NAISL
Quarterly, 2017
Volume 2, Number 2
Pages 95 – 102
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X

Introduction to Confocal Raman Microscopy

Ali Hallaj Jahani[1*], Morteza Nazari[2] and Soheil Shirazian[3]

Abstract

Raman spectroscopy is widely known as a non-destructive, robust technique among all available analytical techniques duo to inelastic interactions between incident light photons and the sample molecules. Employing the Raman spectroscopy one can find unique features such as molecular composition, molecular interactions, phase analysis, polymorph characterization and crystallinity all without sample preparation.

Combination Raman spectroscopy with all mentioned features and microscopy technique one has a brand-new technique in hand which can provide valuable data not only the surface but the depth of sample, it is called Raman confocal Microscopy which has been widely used as a one of the most important analytical instruments in the last decade.

Using this technic not only the high magnification and Raman analysis by laser spot, but also depth profiling of sample would be achievable. Raman confocal microscopy is widely used in a variety of fields such as material science, polymers, thin films, semiconductors, graphene/carbon characterization, pharmacy, cosmetic, forensics, geology, crystallography and life science. In this article at first the Raman spectroscopy and then Raman confocal Microscopy is discussed theoretically. It is expected that getting familiar with this technique leads to a valuable comprehension of physical and chemical characterization of organic and inorganic compounds.

Key Words

Raman,
Spectroscopy,
Raman Scattering,
Confocal Microscope,
Chemical imaging

(*) Corresponding author.
1. Nanometrology Supervisor / Aria Fan Varzan Co.
E-mail: nano@ariafan.com
Tel: 02188503633
2. Nanometrology Expert / Aria Fan Varzan Co.
E-mail: nsb@ariafan.com
Tel: 02188503633
3. Nanometrology Expert / Aria Fan Varzan Co Sharif university of technology/ Department of Physics.
E-mail: nsc@ariafan.com, Soheilshirazian@alum.sharif.edu
Tel: 02188503633

نشریه رویکردهای نوین در
آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال دوم، شماره ۲
صفحات ۹۵ – ۱۰۲، ۱۳۹۶
شاپای چاپی: ۲۵۸۸-۶۴۰۱
شاپای الکترونیکی: ۲۵۸۸-۶۴۱X

آشنایی با میکروسکوپ رامان کانفوکال

علی حلاج جهانی[۱،*] مرتضی نظری[۲] و سهیل شیرازیان[۳]

چکیده

طیف سنجی رامان به عنوان یک تکنیک قدرتمند غیر مخرب در بین تمام تکنیک‌های تحلیلی موجود شناخته شده است که از پراکندگی غیر الاستیک بین فوتون‌های نور فرودی و مولکول‌ها ناشی می‌شود. با استفاده از طیف سنجی رامان می‌توان از ویژگی‌های منحصر به فرد مانند ترکیب مولکولی، برهمکنش مولکولی، تجزیه و تحلیل فاز، خصوصیات چند شکلی و بلورینگی بدون نیاز به آماده سازی نمونه اطلاع یافت.

ترکیب طیف سنجی رامان با تمام ویژگی‌های ذکر شده و تکنیک میکروسکوپی، یک تکنیک جدید است که می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را نه تنها از سطح نمونه بلکه از عمق نمونه ارائه دهد، این تکنیک میکروسکوپ رامان کانفوکال است که به طور گسترده‌ای به عنوان یکی از مهمترین ابزار تحلیلی در دهه گذشته مورد استفاده قرار گرفته است.

با استفاده از این تکنیک علاوه بر بزرگنمایی بالای نمونه و تجزیه و تحلیل رامان با نقطه اثر لیزری، آنالیز عمقی نمونه قابل دستیابی خواهد بود. میکروسکوپ رامان کانفوکال در بسیاری از زمینه‌های مختلف از جمله علم مواد، پلیمرها، فیلم‌های نازک، نیمه هادی‌ها، ویژگی‌های گرافن/کربن، داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، پزشکی قانونی، زمین شناسی، کانی شناسی و علوم زیستی استفاده می‌شود.

