

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Zuzana Rozlívková

Použití Ramanovského mikroskopu ke studiu molekulární struktury látek

Katedra makromolekulární fyziky

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Miroslava Trchová, CSc.
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

Studijní program: Fyzika, obecná fyzika, fyzika kondenzovaných soustav
a materiálů

2007

Děkuji vedení Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., v Praze za možnost měření na moderním Ramanově mikroskopu firmy Renishaw. Dále děkuji vedoucí mé bakalářské práce, doc. RNDr. Miroslavě Trchové, CSc., za trpělivou pomoc poskytovanou v průběhu všech experimentů a při sepisování práce. Můj dík patří též kolektivu vedenému Dr. Jaroslavem Stejskalem, CSc., za metodickou pomoc a poskytnuté vzorky.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejněním.

V Praze dne: 17. 5. 2007

Zuzana Rozlívková

Obsah:

1 Teoretický úvod	4
1.1 Spektroskopické metody.....	4
1.2 Podstata Ramanova jevu.....	5
1.2.1 Klasická představa Ramanova rozptylu.....	6
1.2.2 Relativní intenzita Ramanova rozptylu.....	6
2 Ramanův spektrometr	8
2.1 Princip Ramanova mikroskopu.....	8
2.2 InVia Renishaw Ramanův mikroskop.....	10
3 Příklady užití Ramanova mikroskopu	14
3.1 Teplotní závislost intenzity Stokesovy anti-Stokesovy linie.....	14
3.2 Polyanilin.....	16
3.2.1 Různé formy polyanilinu.....	17
3.2.2 Ramanovo spektrum polyanilinu.....	18
3.2.3 Stabilita pernigranilinu.....	19
4 Závěry	21
5 Literatura	22

Název práce: Použití Ramanova mikroskopu ke studiu molekulární struktury látek

Autor: Zuzana Rozlívková

Katedra: Katedra makromolekulární fyziky

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Miroslava Trchová, Csc., Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

e-mail vedoucího: trchova@imc.cas.cz

Abstrakt: Práce je zaměřena na využití Ramanova mikroskopu ke studiu molekulární struktury látek. V první kapitole práce jsou uvedeny stručné teoretické základy Ramanova rozptylu v klasickém přiblížení. Druhá kapitola je zaměřena na popis a vysvětlení principu činnosti disperzního Ramanova mikroskopu. Konkrétně je pak probírán ve třetí kapitole moderní Ramanův mikroskop InVia Renishaw. Použití Ramanova mikroskopu je ilustrováno v závěrečné kapitole na měření poměru intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy spektrální linie krystalického křemíku a jeho porovnání s teoretickými výpočty. Druhým příkladem je studium stability molekulární struktury a morfologie tenkého filmu oxidované formy polyanilinu, pernigranilinu, na základě naměřených Ramanových spekter a mikroskopických obrázků.

Klíčová slova: Ramanův rozptyl, Ramanův mikroskop, krystalický křemík, polyanilin

Title: Using of Raman microscope for study of molecular structure

Author: Zuzana Rozlívková

Departement: Department of Macromolecular Physics

Supervisor: Doc. RNDr. Miroslava Trchová, CSc.

Supervisor's e-mail adress: trchova@imc.cas.cz

Abstract: This work concerns the application of Raman microscope to the study of the molecular structure of materials. The first chapter introduces the theoretical background in classical approach. In the second chapter, the description and the explanation of the function of dispersive Raman microscope is presented. The third chapter concerns the application of the previous knowledge to the modern Raman microscope inVia Renishaw. The use of the Raman microscope is illustrated on the measurements of the intensity ratios of the Stokes and anti-Stokes Raman lines of crystalline silicon and their comparison with the theoretical calculations. The second example is the study of the stability of the molecular structure and morphology of the thin films of the oxidized form of polyaniline, pernigraniline, on the basis of the measured Raman spectra and the microscopic images.

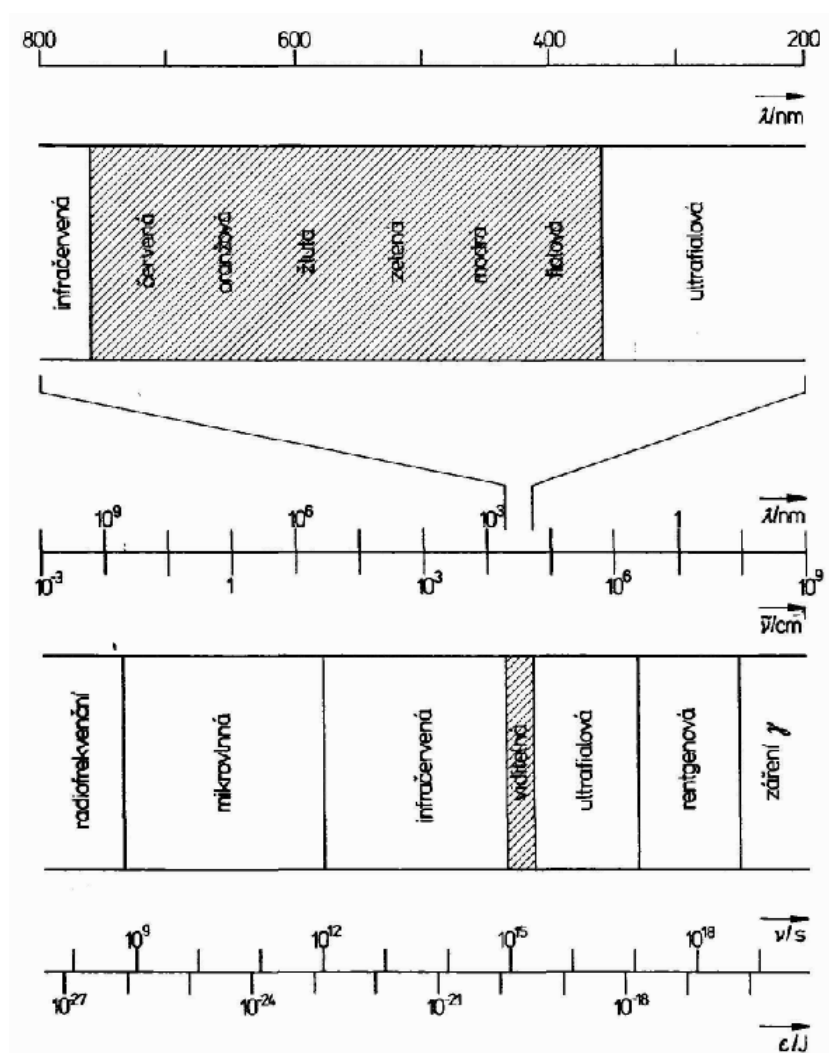
Keywords: Raman scattering, Raman microscope, crystalline silicon, polyaniline

Kapitola 1

Teoretický úvod

1.1 Spektroskopické metody

Spektroskopické metody jsem našla přehledně popsané např. v [1]. Spektroskopie je skupina metod zkoumání látek založená na jejich interakci s elektromagnetickým zářením, při které se určitá jejich vlastnost mění v závislosti na vlnové délce dopadajícího záření (např. koeficient absorpce).



Obr. 1. Elektromagnetické záření [1].

Protože pro interakce je podstatná energie dopadajícího záření, je vhodné je rozdělit do několika skupin právě podle jeho energie. Pro vyjádření energie záření se používá několik různých veličin zpřízněných mezi sebou pomocí základních konstant. Ve spektroskopii se nejčastěji používá vlnčet ν [cm^{-1}].

$$\tilde{\nu} = \frac{2\pi}{\lambda},$$

kde λ je vlnová délka záření. Dále se používá frekvence

$$\nu = \frac{c}{\lambda},$$

kde c je rychlost světla. Kruhová frekvence pak je

$$\omega = 2\pi\nu.$$

Vzhledem k tomu, že energii částic v látce lze separovat na jednotlivé druhy (jaderná, elektronová, vibrační, rotační atd.), které jsou řádově odlišné, lze zářením o dané frekvenci studovat zpravidla jeden vybraný druh energie. Rentgenovým a tvrdším zářením zkoumáme energetické přechody v jádrech atomů. Ultrafialové a viditelné záření má energie vhodné k vyvolání přechodů elektronů do excitovaných stavů. Infračervené záření se používá ke zkoumání vibrací molekul. Mikrovlnné slouží ke zkoumání rotací a elektronové paramagnetické rezonanci (spinové přechody elektronů). Rádiovým zářením se vzbuzují spinové přechody v jádrech, tato metoda se nazývá jaderná magnetická rezonance.

