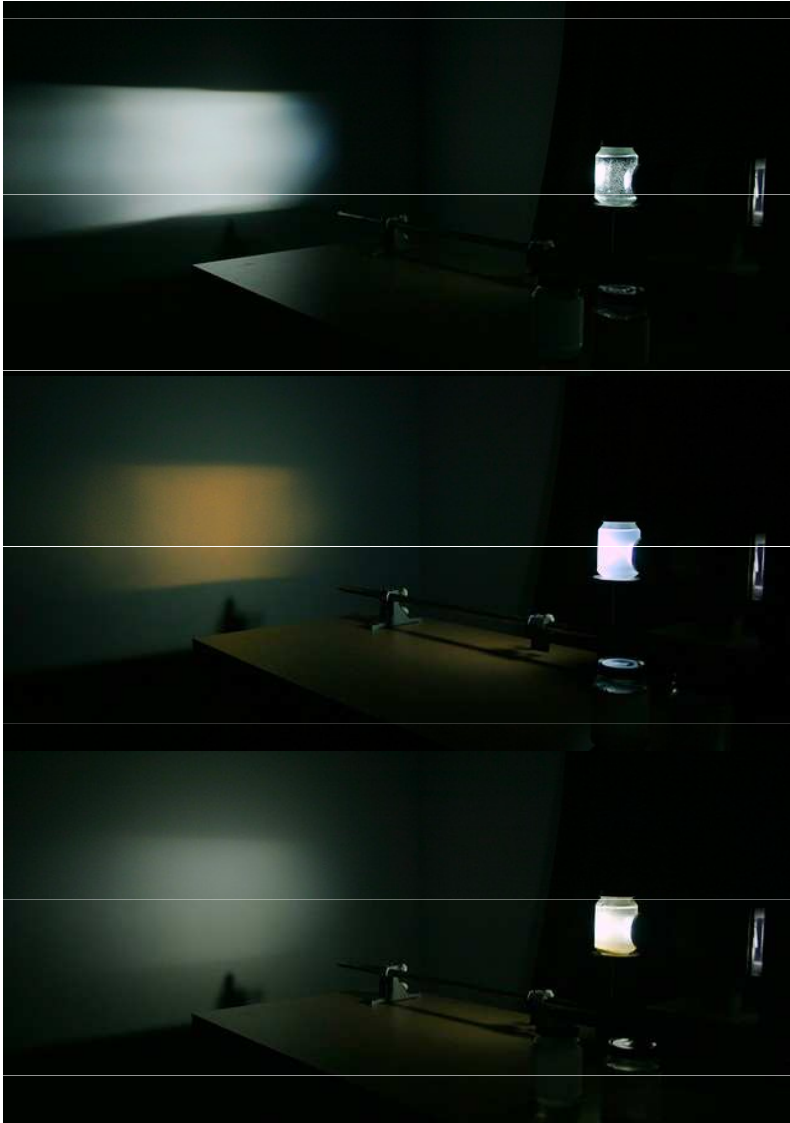
- When the particle size approaches and eventually exceeds the wavelength of light λ , the Rayleigh approach is no longer applicable. For spherical particles, can be used the theory derived in 1908 by the German physicist G. Mie
- Mie's theory assumes that every particle that hits light behaves like a resonant oscillator, taking into account that beam interaction causes scattering, reflection, absorption, refraction, and light interference.



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



Rayleigh and Mie scattering



water

milk - Rayleigh scattering

dust particles - Mie scattering

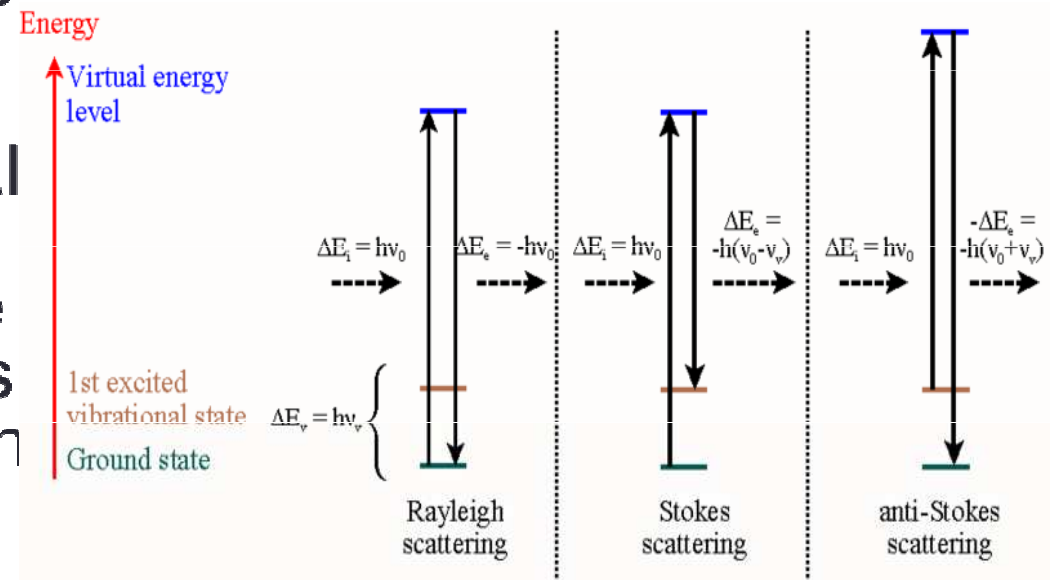


Raman scattering

- Inelastic Raman scattering occurs when the photons of the incident radiation interact with the vibrational or rotational states of atoms or molecules where the scattered radiation has a different wavelength than the incident radiation :

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

where Ω corresponds to the energy difference of quantum levels of a given substance.



$$\sigma_R \approx 10^{-15} \sigma_A$$

absorption cross section

Fluorescence of molecules

- Fluorescence of molecules can be a very disturbing phenomenon because the fluorescence spectrum can cover a wide range of wavelengths - up to hundreds of nm.

