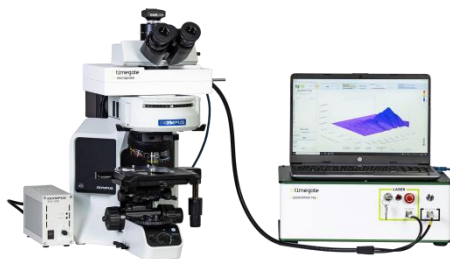




NICOLET CZ
MOLECULAR SPECTROSCOPY

Ramanova spektroskopie: Novinky a trendy

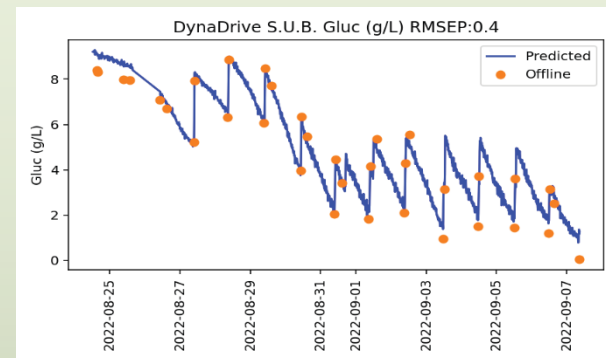
František Kesner





Ramanova spektroskopie - procesní analytická technika (PAT)

- výukové účely (střední a vysoké školy)
- akademická a vědecká pracoviště
- rutinní analytické laboratoře
- procesní analyzátory



Jakým způsobem můžeme vzorek analyzovat?

- **off-line** - manuální odběr vzorku s jeho následným transportem do laboratoře
- **at-line** - manuální odběr vzorku s jeho následným transportem k analyzátoru, který je v bezprostřední blízkosti odběrového místa
- **on-line** - analýza vzorku bez odběru vzorku přímo ve výrobním procesu, ale je realizováno pomocí nějaké smyčky nebo odbočky „by pass“ (důvodem mohou být např. extrémní fyzikální parametry vzorku: teplota, tlak,...)
- **in-line** - analýza vzorku bez odběru vzorku přímo v potrubí z jednoho nebo více míst

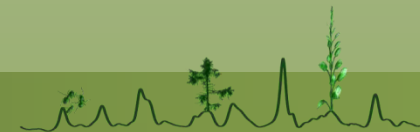
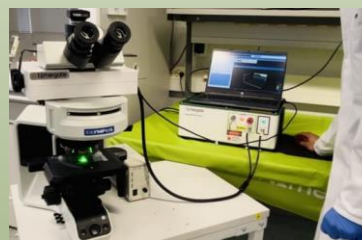
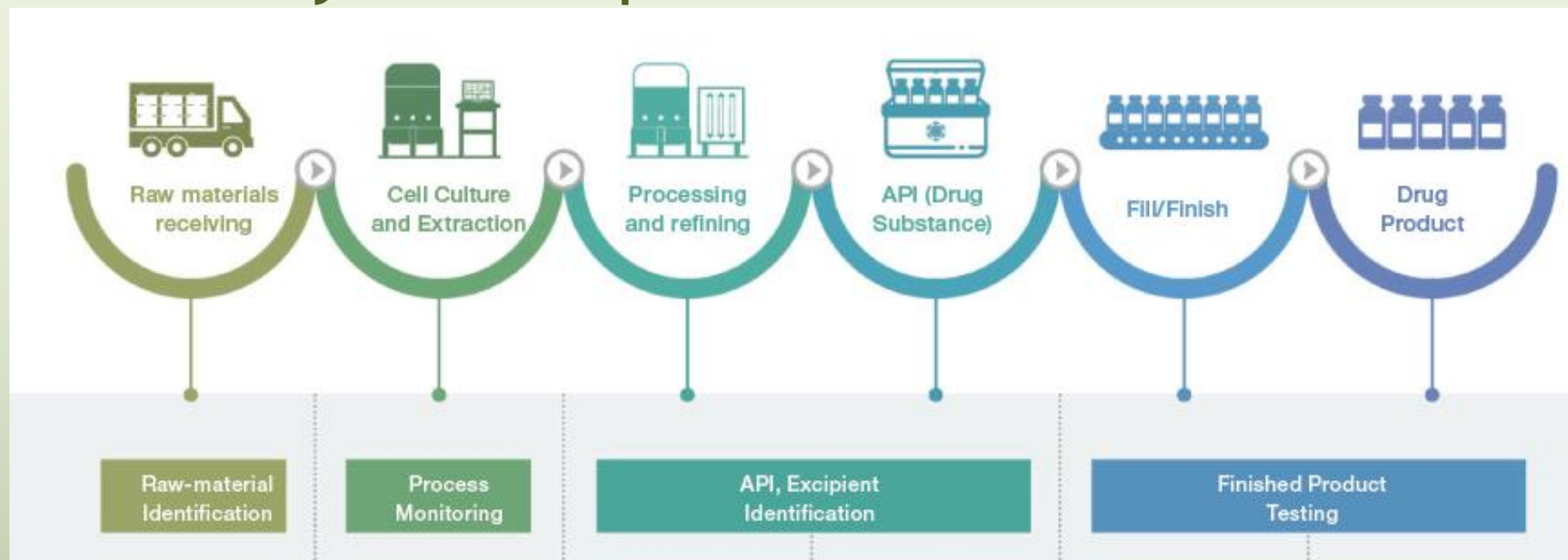


Schéma výrobního procesu - PAT

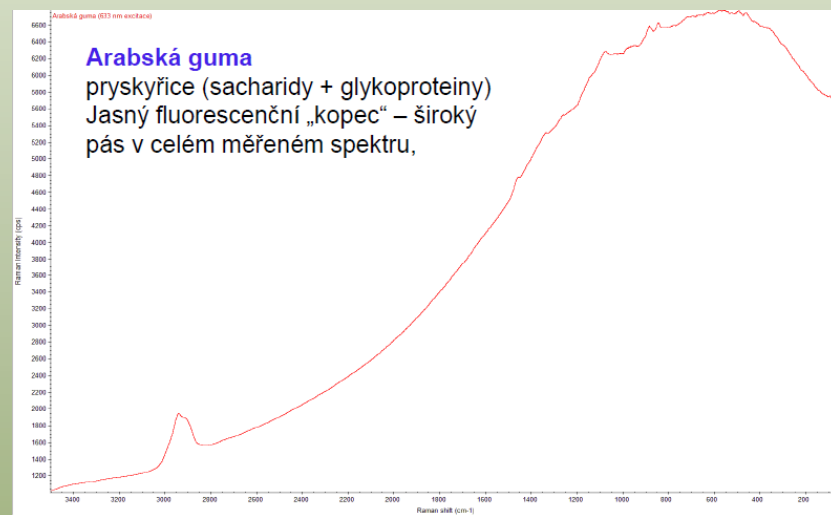
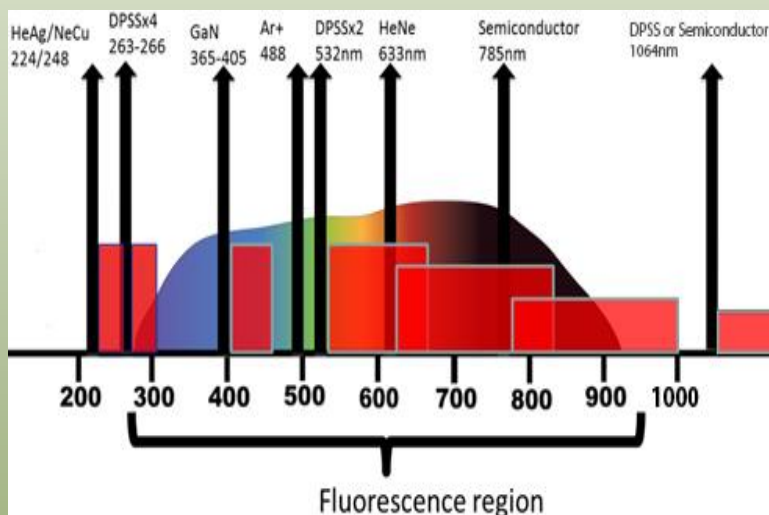




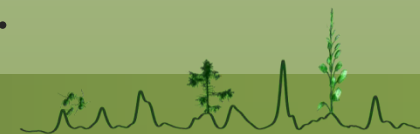
Fluorescence: nepřítel Ramanovy spektroskopie

Tento jev může zkomplikovat, i úplně znemožnit měření Ramanových spekter.

