VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

RAMANOVSKÁ SESTAVA PRO ANALÝZU ZÁŘENÍ

RAMAN ASSEMBLY FOR RADIATION ANALYSIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. LENKA STRÁNSKÁ**

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. ZBYNĚK DOSTÁL, Ph.D.**

SUPERVISOR

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

Zadaní diplomové práce

Ústav:	Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka:	**Bc. Lenka Stránská**
Studijní program:	Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor:	Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce:	**Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.**
Akademický rok:	2020/21

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Ramanovská sestava pro analýzu záření

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

V současnosti je vyvíjeno přetlakové zařízení pro zavádění médií a světla do dutých optických vláken. K jeho provozu je vyžadována optická sestava pro Ramanovskou spektroskopii. V rámci této diplomové práce bude navržena právě tato soustava, která umožní vyčítaní i velmi slabých signálů.

Cíle diplomové práce:

1) Navrhnout řešení optické sestavy.
2) Optimalizovat optickou soustavu sestavy.
3) Vytvořit výrobní dokumentaci mechanických částí sestavy.
4) Navrhnout vhodnou justážní metodu.
5) Sestavu vyrobit a otestovat.

Seznam doporučené literatury:

LEWIS, Ian R. a Howell G. M. EDWARDS. Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 0824705572.

FUKA, J. a HAVELKA, B. Optika a atomová fyzika: fyzikální kompendium pro vysoké školy. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961.

GLÉZL, Š., KAMARÁD, J., a SLIMÁK, I. Přesná mechanika. Alfa, 1992.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2020/21

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc. ředitel ústavu	doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D. děkan fakulty

Abstrakt
Pro potřeby Ramanovské spektroskopie je nutné zavádět laserové záření do optického vlákna a současně analyzovat zpětně sbírané záření. Bylo proto nutno navrhnout specializovanou optickou soustavu. Tu lze použít i pro měření dalších spektroskopických metod, například pro měření fotoluminiscence. Právě těmito dvěma zmíněnými metodami se zabývá teoretická část této práce, ve které je popsán jejich základní princip a používaná instrumentace. V souvislosti s Ramanovskou spektroskopií jsou v teoretické části představeny i speciální metody Ramanovské spektroskopie pro zesílení měřeného Ramanova rozptylu. Taktéž je v teoretické části věnována pozornost problematice vyčítání slabých signálů. V praktické části diplomové práce je nejprve pojednáno o optickém návrhu sestavy a výběru optických prvků, které tuto sestavu tvoří. Následuje představení konstrukčního řešení sestavy, které bylo potřeba navrhnout na základě parametrů vybraných optických prvků. Praktická část práce je zakončena sestavením a otestováním navrhované sestavy.

Summary
For Raman spectroscopy is a need to introduce a laser light into an optic fiber and analyze a collected light at the same time. Therefore it was proposed a specialized optical system. This system can also be used to measure other spectroscopy methods such as photoluminescence. In the theoretical part of this theses, was discussed both mentioned methods and their instrumentations. In addition to the Raman spectroscopy, was also shown some special cases of Raman spectroscopy for enhanced measurement of Raman scattering. The problem of weak signal detection and its reading is also discussed in the theoretical part of the thesis. In the practical part of this thesis was discussed the mechanical design of the optical system and the choice of optical elements that are used in the system. Next, is introduced the manufactured system, which design is based on the parameters of the chosen optical elements. The practical part of the thesis ends with an assembly and testing of the proposed system.

Klíčová slova
Ramanovská spektroskopie, fotoluminiscence, optický návrh, konstrukční řešení.

Keywords
Raman spectroscopy, photoluminescence, optical design, mechanical design.

STRÁNSKÁ, L.*Ramanovská sestava pro analýzu záření.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2021. 58 s. Vedoucí Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně, za odborného vedení Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D., a že všechny podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Bc. Lenka Stránská

Mé poděkování patří panu Ing. Zbyňkovi Dostálovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu při studiu.

Bc. Lenka Stránská

Obsah

Úvod **3**

1 Ramanovská spektroskopie **5**
1.1 Princip Ramanovské spektroskopie . . . 5
1.2 Instrumentace pro Ramanovskou spektroskopii . . . 7
1.2.1 Excitační zdroje . . . 8
1.2.2 Filtry . . . 9
1.2.3 Světlovodná optika . . . 10
1.2.4 Detektory . . . 11
1.2.5 Spektrometry . . . 12
1.3 Speciální metody Ramanovské spektroskopie . . . 14
1.3.1 Rezonanční Ramanovská spektroskopie . . . 15
1.3.2 Povrchem zesílená Ramanovská spektroskopie (SERS) . . . 15
1.3.3 Hrotem zesílená Ramanovská spektroskopie (TERS) . . . 18
1.4 Vyčítání slabých Ramanových signálů . . . 19
1.4.1 Metody zesílení a modulace signálu . . . 20
1.4.2 Metody redukce šumu . . . 23

2 Luminiscenční spektroskopie **25**
2.1 Fotoluminiscence . . . 26
2.1.1 Interakce záření s molekulou . . . 26
2.1.2 Fotoluminiscenční spektra . . . 28
2.1.3 Instrumentace pro fotoluminiscenci . . . 29

3 Motivace a cíle práce **31**

4 Optické řešení sestavy **33**
4.1 Optický návrh . . . 33
4.2 Výběr optických součástí . . . 35
4.2.1 Sada pro Ramanovskou spektroskopii . . . 35
4.2.2 Objektivy . . . 36
4.2.3 Sada ND filtrů . . . 36
4.3 Optická simulace . . . 37

5 Konstrukční návrh **39**
5.1 Optická kostka . . . 40
5.2 Lineární posuv . . . 42
5.3 Posuv objektivu . . . 43
5.4 Paralelogram . . . 44
5.5 Držák filtrů . . . 45

6 Sestavení a testování sestavy **47**
6.1 Sestavení . . . 47
6.2 Justáž . . . 48
6.3 Testování . . . 50

Závěr **53**

Literatura **55**

Úvod

Na interakci elektromagnetického záření se zkoumanou látkou je založena celá řada spektroskopických metod. Při dopadu záření na látku může docházet k absorpci, rozptylu či průchodu tohoto záření danou látkou. Ramanovská spektroskopie je založena na nepružném Ramanovu rozptylu, který byl objeven již v roce 1928. Tento rozptyl vzniká změnami rotačně-vibračních energiových stavů molekul ve vzorku způsobenými dopadajícím zářením [1]. Ramanovská spektroskopie je tedy jednou z metod molekulové rotačně-vibrační spektroskopie. Kromě obecných výhod metod optické spektroskopie, jako je nedestruktivnost a rychlost měření, vynikají metody rotačně-vibrační spektroskopie poskytováním informací o chemických strukturách a fyzikálních vlastnostech analytu, které vedou ke snadnému rozpoznání zkoumané látky díky jejímu specifickému „otisku prstu“ ve spektrech, který je pro každou měřenou molekulu jedinečný [2].

Díky svým výhodám nachází tato metoda uplatnění napříč různými obory i aplikacemi. Právě s narůstajícím počtem aplikací se zvyšuje také snaha o zdokonalení této spektroskopické metody či její spojení s dalšími analytickými technikami. Příkladem je i projekt v rámci kterého vznikla tato diplomová práce. V tomto projektu je v současné době vyvíjena přetlaková komora umožňující současné přivádění světla a pracovního média ke vzorku, který se nachází v komoře skenovacího mikroskopu. Přetlaková komora obsahuje dvě optická vlákna, kdy první optické vlákno slouží k přívodu záření a druhé optické vlákno, které je duté, slouží k vedení světla a pracovního média z této komory ke vzorku [3].

Navrhovaná sestava, která je předmětem této diplomové práce, slouží k zavádění záření do prvního optického vlákna, jehož konec je umístěn mimo zmíněnou přetlakovou komoru. Zároveň navrhovaná sestava bude sloužit i ke sběru záření, které bude vznikat interakcí světla se vzorkem. Tento sběr bude probíhat po stejné optické cestě, jakou je ke vzorku přiváděno záření ze zdroje. V návrhu je uvažováno nejen o sběru záření odpovídající Ramanovu rozptylu, ale také bude možné tuto sestavu využívat i pro další spektroskopické metody, například pro měření fotoluminiscence. Proto se budou následující části této práce zabývat právě Ramanovskou spektroskopií a fotoluminiscencí a jejich instrumentací.

1. Ramanovská spektroskopie

Ramanovská spektroskopie je metoda, která získává informace o struktuře a vlastnostech molekul ze vzorkem rozptýleného záření. Je založena na interakci fotonů dopadajícího záření s molekulami zkoumané látky, při které dochází ke změnám ve vibračních stavech v molekulách. Při Ramanovské spektroskopii se využívá laserového zdroje, kterým se v molekulách vzorku generuje charakteristické rozptýlené záření, které je následně zaznamenáno jako tzv. Ramanovo spektrum [1].

Ramanovská spektroskopie patří mezi nedestruktivní techniky, které umožňují jak kvantitativní, tak i kvalitativní analýzu zkoumané látky. Mezi její výhody patří například bezkontaktnost, možnost měřit vzorky různých skupenství a možnost analyzovat jak organické, tak i anorganické látky. Další výhodou je, že pro analýzu stačí i malé objemy vzorků. Tuto metodu je možné použít také při nestandardních podmínkách, kterými mohou být například vysoká teplota nebo zkoumání vzorku ve vakuu [4].

1.1. Princip Ramanovské spektroskopie

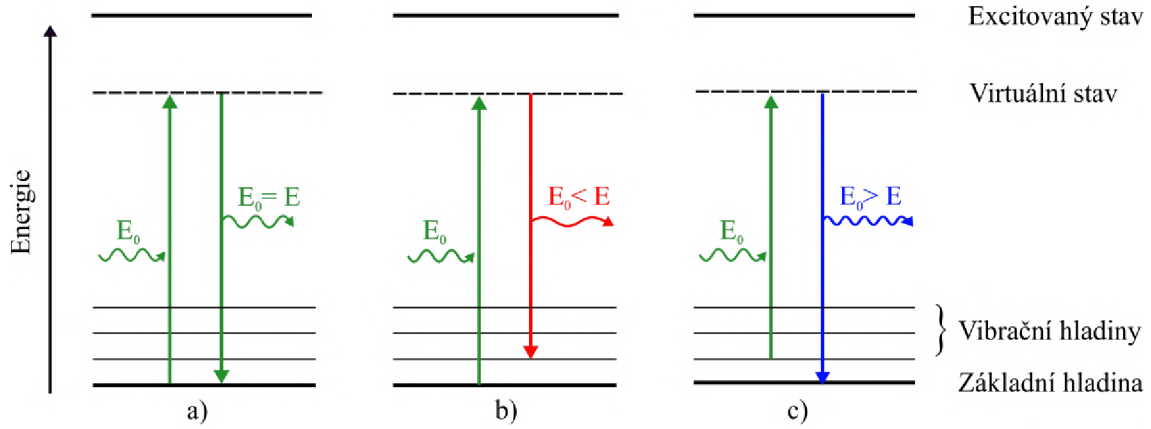
Jak již bylo řečeno v úvodu, při dopadu záření na vzorek dochází k interakci fotonů s molekulami vzorku, při které nastává výměna energií mezi fotony z monochromatického záření a molekulami. Tato energie excituje molekulu a tím je vytvořen krátkodobý tzv. virtuální energiový stav. Tento stav není stabilní, a proto dochází k rychlému vyzáření získané energie ve formě fotonu, který tvoří rozptýlené záření. Tento proces vyzáření se v literatuře označuje také jako tzv. reemise [2].

Pokud při interakci fotonu s molekulou vzorku nedojde ke změně rotačního nebo vibračního stavu, tak se molekula vrací z virtuálního stavu zpět do základního vibračního stavu a při tomto přechodu jsou vyzářeny fotony o stejné vlnové délce (energii) jako fotony dopadajícího záření. Jedná se tedy o dokonale pružné srážky fotonu s molekulou, při kterých nenastává změna energie. Tento typ rozptylu je dominantní a nazývá se Rayleighův či pružný rozptyl a na obrázku 1.1 mu odpovídá situace a) [2, 5].

V případě, že se molekula z virtuálního stavu nevrátí do základního vibračního stavu, znamená to, že v procesu rozptylu byla přenesena část energie, a to buď z dopadajícího fotonu na molekulu, nebo z molekuly na rozptýlený foton. V tomto případě se jedná o nepružný proces a vlnová délka (energie) rozptýleného fotonu se liší od vlnové délky (energie) dopadajícího fotonu. Tento proces je znám jako Ramanův jev a nese jméno po indickém fyzikovi siru C. V. Ramanovi, který jako první tento efekt v roce 1928 pozoroval a popsal. Za tento objev se následně stal v roce 1930 nositelem Nobelovy ceny za fyziku. V souvislosti se změnami energie během tohoto jevu se tento druh rozptylu označuje jako nepružný nebo též Ramanův rozptyl [2]. Právě na Ramanovu rozptylu je založena Ramanovská spektroskopie. Naopak dominantní Rayleighův rozptyl je pro Ramanovskou spektroskopii zcela bezvýznamný. Při porovnání s Rayleighovým rozptylem je Ramanův rozptyl velice slabý a nastává pouze pro jeden z 10^6 až 10^8 fotonů, které jsou rozptýleny [5].

Při nepružném rozptylu jsou emitovány fotony s vyšší nebo nižší vlnovou délkou, než má dopadající záření. Prvním případem je situace, kdy molekula část energie získané z dopadajícího fotonu využije k přechodu ze základního vibračního stavu na vyšší virtuální energiový stav. Při návratu zpět do základního vibračního stavu je pak vyzářen foton

o nižší energii, a tedy s vyšší vlnovou délkou, než měl původní dopadající foton. Tento typ nepružného rozptylu se nazývá Stokesův a takto vzniklé rozptýlené záření náleží do Stokesovy oblasti spektra. Stokesův rozptyl je znázorněn na obrázku 1.1 b). Druhou možností nepružného rozptylu je anti-Stokesův rozptyl, při kterém jsou rozptylovány fotony s vyšší energií, než jakou měly fotony z laserového záření, tomuto odpovídá situace c) na obrázku 1.1. Tuto energii fotonům odevzdaly molekuly, které se již nacházely ve vyšším vibračním energiovém stavu a při vyzáření fotonu se molekula vrátila do základního vibračního stavu. Lze tedy říci, že foton odebírá molekule část její vibrační energie, a proto dochází k vyzáření fotonů s vyšší energií neboli s nižší vlnovou délkou. Tento rozptyl pak reprezentují čáry v anti-Stokesově oblasti spektra [1, 2, 5] .

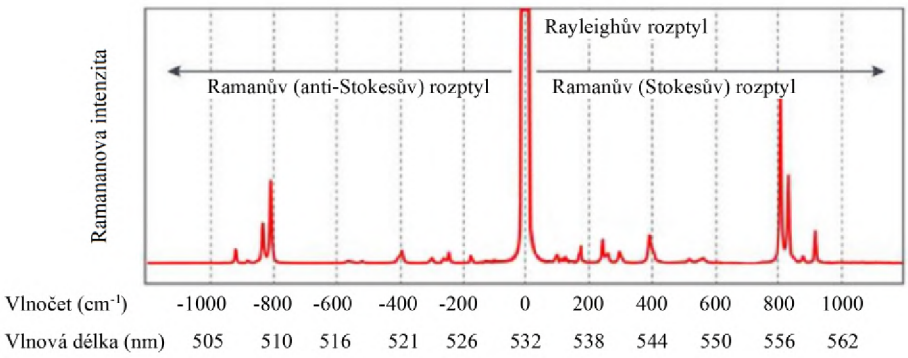


Obrázek 1.1: Schematický diagram energiových přechodů pro a) Rayleighův rozptyl, b) Stokesův rozptyl a c) anti-Stokesův rozptyl.

Poměr fotonů rozptýlených Stokesovým a anti–Stokesovým mechanismem je závislý na populaci daných vibračních stavů v molekule. Při pokojové teplotě bývá obecně intenzita Stokesova rozptylu vyšší, protože se při normální teplotě většina molekul nachází v základním vibračním stavu, a proto je u nich větší pravděpodobnost právě Stokesova rozptylu. V literatuře se udává, že intenzita anti-Stokesových čar ve spektru bývá i 10krát nižší než u Stokesových čar v závislosti na teplotě vzorku [6]. Zvýšení poměru anti-Stokesova mechanismu rozptylu vzhledem ke Stokesovu lze jednoduše dosáhnout například zahřátím vzorku [2].

Ramanovo spektrum, tvořené Stokesovým a anti-Stokesovým rozptylem, je možné vidět na obrázku 1.2, kde je zároveň zobrazen i dominantní Rayleighův rozptyl, při kterém nedochází k posunu vlnových délek. Rayleighův rozptyl však není pro Ramanovskou spektroskopii podstatný, a proto se při měření umisťují před spektrometr filtry, které tento typ rozptylu blokují a zabraňují jeho vstupu do spektrometru [2].

Jak již bylo řečeno, výstupem měření Ramanovské spektroskopie je Ramanovo spektrum. Standardně je vyjádřeno jako závislost intenzity rozptýleného záření na vlnočtu (reciproká hodnota vlnové délky), jehož jednotkou je cm^{-1}. Tato jednotka vlnočtu sice není doporučenou jednotkou Mezinárodní soustavy jednotek, ale její používání je ve spektroskopii již zvyklostí. Je to dáno tím, že se ve spektroskopii studuje interakce záření a molekuly, která je obvykle sledována z hlediska energie. Proto je vhodné použít stupnice frekvencí nebo vlnočtu, které lineárně souvisí s energií [2, 6].



Obrázek 1.2: Schematické znázornění Ramanova spektra s porovnáním intenzit pružného a nepružného rozptylu. Převzato a upraveno z [7].

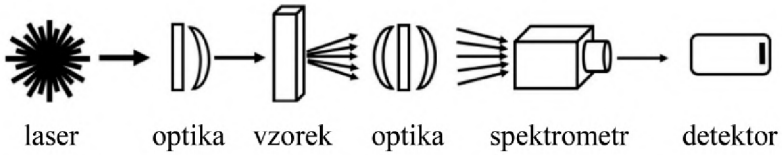
Pro vznik Ramanova rozptylu však nestačí pouze interakce fotonů s molekulou a následné změny energií ve vibračních energiových hladinách. Je zapotřebí, aby při vibračním pohybu došlo ke změně polarizovatelnosti molekuly v průběhu vibrace. Změna polarizovatelnosti je schopnost posunu elektrických nábojů v molekule vlivem elektrického pole monochromatického záření. Tuto schopnost vykazují hlavně nepolární části molekul a molekuly s vysokou symetrií. Vibrace nepolárních vazeb se v Ramanovu spektru projevují jako intenzivní pásy, neboť se při vibraci jejich polarizovatelnost výrazně mění. Zatímco polární vazby jsou málo polarizovatelné, stejně tak jako molekuly s nízkou symetrií, a proto se v Ramanových spektrech buď vůbec neprojeví nebo jim budou náležet jen velmi slabé linie [6, 8]. Ramanovská spektroskopie je komplementární metoda k infračervené spektroskopii, která také patří do skupiny rotačně-vibrační spektroskopie. Při infračervené spektroskopii je pro absorpci infračerveného záření nutné splnit podmínku měnícího se dipólového momentu při vibraci molekuly [8]. V infračervené spektroskopii nejsilnější spektra odpovídají vibracím polárních vazeb a velmi nesymetrickým molekulám. Lze tedy obecně říci, že přechody, které mají vysokou intenzitu v Ramanovu spektru (např. nepolární funkční skupiny molekul), mají často slabé intenzity ve spektru infračervené spektroskopie a naopak. V praxi je realita pro většinu molekulárních sloučenin někde mezi těmito dvěma extrémy. V důsledku toho většina chemických sloučenin produkuje jedinečná infračervená a Ramanova spektra, která obsahují směs silných, středních a slabých spektrálních pásem, kdy se obvykle silná vlastnost v jednom spektru buď nezobrazí, nebo může být slabší v druhém spektru a naopak [6].

1.2. Instrumentace pro Ramanovskou spektroskopii

Od objevu a popisu Ramanova jevu v roce 1928 prošla Ramanovská spektroskopie velkým vývojem. V začátcích Ramanovské spektroskopie byla měření prováděna nejprve pomocí filtrovaného slunečního světla, kterým byl excitován vzorek čištěné kapaliny nebo plynu [2]. Později se jako excitační zdroj používaly rtuťové obloukové lampy. V úplném začátku bylo rozptýlené Ramanovo záření pozorováno okem, později se jako detektory používaly fotografické desky. Kvůli slabé povaze Ramanova jevu byly zkoumány pouze extrémně čisté vzorky, aby byla co nejvyšší pravděpodobnost, že pozorovaný rozptýlený signál odpovídá sloučenině a nikoliv nečistotám. Velký pokrok Ramanovské spektroskopie zajistil v šedesátých letech příchod laserů, které se začaly používat jako zdroje záření namísto

do té doby používaných výbojek. Na konci osmdesátých let došlo k dalšímu výraznému pokroku zavedením CCD detektorů, které tak vystřídaly fotografické desky a fotonásobiče. Taktéž technologický vývoj nové techniky, jako například optických vláken a filtrů či miniaturizace nástrojů nebo vznik metod redukce šumu a zesílení měřených signálů, měly zásadní vliv na rozmach Ramanovské spektroskopie napříč celou řadou vědeckých oborů [9, 10].

Obecná sestava pro Ramanovskou spektroskopii vyžaduje koherentní zdroj záření, zařízení k separování vlnových délek rozptýleného záření a citlivý detektor. Taktéž se v experimentálním uspořádání obvykle používá optika pro shromažďování, směrování a zaostření světla, nebo také pro eliminaci nežádoucích vlnových délek. Dále se v sestavě nachází držák vzorku, který může mít jak podobu jednoduché kyvety, tak i specializovaných cel s řízenou teplotou či tlakem. Jednoduché schéma ukazující standardně používané komponenty a jejich umístění v sestavě pro Ramanovskou spektroskopii je na obrázku 1.3. Je potřeba mít na paměti, že všechny součásti a jejich vzájemné spojení mají vliv na konečný výsledek pozorování [11].



Obrázek 1.3: Schéma zobrazující hlavní komponenty sestavy pro Ramanovskou spektroskopii. Převzato a upraveno z [11].

1.2.1. Excitační zdroje

Jako excitační zdroje pro Ramanovskou spektroskopii se v současnosti používají výhradně lasery. Existuje hned několik důležitých vlastností laseru, díky nimž jsou tak vhodnými excitačními zdroji, a to například jejich monochromatičnost, vysoká intenzita a koherence záření. Díky těmto výhodám proto zcela nahradily dříve používané rtuťové lampy, které byly vybaveny filtrem pro přenos jedné či omezeného rozsahu vlnových délek.

