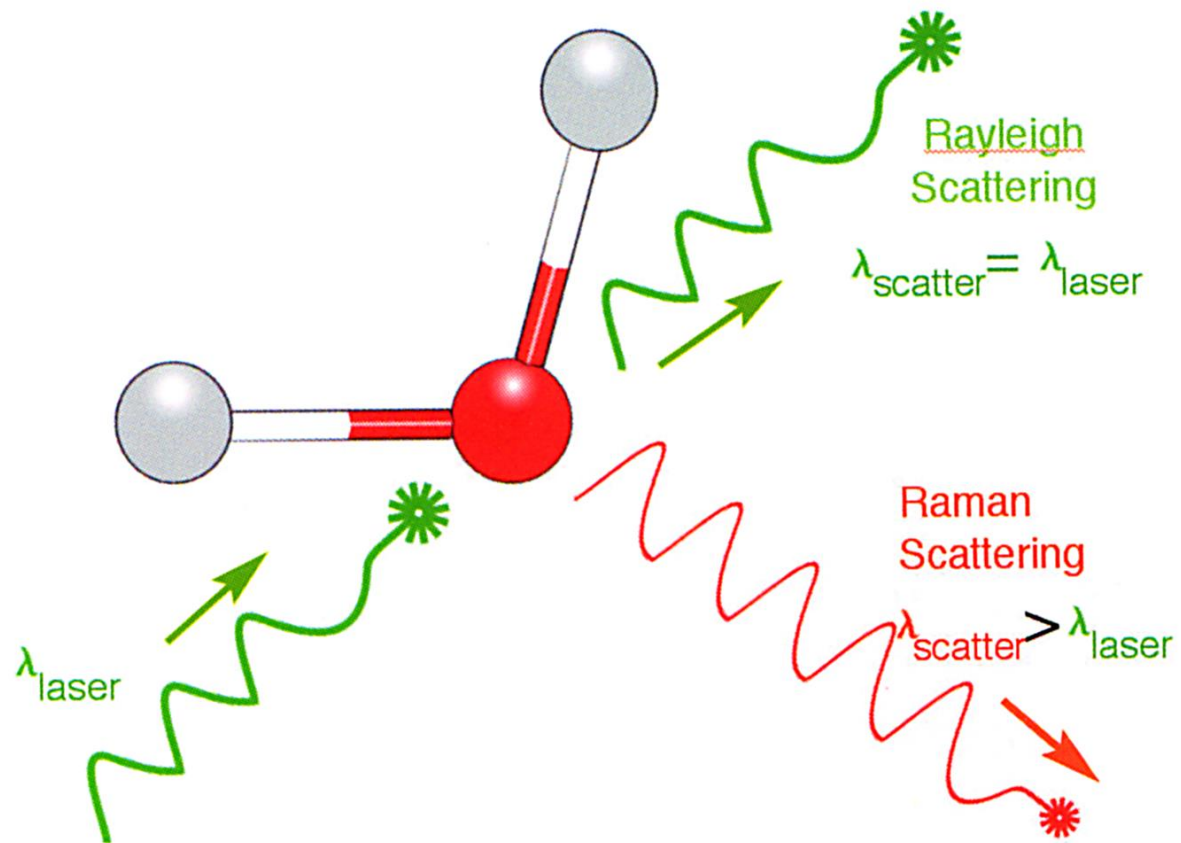


Lasery – Ramanova spektrometrie

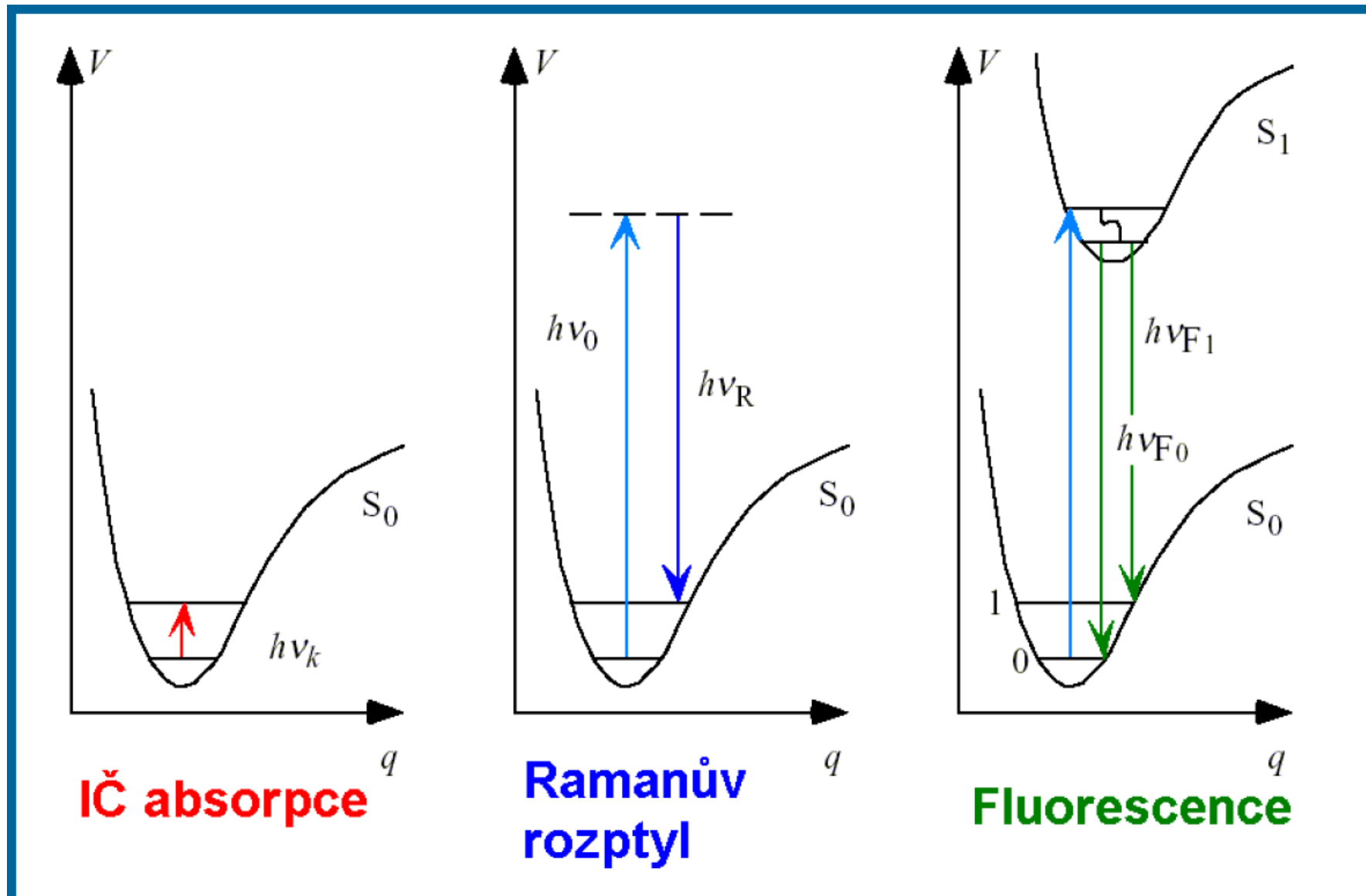


Ramanův rozptyl poskytuje vysoce specifické a nedestruktivní informace o molekulárních vibracích, což umožňuje analýzu, kterou často nelze získat jinými technikami, jako je fluorescenční nebo infračervená spektroskopie.

Ramanova spektroskopie

- ▶ **Každá čára Ramanova spektra je svými vlastnostmi závislá:**
 - ▶ *na počtu a hmotě společně kmitajících atomů molekuly*
 - ▶ *na jejich prostorovém uspořádání*
 - ▶ *na vnitřně molekulovém silovém poli*
- ▶ **Je zřejmé, že Ramanových spekter lze použít analyticky, zvláště při řešení některých, chemicky těžko dokazovatelných rozdílů konstitučních**

**Prof. Dr. Arnošt Okáč: Výklad k základním operacím v chemické analýze,
JČMF 1948**



Podstata Ramanova jevu

ROZPTYL ZÁŘENÍ

rozptýlený foton má odlišnou energii oproti dopadajícímu zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly jejichž energie jsou E_1 a E_2 , vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření o frekvenci

$$\nu_0 > (E_2 - E_1) / h,$$

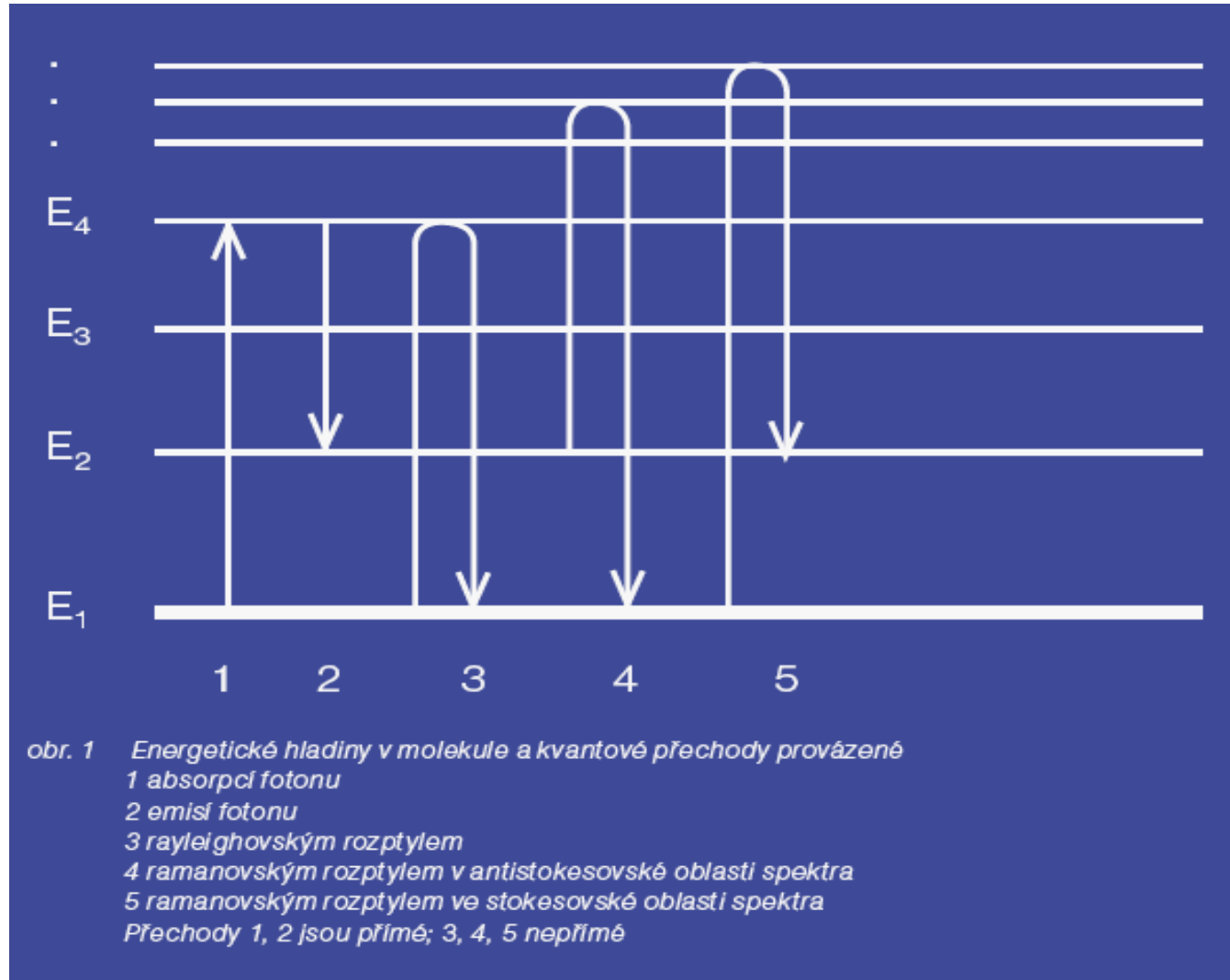
provázený vyzářením rozptýleného fotonu o energii

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1),$$

kde $h\nu_{\text{vib}} = E_2 - E_1$

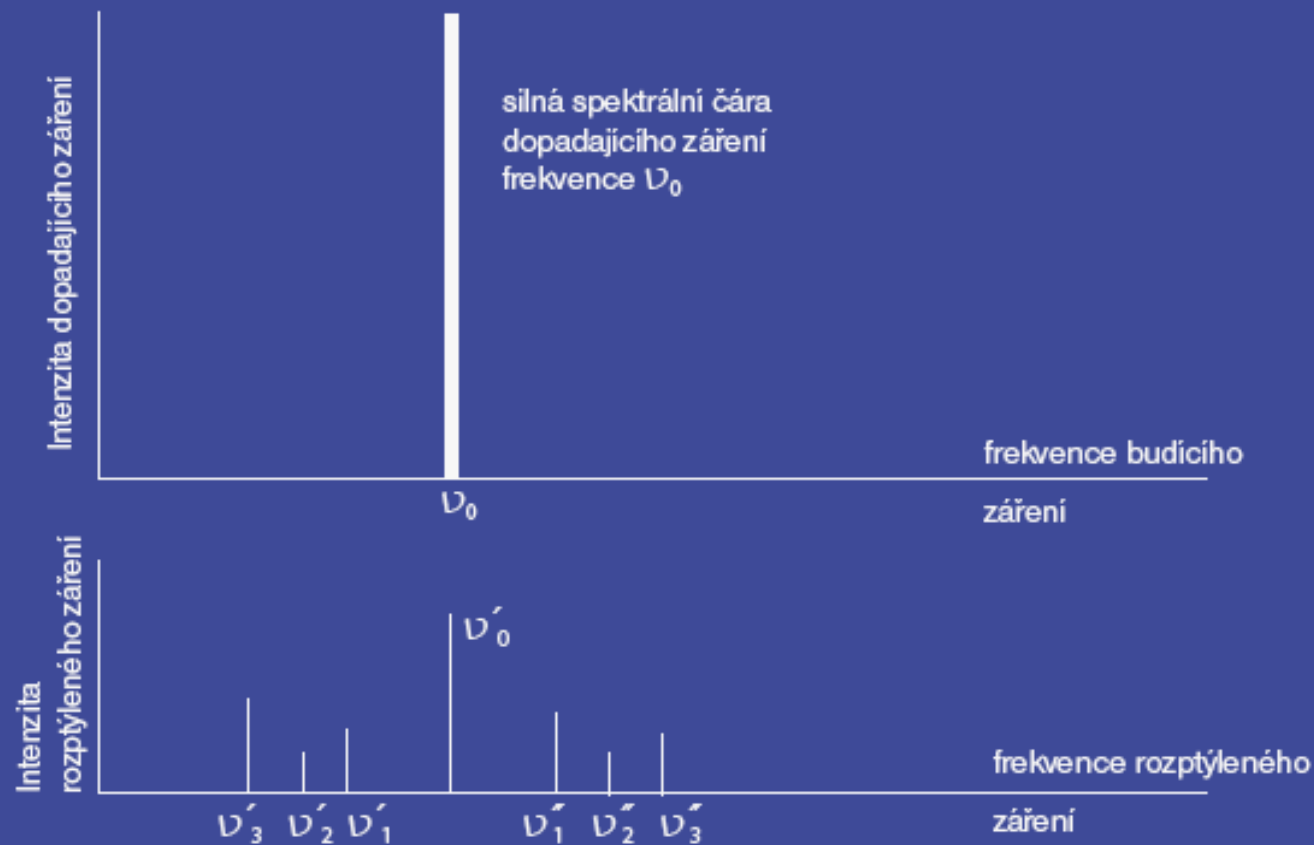
Rozptýlené fotony nesou informace o energetickém spektru rozptylového centra i prostorové orientaci konkrétní chemické vazby, tedy jakési molekulární „vizitky“. Bez speciálních opatření je však tímto způsobem rozptylován pouze jediný foton ze stovek miliónů až stovek miliard dopadajících fotonů. Účinný průřez Ramanova rozptylu je zhruba 10^{-30} cm^2 .

Rozptyl světla se děje ve všech směrech kolem rozptylující částice.



Rayleighův (molekulární) rozptyl

Lord John Rayleigh správně shledal, že intenzita rozptýleného záření je přímo úměrná čtvrté mocnině frekvence záření, čili nepřímo úměrná téže mocnině jeho vlnové délky; rozptyl světla se děje ve všech směrech kolem rozptylující částice a že je dokonce trojího druhu: rozptyl skalární, u něhož je intenzita ve všech směrech stejná, rozptyl symetrický a antisymetrický, jejichž intenzita je různá v různých směrech, stejně jako polarizace rozptýleného záření. Přitom dopadají-li na částici jednobarevné světlo frekvence ν_0 pak také rozptýlené záření má tutéž frekvenci ν_0' , jeho intenzita je však mnohem nižší než intenzita dopadajícího záření; v tom případě říkáme, že spektrum rozptýleného záření je tvořeno jedinou spektrální čarou. Při všech experimentech Rayleighových současníků se tato teorie potvrdzovala. Ani on ani nikdo z jeho současníků ovšem nemohl tehdy tušit, že existuje nejméně deset typů rozptylu světla, ani to, že modř oblohy není způsobena rozptylem světla na jednotlivých molekulách, ale na tzv. fluktuacích hustoty atmosféry, tj. na nahodilých okamžitých shlucích molekul obsažených v atmosféře, které trvají nesmírně krátkou dobu, totiž jen po dobu srážky nejméně tří takových molekul.



obr. 2 Spektrální čáry dopadajícího a rozptýleného záření
 ν'_0 rayleighovská spektrální čára rozptýleného záření
 $\nu'_1 = \nu_0 - f_1$, $\nu'_2 = \nu_0 - f_2$, $\nu'_3 = \nu_0 - f_3$ jsou frekvence ramanovských spektrálních čar
v antistokesovské oblasti spektra (nalevo od ν'_0)
 $\nu''_1 = \nu_0 + f_1$, $\nu''_2 = \nu_0 + f_2$, $\nu''_3 = \nu_0 + f_3$ jsou frekvence v antistokesovské
oblasti spektra, přičemž frekvence f_1 , f_2 , f_3 jsou frekvence mechanických kmitů uvnitř molekuly

Princip Ramanovy spektrometrie

- ▶ Podstatou Ramanova rozptylu je zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly, jejichž energie jsou E_1 a E_2 , vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření o frekvenci $\nu_0 > |E_2 - E_1| / h$, kde h je Planckova konstanta, a provázený vyzářením fotonu rozptýleného záření o frekvenci ν_R . Tento rozptylový efekt si lze zjednodušeně představit jako současnou absorpci fotonu budícího záření molekulou, kdy molekula přechází na virtuální energetickou hladinu, a emisi sekundárního fotonu, za splnění podmínky zachování energie:

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1) \quad (1)$$

- ▶ Existuje několik možností takto uskutečněného přechodu podle polohy virtuální energetické hladiny vůči vlastním stavům molekuly (např. normální a rezonanční Ramanův jev).

Princip Ramanovy spektrometrie 2

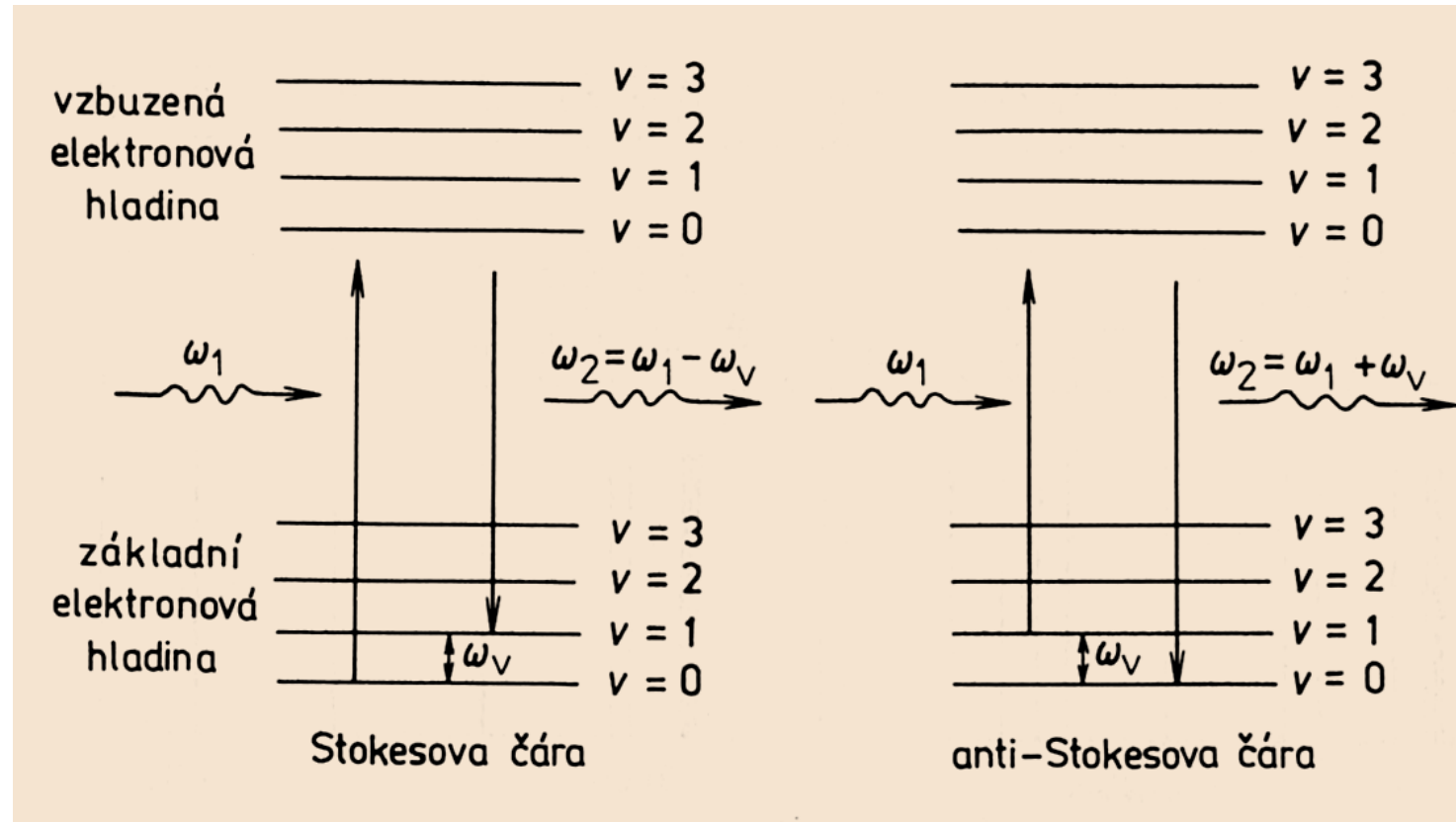
V klasickém přiblížení platí pro molekulu interagující se zářením, že v molekule je indukován dipólový moment \mathbf{p} :

$$\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E} \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q \mathbf{E} \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{\text{vib}}) t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{\text{vib}}) t] \}$$

kde ν_0 je frekvence budícího záření, ν_{vib} je vibrační frekvence, \mathbf{E} je vektor intenzity elektrického pole dopadajícího záření, q jsou vnitřní souřadnice molekuly a α je polarizovatelnost molekuly (polarizibilita, tj. míra „obtížnosti“, s níž se vychylují negativní náboje elektrickým polem). Z rovnice vyplývá, že molekula emituje záření s nezměněnou frekvencí (ν_0 - Rayleighův rozptyl) a dále záření s frekvencemi ($\nu_0 + \nu_{\text{vib}}$) a ($\nu_0 - \nu_{\text{vib}}$), které se souhrnně nazývají Ramanův rozptyl, při čemž nižší frekvence ($\nu_0 - \nu_{\text{vib}}$) odpovídá Stokesovu rozptylu, zatímco vyšší frekvence ($\nu_0 + \nu_{\text{vib}}$) náleží anti-Stokesovu rozptylu. Z rovnice je též zřejmé, že pro vznik Ramanovy linie je nutné, aby při daném vibračním pohybu docházelo ke změně polarizovatelnosti, tedy aby

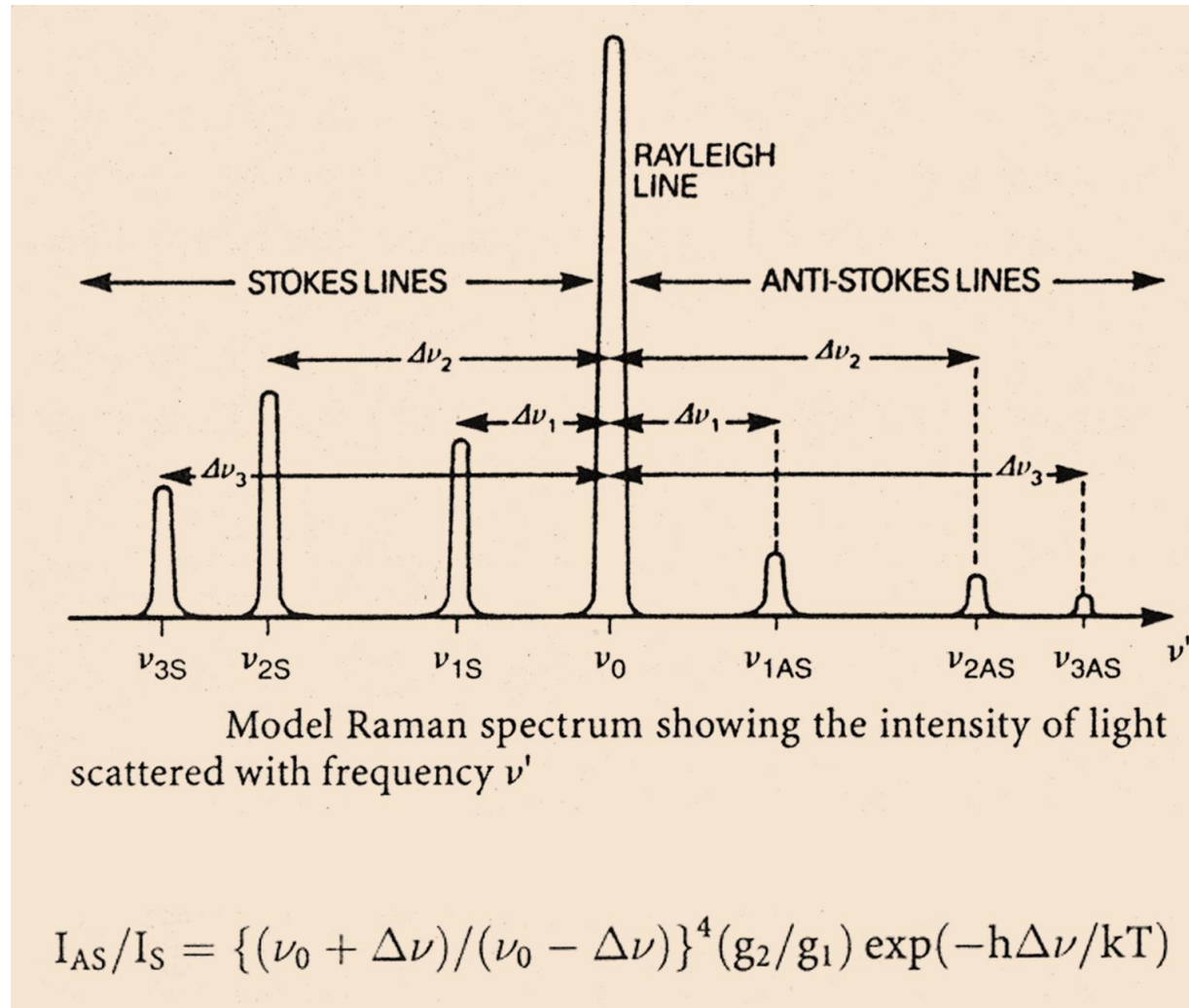
$$\frac{\partial \alpha}{\partial q} \neq 0$$

Ramanova spektra nerezonanční

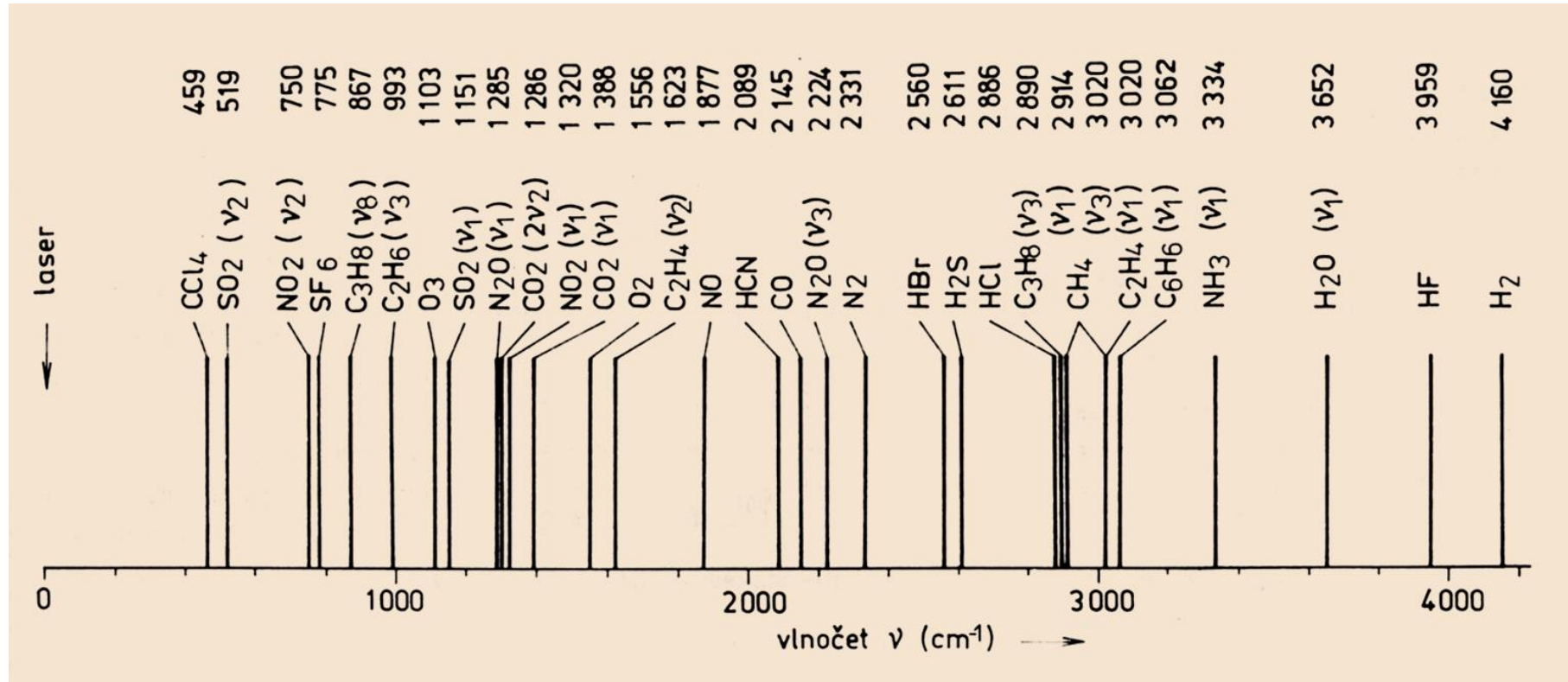


Velikost frekvenčního posuvu ω_V nezávisí na frekvenci dopadajícího záření
Pravděpodobnost Ramanova jevu roste se čtvrtou mocninou frekvence dopadajícího záření a má o tři řády menší pravděpodobnost než rozptyl Rayleighův

Ramanovo spektrum

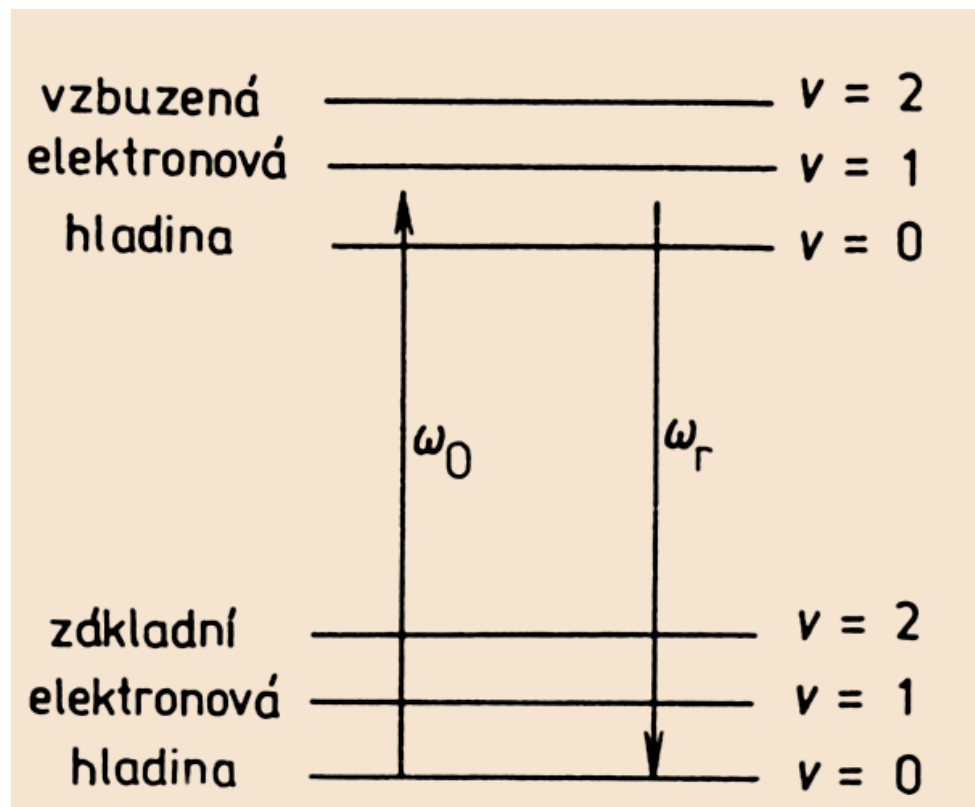


Ramanovo spektrum látek přítomných v atmosféře



Spektrum ramanovského lidaru

Ramanova spektra rezonanční



K rezonančnímu Ramanovu rozptylu dochází v případě, kdy frekvence záření dopadajícího na rozptylující částici souhlasí nebo se blíží frekvenci kvantového přechodu částice. Proti intenzitě záření nerezonančního Ramanova rozptylu může být intenzita vyšší o 3 až 6 řádů.

