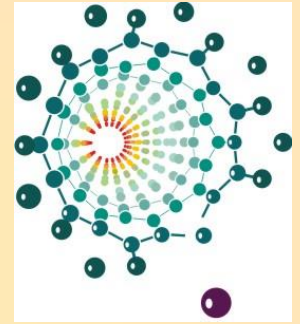




PRIMENE RAZLIČITIH METODA RAMANSKE SPEKTROSKOPIJE

do njihovog razvoja je došlo sa
otkrićem i razvojem lasera

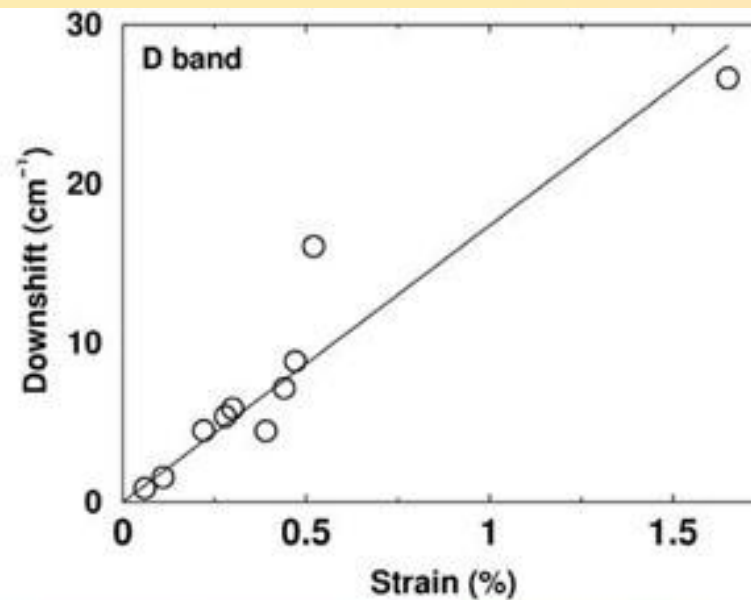
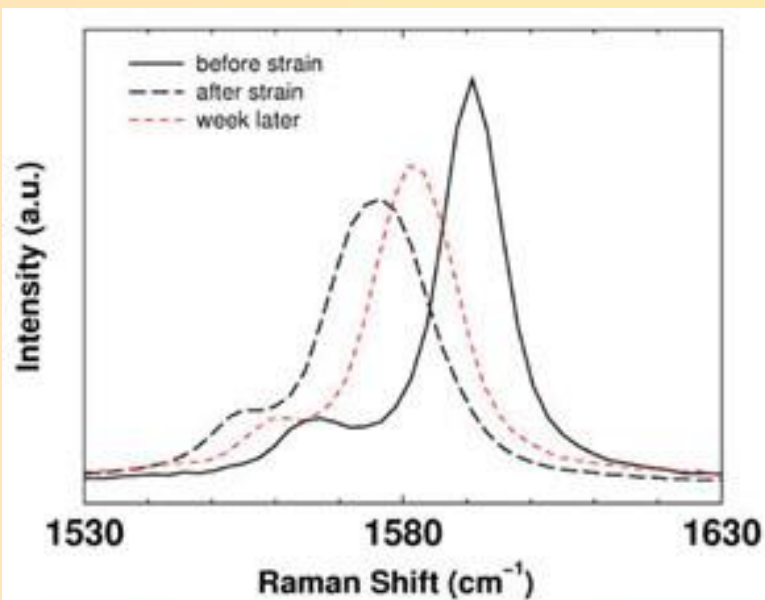
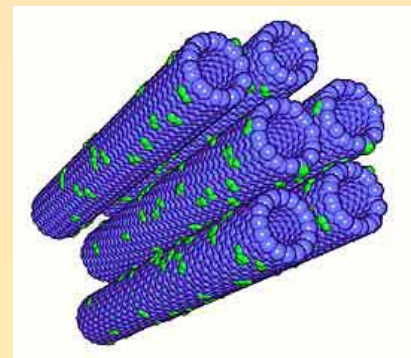
Primena standardne ramanske spektroskopije

- Minimalne koncentracije koje se uspešno mogu analizirati su 0,1-0,5 M.
- Intenzitet ramanskih traka:

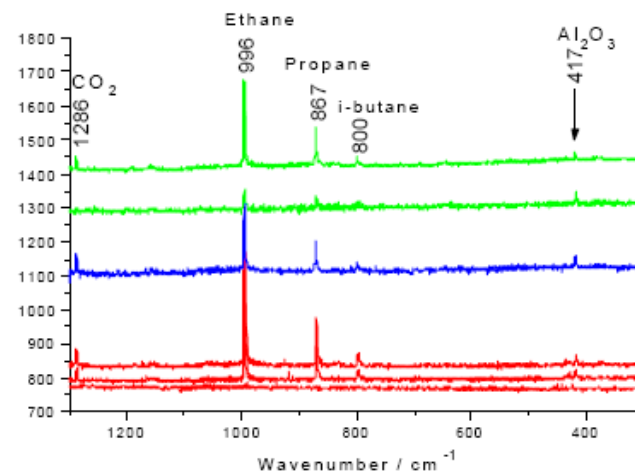
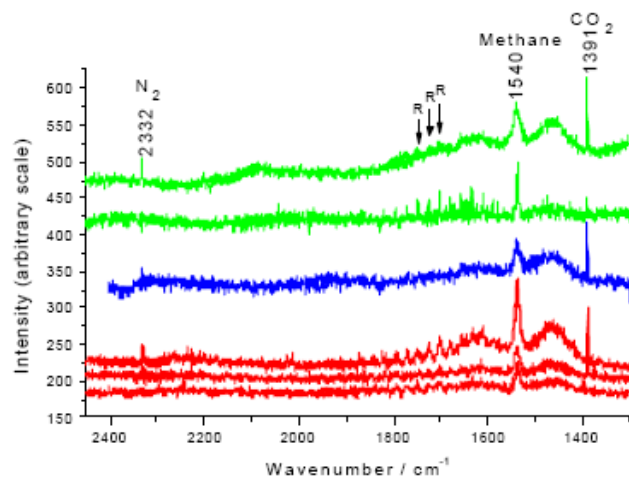
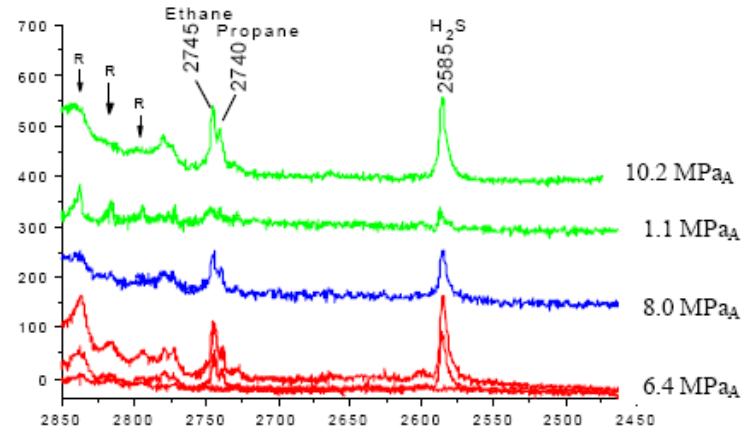
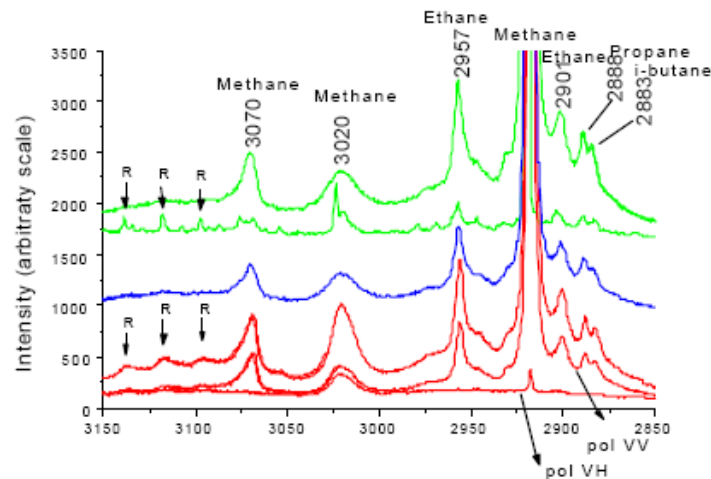
$$I = KJ\nu^4c$$

gde je I intenzitet ramanske trake na frekvenciji ν ; K je konstanta proporcionalnosti koja obuhvata instrumentalne parametre; J je konstanta rasejanja za određenu ramansku traku i c je koncentracija analita.

