

ROZDZIAŁ 3

Spektroskopia rozproszenia Ramana

Małgorzata Barańska, Kamilla Małek, Aleksandra Weselucha-Birczyńska

3.1. Wstęp

Spektroskopia rozproszenia Ramana jest ważną metodą badania przejść pomiędzy poziomami rotacyjnymi i oscylacyjnymi cząsteczek zachodzącymi na skutek **nieelastycznego rozproszenia światła**. Teoretycznie, efekt ten został opisany przez A. Sme-kala w 1923 roku, a w roku 1928 hinduski fizyk C.V. Raman potwierdził doświadczalnie jego istnienie, opierając się na wynikach badań benzenu. Za to odkrycie przyznano mu w 1930 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki.

Widma ramanowskie niosą ze sobą, przede wszystkim, zaszyfowaną informację o strukturze molekularnej. Mogą być one wykorzystane do identyfikowania nieznan-ych substancji i ich ilości, ich przemian w reakcjach chemicznych oraz obecności określonych ugrupowań atomów czy też wiązań cząsteczkowych. Identyfikację tę przeprowadza się na podstawie szczegółowej analizy pasm zarejestrowanego widma. U podstaw tej metody spektroskopowej leży wzbudzenie rotacji lub oscylacji molekuly poprzez oświetlenie próbki światłem (ν_0) z zakresu ultrafioletowego, widzialnego lub bliskiej podczerwieni. W wyniku oddziaływania „molekuła – fala elektromagnetyczna” obserwuje się rozproszone światło o tej samej energii (**rozproszenie Rayleigha**) oraz dyskretne składowe o innej, niż wzbudzające promieniowanie, liczbie falowej (**rozpro-szenie Ramana**). A zatem, rozpatrując widmo oscylacyjne, obecne są położone syme-trycznie względem pasma Rayleigha nowe pary linii o częstości równej $\nu_0 \pm \nu_{osc}$ (pa-sma ramanowskie), gdzie ν_{osc} odpowiada częstości przejść pomiędzy oscylacyjnymi poziomami danej molekuly. Należy podkreślić, iż wielkość przesunięcia pasm rama-nowskich względem rayleighowskiego nie zależy od częstości promieniowania wzu-budzającego, a wynika wyłącznie z właściwości cząsteczek rozpraszających. Pasma ramanowskie pojawiające się przy liczbie falowej mniejszej niż ta dla światła wzbudzają-cego ($\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_{osc}$) nazywane są **pasмами stokesowskimi**, a te przy wyższych ($\bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_{osc}$) **pasмами antystokesowskimi**. Intensywność rozpraszania Rayleigha jest ok. 10^{-3} , a Ramana 10^{-6} – 10^{-7} razy mniejsza od intensywności promieniowania wzbudzającego. Dodatkowo, jak wynika z rozkładu Boltzmanna, pasma antystokesowskie są mniej intensywne w porównaniu z pasmami stokesowskimi. Stąd w większości metod spek-troskopii rozproszenia Ramana pomiar dotyczy jedynie części stokesowskiej widma ramanowskiego przedstawionej w skali względnych wartości częstości (wyrażonych w Δcm^{-1} , tzw. przesunięcie ramanowskie) w zakresie od 4000 do 0cm^{-1} . Tak wyrażo-ne widmo ramanowskie odpowiada skali częstości widma IR, co ułatwia z kolei po-równanie tych komplementarnych względem siebie metod spektroskopowych.

Metodą rozproszenia Ramana można badać związki we wszystkich stanach skupie-nia, a więc gazy, ciecze, roztwory (w tym wodne), pasty, ciała stałe jako proszki mi-krokryształiczne czy też monokryształy w szerokim przedziale temperatur i ciśnień.

Pomiar widm ramanowskich nie wymaga zastosowania skomplikowanych procedur przygotowania próbek, jak również nie są wymagane specjalnego rodzaju naczynia pomiarowe. W technikach, gdy nie używa się mikroskopu, badane substancje mogą być umieszczane w ilości około miligrama w kapilarach (najczęściej szklanych) przezroczystych dla promieniowania wzbudającego lub bezpośrednio ekspozowane na działanie promieniowania w dowolnie zaprojektowanym naczyniu. Do pewnych specjalnych pomiarów (np. badania przebiegu reakcji chemicznych) stosuje się naczynia przepływowe, w których następuje mieszanie się dwóch substancji reagujących ze sobą. Niewątpliwą zaletą spektroskopii ramanowskiej jest możliwość jej zastosowania dla próbek w roztworach wodnych (szczególnie przydatne dla próbek biologicznych), gdyż widmo ramanowskie wody jest ubogie, pasma wykazują stosunkowo słabą intensywność wynikającą z małej polaryzowalności molekuł wody. Podstawowym problemem utrudniającym otrzymanie widm ramanowskich jest występowanie tła fluorescencyjnego. Usunięcie lub zmniejszenie tego efektu można zrealizować m.in. poprzez:

- dodanie do badanej substancji tzw. wygaszaczy (KBr, NaI, KI),
- zastosowanie techniki impulsowego wzbudzania próbki,
- wykonanie pomiaru w antystokesowskiej części widma,
- zmianę długości fali promieniowania wzbudającego,
- oczyszczenie próbki z zanieczyszczeń fluorescencyjnych,
- naświetlanie próbki przed pomiarem.

Klasyczna teoria (teoria Placzka) wyjaśnia zjawisko rozproszenia Ramana, opierając się na generowaniu światła rozproszonego poprzez indukowany moment dipolowy (3.1), który powstaje w molekułach pod wpływem oddziaływania z padającym promieniowaniem elektromagnetycznym:

$$\mu_{\text{ind.}} = \alpha E, \quad (3.1)$$

gdzie: α – tensor polaryzowalności, E – wektor elektryczny fali elektromagnetycznej.

Tensor polaryzowalności jest dodatkowo zaburzony przez drganie normalne, stąd indukowany moment dipolowy jest również modulowany przez dany rodzaj oscylacji. Ostatecznie więc można wyrazić moment dipolowy przez poniższe równanie (3.2):

$$\mu_{\text{ind.}} = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \bar{\nu}_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_{\text{osc.}}} \right) Q_{\text{osc.}0} E_0 \times [\cos 2\pi c(\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_{\text{osc.}})t + \cos 2\pi c(\bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_{\text{osc.}})t]. \quad (3.2)$$

Wyrażenie to wyjaśnia, jak indukowany, a zarazem oscylujący moment dipolowy wytwarza jednocześnie promieniowanie elektromagnetyczne o trzech częstościach odpowiadających kolejno: rozproszeniu Rayleigha, stokesowskiemu i antystokesowskiemu rozpraszaniu Ramana. Teoria ta wyjaśnia również niezależność przesunięcia ramanowskiego od długości fali promieniowania wzbudającego i określa warunek konieczny, aby nastąpiło rozproszenie Ramana. Mianowicie, w widmie Ramana pojawiają się jedynie pasma tych drgań normalnych, w czasie których następuje zmiana

przynajmniej jednej składowej tensora polaryzowalności. Należy podkreślić, iż każda cząsteczka posiada niezerową wartość polaryzowalności, a więc zawsze rozprasza światło na sposób Rayleigha, ale, jak wykazano powyżej, niekoniecznie w sposób ramanowski. Ten klasyczny opis zjawiska rozproszenia światła wyjaśnia poprawnie jedynie pojawienie się jego trzech składowych. Jednakże prawdopodobieństwo przejść energetycznych określa prawidłowo wyłącznie jego opis kwantowo-mechaniczny.

Według podstawowych zasad mechaniki kwantowej energia stanów rotacyjnych, oscylacyjnych czy też elektronowych jakiegokolwiek systemu molekularnego może przyjmować jedynie wartości dyskretne (kwantowane) i odpowiada stanom stacjonarnym molekuly opisanych przez jej funkcję falową Ψ .

Rozwiązaniem równania własnego dla stanów oscylacyjnych w **przybliżeniu harmonicznym** jest wyrażenie (3.3):

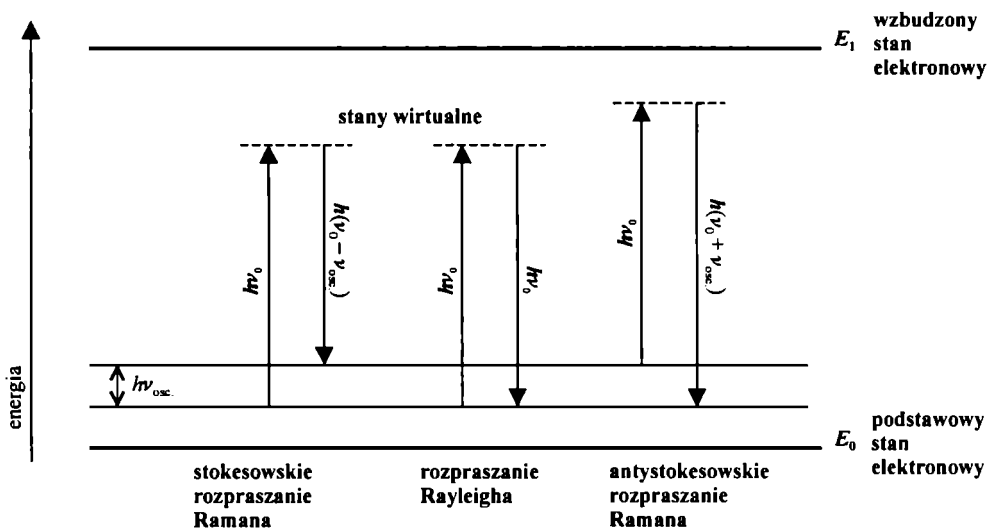
$$E_v = h\nu_e(v + 1/2), \quad (3.3)$$

a wynikają z niego następujące konsekwencje:

- energia oscylacyjna molekuly w jej stanie podstawowym przyjmuje niezerową wartość,
- odstęp między kolejnymi poziomami oscylacyjnymi są takie same,
- kwantowa reguła wyboru brzmi, iż oscylacyjna liczba kwantowa ν może się zmieniać jedynie o wartość ± 1 (stąd w widmie obecność tonu podstawowego).

