

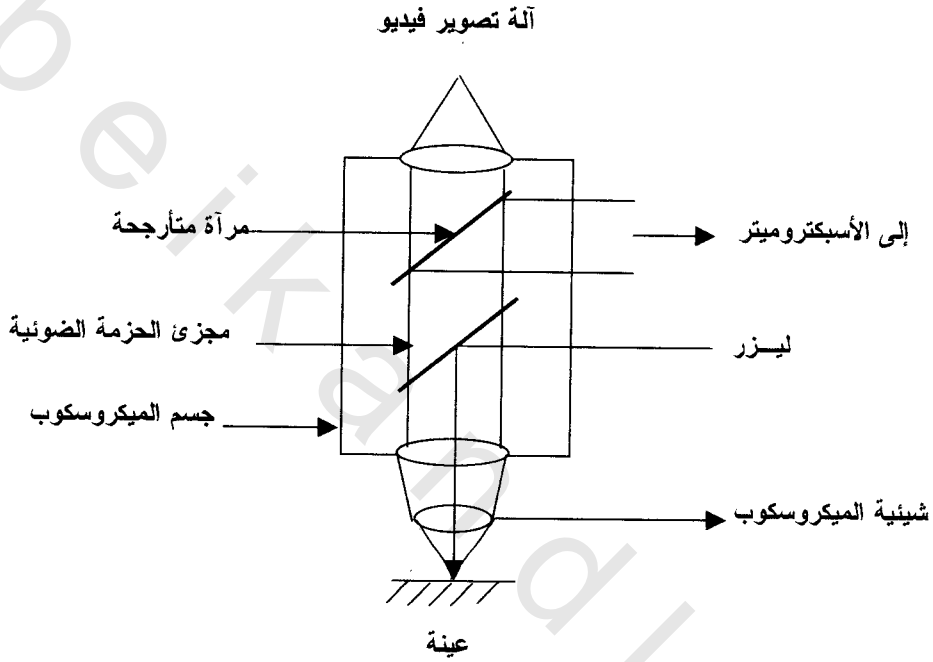
مجهرية رامان Raman Microscopy

1:4 مقدمة:

فى السنوات الأخيرة استخدمت مجهرية رامان على نطاق واسع فى تحليل العينات الصغيرة جدا (أقل من ميكرومتر على الجوانب وبعمق عدد قليل من الميكرومترات). وأهم خطوة فى إشراك الميكروسكوب مع مطياف رامان هي توجيه حزمة الليزر على طول المحور البصري للميكروسكوب ليتحقق الوضع الهندسي 180° . معظم ميكروسكوبات رامان تستخدم مجزئ الحزمة Beam splitter لإدخال الليزر إلى محور التجميع، وتستخدم العدسات الشينية لتجميع الضوء المشتت (شكل 52)، وتوجد نوعيات مختلفة من التصميمات، ولكن جميعها مبنية على أساس توجيه حزمة الليزر إلى العدسة الشينية التي تعمل على تجميع الضوء المشتت.

أول نتائج عملية عن مجهرية رامان سجلت فى المؤتمر الدولي الرابع لأطياف رامان 1974م لمجموعتين مستقلتين. وكان نظام المجموعة الأولى (واشنطن) يتكون من مطياف ليزر رامان العادي الذي تتكون بصريا ته من شينية ميكروسكوب، لتركيز حزمة الليزر لأسفل إلى واحد ميكرومتر وبصريات تجميع رامان، لتركيز الصورة المكبرة على شق مدخل المحلل. وبالرغم من أنه أمكن استخدام هذه المجموعة للعينات الميكرونية إلا أنه، كان هناك بعض الصعوبات فى الاستخدام

وخصوصا بالنسبة لوضع وترتيب العينات. التركيب الأساسي لجهاز المجموعة الثانية (فرنسا) كان يتكون من ميكروسكوب ضوء عادي وسبيكترومتر المحلل الثنائي المزود بمحزوزات هولوجرافية مقعرة وكاشف لتحليل النقط المنفردة.



شكل (52): ميكروسكوب رامان.