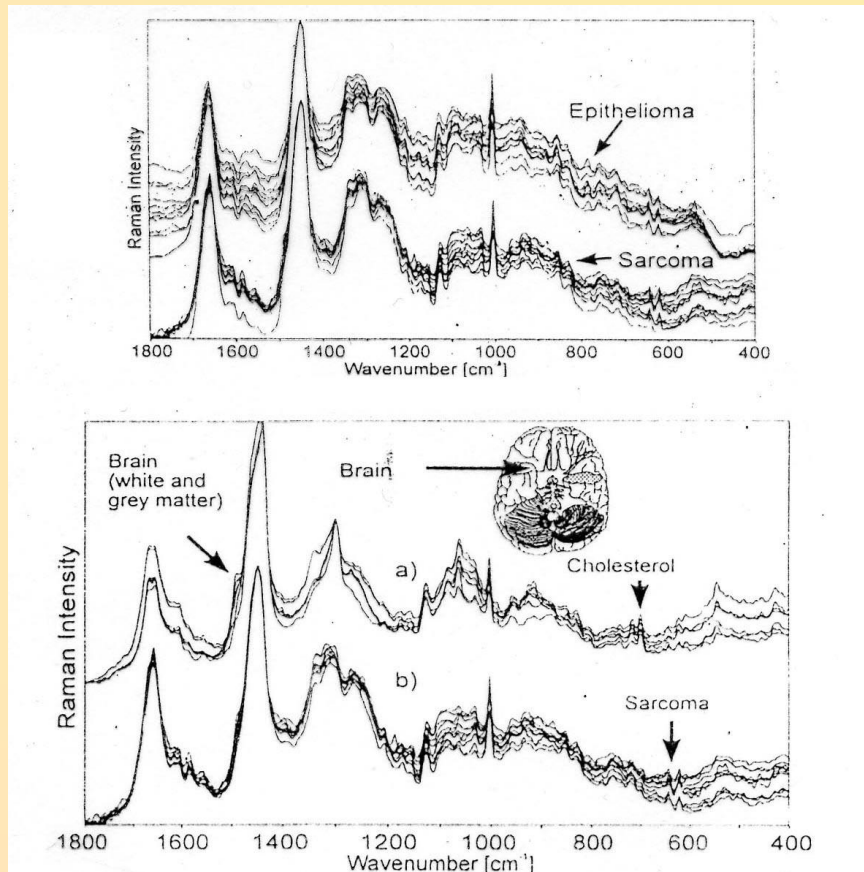
Primena ramanske spektroskopije za analizu naprezanja poluprovodničkih nanocevi ugljenika



Analiza prirodnog gasa ramanskom spektroskopijom



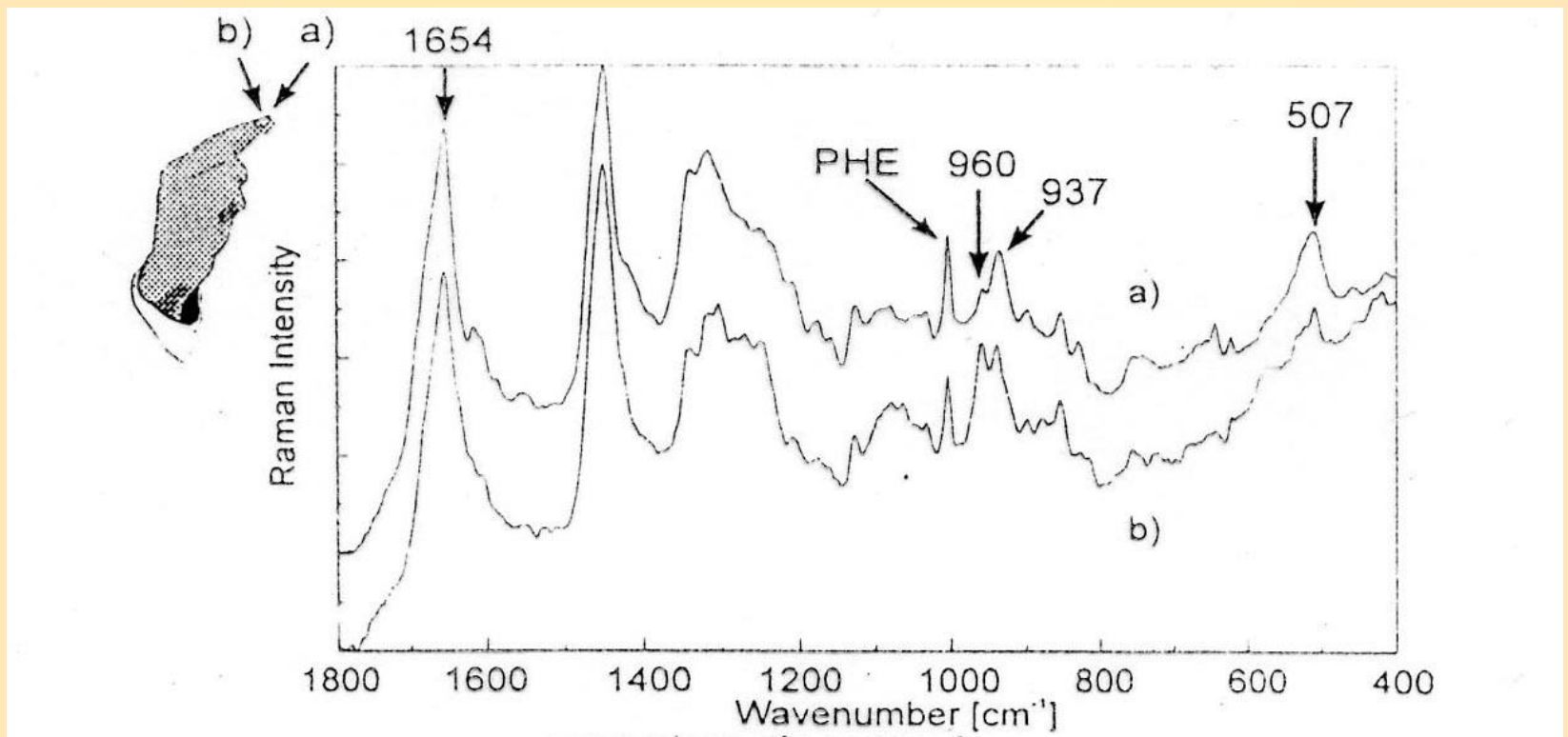
- FT IC posebno u kombinaciji sa BIC FT ramanskom spektroskopijom omogućava analizu bilo kog biološkog materijala
- BIC FT ramanska spektroskopija omogućava brzo i sigurno razlikovanje različitih tkiva preko karakterističnog spektra i dobijanje informacija o relativnom sadržaju specifičnih komponenti



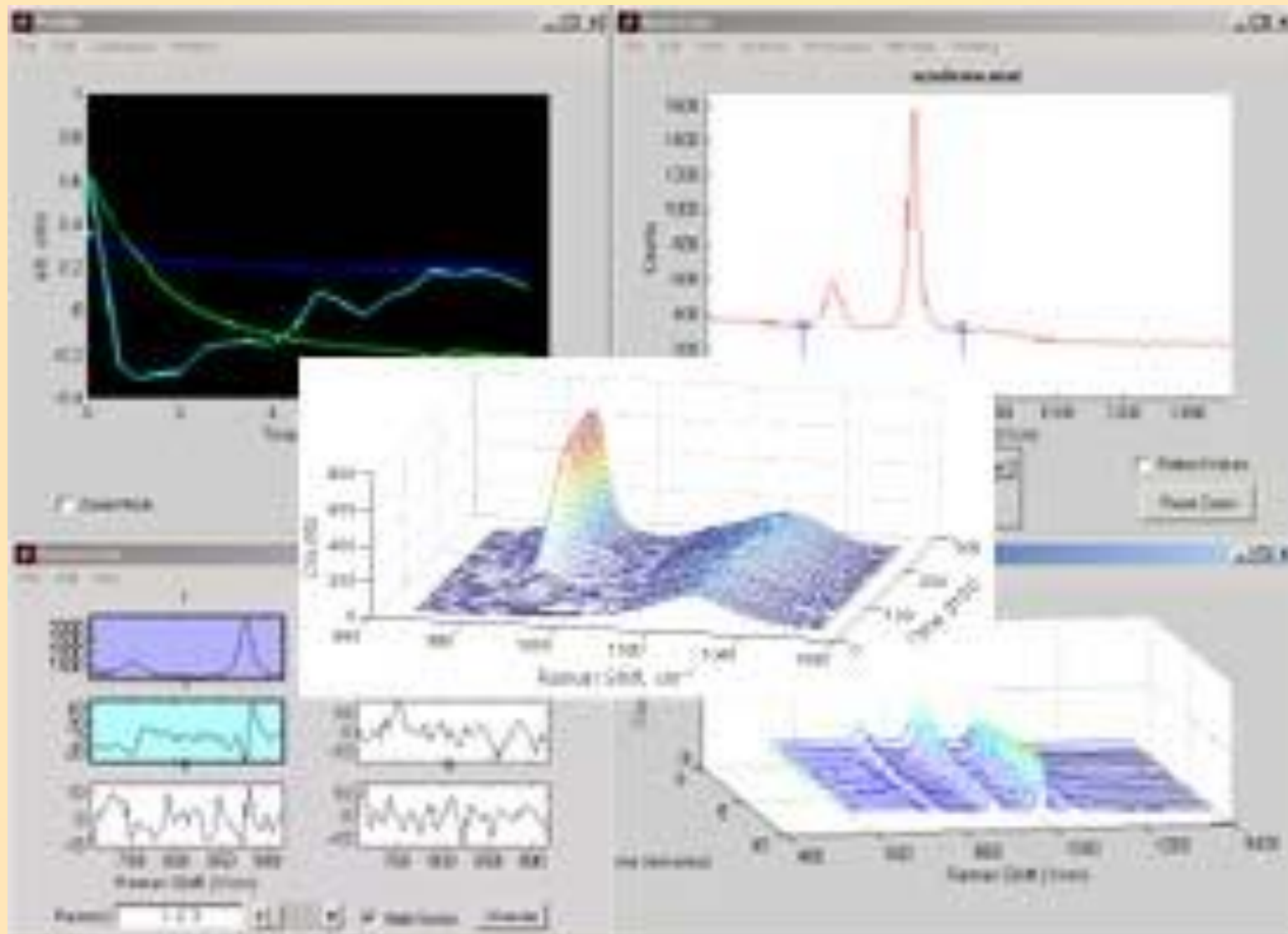
**Spektri mozga i
tumora mozga**

Spektri nokta pokazuju visok sadržaj disulfida – traka na 507 cm^{-1} , kao i znatnu konformaciju α -heliksa određenim trakama na 1654 i 937 cm^{-1} .

Spektar “živog nokta” pokazuje doprinos spektru ležišta nokta, koje se sastoji od niskog sadržaja kolagena i lipida - traka na 960 cm^{-1} .