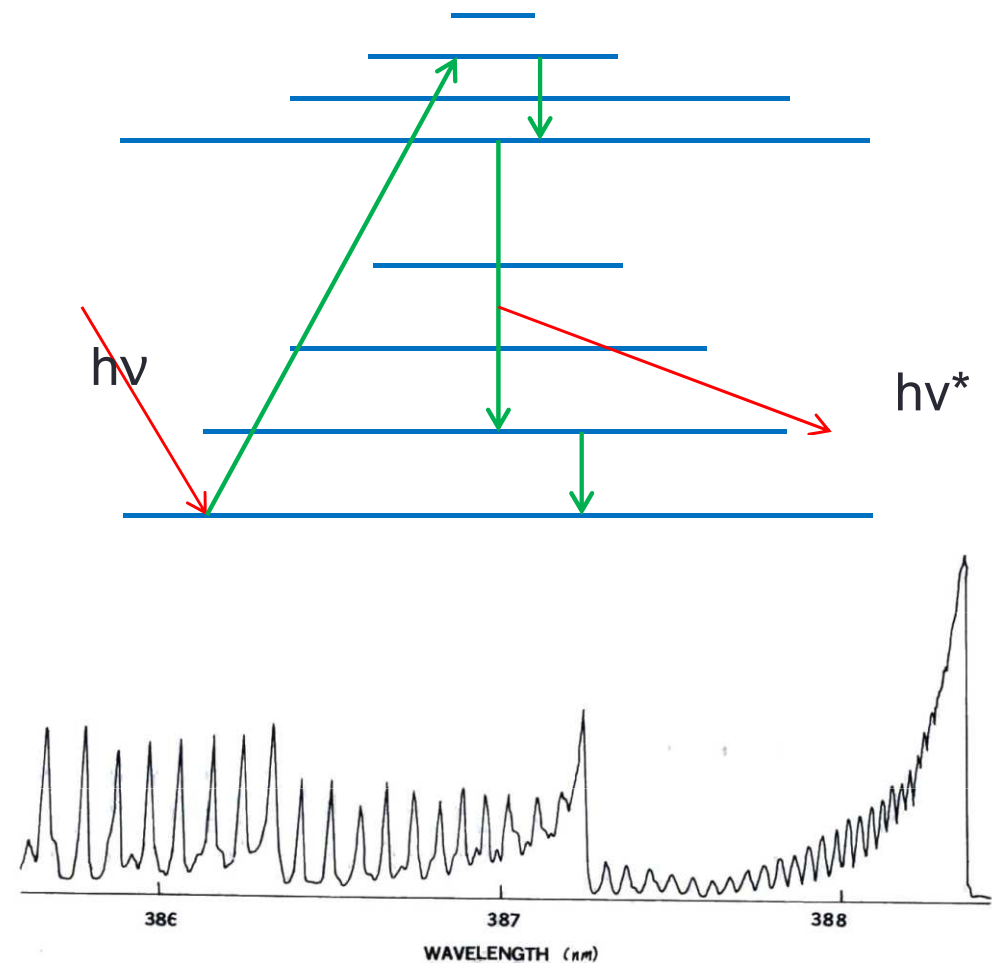


FIG. 5. Excitation spectrum of CN in a nitrous oxide-acetylene flame: $\lambda_n = 385.5$ nm, 400 μm slit width, 385–389 nm wavelength range, BBQ dye.

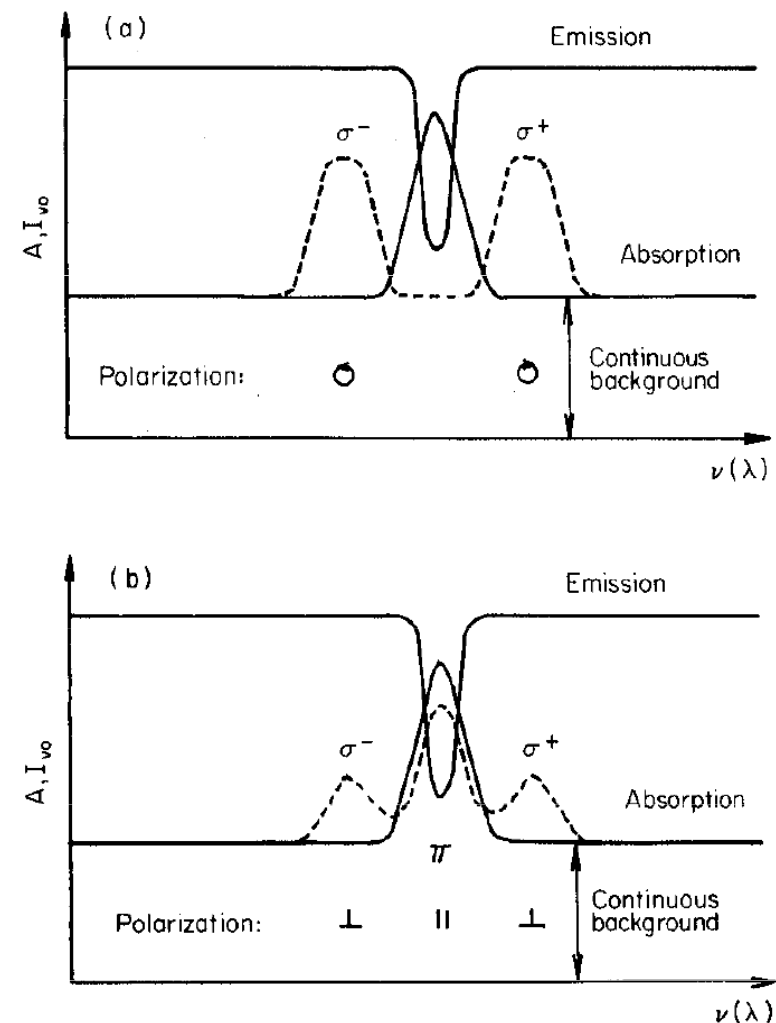
BBQ - [4,4''-bis-(2-butyloctyloxy)-p-querphenyl]