Ramanova a infračervená spektroskopie se zabývají vibračními přechody molekul, ale každá metoda „vidí“ jiné vibrace. Infračervenou spektroskopií pozorujeme vibrace, při nichž se mění dipólový moment molekuly, tedy především vibrace polárních vazeb. Ramanovou spektroskopií vidíme vibrační přechody, při nichž se mění polarizabilita molekuly, tedy převážně vibrace symetrických vazeb. Tím jsou tyto dvě metody za určitých podmínek komplementární.

1. 2 Podstata Ramanova jevu

Podstata Ramanova jevu je stručně popsána např. v [2]. Ramanův rozptyl je z hlediska kvantové teorie zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly, jejichž energie jsou E_1 a E_2 . Molekula nejprve interaguje s dopadnuvším fotonem o frekvenci $\nu_0 > |E_2 - E_1| / h$, kde h je Planckova konstanta. Následně je vyzářen foton o frekvenci ν_R . Molekula mezitím přejde na virtuální excitovanou hladinu a spadne na stejnou (Rayleighův rozptyl) nebo vedlejší (Ramanův rozptyl) vibrační hladinu. Ze zákona zachování energie plyne

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1) = h\nu_0 \pm h\nu_{\text{vib}},$$

kde ν_R je frekvence rozptýleného záření a ν_{vib} je frekvence vibrací.

Na rozdíl od absorpce a následné emise je tento proces velmi rychlý. Spektrální linii o frekvenci ν_0 nazýváme Rayleighovou linií. Spektrální linii o frekvenci $\nu_R = \nu_0 + \nu_{\text{vib}}$ nazýváme Stokesovou a linii $\nu_R = \nu_0 - \nu_{\text{vib}}$ anti-Stokesovou. Mezi jednotlivými spektrálními liniemi je velká disproporce. Intenzita Rayleighova rozptylu je obvykle 10^3 – 10^6 -krát větší, než jsou intenzity Ramanových linií. I mezi Stokesovou a anti-Stokesovou linií je podstatný rozdíl v intenzitě.

Kromě rozptylu při ozařování vzorku dochází navíc k odrazu, průchodu a absorpci záření, fluorescenci a fosforescenci vzorku, které mohou činit problémy při zpracování měření.

1.2.1 Klasická představa Ramanova rozptylu

Ke kvantitativnímu popisu Ramanova rozptylu je nutno přistupovat kvantově. Klasická teorie není schopna vysvětlit např. různé intenzity Stokesovy a anti-Stokesovy linie. Klasická teorie je popsána v řadě učebnic, stručně a výstižně je uvedena např. v [2].

V klasickém přiblížení se v molekule při interakci s elektromagnetickým zářením indukuje dipólový moment \mathbf{p} (uvažuje se jenom oscilující dipól, magnetický dipól a elektrický kvadrupól už jsou zanedbatelné). Při vibraci molekuly se mění jí příslušná vnitřní souřadnice q harmonicky v čase $q=q_0 \cos(2\pi\nu_{\text{vib}}t)$. Polarizace dipólů pak závisí na tenzoru polarizovatelnosti α .

$$\mathbf{p} = \alpha \cdot E_0 \cos(2\pi\nu_{\text{vib}}t) \mathbf{e}_1$$

Polarizovatelnost α se dá popsat s použitím Taylorova rozvoje jako funkce normálních vibrací vnitřní souřadnice q .

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=q_0} \cdot q,$$

odtud

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

kde \mathbf{E} je vektor intenzity elektrického pole dopadajícího záření, q je vnitřní souřadnice molekuly příslušející dané vibraci a α je polarizovatelnost molekuly. Molekula tedy emituje záření s nezměněnou frekvencí ν_0 (Rayleighův rozptyl) a záření s frekvencemi $(\nu_0 + \nu_{\text{vib}})$ a $(\nu_0 - \nu_{\text{vib}})$ (Ramanův rozptyl). Pro vznik Ramanovy linie je nutné, aby při vibraci docházelo ke změnám polarizovatelnosti molekuly, tedy

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

Důsledkem jsou základní výběrová pravidla pro vznik Ramanových linií na základě symetrie molekuly.

1.2.2 Relativní intenzity Ramanova rozptylu

Pro popis relativní intenzity Ramanova rozptylu musíme vycházet z kvantové teorie. Nabitá částice, která má nějaké zrychlení, je zdrojem elektromagnetického záření, s výjimkou stacionárních stavů, které lze získat řešením bezčasové Schrödingerovy rovnice $\mathbf{H}\psi = E\psi$. Hamiltonián $\mathbf{H} = \mathbf{T} + \mathbf{U}$ je součtem kinetické energie elektronů i jader a potenciální energie interakce elektron–elektron, jádro–jádro a jádra–elektrony.

$$\mathbf{T} = \mathbf{T}_{\text{jad}} + \mathbf{T}_{\text{el}} = -\frac{\hbar^2}{8\pi^2 m_{\text{el}}} \sum_{i=1}^n \Delta_i^{\text{el}} - \frac{\hbar^2}{8\pi^2 M_{\text{jad}}} \sum_{j=1}^N \frac{1}{A_j} \Delta_j^{\text{jad}},$$

$$\mathbf{U} = -\frac{q_{\text{el}}^2}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1, j=1}^{n, N} \frac{Z_j}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_j|} + \frac{q_{\text{el}}^2}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1, i' > i}^{n, n} \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i'}|} + \frac{q_{\text{el}}^2}{4\pi\epsilon_0} \sum_{j=1, j' > i}^{N, N} \frac{Z_j Z_{j'}}{|\mathbf{R}_j - \mathbf{R}_{j'}|},$$

kde malá písmena a index i souvisí s elektrony a velká písmena a index j s jádry. \hbar je Planckova konstanta, m , M jsou hmotnosti elektronu a jádra, Δ jsou výchylky a A jsou stacionární polohy. q je (pouze v tomto případě) náboj elektronu, Z je protonové číslo atomu a ϵ_0 je permitivita vakua.

Takovou vlnovou rovnici nelze separovat na rovnici pro elektrony a pro jádra kvůli členu interakce mezi elektrony a jádry. Používá se Bornova-Oppenheimerova aproximace, kdy uvažujeme, že elektronová funkce závisí na polohách jader jen parametricky (zanedbáváme tím působení operátoru kinetické energie jader na elektronovou funkci)

$$\Psi(R, r) = \Phi_R(r) \Theta(R).$$

Čímž získáme rovnice

$$\begin{aligned} \forall R: \mathbf{H}_{el} \Phi_R(r) &= (\mathbf{T}_{el} + \mathbf{U}) \Phi_R(r) = E_{el}(R) \Phi_R(r), \\ \mathbf{H}_{jad} \Theta(R) &= (T_{jad} + E_{el}(R)) \Theta(R) = E \Theta(R), \end{aligned}$$

kde E_{el} má význam potenciální energie pro pohyb jader. Pohyb jader lze dále separovat na translační (3 stupně volnosti), rotační (3 stupně volnosti, pro lineární molekulu jen 2) a vnitřní pohyby, tedy vibrace ($3N-6$ stupňů volnosti, $3N-5$ pro lineární molekulu, N je počet atomů v molekule). Translačního pohybu se dá úplně zbavit přechodem k těžišťové soustavě souřadnic. Rotační pohyb nelze separovat přesně, protože při přechodu k soustavě souřadné pevně spojené s molekulou se uplatní zdánlivé síly, ale energie rotací je ve většině případů (kapaliny, pevné látky) řádově menší než energie vibrací, proto ji zanedbáváme. Ve skutečnosti způsobuje rozšiřování vibračních pásů ve spektru. Zbývá tedy vibrační pohyb a $3N-6$ ($3N-5$) souřadnic. Vzhledem k tomu, že vibrace jsou malé, lze napsat Schrödingerovu rovnici ve výchylkách od rovnovážné geometrie molekuly. Tyto výchylky se pak lineárně transformují na normální souřadnice q , ve kterých je rovnice diagonální. Výsledné normální vibrační módy se pak chovají jako nezávislé lineární harmonické oscilátory.