2:4 تشغيل المجس الميكروني The micro Probe Operation

توضع العينة المراد قياسها على قاعدة العينة بالميكروسكوب وتشاهد بواسطة إما ضوء أبيض نافذ للعينات المنفذة أو ضوء أبيض ساقط للعينات المعتمة على شاشة المشاهدة، أو بواسطة نظام مشاهدة

تليفيزيون الدائرة المغلقة. توضع المساحة المطلوبة للعينه فى مركز مجال المشاهدة وتشع بحزمة الليزر. يوجه شعاع الليزر إلى مجزئ الحزمة، ينعكس جزء من هذه الحزمة إلى أسفل بواسطة مجزئ الحزمة و ينفذ جزء آخر خلاله. بعدئذ تمر الحزمة المنعكسة خلال شبيئية الميكروسكوب التي تعمل على تركيز حزمة الليزر على بقعة صغيرة من العينه، وأيضا تجمع الأشعة المشتتة من العينه. وتنفذ الأشعة المشتتة مرة أخرى من المجزئ إلى كاميرا الفيديو Video camera أو توجه بواسطة منشور قائم الزاوية أو مرآة متأرجحة Swing mirror إلى شق مدخل المحلل، ومن ثم إلى الكاشف لكشف إشارات رامن وتسجيل الطيف.

Objective Lens Choice

اختيار العدسة الشبيئية

يعتمد اختيار الشبيئية على نوع العينات تحت الاختبار. فإذا كانت العينات جسيمات ميكرونية حجمها فى حدود جزء من الميكررون، ينبغي أن تكون عدسة الشبيئية عالية التكبير وذات فتحة عدديه كبيرة (NA) Numerical aperture (تعرف الفتحة العدديه بأنها جيب نصف زاوية مخروط التجميع (Sine of the half-angle of the collecting cone)).
تجمع العدسة الشبيئية ذات الفتحة العدديه الكبيرة الضوء المشتت على زاوية مجسمة كبيرة أي يصل للكاشف إشارات رامن أكثر. الشبيئية العادية يجب أن يكون تكبيرها 100 x والفتحة العدديه (NA) 0.9 أو 150 x 0.95NA. إذا كان حجم العينه 5 ميكررون أو أكثر تكون الشبيئية 50x أو 60x، 0.8NA مناسبة. إذا كانت العينه مدفونة داخل مادة مضيقة يكون المطلوب عدسة شبيئية ذات مسافة تشغيل طويلة Long working

distance objective. عموماً، في حالة العينات الصغيرة أقل من واحد ميكرون حتى 5 ميكرون تكون الشيئية 150x، 0.95NA، أو 0.90NA، 100x. في حالة العينات من 5 ميكرون فأكثر تكون الشيئية، 0.8NA، 60x أو 50x، 0.8NA، وفي حالة العينات المدفونة في مادة مضيئة تكون العدسة الشيئية ذات مسافة تشغيل طويلة جداً (مسافة التشغيل 8nm)، 50x، 0.55NA. في حالة السوائل في أنابيب زجاجية شعرية تكون الشيئية 20x، 0.45NA.

يحدد التحليل الفراغي Spatial Resolution في عينة النقطة المنفردة Single- Point Sampling بالخصائص الضوئية للعدسة الشيئية والبصريات المرتبطة بها وكذلك انفرج الليزر. ويحدد التحليل الفراغي إما بحجم بقعة الليزر أو ببصريات التجميع، وكل منها محدد كلياً بالحيود. بالنسبة لمجهرية النقطة المنفردة، حجم بقعة الليزر يحدد غالباً، التحليل الفراغي، ويصمم السبيكترومتر لتجميع الضوء من مساحة تساوى أو أكبر من حجم هذه البقعة، والاعتبارات التالية ذات قيمة عامة.

- 1- قطر بقعة الليزر عامل هام في اختيار البعد البؤري للعدسة المجمع.
- 2- عمق البؤرة دالة قوية أيضاً للبعد البؤري.
- 3- يزداد حجم البقعة وعمق البؤرة مع زيادة الطول الموجي لليزر حيث إن تأثيرات الحيود تزداد مع زيادة الطول الموجي.
- 4- تزداد كثافة القدرة مع قدرة الشيئية.

