

Capitolo 9: Preparazione dei provini per le tecniche RAMAN

Le tecniche RAMAN vengono impiegate sempre più frequentemente nel mondo analitico, soprattutto perché possono validamente sostituire due importantissime specialità analitiche:

- la spettrometria infrarossa per gran parte delle molecole organiche
- la diffrazione a raggi X per molti composti inorganici

La tecnica RAMAN si presta ad essere più semplice da usare, rispetto alle due tecniche citate in quanto non necessita di particolari preparative complesse, non ha problemi di sicurezza intrinseca (come nel caso dei raggi X) e può essere applicata praticamente a tutti i composti solidi e liquidi, oltre alle inclusioni fluide all'interno dei minerali e dei composti sintetici.

Le banche dati che accumulano spettri di riferimento RAMAN sono ormai moltissime, anche nel settore inorganico, dove RAMAN è applicata da meno tempo.

Vediamo in dettaglio in cosa consiste la spettroscopia RAMAN e cosa ci si può fare nel campo della SPECIAZIONE dei composti solidi.

9.1 Teoria della spettroscopia RAMAN

La spettroscopia RAMAN è allo stato attuale la più potente tecnica di analisi molecolare tra quelle disponibili per l'analisi dei materiali. Essa può fornire informazioni sulla composizione molecolare di solidi, liquidi e gas, sui legami chimici, sull'ambiente chimico, la fase e la struttura dei composti cristallini. La tecnica sfrutta un principio fisico scoperto nel 1928 dal fisico indiano C.V. Raman, che gli valse il premio Nobel nel 1931. Raman scoprì che una piccola frazione della radiazione diffusa da certe molecole aveva energia diversa da quella incidente e che la differenza di energia era legata al consumo di questa per effetto di vibrazioni molecolari, che davano origine alla diffusione della radiazione: l'effetto RAMAN. In pratica, quando una radiazione monocromatica incide su una superficie di un oggetto, la radiazione può essere:

- assorbita, se ha energia pari ad una transizione ad un livello energetico superiore (come nel caso della radiazione UV, visibile o IR)
- riflessa, se non interagisce con la materia
- diffusa, se interagisce senza causare transizioni energetiche

Se la diffusione avviene per interazione elastica, cioè senza trasferimento di energia, i fotoni hanno la stessa energia della radiazione incidente – diffusione di Rayleigh

Se la diffusione avviene con interazione anelastica, cioè con trasferimento di energia dal fotone alla particella del materiale, il fotone diffuso ha energia rispettivamente minore o maggiore di quello incidente. Questo è il caso della “diffusione Raman”, che avviene in un numero di casi molto limitato, circa 10^6 volte meno frequentemente della diffusione elastica.

Lo spettro Raman di una molecola irraggiata da luce monocromatica è caratterizzato da tre tipi di segnali:

- la radiazione Rayleigh, nettamente la più intensa dello spettro, avente la stessa lunghezza d'onda della radiazione incidente ed energia $h\nu_0$
- i segnali corrispondenti alle interazioni anelastiche in cui sono emessi fotoni ad energia minore di quelli incidenti: le cosiddette linee Stokes, con energia $h\nu_0 - h\nu_1$
- i segnali corrispondenti alle interazioni anelastiche in cui sono emessi fotoni ad energia maggiore di quelli incidenti: le cosiddette linee antiStokes, con energia $h\nu_0 + h\nu_1$

A temperatura ambiente, il livello vibrazionale fondamentale è più popolato, quindi le linee Stokes sono più intense delle anti-Stokes. Inoltre, le linee Stokes e quelle anti-Stokes sono simmetriche rispetto alla linea Rayleigh (differiscono entrambe di $h\nu_1$ rispetto alla Rayleigh)

