Spektroskopické metody

Ramanova spektroskopie

Objev Ramanova jevu

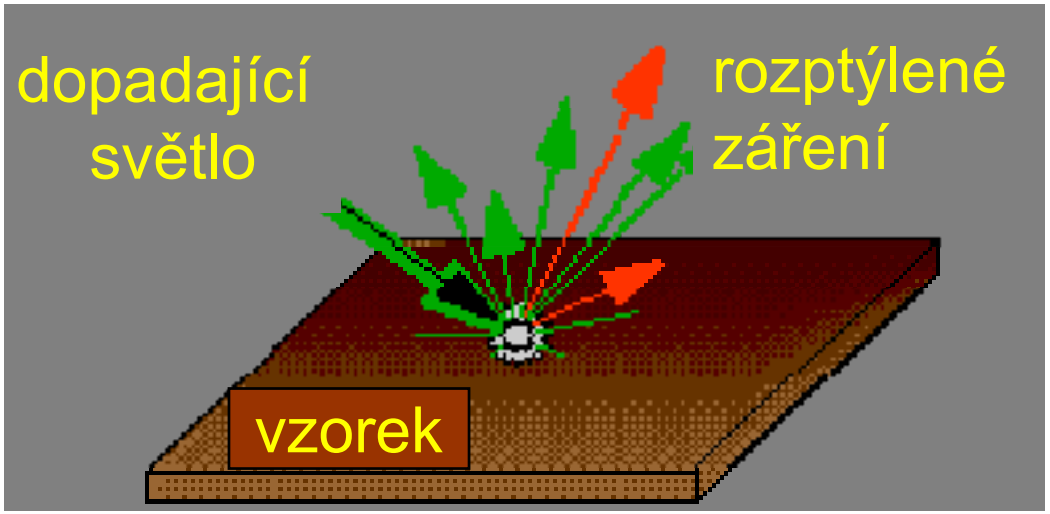
Sir Chandrasekhara Venkata **Raman**

spolu s K.S. Krisnanem v roce 1928 v Kalkatě v Indii a nezávisle také v roce 1928 G. Landsberg a L. Mandelstam v Moskvě poprvé prokázali existenci spontánního nepružného rozptylu světla

C. V. Raman získal v roce 1930 za tento objev Nobelovu cenu za fyziku

(zdroj světla sluneční záření+monochromatický filtr a lidské oko jako detektor)

Ramanův jev



Ramanův
rozptyl

Rayleighův
rozptyl

- rozptýlené záření zahrnuje:
  - fotony stejné energie (frekvence, vlnové délky, vlnočtu) jako mělo dopadající záření (pružný rozptyl, Rayleighův rozptyl)
  - fotony (emitované) s jinou energií (frekvencí, vlnovou délkou, vlnočtem) než mělo dopadající záření (nepružný rozptyl, Ramanův rozptyl; asi 1 foton z 10^7 dopadajících)

Princip vzniku spontánního Ramanova jevu

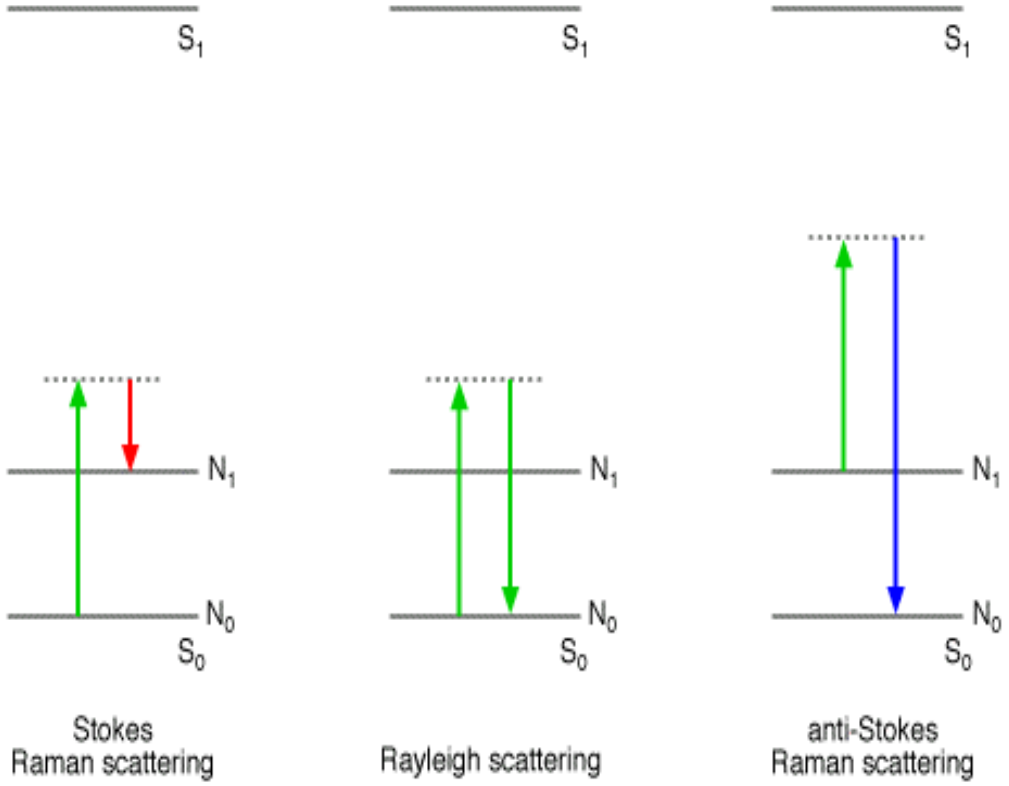
Ramanův rozptyl:

$$h\nu_0 + E_1 = h\nu_1 + E_2$$

ν_0– frekvence dopadajícího záření,
ν_1 – frekvence rozptýleného záření

E_1 – počáteční hladina energie

E_2 – konečná hladina energie



$$E = E_2 - E_1 = h\nu_0 - h\nu_1 = +h\Delta\nu$$ **Stokesova linie**

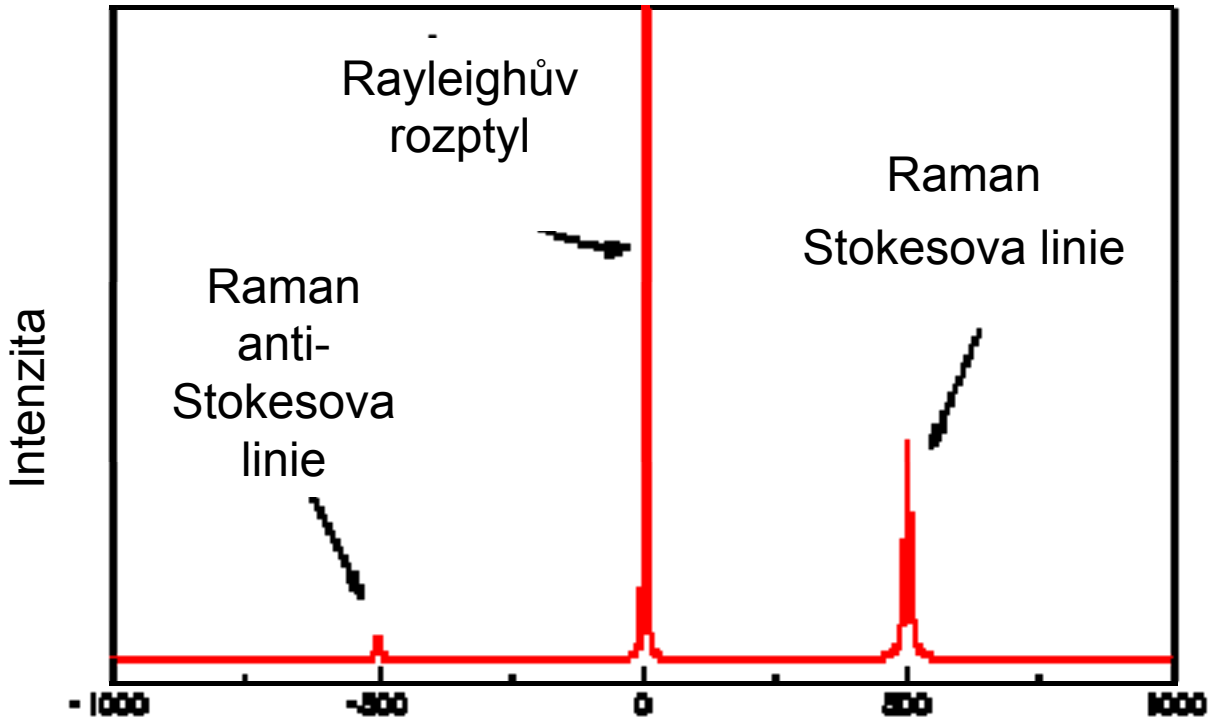
$$-h\Delta\nu$$ **anti-Stokesova linie**

$\Delta\nu$ – Ramanův posun, $h\Delta\nu$ – vibrační energie

Ramanovy linie

Stokesovy a anti-Stokesovy linie jsou rozloženy symetricky vzhledem k linii Rayleighově. Rayleghova je výrazně (až 10^5krát) intenzivnější. Obvykle se pozorují jen Stokesovy čáry.

Poměr intenzit anti- a Stokesových linií je při všech vibračních frekvencích mírou teploty ⇒ možnost bezkontaktního měření teploty vzorku



Ramanovo spektrum

- je závislost intenzity rozptýleného záření na Ramanově posunu (ve vlnočtech)
- velikost posunu nezávisí na vlnové délce dopadajícího světla, ale jen na poloze vibračních (rotačních) hladin (tak lze odlišit fluorescenci a Ramanův rozptyl)
- intenzita Ramanovy linie S je úměrná λ^{-4} a $(\delta\alpha/\delta x)^2$
- intenzita spontánního Ramanova rozptylu představuje asi 10^{-8} intenzity dopadajícího záření
- intenzita anti-Stokesovy linie je vždy výrazně slabší než intenzita Stokesovy linie

Intenzita Ramanovy linie

[počet fotonů za 1 s vyzářených do prostoru 1 steradiánu]

$$S = KP_D \left(\frac{d\sigma}{dO} \right)_0 D_n$$

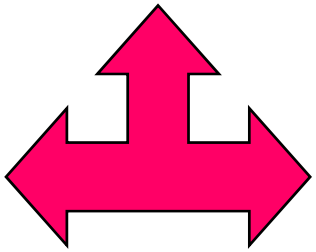
hustota (počet molekul/cm^3)

konstanta K (závisí na geometrii uspořádání vzorku)

hustota energie laserového svazku [počet fotonů/s/cm^2]

diferenciální Ramanův účinný průřez [cm^2 na 1molekulu v prostorovém úhlu 1 sr]

Ramanova spektroskopie - možnosti



spontánní

stimulovaná
rezonanční

SERS
Surface-enhanced
Raman Scattering

depolarizace
Ramanova rozptylu

konvenční disperzní
Ramanova spektroskopie

FT Ramanova
spektroskopie

Využití Ramanovy spektroskopie

- doplňuje metodu infračervené (vibrační) spektroskopie – některé vibrace neaktivní v IČ lze pozorovat v Ramanově spektru; v mnoha případech odpovídá Ramanův posuv vlnočtům čar v IČ spektru, čím vyšší symetrii jeví molekula, tím rozdílnější je průběh IČ a Ramanova spektra
- strukturní analýza (rozlišení polymorfů, velikosti krystalů, kvantitativní analýza směsí účinných a pomocných látek, studium nanočástic)
- analýza znečistění prostředí
- studium vesmíru (atmosféra vesmírných těles, povrch hornin)

Využití Ramanovy spektroskopie

- studium struktury, konformací a intermolekulárních interakcí polymerů, studium složení a prostorové orientace kopolymerů a jejich úseků
- vibrace bočních substituentů polymerů lze snáze identifikovat v IČ spektru, vibrace hlavního uhlíkového řetězce mohou být studovány spíše Ramanovou spektroskopií
- moderní systémy umožňují nedestruktivní studium např. biologických vzorků in vivo
- aplikace v medicině k identifikaci patogenních mikroorganismů, časné detekci rakoviny, ke studiu ortopedických implantátů, ke studiu účinnosti farmaceutických výrobků…

Využití Ramanovy spektroskopie

- vibrační Ramanova spektroskopie není limitována jen na intramolekulární vibrace, je možno sledovat např. vibrace mřížky (fonony)
- rozptýlené záření je polarizováno
- Ramanův rozptyl spojený s dokonale symetrickými vibracemi je silně polarizován rovnoběžně s rovinou polarizace dopadajícího světla
- intenzita čar, odpovídajících neúplně symetrickým vibracím je nižší v rovině kolmé (asi o ¼) než intenzita v rovině paralelní s rovinou polarizace dopadajícího světla