Beamsplitter Choice

اختيار مجزئ الحزمة

مجزئ الحزمة عريض النطاق Broad band beam splitter عبارة عن مرآة نصف عاكسة على قاعدة رقيقة من السيليكا أو الزجاج. الوضع الهندسي في الشكل (52) يستخدم هذا المجزئ ليعكس الليزر إلى العدسة الشيئية، وينفذ 50% من تشتت رامان الخلفي خلال مجزئ

الحزمة إلى شق المدخل للمحلل. والمجزئ عريض النطاق طريقة بسيطة لجمع محاور الإثارة والتجميع، ولكن أيضا يحدث فقدا واضحا للإشارة. يصل نصف ضوء الليزر فقط إلى العينة، وينعكس نصف الضوء المجمع خلفا إلى الليزر. لذلك تضعف الإشارة 75% مقارنة بالإشارة التي يجب أن تكون، علاوة على ذلك، يوضع مجزئ الحزمة مباشرة في محور التجميع مع ذلك يمكن أن يصدر عنه إشارة خلفية واضحة. التشتت غير المرين لليزر من المجزئ يمكن أن يدخل إلى السبيكترومتر وتظهر كاستضاءة عريضة النطاق أو رامن للسيليكا. يمكن تخفيض الفقد من المجزئ بوضوح باستعمال مجزئ الحزمة سمارت Smart beam splitter، وهو عبارة عن مرآة Dichroic mirror ثنائية التلوين أو عنصر بصري هيلوجرافي Holographic optical element وتعتمد انعكاسية هذه الأجهزة بشدة على الطول الموجي. ويصنع مجزئ الحزمة ليحقق انعكاسا عاليا لليزر ونفاذ يته عالية لضوء إزاحة رامن.

البديل لمجزئ الحزمة سمارت هو مرشح الرقعة الهولوجرافي عالي الانعكاسية Holographic notch filter عند الطول الموجي لليزر. وهذا المرشح يعمل على إدخال حزمة الليزر إلى محور التجميع، وحيث إن المرشح موضوع عند زاوية قائمة مع محور التجميع فإنه ينفذ جزءا من ضوء إزاحة رامن إلى السبيكترومتر. علاوة على ذلك المرشح يبعد الضوء المشتت تشتتا مرنا من العينة. إذا فإن هذا المرشح يعمل كمجزئ للحزمة وأيضا كمرشح رقعة لتقليل الضوء الشارد في السبيكتروجراف.

3:4 ميكروسكوب رامن متحد البؤرة Confocal Raman Microscope

معظم ميكروسكوبات رامن تستخدم بصريات متحدة البؤرة. والفرق بين الميكروسكوب العادي و الميكروسكوب متحد البؤرة هو أن الأخير عنده فتحة إضافية Aperture يطلق عليها أحيانا الثقب Hole،

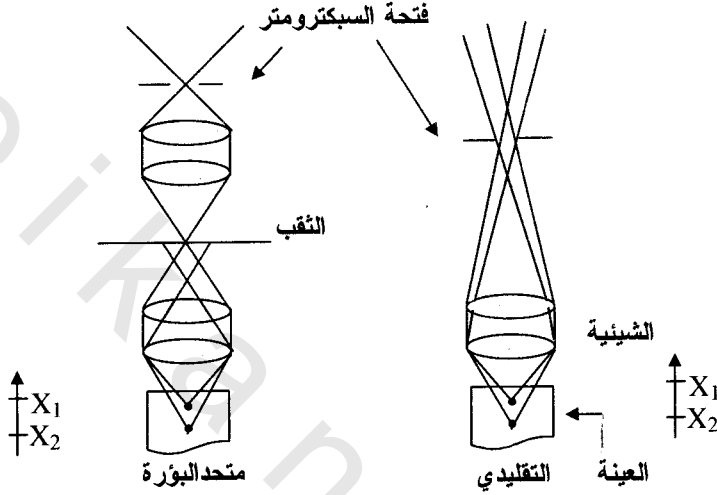
وتأثيرها هو تقليل عمق بؤرة الليزر. النظام البصري متحد البؤرة يحجز كثيراً من الضوء القادم من أعلى وأسفل المستوى البؤري الذي يتركز عليه ضوء الليزر ، يأتي الضوء المجمع إلى بؤرة عند الفتحة، فإذا كان قطر الفتحة أصغر من القطر المكبر لليزر المركز فإن معظم الضوء من أعلى أو أسفل المستوى البؤري لليزر سوف يستبعد. وأهم فوائد هذا النظام هي تحسين تحليل العمق، وبالتالي زيادة نسبة الإشارة إلي الخلفية في طيف رامان، أيضا يحسن إلي حد ما - التحليل الفراغي الجانبي

