

Ramanova spektroskopie

C5060 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.¹
- Při nepružném rozptylu naopak k výměně energie mezi zářením a hmotou dochází. Tento jev byl popsán v roce 1928 Sirem Chandrasekhara Venkata Ramanem.² Pojmenován byl po objeviteli *Ramanův efekt nebo Smekalův-Ramanův efekt*. Za tento objev obdržel sir Raman Nobelovu cenu za fyziku v roce 1930.³

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

²Objev z lodní paluby

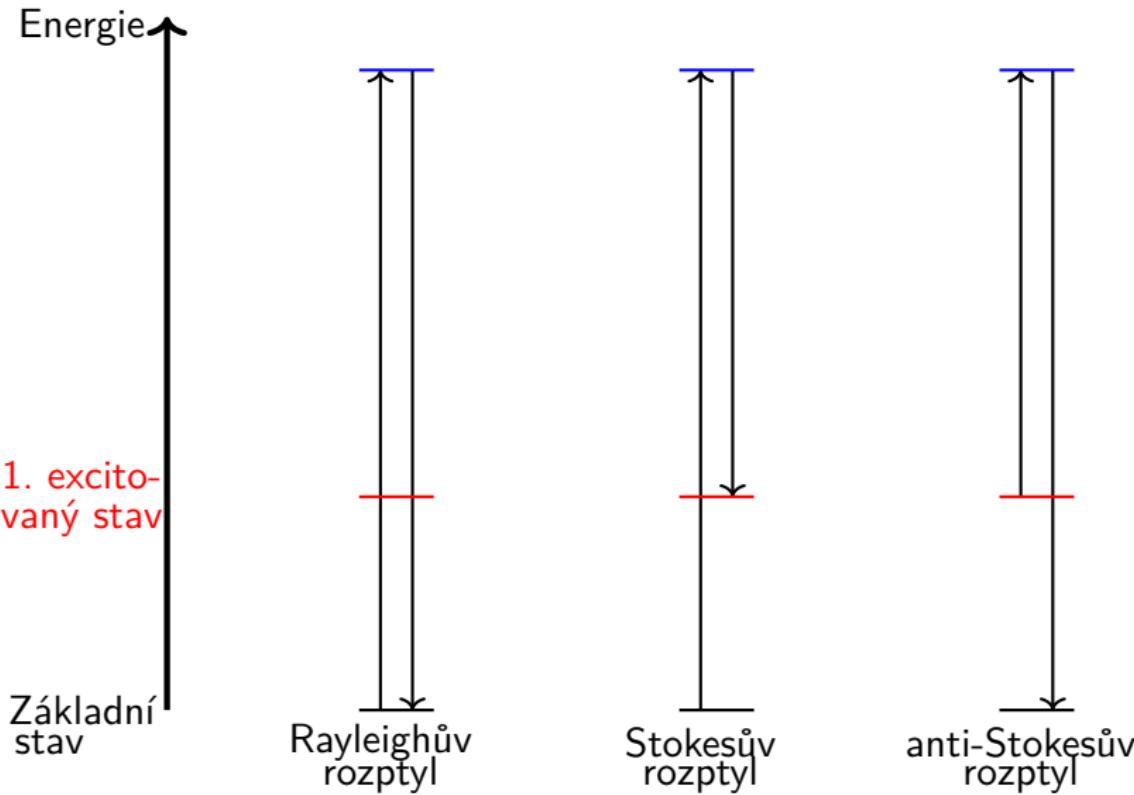
³http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman-lecture.pdf

Ramanův rozptyl

- Ramanův efekt může být popsán jako nepružná srážka fotonu s molekulou, jejímž výsledkem je změna vibračního nebo rotačního stavu molekuly.⁴
- *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.