Přednosti Ramanovy spektroskopie ve srovnání s IČ

- metoda rozptylu světla ⇒ **lze měřit vzorky libovolného tvaru a velikosti bez jakékoli úpravy**
- bez úpravy spektrometru lze měřit i mikroskopické vzorky (jen fokusace laserového svazku)
- pro měření vzdálených vzorků (např. *in vivo*) lze použít spektrometr se světlovody
- lze měřit vzorky ve vodných roztocích
- jedním přístrojem lze měřit i velmi malé posuny vlnočtů v oblasti 10–500 cm^{-1}
- protože se jedná o rozptyl, není zde limitace saturací jako u absorpčních spektroskopií

Výběrová pravidla

IČ

má-li být absorbován foton infračerveného záření, pak vibrace s tím spojená musí být provázena změnou dipólmomentu μ

$$\mu = \mu^0 + \left(\frac{\partial \mu}{\partial x}\right)_{x=0} x$$

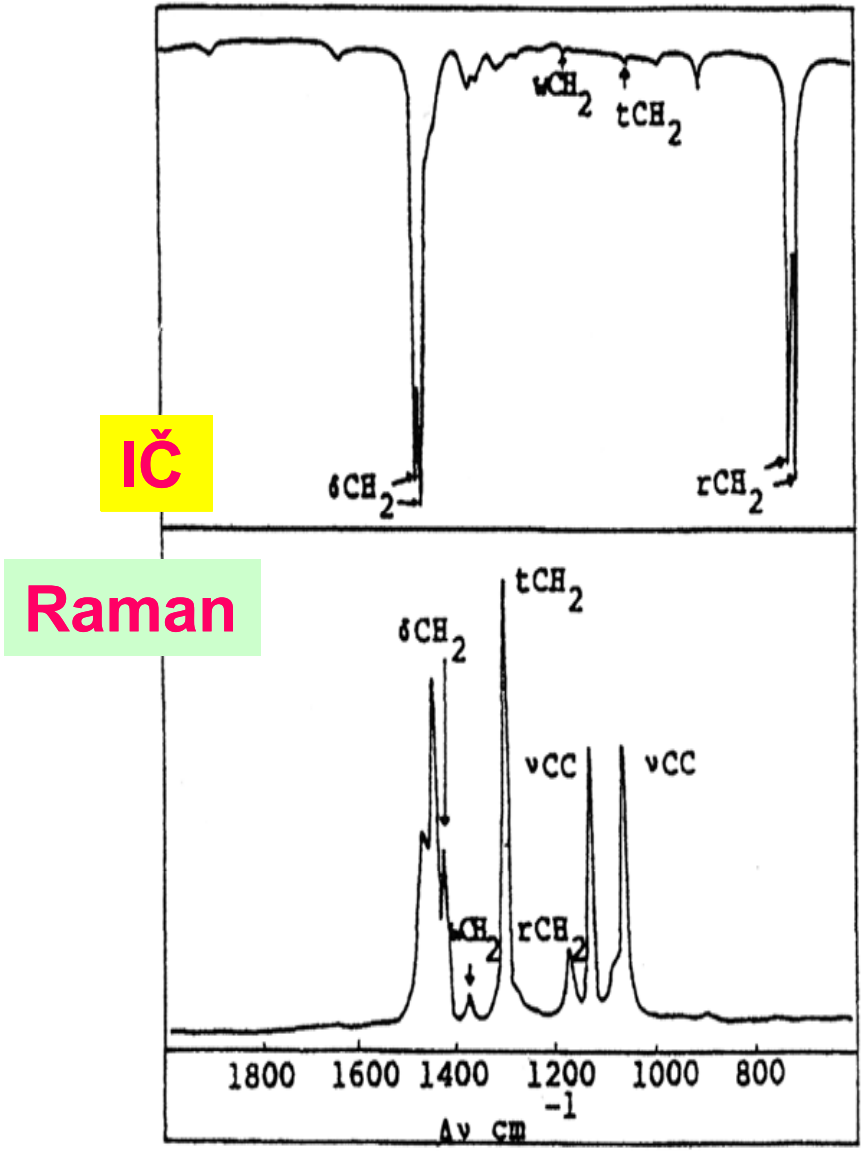
Raman

nepružný rozptyl závisí na změně indukovaného dipólmomentu μ_{in}, resp. na změně polarizovatelnosti α

$$\mu_{in} = \alpha E \quad (1)$$

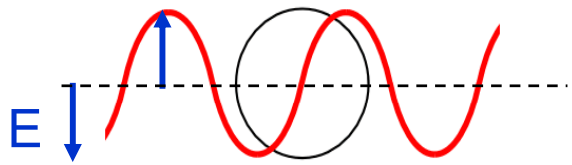
$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x}\right)_{x=0} \Delta x \quad (2)$$

Ramanova a IČ spektra lineárního polyethylenu



molekula PE má střed symetrie $\Rightarrow$ IČ a Ramanova spektra by měla vykazovat zcela jiné vibrační módy.
V IČ spektru jsou nejsilnější módy methylenové skupiny, ale v Ramanově spektru dominují C-C módy.

Výběrová pravidla Raman



- polarizovatelnost atomu nebo molekuly α ovlivňuje velikost indukovaného dipólmomentu μ_{in} v přítomnosti elektrického pole intenzity **E**
- polarizovatelnost atomů je isotropní (ve všech směrech stejná), velké atomy mají α větší než malé atomy
- polarizovatelnost molekul závisí na symetrii molekuly
- v rovnovážné poloze je polarizovatelnost α_0
- koná-li molekula vibrační nebo rotační pohyby, vzdaluje se od rovnovážné polohy a odchylku od této polohy Δx můžeme v čase t pro harmonické vibrace s frekvencí ν a amplitudou vibrací x_{max} zapsat ve tvaru

$$\Delta x = x_{max}\cos(2\pi\nu t) \qquad (3)$$

Výběrová pravidla Raman

- elektromagnetické záření, které na molekulu dopadá s frekvencí ν_{in} indukuje elektrické pole E

$$E = E_{max}\cos(2\pi\nu_{in}t) \qquad (4),$$

kde E_{max} je amplituda elektrické vlny

- dosazením vztahů (2), (3) a (4) do vztahu (1) pro indukovaný dipól dostaneme:

$$\mu_{in} = \alpha_0 E_{max}\cos(2\pi\nu_{in}t) + E_{max}x_{max}\left(\frac{\partial\alpha}{\partial x}\right)\cos(2\pi\nu t)\cos(2\pi\nu_{in}t)$$

$$\cos(2\pi\nu t)\cos(2\pi\nu_{in}t) = \frac{1}{2}\left[\cos 2\pi t(\nu+\nu_{in}) + \cos 2\pi t(\nu-\nu_{in})\right]$$

Výběrová pravidla Raman

$$\mu_{in} = \alpha_0 E_{max} \cos(2\pi\nu_{in} t) + E_{max} x_{max} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial x}\right) \cos(2\pi\nu t)\cos(2\pi\nu_{in} t)$$

$$\mu_{in} = \alpha_0 E_{max} \cos(2\pi\nu_{in} t) + \frac{E_{max} x_{max}}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial x}\right) \left[\cos 2\pi t(\nu_{in} + \nu) + \cos 2\pi t(\nu_{in} - \nu)\right]$$

Rayleighův rozptyl

frekvence dopadajícího záření

Ramanův rozptyl

$\neq 0$

Porovnání přístrojového vybavení

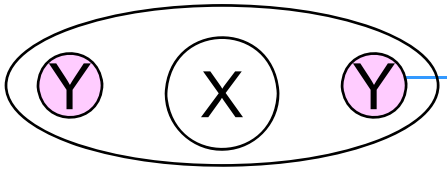
IČ		Raman
absolutně černé těleso, laserová dioda	zdroj záření	kontinuální laser emitující záření ve viditelné nebo blízké IČ oblasti
termočlánek, pyroelektrický, bolometr	detektor	fotonásobič
≈ 0,05 cm^{-1}	rozlišení	≈ 0,25 cm^{-1}
180–4 000 cm^{-1} (jeden přístroj)	rozsah vlnočtů	10–4 000 cm^{-1}
kovy, vodné roztoky	omezení ze strany vzorků	barva, fluorescence
kapaliny, plyny a páry	snadno měřitelné vzorky	kapaliny, prášky, monokrystaly, polymery, vlákna
prášky, monokrystaly, polymery	obtížně měřitelné	plyny a páry

Omezení Ramanovy spektrometrie fluorescencí

- pokud je dopadající záření částečně absorbováno, může docházet k fluorescenci nebo fosforescenci
- kdyby byly přítomny fluoreskující nečistoty $1:10^6$ a kvantový výtěžek byl jen 0,1 $\Rightarrow \Rightarrow$

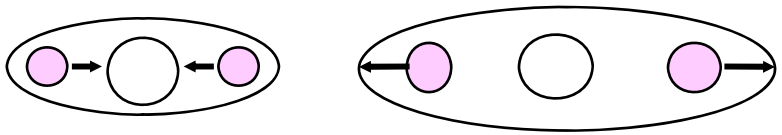
  na 1 Ramanův foton bylo emitováno 10 fluorescenčních fotonů.
- při použití viditelného světla pro excitaci až 95 % polymerů tak fluoreskuje, že nelze spontánní Ramanovo spektrum měřit
- proto se používá pro excitaci spontánního Ramanova rozptylu dlouhovlnné viditelné nebo NIR záření nebo rezonanční Ramanův rozptyl
- další problém při měření polymerů – vysoká intenzita laseru může způsobit dekompozici polymeru

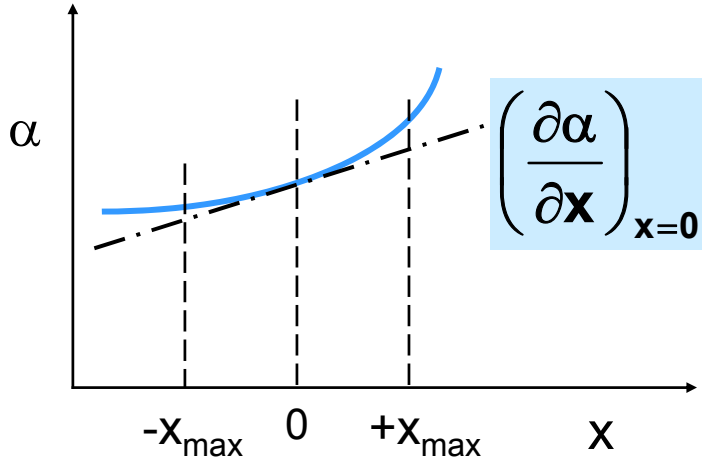
Rozdílná citlivost IČ a Ramana



molekula Y-X-Y v rovnovážné poloze

symetrické valenční vibrace



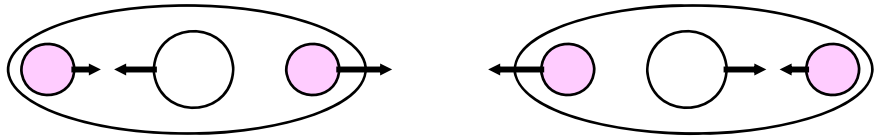


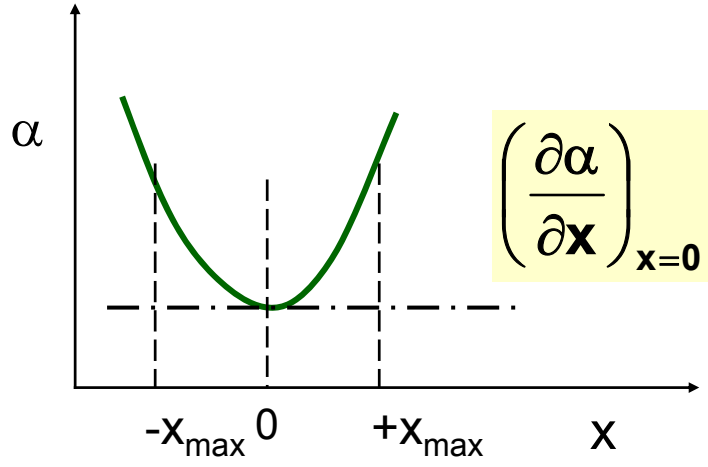
$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial x}\right)_{x=0} \neq 0$