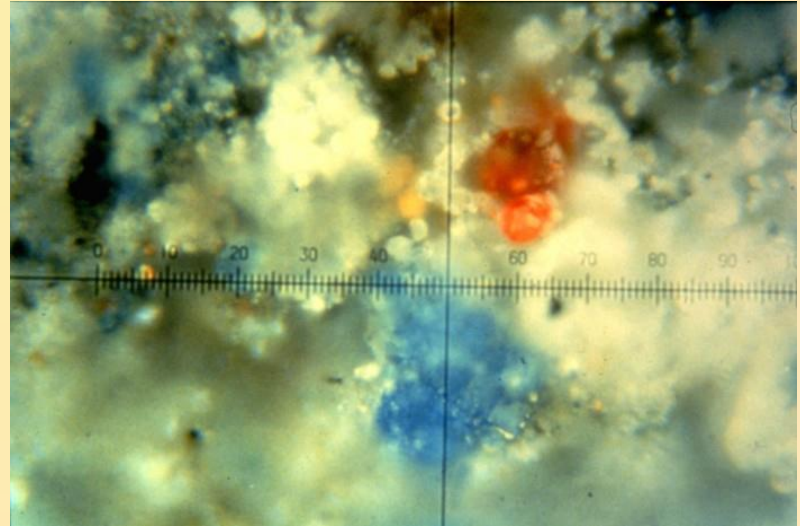
Morfološka ispitivanja



Mikro – ramanska spektroskopija



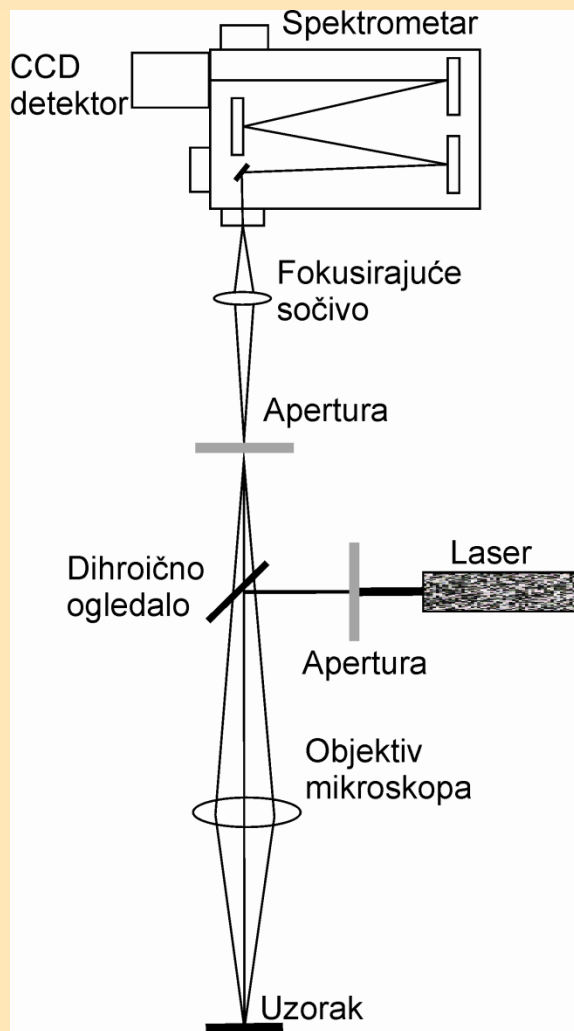
Ramanski spektrometar povezan sa mikroskopom i izvorom bele svetlosti koji omogućava da se lokalizuje mala površina uzorka, tj. napravi prostorna rezolucija uzroka, a zatim snimi spektar



Slika mešavine pigmenata uvećana 100 puta



Minijatura Elizabeta I, naslikao Nicholas Hilliard



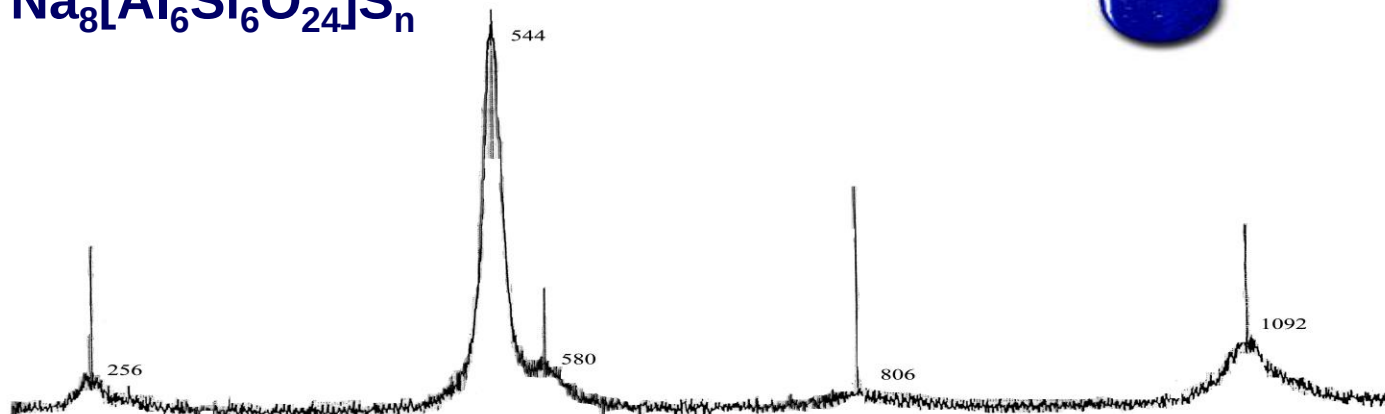
Konfokalni mikroskop omogućava da samo svetlost fokusirana na određenu tačku uzorka stigne do detektora dok se sva ostala svetlost blokira aperturama malih otvora.

Disperzivni ramanski mikroskop – rezolucija bolja od $1\ \mu\text{m}$.

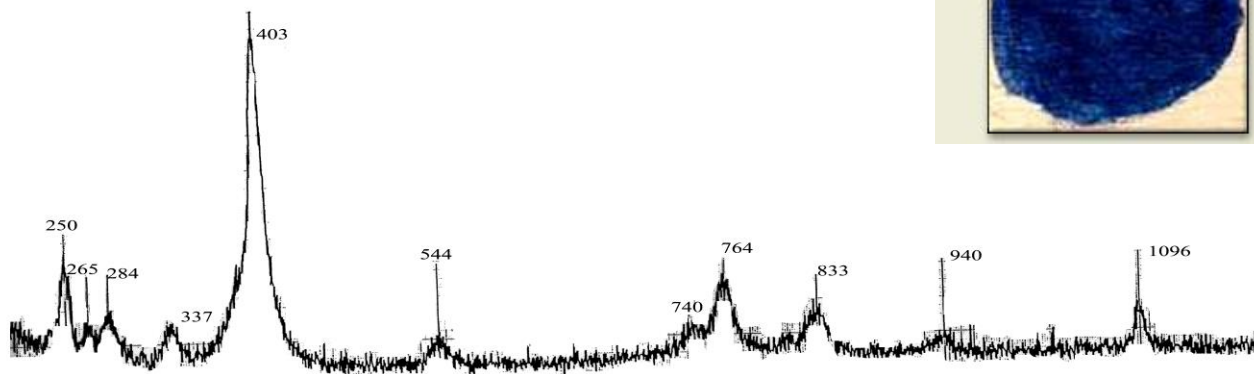
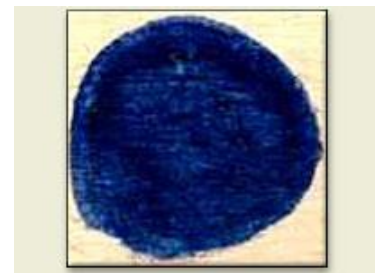
Shematski prikaz konfokalnog ramanskog mikroskopa

- Metoda je nedestruktivna i bezkontaktna
- Nije potrebna priprema uzoraka
- Izbjegava se fluorescencija izborom čestica koje su “čiste”
- Potrebno hlađenje držača da bi se izbeglo razaranje uzorka ili fotohemijske reakcije u uzorku
- Mogu se ispitivati
 - vodeni rastvori
 - umetnički predmeti
 - biološki materijali
 - živi objekti
- Kao i:
 - mikrostruktura
 - defekti u čvrstim materijalima
 - analiza čestica prašine, polutanata
 - inkluzija gasova i tečnosti u mineralima i geološkim uzorcima
 - analiza emulzija

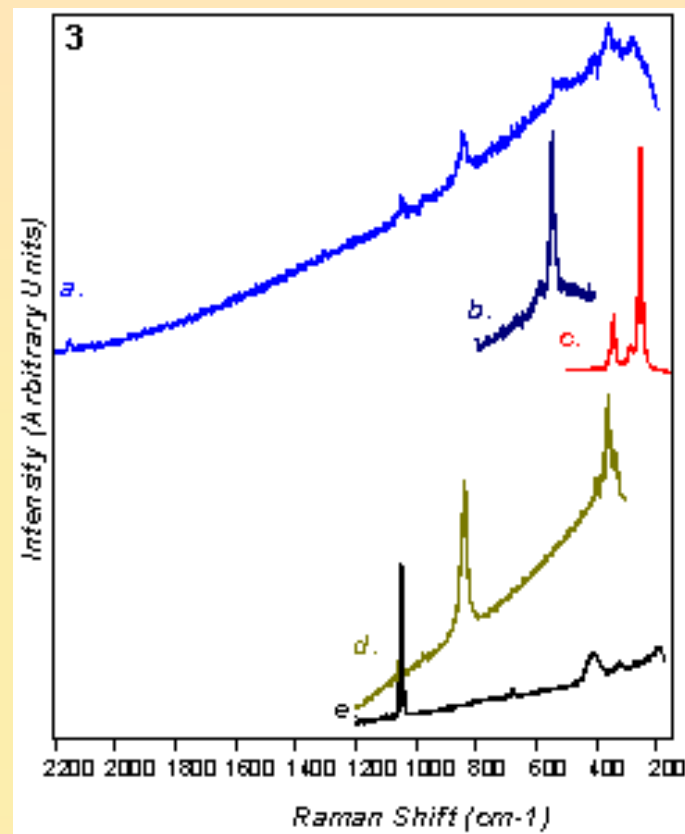
Lapis lazuli



Azurit



Studentska pozivnica za maskenbal, 1843. god.