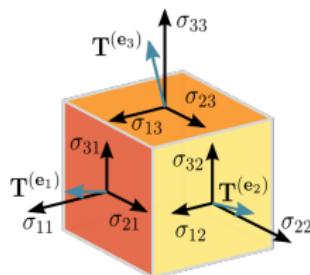
⁴Malíšek V.: "Rozptyl světla - nejvšeobecnější jev v přírodě, nebo div moderní optiky?", str. 62-64

Ramanův rozptyl



Polarizovatelnost

- Polarizovatelnost (α) popisuje deformovatelnost elektronové hustoty v okolí molekuly působením elektromagnetického záření, nebo přesněji elektrického pole generovaného fotonem.^{5,6,7}
- Je to *tensor druhého řádu*, tzn. že ji lze popsat maticí 3×3 .⁸



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

Složky tensoru polarizovatelnosti.⁹

⁵<https://en.wikipedia.org/wiki/Polarizability>

⁶http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/Intermolecular_Forces/Polarizability

⁷Animace - polarizovatelnost

⁸<https://en.wikipedia.org/wiki/Tensor>

⁹Zdroj: Sanpaz/Commons

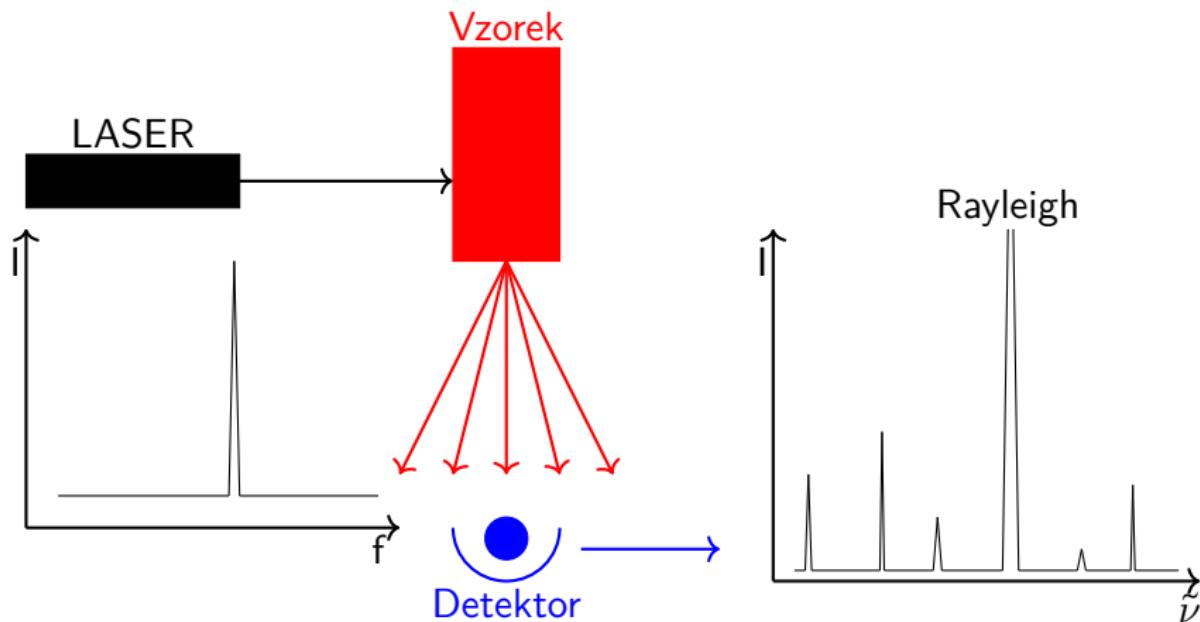
Polarizovatelnost

- Polarizovatelnost (α) 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

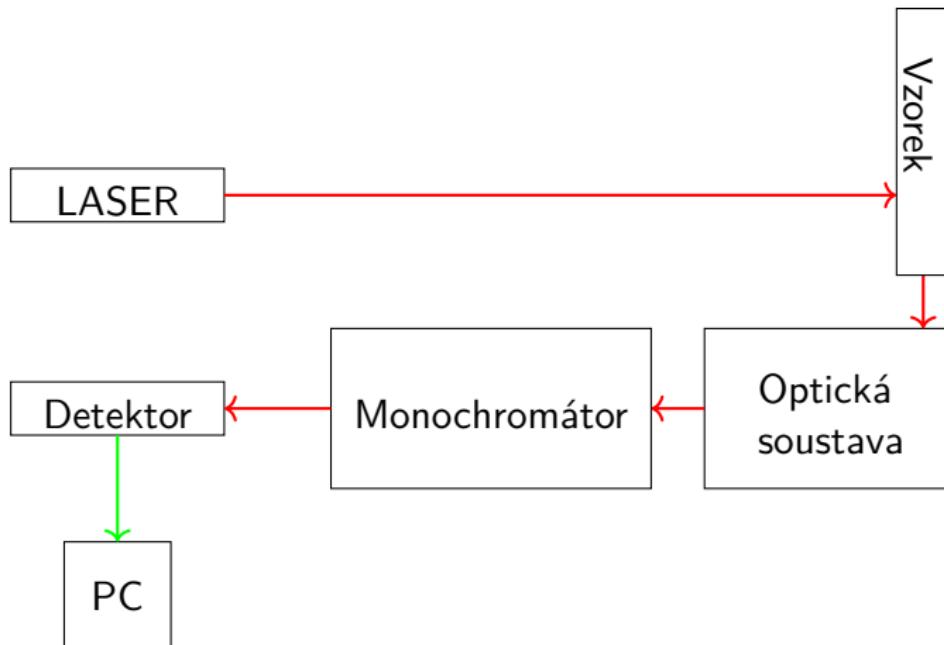


Spektrometry

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

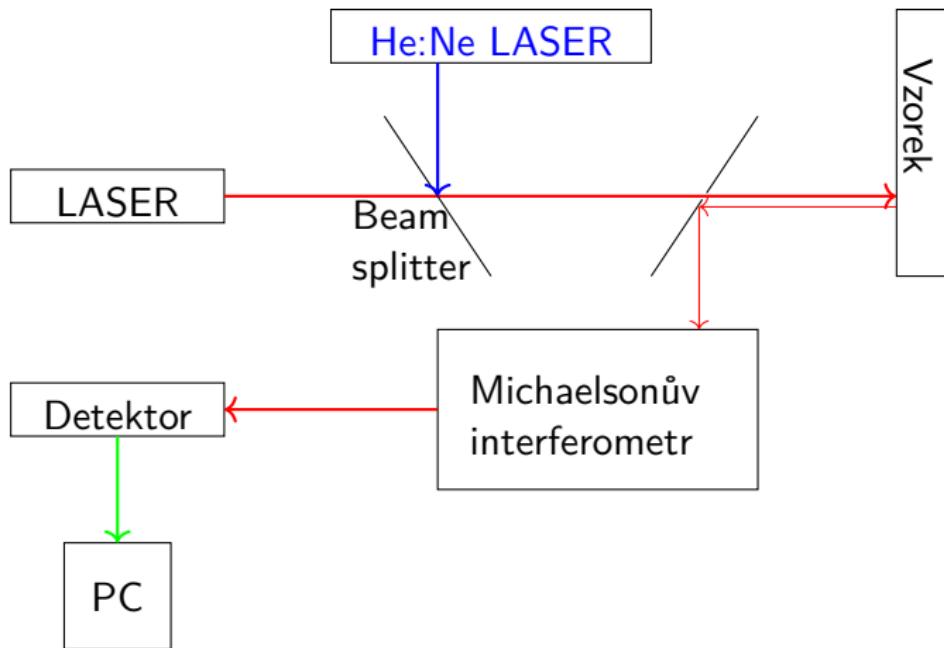
Spektrometry

Disperzní spektrometry



Spektrometry

FT-RA spektrometry

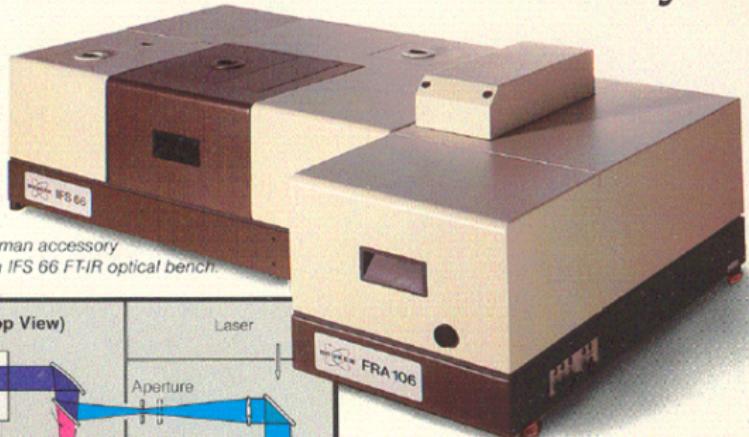


Spektrometry

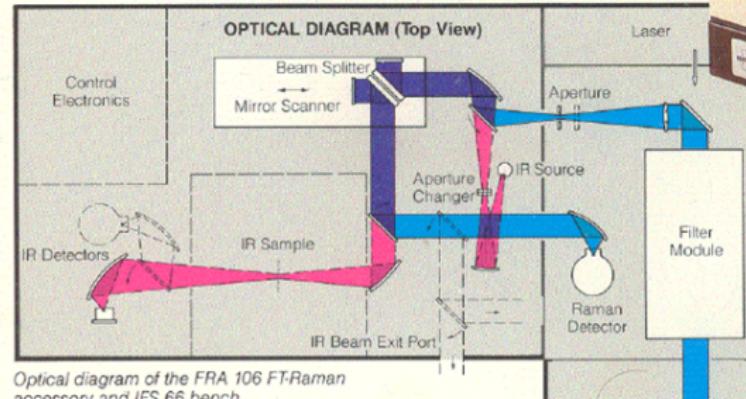
FT-RA spektrometry

The Bruker FRA 106 FT-Raman Accessory.

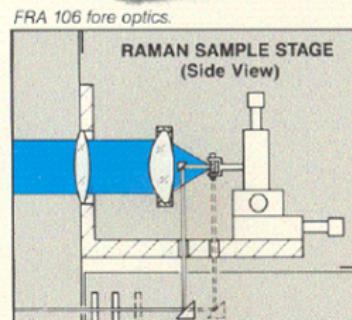
The FRA 106 enables the analyst to routinely collect essentially fluorescence-free Raman data without sample preparation.



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.¹⁰