- dochází k ní zejména v případě excitace laser. zářením z NIR/VIS oblasti (cca. 300 - 900 nm)
- způsobena vlastním materiálem - tj. běžné proteiny, pigmenty, zbarvení vzorku nebo nízkými hladinami nečistot v materiálu (obtížně odstranitelné bez rozsáhlých kroků čištění)



Fluorescence má obvykle vyšší energii než Ramanovo záření, pásy jsou široké a můžou plně „zakrýt“ Ramanovo záření.



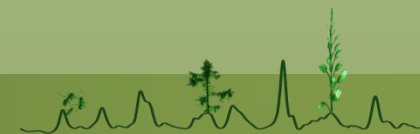


Technika měření, změna nastavení experimentu:

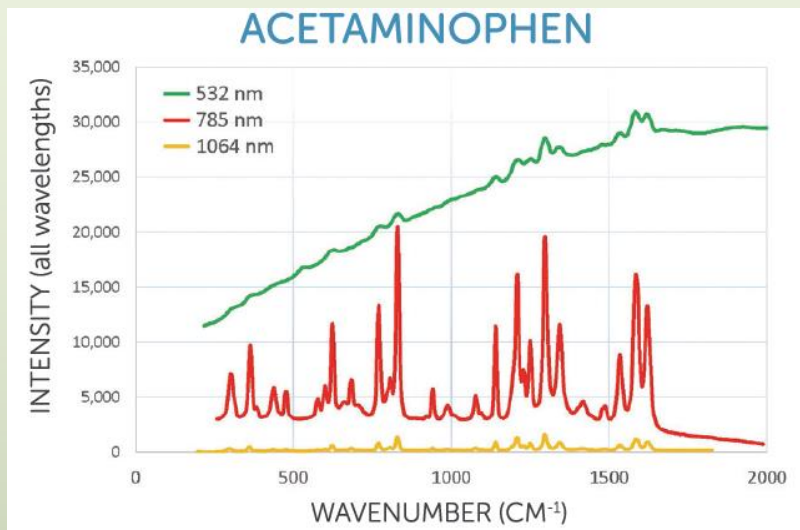
- reálné čištění vzorku nebo photo-bleaching
- změna vlnové délky excitačního laseru a jeho výkonu
- rotace vzorku nebo pohyb excitačního paprsku po vzorku (např. VDPS mód)
- fokusace resp. defokusace paprsku budícího laseru
- olejové objektivy u mikroskopů
- technika povrchově zesíleného Ramanova rozptylu (SERS)
- technika rezonanční Ramanovy spektroskopie
- technika časově rozlišené Ramanovy spektroskopie - velmi rychlé měření spekter **PŘED** vznikem fluorescence (Timegate)

Matematické postupy:

- korekce základní linie a další složité algoritmy k automatické korekci fluorescence (i během měření)
- odečítání fluorescence



Změna vlnové délky excitačního laseru



Vlnová délka
(intenzita v %)

532 nm (100 %)

633 nm (50 %)

785 nm (21 %)

840 nm (16 %)

1064 nm (6 %)

Fluorescence i
Ramanův signál
klesá

$$\text{Raman Scattering Intensity} = (1/\lambda^4)$$

Disperzní Ramanův mikroskop DXR3 Raman



- volitelné vlnové délky budících laserů
- konfokální měření

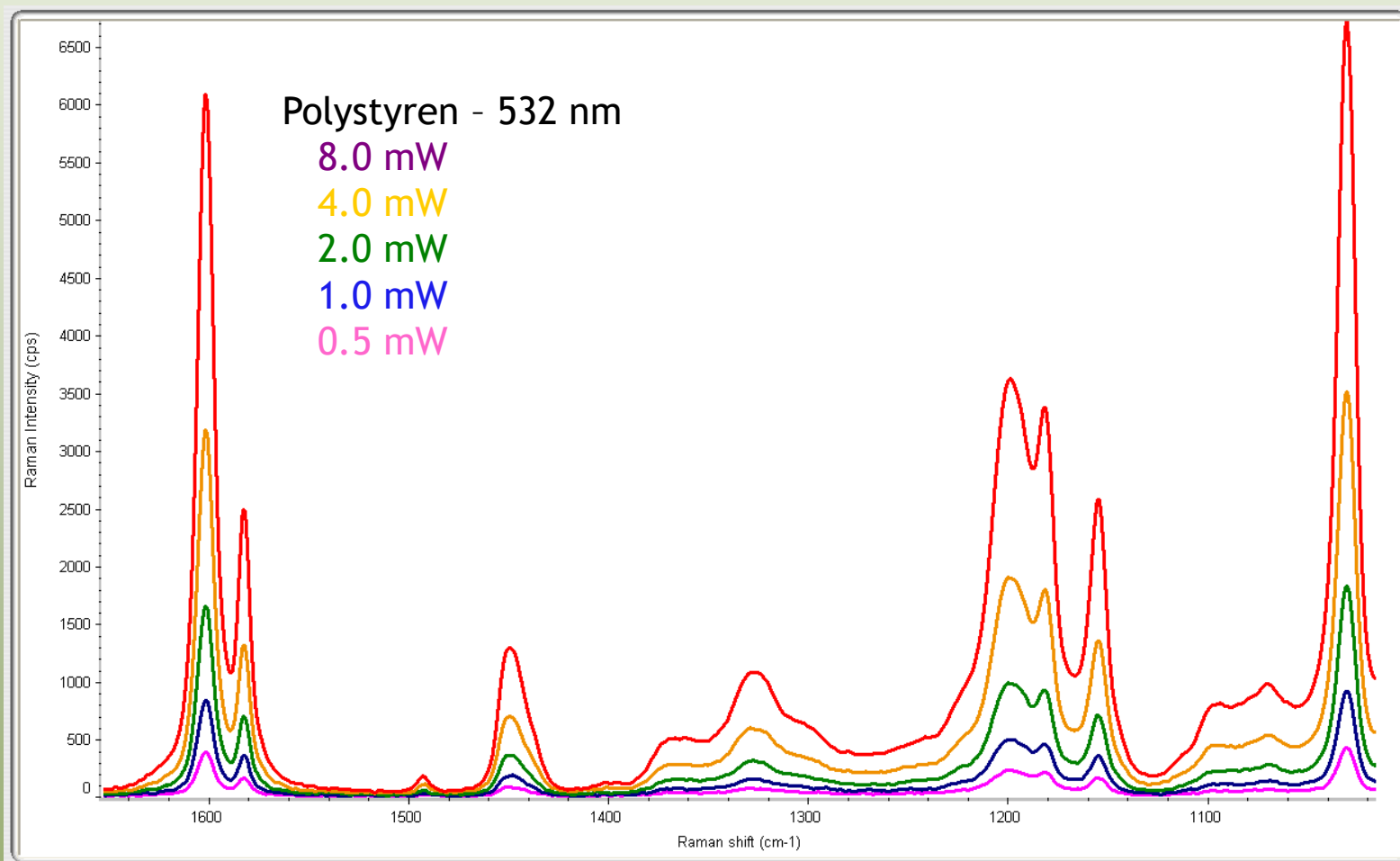
Procesní Ramanův spektrometr DXR3 Flex



- volitelné vlnové délky budících laserů
- integrace s dalšími analytickými metodami