Uwzględnienie **anharmoniczności** powoduje zmianę odległości pomiędzy poszczególnymi poziomami oscylacyjnymi oraz przede wszystkim rozszerzenie reguły wyboru, gdzie wzrasta prawdopodobieństwo przejść dla $\Delta\nu = \pm 2, \pm 3, \dots$, i dlatego w widmie obserwowane są nadtony ($\Delta\nu = \pm 2$ zwana jest pierwszym nadtonem, ± 3 drugim itd.). Podejście kwantowe wyraźnie wskazuje, iż promieniowanie jest absorbowane lub emitowane również w sposób kwantowany, gdyż zachodzi na skutek przejść pomiędzy dwoma stanami energetycznymi cząsteczki.

Diagram energetyczny (rys. 3.1) przedstawia **dwufotonową** naturę efektu rozpraszania Rayleigha i Ramana wynikającą z reguł kwantowych: absorpcję fotonu do stanu wirtualnego leżącego poniżej wzbudzonego stanu elektronowego oraz emisję (po $\sim 10^{-14}$ s) tworzącą inny foton o tej samej (rozproszenie Rayleigha), niższej (stokesowskie rozproszenie Ramana) lub wyższej energii (antystokesowskie rozproszenie Ramana).



RYS. 3.1. Diagram energetyczny przejść pomiędzy oscylacyjnymi poziomami dla rozproszenia Rayleigha i Ramana.

Aby jakiegokolwiek przejście energetyczne było dozwolone, jego moment przejścia musi przyjmować wartości różne od zera (3.4):

$$\alpha_{nm} = \langle \Psi_n | \hat{\alpha} | \Psi_m \rangle \neq 0. \quad (3.4)$$

W przypadku rozproszenia Ramana decyduje o tym **zmiana polaryzowalności w czasie przejścia ze stanu oscylacyjnego n do m** .

Podejście kwantowe, jako jedyne, prawidłowo opisuje intensywność promieniowania rozproszonego dla przejścia $n \rightarrow m$ i wykazuje jego zależność od oscylacyjnej liczby kwantowej. Integralna intensywność promieniowania ramanowskiego jest zależna od czwartej potęgi częstości światła rozproszonego i kwadratu pochodnej polaryzowalności względem danej współrzędnej normalnej i jest wyrażona ogólnie przez zależność (3.5):

$$I \propto I_0 \cdot (\nu_0 \pm \nu_{osc})^4 \cdot |\alpha_{nm}|^2. \quad (3.5)$$

Przekrój czynny na rozproszenie (proporcjonalny do $(\nu_0 \pm \nu_{osc})^4 \cdot |\alpha_{nm}|^2$) ma istotne znaczenie fizyczne, gdyż określa **prawdopodobieństwo** przejść pomiędzy poszczególnymi poziomami dwufotonowego procesu, jakim jest rozproszenie Ramana.

W celu określenia stosunku intensywności składowych światła rozproszonego należy rozważyć populację molekuł na poszczególnych stanach oscylacyjnych w określonej temperaturze (rozkład Boltzmanna). Trzeba pamiętać, iż w warunkach normalnych największa ilość cząsteczek znajduje się w podstawowym stanie oscylacyjnym ($\nu = 0$). Stąd też wynika większa intensywność pasm stokesowskich w porównaniu z antystokesowskimi. Stosunek ten możemy wyrazić następująco (3.6):

$$\frac{I_{\text{anty-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \frac{(\nu_0 + \nu_{\text{osc}})^4}{(\nu_0 - \nu_{\text{osc}})^4} \exp\left(-\frac{h\nu_{\text{osc}}}{kT}\right). \quad (3.6)$$

W przypadku zastosowania promieniowania widzialnego lub nadfioletowego $\nu_0 \gg \nu_{\text{osc}}$, a więc czlon przed eksponentą w powyższym równaniu jest prawie równy jedności i zależność tę sprowadza się do wzoru (3.7):

$$\frac{I_{\text{anty-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \exp\left(-\frac{h\nu_{\text{osc}}}{kT}\right). \quad (3.7)$$

Tak więc o stosunku intensywności decyduje stosunek obsadzeń poziomów oscylacyjnych i temperatury, w jakiej znajduje się drgająca cząsteczka.

Każdą molekułę można scharakteryzować poprzez **tensor polaryzowalności** wynikający z jej właściwości strukturalnych. Stąd też jeśli cząsteczka jest izotropowa, to jej polaryzowalność ma tę samą wartość we wszystkich kierunkach. W przypadku anizotropowości molekuly wartość polaryzowalności przynajmniej w jednym kierunku jest inna od dwóch pozostałych (np. $\alpha_{xx} \neq \alpha_{yy} = \alpha_{zz}$) i zależy od budowy tej molekuly. W tym ostatnim przypadku istotne znaczenie w opisie widma Ramana odgrywa pomiar **współczynnika depolaryzacji** ρ , wyrażonego następująco (3.8):

$$\rho = \frac{3\gamma^2}{45\alpha_{sr}^2 + 4\gamma^2}, \quad (3.8)$$

gdzie α_{sr} jest $\frac{1}{3}$ śladu tensora polaryzowalności, a γ jego anizotropią.

Pomiar stopnia depolaryzacji dokonuje się poprzez rejestrację widma kolejno przy polaryzacji prostopadłej (90°) i równoległej (180°), a następnie zastosowanie dla każdego z pasm wzoru (3.9):

$$\rho = I_{\perp} / I_{\parallel}. \quad (3.9)$$

Wartość tego współczynnika pomaga określić symetrię drgania normalnego i dla spolaryzowanego światła wzbudzającego (np. światło lasera) przyjmuje wartości od 0 do $\frac{3}{4}$. Stąd możemy rozważyć następujące przypadki:

- $\rho = \frac{3}{4}$ oznacza całkowicie asymetryczne lub zdegenerowane drganie (np. B_2, T), dla którego $\alpha_{sr} = 0$, a $\gamma \neq 0$. Pasma odpowiadające tej wartości ρ są zazwyczaj o niskiej intensywności i nazywane pasmami zdepolaryzowanymi,
- $\rho < \frac{3}{4}$ oznacza drganie symetryczne (np. A_2), dla których α_{sr} i γ są różne od zera. Pasma odpowiadające tej z kolei wartości ρ są zazwyczaj bardziej intensywne i nazywane pasmami częściowo spolaryzowanymi,
- oraz szczególny przypadek, gdzie $\rho \cong 0$, oznacza pełnosymetryczne drganie (np. A_1), dla którego $\alpha_{sr} \neq 0$, a $\gamma = 0$. Pasma odpowiadające tej wartości ρ wykazują znaczną zazwyczaj intensywność i są nazywane pasmami całkowicie spolaryzowanymi.

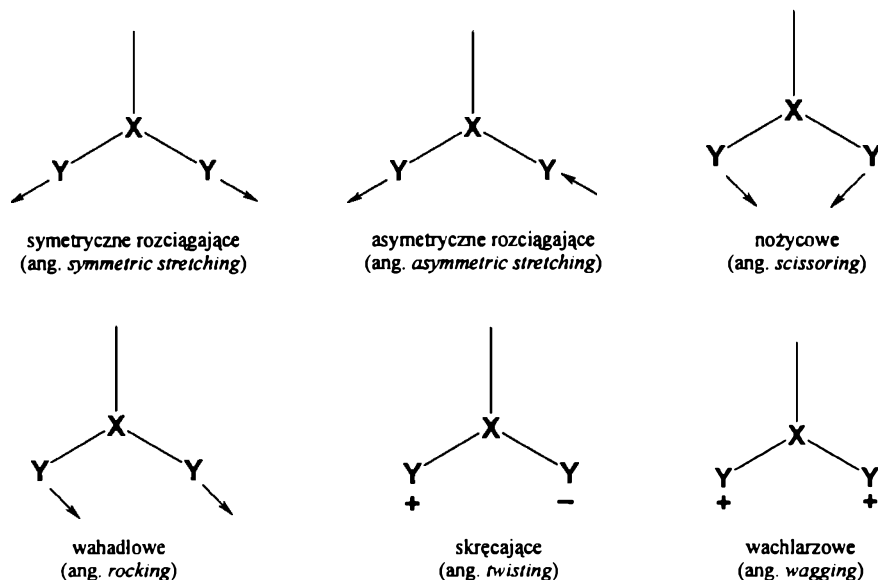
Niezwykle pomocne w analizie widm ramanowskich jest rozważenie symetrii molekuly (a więc jej możliwej struktury molekularnej) i jej wpływu na postać widma. $3N-6(5)$ drgań normalnych N atomowej cząsteczki (patrz rozdział 1) mogą być sklasyfikowane według właściwości jej grupy punktowej. Na przykład, cząsteczka H_2O o grupie punktowej C_{2v} posiada dwa drgania o symetrii A_1 i jedno o symetrii B_2 . Czytelnik może się zapoznać ze szczegółami dotyczącymi teorii grup w literaturze [1, 2]. Następnie rozważania dotyczące teorii grup pozwalają na przewidywanie ilości aktywnych drgań w widmie rozproszenia ramanowskiego. Mówi o tym reguła wyboru wskazująca, iż drganie jest aktywne w Ramanie, jeśli którakolwiek ze składowych polaryzowalności jest o tej samej symetrii jak to drganie.