در این مقاله تئوری طیف سنجی رامان بصورت مختصر مرور شده است سپس مکانیزم میکروسکوپ رامان کانفوکال مورد بحث قرار گرفته است. انتظار می‌رود که آشنایی با این تکنیک منجر به درک مفیدی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات آلی و معدنی شود.

علی حلاج جهانی

مرتضی نظری

سهیل شیرازیان

واژگان کلیدی

رامان،
طیف سنجی،
پراکندگی رامان،
میکروسکوپ کانفوکال،
تصویربرداری شیمیایی

(*) مسئول مکاتبات .
۱. مسئول دپارتمان نانومترولوژی / شرکت آریا فن ورزان.
ایمیل: nano@ariafan.com
تلفن: ۰۲۱۸۸۵۰۳۶۳۳
۲. کارشناس نانو مترولوژی / شرکت آریا فن ورزان.
ایمیل: nsb@ariafan.com
تلفن: ۰۲۱۸۸۵۰۳۶۳۳
۳. کارشناس نانو مترولوژی / شرکت آریا فن ورزان – دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده فیزیک.
ایمیل: nsc@ariafan.com و Soheilshirazian@alum.sharif.edu
تلفن: ۰۲۱۸۸۵۰۳۶۳۳

۱ مقدمه

از زمان گزارش اولیه پدیده رامان در سال ۱۹۲۸ تا کنون، تجهیزات و ادوات اپتیکی رامان تکامل یافته است. سیستم‌های اولیه شامل طیف‌سنج منشوری[۱] با صفحات عکاسی و منبع برانگیختگی لامپ جیوه بود. در دوره بین دهه‌های ۱۹۶۰ تا ۱۹۹۰ مشکلات ضعیف بودن سیگنال پراکندگی رامان، تداخل فلورسانس و عدم وجود کامپیوترهای پیشرفته و سریع از موانع فنی مهمی بود که مانع از استفاده تکنیک رامان در این دوره بود. در اواسط دهه ۱۹۹۰ با پیشرفت تکنولوژی قطعات و ادوات اپتیکی از جمله لیزر دیود، فیلترهای اپتیکی کارآمد، آشکارسازها و همین طور رایانه‌های پرقدرت، نسل جدیدی از سیستم‌های رامان توسعه پیدا کرد [۲].

بهینه‌سازی قطعات مختلف و افزودن امکانات جدید در تکنیک رامان به طور مداوم صورت می‌گیرد. طیف‌سنجی رامان در طول دهه گذشته به دلیل مزایای بسیاری که نسبت به دیگر روش‌های معمول آنالیز دارد، به یکی از قوی‌ترین تکنیک‌های آنالیز تبدیل شده است. از جمله مزیت‌های برجسته و کلیدی رامان عبارتند از: آنالیز مولکولی و شیمیایی کامل با تمام جزئیات، اطلاعات بسیار دقیق که استخراجش مشکل است (مانند بلورینگی[۲]، پلی مورفیسم[۳]، فاز)، سرعت آنالیز بالا، بدون نیاز به آماده سازی نمونه، غیر مخرب بودن آنالیز، تفکیک‌پذیری فضایی میکروسکوپی، آنالیز کانفوکال[۴] و سه بعدی، مناسب برای آنالیز in situ، in vitro و in vivo [۲، ۳].

به دلیل اینکه میزان کمی از نور پراکنده شامل پراکندگی رامان است و با این استدلال که کاهش اندازه نمونه باعث افزایش سیگنال می‌شود، میکروسکوپ رامان بسیار مورد توجه قرار گرفت. تصویربرداری شیمیایی رامان[۵] (RCI) یک تکنیک جدید است که ترکیبی از طیف‌سنجی رامان و تصویربرداری دیجیتال است. با استفاده از این تکنیک می‌توان ترکیب، توزیع فضایی و ویژگی‌های مورفولوژیکی نمونه را در ابعاد پیکسل در تصاویر شیمیایی رامان ایجاد کرد. تکنیک RCI در دهه گذشته به سرعت در حال پیشرفت است تا نیازهای کاربردی دانشگاه و صنعت را برآورده کند [۴].