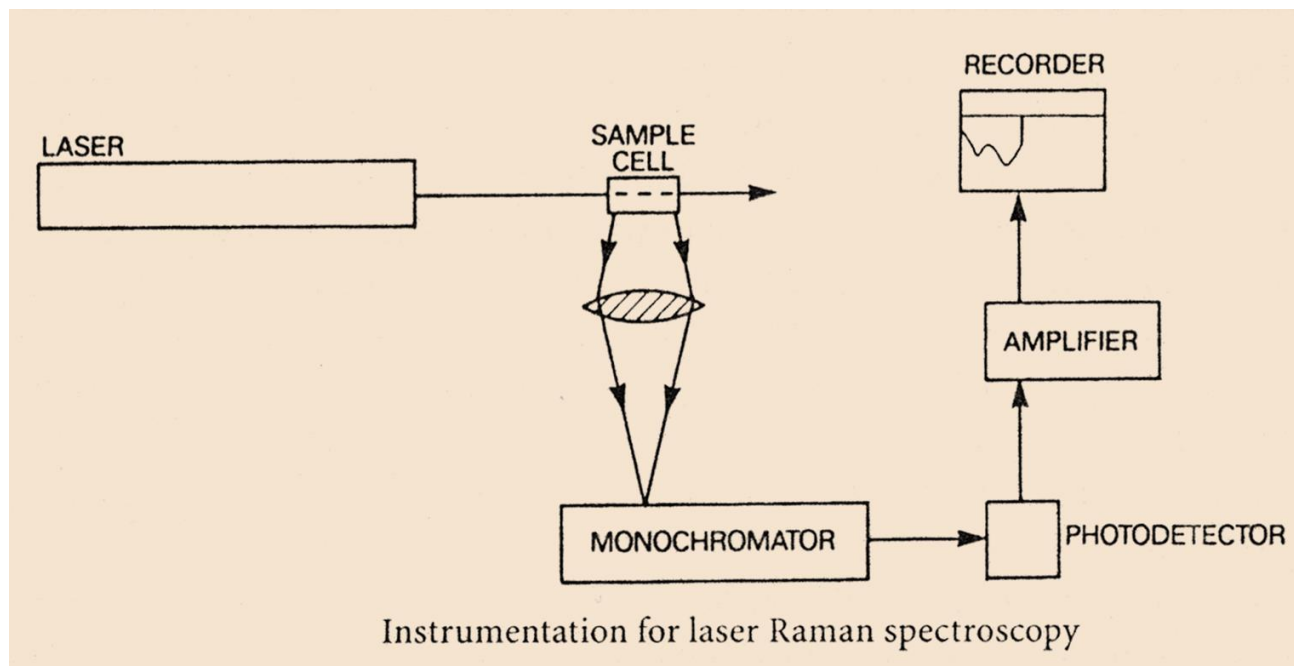
Rezonanční Ramanův rozptyl

- ▶ virtuální hladina v blízkosti elektronově excitovaného stavu
- ▶ UV rezonanční Ramanova spektroskopie – nukleové kyseliny, proteiny
- ▶ Viditelná oblast – koordinanční sloučeniny, organická barviva, hemoproteiny
- ▶ NIR – „prerezonance“ ? – nízkoenergetické elektronové přechody
- ▶ Excitační profily – závislost Ramanových spekter (vybraných pásů) na excitační vlnové délce

Rezonanční Ramanova spektrometrie

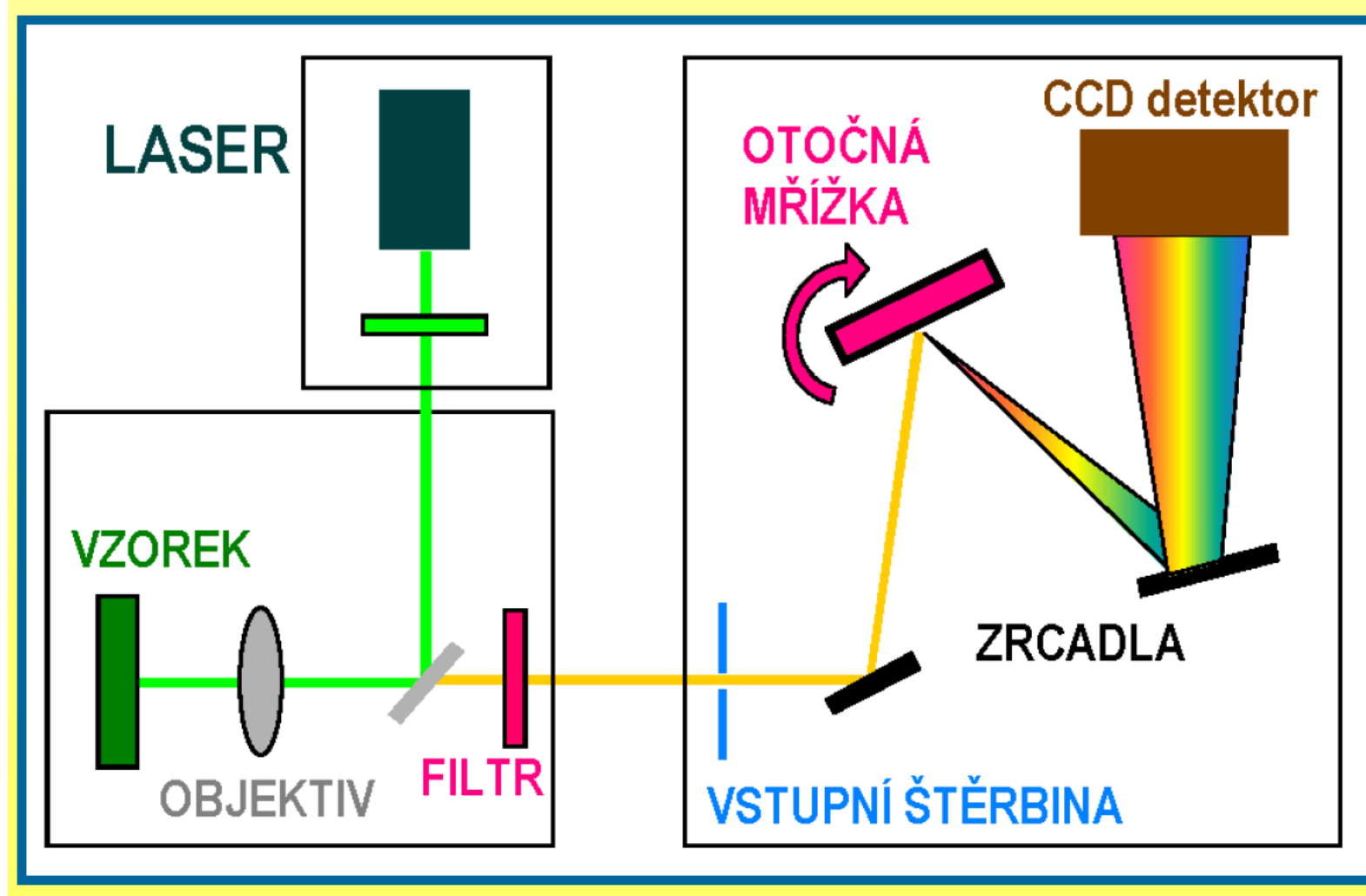
- ▶ Faktor zesílení 10^2 – 10^4
- ▶ Praktické aspekty
 - ▶ U roztoků – otázka volby koncentrace a pozice excitačního paprsku
 - ▶ Samoabsorpce
 - ▶ Fluorescence
 - ▶ Volba geometrie paprsku, fokusace
 - ▶ Koncentrační profil

Instrumentace pro Ramanovu spektrometrii



Pevný, resp. kapalný vzorek se umístí před štěrbinu spektrometru. Vzorek se ozáří fokusovaným svazkem z laseru s výstupním výkonem větším než 100mW, obvykle iontového Ar ($\lambda=514,5$ nm – zelená a 488 nm – modrá) nebo He-Ne laseru ($\lambda=632,8$ nm). Často se v poslední době využívá Nd:YAG laser s násobičem frekvence a laseroých diod. Monochromátor musí mít velmi nízké rozptýlené záření (obvykle dvojitý). Detektorem je obvykle fotonásobič, příp. intenzifikovaný CCD detektor.

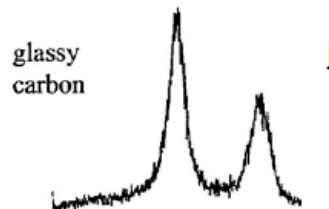
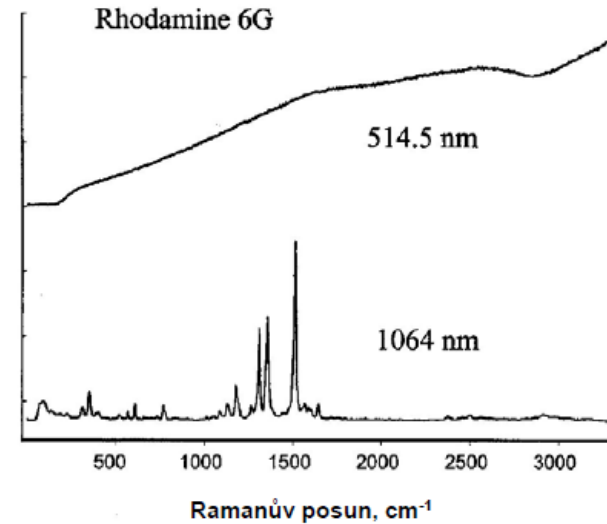
Schéma Ramanova disperzního přístroje



Technologický pokrok v Ramanově spektroskopii v uplynulých 20 letech

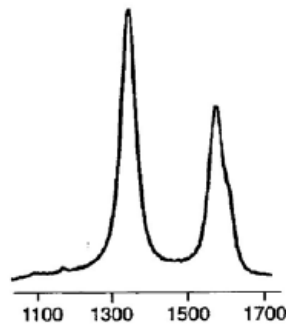
1. FT Ramanova spektroskopie

- + excitace v NIR oblasti → řeší problém s fluorescencí
- + vysoká přesnost určení vlnočtu
- nižší intenzita rozptylu, obtížnější detekce



jednokanálový/PMT

Spex 1403
20 minut
SNR ~ 28



mnohokanálový/CCD

Chromex 250
5 sekund
SNR ~ 280

2. Mnohokanálové CCD detektory

- + výrazné zlepšení poměru signál/šum (SNR)
- + zkrácení doby měření

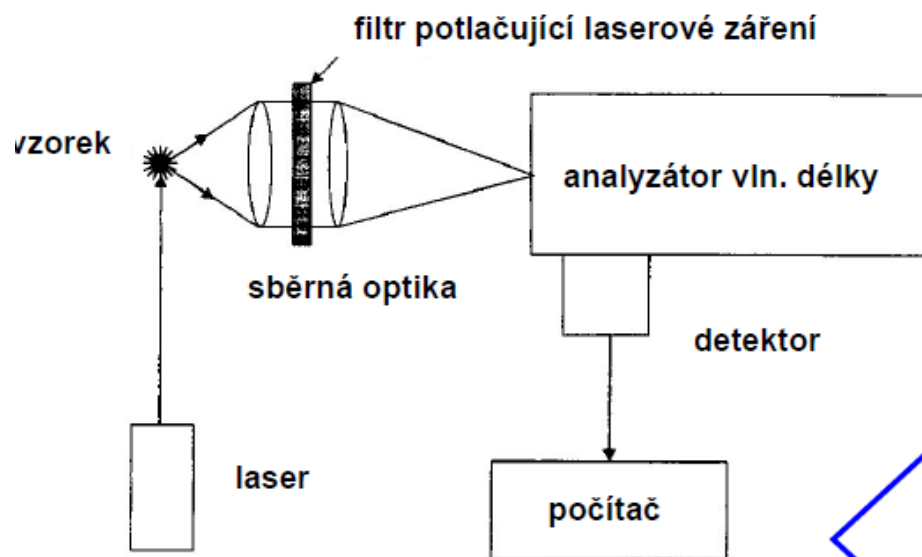
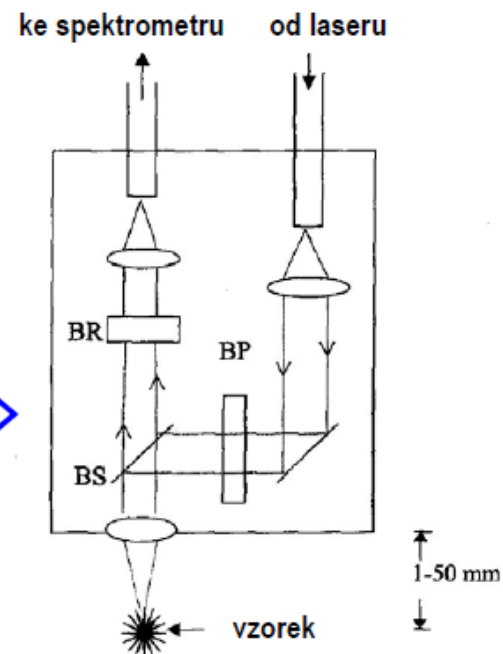
Ramanův posun, cm⁻¹

(v obou případech excitace 514.5 nm / 50 mW)

3. Vláknová optika (integrované sondy)

- + využití pro monitorování a kontrolu procesů
- + výrazné zvýšení aplikačního potenciálu RS
- + „vzdálený“ spektrometr

Integrovaná vláknová sonda obsahující nezbytné filtry (BP, BR) i fokusační optiku

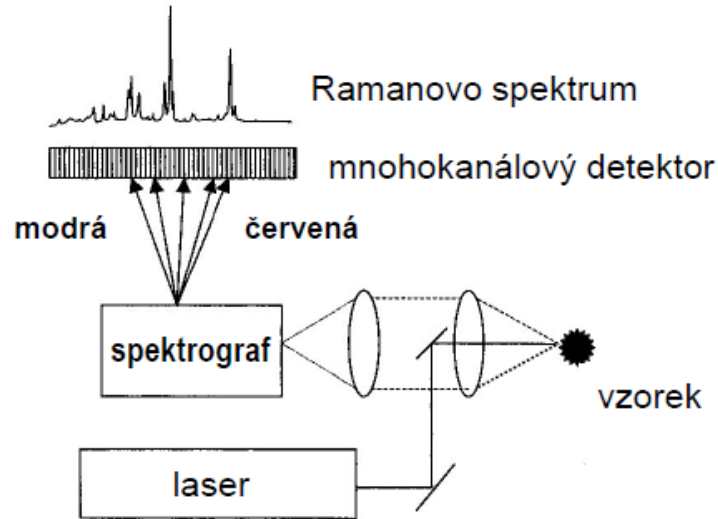


4. Holografické filtry

- + výrazné snížení rozměrů spektrometrů i jejich ceny
- + více záření na detektoru
- ke každé excitační vlnové délce je potřeba filtr

schéma kompaktního Ramanova spektrometru

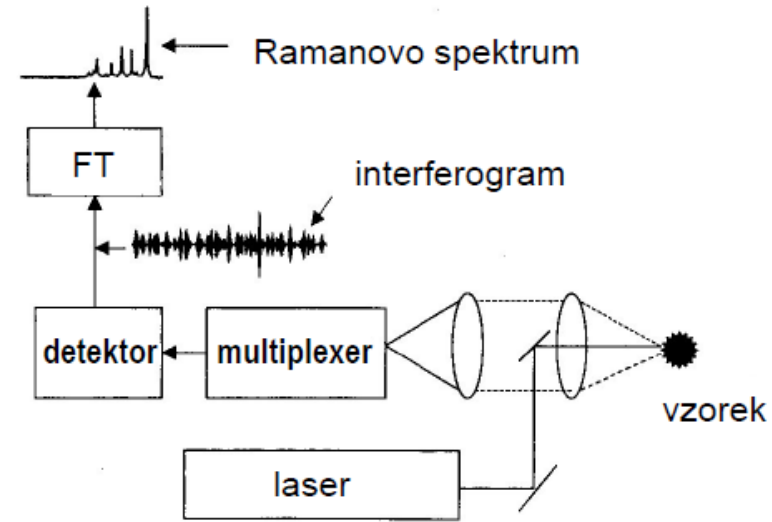
Disperzní mnohokanálový Ramanův spektrometr



- citlivost
- vyšší poměr signál/šum
- $\lambda_{\text{exc}} = 200 - 800 \text{ nm}$
(limitováno odezvou CCD)

Výhody

Nedisperzní FT-Ramanův spektrometr



- vysoká přesnost určení frekvence
- vyšší světelnost
- vždy $\lambda_{\text{exc}} \geq 1064 \text{ nm}$
- zpravidla bez fluorescence

Nevýhody

- kompromis mezi rozlišením a pokrytím
- více fluorescence
- měnící se spektrální rozlišení

- horší poměr signál/šum
- často vysoký výkon budícího laseru

$\lambda_{\text{exc}} < 900 \text{ nm} \Rightarrow$ disperzní Ramanovy spektrometry (omezení křemíkovými CCD detektory)

$\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm} \Rightarrow$ nedisperzní FT Ramanovy spektrometry

Kontinuální (cw) lasery pro Ramanovu spektroskopii

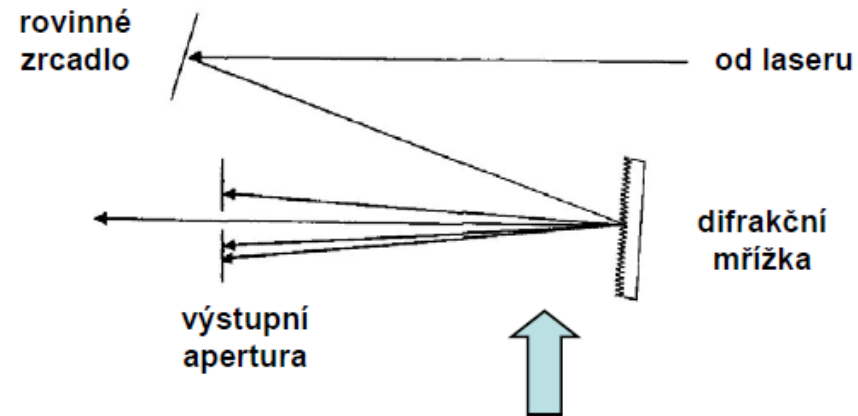
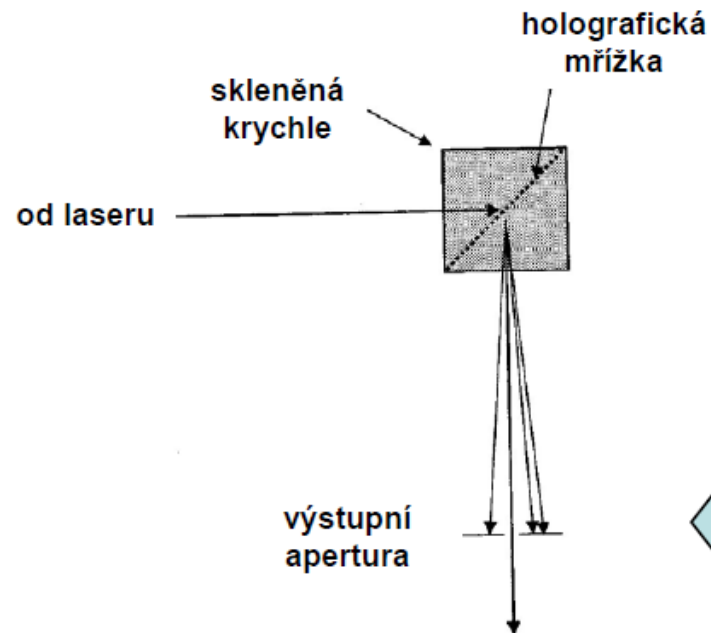
typ	λ (nm)	typický výkon
druhá harmonická Ar ⁺	224, 257, 229	15-200 mW
Ar ⁺ (vzduchem chlazený)	488, 514.5	5-50 mW
Ar ⁺ (vodou chlazený)	351.1, 454.5, 457.9, 465.8 476.5, 488, 496.5, 501.7, 514.5	0.1-10 W
He-Ne	632.8	5-100 mW
He-Cd	442 nm	5-50 mW
Kr ⁺	406.7, 413.1, 647.1, 752.5	0.1-4 W
Nd:YAG	1064	0.1-10 W
druhá harmonická Nd:YAG	532	0.05-5 W
diodový (external cavity, fixed λ)	785	300 mW
diodový (external cavity)	780-1060	500 mW
barvivové, Ti: safír	spojitě přeladitelné	

PROČ ?

pro potlačení nežádoucí spontánní emise (např. plasmové linie v iontových laserech, široké pozadí z Nd:YAG a diodových laserů)

JAK ?

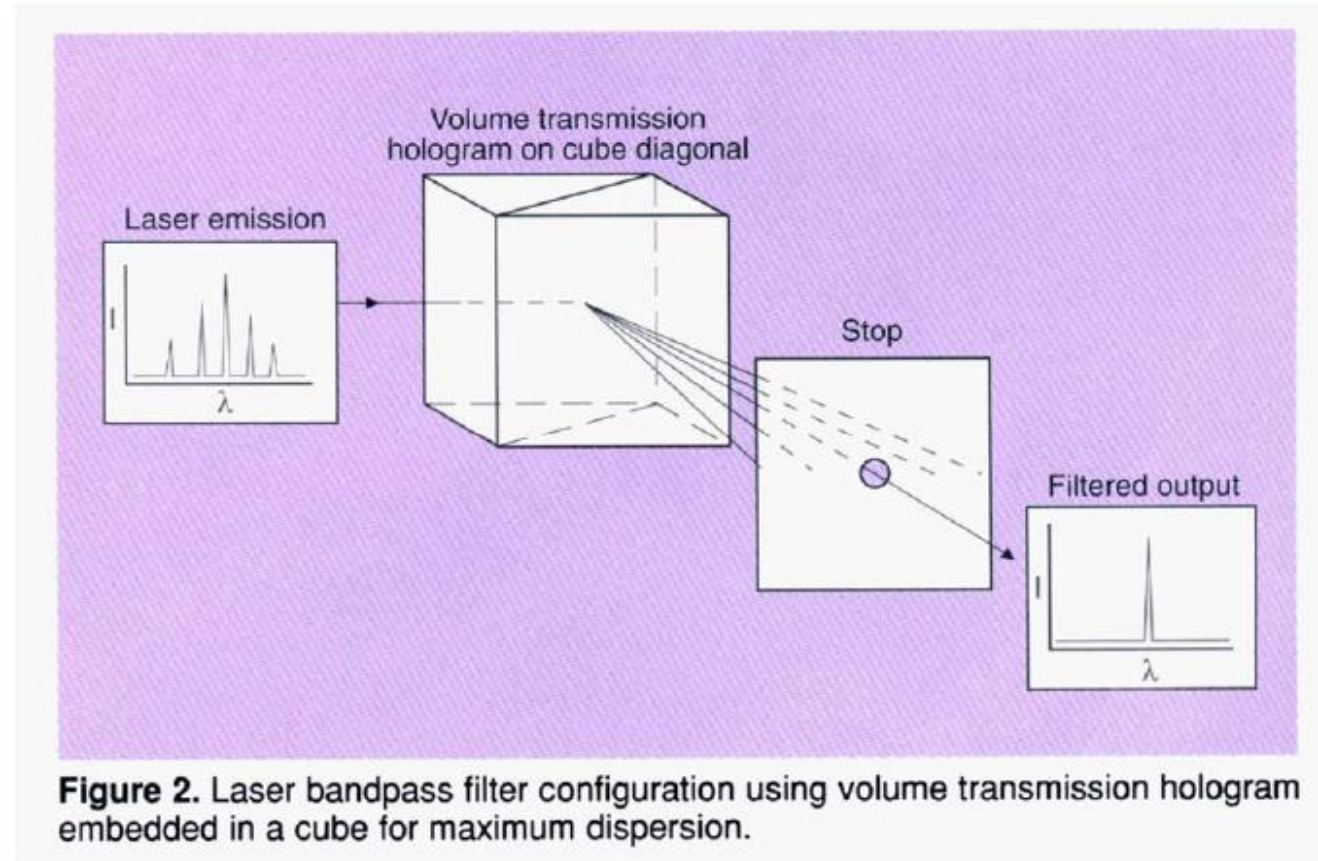
- interferenční filtry
- předmonochromátor jako filtr



Mřížkový premonochromátor pro odfiltrování plasmových linií z kolimovaného svazku

Holografický pásmový filtr s vysokou propustností, až 80% (Kaiser Optical Systems)

Laser band-pass filters



Velmi účinné potlačení plasmových čar iontových laserů

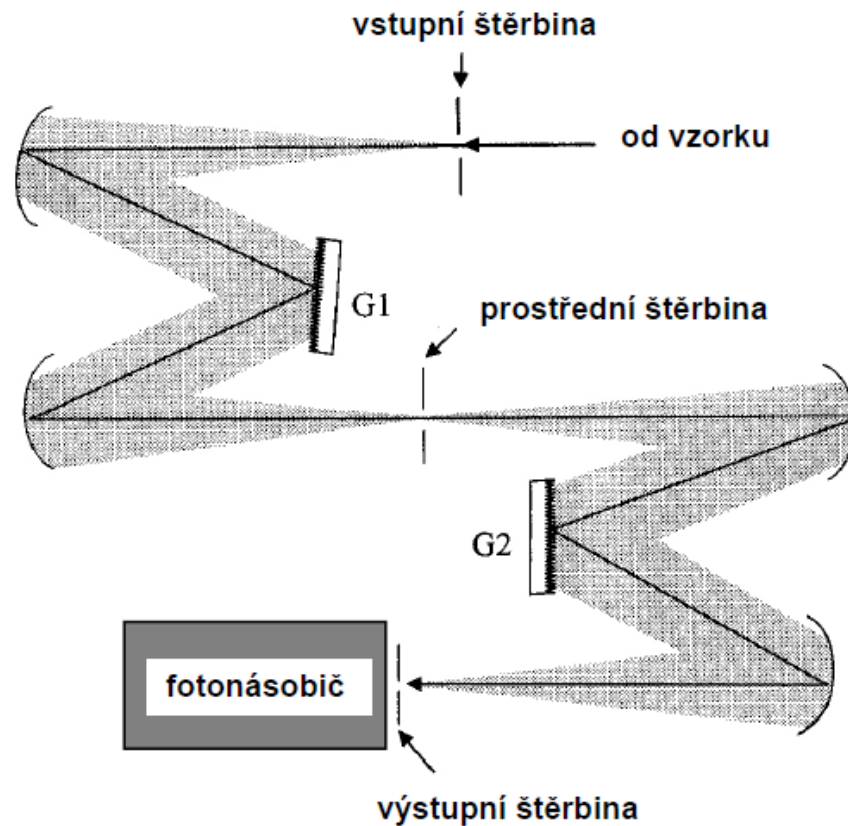


Schéma dvojitého monochromátoru
(např. Spex 1403)
70. až 80. léta

Výhody:

- vysoké rozlišení
- výborný odstup od pozadí (10^{-12} – 10^{-14})
- měření v blízkosti excitační linie

Nevýhody:

- pomalé měření (bod po bodu)
- příliš velká disperze pro mnohokanálovou detekci

filtrující dvojitý monochromátor
v subtraktivním módu

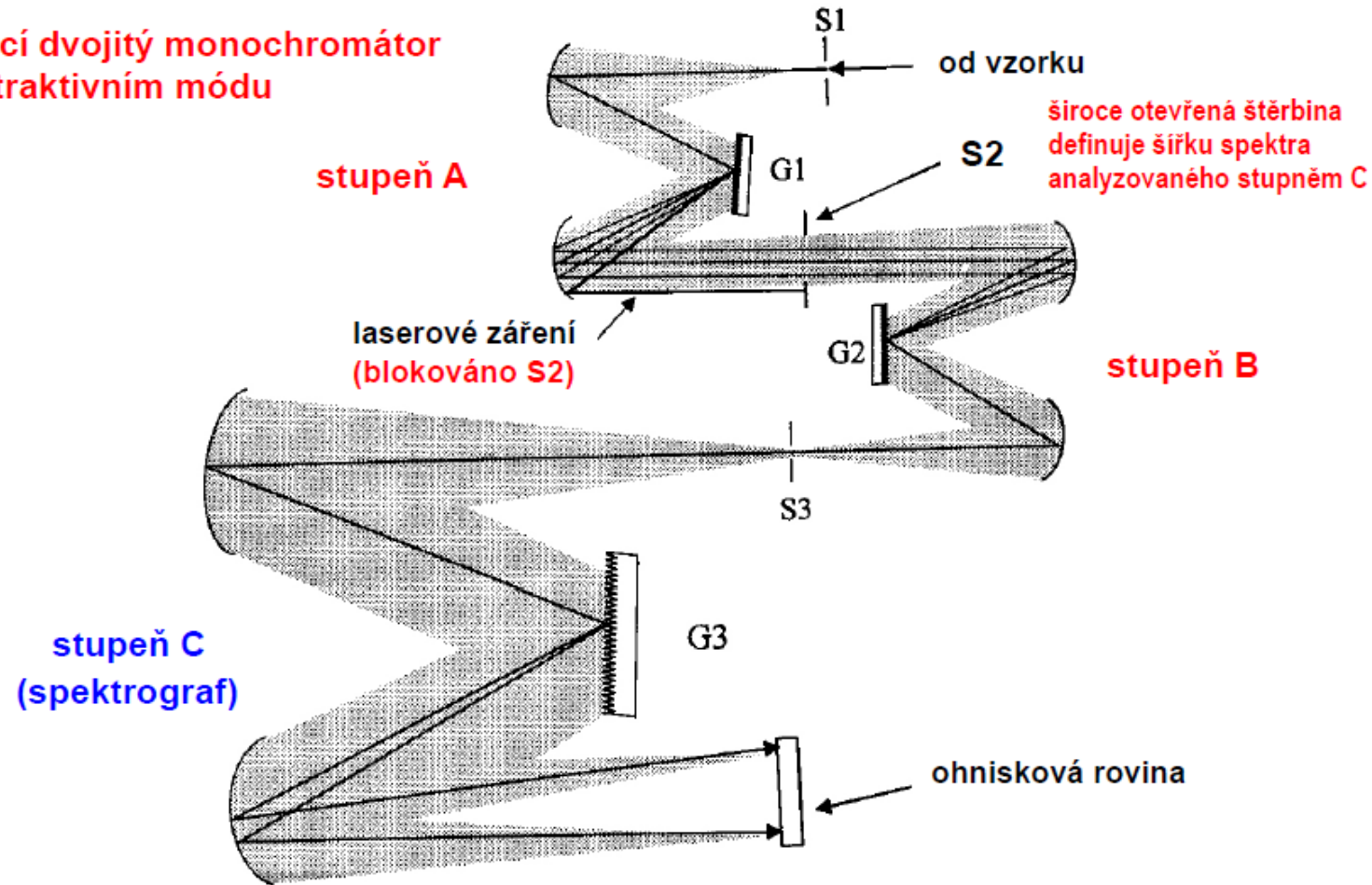


Schéma trojitého spektrografu (např. Jobin Yvon T64000)

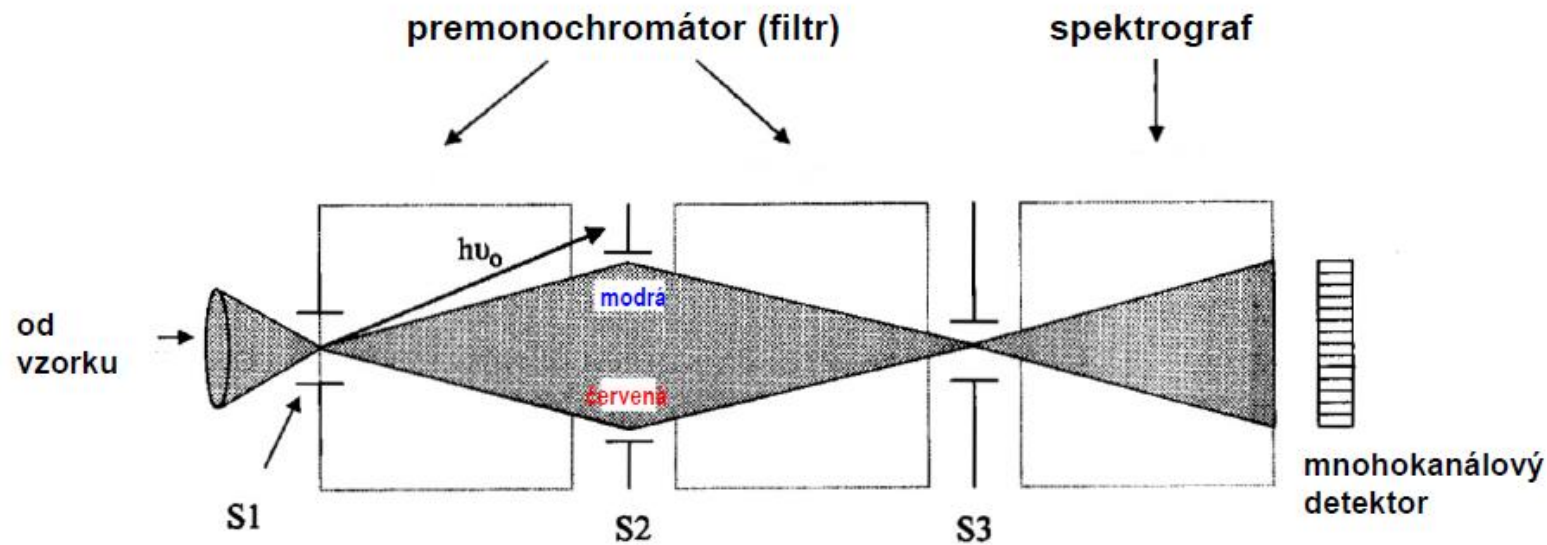


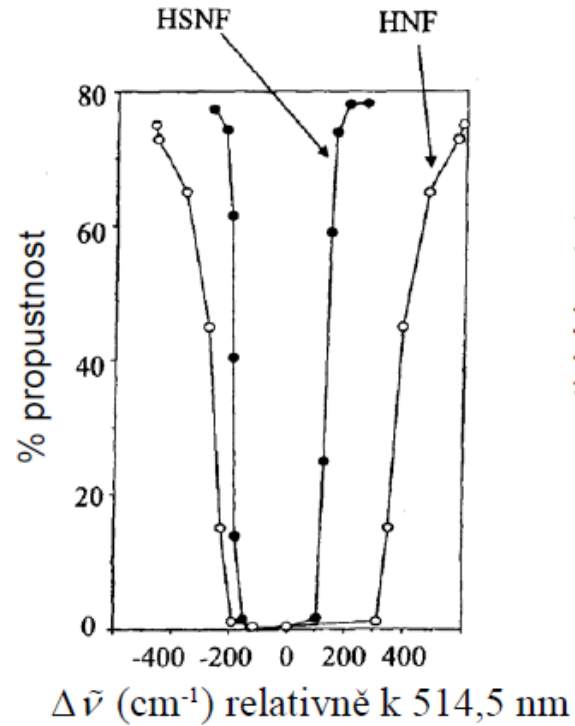
Diagram ilustrující fungování trojitého spektrografu

Výhody:

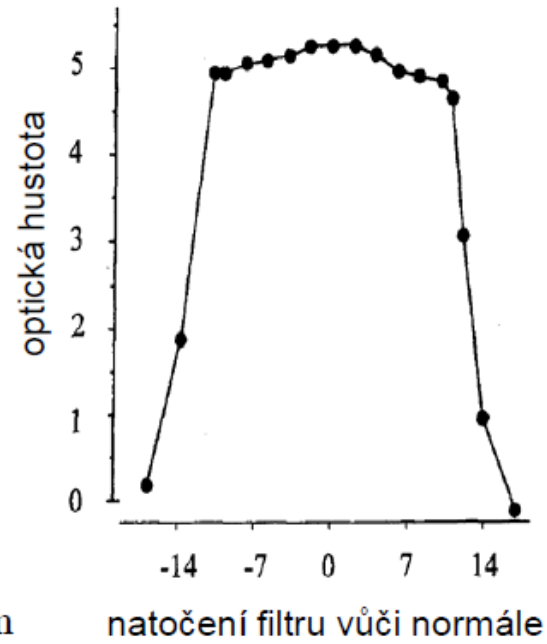
- výborný odstup od pozadí (10^{-12} - 10^{-14})
- měření v blízkosti excitační linie
- univerzálnost

Nevýhody:

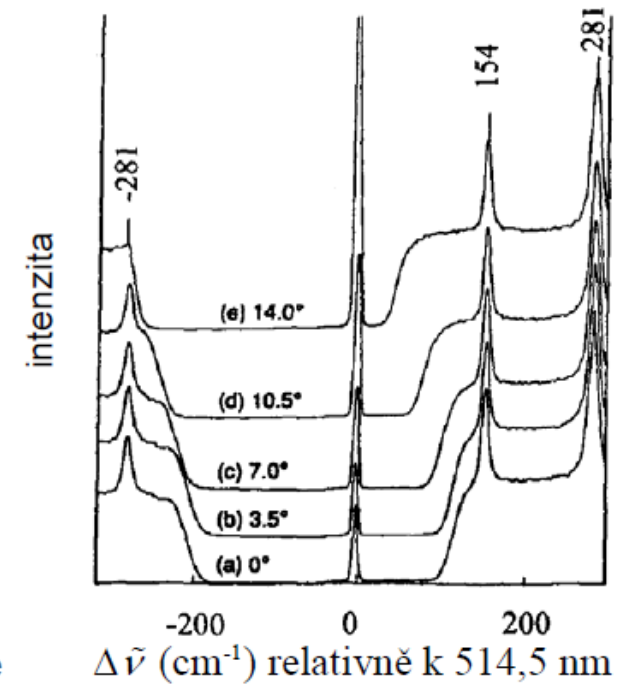
- nízká světelnost (\Rightarrow málo světla na detektoru)
- vysoká cena



Propustnost holografického notch filtru (HNF) a holografického super notch filtru (HSNF).



