

# Ramanova spektroskopie

## C6250 Metody chemické výzkumu

Zdeněk Moravec, C12/316, hugo@chemi.muni.cz

- Základní principy Ramanovy spektroskopie
  - Ramanův rozptyl
  - Polarizovatelnost
- Ramanovy spektrometry a mikroskopy
- Využití Ramanovy spektroskopie v praxi
- Aplikace
  - Chemie
  - Restaurování uměleckých předmětů
  - Biologie
- Informace o přístrojovém vybavení UCH

# Ramanův rozptyl

- Při interakci elektromagnetického záření s hmotou může dojít k absorpci, přenosu a rozptylu.
- Rozptyl může být pružný a nepružný.
- Při pružném rozptylu nedochází k výměně energie mezi zářením a hmotou. Tento byl popsán britským fyzikem Lordem Rayleighem, po němž je pojmenován.<sup>1</sup>
- Při nepružném rozptylu naopak k výměně energie mezi zářením a hmotou dochází. Tento jev byl popsán v roce 1928 Sirem Chandrasekhara Venkata Ramanem. Pojmenován byl po objeviteli *Ramanův efekt nebo Smekalův-Ramanův efekt*. Za tento objev obdržel sir Raman Nobelovu cenu za fyziku v roce 1930.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup><http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/atmos/blusky.htm#c2>

<sup>2</sup>[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1930/raman-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman-lecture.pdf)

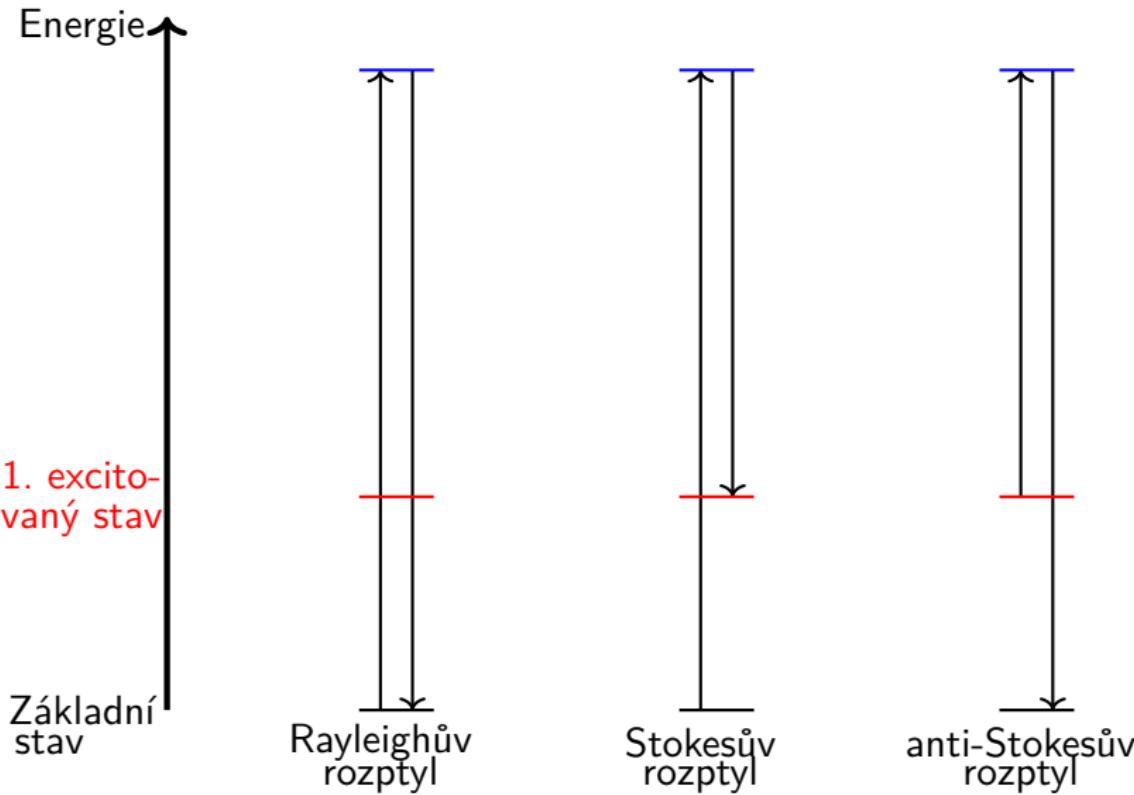
# Ramanův rozptyl

- Ramanův efekt může být popsán jako nepružná srážka fotonu s molekulou, jejímž výsledkem je změna vibračního nebo rotačního stavu molekuly.<sup>3</sup>
- *Stokesův rozptyl*: vzorek přijme část energie od záření a emituje foton s nižší energií.
- *anti-Stokesův rozptyl*: vzorek ztratí část energie a emituje foton s vyšší energií.
- Stokesovy linie jsou intenzivnější než anti-Stokesovy. Poměr intenzit je teplotně závislý, čehož lze využít pro měření teploty.
- $$\frac{I_{as}}{I_s} = \frac{(\nu_i + \nu)^4}{(\nu_i - \nu)^4} e^{-\frac{h\nu_i}{kT}}$$
- Hodnota Ramanova posunu je *nezávislá* na energii (vlnové délce) použitého laseru.

