

11.15.11 *Apparative Trennung von Fluoreszenz und Ramanstreuung (*)*

Obwohl der Raman-Effekt bereits im Jahr 1928 durch Raman experimentell nachgewiesen wurde, konnte sich die Ramanspektroskopie als Ergänzung zur Infrarotspektroskopie bis heute nur in einzelnen speziellen Anwendungen behaupten. Das größte experimentelle Hindernis für ihre kommerzielle Nutzung als Methode zur Aufklärung molekularer Strukturen war und ist der sehr niedrige Streuquerschnitt des Ramaneffektes, d.h. das sehr niedrige Niveau der zu messenden Strahlungsströme, und insbesondere der im Vergleich hierzu i.a. um mehrere Größenordnungen höhere Streuquerschnitt der Fluoreszenz. Sobald also die zu untersuchende Probe fluoreszenzfähige Bestandteile oder Verunreinigungen enthält (und das ist bei nahezu allen industriellen Proben der Fall), oder in Folge der Bestrahlung durch das Anregungslicht selbst zu fluoreszieren beginnt, wird die Messung äußerst schwierig, weil sich nämlich Raman- und Fluoreszenzstreusignale rein messtechnisch nicht auf einfache Weise voneinander trennen lassen. Der bis heute überwiegend beschrittene Weg besteht darin, mit der Anregungswellenlänge ausreichend weit in den infraroten Bereich zu gehen. Dann findet zumindest über einen 1-Photonen-Prozess (s. Abschnitt 7.13.3) keine Fluoreszenz mehr statt, während die Ramanstreuung weiterhin möglich ist, wenn auch mit nochmals deutlich niedrigerem Streuquerschnitt als bei der Anregung im sichtbaren Strahlungsbereich. In einfacher Störungsrechnung (s. Abschnitt 7.13.4 sowie Aufgabe 14 in Heft 7) erhält man für die Ramanstreuung eine Wellenlängenabhängigkeit von

$$I_{Raman} \sim \lambda^{-4} \quad (11.364)$$

In der Realität ist diese Wellenlängenabhängigkeit jedoch noch deutlich stärker ausgeprägt. Denn alle relevanten festen oder flüssigen Materialien weisen elektronische Anregungen im nahen UV-Bereich auf, z.B. in der Nähe von $300 \cdot nm$. Diese sind stark verbreitert, so dass der Ausläufer dieser Anregungsbanden noch weit bis in das sichtbare Spektrum hinein reicht. Hierdurch erreichen Effekte höherer Ordnung (Kopplung des Raman-Übergangs mit virtuellen Anregungen dieser elektronischen Zustände) eine endliche Übergangswahrscheinlichkeit. Wegen der unter Vernachlässigung jeglicher weiterer Anregungsmöglichkeiten des betrachteten Moleküls äußerst niedrigen Übergangswahrscheinlichkeiten der Ramanstreuung genügt dieser Resteinfluss der elektronischen Anregungen bei weitem, um die Wellenabhängigkeit der Ramanstreuung bereits signifikant zu modifizieren. Experimentell werden von Material zu Material stark schwankende Wellenlängenexponenten (in der Gl. 11.364) gemessen, die aber Werte bis zu 50 erreichen können. Dies ist die physikalische Erklärung für die experimentelle Erfahrung, dass kommerzielle Ramangeräte, die bei einer Anregungswellenlänge von $1024 \cdot nm$ arbeiten, trotz eines Anregungsstroms im

Bereich von $100 \cdot mW$ Messzeiten bis zu mehreren Stunden (!) benötigen, während bei Geräten, die z.B. mit $514 \cdot nm$ und $10 \cdot mW$ Strahlungsenergiestrom anregen, nur Messzeiten im Bereich von s bis min erforderlich sind. Die Ramanspektroskopie im nahen Infrarot ist daher i.a. durchaus ein Weg zur Einstellung eines akzeptablen Verhältnisses von Raman- und Fluoreszenzintensität, aber um den Preis eines extrem niedrigen Signals. Sobald nun zusätzlich nur ein besonders kleines Messvolumen verfügbar ist, wird die Situation noch einmal verschärft. Denn bei konstant gehaltener Bestrahlungsstärke ist die Intensität des Raman-Streusignals direkt proportional zum Messvolumen! (Eigentlich muss es an dieser Stelle Raumbestrahlungsstärke heißen, s. Abschnitt 11.7.2. Diese beiden Größen sind jedoch bei der in Spektrometern üblichen Geometrie nahezu identisch.) Die Bestrahlungsstärke aber lässt sich nur bis zu einem gewissen Grenzwert steigern, der durch die thermische und Strahlungsbelastbarkeit des untersuchten Materials vorgegeben ist. Daher ist die Anregung im IR bei mikroskopischen Raman-Methoden keine brauchbare Alternative. Insbesondere gilt diese Aussage für die *konfokale Raman-Mikroskopie* ([49],[50]), bei der ein konfokales Mikroskop (Abschnitt 11.11.4) mit einem Raman-Spektrometer gekoppelt wird. Mit einem derartigen System erhält man zusätzlich zu der über den optischen Kontrast erzeugten 3D-Information auch Informationen über die in der Probe auftretenden chemischen Unterschiede, wobei diese beiden Informationen miteinander streng verknüpft sind. Das wirksame Messvolumen ist durch die laterale und vertikale Ortsauflösung des konfokalen Mikroskops gegeben, beträgt also etwa

$$\delta V = (0,2 \cdot \mu m)^2 \cdot 0,5 \cdot \mu m = 0,02 \cdot \mu m^3 \quad (11.365)$$