Background correction

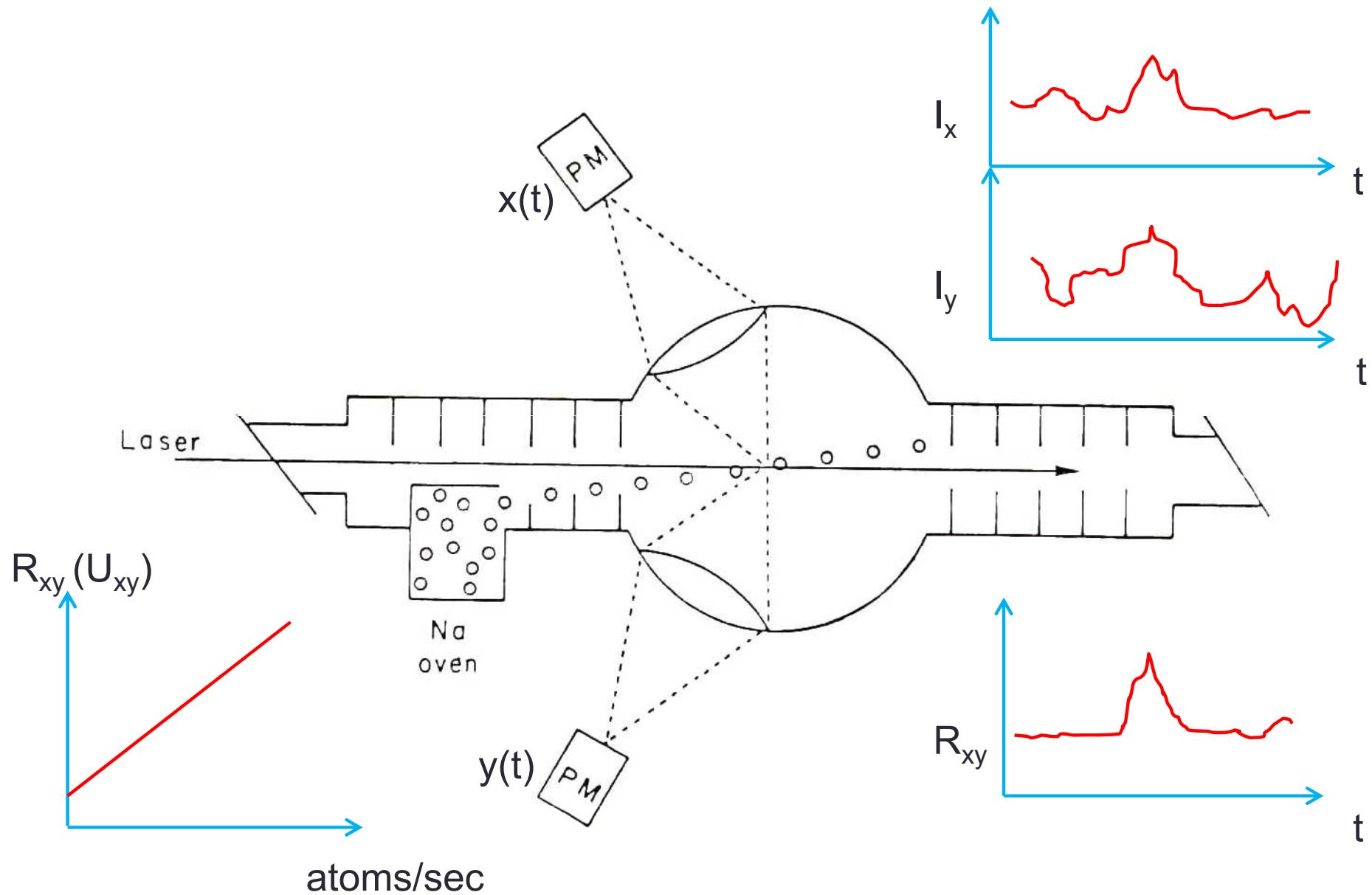
- Correction of scattered radiation, resp. reduction of scattered radiation allows reducing the detection limit by up to several orders of magnitude. Fluorescence measurement at a different transition than the excitation is optimal. Other options are :
 - Usage of Zeeman effect - splitting of absorption line in magnetic field
 - Scanning using a tunable laser - measuring the scattering around a fluorescent line
 - Periodic scanning of the excitation laser emission line in combination with frequency selective detection (eg lock-in)
 - Utilization of time resolved fluorescence
 - Multichannel detection

Background correction by Zeeman effect

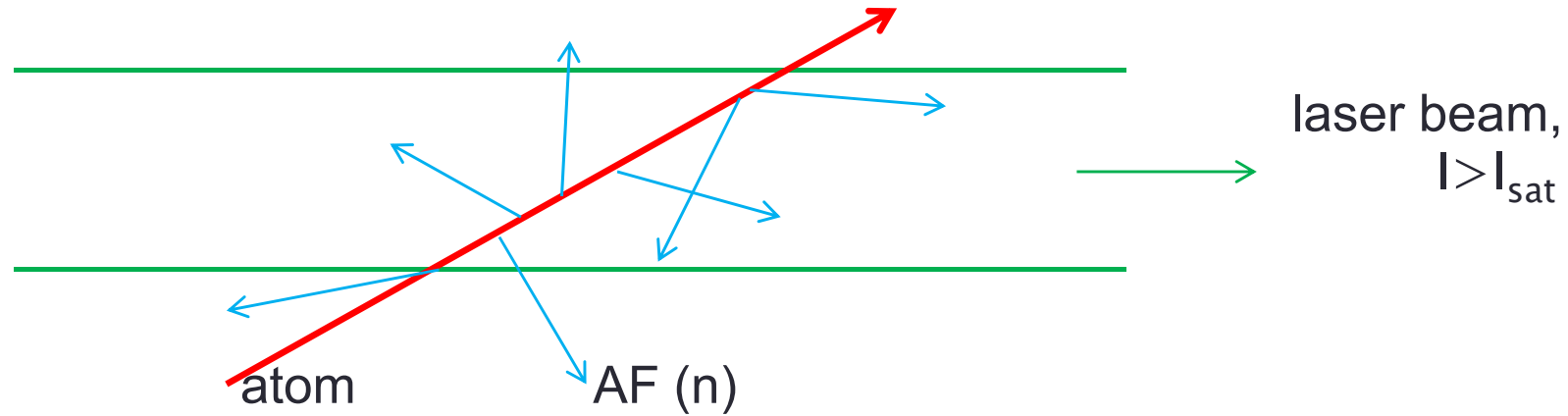
- In a variable magnetic field, the absorption profile of the spectral line changes, which we excite for fluorescence measurements. In case of perfect line splitting, only the scattered radiation is measured in the presence of a magnetic field. If perfect cleavage of the absorption profile does not occur (almost always in practice), then the fluorescence signal fluctuates in the rhythm of changes in the magnetic field and this frequency can be well separated from the constant scattered radiation signal.
- The molecular spectra of some molecules, eg O_2 , NO , ClO_2 , NO_2 , are also modulated in the magnetic field, so that the Zeeman effect cannot be used to correct their fluorescence.