---

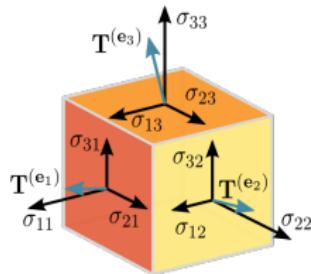
<sup>3</sup>Malíšek V.: "Rozptyl světla - nejvšeobecnější jev v přírodě, nebo div moderní optiky?", str. 62-64

# Ramanův rozptyl



# Polarizovatelnost

- Polarizovatelnost ( $\alpha$ ) popisuje deformovatelnost elektronové hustoty v okolí molekuly působením elektromagnetického záření, nebo přesněji elektrického pole generovaného fotonem.<sup>4,5,6</sup>
- Je to *tensor druhého řádu*, tzn. že ji lze popsat maticí  $3 \times 3$ .<sup>7</sup>



$$\alpha = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix}$$

Složky tensoru polarizovatelnosti.<sup>8</sup>

<sup>4</sup><https://en.wikipedia.org/wiki/Polarizability>

<sup>5</sup>[http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical\\_Chemistry/Physical\\_Properties\\_of\\_Matter/Intermolecular\\_Forces/Polarizability](http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/Intermolecular_Forces/Polarizability)

<sup>6</sup>Animace - polarizovatelnost

<sup>7</sup><https://en.wikipedia.org/wiki/Tensor>

<sup>8</sup>Zdroj: Sanpaz/Commons

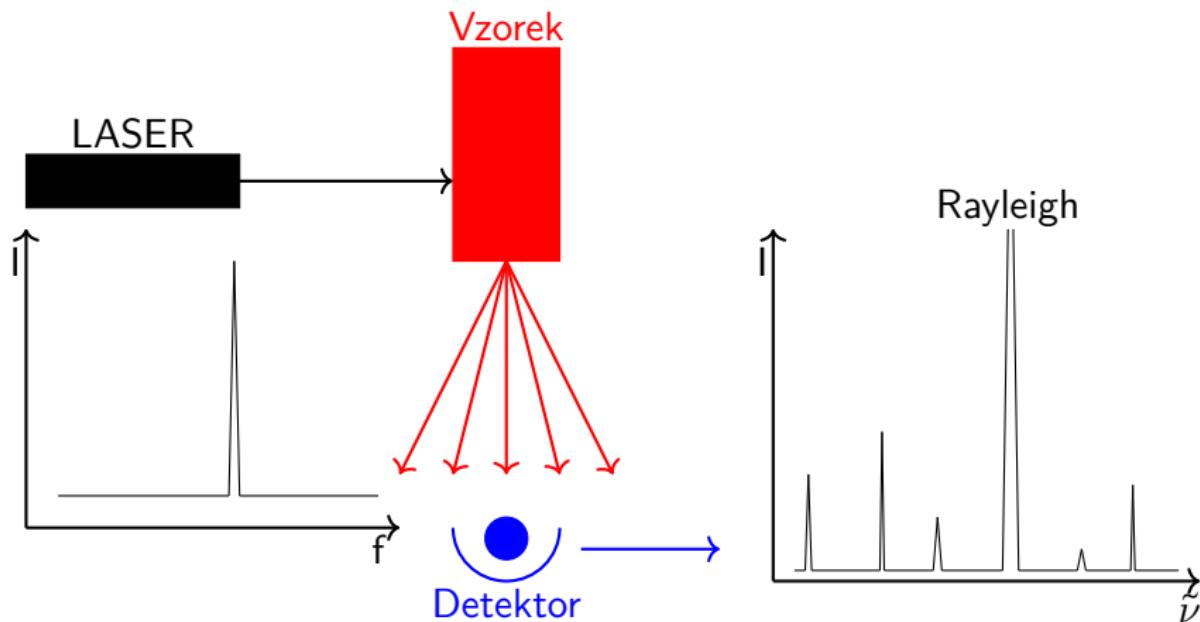
# Polarizovatelnost

- Polarizovatelnost ( $\alpha$ ) je ovlivněna několika faktory:
  - Čím více elektronů má atom, tím slaběji je k sobě váže a tím je polarizovatelnost větší.
  - Čím je elektron více vzdálen od kladného jádra, tím je pohyblivější a zvyšuje polarizovatelnost atomu.
  - Orientací molekuly vůči vnějšímu elektrickému poli.
- Ramanův rozptyl lze popsát rovnicí pro indukovaný dipólový moment:
- $\vec{p} = \alpha \vec{E} \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{\delta\alpha}{\delta q} q \vec{E} \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t] \}$
- První člen odpovídá Rayleighovu rozptylu, druhý a třetí pak Ramana (Stokes a anti-Stokes).

# Ramanova spektroskopie

- Ramanova spektroskopie je komplementární metodou k infračervené spektroskopii.
- Citlivost je nižší než v případě IR spektroskopie.
- Je vhodnější pro nepolární vazby a umožňuje pozorovat vibrace i na nižších vlnočtech ( $<400\text{ cm}^{-1}$ ).
- Umožňuje snadné měření vodních roztoků (voda poskytuje slabý signál).
- Aby byla vibrace aktivní v IR spektroskopii, musí během ní docházet ke změně vektoru dipólmomentu molekuly.
- Aby byla vibrace aktivní v Ramanově spektroskopii, musí během ní docházet ke změně *tensoru polarizovatelnosti* molekuly (viz rovnice na předchozím slidu).
- Pokud má molekula *střed symetrie*, mohou být vibrace aktivní buď v IR nebo v RA, ale ne v obou zároveň.