pás v Ramanově spektru

žádný v IČ

antisymetrické valenční vibrace



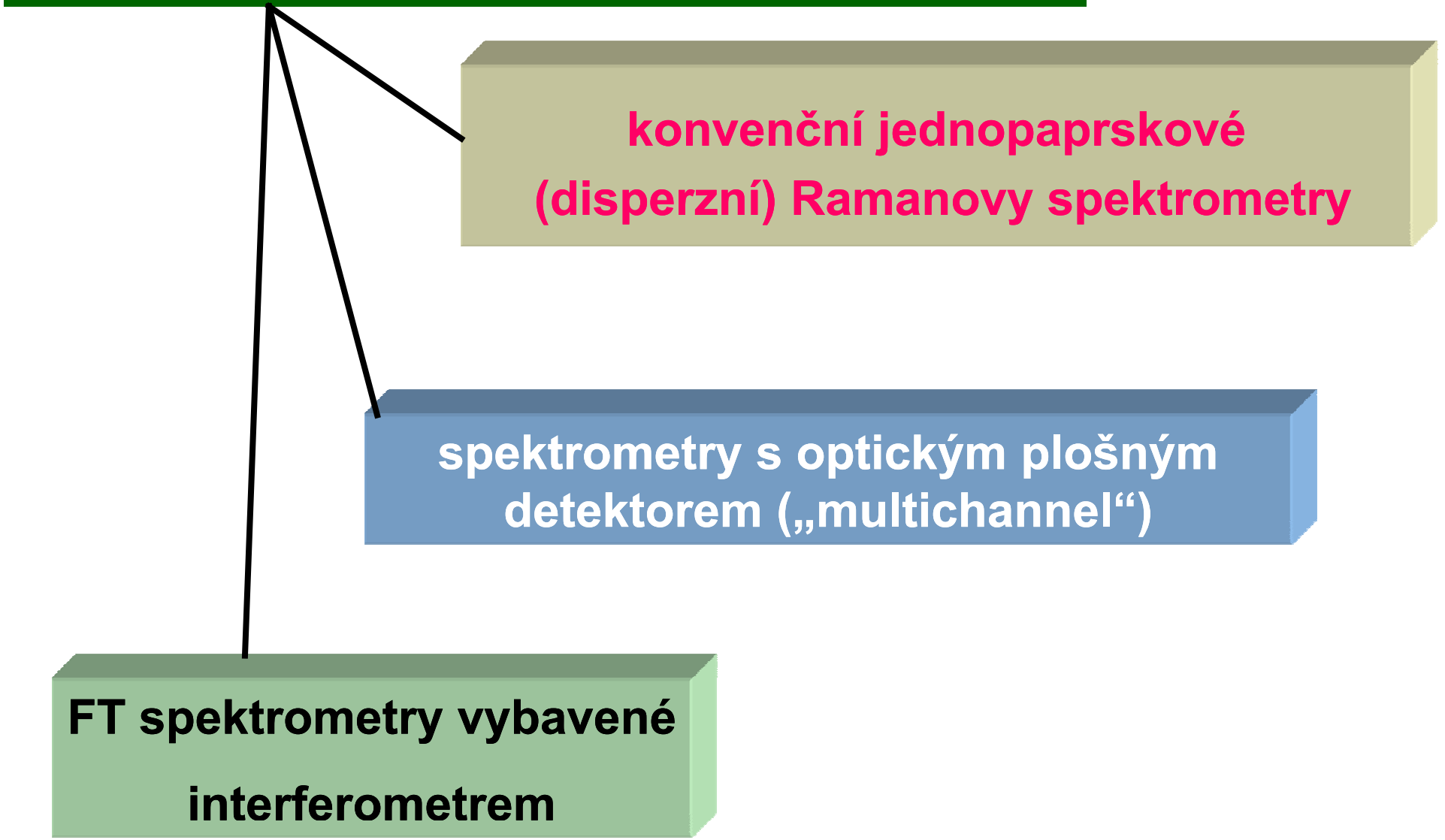


$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial x}\right)_{x=0} = 0$

žádný pás v Ramanově spektru

absorpční pás v IČ

Ramanovy spektrometry



Součásti Ramanova spektrometru

- zdroj záření (laser): velmi intenzivní, monochromatický, lineárně polarizovaný zdroj
- monochromátory
  - holografické mřížky (dvě nebo tři za sebou řazené)
- optický systém
  - odfiltrování Rayleighova rozptylu
  - interferometr
- polarizátory
- prostor pro vzorky (temperace, kryostaty pro měření teplotních závislostí od 325 K do 2,5 K)
- detektor
  - fotonásobič („photon-counting“), CCD plošný detektor nebo kamera

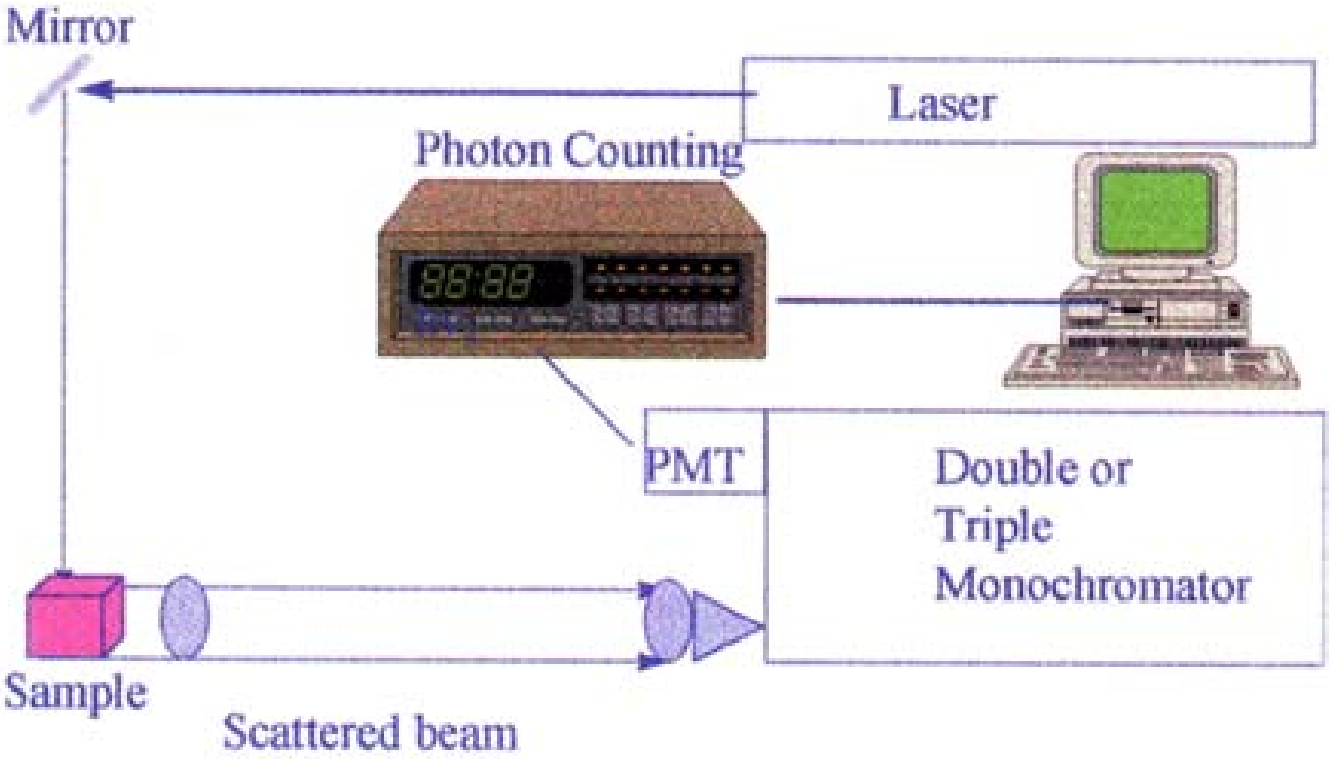
Standardy

- pro absolutní měření intenzit čar Ramanova spektra v různé spektrální oblasti je nutné provádět kalibraci a korigovat tak vlastní přístrojovou funkci (především u konvenčních spektrometrů) pomocí standardního světelného zdroje, jehož spektrum je přesně kvantitativně definováno
- používá se „NIST-traceable standard lamp“ a luminiscenční skleněný standard

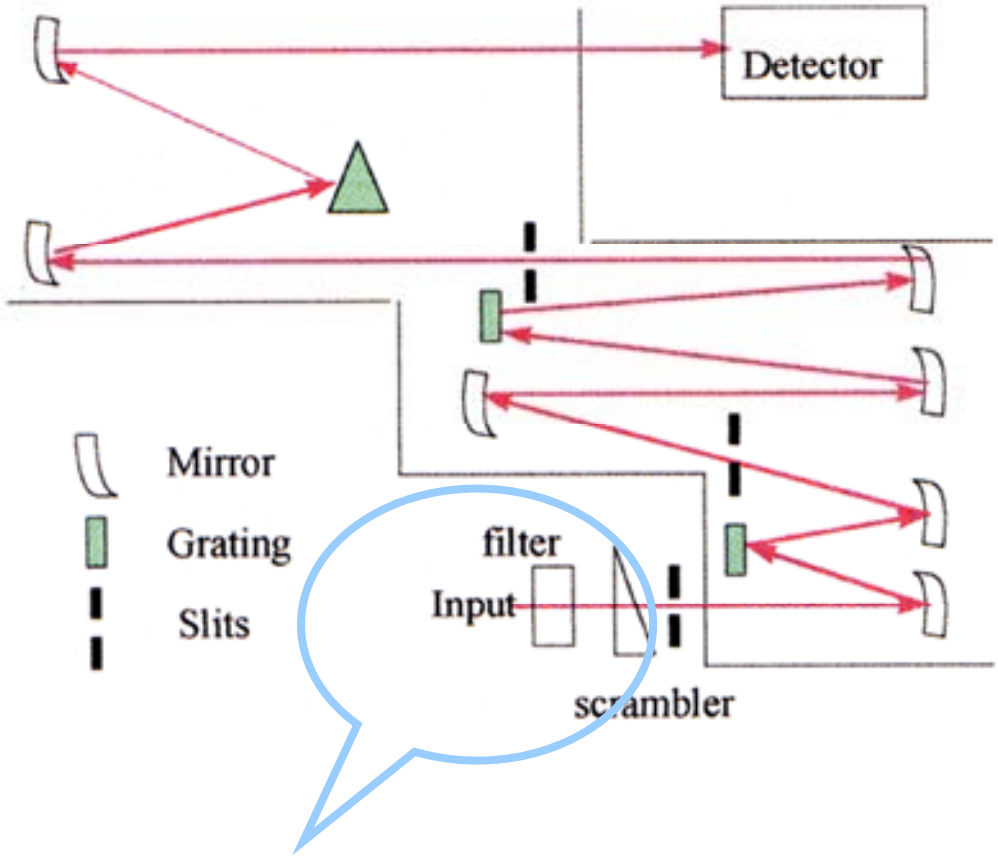
Lasery v Ramanově spektrometrech

laser	λ [nm]	vlnočet [cm^{-1}]	výkon [mW]
Ar-ion	488,0 514,5	20 491,8 19 436,3	1 500 2 000
Kr-ion	413,1 530,9 647,1	24 297,2 18 835,9 15 453,6	1 800 1 500 3 500
Kr-ion (zdvojená frekvence)	206,5 234	48 426,1 42 735,0	4 8
He-Ne	632,8	15 802,8	50
Nd-YAG	1064	9 398,0	500 000
Ti-sapphire	1300	7 692,3	750
laserová dioda	785 840	12 740 11 900	500 500