Vzhledem k různé populaci jednotlivých energetických stavů molekuly je při spontánním Ramanově rozptylu poměr intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy linie dán vztahem

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_{\text{vib}}}{\nu_0 - \nu_{\text{vib}}} \right)^4 \exp\left(-\frac{h\nu_{\text{vib}}}{kT}\right)$$

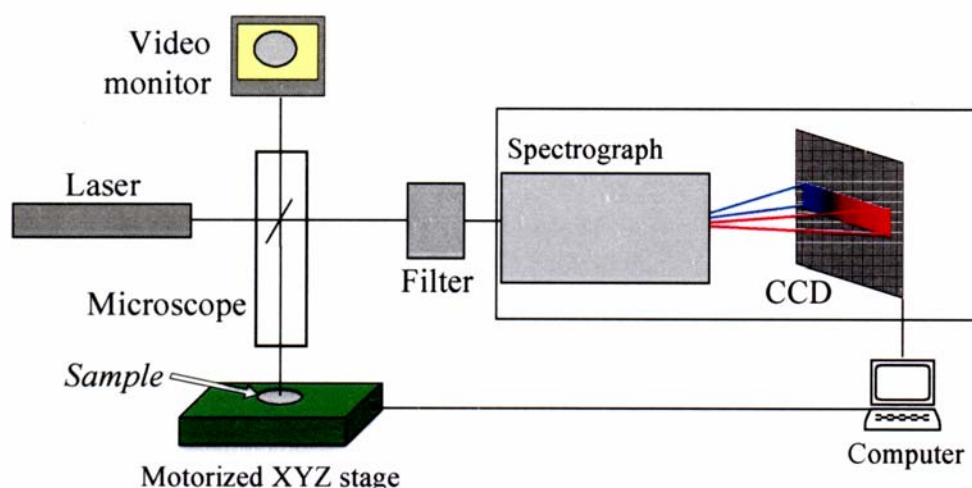
vycházejícím z Boltzmannova distribučního zákona. $I_{\text{anti-Stokes}}$ je intenzita anti-Stokesova a I_{Stokes} Stokesova rozptylu [3]. Za laboratorní teploty je mnohem silnější Stokesův rozptyl, ale za vyšších teplot intenzita anti-Stokesova rozptylu roste rychleji. Tím by bylo možné měřit teplotu vzorku při měření, bylo by ale nutné spektrometr pro taková měření předem zkalibrovat.

Kapitola 2

Ramanův spektrometr

2. 1 Princip Ramanova mikroskopu

Schéma standardního Ramanova mikroskopu je zobrazeno na obrázku 2. Ramanův mikroskop umožňuje kromě měření spekter získaných Ramanovým rozptylem též pozorování vzorku mikroskopem. Pokud chceme vzorek pouze pozorovat mikroskopem (a vybrat na něm vhodné místo k měření), necháme do mikroskopu vstupovat bílé světlo z nezávislého zdroje, kterým osvětlujeme vzorek a zároveň jej sledujeme pomocí video kamery na monitoru (na obrázku 2 Video monitor).



Obr. 2. Schéma Ramanova mikroskopu [4].

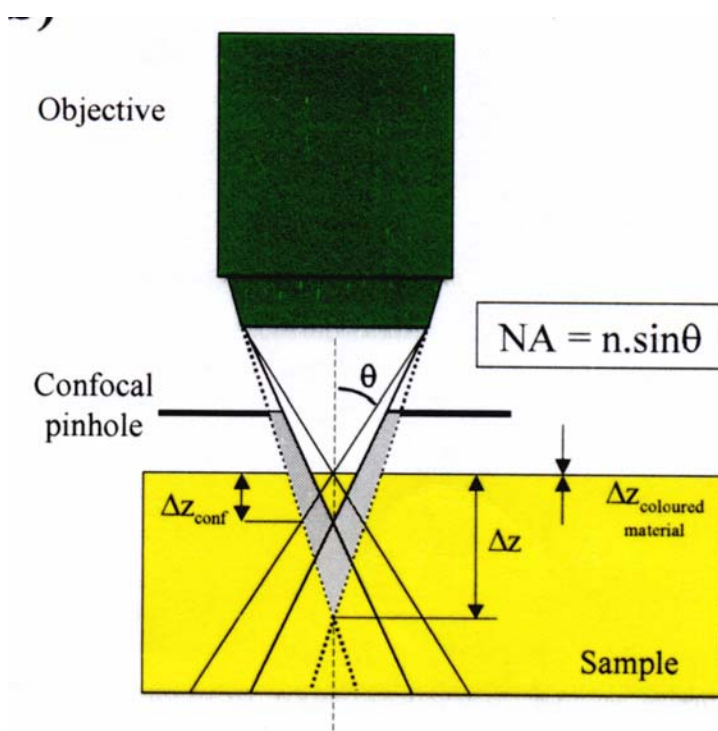
Při samotném měření prochází paprsek z laseru na polopropustný dělič svazku a dále je fokusován pomocí mikroskopu na vzorek, kde se rozptyluje zpět na dělič a dále se odráží na filtr. Filtr odrazí zpět většinu záření vlnové délky laseru, které se tak vrací na dělič a zvyšuje intenzitu záření dopadajícího na vzorek. Hlavně však eliminuje nežádoucí Rayleighův rozptyl výrazným snížením jeho intenzity. Ramanovsky rozptýlené záření postupuje dále do spektrografu, obsahujícího disperzní element, v našem případě mřížku. Na ní se rozptýlené záření rozloží podle vlnových délek, a dále pak dopadá na CCD detektor. Digitální záznam spektra pak putuje ke zpracování do počítače.

Pokud je potřeba dosáhnout většího rozsahu vlnových délek, než umožňuje prostorové uspořádání spektrografu, mřížka se natáčí. Obraz ze CCD detektoru je pak zaznamenáván nikoli staticky, ale v závislosti na čase, tedy i na natočení mřížky.

Stolkem, na kterém je umístěn vzorek (Motorized XYZ stage) lze pohybovat pomocí motoru ovládaného počítačem. To umožňuje nechat mapovat část vzorku bod po bodu podle přesného programu, zobrazena je pak závislost např. intenzity vybrané spektrální linie na poloze na vzorku (Raman mapping).

Kromě konvenčního mikroskopu lze použít i tzv. konfokální uspořádání (obr. 3). Dopadající svazek je prostorově omezen štěrbinami, je zaostřen na menší objem vzorku.

Je tak přesněji určeno místo měření, tj. můžeme měřit vybraný mikroskopický objekt. Lze tak snáze měřit v různých hloubkách průhledných vzorků. Ramanův signál je ale vzhledem k omezenému množství světla velmi slabý, proto je třeba dbát na velkou světelnost detekční optiky.



Obr. 3. Konfokální uspořádání, NA je numerická apertura, n je index lomu prostředí mezi objektivem a vzorkem [4].

Spektrometr musí obsahovat optiku k řízení směru a šířky laserového paprsku. Tato soustava čoček a štěrbin je při běžném měření pevně seřízená. Před měřením je ovšem třeba zkontrolovat, zda je dráha laseru nastavená správně.

V Ramanově spektroskopii se používají různé typy laserů s různou excitační linií. Ve viditelné oblasti jsou běžné He-Ne lasery (červená linie 633 nm), argonový iontový laser (modrá 457 nm, modrozelená 488 nm a zelená linie 514.5 nm) a krypton iontový laser (červená 647 nm, žlutá linie 568 nm). V poslední době se stále častěji používá i Nd-YAG laser (neodymem dotovaný yttriohlinitý granát, zelená linie 532 nm).

K odstranění rozptýleného Rayleighova záření slouží filtry několika typů. Pásové filtry (*Band rejection filters, BR filtry*) mají absorpční pás, který nepropouští vlnové délky blízké vlnové délce laseru. Používají se vícevrstvé dielektrické pásové filtry. Takové filtry mají průchodnost 60–80 % mimo absorpční pás, ale jejich průchodnost je v této oblasti modulovaná vlnovou délkou vlivem interferenci na vrstvách. Ořezávací charakteristika typického dielektrického filtru umožňuje pozorovat Ramanovy posuvy od 200–400 cm^{-1} . Holografické BR filtry jsou tvořeny emulzí citlivou na světlo, do které je laserem vytvořena struktura se sinusoidálně se měnící odrazivostí. Tak se dá vytvořit filtr pro různé vlnové délky. Rozdílnost propustnosti pro ostatní vlnové délky je tady zanedbatelná. Holografické filtry mají mnohem užší charakteristiku, proto s nimi lze pozorovat už Ramanovy posuvy 50–100 cm^{-1} . BR filtrům s úzkým výřezem se říká Notch filtry. Do prostoru určeného filtrům lze rovněž umisťovat polarizační filtry.

Nejčastěji používaným detektorem je CCD (charge coupled device) detektor. Je složen z mnoha malých identických detektorů poskládaných do pole (array detector), které mohou simultánně měřit intenzitu dopadajícího záření. Detektor se skládá z fotosenzitivního materiálu, ve kterém se vytvoří pár elektron – díra. Ten vytvoří potenciál, který je pak snímán elektrodou. Měření probíhá tak, že se otevře závěrka, na CCD detektoru se nashromáždí určitý potenciál, zavře se závěrka, náboj přejde zpět, a každý takto změřený proud je digitalizován.