# Ramanova spektroskopie

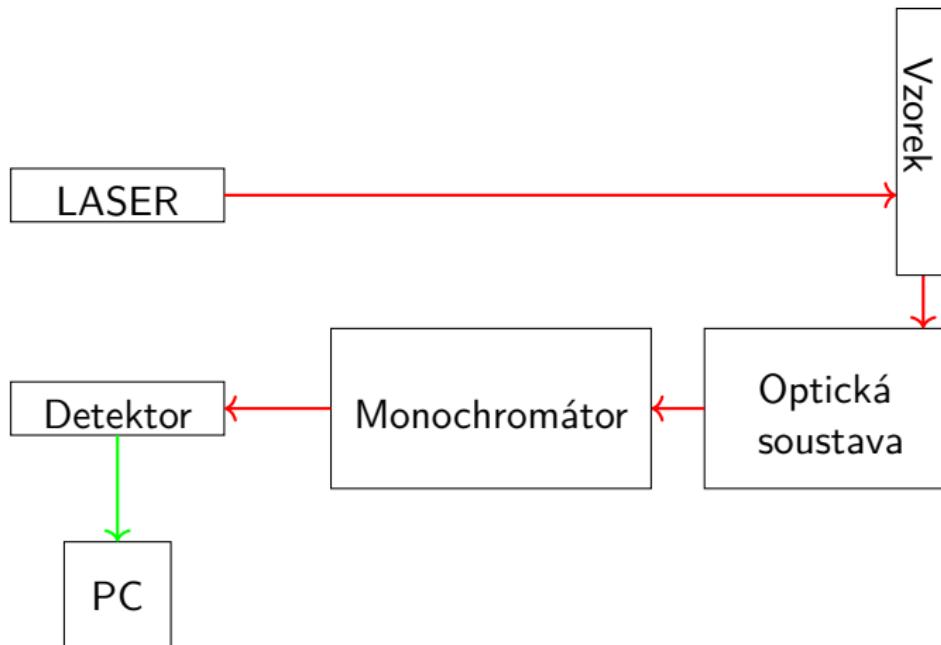


# Spektrometry

- Podle optické soustavy
  - Disperzní
  - FT-Raman
  - Mikroskopy
- Podle vlnové délky laseru
  - UV
  - VIS
  - NIR

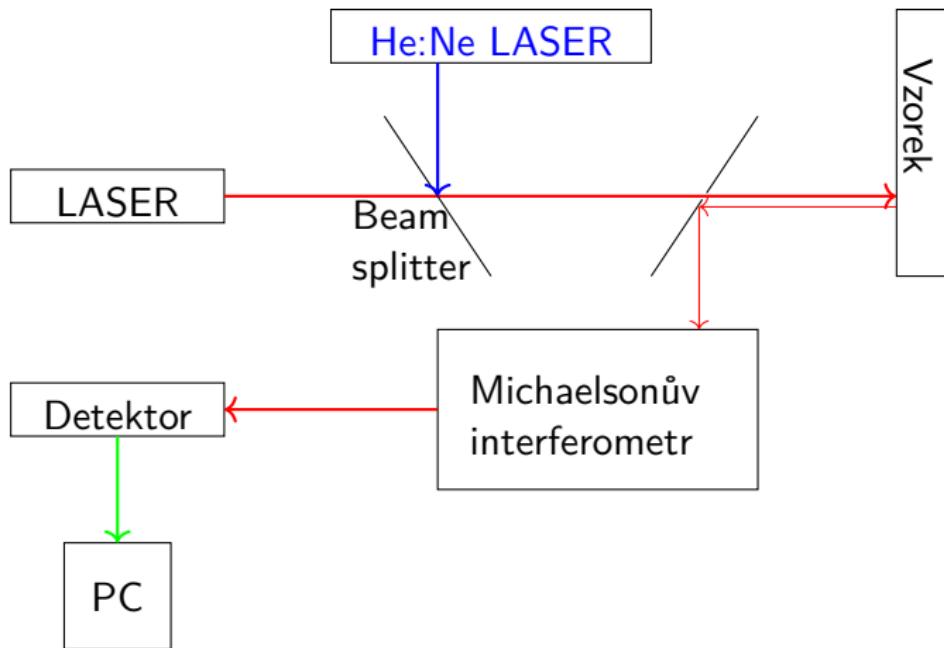
# Spektrometry

## Disperzní spektrometry



# Spektrometry

## FT-RA spektrometry

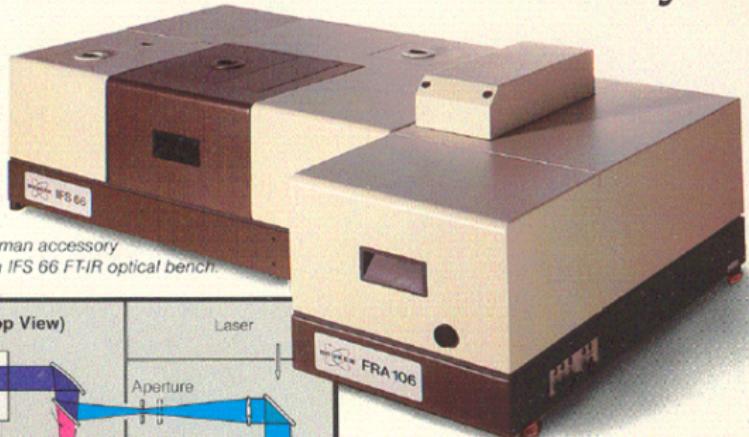


# Spektrometry

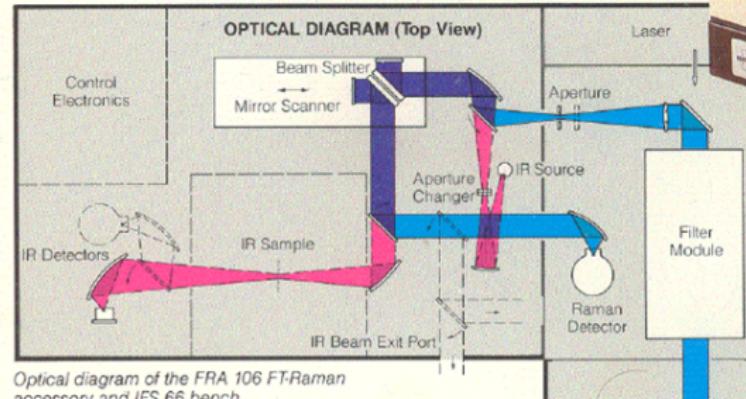
## FT-RA spektrometry

### The Bruker FRA 106 FT-Raman Accessory.

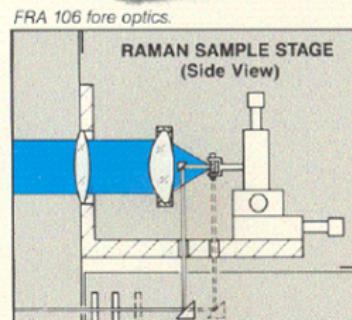
The FRA 106 enables the analyst to routinely collect essentially fluorescence-free Raman data without sample preparation.