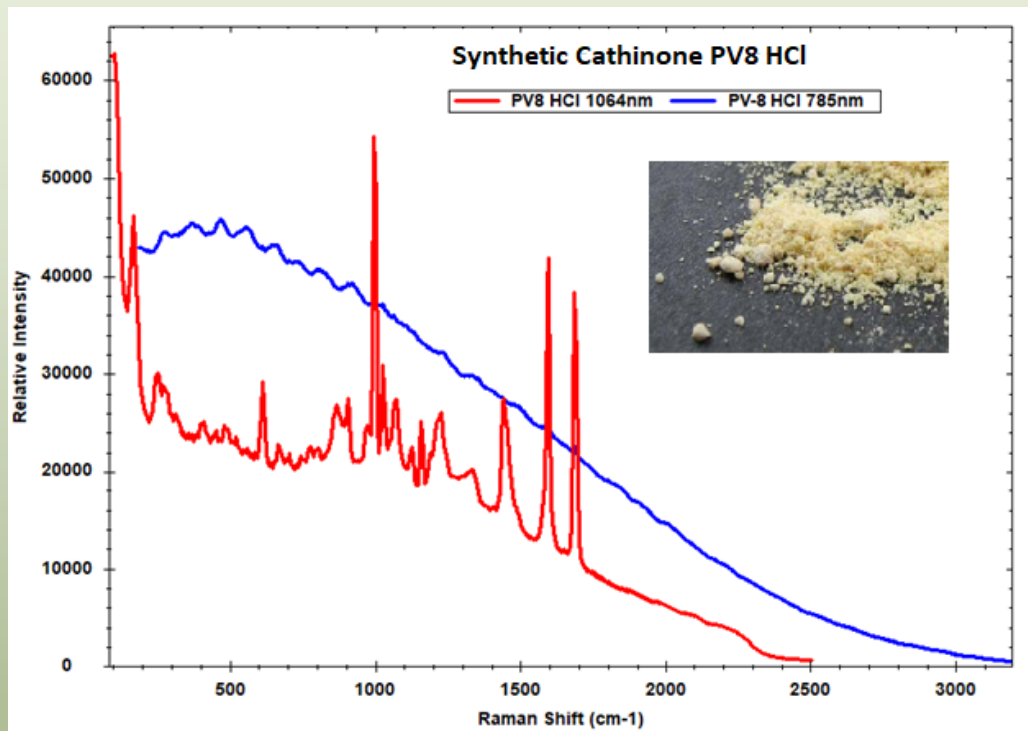
Výkon excitačního laseru versus intenzita Ramanova signálu





Změna vlnové délky excitačního laseru - příklad 1

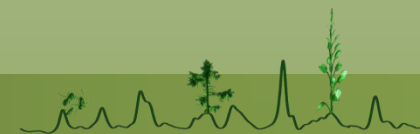
Syntetické kanabinoidy a katinony



FT-Raman
Nicolet iS50 + Raman modul

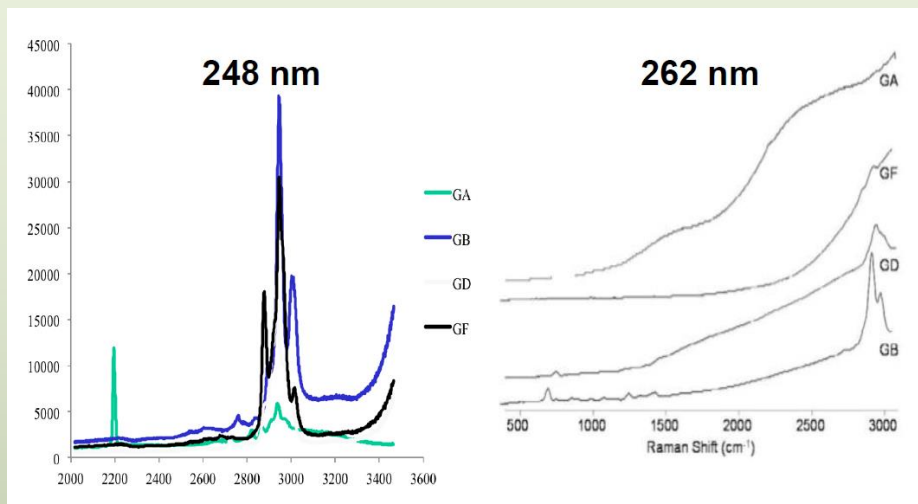


použitá vlnová délka budícího laseru **1064 nm**





Vlnová délka budícího laseru v hluboké UV oblasti - příklad 2



Příklad G Agents = nervové bojové otravné látky
GA - Tabun, GD - Soman, GB - Sarin a GF - Cyklosarin

přenosný **STANDOFF 200**



- použitá vlnová délka 248 nm hluboká UV excitace - mimo oblast fluorescence
- současné měření Ramanova i fluorescenčního spektra najednou v reálném čase
- okolní zářivky nebo slunce nemá vliv na kvalitu naměřených spekter



vědecké systémy **MonoVista, DuoVista, TriVista**

- volitelné budící lasery UV -VIS-NIR oblast - mimo oblast fluorescence
- vysoké rozlišení spekter
- Velmi široký spektrální rozsah spekter
- TERS, AFM- Raman mapování/imaging

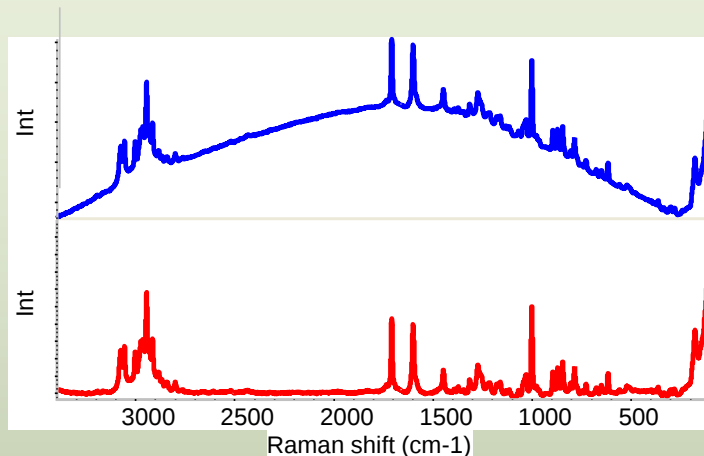




Jak omezit vliv fluorescence?

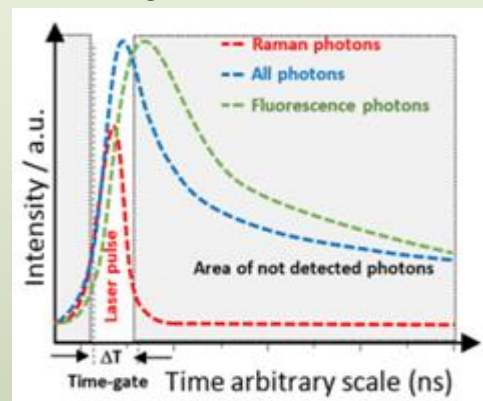
Matematicky

například odečtení základní linie



Časově rozlišená Ramanova spektroskopie

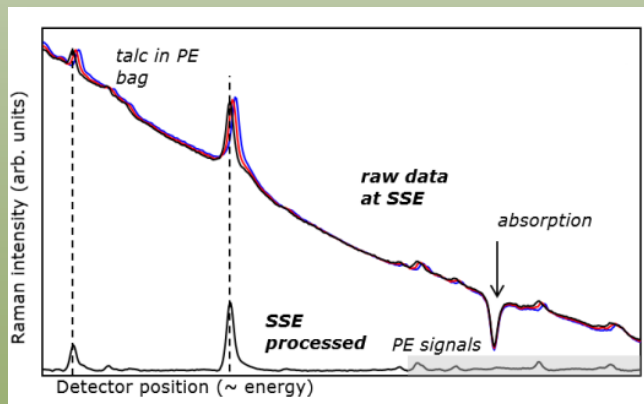
fluorescence je časově posunuta (opožděna) oproti Ramanu signálu



timegate

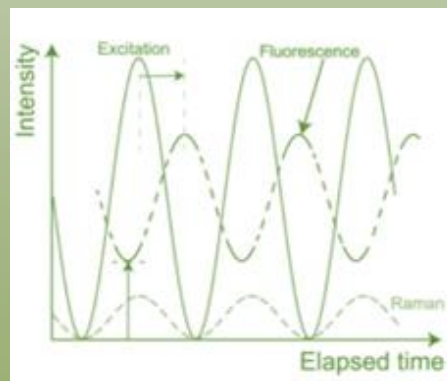
Sekvenčně posunutá excitace

algoritmus odstraňuje pohyblivou složku (Raman) od statické složky záření (fluorescence je nezávislá na excitační vlnové délce)



Změna frekvence excitačního laseru pomocí vložených modulátorů frekvence

akustooptický modulátor (AOM) nebo elektrooptický modulátor (EOM)