- První laser byl sestrojen roku 1957, teoreticky byl předpovězen (resp. stimulovaná emise) již roku 1917 Albertem Einsteinem.¹¹
- Jde o koherentní a monochromatický zdroj záření.¹²
 - 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.

¹⁰VRBOVÁ, Miroslava. *Lasery a moderní optika*. Praha : Prometheus, 1994. 474 s.
ISBN 80-85849-56-9.

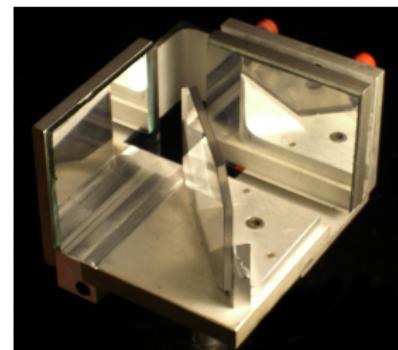
¹¹Zur Quantentheorie der Strahlung

¹²Laser principle animation

Spektrometry

Michelsonův interferometr

- Autorem je americký fyzik Albert A. Michelson.
- Skládá se z beam splitteru a dvou zrcadel.¹³
- Jedno ze zrcadel se pohybuje konstantní rychlostí po dráze kolmé k jeho ploše.
- Interferometr moduluje vstupující záření plynulou změnou rozdílu délky drah paprsků.¹⁴