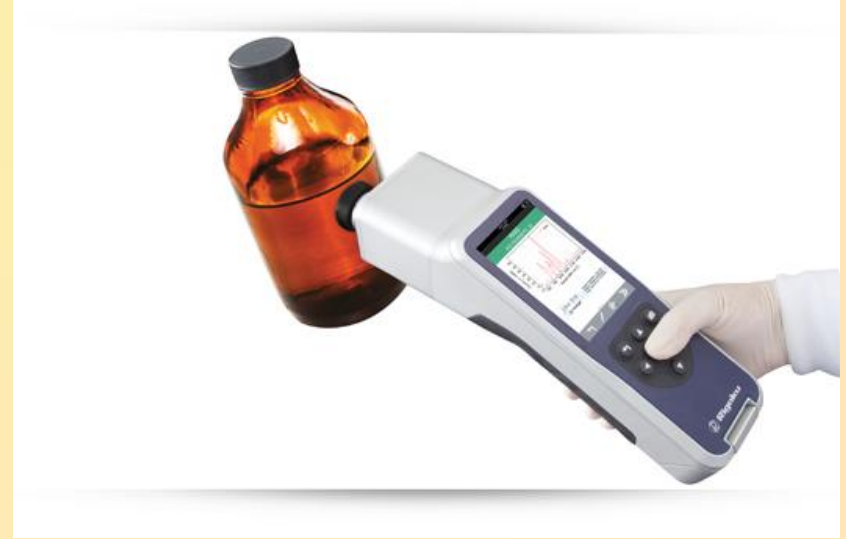


- a) svetlo plava: Prusko plavo ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)
- b) tamno plava: Ultramarin ($\text{Na}_{8-10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$)
- c) crvena: Cinober (HgS)
- d) žuta: Hrom žuto (PbCrO_4)
- e) bela: Olovo belo ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$)



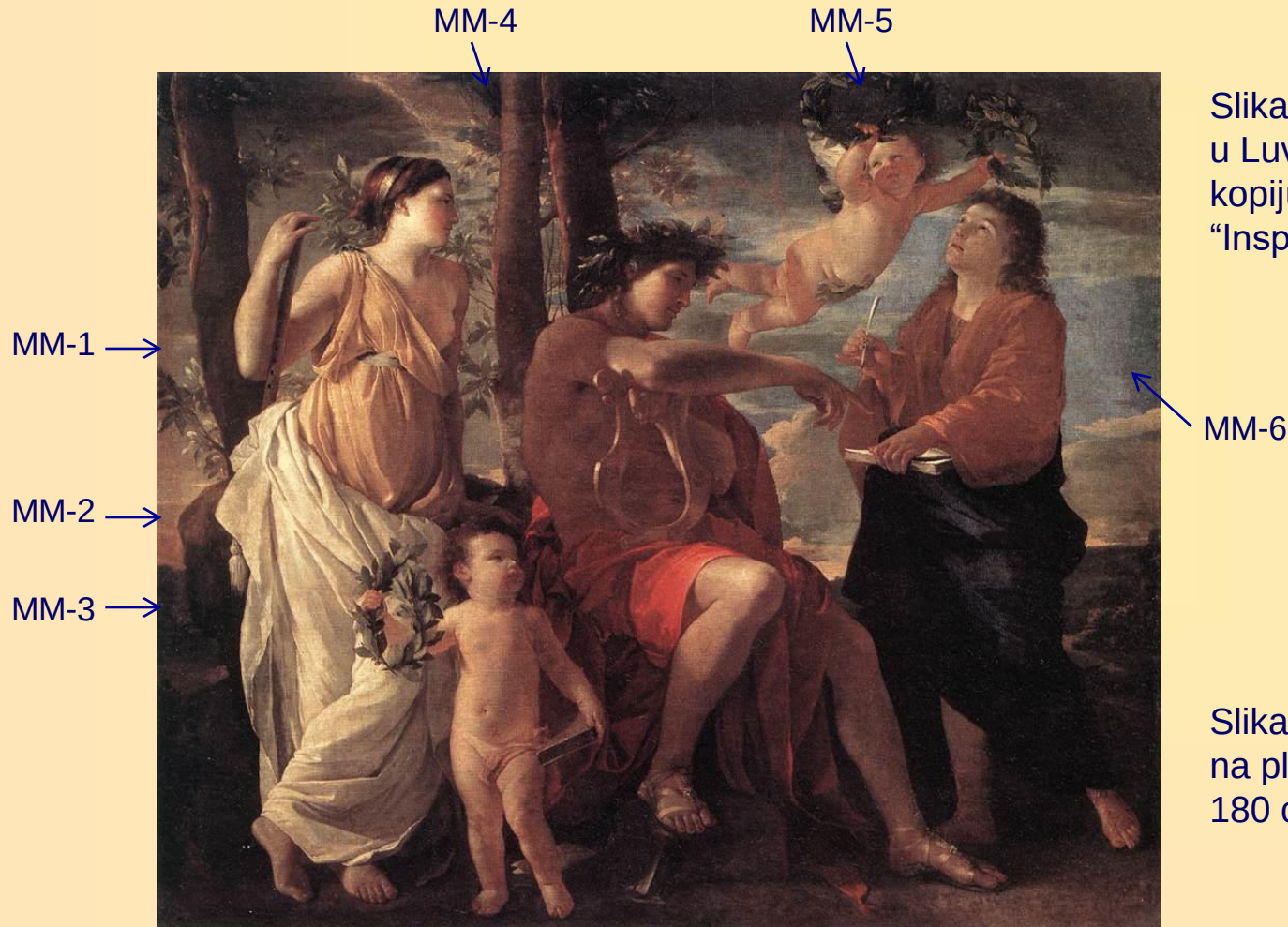
U slučajevima kada se umetnički predmeti ne mogu iznositi iz muzeja koriste se prenosivi ramanski spektrometri.

Prenosivi ramanski spektrometri



Proizvođač: Rigaku analytical devices

Spektroskopsko ispitivanje slike na platnu “Inspiracija pesnika”, slikara Mila Milunovića



Slika je nastala 1926/27. godine u Luvru gde je umetnik slikao kopiju Pusenove slike “Inspiracija pesnika”.

Slika je urađena tehnikom ulje na platnu i dimenzija je 218 x 180 cm.

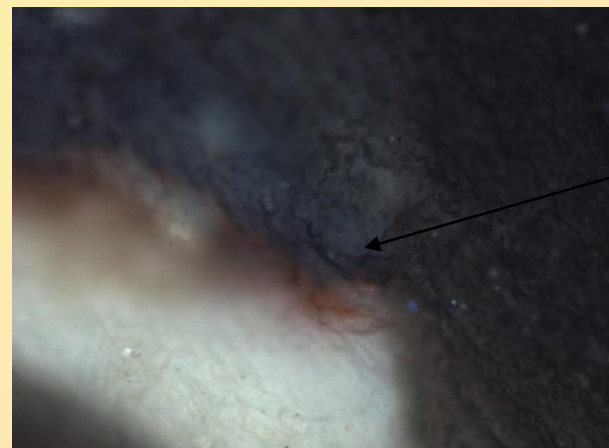


Uzorak MM-4 je malih dimenzija – manji od 1 mm.

Na slici 1. prikazana je fotografija uzorka MM-4 odmah nakon uzimanja sa slike, pri uvećanju 60x.

Slika. 1

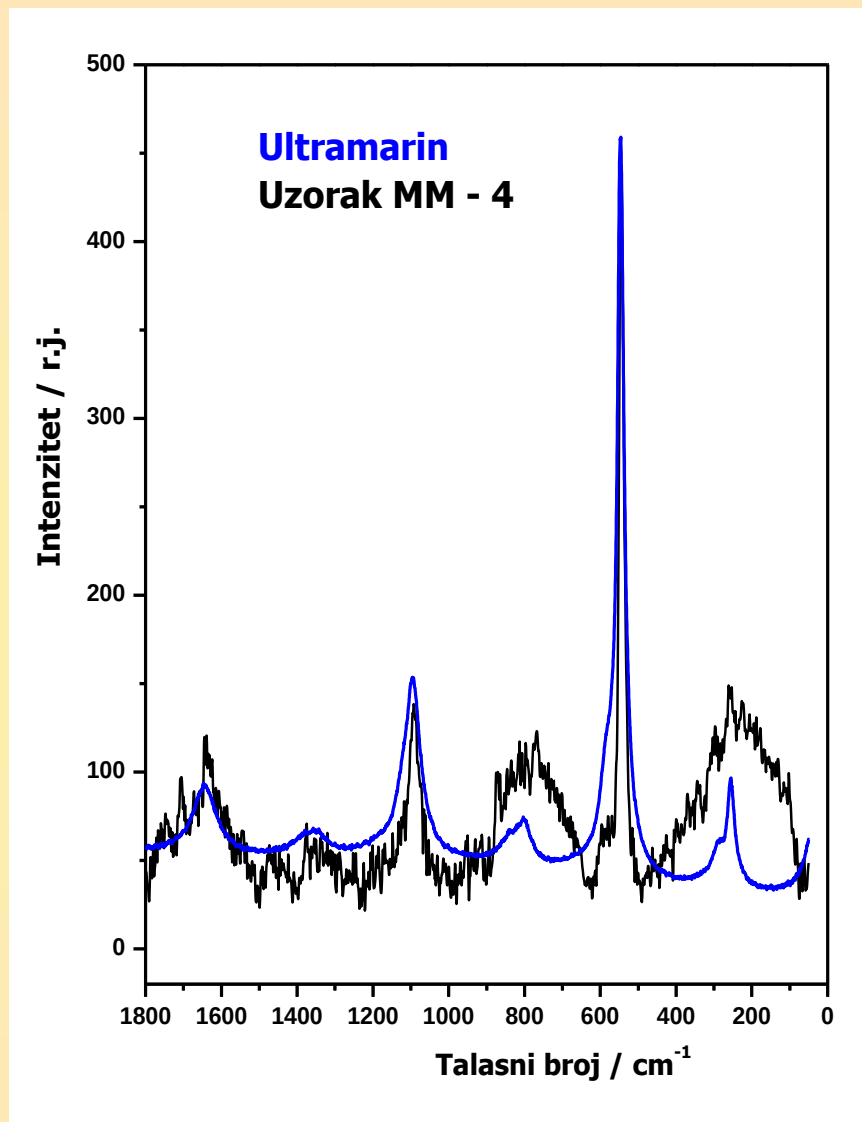
Da bi se utvrdio redosled nanošenja slojeva boje, kao i broj slojeva, vrši se snimanje poprečnog preseka uzorka optičkim mikroskopom.