Konvenční Ramanův spektrometr

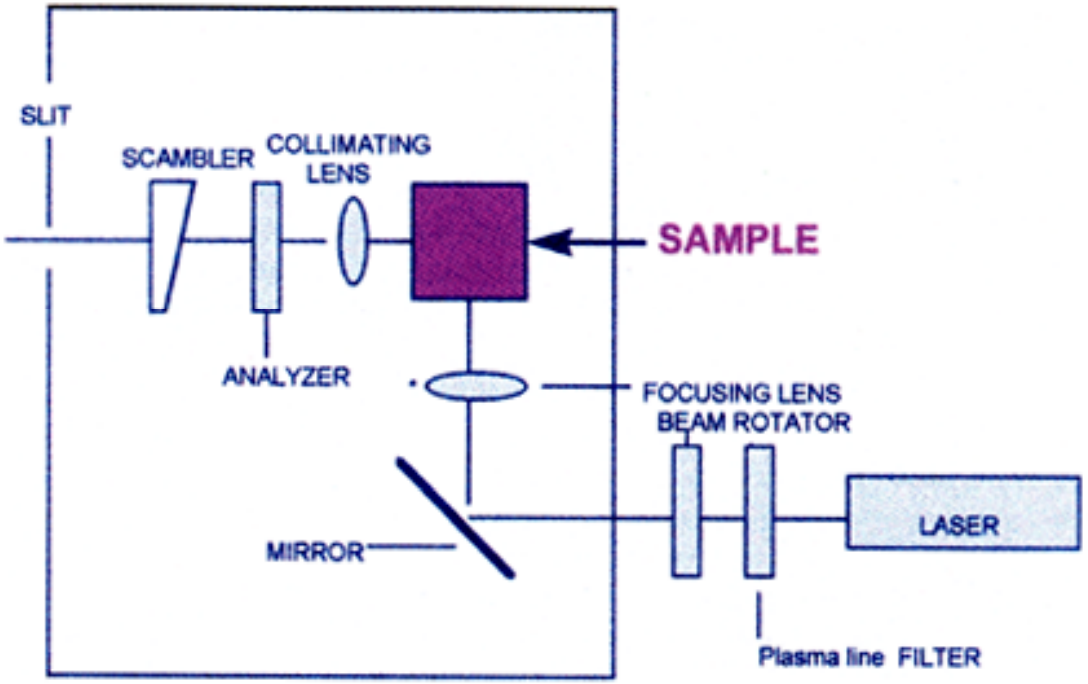


Monochromátor Ramanova spektrometru

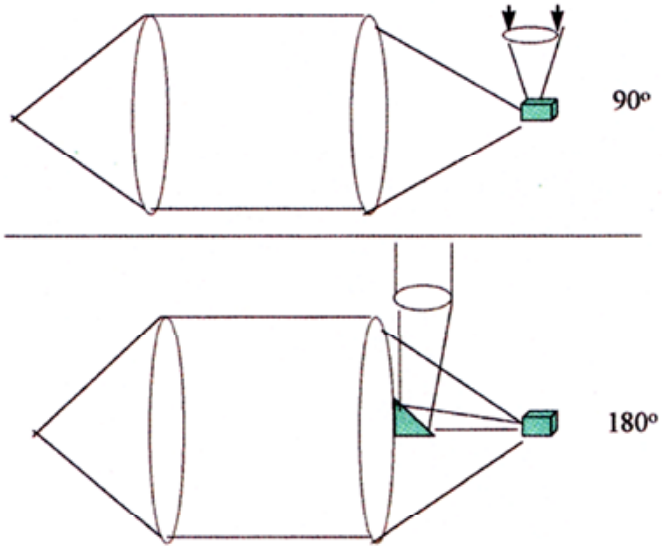


odstranění excitační
frekvence ± 30 cm^{-1}

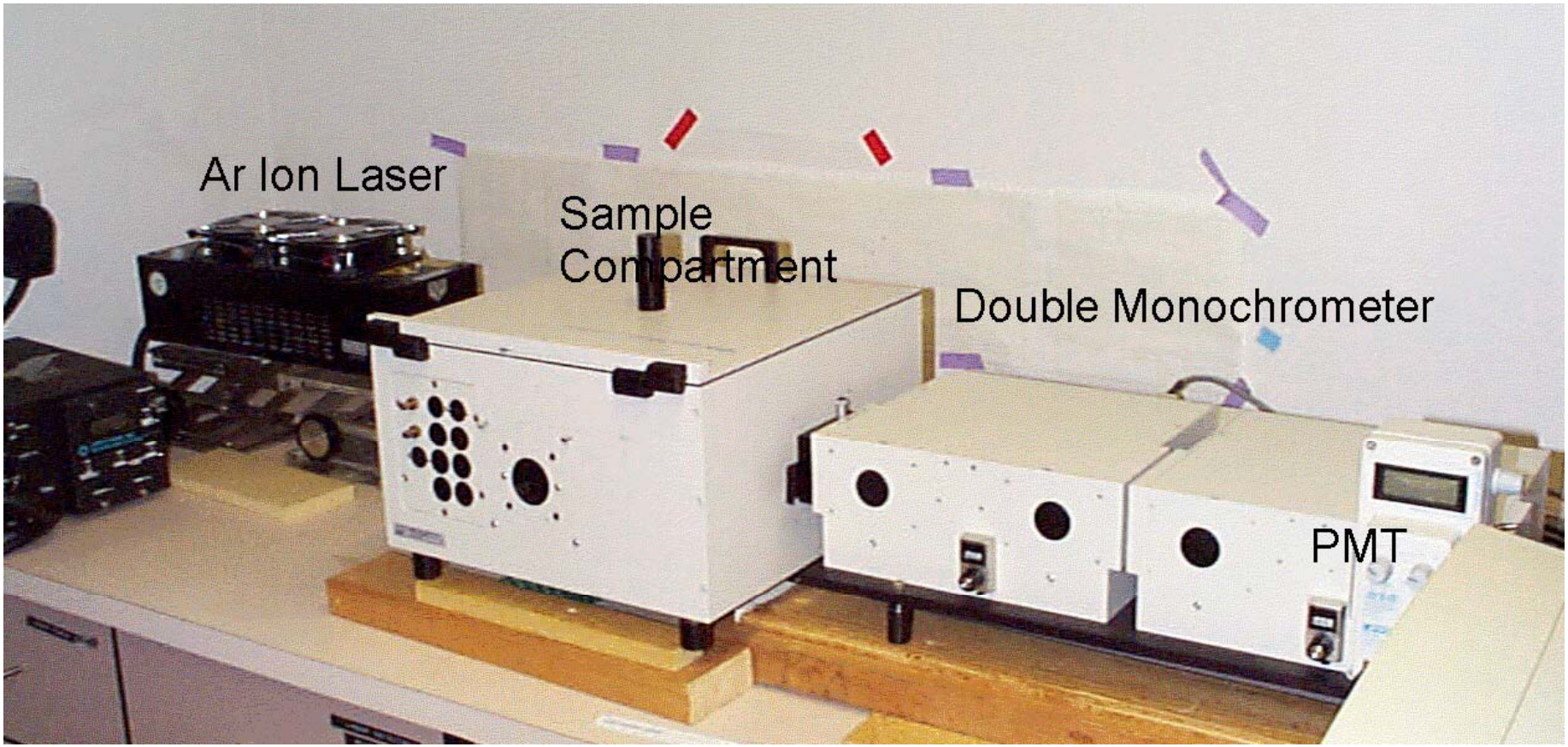
Optické schéma prostoru pro vzorek



systémy osvětlení vzorku

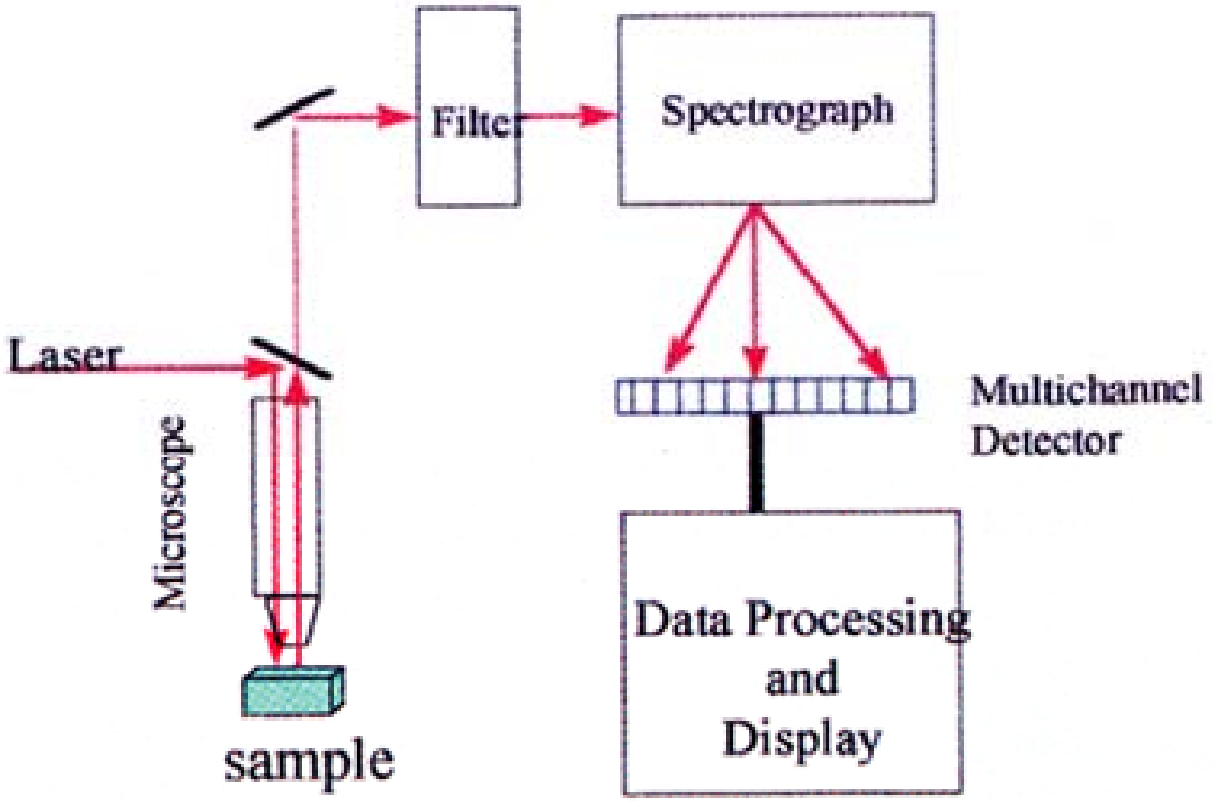


Konvenční Ramanův spektrometr



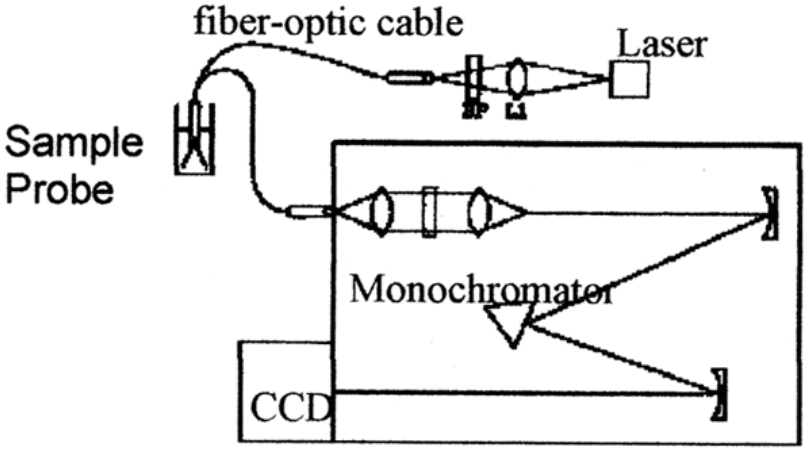
Ar-ion laser: vlnová délka 488 nm

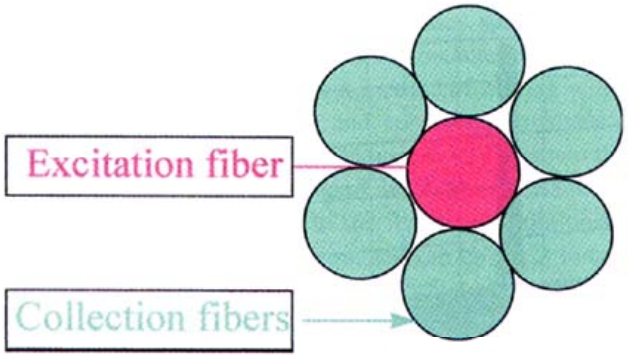
„Optical multichannel“ Ramanův spektrometr



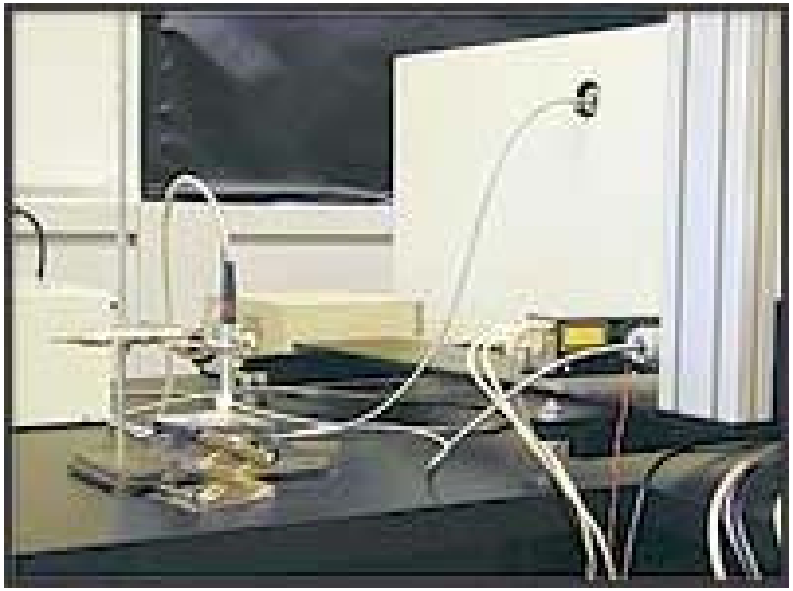
záznam spektra 10 až 200x rychleji, nevýhodou je omezený rozsah vlnočtů najednou snímatelný