Single atoms detection



Single atoms detection



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

The most common random processes:

- **Gaussian process (continuous variable)**
 - Brown's movement,
 - diffusion,
 - speed of molecules,
 - heat transfer,
 - noise in electr. circuits,
 - pressure fluctuation,
 - electric light intensity
- **Poisson process (discrete variable)**
 - radioactive decay,
 - insurance events,
 - defects, scrap,
 - traffic jams,
 - **fluctuations in density of atomic (molecules),**
 - shot noise,
 - **photodetection,**
 - **standard quantum noise**

Correlation of random variables

- The mean $\langle xy \rangle$ of the product of two independent quantities is equal to the product of their mean values $\langle x \rangle \langle y \rangle \rightarrow \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle = 0$
- The degree of dependence or **correlation** $C(x;y)$ is defined by the relation:

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

Correlation of fluctuations $C(\Delta x; \Delta y)$:

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

the fluctuations of the relevant variables and because

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

therefore $C(\Delta x; \Delta y) = \langle \Delta x \cdot \Delta y \rangle - \langle \Delta x \rangle \langle \Delta y \rangle = \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle$ and so

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

Discrete random process

probability of the impulse is proportional to time

Poisson process

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

deterministic process - one where each subsequent state necessarily follows from the previous one

stochastic process - those where further development can be predicted only with a certain probability

Poisson process $\langle (\Delta n)^2 \rangle = \langle n \rangle$



Chaotic process $\langle (\Delta n)^2 \rangle > \langle n \rangle$ (pulse clustering)

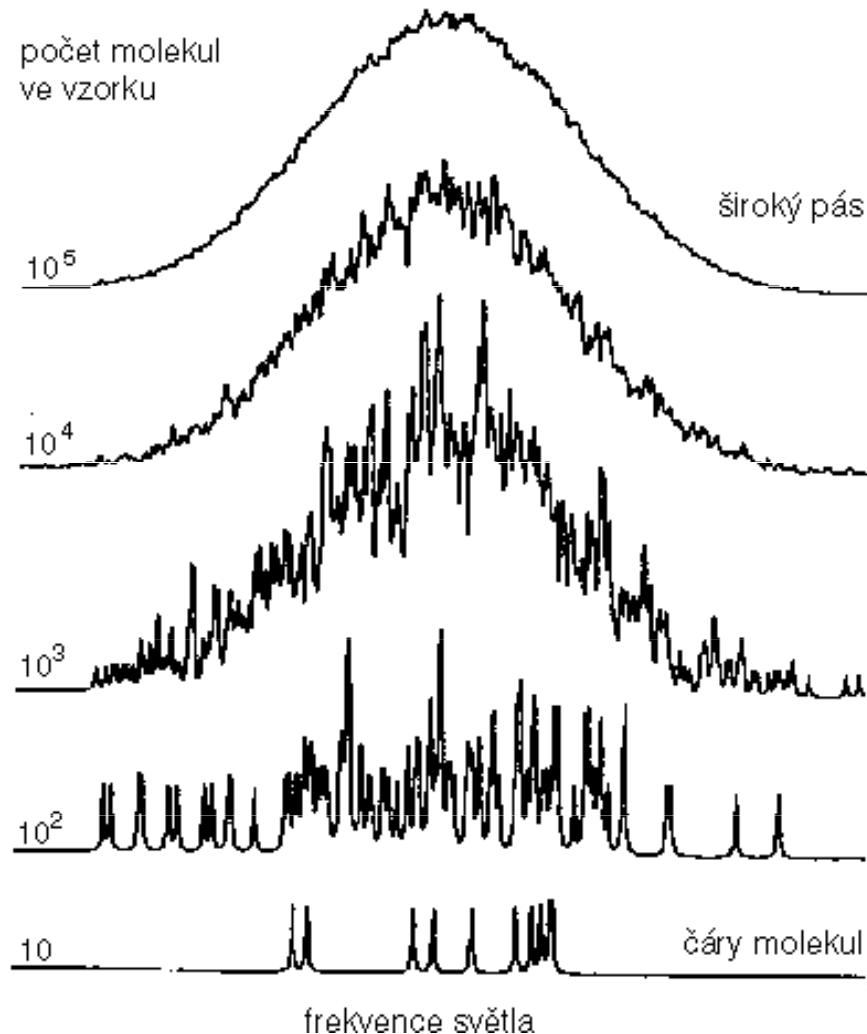


Deterministic process $\langle (\Delta n)^2 \rangle = 0$ (pulse anti-clustering $\langle (\Delta n)^2 \rangle < \langle n \rangle$)