.Lateral Spatial Resolution

في شكل (53) الضوء المشتت من العمقين x_1 , x_2 للعينة موضح بالخطوط المتصلة والمقطعة. بالنسبة لشق السبيكترومتر، الضوء القادم من x_1 , x_2 يمكن أن يدخل السبيكترومتر. إذا كانت النقطتان داخل الأسطوانة البؤرية لحزمة الليزر فإن الطيف سيمثل التركيب المتوسط للعينة بين x_1 , x_2 . تحد الفتحة في النظام البصري متحد البؤرة من عمق العينة بحجز الضوء القادم من x_2 قبل دخوله السبيكترومتر. إذا كانت العينة متجانسة فإن فتحة النظام متحد البؤرة، سوف تقلل أيضا الإشارة، حيث إنه يقلل طول المسار الفاعل. ولكن بالنسبة للعينة التي يتغير تركيبها مع العمق فإن ذلك يحصر عمق العينة في منطقة أصغر من تلك التي في حالة البصريات العادية. يعتمد تحليل العمق على قطر فتحة البصريات متحدة البؤرة.

ونظراً لأن النظام البصري متحد البؤرة يضعف الإشارة القادمة من منطقة أفضل بؤرة للميكروسكوب فذلك يحسن نسبة الإشارة إلي الخلفية في طيف رامان، ولكن يحجز 90% من الضوء المجمع بالعدسة الشينية للميكروسكوب، المرشح الفراغي يخفض الشدة بنفس المقدار. استخدام الضوء المرئي يعطي ميزة أكبر منها في حالة استخدام تحت الحمراء. واستخدام ليزرات الضوء المرئي تتيح استخدام عدسات شينية

ذات خصائص معينة. العدسات الشبكية التي تغمر في الزيت أو الماء والتي لها فتحة عديدة أكبر تعطي أمثلة على ذلك. هذه العدسات تعطي صوراً ساطعة عالية التحليل. الشبكيات المغمورة غير متوفرة لتحت الحمراء ومكلفة جداً تحت الحمراء القريبة.



شكل(53): بصريات الميكروسكوب متحد البؤرة.

4:4 تحضير العينات Sample Preparation

توضع العينة في معظم الحالات على شريحة الميكروسكوب الزجاجية العادية Glass Microscope Slide ذلك لأن الزجاج لا يتفاعل، وتشنت رامن له ضعيف وهذا لا يحدث أي تداخل مع طيف رامن. ويستخدم أيضا (السفير الياقوت الأزرق) Sapphire ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$)، وبير كليس (Periclase (MgO)). ويمكن الحصول على أطراف العينات العضوية

وغير العضوية ذات الحجم الميكروني على ميكروسكوب رامن. ويمكن تعريض العينات غير العضوية بقدرة من (20 mw إلى 5) عند العينة دون أي تلف. أما العينات العضوية تكون أكثر عرضة للتلف من العينات غير العضوية نتيجة لتعرضها لشعاع الليزر، لذلك تستخدم لها قدرة أقل عند العينة للحصول على أطياها (عادة من 2.5 mw إلى 0.5). في حالة السوائل توضع العينة في أنبوبة شعيرية من الزجاج ذات جوانب رقيقة مسطحة أو دائرية. وتستخدم عند تسجيل طيف العينة شبيئية قدرتها منخفضة (20 X أو 10 X).