در حالت کلی طیف رامان را می‌توان از تمام نمونه‌هایی که شامل پیوند مولکولی است به دست آورد. بنابراین اسپکتروسکوپی رامان برای آنالیز مواد جامد، پودر، مایعات، گازها، مواد بیولوژیک آلی و غیرآلی، محلول‌های مخلوط و خالص شیمیایی مناسب است. هرچند برای آنالیز گازها تجهیزات خاص مانند لیزر توان بالا و نمونه با طول مسیر زیاد مورد نیاز است. در بعضی حالات که فشار گاز بالا است، تجهیزات استاندارد رامان می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

۲ پراکندگی رامان

طیف‌سنجی عبارت است از برهم کنش تابش الکترومغناطیس با ماده که به جذب، نشر یا پراکنده شدن تابش الکترومغناطیس به وسیله اتم‌ها یا مولکول‌ها مربوط می‌شود. طیف‌سنجی قدرتمندترین وسیله برای شناسایی دنیای میکروسکوپی اتم‌ها و مولکول‌ها است.

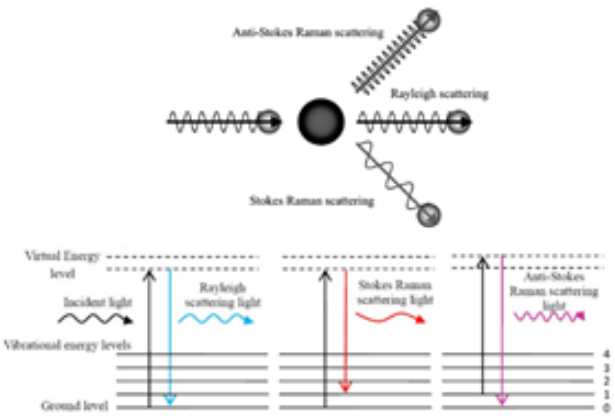
در صورتی که انرژی تابش با اختلاف بین دو تراز انرژی در نمونه منطبق باشد، تابش می‌تواند توسط نمونه جذب و یا سبب نشر القایی شود. اما اگر این انطباق صورت نگیرد، تابش از نمونه عبور می‌کند و بخش کمی از انرژی تابشی پراکنده می‌شود. رامان تکنیک پراکندگی نور ناشی از لرزش مولکولی توسط پرتو فرودی از یک منبع شدید نور لیزر است. بیشتر نور پراکنده شده دارای طول موج یکسان با منبع لیزر است و اطلاعات مفیدی ارائه نمی‌دهد که به آن پراکندگی ریلی[۶] می‌گویند. ریلی در سال ۱۸۷۱ میلادی نشان داد که شدت تابش پراکنده شده با عکس توان چهارم طول موج تابش متناسب است. با این حال میزان کمی از تابش (حدود ۰/۰۰۰۰۰۰۱٪) با طول موج‌های مختلف پراکنده می‌شود که به ساختار شیمیایی نمونه مربوط است و به آن پراکندگی رامان می‌گویند.

مطابق قوانین مکانیک کوانتومی، تابش را به صورت ذراتی از فوتون‌ها با انرژی مشخص در نظر می‌گیریم. در عبور از یک محیط مادی، این ذرات با اتم‌ها یا مولکول‌ها برخورد می‌کنند. اگر برخورد کاملا الاستیک باشد، تابش بدون تغییر در انرژی منحرف می‌شود (پراکندگی رایلی). اگر برخورد غیرالاستیک باشد و مبادله انرژی بین

[۱] prism spectrographs
[۲] crystallinity
[۳] polymorphism
[۴] Confocal
[۵] Raman chemical imaging
[۶] Rayleigh scattering

فوتون ها و نمونه انجام شود، آنگاه این مبادله انرژی سبب کاهش یا افزایش انرژی فوتون‌های پراکنده شده خواهد شد (پراکندگی رامان). تغییر انرژی باید برابر با اختلاف انرژی بین دو حالت از حالت‌های مجاز در نمونه (تغییر انرژی چرخشی، ارتعاشی، الکترونی، یا هر سه در نمونه مولکولی و یا تغییر انرژی الکترونی در نمونه اتمی) باشد. برخوردهای غیرالاستیک در مقایسه با برخوردهای الاستیک احتمال وقوع کم‌تری دارند، بنابراین شدت پراکندگی رامان کم تر از شدت پراکندگی ریلی است.