2. 2 InVia Renishaw Ramanův mikroskop

V této kapitole je popsán konkrétní spektrometr od firmy Renishaw, který je umístěn na Ústavu makromolekulární chemie v Praze 6 na Petřinách (obrázky 4 a 5) [4]. K přístroji lze připojit různé lasery (v ÚMCH na Petřinách mají dva viditelné lasery, He-Ne s excitační vlnovou délkou 633 nm a Ar⁺ s excitační délkou 514 nm). Každý má svou vlastní definovanou optickou dráhu, což usnadňuje jejich záměnu. Po zapnutí se však musí laser určitou dobu tepelně stabilizovat, aby byl jeho výkon konstantní.

Vzorek lze pozorovat v odraženém světle pomocí integrovaného vědeckého mikroskopu Leica DMLM. Je vybaven binokulárem a objektivy se zvětšením 5×, 10×, 20×, 50× a 100×. Mikroskop je osazen pro snímání obrázků studovaných vzorků video kamerou Philips. Pozorované a měřené místo na vzorku lze nastavovat pomocí šroubu na mikroskopu, joysticku nebo softwarově.

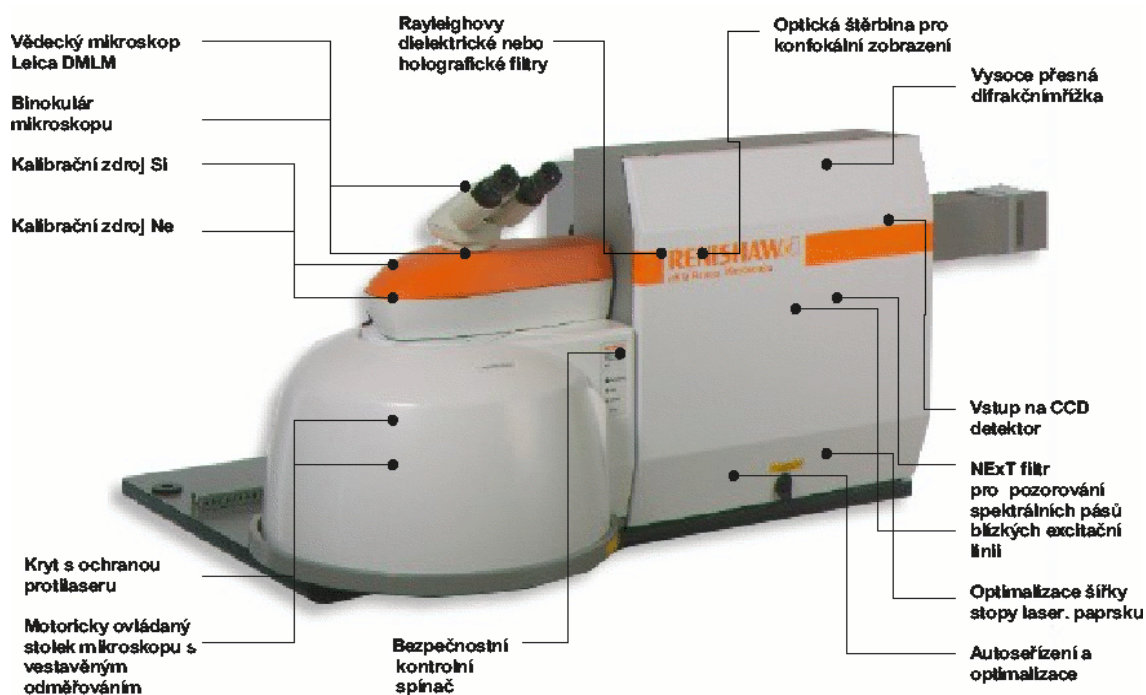
Rayleighovy filtry pro různé vlnové délky excitačních laserů odstraňují z rozptýleného záření Rayleighův rozptyl, tj. záření o vlnové délce laseru. Filtry jsou upnuty prostřednictvím vysoce opakovatelné spojky (0.5 μm) k softwarově ovládanému nosiči. Spektrometr je vybaven dielektrickými i holografickými Notch filtry. Lze k nim přidat navíc i polarizátory, pokud chceme pozorovat vliv polarizace budícího a rozptýleného záření na výsledné Ramanovo spektrum.

Rozptýlené záření je difraktováno jednou ze tří mřížek s různým množstvím vrypů (1800, 2400 a 3000). Difrakční mřížky jsou upnuty k softwarově ovládanému nosiči s vestavěným odměřováním, který umožňuje připojení dvou difrakčních mřížek pro různé vlnové délky používaných laserů. Opakovatelnost při úhlovém natočení difrakčních mřížek je 0.3 cm⁻¹. Spektrální rozlišení přístroje je < 1 cm⁻¹. Při využití difrakčních mřížek s vysokým rozlišením 3000 vrypů/mm je možno dosáhnout spektrálního rozlišení 0.5 cm⁻¹.

Ramanovo spektrum může být snímáno ve dvou rozlišných módech. Při statickém skenu zůstává difrakční mřížka během snímání spektra v pevně definované úhlové poloze. Takto lze získat spektrum typicky v spektrální oblasti od 400 cm⁻¹ do 1000 cm⁻¹. Při rozšířeném skenu se difrakční mřížka během snímání spektra natáčí po velmi malých úhlových krocích a dochází k načtení spektra v široké spektrální oblasti od 100 cm⁻¹ až do 10000 cm⁻¹ (v závislosti na konfiguraci přístroje). Rozšířený sken je závislý na synchronizovaném úhlovém natáčení difrakční mřížky a posuvu kumulovaného náboje po jednotlivých pixelech CCD detektoru [4].

Signál je detekován termoelektricky chlazeným (-70 °C) CCD detektorem se zvýšenou citlivostí a velmi nízkou hladinou šumu. Standardní rozlišení je 576 × 384 pixelů při velikosti jednoho pixelu 22 μm × 22 μm.

Přístroj disponuje automatickým seřízením optických drah jednotlivých laserů, automatickou kalibrací difrakčních mřížek a optimalizací aktivní plochy CCD čipu.



Obr. 4. InVia Renishaw Ramanův mikroskop [4].

Spektrometry firmy Renishaw využívají tzv. pseudo-konfokální systém. Při něm je sběrný objem Ramanova záření vymezen šířkou vstupní štěrbliny do spektrografu a aktivní oblastí nastavenou na CCD detektoru. Jeho výhodou je, že není nutné použít kruhovou aperturu (pinhole), což umožňuje snadné seřízení a vyžaduje méně optických členů.

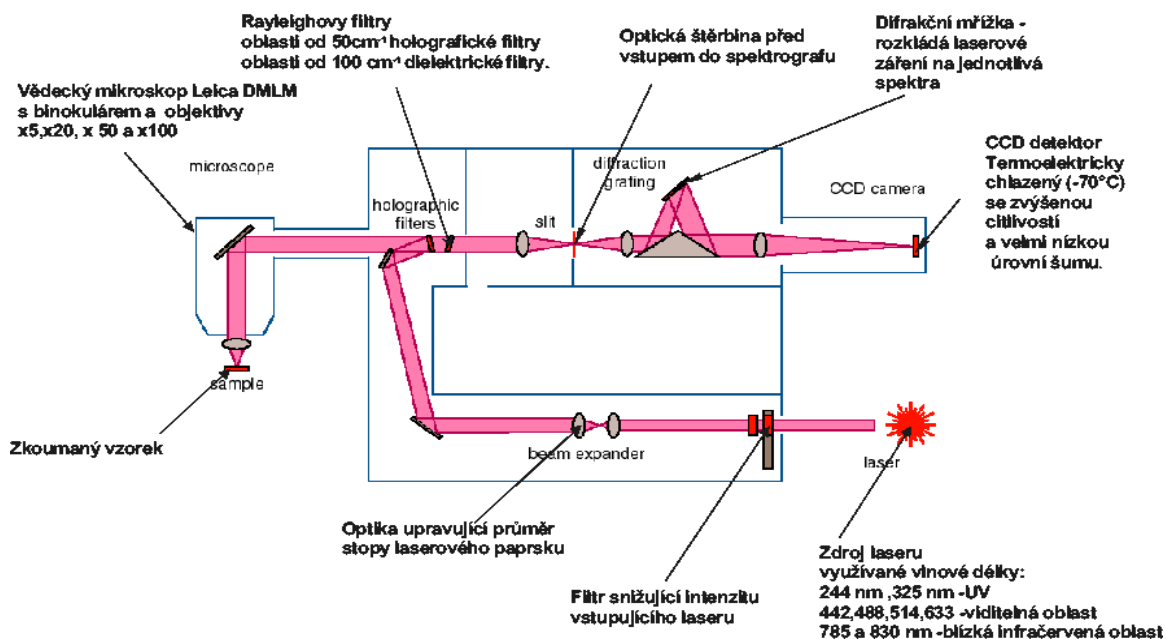
Dostatečně dlouho před měřením je třeba zapnout laser, aby se stačil stabilizovat. Pak můžeme postupně zapínat vlastní spektrometr, video kameru a ovládání stolku mikroskopu. Až nakonec zapínáme ovládací software. Software WiRE™ 2.0 je kompletní softwarový balík pro ovládání přístroje, získávání, studium a prezentaci Ramanových spekter. Po zapnutí kontroluje nastavení některých částí spektrometru, např. motorky řídicí polohy mřížky.

