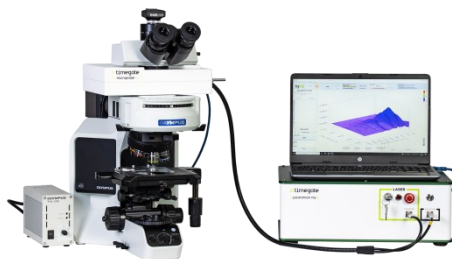




NICOLET CZ
MOLECULAR SPECTROSCOPY

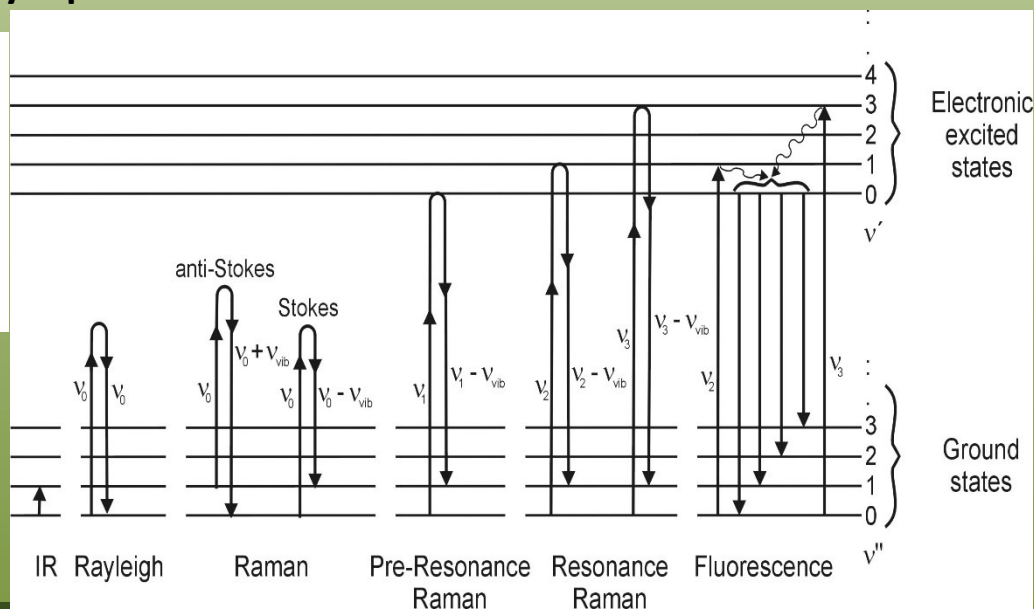
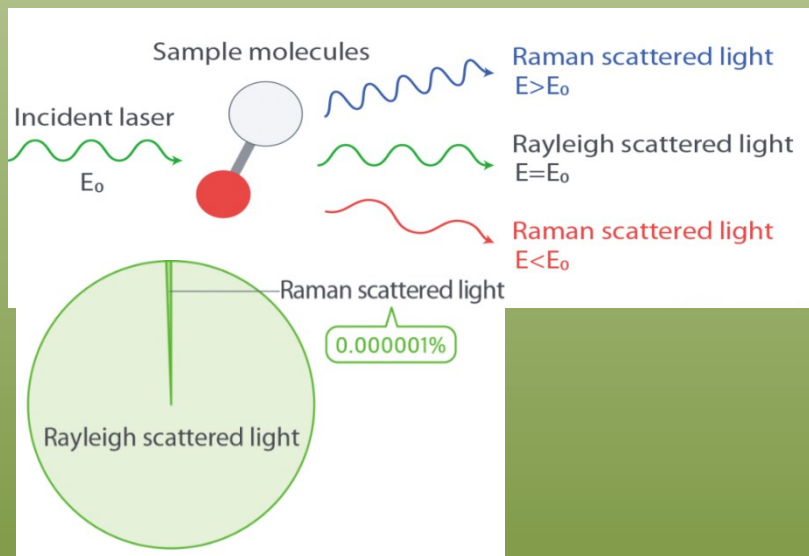
Analýza anorganických a organických látek pomocí Ramanovy spektroskopie s reálně potlačenou fluorescencí

František Kesner



Ramanova spektroskopie

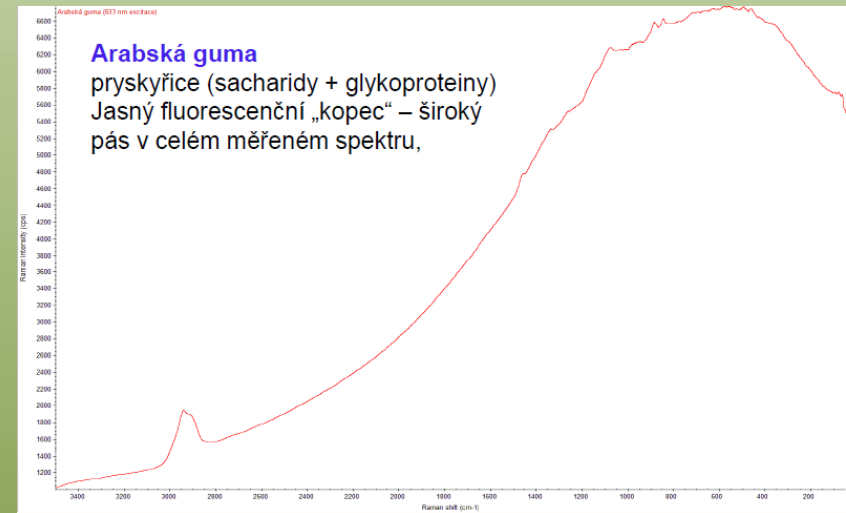
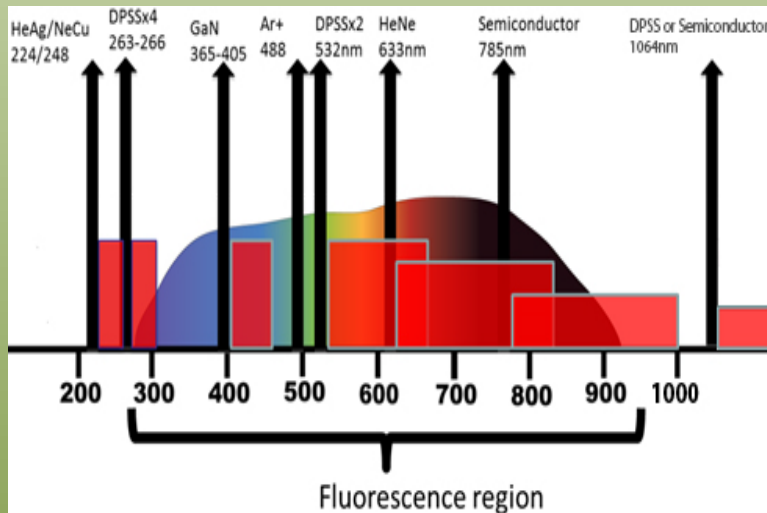
- Metoda analytické chemie využívající **Ramanova jevu – rozptyl záření** (interakce s látkou v jejím objemu)
- Intenzita rozptýleného světla molekulou je nepřímo úměrná čtvrté mocnině jeho vlnové délky
- Typy rozptylu: **ELASTICKÝ** (nedochází k výměně energie, frekvence záření se nemění) a **NEELASTICKÝ** (excitace, deexcitace molekuly – frekvence rozptýleného záření má nižší nebo vyšší frekvenci)
- Dominantní proces je Rayleighův rozptyl (=elastický), Ramanův rozptyl je extrémně slabý (Jen cca jeden foton z $10^6 - 10^8$ fotonů je Ramanovo záření)
- V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná **druhé mocnině polarizovatelnosti X** v IČ spektru je úměrná **druhé mocnině změny dipólového momentu**



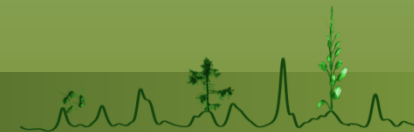
Fluorescence: nepřítel Ramanovy spektroskopie

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 – 900nm)
- 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.**

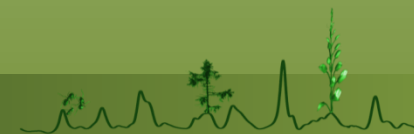


Technika měření, změna nastavení experimentu:

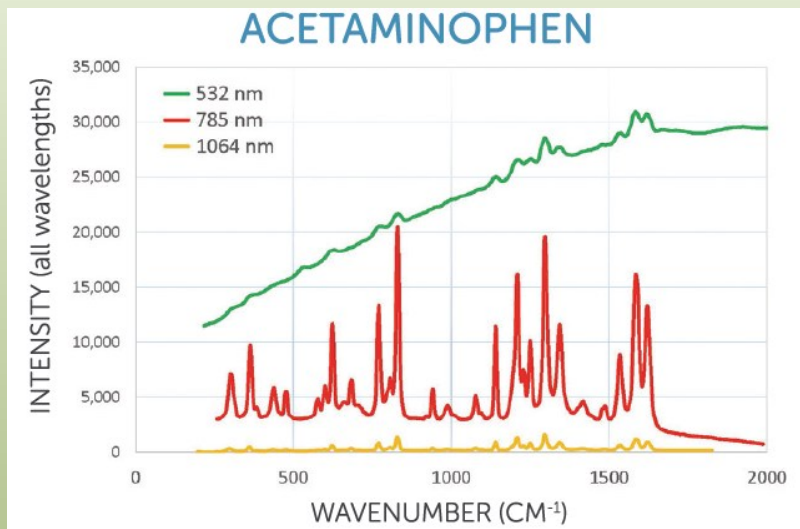
- Změna excitačního laseru a jeho výkonu (popř. i změna mřížky)
- Photo-bleaching vzorku
- Využití konfokality spektrometrů
- VDPS mód měření vzorku spektrometrem
- Úprava vzorku (čištění)
- Olejové objektivy u mikroskopů
- Techniky SERS, SSERS
- Technika Rezonanční Ramanovy spektroskopie
- Technika 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



Jak omezit vliv fluorescence? - změna 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