Należy również podkreślić, iż ilość drgań aktywnych w widmach rozproszenia Ramana, wyznaczonych na podstawie teorii grup, może być inna niż ilość obserwowanych pasm w zarejestrowanym widmie. Rozbieżności te mogą wynikać m.in. z obecności w widmie nadtonów, pasm kombinacyjnych, rezonansu Fermiego, zniesienia degeneracji niektórych drgań ze względu na obniżenie symetrii molekuly czy też występowania danej cząsteczki w formie różnych izomerów.

Metodą pomagającą w opisie widma ramanowskiego jest jego analiza pod kątem **charakterystycznych drgań grup atomów**. Występują one w określonych zakresach widma i są niezależne od pozostałej części cząsteczki (np. drganie rozciągające C–H spodziewane jest w zakresie liczb falowych $2850\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$). Częstości grupowe są nieodłącznie związane z różnymi kryteriami podziału drgań. Rysunek 3.2 przedstawia rodzaje drgań na przykładzie grupy XY_2 . I tak drgania związane ze zmianą długości wiązania nazywamy drganiami rozciągającymi, a te zmieniające kąt pomiędzy atomami – drganiami deformacyjnymi lub zginającymi (np. drganie nożycowe). Używając tablic z częstościami grupowymi, można opisać jakościowo widmo Ramana i zidentyfikować grupy atomów odpowiedzialnych za poszczególne drganie, a więc zdefiniować pochodzenie pojawiającego się pasma (przykładowe tablice można znaleźć w [3]).

Inne kryterium podziału wynika z symetrii wychylenia (tj. drganie symetryczne i asymetryczne) czy też, jak w przypadku molekuł płaskich, rozróżnia się drgania w płaszczyźnie (ang. *in-plane*) i poza płaszczyzną (ang. *out-of-plane*).

Każde z tych drgań można również rozpatrywać ze względu na wyżej wspomniane zasady teorii grup. I tak drgania typu A to drgania niezdegenerowane, symetryczne względem osi o najwyższej krotności, typu B to także drgania niezdegenerowane, ale antysymetryczne względem osi o najwyższej krotności, a typu E i T (F) to drgania kolejno dwu- i trzykrotnie zdegenerowane. Dodatkowe indeksy przy symbolu, takie jak 1 i 2, ' i ", g (*gerade*) oraz u (*ungerade*) określają symetrię drgania względem: kolejno osi o innej krotności niż oś główna, płaszczyzny czy środka inwersji.

RYS. 3.2. Rodzaje drgań molekuli XY_2 .

Jednakże należy pamiętać, iż koncept częstości grupowych może być stosowany tylko wtedy, gdy oscylację danej grupy można przyjąć jako „izolowaną” w stosunku do innych drgań molekuli. Inaczej mówiąc, gdy dana oscylacja (współrzędna wewnętrzna) stanowi ponad 50% energii potencjalnej w danym drganiu normalnym (PED, ang. *potential energy distribution*).

Eksperymentalnie, przypisanie pasmom drgania poszczególnych grup atomów opiera się również na obserwacji **przesunięcia izotopowego** (zmiany częstości określonego drgania na skutek wprowadzenia innego izotopu danego atomu). Przy czym zakłada się, iż podczas zmiany izotopu nie zmienia się rozkład gęstości elektronowej, a więc nie zmienia się stała siłowa danego wiązania. Wielkość tego przesunięcia określa się, korzystając z równania (3.10):

$$\bar{\nu}[\text{cm}^{-1}] = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu_{\text{red}}}}, \quad (3.10)$$

gdzie: k – stała siłowa, μ_{red} – masa zredukowana, c – prędkość światła (patrz rozdział 1).

Przyjmuje się również, iż znacznemu przesunięciu ulegają jedynie pasma, które reprezentują „izolowane” drgania grupy atomów ze zmienionym izotopem. Należy jednak pamiętać, iż w prawie każdym drganiu normalnym może być nawet niewielki przyczynek do oscylacji tejże grupy, a więc jego częstość również może ulec nieznacznemu przesunięciu.

Przedstawione powyżej metody opisu widm rozproszenia Ramana opierają się na uzyskanych danych doświadczalnych. Niemniej jednak trudno sobie obecnie wyobrazić dokładną interpretację widm oscylacyjnych bez użycia metod kwantowo-chemicz-

nych, a wśród nich przede wszystkim DFT (ang. *density functional theory*). Zastosowanie tego typu podejścia do opisu widma oscylacyjnego (zarówno IR jak i Ramana) opiera się na kilku etapach:

- skonstruowaniu modelu lub kilku modeli strukturalnych o zadanej symetrii dla danej molekuly,
- optymalizacji ich geometrii, czyli otrzymaniu struktury o najmniejszej wartości energii wewnętrznej,
- obliczeniach dla tej ostatniej struktury molekularnej częstości drgań w **przybliżeniu harmonicznym**, ich symetrii, intensywności pasm IR i Ramana oraz współczynnika depolaryzacji,
- porównaniu eksperymentalnych i teoretycznych widm dla wybranego optymalnego modelu,
- opisie doświadczalnego widma na podstawie obliczonych wartości PED lub wizualizacji poszczególnych drgań dla wybranego w poprzednim kroku modelu.

Dokładny opis przedstawionych powyżej pojęć spotykanych w spektroskopii ramanowskiej można znaleźć w literaturze [2, 4–6].

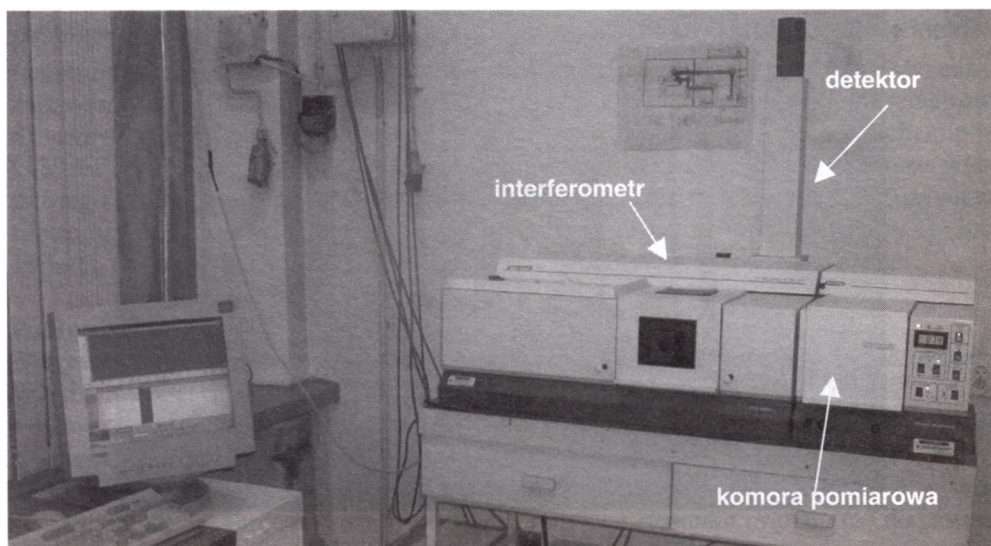
3.2. Opis aparatury

Fourierowski spektrometr ramanowski został przedstawiony na rysunku 3.3, a jego zasadnicze elementy to:

laser ⇒ komora pomiarowa ⇒ interferometr ⇒ detektor

3.2.1. Laser

Wyraz „laser” jest skrótem pełnej angielskiej nazwy mechanizmu jego działania: *light amplification by stimulated emission of radiation* – wzmocnienie światła przez wymuszoną emisję promieniowania. Zjawisko emisji wymuszonej (A. Einstein, 1917) polega na oddziaływaniu fotonu ze wzbudzonym atomem, jonem lub molekułą o energii wzbudzenia równej energii fotonu, w wyniku którego powstaje drugi foton o tych samych własnościach co foton inicjujący. Zjawisko to musi towarzyszyć absorpcji i emisji spontanicznej. W ośrodku czynnym lasera wytwarzany jest stan inwersji obsadzeń oraz oświetlany promieniowaniem, aby efektywnie spowodować emisję wymuszoną w określonym kierunku. Inwersję obsadzeń osiąga się przez pompowanie ośrodka czynnego. Rezonator optyczny zapewnia selektywne sprzężenie zwrotne dla promieniowania emitowanego przez laser. Zasadniczą częścią rezonatora jest układ dwóch zwierciadeł, z których jedno jest nieprzepuszczalne (współczynnik odbicia $R \approx 100\%$), drugie – częściowo przepuszczalne ($R \approx 95\%$), co pozwala na wyprowadzenie części promieniowania na zewnątrz. Taka całość złożona ze zwierciadeł i ośrodka czynnego stanowi rezonator optyczny.