Gegenüber einem typischen makroskopischen Raman-Spektrometer ist das eine Reduzierung des Probenvolumens um mindestens 10 Größenordnungen! Insbesondere für diesen Typ von Anwendungen der Raman-Spektroskopie ist man daher gezwungen, die Anregung so weit wie möglich in den sichtbaren, möglichst in den blauen Spektralbereich zu legen. Dann aber stellt sich die Frage nach der Trennung von Fluoreszenz und Ramanstreuung in voller Schärfe.

Eine experimentelle Möglichkeit zur Lösung dieser Aufgabe ist die Nutzung der Unterschiede im Zeitverhalten. Die Raman-Streuung erfolgt, verglichen mit der Fluoreszenzanregung, **spontan**, die Fluoreszenz-Streuung dagegen mit einer typischen Verzögerung in der Größenordnung $10^{-12} \cdot s$ bis $10^{-8} \cdot s$, in extremen Sonderfällen bis zu $10^{-4} \cdot s$ (s. Abschnitt 11.2.2). Durch Anregung der Probe mit einem Pulslaser, der ausreichend kurze Strahlungsimpulse abgibt, in Verbindung mit einer zeitlich aufgelösten spektroskopischen Detektion des Streusignals lassen sich daher Fluoreszenz- und Raman-Streuung weitgehend vollständig voneinander trennen. Eine weitere Möglichkeit ist die Intensitätsmodulation des Anregungslasers mit einer ausreichend hohen Frequenz in Verbindung mit einer Lock-In-Messtechnik. Bei dieser Messtechnik äußert sich eine unterschiedliche Verzögerung zwischen Anregung und System-Response in einer unterschiedlichen Phasenverschiebung zwischen diesen beiden (periodischen) Signalen. In Abhängigkeit der Phasenverschiebung treten daher 2

deutliche Intensitätsmaxima auf. Das (scharfe) Maximum bei (sehr) kleinen Phasenverschiebungen ist dann dem Ramansignal zuzuordnen und das (i.a. stark verwaschene) Maximum bei deutlich größeren Phasenverschiebungen dem Fluoreszenzsignal. Wegen der extrem kurzen Verzögerungszeiten sind jedoch beide Konzepte apparativ extrem aufwendig. Ich werde im Folgenden das Prinzip einer deutlich einfacheren Methode zur Trennung dieser beiden Signaltypen erläutern. Obwohl das Basiskonzept dieser Methode literaturbekannt ist, wird sie meiner Kenntnis nach bis heute (2010) nicht konkret eingesetzt.

Grundlage dieser Methode ist die unterschiedliche Abhängigkeit der Fluoreszenz und der Raman-Streuung von der Anregungsfrequenz. Bei der Raman-Streuung sind die Energien der eingestrahnten und der gestreuten Photonen auf einfache Weise mit der betrachteten Anregungsenergie des streuenden Moleküls verknüpft,

$$E_S = E_0 - E_i \quad (11.366)$$

E_S : Energie des gestreuten Photons

E_0 : Energie des eingestrahnten Photons

E_i : Energie des angeregten Molekülzustands

also

$$\begin{aligned} \frac{h \cdot c_0}{\lambda_S} &= \frac{h \cdot c_0}{\lambda_0} - \frac{h \cdot c_0}{\lambda_i} \Rightarrow \\ \lambda_S &= \frac{\lambda_0 \cdot \lambda_i}{\lambda_i - \lambda_0} \end{aligned} \quad (11.367)$$

In der Darstellung mit der als *Wellenzahl* bezeichneten Größe $k = \lambda^{-1}$ als unabhängiger Variable, genauer in der jeweiligen Differenz ($\lambda_0^{-1} - \lambda_S^{-1}$), sind daher die Ramanspektren unabhängig von der Anregungswellenlänge. Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum dagegen ändert seine Struktur bei kleinen Änderungen der Anregungswellenlänge (s. Abschnitt 11.2.2) nur in unmittelbarer Nachbarschaft der Anregung. Im übrigen Bereich des Spektrums verändert sich nur die Fluoreszenz-Gesamtintensität.

(XXX: Der an dieser Stelle noch vorgesehene Text mit der sauberen mathematischen Aufarbeitung dieser Zusammenhänge ist noch nicht verfügbar.)