العينات الحساسة للحرارة Thermally Sensitive Samples

في ميكروسكوب رامن يركز شعاع الليزر على العينة و يكون مستوى التشيع مرتفعا (عادة 10^6 w/m^2) ، ونتيجة لذلك تتحلل المادة وخصوصا عند تعريض المادة لفترات طويلة أثناء التسجيل.

أحد طرق التغلب على هذه المشكلة هو عدم تركيز حزمة الليزر على العينة لتقليل كثافة القدرة وخصوصا في حالة العينات الحساسة للحرارة. بالنسبة للمركبات التي تتأثر بالأشعة السافطة ذات الطاقة العالية (المواد الحمراء مع أشعة الليزر الزرقاء) يمكن استخدام مصادر ليزر ترددها منخفض مثل: ليزرات أيون الكريبتون أو الصبغات. والطريقة الأخرى هي أن نغمس العينة في وسط مناسب يعمل كحوض للحرارة. وأنسب سائل لهذا الغرض هو الماء حيث إن طيفه بسيط وضعيف، علاوة على خواصه الحرارية الممتازة. في هذه الطريقة يوضع الجسم على الشريحة الزجاجية ويغمس في نقطة من الماء. والجسيمات الصغيرة يمكن منعها من الحركة باستخدام طبقة غروائية رقيقة. وتستخدم شبيئية خاصة بالغمس في الماء لمشاهدة العينة وتسجيل الطيف. في حالة

العينات الحساسة للحرارة والتي تذوب في الماء يستخدم وسط غمس عضوي لا تتفاعل معه المادة.

العينات الحساسة للبيئة Environmentally Sensitive Samples

توضع العينات التي تتأثر بالبيئة داخل خلية عينة مسطحة الجوانب مثل: الخلايا التي تستخدم في مطياف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية. توضع داخل صندوق مملوء هواء جاف وتفحص العينة باستخدام شينية تعمل على مسافة طويلة خلال جوانب الخلية.

طرق الضغط والحرارة في ميكروسكوب رامان Temperature and Pressure Techniques with Raman Microscope

1- قياس الحرارة Temperature Measurements

توجد قواعد لعينات الميكروسكوب المزودة بطرق تحكم في ضبط الحرارة العالية أو المنخفضة. وكذلك التحكم في المناخ وذلك لدراسة انتقال أطوار المواد الصلبة تحت ظروف معينة، في الهواء أو في أجواء خاملة. وهذه الخلايا تستخدم في مدى من 100°C إلى -196°C . وتوجد خلايا تستخدم في المدى من درجة حرارة الغرفة حتى 1500°C . توضع العينة على قاعدة العينة داخل الخلية و تستخدم شينية مسافة العمل لها طويلة لمشاهدة و تسجيل طيف رامان عند درجات حرارة مختلفة لمتابعة الانتقالات الكيميائية المختلفة.

2- قياسات الضغط Pressure Measurements

تحتاج بعض الدراسات إلى تسجيل طيف رامان للعينات عند ضغوط مرتفعة لمعرفة تأثير هذه الضغوط على ذبذبات بعض المجموعات

الجزئية. تستخدم فى هذه الدراسة خلية السندان الألماسية (DAC) Diamond Anvil Cell، توضع العينة فى DAC مع شريحة صغيرة (50 μm) من الياقوت Ruby. يستخدم الياقوت كمقياس للضغط داخل الخلية، حيث يتأثر طيف رامان له بالضغط داخل الخلية. يسجل بعدئذ طيف العينة عند نفس الضغط، يرفع الضغط بعد ذلك ويسجل طيف كل من العينة والياقوت عند كل ضغط. يستخدم المجس الميكرونى لرامان أيضا لقياس الإجهاد فى DAC .

5:4 نسب الاستقطاب Polarization ratios

تعطى دراسة خواص الاستقطاب معلومات قيمة عن نمط الذبذبة الجزئية التي ينشأ عنها شريط رامان. المجس الميكرونى لرامان Raman Microprobe هو الأداة المثالية للحصول على قياسات الاستقطاب من البلورات المنفردة الصغيرة ومن شعيرات البلمرات المفردة وعدم التجانس فى أفلام البلمرات. على أية حال نظرا لأن التصميم البصري للمطياف الميكرونى يشتمل على مجزئ الحزمة العزلى Dielectric Beam Splitte فإن القياسات لا تكون بالدقة الكافية. لذا يجب إجراء تصحيحات لتأثيرات مجزئ الحزمة.