FRA 106 FT-Raman accessory  
mounted on an IFS 66 FT-IR optical bench.



Optical diagram of the FRA 106 FT-Raman accessory and IFS 66 bench.



# Spektrometry

## LASER

- Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.
- Zesilování světla stimulovanou emisí záření.<sup>9</sup>
- První laser byl sestrojen roku 1957, teoreticky byl předpovězen (resp. stimulovaná emise) již roku 1917 Albertem Einsteinem.<sup>10</sup>
- Jde o koherentní a monochromatický zdroj záření.
  - Koherentní - na dlouhém úseku mezi jednotlivými vlnami paprsku existuje pevná časová a prostorová vazba fáze.
  - Monochromatický - obsahuje pouze jednu vlnovou délku.
- Používají se lasery v oblasti UV, VIS a NIR.
- Často používané vlnové délky jsou 457, 532 a 1064 nm.

---

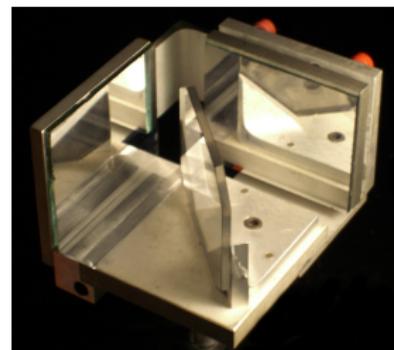
<sup>9</sup>VRBOVÁ, Miroslava. *Lasery a moderní optika*. Praha : Prometheus, 1994. 474 s.  
ISBN 80-85849-56-9.

<sup>10</sup>Zur Quantentheorie der Strahlung

# Spektrometry

## Michelsonův interferometr

- Autorem je americký fyzik Albert A. Michelson.
- Skládá se z beam splitteru a dvou zrcadel.<sup>11</sup>
- Jedno ze zrcadel se pohybuje konstantní rychlostí po dráze kolmé k jeho ploše.
- Interferometr moduluje vstupující záření plynulou změnou rozdílu délky drah paprsků.<sup>12</sup>



Michelsonův interferometr.<sup>13</sup>

<sup>11</sup><http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/michel.html>

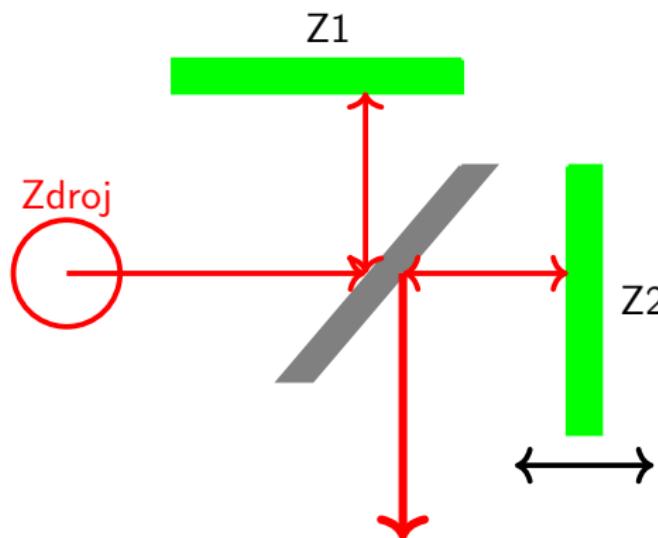
<sup>12</sup>Interferometer – animation

<sup>13</sup>Zdroj: Falcorian/Commons

# Spektrometry

## Michelsonův interferometr

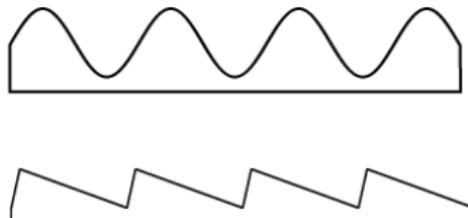
Beamsplitter (BS) rozděluje paprsek ze zdroje na dva stejné paprsky. Jeden je odražen na nepohyblivé zrcadlo (Z1), od kterého se odrazí zpět. Druhý projde BS a dopadne na pohyblivé zrcadlo (Z2). Oba paprsky dopadnou zpět na BS, kde interferují a výsledný paprsek je znova zčásti odražen k detektoru a z části projde BS směrem ke zdroji. Intenzita výsledného paprsku je závislá na rozdílu vzdáleností obou zrcadel od BS.



# Spektrometry

## Monochromátor

- Nejčastěji se využívá *difrakční mřížka*.<sup>14</sup>
- Rozkládá dopadající světlo na vlnové délky.
- Skládá se z velkého počtu štěrbin nebo vrypů, na nichž dochází k difrac-  
ci.
- Hustota vrypů na mřížce je řádově stovky vrypů na centimetr.
- Hustota vrypů a kvalita mřížky ovlivňuje rozlišení naměřeného spek-  
tra.

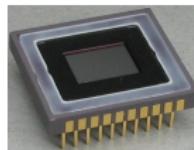


<sup>14</sup>Optická mřížka

# Spektrometry

## Detektor

- Jednokanálové detektory (Single-channel)
  - Fotonásobič<sup>15</sup>
- CCD - Charged Coupled Device
  - Vícekanálový detektor (Multi-channel).
  - Disperzní spektrometry.
  - Pracuje za laboratorní teploty nebo pro zvýšení citlivosti (snížení šumu) za teploty kapalného dusíku.
  - Parametry CCD (velikost pixelu) určují rozlišení naměřeného spektra.