→ time

Spektroskopie jednotlivých molekul



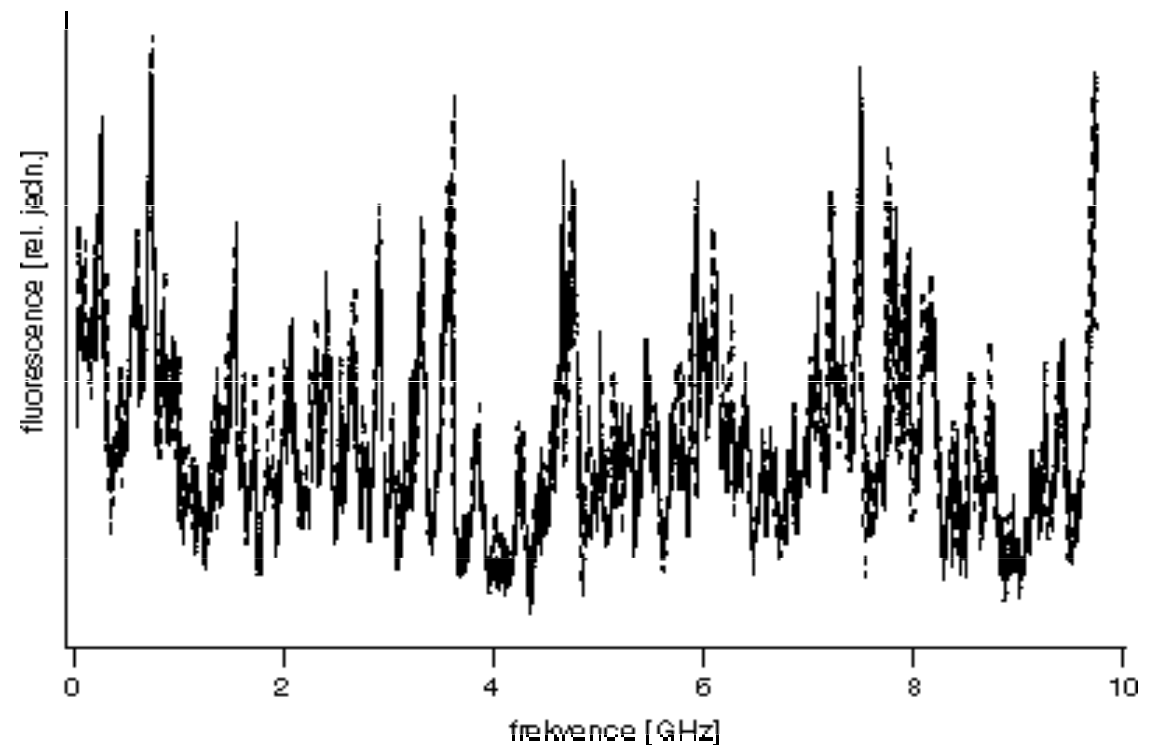
- Je-li ve vzorku 10^5 molekul, dostáváme široký pás, často nazývaný nehomogenně rozšířený pás.
- Snížíme-li počet molekul na 10^3 , pás zůstává široký a objevuje se jemná statistická struktura.
- Je-li 10 molekul ve vzorku, napočítáme ve spektru 10 dobře rozlišených spektrálních čar.
- Laser zaostříme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

Experimentální požadavky

- Bude světlo vyzářené jednou molekulou dost silné na to, abychom ho dokázali zaregistrovat?
- Světlo musíme zachytit co nejúčinněji – 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 vyzářeného 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.

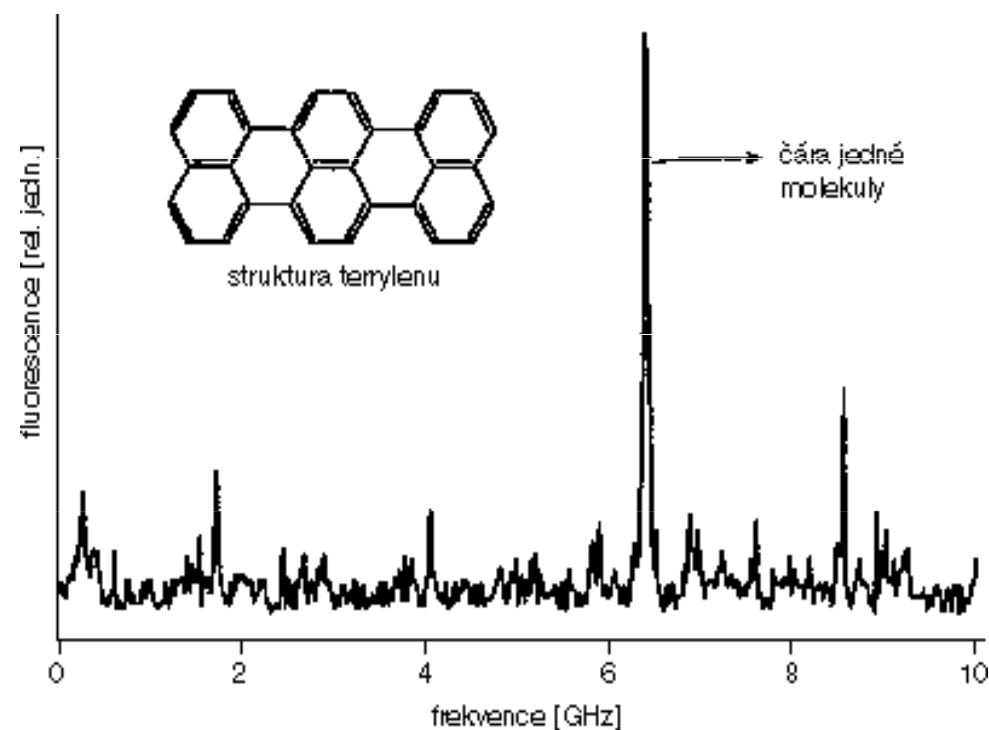
Reprodukovatelnost spekter

- 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.