6:4 تصوير وتخطيط رامان Raman Imaging and Mapping

فى تصوير رامان توضع العينة على شريحة الميكروسكوب، ثم يضاء كل مجال مشاهدة الميكروسكوب بالليزر. ويتم ذلك بتدوير حزمة الليزر لتكوين حزمة مستديرة من الضوء، والتي توجه إلى مكثف مجال شبيثة الميكروسكوب المظلم أى أن يكون تشعيع العينة بضوء أحادى الطول الموجي متجانسا. وينقل الميكروسكوب بعدئذ صورة العينة إلى

المحلل الذي ينتقى الطول الموجي المعنى لتصويره بواسطة آلة التصوير التليفزيونية (Television Camera) الموضوعة عند المستوى البؤري لنشق الخروج. إذا كان الطول الموجي المنتقى يقابل تردد شريط رامان لمركب فى العينة، فإن الصورة الميكرونية سوف توضح توزيع هذه المركبة خلال المساحة المضاءة. والتحليل الفراغى للنظام يكون فى حدود واحد ميكرومتر. وهذا النظام يعمل جيدا للعينات جيدة التشتت لرامان، ولكن هذا النظام لا يعمل مع العينات ضعيفة التشتت لرامان. وأهم مميزات هذه الطريقة لتصوير رامان هي أن الكاشف يلاحظ المجال بالكامل فى نفس الوقت.

الطريقة الأخرى فى تصوير رامان تستخدم الحاسب فى التحكم فى الحركة المرحلية لمحرك يعمل على تحريك قاعدة العينة على الميكروسكوب بالنسبة لحزمة الليزر الثابتة. فى هذه الطريقة يتم الكشف عن أطيف رامان عند عدة مئات من المواضع على سطح العينة. ويبرمج الحاسب لتسجيل طيف الموضع الأول على العينة ويخزن الطيف على قرص، بعد ذلك تتحرك قاعدة العينة عن طريق الحاسب الى موضع آخر على العينة ويسجل الطيف لها ثم يخزن، وتكرر العملية على باقى النقط على العينة ويسجل طيف رامان ويخزن. ويمكن بهذه الطريقة الحصول على صورة على خط ذى بعد واحد أو صورة ثنائية البعد للنوعيات Species الموجودة على سطح العينة.

توجد طريقة أخرى مختلفة فيها يتم مسح العينة الثابتة بحزمة الليزر المركزة وتسجيل الطيف عند مواقع مختلفة على العينة. وتتم هذه الطريقة بنوع جديد من البصريات الناقلة موضوعة بين الميكروسكوب والسيكرومتر. وتتكون هذه البصريات من زوج من العدسات، إحدى العدستين تركز حزمة ضوء الليزر على المستوى البؤري الخلفى للعدسة الشيئية للميكروسكوب. هذه العدسة المرتبطة بصريا بفتحة خلفية

للشينية يمكن تحريكها في اتجاهين متعامدين على حزمة الليزر. أي أن هذه العدسة يمكن أن تركز حزمة الليزر على أي نقطة في مجال الميكروسكوب، ومن ثم على أي نقطة من العينية. والعدسة الثانية ترتبط ميكانيكيا بالعدسة الأولى وتوضع في الحزمة المشتتة لكي توازن أي إزاحة في صورة المساحة المتطورة، وتركز الحزمة المشتتة على شق المدخل للسبيكترومتر. وهذا التركيب البصري أثبت أنه مناسب لعديد من نوعيات العينسات مثل: الكريوستات وخلايا الحرارة العالية أو الضغط العالي.