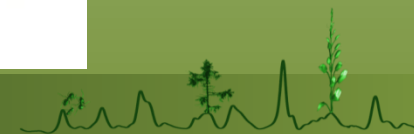


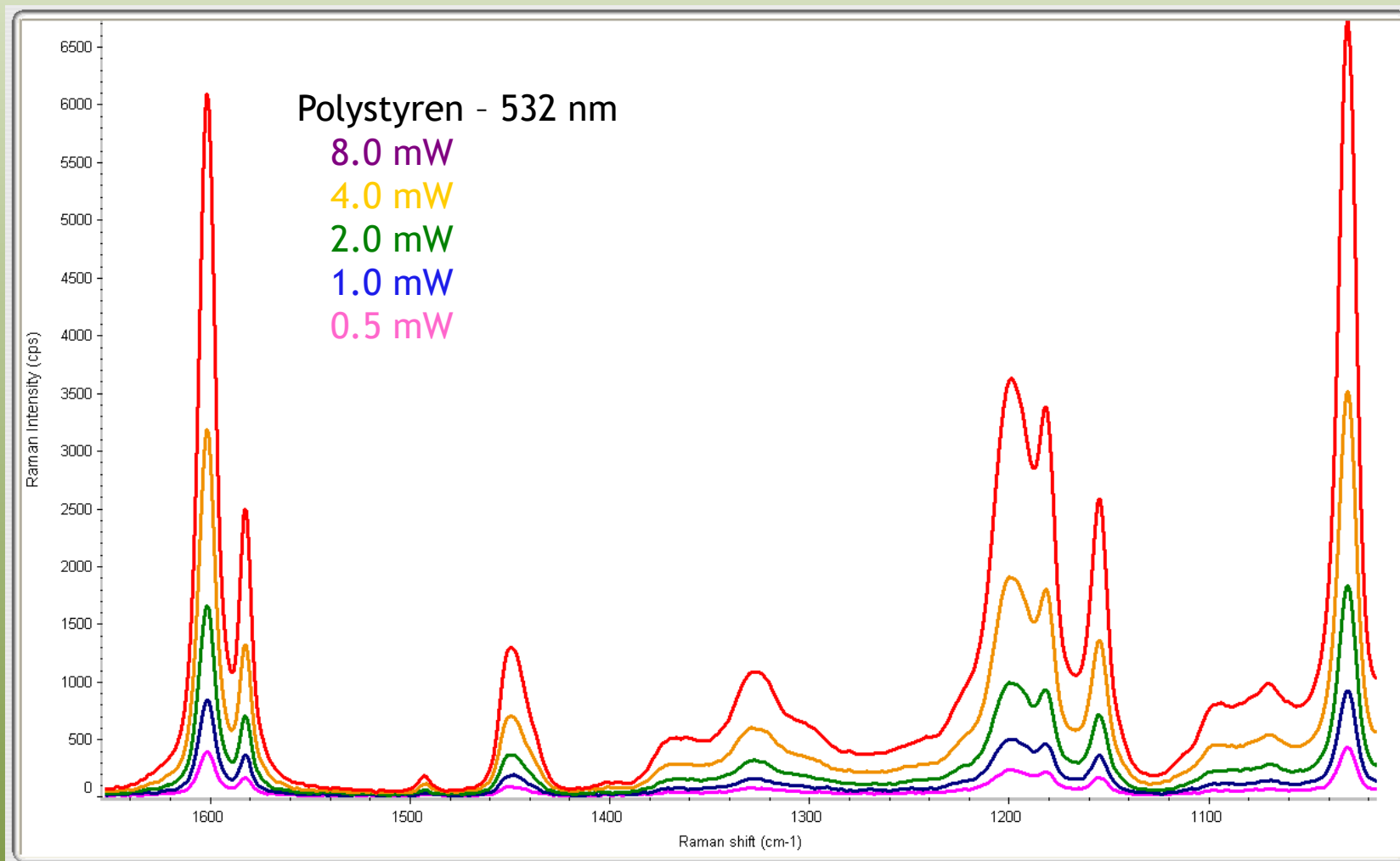
- Volitelné budící lasery
- **konfokální měření**

Procesní Ramanův spektrometr iXR

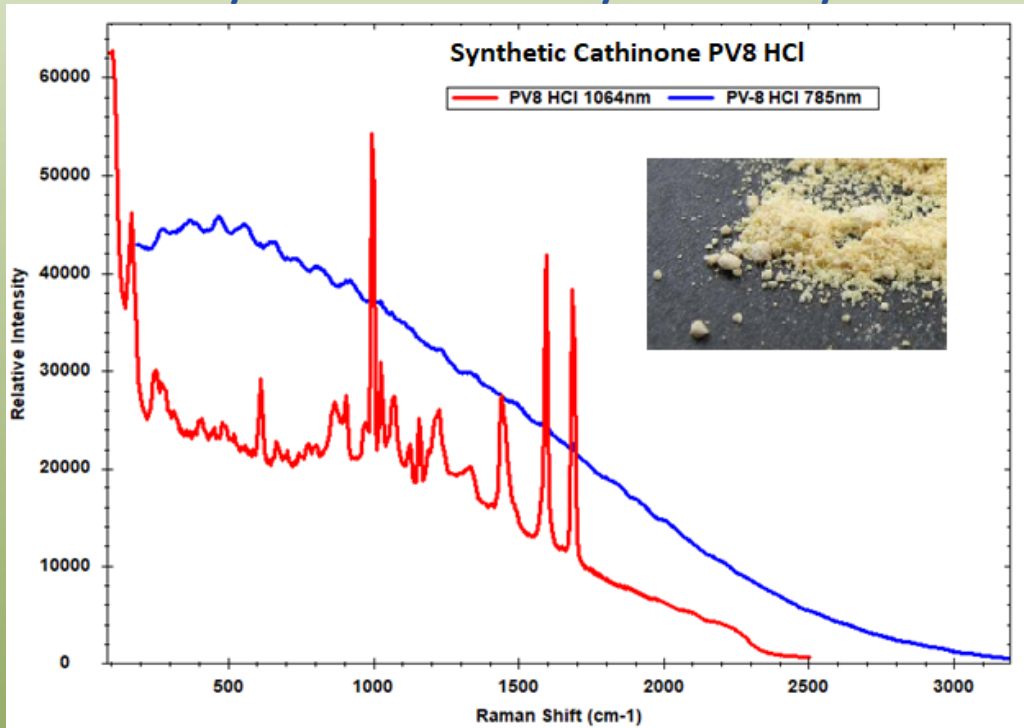


- Volitelné budící lasery
- **Integrace s dalšími analytickými metodami**





Syntetické kanabinoidy a katinony

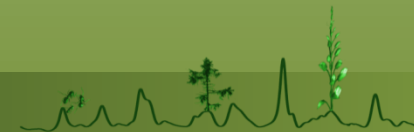


FT-Raman

Nicolet iS50 + Raman modul

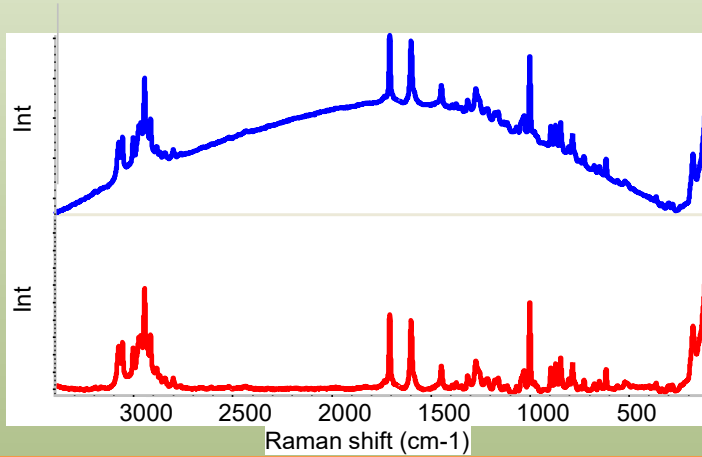


použitá vlnová délka budícího laseru 1064 nm



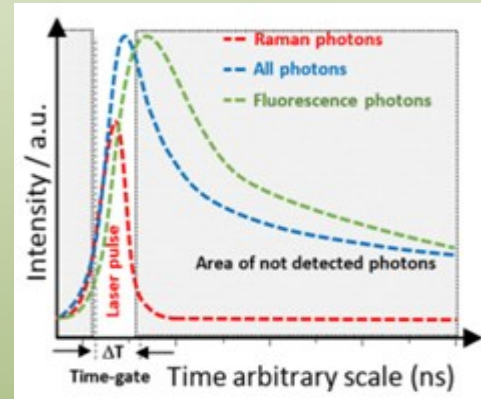
Matematicky

například odečtení základní linie



Časově rozlišená Ramanova spektroskopie

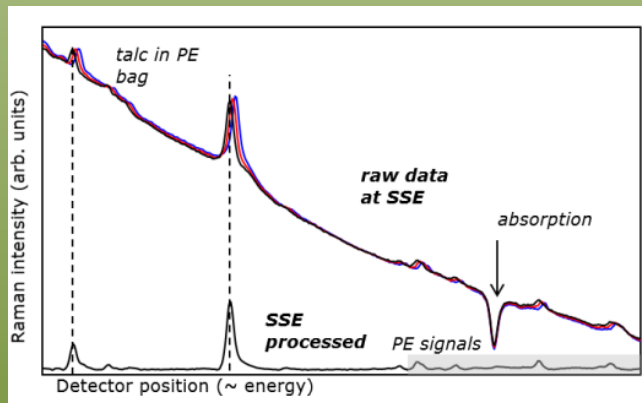
fluorescence je časově posunuta (opožděna) oproti Ramanu signálu





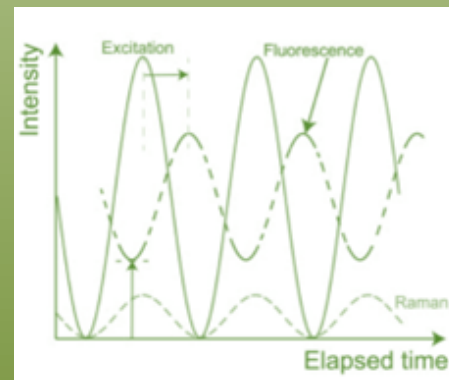
Sekvenčně posunutá excitace

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



Změna frekvence excitačního laseru pomocí vložených modulátorů frekvence

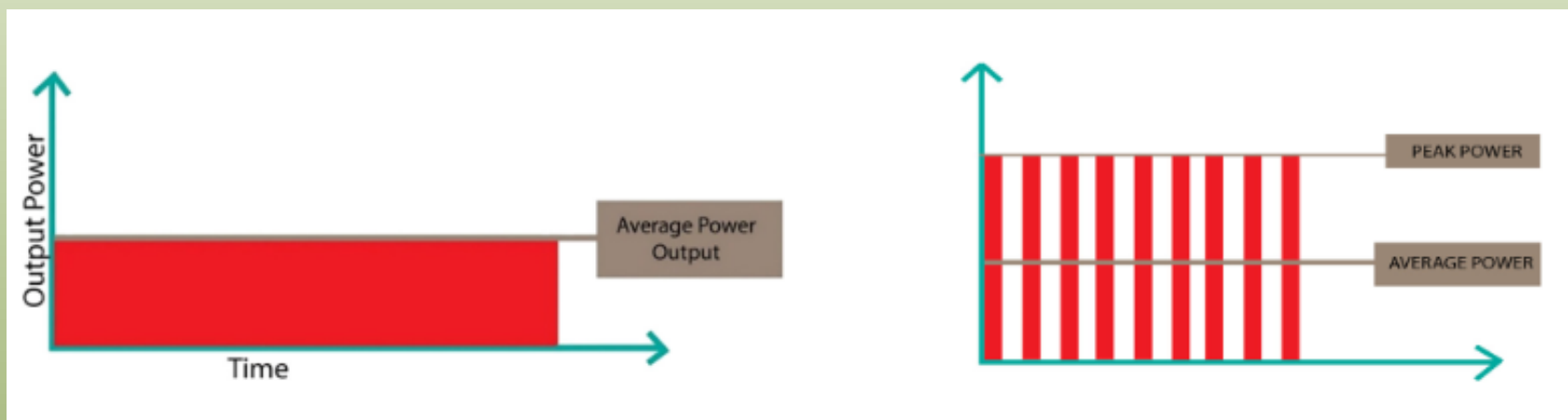
akustooptický modulátor (AOM) nebo elektrooptický modulátor (EOM)