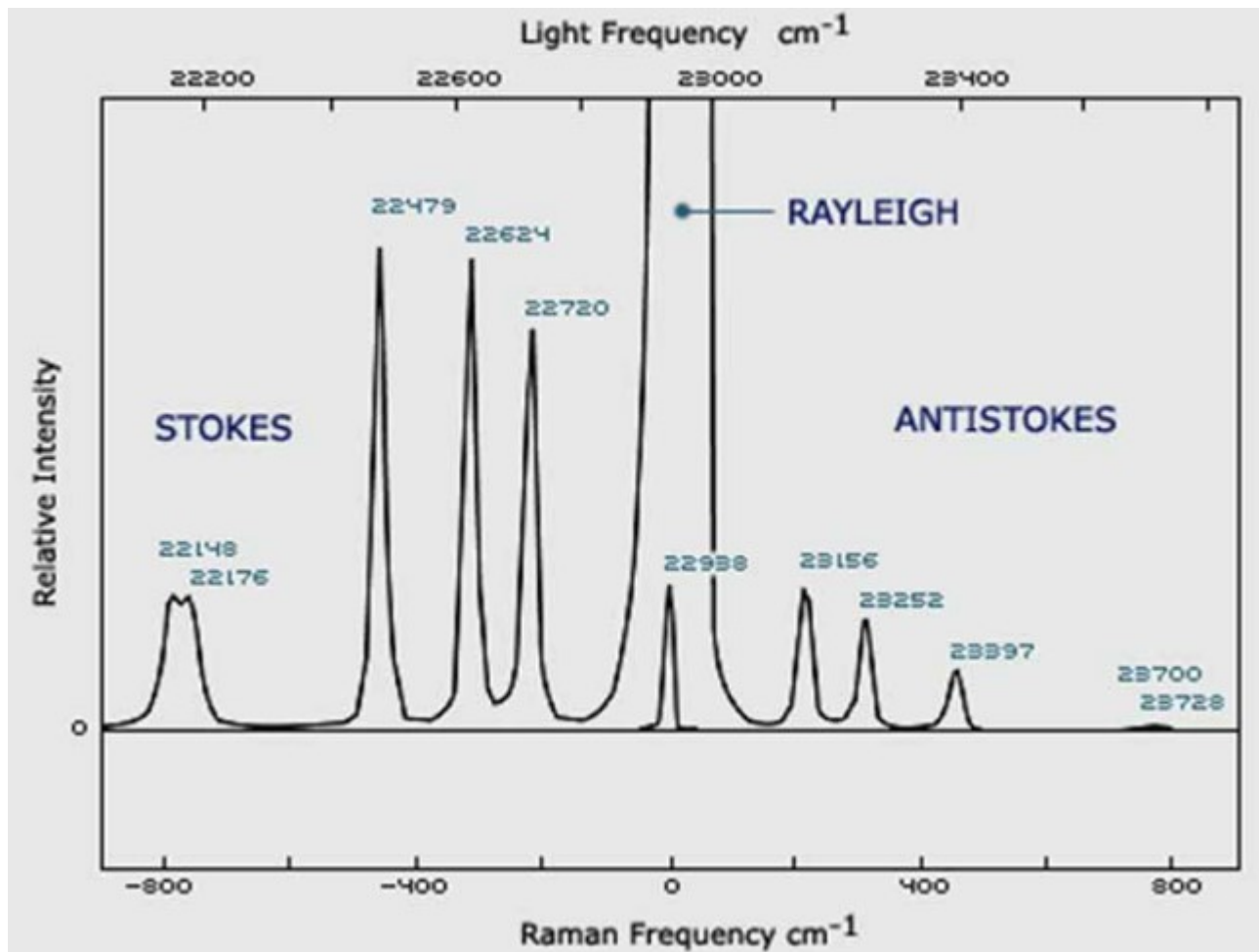


Figura 74: Composizione spettrale dello spettro Raman

Le informazioni che lo spettro Raman di una molecola può dare discendono quasi esclusivamente dalle righe Stokes. La radiazione Rayleigh non fornisce alcuna informazione in quanto ha la stessa energia in ogni campione; le righe anti-Stokes sono generalmente di intensità troppo bassa per essere rivelate e possono essere sfruttate soltanto per indicare la temperatura del campione in base al rapporto con l'intensità delle righe Stokes. Le righe Stokes, invece, sono legate ai gruppi funzionali della molecole del campione e ai loro modi di vibrazione, in maniera analoga alla spettroscopia infrarossa (pur con meccanismi diversi), e sono quindi sfruttate a scopo diagnostico per identificare qualitativamente i composti presenti nel campione.

Le differenze energetiche tra la radiazione incidente (quindi anche la radiazione di Rayleigh) e le radiazioni Raman sono, in termini di numero d'onda, comprese nell'intervallo del MIR (Medium Infrared Region) cioè tra 2.5 e 50 μm , cioè tra 4000 e 200 cm^{-1} . Per questo motivo, in molti casi lo spettro Raman e quello infrarosso in assorbimento si assomigliano perché derivano entrambi da vibrazioni molecolari quantizzate.

Le due tecniche possono essere considerate complementari, sia per la natura del fenomeno (transizioni energetiche nell'IR, VIS e UV, diffusione anelastica nel Raman) sia perché le cosiddette Regole di selezione, che determinano quali modi di vibrazione sono attivi o no, sono diverse: nell'IR sono assorbite energie che provocano cambiamenti nel momento di dipolo di una molecola, mentre nel Raman è richiesto il cambiamento di polarizzabilità, legata a sua volta alla possibilità di distorsione della nuvola elettronica. Per questi motivi, alcune bande sono comuni tra IR e Raman, altre no.

Rispetto all'IR, in Raman sostanze come acqua e vetro non causano interferenze e le linee Raman sono in genere più strette e più semplici da identificare. In IR abbiamo una maggiore ricchezza di segnali e quindi una maggiore applicabilità.

9.2 Strumenti RAMAN, in breve

Gli strumenti Raman sono estremamente semplici nella loro conformazione generale. Contengono, in genere, tre unità:

- un generatore di luce monocromatica, cioè un Laser di potenza media-elevata, da 1 a 10 mW/ μm^2 , con lunghezze d'onda comprese nel range del visibile e dell'infrarosso
- un sistema ottico di puntamento, comprensivo di telecamera coassiale al fascio
- un sistema ottico di monocromatizzazione e detezione della radiazione diffusa Stokes

Il fascio diffuso viene filtrato da un filtro passa basso della frazione di spettro Rayleigh e di quella antiStokes a più alta energia.