V Ramanovské spektroskopii se používá celá škála různých typů laserů. V praxi se používají lasery s vlnovými délkami od ultrafialové oblasti (UV – ultraviolet, < 200 nm) přes oblast viditelného záření až po blízké infračervené záření (NIR – near-infrared, 1064 nm) [10]. Nejčastěji používanými lasery z viditelné oblasti jsou helium-neonový He-Ne laser (632,8 nm), argonovoiontový laser Ar+ (více čar od 351,1 nm do 514,5 nm), kryptonovoiontový laser Kr+ (více čar od 337,4 nm do 676,4 nm) a případně druhá harmonická frekvence Nd:YAG laseru (532 nm). Excitace v blízké infračervené oblasti se nejčastěji provádí Nd:YAG laserem (1064 nm), případně diodovým laserem, který má rozsah vlnových délek 660 nm až 880 nm. Pro ultrafialovou oblast se používají frekvenčně zdvojené argonovoiontové laserové zdroje (229 nm, 244 nm a 257 nm) [10, 12].

Volbou delší excitační vlnové délky lze výrazně snížit nežádoucí fluorescence vzorku. V případě excitace v NIR oblasti je virtuální hladina pod úrovní elektronově excitovaných stavů a nedochází tak k fluorescenci a dalším nežádoucím fotochemickým reakcím. Naopak možnou výhodou excitace vlnovou délkou ležící ve viditelné oblasti je vyšší intenzita rozptylu, ovšem za cenu vyšší fluorescence.

V Ramanovské spektroskopii se používají jak kontinuální, tak i pulsní režimy laserů. Jednou z výhod využití pulsního režimu může být rozlišení fluorescence od Ramanova rozptylu, neboť Ramanův rozptyl má mnohem kratší dobu života [12]. Pulzní lasery se spíše používají v pokročilejších metodách, příkladem může být jejich uplatnění v Ramanovské spektroskopii v oblasti rezonančních studií. Klasickým metodám Ramanovské spektroskopie dominují kontinuální lasery, které jsou snadněji použitelné a jsou levnější v porovnání s pulsními lasery. Taktéž díky vysokému výkonu pulsního laseru může hrozit poškození vzorku [4, 10].

1.2.2. Filtry

V Ramanovské spektroskopii ve využívá celá řada filtrů, kdy má každý zcela jinou charakteristiku. Například neutrální filtry (ND, Neutral density), které jsou známé také jako tzv. šedé filtry, se používají ke konstantní absorpci světla v celém rozsahu vlnových délek. Dále existují filtry typu dolní propust (low-pass), které propouštějí kratší vlnové délky, než je mezní hodnota filtru, zatímco světlo o delší vlnové délce je blokováno. Přesně opačnou funkci pak plní filtry typu horní propust (long-pass), tedy propouštějí delší vlnové délky, kdežto kratší vlnové délky, než je mezní hodnota filtru, jsou tímto typem filtru blokovány. Pásmové filtry pak mohou buď propouštět záření pouze v určitém rozsahu vlnových délek, nebo naopak blokovat pouze světlo o daném rozsahu vlnových délek. Při Ramanovské spektroskopii se krom klasických absorpčních filtrů používají například holografické, dielektrické či elektronicky laditelné filtry [10].

Filtry se používají pro filtraci excitačního záření, kdy potlačují nežádoucí spontánní emise či plasmové linie v iontových laserech. K těmto účelům se používá úzký pásmový filtr, obvykle se středem na spektrální čáře laseru. Tímto dojde k „vyčištění“ laserového záření od frekvencí ležící nad a pod pásem filtru [11]. Ještě důležitější je však filtrace Rayleighova rozptylu, který má stejnou vlnovou délku jako excitační zdroj a je mnohonásobně intenzivnější než Ramanův rozptyl. V minulosti se pro potlačení Rayleighova rozptylu používaly dvojité či trojité monochromátory. V jednoduchosti je monochromátor tvořen difrakční mřížkou, která rozptýlí laserové světlo do hlavního paprsku a vedlejších vlnových délek. Takto rozložené záření dopadá na clonu vymezující, které vlnové délky projdou a které budou touto clonou blokovány. Na stejném principu pracovaly i takzvané předmonochromátory, kterými se filtrovalo excitační laserové záření [9].

Holografické objemové filtry se skládají z vrstvy materiálu na bázi želatiny, která je vložena mezi dvěma skleněnými deskami. Ve vrstvě želatinového materiálu je pomocí laserového záření vytvořen interferenční obrazec (při osvitu laserem dochází k zesíťování mezi molekulárními řetězci v emulzi želatiny s fotocitlivými ionty). Je-li pak tento filtr osvícen vhodnou vlnovou délkou, tak v želatinové vrstvě dochází k destruktivní interferenci a světlo o této vlnové délce je filtrem absorbováno. Výhodou těchto filtrů je úzká šířka absorpčního pásma, jehož polohu určuje vlnová délka, pro kterou je filtr určen. Nevýhodou holografických filtrů je, že se postupně znehodnocují. Je to dáno tím, že při absorpci laserového záření vzniká teplo, které postupně rozmazává interferenční obrazec, čímž se postupně snižuje spektrální kvalita filtru [10].

Další filtry využívané v Ramanovské spektroskopii jsou dielektrické filtry, které mají oproti holografickým tu výhodu, že degradují mnohem pomaleji. Tyto filtry se skládají ze základní skleněné desky, na kterou jsou postupně nanášeny tenké vrstvy dielektrického

materiálu, nejčastěji z oxidu titaničitého (TiO_2) či oxidu křemičitého (SiO_2). Změnou tloušťky a pořadím vrstev lze vyrobit filtry o různé spektrální propustnosti [9, 10].

Elektronicky laditelné filtry jsou filtry, jejichž spektrální přenos lze ovlivňovat přiložením napětí. Tyto filtry mohou být realizované například pomocí akusto-optického zařízení či mohou být tvořeny tekutými krystaly. Akusto-optické laditelné filtry (AOTF, Acousto-optic Tunable Filter) jsou z krystalu, na který je přiváděn akustický signál z ultrazvukového generátoru. Přítomnost ultrazvukové vlny v krystalu vyvolá lokální změny indexu lomu, které působí jako difrakční mřížka. Při dopadu záření dochází k rozptylu záření do více složek. Systém pak může být například optimalizován tak, že pouze určitá část z tohoto záření dopadá na detektor. Je tedy možné postupnou změnou frekvence ultrazvuku skenovat celé spektrum záření.

Druhou technologií, kterou lze vytvořit laditelné filtry, jsou tekuté krystaly. Typický laditelný filtr, který je selektivní pro vlnovou délku, se skládá z několika desek obsahujících tekuté krystaly, polarizátorů a zdroje napětí. Přiložením napětí a jeho změnou lze ovlivňovat orientace tekutých krystalů a tím řídit i selektivitu tohoto filtru [9].

1.2.3. Světlovodná optika

Kromě filtrů se v Ramanovské spektroskopii používají i další optické komponenty, které slouží k přivádění laserového záření ke vzorku a také k vedení rozptýleného záření k detektoru. Tento přenos záření může být zprostředkován čočkami, zrcadly nebo pomocí optických vláken. Je zapotřebí používat kvalitní čočky a zrcadla s dobrými povrchovými úpravami, aby byla propustnost či odrazivost těchto členů co nejvyšší [10].

Pro transport záření v Ramanovské sestavě lze namísto čoček a zrcadel využít optická vlákna. Obecně se optická vlákna skládají z jádra o průměru 5 µm až 600 µm, okolo kterého se nachází plášť s nižším indexem lomu, než které má jádro. Při dopadu paprsku na rozhraní jádra a pláště pod úhlem vyšším, než je kritický bude docházet k úplnému odrazu a tento paprsek bude veden optickým vláknem téměř beze ztrát. Právě díky vedení světla s velmi malými ztrátami i na velké vzdálenosti (v rámci desítek až stovek metrů) se začala optická vlákna využívat i v Ramanovské spektroskopii. Díky tomu je možné umístění spektrometru ve značné vzdálenosti od vzorku, což umožnilo rozšířit dosavadní konstrukční možnosti [9].

Laserové světlo je ke vzorku přenášeno „excitačním“ optickým vláknem a rozptýlené světlo je vedeno k detektoru jedním nebo více „sběrnými“ optickými vlákny. Příklad takového optického vlákna je zobrazen na obrázku 1.4. Zakončení „excitačního“ optického vlákna u vzorku může být jednoduše tvořeno svazkem paralelních vláken, nebo může být tvořeno sondovací hlavicí, která navíc obsahuje zaostřovací optiku a filtry. V sondovací hlavici se nachází pásmový filtr, kterým je „vyčištěno“ laserové záření, než je zfokusováno na vzorek. Ve směru sběru rozptýleného záření je umístěn další filtr, který z tohoto sbíraného záření odstraňuje záření intenzivního Rayleighova rozptylu [9, 10].

Obrázek 1.4: Příklad uspořádání optického vlákna pro Ramanovskou spektroskopii. Převzato a upraveno z [10].

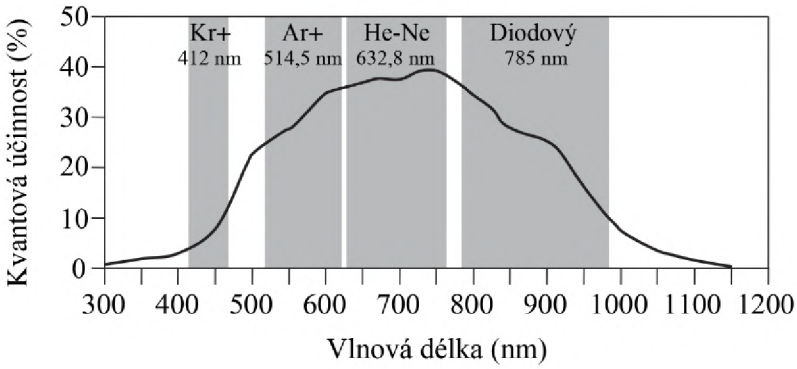
1.2.4. Detektory

Vzhledem k velmi slabým Ramanovým signálům je nutné používat citlivé detektory s nízkým šumem. Citlivost detektoru vyjadřuje tzv. kvantová účinnost, která udává poměr počtu dopadajících fotonů na senzor a počtu senzorem generovaných elektronů. Kvantová účinnost je závislá na vlnové délce dopadajících fotonů. Nejen, že je důležité mít vysokou kvantovou účinnost detektoru, ale je také vhodné mít senzor s co nejnižším temným proudem. Tento temný proud je tvořen spontánní (tepelnou) tvorbou párů elektronů a děr v polovodičovém detektoru, když na detektor nedopadá žádné světlo, což výrazně přispívá k celkovému šumu detektoru. Temný proud lze výrazně omezit chlazením senzoru. Existuje celá řada detektorů s různými kvantovými účinnostmi, pro různé rozsahy vlnových délek a s různými úrovněmi potlačení šumu. Je tedy zapotřebí při volbě detektoru zvážit excitační vlnovou délku laseru a taktéž brát v potaz povahu zkoumaného analytu a očekávané posuvy vlnových délek při Ramanovu rozptylu vzhledem k excitační vlnové délce. V Ramanovských spektroskopických experimentech se obvykle používají tyto tři typy detektorů: fotonásobiče, nábojově vázaná zařízení a polovodičové detektory [11].

Fotonásobiče (PMT, Photomultiplier Tube) byly poprvé použity v Ramanovské spektroskopii v 60. letech minulého století, kdy zcela nahradily do té doby používané fotografické desky. Fotonásobič je zařízení, které převádí přicházející fotony na elektrony a skládá se z fotokatody, několika dynod (zesilovací elektrody) a anody. Na katodu je obvykle přivedeno vysoké záporné napětí, na každou následující dynodu je zavedeno stále se zmenšující záporné napětí a anoda bývá nejčastěji na nulovém potenciálu. Dopadem fotonu o dostatečné energii na katodu je z materiálu katody vyražen elektron, který je zesilován a urychlován mezi dynodami. Zesílený signál pak dopadá na anodu. Faktor zesílení fotonásobiče se obvykle pohybuje v rozmezí 10^3–10^7, což umožňuje i počítaní jednotlivých fotonů [9, 10]. Výhodou fotonásobičů je relativně vysoká citlivost a velký dynamický rozsah. Na druhou stranu je nutné zmínit, že se jedná o tzv. jednokanálový detektor, kdy se měření provádí pouze na jedné vlnové délce. Ramanovo spektrum tedy není možné získat celé v jenom měření, ale je zapotřebí postupné snímání po jednotlivých vlnových délkách fotonů. Z tohoto vyplývá, že změření celého Ramanova spektra je velice časově náročné [10, 11].

Jedním z nejčastěji používaných typů detektorů v Ramanovské spektroskopii jsou CCD detektory (Charge Coupled Device) neboli nábojově vázaná zařízení. Při dopadu fotonu

o dostatečné energii na materiál detektoru (nejčastěji se jedná o oxid křemičitý SiO_2) dochází na základě fotoefektu ke vzniku párů elektron-díra, což vede ke vzniku elektrického signálu. Elektrony jsou zachycovány v potenciálových jamách, které vznikají pod elektrodami CCD senzoru v závislosti na přiloženém napětí. Následně jsou tyto elektrony přesunuty k okraji detektoru, kde jsou pomocí převodníku transformovány na napěťový signál. V praxi se lze setkat s různým konstrukčním řešením CCD detektorů. Například konstrukční řešení, při kterém dochází k dopadu světla zezadu (anglicky back-illuminated) mnohonásobně zvyšuje kvantovou účinnost (až na 80–95 %) oproti klasickému CCD detektoru, který je osvětlován zepředu (anglicky front-illuminated) jehož kvantová účinnost dosahuje maximálně 50 %. Dalším konstrukčním prvkem zvyšujícím kvalitu CCD detektorů je například chlazení, kterým, jak již bylo zmíněno, lze snížit šum detektoru, jenž je vytvářen temným proudem. Na obrázku 1.5 je možné vidět křivku, která popisuje typický rozsah odezvy CCD detektorů. Je možné vidět, že CCD detektory mají nejlepší odezvu pro viditelnou část spektra, zatímco v oblasti UV a NIR jejich odezva výrazně klesá [10, 11].



Obrázek 1.5: Závislost kvantové účinnosti CCD detektorů pro různé excitační lasery. Převzato a upraveno z [10].

Jak již bylo zmíněno, pro zabránění vzniku fluorescence je vhodné zvolit excitační záření o delší vlnové délce, ideálně z oblasti NIR. Jak je patrné z obrázku 1.5, CCD detektory nejsou pro tuto oblast záření téměř citlivé. Proto se pro Ramanovskou spektroskopii v blízké infračervené oblasti využívá jiný typ detektorů, a to polovodičové detektory. Používají se polovodiče s malou šířkou zakázaného pásu, typicky se používají polovodiče z germania (Ge) nebo ze sloučeniny InGaAs (Indium-Gallium-Arsenid). Pokud je šířka zakázaného pásu dostatečně malá na to, aby byly detekovány nízkoenergiové fotony (tedy fotony o delších vlnových délkách), tak v tomto pásu bude také docházet ke snadnému generování temného proudu spontánní tepelnou tvorbou párů elektron-díra, který zatěžuje detektor šumem. Proto musí být tyto detektory kvalitně chlazeny, čímž se toto „tepelné“ vytváření párů elektronů a děr sníží, a tím se zmenší i hodnota šumu detektoru [9, 10].

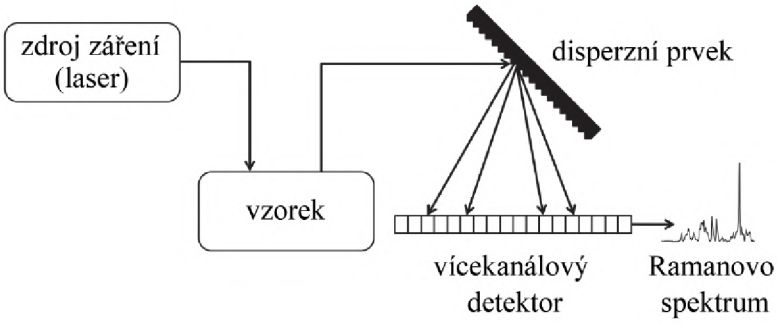
1.2.5. Spektrometry

Spektrometry používané pro zpracování a detekci rozptýleného záření v Ramanovské spektroskopii je možné rozdělit na disperzní a nedisperzní. Disperzní spektrometry využívají k rozkladu světla mřížky či hranoly, zatímco nedisperzní spektrometry fungují na prin-

cipu Michelsonova interferometru. Oba dva typy budou krátce přestaveny v následujících odstavcích spolu s jejich výhodami i nevýhodami [10].

Disperzní Ramanův spektrometr

Jak je možné vidět na obrázku 1.6, obecně se disperzní Ramanův spektrometr skládá ze zdroje záření, držáku se vzorkem, disperzního prvku a detektoru. Rozptýlené záření, které vzniká po osvícení vzorku laserem, je vedeno nejprve na disperzní prvek ve spektrometru a následně dopadá na vícekanálový detektor.



Obrázek 1.6: Schéma disperzního Ramanova spektrometru. Převzato a upraveno z [10].

Ve spektrometru dochází k rozdělení záření na jednotlivé vlnové délky. Mezi jeho základní prvky patří vstupní štěrbina, která slouží k výběru části rozptýleného záření ze vzorku. Toto záření je pak fokusováno na disperzní prvek, kterým je buď difrakční mřížka nebo hranol, jehož úkolem je rozklad dopadajícího záření na jednotlivé vlnové délky. Otáčením difrakční mřížky, čímž se mění úhel dopadu paprsku na mřížku, lze vybírat konkrétní vlnovou délku či jejich rozsah [10]. Rozložené záření je pak vedeno na vícekanálový CCD detektor. Existuje několik různých typů spektrometrů, lze třeba zmínit typ Czerny-Turner nebo spektrometr typu Echelle. Pro Ramanovskou spektroskopii je častěji používán právě typ Czerny-Turner, který obsahuje jednu difrakční mřížku. Méně častěji se používá konstrukčně složitější Echellův typ, který obsahuje dva difrakční prvky [9].

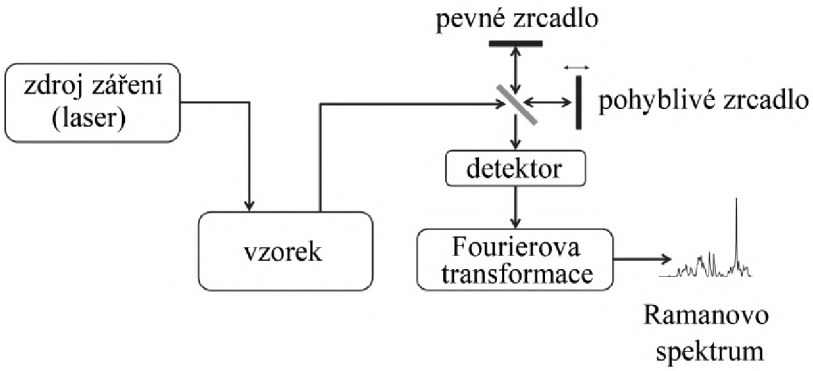
Obecně platí, že disperzní Ramanovy spektrometry používají lasery s vlnovými délkami kratšími než 750 nm, tedy využívají záření ve viditelné či UV oblasti. Důvodem je již zmíněný omezený rozsah odezvy CCD detektoru. Mezi výhody disperzního Ramanova spektrometru patří především vysoká citlivost a vyšší poměr signálu k šumu. Naopak nevýhodou disperzních spektrometrů je přítomnost fluorescence, která souvisí s excitační délkou laseru. Při použití disperzních spektrometrů je potřeba mít na paměti, že lze buď získat široký spektrální rozsah s relativně nízkým rozlišením nebo naopak omezený spektrální rozsah s vysokým rozlišením, nikdy nelze získat obojí. Proto je zapotřebí vždy volit rozumný kompromis [9].

Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací

Spektrometr s Fourierovou transformací je nedisperzní typ spektrometru, který se používá v Ramanovské spektroskopii. Jak již bylo zmíněno, tento typ spektrometru pracuje na principu interference, ke které využívá Michelsonův interferometr. V podstatě je tento

interferometr tvořen děličem svazku a dvěma zrcadly, z nichž je jedno pevné a druhé pohyblivé. Při dopadu svazku na dělič dojde k rozdělení na dva stejné svazky. První svazek se od děliče odráží na nepohyblivé zrcadlo, zatímco druhý svazek děličem projde a dopadá na zrcadlo pohyblivé. Oba svazky se od zrcadel odráží zpět k děliči, na kterém dojde k jejich spojení (interferenci). V závislosti na rozdílu dráhy těchto dvou svazků (tedy poloze pohyblivého zrcadla) může docházet ke konstruktivní interferenci pouze pro záření jedné vlnové délky. Intenzita svazku vzniklého interferencí je následně zaznamenána detektorem. Pohyblivé zrcadlo je posouváno tak, aby postupně docházelo k interferenci všech vlnových délek obsažených ve vzniklém svazku. Pro zlepšení kvality interferogramu se obvykle provádí několik stovek či tisíc skenů, které jsou jeden po druhém zaznamenávány detektorem a jsou následně sčítány. Fourierovou transformací je pomocí počítače z naměřených dat získáno Ramanovo spektrum [10].

Na obrázku 1.7 je možné vidět kromě již popsaného interferometru i zbytek Ramanova spektrometru s Fourierovou transformací, který je tvořen laserem, kterým je excitován vzorek. Oproti disperznímu Ramanovu spektrometru se pro excitaci používá laser s vlnovými délkami v blízké infračervené oblasti. Nejčastěji se používá Nd:YAG laser s vlnovou délkou 1064 nm. Jako detektory se používají již představené polovodičové detektory, které jsou určeny pro rozsah vlnových délek 1100 nm až 1700 nm [9].



Obrázek 1.7: Schéma Ramanova spektrometru s Fourierovou transformací. Převzato a upraveno z [10].

Velkou výhodou nedisperzního spektrometru je vysoké rozlišení i spektrální pokrytí, neexistuje tedy žádný jejich vzájemný kompromis jako u disperzních spektrometrů. Další výhodu přináší excitační délka laseru, která výrazně redukuje fluorescenci. Avšak příliš vysoká energie laseru může způsobit poškození vzorku. Další nevýhodou je horší poměr signálu k šumu, který je zapříčiněn typem detektoru [9, 10].

1.3. Speciální metody Ramanovské spektroskopie

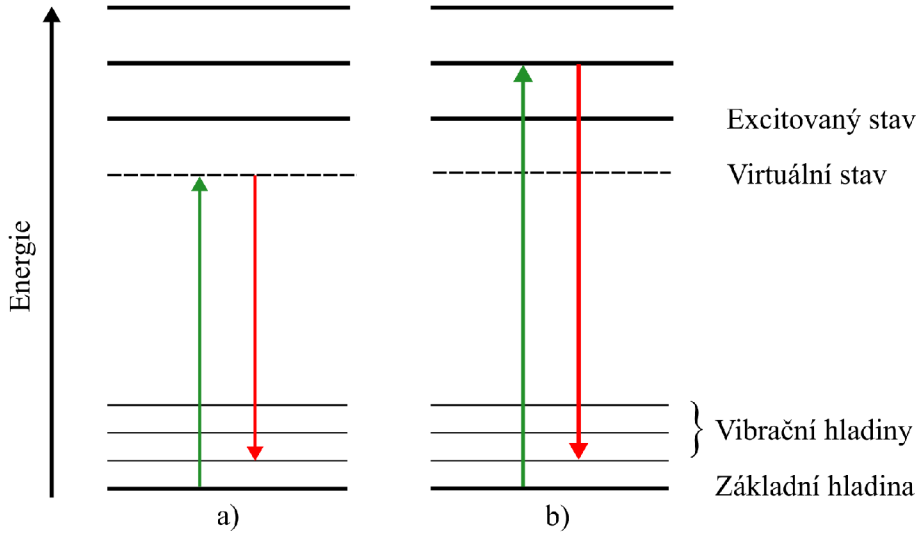
Jak již bylo zmíněno v předcházející části, Ramanův rozptyl je ze své podstaty velice slabý. I přesto, že Ramanovská spektroskopie je velice vhodná analytická metoda, jejíž hlavními výhodami jsou nedestruktivnost, možnost analyzovat vzorky všech skupenství a malých objemů, tak právě kvůli velice malé intenzitě Ramanova signálu měla tato metoda po několik desetiletí od svého objevení pouze omezené uplatnění. Její využití jako analytické techniky se zvýšilo až s objevem laserů a výkonnějších detektorů pro rozptýlené fotony.