Schéma přenosného vláknového RS

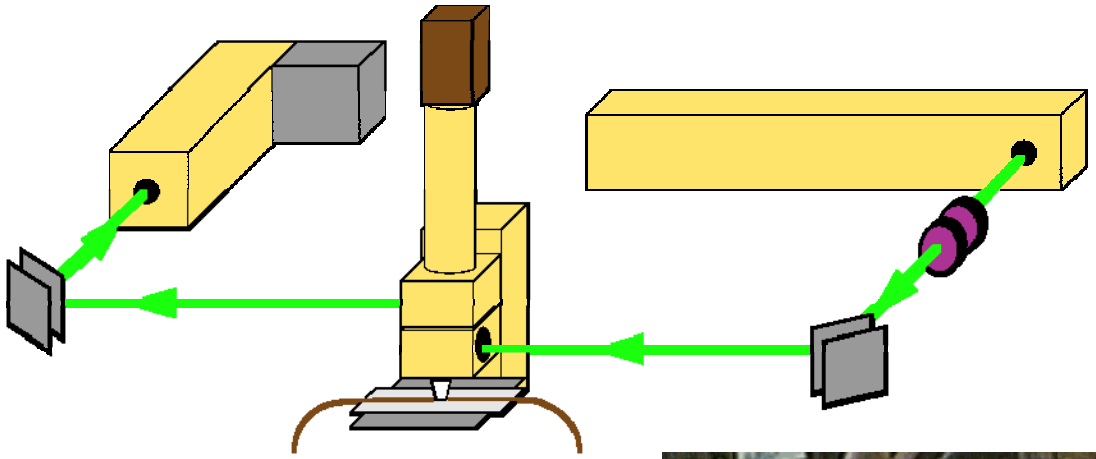


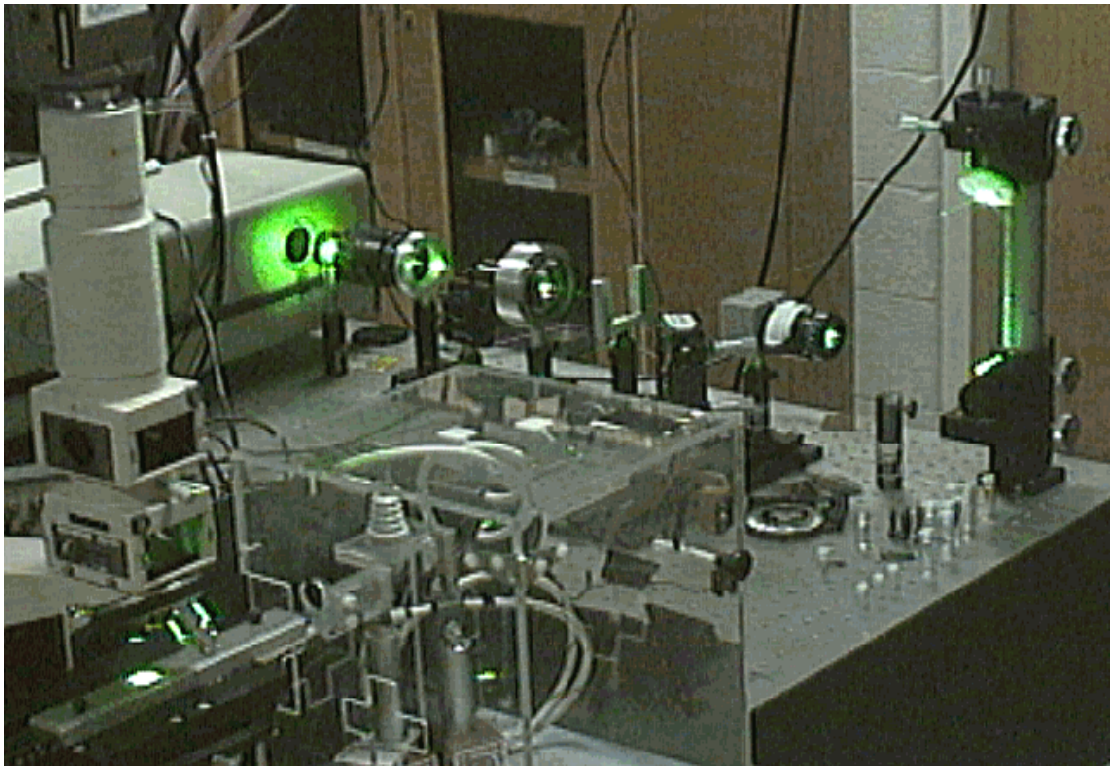


možnost studia vzorků *in vivo*
„biomedical“ aplikace,
buněčné vzorky, excitace
NIR, 785 nebo 830 nm aby
se minimalizoval možný vliv
fluorescence