Circa i sistemi di monocromatizzazione, i Raman hanno seguito la stessa evoluzione degli strumenti IR. Nel passato la maggior parte delle sonde Raman era dotata di monocromatori a reticolo, analoghi agli strumenti dispersivi IR. La radiazione incidente e diffusa è comunque nel range del visibile e di conseguenza, anche i monocromatori erano fondamentalmente più semplici (figura 75). Gli strumenti moderni hanno un interferometro Michaelson, coadiuvato dall'algoritmo FFT, analogo al sistema FT-IR, che consente una misura più veloce e con maggior rapporto segnale disturbo

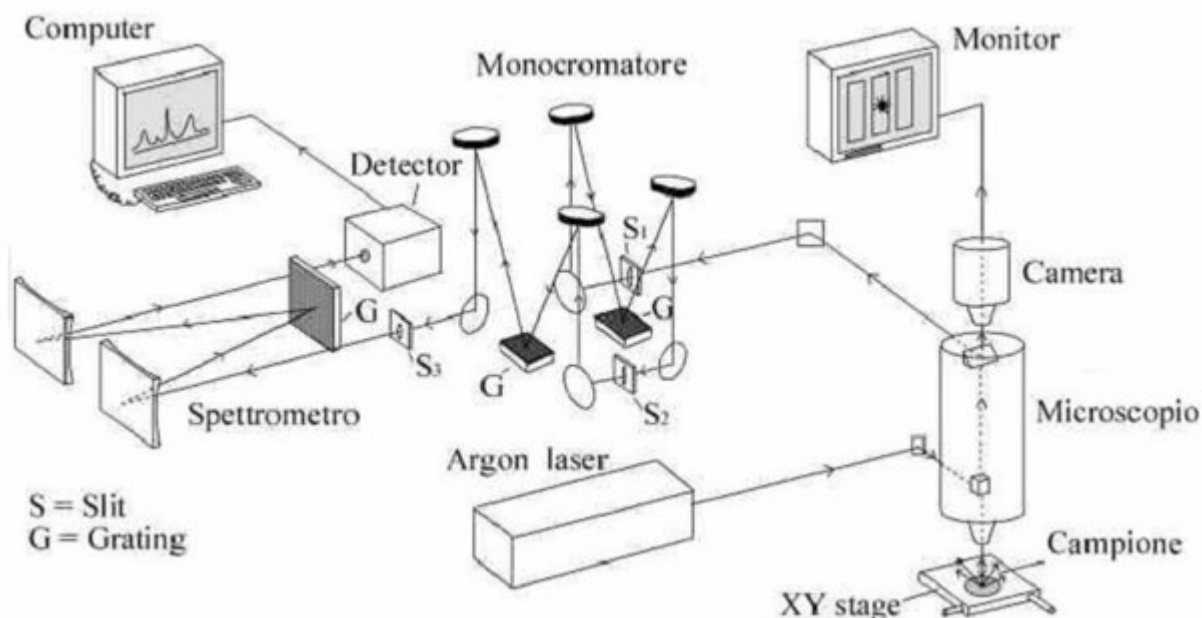


Figura 75: Schema di uno strumento Raman dispersivo

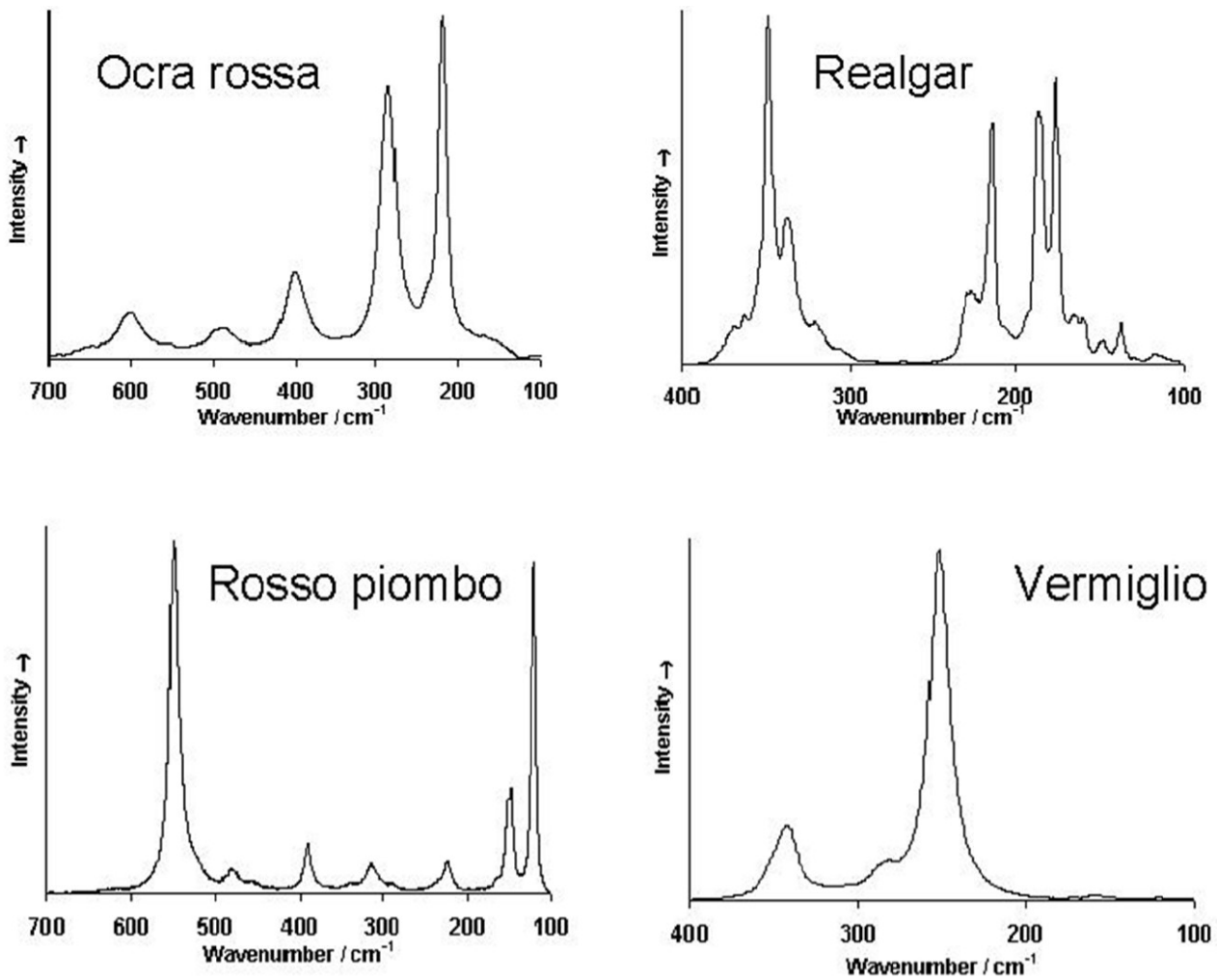


Figura 76: Alcuni spettri Raman di composti pittorici (da www.didattica.unitus.it)

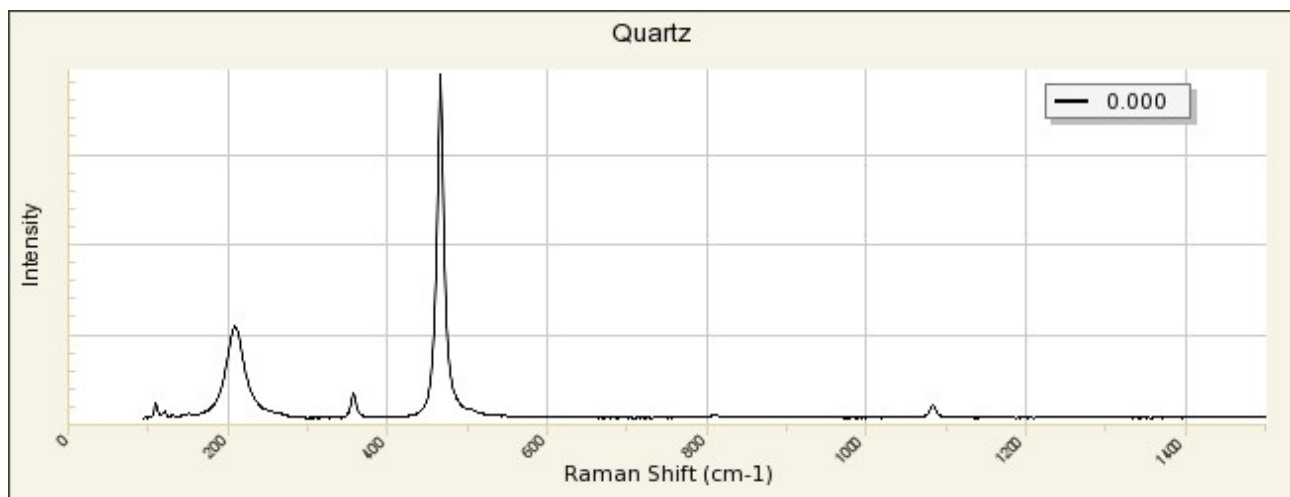


Figura 77: Spettro Raman di quarzo

9.3 Banche dati spettrali Raman

Essendo una tecnica analitica relativamente recente, la disponibilità di banche dati non è ancora al livello della diffrazione a raggi X (Powder Diffraction files, oltre 2 milioni di specie organiche ed inorganiche note e catalogate) o dell'IR (oltre 5 milioni di spettri noti e catalogati).

Per questo, consigliamo al Lettore di utilizzare le risorse del Web ed in particolare, nel campo minero-petrografico e gemmologico, è estremamente utile la banca dati del Progetto RRuff.

Il progetto RRUFF™ è nato nell'Università dell'Arizona, Dipartimento di Geoscienze, Tucson, AZ, USA. Gli Autori di questa banca dati, lavorano per creare un set completo di dati spettrali di alta qualità da minerali ben caratterizzati e sta sviluppando la tecnologia per condividere queste informazioni con il mondo. I dati raccolti forniscono uno standard per mineralogisti, geoscientisti, gemmologi e il pubblico in generale per l'identificazione dei minerali sulla terra e per l'esplorazione planetaria. Altra particolarità della banca dati RRuff è la sua gratuità, come dovrebbe essere per la maggior parte delle risorse della conoscenza.