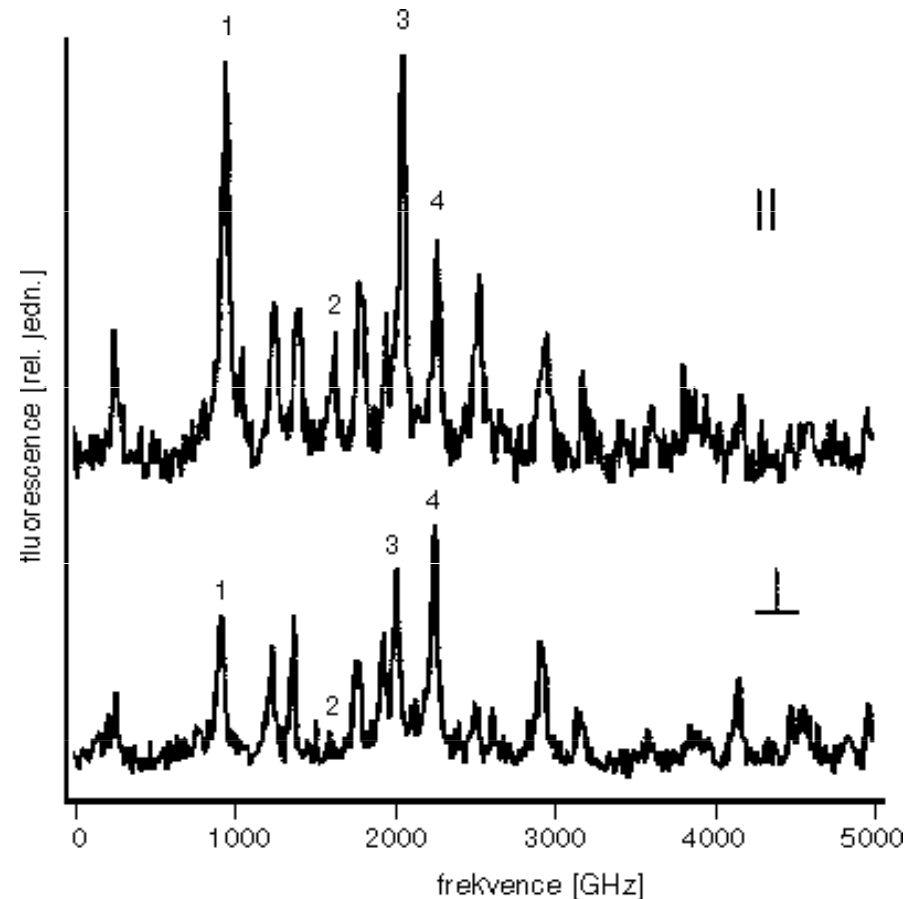
Spektrum jedné molekuly

- 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

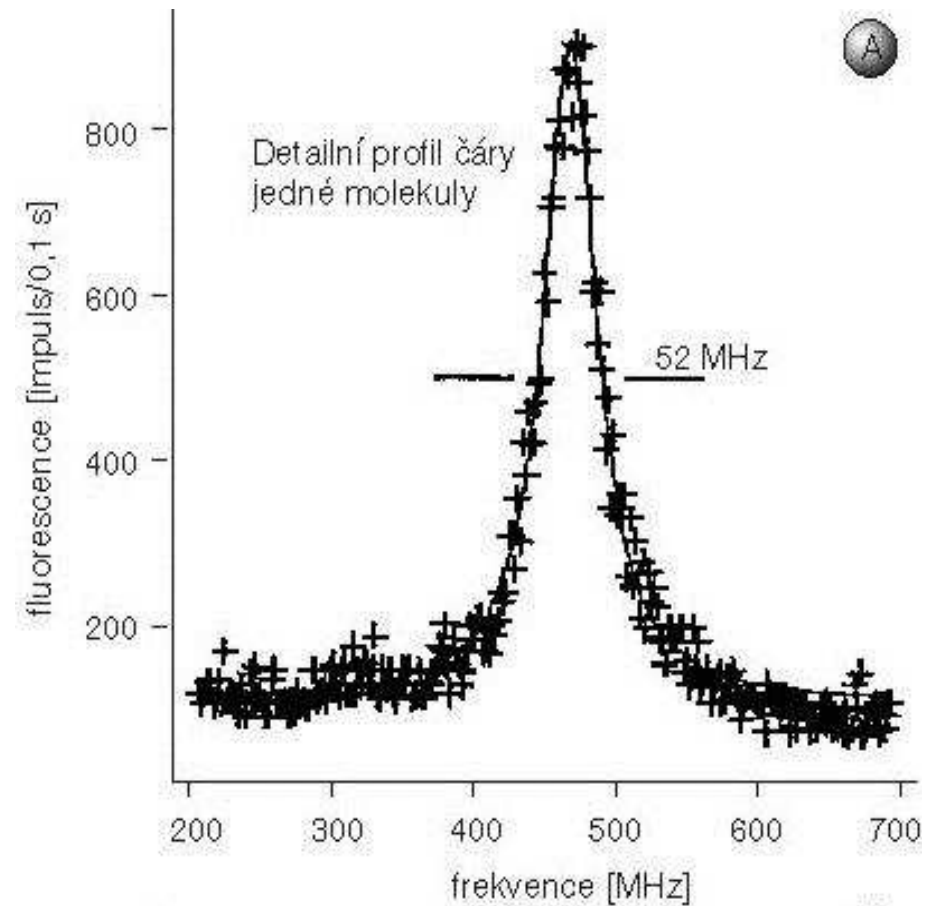
- dvě spektra celé série čar jednotlivých molekul, přitom každá z nich je jinak intenzivní
- ne všechny molekuly se nalézají přímo v bodě největšího zaostření laserového paprsku
- Další příčinou je, že záření laseru je polarizované. Polarizované světlo nejlépe pohlcují molekuly jejichž dipólové momenty 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?
- Čáry 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