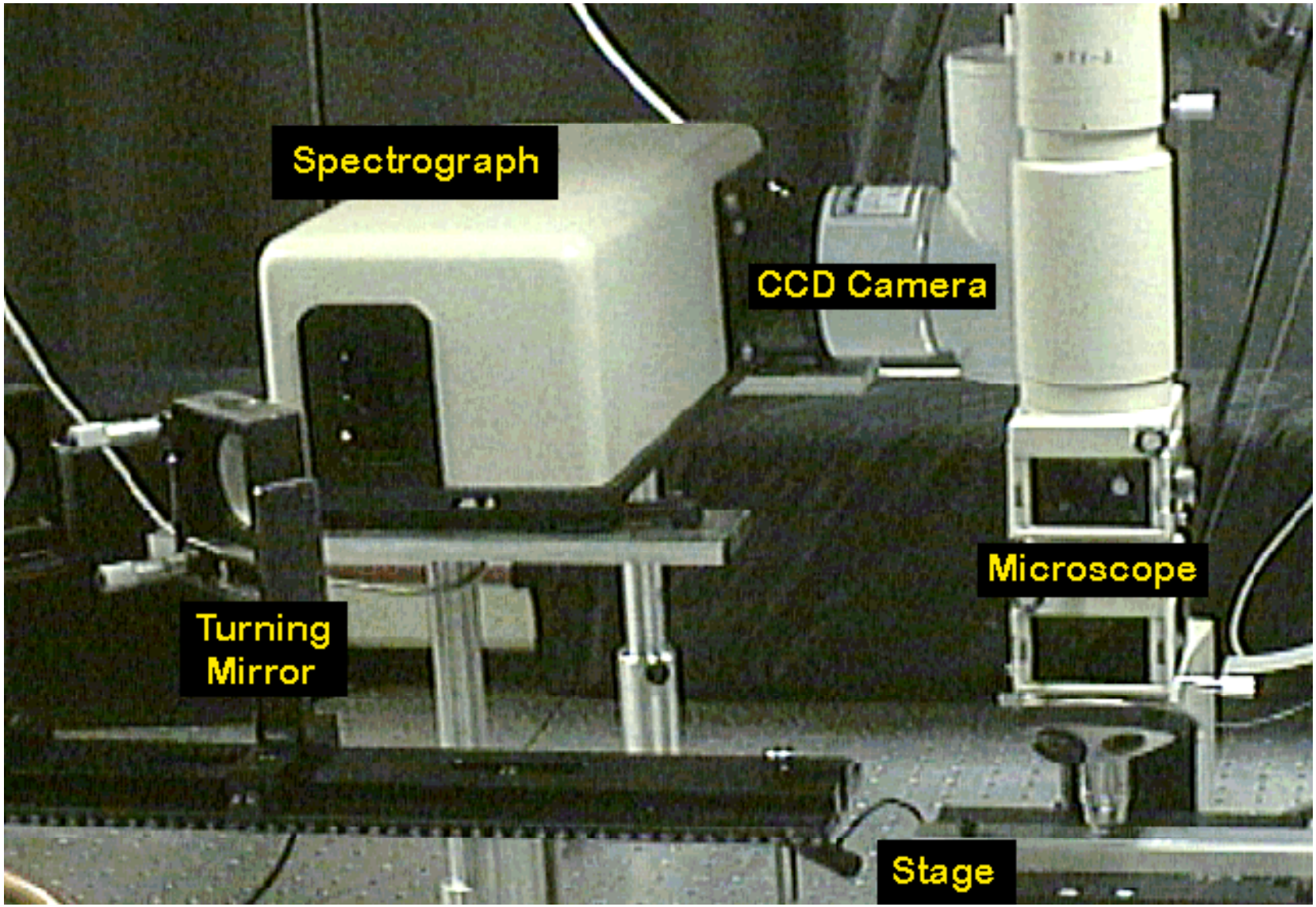


Ramanův mikrospektrometr

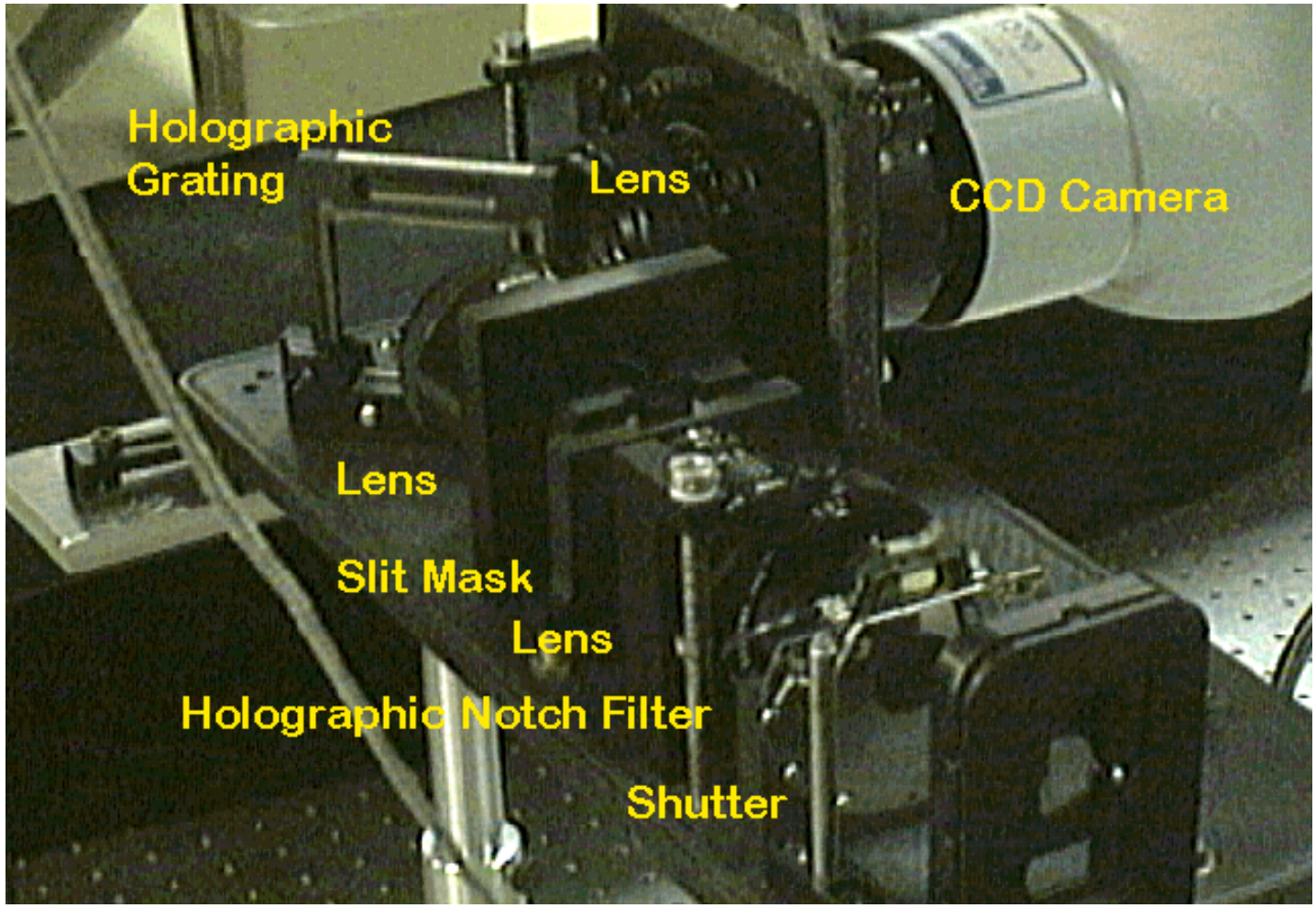




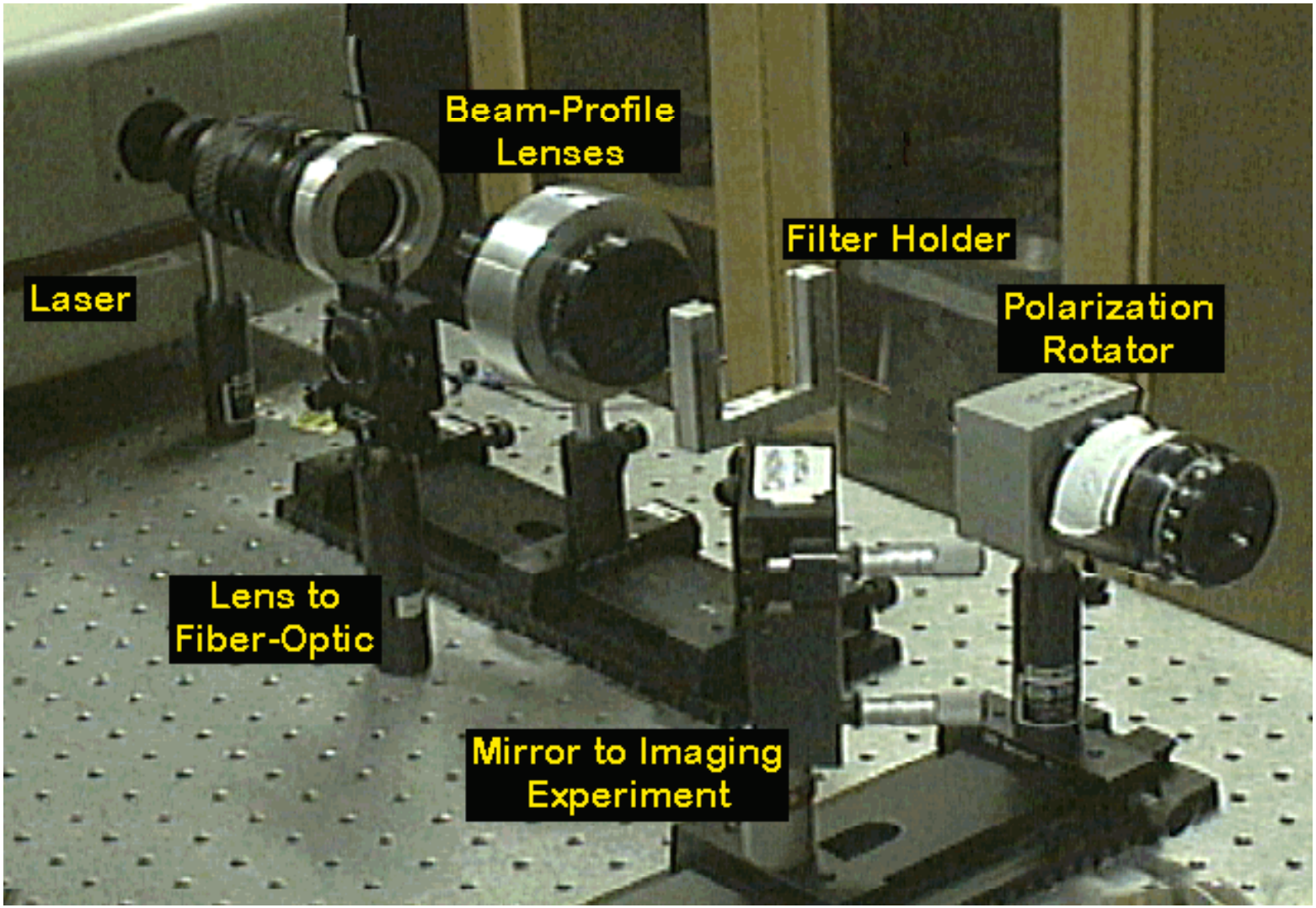
Ramanův mikrospektrometr



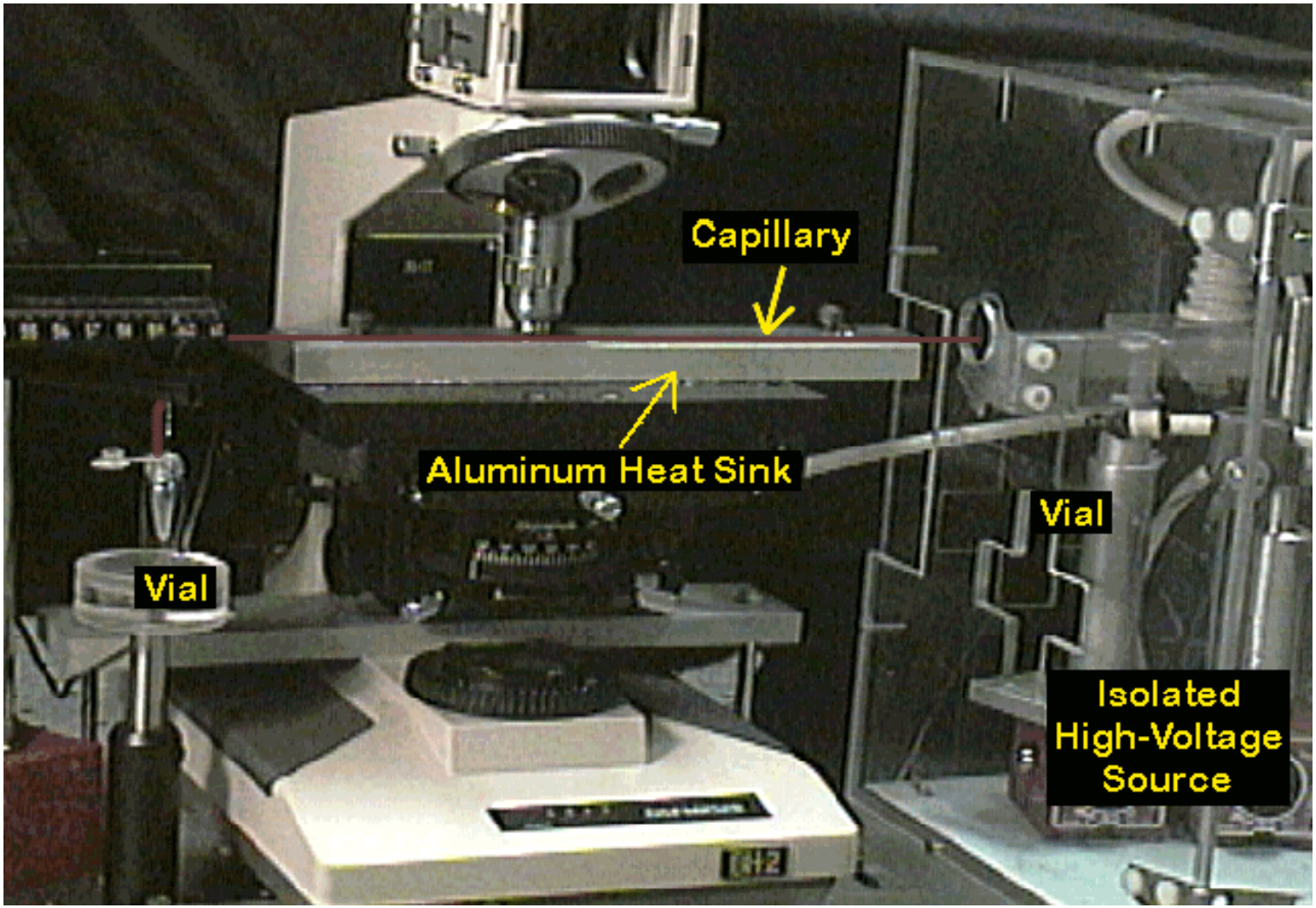
Ramanův mikrospektrometr



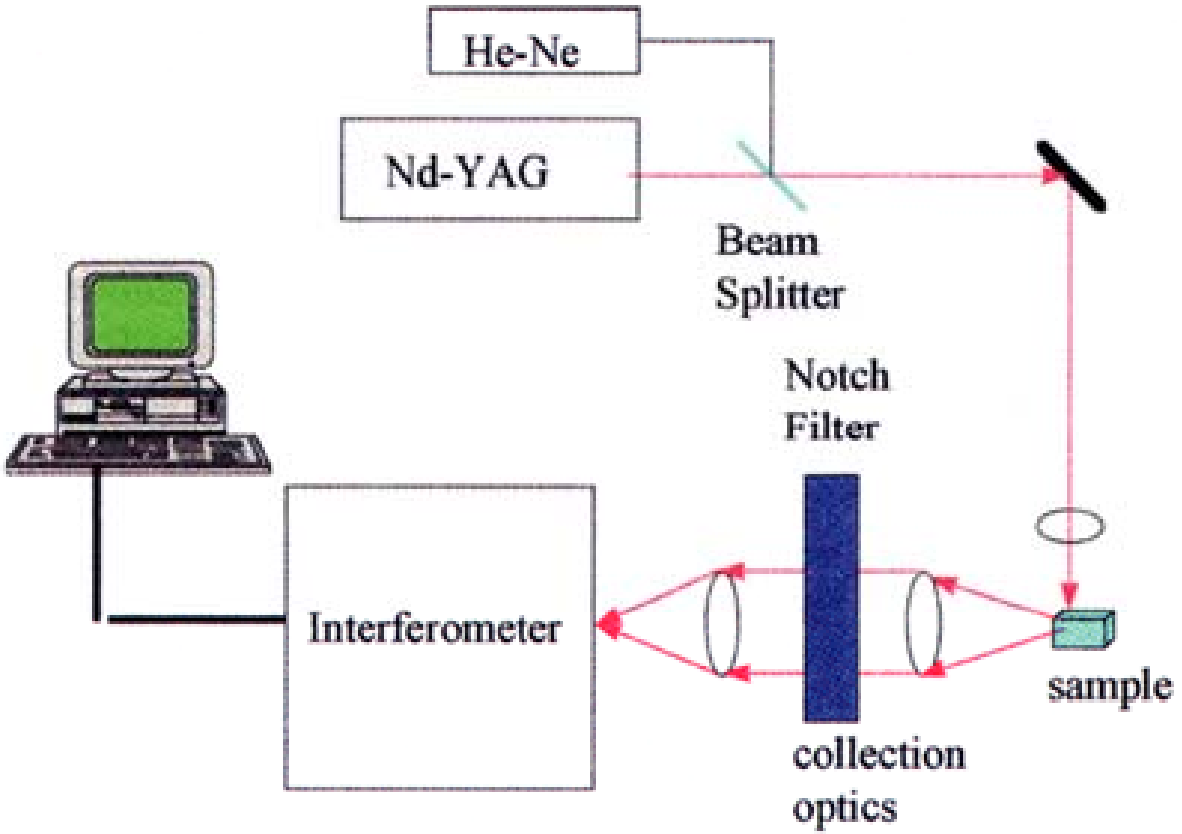
Ramanův mikrospektrometr – optická část



Ramanův mikrospektrometr – dílčí pohled

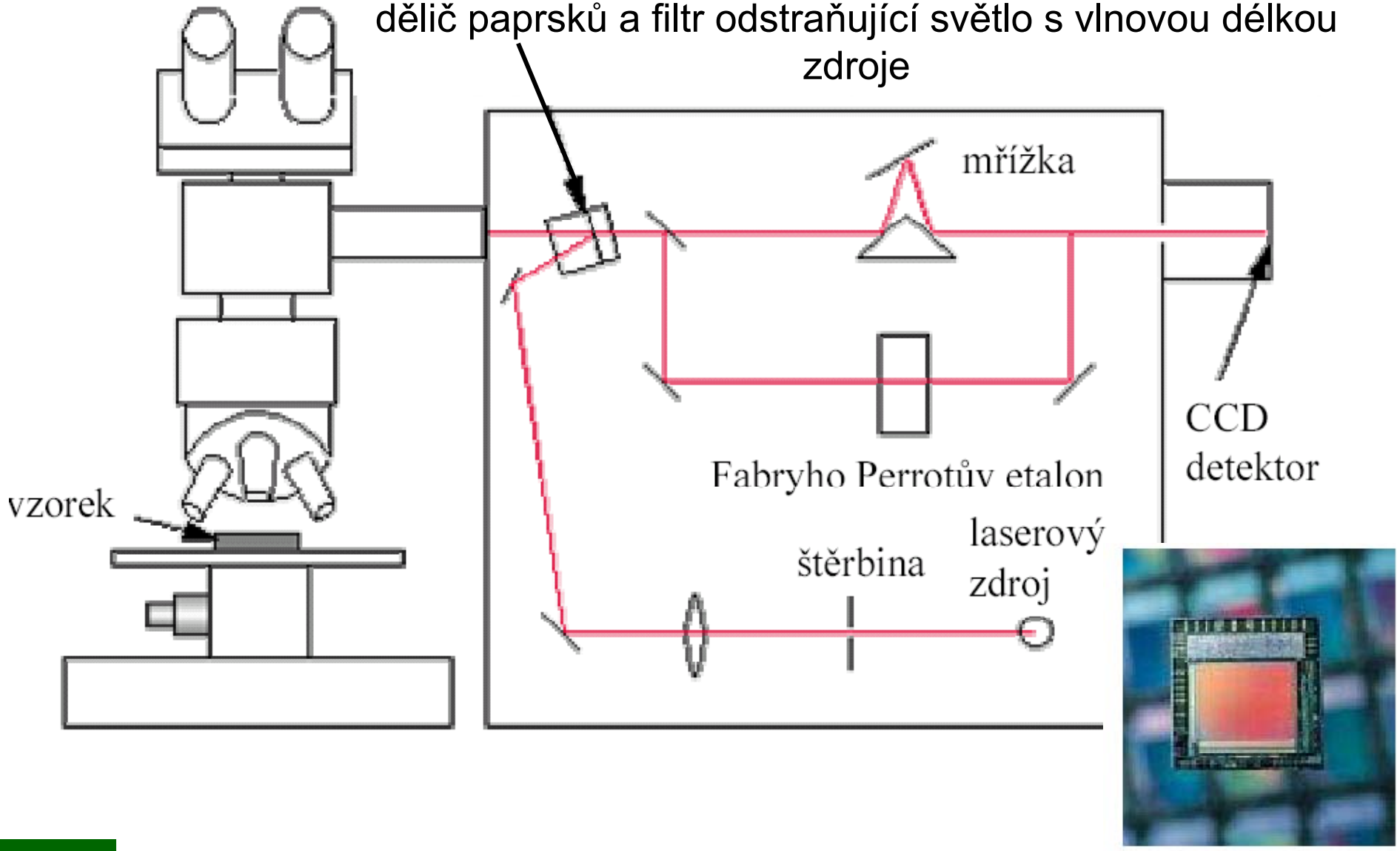


Optické schéma FT Ramanova spektrometru



dobře eliminuje fluorescenci, Nd:YAG 1064 nm, „notch“ filtr pro odstranění Rayleighova rozptylu