In der Literatur bekannt ist das Verfahren, die bei 2 verschiedenen Anregungswellenlängen erhaltenen Mischspektren aus Fluoreszenz und Raman-Streuung aufzunehmen und sodann über einen numerischen Fitprozess und unter Voraussetzung der Transformationsbeziehungen gem. Gl. 11.367 in den Fluoreszenz- und den Raman-Anteil zu trennen. Nachteil dieser Methode ist, dass das Messsystem zunächst beide Signalanteile registrieren muss. Falls also der Fluoreszenzanteil deutlich größer ist als das Ramansignal, kommt es zu Rauschproblemen, da das dem Fluoreszenzsignal überlagerte Rauschsignal annähernd mit seinem **Absolutwert** in dem rechnerisch extrahierten Ramansignal erscheint. Ich werde im folgenden eine auf

demselben Grundprinzip basierende Hardware-Lösung vorschlagen, die nach meiner Kenntnis noch nicht in der Literatur beschrieben worden ist (, aber von mir auch nicht (mehr) konkret erprobt wurde).

Diese Methode lehnt sich an die in der elektronischen Analog-Messtechnik weit verbreitete Lock-In-Verstärkung (Abschnitt 14.9.7) an. Wir verwenden daher zur Anregung eine über ein elektrisches Signal in der Wellenlänge modulierbare Strahlungsquelle (s.u.), analysieren das Streulicht mit einem FourierSpektrometer (s. Abschnitt 11.12.1) und werten das elektrische Signal des Strahlungsdetektors mit einem Lock-In-Verstärker aus. Den Modulationshub der Strahlungsquelle wählen wir derart, dass er von der Größenordnung, aber etwas kleiner ist als die proben- und gerätebedingte Halbwertsbreite der zu messenden Ramanlinien. Die Modulationsfrequenz ist nur von untergeordneter Bedeutung, sie sollte lediglich deutlich höher sein als der Kehrwert der angestrebten Messzeit pro Datenpunkt des FourierSpektrometers (s. jedoch Abschnitt 14.10). Auf Grund der oben ausgeführten Berechnungen und Abschätzungen ist offensichtlich, dass dieses Signal ganz überwiegend durch das Ramansignal bestimmt ist, während die Fluoreszenzanteile weitgehend eliminiert sind. Diese Methode sollte also funktionsfähig bleiben, selbst wenn das Fluoreszenzsignal deutlich höher ist als das Ramansignal (s. wieder Abschnitt 14.9.7). Ergebnis dieser Messung ist allerdings nicht das Ramanspektrum selbst, sondern dessen Ableitung nach der Wellenlänge. Das Originalspektrum erhält man hieraus durch Integration.

Bei der Umsetzung dieses Konzeptes müssen 2 experimentelle Aufgaben gelöst werden. Zum einen wird ein im sichtbaren Spektralbereich arbeitendes hochauflösendes FourierSpektrometer benötigt. Dies ist kein grundsätzliches Problem, allerdings hat es sich aus historischen Gründen eingebürgert, im sichtbaren Spektralbereich ausschließlich **dispersive** Spektrometer zu verwenden. Daher ist dieses Gerät (zumindest nach meiner Kenntnis) z.Zt. nicht als kommerzielle Baugruppe verfügbar. Zum anderen benötigen wir eine wellenlängenmodulierbare Strahlungsquelle. Hierfür schlage ich (anstelle eines grundsätzlich einsetzbaren, aber sehr teuren modulierbaren Lasers auf Basis eines optischen parametrischen Oszillators *OPO*) eine Laserdiode vor, deren Wellenlänge sich einfach über den angelegten elektrischen Strom variieren lässt. Letztlich ist die Kristall-Temperatur die steuernde Größe. Allerdings ändert sich dann gleichzeitig auch der Strahlungsstrom. Dieser Effekt lässt sich problemlos über einen elektrisch steuerbaren Abschwächer (z.B. eine Pockelszelle oder einen sog. *Akusto-optischen Modulator*) und einen geeignet optimierten Regelkreis vorab minimieren. Wählt man nun die Modulationsfrequenz derart, dass sie von der Größenordnung, aber kleiner ist als $(4 \cdot \tau)$, wenn τ die thermische Zeitkonstante der Laserdiode ist, so ist die Wellenlängenmodulation deutlich gegen die (Rest-)Modulation der Intensität des Strahlungsstroms phasenverschoben, die trotz der soeben beschriebenen Strahlungsstrom-Stabilisierung verblieben ist. Diese beiden Effekte

- Intensitäts-Modulation des Raman-Signals infolge der Frequenzmodulation der Anregung; und

- Intensitäts-Modulation des Raman-Messsignals infolge Intensitätsmodulation der Anregung;

lassen sich daher im Lock-In-Messkanal in sehr guter Näherung von einander trennen.

Ich lade meine Leser ein, diese Methode zu erproben und mir zu berichten, welche Erfahrungen sie hiermit gemacht haben.