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



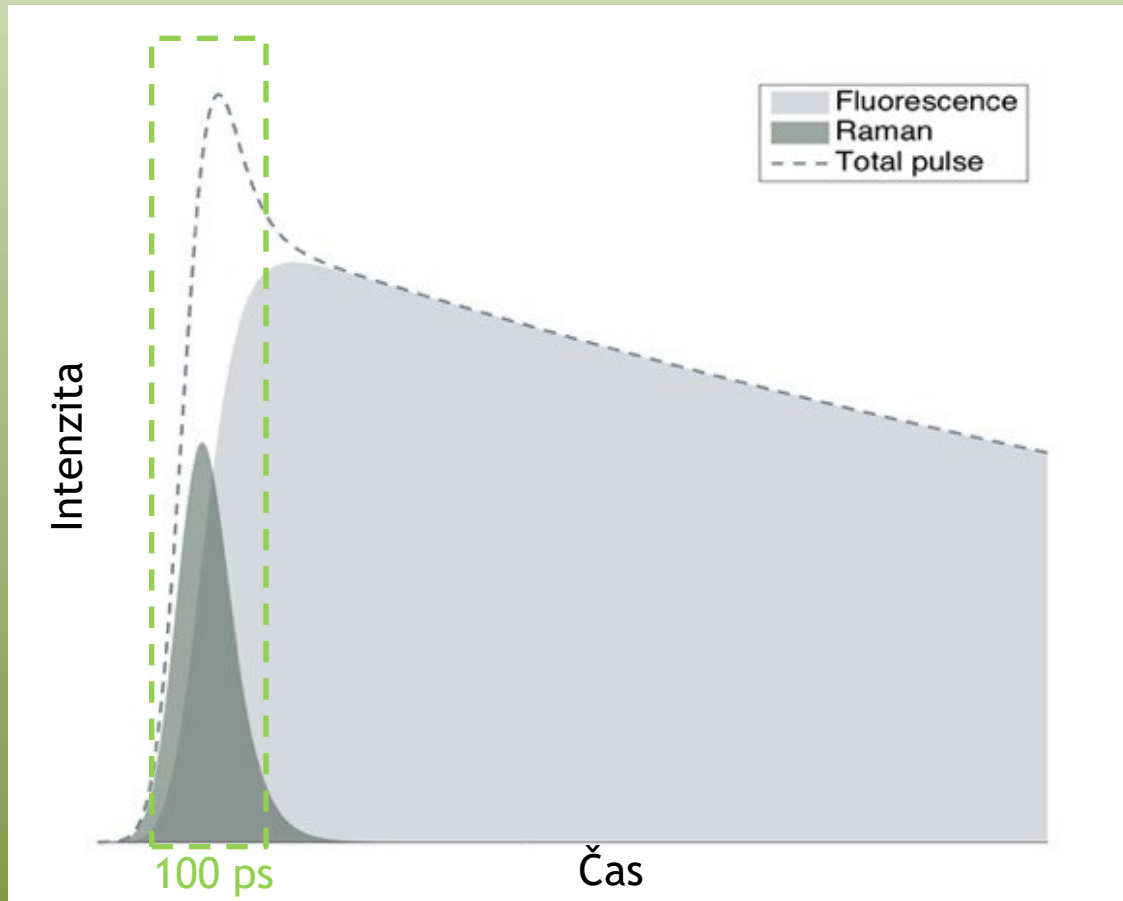
- principem časově rozlišené Ramanovy spektroskopie je excitace pulsním laserem a měření Ramanova spektra v krátkých pulzech (většinou v časech menších než 100ps), který využívá principu, že fluorescence je časově posunuta (opožděna) oproti Ramanovu signálu.
- pulzní laser - měření i ultrarychlých procesů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



Tajný trik: time-gating signálu!

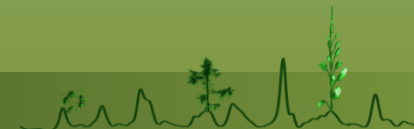
Patentovaná inovace, která z klasického Ramanova spektrometru dělá úplně jiný, nový typ přístroje.

- ✓ Rychlá detekce založená **SPAD (Single Photon Avalanche Diode)** detektoru



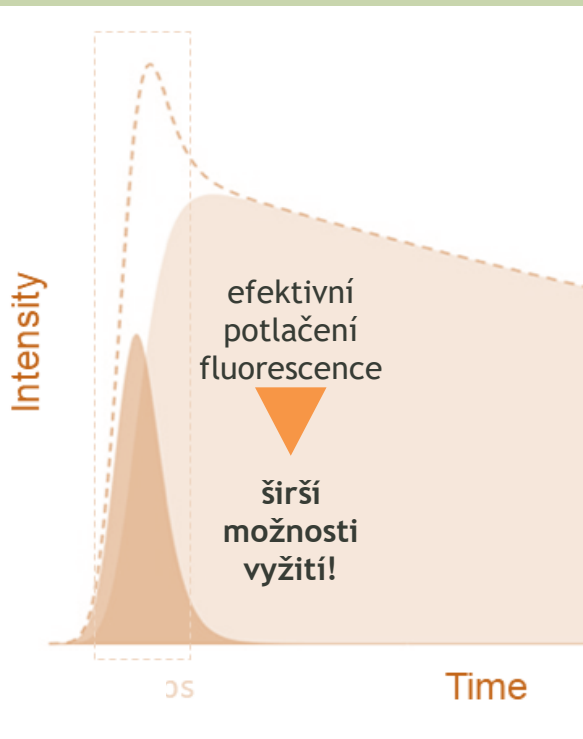
- pulsní laser - 532 nm
- rychlá detekce založená na speciálním polovodičovém SPAD (Single Photon Avalanche Diode) detektoru

schopnost detekce jednotlivých (!) fotonů světla



Výhody technologie Time-gated

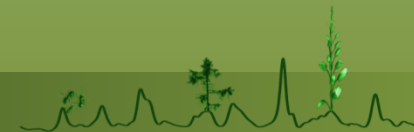
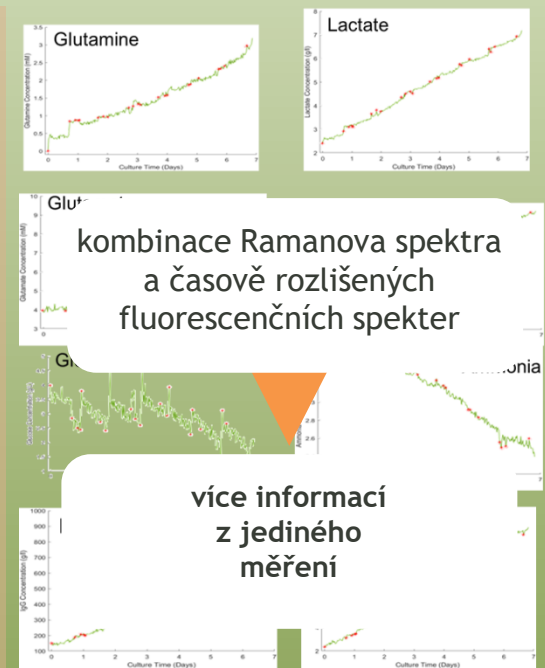
1



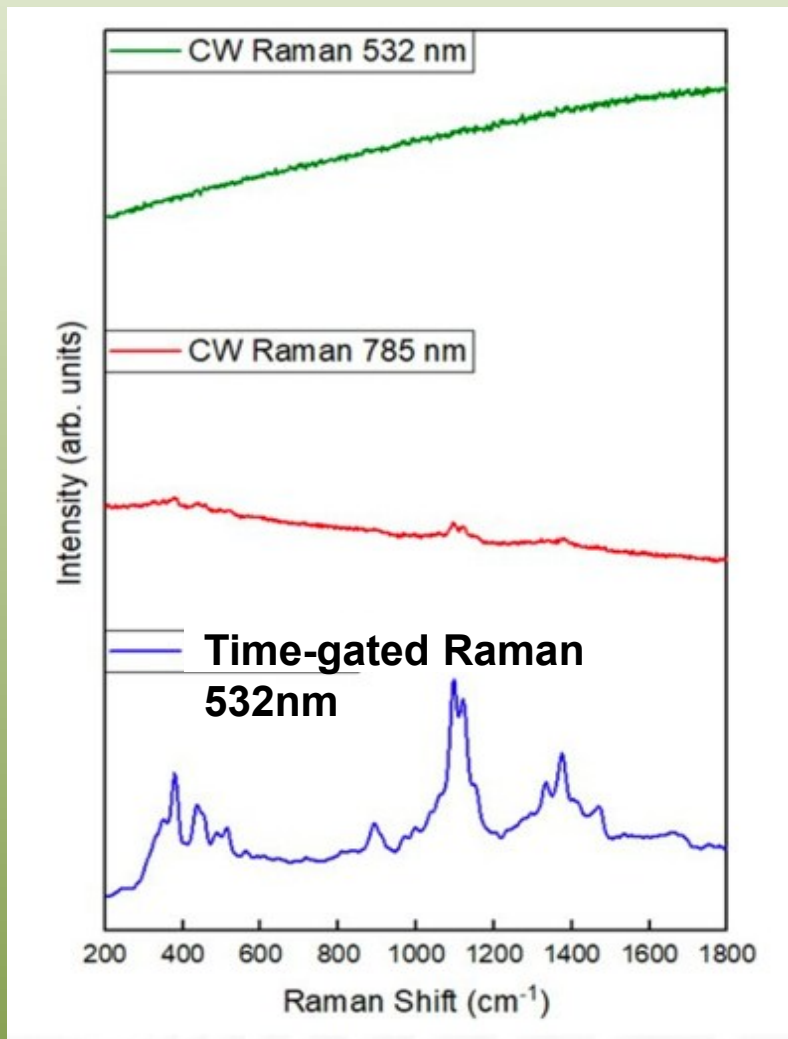
2



3



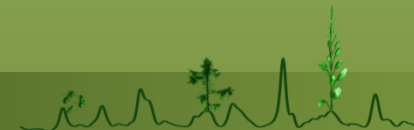
Časově rozlišená Ramanova spektroskopie!