Per chi è interessato o vuole acquisire spettri, confrontarli con i propri o donare i propri spettri Raman, l'indirizzo è:

http://rruff.info/about/about_contact.php



9.4 Come migliorare la detezione degli spettri RAMAN

Scelta delle lunghezze d'onda di eccitazione

Una delle domande più frequenti che arrivano dagli Utenti che non conoscono la spettroscopia Raman è: "Di quale lunghezza d'onda di eccitazione laser ho bisogno?" Naturalmente, la risposta a questa domanda è che dipende interamente dai materiali che si desidera analizzare.

La sezione trasversale di scattering Raman del materiale è importante, così come le sue proprietà fisiche e ottiche. Ad esempio, se il campione è trasparente alla lunghezza d'onda di eccitazione e abbastanza sottile, ci si può aspettare un contributo spettrale dal substrato su cui è montato o posizionato il campione. E quel contributo spettrale può essere lo scattering Raman o la fotoluminescenza.

Esaminiamo alcune delle considerazioni relative alla scelta di una lunghezza d'onda di eccitazione laser per la spettroscopia Raman. Per cominciare, si dovrebbe essere consapevoli che la forza di scattering Raman è proporzionale alla quarta potenza della frequenza di eccitazione, ν^4 .

Di conseguenza, ci si può aspettare di ottenere un segnale Raman molto più forte da un dato campione quando si utilizza una frequenza di eccitazione più alta. La frequenza della luce è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda, e quindi, a parità di altre condizioni, la lunghezza d'onda di eccitazione più corta produrrà un segnale Raman più forte.

Questo è uno dei motivi per cui, quando viene data una scelta, gli spettroscopi Raman preferiscono più brevi lunghezze d'onda di eccitazione.

Un'altra considerazione quando si seleziona una lunghezza d'onda di eccitazione può essere la variazione della densità ottica del materiale in funzione della lunghezza d'onda.

Se il materiale è trasparente, la profondità di messa a fuoco e il volume focale del raggio laser saranno determinati dall'apertura numerica dell'obiettivo, dalla lunghezza d'onda della luce laser e dal componente reale dell'indice di rifrazione “n” del campione a quella lunghezza d'onda.

Tuttavia, se il campione non è trasparente (ovvero, la componente immaginaria “ik” dell'indice di rifrazione del campione è diversa da zero), la profondità della penetrazione della luce sarà dettata non dall'ottica fisica ma dall'assorbibilità del campione a quella lunghezza d'onda.

Queste circostanze hanno permesso a molti spettroscopisti di eseguire analisi stratigrafiche in profondità di materiali, modificando la lunghezza d'onda di eccitazione. In generale, più lunga è la lunghezza d'onda dell'eccitazione più profonda è la profondità nella quale penetra la luce. La variazione della penetrazione della profondità nella regione visibile ha permesso agli spettroscopisti Raman di eseguire profili di profondità nel Si impiantato con ioni, semplicemente modificando la lunghezza d'onda di eccitazione.

Se parliamo di film sottili, è utile controllare la profondità di penetrazione del fascio per limitare l'analisi al solo strato superficiale. Immaginiamo un film organico, depositato su silicio metallico.

Se la lunghezza d'onda di eccitazione è troppo lunga, la luce laser penetrerà attraverso il film fino al substrato. Più profonda è la penetrazione della luce laser, maggiore è il contributo frazionario del substrato al segnale e allo spettro Raman globali. Il risultato è che il segnale del substrato sarà molto più forte del substrato, stravolgendo il segnale molto più debole del film sottile.

Per risolvere il problema è necessario limitare la profondità di penetrazione della luce laser. Pertanto, la maggior parte delle analisi di film sottili concentrate su un substrato, richiede lunghezze d'onda di eccitazione nella regione viola o più brevi.

La risoluzione spaziale laterale è un'altra considerazione quando si seleziona una lunghezza d'onda di eccitazione. Sempre più spesso, la spettroscopia Raman viene eseguita su scala micrometrica usando spettrometri Raman accoppiati a microscopi ottici. Qui, la risoluzione spaziale della misura è fondamentale e occorre conoscere la dimensione del punto laser che deve essere commisurata con la risoluzione da dare all'immagine della struttura.

Di conseguenza, quando si seleziona una lunghezza d'onda di eccitazione, è necessario sapere che la dimensione del raggio laser focalizzato è limitata dalla diffrazione e dipende dalla lunghezza d'onda del laser. La dimensione del punto laser ideale [DAiry]) e la risoluzione spaziale (ρ) per la configurazione micro-Raman sono dati dalle seguenti espressioni:

$$D_{airy} = 1.22 \lambda / NA \quad (1)$$

$$\rho = 0.61 \lambda / NA \quad (2)$$

Dove NA è l'apertura numerica dell'obiettivo e λ è la lunghezza d'onda del laser. Laser a 532 nm e 785 nm hanno una risoluzione spaziale, rispettivamente, di 360 e 530 nm.

Il Lettore tenga conto di queste informazioni quando sceglie un Raman.