tamno
plava nit

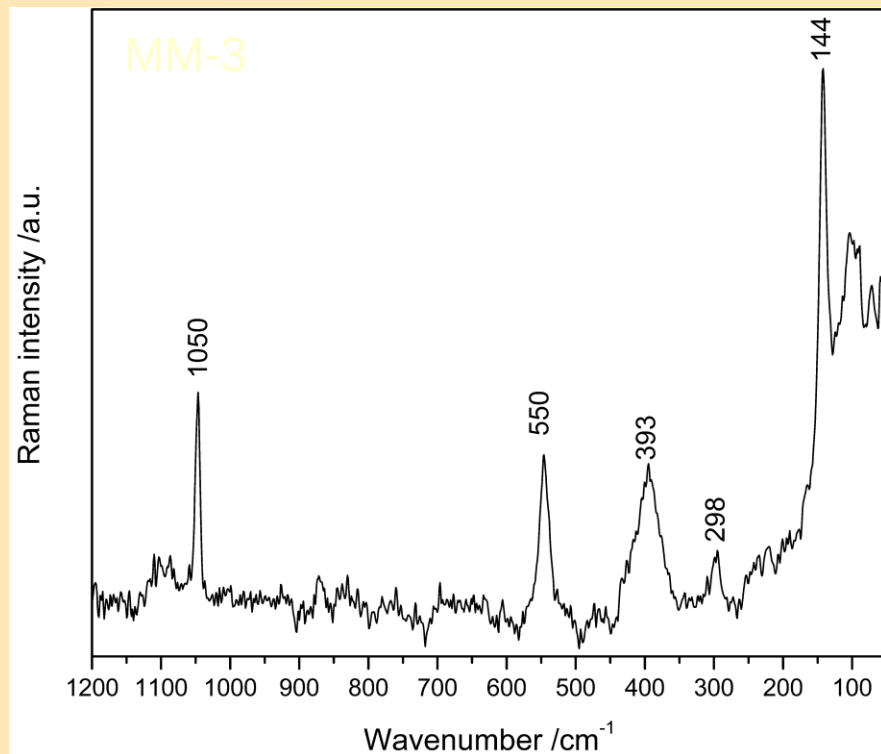
Poprečni presek uzorka MM-4 pri uvećanju 100x; jasno se vidi sloj preparature (beo sloj) i tri sloja boje: tanki crveni i dva plava.

Očigledno preklapanje najintenzivnijih signala (traka) u spektrima, potvrđuje da je ultramarin korišćen na ovom delu slike.



Ramanski spektri uzorka MM-4 i čistog pigmenta ultramarina.

Ramanski spektri tankog sloja crvene boje nanesenog na podlogu ispod bojenog sloja (podslik)

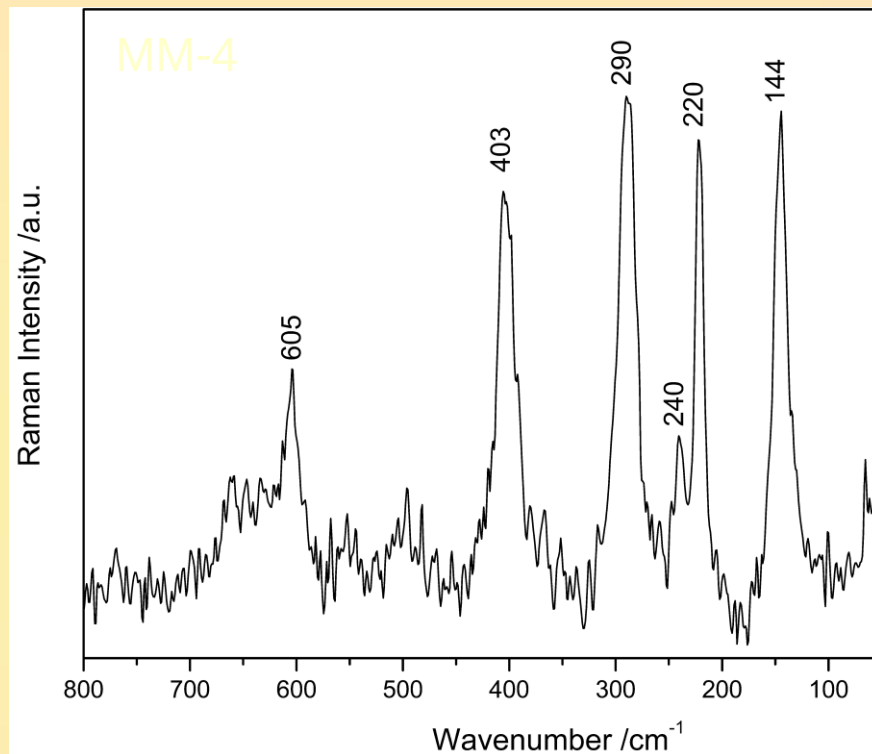


1050 cm⁻¹ -> olovo bela

550 cm⁻¹ -> minijum

144 cm⁻¹ -> anataz

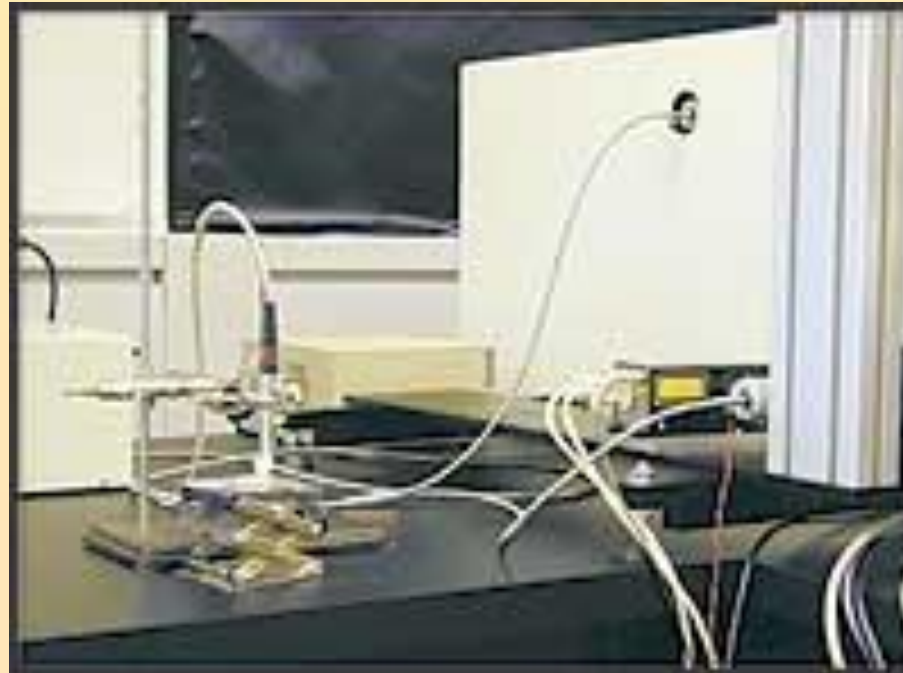
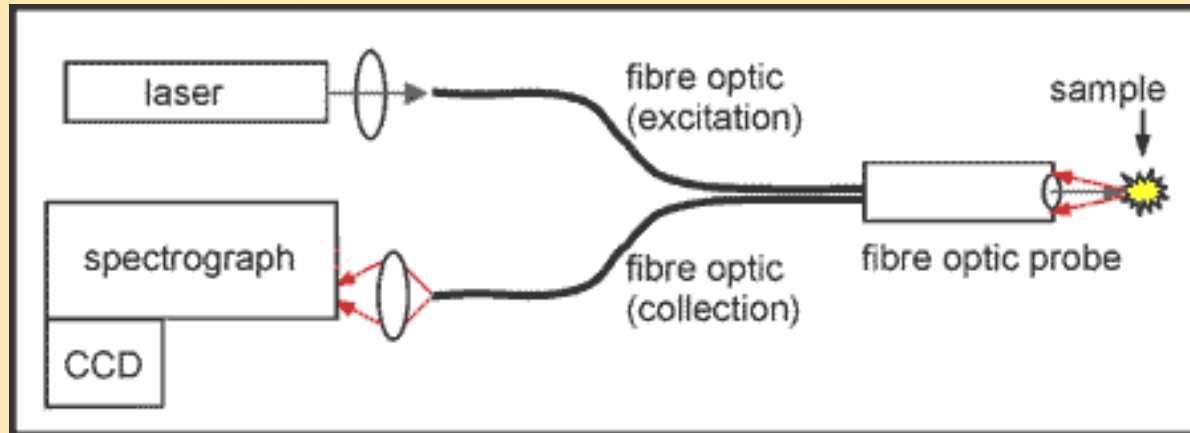
393 i 298 cm⁻¹ -> getit