Michelsonův interferometr.¹⁵

¹³<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/michel.html>

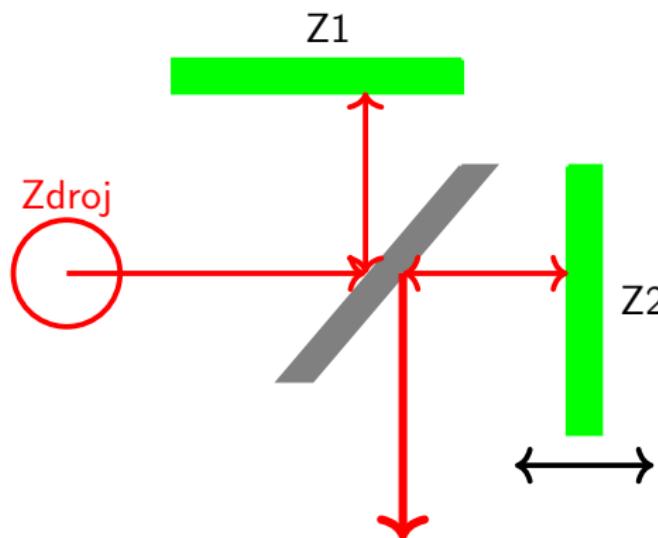
¹⁴Interferometer – animation

¹⁵Zdroj: Falcorian/Commons

Spektrometry

Michelsonův interferometr

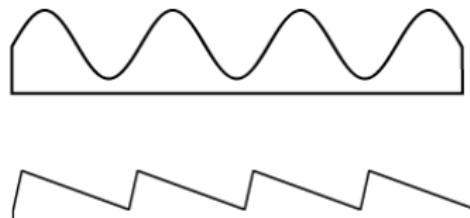
Beamsplitter (BS) rozděluje paprsek ze zdroje na dva stejné paprsky. Jeden je odražen na nepohyblivé zrcadlo (Z1), od kterého se odrazí zpět. Druhý projde BS a dopadne na pohyblivé zrcadlo (Z2). Oba paprsky dopadnou zpět na BS, kde interferují a výsledný paprsek je znova zčásti odražen k detektoru a 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*.¹⁶
- 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.¹⁷
- Hustota vrypů a kvalita mřížky ovlivňuje rozlišení naměřeného spek-
tra.



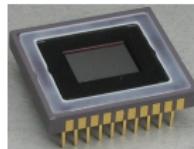
¹⁶Optická mřížka

¹⁷Ohyb světla na mřížce

Spektrometry

Detektor

- Jednokanálové detektory (Single-channel)
 - Fotonásobič¹⁸
- 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 čip¹⁹



Fotonásobič²⁰

¹⁸Animace fotonásobiče

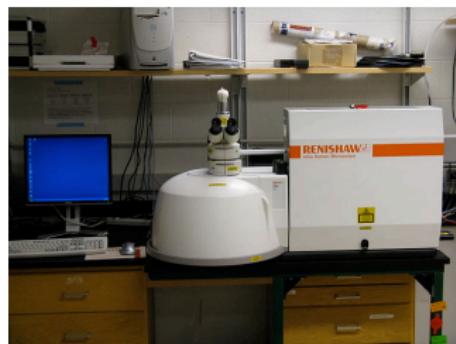
¹⁹Zdroj: Sphl/Commons

²⁰Zdroj: 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.²¹

²¹Zdroj: 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.^{22,23}
- Zesílení signálu může být řádově až 10^{11} , tzn. že teoreticky lze detektovat jedinou molekulu.²⁴
- Prakticky je však hodnota zesílení spíše 10^3 až 10^6 .
- Jako substrát je nejhodnější stříbro, ale využívá se také zlato a měď.²⁵

²²Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode

²³Surface-Enhanced Raman Spectra of Pyridine and Pyrazine Adsorbed on a Au(210) Single-Crystal Electrode

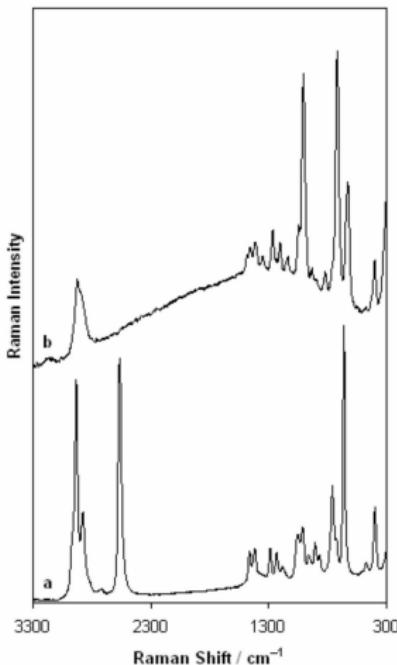
²⁴Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors

²⁵Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering

SERS — Surface-Enhanced Raman Spectrometry

- Vznik SERS lze popsat dvěma mechanismy:
 - Prvním je zesílené elektromagnetické pole vytvářené na povrchu kovu (*povrchová plazmonová rezonance*). Nejvíce jsou zesilovány vibrační módy kolmé k povrchu kovu.
 - Druhý způsob zesílení spočívá v přenosu náboje mezi povrchem a molekulou analytu. Elektronické přechody mnoha komplexů s přenosem náboje jsou ve viditelné oblasti, takže dochází k rezonančnímu zesílení. Nejsilnější SERS vykazují molekuly s nepárovými elektronami nebo páry elektronů (aromatické sloučeniny). Tento efekt byl poprvé objeven u pyridinu.
- Využití SERS v praxi
 - Studium povrchových vrstev analytu na kovovém substrátu.
 - Lze také studovat koloidní a kovové filmy na dielektrických substrátech.
 - Analýza biologických vzorků o malé koncentraci.