Kromě technických vylepšení existují také speciální metody Ramanovské spektroskopie, které dokáží zesílit Ramanův signál [13]. Metody zesílení Ramanova signálu budou popsány níže.

1.3.1. Rezonanční Ramanovská spektroskopie

Pro zvýšení intenzity Ramanova signálu lze použít tzv. Rezonanční Ramanovskou spektroskopii (RRS, Resonance Raman Spectroscopy). Intenzitu Ramanova signálu lze výrazně zvýšit, pokud je zkoumané molekule dodáno takové množství energie, které je potřebné k přechodu elektronů zkoumané látky ze základního stavu do elektronově excitovaného stavu, tomuto odpovídá situace b) na obrázku 1.8, zatímco situace a) odpovídá klasickému Ramanovu (Stokesovu) rozptylu. Tuto energii dodá molekule laserové záření o vhodné frekvenci, která odpovídá frekvenci záření potřebné na přechod do elektronového excitačního stavu. V takovém případě může dojít k rezonančnímu zesílení Ramanova jevu až 10^6krát, avšak nejčastěji bývá intenzita Ramanova rozptylu zesílena řádově 10^3 až 10^4krát [2]. Takové zesílení Ramanova signálu dovoluje zaznamenávat spektra vzorků o velmi nízké koncentraci, a to i o koncentracích jako 10^{-8} mol.m^{-3} [14].

Jelikož každému typu molekulární vazby odpovídá jiná frekvence, tak v případě molekuly s více druhy vazeb při excitaci jednou frekvencí (vlnovou délkou) laseru, bude v naměřeném spektru viditelný pouze ten typ vazby, který s danou vlnovou délkou rezonuje. Jedná se tedy o selektivní rezonanční Ramanův jev. Proto je při měření vhodné volit vlnovou délku laseru dle známých vlastností zkoumané molekuly. Pokud má být touto metodou zkoumána složitější směs, je vhodnější použít při měření široký rozsah excitačních vlnových délek, čímž se získá celé rezonanční Ramanovo spektrum [14].



Obrázek 1.8: Schematický diagram energiových přechodů pro a) Ramanův (Stokesův) rozptyl, b) Ramanův (Stokesův) rezonanční rozptyl.

1.3.2. Povrchem zesílená Ramanovská spektroskopie (SERS)

Technika povrchem zesílené Ramanovské spektroskopie (SERS, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) využívá zdrsněného kovového povrchu. Na tento povrch, který je pokryt nanočásticemi kovu, jsou navázány zkoumané molekuly. Ramanův signál z molekuly, která

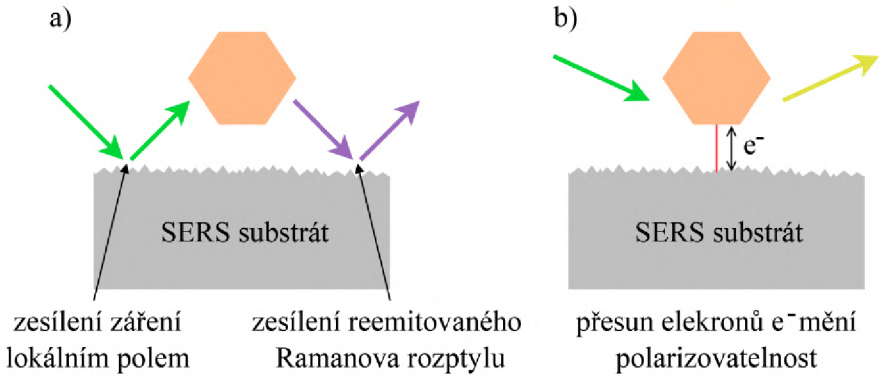
je adsorbována na tomto kovovém povrchu, je výrazně zesílen až o 10^6 oproti klasickému Ramanovu signálu ze stejné molekuly bez použití kovového substrátu [2]. Díky takovému zesílení lze studovat vzorky o mnohem nižších koncentracích. V literatuře se uvádí, že detekční limit koncentrace pro povrchem zesílenou Ramanovskou spektroskopii může být až 10^{-9} mol.m^{-3}, tedy ještě nižší, než pro rezonanční Ramanův rozptyl [15].

Při interakci laserového záření s molekulami na povrchu tvořeném nanočásticemi dochází k zesílení Ramanova signálu působením elektromagnetického a chemického mechanismu. Elektromagnetický mechanismus zesílení je založen na zvýšení elektrického pole v okolí adsorbované molekuly, které je způsobeno elektromagnetickými rezonancemi vznikajícími v blízkosti povrchových kovových nanočástic. Chemický mechanismus zesílení signálu nebo též označovaný molekulární efekt pracuje na přenosu náboje mezi molekulou a povrchem kovu, čímž se zvyšuje polarizovatelnost molekuly [15].

Zesílení pomocí elektromagnetického mechanismu je založeno na zesílení lokálního elektromagnetického pole. Při interakci laserového záření o specifické vlnové délce s kovovými nanočásticemi povrchu dojde vlivem elektromagnetického pole laseru k přesunům elektronů v těchto částicích. Pokud jsou kovové nanočástice dostatečně malé v porovnání s dopadající vlnovou délkou záření, budou vodivostní elektrony částice oscilovat ve fázi s dopadajícím elektromagnetickým zářením a vytváří se lokalizovaný povrchový plazmon, který ve své blízkosti generuje elektromagnetické pole. Pokud se v jeho okolí nachází molekula, je vystavena silnějšímu elektrickému poli, které je tvořeno generovaným elektrickým polem kovové nanočástice spolu s dopadajícím elektromagnetickým polem laserového záření [10]. Toto lokálně zesílené elektrické pole vyvolává zesílení Ramanova rozptylu dvěma způsoby. Prvním je přímé působení zesíleného elektrického pole, které tak zvýší intenzitu dopadajícího záření na molekulu analytu, což vede ke vzniku silnějšího Ramanova signálu. Druhý efekt zesílení pomocí elektromagnetického mechanismu zvyšuje intenzitu již rozptýleného záření, kdy toto rozptýlené záření interaguje s polarizovanými kovovými nanočásticemi v okolí molekuly a vzniká reemitovaný zesílený Ramanův rozptyl [16]. Schéma principu elektromagnetického zesílení je zobrazeno na obrázku 1.9 v situaci a), kde je možné vidět jak zesílení dopadajícího záření laseru, tak i následnou zesílenou reemisi Ramanova rozptýleného záření. Dominantním mechanismem zesílení pro povrchem zesílenou Ramanovskou spektroskopii je právě elektromagnetický mechanismus, který obvykle poskytuje zesílení Ramanova signálu v rozsahu 10^5 až 10^7. Výjimečně lze dosáhnout i zesílení s faktorem 10^{10} či 10^{11}. Při takto vysokém faktoru zesílení je možná detekce i jednotlivých molekul. Takto vysokého zesílení Ramanova signálu lze dosáhnout v případě, že se molekula analytu vyskytuje v tzv. hot-spotu, což je místo, ve kterém dochází k intenzivnímu zesílení elektrického pole, jenž je způsobeno rezonancemi lokalizovaného povrchového plazmonu [16].

Elektromagnetický mechanismus zesílení úzce souvisí pouze s vlastnostmi nanočástic jako jsou velikost, tvar a jejich vnitřní dielektrické vlastnosti, zatímco na vlastnostech analytu je tento mechanismus zesílení zcela nezávislý [16]. Nejčastěji se k zesílení signálu používají nanočástice vzácných kovů, konkrétně je nejvíce používáno zlato a stříbro, ale je možné použít i nanočástice mědi, hliníku, sodíku či lithia [15]. Kromě velikosti nanočástice, která jak již bylo zmíněno, by měla být mnohem menší než vlnová délka laseru, významně výsledky měření ovlivňují i tvar a rozmístění těchto nanostruktur [10]. Taktéž je zapotřebí pro danou nanočástici zvolit takovou vlnovou délku laseru, aby frekvence dopadajícího záření náležela do oblasti plazmonové rezonance dané kovové nanočástice. Pro stříbrné nanočástice se používá excitační záření ve spektrálním rozsahu 380–420 nm a na kovové

substráty se zlatými nanočásticemi se používá laserové záření s rozsahem vlnových délek 515–550 nm [16]. Substrátem pro povrchem zesílenou Ramanovskou spektroskopii může být například stříbrná elektroda s upraveným zdrsněným povrchem či koloidní roztoky obsahující kovové nanočástice [15].



Obrázek 1.9: Mechanismy zesílení povrchem zesílené Ramanovské spektroskopie: a) elektromagnetický mechanismus zesílení, b) chemický mechanismus zesílení.

Druhým mechanismem zesílení Ramanova signálu v povrchem zesílené Ramanovské spektroskopii je zesílení pomocí chemického mechanismu, který je v literatuře často označován také jako molekulární mechanismus zesílení. Tento typ zesílení využívá zvýšení polarizovatelnosti molekuly analytu v důsledku její interakce s povrchem kovové nanočástice, při které dochází ke vzniku nového povrchového komplexu molekuly a povrchové nanočástice kovu. Při vytvoření tohoto komplexu dochází k elektronovým přechodům, jenž generují náboj, který je přenášen z kovové nanočástice na molekulu analytu a naopak. Tento přenos náboje je vyobrazen na obrázku 1.9 b). Tyto přesuny elektrického náboje mají za následek zvýšení molekulární polarizovatelnosti zkoumané molekuly. Zesílení pomocí chemického mechanismu přispívá k celkovému zesílení Ramanova signálu v mnohem menší míře než elektromagnetický mechanismus zesílení, obvykle dosahuje zesílení signálu řádově do 10^2 [16].

Velikost chemického zesílení je na rozdíl od elektromagnetického zesílení závislá také na vlastnostech molekuly analytu jako je například její počáteční vibrační stav. Dále je velikost zesílení ovlivněna vlastnostmi nanočástice a typu a síle vazby mezi touto nanočásticí a molekulou. Dle síly interakce molekuly s povrchem nanočástice lze rozlišit dva typy interakcí, a to fyzisorpci a chemisorpci. Fyzisorpce označuje relativně slabé interakce na úrovni energií elektrostatických vazeb. Oproti tomu chemisorpce se používá k popisu interakce, při které je vytvořena chemická vazba mezi nanočásticí substrátu a molekulou analytu a jedná se tedy o silnější typ interakce. Tyto vazby je možné pozorovat i ve výsledném Ramanovu spektru, kdy následkem interakcí a změnami v elektronových hladinách může docházet k posunutí či změně šířky některých spektrálních čar. Taktéž se ve spektru mohou objevovat i nové čáry, které odpovídají vzniklým vazbám mezi molekulou a nanočásticí kovu [10, 15].

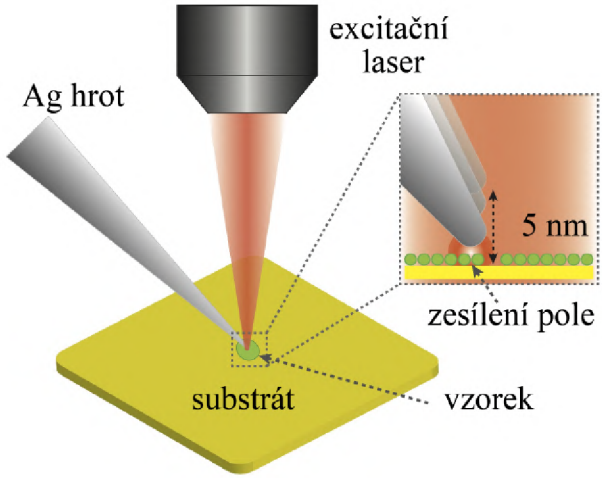
I přes hlavní výhodu povrchem zesílené Ramanovské spektroskopie, kterou je významné zesílení Ramanova signálu v porovnání s klasickou Ramanovskou spektroskopií, má tato technika také několik nevýhod. Jednou z nevýhod může být složitější interpretace získaných spekter, kde se kvůli zesílení ve spektru objevují i Ramanovy pásy, které by při klasické metodě byly velmi slabé či nepozorovatelné. Jak již bylo řečeno, některé spek-

trální čáry mohou být interakcí molekuly s nanočásticí posunuty nebo mohou dokonce vznikat i nové spektrální čáry. Další možnou nevýhodou je poměrně složitá reprodukovatelnost analýzy. Také příprava vzorku pro měření pomocí povrchem zesílené Ramanovské spektroskopie je komplikovanější než příprava vzorku pro standardní Ramanovskou spektroskopii [10]. Avšak i přes tyto nevýhody je povrchem zesílená Ramanovská spektroskopie stále populárnějším analytickým nástrojem, který se používá v mnoha vědních oblastech. Své uplatnění tato technika nachází v biomedicíně, biochemii, životním prostředí či v materiálových vědách [15].

1.3.3. Hrotem zesílená Ramanovská spektroskopie (TERS)

Další speciální technikou, která se používá pro zesílení Ramanova signálu, je hrotem zesílená Ramanovská spektroskopie (TERS, Tip-Enhanced Raman Spectroscopy). Tato metoda kombinuje výhody povrchem zesílené Ramanovské spektroskopie (SERS) s technologiemi mikroskopie skenovací sondou (SPM, Scanning Probe Microscopy), mezi které patří například mikroskopie atomárních sil (AFM, Atomic Force Microscopy) či rastrovací tunelová mikroskopie (STM, Scanning tunneling microsopy) [13, 17].

V technice hrotem zesílené Ramanovské spektroskopie se používá ostrý hrot, který je vyroben z kovového materiálu nebo je na jeho povrchu nanesena vrstva nanočástic kovu. Průměr vrcholu hrotu se nejčastěji pohybuje v rozsahu 20–30 nm [18]. Jak je možné vidět na obrázku 1.10, špička hrotu je osvícena laserovým zářením, jehož vlivem dojde na této špičce s nanočásticemi k vytvoření, stejně jako v případě povrchem zesílené Ramanovské spektroskopie, lokalizované povrchové plazmonové rezonance, která v okolí vrcholu hrotu zvýší elektrické pole. Přiblížením špičky hrotu s lokalizovaným zesíleným elektrickým polem k povrchu substrátu dochází ke vzniku lokálních hot-spotů v mezeře mezi vzorkem a hrotem, které umožňují výrazné zesílení Ramanova signálu o faktor 10^{10} až 10^{12} [13].



Obrázek 1.10: Hrotem zesílená Ramanovská spektroskopie. Převzato a upraveno z [19].

Kromě elektromagnetického zesílení, při kterém dochází k zesílení elektrického pole v okolí kovové nanočástice, se může uplatňovat i chemický mechanismus zesílení, který se vyznačuje přenosem náboje. Pro uplatnění molekulárního mechanismu zesílení musí být kovový hrot v přímém kontaktu se vzorkem. Avšak pro nižší hodnoty zesílení tohoto mechanismu a jeho vlivu na výslednou podobu spektrálních čar, spolu s možností poničení

vrstvy nanočástic na hrotu při kontaktu s povrchem vzorku, se při většině aplikací hrotem zesílené Ramanovské spektroskopie volí spíše pouhé přiblížení hrotu [18].

Při měření technikou hrotem zesílené Ramanovské spektroskopie probíhá postupné skenování povrchu vzorku, čímž jsou získávána zesílená Ramanova spektra z jednotlivých bodů měření [20]. V závislosti na experimentálním uspořádání, vlnové délce laseru a vlastnostech hrotu lze hrotem zesílenou Ramanovskou spektroskopií dosáhnout prostorového rozlišení obvykle okolo 10 nm [17, 20]. V literatuře se také uvádí, že v některých aplikacích je možné touto technikou dosáhnout i detekce jednotlivých molekul [17, 18].

Mezi výhody hrotem zesílené Ramanovské spektroskopie patří možnost provádět měření za jakýchkoliv okolních tlakových a teplotních podmínek [13, 20]. Taktéž lze tuto techniku použít na jakékoli vzorky, včetně vzorků ve vodním prostředí. Díky těmto výhodám je metoda hrotem zesílené Ramanovské spektroskopie velmi používána ve výzkumu biologických molekul a jejich procesů. Dále se této techniky hojně využívá také v materiálových vědách či při studiu polovodičů [20]. Naopak největší nevýhodou této metody je omezená životnost kovového hrotu, která je dána zahříváním hrotu při měření [18].

Dle plánu celého projektu, jenž byl nastíněn v úvodu, bude zkoumaný vzorek umístěn v komoře skenovacího mikroskopu, ve kterém bude pomocí sondy rastrováno po jeho povrchu. Proto se v budoucnu nabízí pro měření Ramanových spekter použít právě hrot skenovací sondy a měření vlastností vzorku provádět prostřednictvím hrotem zesílené Ramanovské spektroskopie. Tímto dojde k výraznému zesílení Ramanova signálu a taktéž bude možno snímat zesílená Ramanova spektra z jednotlivých bodů měření na povrchu daného vzorku.

1.4. Vyčítání slabých Ramanových signálů

Jak již zde bylo několikrát zmíněno, při Ramanovské spektroskopii vzniká velice slabý Ramanův signál, který může být dokonce slabší než vznikající šum. Často bývá tento nízký signál v šumu zcela „utopen“, což způsobuje obtížnou, někdy až nemožnou interpretaci výsledků měření. Optická cesta celého projektu, která je nastíněna v úvodu práce a jehož součástí je i navrhovaná sestava, je poměrně komplikovaná. Dochází v ní k přepojování optických vláken a několika navázání laserového záření a zpětně sbíraného signálu do optických vláken. Proto lze očekávat, že zpětně sbíraný signál bude slabý a zároveň bude obsahovat velký poměr šumu, a lze tedy předpokládat, že jeho analýza bude obtížně proveditelná. Proto bude v budoucnu potřeba vyzkoušet různé metody a techniky pro zesílení měřeného signálu a stejně tak bude pravděpodobně zapotřebí na naměřená data aplikovat některou z metod k potlačení šumu. Tyto metody budou představeny níže.

Nejjednodušeji lze problém slabého Ramanova signálu vyřešit zvýšením výkonu excitačního laseru a nebo prodloužením doby expozice. Avšak toto nelze použít při měření nestabilních materiálů nebo při zkoumání dynamických jevů [21, 22]. Z toho důvodu bylo vyvinuto značné množství metod detekce a spektrální rekonstrukce Ramanových spekter, které umožňují získat spektra s nízkým poměrem signálu k šumu (SNR, Signal to Noise Ratio) [23].

Termínem „šum“ se označují všechny signály, které jsou detekovány a neobsahují žádné relevantní informace [10]. Šum, kterým mohou být Ramanovy signály rušeny, je tvořen celou řadou dílčích šumů, které mohou být generovány různými instrumentálními částmi Ramanovské sestavy nebo i samotným vzorkem. Zdrojem šumu při Ramanovské spek-

troskopii jsou především detektory s CCD čipem, na kterém vzniká jak tepelný šum (též známý jako temný proud), tak i fotonový šum. Tyto dva zmíněné šumy lze do velké míry omezit chlazením čipu. Taktéž jsou detekční čipy zatíženy čtecím šumem. Šum vznikající na vzorku je především tvořen nežádoucí fluorescencí, která bývá obvykle o několik řádů intenzivnější než Ramanův rozptyl, či nespecifickou absorpcí a vyzařováním neprůhlednými vzorky [22, 24]. V neposlední řadě může šum vznikat také při zpracování již naměřeného signálu. V případě, že nelze jednoznačně definovat příčinu šumu, je tento šum označován jako šum pozadí [10].

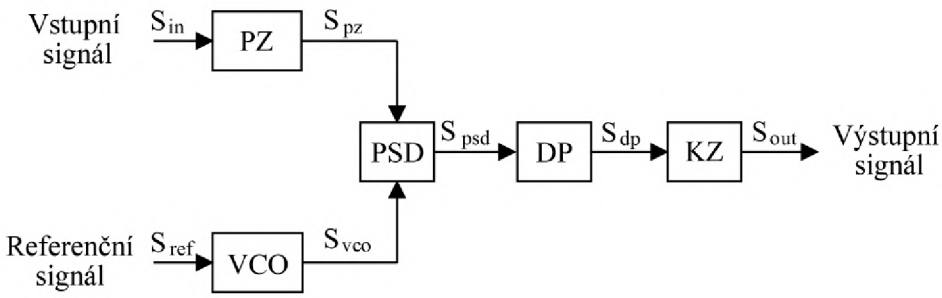
1.4.1. Metody zesílení a modulace signálu

Kromě metod, které zpracovávají a upravují již naměřený signál, existují i speciální detekční metody a detektory, které jsou vhodné právě pro detekci slabých optických signálů. Tyto detektory jsou spojeny se zesilovači, které zesilují naměřený signál. Lze zmínit například detekci fotonásobičem, detektory s napěťovými či transimpedančními zesilovači. Další skupinou detektorů pro detekci velice slabých signálů jsou detektory využívající modulační techniky. Díky vhodné modulaci budícího zdroje a měření signálu na modulační frekvenci, která leží mimo oblast nízkofrekvenčního šumu, lze dosáhnout na výstupním signálu vyššího poměru signálu k šumu. Lze říci, že tyto detektory umožňují zbavit se části šumu již v průběhu měření. Mezi modulované metody měření optického signálu patří například metoda Lock-In či metoda čítání fotonů [25].

Lock-In zesilovač

Právě detekce a měření pomocí metody Lock-In jsou velice vhodné pro rekonstrukci velice slabých optických signálů, které jsou zatíženy šumem podstatně větším než je samotný optický signál [25, 26]. Díky těmto zmíněným výhodám se Lock-In detekce používá pro mnohá spektrální měření, včetně Ramanovské spektroskopie [26].

Základním principem Lock-In zesilovače je modulace měřeného signálu referenčním signálem. Právě referenční frekvence udává oblast či tzv. frekvenční pás, ve kterém Lock-In zesilovač signály vyčítá, zatímco signály o frekvencích ležících mimo frekvenční pás jsou potlačovány [26]. Na obrázku 1.11 je zobrazeno blokové schéma obecného Lock-In zesilovače a v následující části budou popsány jeho jednotlivé části a bude také nastíněna jejich funkce.