144 cm⁻¹ -> anataz

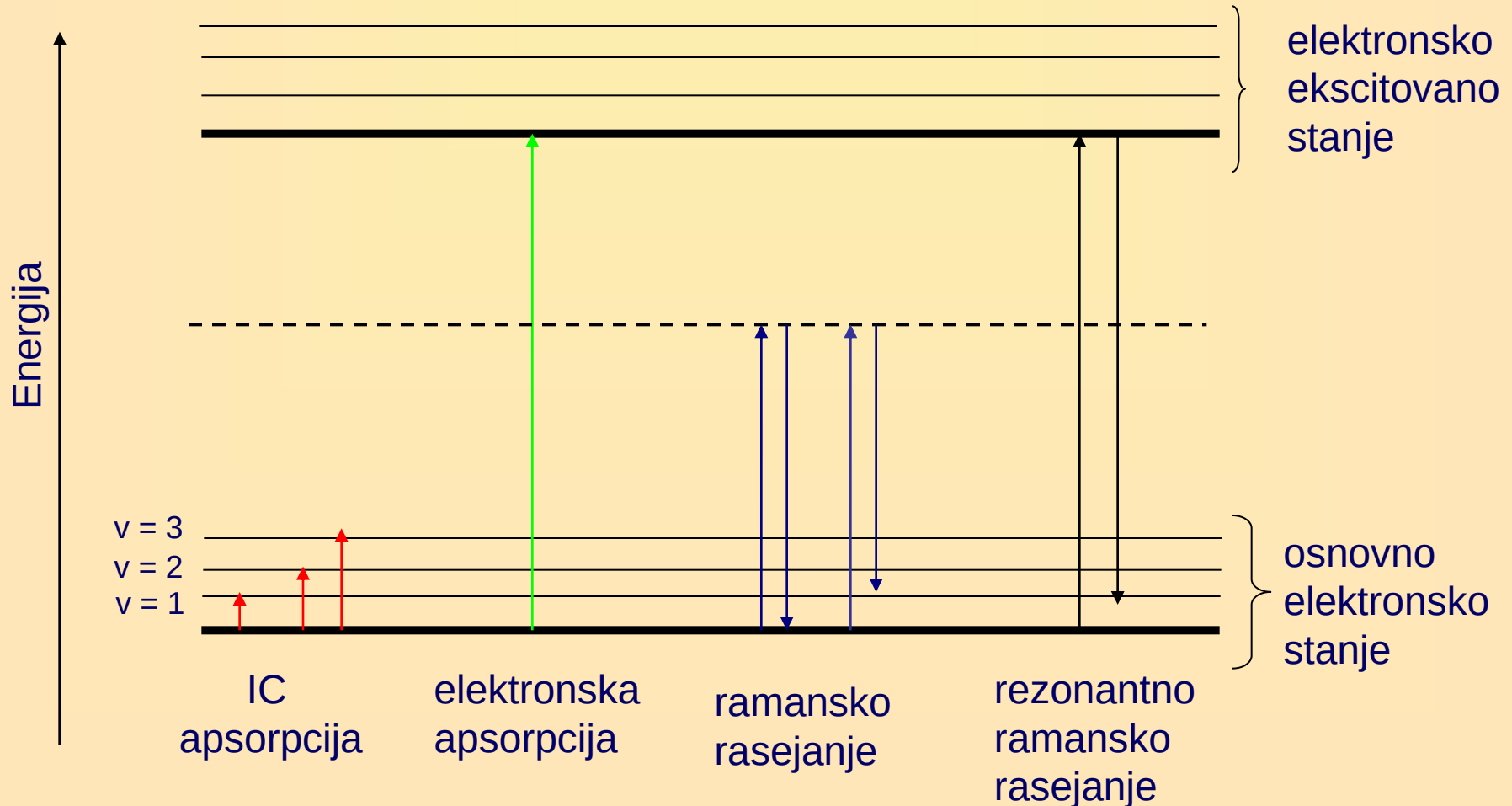
220, 240, 290, 403 i 605 cm⁻¹
-> hematit

Ramanska analiza uz upotrebu optičkih vlakana



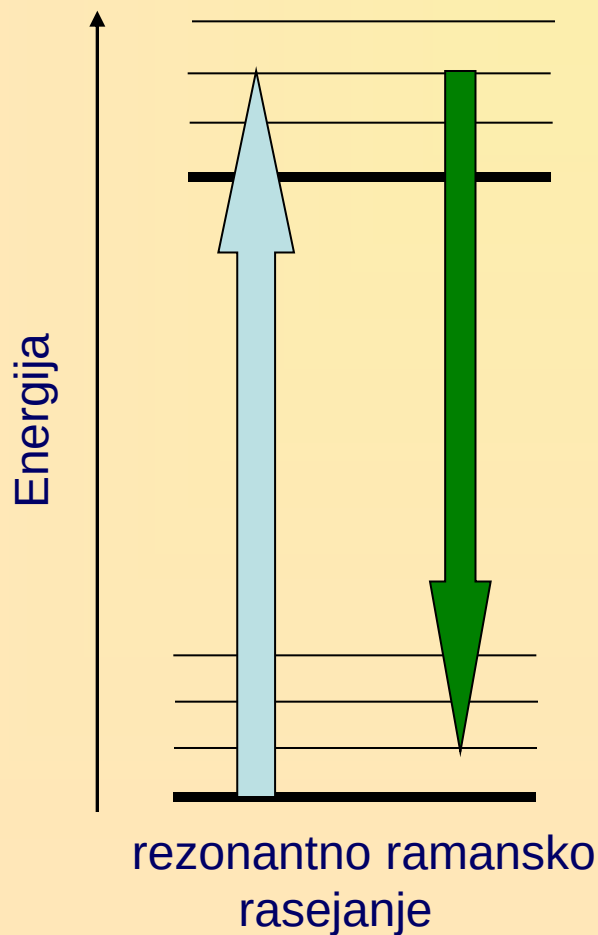
REZONATNA RAMANSKA (RR) SPEKTROSKOPIJA

(shematski prikaz mehanizma)

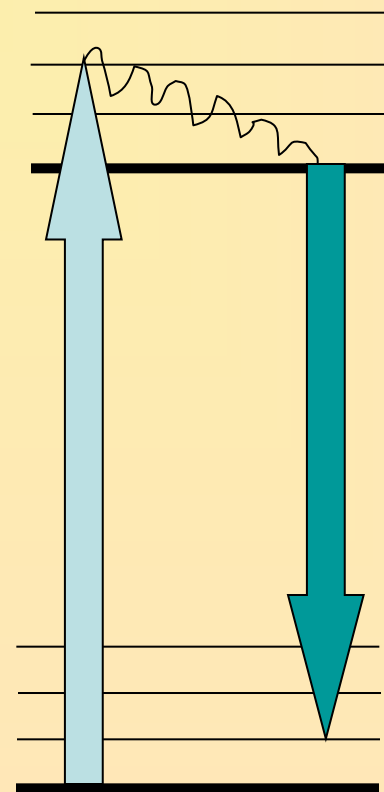


- Kada je ekscitatorska talasna dužina vrlo bliska elektronskoj apsorpciji molekula dolazi do rezonantnog ramanskog rasejanja
- Intenzitet određenih ramanskih traka (koje potiču od najsimetričnijih vibracija) se povećava za faktor $10^2 - 10^6$
- **Posledica:**
moguće je dobiti spektre uzoraka koncentracija $10^{-4} - 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$
(standardna ramanska analiza $\sim 0,1 \text{ mol/dm}^3$)
- Samo ramanske trake vezane za elektronske hromofore (deo molekula koji apsorbuje zračenje) podležu porastu intenziteta
- Rezonantni ramanski spektri su znatno jednostavniji od standardnih ramanskih spektara