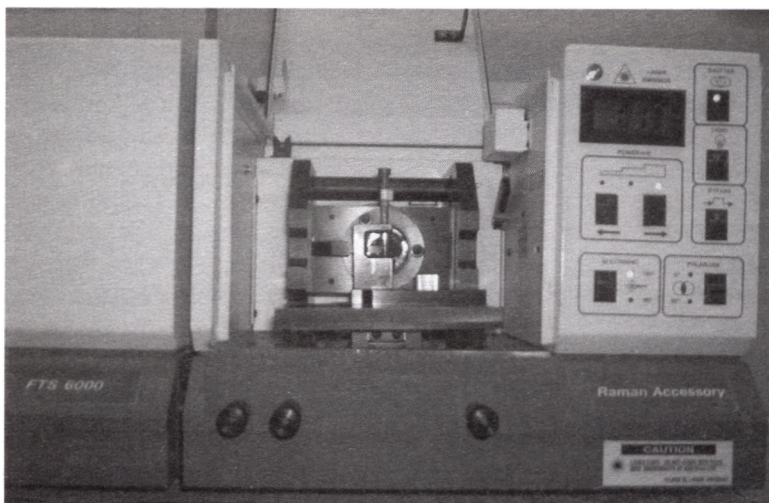
RYS. 3.3. Fourierski spektrometr ramanowski (Bio-Rad Raman Accessory).

Widmo ramanowskie jest wzbudzone promieniowaniem monochromatycznym emitowanym przez laser. Takie promieniowanie cechuje się dużą gęstością promieniowania i jest spolaryzowane, tzn. składowa elektrycznej fali elektromagnetycznej jest falą płaską.

W spektrometrach fourierskich stosuje się najczęściej laser Nd:YAG (granat itrowo-glinowy z domieszką jonów neodymu Nd^{3+} ; $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12} + \text{Nd}_2\text{O}_3$) chłodzony powietrzem lub wodą, o mocy rzędu jednego wata, pracujący w sposób ciągły w zakresie bliskiej podczerwieni, $\lambda = 1064 \text{ nm}$.

3.2.2. Próbką

Wnętrze komory pomiarowej przedstawia rysunek 3.4. Badana próbka może mieć dowolny stan skupienia, zazwyczaj umieszczana jest w szklanej lub kwarcowej kapilarze. Monokryształ można umieścić bezpośrednio na drodze wiązki promieniowania wzbudzającego. Minimalna ilość próbki jest rzędu mg. W typowych rozwiązaniach 50% promieniowania jest odbijane przez płytkę, a 50% przechodzi przez nią.



RYS. 3.4. Wnętrze komory pomiarowej.

3.2.3. Interferometr Michelsona

Zasada działania interferometru Michelsona jest przedstawiona w rozdziale 1.

3.2.4. Detektor

W spektrometrach fourierowskich stosuje się detektory InGaAs pracujące w temperaturze pokojowej lub bardzo czułe detektory germanowe działające w temperaturze ciekłego azotu.

3.2.5. Porównanie spektrometrów dyspersyjnych i fourierowskich

Intensywność rozpraszania ramanowskiego jest proporcjonalna do stężenia i grubości warstwy (objętości, w jakiej powstaje sygnał ramanowski) badanej próbki, zgodnie z wzorem (3.11):

$$I = I_0 k c l \sim \nu_0^4 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)^2 c l. \quad (3.11)$$

Zależy również od czwartej potęgi częstości promieniowania padającego ν_0 , co już wcześniej było dyskutowane. Oznacza to, że najsilniejsze rozpraszanie ramanowskie uzyskujemy, stosując do wzbudzeń lasery z zakresu UV (krótkie fale = wysokie częstotliwości), najsłabsze zaś dla zakresu IR (długie fale = niskie częstotliwości) (patrz rys. 3.5).

Zastosowanie w spektrometrach fourierowskich laserów Nd:YAG pracujących w zakresie podczerwieni powoduje „ucieczkę” od fluorescencji (w tym zakresie promieniowania nie obserwuje się przejść elektronowych), ale intensywność światła roz-

proszonego jest zredukowana poprzez wspomniany czynnik ν_0^4 . Zastosowanie interferometru powoduje jednak częściową kompensację tego zjawiska, gdyż brak szczeliny daje wzmocnienie sygnału o ok. 2 rzędów wielkości w porównaniu do spektrometrów dyspersyjnych. Stosowanie lasera Nd:YAG w spektrometrach fourierowskich implikuje też możliwości detekcji promieniowania rozproszonego. Dla tego zakresu widmowego nie mogą być stosowane wielokanałowe, czułe detektory CCD (używane często w spektrometrach dyspersyjnych), wykorzystuje się natomiast detektory Ge lub InGaAs, które niestety charakteryzują się wyższym szumem i niższą czułością.

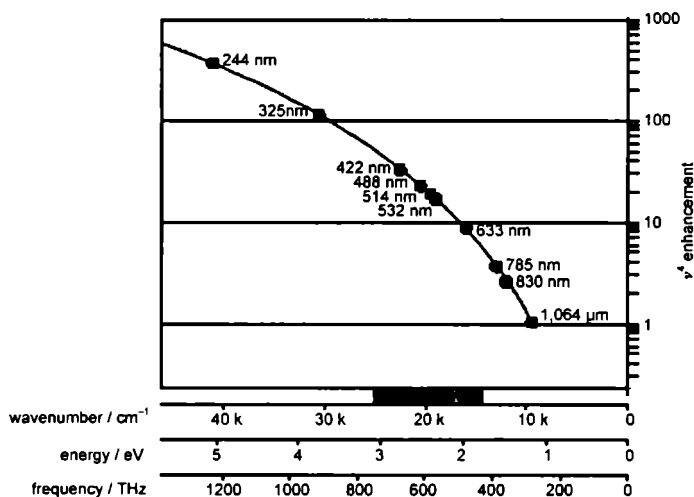
Podsumowując:

Korzyści ze stosowania spektrometrów interferometrycznych w stosunku do dyspersyjnych to:

- korzyść Connesa: optyczna kontrola przesuwu zwierciadła, wysoka precyzja skali częstości widma dzięki stosowaniu lasera (He i Ne) jako wzorca częstości,
- korzyść Fellgetta (zysk multipleksowy): zbieranie wszystkich długości fal w tym samym czasie, skrócenie czasu pomiaru i poprawa stosunku sygnału (S) do szumu (N), gdyż:

$$(S/N \sim n^{\frac{1}{2}}), \quad n - \text{liczba pomiarów}, \quad (3.12)$$

- korzyść Jacquinota: brak szczelin ograniczających wiązkę promieniowania, a więc możliwość rejestracji całego widma w tym samym czasie,
- zmiana rozdzielczości widma jest prosta i szybka – dokonywana jest przez zmianę w programie komputerowym, natomiast w spektrometrach dyspersyjnych wymaga zmiany siatki dyfrakcyjnej i rekaliibracji instrumentu.



RYS. 3.5. Diagram pokazujący wielkość czynnika ν_0^4 dla kilku laserów wzbudzających promieniowanie od zakresu UV do IR. Dane zostały znormalizowane tak, by wzbudzenie przy $\lambda = 1064$ nm miało wydajność 1 [Renishaw SPD/TN/014 Issue 4.0 March 2004, <http://www.renishaw.com/UserFiles/acrobat/UKEnglish/SPD-TN-014.pdf>].

Korzyści ze stosowania lasera Nd:YAG w stosunku do laserów pracujących w zakresie UV-VIS:

- brak fluorescencji dla większości badanych próbek (szczególnie istotne w analizie materiału biologicznego wykazującego silną fluorescencję w zakresie UV-VIS),
- ze względu na brak absorpcji promieniowania laserowego przez próbkę mniejsza możliwość jej fotochemicznego lub termicznego rozkładu.

3.3. Zagadnienia do opracowania

Model oscylatora harmonicznego i anharmonicznego; klasyczny i kwantowy model opisu efektu rozproszenia Ramana; współczynnik depolaryzacji; definicja drgania normalnego oraz jego rodzaje, częstości grupowe, określenie liczby i symetrii drgań aktywnych w widmie Ramana na podstawie teorii grup; znaczenie przesunięcia izotopowego; budowa i działanie fourierowskiego spektrometru ramanowskiego, zalety i wady stosowanej aparatury.

3.4. Opis ćwiczeń

A p a r a t u r a

Wszystkie ćwiczenia są wykonywane na spektrometrze Bio-Rad Raman Accessory FTS 6000. Spektrometr ten wykorzystuje wzbudzenie lasera Nd:YAG (granat itrowo-glinowy domieszkowany jonami Nd^{3+}) o długości promieniowania 1064 nm oraz detektor germanowy chłodzony ciekłym azotem.

Ćwiczenie 1. Wyznaczenie struktury molekularnej chlorowcopochodnych metanu na podstawie analizy ich widm rozproszenia Ramana

C e l ć w i c z e n i a

Identyfikacja struktury molekularnej dichlorometanu, chloroformu i tetrachlorku węgla(IV) na podstawie:

- zastosowania teorii grup,
- opisu widm rozproszenia Ramana,
- idei przesunięcia izotopowego (dla dichlorometanu i chloroformu)
- oraz obliczeń kwantowo-chemicznych.

O d c z y n n i k i

Ciekły CCl_4 , CHCl_3 , CDCl_3 , CH_2Cl_2 , CD_2Cl_2 .

W y k o n a n i e ć w i c z e n i a

Szklane ampułki z odczynnikami umieścić się w spektrometrze, a następnie przeprowadzić pomiar widma. Warunki pomiarowe (rozdzielczość, moc lasera, ilość skanów =

czas pomiaru) należy dobrać eksperymentalnie, indywidualnie dla każdego pomiaru. Wykonuje się widma bez polaryzacji oraz z polaryzacją 0 i 90°.