Obrázek 1.11: Blokový diagram obecného Lock-In zesilovače: VCO - napětím řízený oscilátor, PZ - předzesilovač, PSD - fázově synchronní detektor, DP - filtr typu dolní propust, KZ - koncový zesilovač.

Do Lock-In zesilovače vstupuje měřený (vstupní) signál S_{in}, který je nejprve zesílen na předzesilovači PZ a případně může být tento signál i filtrován tak, aby byl odstraněn šum nad a pod referenční frekvencí [27]. Lock-In zesilovače obvykle obsahují nízkošumový předzesilovač spolu s filtrem, který ze zesíleného vstupního signálu filtruje část šumu. Odfiltrováním určité šířky pásma šumu se obvykle zlepšuje výkon následné modulace signálu [28].

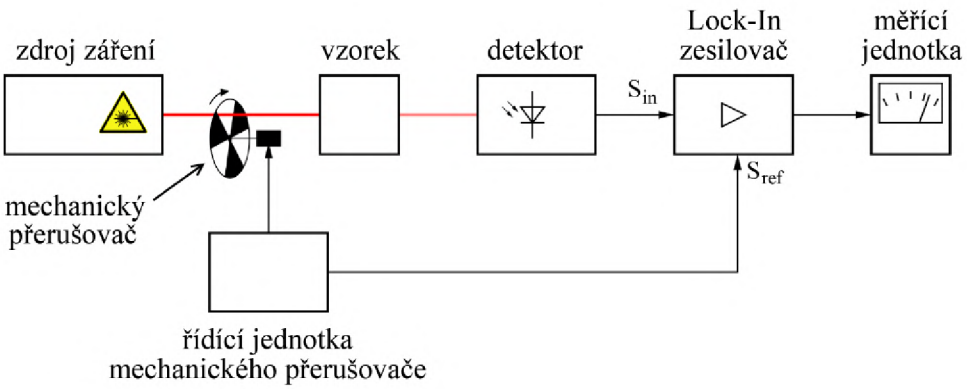
Kromě vstupního signálu je také třeba poskytnout referenční signál o frekvenci, podle které bude měřený signál modulován. Referenční signál S_{ref} vstupuje do napěťově řízeného oscilátoru VCO, který slouží k úpravě referenčního signálu. Referenční signál je obvykle sinusová vlna, ale může mít i jiné formy, například ve spojení s mechanických chopperem se používají vlny čtvercové [25, 27]. Funkcí napěťově řízeného oscilátoru VCO je tedy buď úprava referenčního signálu z externího zdroje, nebo v případě vlastního oscilátoru pak generování samotného referenčního signálu. Jednou z důležitých úprav referenčního signálu je nastavit fázi jeho průběhu tak, aby výsledný signál byl maximální.

Jak již bylo zmíněno, referenční signál určuje frekvenci, podle které bude měřený signál modulován. Upravený referenční signál S_{vco} na výstupu napěťově řízeného oscilátoru VCO je elektronikou zesilovače „uzamknut“ (z anglického slovesa lock, podle kterého nese Lock-In zesilovač svůj název [28]), čímž se určí pracovní frekvence zesilovače. Pouze ty frekvence z měřeného signálu, které leží v těsné blízkosti této referenční frekvence budou obsaženy ve výstupním signálu na výstupu Lock-In zesilovače [25]. Předzpracovaný vstupní signál S_{pz} je spolu s upraveným a „uzamknutým“ referenčním signálem S_{vco} zaveden do fázově synchronního detektoru PSD, který bývá někdy označován také jako demodulátor nebo směšovač, kde jsou tyto dva signály vynásobeny [25, 28].

Výsledný signál S_{psd} je následně zaveden do filtru typu dolní propust DP, kde jsou odfiltrovány vyšší frekvence ze signálu, které jsou produktem násobení. Filtr DP potlačí veškeré součtové a rozdílové frekvence vzniklé ve fázově synchronním detektoru PSD ležící mimo jeho propustné pásmo a na jeho výstupu zůstanou pouze nízkofrekvenční složky signálu, které se vešly do propustného pásma filtru DP a nebyly jím potlačeny.

K zesílení filtrovaného signálu S_{dp} slouží koncový zesilovač KZ. Zesílením signálu již s vysokým poměrem signálu k šumu získáváme na výstupu zesilovače výstupní signál S_{out} [25].

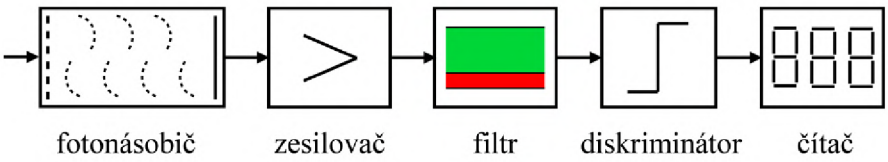
Na obrázku 1.12 je možné vidět zapojení Lock-In zesilovače do experimentální sestavy. Jelikož je Lock-In zesilovač citlivý pouze na střídavé signály a nezesiluje stejnosměrné signály nebo signály měnící se v čase velmi pomalu [25], v praxi se pro úpravu signálu z kontinuálních zdrojů používají mechanické přerušovače světla tzv. choppery, které mají nejčastěji podobu rotujícího disku s výsečemi či otvory [27]. Do Lock-In zesilovače poté vstupuje záření, které prošlo skrze výseče přerušovače a jako reference se používá frekvence mechanického přerušovače, která se přebírá z výstupu na jeho řídící jednotce. Po modulaci a úpravě signálu v Lock-In zesilovači je pak výsledný zesílený signál s lepším poměrem signálu k šumu veden do měřícího zařízení či počítače [25, 27, 28].



Obrázek 1.12: Lock-In zesilovač v experimentálním uspořádání. Převzato a upraveno z [29].

Čítání fotonů

Dalším typem detekce, používaným i v Ramanovské spektroskopii, je detekce metodou čítání fotonů. Tato metoda detekce byla představena v 60. letech a byla velice využívána přibližně až do roku 1985, poté se začaly pro detekci využívat CCD čipy [9]. Metoda čítání fotonů je založena na fotonásobiči, jehož princip byl již popsán v části věnující se detektorům. V praxi se za fotonásobič často zařazuje elektronický zesilovač, který zesiluje výstupní signál z fotonásobiče. Dále se v praxi spolu se zesilovačem používá i filtr, kterým je ze zesíleného signálu odfiltrováno nízkofrekvenční napětí. Zesílené pulzy jsou následně zpracovány v diskriminátoru, který propouští pouze pulzy o amplitudě přesahující nastavenou hodnotu diskriminační hladiny, čímž lze ze signálu odstranit i některé rušivé elektrony nebo šum. Takto upravený a zesílený signál je nakonec veden do čítače pro sčítání pulsů [9, 25]. Na obrázku 1.13 je možné vidět zjednodušené schéma detektoru fungujícího na metodě čítání fotonů, jehož princip byl právě popsán. Metoda čítání fotonů se vyznačuje velikou citlivostí, vysokým dynamickým rozsahem a umožňuje i potlačení nízkofrekvenčního šumu. Mezi nevýhody metody čítání fotonů patří například vysoké pořizovací náklady, jeho relativně velké rozměry a také to, že fotonásobič je nutné chránit před přebuzením [25]. I přesto, že v současnosti pro detekci v Ramanovské spektroskopii dominují CCD čipy, jsou stále dostupné i spektrometry určené pro Ramanovskou spektroskopii, ve kterých se jako detektory používají fotonásobiče, např. od firmy Holmarc [30].



Obrázek 1.13: Metoda čítání fotonů.

1.4.2. Metody redukce šumu

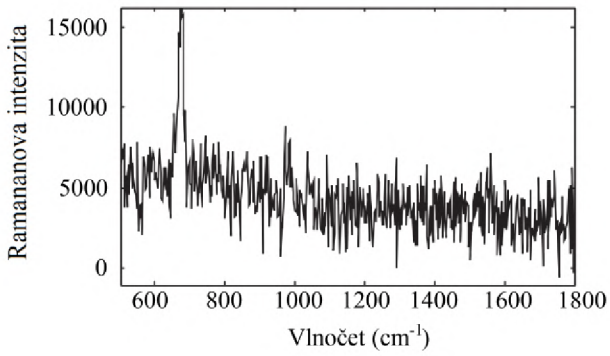
Jelikož šum může výrazně ovlivnit přesnost získaných výsledků [10], je potřebné při zpracování naměřených dat šum co nejvíce potlačit. V současnosti existuje velké množství metod pro filtraci a odstraňování šumu z Ramanových spekter. Mezi často používané patří například Fourierova transforamce, Vlnková transformace nebo Savitzky-Golayův filtr [21, 22, 23].

Fourierova transformace umožňuje převod signálu do frekvenční domény, kde je možné na signál aplikovat např. Gaussův filtr pro odstranění vysokofrekvenčního šumu. Díky zpětné Fourierově transformaci se po filtraci převede spektrum zpět do časové domény. Tato poměrně jednoduchá technika umožňuje odfiltrovat vysokofrekvenční šum, ale pouze za předpokladu, že existuje významný frekvenční rozdíl mezi signálem a šumem [23].

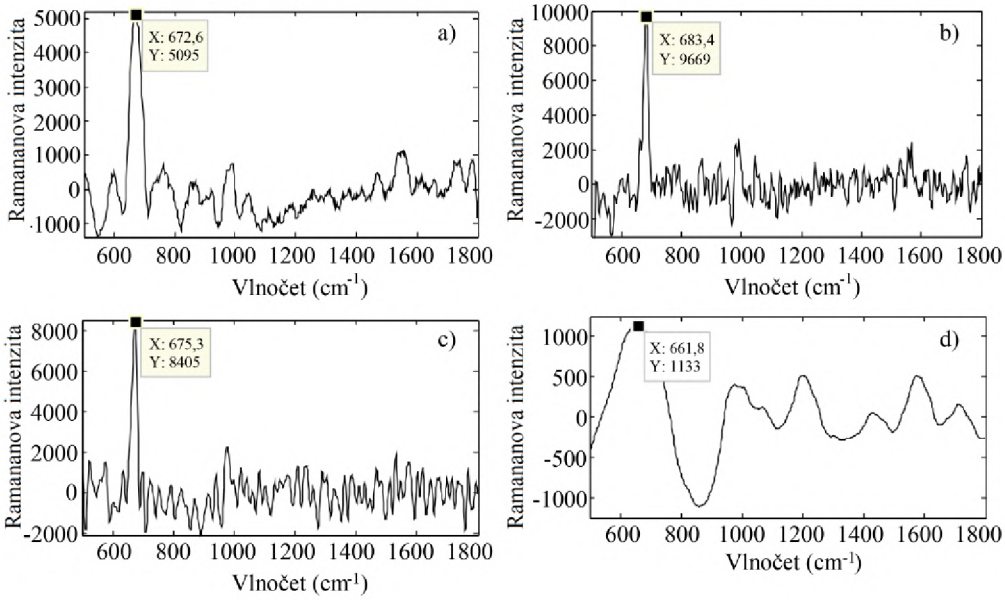
Vlnková transformace je další technikou, která je v literatuře často zmiňována ve spojení s redukcí šumu v Ramanových spektrech [24, 31, 32]. Tato technika rozkládá spektrální data do dvou typů vlnek, a to do aproximační a detailové vlnky. Z těchto dvou komponent je možné získat časově-frekvenční reprezentaci daného signálu. Odfiltrování šumu probíhá ve třech hlavních krocích. V prvním kroku je vstupní signál převeden do vlnkové domény. Potom se vhodně zvolenými hodnotami odprahují detailové koeficienty. U filtrace šumu Vlnkovou metodou se obvykle používají dvě různé techniky: tvrdé prahové hodnoty nebo měkké prahové hodnoty. Technika tvrdého prahování spočívá v nastavení všech vlnkových koeficientů pod danou prahovou hodnotu rovnou nule, zatímco v měkkém prahování jsou vlnkové koeficienty sníženy o prahovou hodnotu. Ve třetím kroku je provedena rekonstrukce signálu s použitím původních aproximačních koeficientů s upravenými detailovými koeficienty. Výsledkem je spektrum s redukovaným šumem. Jedním z problémů využití Vlnkové transformace je, že postup vyžaduje odhad hladiny šumu [24, 32].

Další metodou používanou v Ramanovské spektroskopii pro odfiltrování šumu spolu s vyhlazením průběhu spektra je Savitzky-Golayův filtr. Nejdříve je původní signál rozdělen na menší úseky (tzv. okna). Následně je všemi okny s původním signálem proložena polynomiální funkce. Úroveň vyhlazení a filtrace šumu závisí na volbě velikosti okna a řádu polynomiální funkce. Pokud bude velikost okna příliš malá, nedochází k filtraci šumu a výsledné vyhlazení signálu bude minimální. Naopak v případě volby příliš velkého okna dojde ke snížení spektrálního rozlišení a může dojít ke zkreslení či zaniknutí slabších signálů. Při použití vyhlazovacího Savitzky-Golayova filtru je tedy potřebné zvolit rozumný kompromis mezi velikostí okna a řádem polynomiální funkce [21, 31].

Na obrázku 1.14 je možné vidět Ramanovo spektrum melanimu získané při výkonu excitačního laseru 10 mW. Toto spektrum je v „surovém“ formátu, nebylo tedy nijak dodatečně upravováno. Na obrázku 1.15 je pak možné vidět spektra, která vznikla úpravou původního spektra pomocí zmíněných technik. Je vidět, že každá technika upravila průběh spektra i polohu a intenzitu hlavního píku trochu jiným způsobem. Vždy je tedy zapotřebí vybírat vhodnou techniku v závislosti na poměru signálu k šumu, tvaru a překrytí signálů a v závislosti na předpokladu rozložení šumu. Nelze tedy říci, že by některá z vyjmenovaných metod byla lepší než ostatní [24].



Obrázek 1.14: Neupravené Ramanovo spektrum melaninu při výkonu excitačního laseru 10 mW. Převzato a přeloženo z [23].



Obrázek 1.15: Ramanova spektra melaninu při výkonu excitačního laseru 10 mW upravena pomocí různých technik na filtraci šumu: a) Savitzky-Golay filtr, b) Gaussův filtr, c) Vlnková transformace s tvrdým nastavením prahu, d) Vlnková transformace s měkkým nastavením prahu. Převzato a přeloženo z [23].

2. Luminiscenční spektroskopie

Kromě možnosti měřit slabý Ramanův signál, bude navrhovaná sestava schopna měřit i silnější luminiscenční záření. Pojem „luminiscence“ obsahuje latinské slovo „lumen“, což znamená světlo. Termín luminiscence pak popisuje proces vyzařování světla látkou. Tento termín byl poprvé použit fyzikem Eilhardem Wiedemannem v roce 1888, kterým popsal „všechny jevy vyzařování světla z látek, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úrovní jeho tepelného záření“ [33].

Luminiscence tedy označuje emisi (vyzáření) ultrafialových, viditelných nebo infračervených fotonů z látky, která nastává v důsledku excitace elektronů a jejich následným návratem do nižšího či základního stavu. Excitace elektronů do energiově vyšších stavů je způsobena dodáním vnější energie molekule. Tato přebytečná energie je následně molekulou vyzářena ve formě fotonů. Jedná se tedy o proces tzv. zářivého dohasínání, při kterém je absorbovaná energie přeměněna na energii světelnou [8, 33].

Látky či molekuly, u nichž nastává luminiscence, se označují jako luminofory. Luminiscenci mohou vykazovat jak organické látky (např. aromatické uhlovodíky, aminokyseliny či molekuly obsahující více dvojných vazeb), tak i anorganické sloučeniny (např. ionty lanthanoidů, dopovaná skla a krystaly selenidů nebo sulfidů). Taktéž luminiscenci vykazují některé organokovové sloučeniny (komplexy s lanthanoidovými ionty či rutheniové komplexy). Právě díky tomu, že luminiscenci vykazuje velké množství látek spolu s možností zkoumat jak pevné látky, tak i roztoky a plyny, jsou luminiscenční metody stále více využívány v celé řadě oborů. Velké využití má luminiscenční spektroskopie v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, stejně tak i například při studiu kvality a čistoty polovodičových materiálů [8, 33, 34].

Podle povahy původně dodané energie (způsobu buzení) je možné luminiscenci rozdělit na několik druhů, které jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 2.1. V následujícím textu bude věnována pozornost fotoluminiscenci, tj. luminiscenci vyvolané absorpcí elektromagnetického záření hmotou.

Tabulka 2.1: Dělení luminiscenční dějů dle způsobu excitace. Převzato z [33].

Luminiscenční děj	**Způsob dodání excitační energie**
Fotoluminiscence	absorpcí světla (fotonů)
Radioluminiscence	ionizačním zářením (rentgenové záření)
Katodoluminiscence	proudem elektronů
Elektroluminiscence	působením elektrického pole
Termoluminiscence	absorpcí tepla
Chemiluminiscence	chemickou reakcí
Bioluminiscence	biologickými pochody
Triboluminiscence	působením třecích a elektrostatických sil
Sonoluminiscence	působením ultrazvuku

2.1. Fotoluminiscence

Při interakci elektromagnetického záření s hmotou nedochází pouze k jeho rozptýlení danou látkou, které již bylo popsáno v předcházející části, ve které byl vysvětlen jak pružný Rayleighův rozptyl záření, tak i nepružný Ramanův rozptyl. Elektromagnetické záření může být látkou také absorbováno, čímž je látce dodána energie. V případě, že látka získanou energii vyzáří ve formě záření, lze tento jev považovat za fotoluminiscenci (PL, Photoluminescence). Fotoluminiscence patří mezi nedestruktivní techniky (například na rozdíl od katodoluminiscence, kdy urychlený elektronový svazek může povrch vzorku poškodit). Dále lze zmínit, že fotoluminiscence excitovaná laserovým zářením umožňuje nejen analyzovat povrch daného vzorku s vysokým prostorovým rozlišením (řádově o hodnotě použité vlnové délce světla), ale také provádět hloubkové analýzy na připravených i hrubých vzorcích. Naproti tomu jiné luminiscenční techniky (například katodoluminiscence) jsou kvůli omezené penetrační hloubce excitace pouze technikami pro povrchové analýzy, které navíc obvykle vyžadují vhodně připravený povrchu vzorku. [35].

2.1.1. Interakce záření s molekulou

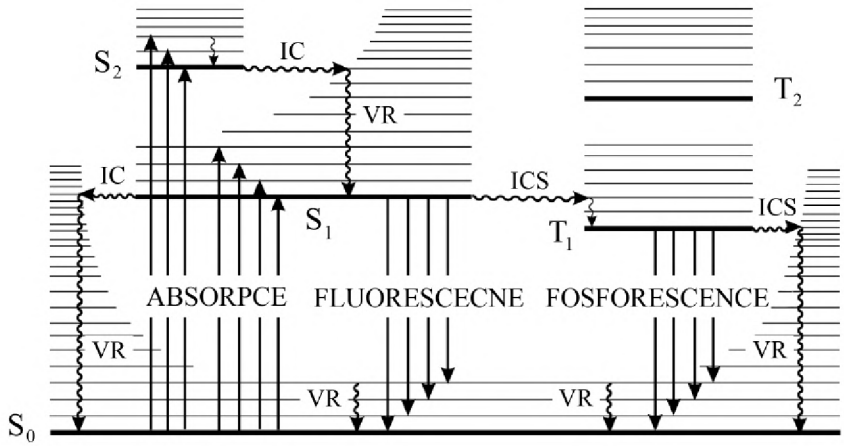
Při absorpci elektromagnetického záření látkou dochází k excitaci, tedy k přechodu elektronu ze základní energiové hladiny na vyšší. Jelikož je však excitovaný stav nestabilní, nastává v excitované molekule celá řada deexcitačních procesů, které umožňují její návrat zpět do základního stavu. V následují části budou vysvětleny principy zmíněných deexcitačních molekulárních procesů při fotoluminiscenci a bude také objasněna podstata vzniku fluorescence a fosforescence. Jednotlivé molekulární procesy, které probíhají mezi absorpcí a emisí jsou graficky znázorněny na Jablonského diagramu, který je na obrázku 2.1. Mezi deexcitační procesy uplatňujícími se při fotoluminiscenci patří:

- absorpce,
- vibrační relaxace,
- vnitřní konverze,
- fluorescence,
- mezisystémové přechody,
- fosforescence.

Deexcitační procesy je možné rozdělit na tzv. zářivé a nezářivé. Do skupiny nezářivých procesů patří například vnitřní konverze (IC, internal conversion), vibrační relaxace (VR, vibrational relaxation) či mezisystémové přechody (ICS, intersystem crossing). Při zářivých procesech dochází k emisi přebytečné energie ve formě fotonů. Do zářivých procesů patří fluorescence a fosforescence. Tyto dva typy zářivých procesů se od sebe liší tzv. délkou dosvitu (tj. dobou, která uplyne od ukončení budícího impulsu do vyhasnutí fotoluminiscence). Pokud emise fotonů nastává již během buzení či okamžitě po skončení excitace (v časovém rozmezí mezi 10^{-8} až 10^{-5} s) jedná se o fluorescenci, tedy fotoluminiscenci s krátkým dosvitem. Naopak fosforescence odpovídá fotoluminiscenci s dlouhou dobou dosvitu (více než 10^{-2} s). V některých případech může emise při fosforescenci přetrvávat po skončení působení excitačního zdroje i minuty či hodiny [8, 33].

Má-li dojít k luminiscenci, musí molekula nejprve přejít do excitovaného stavu absorpcí excitační energie, která je v případě fotoluminiscence dodána ve formě elektromagnetického záření. Absorpcí energie mohou elektrony přecházet ze základní energiové hladiny S_0

do některého z excitovaných elektronových singletových stavů (S_1, S_2, ...). Tento proces probíhá řádově v časovém rozmezí 10^{-15} s a jedná se o nejrychlejší přechod v Jablonského diagramu [8, 33].



Obrázek 2.1: Jablonského diagram: $S_{0,1,2}$ - singletové stavy, $T_{1,2}$ - tripletové stavy, VR - vibrační relaxace, IC - vnitřní konverze, ICS - mezisystémový přechod. Přímé šipky reprezentují zářivé deexcitační procesy, vlnité šipky označují deexcitační procesy nezářivé. Převzato a upraveno z [33].

Pokud se po absorpci a následné excitaci elektrony nachází na vyšší vibrační hladině daného singletového stavu, dochází k tzv. vibračním relaxacím VR. Při těchto nezářivých procesech excitované elektrony přechází na co nejnižší vibrační hladinu daného excitovaného singletového stavu S_1 (resp. S_2, ...). Vibrační relaxace VR je velice rychlá (v průměru trvá asi 10^{-13} až 10^{-11} s) a je při ní uvolňována energie ve formě tepla [33].

Dalším typem nezářivého deexcitačního procesu je tzv. vnitřní konverze IC, při které přechází elektron z nejnižšího vibračního stavu excitovaného singletu (S_{n+1}) na vibrační hladinu nižšího energiového stavu (S_n). Jedná se tedy o přechod elektronu mezi dvěma energiovými stavy o stejné multiplicitě. Po tomto přechodu opět následuje vibrační relaxace VR na nejnižší vibrační hladinu daného singletového stavu. Rychlost tohoto přechodu záleží na velikosti energiové mezery mezi dvěma danými energiovými stavy. Například vnitřní konverze IC z vyšších excitovancý stavů singletů (z S_2 na S_1) bude probíhat mnohem rychleji než přechod z S_1 na S_0 kvůli mnohem větší energiové mezeře mezi těmito dvěma energiovými stavy. V tomto případě bude vnitřní konverze IC probíhat mnohem pomaleji (řádově 10^{-4} s), což umožní fluorescenci či mezisystémovým přechodům ICS vnitřní konverzi IC konkurovat [8, 33].