CCD čip<sup>16</sup>



Fotonásobič<sup>17</sup>

<sup>15</sup>Animace fotonásobiče

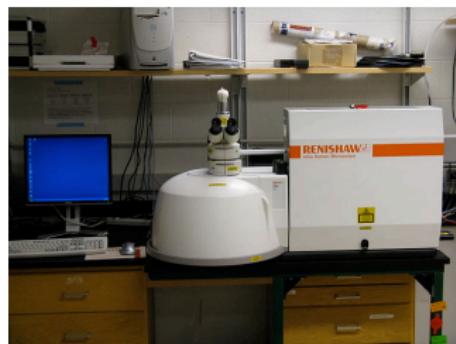
<sup>16</sup>Zdroj: Sphl/Commons

<sup>17</sup>Zdroj: Poil/Commons

# Spektrometry

## Ramanova mikroskopie

- První Ramanův mikroskop byl vyvinut v 70. letech 20. století.
- Umožňuje nedestruktivně měřit spektra i od větších vzorků.
- Umožňuje velmi přesně zaměření LASERu na požadované místo, příp. i mapování části povrchu vzorku.
- Velmi výhodný pro analýzu uměleckých předmětů, biologických vzorků, apod.



Ramanův mikroskop.<sup>18</sup>

<sup>18</sup>Zdroj: Matzger Lab/Commons

# SERS — Surface-Enhanced Raman Spectrometry

- Tento jev byl poprvé pozorován a interpretován roku 1977.
- Technika, umožňující zesílení Ramanova rozptylu na molekulách adsorbovaných na kovovém substrátu.<sup>19,20</sup>
- Zesílení signálu může být řádově až  $10^{11}$ , tzn. že teoreticky lze detektovat jedinou molekulu.<sup>21</sup>
- Mechanismus není dosud detailně objasněn, pravděpodobně jde o zvětšení vlivem elektrického pole substrátu.
- Využití SERS v praxi
  - Detekce extrémně malých množství chemikalií.
  - Analýza vzácných uměleckých děl - pro analýzu stačí méně než  $\mu\text{g}$  vzorku.

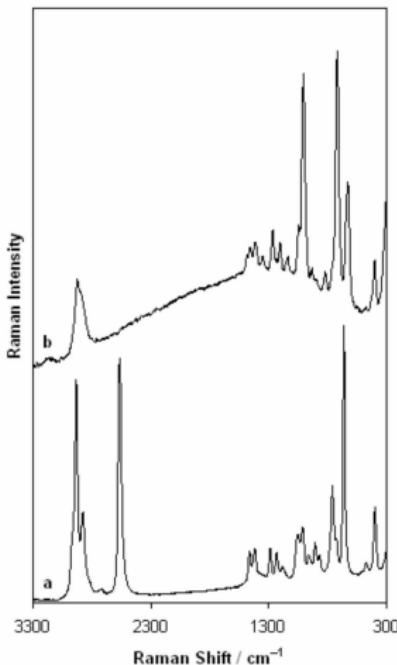
---

<sup>19</sup>Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode

<sup>20</sup>Surface-Enhanced Raman Spectra of Pyridine and Pyrazine Adsorbed on a Au(210) Single-Crystal Electrode

<sup>21</sup>Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors

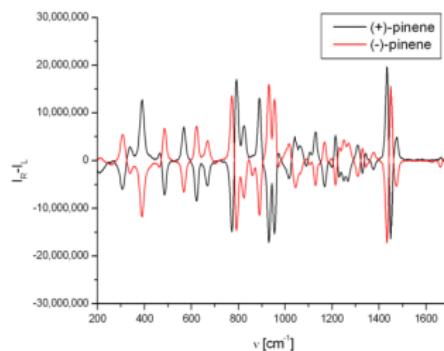
# SERS — Surface-Enhanced Raman Spectrometry



Ramanovo spektrum 2-merkaptoethanolu ( $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ): a) kapalina, b)  
SERS, 10 mM roztok na stříbrném substrátu.<sup>22</sup>

# Ramanova optická aktivita

- Měřící technika, kdy zaznamenáváme rozdíl v intenzitách Ramanova rozptylu pravo-a levotočivě polarizovaného záření na chirálních molekulách.
- Metodu lze využít pro stanovení enantiomerické čistoty, a to i u směsí několika chirálních látek.<sup>23</sup>
- V současnosti nachází velké využití při studiu struktury biomolekul a jejich chování ve vodných roztocích.



ROA spektrum (+) a (-) pinenu.<sup>24</sup>

<sup>23</sup>Raman Optical Activity: A Powerful Technique to Investigate Essential Oil Components

<sup>24</sup>Zdroj: M.Pecul/Commons

# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

- *Farmacie, kosmetika*

- Rozložení sloučenin v tabletě
- Složení a čistota práškových produktů
- Krystalinita
- Koncentrace aktivních látek

- *Geologie*

- Identifikace minerálů a drahokamů
- Fázové přechody
- Chování minerálů v extrémních podmínkách

- *Polovodičový průmysl*

- Čistota
- Analýza defektů
- Fotoluminiscenční mikroanalýza
- Složení slitin

- *Přírodní vědy*

- Analýza DNA/RNA
- Analýza jednotlivých buněk
- Struktura kostí
- Interakce léčiva s buňkami