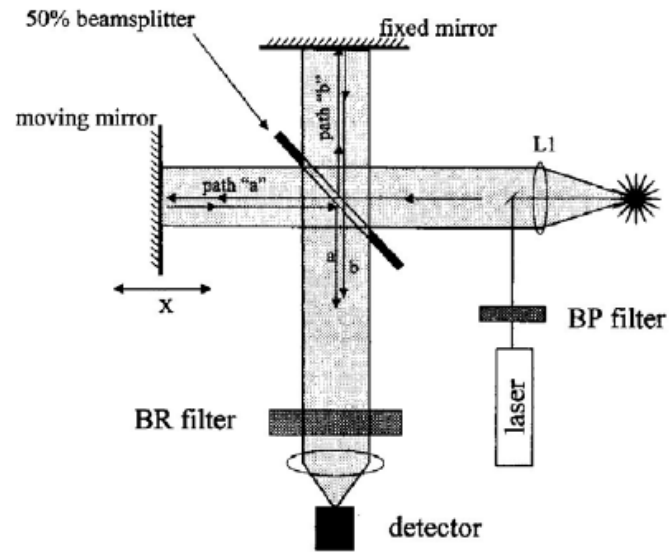
Závislost optické hustoty HNF na úhlu natočení filtru.



Úhlové ladění HNF filtru (spektrum kalcitu).

Notch	OD > 4.0	šířka pásma 700 cm^{-1}	šířka hrany 300 cm^{-1}
Notch Plus	OD > 6.0	šířka pásma 700 cm^{-1}	šířka hrany 300 cm^{-1}
Super Notch	OD > 4.0	šířka pásma 350 cm^{-1}	šířka hrany 150 cm^{-1}
Super Notch Plus	OD > 6.0	šířka pásma 350 cm^{-1}	šířka hrany 150 cm^{-1}

FT-Raman – multiplexová technika, kdy je mnoho vlnových délek modulováno interferometrem, který generuje interferogram zaznamenávaný jediným detektorem



cyclohexane, FT-Raman

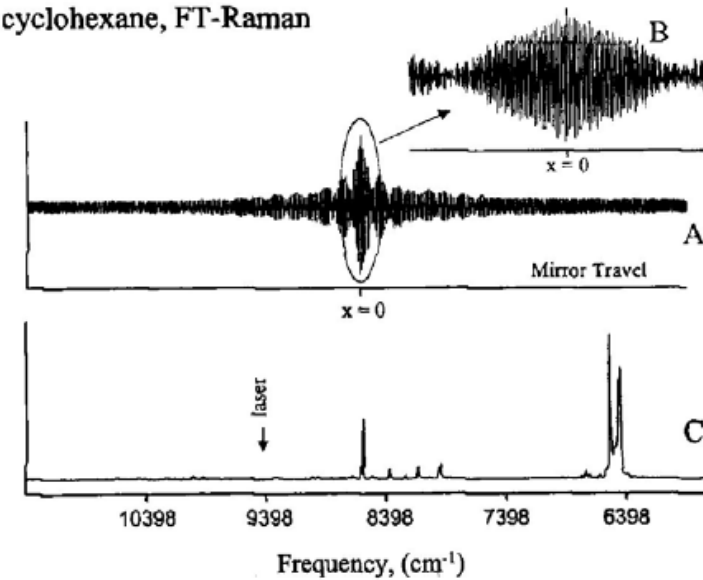
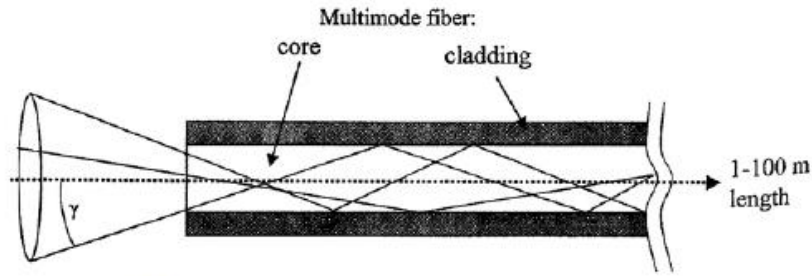


Schéma FT Ramanova spektrometru založeného na Michelsonově interferometru

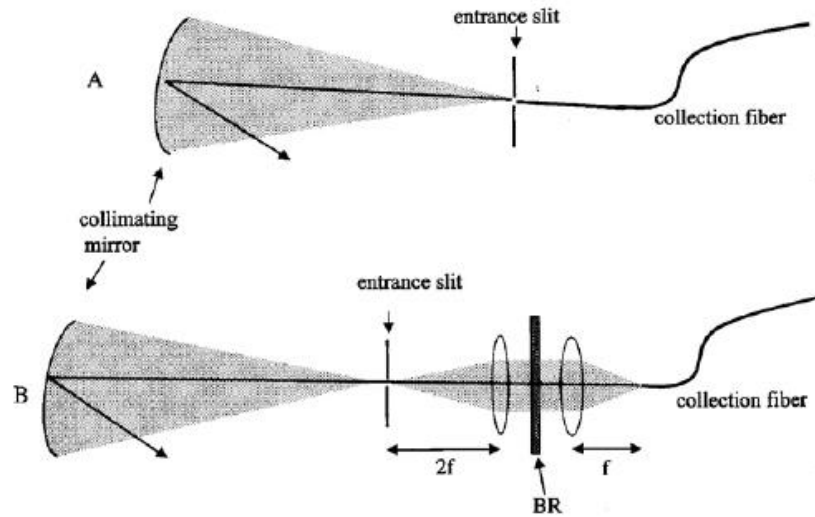
modulace – lineárním pohybem zrcadla, který generuje dráhový rozdíl $a - b = 2x$

Interferogram (A) pro cyklohexan excitovaný 1064 nm a Ramanovo spektrum (C).

rozlišení $\delta\tilde{\nu} = \frac{1}{\Delta x_{\max}}$ ← maximální dráha zrcadla

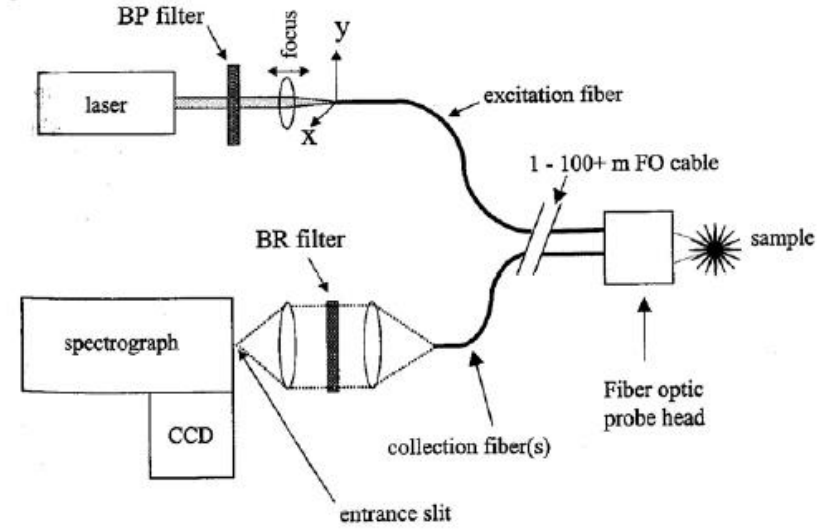


Šíření světla v optickém vlákně.

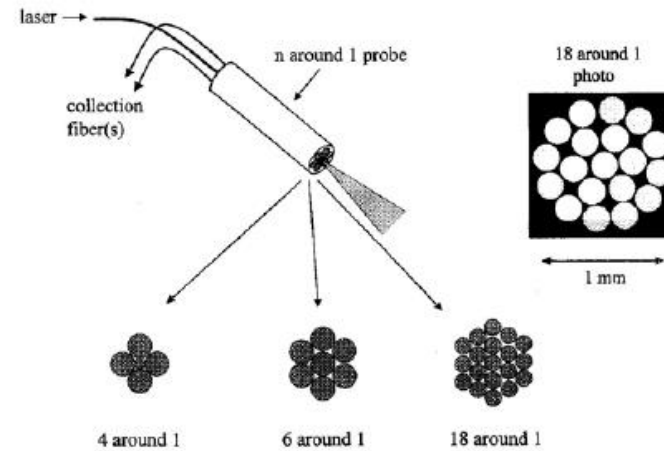


Dvě metody připojení optických vláken ke spektrometru

- A. přímé připojení bez možnosti přizpůsobení $f/\#$ spektrometru
- B. běžný způsob umožňující i umístění BR filtru do kolimovaného svazku



Obecné schéma použití optických vláken v RS.



Uspořádání vláknových sond (n-around 1).

Holografický zobrazovací spektrograf s vysokou světelností

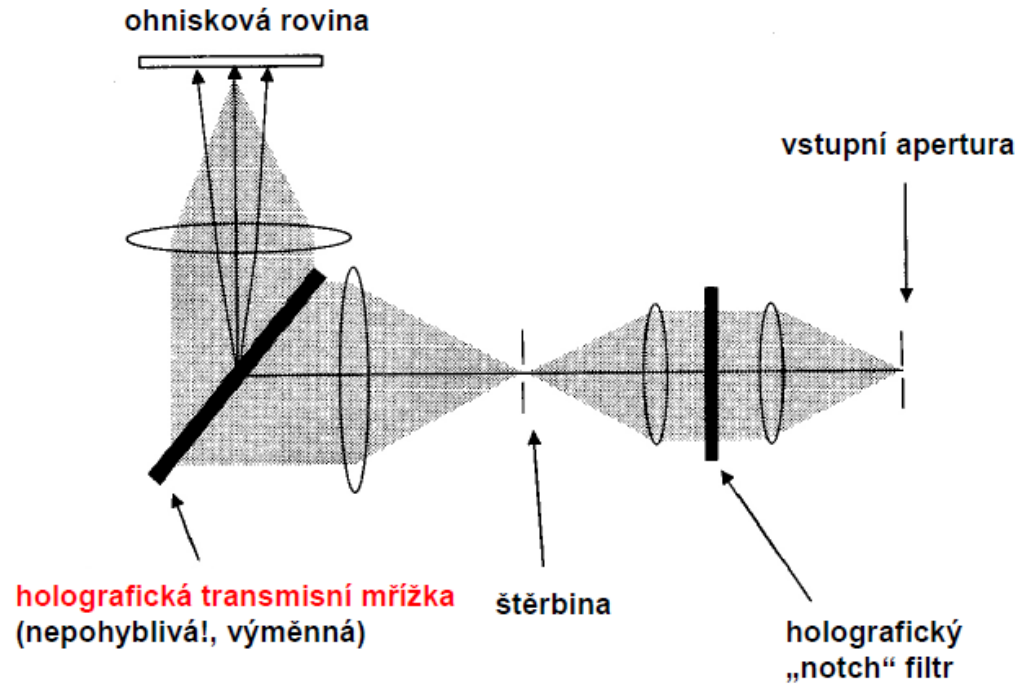


Schéma osového transmisního holografického spektrografu (např. Kaiser 1.8i)

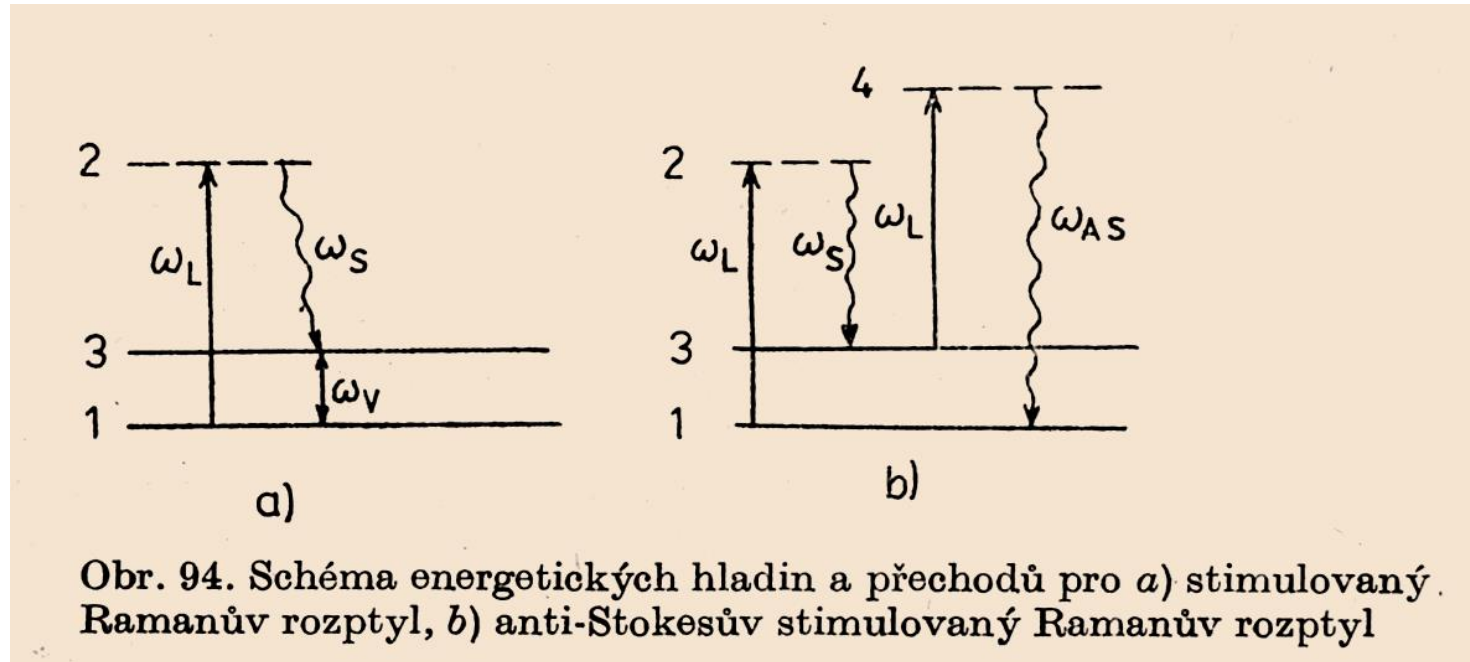
Výhody:

- světelnost (přechod od $f/4$ k $f/1.4$ představuje téměř **řádové zvýšení signálu** na detektoru, $4/1.4^2 = 8.2$)
- kompaktnost (malé rozměry)
- velká disperze

Nevýhoda:

- různé mřížky pro různé excitační vlnové délky

Metody nelineární – SRS a ASRS



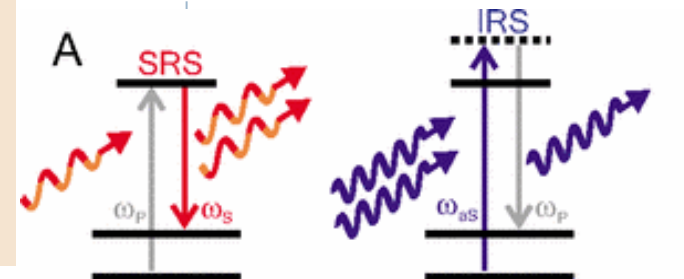
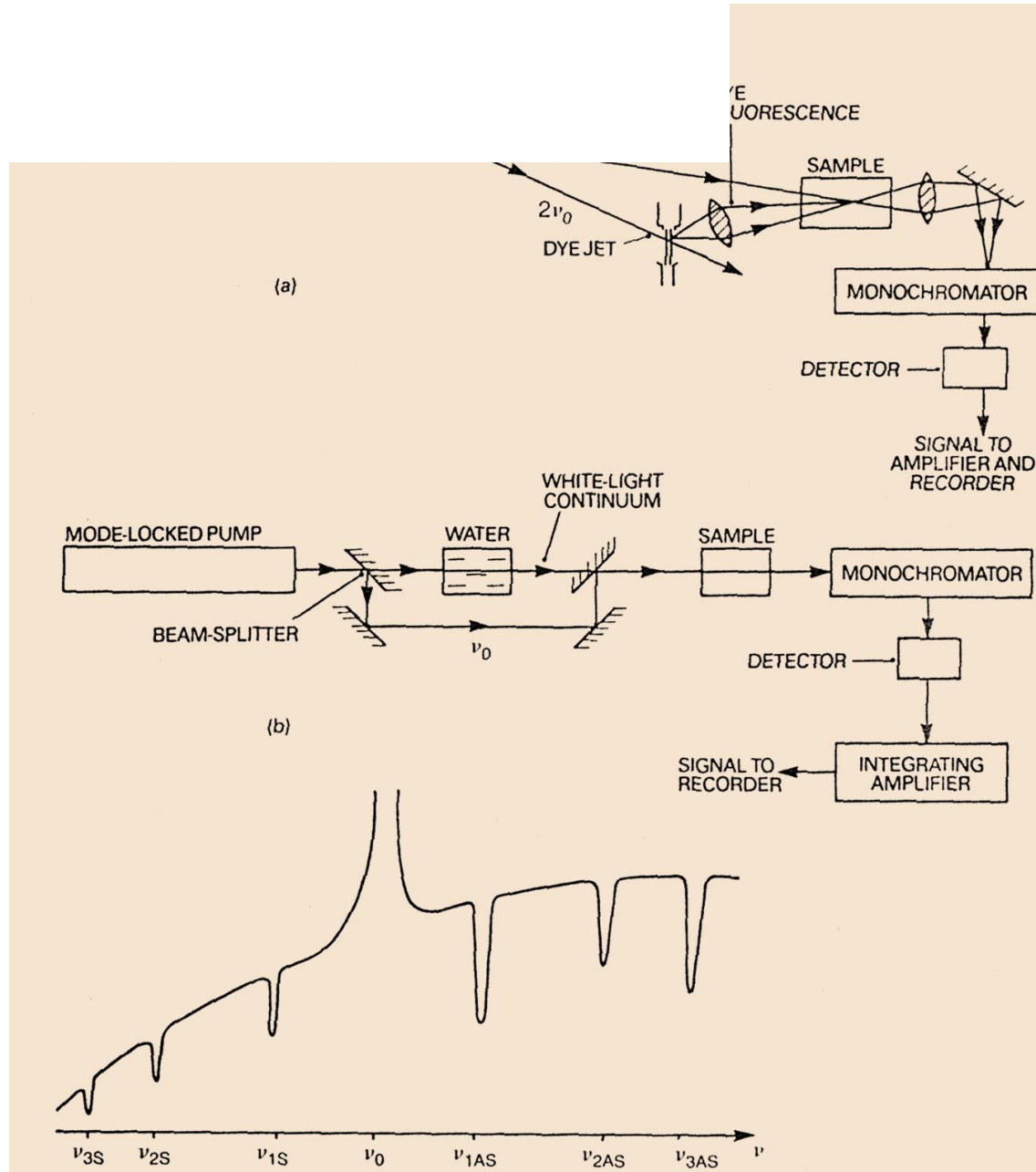
SRS (Stimulated Raman Scattering) je variantou metody dvojí rezonance (a), při níž laserem (frekvence ω_L) buzená hladina 2 je virtuální. Je-li ω_V frekvence vibračního přechodu, pak $\omega_L - \omega_V = \omega_S$. Zavedeme-li do kvety pomocný paprsek s frekvencí ω_S , tedy se Stokesovou frekvencí Ramanova spektra, dojde k zesílení na této frekvenci. V případě ASRS (Antistokes SRS) dochází k vybuzení dvou virtuálních hladin 2 a 4 a platí $\omega_L + \omega_V = \omega_{AS}$. Metody se používají k měření s vysokým rozlišením až $0,01 \text{ cm}^{-1}$. Na jejich principu jsou založeny i laditelné infračervené (ramanovské) lasery.

Inverzní Ramanova spektrometrie

(a) Using a laser dye to generate a continuum

(b) Using a white light continuum produced by self-focusing of picosecond laser pulses in water

(c) Illustration of the spectrum



Experimentální výhody

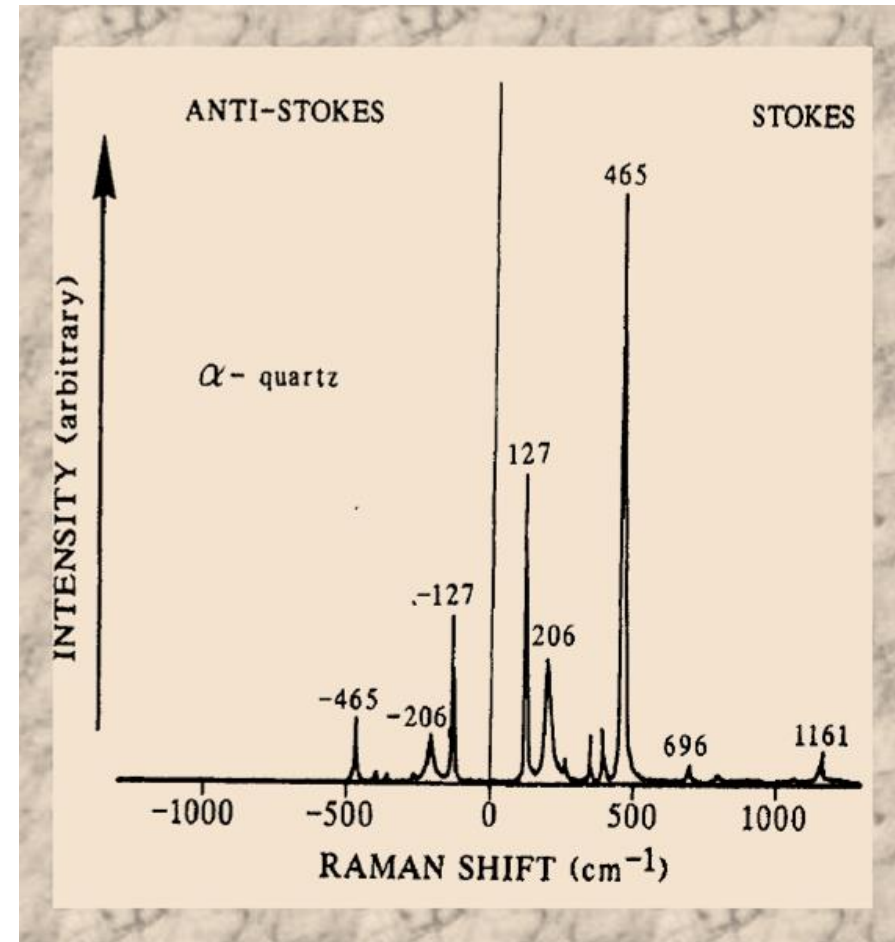
- ▶ možnost měření ve vodném prostředí
 - ↳ nízká intenzita Ramanova rozptylu pro vodu
 - ↳ používané optické materiály nejsou citlivé na vlhkost
- ▶ možnost měření ve skleněných nádobách
 - ↳ měření v uzavřených ampulích - např. pod vakuem
- ▶ snadné využití skelné vláknové optiky
- ▶ minimální požadavky na úpravu pevných vzorků
- ▶ intenzivní pásy $-C=C-$, $-N=N-$, $-S-S$ a dalších symetrických vibrací

Aplikace RS v geologii

- ▶ identifikace a analýza fází: v některých případech je RS nejjednodušší či dokonce jedinou použitelnou metodou k identifikaci minerálu, zvláště tehdy, je-li uzavřen v jiném průhledném, nefluoreskujícím minerálu. Umožňuje rozlišovat členy izomorfních řad snáze, než rtg-difrakce.
- ▶ k identifikaci plynů v plyno - kapalných uzavřeninách
- ▶ studium struktury (zvláště vazba OH skupin), uspořádanosti struktury
- ▶ Fázové přechody (teplotní změna struktury perovskitu v podmínkách pláště)
- ▶ Určování termodynamických vlastností minerálů

Další aplikace RS v geologii

- ▶ rezonanční Ramanova spektroskopie
- ▶ Elektronická Ramanova spektroskopie
- ▶ hyper-Ramanova spektroskopie
- ▶ koherentní antistokesovský Ramanův rozptyl (CARS)



Geologické materiály - hematit

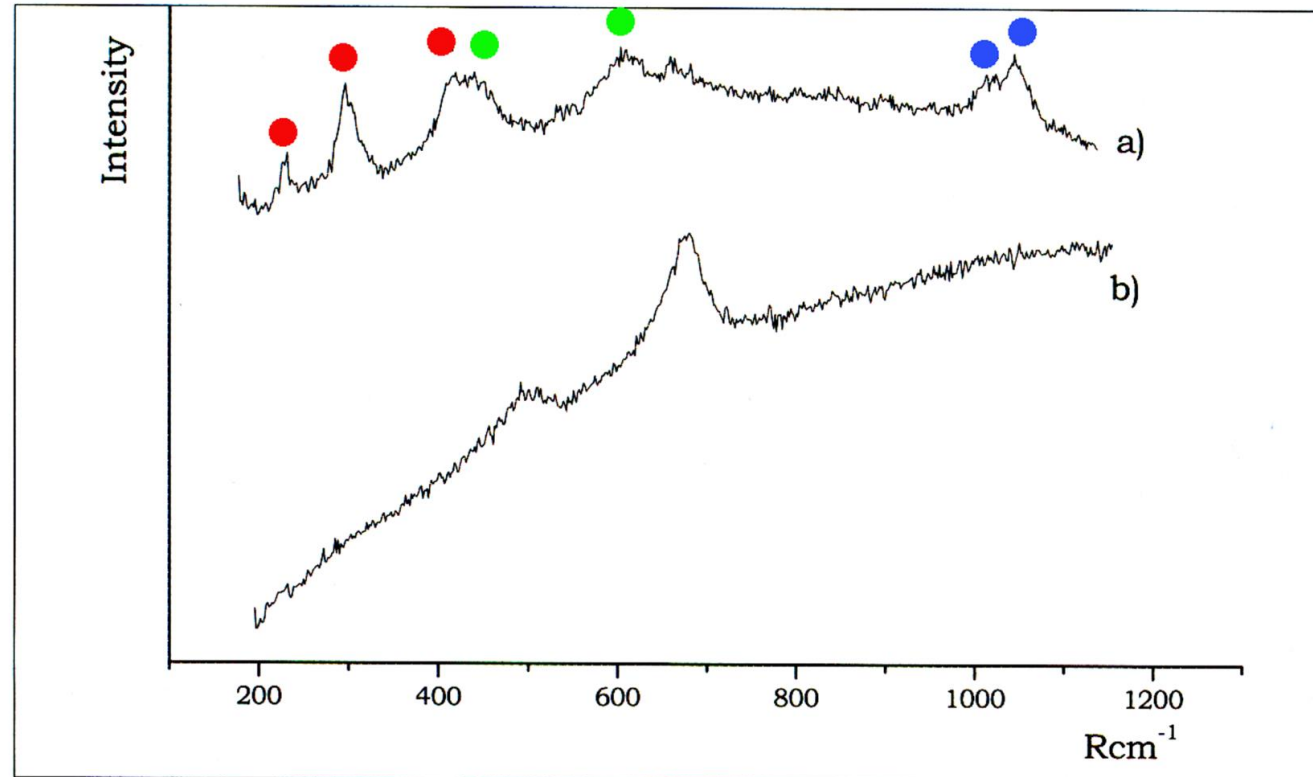
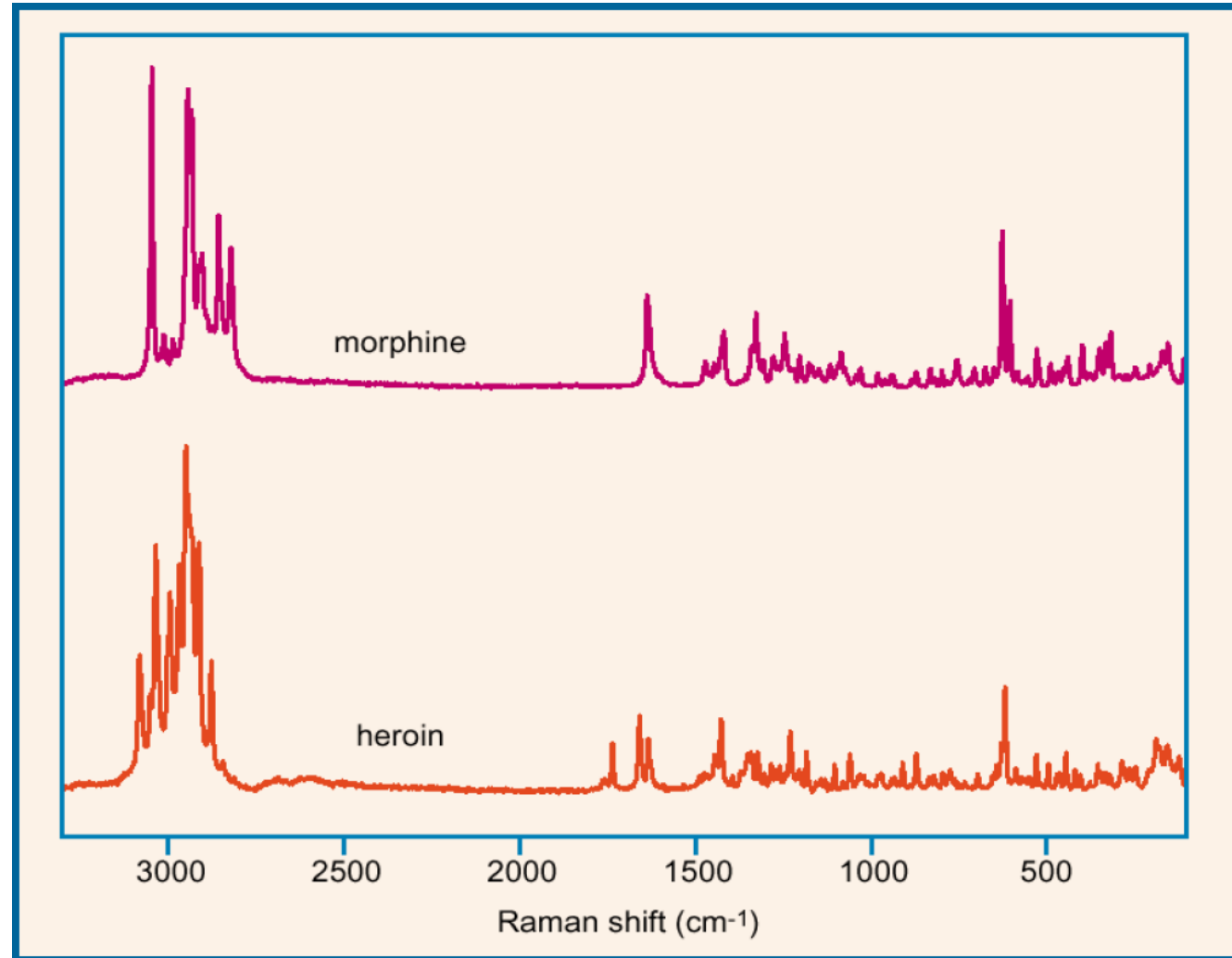
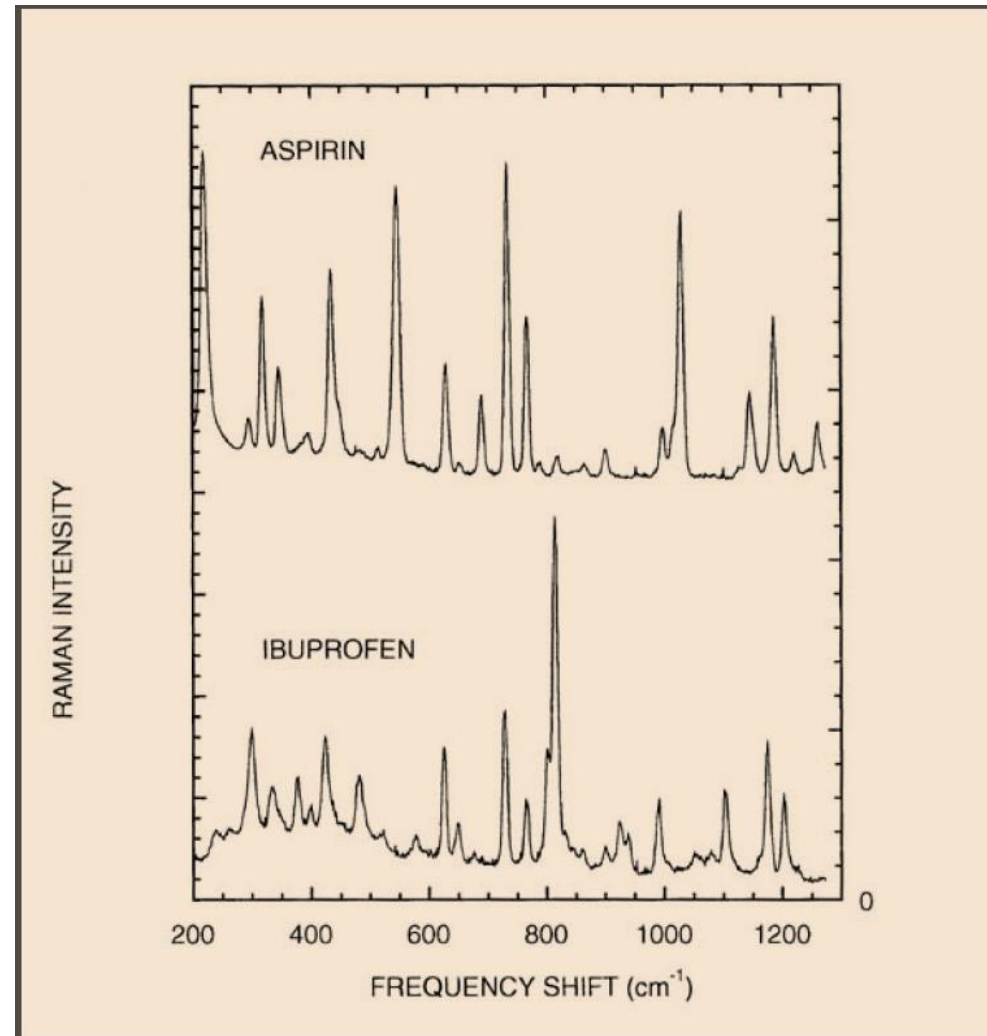


Figure 4. Raman spectra of (a) hematite and (b) magnetite, acquired on B and A sherds, respectively. In the (a) spectrum the bands of hematite are indicated by a ●, while those of rutile are labelled with a ● symbol; the doublet marked with ● is due to Cr(III) luminescence.