Pro elektron nacházející se na nejnižší vibrační hladině singletového stavu S_1 můžou nastat tři možnosti deexcitace. První možností je, že elektron přejde prostřednictvím vnitřní konverze IC na základní energiový stav S_0 a při tomto nezářivém procesu dojde k uvolnění energie ve formě tepla. Další možností je přechod elektronu do různých vibračních hladin S_0, při kterém je energie uvolňována ve formě fotonů, tj. fluorescence. V jiném případě dochází k nezářivému přechodu elektronů pomocí tzv. mezisystémového přechodu ICS [8, 33].

Jak již bylo zmíněno, emise fotonů doprovázející přechod elektronů z nejnižší vibrační hladiny S_1 na jednu z vibračních hladin S_0 se nazývá fluorescence. Při tomto zářivém procesu je energie uvolňována ve formě světelného záření, které má vyšší vlnovou délku (nižší energii) než záření absorbované, neboť došlo ke ztrátě části energie vlivem vibračních relaxací. Proces fluorescence probíhá v časovém rozmezí 10^{-8} až 10^{-5} s [33].

Pokud budeme opět uvažovat elektron na nejnižší vibrační hladině S_1, tak kromě již zmíněné fluorescence a vnitřní konverze IC může docházet také k mezisystémovým přechodům ICS. Mezisystémový přechod ICS je nezářivý typ procesu, který nastává mezi dvěma vibračními hladinami patřícími do stavů různých multiplicit. Křížení mezi různými stavy multiplicity je v zásadě zakázáno, ale díky vlivu spin-orbitální vazby je tento typ přechodu umožněn. Příkladem může být přechod elektronu z nejnižší vibrační hladiny S_1 na vyšší vibrační hladinu excitovaného tripletového stavu T_1. Tento přechod je možný, neboť tripletové energiové stavy mají obecně nižší energii než singletové stavy [8]. Po tomto přechodu budou opět následovat vibrační relaxace VR, kterými přejdou elektrony do základního vibračního stavu daného tripletového stavu. Mezisystémové přechody probíhají poměrně rychle, nejčastěji v časovém rozmezí 10^{-9} až 10^{-7} sekund [33].

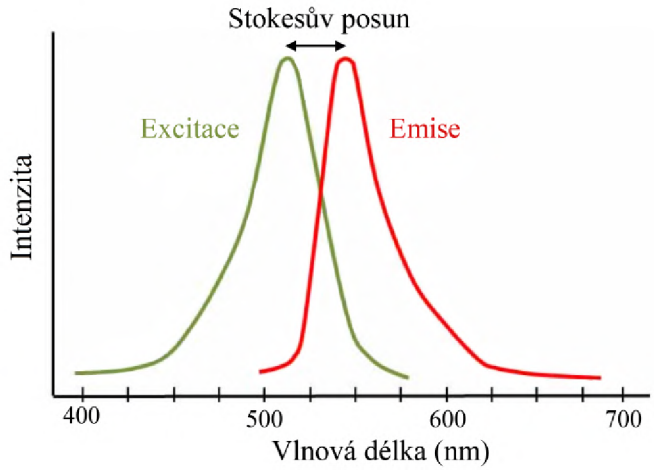
Z tripletové hladiny T_1 může excitovaný elektron sestoupit na základní energiový stav S_0 vnitřní konverzí IC, tedy nezářivým přechodem. Druhou možností deexcitace elektronu na hladině T_1 je prostřednictvím zářivého přechodu zvaným fosforescence. Díky nižší energii hladiny T_1 v porovnání se základním stavem S_1 jsou při fosforescenci vyzařovány fotony s delší vlnovou délkou než u fluorescence. V důsledku spinově zakázaného přechodu elektronu z T_1 do S_0 probíhá tento přechod mnohem pomaleji, řádově 10^{-4} až 10^{-2} s. Během takto pomalého procesu se častěji uplatňují nezářivé přechody ve formě vnitřních konverzí IC a vibračních relaxací VR, při kterých je molekule odebírána energie, a tím se fosforescence předčasně deaktivuje. Tyto nezářivé procesy lze omezit například snížením teploty, čímž se zároveň zvýší i životnost tripletové hladiny a pak lze pozorovat fosforescenci v časovém měřítku i sekund či minut [33].

V některé literatuře je uváděn pojem zpožděná fluorescence či také zpožděná termická fluorescence. Tento typ fluorescence nastává v případě přechodu z tripletového stavu T_1 do singletového stavu S_1. Aby mohlo k tomuto přechodu dojít, je potřeba dodat molekule potřebné množství tepelné energie. Poté dochází ze stavu S_1 k zářivému přechodu a vyzáření fotonu o stejné vlnové délce, jakou mají fotony z klasické fluorescence [8, 33].

2.1.2. Fotoluminiscenční spektra

Při fotoluminiscenci lze měřit emisní či excitační spektrum analyzované látky. Emisní spektrum se měří při konstantní vlnové délce excitace a popisuje rozložení emitovaných vlnových délek zkoumané látky. Emisní spektrum je zpravidla téměř zrcadlovým obrazem spektra absorpčního, ale je oproti němu posunuto k delším vlnovým délkám. Naopak excitační nebo též nazývané absorpční spektrum zobrazuje závislost intenzity luminiscence na vlnové délce absorbovaného záření a měří se při konstantní vlnové délce emise. Z rozdílu vlnových délek mezi emisním a excitačním maximem lze určit tzv. Stokesův posun [8, 33]. Ve většině případů se ve spektrech nachází právě Stokesův posun, při kterém je excitační spektrum od absorpčního posunuto k delším vlnovým délkám. Toto odpovídá situaci, kdy mají excitační fotony vyšší energii než fotony emitované. V některých případech však můžou mít emitované fotony vyšší energii, než jakou měly fotony excitační (toto může nastat například součtem energií dvou dopadajících fotonů či excitací fotonem

se současnou absorpcí tepla). Výsledné emisní spektrum bude od excitačního posunuto ke kratším vlnovým délkám a tento typ posunu se označuje anti-Stokesův posun [34].



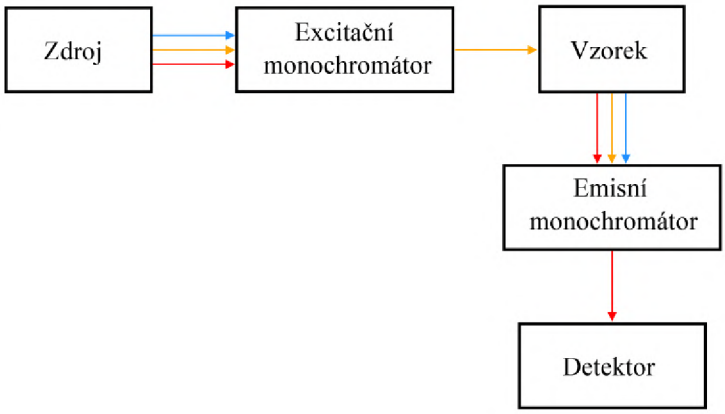
Obrázek 2.2: Excitační a emisí spektrum. Převzato a upraveno z [36].

2.1.3. Instrumentace pro fotoluminiscenci

Experimentální sestava pro pozorování a měření fotoluminiscence se obecně skládá ze zdroje záření, dvou monochromátorů (excitačního a emisního), kyvety s měřeným vzorkem a detektoru. Detektor je následně připojen k počítači, který měřená data sbírá a vyhodnocuje. Pro měření fotoluminiscence se v praxi používají fluorimetry a spektrofluorimetry. Tyto dva přístroje se od sebe liší tím, že fluorimetr používá místo monochromátoru filtry. Fluorimetry jsou určeny pro pozorování či měření fotoluminiscence při dané vlnové délce vhodného filtru. Zatímco spektrofluorimetry využívající monochromátory umožňují zaznamenávat celá emisní a excitační luminiscenční spektra [8].

Blokové schéma spektrofluorimetru je zobrazeno na obrázku 2.3. Jak je možné vidět, světlo ze zdroje záření nejdříve vstupuje do excitačního monochromátoru, kde dochází k výběru konkrétní excitační vlnové délky, která pak dopadá na vzorek a způsobuje fotoluminiscenci. Záření způsobené luminiscencí vzorku je vedeno do druhého (emisního) monochromátoru, který je obvykle umístěný pod úhlem 90° k dopadajícímu světlu, což má minimalizovat intenzitu rozptýleného světla dopadajícího na detektor. Emisní monochromátor slouží k rozkladu luminiscenčního záření a výběru určité emisní vlnové délky, která bude snímána detektorem [8].

Jako zdroje záření se ve fotoluminiscenci používají výbojky, lampy či lasery. Mezi širokopásmové excitační zdroje patří vysokotlaká xenonová výbojka, která poskytuje kontinuální spektrum záření v rozsahu vlnových délek od 250 nm do 800 nm. Dalším poměrně vhodným zdrojem pro fotoluminiscenci je například rtuťová výbojka, kdy se z jejího spektra pomocí filtrů odfiltruje viditelné záření a k excitaci se použije některá z jejích spektrálních čar v UV oblasti. Právě použitím ultrafialového záření je možné pozorovat fluorescenci ve viditelné oblasti. V případě širokopásmových zdrojů je nutné do sestavy přidat monochromátory či filtry, které umožní výběr přesné excitační (případně i emisní) vlnové délky. Ve fotoluminiscenci lze také jako excitační zdroj využít laser, který se užívá v aplikacích, kde není potřeba excitační záření v širokém rozmezí vlnových délek. Jejich výhodu oproti výbojkám je mnohem vyšší intenzita záření o dané vlnové délce [8, 37].



Obrázek 2.3: Blokový diagram spektrofluorimetru.

Ve spektrofluorimetru se nacházejí dva monochromátory, které slouží k výběru excitační a emisní vlnové délky. Monochromátor rozděluje pomocí disperzního prvku (nejčastěji pomocí difrakční mřížky) excitační nebo emisní záření na jednotlivé vlnové délky. Na výstupu monochromátoru se nachází štěrbina, která propouští pouze úzké spektrální pásmo či požadovanou vlnovou délku. Právě díky monochromátorům je možné získat excitační i emisní spektrum zkoumané látky. Při záznamu excitačního spektra se plynule mění vlnová délka vycházející z prvního excitačního monochromátoru. Druhý emisní monochromátor je mezitím nastaven na určitou konstantní vlnovou délku. Pro záznam emisního spektra je tomu přesně naopak. Ve fluorimetru jsou monochromátory nahrazeny vhodnými filtry. Zpravidla se používá excitační filtr, který slouží k výběru požadované excitační vlnové délky záření z excitačního zdroje. Emisní filtr je umístěn mezi vzorkem a detektorem a jeho úkolem je propustit určité emitované záření a zároveň odfiltrovat excitační vlnovou délku či rozptýlené záření [8, 37].

Jelikož má záření vznikající fotoluminiscencí zpravidla velmi nízkou intenzitu, je zapotřebí ve spektrofluorimetru (příp. fluorimetru) používat detektory s vysokou citlivostí. Při měření fluorescence se využívá fotonásobičů (PMT), které patří mezi jednokanálové detektory. Druhým používaným typem detektoru ve fotoluminiscečních sestavách je CCD detektor, který patří mezi vícekanálové detektory [37]. Principy obou těchto detektorů již byly také popsány v části věnované instrumentaci pro Ramanovskou spektroskopii.

Je zapotřebí rozlišovat mezi fluorescencí a fosforescencí, které se od sebe liší dobou dohasínání. Pro sledování fosforescence lze do spektrofluorimetru umístit adaptér zvaný fosforoskop. Tento adaptér obsahuje rotující záklopku, která umožňuje střídavé přerušování dopadajícího záření na vzorek umístěný v kyvetě. Volbou otáček lze získat rozlišovací doby v rozmezí 10^{-4} až 1 sekundy. Pokud je záklopka nastavena tak, že na vzorek nedopadá excitační záření, tak druhým výřezem záklopky vystupuje fosforescenční záření směrem k monochromátoru a následně k detektoru. V tomto nastavení dopadá na detektor pouze fosforescenční záření, neboť fluorescence s krátkou dobou dosvitu se zháší ihned po přerušení budícího záření, a tedy není detektorem zaznamenávána [8].

3. Motivace a cíle práce

Jak již bylo zmíněno v úvodu, v současnosti je vyvíjeno přetlakové zařízení, které bude sloužit pro zavádění pracovních médií a světla do dutého optického vlákna. Je potřeba navrhnout sestavu, která bude zavádět záření do optického vlákna, které toto záření povede právě do této přetlakové komory. Dále má tato sestava sloužit i ke sběru a vyčítání světla o nízké intenzitě a má jej zavést do jiného optického vlákna, které je spojeno se spektrometrem. Tato sestava je navržena nejen pro Ramanovskou spektroskopii, ale také pro měření fotoluminiscence, popsané v předchozí části. Proto musí měřící sestava umožnit jednoduchou volbu měřící metody. V rámci vývoje měřící sestavy je třeba postupně dosáhnout těchto cílů:

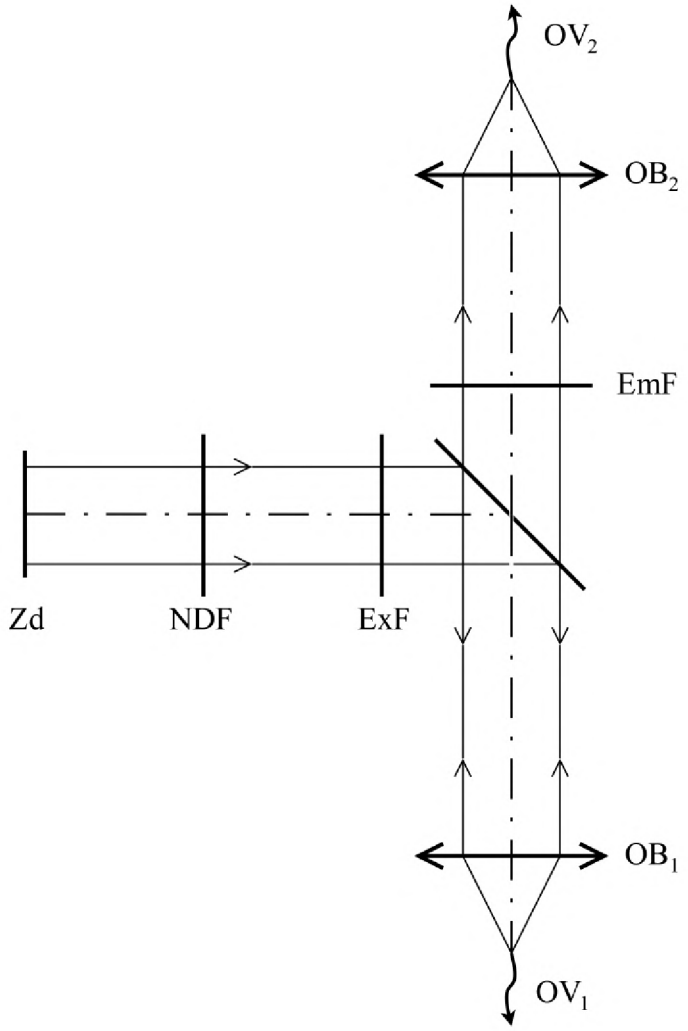
1. Návrh řešení optické sestavy a její simulace.
2. Výběr a optimalizace optických komponentů.
3. Tvorba výrobní dokumentace mechanických částí sestavy.
4. Návrh vhodné justážní metody.
5. Kompletace a testování sestavy.

4. Optické řešení sestavy

Navrhovaná sestava musí umožňovat zavádění laserového záření do optického vlákna, které toto záření povede dále ke vzorku. Také bude zároveň sloužit i pro sběr záření přicházejícího směrem od vzorku stejným optickým vláknem a toto záření má být pomocí soustavy navázáno do jiného optického vlákna, které je napojeno na spektrometr či na detektor. K tomu je nutno do optické sestavy zakomponovat optické členy, které umožní analyzovat sbírané záření pomocí Ramanovské spektroskopie či fotoluminiscence.

4.1. Optický návrh

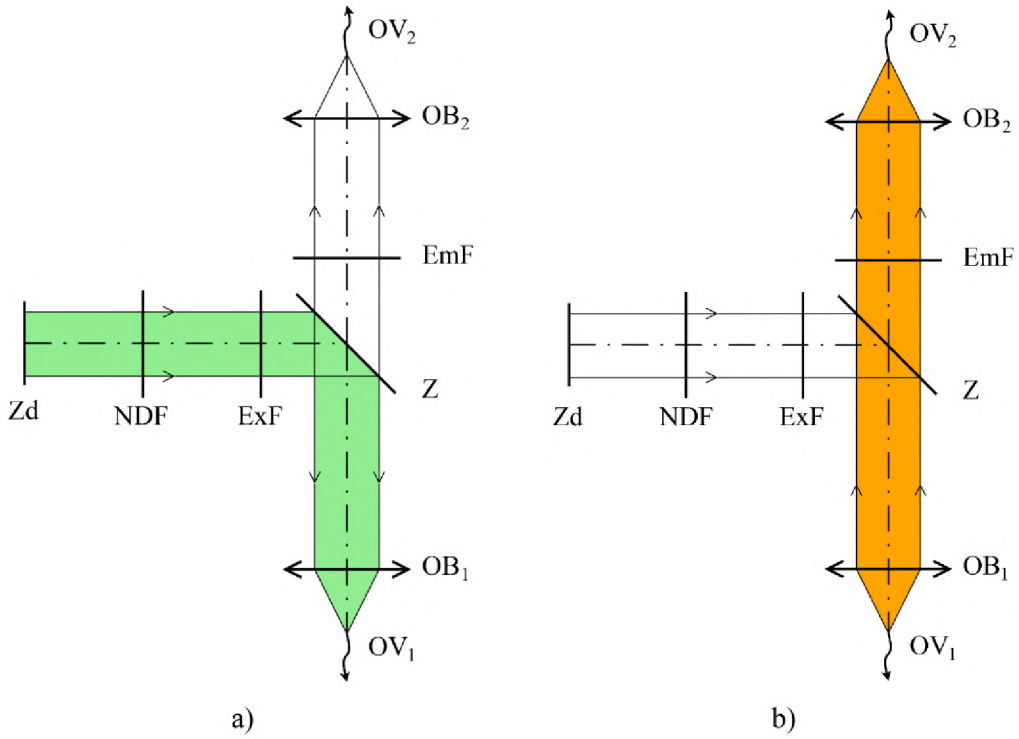
Při tvorbě optického návrhu sestavy bylo zapotřebí vycházet z několika prvotních požadavků, které jsou zmíněny dále. Na základě těchto požadavků jsem vytvořila optické schéma, které je zobrazeno na obrázku 4.1.



Obrázek 4.1: Optické schéma: Zd - laserový zdroj, NDF - ND filtr, ExF - excitační filtr, Z - dichroické zrcadlo, EmF - emisní filtr, $OB_{1,2}$ - objektivy, $OV_{1,2}$ - optická vlákna.

Prvním z požadavků je použití laserového zdroje záření s vlnovou délkou záření 532 nm a s průměrem svazku 2 mm. Toto záření je zapotřebí v sestavě navázat do jednovidového optického vlákna OV_1 s označením S405-XP od firmy Thorlabs [38]. Zmíněné optické vlákno OV_1 je určeno pro vlnové délky záření v rozsahu 400–680 nm, průměr jeho jádra je 3 µm a jeho numerická apertura NA_{OV} má hodnotu 0,12.

Pro vedení záření ze sestavy směrem k detektoru či spektrometru je použito totožné optické vlákno OV_2 se stejnými parametry, do kterého je potřeba toto záření sestavou opět navázat. Pro zavedení záření do optických vláken je zapotřebí vybrat vhodné objektivy OB_1 a OB_2. Dalším členem, který je nutné do optického návrhu zařadit, je dichroické zrcadlo Z. Jeho funkcí je rozdělení excitační a emisní optické dráhy, viz. obrázek 4.2. Na něm je možné vidět i již zmíněné komponenty, a to zdroj laserového záření Zd, dichroické zrcadlo Z, objektivy OB_1 a OB_2 a optická vlákna OV_1 a OV_2.



Obrázek 4.2: Optické schéma znázorňující optické dráhy: a) excitace, b) emise. Zd - laserový zdroj, NDF - ND filtr, ExF - excitační filtr, Z - dichroické zrcadlo, EmF - emisní filtr, $OB_{1,2}$ - objektivy, $OV_{1,2}$ - optická vlákna.

Dále je možné na obou obrázcích 4.1 a 4.2 vidět i několik filtrů. Excitační filtr ExF slouží k „vyčištění“ laserového záření, kterým je excitován vzorek a emisní filtr EmF má za úkol blokovat Rayleighův rozptyl (tedy záření o vlnové délce stejné jako má excitační záření) a zabraňovat jeho vstupu na detektor nebo spektrometr. V optickém návrhu se nachází také ND filtr NDF, který slouží v případě potřeby k úpravě intenzity laseru.

Excitační dráha, jenž je vyznačena na obrázku 4.2 a) vede laserové záření ze zdroje Zd přes ND filtr NDF a excitační filtr ExF na dichroické zrcadlo Z, které toto záření odráží směrem k objektivu OB_1, který toto záření fokusuje do jádra optického vlákna OV_1. Excitační záření je vláknem OV_1 vedeno do přetlakové komory, odkud je záření

přepojeno do dutého optického vlákna, kterým je vyvedeno mimo přetlakové zařízení a je dále vedeno do komory mikroskopu ke vzorku.

Emisní dráha slouží k vedení záření, které vzniklo interakcí excitačního záření se zkoumaným vzorkem a odpovídá jí na obrázku 4.2 situace b). Záření je od vzorku vedeno přes duté optické vlákno do přetlakové komory, kde dochází k přepojení na jednovidové optické vlákno OV_1. Optické vlákno OV_1 vede záření zpět do navrhované sestavy. Po průchodu objektivem OB_1 emisní záření prochází dichroickým zrcadlem Z a emisním filtrem EmF a je objektivem OB_2 zavedeno do optického vlákna OV_2, které jej vede dále k detektoru (případně ke spektrometru).