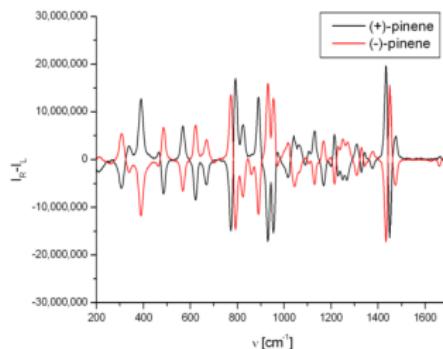
SERS — Surface-Enhanced Raman Spectrometry



Ramanovo spektrum 2-merkaptoethanolu ($\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$): a) kapalina, b)
SERS, 10 mM roztok na stříbrném substrátu.²⁶

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.²⁷
- V současnosti nachází velké využití při studiu struktury biomolekul a jejich chování ve vodných roztocích.



ROA spektrum (+) a (-) pinenu.²⁸

²⁷Raman Optical Activity: A Powerful Technique to Investigate Essential Oil Components

²⁸Zdroj: 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*

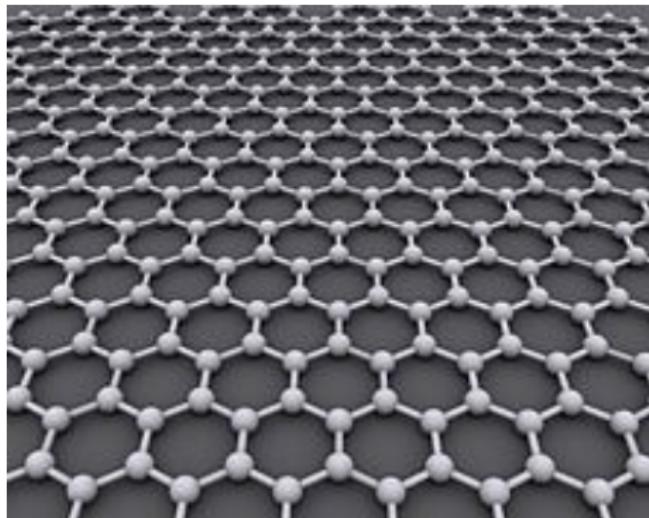
- Analýza DNA/RNA
- Analýza jednotlivých buněk
- Struktura kostí
- Interakce léčiva s buňkami

Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

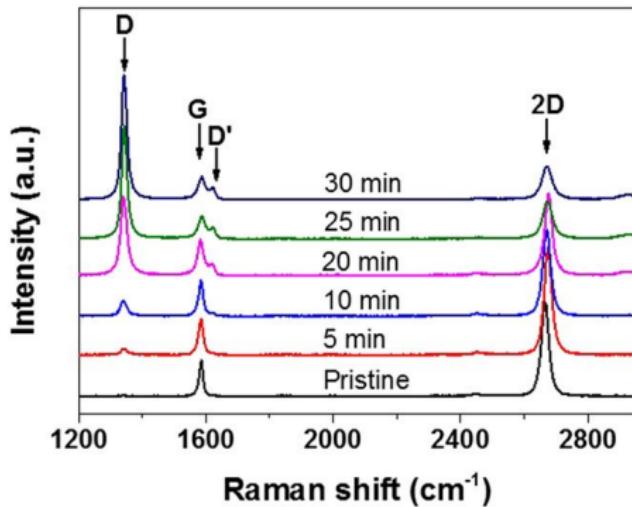
- Pomocí Ramanovy spektroskopie lze studovat kvalitu grafenu a určit počet vrstev vzorku.²⁹
- Pás D (1350 cm^{-1}) odpovídá poruchám ve struktuře grafenu.
- Pás G (1583 cm^{-1}) odpovídá valenčním vibracím vazeb C-C, najdeme ve všech systémech s sp^2 uhlíky.
- V případě nečistot nebo výskytu náboje na povrchu grafenu, najdeme v blízkosti pásu G i méně intenzivní pás D' (1620 cm^{-1}).
- Pás G' v oblasti $2500\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ se označuje jako 2D-pás, nalezneme ho u všech systémů s sp^2 uhlíky.