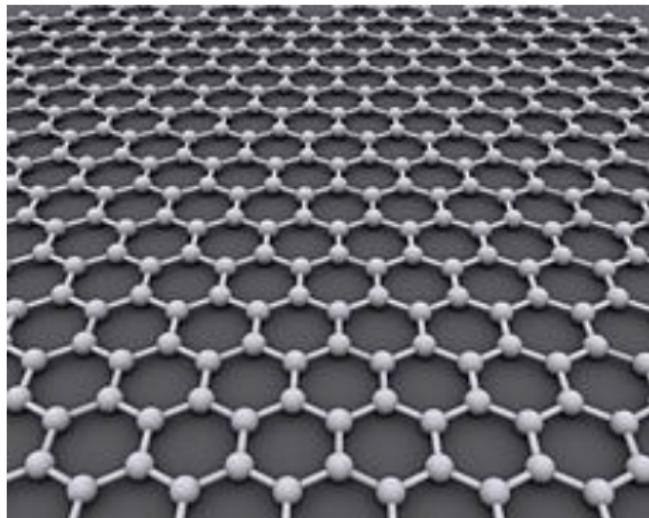
# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

- Pomocí Ramanovy spektroskopie lze studovat kvalitu grafenu a určit počet vrstev vzorku.<sup>25</sup>
- Pás D ( $1350\text{ cm}^{-1}$ ) odpovídá poruchám ve struktuře grafenu.
- Pás G ( $1583\text{ cm}^{-1}$ ) odpovídá valenčním vibracím vazeb C-C, najdeme ve všech systémech s  $\text{sp}^2$  uhlíky.
- V případě nečistot nebo výskytu náboje na povrchu grafenu, najdeme v blízkosti pásu G i méně intenzivní pás D' ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ).
- Pás G' v oblasti  $2500\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  se označuje jako 2D-pás, nalezneme ho u všech systémů s  $\text{sp}^2$  uhlíky.

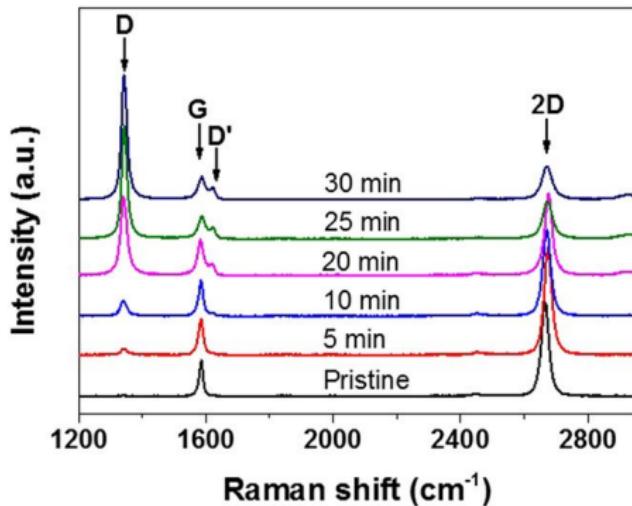
---

<sup>25</sup>Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers

# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi



Struktura grafenu.<sup>26</sup>



Ramanovo spektrum grafenu.<sup>27</sup>

<sup>26</sup>Zdroj: AlexanderAIUS/Commons

<sup>27</sup>Zdroj: Guodong Gao, Dandan Liu, Shangcheng Tang, Can Huang, Mengci He, Yu Guo, Xiudong Sun & Bo Gao/Commons

# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

## Analýza uměleckých předmětů

- Spektroskopická analýza uměleckých předmětů je velice důležitá pro konzervátory, historiky umění i sběratele.<sup>28,29</sup>
- Ramanova spektroskopie a mikroskopie se využívá pro:<sup>30</sup>
  - Identifikaci anorganických pigmentů
  - Identifikaci organických pigmentů
  - Identifikaci pojiv a lakov
- Větší předměty, např. nástěnné malby lze analyzovat s využitím optických vláken, aniž by hrozilo jejich poškození.<sup>31</sup>

---

<sup>28</sup><http://www.ndt.net/article/wcndt00/papers/idn163/idn163.htm>

<sup>29</sup>Raman spectroscopic database of azo pigments and application to modern art studies

<sup>30</sup>Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation

<sup>31</sup>Non-destructive analysis of museum objects by fibre-optic Raman spectroscopy



# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

## Analýza biologických vzorků

- Ramanovu spektroskopii lze využít jako neinvazivní, a přitom rychlou a přesnou metodu detekce karcinomu tlustého střeva.<sup>32</sup>
- Vzorky lze získat během diagnostické kolonoskopie.
- Analýza spekter byla provedena s využitím metod strojového učení.
- Oproti běžným diagnostickým metodám lze získat i další informace o složení tkání.

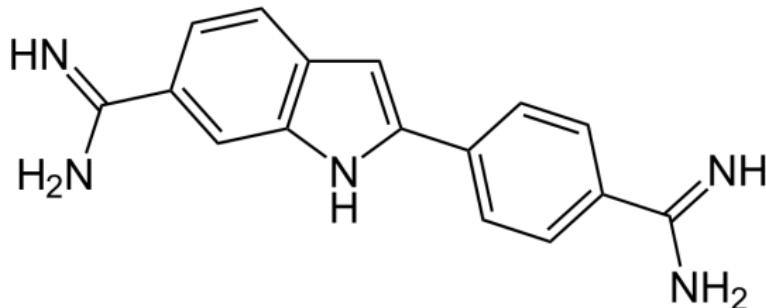
Pás [cm <sup>-1</sup> ]	Vibrační mód	Přiřazení
935	$\nu$ (CC)	proteiny, $\alpha$ -helix, Pro, Val
1005	$\delta$ (CC) dýchání kruhu	Phe
1050	$\nu$ (CN), $\nu$ (CO)	Pro
1077	$\nu$ (CC), $\nu$ (CO)	Glukóza, triglyceridy, lipidy
1126	$\nu$ (CN), $\nu$ (CC)	Proteiny, lipidy, fosfolipidy
1750	$\nu$ (C=O)	Lipidy, fosfolipidy