Opracowanie wyników

1. Wskazać grupę punktową, do której należą badane związki chemiczne, oraz na podstawie znajomości reguł teorii grup wyznaczyć liczbę drgań normalnych i ich aktywność w Ramanie. Określić zależność pomiędzy symetrią molekuly a ilością pasm w widmie ramanowskim.
2. Odczytać z otrzymanych widm położenia poszczególnych pasm.
3. W przypadku widm polaryzacyjnych:
 - odczytać intensywność pasm oraz obliczyć dla nich współczynnik depolaryzacji,
 - na podstawie wartości ρ zaproponować symetrię poszczególnych pasm oraz określić rodzaj drgań.
4. Dla związków CHCl_3 i CDCl_3 oraz CH_2Cl_2 i CD_2Cl_2 obliczyć eksperymentalną wielkość przesunięcia izotopowego i na jego podstawie przypisać rodzaj drgań do poszczególnych pasm widma.
5. Porównać otrzymane eksperymentalnie wyniki (częstości, intensywności względne pasm, symetrie drgań, współczynnik depolaryzacji i przesunięcie izotopowe) z danymi teoretycznymi (patrz tab. 3.1). Skomentować występujące różnice.

TAB. 3.1. Wartości częstości (w cm^{-1}), intensywności pasm (I_R , w jednostkach względnych przeliczonych wg [7]) i współczynnika depolaryzacji dla badanych cząsteczek obliczonych metodą B3LYP przy użyciu bazy funkcyjnej 6-311++G(d,p) [program Gaussian 03, 8].

CCl ₄ o symetrii T _d						
Numer drgania	Częstość [cm ⁻¹]		Symetria	I _R	ρ	
1	220		E	152	0,75	
2	220		E	152	0,75	
3	314		T ₂	150	0,75	
4	314		T ₂	150	0,75	
5	314		T ₂	150	0,75	
6	447		A ₁	331	0,0	
7	733		T ₂	195	0,75	
8	733		T ₂	195	0,75	
9	733		T ₂	195	0,75	
CHCl ₃ i CDCl ₃ o symetrii C _{3v}						
Numer drgania	Częstość [cm ⁻¹]		Symetria	I _R		ρ
	CHCl ₃	CDCl ₃		CHCl ₃	CDCl ₃	
1	261	258	E	167	167	0,75
2	261	258	E	165	165	0,75
3	365	360	A ₁	190	185	0,22
4	662	641	A ₁	119	125	0,01
5	729	708	E	31	33	0,75
6	729	708	E	31	33	0,75
7	1245	920	E	21	17	0,75
8	1245	920	E	20	17	0,75
9	3182	2343	A ₁	32	35	0,26

CH ₂ Cl ₂ i CD ₂ Cl ₂ o symetrii C _{2v}						
Numer drgania	Częstość [cm ⁻¹]		Symetria	I _R		ρ
	CH ₂ Cl ₂	CD ₂ Cl ₂		CH ₂ Cl ₂	CD ₂ Cl ₂	
1	282	278	A ₁	205	203	0,53
2	699	670	A ₁	135	135	0,08
3	719	693	B ₂	37	46	0,75
4	902	712	B ₁	10	14	0,75
5	1179	838	A ₂	40	36	0,75
6	1302	975	B ₂	18	7	0,75
7	1457	1069	A ₁	28	28	0,45
8	3122	2262	A ₁	49	53	0,09
9	3201	2385	B ₁	27	29	0,75

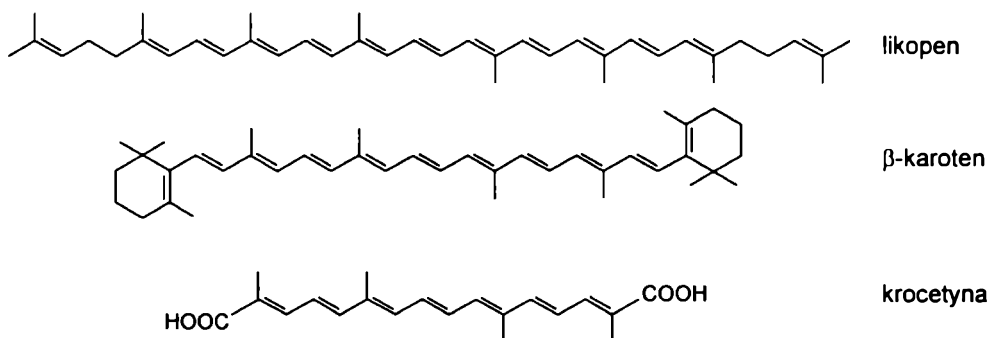
Ćwiczenie 2. Badanie karotenoidów w roślinach

Karotenoidy są związkami alifatycznymi lub alifatyczno-cyklicznymi, rozpuszczalnymi w tłuszczach. Dzielimy je na karoteny oraz ksantofile (pochodne karotenów zawierające tlen). Karotenoidy występujące w roślinach to głównie tetraterpenoidy C₄₀ zbudowane z ośmiu jednostek izoprenowych C₅. Charakteryzują się obecnością długiego łańcucha centralnego z systemem sprzężonych wiązań podwójnych, które absorbując światło (przejście elektronowe π-π*), są odpowiedzialne za żółtą, pomarańczową lub czerwoną barwę tych związków [9]. Pomimo tego że barwniki te występują w roślinach w ilościach ppm, mogą być analizowane przy użyciu spektroskopii ramanowskiej [10]. W widmach otrzymanych techniką NIR-FT-Raman pasma karotenoidowe są silnie wzmocnione poprzez efekt prerezonansowy i dzięki temu łatwe do zidentyfikowania. Zastosowanie tej techniki pozwala jednocześnie na uniknięcie fluorescencji materiału biologicznego, obserwowanej w przypadku stosowania laserów w zakresie widzialnym [11]. Silne pasma karotenoidów są związane z drganiami rozciągającymi zgodnymi w fazie (ang. *in-phase stretching*) wiązań C=C (ν₁) i C-C (ν₂) łańcucha polienowego i są widoczne na widmie ramanowskim odpowiednio w zakresach 1500–1580 cm⁻¹ oraz 1150–1170 cm⁻¹. Dodatkowo widoczne jest średniej intensywności pasmo ok. 1000–1020 cm⁻¹ (ν₃) związane z drganiami wahadłowymi grup CH₃. Dla celów identyfikacyjnych karotenoidów może być wykorzystane pasmo markerowe ν₁, którego położenie silnie zależy od długości łańcucha polienowego [12]. Stwierdzono, że wraz z wydłużaniem łańcucha centralnego liczba falowa pasma ν₁ zmniejsza się ze względu na sprzężenie elektronowo-fononowe [13].

Karotenoidy pełnią wiele ważnych funkcji biologicznych w żywych organizmach. Powszechnie występują razem z chlorofilem w chloroplastach (zielone tkanki roślin) oraz w chromoplastach, nadając atrakcyjną barwę płatkom kwiatów i owocom. Ludzie ani zwierzęta nie potrafią syntezować karotenoidów, jednakże mogą je pobierać wraz z pożywieniem i następnie modyfikować, jak np. β-karoten, który po przyswojeniu jest przekształcany do witaminy A. Uważa się, że karotenoidy odgrywają ważną funkcję w zapobieganiu chorobom nowotworowym, układu krążenia oraz degeneracji żółtej plamki oka, co jest związane z ich własnościami antyoksydacyjnymi. Zdolność wychwytywania tlenu w stanie singletowym jest związana ze sprzężonym systemem wiązań podwójnych obecnym w ich cząsteczkach. Stwierdzono, że największe znaczenie prewencyjne mają karoteny posiadające co najmniej 9 wiązań podwójnych i dlatego

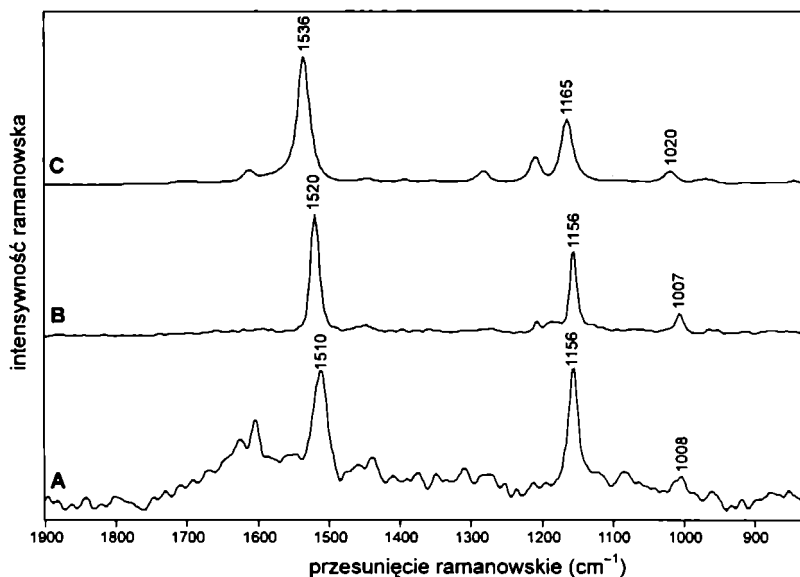
w ostatnich latach badania skupiają się w dużej mierze na likopenie, który posiada 11 sprzężonych wiązań C=C [9].