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

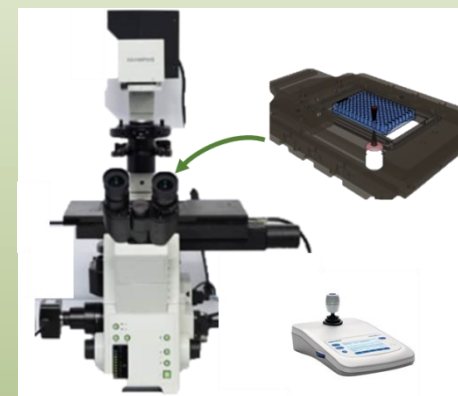


Spektrometr PicoRaman M3 a sonda ProbePro

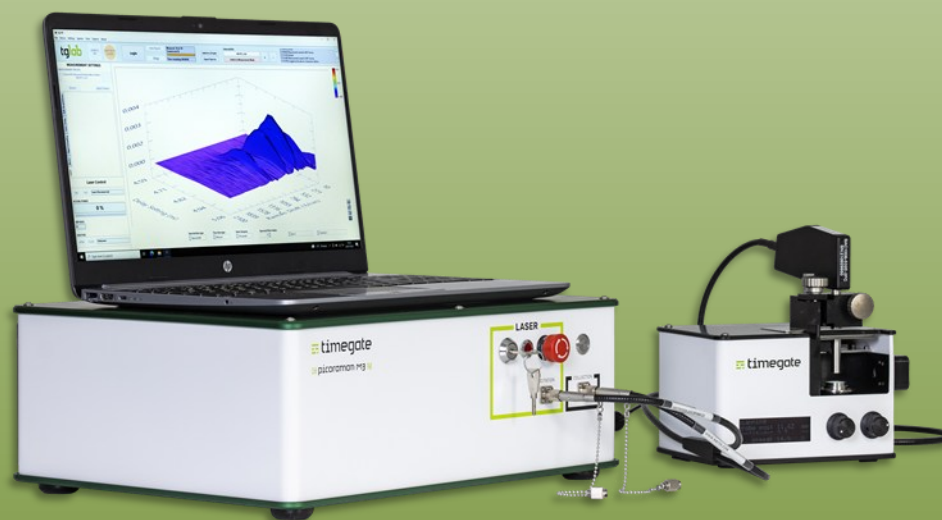


Spektrometry Timegate

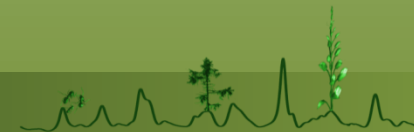
MICROPLATE HTS SYSTEM



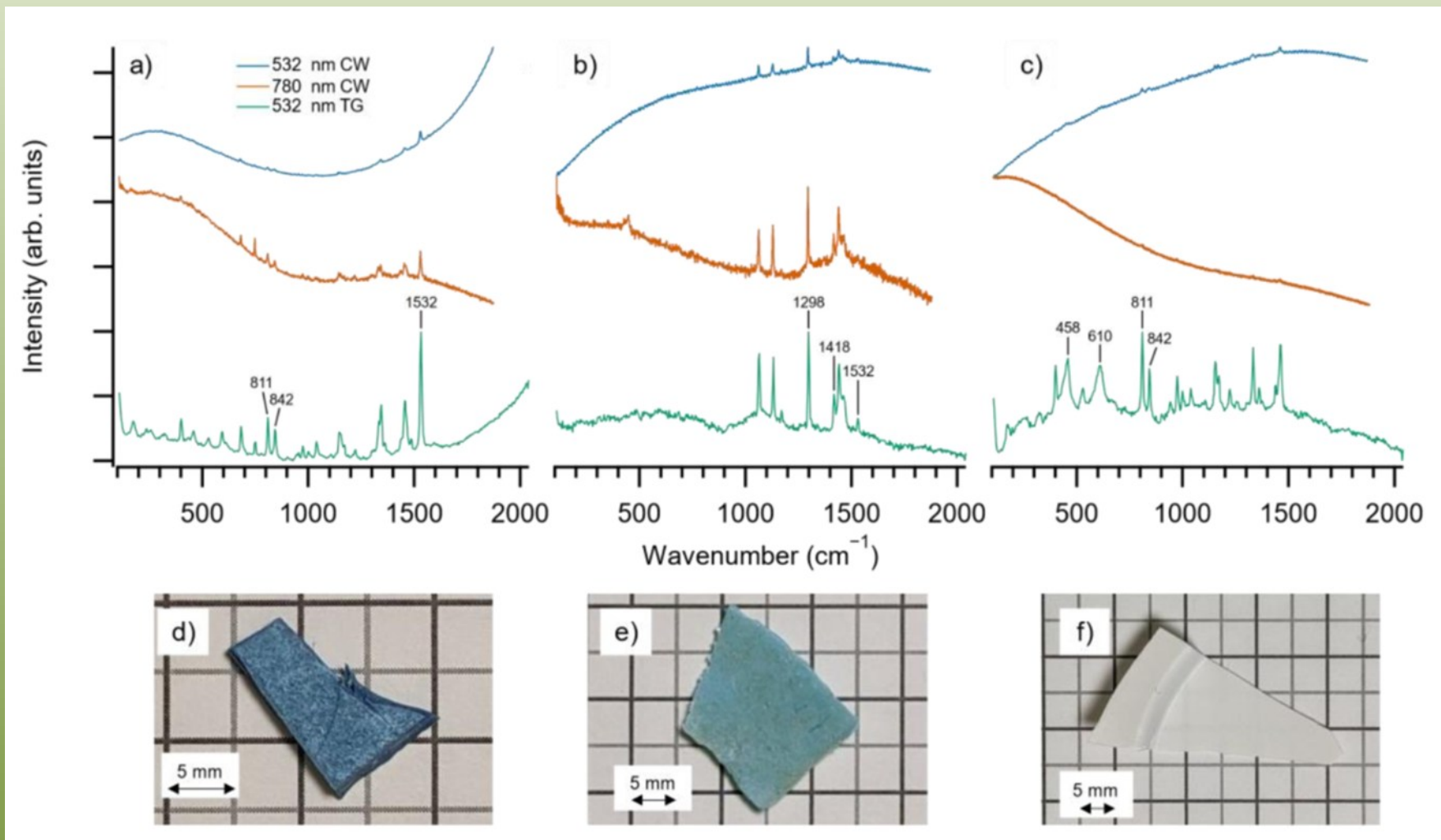
Spektrometr PicoRaman M3 v kombinaci s optickým mikroskopem Olympus



SampleCube: Další rozšíření Ramanova spektrometru PicoRaman M3



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



Měření nebezpečných látek

- **Kategorie možných nebezpečných zneužitelných látek:**

- Bojové chemické supertoxické (fosgen, difosgen, sarin, soman)
- Zpuchýřující látky (Yperity, Lewisit)
- Policejní dráždivé látky (pepřový sprej, slzný plyn)
- Toxické průmyslové chemikálie
- Agrochemikálie
- Farmakologické látky
- Toxiny a bakteriologické látky

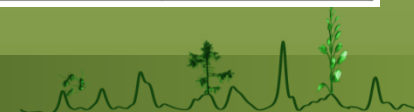


- **Látky:**

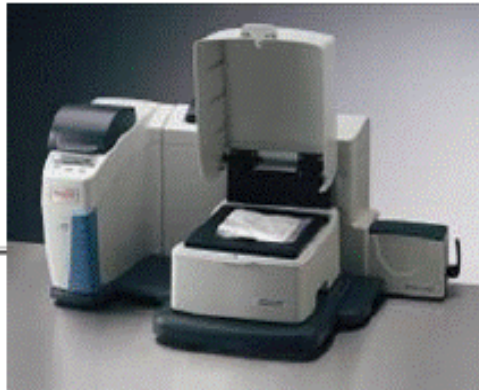
- plynné (plynové květy)
- aerosoly
- Kapalně (vodné roztoky – raman)
- pevné



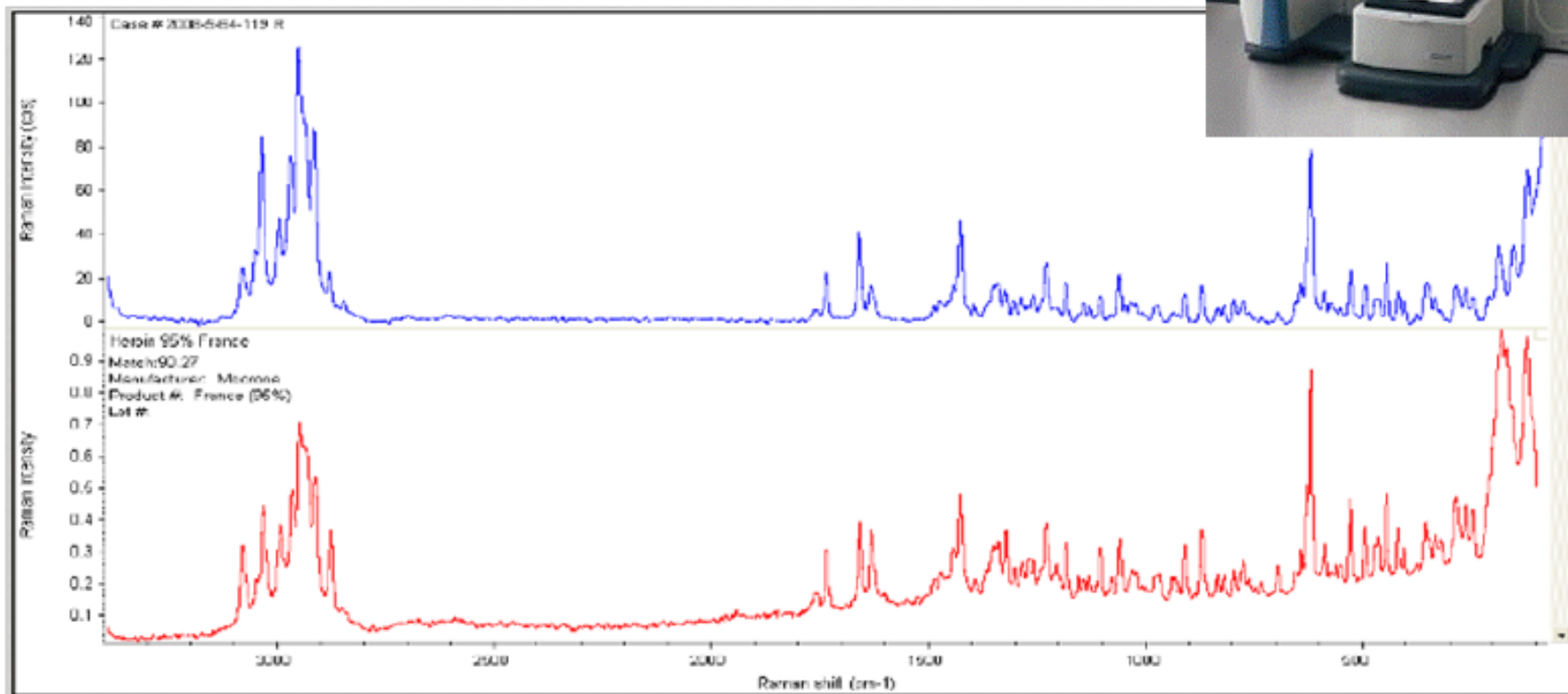
Látka	EC ₅₀ mg-min/m ³	LC ₅₀ mg-min/m ³	ED ₅₀ mg	LD ₅₀ mg
Tabun	2-3	200-400	-	1000
Sarin	3	100-200	-	1700
Soman	1-2	50-70	-	50
VX	1-2	10-50	1	10
Yperit	10-1000	1500	10	7000
Lewisit	1500	1500	15	4000
Fosgen	-	3200	-	-
HCN	~1500	2500-5000	-	7000