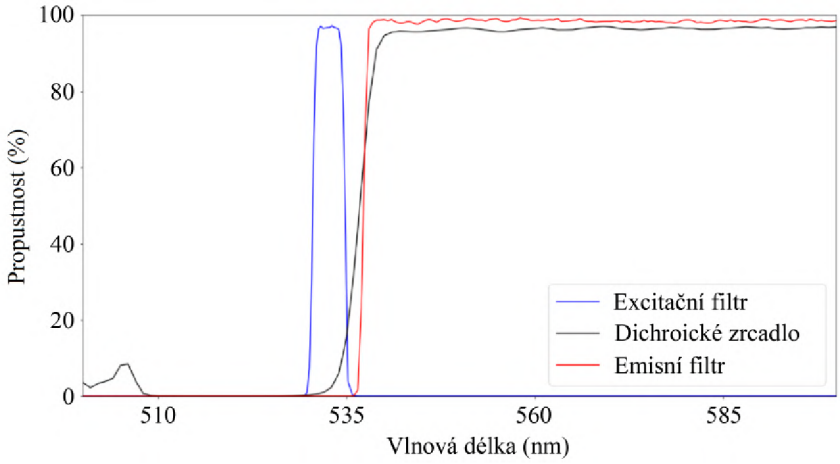
4.2. Výběr optických součástí

Dle stanovených optických požadavků a prvotního optického návrhu byly vybrány následující optické součásti:

- sada pro Ramanovskou spektroskopii,
- objektivy,
- sada ND filtrů.

4.2.1. Sada pro Ramanovskou spektroskopii

Sada pro Ramanovskou spektroskopii s označením 49952 byla vybrána od firmy Chroma Technology Corp a je určena pro excitační vlnovou délku 532 nm [39]. Tato sada obsahuje dichroické zrcadlo Z s označením RT532rdc, které je určeno pro dopad paprsků pod úhlem 45° a jehož rozměry jsou 26x18x1 mm. Toto dichroické zrcadlo Z odráží excitační záření a je propustné pro delší vlnové délky. Dále sada obsahuje excitační filtr ExF s označením RET532/4x, jehož centrální vlnová délka je 532 nm a propouští pouze úzké pásmo o pološířce (FWHM, Full width at half maximum) 4 nm. Posledním členem sady je emisní filtr EmF typu horní propust, jehož funkcí je blokovat záření o excitační vlnové délce a je u dodavatele označen RET537lp. Oba filtry mají požadovaný úhel dopadu paprsků 0° a jsou dodány o průměru 18 mm zalepené v 3,5 mm tlustém prstenci. Graf popisující propustnost v závislosti na vlnové délce všech prvků sady je zobrazen na obrázku 4.3.



Obrázek 4.3: Závislost propustnosti na vlnových délkách jednotlivých prvků z vybrané sady pro Ramanovskou spektroskopii. Převzato a upraveno z [39].

4.2.2. Objektivy

Pro zavedení záření do optických vláken $OV_{1,2}$ byly vybrány dva totožné objektivy $OB_{1,2}$ od firmy Nikon Instruments Inc. [40], která je dodává pod označením CFI Plan Flour 10X, viz. obrázek 4.4. Jedná se o objektivy Nikon Plan Fluorite se zvětšením 10x, s pracovní vzdáleností *WD* (Working Distance) 16 mm a s numerickou aperturou NA_{OB} o hodnotě 0,3. Dle prodejce je tento objektiv vhodný k použití v rozsahu od UV záření až po blízké infračervené světlo. Právě díky tomuto širokému spektrálnímu rozsahu záření bude možné v budoucnu použít navrhovanou sestavu i pro lasery o jiných vlnových délkách, aniž by se musely v sestavě vyměňovat objektivy. Tyto objektivy byly zvoleny i pro jejich schopnost fokusace. Poloměr r prvého minima rozptylové funkce bodu, který je objektivem tvořen je dán Rayleighovým vztahem

$$r = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA_{\mathrm{OB}}}, \tag{4.1}$$

kde λ je vlnová délka použitého záření. Pro zvolený objektiv a laser o vlnové délce $\lambda = 532\,\mathrm{nm}$ je poloměr r roven 1,082 µm. Vzhledem k tomu, že poloměr jádra vybraného jednovidového optického vlákna je roven 1,5 µm, je fokusační schopnost vybrané objektivu plně dostačující.

Obrázek 4.4: Vybraný objektiv Nikon Plan Fluorite se zvětšením 10x. Převzato z [38].

4.2.3. Sada ND filtrů

Posledním prvkem optického návrhu sestavy je sada deseti absorpčních ND (ND, Neutral Density) filtrů s označením NEK01 od firmy Thorlabs. Filtry z této sady jsou určeny pro záření o vlnových délkách 400 nm až 650 nm. Jejich průměr je 25 mm a v sadě jsou obsaženy ND filtry o následujících optických hustotách: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0 a 4.0. V sestavě se nachází za laserovým zdrojem a jejich funkcí je v případě potřeby upravovat intenzitu záření laseru. Výhodou této sady je možnost šroubování jednotlivých filtrů do sebe, čímž lze zajistit relativně přesný absorpční požadavek [38].

4.3. Optická simulace

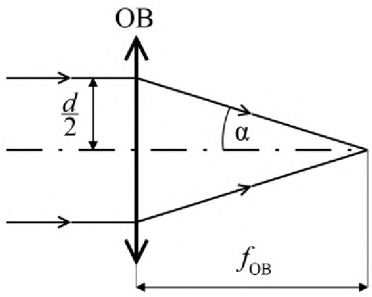
Parametry vybraných optických prvků byly následně použity pro vytvoření simulačního návrhu optické sestavy v programu Zemax. Pro tuto optickou simulaci bylo potřeba určit maximální možný průměr laserového svazku d, které vybrané optické vlákno ještě dokáže pojmout ve spojení se zvoleným typem objektivu. K výpočtu je potřeba znát hodnoty numerické apertury vybraného optického vlákna NA_{OV} a ohniskové vzdálenosti objektivu f_{OB}. Optické vlákno má hodnotu numerické apertury NA_{OV} rovnou 0,12 a ohnisková vzdálenost f_{OB} vybraného objektivu je 20 mm. Numerickou aperturu NA lze určit vztahem

$$NA = n \cdot \sin \alpha, \tag{4.2}$$

kde n označuje index lomu prostředí a α reprezentuje úhel aperturního paprsku. Z obrázku 4.5 lze určit průměr svazku d vztahem

$$d = \frac{f_{\mathrm{OB}} \cdot \tan \alpha}{2}. \tag{4.3}$$

Pro výpočet průměru d je nutno vybrat aperturu vlákna NA_{OV}, protože je více omezující než numerická apertura objektivu NA_{OB}. Pro index lomu $n = 1$ je hodnota maximálního průměru svazku $d = 4{,}84$ mm.

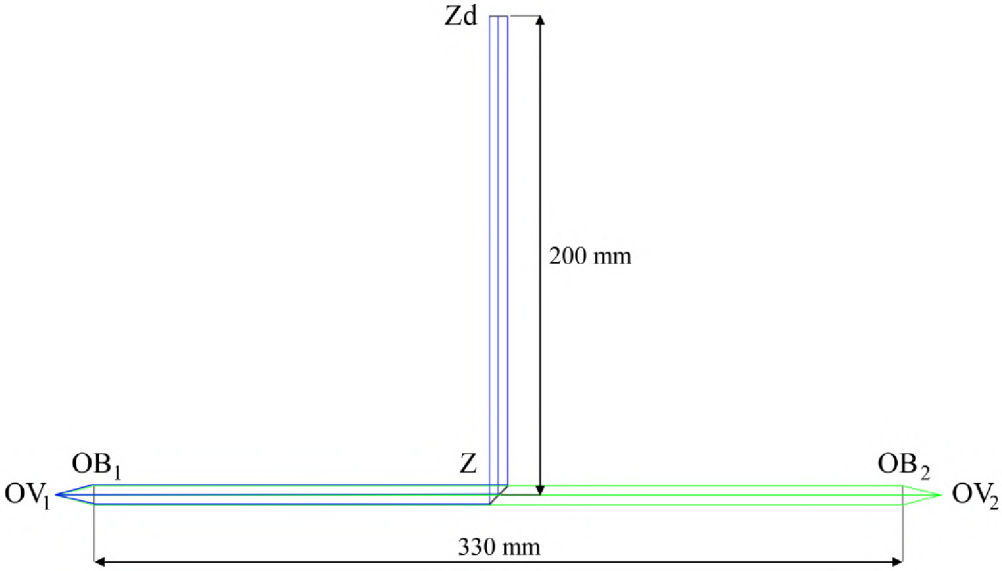


Obrázek 4.5: Schéma pro výpočet průměru svazku. OB - objektiv, f_{OB} - ohnisková vzdálenost objektivu OB, α - úhel aperturního paprsku, d - maximální průměr svazku.

Díky rovnoběžnému chodu záření z laseru je možné umístit dichroické zrcadlo Z libovolně daleko od zdroje záření Zd. Stejně tak lze i objektivy $\mathrm{OB}_{1,2}$ uložit jakkoliv daleko od dichroického zrcadla Z. Dle následného konstrukčního řešení, které bude popsáno v další části, jsou tyto vzdálenosti zvoleny co nejkratší s ohledem na to, aby bylo možné umístit do sestavy výměník optických filtrů. Vzdálenost laserového zdroje Zd a dichroického zrcadla Z byla zvolena 200 mm a vzdálenost objektivu OB_1 (respektive OB_2) od dichroického zrcadla Z byla určena 165 mm.

Objektivy $\mathrm{OB}_{1,2}$ jsou v simulačním návrhu reprezentovány paraxiálními čočkami, neboť výrobce na svých stránkách neuvádí parametry jednotlivých optických členů, ze kterých je objektiv složen. Tyto paraxiální čočky jsou definovány ohniskovou vzdáleností f_{OB}.

Na základě vypočítaného průměru svazku d, parametrů vybraných optických prvků a jejich vzájemnou vzdáleností byla vytvořena odpovídající optická simulace návrhu sestavy, jejíž výsledek je zobrazen na obrázku 4.6. Všechny použité parametry pro vytvoření tohoto simulačního optického návrhu jsou uvedeny v tabulce 4.1.



Obrázek 4.6: Optický návrh v programu Zemax: Zd - laserový zdroj, Z - dichroické zrcadlo, $OB_{1,2}$ - objektivy, $OV_{1,2}$ - optická vlákna. Modré paprsky náleží excitační dráze, zelené paprsky odpovídají dráze emisního záření.

Tabulka 4.1: Parametry použité pro vytvoření optické simulace. Excitační a emisní část optické dráhy v simulaci je oddělena tučnou čarou.

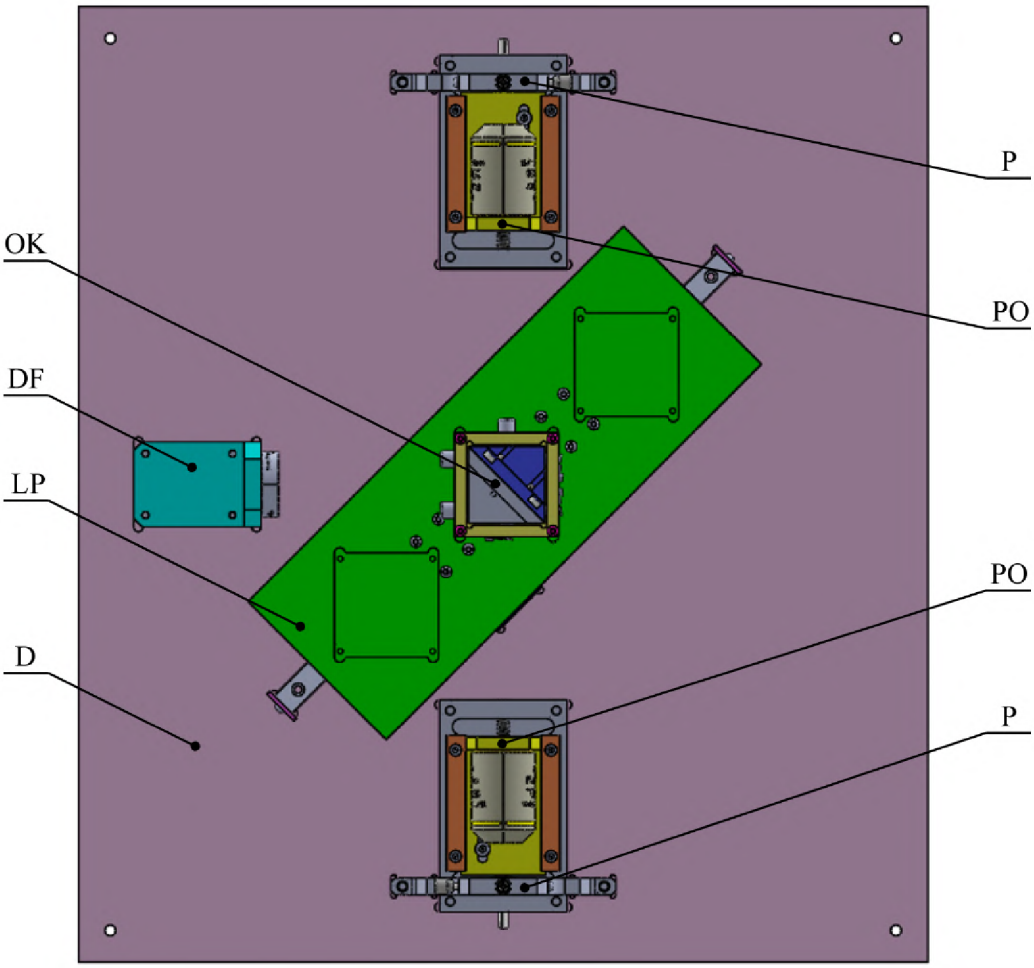
Optická dráha	**Plocha**	**Název**	**Komponenta**	**Tloušťka (mm)**	**Průměr (mm)**	**Ohnisková vzdálenost (mm)**	**Natočení (°)**
EXCITACE	1	Zd	ZDROJ	200,00	4,84	-	-
	2	Z	ZRCADLO	165,00	6,84	-	45,00
	3	OB_1	OBJEKTIV	20,00	4,84	20,00	-
	4	OV_1	OPTICKÉ VLÁKNO	0,00	-	-	-
EMISE	5	OV_1	OPTICKÉ VLÁKNO	0,00	-	-	-
	6	OB_1	OBJEKTIV	20,00	4,84	20,00	-
	7	OB_2	OBJEKTIV	330,00	4,84	20,00	-
	8	OV_2	OPTICKÉ VLÁKNO	0,00	-	-	-

Optickou simulací bylo potvrzeno, že vybrané průměry excitačního ExF a emisního filtru EmF a zvolené rozměry dichroického zrcadla Z z již představené sady pro Ramanovskou spektroskopii od firmy Chroma Technology Corp jsou zcela dostačující. Toto ověření bylo přínosné vzhledem k vysoké pořizovací ceně, která se se zvětšujícími rozměry optických členů zvyšuje.

5. Konstrukční návrh

Konstrukční návrh navazuje na optickou simulaci a slouží k uložení a upevnění optických částí, které byly představeny v předcházející části. Taktéž má navržená mechanická část umožnit danými komponenty pohybovat podle potřeby, čímž bude zajištěna jejich justáž v sestavě. Konstrukční řešení jsem vytvořila v programu SolidWorks, který umožňuje vytvoření 3D modelů. Ve stejném programu jsem také vypracovala výrobní dokumentaci.

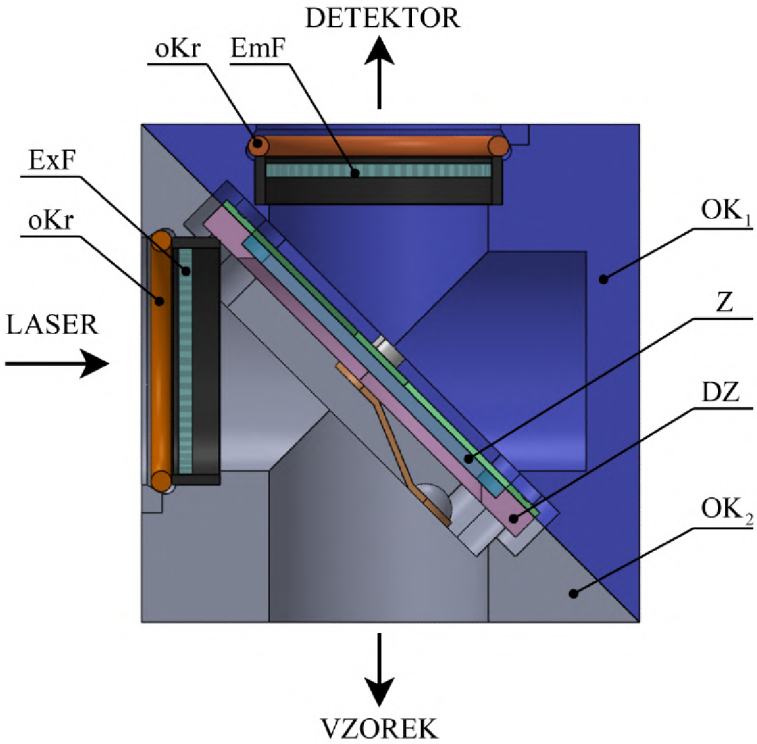
Celé konstrukční řešení je zobrazeno na obrázku 5.1 a skládá se z několika podsestav. První podsestavou je optická kostka OK, která je umístěna na podsestavě lineárního posuvu LP. Další podsestavou je posuv objektivu PO, který slouží k uchycení a justáži obou objektivů $OB_{1,2}$. Objektivy $OB_{1,2}$ slouží k zavádění/vyvádění záření do/z optických vláken $OV_{1,2}$, které jsou uchyceny v paralelogramech P. Díky výběru totožných objektivů $OB_{1,2}$ i stejných optických vláken $OV_{1,2}$ jsou v sestavě hned dvě stejné podsestavy posuvu objektivu PO a dva paralelogramy P. Sestava dále obsahuje držák filtrů DF, který slouží k uchycení ND filtrů NDF. Vyjmenované podsestavy jsou uchyceny pomocí šroubů do vyfrézovaných drážek, které se nachází v základní desce D. Celou sestavu na základní desce D je pak možné připevnit k optickému stolu.



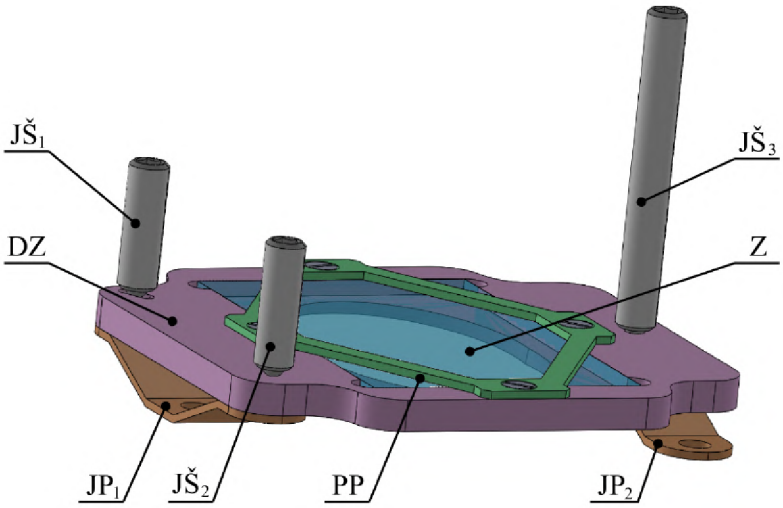
Obrázek 5.1: Konstrukční návrh. D - základní deska, OK - optická kostka, LP - lineární posuv, PO - posuv objektivu, P - paralelogram, DF - držák filtrů.

5.1. Optická kostka

Optická kostka OK, která je v řezu znázorněna na obrázku 5.2, slouží k uložení sady pro Ramanovskou spektroskopii, tedy dichroického zrcadla Z, excitačního filtru ExF a emisního filtru EmF. Dichroické zrcadlo Z je umístěno v desce zrcadla DZ. Optické filtry ExF a EmF jsou v optické kostce uloženy v zahloubené drážce a jsou zde zajištěny pomocí o-kroužků oKr. Pro přehlednost je obrázek 5.2 doplněn o šipky s popisky udávající orientaci optické kostky OK. Optická kostka OK se skládá ze dvou součástí OK_1 a OK_2, které jsou k sobě přišroubovány. Na obrázku 5.3 je možné vidět justážní řešení pro naklápění dichroického zrcadla Z, což umožňuje nastavení zrcadla Z přesně na požadovaný úhel dopadu paprsků, a to 45°. Dichroické zrcadlo Z je uloženo v desce zrcadla DZ a je zajištěno pomocí přítlačného plechu PP. Mechanismus naklápění zrcadla je dán tříbodovým kinematickým uložením, které je tvořeno třemi justážními šrouby JŠ s kulovým koncem a dvěma justážními plechy JP, jenž jsou umístěny na druhé straně desky zrcadla DZ než justážní šrouby JŠ. Justážní šroub $JŠ_1$ se svým kulovým koncem pohybuje v zaoblené drážce v desce zrcadla DZ, justážní šroub $JŠ_2$ má s deskou zrcadla DZ bodový dotyk a konec justážního šroubu $JŠ_3$ je umístěn v kuželovém zahloubení. Vybrané justážní šrouby s jemným stoupáním o hodnotě 0,2 mm jsou od firmy Thorlabs, šrouby $JŠ_{1,2}$ mají označení F2D5ES8 a šroub $JŠ_3$, který se od prvních dvou liší pouze délkou, je označen F2D5ES20 [38]. Justážní plechy $JP_{1,2}$ působí silou proti justážním šroubům JŠ, a tak je zajištěn vratný náklon desky zrcadla DZ.

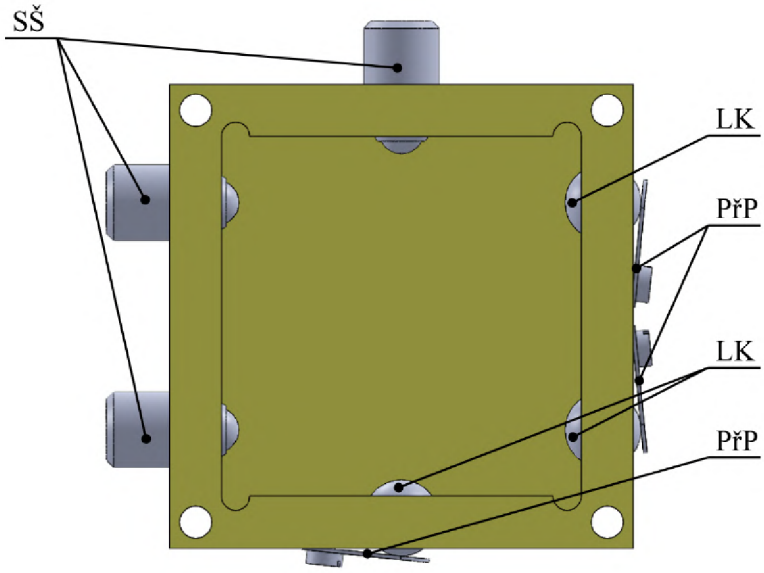


Obrázek 5.2: Optická kostka OK v řezu. ExF - excitační filtr, oKr - o-kroužek, EmF - emisní filtr, $OK_{1,2}$ - části optické kostky, Z - dichroické zrcadlo, DZ - deska zrcadla.



Obrázek 5.3: Tříbodové kinematické uložení dichroického zrcadla Z. $JŠ_{1,2,3}$ - justážní šrouby, DZ - deska zrcadla, $JP_{1,2}$ - justážní plechy, PP - přítlačný plech, Z - dichroické zrcadlo.