Identifikace drog



Identifikace léčiv



Studium komplexů

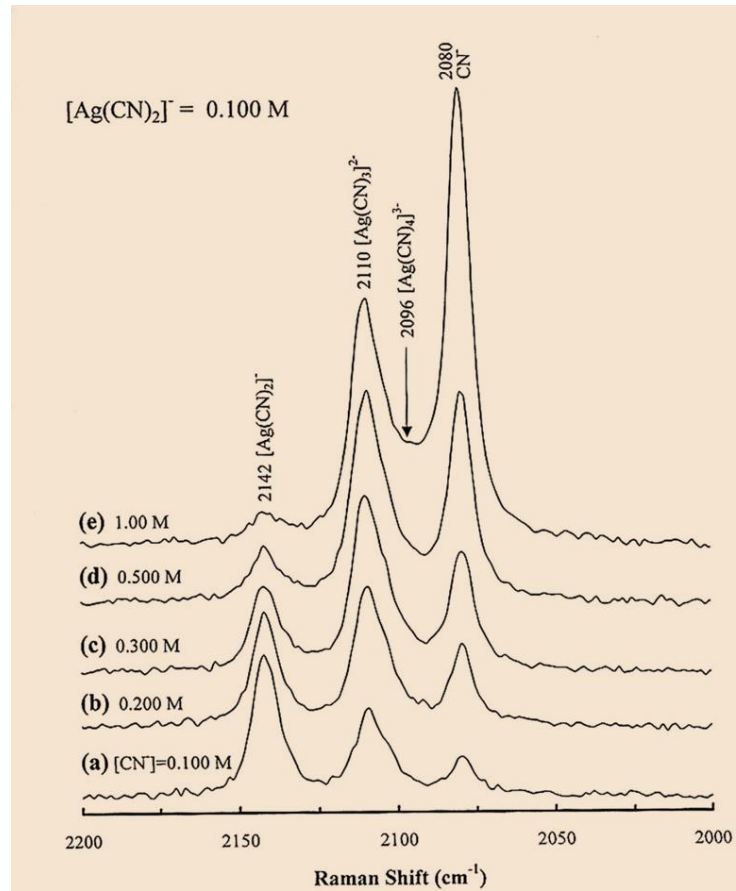


FIG. 3. Raman spectra at different ratios of CN^- with respect to $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$. The concentrations of CN^- ranged from 0.00 to 1.00 M at the constant $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ concentration of 0.100 M before mixing the two solutions. (a) 0.100 M , (b) 0.200 M , (c) 0.300 M , (d) 0.500 M , and (e) 1.00 M of the CN^- concentration.

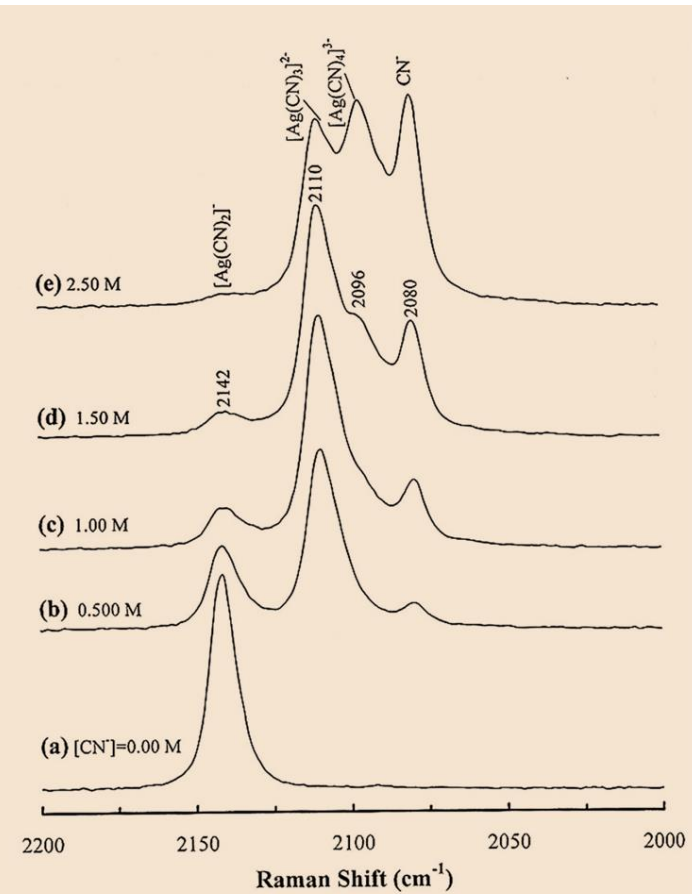


FIG. 4. Raman spectra at different ratios of CN^- with respect to $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$. The concentrations of CN^- ranged from 0.00 to 2.50 M at the constant $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ concentration of 0.500 M before mixing the two solutions. (a) 0.00 M , (b) 0.500 M , (c) 1.00 M , (d) 1.50 M , and (e) 2.50 M of the CN^- concentration.

Archeologie - keramika

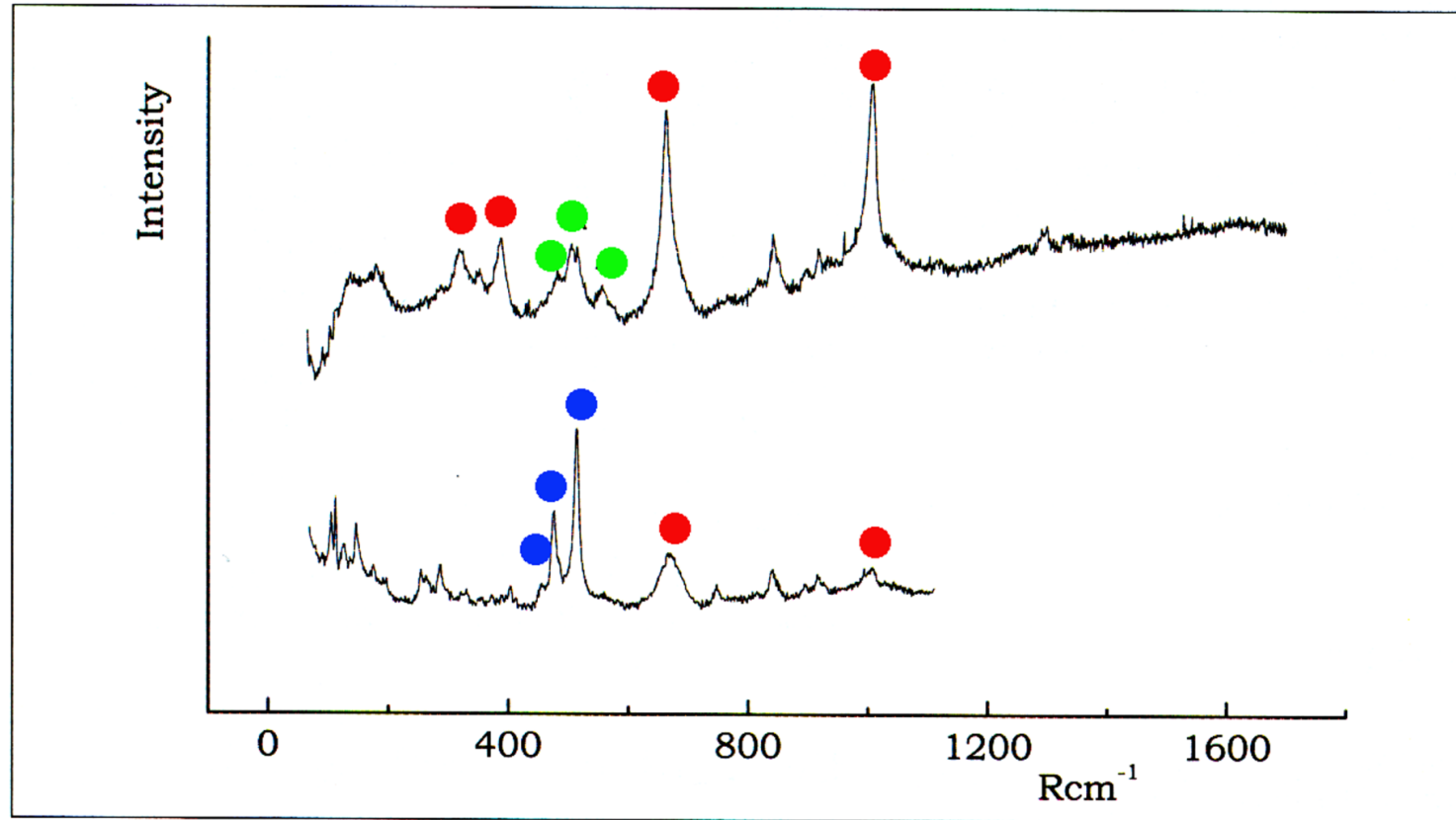
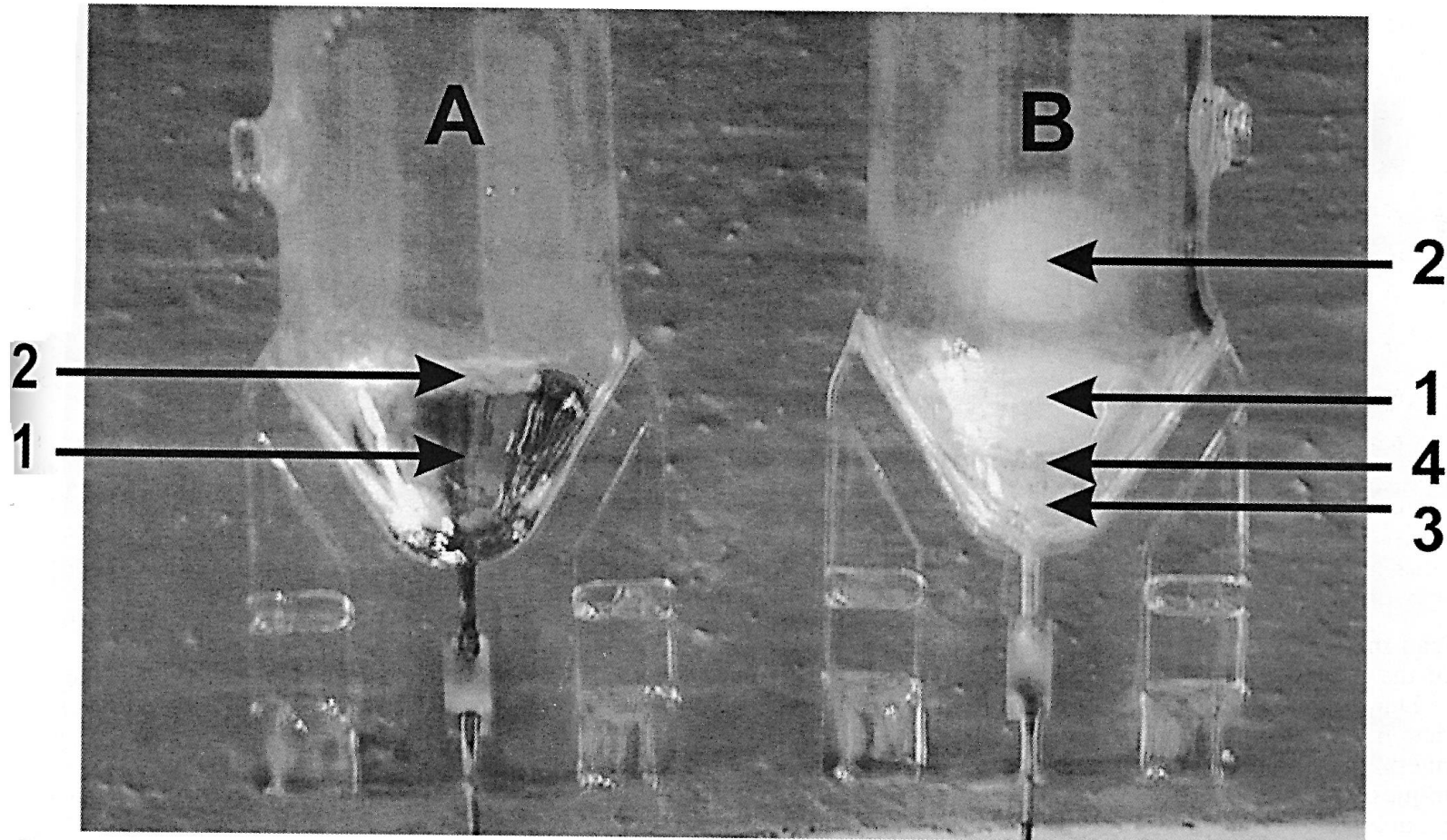


Figure 3. Spectra recorded on A wares containing characteristic peaks of diopside (●), K-feldspars (●) and plagioclases (●).

Analýza sloučenin ve výbojce



Photographs of lower ends of arc tube A immediately after seasoning (i.e., 7 min vertical burning) and of arc tube B after burning vertically for 125 h.

Analýza sloučenin ve výbojce

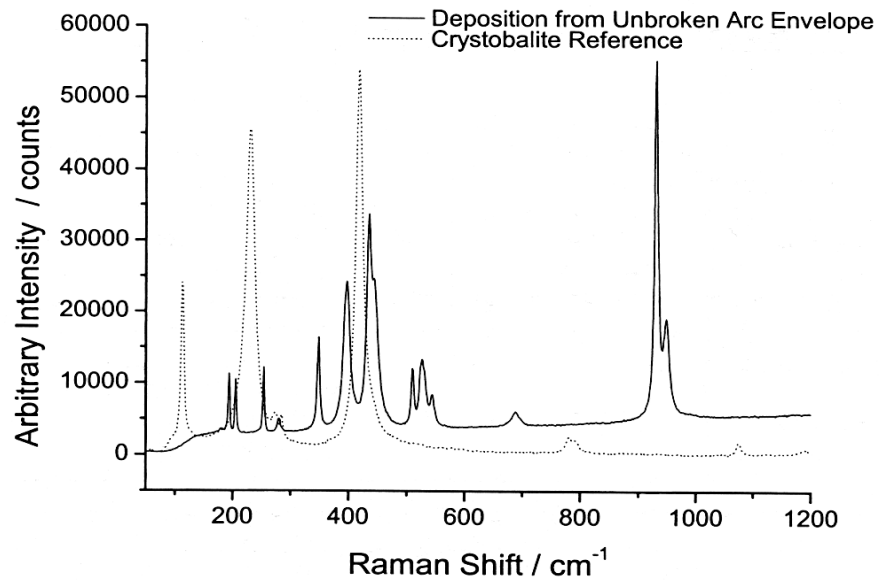


FIG. 9. Raman spectrum of white lamp envelope deposit (Positions 1 and 2 on arc tube B shown in Fig. 2) and an α -cristobalite reference spectrum from the HTSL Raman Database.

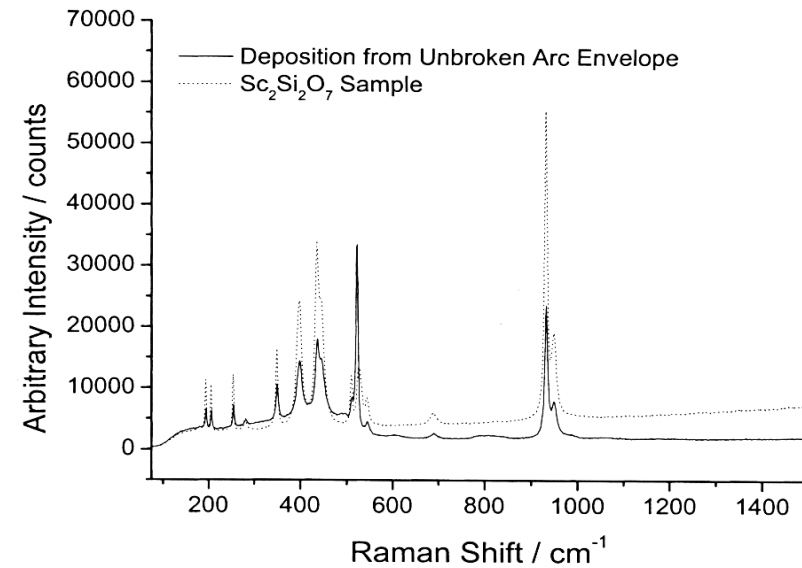
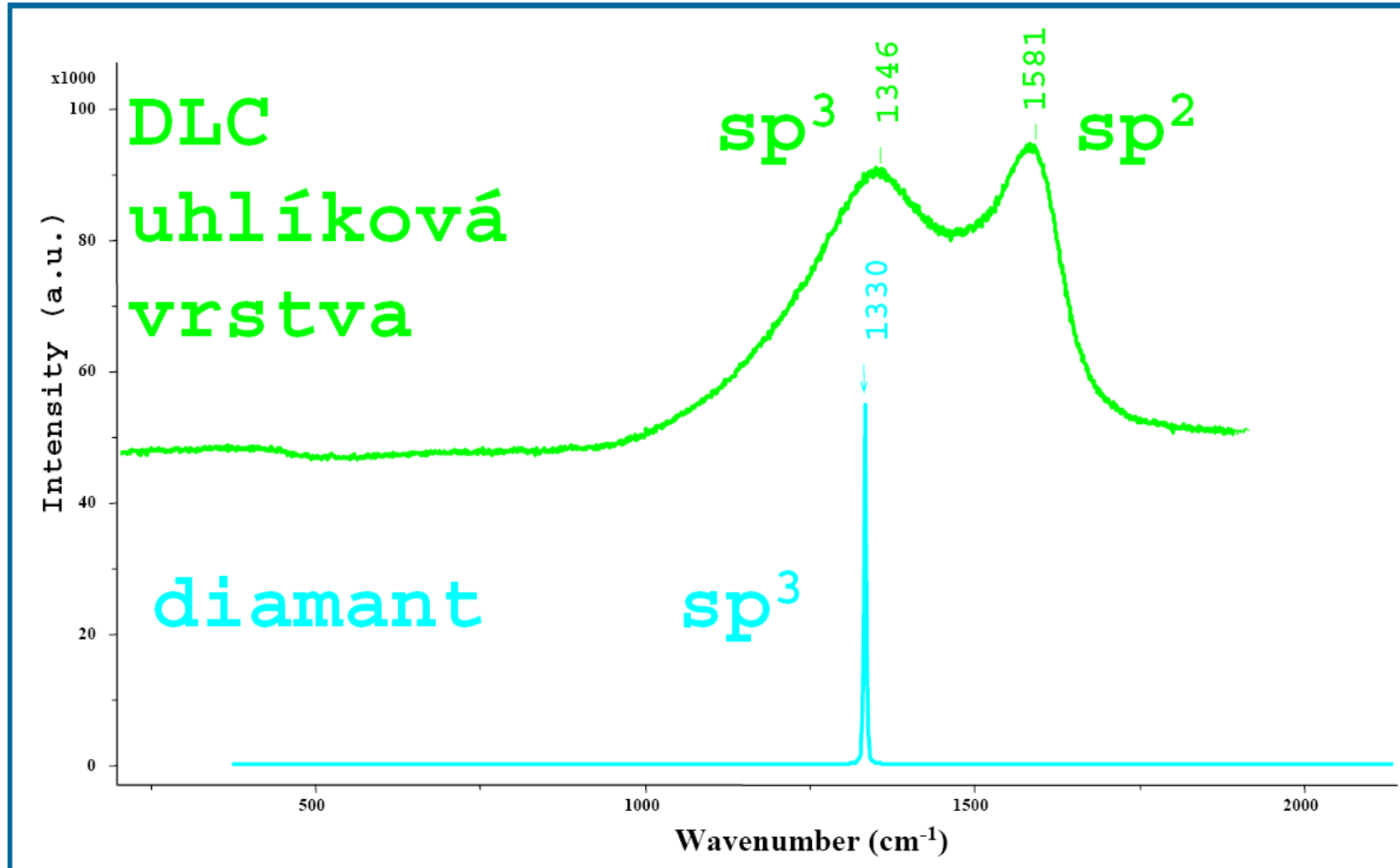
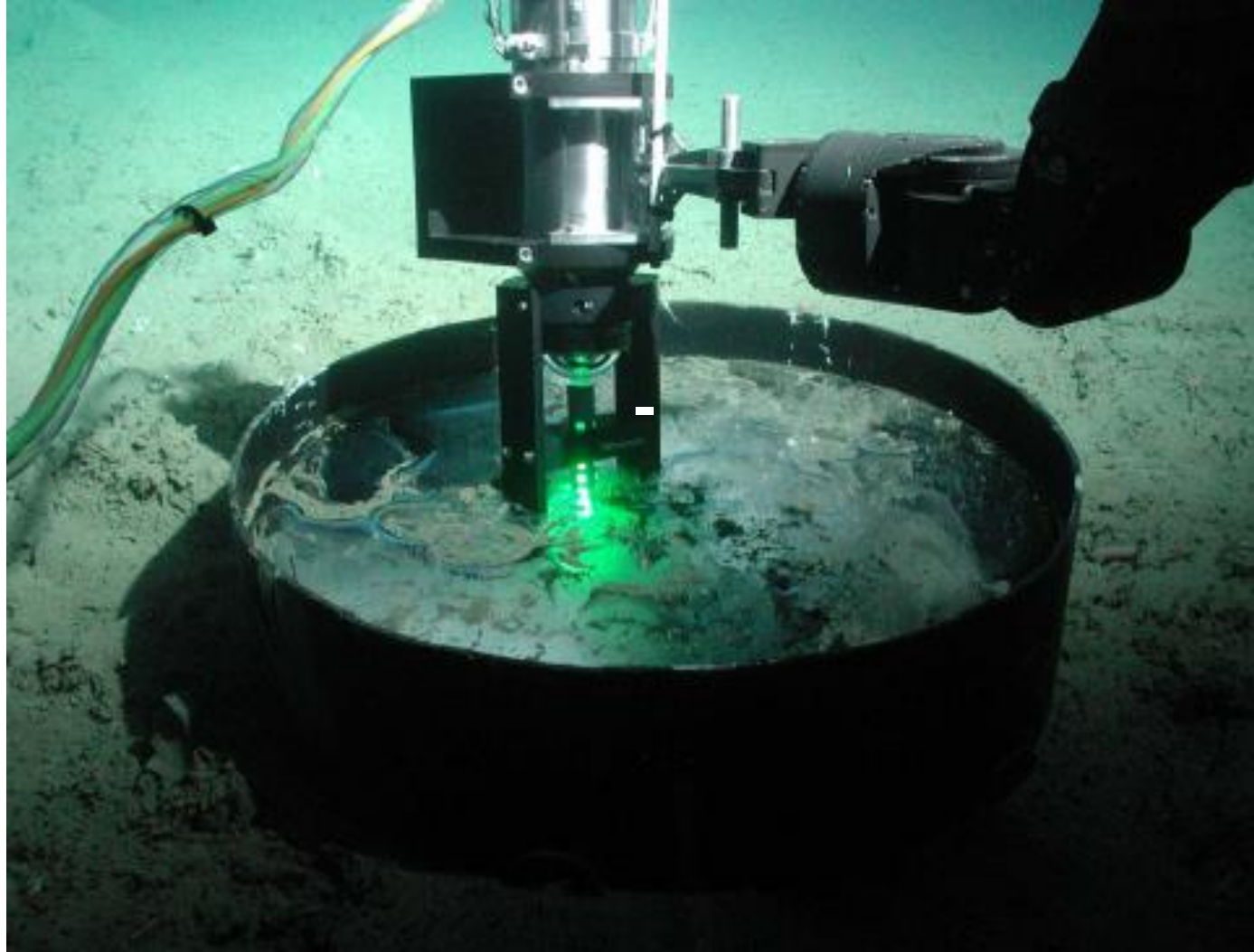


FIG. 11. Raman spectrum of white envelope deposit (Positions 1 and 2 on arc tube B shown in Fig. 2) and a Sc₂Si₂O₇ reference spectrum from the HTSL Raman Database.

Analýza uhlíkatých materiálů



DORISS system (depth of 3607 meters in Monterey Bay)



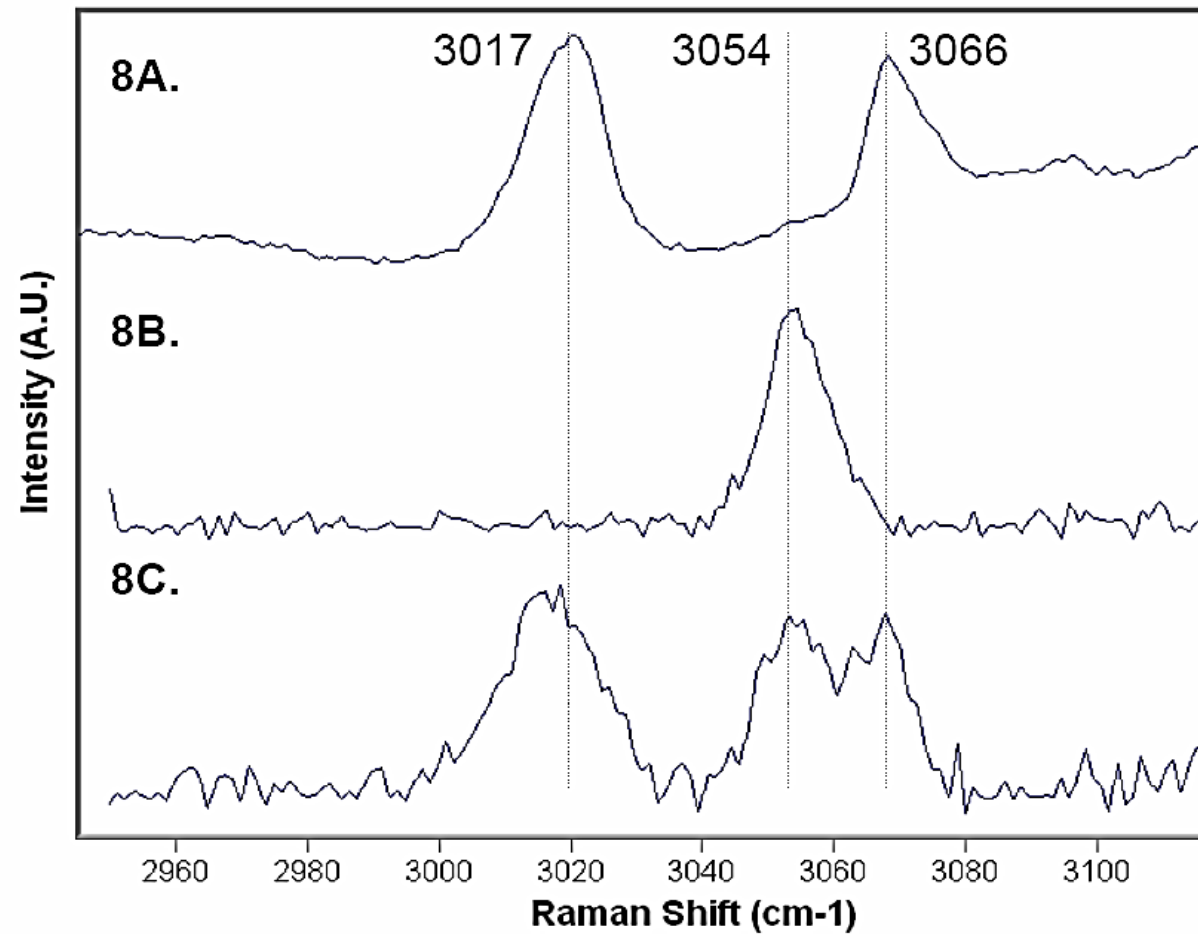


Figure 8. Methane Raman spectra. Spectrum 8A (5 MPa, 278 K, 150 sec (15 sec X 10)) shows two peaks (3017, 3066 cm^{-1}) assigned to methane gas. Spectrum 8B (7 MPa, 276 K, 200 sec (20 sec X 10)) shows one peak (3054 cm^{-1}) for pure synthetic methane hydrate. Spectra 8C (7.7 MPa, 275.4 K, 25 sec (5 sec X 5)) shows three peaks (3017, 3054, and 3066 cm^{-1}) for a natural hydrate sample measured *in situ*. Of the three peaks in 8C, two peaks (3017 and 3066 cm^{-1}) can be assigned to gas phase methane and 3054 cm^{-1} can be assigned to methane in the hydrate phase.

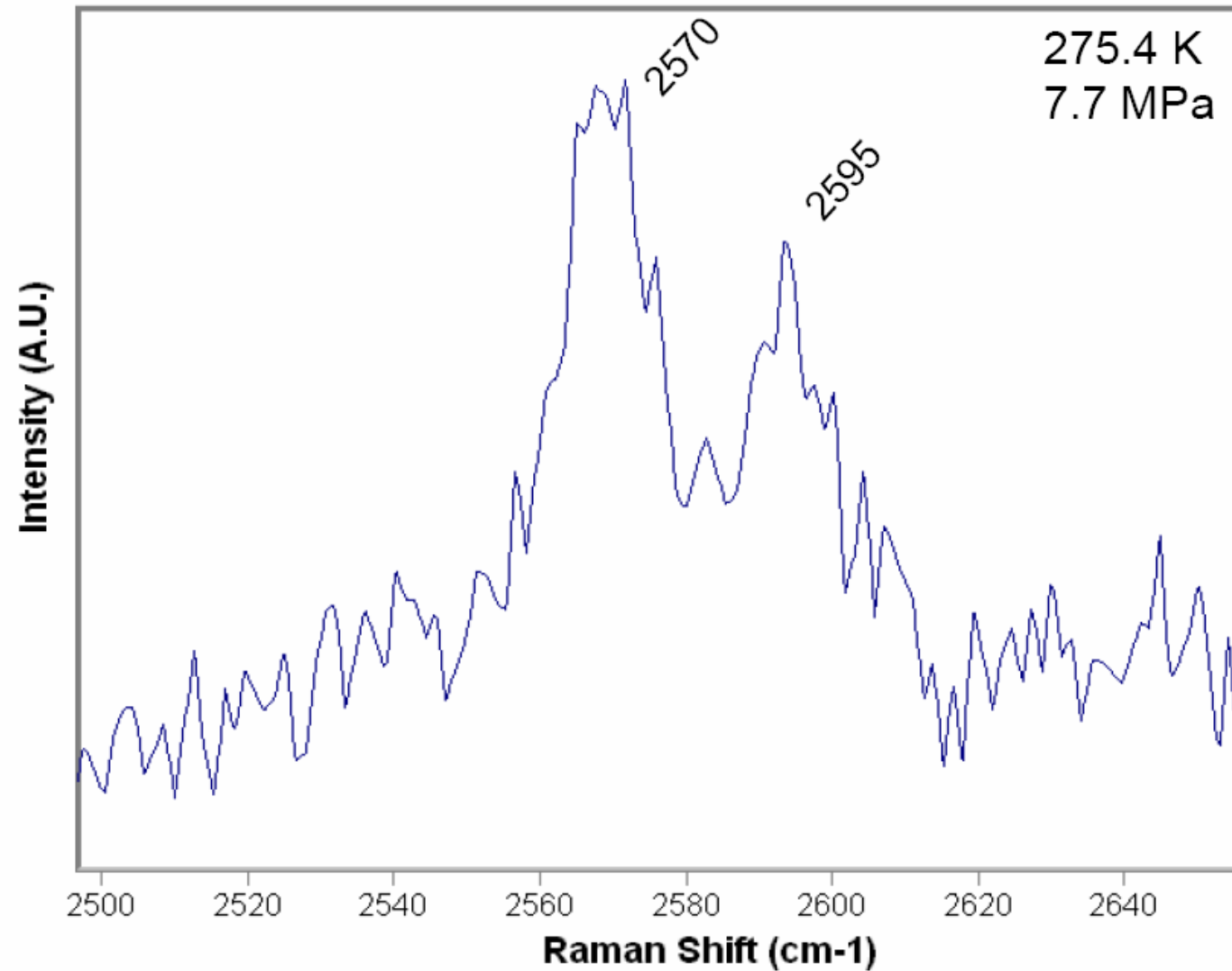
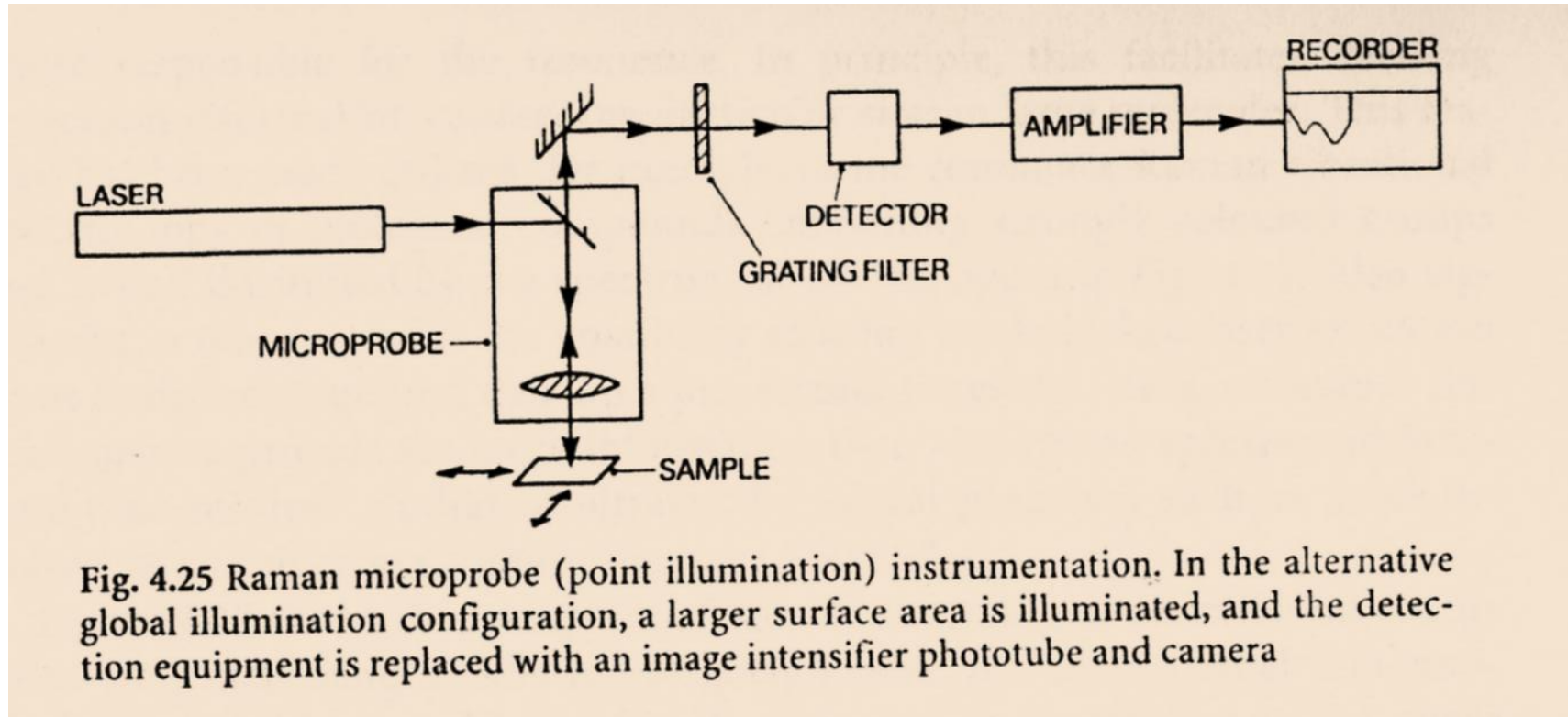
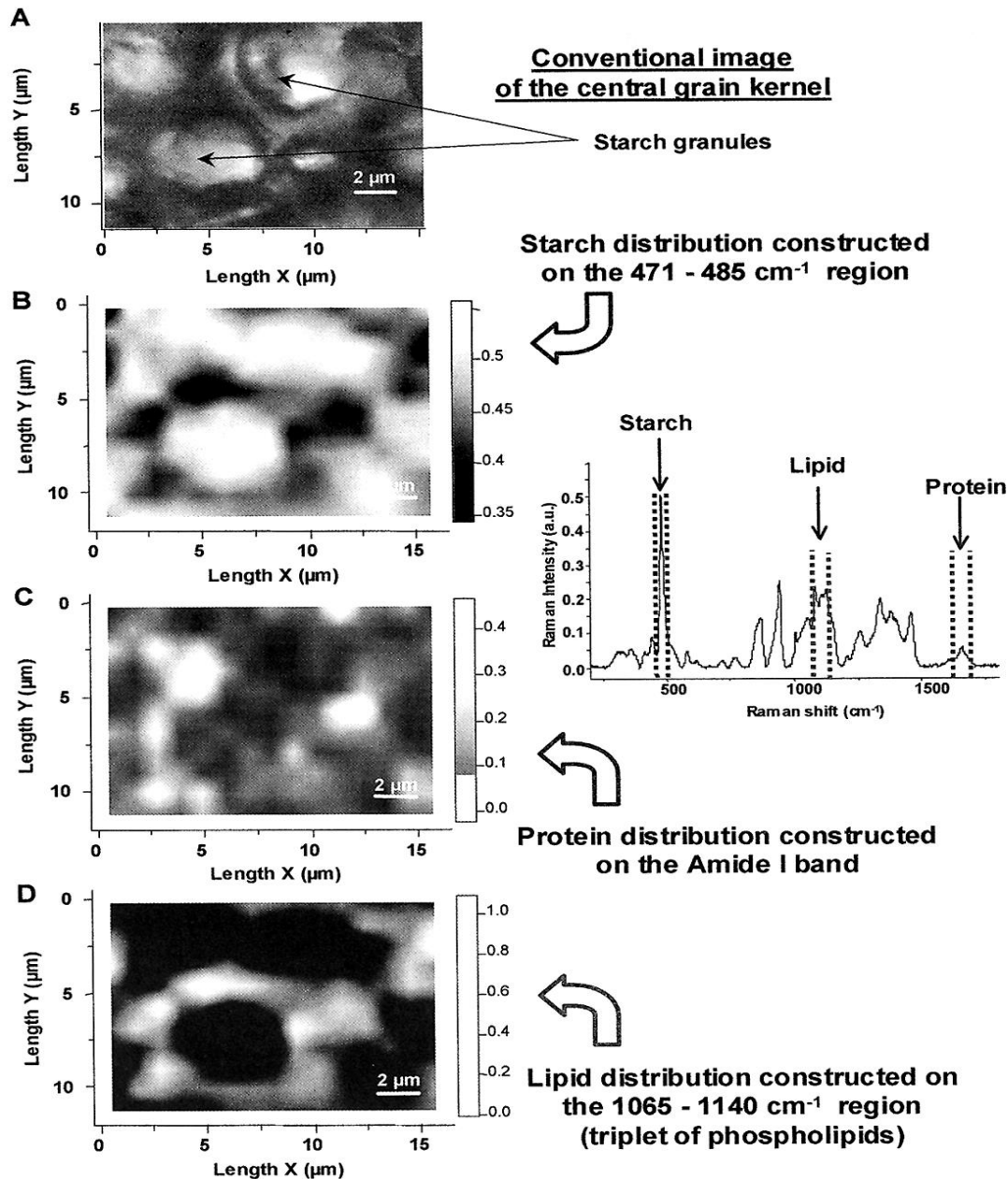