- **Podezřelý bílý prášek – nelegální droga?**
- Analýza přes plastový sáček
- **Potvrzení - Heroin**



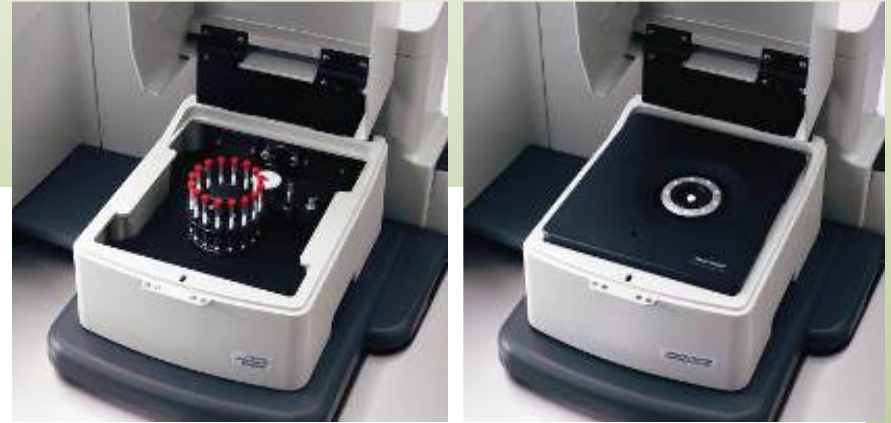
DXR3 Smart Raman



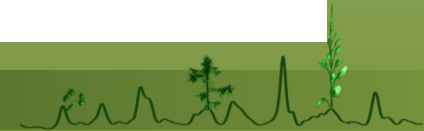
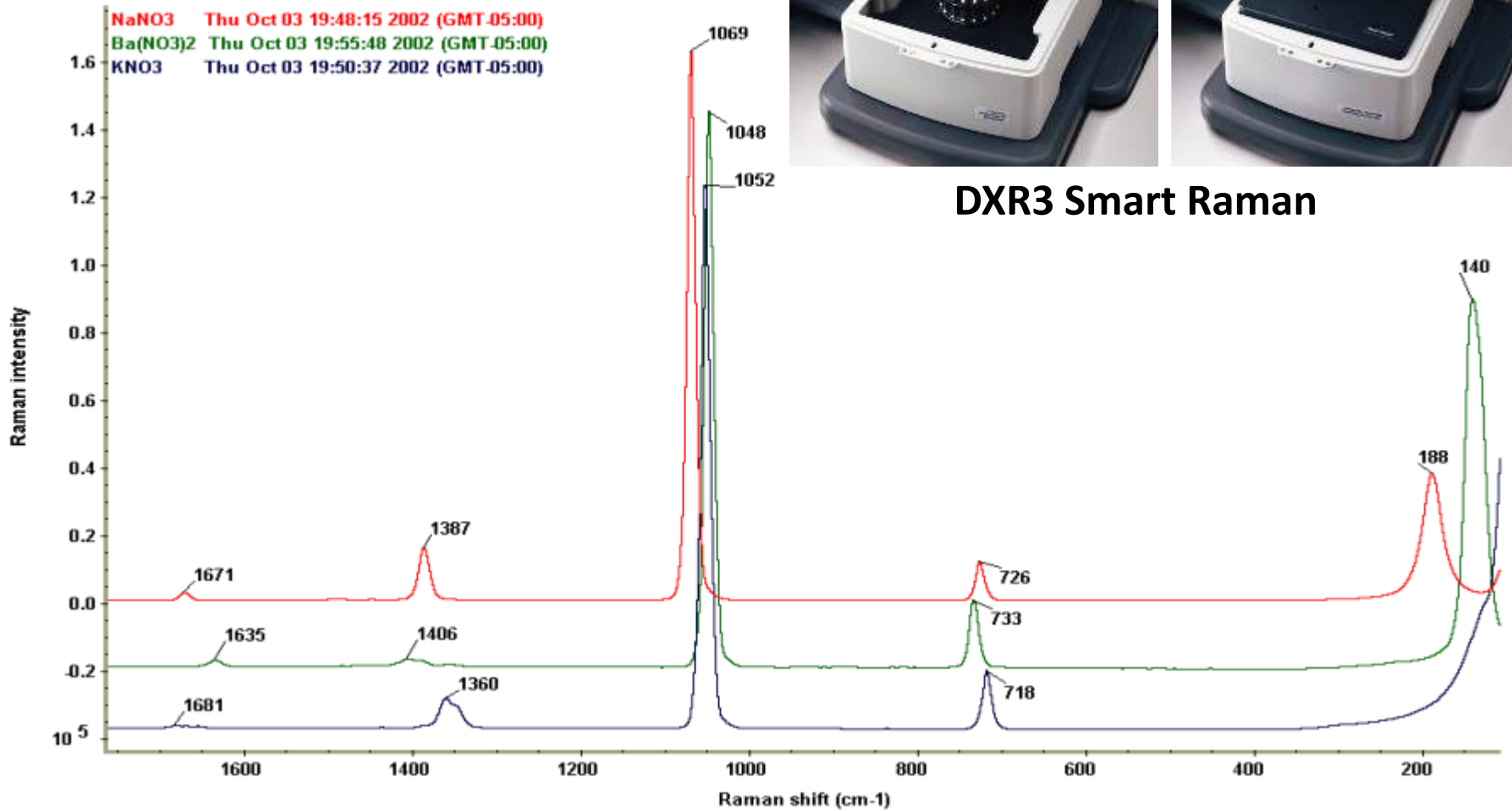
The best match is very good.

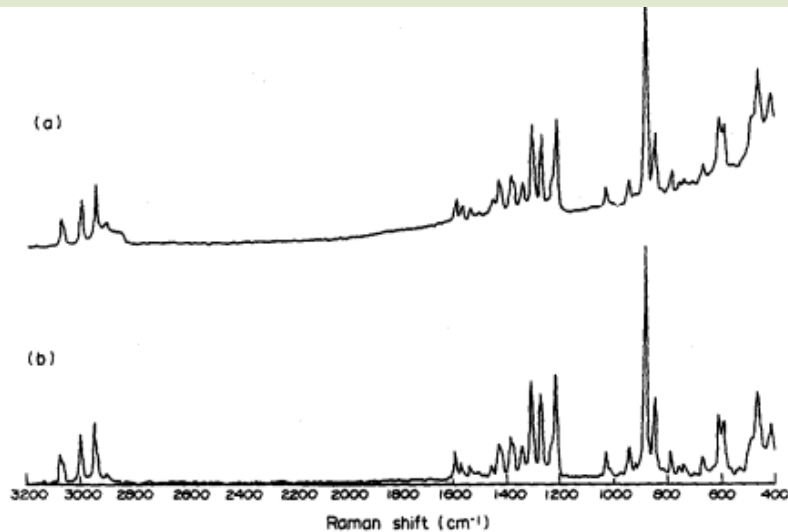


Dusičnany

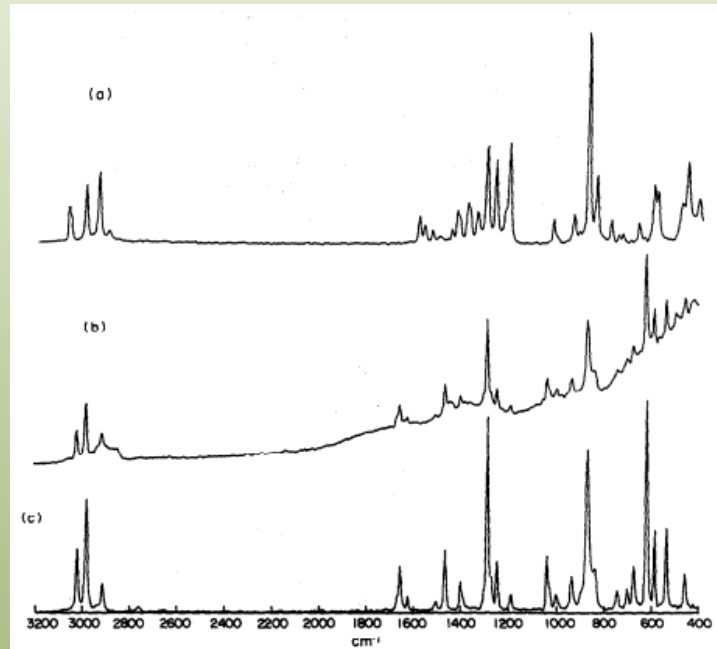


DXR3 Smart Raman





Semtex A (a), cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) (b)

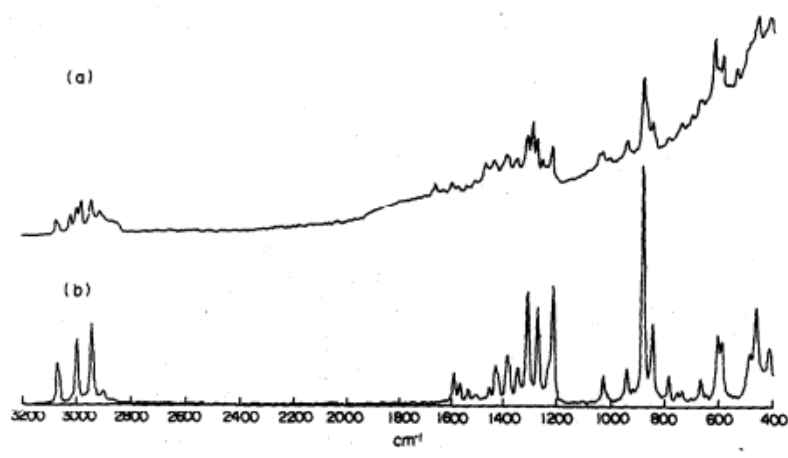


RDX (a), Semtex B (b), pentaerythritol tetranitrate (PETN) (c)