Il Fondo fotoluminescente

Chiunque abbia avuto esperienza con la spettroscopia Raman ti dirà che la fluorescenza è la nemesis degli spettroscopi Raman. Anche se la sostanza primaria nel campione non emette essa stessa, minime impurità del campione possono causare abbastanza fotoluminescenza da sopraffare il segnale Raman. Il motivo principale di questo problema è che l'emissione è un processo "one-photon" mentre la dispersione del Raman è un processo a due fotoni; cioè la fotoluminescenza ha una probabilità molto maggiore di verificarsi rispetto allo scattering Raman.

In linea generale, l'eccitazione laser permette la generazione di un solo fotone Raman per ogni 10^6 - 10^9 fotoni incidenti sul campione. Pertanto, la presenza di un fluoroforo con efficienza quantica anche estremamente bassa può produrre un'emissione che travolge il segnale Raman.

Una semplice sottrazione del fondo di fotoluminescenza non è sufficiente a rivelare lo spettro Raman rimanente, se i segnali Raman e fotoluminescenti sono sovrapposti. Il problema è che la fotoluminescenza di fondo può essere così grande che il rumore generato da questo segnale è nell'ordine o addirittura maggiore del solo segnale Raman.

Per evitare il fondo da fotoluminescenza e il rumore che produce, si dovrebbe identificare una lunghezza d'onda di eccitazione che non induca la fotoluminescenza nel campione né dal componente principale né dalle impurità. Ecco perché gli spettroscopi Raman della vecchia scuola preferiscono operare con più lunghezze d'onda quando lavorano con tanti materiali diversi.

Molti campioni che sembrano trasparenti produrranno comunque uno sfondo fotoluminescente, a volte così forte che non si osserva altro che fotoluminescenza nello spettro Raman. Si scopre che questo è spesso il caso dei polimeri commerciali, anche quelli che sono incolori e trasparenti. I polimeri stessi sono molto

spesso trasparente con assorbimento a causa delle transizioni elettroniche che si verificano generalmente nella regione ultravioletta dello spettro. I polimeri colorati spesso appaiono in questo modo a causa di coloranti o coloranti aggiunti al polimero nel processo di fabbricazione.

Ci si potrebbe aspettare che i polimeri commerciali incolori e trasparenti producano uno spettro Raman libero da fotoluminescenza senza alcun background significativo. Tuttavia, molto spesso non è così. Provate a ottenere uno spettro Raman usando l'eccitazione di 532 nm di una bottiglia di plastica trasparente incolore che conteneva una bevanda o un altro prodotto commerciale e molto probabilmente genererete una forte fotoluminescenza nella regione in cui ci si aspetta di rilevare lo scattering Raman.

Inoltre, mentre si osserva lo spettro nella visualizzazione in tempo reale, è possibile che lo sfondo fotoluminescente diminuisca nel tempo con l'illuminazione continua. Questo fenomeno familiare è chiamato **fotobleaching** ed è stato ampiamente utilizzato negli ultimi decenni dagli spettroscopisti Raman per ottenere uno spettro Raman con un buon rapporto segnale-rumore, molto migliore di quello esistente all'inizio della misura.

La giustificazione per l'uso del fotobleaching è che la fotoluminescenza non proviene dal polimero stesso ma da additivi che sono ancora presenti nel processo di polimerizzazione o che sono stati aggiunti per altri motivi, ad esempio per la stabilizzazione o per aumentare la brillantezza.

Se lo spettro Raman del polimero sfuso rimane essenzialmente lo stesso nel tempo del fotobleaching e della misurazione, allora l'assunzione che il fotobleaching sia il risultato della fotolisi dei componenti in traccia risulterà ragionevole. Come in molte cose nell'analitica strumentale, anche qui è necessaria una buona dose di esperienza, per dosare la potenza del laser e i tempi di incidenza per aumentare l'effetto di "sbiancamento" evitando nel contempo di distruggere il campione. Inoltre, quando possibile, va determinato se lo spettro risultante è veramente del materiale cercato o di un prodotto di fotolisi indotto dal laser.