Application Areas

مجالات التطبيق

Industrial Applications

التطبيقات الصناعية

وجود شوائب في الألياف أو أفلام البوليمرات يتسبب في تغيير مظهر و خواص هذه الألياف أو الأفلام. وتحديد هذه الشوائب يمكن من معرفة المشكلة وتصحيحها. ويستخدم مجهر رامن لتعيين هذه الشوائب والفروق الموضعية في التبلور والتركيزات الموضعية للبوليمرات المشتركة في عمليات البلمرة.

تصنيع الدوائر الميكرونية يتضمن العديد من العمليات الكيميائية المعقدة، خلال هذه العمليات يمكن أن تؤثر الشوائب العارضة في وظائف هذه الدوائر. الشوائب في دوائر البلورات شبه الموصلة والدوائر المتكاملة يمكن توصيفها ومعرفة أسبابها، والتخلص منها.

تحليل الشوائب الدخيلة والرواسب في الفقاعات الموجودة بالزجاج يمكن أن يعطى معلومات دقيقة عن عملية التكرير أو أسباب تكوين الفقاعات الغير مرغوب فيها. والتطبيقات الصناعية الأخرى تشمل

دراسات التبلور فى الجرانيت وألياف الكربون و المحفزات الصناعية
لكشف درجة النشاط التى يتم الحصول عليها فى تحضير المحفزات. وتم
أيضا قياس مستوى تركيز الطعم فى الألياف البصرية.

المجال البيولوجي و الباثولوجي Biology and Pathology

يمكن باستخدام مجهرية رمان تحديد موقع تحجر أو تصلب
حمض اليوريك فى الموقع، والجويانين Guanine أو يورات الصوديوم
والبوتاسيوم و الزانتين (حامض الصنغراوين Xanthene) فى أنسجة
الأسماك، العناكب، الرخويات، أو اللافقاريات والحشرات، وتراكم مكونات
كبريتات النحاس الإبرية داخل Cytosomes of Littorina Littorea .
ويمكن أيضا دراسة التمعدن البيولوجي فى الأسنان، والعظام، وتصلب
الشرايين، و Bioprosthetic Calcification ، والتكلس فى الإنسان و
الحيوان، ومعرفة تركيب حصوات المسالك.

ويستخدم ميكروسكوب رمان لكشف الأجسام الغريبة فى
الأنسجة الحيوية، وقد تم تسجيل نسيج عقدة لمفاوية فى حجم 5 µm تم
الحصول عليه بواسطة عينة Biopsy من المريض. وتعتبر مجهرية
رمان تقنية فاعلة فى دراسة خلايا الطحالب، وأيضا التعرف على
مكونات وخصائص حصوات المرارة.

التعدين والجيولوجيا Mineralogy and Geology

تستخدم مجهرية رمان فى تحليل الشوائب، سواء كانت صلبة أو سائلة
أو غازية، داخل المعادن وتفيد معرفة هذه الشوائب فى العمليات الجيولوجية
والجيوكيميائية. كما يمكن تحديد الشوائب فى الأحجار الكريمة والزجاج غير
العضوي الشفاف دون تفتيت العينة.

أثبتت مجهرية رامان أنها أداة مفيدة جدا في تحديد مكونات الصدأ على أسطح المعادن. من المعروف أن تآكل السطوح المعدنية يشمل تفاعلات معقدة بين سطح المادة و البيئة المحيطة. وتؤدي هذه التفاعلات إلي تلف أو كسر المعدن يمكن التوصل الي معرفة عملية التآكل عن طريق توصيف نواتج التفاعل على السطح المتآكل. ومن ثم يمكن فهم التفاعل بين السطح و البيئة المحيطة به.

سطوح التلامس الهيدروديناميكية المرنة

Elastohydrodynamic Contacts

من أهم التطبيقات الحديثة لمجهرية رامان هو دراسة الضغط الناتج عن الشحم عند سطح تلامس كرة الصلب والقرص الزجاجي. في أسطح التلامس ذات الأحمال العالية يحدث لها تشوه مرن حول غشاء رقيق من الشحم. ويمكن تسجيل طيف رامان باستخدام مجهرية رامان في منطقة التلامس. ويمكن مراقبة هذا الطيف كدالة للحمل والسرعة والموضع داخل منطقة التلامس.