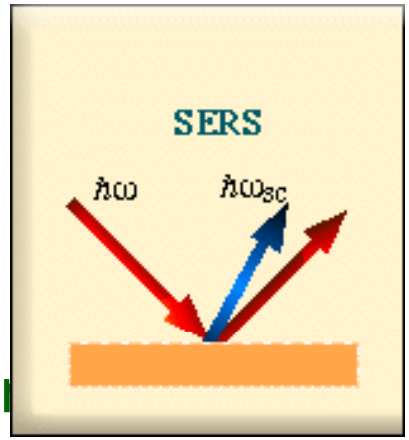
FT Ramanův mikrospektrometr



Rezonanční Ramanova spektroskopie

- je-li vlnová délka excitujícího záření blízká vlnové délce absorpčního pásu molekuly, dochází k tzv. rezonančnímu (stimulovanému) Ramanovu efektu, který způsobí zvýšení intenzity Ramanova rozptylu až o 6 řádů
- metoda se používá pro analýzu látek absorbujících viditelné záření nebo NIR, např. metaloporfyrinů, karotenoidů, biochemických látek, polymerů
- vibrace, jejichž pásy RRS zesílí se dělí na
  - Franck-Condonovo zesílení
  - „ring breathing“
  - „vibronic enhancement“

Surface-Enhanced Raman Scattering



- Ramanův rozptyl sloučenin nebo iontů adsor
  na povrchu nebo těsně pod povrchem metalické podložky může být 10^3 až 10^6 krát intenzivnější než rozptyl těchto látek v roztoku
- zesílení tímto jevem je nejsilnější, je-li podložkou stříbro, ale je dobře pozorovatelný i na zlatě nebo mědi
- molekuly s izolovaným párem elektronů nebo delokalizovanými π jeví nejsilnější SERS. Jev byl objeven na pyridinu; látky s karboxylovou skupinou jsou pro tuto metodu nejcitlivější

SERS

- intenzita závisí na morfologii kovu na povrchu
- vlnová délka odpovídající přechodu kovů do plasmatického stavu („plasma wavelength of the metal surface“) je 382 nm pro částice Ag velikosti asi 5 mikrometrů, ale může být až 600 nm pro větší elipsoidální částice stříbra. Pro Cu a Au je tato vlnová délka asi 650 nm. Nejlepších výsledků je dosahováno pro částice kovu menší než 100 nm nebo atomárně hladký povrch podložky.
- tato metoda umožňuje sledovat Ramanova spektra vzorků mikromolárních koncentrací

Vysvětlení zesílení intenzity při SERS

dva mechanismy

zesílení elektromagnetického pole na povrchu kovu

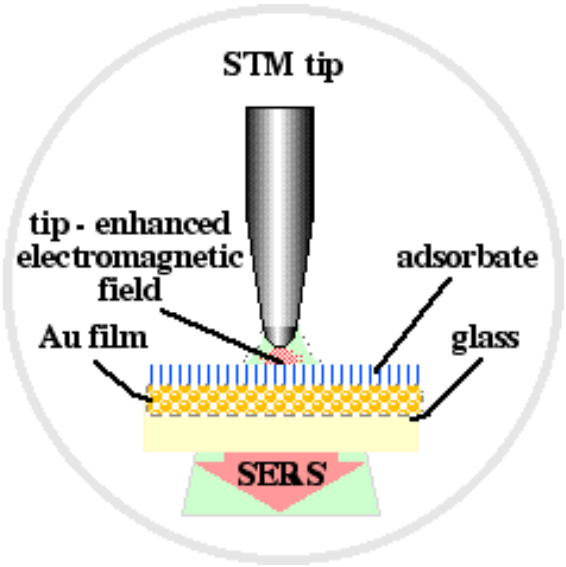
Je-li vlnová délka laseru blízká vln. délce plasmatu kovu, vodivostní elektrony na povrchu kovu jsou excitovány do stavu „surface plasmon resonance“. Molekuly zkoumané látky adsorbované v jejich blízkosti jsou ovlivněny mimořádně silným elektromagnetickým polem.

vytvoření charge-transfer komplexu mezi kovem na povrchu a analyzovanou molekulou

Elektronické přechody mnoha CT komplexů jsou ve viditelné oblasti spektra a tak se vlastně posílí rezonanční Ramanův rozptyl

TERS - Tip Enhanced Raman Spectroscopy

modifikace metody SERS na hladké kovové podložce použitím hrotu k enormnímu lokálnímu zesílení elektromagnetického pole v blízkosti vzorku

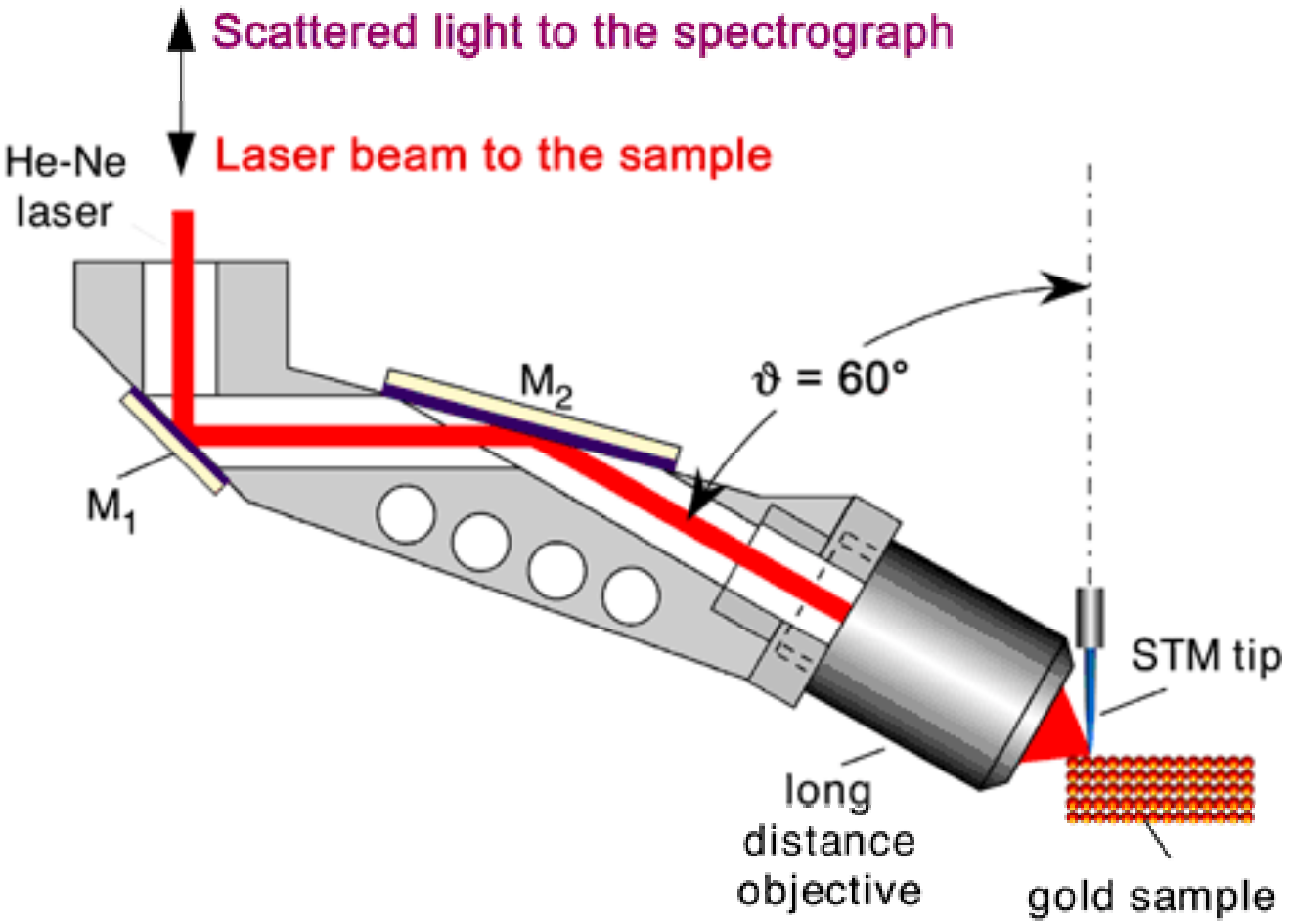


zesílení až 10^7 krát

↓

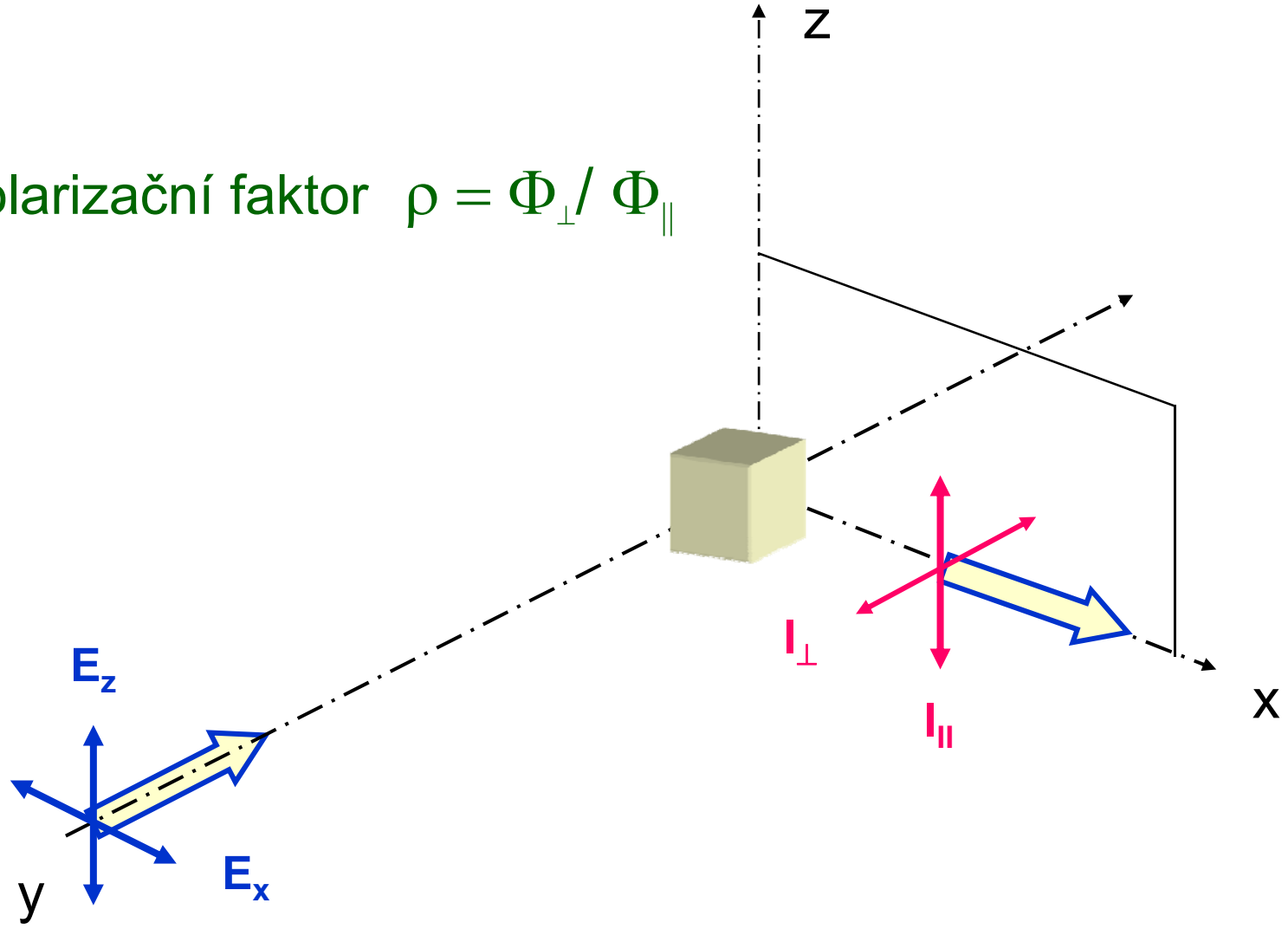
možnost tzv. „single molecule Raman Spectroscopy“