Energetski dijagram rezonantnog ramanskog rasejanja i fluorescentne emisije



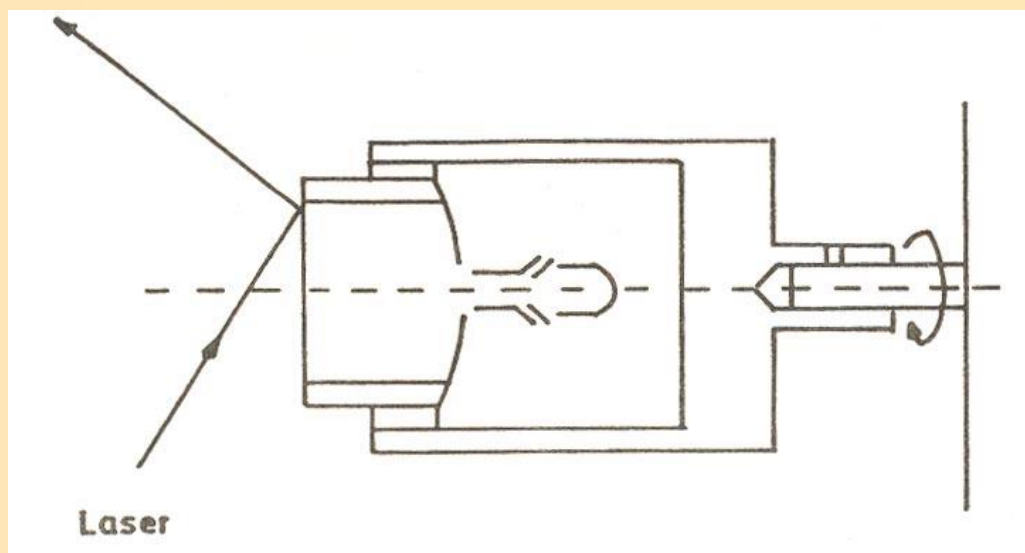
Vreme relaksacije: 10^{-14} s



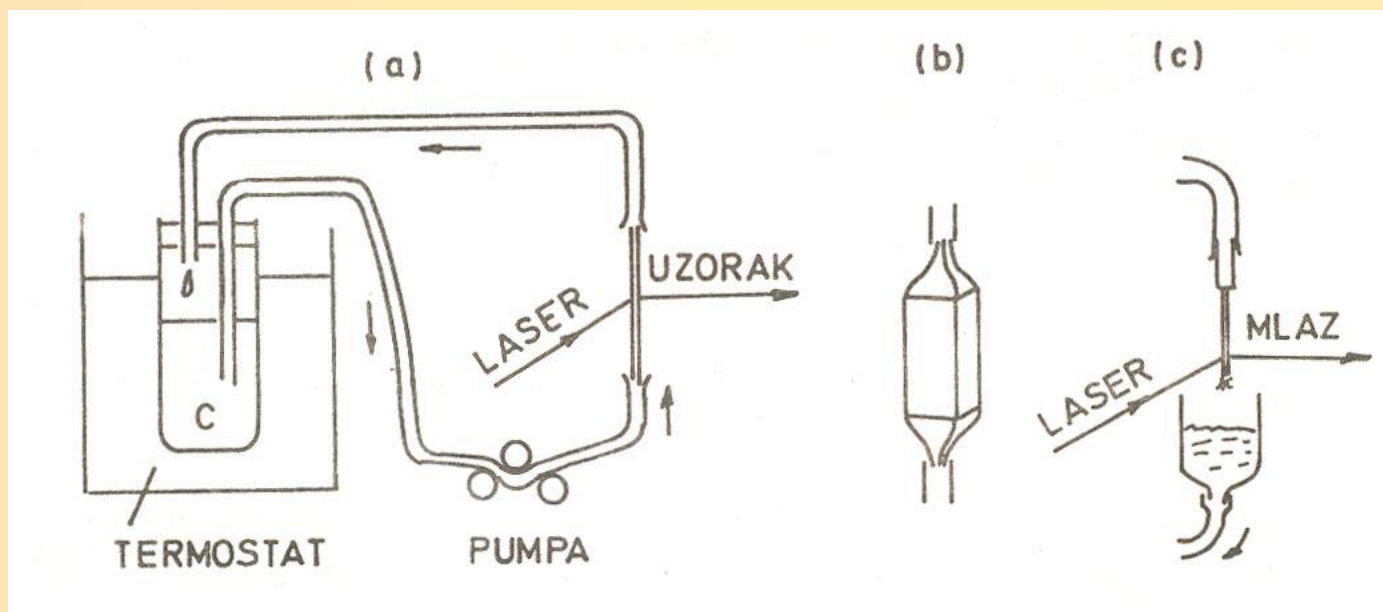
$10^{-6} - 10^{-8}$ s

- Nedostatak: interferencija sa fluorescencijom
- Usled intenzivnog laserskog zračenja problem je lokalno pregrevanje i degradacija uzorka (elektronski prelazi su veoma česti u UV oblasti)
- Neophodno hlađenje uzorka i osvetljavanje samo malog dela uzorka

ĆELIJE ZA TEČNE UZORKE

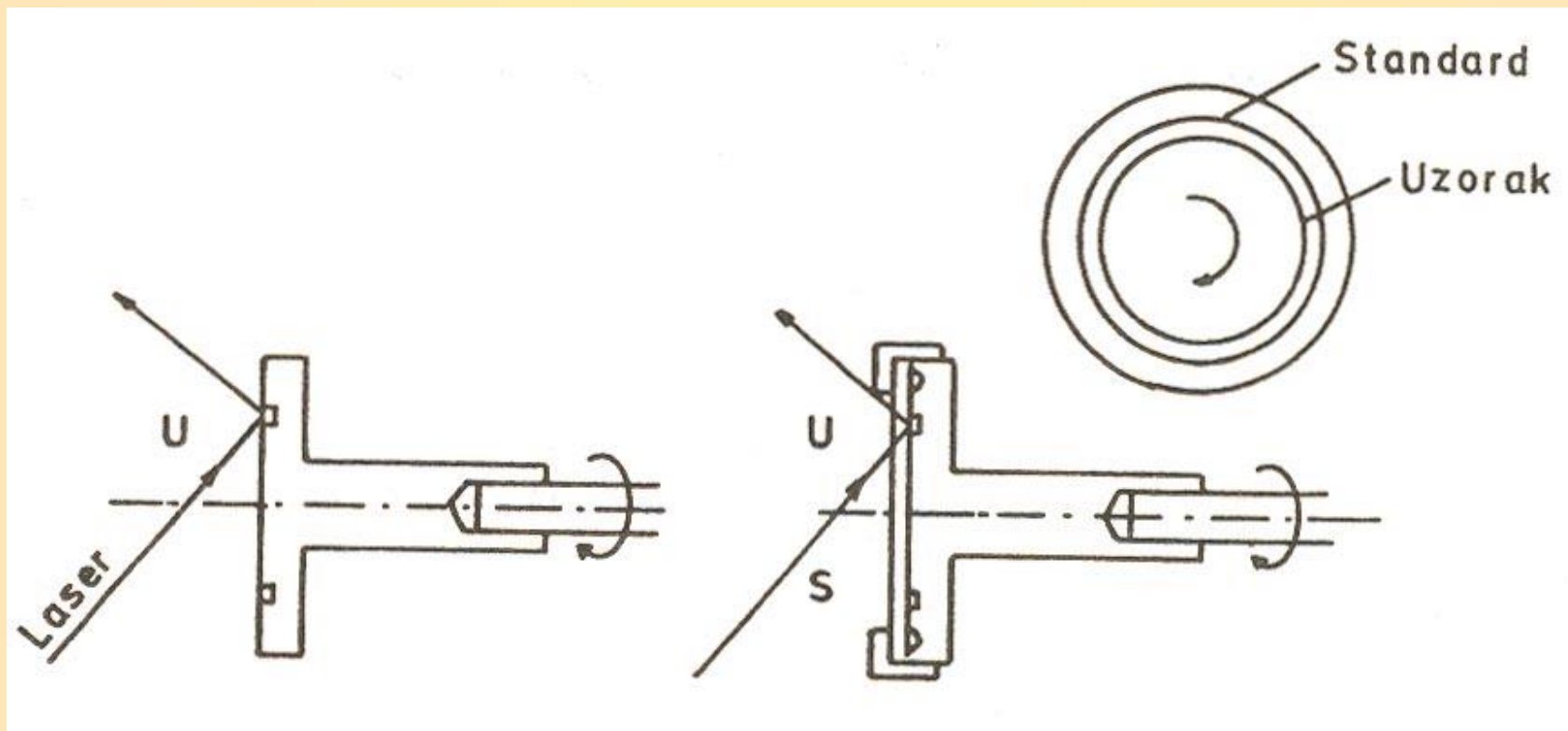


Rotirajuća ćelija za
tečnosti
(postolje se okreće brzinom
od 2400 obrta/min)



Ćelije za tečnosti
sa cirkulacijom

Rotirajuća ćelija za čvrste uzorke

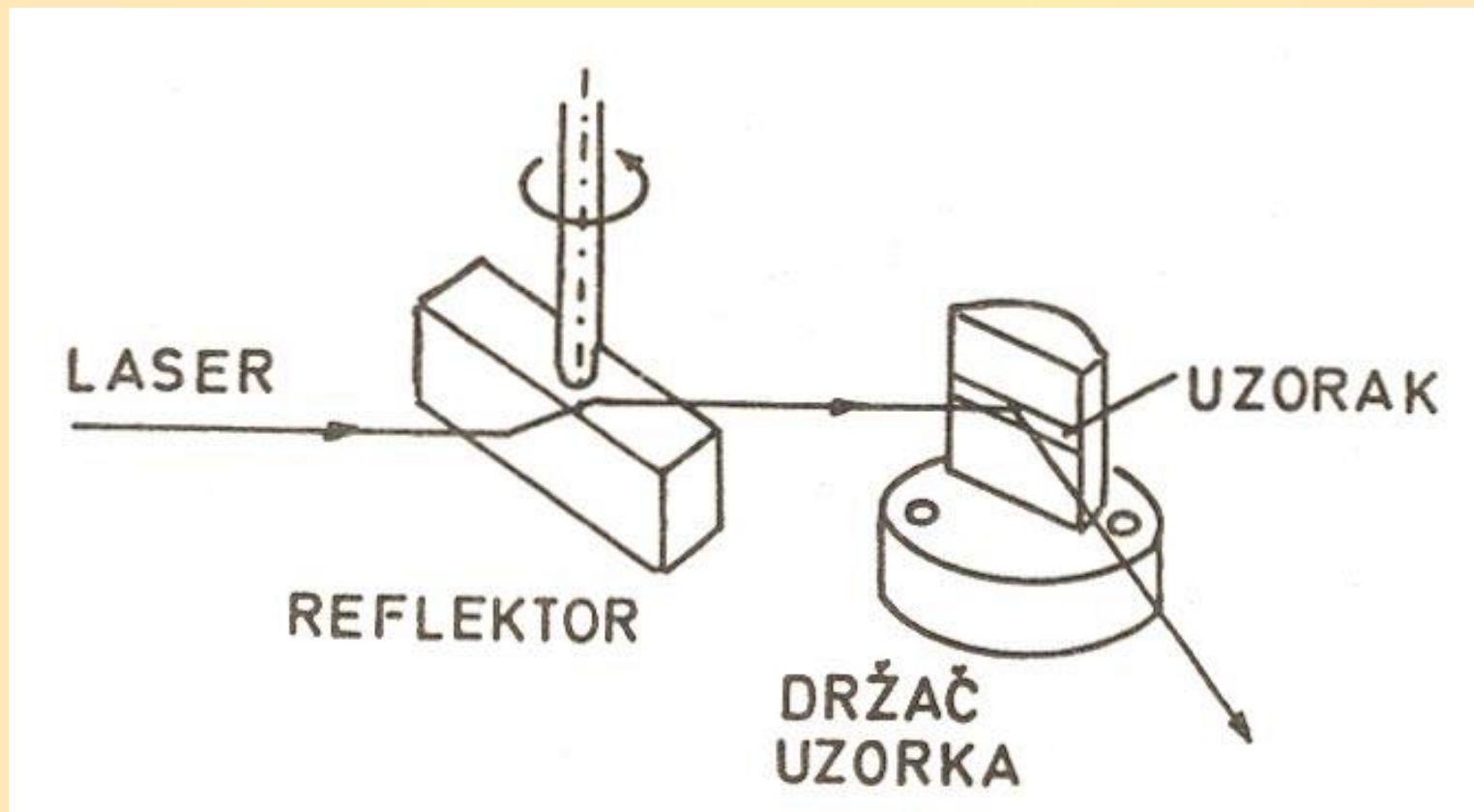


Disk na kome je čist prah ili homogeno pomešan sa KBr presovan u žljeb na površini diska; disk se obrće bzinom od 2000 obrta/min.