²⁹Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers

Využití Ramanovy spektroskopie v praxi



Struktura grafenu.³⁰



Ramanovo spektrum grafenu.³¹

³⁰Zdroj: AlexanderAIUS/Commons

³¹Zdroj: 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.^{32,33}
- Ramanova spektroskopie a mikroskopie se využívá pro:³⁴
 - 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.³⁵

³²<http://www.ndt.net/article/wcndt00/papers/idn163/idn163.htm>

³³Raman spectroscopic database of azo pigments and application to modern art studies

³⁴Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation

³⁵Non-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.³⁶
- 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.

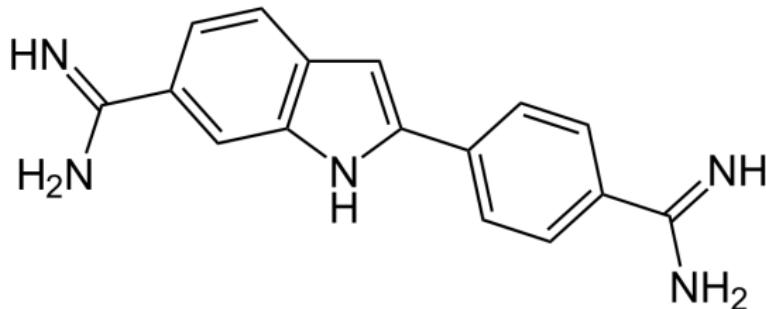
Pás [cm ⁻¹]	Vibrační mód	Přiřazení
935	ν (CC)	proteiny, α -helix, Pro, Val
1005	δ (CC) dýchání kruhu	Phe
1050	ν (CN), ν (CO)	Pro
1077	ν (CC), ν (CO)	Glukóza, triglyceridy, lipidy
1126	ν (CN), ν (CC)	Proteiny, lipidy, fosfolipidy
1750	ν (C=O)	Lipidy, fosfolipidy

³⁶In vivo Raman spectroscopy in the diagnostics of colon cancer

Využití Ramanovy spektroskopie v praxi

Analýza biologických vzorků

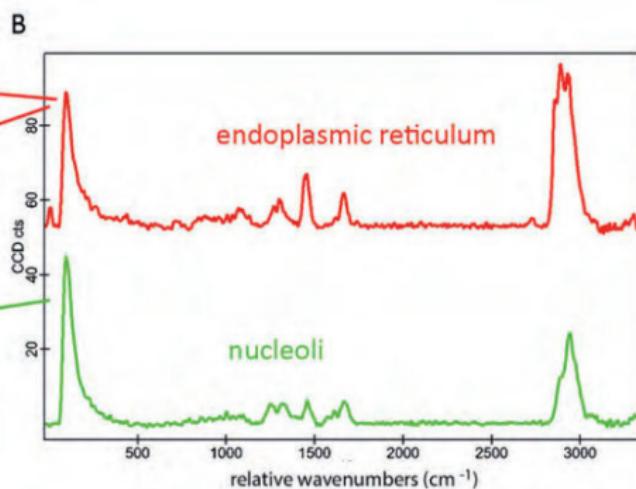
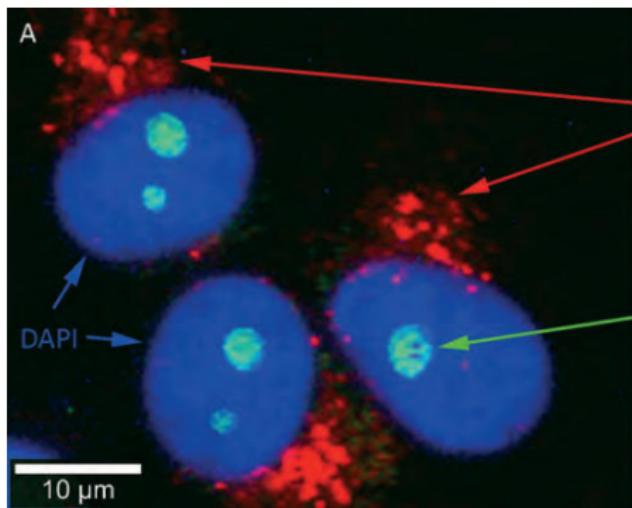
- S výhodou lze využít fluorescenční mikroskopu s Ramanovým spektrometrem.
- Na obrázku jsou buňky primátů obarvené fluorescenčním barvivem DAPI a příslušné Ramanovo spektrum.³⁷
- Pro excitaci byl využit laser o vlnové délce 532 nm. Byl získán obrázek plochy $50 \times 40 \mu\text{m}$.
- Jádra buněk jsou znázorněna modře, jadérka zeleně a endoplazmatická retikula červeně.