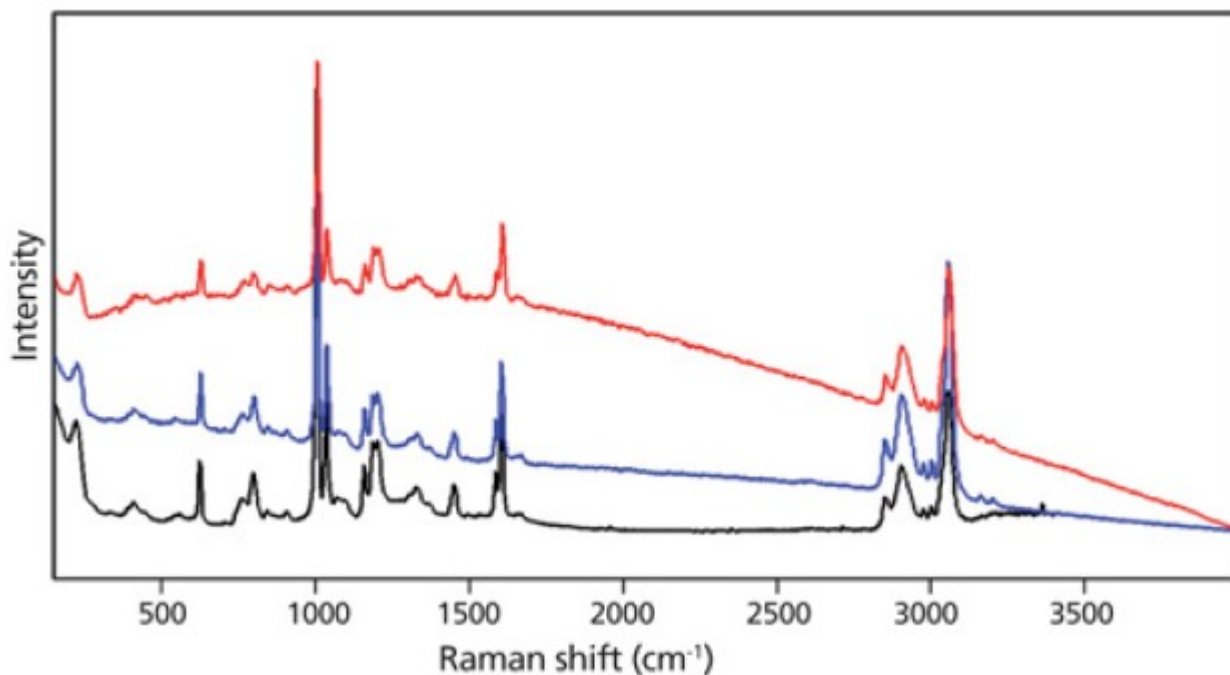


Figura 78: Spettro Raman di polistirene: eccitazione laser a 532 nm (spettro rosso), 638 nm (spettro blu) e 785 nm (spettro nero)

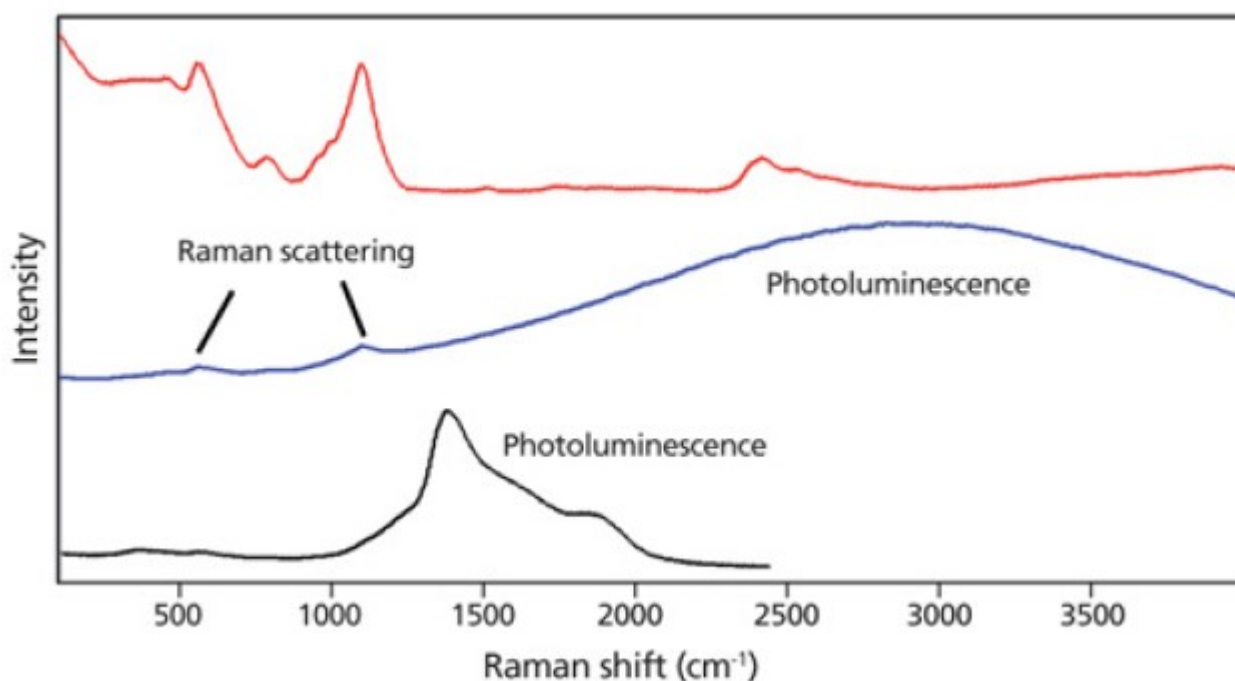


Figura 79: Spettri Raman eseguiti su vetrino da microscopia ottica; in rosso lo spettro ottenuto con eccitazione a 532 nm, in blu a 638 nm e in nero a 785 nm

Nel caso del polistirene (figura 78), abbiamo visto il vantaggio dell'utilizzo dell'eccitazione laser a 785 nm per eliminare la fotoluminescenza generata dalla luce a 532 nm.