Pomidory są istotnym źródłem likopenu i β -karotenu, a barwa tych owoców zależy od stosunku zawartości obu karotenów. W pomidorach o barwie czerwonej jest wyższy poziom likopenu niż w pomidorach pomarańczowych, w których obserwuje się więcej β -karotenu. Wysoką zawartość likopenu ma również przecier pomidorowy. Bogatym źródłem β -karotenu są także pomarańczowe korzenie marchwi jadalnej. Suszone znamiona słupków krokusa używane są jako przyprawa (szafran) oraz barwnik, a swój intensywny kolor zawdzięczają karotenoidowi – krocetynie. Likopen, β -karoten oraz krocetyna posiadają odpowiednio 11, 9 i 7 sprzężonych wiązań podwójnych C=C w łańcuchu centralnym (rys. 3.6).



RYS. 3.6. Struktura molekularna wybranych karotenoidów.

Występowanie tych związków w tkance roślinnej można zaobserwować przy użyciu spektroskopii ramanowskiej. Pomiar można wykonać zarówno na materiale świeżym, jak i wysuszonym. Otrzymane widma czerwonych owoców pomidora, pomarańczowego korzenia marchwi oraz przyprawy (szafran) zostały przedstawione na rysunku 3.7. Na widmach można zaobserwować zależność pomiędzy wartością ν_1 pasma karotenowego a długością łańcucha polienowego i na tej podstawie dokonać identyfikacji badanych karotenoidów.



RYS. 3.7. Widma FT-Raman czerwonego owocu pomidora (A), pomarańczowego korzenia marchwi (B) oraz szafranu (C).

Cel ćwiczenia

1. Analiza karotenoidów *in situ* w wybranych owocach, warzywach, liściach lub kwiatkach i ich produktach przy zastosowaniu spektroskopii NIR-FT-Raman.
2. Określenie długości łańcucha centralnego badanych karotenoidów na podstawie położenia pasma ν_1 w otrzymanych widmach ramanowskich.

Odczynniki

3–6 wybrane rośliny bogate w karotenoidy o różnej długości łańcucha polienowego (tab. 3.2), retinol (witamina A, karotenoid posiadający 4 sprzężone wiązania C=C), dowolna próbka roślinna zawierająca karotenoidy.

TAB. 3.2. Dominujące karoteny występujące w wybranych roślinach.

Nazwa rośliny	Część rośliny	Dominujący karotenoid (liczba wiązań C=C w łańcuchu)
Szafran (<i>Crocus sativus</i> L.)	znamiona słupków	krocetyna (7)
Nagietek (<i>Calendula officinalis</i> L.)	płatki	auroksantyna (7), flawoksantyna (8), luteoksantyna (8)
Rumianek (<i>Chamomilla recutita</i> L.)	pyłek	flawoksantyna (8), luteoksantyna (8)
Nagietek (<i>Calendula officinalis</i> L.)	pyłek	flawoksantyna (8), luteoksantyna (8), luteina (9), anteraksantyna (9)
Marchew (<i>Daucus carota</i> L.)	żółty korzeń	luteina (9)
Marchew (<i>Daucus carota</i> L.)	liść	luteina (9), β -karoten (9)
Bluszcz (<i>Hedera helix</i> L.)	liść	luteina (9), β -karoten (9)

Bazylija (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	liść	luteina (9), β -karoten (9)
Begonia (<i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> Hort.)	liść	luteina (9), β -karoten (9)
Brokuł (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> L.)	kwiat	luteina (9), β -karoten (9)
Fasola szparagowa (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	zielony strąk	luteina (9), β -karoten (9)
Kukurydza (<i>Zea mays</i> L.)	nasiono	zeaksantyna (9)
Dynia (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	owoc	β -karoten (9)
Marchew (<i>Daucus carota</i> L.)	pomarańczowy korzeń	β -karoten (9)
Papryka (<i>Capsicum annuum</i> L.)	zielony owoc	luteina (9)
Papryka (<i>Capsicum annuum</i> L.)	czerwony owoc	kapsantyna (9)
Arbuz (<i>Citrullus lanatus</i> Thumb.)	owoc	likopen (11)
Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	czerwony owoc	likopen (11)
Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	pomarańczowy owoc	β -karoten (9)
Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	przecier pomidorowy	likopen (11)

Wykonanie ćwiczenia

Odkroić fragment tkanki kolejnych próbek roślinnych i przymocować do stolika pomiarowego, a następnie wykonać pomiar. Wszystkie pomiary należy wykonać *in situ*. Dodatkowo zmierzyć widmo retinolu. Warunki pomiarowe (rozdzielczość, moc lasera, ilość skanów = czas pomiaru) należy dobrać eksperymentalnie, indywidualnie dla każdej próbki.

Opracowanie wyników

1. Odczytać z otrzymanych widm położenia pasm karotenoidów: ν_1 , ν_2 i ν_3 .
2. Określić długość łańcucha polienowego badanych karotenoidów na podstawie położenia pasma ν_1 . Czy istnieje związek pomiędzy długością łańcucha a kolorem karotenoidu?
3. Przedstawić graficznie zależność pomiędzy wartością ν_1 a $(N + 1)^{-1}$, gdzie N jest liczbą wiązań sprzężonych C=C, i omówić tę zależność. Podać przybliżone wartości liczby falowej pasma ν_1 dla karotenów posiadających 5, 13 i 17 wiązań C=C w łańcuchu centralnym.
4. Przedyskutować użyteczność metody do badania karotenoidów w roślinach i ich produktach.

Ćwiczenie 3. Analiza kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe są wyższymi kwasami monokarboksylowymi o ogólnym wzorze R-COOH. Ich łańcuchy węglowodorowe są proste, o parzystej liczbie atomów węgla (nie wliczając grupy -COOH). Kwasy tłuszczowe często oznacza się w notacji *n:m*,

gdzie n jest liczbą atomów węgla w cząsteczce (włącznie z atomem zawartym w grupie karboksylowej), m zaś liczbą wiązań podwójnych. W przyrodzie kwasy te występują w postaci estrów z gliceryną, czyli tłuszczów. Tłuszcz spożywany w odpowiednich ilościach jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, jednak rodzaj spożywanych tłuszczów ma ogromne znaczenie w diecie. Miękkie i ciekłe tłuszcze (oleje i margaryny kubkowe wytwarzane z olejów) bogate są w wielo- i jednonienasycone kwasy tłuszczowe (NKT), kwasy korzystne dla zdrowia. Natomiast tłuszcze o twardej konsystencji (masło, smalec i margaryny twarde) zawierają większe ilości nasyconych kwasów tłuszczowych oraz izomery *trans*, które są niekorzystne dla zdrowia.

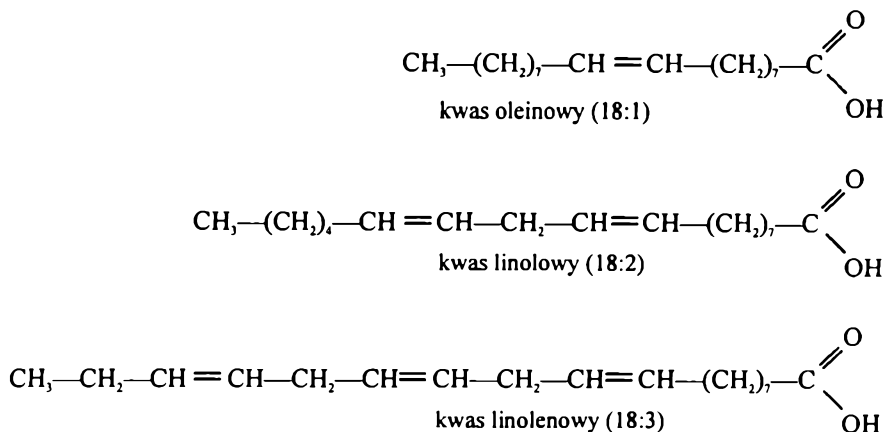
Bardziej szczegółowo przedstawia to poniższe zestawienie:

1. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe:

- aktywnie obniżają poziom cholesterolu we krwi,
- występują głównie w ciekłych i miękkich tłuszczach, takich jak oleje roślinne (olej sojowy i kukurydziany), miękkich margarynach kubkowych wytwarzanych z olejów oraz w różnych rodzajach orzechów,
- wśród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych występują niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), które biorą udział w budowie błon komórkowych i w produkcji hormonów. Można je podzielić na dwie rodziny: rodzinę kwasu linolowego (omega-6) i rodzinę kwasu α -linolenowego α -LNA (omega-3) (czasem wyróżnia się też grupę omega-9, do której należy kwas oleinowy). Największą wartością i aktywnością biologiczną odznaczają się NNKT należące do rodziny omega-3, obejmujące również kwas dokozaheksaenowy (DHA) i kwas eikozapentaenowy (EPA), zawarte przede wszystkim w żywności pochodzenia morskiego (tj. makrela, łosoś, halibut, dorsz, śledź, sardynka) oraz siemieniu lnianym,
- organizm ludzki nie może wytwarzać kwasów NNKT i w związku z tym muszą być one dostarczane wraz z pożywieniem. Za bardzo ważny czynnik zdrowotny uważa się odpowiedni skład tych kwasów, przede wszystkim stosunek ilościowy kwasu linolowego do linolenowego, przy czym tego drugiego wciąż spożywa się za mało (rys. 3.8, tab. 3.3).

2. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe:

- są korzystne dla zdrowia,
- występują głównie w ciekłych tłuszczach, tj. w oliwie z oliwek, oleju słonecznikowym i oleju rzepakowym, oraz w tłuszczach o miękkiej konsystencji, czyli w miękkich margarynach wytworzonych z tych olejów.



RYS. 3.8. Struktura molekularna wybranych kwasów tłuszczowych.