Před prvním měřením po zapnutí je vhodné provést kontrolu dráhy laseru ve spektrometru (*Health check*), najdeme jej v menu pod *Tools/ system health*. Tam lze nastavit jednotlivé součásti přístroje, které chceme nechat zkontrolovat. Řídíme se pak pokyny programu. Místo vzorku vložíme kalibrační křemíkovou podložku, program sám změří Ramanovo spektrum a vyhodnotí polohu a intenzitu čáry křemíku v blízkosti 520 cm^{-1} . Podle pokynů programu lze v přístroji postupně seřídít dráhu laseru na střed zorného pole na vzorku nebo paprsek zaostřovat.

Měřený vzorek vložíme na stolek mikroskopu na podložku a s mikroskopem nastaveným na optické pozorování v bílém světle a najdeme na vzorku vhodné místo

k měření Ramanova spektra. Je třeba dbát zvýšené opatrnosti při manipulaci s největším objektivem, protože by se mohl dotknout vzorku a tím se poškodit.

Software umožňuje sejmout vybrané místo na vzorku pomocí video kamery, provádí se to v části menu nazvaném *Live video*. Na snímku lze zobrazit měřítko, které je určeno zadáním používaného objektivu. To je jedna z mála věcí, kterou si software nezjistí sám, ale je to potřeba zadat ručně. Dál lze na snímku zobrazit souřadné osy. Příkazem *Set origin* nastavíme jejich střed do centra obrázku. Naopak příkazem *Get origin* se stolek mikroskopu posune tak, aby byl poslední počátek souřadnic ve středu zobrazeného výseku. Snímek vzorku pořídíme příkazem *Snap*.



Obr. 5. Optická dráha paprsku [4].

Před měřením je nutné zadat parametry měření v menu *Measurement/ New measurement*. Software nabídne možnost načíst již dříve uloženou šablonu. Jiná možnost je zvolit *Measurement/ New .../Spectral acquisition*. Potom postupně nastavíme všechny požadované parametry. Při následujících měřeních můžeme upravovat parametry v menu *Measurement/ Setup measurement*.

V podmenu *Range* zvolíme, zda chceme provádět statický nebo rozšířený sken, a zvolíme rozsah měření. Vybereme si, zda chceme provádět měření se zvýšenou konfokalitou, a ujistíme se, že používáme správnou difrakční mřížku.

V podmenu *Acquisition* nastavíme dobu expozice, počet měření (*Accumulations*, při nastavení opakování software naměřená spektra prostě sčítá) a výkon laseru (pokud měříme nějaký barevný organický vzorek, volíme menší hodnoty, abychom jej nepoškodili). Dál máme možnost nastavit odstraňování píků způsobených kosmickým zářením (*Cosmic ray removal*), což ale podstatně prodlužuje dobu měření. Navíc se může společně s píkem kosmického záření odstranit i něco podstatného v měřeném spektru. Po skončení měření je možné nechat zavřít závěrku laseru (*Close laser shutter on completion*) nebo vrátit spektrometr do původního nastavení (*Restore instrument state on completion*). Text v položce *Title* se zobrazí přímo u grafu naměřeného spektra, text v položce *Description* bude uložen v souboru naměřených dat. V podmenu *File* můžeme

nastavit automatické ukládání naměřených dat do souboru. V podmenu *Timing* můžeme nastavit zpoždění začátku měření (*Sample bleaching*), počet měření (*Number of acquisitions*) a interval mezi měřeními (*Interval between acquisitions*).

Přístroj je vybaven teplotní komorou, kterou lze využít pro studium vzorku v rozmezí teplot od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do $600\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rychlost ohřevu vzorku je $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu. Součástí systému je kontrolní jednotka a softwarová operace v WiRE™ 2.0. Chceme-li provádět měření s teplotní celou, zvolíme v podmenu *Temperature* výchozí a konečnou teplotu a teplotní krok. Pak již můžeme měření spustit.

Naměřené spektrum můžeme zpracovávat přímo v programu WiRE™ 2.0 v menu *Analysis*. Software umožňuje zpracovávat naměřená spektra pomocí standartních rutin (peak picking, curve fitting, baseline subtraction, smoothing). Utilita *Curve fit* se např. pokusí fitovat vybraný spektrální pás Gaussovou křivkou. Jejím výstupem jsou střední poloha pásu (*center*), jeho šířka (*width*), výška (*height*), plocha (*area*) a veličina popisující úspěšnost fitu (*Gaussian*). Před fitováním daného pásu provedeme nejdřív tzv. inicializaci pásů, aby fitování probíhalo od začátku vhodným směrem.

Chceme-li získat pouze polohy pásů, provedeme příkaz *Pick peak*. Ten zobrazí hodnoty poloh pásů a jednotlivé píky označí čárkou. V menu, které se zobrazí po kliknutí pravým tlačítkem myši do výstupu *Pick peak* lze v *Properties* nastavit *treshhold* hledání píků, tj. vybereme si, od jaké minimální intenzity nás píky zajímají.

K odstranění nežádoucích částí spektra slouží pomůcka *Zap*. S její pomocí můžeme dodatečně vystříhnout např. pík kosmického záření.

Kapitola 3

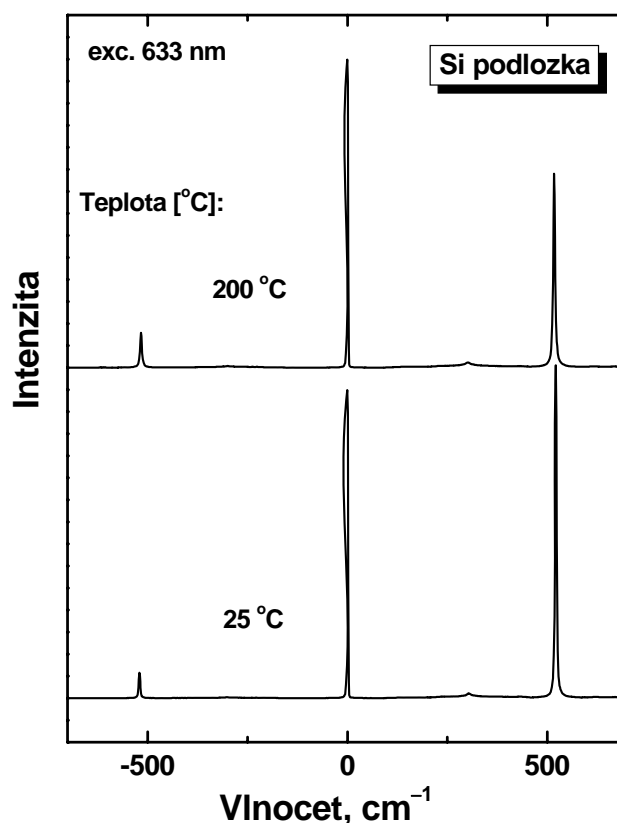
Příklady užití Ramanova mikroskopu

3. 1 Teplotní závislost intenzity Stokesovy a anti-Stokesovy linie

Jak již bylo zmíněno, poměr intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy linie závisí na teplotě vzorku, protože při různých teplotách jsou obsazeny jednotlivé energetické stavy podle Boltzmannova zákona.

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_{\text{vib}}}{\nu_0 - \nu_{\text{vib}}} \right)^4 \exp\left(-\frac{h\nu_{\text{vib}}}{kT}\right)$$

S cílem ověřit uvedenou závislost a zdůvodnit nutnost intenzitní kalibrace spektrometru jsem měřila Stokesovu a anti-Stokesovu linii u 520 cm^{-1} krystalického křemíku v teplotní cele pro teploty od pokojové do 670 K v intervalech 100 K. Použila jsem rozšířený sken, abych měla oba pásy v jednom spektru a tím stejné podmínky měření obou čar. Měření jsem provedla jednou, s plným výkonem laseru. Výkon červeného laseru dopadající na vzorek je 9 mW (z nezávislých měření).



Obr. 6. Ramanův posun Stokesovy a anti-Stokesovy linie u 520 cm^{-1} krystalického křemíku.

Z naměřených spekter jsem pak získala polohy a intenzity pásů v programu WiRETM 2.0. Proložila jsem příslušnými pásy Gaussovou křivku a odečetla plochu pod ní.