اگر انرژی فوتون به اندازه کافی بالا باشد، می‌تواند مولکول را در حالت برانگیخته قرار دهد. سپس مولکول برانگیخته بلافاصله با گسیل تابش به حالت پایه برمی‌گردد. اگر انرژی فوتون‌ها به اندازه کافی بالا نباشد تا مولکول‌ها را به حالت برانگیخته ببرد، ممکن است پراکندگی رامان یا پراکندگی ریلی اتفاق بیافتد. در این صورت بعد از برخورد فوتون به مولکول، مولکول به حالت برانگیخته مجازی می‌رود و با انتشار نور به حالت پایه بازمی‌گردد. اگر فوتون پراکنده انرژی خود را حفظ کند، پراکندگی ریلی خواهد بود و اگر فوتون پراکنده انرژی دریافت کرده یا از دست داده باشد، به ترتیب پراکندگی آنتی استوکس و استوکس رامان به وقوع می‌پیوندد (شکل ۱). از آنجا که پراکندگی آنتی استوکس با کاهش انرژی در نمونه همراه است، این پراکندگی تنها در حالتی اتفاق می‌افتد که نمونه قبل از برخورد با تابش در یک حالت برانگیخته باشد اما پراکندگی استوکس همراه با افزایش انرژی در مولکول است و همیشه امکان پذیر است، بنابراین شدت تابش استوکس از آنتی استوکس بیشتر است [۱].



شکل ۱: انواع پراکندگی فوتون‌ها در طیف‌سنجی رامان [۵]

۳ اطلاعات طیف رامان

با استفاده از طیف رامان می‌توان اطلاعات کیفی و کمی یه نمونه را به دست آورد. پروفایل طیف کلی (موقعیت پیک و شدت پیک وابسته) یک اثر انگشت شیمیایی منحصر به فرد را ارائه می‌دهد که برای شناسایی مواد و تشخیص از سایر مواد به کار می‌رود. شدت یک طیف به طور مستقیم به غلظت وابسته است. معمولا یک روش کالیبراسیون برای تعیین رابطه بین شدت پیک و غلظت استفاده می‌شود و سپس اندازه گیری معمول انجام می‌شود تا غلظت را آنالیز کند.

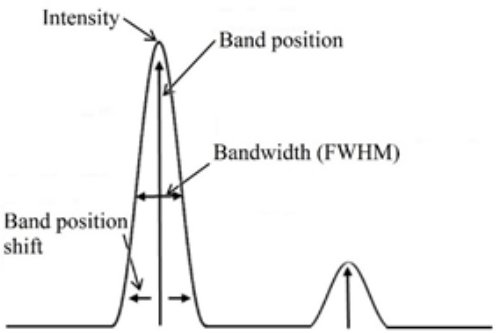
همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، یک طیف رامان تعدادی پیک دارد که نشان دهنده شدت و موقعیت طول موج نور پراکنده شده رامان است. هر پیک متناسب با یک ارتعاش پیوند مولکولی خاص است. عوامل متعددی در یک طیف رامان می‌تواند تأثیر گذار باشد. این عوامل عبارتند از:

۱. موقعیت پیک[۱]

۲. شدت پیک[۲]

۳. جابه‌جایی پیک[۳]

۴. پهنای پیک[۴]



شکل ۲: اطلاعات ارائه شده در طیف رامان [۵]

اطلاعاتی که از موقعیت پیک می‌توان دریافت کرد حاوی اطلاعات کیفی، شناسایی گروه‌های عاملی و تجزیه و تحلیل شیمیایی

[۱] Band Position
[۲] Band Intensity
[۳] Band Shift
[۴] Band Width

است. از شدت پیک می‌توان اطلاعاتی همچون غلظت و جهت‌گیری مولکولی (قطبش) را مشخص کرد. جابه‌جایی پیک نشان دهنده اطلاعات تنش و کرنش نمونه است و در نهایت پهنای پیک نیز فاز آمورفی/کریستالی نمونه را تعیین می‌کند.