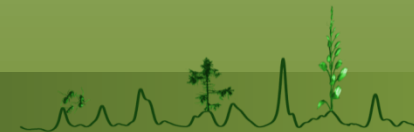
FT-Raman, laser 1064 nm, 400-3200 cm^{-1}

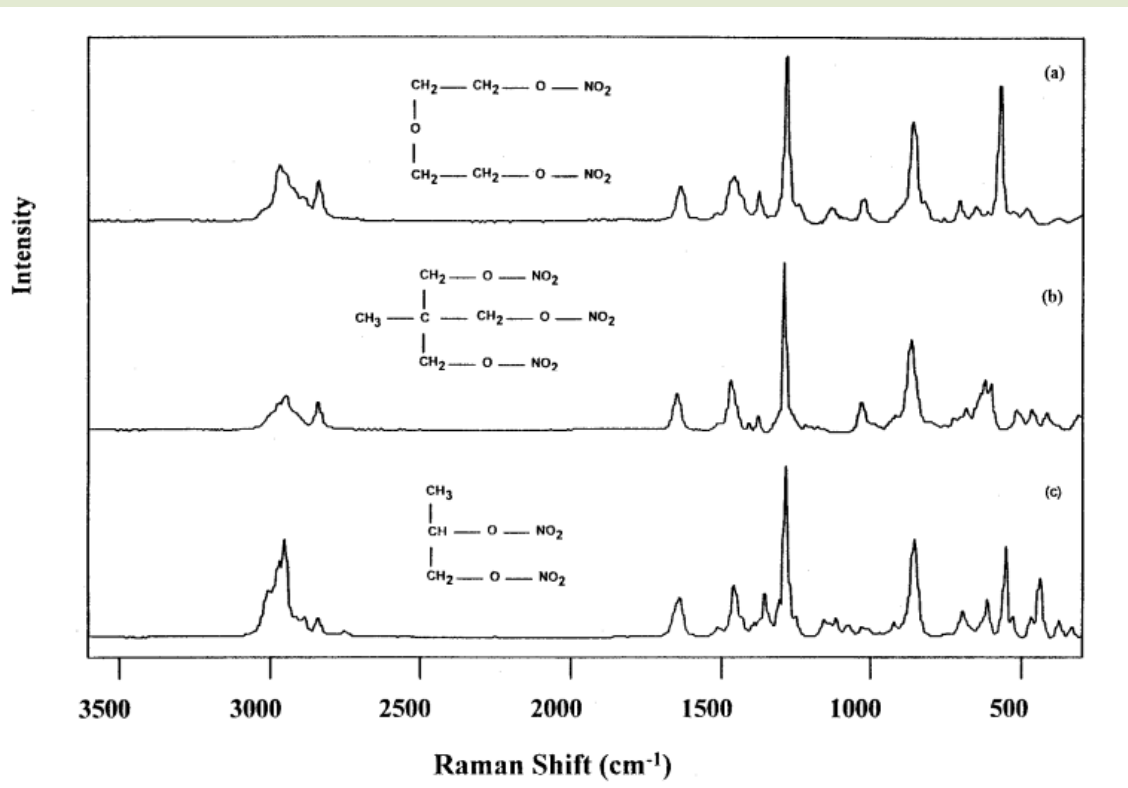
Neznámé vzorky:

- Semtex A odpovídá RDX
- Semtex B odpovídá PETN
- Semtex C obsahuje RDX a PETN



Semtex C (a), RDX (b)





FT-Raman, DEGDN (a), MTN (b), PGDN (c)

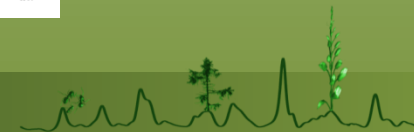
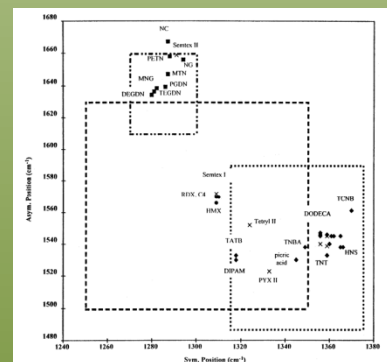
FT-Raman, laser 1064 nm, 300-3600 cm⁻¹

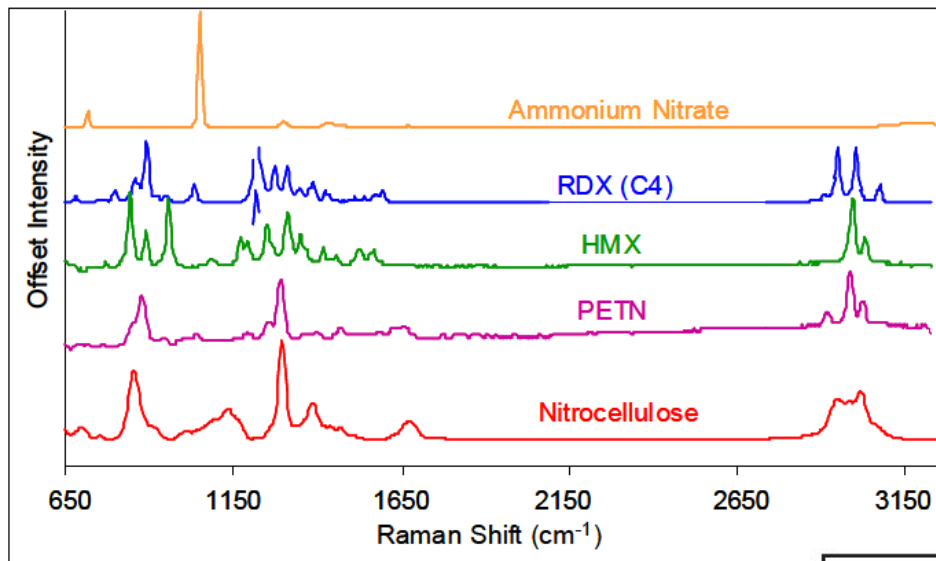
- DEGDN – diethyleneglycol dinitrate
- MTN – methyl trimethylolmethane trinitrate (Metriole trinitrate)
- PGDN – propylene glycol dinitrate

TABLE III. Observed wavenumbers of the symmetric and anti-symmetric $\nu(\text{NO}_2)$ band.

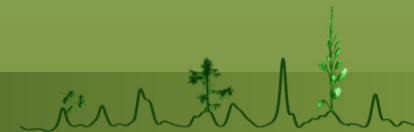
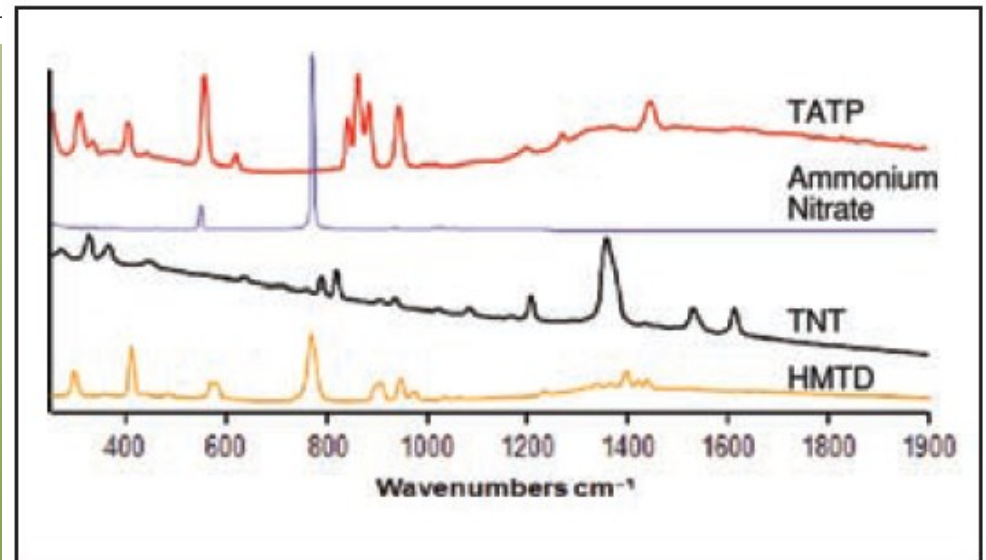
Acronym	Wavenumber ^a of the $\nu_s(\text{NO}_2)$ band	Wavenumber ^a of the $\nu_{as}(\text{NO}_2)$ band
Nitrate ester		
NG	1294	1656
PETN	1288	1658
MTN	1287	1647
NC	1287	1667
PGDN	1286	1639
MNG	1282	1638
DEGDN	1281	1636
TEGDN	1280	1634
Nitro-aromatic		
TCNB	1370	1561
HNS Superfine	1366	1538
HNS-II	1366	1538
HNS + HNBiB	1365	1538
TNB100	1365	1545
TNN	1362	1545
TPT	1361	1545
TNB	1360	1540
TNT	1359	1533
ONT	1359	1546
Nitro-aromatic		
DODECA	1356	1546
NONA	1356	1545
HNBP	1356	1547
TNBA	1350	1538
Picric acid	1345	1530
DIPAM	1318	1530
TATB	1318	1533(?)
Nitramine		
RDX	1310	1570
C4	1309	1570
HMX	1309	1566
Exceptional		
NTO	1359	1545
Tetryl (I)	1359	1539
Tetryl (II)	1324	1552
PYX (I)	1356	1540
PYX (II)	1333	1523
Semtex (I)	1309	1572
Semtex (II)	1291	1659

^a In the explosives where distinct *o*-, *m*-, and *p*-nitro groups give rise to several distinct vibrations, the most intense band has been selected.