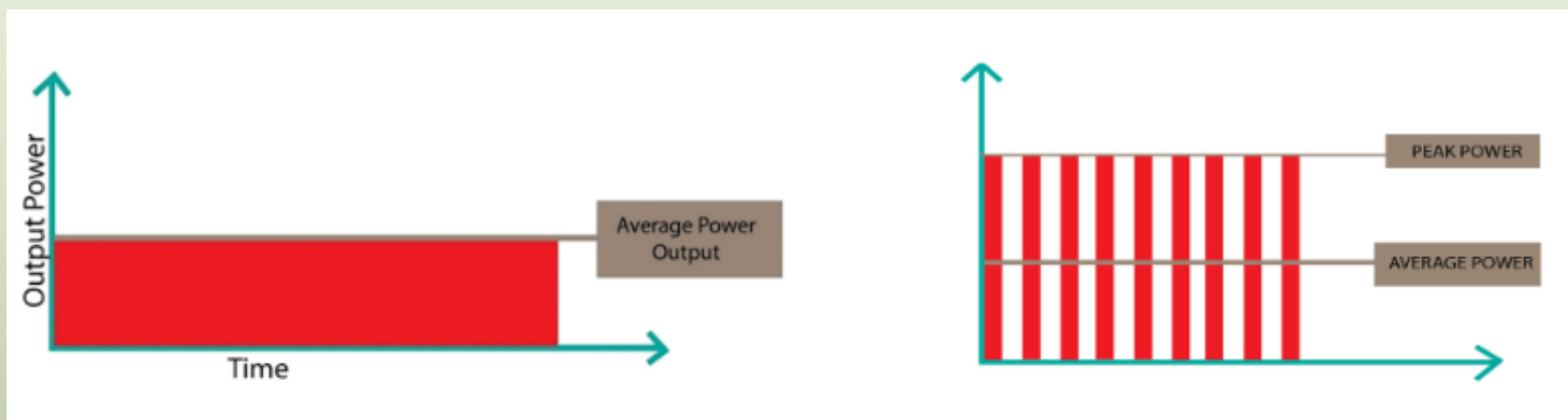


AOM - změna indexu lomu v krystalu změnou akustické vlny (akustická vlna indukuje periodickou změnu indexu lomu)
EOM - změna indexu lomu elektrooptického materiálu změnou elektrického pole

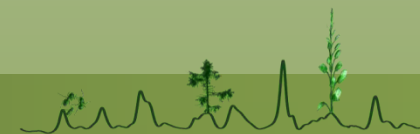




kontinuální vs. pulzní laser



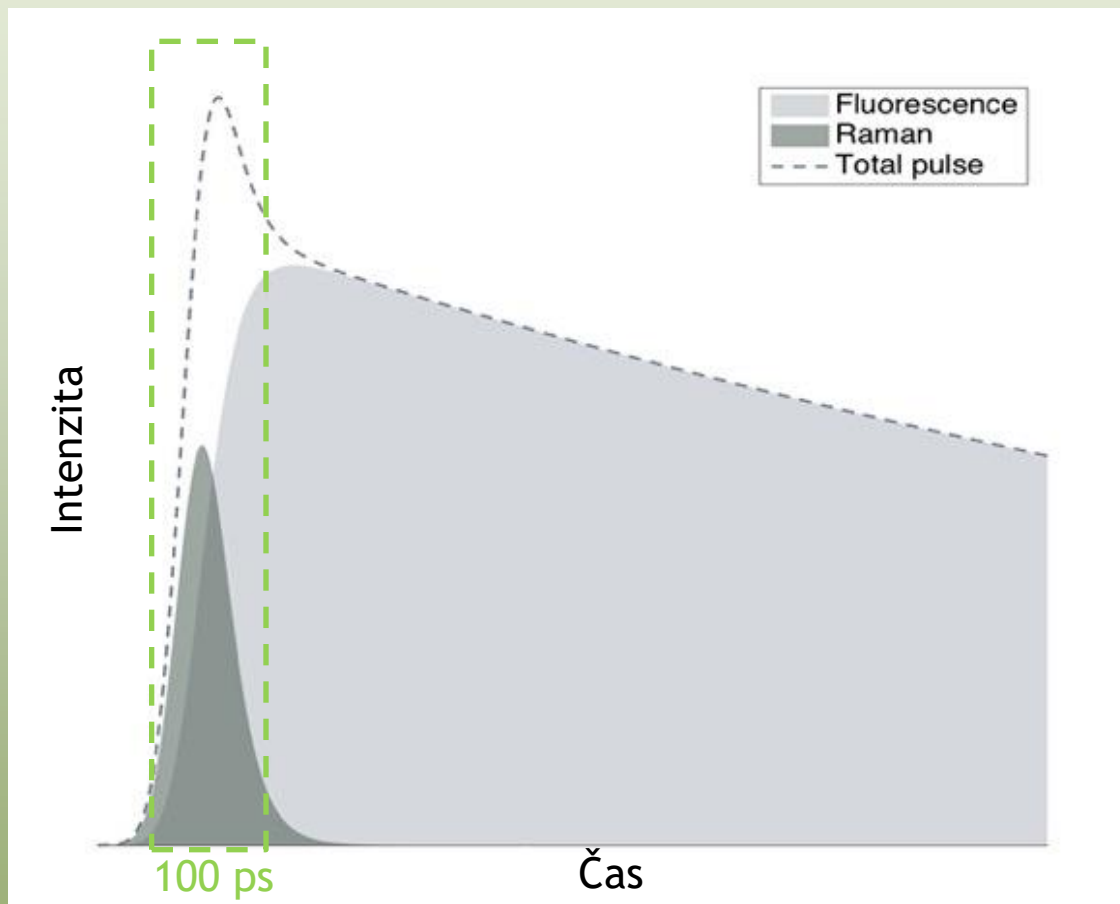
- principem časově rozlišené Ramanovy spektroskopie je excitace pulsním laserem a měření Ramanova spektra v krátkých pulzech (většinou v časech menších než 100ps), který využívá principu, že fluorescence je časově posunuta (opožděna) oproti Ramanovu signálu.
- pulzní laser - měření i ultrarychlých procesů (pikosekundy)
- vyšší výkon laseru + relaxace vzorku





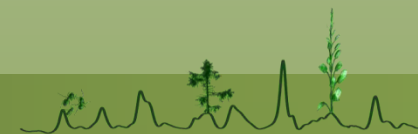
Časově rozlišená Ramanova spektroskopie

Patentovaná inovace, která z klasického Ramanova spektrometru dělá zcela nový typ přístroje.



- pulsní laser - 532 nm
- rychlá detekce založená na speciálním polovodičovém SPAD (Single Photon Avalanche Diode) detektoru

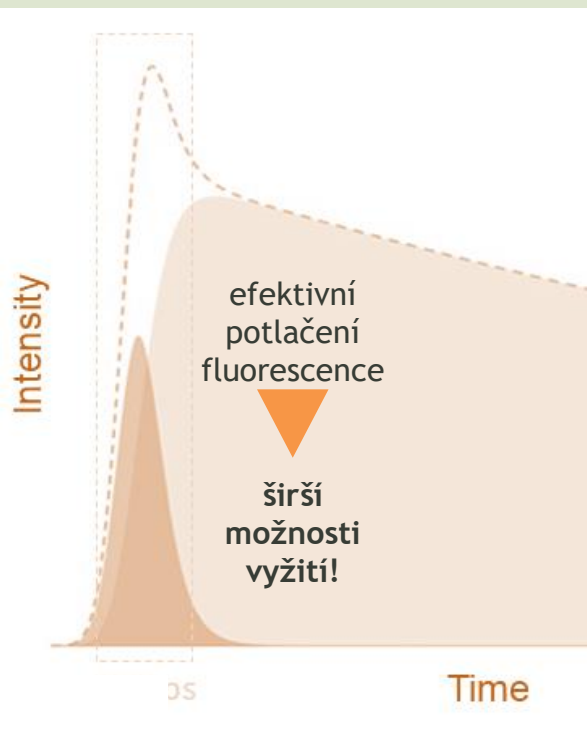
schopnost detekce jednotlivých (!) fotonů světla