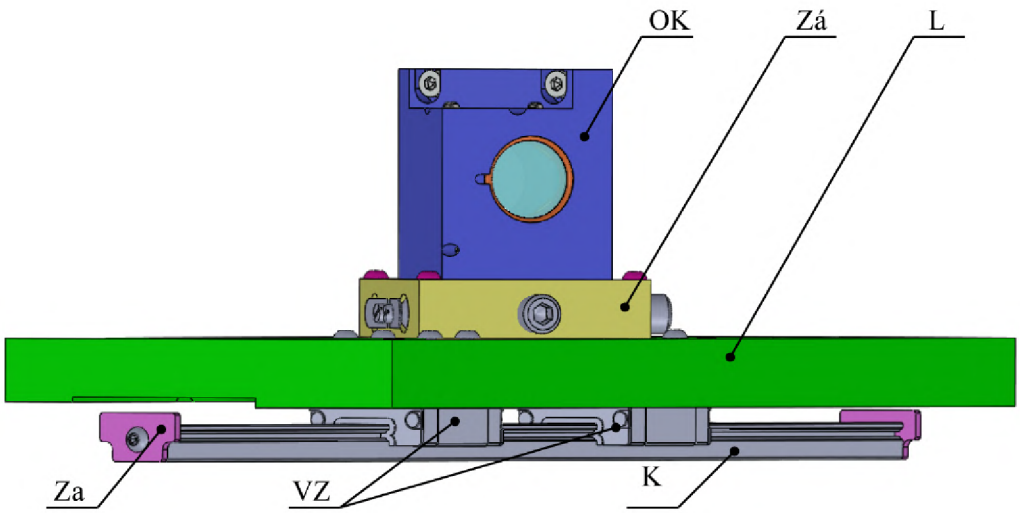
Na podstavě optické kostky OK je navrženo zkosení, které je určeno pro její uchycení do základny Zá. Tato základna Zá je zobrazena na obrázku 5.4 a obsahuje stavěcí šrouby SŠ s kuličkami na konci, které byly vybrány od firmy MISUMI s výrobním označením BCSB8 [41]. Proti těmto šroubům SŠ jsou v návrhu umístěny ložiskové kuličky LK o průměru 8 mm a přítlačné plechy PřP. Tímto návrhem vznikl zacvakávací mechanismus, do kterého je možné optickou kostku OK umístit bez nutnosti šroubování či jiného zajišťování. Po zasunutí kostky OK do základy Zá dojde k vytvoření tlaku mezi ložiskovými kuličkami LK, konci stavěcích šroubů SŠ a zkosením v kostce OK. Tím jsou ložiskové kuličky LK vytlačeny směrem ven. Tato základna Zá je pak pomocí šroubů připevněna k liště L, která je součástí podsestavy lineárního posuvu LP.



Obrázek 5.4: Základna optické kostky Zá. SŠ - stavěcí šrouby, LK - ložiskové kuličky, PřP - přítlačné plechy.

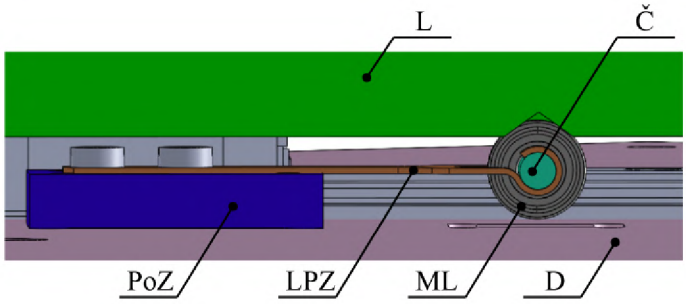
5.2. Lineární posuv

Podsestava lineárního posuvu LP, která je zobrazena na obrázku 5.5, je tvořena lineárním vedením s označením SSE2BV13-295-MC od firmy MISUMI [41]. Toto vedení se skládá z kolejnice K o délce 295 mm a dvou vozíků VZ. Na vozících VZ je pomocí šroubů připevněna již zmíněná lišta L, na které je v základně Zá umístěna optická kostka OK. Jak je možné vidět na obrázku návrhu celé sestavy 5.1, v nosné liště L jsou připraveny tři pozice pro optické kostky OK. Je tedy možné umístit na lištu L najednou tři optické kostky OK. V tomto návrhu je bráno v potaz možné použití celé sestavy pro různé spektroskopické techniky. Lišta L tedy spolu s lineárním vedením tvoří výměník optických kostek OK, který umožňuje jejich rychlou a jednoduchou výměnu dle potřeb měření. Na obou koncích kolejnice K jsou zarážky Za, které zabezpečují, že vozíky VZ z kolejnice K při pohybu nevyjedou.



Obrázek 5.5: Podsestava lineárního posuvu LP s umístěnou optickou kostkou OK. L - nosná lišta, Zá - základna optické kostky OK, K - kolejnice, VZ - vozíky, Za - zarážka kolejnice.

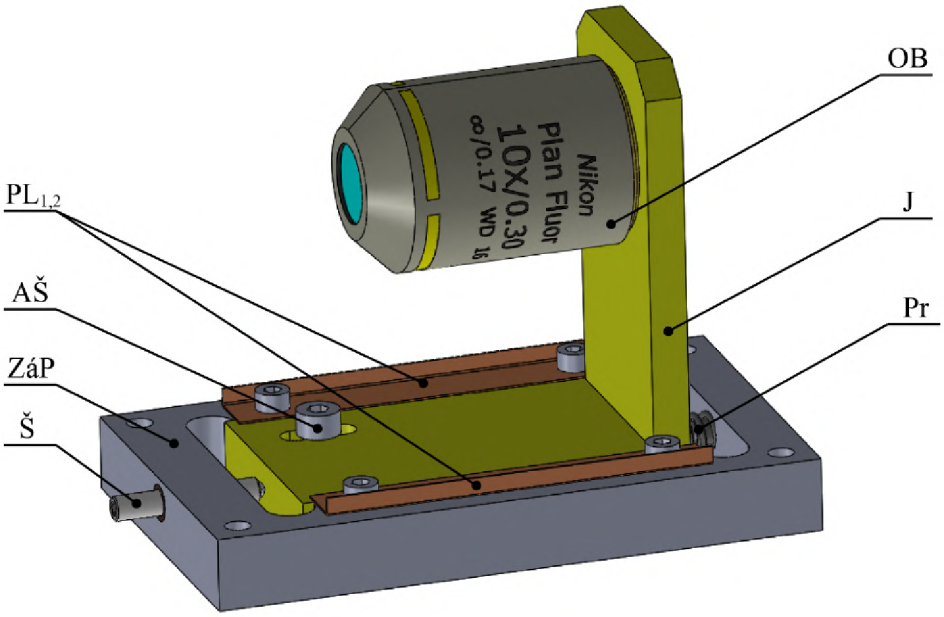
Pro zajištění správné polohy lišty L s danou optickou kostkou OK slouží západka Záp, viz. obrázek 5.6. Tato západka Záp je tvořena tenkým plechem PLZ, na kterém je uchyceno pomocí čepu Č miniaturní ložisko ML s vnějším průměrem 10 mm a šířkou 4 mm. Toto ložisko ML při správné poloze lišty L zapadne do drážky, která je v ní vyrobena a dojde tak k zajištění polohy lišty L na správném místě. Pro výměnu pozice optické kostky OK na liště L stačí pouze lehká mechanická síla k tomu, aby ložisko ML opustilo drážku a tím je možné lištou L opět pohybovat. Mechanismus západky Záp je uchycen na podstavě PoZ, která je přišroubována k základní desce D.



Obrázek 5.6: Západka Záp k zajištění polohy optické kostky OK. L - nosná lišta, Č - čep, PoZ - podstava západky, LPZ - plech západky, ML - miniaturní ložisko, D - základní deska.

5.3. Posuv objektivu

Pro uchycení a justáž objektivů OB slouží podsestava posuvu objektivu PO, která je znázorněna na obrázku 5.7. Objektiv OB je pomocí závitu přišroubován na jezdci J, který se posouvá v přesně vyfrézované drážce v základně posuvu ZáP. Jezdec J je ve vodící drážce upevněn pomocí dvou přítlačných planžet $PL_{1,2}$ s předpružením. Pohyb jezdce J je uskutečněn pomocí šroubu Š a proti němu působící tlačnou pružinou Pr na vodícím šroubu, jehož funkcí je zabránit vybočení pružiny. Tlačná pružina Pr je pod označením C02400380620S dodávána firmou Sodemann [42]. Zmíněný šroub Š má jemné stoupání o hodnotě 0,25 mm a je dodáván firmou Thorlabs s označením F4MSS25. V základně posuvu ZáP je pak uchycen pomocí závitového pouzdra F4MSSN2P od stejné firmy [38]. Rozsah pohybu jezdce J je ±4 mm. Pro zajištění hladkého pohybu jsou rozměry podstavy jezdce J (část pohybující se ve vodící drážce) zvoleny tak, aby nedocházelo k jeho vzpříčení v podélném směru pohybu. Pro aretaci určité polohy jezdce J slouží aretační šroub AŠ.

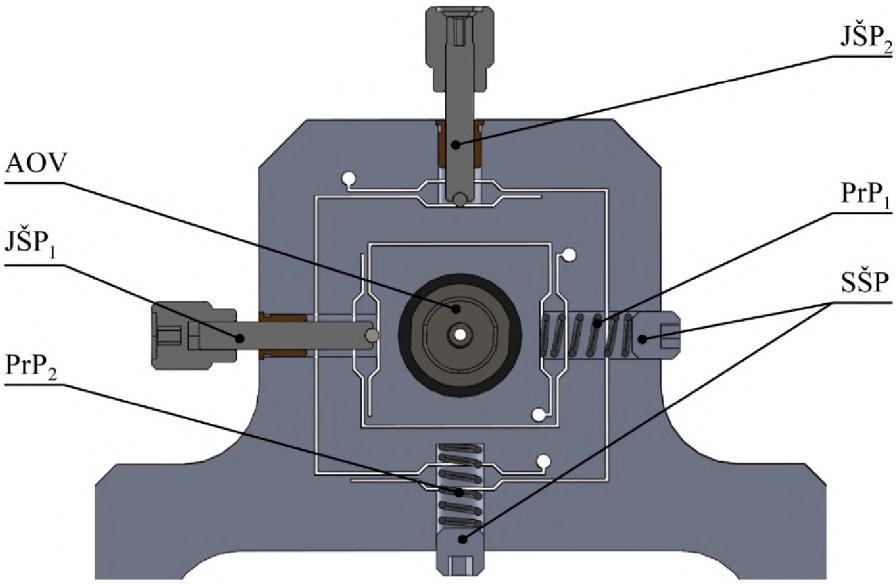


Obrázek 5.7: Podsestava posuvu objektivu PO. OB - objektiv, ZáP - základna posuvu, J - jezdec, $PL_{1,2}$ - přítlačné planžety, Š - šroub, Pr - pružina, AŠ - aretační šroub.

5.4. Paralelogram

Uchycení optického vlákna OV, do kterého objektiv OB zavádí laserové záření, zajišťuje paralelogram P. Optické vlákno OV je zde upevněno v adaptéru pro optická vlákna AOV od firmy Thorlabs, která jej dodává pod označením SM05FC [38]. Adaptér AOV s optickým vláknem OV, do kterého má být zavedeno laserové záření, se proto nachází ve vzdálenosti 16 mm od objektivu OB, tedy v jeho pracovní vzdálenosti *WD*.

Pro justáž pozice optického vlákna OV v adaptéru AOV slouží mechanismus paralelogramu P, který je tvořen drážkami, proti sobě působícími justážními šrouby $JŠP_{1,2}$ a pružinami $PrP_{1,2}$. Drážky jsou vytvořeny elektroerozivním obráběním a jejich šířka je 0,35 mm. Právě díky drážkám v materiálu je možný dvouosý pohyb adaptéru AOV pomocí justážních šroubů $JŠP_{1,2}$. Jako první šroub $JŠP_1$ byl zvolen šroub s hlavou MAS15 od firmy Thorlabs. Druhý šroub $JŠP_2$ kvůli jeho specifické délce je složen ze dvou dílů s označením F3SS20 a F3SSK1, které dodává firma Thorlabs. Oba tyto šrouby $JŠP_{1,2}$ mají jemné stoupání o hodnotě 0,25 mm a jsou v paralelogramu P uchyceny pomocí šroubových vložek F3SSN1P od stejné firmy [38]. Proti justážním šroubům $JŠP_{1,2}$ jsou v paralelogramu umístěny pružiny $PrP_{1,2}$ s označením C01800290380S od firmy Sodemann [42], které jsou na místě zajištěny pomocí stavěcích šroubů SŠP. Umístění těchto součástí umožňující přesné nastavění polohy adaptéru AOV je zobrazeno na obrázku 5.8. Na tomto obrázku je možné vidět, že při utažení justážního šroubu $JŠP_1$ dojde ke stlačení pružiny PrP_1, které způsobí pohyb adaptéru AOV směrem doprava. Naopak při povolení šroubu $JŠP_1$ se tlačná pružina PrP_1 roztáhne a tím nastane pohyb adaptéru AOV doleva. Stejným mechanismem je zajištěno výškové nastavení adaptéru AOV pomocí šroubu $JŠP_2$ a pružiny PrP_2. Právě tímto dvouosým pohybem optického vlákna OV v adaptéru AOV, jehož rozsah je ±0,7 mm, je doplněn podélný justážní pohyb objektivu OB. Tím je umožněno přesné zavedení laserového záření do jádra optického vlákna OV.

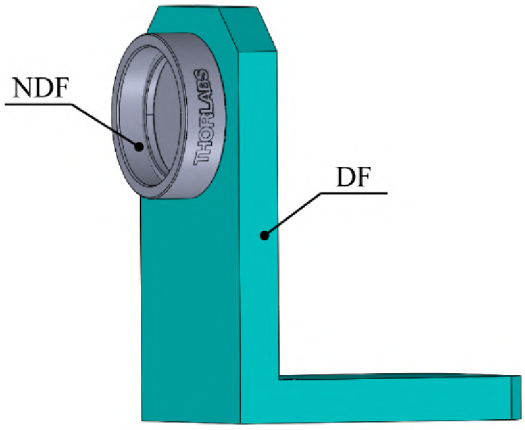


Obrázek 5.8: Paralelogram P v řezu. AOV - adaptér pro optické vlákno, $JŠP_{1,2}$ - justážní šrouby paralelogramu, $PrP_{1,2}$ pružiny paralelogramu, SŠP - stavěcí šrouby.

5.5. Držák filtrů

Pro zajištění polohy filtru NDF ze sady ND filtrů slouží v sestavě držák filtrů DF, který je znázorněn na obrázku 5.9. Filtry jsou v tomto držáku DF uchyceny pomocí závitu SM1. V sestavě je držák filtrů DF umístěn před optickou kostkou OK, což umožňuje dle použitých ND filtrů NDF upravovat intenzitu vstupujícího záření do optické kostky OK, odkud pak záření pokračuje zbytkem sestavy do optického vlákna OV_1 a dále je vedeno až ke vzorku.

Již zmíněný závit SM1 v držáku DF umožňuje nejen montáž ND filtrů NDF, ale také napojení dalších dílů a komponent do navrhované sestavy od firmy Thorlabs, pro kterou je tento typ závitu zcela typický [38]. Toto umožní do držáku DF uchytit například i laser, čímž bude zajištěno jeho přesné ustavení vůči zbytku sestavy.



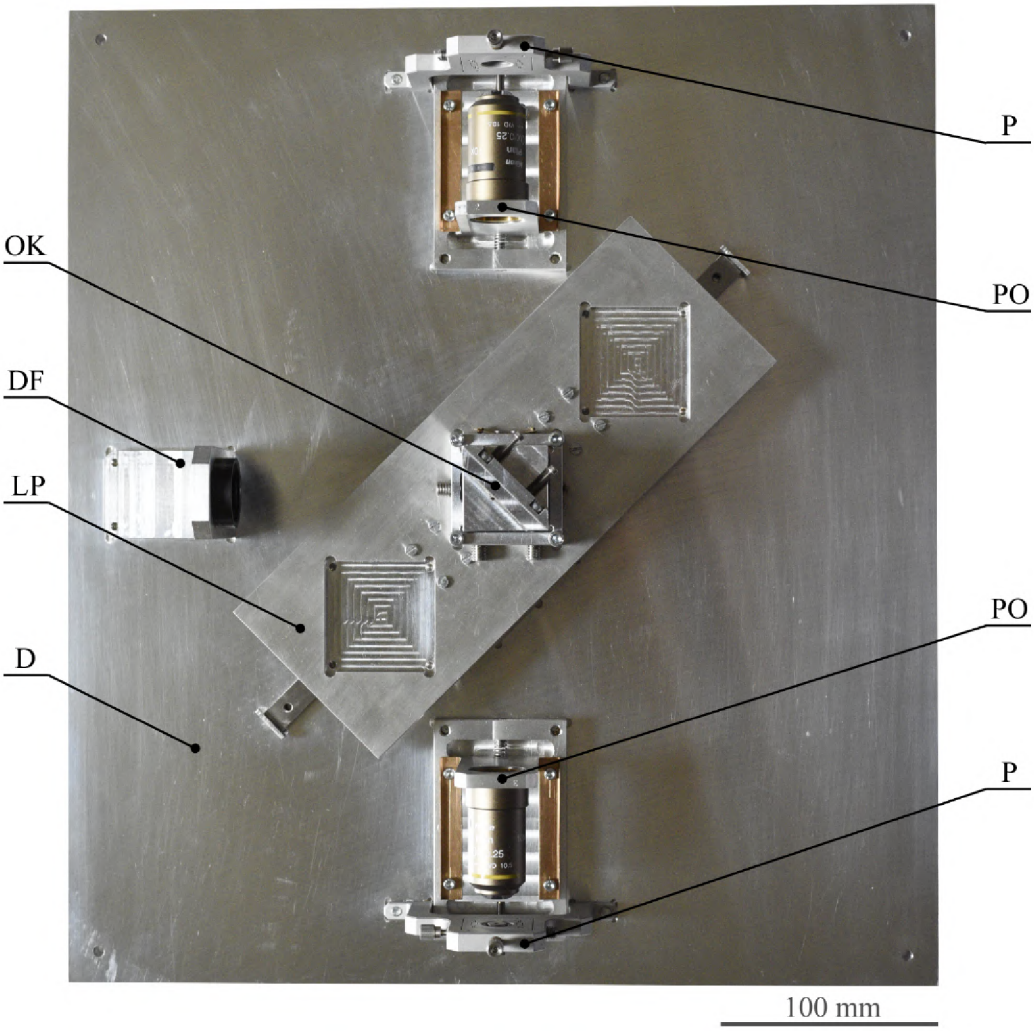
Obrázek 5.9: Držák filtrů DF s uchyceným ND filtrem NDF.

6. Sestavení a testování sestavy

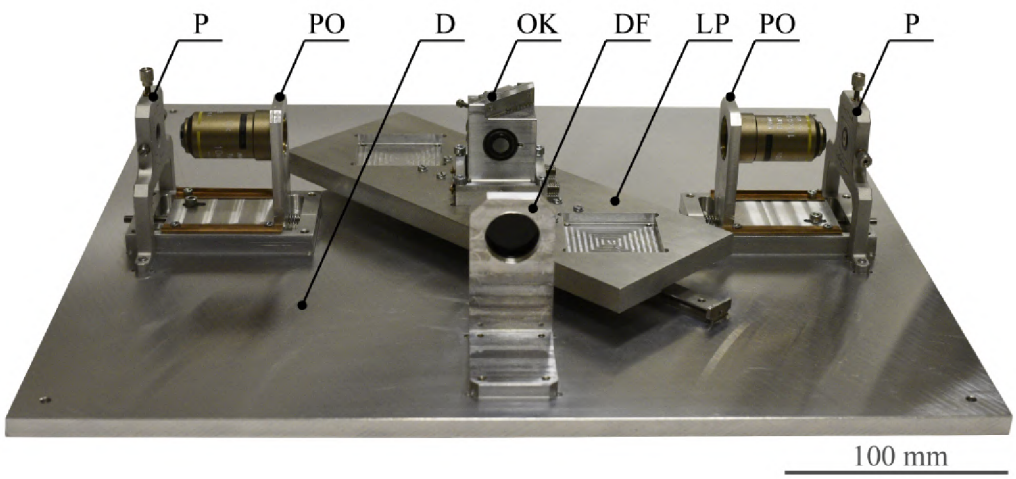
Po vyrobení navržených mechanických částí byla sestava smontována. Před testováním byla nejprve provedena justáž, při které byly optické prvky nastaveny do správných pozic dle optického návrhu. Tímto nastavením byla ověřena vhodnost návrhu jednotlivých justážních mechanismů, ve kterých jsou tyto optické členy uloženy. Justáží byla navržená sestava připravena k testování, které bylo realizováno měřením fotoluminiscence.

6.1. Sestavení

Na základě výrobní dokumentace mechanického řešení sestavy byly vyrobeny jednotlivé součásti, ze kterých byly nejprve sestaveny jednotlivé podsestavy. Následně byly tyto podsestavy přišroubovány k základní desce D sestavy. Celá složená sestava je zobrazena na obrázcích 6.1 a 6.2.



Obrázek 6.1: Vyrobená a smontovaná sestava - pohled shora. OK - optická kostka, DF - držák filtrů, LP - lineární posuv, D - základní deska, PO - posuv objektivu, P - paralelogram.

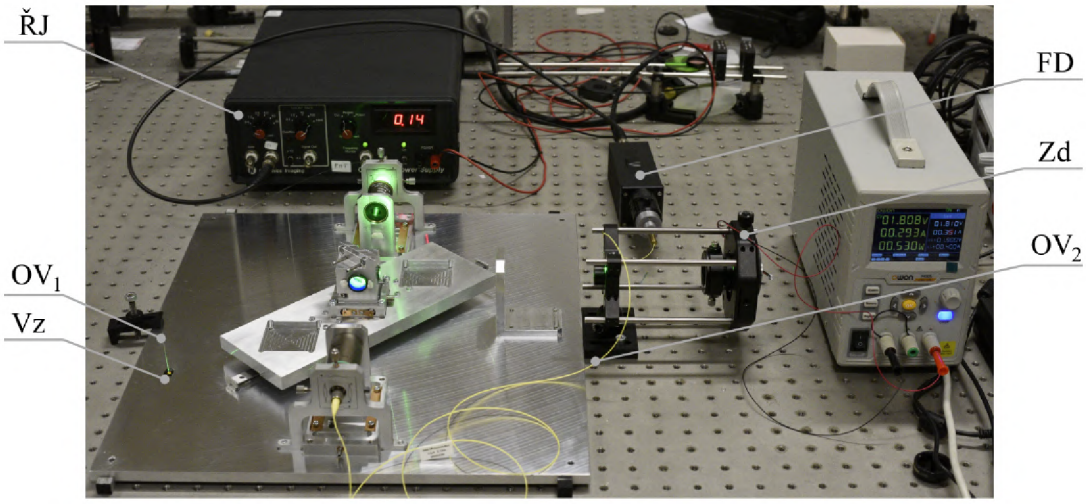


Obrázek 6.2: Vyrobená a smontovaná sestava - boční pohled. P - paralelogram, PO - posuv objektivu, D - základní deska, OK - optická kostka, DF - držák filtrů, LP - lineární posuv.