³⁷CHEMAGAZIN, 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



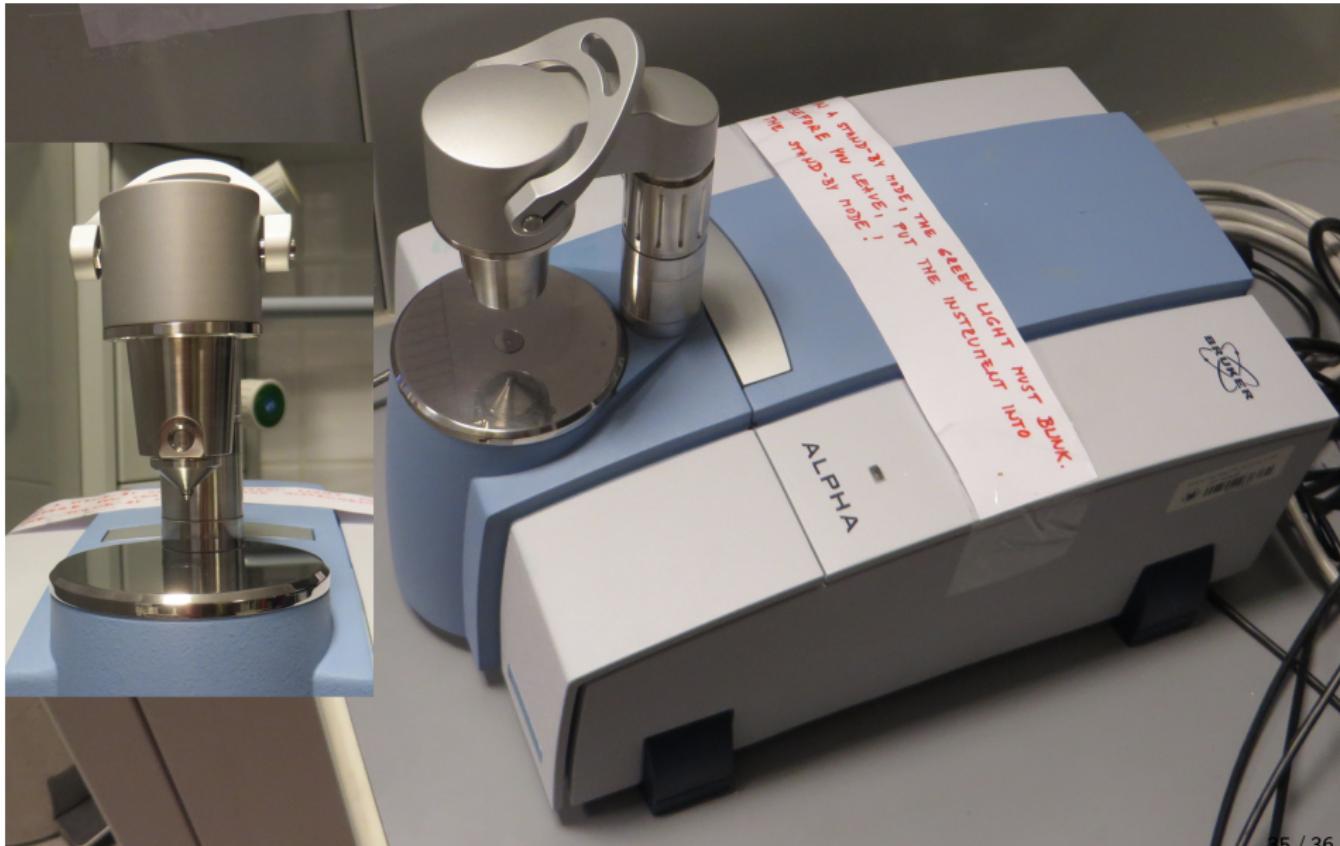
Spektrometry na ústavu chemie

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>