Pak jsem vynesla do grafu poměr ploch pásů příslušných změřených linií a teoretický poměr ploch linií při daných Ramanových posuvech. Linie se totiž s rostoucí teplotou posouvaly směrem k menším absolutním vlnočtům. To mohlo být způsobeno např. tím, že vibrace již přestávají být pro vyšší teploty harmonické. Navíc jsem zjistila, že příslušné linie odpovídající dané teplotě neměly stejnou absolutní hodnotu posuvu, což může souviset s rozostřováním laserového paprsku při ohřevu. Hodnoty posuvu jsem proto pro další výpočet vystředovala a za jejich chybu jsem považovala polovinu šířky píku. Chyba určení plochy pásů je statistická. Měření jsem provedla pro vzrůstající i klesající teplotu. Je pravděpodobné, že teplota vzorku byla odlišná od teploty zjištěné v teplotní cele. Při měření s klesající teplotou se mi nepodařilo pouhým chlazením dosáhnout výchozí teploty, proto je nejnižší teplota u obou měření různá. V budoucnosti lze tento problém řešit zapojením chlazení tekutým dusíkem.

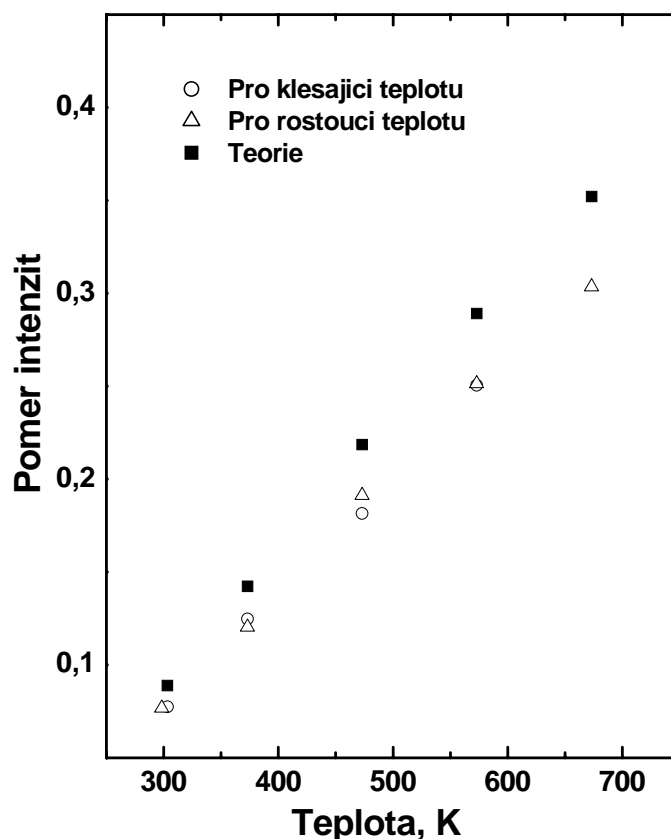
Tabulka 1. Měření pro vzrůstající teplotu.

T	ν_S / cm^{-1}	Plocha _S	$\nu_{\text{anti-S}} / \text{cm}^{-1}$	Plocha _{anti-S}	Poměr změřený	Poměr teoretický	Chyba poměru
298,25	520,28	74882	521,11	975017	0,077	0,085	0,009
373,15	518,67	108355	519,48	899800	0,120	0,142	0,015
473,15	516,33	130466	517,11	682414	0,191	0,219	0,028
573,15	513,83	156117	514,67	621329	0,251	0,289	0,045
673,15	511,30	194332	512,10	640318	0,304	0,352	0,058

Tabulka 2. Měření pro klesající teplotu.

T	ν_S / cm^{-1}	Plocha _S	$\nu_{\text{anti-S}} / \text{cm}^{-1}$	Plocha _{anti-S}	Poměr změřený	Poměr teoretický	Chyba poměru
303,15	520,55	5978	520,74	77234	0,077	0,089	0,008
373,15	519,39	4574	518,89	36697	0,125	0,142	0,016
473,15	517,29	1346	516,38	7422	0,181	0,219	0,030
573,15	515,30	587	514,01	2345	0,250	0,289	0,043
673,15	512,28	180	511,67	899	0,201	0,352	0,047

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2 a vyneseny do grafu na obrázku 7, ve kterém nejsou kvůli názornosti vyneseny chyby měření. Jak je vidět, naměřené hodnoty poměrů intenzit pásů rostou s teplotou pomaleji než poměry vypočtené podle teorie. To může být způsobeno jednak špatným kontaktem vzorku s držákem teplotní cely nebo rozostřováním laserového paprsku s ohřevem. Hodnoty získané při ohřevu a chlazení jsou v dobré shodě. Velikost chyb měření souvisí nejspíš s malým počtem provedených pokusů. Chyba určení plochy pásu je řádově stejná. Měření poměru intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy linie Ramanova rozptylu linie u 520 cm^{-1} krystalického křemíku bude využito k dalšímu zdokonalení teplotních měření v cele, odstranění odhalených nedostatků a získané poznatky poslouží pro intenzitní kalibraci spektrometru.



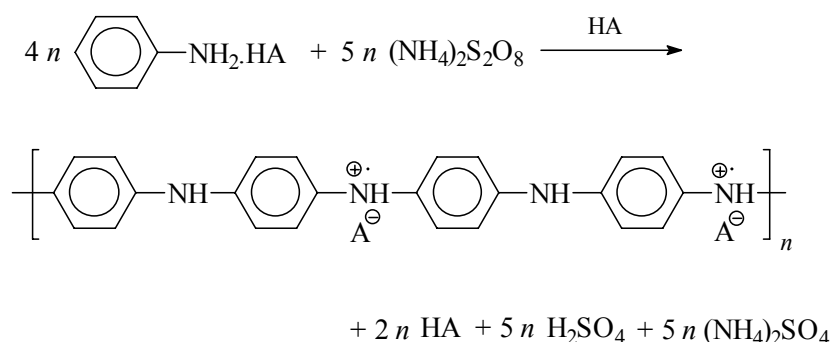
Obr. 7. Graf závislosti poměru integrálních intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy linie krystalického křemíku u 520 cm^{-1} na teplotě.

3. 2 Polyanilin

Polyanilin je jedním z tzv. vodivých polymerů, je tvořen monomerními jednotkami anilinu. Polyanilinový řetězec může těchto jednotek obsahovat až tisíc, jde tedy jednoznačně o polymerní materiál. Nejjednodušším a také prvním objeveným vodivým polymerem byl ale polyacetylen. Při zkoumání jeho halogenace bylo pozorováno zvýšení jeho vodivosti na úroveň anorganických polovodičů, až na 38 S cm^{-1} . Polyacetylen je však nestabilní.

Základním předpokladem pro vodivost polymeru je systém konjugovaných π -elektronů, který je tvořen střídáním jednoduchých a dvojných vazeb v řetězci. Materiál musí navíc obsahovat volné nositele náboje, které zprostředkovávají jeho přenos po řetězci. Ty jsou do systému vnášeny tzv. dopováním. Zde, na rozdíl od dopování anorganických polovodičů, jsou třeba vysoké koncentrace dopantu. V průběhu dopování se zvýší vodivost z obvyklých hodnot typických pro izolátory (10^{-10} až 10^{-5} S cm^{-1}) na úroveň polovodičů a kovů (1 až 10^4 S cm^{-1}) [6].

Polyanilin se nejčastěji připravuje oxidací anilinu vhodným oxidačním činidlem v kyselém vodném prostředí. Standardní postup spočívá v oxidaci 0.2 M anilin hydrochloridu (vodný roztok) 0.25 M peroxodvojsíranem amonným při laboratorní teplotě. Reakce proběhne během několika minut a výsledný polyanilin ve formě tzv. protonovaného emeraldinu pak získáme filtrací (obr. 8) [7].