Fig. 9. Raman spectra showing H₂S in the 5¹²⁶² cage (The peak at 2570 cm⁻¹ is a vibrational mode from methane in the hydrate), (400 sec, 20 sec X 20)

Ramanova mikrosonda



Analýza obilných zrn



Spectral images were generated from a set of 15 x 11 spectra taken at 1 μm interval

Mapování povrchu papíru

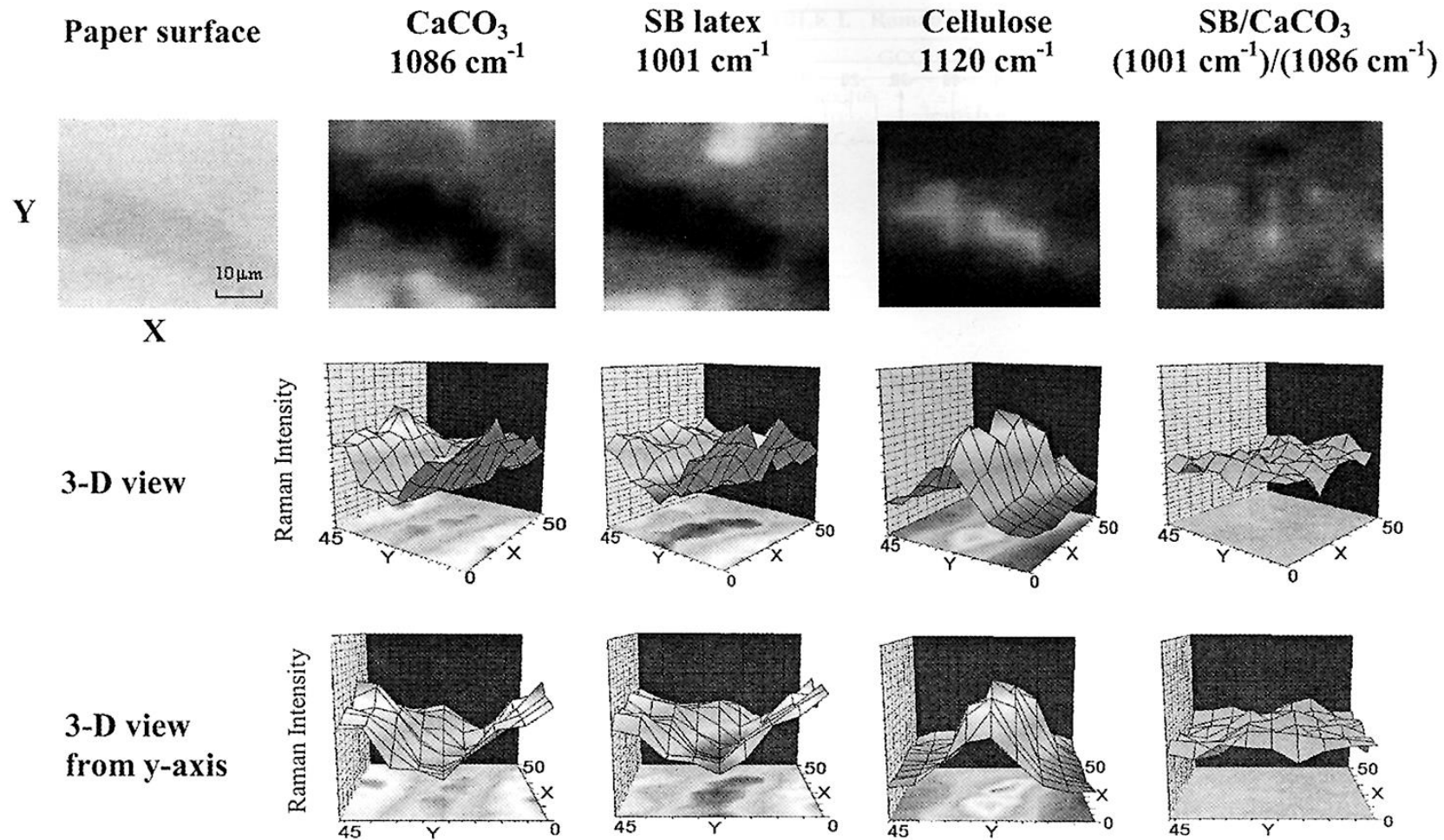
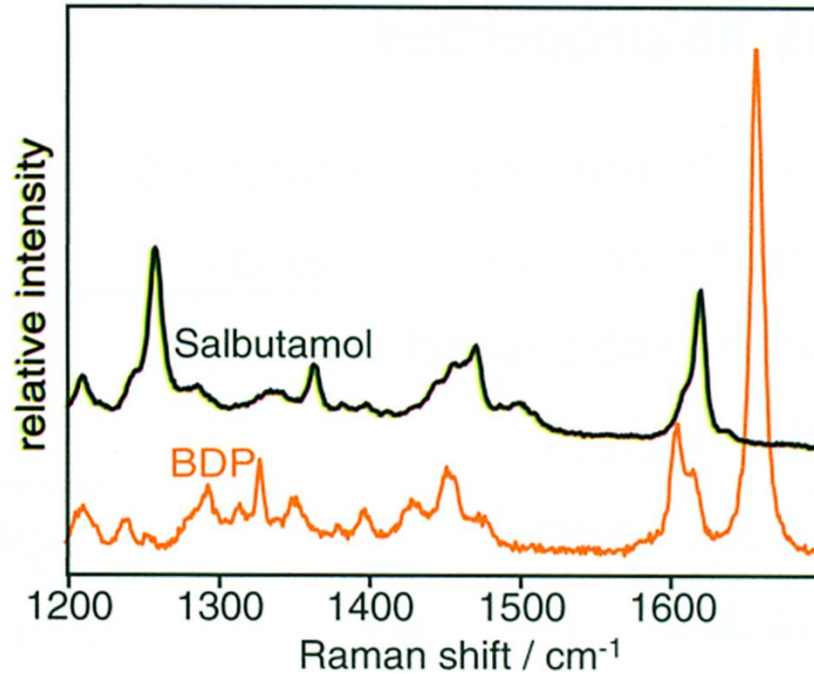
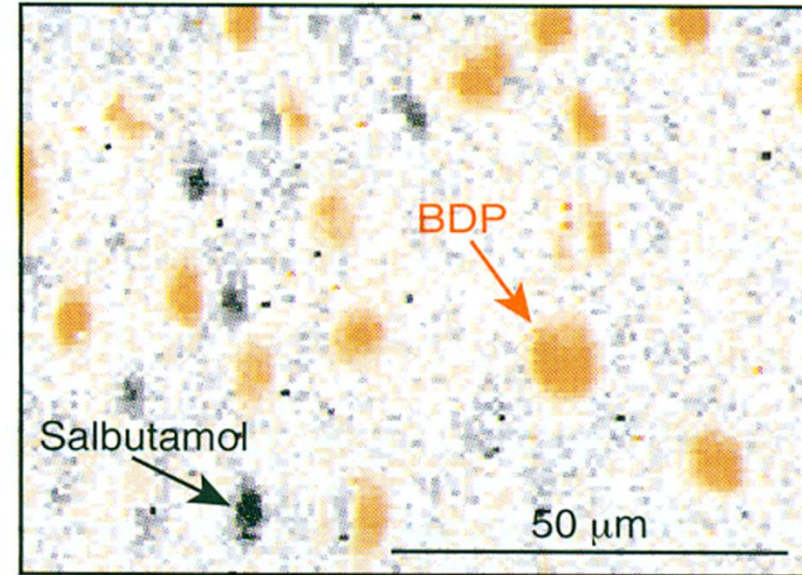


FIG. 6. Surface mapping of SB/CaCO₃ coated paper.

Prostorové rozložení aerosolu



Raman spectra of pure samples of BDP and salbutamol



Raman map of BDP and salbutamol distribution

Detekce infikovaných erytrocytů

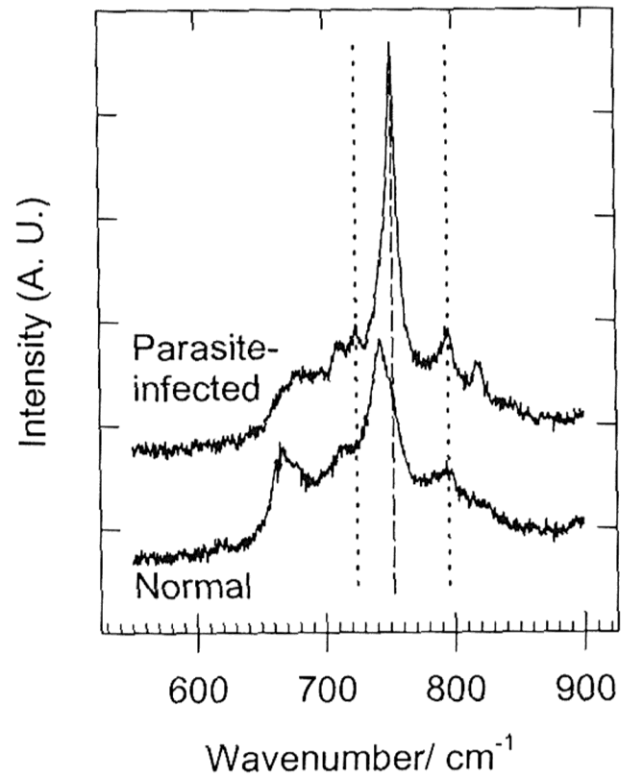


FIG. 6. Raman spectra comparing the differences between the normal and parasite-infected erythrocytes in the 550–900 cm^{-1} region with the 632.8-nm HeNe laser. The band due to the vibrational mode C_aNC_a occurs at 743 cm^{-1} for normal erythrocytes and 754 cm^{-1} for parasite-infected erythrocytes, as indicated by the dashed line. More differences can be identified by the weaker bands, at 724 and 795 cm^{-1} , indicated by the dotted lines.

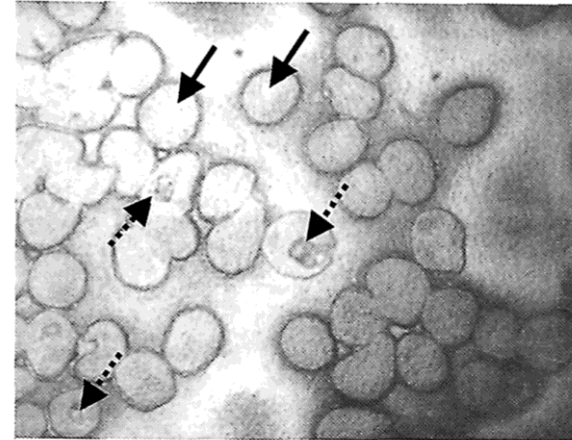


FIG. 2. Optical images of uninfected and *P. berghei*-infected erythrocytes. The uninfected mouse erythrocytes are indicated by solid arrows and the *P. berghei*-infected erythrocytes by dashed arrows. Mag: 1000 \times .

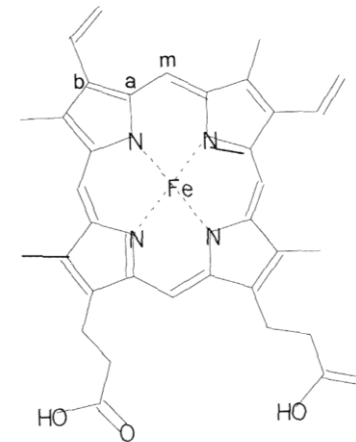


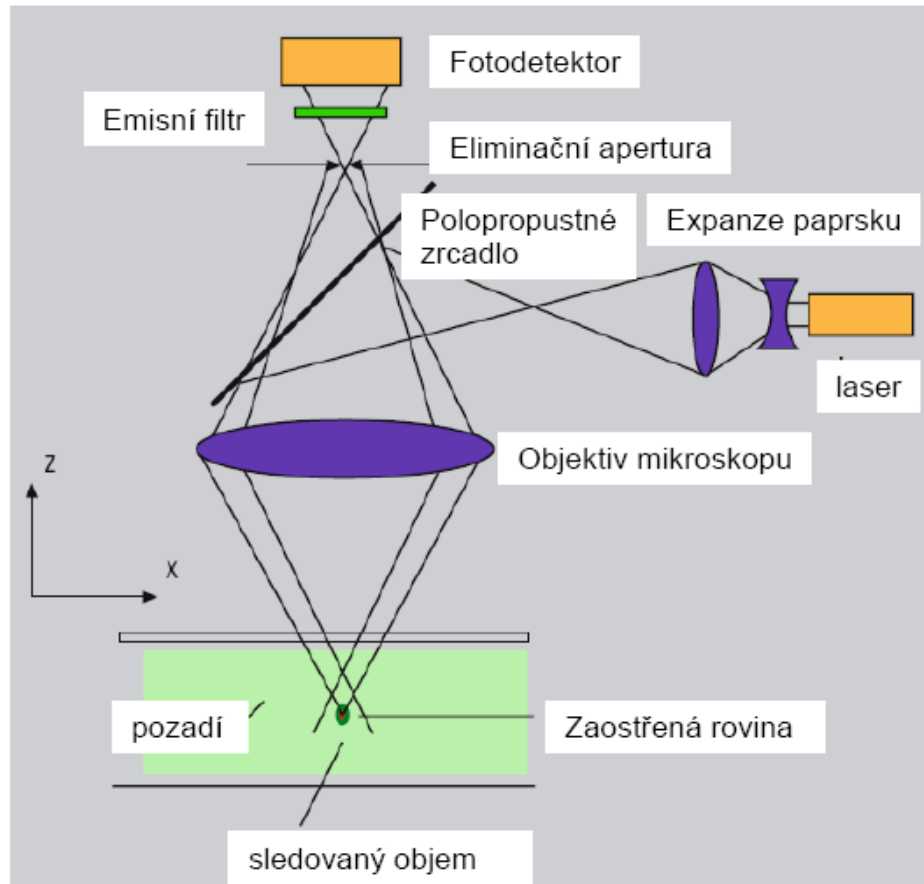
FIG. 4. Schematic representation of the iron protoporphyrin showing the atoms referred to in the band assignments.

FIG. 4. the atom

Konfokální mikroskop

Rozdělení:

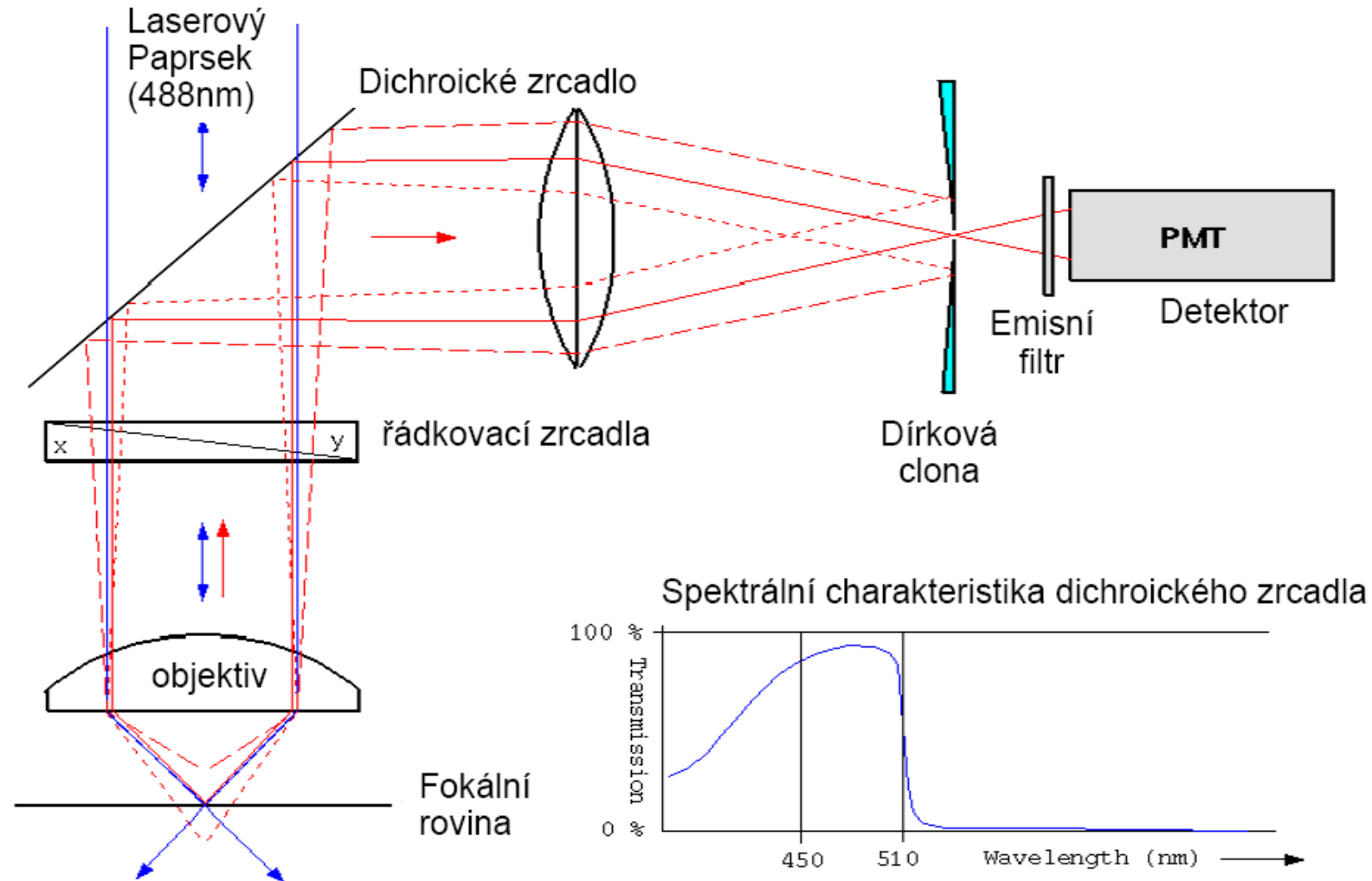
1. LSCM (Laserová skenovací konfokální mikroskopie)
2. TSM (Tandemová skenovací mikroskopie)



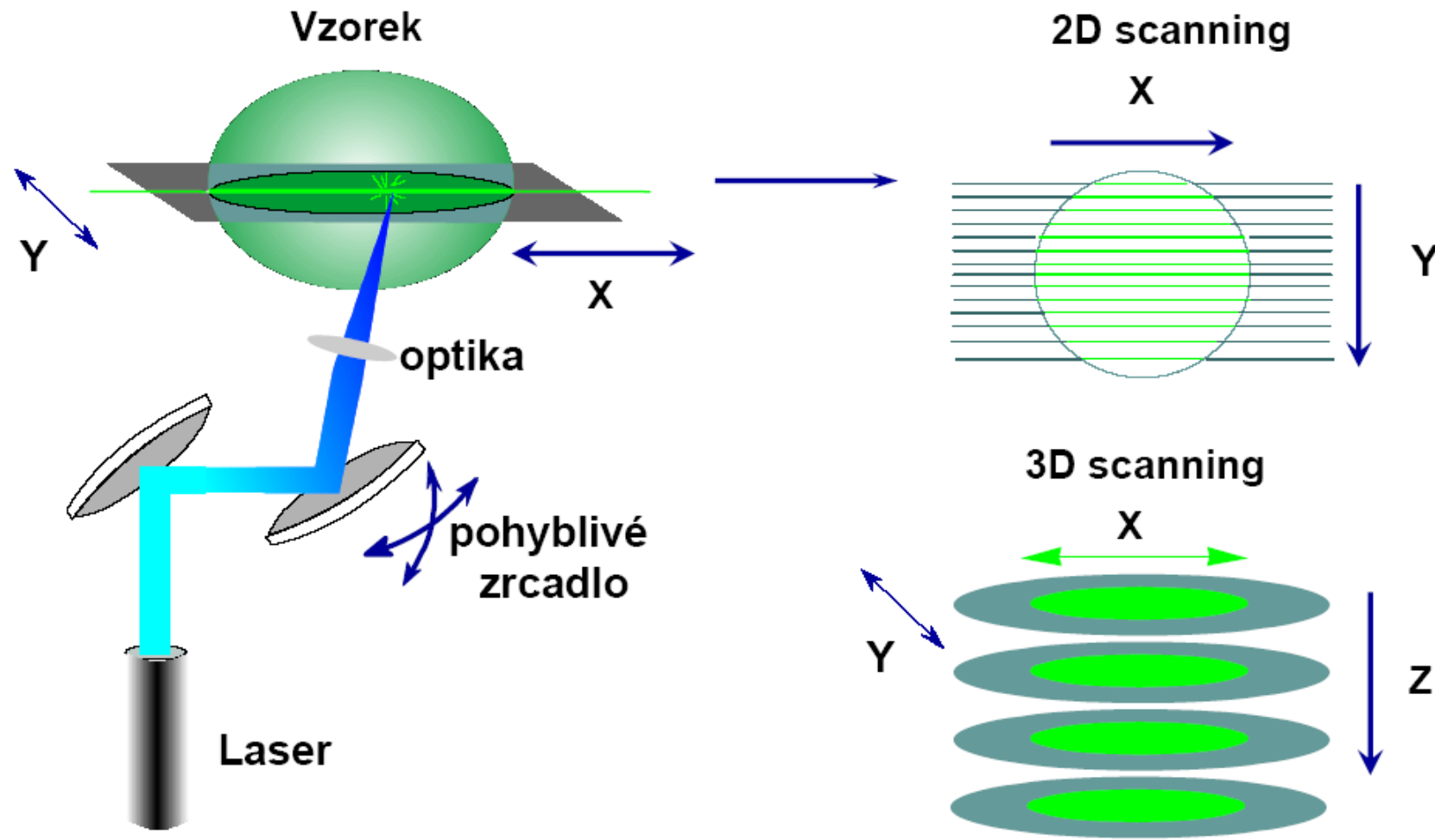
Odlišnosti konfokálního způsobu od klasického SM

- 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 = $0,4 \mu\text{m}$)

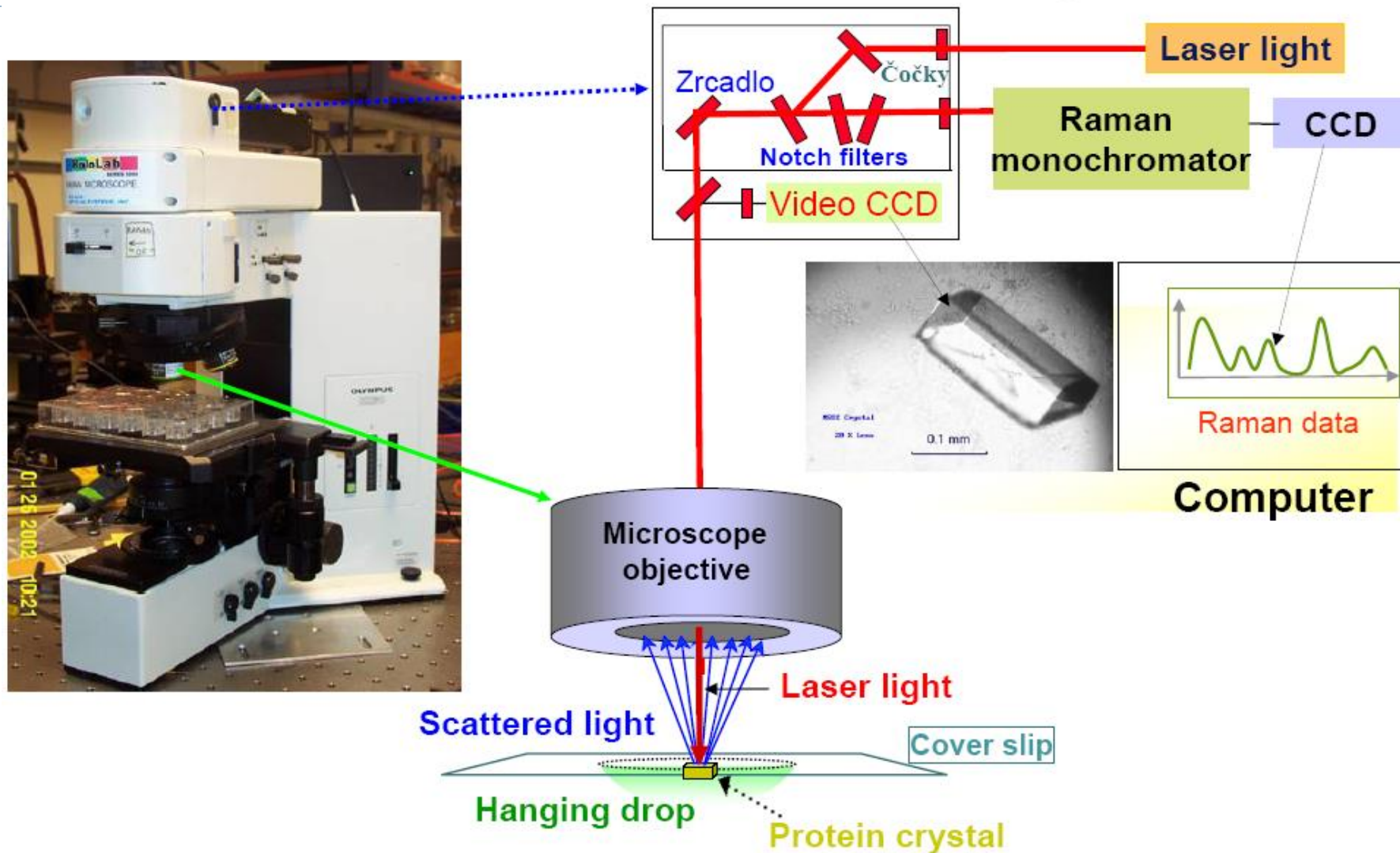
Laserový skenovací konfokální mikroskop



Řádkovací zrcadla



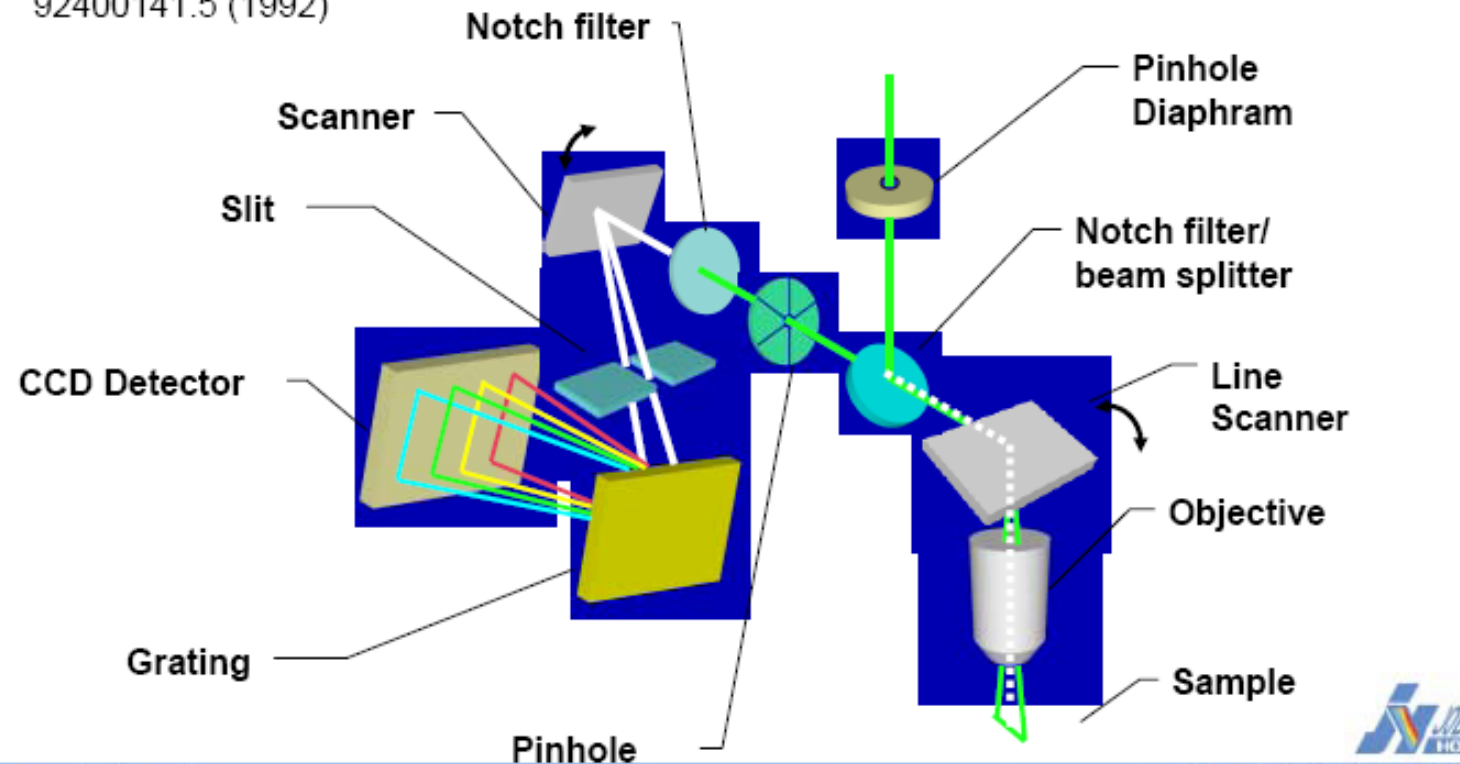
Konfokální Ramanův mikroskop



Ramanova mikrospektroskopie

Confocal Line Scanning

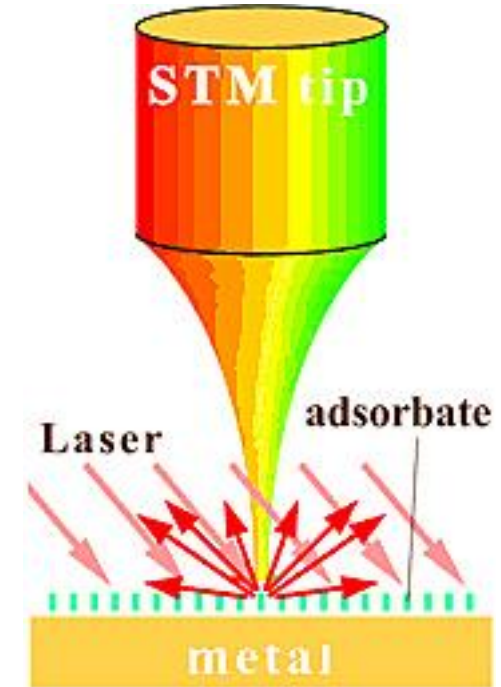
Patented unique method to scan laser through objective to avoid aberrations and maintain diffraction-limited spot. Then the spectrum of each spot on sample is displayed on a different row of the CCD, **assuming that the spectrograph is stigmatic.** European patent # 92400141.5 (1992)



Ramanova nanospektroskopie

▶ Techniky blízkého pole

- ▶ sonda v blízkosti povrchu („blízké pole“)
- ▶ Spektroskopie blízkého pole
 - ▶ (near-field spectroscopy)
- ▶ Mikroskopie blízkého pole
 - ▶ SNOM – scanning near-field optical microscopy
 - ▶ UV-vis, IR (IR-SNOM), Ramanova spektroskopie + TERS
 - ▶ fotoluminiscence, fluorescence
 - rozlišení lepší než 50 nm
 - spektroskopie jedné molekuly