TERS - Tip Enhanced Raman Spectroscopy



Depolarizace Ramanových spekter

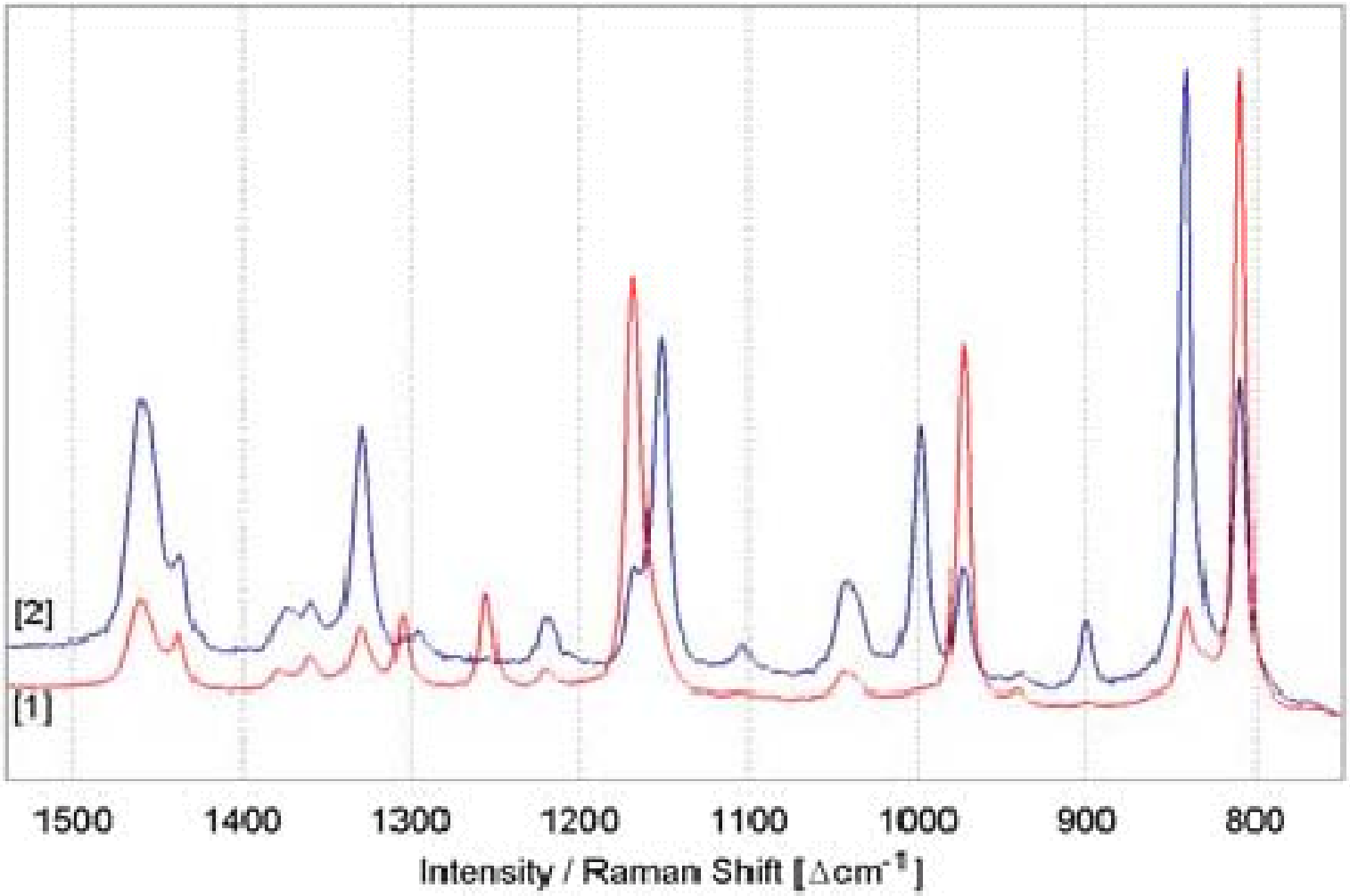
depolarizační faktor $\rho = \Phi_{\perp} / \Phi_{||}$



Depolarizace Ramanových spekter

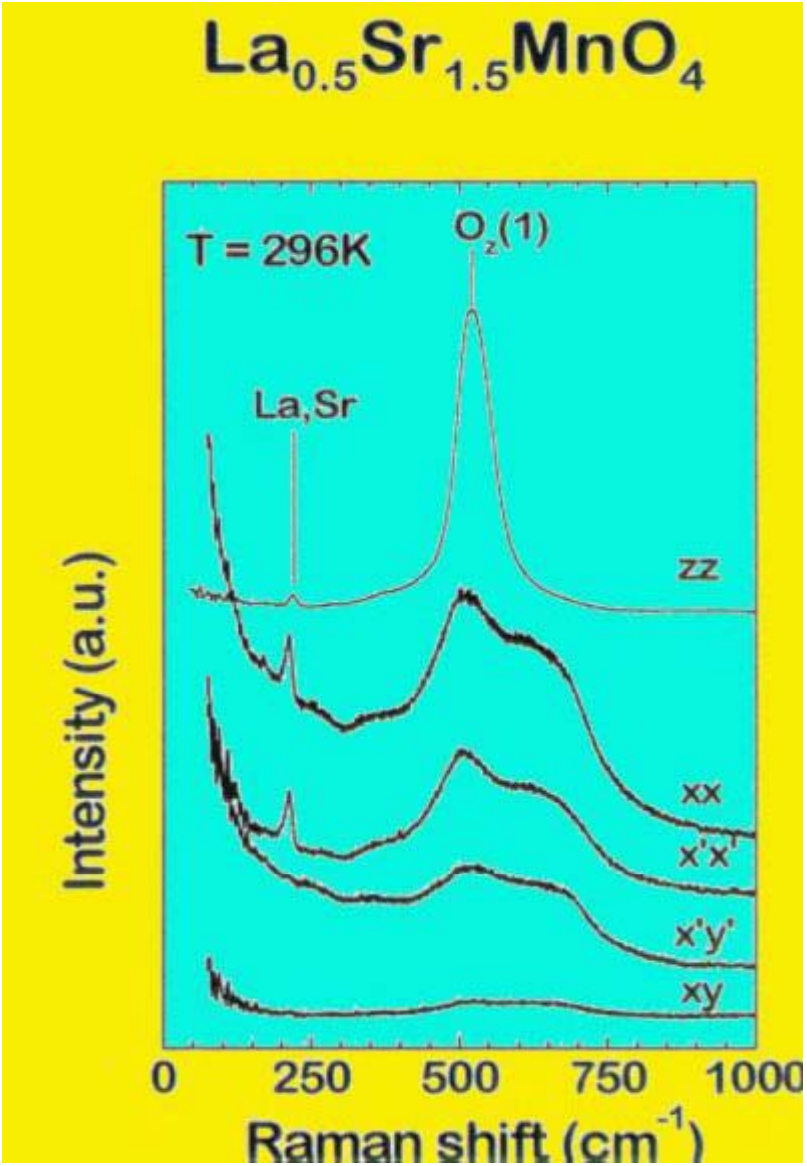
- pro nepolarizovanou excitaci ρ_n , pro lineárně polarizované excitující záření ρ_l
- nesymetrické vibrace: $\rho_n = 6/7$ $\rho_l = 0{,}75$
- symetrické vibrace: $0 < \rho_n < 6/7$ $0 < \rho_l < 0{,}75$
- plně polarizované Ramanovy linie $\rho = 0$
- částečně polarizované Ramanovy linie $0 < \rho < \rho_{max}$
- depolarizované Ramanovy linie, $\rho = \rho_{max}$

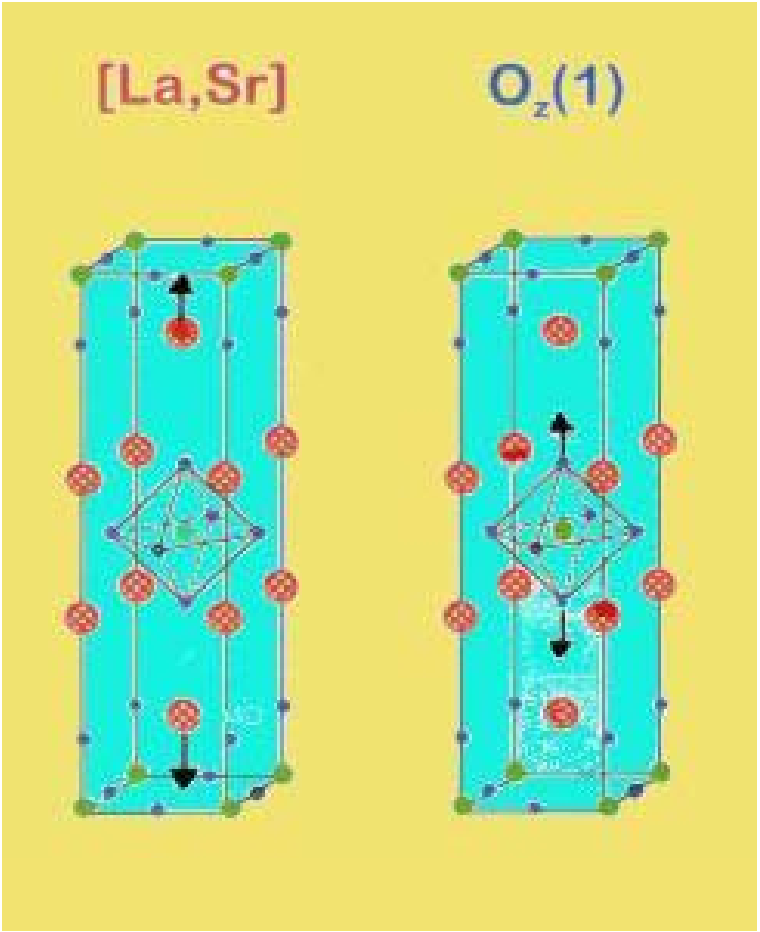
Studium vysoce orientovaných PP vláken



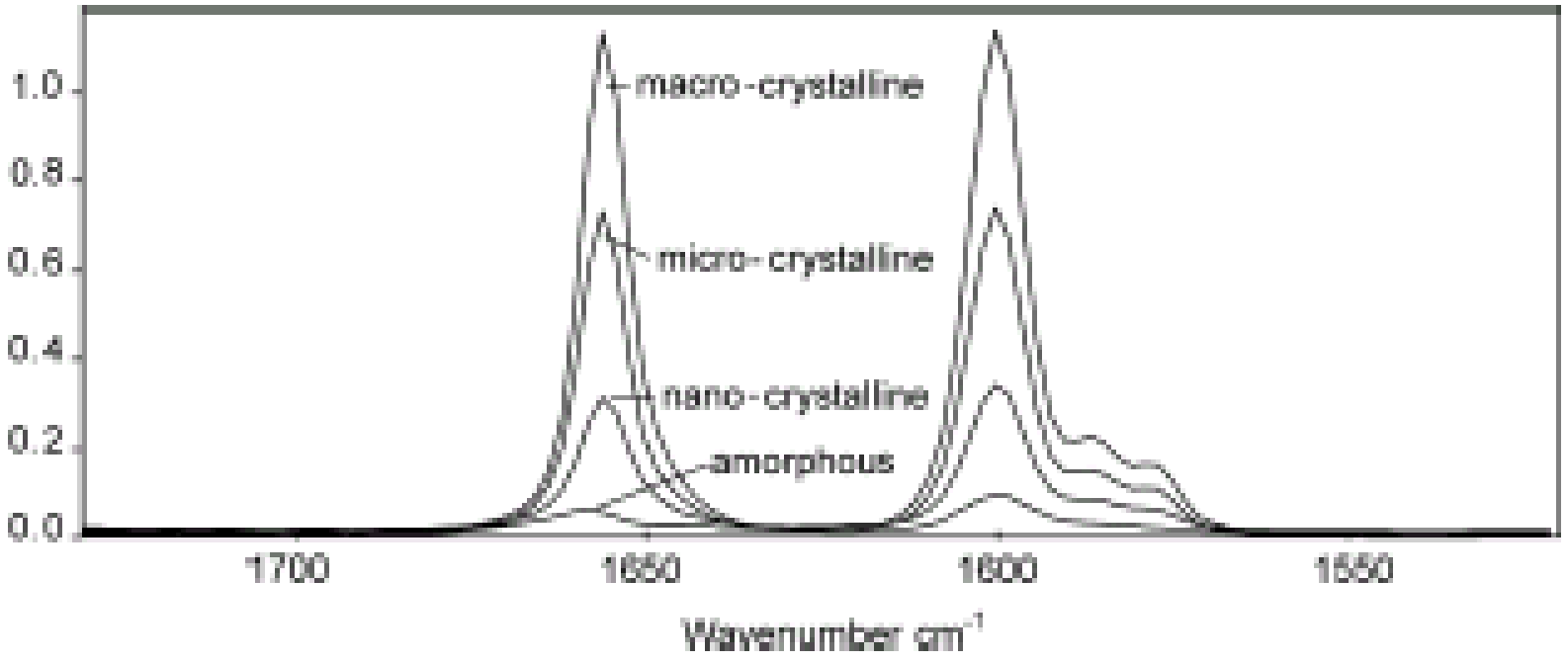
vlákna orientována rovnoběžně (1) a kolmo (2) vzhledem k polarizaci laserového paprsku (He-Ne laser)

Ramanův rozptyl na krystalických vzorcích





monokrystaly

Ramanův rozptyl na krystalických vzorcích

Část FT-Ramanových spekter vzorků ketoprofenu lišících se velikostí krystalů