3. Nasycone kwasy tłuszczowe:

- podnoszą poziom cholesterolu we krwi, a co za tym idzie zwiększają ryzyko zachorowania na miażdżycę i choroby układu krążenia,
- występują głównie w produktach pochodzenia zwierzęcego, takich jak mięso, masło, tłuste mleko, ser, oraz w żywności przetworzonej, która zawiera tłuszcze piekarnicze czy częściowo uwodornione tłuszcze roślinne.

4. Izomery *trans* kwasów tłuszczowych:

- podnoszą poziom cholesterolu we krwi,
- występują w przetworzonej żywności, która zawiera tłuszcze piekarnicze czy częściowo uwodornione tłuszcze roślinne (np. margaryny utwardzane, ciastka, krakersy, frytki i chipsy), a w mniejszych ilościach występują w mleku, maśle czy wołowinie.

TAB. 3.3. Przybliżona zawartość procentowa nienasyconych kwasów tłuszczowych wybranych olejów [14, 15].

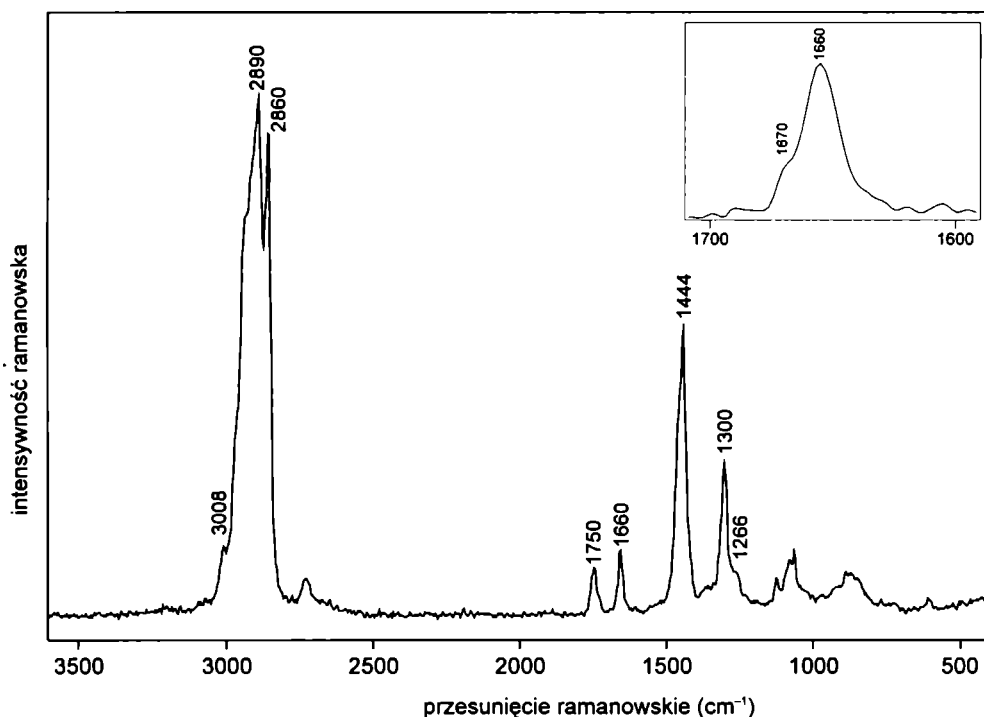
Olej	Kwas oleinowy (18:1) omega-9	Kwas linolowy (18:2) omega-6	Kwas linolenowy (18:3) omega-3
kukurydziany	34	48	1
lniany	19	15	55
oliwa z oliwek	74	9	
rzepakowy	15–60*	14–24*	8
sezamowy	40	42	
słonecznikowy	14–39	48–74	3
winogronowy	15	78	
z orzeszków ziemnych	61	19	

* Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych jest różna w zależności od odmiany rzepaku; ostatnie modyfikacje rzepaku prowadzą do otrzymania odmian o wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Spektroskopia ramanowska jest doskonałym narzędziem do badania tłuszczów. Pozwala na określenie dwóch ważnych parametrów dotyczących ich jakości:

1. Obecności szkodliwych izomerów *trans* C=C, występujących obok izomerów *cis* wiązania C=C.

Na rysunku 3.9 zostało przedstawione widmo ramanowskie margaryny. Położenia pasm wraz z odpowiednim drganiem grup funkcyjnych kwasów tłuszczowych zostały umieszczone w tabeli 3.4 [16].



RYS. 3.9. Widmo ramanowskie margaryny. Zakres liczb falowych pomiędzy 1700 a 1600 cm^{-1} został rozszerzony, aby uwidocznić strukturę znajdującego się tam pasma.

TAB. 3.4. Przypisanie najważniejszych pasm występujących w widmie ramanowskim margaryny [16].

Liczba falowa [cm^{-1}]	Grupa funkcyjna	Oznaczenie drgania	Opis drgania
3008	RCH=CHR	$\nu_{as}(\text{C-H})$	asymetryczne rozciąganie
2970	-CH ₃	$\nu_{as}(\text{C-H})$	asymetryczne rozciąganie
2940	-CH ₂	$\nu_{as}(\text{C-H})$	asymetryczne rozciąganie
2890	-CH ₃	$\nu_s(\text{C-H})$	symetryczne rozciąganie
2860	-CH ₂	$\nu_s(\text{C-H})$	symetryczne rozciąganie
1750	RC=OOR	$\nu(\text{C=O})$	rozciąganie
1670	<i>trans</i> RCH=CHR	$\nu(\text{C=C})$	rozciąganie
1660	<i>cis</i> RCH=CHR	$\nu(\text{C=C})$	rozciąganie
1444	-CH ₂	$\delta(\text{C-H})$	deformacja nożycowa
1300	-CH ₂	$\tau_{ip}(\text{C-H})$	deformacja skręciowa w fazie
1266	<i>cis</i> RCH=CHR	$\delta_{ip}(\text{C-H})$	symetryczne drganie wahadłowe
1100-800	-(CH ₂) _n	$\nu(\text{C-C})$	rozciąganie

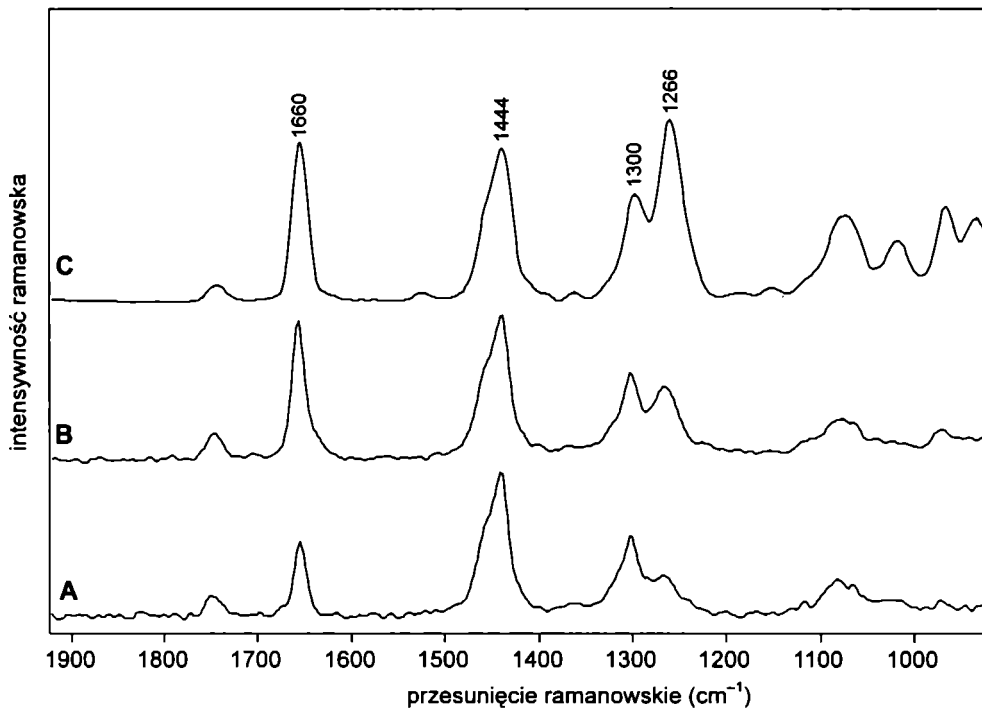
2. Stopnia nienasycenia tłuszczów.

Stopień nienasycenia tłuszczów wyrażany jest przez tzw. liczbę jodową (LJ), która określa liczbę gramów jodu potrzebną do wysycenia wiązań wielokrotnych w 100-gramowej próbce tłuszczu (3.13):

$$LJ = m_{I_2} = 100g/M_{\text{tłuszczu}} \cdot w \cdot M_{I_2}, \quad (3.13)$$

gdzie w ilość wiązań podwójnych w 1 molu tłuszczu.

Wartość LJ jest tym większa, im więcej wiązań podwójnych zawiera cząsteczka tłuszczu. Przy tej samej ilości wiązań podwójnych decyduje $M_{\text{tłuszczu}}$: im jest ona mniejsza, tym większa jest wartość LJ .



RYS. 3.10. Widma FT-Raman oliwy z oliwek (A), oleju słonecznikowego (B) i oleju lnianego (C).