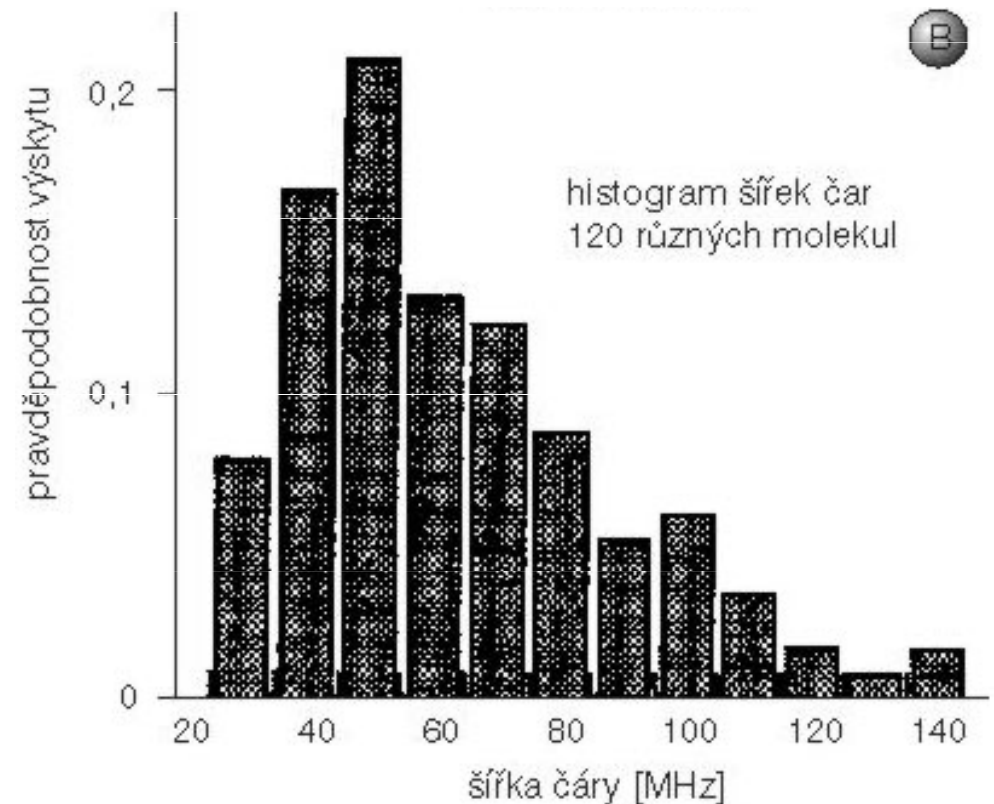
- Na obr. je detailně změřena čára jedné molekuly. Má lorentzovský profil, jak to předpovídá kvantová teorie, a je to také jeden z argumentů, proč jde právě o jednu molekulu a ne o více. Čára na obr. má šířku 52 MHz. Tady se znovu obrátíme ke kvantové teorii, jejíž princip neurčitosti nám říká, že šířka 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

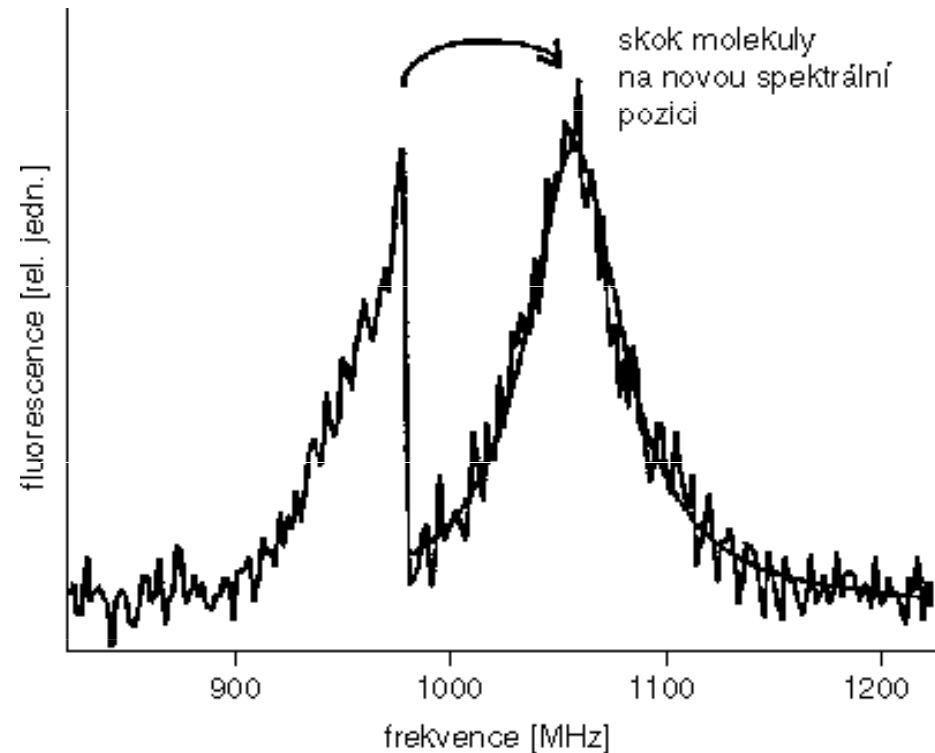
- Histogram ukazuje, s jakou pravděpodobností se ve spektrech vyskytly čáry s danou šířkou, že proti očekávání byla většina čar širších než 42 MHz. Během měření spektra se krystal nepatrně mění, je v neustálém pohybu i když měříme při teplotách 1,6 K. Neustálé nepatrné změny struktury krystalu ovlivňují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