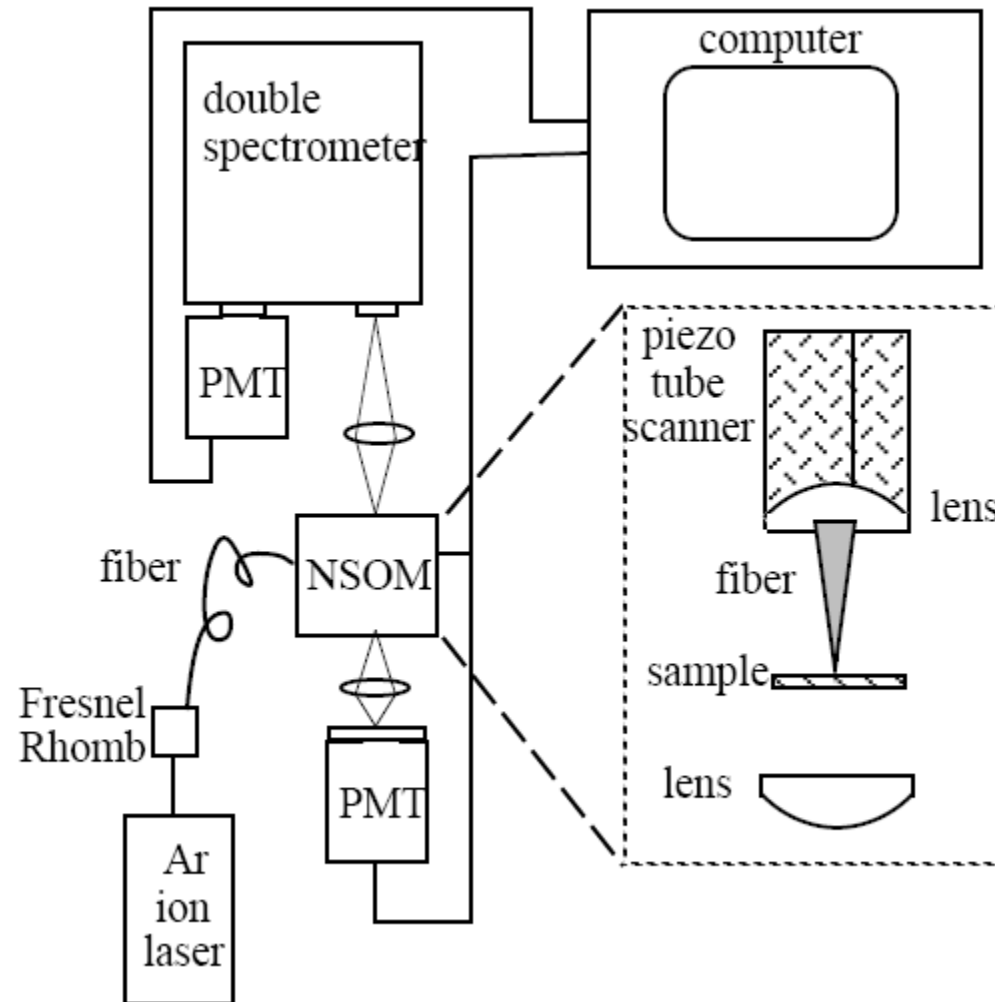


Aplikace SNOM

- ▶ **Single Molecule Detection** J.K. Trautman et al. Nature 369,40, (1994)
- ▶ **Raman Scattering** C.L. Jahncke et al. Appl. Phys. Lett. 67 (17), 2483 (1995)
- ▶ **Polarization and Orientation** B. McDaniel et al., Appl. Opt. 37, 84 (1998)
- ▶ **Magnetic-Imaging** U. Hartman, J. Magn. & Magn. Mater. (1996)
- ▶ **Data Storage** H.J. Mamin, IBM J. Res. Develop. (1995)
- ▶ **Biological Imaging.** VanHulst et al. J. Struct. Bio., 119,222 (1997)
- ▶ **Quantum Dots, Quantum Wires** H.F. Hess et al. Science 264, 1740 (1994)
- ▶ **Lithography** S. Madsen et al. J. App. Phys. 82 (1) 49 (1997).
- ▶ **Photonic Device Characterization** S.K. Buratto et al. App. Phys. Lett. 65, 2654 (1994)
- ▶ **Semiconductor/ Defect Characterization** LaRosa et al. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 406, 189-194 (1996)

Raman - NSOM

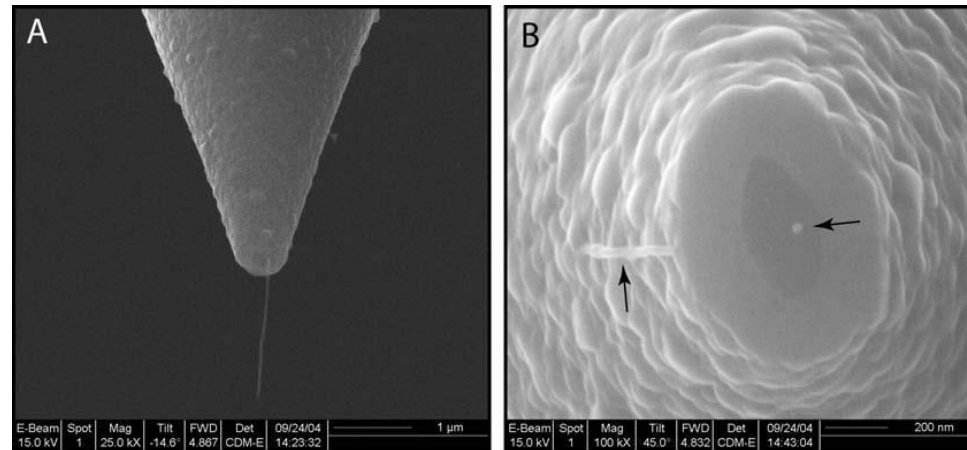
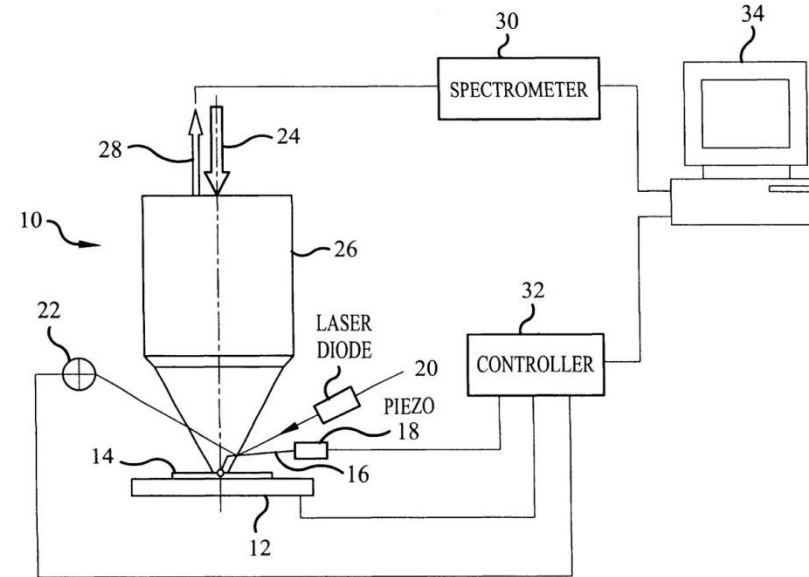
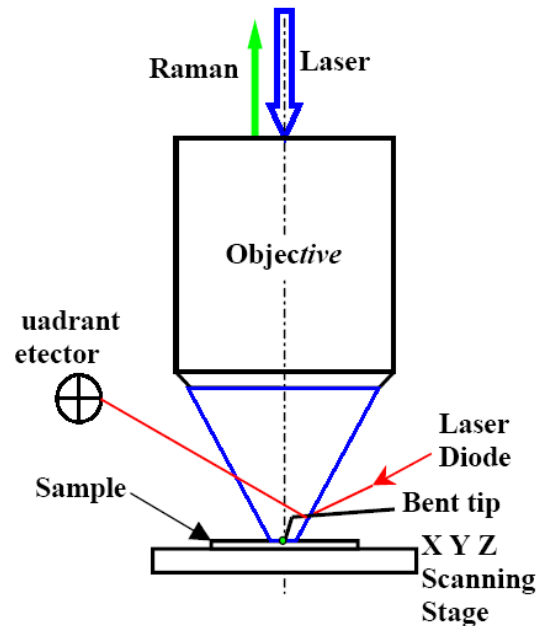
- ▶ vzdálenost sondy – do 10 nm
- ▶ • apertura sondy
- ▶ • režimy snímání
 - ▶ transmisní (jen transparentní vzorky)
 - ▶ reflexní – ostrá sonda – vysílač, přijímač, obojí
 - ▶ rozptyl – vysílač, přijímač, obojí



Raman-NSOM

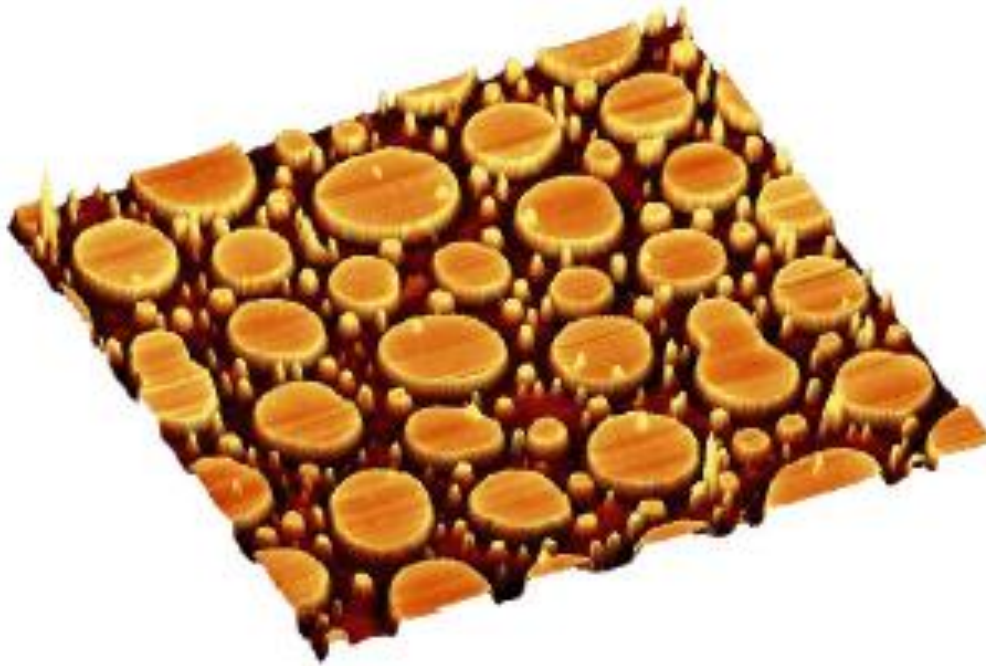
vzdálenost sondy –do 10 nm

- apertura sondy
- režimy snímání
kolmá či šikmá laserová excitace

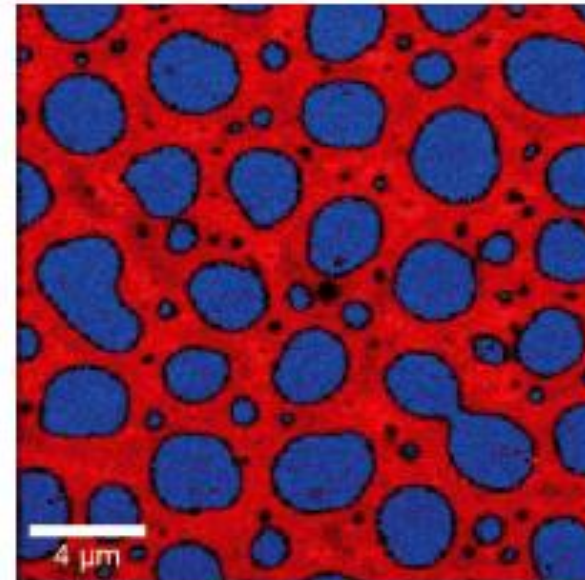


Separace fází

**AFM zobrazení směsi polymerů
PMMA-SBR, odstředivě
nanesené na skleněnou podložku.
Sken 20x20 μm , topografické
měřítko 30 nm**



**Ramanovské zobrazení směsi
polymerů PMMA-SBR.
Plochy PMMA jsou barevně kódovány
modře, plochy SBR jsou zobrazeny
červeně. zobrazení: 200x200 spekter**

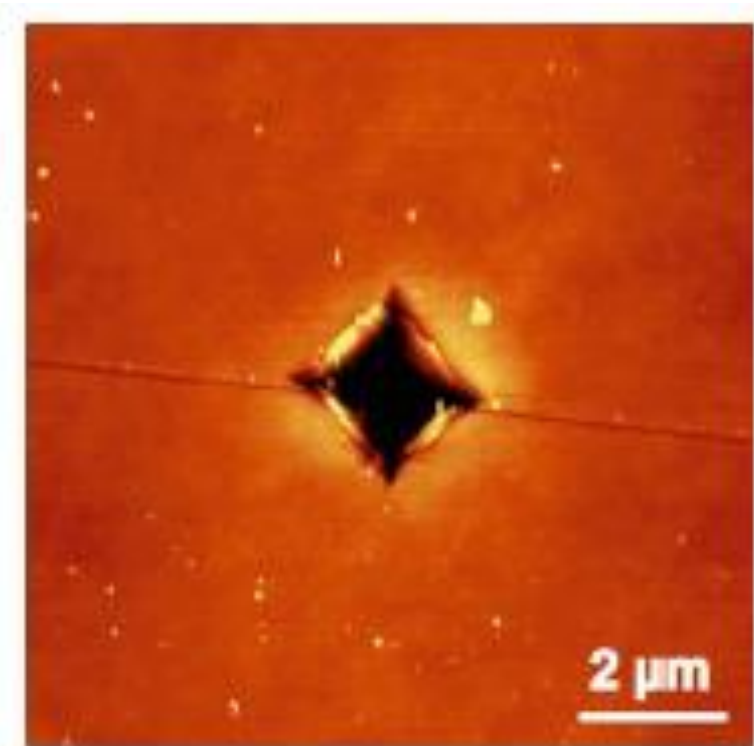


Měření napětí v materiálu

AFM měření vtisku ze zkoušky tvrdosti Si dle Vickerse.

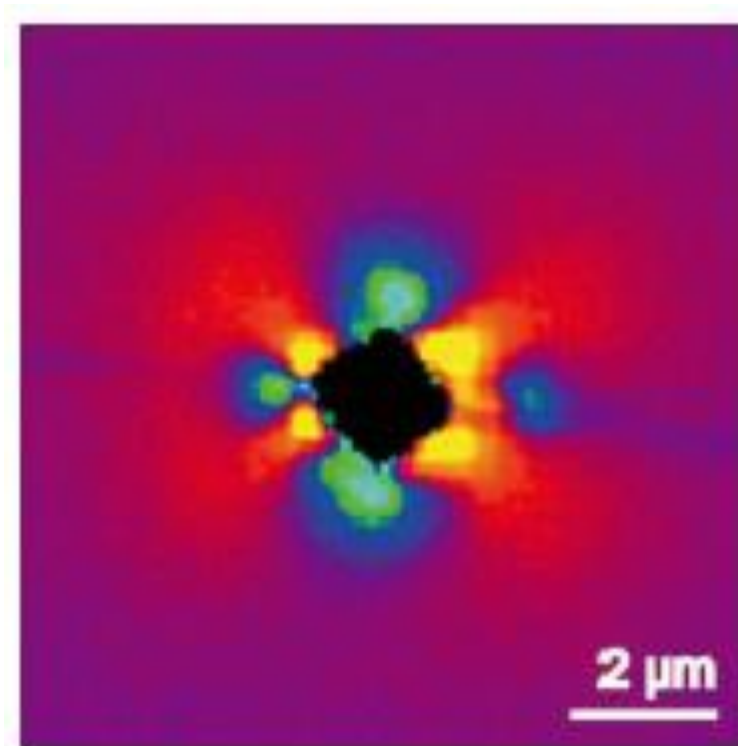
Vtisk o úhlopříčce $2,75\ \mu\text{m}$ a hloubce $210\ \text{nm}$ byl vytvořen silou

$50\ \text{mN}$. Velikost skenované plochy: $10 \times 10\ \mu\text{m}$.

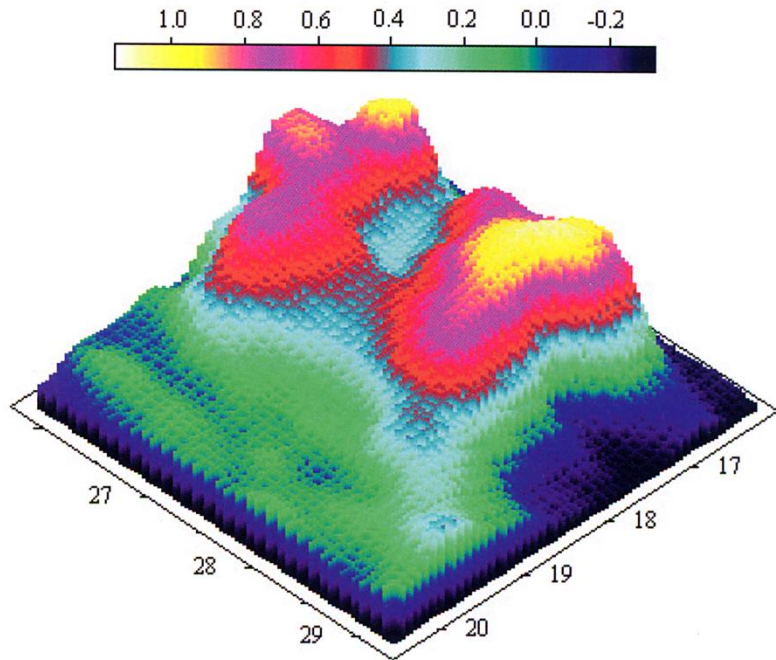


Ramanovské zobrazení stejné oblasti jako na vedlejším obr.

Zobrazení bylo vypočteno z polohy píku parabolické aproximace



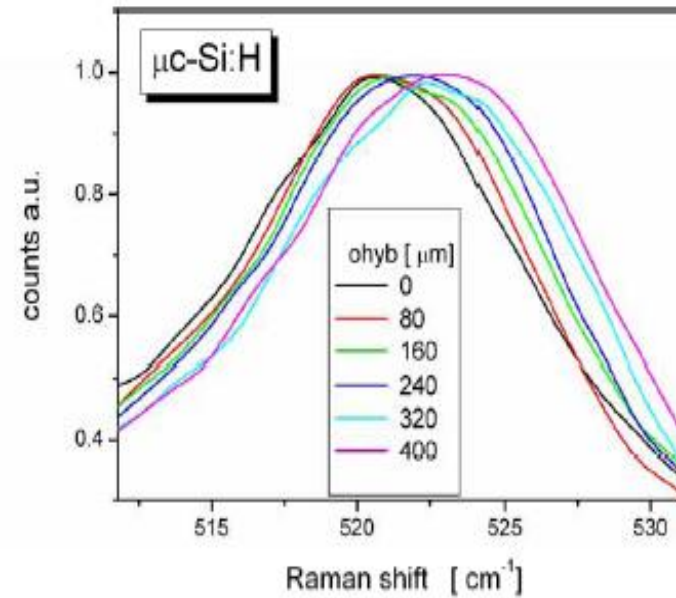
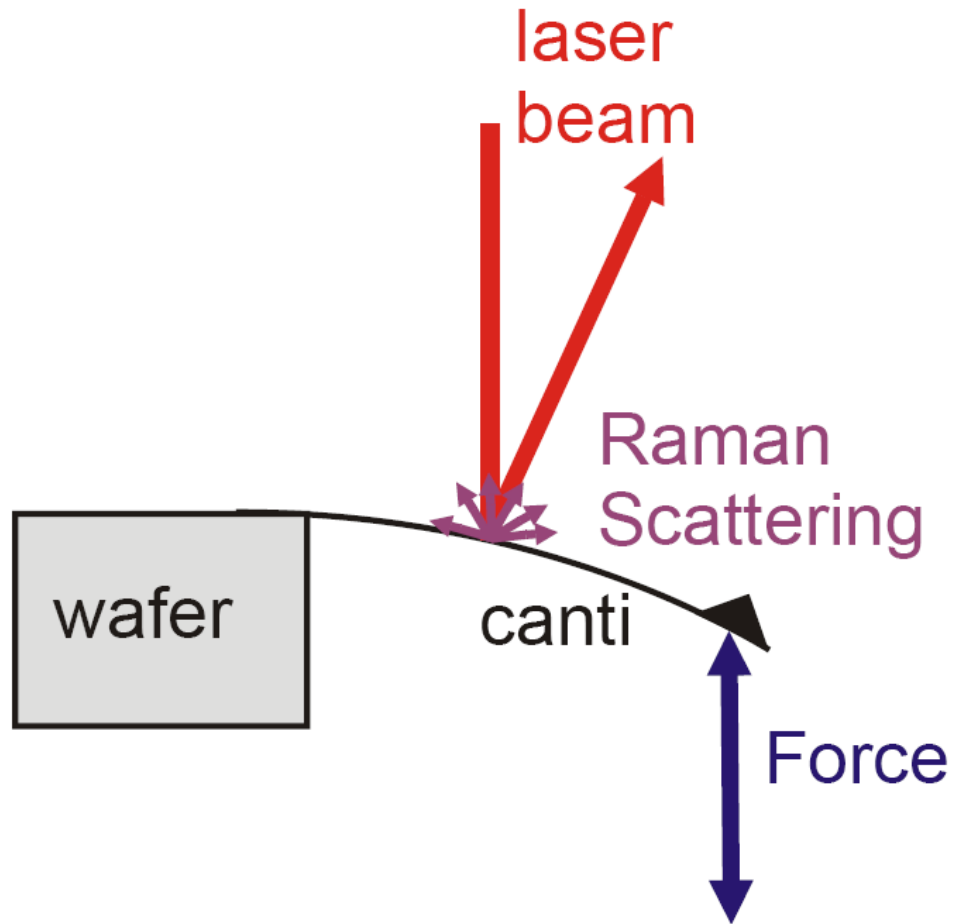
Měření napětí v materiálu _ fonony



High resolution analysis can provide very detailed information on intrinsic stress and strain in a sample. Raman map of a sub-micron structure ($0,6 \times 0,6 \mu\text{m}^2$) showing the Si-phonon shift used for stress analysis.

- ▶ **Fonon** – kvazičástice vibrací krystalové mříže, vibrační kvantum šířící se krystalovou mříží. Pomocí fononů lze popisovat šíření zvukových vln v pevných látkách. Samotný název fonon vznikl jako analogie k fotonu. Foton je částicí elektromagnetického pole, fonon je kvazičásticí netlumeného zvukového pole v pevné látce. Řadí se mezi bosony.

Mechanické napětí v nanostrukturách

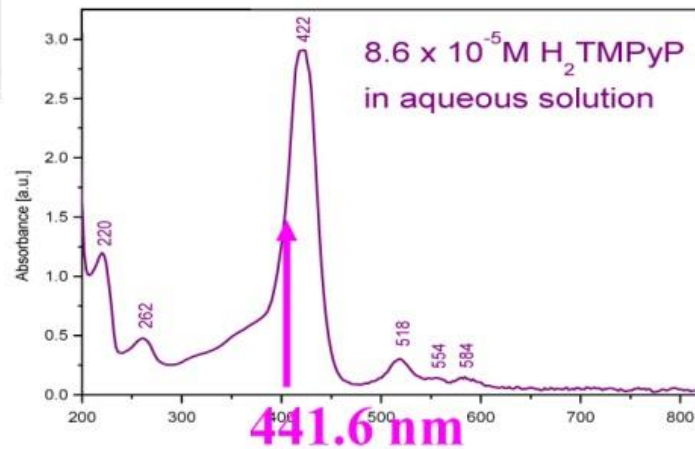
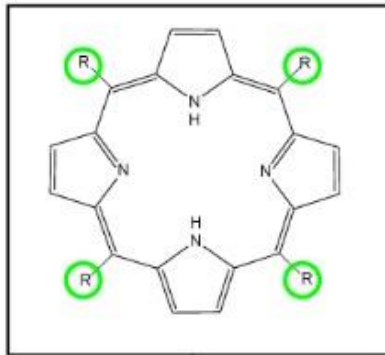


Speciální techniky

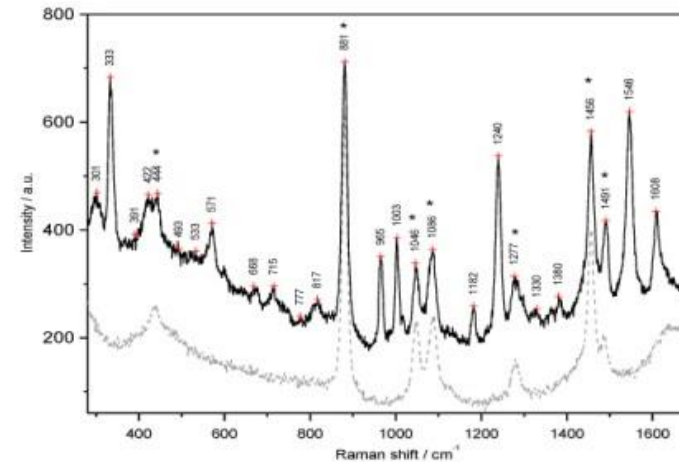
- ▶ rezonanční - RR
- ▶ povrchem zesílený - SERS
- ▶ rezonanční povrchem zesílený - SERRS
- ▶ fotoakustický – PARS (nelineární, pulzní)
- ▶ hyperRaman (two photon pumping)
- ▶ koherentní anti-Stokes - CARS
- ▶ koherentní Stokes - CSRS

RRS (Resonance Raman Scattering)

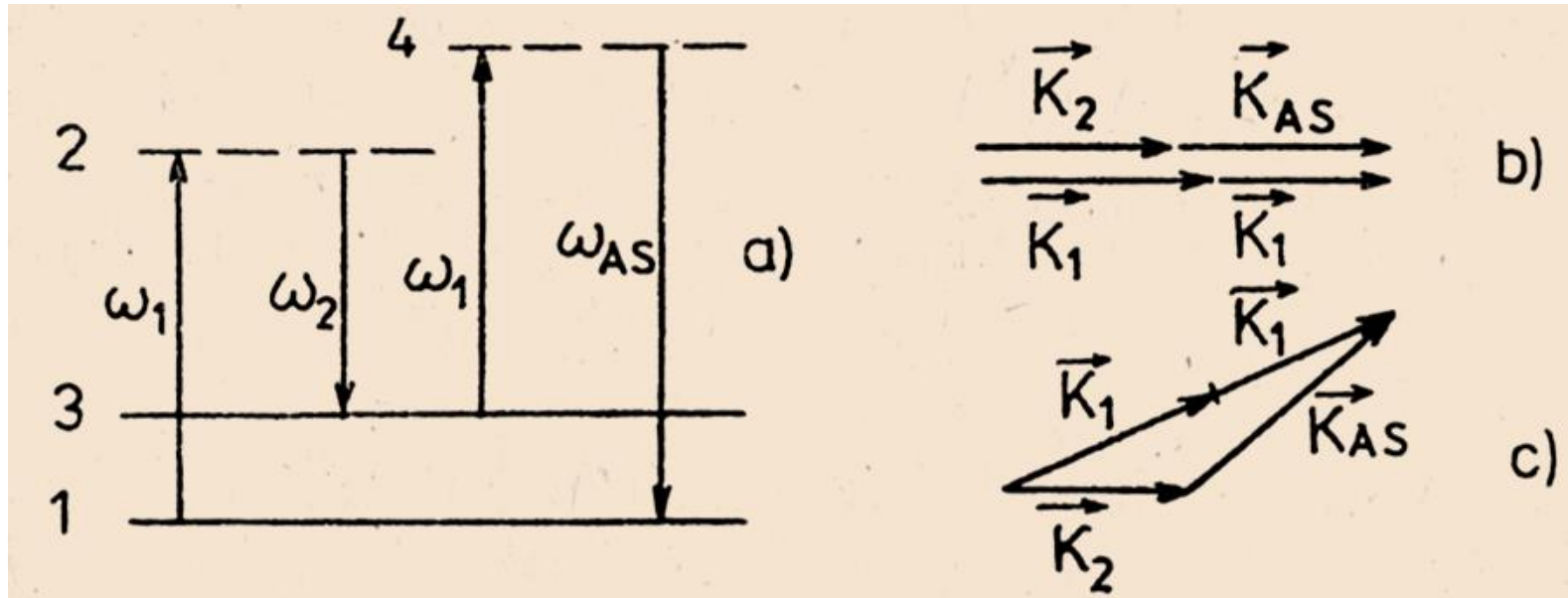
- ▶ Excitace do absorpčního pásu molekuly, ale hrozí fotodegradace a rušení výsledného Ramanova signálu fluorescencí



RRS
 10^{-6} M porphyrin



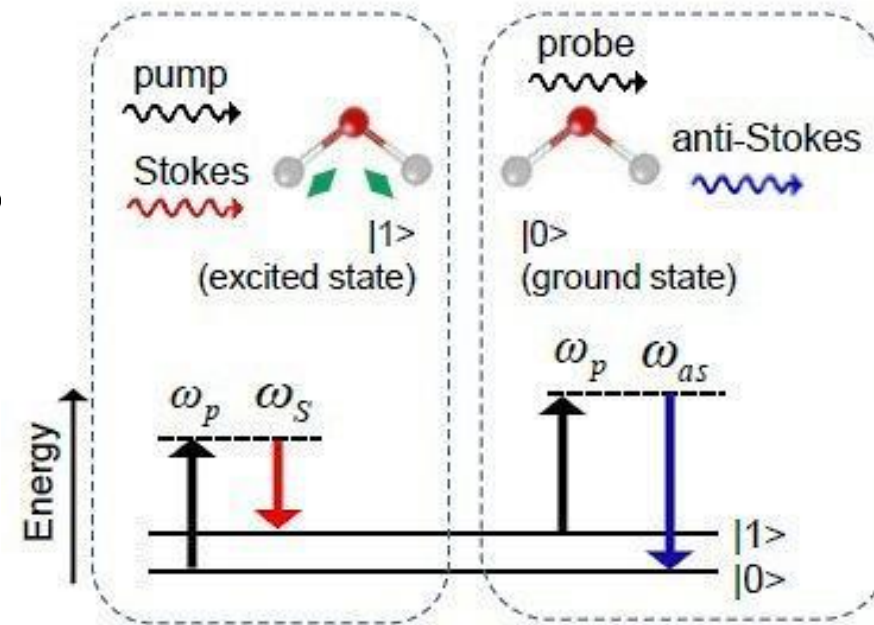
Metody nelineární - CARS



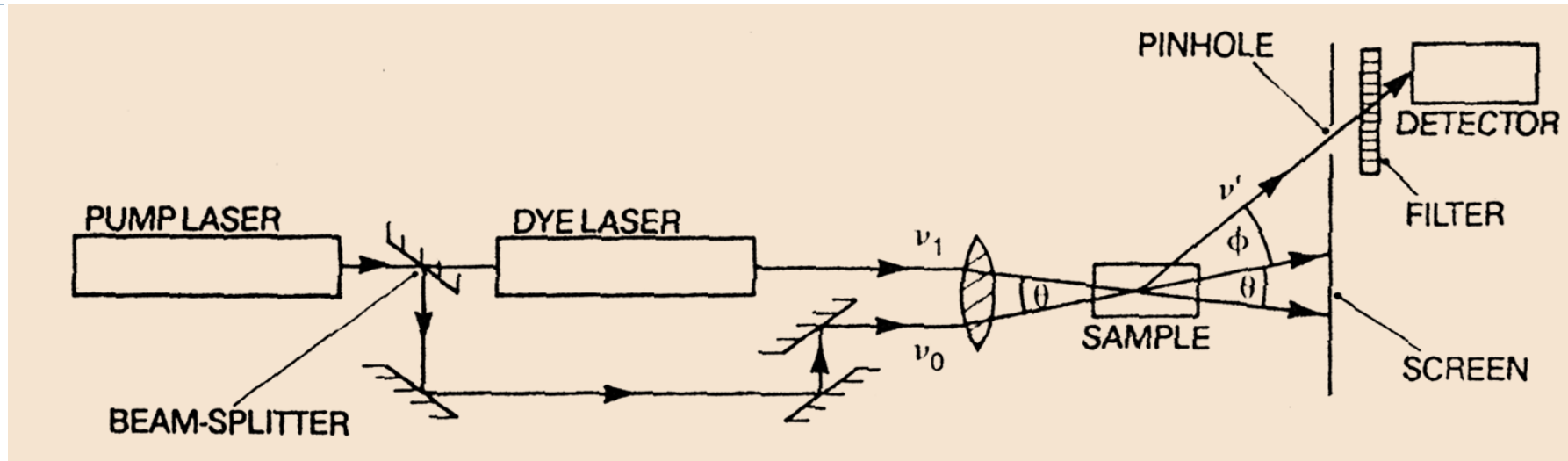
U metody CARS („čtyřfrekvenční směšování“), na rozdíl od ASRS, je relaxace z první virtuální hladiny 2 vynucená zářením druhého laseru s frekvencí ω_2 , které způsobí zvýšení populace hladiny 3 a antistokesův přechod má charakter stimulované emise koherentního a směrovaného záření. Emise záření ω_{AS} vychází v podobě úzkého kužele. U disperzních vzorků (kapalin) se vlnové vektory sčítají vektorově (c), takže k oddělení detekovaného záření není potřeba žádný disperzní prvek, na rozdíl od plynů (b).

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering

- ▶ CARS can stimulate the production of a significantly larger amount of signal than spontaneous Raman microscopy. Like spontaneous Raman, CARS probes vibrational modes in molecules and does not require the introduction of exogenous dyes or markers, which is advantageous in imaging small molecules, such as metabolites, for which labeling may significantly affect their molecular properties.
- ▶ CARS is a process that involves four photons that interact with the third order nonlinear susceptibility of the sample, which is a function of the vibrational frequencies. To understand a CARS event, consider two photons: a pump, of energy $\hbar\omega_p$, and a Stokes, of lower energy $\hbar\omega_s$. Consider also a molecule with a single resonance, represented by a third order susceptibility. A CARS event can be understood in two steps. Upon the illumination of the molecule with the pump and Stokes photons, the first step is initiated if the condition is met; that is, if the difference in energy between the pump and Stokes photons matches the energy of the excited vibrational state of the molecule, so that the molecule is excited. Once this happens, the second step is the result of the interaction of this excited state with a third photon, known as the probe, of energy $\hbar\omega_p$. This photon gains the energy of excitation of the molecule, and an anti-Stokes photon is emitted with an energy that has a higher frequency than any of the incident photons.