<sup>32</sup>In vivo Raman spectroscopy in the diagnostics of colon cancer

# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

## Analýza biologických vzorků

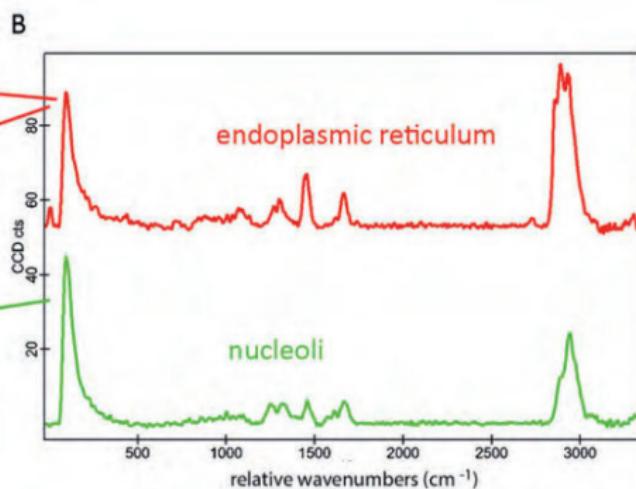
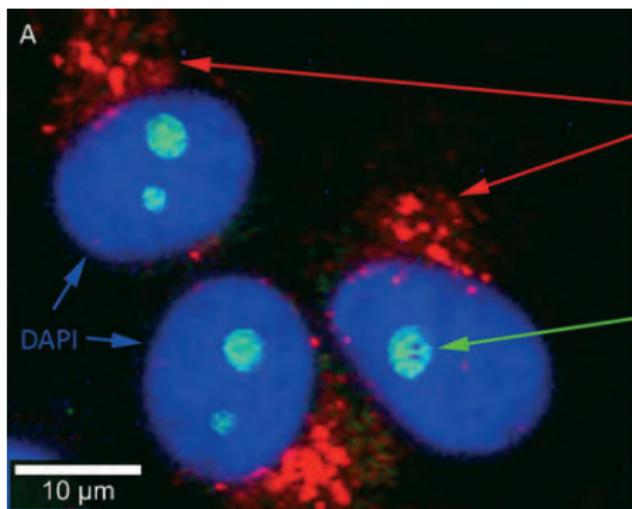
- S výhodou lze využít fluorescenční mikroskopu s Ramanovým spektrometrem.
- Na obrázku jsou buňky primátů obarvené fluorescenčním barvivem DAPI a příslušné Ramanovo spektrum.<sup>33</sup>
- Pro excitaci byl využit laser o vlnové délce 532 nm. Byl získán obrázek plochy  $50 \times 40 \mu\text{m}$ .
- Jádra buněk jsou znázorněna modře, jadérka zeleně a endoplazmatická retikula červeně.



<sup>33</sup>CHEMAGAZIN, 2019, 5, 22-23

# Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

## Analýza biologických vzorků



# Spektrometry na ústavu chemie

- IR spektrometry
  - MIR spektrometr Bruker IFS 28
  - FT-IR ( NIR+MIR) spektrometr Bruker Equinox IFS 55/S s Ramanovým nástavcem FRA 106/S
  - FT-IR ( NIR+MIR) spektrometr Bruker Tensor 27 s možností měření TG/IR
  - ATR Bruker Alpha Platinum
- RA spektrometry
  - FT-IR ( NIR+MIR) spektrometr Bruker Equinox IFS 55/S s Ramanovým nástavcem FRA 106/S
  - Mikro-ramanovský spektrometr Horiba – Labram HR Evolution