Esistono molti campioni, in particolare nelle bioscienze, per i quali l'eccitazione a 785 nm è positiva e produce la minima quantità di fotoluminescenza. Tuttavia, dobbiamo ricordare che la luce laser penetrerà in campioni trasparenti o traslucidi, in particolare se sono sottili, e quindi potenzialmente genereranno scattering Raman e fotoluminescenza dal substrato sottostante. E' qui che le proprietà spettroscopiche del vetrino diventano importanti. Gli spettri di un vetrino da microscopio in vetro acquisiti usando l'eccitazione a 532-, 638- e 785-nm sono mostrati nella Figura 79. Lo spettro acquisito usando l'eccitazione a 532-nm è costituito da ampie bande Raman da SiO₂ con fotoluminescenza minima oltre

circa 3200 cm^{-1} . Uno spettro dalla stessa lastra di vetro e acquisito usando l'eccitazione a 638 nm è costituito da una fotoluminescenza molto forte in tutto e un picco a circa 3000 cm^{-1} . Infine, uno spettro del vetrino acquisito con eccitazione a 785 nm, mostra una fotoluminescenza molto forte e ampia che raggiunge un picco di circa 1400 cm^{-1} e oscura completamente l'impronta digitale dello spettro Raman. Anche in questo caso, le bande di vetro Raman possono a malapena essere rilevate al di sopra della forte fotoluminescenza generata dall'illuminazione con luce a 785 nm. In questi test verificiamo che la fotoluminescenza dal vetro diventa più forte con l'aumentare della lunghezza d'onda di eccitazione.

Uno dei modi per disfarsi della fotoluminescenza del vetrino è usare dei vetrini in silice fusa, detti anche "vetri di quarzo". Si tratta di vetrini da microscopia ottenuti da silice (SiO_2) fusa, chiara e senza inclusioni. Lo spettro della silice fusa, a varie lunghezze d'onda di eccitazione, è visibile in figura 80.

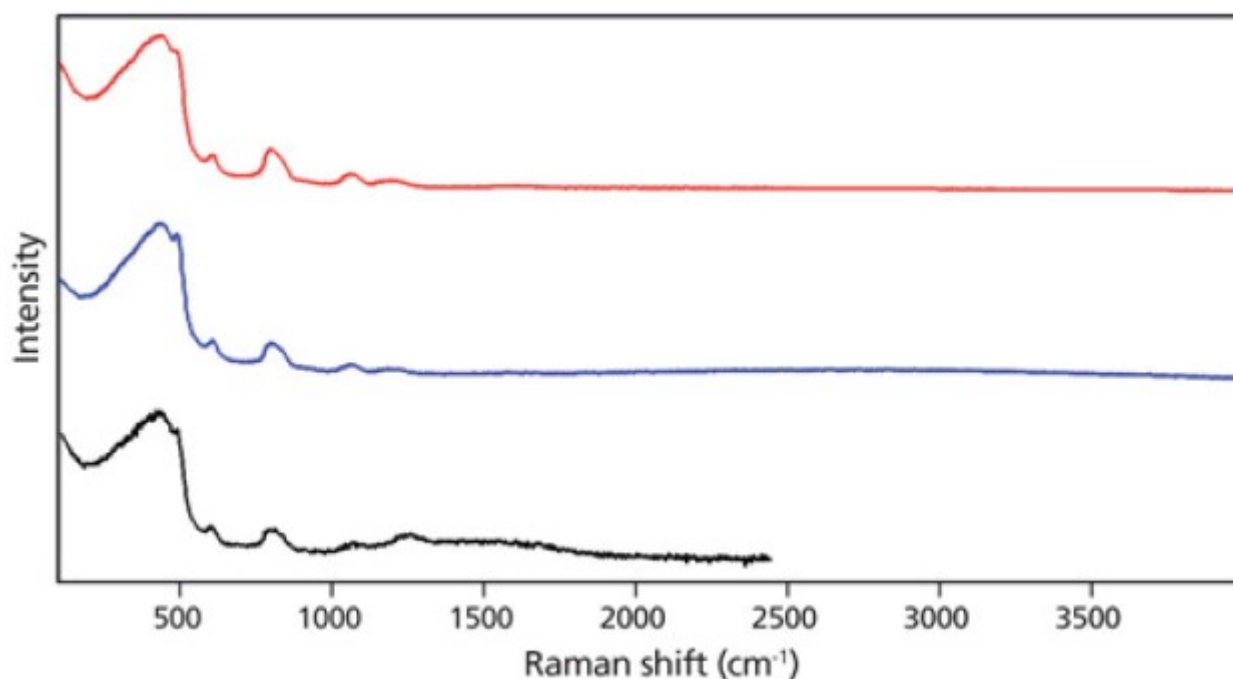


Figura 80: Spettri Raman di vetrini di silice fusa ottenuti usando eccitazione a 532 nm (rosso), 638 nm (blu) e 795 nm (nero)

Questi spettro dimostrano che i vetrini in silice fusa vanno bene per i campioni biologici o polimerici che hanno picchi nelle zone spettrali sopra i 1200 cm^{-1} .

VETRINI IN QUARZO OTTICO PER RAMAN e supporti metallizzati in oro SERS, su Geomateriali.it

Tutto ciò che serve per una buona preparativa per le analisi di amianto, silice e materiali organici in RAMAN. Vi Invitiamo a visitare il nostro sito per avere un'idea della vastità di proposte: strumenti, accessori e standard certificati !