Výhody technologie Time-gated

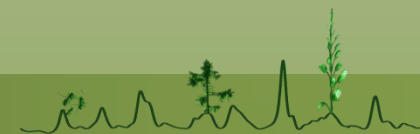
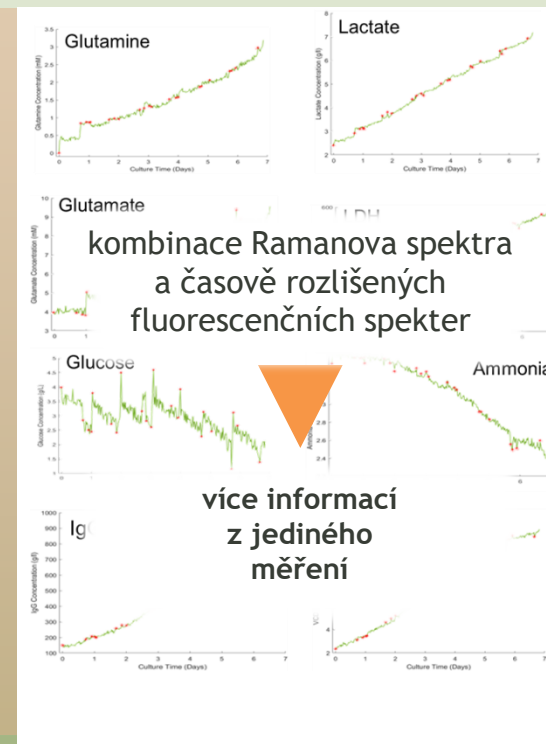
1



2



3





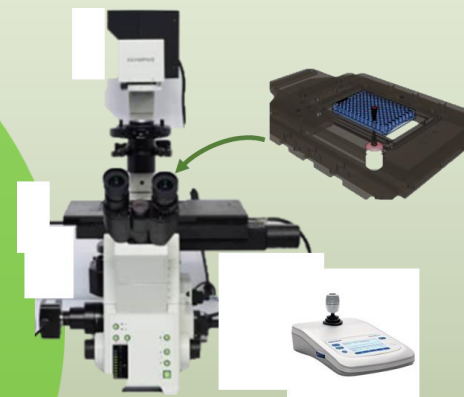
Timegate PicoRaman M3 využití v laboratoři

MICROPROBE měření mikroskopických vzorků v manuálním mikroskopu Olympus



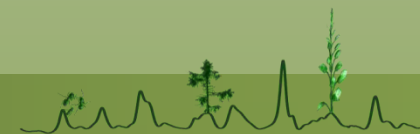
SAMPLECUBE

jednoduché měření
makrovzorků (možnost
rotace)



MICROPLATE HTS SYSTEM

pro automatická měření
mikrovzorků na 96 polohovém
držáku (96-well microplate)





Timegate PicoRaman M3 využití v procesním monitoringu

Imerzní sonda

ProbePro Mini s SCHOTT **shafts** -

- ViewPort® PG13.5 konektor
- ViewPort® Ingold konektor



Průtoková kyveta

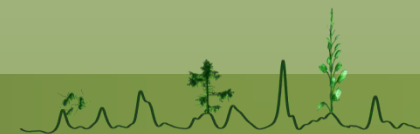
ProbePro Mini s SCHOTT ViewCell™



PICORAMAN M3

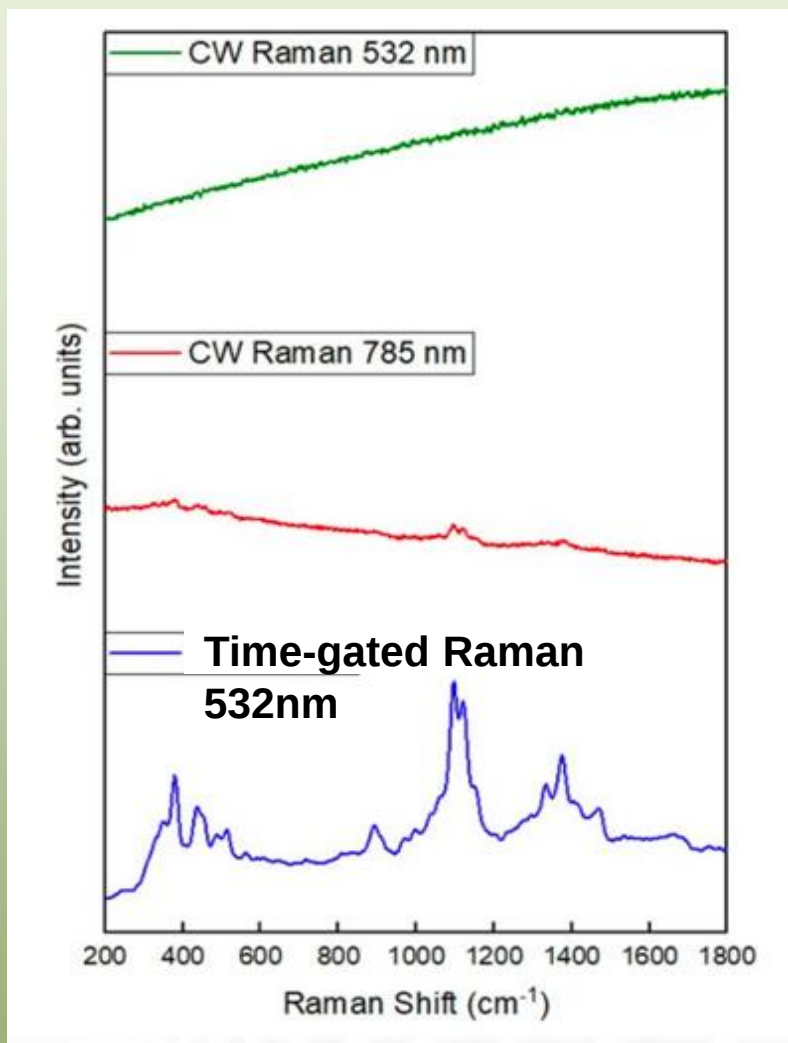


SINGLE-USE VIEWPORT®





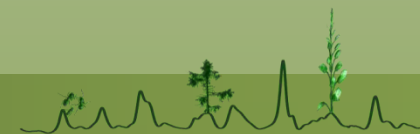
Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 3



spektrum **mikrokrystalické celulózy** měřené pomocí klasické Ramanovy spektroskopie s excitační vlnovou délkou 532 a 785 nm a pomocí časově rozlišené Ramanovy spektroskopie (Timegate).



Spektrometr PicoRaman M3 a sonda ProbePro

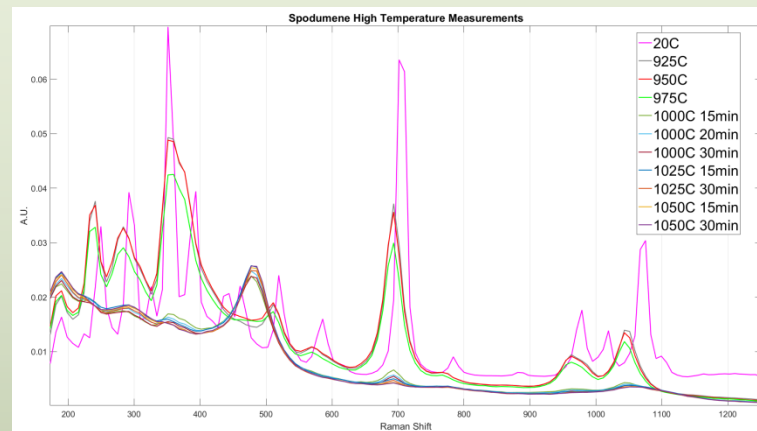
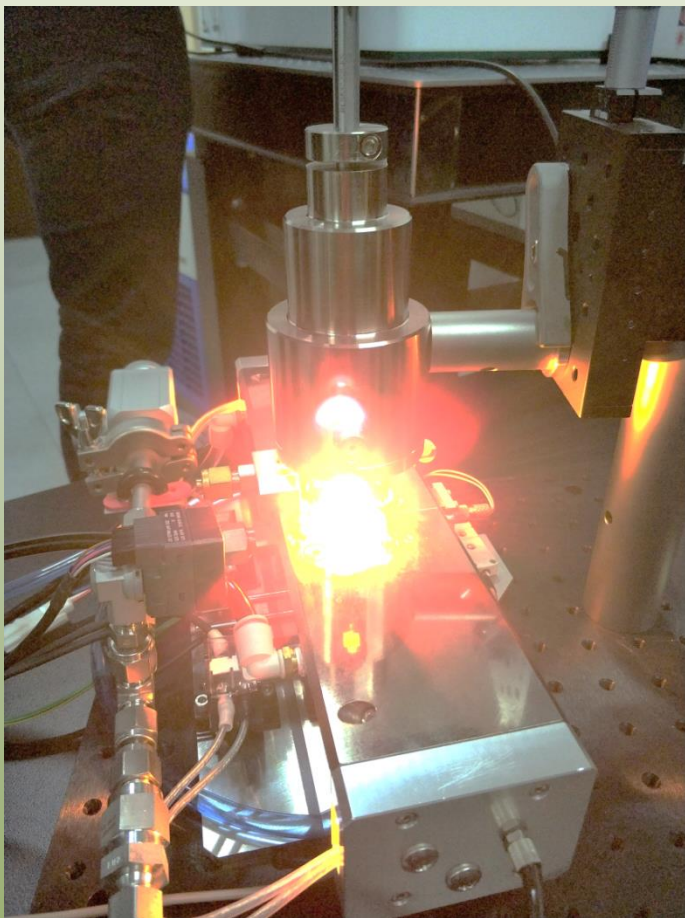