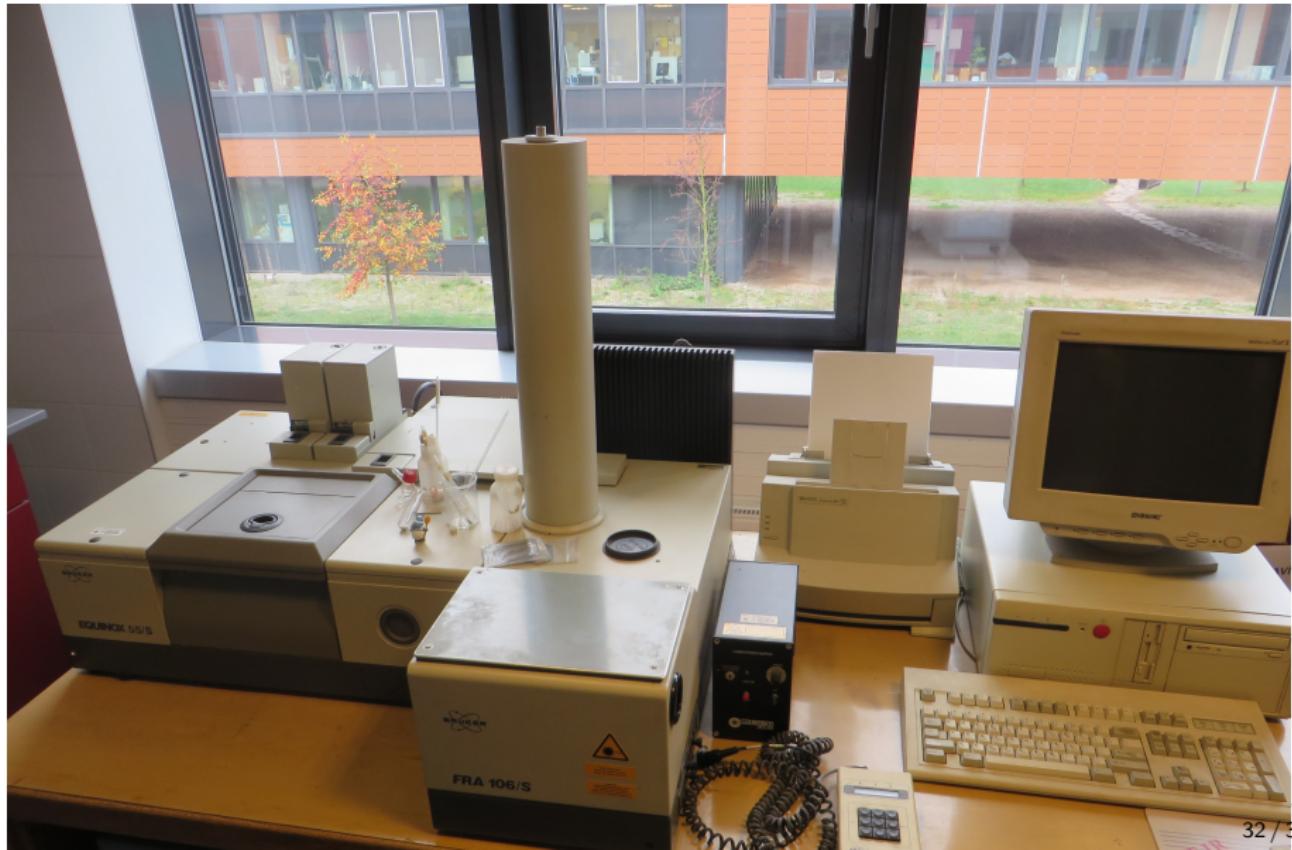
# Spektrometry na ústavu chemie

MIR spektrometr Bruker IFS 28



# Spektrometry na ústavu chemie

Bruker Equinox IFS 55/S s Ramanovým nástavcem FRA 106/S



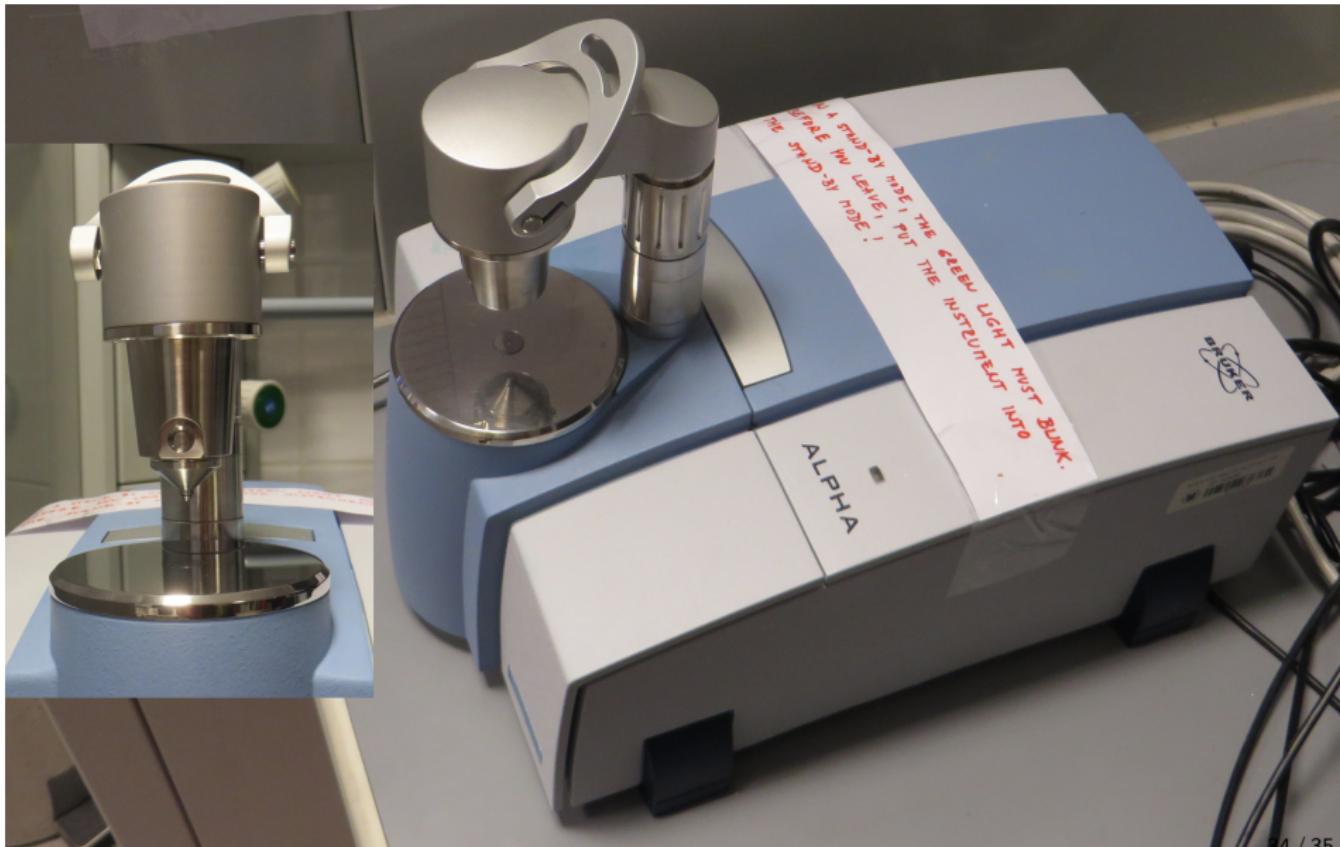
# Spektrometry na ústavu chemie

Bruker Tensor 27



# Spektrometry na ústavu chemie

Bruker Alpha Platinum



# Spektrometry na ústavu chemie

Mikro-ramanovský spektrometr Horiba – Labram HR Evolution - UGV

- <https://ugv.sci.muni.cz/veda-a-vyzkum/sluzby/pracoviste-ramanovskeho-spektrometru>