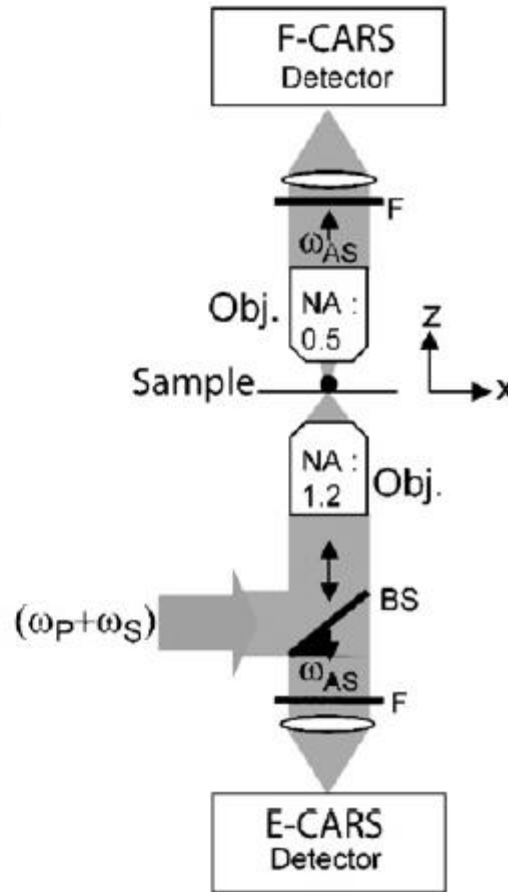
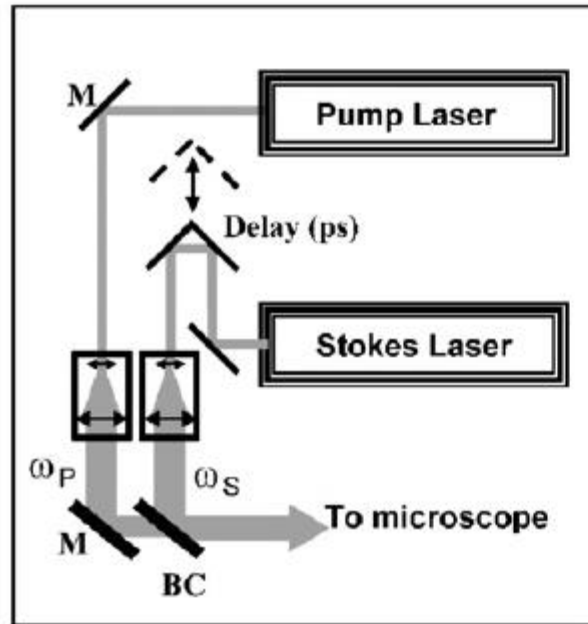


CARS instrumentace



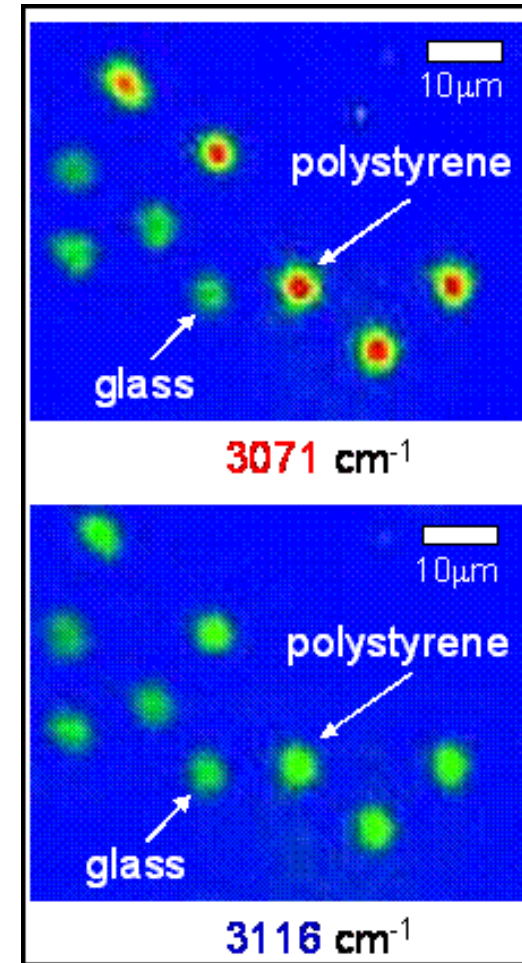
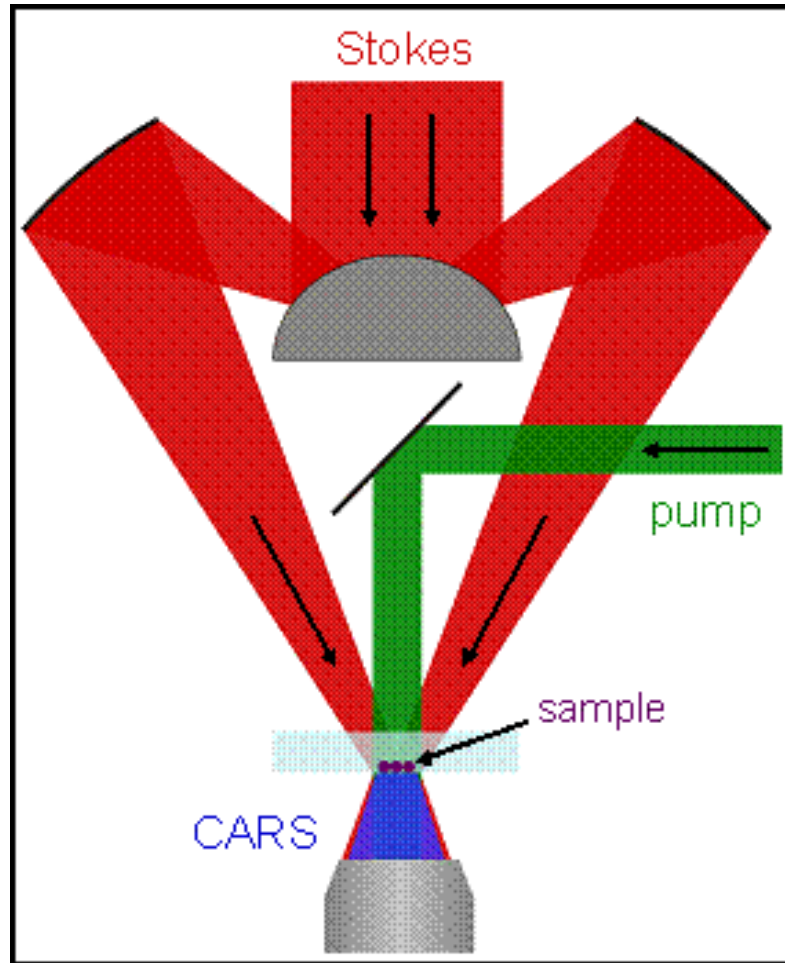
CARS vyžaduje především výkonové laditelné lasery, které jsou technicky i ekonomicky náročné. Na rozdíl od klasické Ramanovy spektrometrie jsou zářivé toky v CARS velmi intenzivní, takže nároky na detekci signálu jsou minimální. Např. při sledování vibračního přechodu benzenu u 992 cm^{-1} (totálně symetrická vibrace vibrace benzenového kruhu), buzení do virtuálních hladin na 513 nm , $P=100\text{ kW}/6\mu\text{s}$, stimulace na 540 nm , $P=30\text{ kW}/6\mu\text{s}$, výkon koherentního záření z interakčního prostoru 300 W ! Účinnost může dosáhnout až 10% , u spontánního Ramanova rozptylu je to 10^{-5} až $10^{-8}\%$.

Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy (CARS):

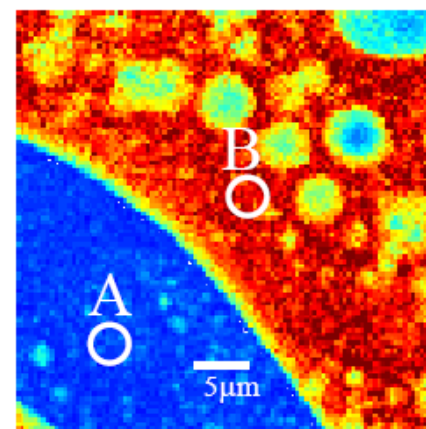
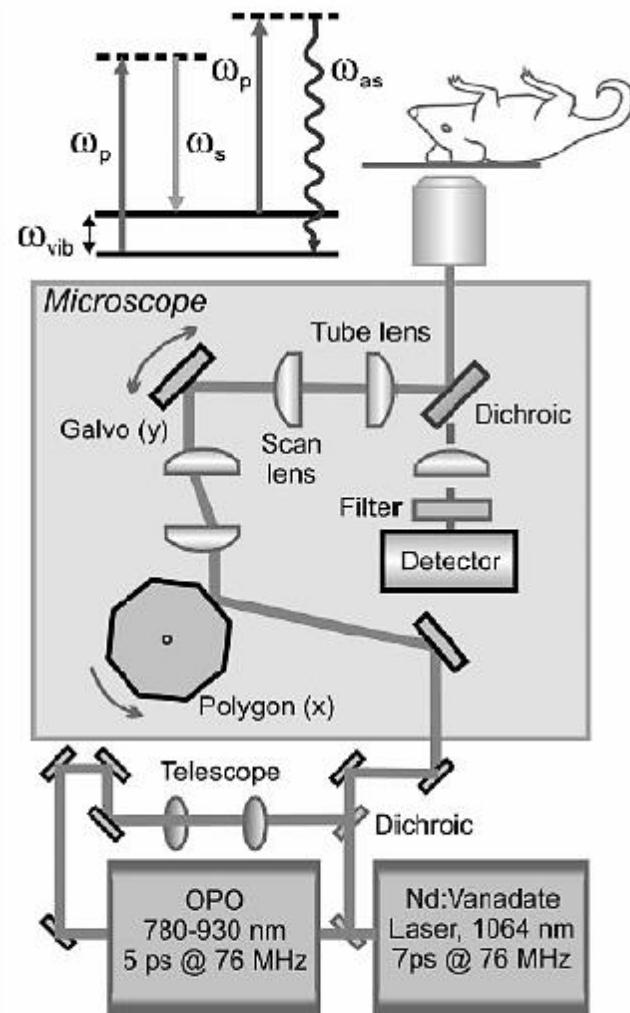


- ▶ F-CARS and E-CARS microscopy with co-propagating incident beams, forward and backward signal collection, respectively
- ▶ Obj., objective lens; F., filter; BC., beam combiner; L., lens; M., mirror

CARS microscopy



Broadband Coherent anti-Stokes Raman Microscope for Materials Research – CARS

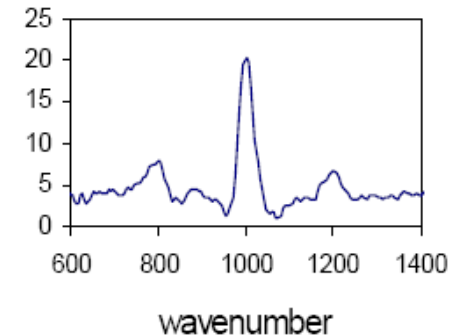
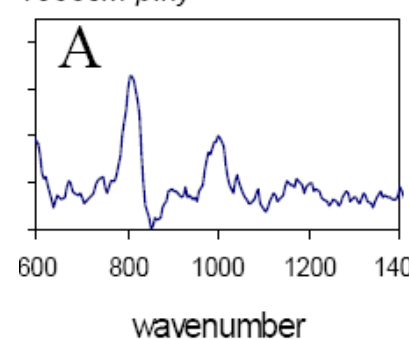


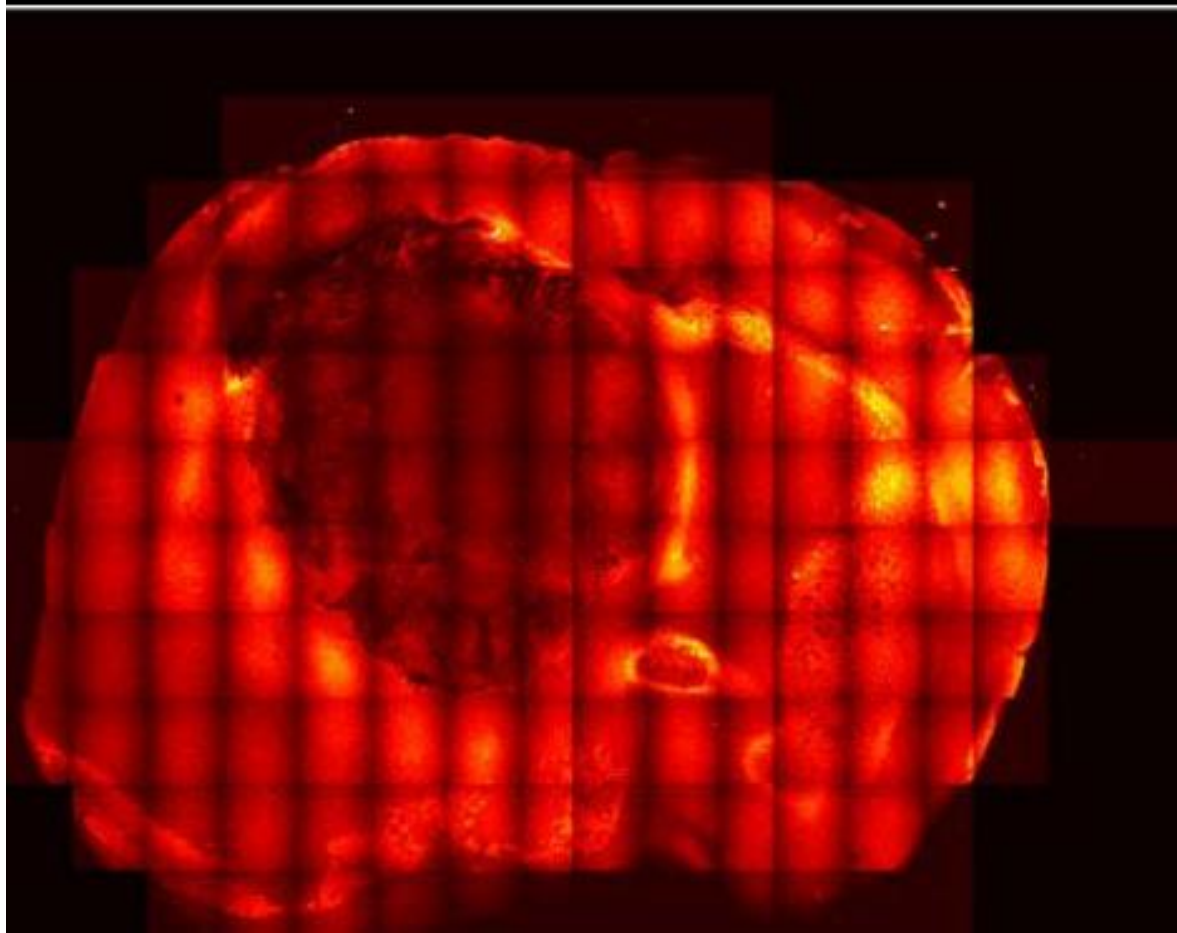
More PS



More PMMA

Obr. 1 ukazuje distribuci jednotlivých složek ve směsi polystyren (PS) – polymethylmetakrylát (PMMA). Obraz je vytvořen na základě relativního poměru mezi 800 a 1000cm píky





epi-CARS microscopy

We used epi-CARS microscopy to image *ex vivo* mouse brain tissues. Epi-CARS microscopy suppresses the nonresonant background from the aqueous medium.

Mosaic picture of an epi-CARS mouse brain image. The brain tumor is on the left side and extends across the center line and distorts the symmetry of the brain. The magnification was 20x. Image is displayed in pseudo-color.

Plasmonová rezonance (SPR)

Plasmonika

**Povrchově zesílená Ramanova
spektroskopie**
Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SERS

Hrotem zesílená Ramanova spektroskopie
Tip Enhanced Raman Spectroscopy/Microscopy
TERS

Použití SPR

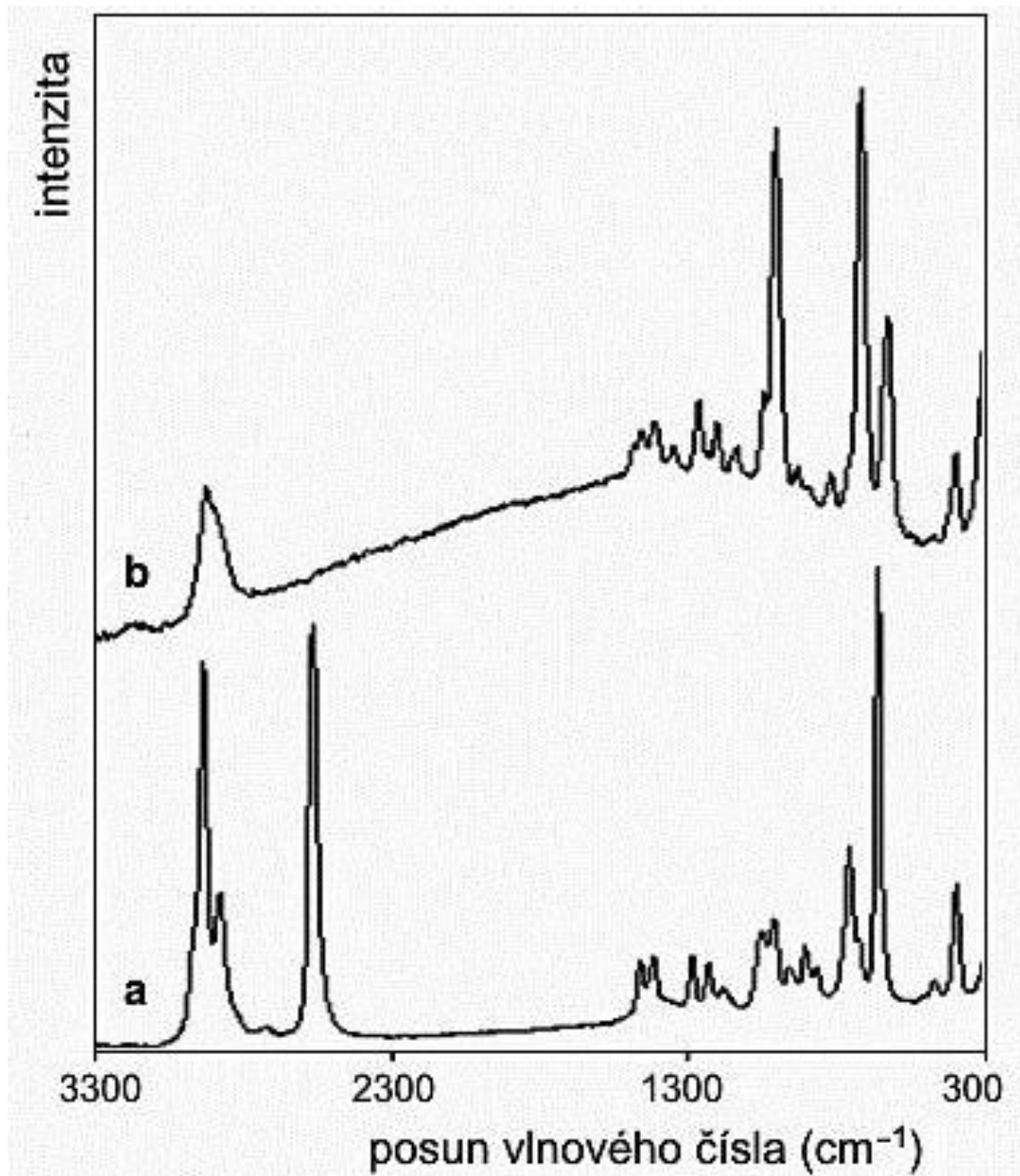
- ▶ **zvětšení citlivosti spektroskopických technik** vč. fluorescence, **Ramanovy spektroskopie ... (povrchové zesílení Ramanovy spektroskopie $\sim 10^{14} - 10^{15} \times$ umožňuje identifikaci jediné molekuly)**
- ▶ změna refrakčního indexu adsorpcí molekul na mezifázi kovu a dielektrika
- ▶ posun resonance v důsledku adsorpce molekul na mezifázi
- ▶ nanočástice vzácných kovů projevují silné UV-Vis absorpční pásy (nejsou přítomny u „makro“)
- ▶ měření tloušťky adsorbovaných vrstev, vazebné konstanty ligandů...

Základní pojmy

- ▶ **SERS** – povrchem zesílený Ramanův rozptyl (Surface Enhanced Raman Scattering). Při Ramanově rozptylu na molekulách navázaných na povrch drahého kovu (zlata, stříbra) může dojít k zesílení jak rozptýleného tak dopadajícího záření díky rezonanční interakci fotonů s kvanty kmitů elektronového plynu v poli iontů krystalové mříže vázaných na povrch.
- ▶ **Plazmon** – kvazičástice (kvantum) podélných oscilací elektronového plynu v pevných látkách (v krystalové mříži kovů, v nekověch, v plastech). Například v kovech je možné vybudit oscilace plazmatu jako kolektivní excitace plynu vodivostních elektronů na pozadí kationtů krystalové mříže. Odražené či prošlé elektrony nebo fotony interagující s plazmony vykazují ztráty energie rovné celistvým násobkům energie plazmonu. Vytváření plazmonů (ve většině materiálů o energii $10 \div 20$ eV) vede k energetickým ztrátám, které se projeví ve formě tzv. Ferrelova záření (objeveno v roce 1960) v UV nebo vizuálním oboru.
- ▶ **Povrchové plazmony** – plazmony vyskytující se na rozhraní vakua či materiálu s kladnou relativní permitivitou a prostředí se zápornou relativní permitivitou (obvykle kovy či dotované polovodiče). Silně interagují s fotony a vytvářejí tak další kvazičástici – polariton.

SERS

- ▶ Surface Enhanced Raman Scattering – metoda přinesla velké zlepšení RS tím, že na zkoumaný povrch jsou naneseny vhodné molekuly nebo nanočástice kovů (např. Ag).
- ▶ Zesílení Ramanových signálů je řádu $10^4 - 10^6$, v některých systémech může být i větší.
- ▶ Zlepšení citlivosti metody souvisí s tím, že u molekul v blízkosti Ag nebo Au nanočástic se projevuje povrchová plasmonová rezonance. Toto vysvětlení není však jediné.
- ▶ *Povrchový plasmon je kvazičástice. Je to kolektivní excitace volných elektronů na mezifázi vodiče a izolátoru.*

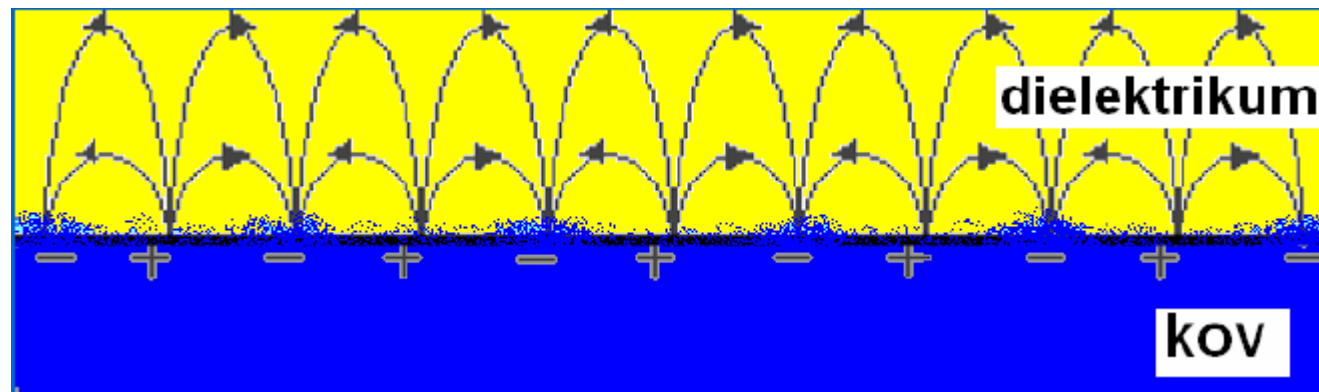


Povrchem zesílený Ramanův rozptyl, SERS

Rozdíl mezi SERS spektrem 2-merkaptoethanolové monomolekulární vrstvy na povrchu zdrsňelého stříbra (a) a spektrem tekutého 2-merkaptoethanolu (b). V důsledku přitažlivých sil povrchu, které modifikují strukturu elektronového obalu, se obě spektra liší. (Pro názornost jsou spektra vzájemně posunuta a zobrazena v různých měřítcích.) Zdroj: Wikipedie.

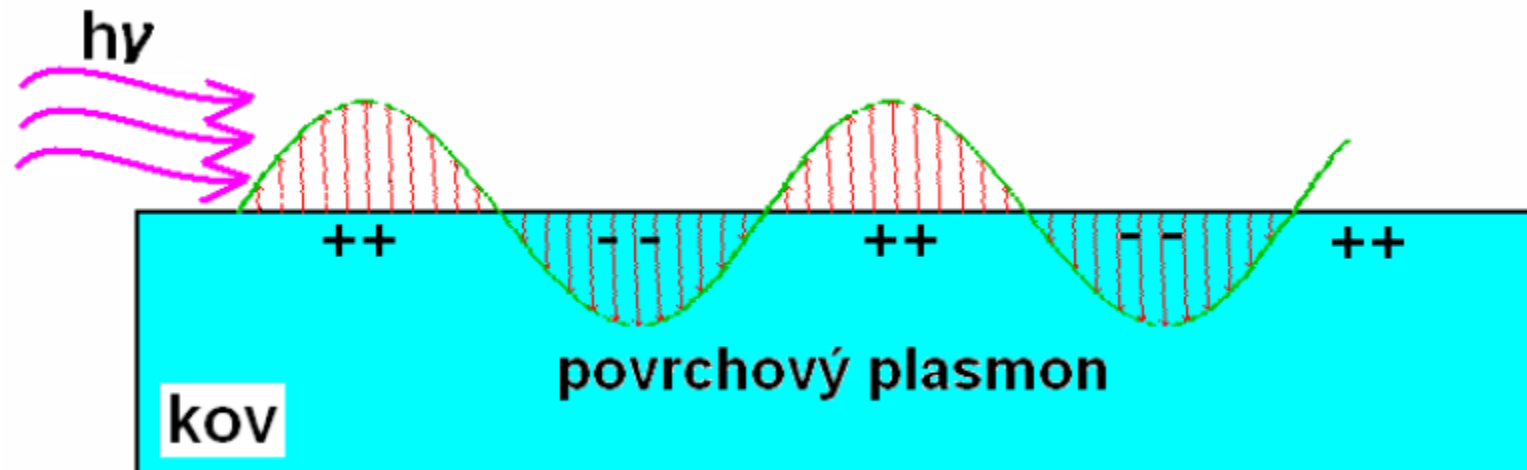
Povrchové plazmony

- ▶ *Povrchový Plasmon - polariton* = koherentní „kolektivní“ oscilace elektronů ve vodivostním pásu
- ▶ Jeho elektromagnetické stavy jsou vázané k rozhraní kov/dielektrikum
- ▶ tvořen nábojem v kovu (e^-) a elmg. polem v obou fázích
 - ▶- projevy: **spojené oscilace e-hustot a elmg. pole**
 - ▶ (= „hladiny“ oscilací elektronových hustot)
 - ▶- Intenzita pole exponenciálně klesá se vzdáleností od povrchu kovové fáze
 - ▶ (= > lokalizace v mezifázi) **šíří se jako podélné vlny na mezifázi**
- ▶ *Vlastnosti plasmonu závisí na*
 - ▶- **složení mezifázi** (ϵ, R_a)
 - ▶- **refraktivním indexu dielektrika** (světlovod, detekce chem. vazeb, nanostruktur)



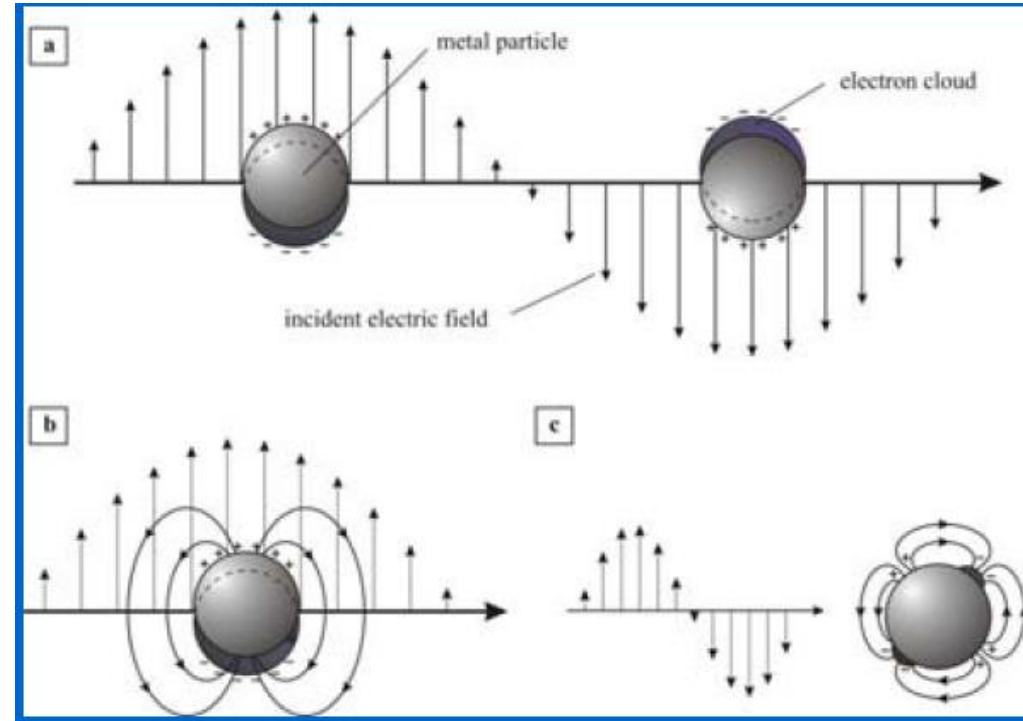
Mechanismus povrchové plasmonové resonance (Surface Plasmon Resonance)

- ▶ Dopadající světlo λ ($h\nu$) excituje oscilace oblaku elektronů vodivostního pásu s následným zesílením elmg. pole na fázovém rozhraní (povrchu)
- ▶ \Rightarrow v resonanci absorpce světla λ_{SPEC} vzroste o několik řádů (= povrchová plasmonová resonance)
- ▶ Kovová nanostruktura funguje jako anténa.



Nanočásticové plazmony

- ▶ **Nanočásticový plasmon** již neexistují lokalizované energetické hladiny (tvoří pás/oblak). Min. rozměr částic: > 2 nm.
- ▶ **Interakce se světlem** => **excitace oscilací e-oblaku** => polariton (el.polarizace)
 - ▶ Interakce malé nanočástice se světlem => dipólová radiace (E-pole) (a, b)
 - ▶ větší nanočástice => kvadrupólová radiace (c, d)



Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

Surface Enhanced Raman Spectroscopy

▶ **Podmínky:**

- ▶ Max. zesílení (dopadající i rozptýlené světlo (Raman) je zesílené plasmonovou resonancí) pro frekvence s minimálním posunem $\Delta\lambda$ (velmi posunutě nemohou být obě v rezonanci => menší zesílení)
- ▶ plasmonové oscilace musí být kolmé k povrchu
- ▶ použití Au, Ag, Cu (NIR-Vis) nanostruktur
- ▶ „Hot-Spots“ (signál není reprezentativní vzhledem k povrchu)

▶ **kombinuje výhody**

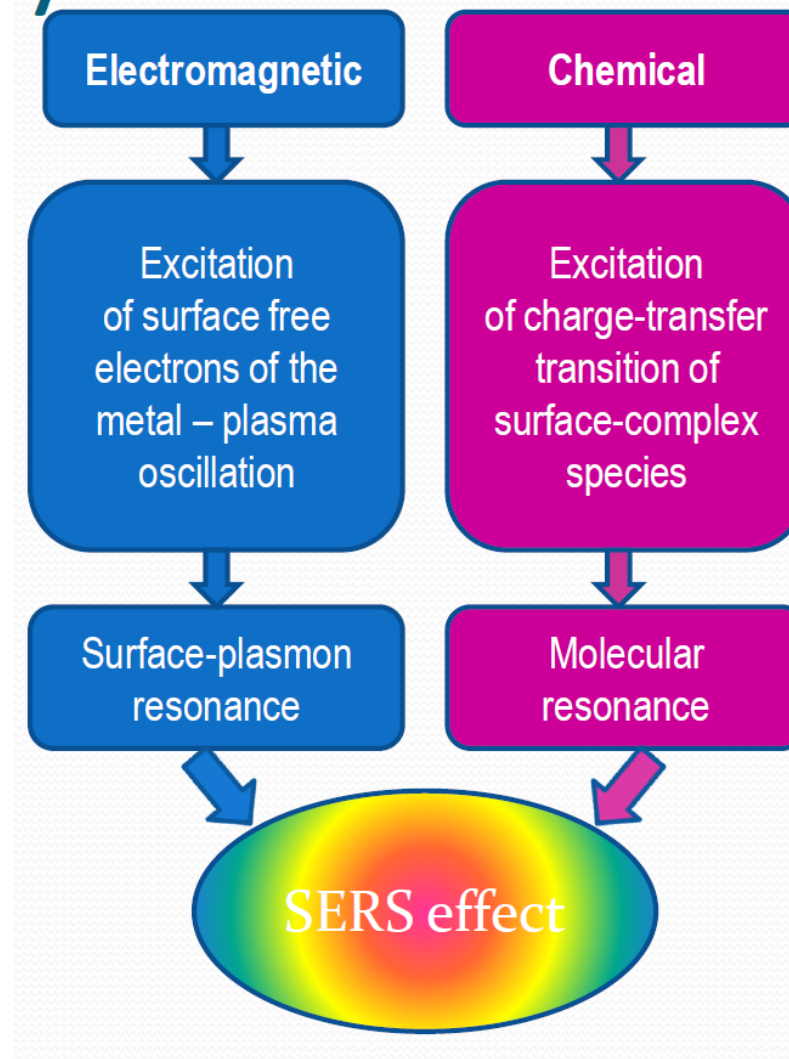
- ▶ fluorescence - vysoký světelný zisk
- ▶ Ramanovy spektroskopie - strukturní informace

▶ **Teorie:**

- ▶ **vazebná** - přenos náboje, vznik vazeb
- ▶ **excitace** povrchových plasmonů
- ▶ ?