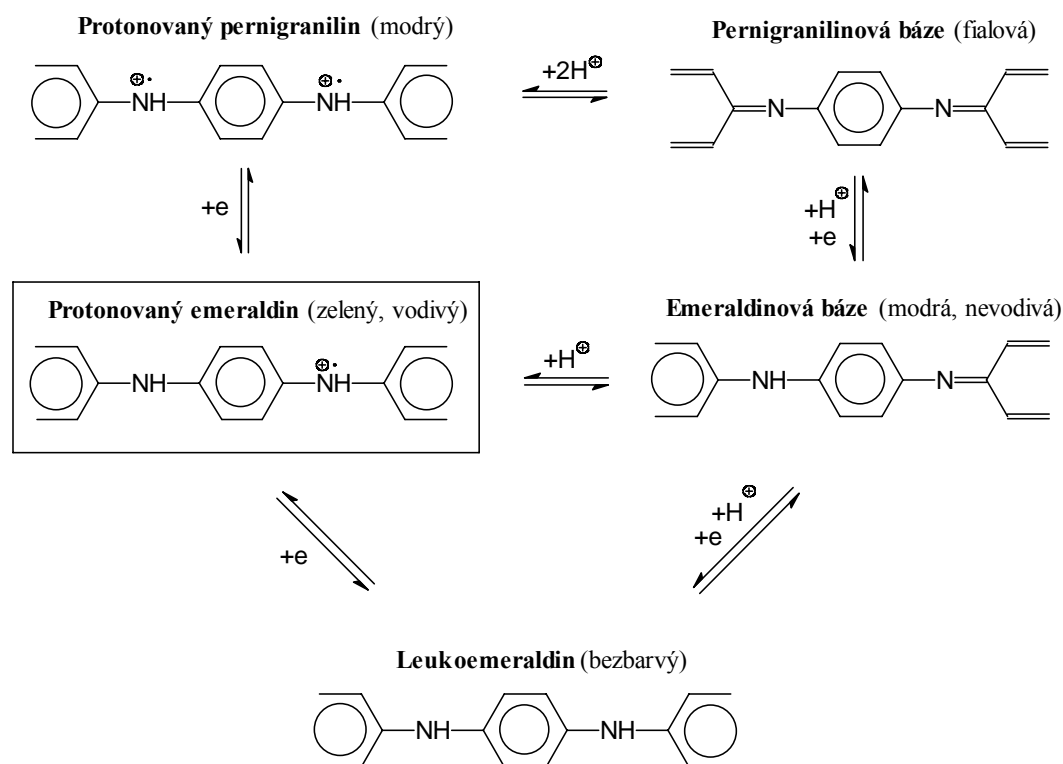


Obr. 8. Oxidace anilinu peroxydvojsíranem amonným v kyselém vodném prostředí poskytuje polyanilin [7].

Kromě vodivosti má polyanilin spoustu dalších zajímavých a potenciálně užitečných vlastností. Dokáže měnit svou strukturu v závislosti na vnějších podmínkách (pH, redoxní potenciál, reakce s určitými látkami). To by se dalo využít při tvorbě senzorů. Polyanilin je barevný a je schopný barvu měnit (modrá/ zelená/ fialová/ bezbarvá). Je paramagnetický, ale ferromagnetika jím pokryta mění své vlastnosti. V kombinaci s přechodovými kovy upravuje jejich katalytické vlastnosti. Sám polyanilin je schopen katalyzovat reakce spojené s přenosem elektronů [8].

3.2.1 Různé formy polyanilinu

Polyanilin může existovat v pěti základních formách [9]. Ty se navzájem liší stupněm protonace a poměrem oxidovaných nebo redukovaných monomerních jednotek. Jednotlivé formy a jejich možné vzájemné přeměny jsou znázorněny v obrázku 9.

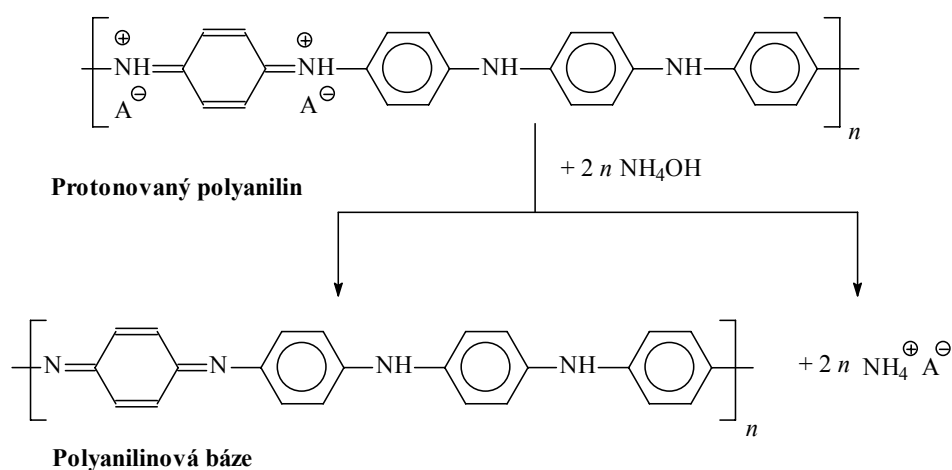


Obr. 9. Formy polyanilinu [9].

Nejdůležitější formou polyanilinu je protonovaný emeraldin. Má charakteristickou zelenou barvu, od které je také odvozen jeho název. Vzniká při oxidační polymeraci anilinu. Je elektricky vodivý a jeho vodivost je způsobena přítomností kationt radikálů ve struktuře. Pozitivní náboj na řetězci je vyvažován aniontem. Aniont ve struktuře polyanilinu je původně odvozen od kyseliny použité při protonaci. Nejčastěji používané kyseliny jsou anorganické, např. chlorovodíková, sírová, nebo fosforečná. Takto připravený polyanilin je nerozpustný v jakémkoliv rozpouštědle s výjimkou koncentrované kyseliny sírové. Původní anionty kyseliny použité při polymeraci mohou být nahrazeny i složitějšími anionty odvozenými od organických kyselin. Takto upravený polyanilin je rozpustný v některých organických rozpouštědlech.

Deprotonovaná forma emeraldinu je emeraldinová báze (obr. 10). Emeraldinová báze má stejný počet redukovaných (aminových) a oxidovaných (iminových) jednotek. Tato forma je nevodivá a má modrou barvu. Je rozpustná v některých organických rozpouštědlech.

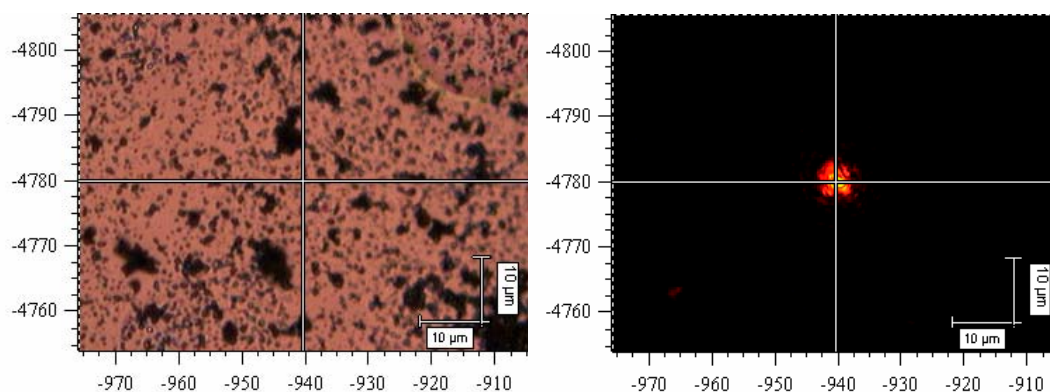
Z emeraldinu lze redukcí připravit leukoemeraldin, oxidací pak pernigranilin. K redukcí emeraldinu lze použít fenylylhydrazin nebo hydrazin. Leukoemeraldin je bezbarvá, elektricky nevodivá látka. Všechny jednotky leukoemeraldinu jsou redukované.



Obr. 10. Vodivá protonovaná forma polyanilinu přechází v alkalickém prostředí hydroxidu amonného na nevodivou polyanilinovou bázi [7].

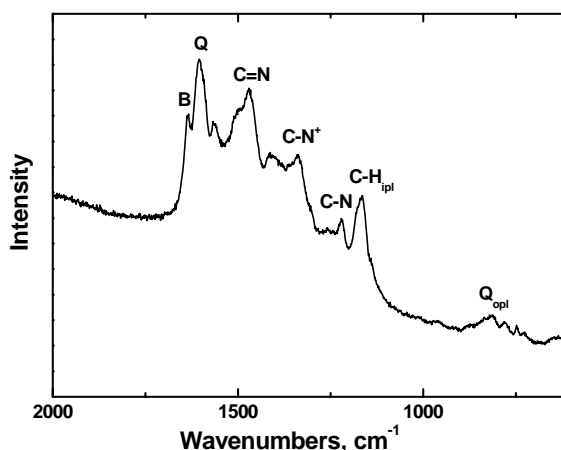
3.2.2 Ramanovo spektrum polyanilinové báze

Obrázek polyanilinové báze připravené *in situ* oxidací 0.1 M anilinu 0.25 M peroxydvojsíranem amonným na zlaté podložce tak, jak je vidět pod mikroskopem v Ramanovském mikroskopu, je zobrazen na obrázku 11 vlevo. V pravé části obrázku je zobrazena stopa laseru o excitační vlnové délce 633 nm tak, jak je vidět pod mikroskopem během měření Ramanových spekter. Tenký film polyanilinové báze má nafialovělou barvu, neboť jej nelze na zlaté podložce úplně deprotonovat. To vyplývá i z naměřených Ramanových spekter uvedených na obrázku 12.