6.2. Justáž

Před otestováním sestavy bylo nejprve zapotřebí provést seřízení jednotlivých justážních mechanismů, ve kterých jsou uloženy optické prvky. Testování bylo realizováno měřením fotoluminiscence kvůli jednoduchosti provedení měření a také z důvodu, že pro měření pomocí Ramanovské spektroskopie nejsou zatím vyrobeny další potřebné komponenty. Proto bylo místo dichroického zrcadla Z v optické kostce OK použit deskový dělič svazku s poměrem reflexe ku transmisi 50/50 od firmy Edmund Optics s označením #45-316 [43]. Na pozici excitačního filtru ExF v optické kostce OK byl vložen úzkopásmový filtr pro vlnovou délku laseru 532 nm s označením FL05532-1 od firmy Thorlabs [38]. Taktéž byl z optické kostky OK vyndán emisní filtr EmF, aby bylo možné justovat i emisní část sestavy s laserovým zářením, které je intenzivnější než luminiscenční záření.

Nastavení sestavy a ověření funkčnosti navržených justážních mechanismů bylo provedeno na optickém stole viz. obrázek 6.3, kde byly k sestavě připojeny další komponenty potřebné pro provoz sestavy. Byl připojen laserový zdroj Zd o vlnové délce 532 nm a detektor s fotonásobičem FD (PMT, Photomultiplier tube) od firmy Perkin Elmer, model MP942 [44]. Fotonásobičový detektor FD byl připojen k řídící jednotce ŘJ od firmy Nanonics Imaging Ltd [45]. Pro vedení excitačního záření ke vzorku bylo použito vícevidové optické vlákno OV_1 s hodnotou numerické apertury $NA_{OV_1} = 0{,}22$ a s průměrem jádra 200 µm, které bylo dodáno firmou Thorlabs pod označením FG200LEA [38]. Druhé optické vlákno OV_2, které má vést sbírané záření k detektoru FD, bylo stejné jako v původním návrhu, tedy jednovidové optické vlákno OV_2 s označením S405XP s jádrem o průměru 3 µm a numerickou aperturou $NA_{OV_2} = 0{,}12$ od firmy Thorlabs [38]. Justáž takto zapojené sestavy byla realizována v několika krocích, které budou v následujících odstavcích probrány.



Obrázek 6.3: Sestava během testování. ŘJ - řídící jednotka detektoru, OV$_{1,2}$ - optická vlákna, Vz - vzorek, FD - fotonásobičový detektor, Zd - laserový zdroj.

Nejdříve byla seřízena výška laserového zdroje Zd tak, aby laserový paprsek dopadal přibližně do středu excitačního filtru ExF uloženého v optické kostce OK. Pro justáž i následné testování nebyl v sestavě použit žádný ND filtr NDF, aby do sestavy vstupovala co nejvyšší intenzita laserového záření.

Dalším krokem bylo nastavení děliče v optické kostce OK na přesně požadovaný úhel dopadu paprsků, a to na úhel 45°. K naklopení a seřízení polohy děliče slouží tříbodové kinematické uložení, ve kterém je dělič uchycen. Tento justážní mechanismus, který se nachází uvnitř optické kostky OK byl již představen v konstrukční části práce. Pro kontrolu správnosti nastavení úhlu děliče a dopadajícího laserového svazku bylo použito rovinné zrcadlo, které se upevnilo na jezdec J posuvu před objektiv OB$_1$. Vstupní laserové záření se tedy nejprve odrazilo od děliče v optické kostce OK směrem k objektivu OB$_1$, ale namísto, aby bylo objektivem OB$_1$ zfokusováno do optického vlákna OV$_1$, bylo rovinným zrcadlem odraženo zpět směrem do optické kostky OK, kde následoval jeho odraz na děliči zpět směrem k laserovému zdroji Zd. Pokud je dělič umístěn pod jiným úhlem než 45° vzhledem ke vstupujícímu laserovému paprsku nastane situace, kdy odražený svazek nesplývá se vstupujícím laserovým svazkem a je možné tento vychýlený svazek pozorovat v okolí apertury laserového zdroje Zd. Naopak při správné poloze děliče se odražený paprsek vrací přesně do místa odkud původně vycházel a tedy plně splývá se vstupujícím svazkem laseru. Nastavení požadované polohy děliče bylo provedeno pomocí justážních šroubů JŠ$_{1,2,3}$ tříbodového kinematického uložení. V průběhu justáže byla správnost nastavení děliče ověřována zastíněním poloviny vstupujícího svazku listem papíru a sledováním vzájemné vzdálenosti vstupujícího a odraženého laserového paprsku v rovině papíru. Na konci justáže se tyto dva laserové svazky překrývaly a lze tedy justážní mechanismus pro nastavení náklonu děliče (respektive dichroického zrcadla Z) realizovaný prostřednictvím tříbodového kinematického uložení považovat jako dostatečný a dobře navržený.

Po seřízení polohy děliče bylo potřeba laserové záření navázat do optického vlákna OV$_1$, které má toto laserové záření vést ke vzorku Vz. Toto navázání záření do optického vlákna OV$_1$ je realizováno pomocí objektivu OB$_1$, který je součástí podsestavy posuvu objektivu PO. Tento posuvný mechanismus PO umožňuje podélný posun objektivu OB$_1$. Druhým justážním mechanismem uplatňujícím se při navázání laserového záření do optického vlákna OV$_1$ je paralelogram P, který slouží k dvouosému nastavení polohy adaptéru

AOV s uchyceným optickým vláknem OV_1 a doplňuje tak justážní podélný pohyb objektivu OB_1. Kombinací těchto justážních pohybů se podařilo laserové záření navázat do optického vlákna OV_1, což se projevilo rozsvícením jeho druhého konce, na kterém vystupovalo navázané laserové záření. Justáž byla ukončena v okamžiku, kdy z druhého konce vlákna OV_1 vycházela nejvyšší možná intenzita světla. Tím byla plně najustována excitační optická dráha sestavy.

Přiložením konce optického vlákna OV_1 s navázaným zářením na rovinné zrcadlo bylo laserové záření od jeho povrchu odráženo a jeho část byla vláknem sbírána zpět. Díky odstranění emisního filtru EmF z optické kostky OK nebylo excitační záření blokováno a bylo sestavou vedeno až k druhému objektivu OB_2, kterým bylo toto záření zavedeno do optického vlákna OV_2. Toto druhé optické vlákno OV_2 bylo připojeno k detektoru s fotonásobičem FD. Na řídící jednotce detektoru ŘJ byl detekován signál ve formě počtu impulsů za sekundu. Právě detekcí tohoto signálu detektorem FD bylo ověřeno, že je sbírané záření navrženou sestavou skutečně vedeno, a že bylo úspěšně navázáno i do druhého optického vlákna OV_2, které jej vede na detektor FD. Při provádění justážních pohybů objektivu OB_2 a optického vlákna OV_2 bylo možné sledovat změny ve velikosti měřeného signálu. Justážní pohyby byly prováděny tak dlouho, dokud se jimi zvyšoval počet detekovaných impulsů za sekundu. Při nejvyšší hodnotě detekovaného signálu byla poloha objektivu OB_2 zajištěna pomocí aretačního šroubu AŠ. Tímto byla plně najustována emisní optická dráha sestavy.

Výše popsanými justážními kroky bylo ověřeno, že navržená sestava funguje a umožňuje vedení a sběr záření spolu s jeho zavedením do optických vláken $OV_{1,2}$. Taktéž bylo zjištěno, že navržené justážní mechanismy jsou dostatečné a lze pomocí nich dosáhnout správného fungování sestavy. Provedenou justáží byla tedy sestava připravena k testování.

6.3. Testování

Po provedení justáže sestavy, které byla popsána v předcházející části, bylo na sestavě uskutečněno měření fotoluminiscence monokrystalu $FAPbBr_3$ (Formamidinium Lead Bromide). K buzení fotoluminiscence monokrystalu sloužil opět laserový zdroj Zd o vlnové délce 532 nm a výkonu 0,53 W. Pro detekci fotoluminiscence byl při testování použit stejný fotonásobičový detektor FD i se stejnou řídící jednotkou ŘJ jako v případě justáže sestavy. Dle výrobce má detektor FD rozsah spektrální citlivosti 165 nm až 650 nm [44].

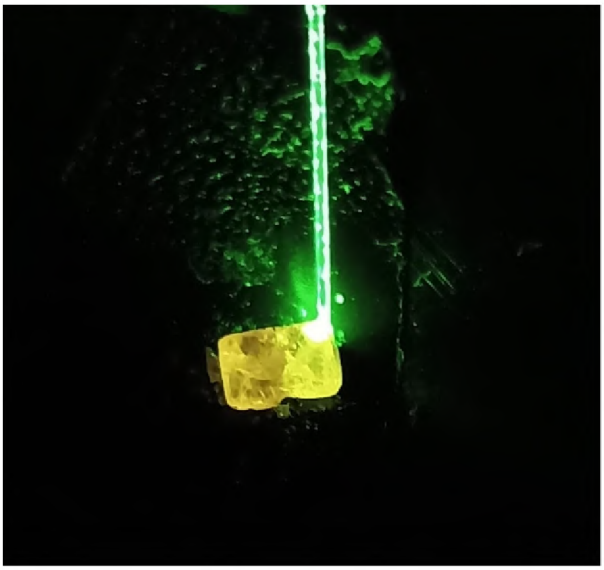
Pro měření byly v optického kostce OK vyměněny některé optické prvky. Namísto dichroického zrcadla Z se v optické kostce OK nacházel již zmíněný dělič svazků. Jako excitační filtr ExF byl použit stejný úzkopásmový filtr jako při justáži sestavy. Pro zamezení vstupu excitačního záření na detektor FD byly použity hned dva filtry. Jedním byl emisní filtr EmF typu horní propust z původní sady pro Ramanovskou spektroskopii s označením RET537lp od firmy Chroma Technology Corp [39] a byl umístěn v optické kostce OK. Druhým filtrem pro blokaci záření o excitační vlnové délce byl notch filtr od firmy Edmund Optics pod označením #86-120 [43] a byl umístěn přímo ve fotonásobičovém detektoru FD.

Také pro toto měření byla použita stejná optická vlákna $OV_{1,2}$, na kterých se prováděla justáž sestavy. Prvním optickým vláknem OV_1 bylo tedy vícevidové optické vlákno. Důvod použití vícevidového optického vlákna byl pro jeho větší průměr jádra, díky kterému optické vlákno vede více excitačního záření, které vyvolává silnější fotoluminiscenční jev.

Zároveň je větším jádrem vedeno i více fotoluminiscenčního záření, a proto použití tohoto typu optického vlákna zvyšuje hodnotu detekovaného signálu. Záření sbírané od vzorku Vz stejným optickým vláknem OV_1 bylo vedeno zpět do optické kostky OK, procházelo skrze dělič a emisní filtr EmF a bylo následně pomocí objektivu OB_2 zavedeno do již zmíněného jednovidového optického vlákna OV_2, které vedlo záření do fotonásobiče FD. Pro zavedení záření do toho optického vlákna OV_2 byl použit objektiv OB_2 Nikon Plan Fluorite se zvětšením 20x namísto původně plánovaného objektivu stejného typu o zvětšení 10x [40]. Objektiv se zvětšením 20x byl zvolen z důvodu vyšší hodnoty numerické apertury NA_{OB_2} (o hodnotě 0,5 namísto původní 0,3), která umožní zfokusovat záření do menšího bodu a lze tedy lépe navázat záření do jádra jednovidového optického vlákna OV_2, které má menší průměr jádra. Po změně objektivu OB_2 bylo nutné dojustovat jeho polohu vůči optickému vláknu OV_2.

Jako první bylo provedeno referenční měření, při kterém se optické vlákno OV_1 přivádějící excitační záření z laserového zdroje Zd přiložilo k povrchu zrcátka. Díky odrazivosti zrcátka se velká část excitačního záření navázala zpět do vlákna OV_1 a byla dále sestavou vedena k detektoru FD. Díky emisnímu filtru EmF v optické kostce OK a notch filtru ve fotonásobičovém detektoru FD byla excitační složka záření ze signálu kvalitně odfiltrována a detektorem FD bylo detekováno pouze 0,06×1000 impulsů za sekundu, tedy 0,06 kHz.

Při přiložení optického vlákna OV_1 s budícím záření na povrch vzorku Vz došlo k vzniku fotoluminiscenčního jevu, který se projevil okem pozorovatelným žlutooranžovým rozzářením monokrystalu. Toto fotoluminiscenční záření se podařilo během měření vyfotografovat a je zobrazeno na obrázku 6.4. Záření vznikající fotolumininiscencí vzorku Vz bylo spolu s excitačním zářením sestavou sbíráno a vedeno na detektor FD. V tomto případě bylo detekováno až 1,45×1000 impulsů za sekundu neboli 1,45 kHz. Tento detekovaný signál je mnohonásobně silnější než v předchozím případě. Proto lze usuzovat, že jak volba optických komponentů, tak i mechanický návrh celé sestavy byl zvolen správně a celá sestava je plně funkční a připravena pro budoucí experimenty s Ramanovskou spektroskopií.



Obrázek 6.4: Detail fotoluminiscence na monokrystalu $FAPbBr_3$.

Závěr

Cílem předložené diplomové práce na téma „Ramanovská sestava pro analýzu záření“ bylo vytvořit návrh specializované optické sestavy, která bude sloužit k zavádění laserového záření do optického vlákna a současně bude umožňovat analyzovat zpětně sbírané záření. Nejprve byl vytvořen optický návrh s výběrem vhodných optických prvků, které budou tuto sestavu tvořit. Vhodnost výběru optických členů byla ověřena optickou simulací, ve které bylo provedeno trasování světelného svazku těmito vybranými prvky. Pro uložení a justáž zvolených optických členů bylo na základně optické simulace vytvořeno konstrukční řešení sestavy. Dle vytvořené výkresové dokumentace byla sestava vyrobena a smontována. Následovala justáž, při které bylo ověřeno, že navržené justážní mechanismy adekvátně fungují a sestava zavádí laserové záření do vlákna a stejně tak zprostředkovává zpětný sběr záření, které je sestavou opět zavedeno do optického vlákna, které jej vede až k detektoru. Posledním krokem bylo testování vyrobené sestavy. Ačkoliv byla sestava primárně navrhována pro Ramanovskou spektroskopii, díky univerzálnosti vybraných optických členů tvořící optickou část sestavy a navrženému výměníku optických kostek v konstrukčním řešení lze sestavu použít i pro jiné spektroskopické metody. A právě měřením fotoluminiscence byla sestava otestována. V budoucnu bude sestava otestována i pomocí Ramanovské spektroskopie, pro kterou však v současné době nebyly vyrobeny další potřebné komponenty.

Jak již bylo řečeno v úvodu, navrhovaná sestava je součástí projektu, který je podpořen Technologickou agenturou České republiky (číslo projektu FW03010504 – Vývoj in-situ technik pro charakterizaci materiálů a nanostruktur / Development of in-situ techniques for characterization of materials and nanostructures). V tomto projektu je navrhovaná sestava klíčovým dílem, který slouží k zavádění laserového záření do optického vlákna, které jej vede do přetlakové komory, kde dochází k přepojení na další optické vlákno, jenž vede záření spolu s pracovním médiem ke vzorku. Stejnou optickou cestou, tedy přes obě zmíněná optická vlákna je záření vedeno zpět do sestavy, kde dochází k zavedení tohoto sbíraného záření do optického vlákna, které vede k detektoru. Pro plnohodnotné ověření funkčnosti a vhodnosti návrhu sestavy bude v budoucnu zapotřebí provést její testování ve spojení s ostatními částmi navrhovaného projektu a případně sestavu dále optimalizovat.

Literatura

[1] LEWIS, Ian R. a Howell G. M. EDWARDS. *Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line.* New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 0-8247-0557-2.

[2] SMITH, Ewen a Geoffrey DENT.*Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach.* Chichester: John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0-471-49668-5

[3] SPOUSTA J., ČERNEK O., DOSTÁL Z., PAVERA M., ŠIKOLA T., Multifunkční rastrovací sonda s dutým optickým vláknem, zaměstnanecký vynález ev. č. VUT 2012/718, 2021

[4] GARDINER, Derek J. a Pierre R. GRAVES. *Practical Raman Spectroscopy.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. ISBN 978-3-540-50254-8.

[5] DUCHEYNE, Paul et al. *Comprehensive Biomaterials II.* Volume 1. Metallic, ceramic, and polymeric biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-08-100691-7.

[6] COATES, John. *Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for Infrared and Raman Spectroscopy.* Applied Spectroscopy Reviews. Taylor & Francis, 1998, 33(4), 267-425. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704929808002060

[7] What is Raman spectrum? In: *Nanophoton* [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: https://www.nanophoton.net/lecture-room/raman-spectroscopy/lesson-1-1

[8] NĚMCOVÁ, Irena, Ludmila ČERMÁKOVÁ a Petr RYCHLOVSKÝ.*Spektrometrické analytické metody I.* 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.

[9] McCREERY, Richard L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis.* Chichester: John Wiley & Sons, 2000. ISBN 978-0-471-23187-5.

[10] VANDENABEELE, Peter. *Practical Raman Spectroscopy: An Introduction.* Chichester: John Wiley, 2013. ISBN 978-0-470-68319-4.

[11] LIN, Yu-Chung a Joseph V. SINFIELD. *Characterization of Raman Spectroscopy System Transfer Functions in Intensity, Wavelength, and Time.* Instruments. 2020, 4(3). Dostupné z: doi:10.3390/instruments4030022

[12] FERRARO, John R., Kazuo NAKAMOTO a Chris W. BROWN. *Introductory Raman spectroscopy.* 2nd ed. Boston: Academic Press, 2003. ISBN 978-0-12-254105-6.

[13] KUDELSKI, Andrzej. *Raman spectroscopy of surfaces,*. Surface Science. 2009, 603(10), 1328-1334. ISSN 0039-6028. Dostupné z: doi:10.1016/j.susc.2008.11.039

[14] KUDELSKI, Andrzej. *Analytical applications of Raman spectroscopy.* Talanta. 2008, 76(1), 1-8. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.02.04

[15] BAIA, Monica, Simion ASTILEAN a Traian ILIESCU. *Fundamentals of Infrared and Raman Spectroscopy, SERS, and Theoretical Simulations.* Raman and SERS Investigations of Pharmaceuticals. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, s. 9-35. ISBN 978-3-540-78283-4.

[16] GUERRINI, Luca a Duncan GRAHAM. *Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy applications.* Chem Soc Rev. The Royal Society of Chemistry, 2012, 41, 7085-7107. Dostupné z: doi:10.1039/c2cs35118h

[17] ZHANG, Zhenglong et al. *Tip-Enhanced Raman Spectroscopy.* Analytical Chemistry. 2016, 88(19), 9328−9346. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b02093

[18] YEO, Boon-Siang et al. *Tip-enhanced Raman Spectroscopy – Its status, challenges and future directions.* Chemical Physics Letters. 2009, 472, 1–13. Dostupné z: doi:10.1016/j.cplett.2009.02.023

[19] Nanoscale Analysis. *ETH Zürich* [online]. © 2021 [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: https://zenobi.ethz.ch/research/nanoscale-analysis.html

[20] CIALLA, Dana et al. *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends.* Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012, 403, 27–54. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5631-x

[21] CHEN, Shuo et al. *Recovery of Raman spectra with low signal-tonoise ratio using Wiener estimation.* Optics EXPRESS. OSA, 2014, 22(10), 12102-12114. Dostupné z: doi:10.1364/OE.22.012102

[22] FAN, X.G.et al. *A reconstruction algorithm based on sparse representation for Raman signal processing under high background noise.* Journal of Instrumentation. IOP Publishing, 2016, 11(02). Dostupné z: doi:10.1088/1748-0221/11/02/P02002

[23] ZHAO, X.Y. et al. *Denoising method for Raman spectra with low signal-to-noise ratio based on feature extraction.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2021, 250. ISSN 1386-1425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2020.119374

[24] RAMOS, Pablo Manuel a Itziar RUISANCHEZ. *Noise and background removal in Raman spectra of ancient pigments using wavelet transform.* Journal of Raman Spectroscopy. 2005, 36, 848–856. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.1370

[25] NOVÁK, Lukáš. *Metoda citlivé optoelektronické detekce a její aplikace.* Praha, 2013. Disertační práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta elektrotechnická, Katedra telekomunikační techniky.

[26] ZURICH INSTRUMENTS. *Raman Spectroscopy* [online]. Zurich [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: https://www.zhinst.com/europe/en/applications/optics-photonics/raman-spectroscopy

[27] LIBBRECHT, K. G., E. D. BLACK a C. M. HIRATA. *A basic lock-in amplifier experiment for the undergraduate laboratory.* American Journal of Physics. 2003, 71(11), 1208-1213. Dostupné z: doi:10.1119/1.1579497

[28] BURDETT, Richard. *Amplitude Modulated Signals: The Lock-in Amplifier*. Handbook of Measuring System Design. 2005, 1197-1208. ISSN 0-470-02143-8. Dostupné z: doi:10.1002/0471497398.mm588

[29] Lock-in amplifier. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-5-14]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Lock-in_amplifier

[30] Holmarc [online]. ©2020 [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: https://www.holmarc.com

[31] BAEK, Seong-Joon et al. *A simple background elimination method for Raman spectra*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2009, 98(1), 24-30. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemolab.2009.04.007

[32] HU, Yaogai et al. *A background elimination method based on wavelet transform for Raman spectra*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2007, 85, 94-101. ISSN 0169-7439. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemolab.2006.05.004

[33] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-29919-X.

[34] WAYCHUNAS, Glenn A. *Luminescence Spectroscopy. Reviews in Mineralogy & Geochemistry*. 2014, 78(1), 175-217. Dostupné z: doi:10.2138/rmg.2014.78.5

[35] GAFT, Michael, Renata REISFELD a Gerard PANCZER. *Modern Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials*. Second edition. New York: Springer International Publishing, 2015. ISBN 978-3-319-24763-2.

[36] Excitační a emisní pásmo. *LabGuide – Průvodce laboratoří* [online]. © 2014 - 2019 [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: https://labguide.cz/fluorochromy/excitacni-a-emisni-pasmo/

[37] RONDA, Cornelis R. *Luminescence: From Theory to Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31402-7.

[38] Thorlabs, Inc [online]. 2016 [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: https://www.thorlabs.com/

[39] Chroma Technology Corporation [online]. ©2020 [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: https://www.chroma.com/

[40] Nikon Instruments Inc. [online]. © 2021 [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/

[41] MISUMI [online]. 2020 [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: https://uk.misumi-ec.com/

[42] SODEMANN-PRUŽINY.CZ [online]. © 2020 [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: https://www.sodemann-pruziny.cz/

[43] Edmund Optics Inc. [online]. ©2021 [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: https://www.edmundoptics.com/

[44] MP942 Datasheet - PerkinElmer Optoelectronics. *Alldatasheet* [online]. [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: https://html.alldatasheet.com/html-pdf/14914/PERKINELMER/MP942/604/1/MP942.html

[45] Nanonics Imaging Ltd [online]. [cit. 2021-5-20].
Dostupné z: https://www.nanonics.co.il/