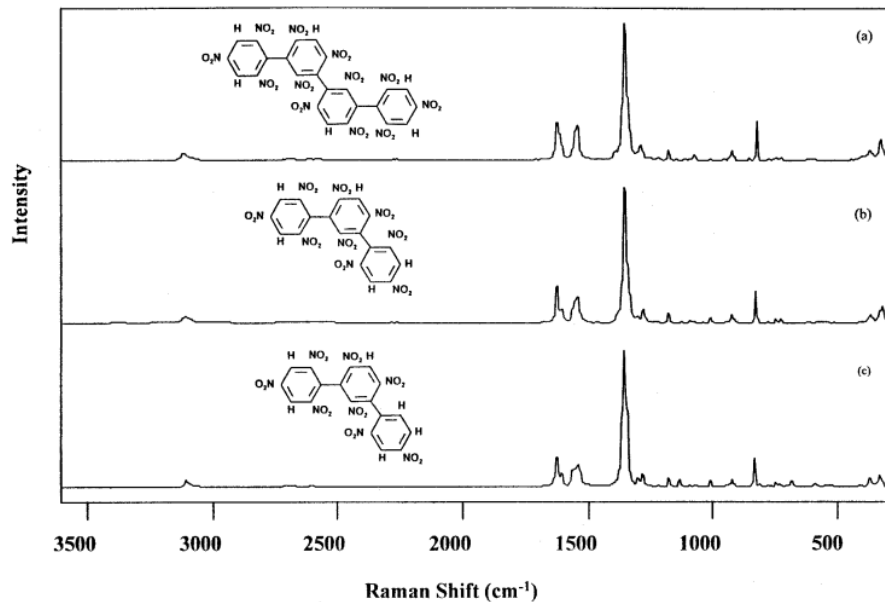




RDX (C4) – hexogen -plastická trhavina
HMX – oktogen
PETN – pentrit
TATP – triacetone triperoxid
TNT – trinitrotoluen
HMTD – hexamethylen triperoxidediamine



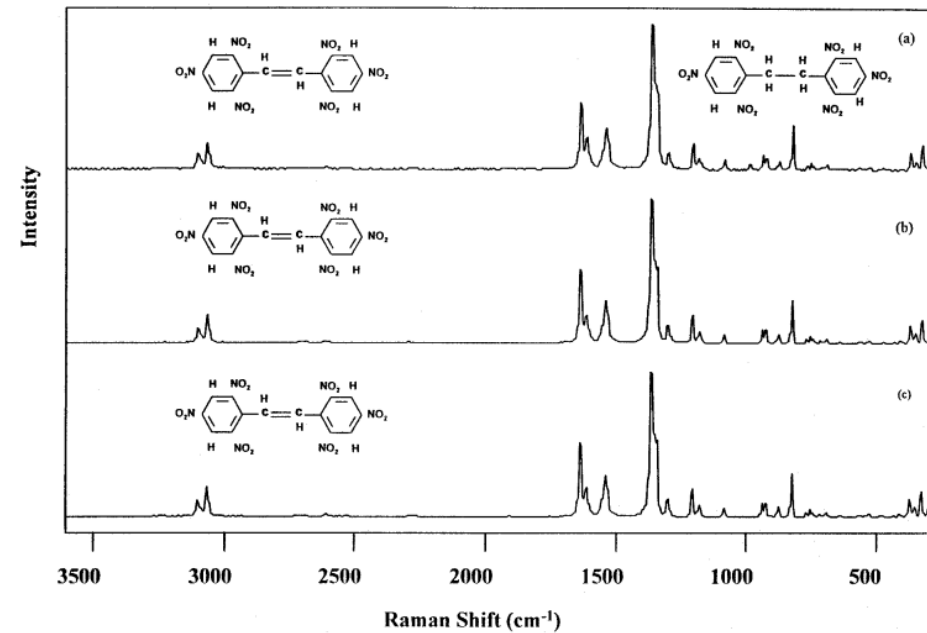
Měření výbušnin⁷ FT-Raman



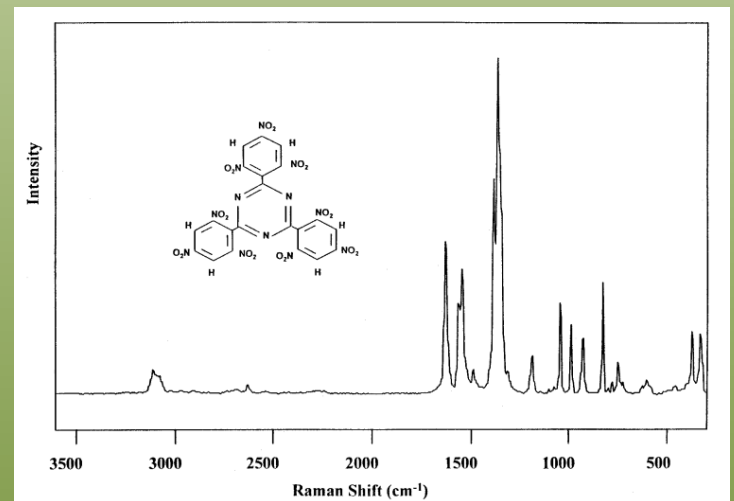
FT-Raman, DODECA (a), NONA (b), ONT (c)

FT-Raman, laser 1064 nm, 300-3600 cm⁻¹

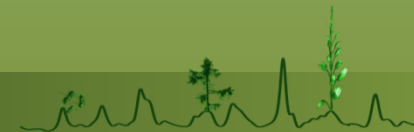
- DODECA – 2,2',2'',2''',4,4',4'',6,6',6'',6'''-dodecanitroquaterphenyl
- NONA – 2,2',2'',4,4',4'',6,6',6''-nonanitroterphenyl
- ONT - 2,2',2'',4',4'',6,6',6''-octanitro-*m*-terphenyl
- HNS (II i Superfine) - 2,2',4,4',6,6'-hexanitrostilbene
- HNS + HNBiB - 2,2',4,4',6,6'-hexanitrostilbene + hexanitrodibenzyl dipicrylethane
- TPT – 2,4,6-tripicryl-s-triazine

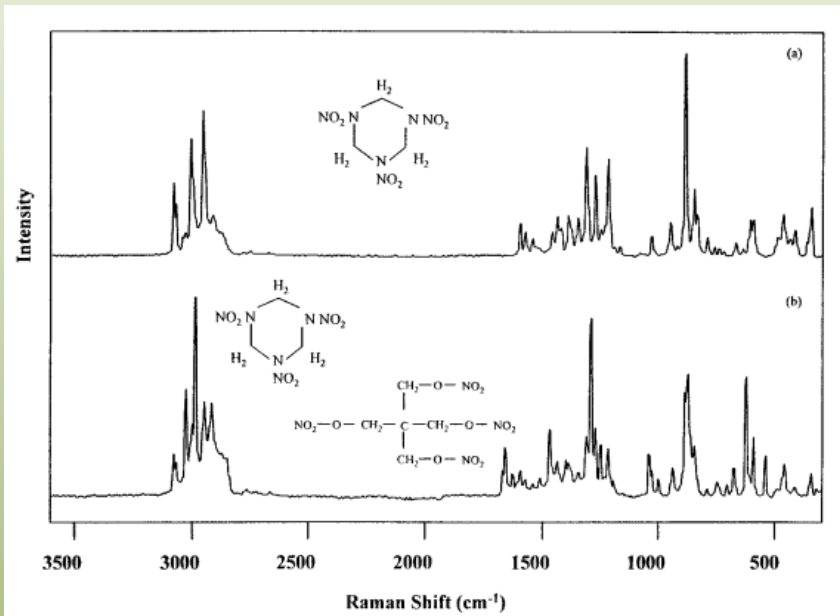


FT-Raman, HNS+HNBiB (a), HNS II (b), HNS Superfine (c)



FT-Raman, TPT

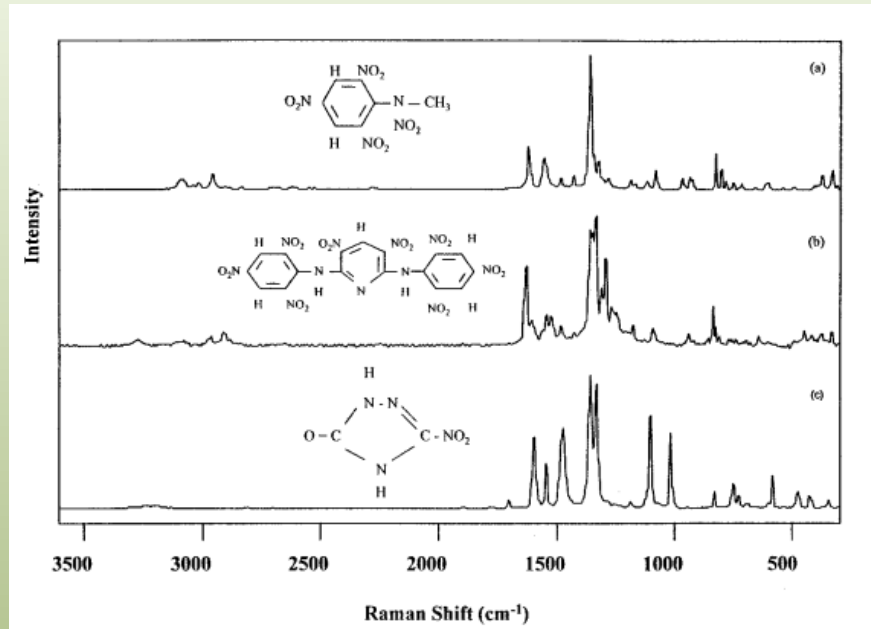




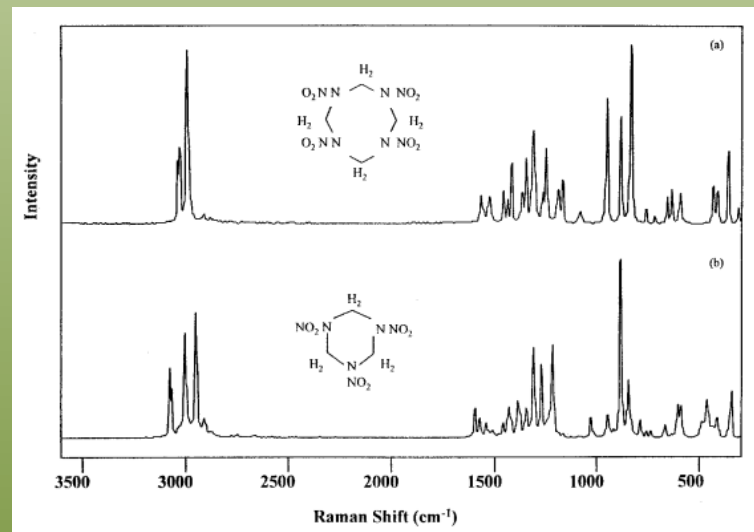
FT-Raman, C4 (a), Semtex (b)

FT-Raman, laser 1064 nm, 300-3600 cm⁻¹

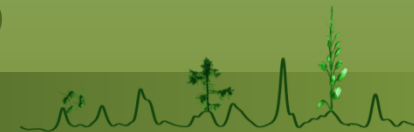
- C4 – composition 4 (90% RDX, 10% polyisobutylene)
- Semtex – (RDX, PETN, in a styrene/butadiene copolymer)
- Tetryl – n-2,4,6-tetranitro-N-methylaniline
- PYX – 2,6-bis-picrylamino)-3,5-dinitropyridine
- NTO – 3-nitro-1,2,4-triazo-5-one
- HMX – 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetra-azacyclooctane
- RDX – 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyclohexane (cyclonit)



FT-Raman, Tetryl (a), PYX (b), NTO (c)