Histogram rozdělení šířek čar 120 molekul

Přeladování frekvence molekuly

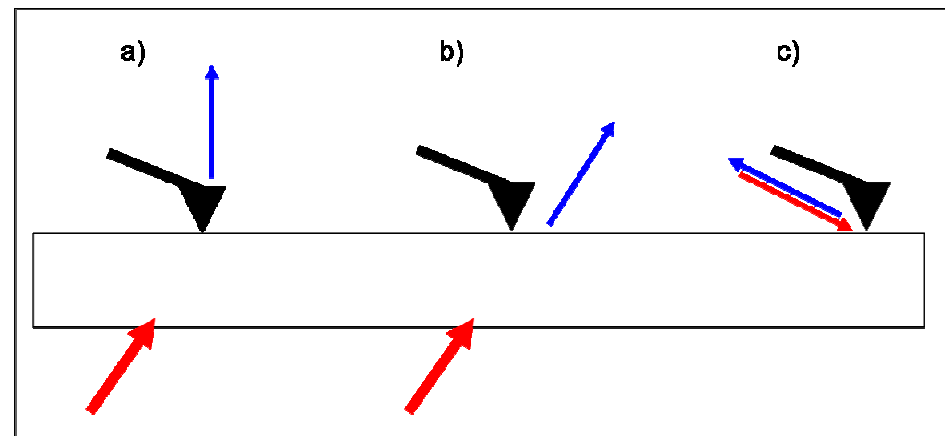
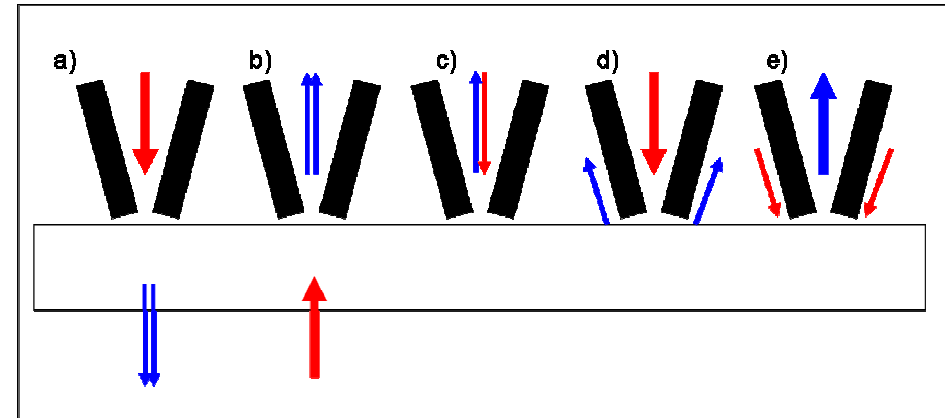
- Změny okolí měřené molekuly ovlivňují samozřejmě její energetické hladiny a tedy i frekvenci vyzářeného světla. Pokud tyto změny nastávají podstatně rychleji, než dokážeme změřit čáru, měříme vlastně jakousi obálku různě pozměněných čar. Histogramy nám pak mohou říci hodně o dynamice krystalů, ale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

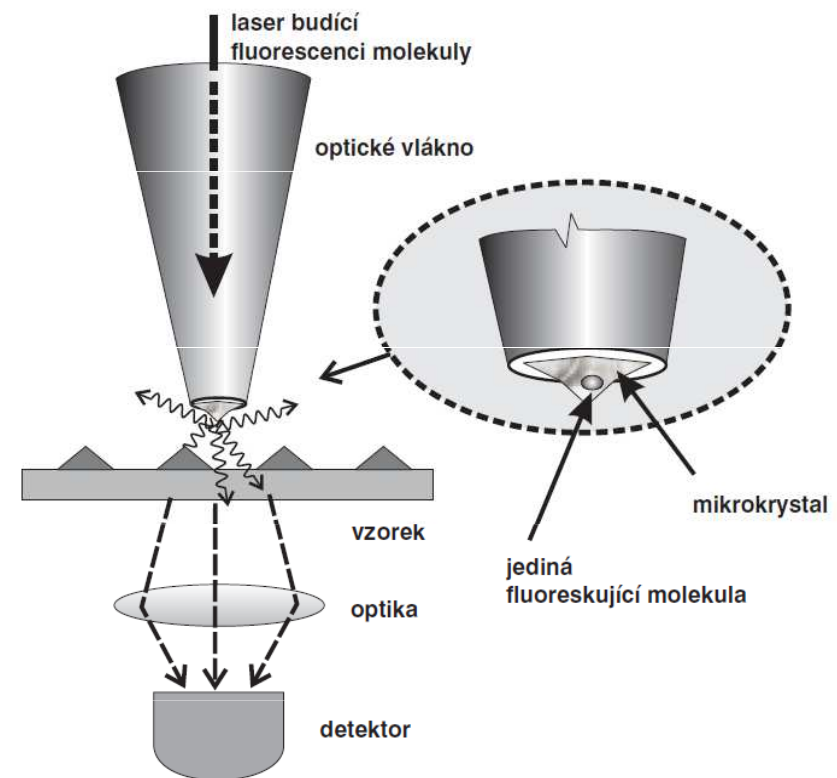
SNOM (scanning near-field optical microscope)

- 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 mikrokrytal 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:

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

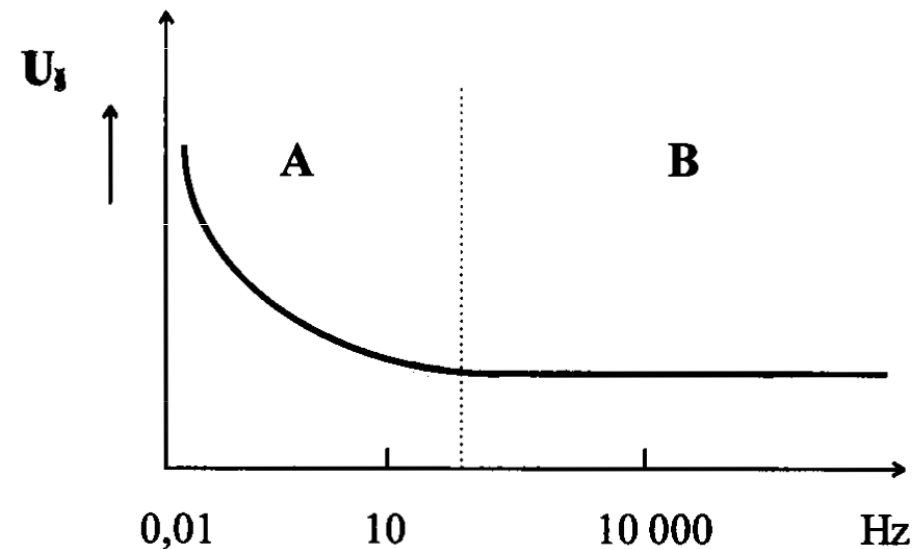
Frekvenční spektrum šumu

- 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. Impulzy 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 zřetelně menší amplitudu než impuls vyvolaný fotonem. Pokud využíváme režim čítání fotonů, nastavíme komparátor tak, aby na tyto menší impulsy nereagoval.