با افزایش غلظت، شدت پیک افزایش می‌یابد. همچنین افزایش استرس و تنش، سبب افزایش جابه جایی پیک خواهد شد و با افزایش فاز کریستالی نمونه، پهنای پیک کاهش پیدا می‌کند [۶].

۴ تاریخچه میکروسکوپ کانفوکال

پایه‌گذاری میکروسکوپ نوری در حدود سال ۱۵۹۰ میلادی توسط هانسن[۱] شکل گرفت و اولین میکروسکوپ نوری توسط گالیله[۲] در سال ۱۶۱۰ میلادی اختراع شد. میکروسکوپ نوری مدرن، در ساده‌ترین حالت از دو عدسی تشکیل شده است. عدسی شی که فاصله کانونی بسیار کوتاهی دارد و عدسی چشمی که فاصله کانونی آن اندکی بیشتر است. هر دو عدسی برای کاهش ابیراهی از اجزای متعددی برخوردارند. میکروسکوپ‌ها در ابتدا به عنوان وسیله‌ای برای دیدن اجسام کوچک ساخته شده بودند؛ ولی در حال حاضر از آن ها برای بررسی و اندازه‌گیری ویژگی‌های ریز ساختاری مواد نیز استفاده می‌شود [۷].

مفهوم پایه میکروسکوپ کانفوکال توسط ماروین مینسکی[۳] در اواسط دهه ۱۹۵۰ توسعه یافت. به دنبال کار مینسکی، دیوید اگر[۴] و مژمیر پتران[۵] در اواخر دهه ۱۹۶۰ یک میکروسکوپ کانفوکال چند پرتو را ساختند و اولین تصاویر قابل تشخیص از سلول‌ها را در سال ۱۹۷۳ منتشر کرد. در اواخر دهه ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰، پیشرفت در تکنولوژی رایانه و لیزر همراه با الگوریتم‌های جدید برای تصاویر دیجیتال منجر به افزایش علاقه به میکروسکوپ کانفوکال گردید. اولین ابزار تجاری در سال ۱۹۸۷ پدید آمد. در دهه ۱۹۹۰، پیشرفت‌های اپتیک و الکترونیک، لیزرهای پایدار و قدرتمند، آینه‌ها با قابلیت کارآیی بالا، پوشش‌های دی الکتریک فیلم نازک و آشکارسازهایی با نویز کم باعث توسعه میکروسکوپ کانفوکال گردید. علاوه بر این در اواخر دهه ۱۹۹۰ با افزایش سرعت پردازش کامپیوتری، صفحه نمایش‌های پیشرفته و تکنولوژی ذخیره‌سازی، شرایط برای انقلاب در میکروسکوپ کانفوکال ایجاد شد.

۵ اساس کار میکروسکوپ کانفوکال

اساس کار میکروسکوپ کانفوکال در شکل ۳ نشان داده شده است. نور همدوس لیزر (منبع برانگیختگی) از طریق یک دیافراگم پین هول عبور می‌کند[۶] و نمونه را به صورت نقطه‌ای اسکن می‌کند. دیافراگم پین هول دوم در مقابل آشکارساز قرار دارد. همزمان که لیزر با استفاده از یک آینه کروماتیکی[۷] سرتاسر نمونه را در صفحه فوکوس اسکن می‌کند، نور منتشر شده از نمونه بعد از عبور از آینه کروماتیکی در نقطه دیافراگم پین هول آشکارساز جمع‌آوری می‌شود [۸].

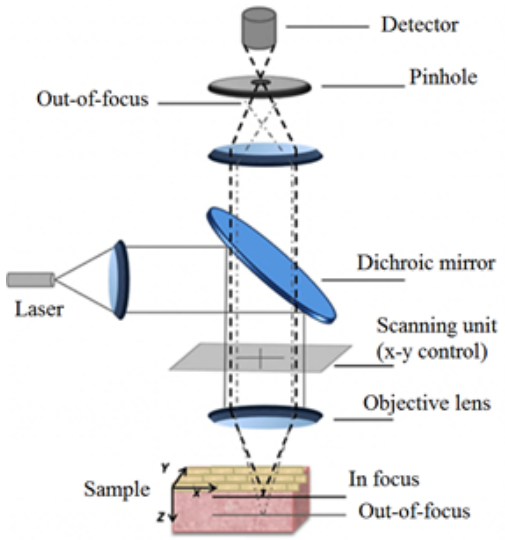
با حذف کردن نورهای خارج از فوکوس[۸] که از نقاط بالا و پایین صفحه فوکوس ساطع می‌شوند، کنتراست به طرز چشمگیری افزایش می‌یابد.