Obr. 11. Mikroskopický obrázek tenkého filmu polyanilinové báze na Au podložce: (vlevo) vzorek pod mikroskopem, (vpravo) stopa laseru při měření.

Ve spektru jsou vidět pásy Ramanova posuvu odpovídající strukturním jednotkám polyanilinové báze. Jde především o pásy valenčních vibrací benzenového (B) a chinoidního (Q) kruhu, valenčních vibrací dvojnásobné C=N a jednoduché C–N vazby, deformačních rovinných C–H vibrací chinoidního kruhu. Většina pásů je široká vzhledem ke složitosti struktury polyanilinu a přítomnosti různých konformací na řetězci. Zbytková protonace polyanilinové báze na zlaté podložce je patrná z přítomnosti pásu valenčních C–N⁺ vibrací odpovídajících protonované formě polyanilinu.

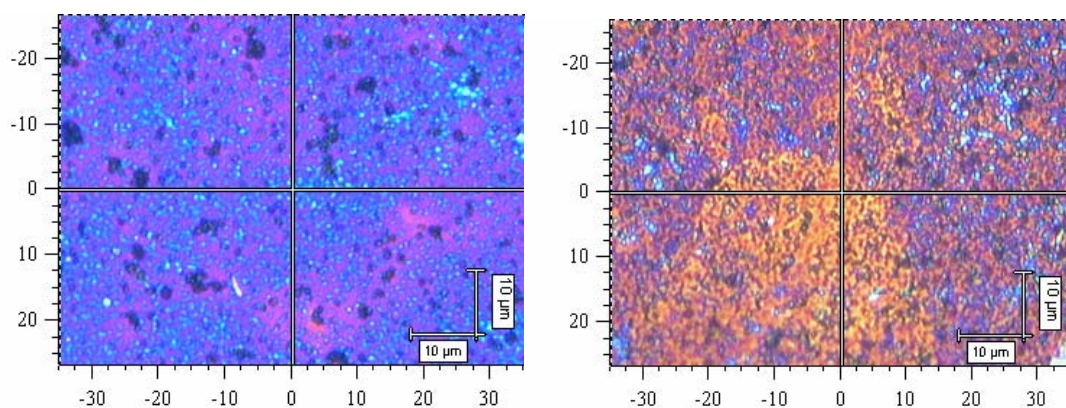


Obr. 12. Ramanovo spektrum polyanilinové báze na Au podložce.

3.2.3 Stabilita pernigranilinu

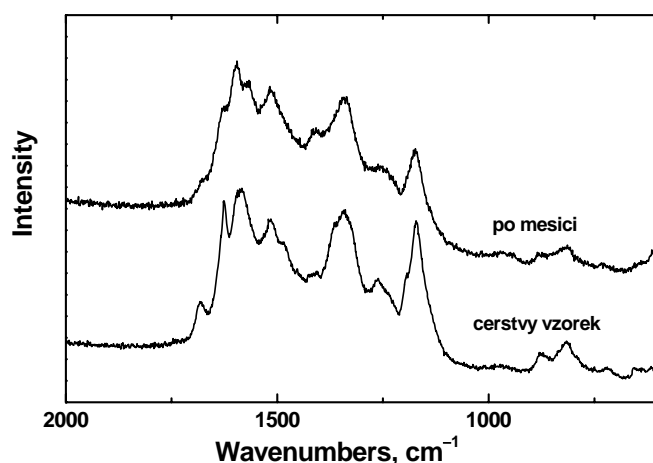
Chemickou oxidací anilinu vzniká polyanilin ve formě emeraldinu [9]. Jde o jeho protonovanou formu, která vznikne v přítomnosti kyseliny. Oxidací emeraldinu oxidačním činidlem, například peroxydvojsíranem amonným nebo peroxidem vodíku, dostaneme plně oxidovanou formu, pernigranilin. Pernigranilin se podobně jako emeraldin vyskytuje ve dvou formách: protonované soli a neprotonované báze (Obr. 9). Pokud je přechod emeraldinu k pernigranilinu uskutečněn v silně kyselém prostředí, výsledný produkt je pernigranilinová sůl a přechod proběhne ve velmi krátké době, prakticky okamžitě. V opačném případě získáme pernigranilinovou bázi a reakce může trvat i několik hodin. Obě formy pernigranilinu jsou nestálé, rozpadají se na nízkomolekulární produkty. Rozpad soli je opět rychlejší než u báze.

Na obrázku 13 je tenký film pernigranilinu připraveného *in situ* polymerací 0.1 M anilinu síranu 0.4 M peroxydvojsíranem amonným tak, jak jej lze pozorovat pomocí mikroskopu u Ramanova spektrometru, bezprostředně po jeho přípravě a po ponechání vzorku jeden měsíc na vzduchu. Modré části na obrázku odpovídají protonované pernigranilinové formě. Fialové části patří fenazinu a zesíťovaným úsekům řetězců [9]. Z obrázku čerstvého vzorku je patrné, že k zesíťování dochází okamžitě, tj. bezprostředně po přípravě filmu. S časem se pak pernigranilin rozkládá na bezbarvé nebo hnědé nízkomolekulární produkty chinonového typu.



Obr. 13. Mikroskopický obrázek pernigranilinového filmu na Si podložce: (vlevo) čerstvý vzorek; (vpravo) vzorek ponechaný jeden měsíc na vzduchu.

Uvedené závěry o vývoji molekulární struktury pernigranilinového filmu vyplývají ze studia naměřených Ramanových spekter čerstvého a měsíc starého vzorku, uvedených na obrázku 14. Je z nich patrné, že se výrazně liší od spektra polyanilinové báze, řada pásů je posunuta k jiným vlnovým délkám a má odlišný tvar. Podrobná studie vývoje molekulární struktury pernigranilinového filmu na křemíkové podložce na základě měření Ramanových spekter v různých časech je předmětem výzkumu na ÚMCH AV ČR v Praze.



Obr.14. Ramanova spektra pernigranilinového filmu připraveného *in situ* na Si podložce: (vlevo) čerstvý vzorek; (vpravo) vzorek ponechaný jeden měsíc na vzduchu.

Závěry

Předkládaná bakalářská práce bude užitečnou pomůckou pro uživatele Ramanova mikroskopu na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze, kteří potřebují znát molekulární strukturu svých vzorků. Kromě stručných teoretických základů Ramanova rozptylu a Ramanovy mikroskopie se s její pomocí rychle seznámí s principem Ramanova mikroskopu, konkrétně s Ramanovým mikroskopem firmy Renishaw a s funkcemi jeho jednotlivých součástí v českém jazyce.

Najdou v ní popis konkrétního praktického měření Ramanových spekter vybraných molekulárních systémů. Výsledky měření poměru intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy linie v závislosti na teplotě vzorku budou využity ke stanovení teploty měřeného vzorku a vlivu teploty na měřené Ramanovo spektrum. Je to první experiment předcházející plánované intenzitní kalibraci spektrometru pomocí k tomuto účelu nově zakoupeného vnějšího zdroje.

Uvedené výsledky studia stability pernigranilinového filmu spadají do první fáze zkoumání vývoje molekulární struktury různých forem polyanilinu na základě měření Ramanových spekter. Toto studium patří mezi základní předměty výzkumu na ÚMCH AV ČR v Praze.

Literatura

- [1] Burda V., in <http://physics.mff.cuni.cz/kchfo/burda/pre.htm>
- [2] Infrared and Raman Spectroscopy, Ed. Schrader B., VCH Weinheim 1995.
- [3] Schrader B., Moore D.S.: *Laser-based molecular spectroscopy for chemical analysis. Raman scattering processes* (IUPAC Recommendations 1997), Pure Appl. Chem. **69** (1997) 1451–1469.
- [4] Materiály firmy Renishaw s.r.o.
- [5] Modern Techniques in Raman Spectroscopy, Ed. Laserna J. J., New York 1996.
- [6] Prokeš J., Stejskal J., Omastová M.: *Polyanilin a polypyrrol – dva představitelé vodivých polymerů*, Chemické listy **96** (2001) 484–492.
- [7] Stejskal J., Gilbert R. G.: *Polyaniline. Preparation of a conducting polymer* (IUPAC technical report), Pure Appl. Chem. **74** (2002) 857–867.
- [8] Stejskal J.: *Polyanilin: vodivý polymer*, Otevřená věda: Praktické kurzy z fyziky, chemie a biologie, AV ČR, Akademické a univerzitní centrum Nové Hradky, Nové Hradky, Srpen 2006, Sborník kurzů, pp. 173–182.
- [9] Stejskal J., Kratochvíl P., Jenkins A. D.: *The formation of polyaniline and the nature of its structures*, Polymer **37** (1996) 367–369.