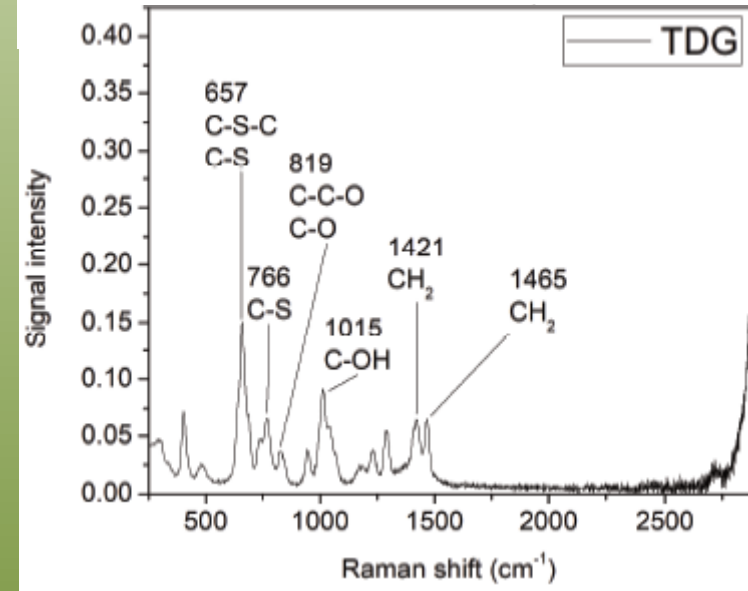
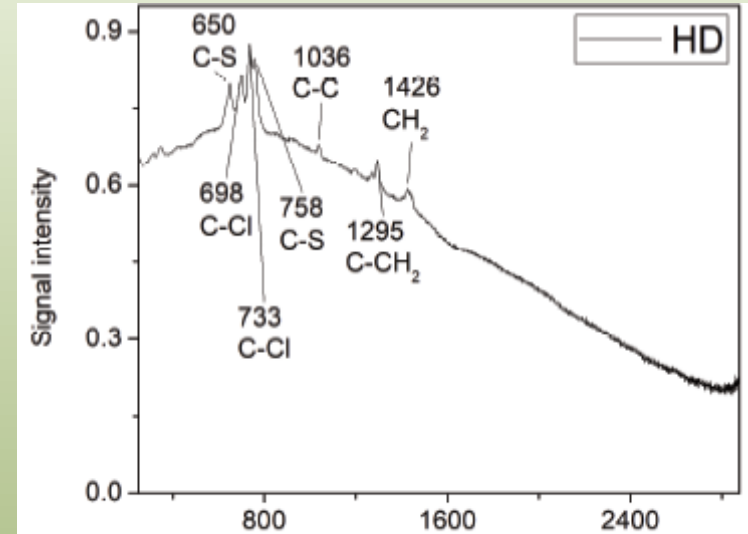


FT-Raman, HMX (a), RDX (b)



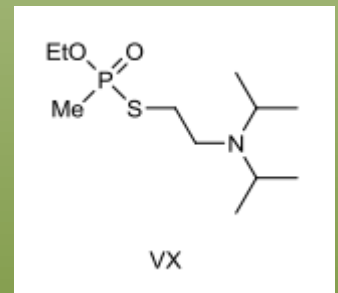
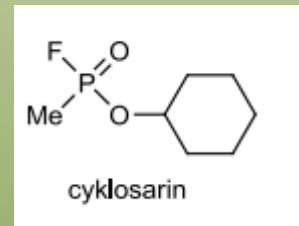
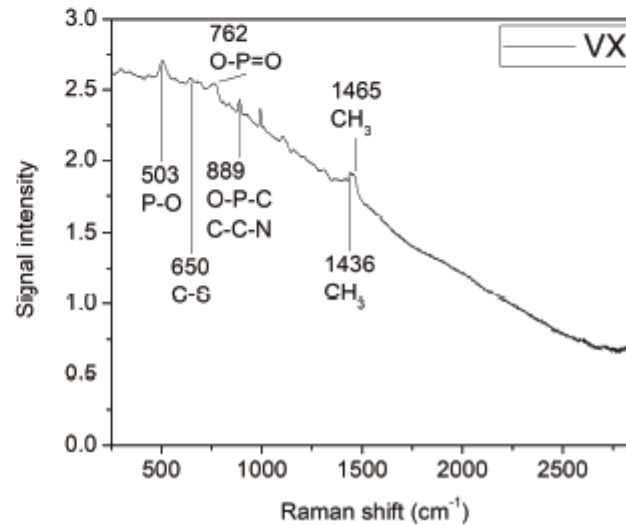
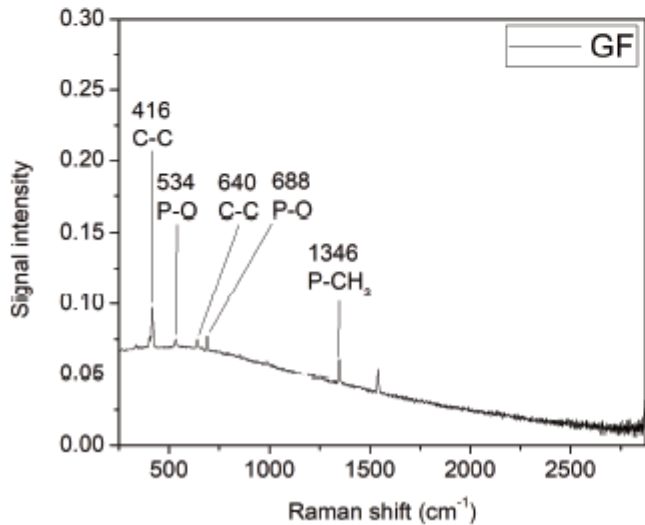
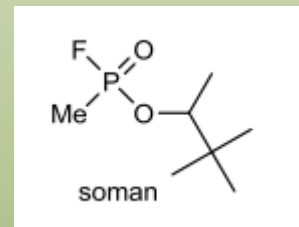
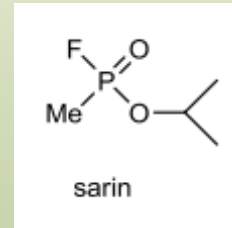
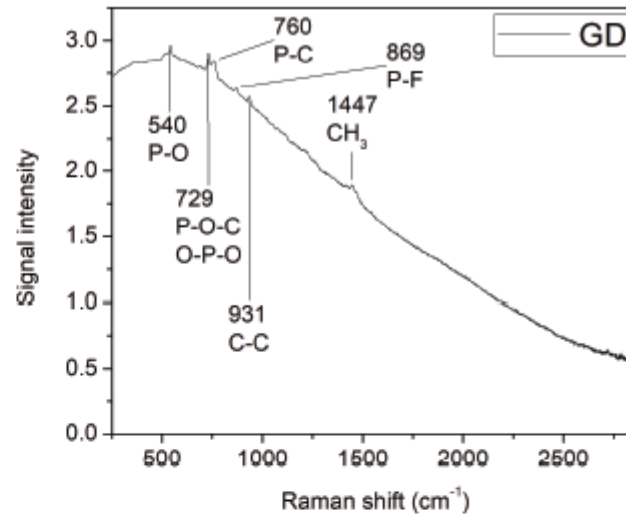
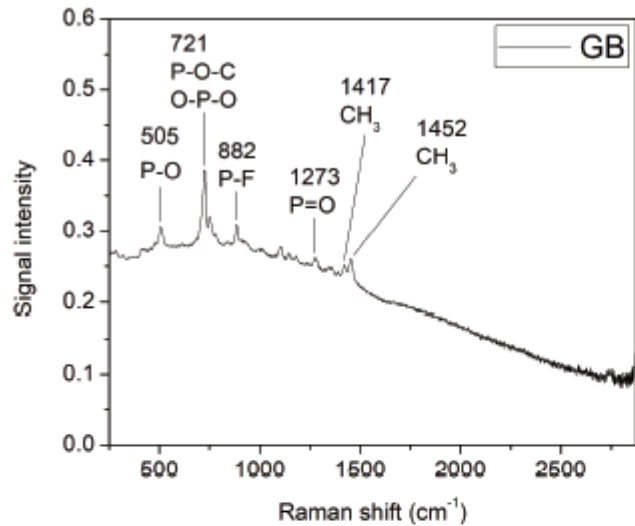
Analýza 29 nebezpečných bojových látek³

Group	Code or abbreviation	Chemical name
choking	DP	trichloromethyl chloroformate
blood	KCN	potassium cyanide
blister	HD	bis(2-chloroethyl)sulfide
	HN-1	ethyl bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride
	HN-2	methyl bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride
	HN-3	tris(2-chloroethyl)amine hydrochloride
	L-1	2-(chlorovinyl)dichloroarsane
	TDG	thiodiglycol
	HN1OH	<i>N</i> -ethyl-diethanolamine
	HN2OH	<i>N</i> -methyl-diethanolamine
	HN3OH	triethanolamine
	As ₂ O ₃	arsenic oxide
nerve	GB	isopropyl methylphosphonofluoridate
	GD	pinacolyl methylphosphonofluoridate
	GA	ethyl (dimethylphosphoramido)cyanidate
	GF	cyclohexyl methylfluorophosphonate
	VX	[2-(diisopropylamino)ethyl] ethyl methylphosphonothiolate
	DIAET	2-diisopropylaminoethanethiol
	DIAE	2-diisopropylaminoethanol
	DMAET	dimethylaminoethanethiol
	COH	cyclohexanol
	IOH	isopropyl alcohol
POH	pinacolyl alcohol	
irritant	CN	chloroacetophenone
	CR	dibenzo[b,f][1,4]oxazepine
	CS	2-chlorobenzylidene malononitrile
psychoactive	BZ	3-quinuclidinyl benzilate
	QOL	3-quinuclidinol

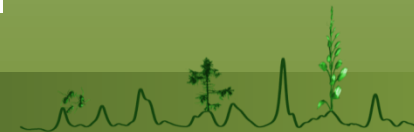


HD – yperit a jeho prekurzoru TDG - thiodiglykol

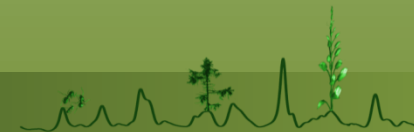




GB – sarin, GD – soman, GF – cyclosarin, VX – bojová látka VX



- 1) www.thermofisher.com
- 2) <https://www.timegate.com>
- 3) Rozsypal T., Greplova N., Advances in Military Technology Vol.18, No.1, 133-150 (2023).
- 4) Zhang P, Liu B, Xu J, Du B, Wang J, Liu Z, Tong Z, Molecules 29, 197 (2024)
- 5) Akhavan J, Spectrochimica Acta 47A (1991).
- 6) Atieno-Alego V, Speers N, Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science, Ch 5, Wiley (2012).
- 7) Johnson TJ, Su YF, Jarman KH, Kunkel BM, Birnbaum JC, Joly AG, Stephan EG, Tonkyn RG, Ewing RG, Dunham GC, International Journal of Spectroscopy 11 (2012).





Děkuji za pozornost

V případě potřeby nás prosím kontaktujte

www.nicolet.cz

Servisní, aplikační a demonstrační středisko

Křelovická 970, Česká Republika - 104 00, Praha 10

RNDr. František Kesner, Ph.D.: +420 603 554 788, kesner@nicoletcz.cz