در هر لحظه فقط یک نقطه از نمونه قابل مشاهده است و تصویر حاصل مجموع آنالیز تمام نقاط است. یکی از مهم‌ترین اجزای اپتیکی میکروسکوپ کانفوکال، دیافراگم پین هول است که به عنوان فیلتر فضایی در مقابل آشکارساز قرار می‌گیرد. معمولاً دیافراگم‌هایی با قطر مختلف روبروی آشکارساز قرار می‌گیرند که اپراتور را قادر می‌سازد اندازه پین هول (و ضخامت بخش نوری) را تنظیم کند.

امروزه برای ایجاد میکروسکوپ کانفوکال از چندین روش استفاده می‌شود، به عنوان مثال دریچه کانفوکال واقعی[۹]، یا تکنیک شبه کانفوکال[۱۰] که بعضی از روش‌ها نسبت به سایر روش‌ها مزایایی دارند. ثابت شده است که با استفاده از یک میکروسکوپ رامان کانفوکال با دریچه کانفوکال واقعی، امکان آنالیز ذرات منفرد یا لایه‌های با ابعاد

[۱] Janssen
[۲] Galileo
[۳] Marvin Minsky
[۴] David Egger
[۵] Mojmir Petran
[۶] pinhole aperture
[۷] dichromatic mirror
[۸] out-of-focus
[۹] true confocal aperture
[۱۰] pseudo confocal

کمتر از یک میکرون فراهم است [۱۰].



شکل ۳: اساس کار میکروسکوپ رامان کانفوکال [۹]

۶ میکروسکوپ رامان کانفوکال

تصویربرداری رامان یک روش قدرتمند برای تولید تصاویر شیمیایی دقیق بر اساس طیف رامان نمونه است و توانایی ارائه تصاویر دو بعدی و سه بعدی را فراهم می‌کند. طیف کامل به دست آمده در هر پیکسل، برای تولید تصاویر رنگی کاذب بر اساس ترکیب مواد، فاز، تبلور و فشار مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این تکنیک تصویربرداری با وضوح بالا را میسر می‌کند و به طور گسترده‌ای برای توصیف مواد و نمونه از نظر ترکیب شیمیایی آنها استفاده می‌شود. با تصاویر رامان، اطلاعات مربوط به ترکیبات شیمیایی و توزیع آنها در نمونه را می‌توان به وضوح نشان داد [۱۲].

پرتو لیزر از طریق میکروسکوپ برای برانگیختن یک نقطه کوچک با قطر در حدود ۰/۵-۱۰ میکرومتر کانونی می‌شود. سیگنال رامان نمونه از نقطه برانگیخته جمع‌آوری می‌شود و از طریق میکروسکوپ برای آنالیز اطلاعات طیفی به اسپکترومتر برمی‌گردد. کاربری ساده میکروسکوپ رامان کانفوکال بر محبوبیت این تکنیک افزوده به گونه‌ای که به سادگی نمونه را در زیر میکروسکوپ قرار داده، فوکوس و اندازه‌گیری انجام می‌شود.

از آنجایی که میکروسکوپ رامان کانفوکال توانایی آنالیز نمونه در محور XY (جانبی) و Z (عمق) را ارائه می‌دهد، این تکنیک برای آنالیز نمونه‌های لایه‌لایه (مانند ورقه پلیمر)، نمونه‌های مرکب (مانند شیشه و مواد معدنی)، نمونه‌های نازک بر روی یک زیرلایه (مانند سلول و بافت بر روی یک اسلاید میکروسکوپ) و مواد در ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی (مانند یک مایع در بطری) مفید است [۱۳].