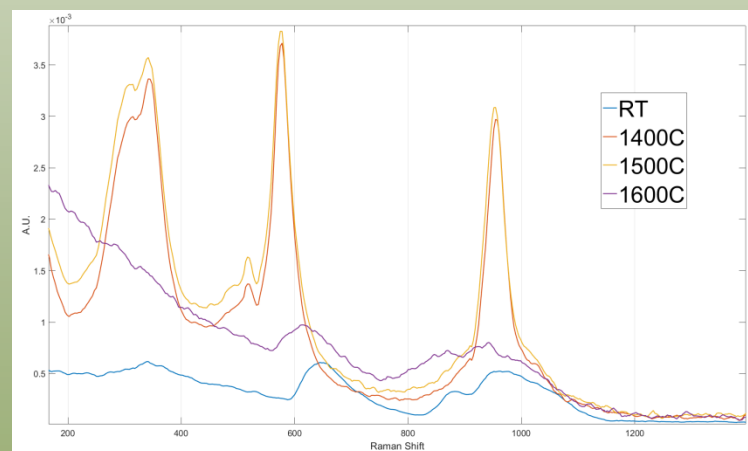
Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 4

Měření za vysokých teplot

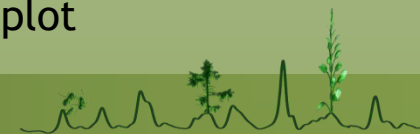
- zdroj lithia do autobaterií



Kalcinační proces spodumenu



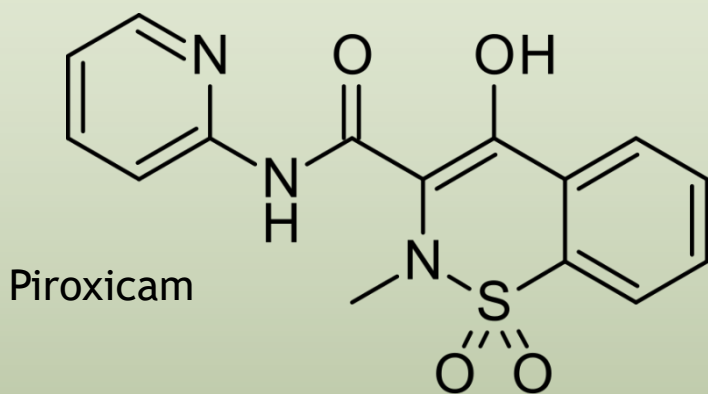
CaSiO₃ za různých teplot





Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 5

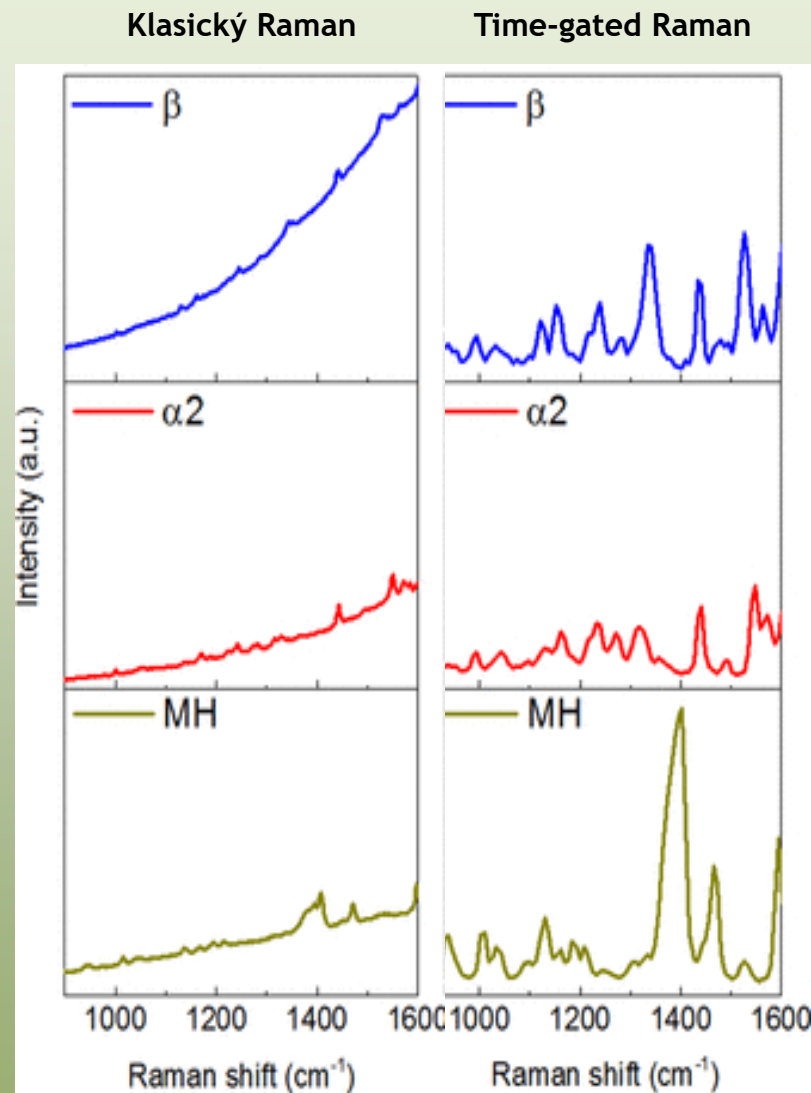
Farmacie



Piroxicam (PRX) je nesteroidní látka s protizánětlivými účinky, která se vyskytuje v polymorfech α a β a v hydratované formě (monohydrát, MH).

Anal. Chem. 2018, 90, 7, 4832-4839

Time-Gated Raman Spectroscopy for Quantitative Determination of Solid-State Forms of Fluorescent Pharmaceuticals



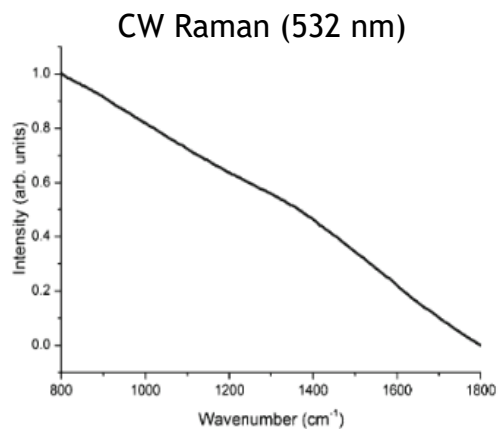
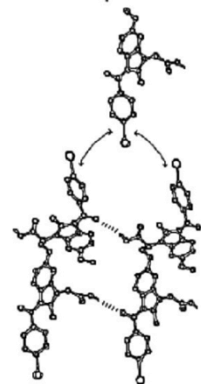


Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 6

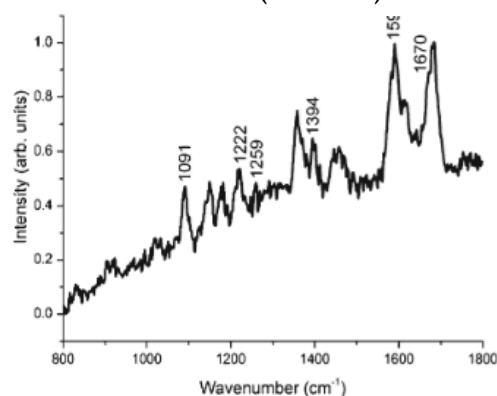
Amorfní forma

Indometacin - nesteroidní protizánětlivý lék

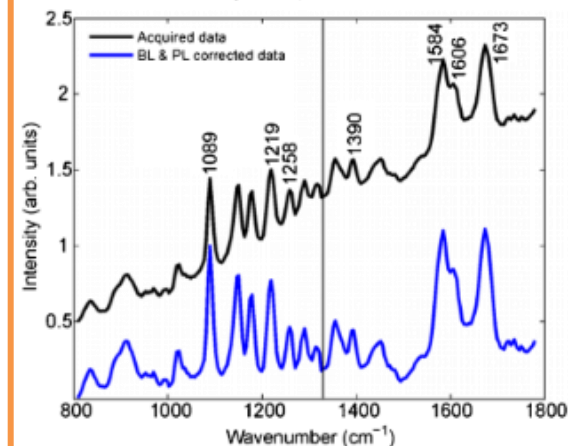
Amorphous



CW Raman (785 nm)

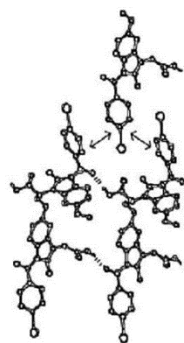


Time-gated Raman (532 nm)

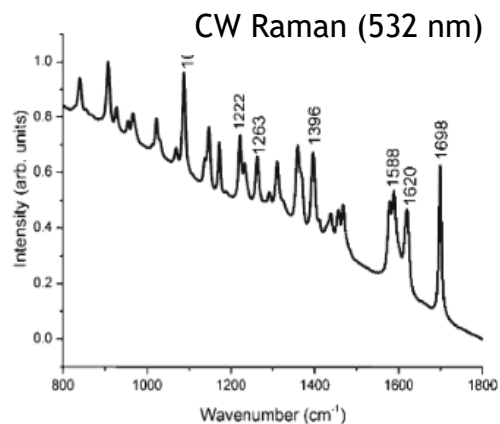


Krystalická forma

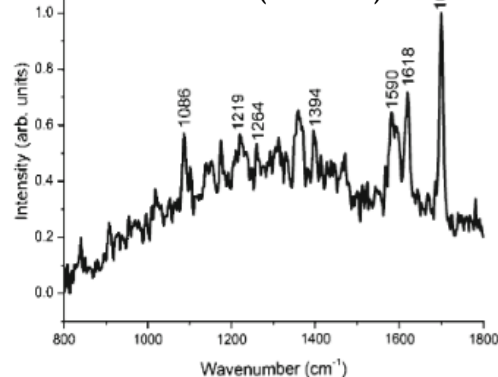
Form γ crystal



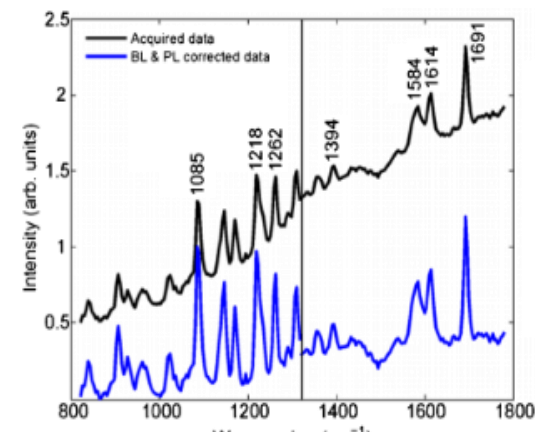
Loll P.J.: Acta Crystallogr



CW Raman (785 nm)



Time-gated Raman (532 nm)



Anal Bioanal Chem, 2016, 408, 761-774

Fluorescence-suppressed time-resolved Raman spectroscopy of pharmaceuticals using complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) single-photon avalanche diode (SPAD) detector

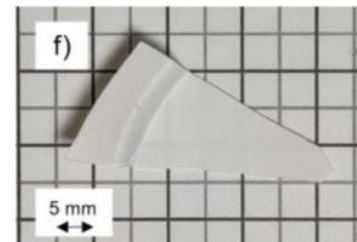
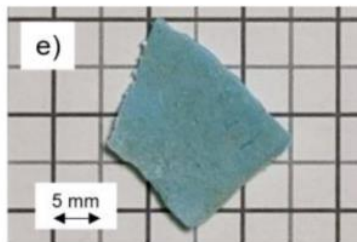
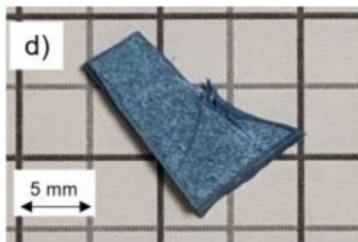
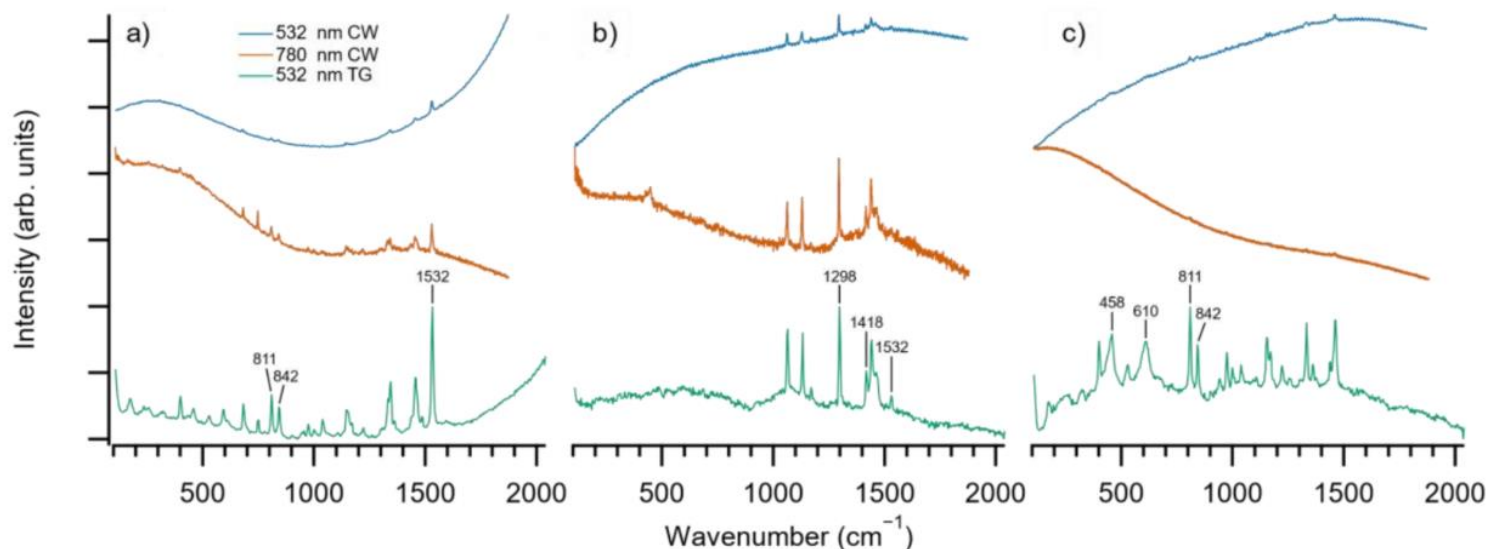




Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 7

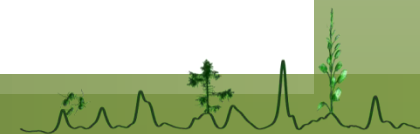
Analýza polymerů

Porovnání klasické Ramanovy spektroskopie (532 a 780 nm) a měření s Timegate



Mar. Pollut. Bull. 2022, 181, 113894

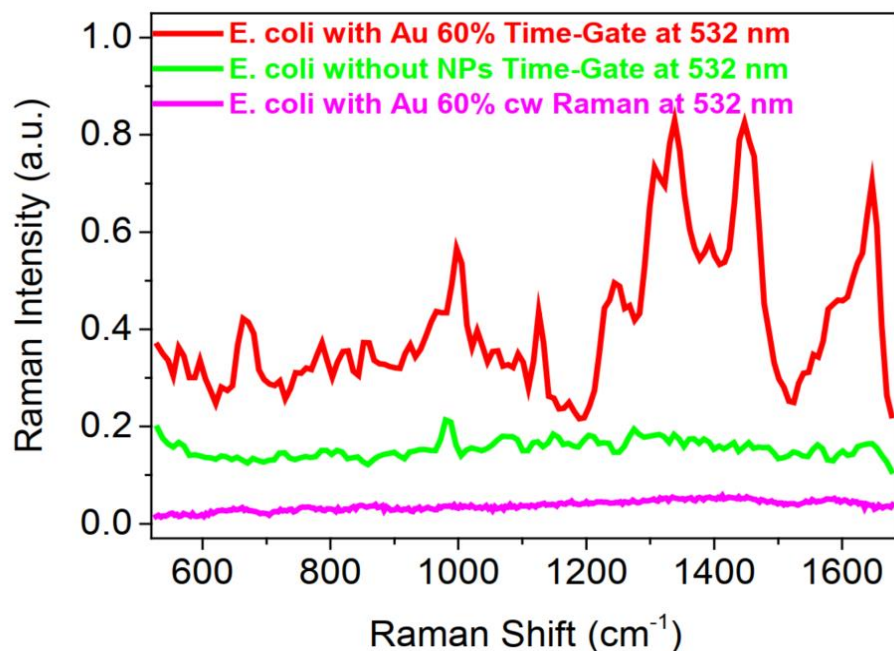
Time-gated Raman spectroscopy of recovered plastics





Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 8

SERS - povrchově zesílený Ramanův rozptyl



monitoring kultivace Escheria Coli
v bioreaktoru

- volná tekutina pod sedimentem (supernatant)
- identifikace bakterií
- analýza metabolitů

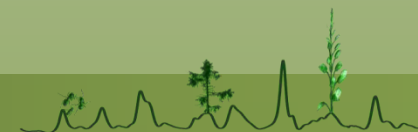
J. Biophotonics. 2018 Jul;11(7):e201700225

Bare laser-synthesized Au-based nanoparticles as nondisturbing surface-enhanced Raman scattering probes for bacteria identification

M. Kögler, 2018, Advanced Raman Spectroscopy for Bioprocess Monitoring, doct. diss., TU Berlin

Biotechnol Prog. 2018 Nov;34(6):1533-1542.

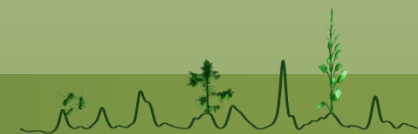
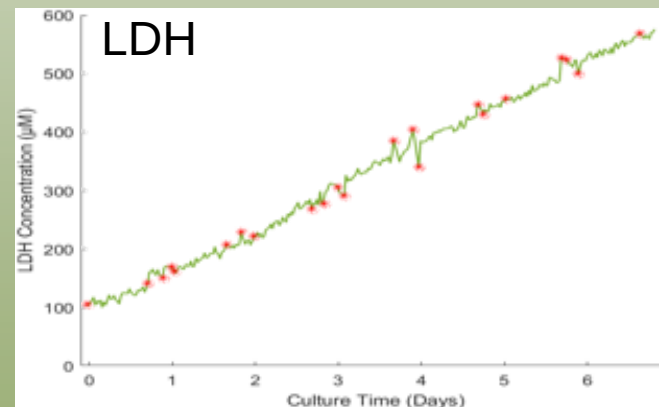
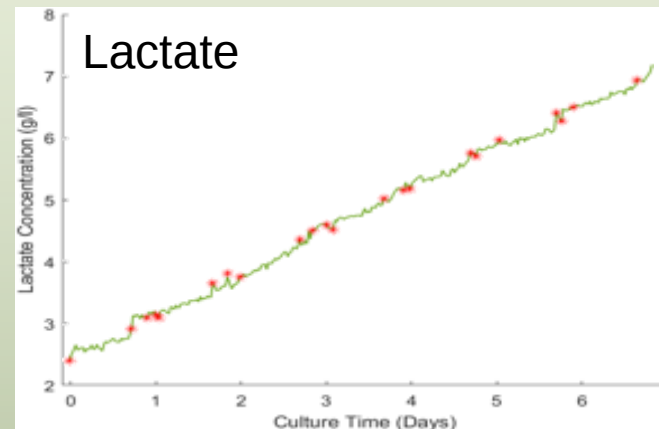
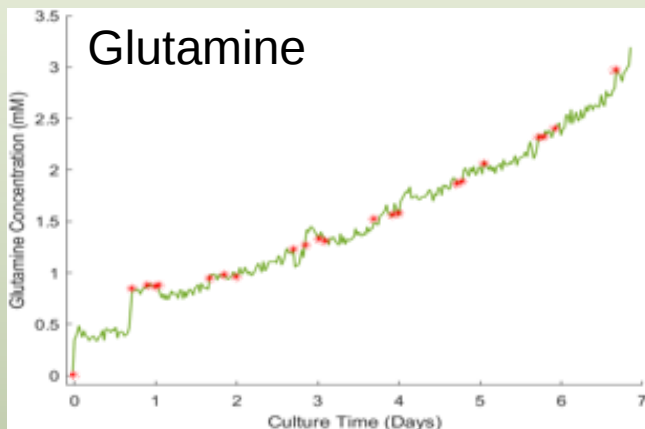
Comparison of time-gated surface-enhanced raman spectroscopy (TG-SERS) and classical SERS based monitoring of Escherichia coli cultivation samples





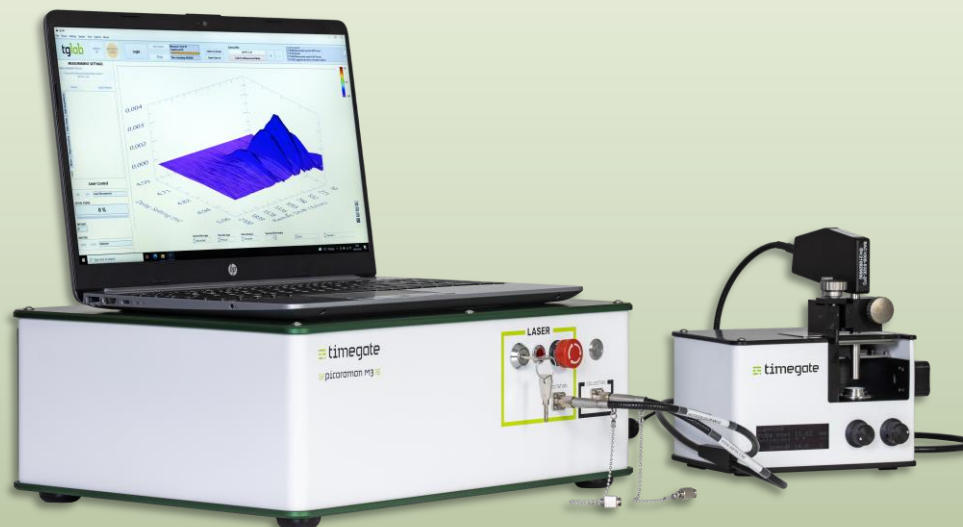
Časově rozlišená Ramanova spektroskopie - příklad 9

Online monitorování procesů - PAT

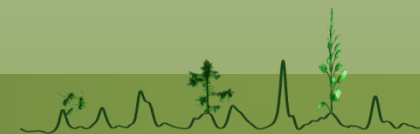




Co můžete vidět u nás na stánku B15



Ramanův spektrometr PicoRaman M3 s nástavcem SampleCube





Co můžete vidět u nás na stánku B15

Procesní analyzátor MarqMetrix® Ramina - All-In-One (AIO)

- s integrovaným počítačem
- přenosný v odolném přepravním kufříku
- po vybalení ihned připraven k měření
- řada dostupných sond včetně patentované sondy BallProbe® (-20 až 300°C, antikorozní)



MARQMETRIX®





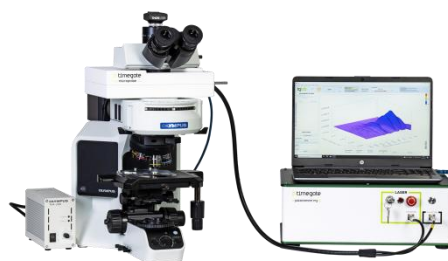
Thermo
SCIENTIFIC



 **timegate**



NICOLET CZ
MOLECULAR SPECTROSCOPY



Děkuji za pozornost

www.nicoletcz.cz