Po potrebi površina zaštićena kvarcnim prozorom.

Za kvantitativnu analizu u isti žljeb se upresuje i standard.

Montaža za snimanje površina tečnosti i čvrstih supstanci



Laserski snop se preseca određenom frekvencijom čime se postiže da se sam uzorak hladi do narednog pobuđivanja.

Primena:

- Ispitivanje fizičkih i fizičkohemijjskih karakteristika različitih sistema:
 - vodonične veze
 - konstanti disocijacije
 - faznih prelaza
 - rezonantne energije
 - kratkoživućih čestica (molekula u ekscitovanom stanju, prelaznih proizvoda)
 - elektrohemijjskih procesa

- Najvažnija primena RR spektroskopije u ispitivanju bioloških sistema pri uslovima značajnim za fiziologiju: u prisustvu vode i pri niskim koncentracijama reagujućih komponenti.
- Primer: određivanje oksidacionog stanja i spina atoma gvožđa u hemoglobinu i citohromu C. Kod ovih molekula RR spektri potiču samo od vibracionih modova tetrapirolske hromofore, u čijem je centru Fe. Ni jedna druga traka nema pojačan intenzitet.
(karakteristična apsorpcija na 570 nm i 530 nm – α i β trake; RR spektri se dobijaju ekscitacijom sa linijom argonskog jonskog lasera na 514 nm)

REZONANTNA MIKRO- RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

- Spektri mikrolokalizovanih površina kao što su pigmenti u mikroheterogenim uzrocima:
 - pigmenti u membranama ili živim objektima (nervima)
 - hemin u crvenim krvnim zrnima
 - karotenoidi u biljnim tkivima

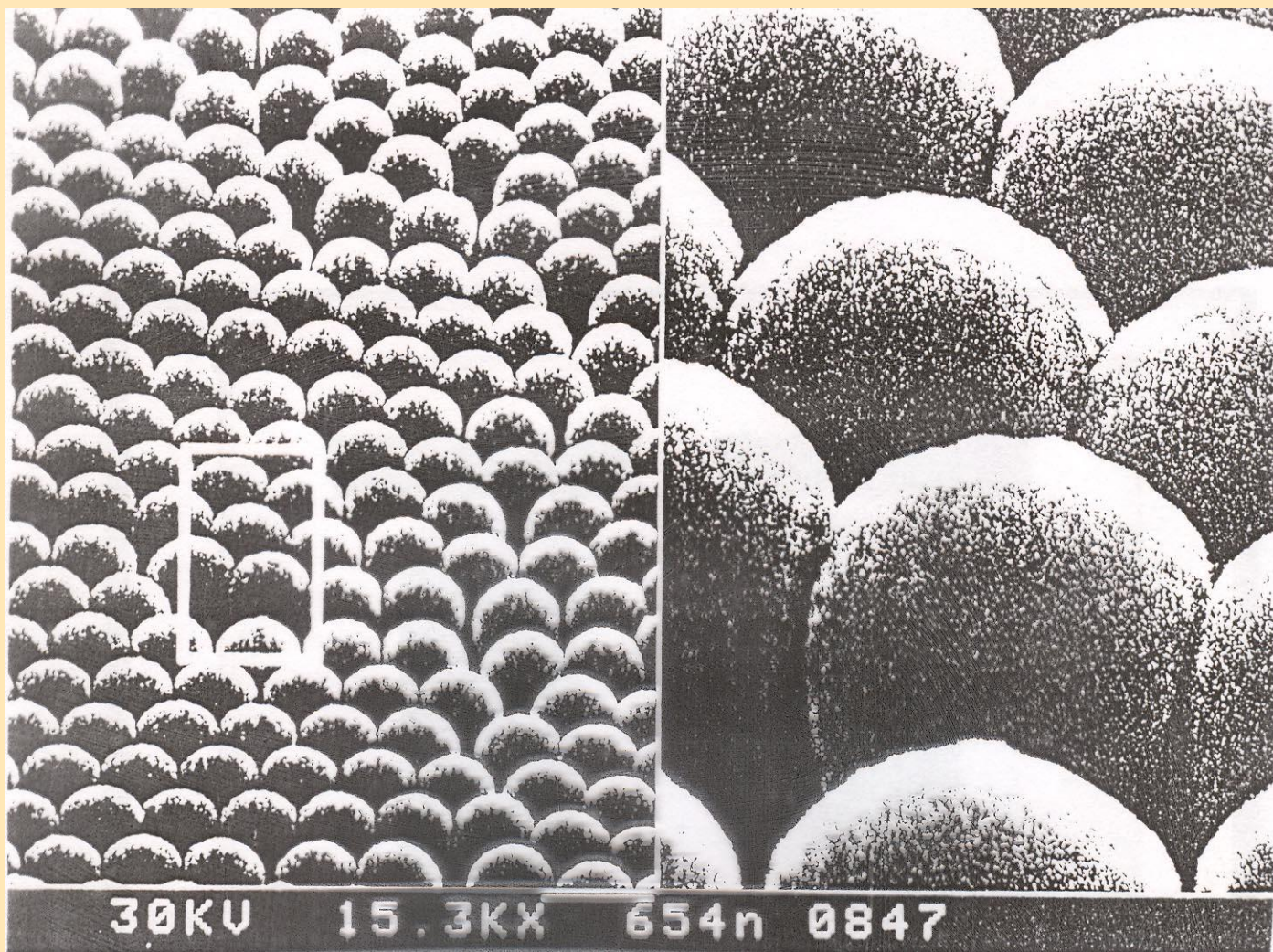
POVRŠINSKI POJAČANA RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

(Surface-Enhanced Raman Spectroscopy $\equiv$ SERS)

- Ne postoji jedinstvena teorija koja bi u potpunosti objasnila ovaj efekat
- Adsorpcija uzoraka na površinu koloidnih metala (Ag, i u manjem obimu Cu, Au i Pt) ili na hrapave površine ovih metala
- SERS aktivni supstrati:
 - elektrode
 - koloidi metala (čestice 10 – 100 nm)
 - ostrva metalnih filmova
 - depozicija metala na submikronske čvrste materijale kao što su alumina, lateks, teflon, stopljeni SiO_2 , mikroporozni filter papir
 - srebrne membrane mikrometarskih pora

- Faktor povećanja intenziteta određenih linija 10^3 - 10^7
- Za molekule koji apsorbuju na odgovarajućim laserskim talasnim dužinama dolazi do kombinacije rezonantnog pojačanja i površinskog pojačanja (površinski pojačana rezonantna ramanska spektroskopija – SERRS); faktor pojačanja i do 10^{12}
- Detekcioni limit u opsegu 10^{-9} – 10^{-12} mol/dm³

- Priprema uzoraka:
 - koloidno Ag ili Au pomešano sa vodenim razblaženim rastvorom uzorka
 - tanak film koloidnih čestica metala nanesen na stakleni nosač i jedna do dve kapi rastvora uzorka se nanesu na film
 - uzorak se nanosi na hrapavu površinu elektrode koja se uklanja iz rastvora i izlaže laserskom snopu



SEM fotografija mikrosfera supstrata prevučenih srebrom

- **Primena:**
 - ispitivanje reakcija na površinama metala
 - karakterizacija hemijskih vrsta adsorbovanih na elektrodama i elektrognerisanih vrsta
 - ispitivanje elektronskih i strukturnih karakteristika boja
 - ispitivanje veoma fluorescentnih neorganskih kompleksa
 - ispitivanje heterogenih katalitičkih procesa
 - u oblasti biofizike i medicine
- **Slaba reproduktivnost:** zavisi od osobina metalnih substrata, talasne dužine lasera, pH rastvora, prirode korišćenih elektrolita

NELINEARNI EFEKTI

- Pri standardnom ramanskom rasejanju prati se linearna zavisnost polarizacije od jačine polja:
$$P = \alpha E \rightarrow \text{linearni optički fenomeni}$$
- Pri visokim intenzitetima zračenja (laser) opažaju se nelinearni optički fenomeni:
$$P = \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots$$

gde su vrednosti konstanti u odnosu $\alpha > \beta > \gamma$
- Jačina polja $E > 10^9 \text{ V/m}$

Ako posmatramo samo dva člana:

$$P = \alpha E_m \sin \omega t + \beta E_m^2 \sin^2 \omega t$$

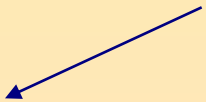
gde je E_m maksimalna amplituda jačine polja, a ω ugaona frekvencija

Primenom trigonometrijske transformacije:

$$\sin^2 \omega t = \frac{1}{2} (1 - \cos 2\omega t)$$

dobija se:

$$P = \alpha E_m \sin \omega t + \frac{\beta E_m^2}{2} (1 - \cos 2\omega t)$$

 Dominira pri slabim intenzitetima zračenja

 Doprinos pri dovoljno visokim intenzitetima zračenja

- Dupliranje frekvencija usled nelineranih efekata, primer:

Nd:Yag laser (1064,0 nm = bliska IC oblast) - prolaskom kroz kristalni materijal kalijum dihidrogen fosfat stvara se oko 30% zelene radijacije na 532 nm; daljim prolaskom kroz kristal amonijum dihidrogen fosfata dobija se UV zračenje od 266 nm

- Na ovom principu razvijeno je više tehnika:
 - Stimulisani ramanski efekat
 - Inverzni ramanski efekat
 - Hiper-ramanski efekat
 - Indukovani ramanski efekat Kera
 - Koherentna anti-Stoksova ramanska spektroskopija (KARS)