SERS Spectroscopy

- ▶ giant enhancement of Raman signal
- ▶ two mechanisms involved
 - ▶ **electromagnetic**-long range, depends on metal-substrate properties (surface plasmons are involved) – coin metals – Au, Ag, Cu
 - ▶ **chemical**-local, molecular structure plays an important role (formation of surface complex)

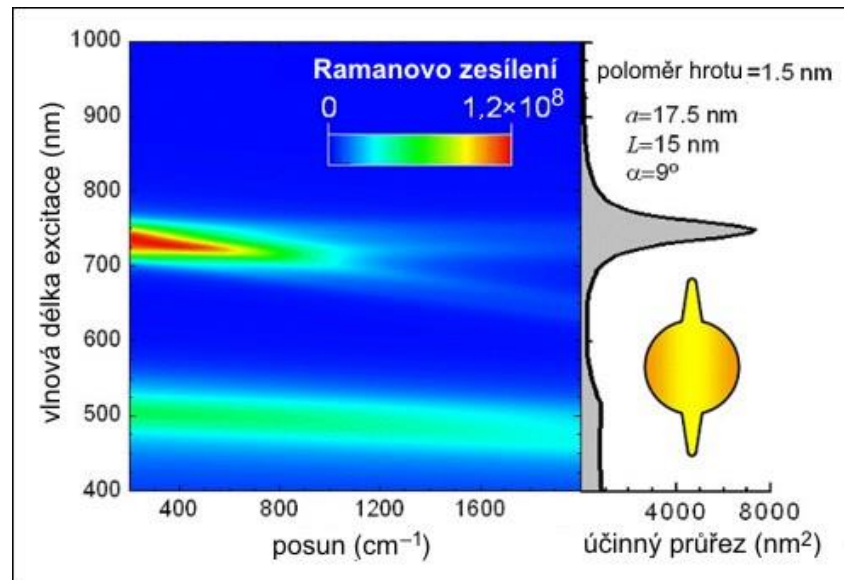


SERS - historie

- ▶ Významným mezníkem k využití kombinačního rozptylu byl objev povrchově zesíleného Ramanova rozptylu uskutečněný roku 1977 dvěma skupinami vědců nezávisle na sobě. Historicky první **SERS** – povrchem zesílený Ramanův rozptyl (Surface Enhanced Raman Scattering) pyridinu adsorbovaného na povrch elektrochemicky zdrsňelého stříbra byl naměřen již v roce 1974, ale nebyl správně interpretován. Obě skupiny zároveň navrhly dvě primární teorie SERS, uznávané dodnes: elektromagnetickou, založenou na excitaci plazmonů vázaných na povrch, zatímco chemická teorie je založena na tvorbě komplexů s přenosem náboje.
- ▶ Nejčastěji užívanými materiály pro SERS jsou zlato a stříbro s povrchem s nerovnostmi alespoň o řád menšími než je vlnová délka dopadajícího světla. Rezonanční frekvence těchto materiálů spadají do oblasti viditelného světla a blízkého infračerveného záření. Zesílení kombinačního rozptylu při plošném substrátu se pohybuje v rozsahu $10^3 \div 10^6$.

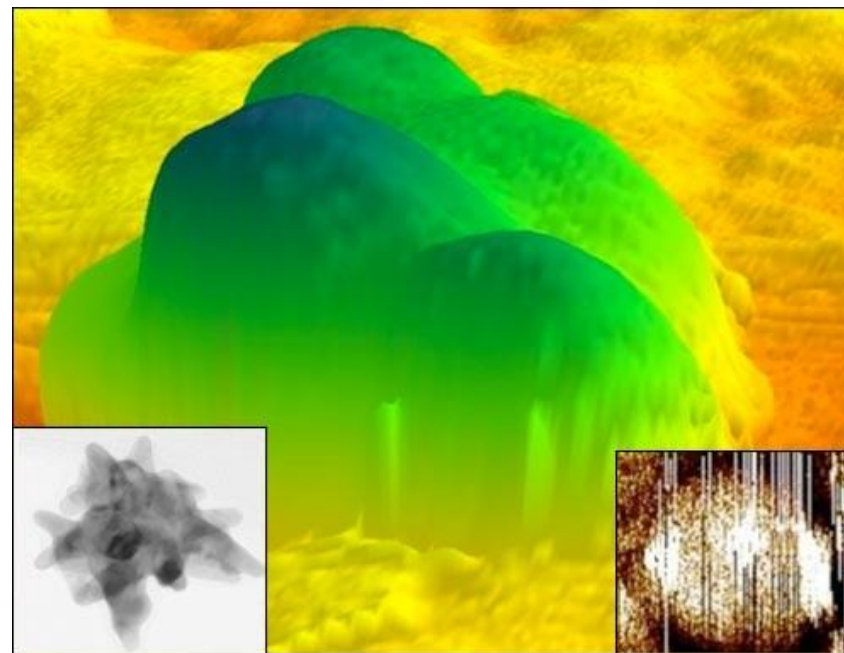
SERS na nanohvězdičkách

- ▶ Vypočtené hodnoty zesílení a účinného průřezu pro hypotetickou nanohvězdičku se dvěma hroty.
- ▶ Zdroj: P. S. Kumar et al; Nanotechnology **19** (2008).

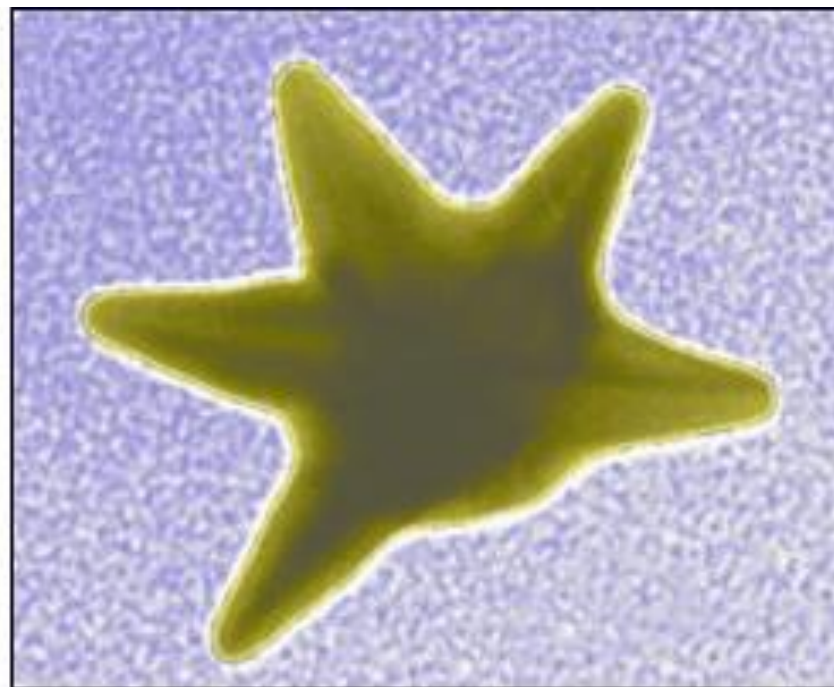
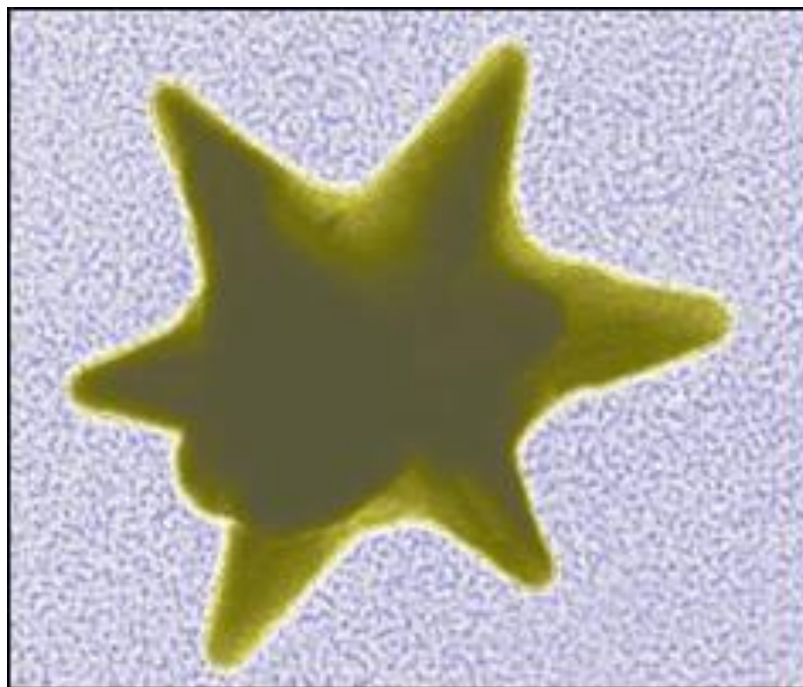


Nanohvězdičky

Obrázek nanohvězdičky v [transmisním rastrovém elektronovém mikroskopu TEM](#) – Transmisní Elektronová Mikroskopie, vytváření obrazu tenkého předmětu průchodem energetických elektronů. Obraz tvořený prošlými elektrony je následně zvětšen a zaostřen elektronovou optikou a na stínítku převeden na viditelné záření, které je většinou dále zaznamenáváno CCD kamerou. Jinou technikou je SEM, při které se obraz vytváří z odražených elektronů. Je doplněn snímkem jediné zlaté nanohvězdy pomocí [mikroskopie na atomových silách AFM](#) – Atomic Force Microscope, mikroskop atomárních sil. Zařízení skenuje povrch materiálu pomocí hrotu zavěšeného na pružném výkyvném raménku. Hrot je přitahován elektrostatickými a van der Waalsovými silami. Výkyvy raménka nad povrchem jsou sledovány laserem. Mikroskop je tak citlivý, že může sledovat elektronové orbitály molekul materiálu. AFM mikroskop byl vynalezen v roce 1986 G. Binnigem, C. Quatem a C. Gerberem. (vlevo dole) a fázovým portrétem nanohvězdičky pomocí mikroskopie na elektrostatických silách (vpravo dole, bílá místa ukazují oblasti s kumulací náboje na ostrých vrcholech hvězdičky. Zdroj: Nanotechweb.



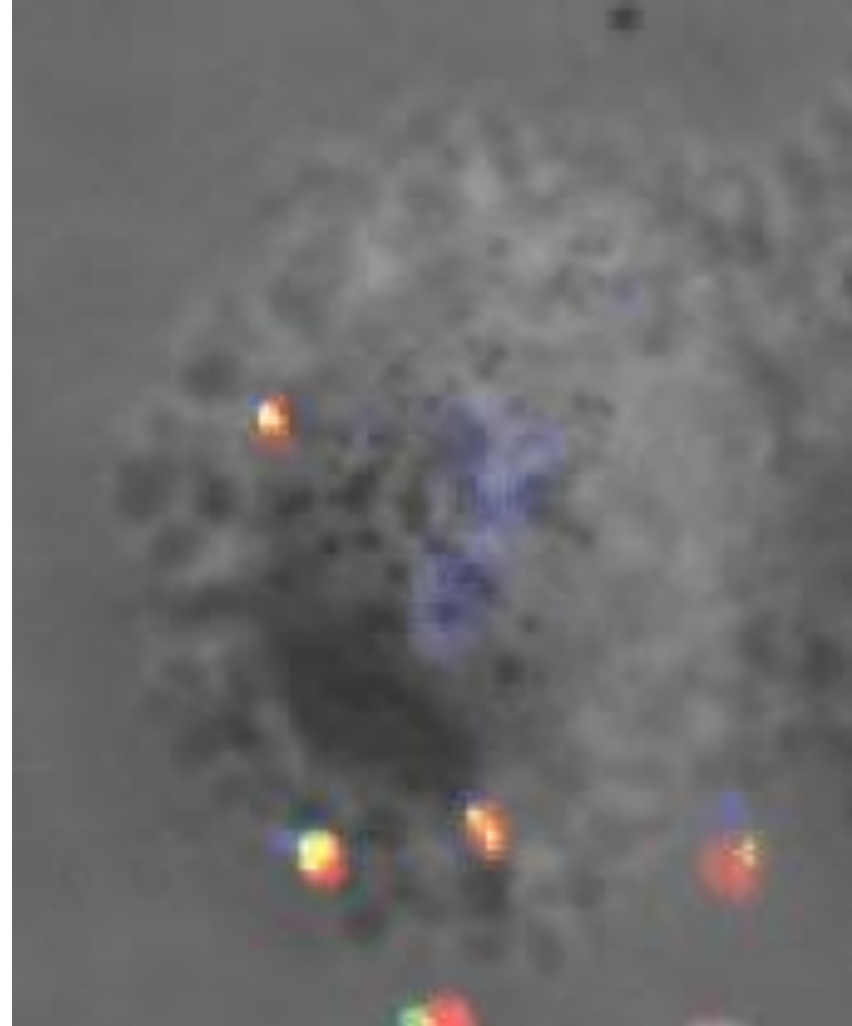
Izolované nanohvězdičky



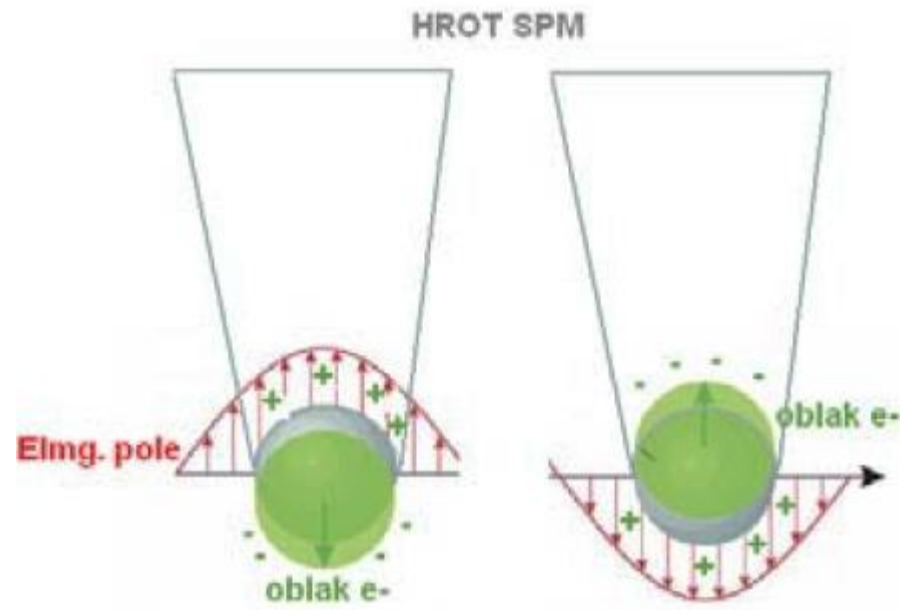
Zdroj: NIST

Nanohvězdičky pronikají do živé buňky

- ▶ Videoklip ukazuje pohyb jednotlivých nanohvězdiček navázaných na molekuly bílkoviny EGFR (Receptor epidermálního růstového faktoru) v živé lidské buňce vypěstované ze zhoubného nádoru děložního čípku. Povšimněte si nenavázaných nanočástic rychle se pohybujících přes zorné pole. Navázané nanočástice se pohybují pomalu, směrem k buněčnému jádru.
- ▶ Zdroj: Aaron et al.: Opt. Express 16/3 (2008).



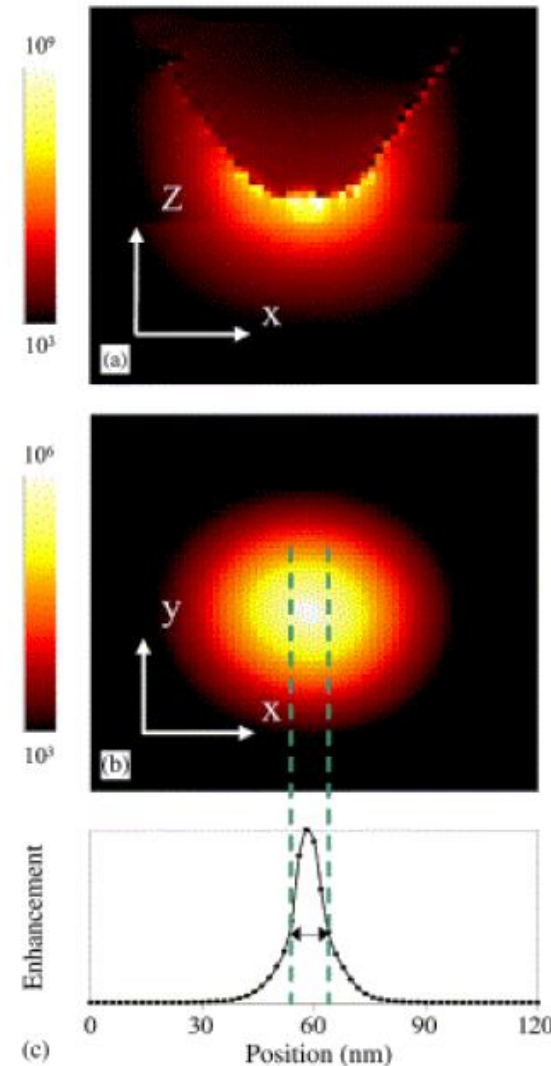
Hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (Tip Enhanced Raman Spectroscopy)



**Od nanočásticové plasmonové
resonance (SE) k hrotovému zesílení (TE)**

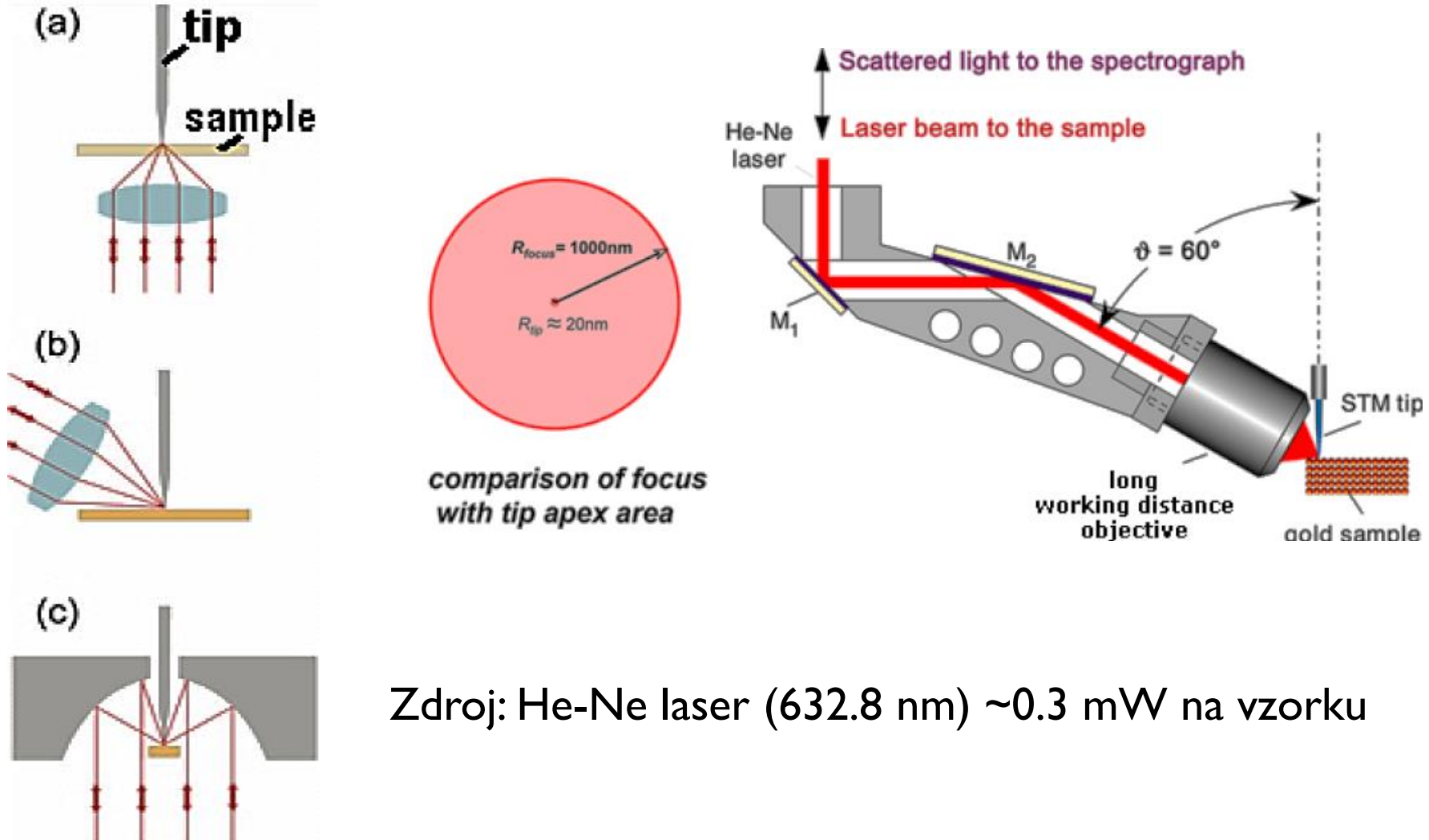
P. Hewagegana, M. I. Stockman: Plasmonics
enhancing nanoantennas

Infrared Physics & Technology 50 (2007) 177–
181



**Řez oblastí
TER(S)
($A = I_{RT}/I_{R0}$)
 $\lambda = 541 \text{ nm}$,
 $d_{TS} = 4 \text{ nm}$**

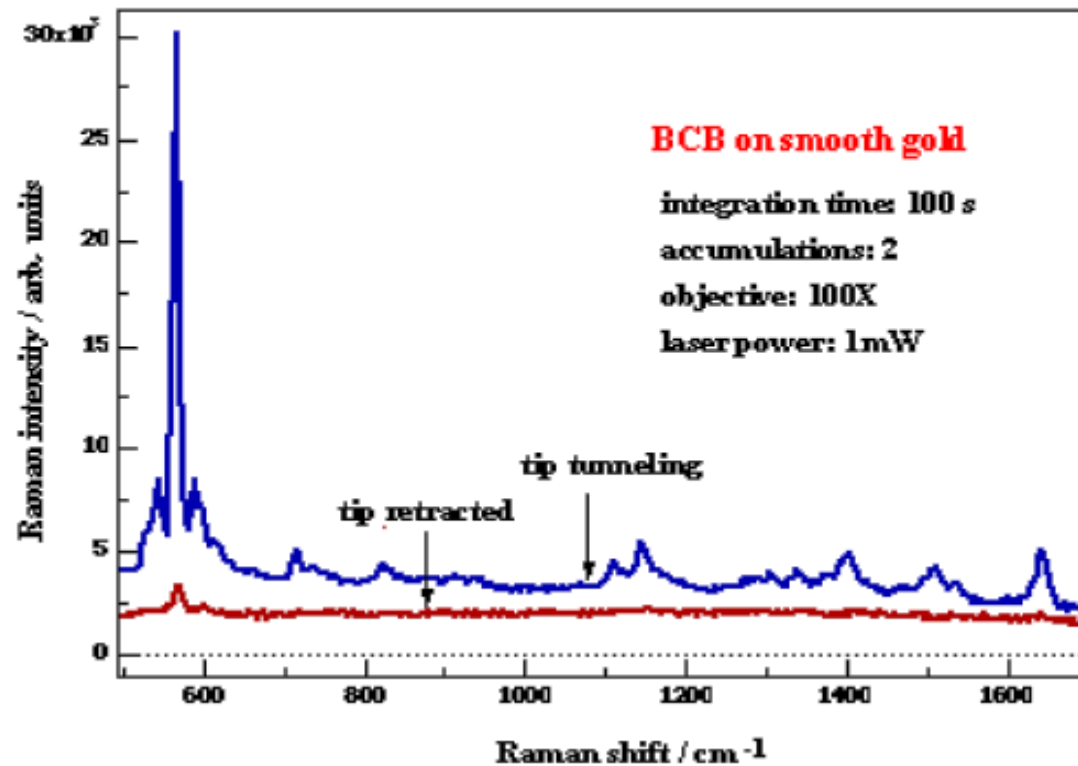
TERS instrumentace



Zdroj: He-Ne laser (632.8 nm) ~ 0.3 mW na vzorku

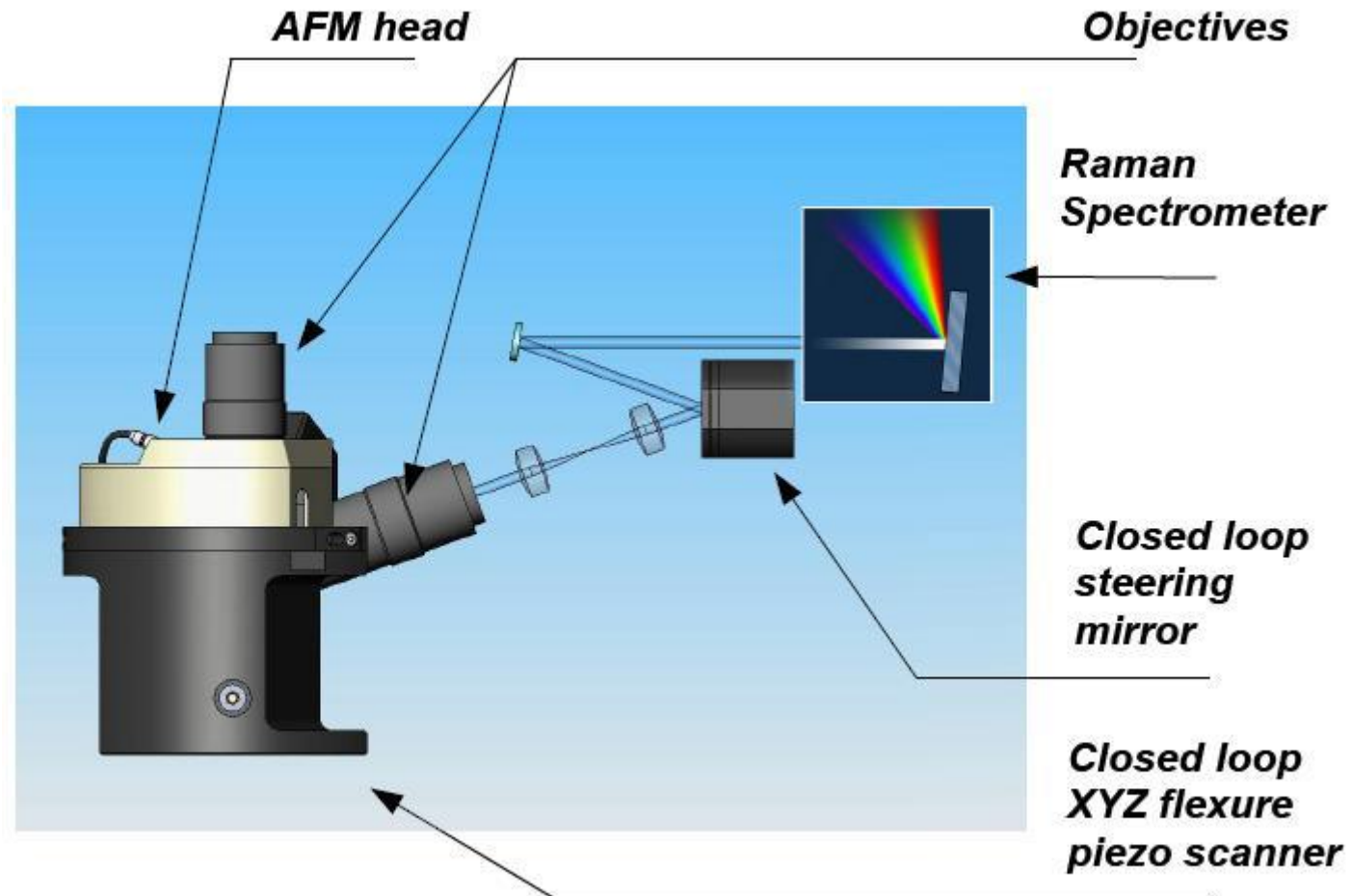
Příklad použití TERS

Brilliant Cresyl Blue (BCB) Dye on Gold

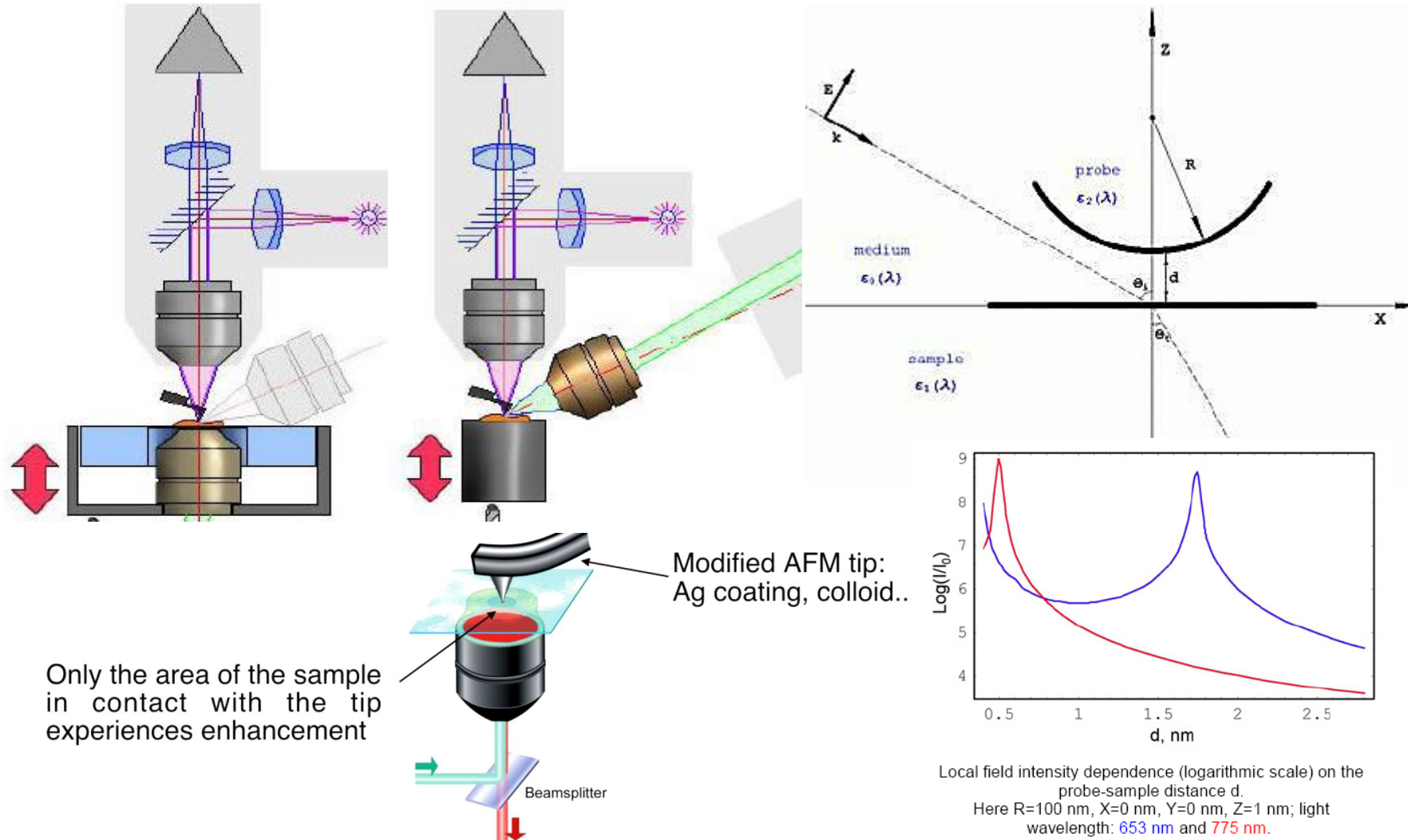


Monovrstva barviva adsorbovaného na Au filmu, STM Ag-hrot
G. Picardi, K. Domke, D.Zhang, B. Ren, J. Steidtner B. Pettinger,
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft

Instrumentace-integrované AFM + TERS



Instrumentace - integrované AFM + TERS dva optické party

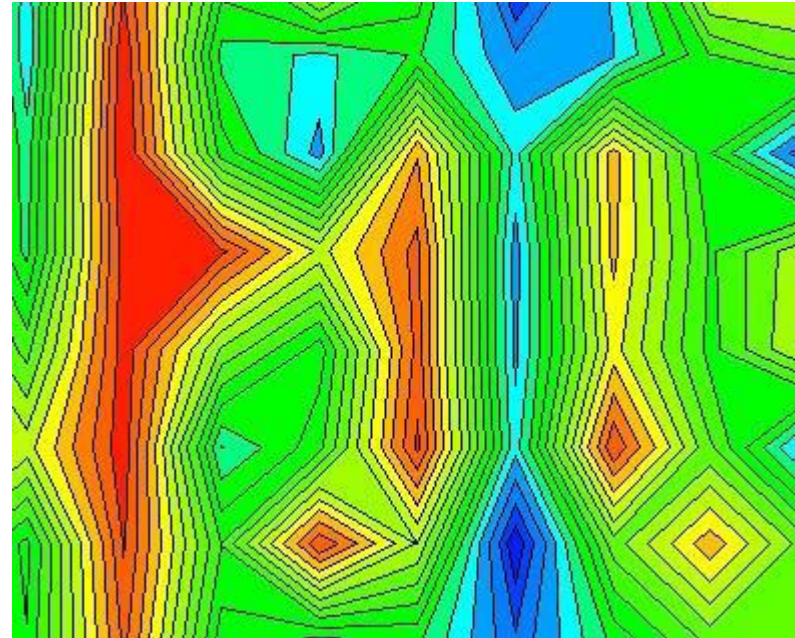


Kombinace – AFM, Raman nanomapování

Paralelní obrazy křemíkového polovodiče



AFM obraz –9 x 7 μm



Obraz Ramanovy intensity–520 cm^{-1} , *stejná oblast*

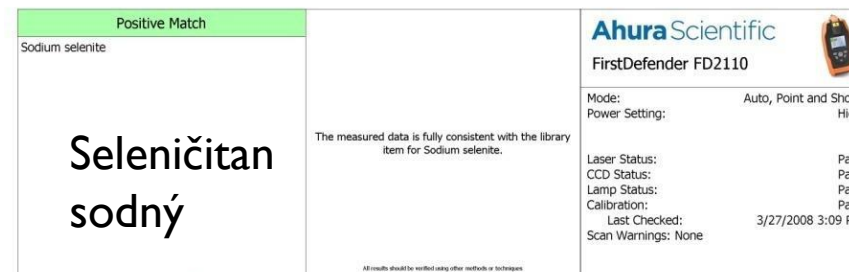
Aplikace

- ▶ **podle typu zkoumaného materiálu**
 - ▶ anorganický
 - ▶ organický
 - ▶ geologický
 - ▶ biologický ...
- ▶ **podle vhodné instrumentace**
 - ▶ disperzní vs. FT
 - ▶ makro x mikro x nano
- ▶ **podle způsobu vyhodnocování dat**
 - ▶ knihovny spekter, „luštění“, chemometrika...

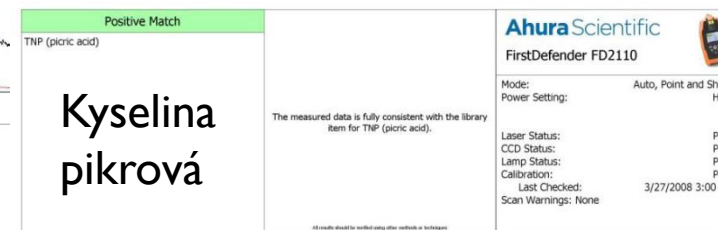
Studované materiály

- ▶ **VZORKY – pevné látky, kapaliny, fázové rozhraní**
- ▶ **příklady**
 - ▶ **anorganické** -*korozní vrstvy, povrchy pevných disků, křemík, amorfni uhlík, diamanty*
 - ▶ **organické** -*supramolekulární systémy, kontaminanty v životním prostředí*
 - ▶ **polymery** -*fotolabilní materiály*
 - ▶ **biologické** -*in vitro, in vivo*
 - ▶ **geologické** -*minerály, horniny*
 - ▶ **archeologické** -*od paleolitu po novověk*

Terénní měření



Nalzovice27-03 - Scan068



Nalzovice27-03 - Scan065

3/27/2008 3:00 PM

Terénní měření

Přenosný dispersní Ramanův spektrometr – AHURA



Život na Marsu?

Metodická příprava

- ▶ **vývoj spektrometru MaRS** (microscope and Raman spectrometer)
 - ▶ **miniaturní, lehký, a přitom robustní**
 - ▶ **prototyp -Montana State University**

D.L. Dickensheets, D.D. Wynn-Williams, H.G.M. Edwards, C. Schoen, C. Crowder, E.M. Newton, *Journal of Raman Spectroscopy* **31** (2000) 633.