Spektroskopia ramanowska pozwala na obliczenie stosunku ilości wiązań C=C do C-C występujących w kwasach tłuszczowych [17, 18], a tym samym na oszacowanie ich liczby jodowej. W tym celu można wykorzystać stosunek intensywności pasm przy 1660 i 1444 cm^{-1} (I_{1660}/I_{1444}). Na podstawie pomiarów szeregu tłuszczów stwierdzono, że istnieje liniowa korelacja pomiędzy stosunkiem I_{1660}/I_{1444} a liczbą jodową [14]. Poziom nienasycenia można wyznaczyć również ze stosunku dwóch innych pasm: przy 1266 i 1300 cm^{-1} (I_{1266}/I_{1300}) [15]. Użytecznym identyfikatorem stopnia nienasycenia jest też intensywność pasma przy 3008 cm^{-1} [20]. Na rysunku 3.10 przedstawione są widma ramanowskie kilku wybranych olejów: oliwy z oliwek (A), oleju słonecznikowego (B) i oleju lnianego (C). Porównanie stosunku intensywności pasm I_{1660}/I_{1444} oraz I_{1266}/I_{1300} widocznych na widmach ramanowskich przedstawionych na rysunku 3.10

pozwała na uszeregowanie badanych tłuszczów pod względem rosnącej zawartości kwasów nienasyconych (stała jodowa też rośnie w tym szeregu):

oliwa z oliwek < olej słonecznikowy < olej lniany.

Wyniki otrzymane na podstawie analizy widm ramanowskich bardzo dobrze korelują z danymi zawartymi w tabeli 3.3.

Cel ćwiczenia

1. Analiza kwasów tłuszczowych *in situ* w wybranych produktach spożywczych przy zastosowaniu spektroskopii NIR-FT-Raman.
2. Określenie stopnia nienasyceń kwasów tłuszczowych zawartych w badanych produktach na podstawie stosunku pasm markerowych. Wyznaczenie wartości stałej jodowej dla badanych tłuszczów.
3. Określenie izomerii badanych kwasów tłuszczowych, a w szczególności zbadanie, czy obecne są izomery *trans*.

Odczynniki

Wybrane produkty spożywcze posiadające wysoką zawartość tłuszczów, jak np. masło, margaryna, oleje roślinne, oraz niektóre owoce bogate w kwasy tłuszczowe, jak np. awokado, migdały, orzechy.

Wykonanie ćwiczenia

Umieścić próbki w szklanej kuwecie (ciekłe lub miękkie) lub w specjalnym uchwycie (twarde), a następnie na stoliku pomiarowym. Wszystkie pomiary należy wykonać *in situ*. Warunki pomiarowe (rozdzielczość, moc lasera, ilość skanów = czas pomiaru) należy dobrać eksperymentalnie, indywidualnie dla każdej próbki.

Opracowanie wyników

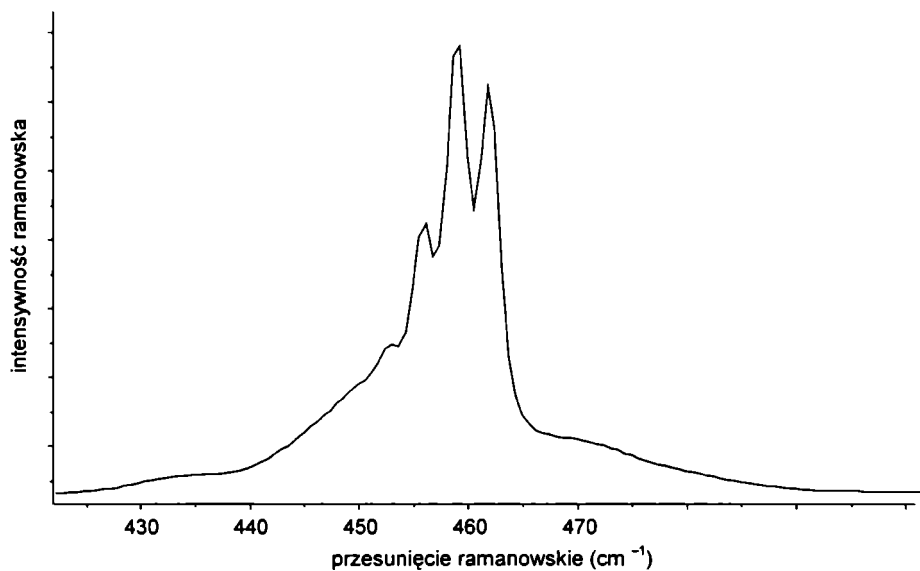
1. Odczytać z otrzymanych widm położenia pasm kwasów tłuszczowych.
2. Określić stopień nienasyceń kwasów tłuszczowych zawartych w badanych produktach na podstawie wizualnego porównania intensywności pasm markerowych.
3. Przeprowadzić integracje pasm markerowych (I_{1660} i I_{1444} lub I_{1266} i I_{1300}) służących do obliczania stosunku wiązań C=C do C–C.
4. Obliczyć stosunek I_{1660}/I_{1444} lub I_{1266}/I_{1300} .
5. Uszeregować produkty według rosnącej wartości stałej jodowej.
6. Określić izomerię badanych kwasów tłuszczowych.
7. Przedyskutować użyteczność metody do analizy kwasów tłuszczowych w produktach spożywczych.

Ćwiczenie 4. Obserwacja i określenie struktury izotopowej w widmie ramanowskim tetrachlorku węgla(IV)

Cząsteczka tetrachlorku węgla(IV), która jest molekułą o symetrii tetraedrycznej, może prezentować strukturę subtelną pasma o symetrii A_1 związaną z faktem, że chlor występuje w dwóch postaciach izotopowych: ^{35}Cl i ^{37}Cl .

Cel ćwiczenia

Identyfikacja struktury subtelnego pasma o symetrii A_1 tetrachlorku węgla(IV).



RYS. 3.11. Widmo ramanowskie CCl_4 z widoczną strukturą subtelną.

Odczynniki

Ciekły CCl_4 .

Wykonanie ćwiczenia

Przeprowadzić pomiar widma. Warunki pomiarowe – ustawić maksymalną rozdzielczość, dopasować moc lasera.

Opracowanie wyników

1. Określić skład izotopowy cząsteczek, których się spodziewamy.
2. Zaproponować położenie ich drgań.
3. Określić procentowy udział pików pochodzący od poszczególnych składowych izotopowych, przyjmując sumę intensywności pików za 100%. Można pominąć

cząsteczkę $C^{37}Cl_4$ (ponieważ jej abundancja wynosi 0,4%, pik ten może być niewidoczny).

4. Skomentować wyniki.

LITERATURA

- [1] Cotton F.A., *Teoria grup: zastosowania w chemii*, PWN, Warszawa 1973.
- [2] Kęcki Z., *Podstawy spektroskopii molekularnej*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1992.
- [3] Szafran M., Dega-Szafran Z., *Określanie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi. Tablice i ćwiczenia*, PWN, Warszawa 1988.
- [4] Sadlej J., *Spektroskopia molekularna*, WNT, Warszawa 2002.
- [5] Twardowski J., *Biospektroskopia*, t. 4, PWN, Warszawa 1990.
- [6] Chalmers J.M., Griffiths P.R., *Handbook of vibrational spectroscopy*, Vol. 1, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2002.
- [7] Michalska D., Wysokiński R., *The prediction of Raman spectra of platinum(II) anticancer drugs by density functional theory*, Chem. Phys. Lett. 2005, **403**, 211–217.
- [8] Frish M.J. et al., *Gaussian 03*, Gaussian Inc., Pittsburgh PA 2003.
- [9] Rodriguez-Amaya D.B., *A Guide to Carotenoid Analysis in Food*, ILSI Press, Washington 2001 (<http://www.ilsis.org/file/carotenoid.pdf>).
- [10] Ozaki Y., Cho R., Ikegawa K., Muraishi S., Kawauchi K., *Potential of Near-infrared Fourier Transform Raman spectroscopy in Food Analysis*, Appl. Spectrosc. 1992, **46**, 1503–1507.
- [11] Schrader B., *Infrared and Raman Spectroscopy. Methods and Applications*, VCH, Weinheim 1995.
- [12] Schulz H., Barańska M., Barański R., *Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoids Analysis*, Biopolymers 2005, **77**, 212–221.
- [13] Withnall R., Chowdhry B.Z., Silver J., Edwards H.G.M., de Oliveira L.F.C., *Raman Spectra of Carotenoids in Natural Products*, Spectrochim. Acta A 2003, **59**, 2207–2212.
- [14] Strehle M.A., Rösch P., Barańska M., Schulz H., Popp J., *Controlling the Quality of Different Vegetable and Fish Oils by Means of Raman Spectroscopy*, Proceedings XIXth International Conference on Raman Spectroscopy, P.M. Fredericks, R.L. Frost, L. Rintoul (eds.), CSIRO Publishing, 2004, 411–412.
- [15] Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G., Grasselli J.G., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press Inc., San Diego 1991.
- [16] Schrader B., *Raman Spectroscopy in the Near Infrared – a most Capable Method of Vibrational Spectroscopy*, Fresenius J. Anal. Chem. 1996, **355**, 233–239.
- [17] Barthus R.C., Poppi R.J., *Determination of the Total Unsaturation in Vegetable Oils by Fourier Transform Raman Spectroscopy and Multivariate Calibration*, Vib. Spectr. 2001, **26**, 99–105.
- [18] Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A., Ayora-Canada M.J., *Direct, Reagent-free Determination of Fatty Acid Content in Olive Oil and Olives by Fourier Transform Raman Spectroscopy*, Anal. Chim. Acta 2003, **487**, 211–220.
- [19] Baeten V., Hourant P., Morales M.T., Aparicio R., *Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy*, J. Agric. Food Chem. 1998, **46**, 2638–2646.