۱.۶ اجزای دستگاه میکروسکوپ رامان کانفوکال

دستگاه میکروسکوپ رامان کانفوکال، اجزای متفاوتی نسبت به یک طیف‌سنج رامان معمولی دارد. عمده تفاوت آن وجود بخش میکروسکوپ می‌باشد که این میکروسکوپ می‌تواند پیکربندی‌های مختلف داشته باشد؛ از جمله کانفوکال واقعی یا شبه کانفوکال. عناصر اساسی دستگاه میکروسکوپ رامان کانفوکال عبارتند از: منبع نوری، اسپکترومتر، آشکارساز و اپتیک دستگاه.

منبع نوری[۱] : در این دستگاه از منبع نور لیزری قدرتمند و تک رنگ استفاده می‌شود. انتخاب طول موج لیزر بر اساس کاربرد مورد نظر است تا بهترین برانگیختگی نمونه صورت گیرد و می‌تواند از ماوراء بنفش دور[۲] تا مادون قرمز[۳] نزدیک باشد. رایج‌ترین طول موج‌های یک دستگاه میکروسکوپ رامان لیزرهای 532 nm، 633 nm و 785 nm می‌باشند.

همان‌طور که قبلاً نیز به آن اشاره شد، رابطه بین شدت سیگنال رامان با طول موج لیزر مورد استفاده طبق رابطه زیر می‌باشد:

$$I_{Raman} \alpha \frac{۱}{\lambda^۴}$$

از دلایل اصلی استفاده از لیزرهای مختلف در یک دستگاه میکروسکوپ رامان، حذف تداخل‌های پدیده فلورسانس در برخی نمونه‌ها، حذف پدیده جسم سیاه، عمق نفوذ متفاوت لیزرها، طیف رزونانس رامان و... می‌باشد.

میکروسکوپ و اپتیک دستگاه[۴] : این بخش شامل میکروسکوپ، لنزهای چشمی، لنزهای شئ، استیج میکروسکوپ و... می‌باشد.

[۱] Light Source
[۲] Deep UV
[۳] NIR
[۴] Optical setup

فیلترها: شامل فیلترهای حذف پراکندگی رایلی، فیلترهای ULF (Ultra Low Frequency)، Edge filter و Notch Filter می‌باشد.

اسپکترومتر[۵] : اجزای این بخش شامل مونوکروماتور، توری و فیلترهای مخصوص می‌باشد. عوامل متعددی در رزولوشن طیفی تأثیر گذارند که عبارتند از: ۱. تعداد شیارهای گریتینگ ۲. فاصله کانونی ۳. طول موج و مشخصات لیزر

هرچه فاصله کانونی[۱] و تعداد شیارهای گریتینگ افزایش یابد، رزولوشن طیفی افزایش خواهد یافت و طیف واضح‌تری خواهیم داشت.

آشکار ساز[۲]: آشکارسازهای مورد استفاده در یک میکروسکوپ رامان، بسته به طول موج لیزر انتخاب خواهند شد و انواع آن‌ها عبارتند از: CCD، InGaAs، PMT و.... [۱۴].

۲.۶ مزیت‌های و کاربردهای میکروسکوپ رامان کانفوال

به دلیل رشد انفجاری نانوساختارها در سال‌های اخیر، مزیت‌های میکروسکوپ رامان کانفوکال به طور محسوسی در بررسی خصوصیات نانو سیستم‌ها نمایان شده است. میکروسکوپ رامان کانفوکال برای بزرگ نمایی ذرات به صورت کانفوکال طراحی شده است. تصویر ایجاد شده ویژگی‌های وضوح و تفکیک را بسیار بهتر از میکروسکوپ‌های معمولی نشان می‌دهد. علاوه بر این، به دلیل ارتباط این میکروسکوپ با سیستم‌های رایانه‌ای، دریافت تصاویر سه بعدی، محیطی و سطحی با دقت بسیار بالا که تمامی مشخصات سطح نمونه را نشان می‌دهد امکان‌پذیر است. همچنین وجود سیستم دیجیتالی امکان اندازه‌گیری مشخصات سطح نمونه در حد نانومتر را ممکن می‌سازد. این تکنیک نیاز به هیچ‌گونه برچسب زدن نمونه یا دیگر روش‌های آماده‌سازی ندارد؛ همچنین روشی غیر مخرب است که از نابود شدن و تغییر ماهیت دادن نمونه جلوگیری می‌کند.

طیف رامان آب خیلی ساده است و تنها تعداد کمی پیک دارد. بنابراین کم‌ترین تداخل را با پیک‌های جسم حل شده ایجاد می‌کند. به دلیل عدم تداخل طیفی، برای نمونه‌های محلول در آب و نمونه‌های زیستی بسیار مناسب است. طیف‌سنجی رامان هم کیفی است و هم کمی. پروفایل طیف کلی (موقعیت پیک و شدت پیک وابسته) یک اثر انگشت شیمیایی منحصر به فرد فراهم می‌کند که برای شناسایی مواد و تشخیص از سایر مواد به کار می‌رود. شدت یک طیف به طور مستقیم به غلظت وابسته است. در مواد کامپوزیت، شدت پیک‌های نسبی اطلاعاتی در مورد غلظت نسبی مولفه‌ها ارائه می‌کند. همچنین شدت پیک مطلق برای اطلاعات مربوط به غلظت مطلق استفاده می‌شود [۱۵].

۷ نتیجه گیری

اثر رامان از برهم‌کنش متقابل حرکات ارتعاشی و/یا چرخشی مولکول‌ها با تابش الکترومغناطیسی حاصل می‌شود.

میکروسکوپ رامان کانفوکال ابزاری برای تصویربرداری با وضوح بالا است که به طور گسترده‌ای برای توصیف مواد و نمونه از نظر ترکیب و توزیع شیمیایی آنها استفاده می‌شود. خواص شیمیایی ترکیبات جامد و مایع را می‌توان با تفکیک‌پذیری فضایی آنالیز کرد. میکروسکوپ رامان کانفوکال این امکان را فراهم می‌کند تا طیف‌سنجی رامان با تفکیک‌پذیری فضایی میکروسکوپی، در راستای جانبی (XY) و عمق (Z) انجام شود. با استفاده از کانفوکال واقعی (که شامل یک دیافراگم سوراخ سوزنی قابل تنظیم است) تفکیک‌پذیری عمق میکرون امکان‌پذیر است و اجازه می‌دهد لایه‌های یک نمونه به طور مجزا آنالیز شود.

مراجع

[۱] اصول نظری طیف‌سنجی اتمی و مولکولی، مریم دهستانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۱۳۸۷

[2] J. D. WINEFORDNER, (2000). Raman Spectroscopy for Chemica1 Analysis, John Wiley & Sons.

[3] Wenyan, Z., et al. (2017). “Three-dimensional ordered macroporous nano-architecture and its enhancing effects on Raman detection sensitivity for Eosin Y molecules” Materials and Design 119.

[4] Stewart, S., et al. (2012). “Raman Imaging” Annual Review of Analytical Chemistry.

[5] J. D. WINEFORDNER, (2000). Raman Spectroscopy for Chemica1 Analysis, John Wiley & Sons.

[6] Zongwei., X, et al. (2018). “Topic Review: Application of Raman Spectroscopy Characterization in Micro/Nano-Machining” Micromachines, 9, 361.

[۵] Wavelength Selector
[۱] Focal Length
[۲] Detection Device

[7] F. A. Jenkins, (1976). Fundamentals of Optics, McGraw Hill.

[8] http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html

[9] F. A. Jenkins, (1976). Fundamentals of Optics, McGraw Hill.

[10] Neil Lagali, (2013). Confocal Laser Microscopy, Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences.

[11] McCreery, R.L. (2000). "Raman Spectroscopy for Chemical Analysis" John Wiley and Sons, New York, NY, USA.

[12] http://www.horiba.com/us/en/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/is-it-possible-to-work-with-large-laser-spot-sizes-on-a-raman-microscope/

[13] http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html

[14] Slobodan Šašić,. (2008). Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York, NY, USA.

[15] http://www.horiba.com/us/en/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/can-a-raman-microscope-be-used-for-analysis-of-liquids/