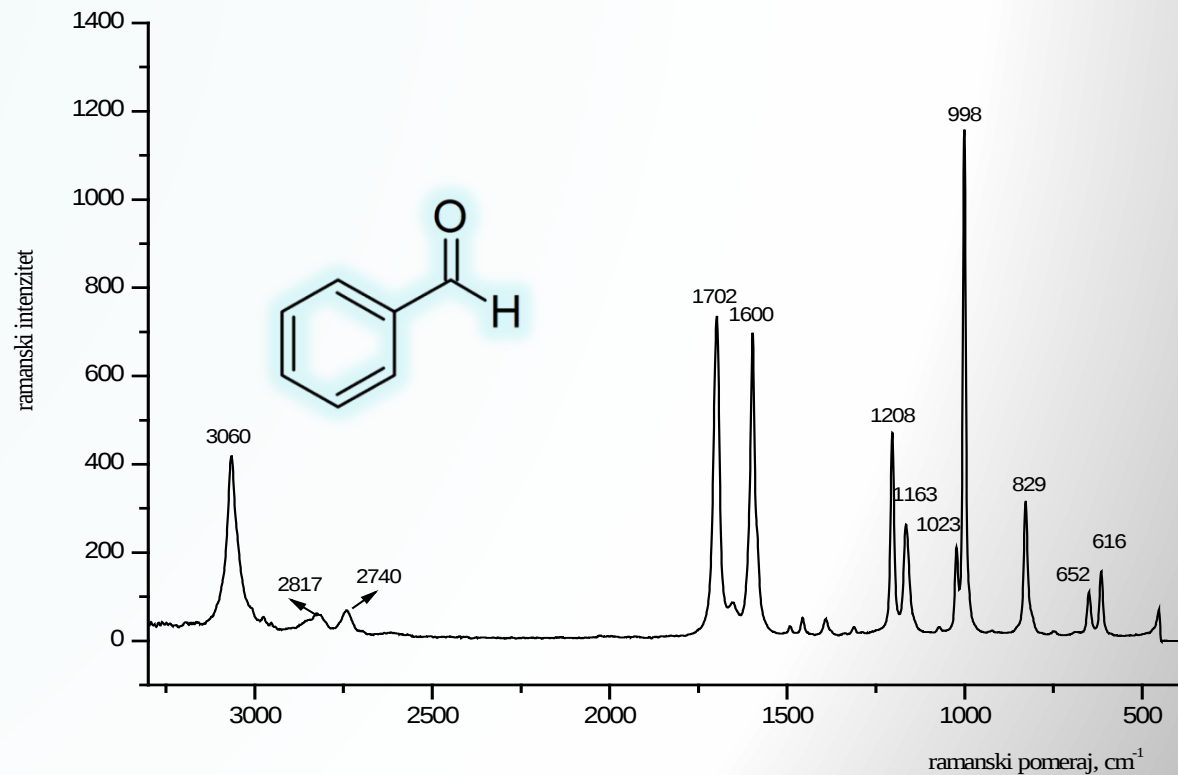


Dr Jasmina Dimitrić Marković, redovni profesor
Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu
markovich@ffh.bg.ac.rs



Ramanska spektroskopija

- **ramanski spektri – spektri kombinacionog rasejanja (KR spektri)**
- **nastaju promenom unutrašnje energije molekula pod dejstvom upadnog neapsorbujućeg monohromatskog zračenja iz Ulj ili VID oblasti (ili bliske IC)**

Ramanski spektri mogu biti:

- **rotacioni**
- **rotaciono-vibracioni**
- **elektronski (retko)**

- **1871. god. lord Rejli** (1903- Nobelova nagrada za fiziku) je pokazao da je **intenzitet rasutog zračenja u vezi sa talasnom dužinom zračenja preko relacije:**

$$I_{rasuto} \approx \frac{1}{\lambda^4} \approx \nu^4$$

poprečni presek za Rejljevo
rasejanje

$$\sigma_s = \frac{2\pi^5}{3} \frac{d^6}{\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2$$



Lord Rayleigh
(1842-1919)

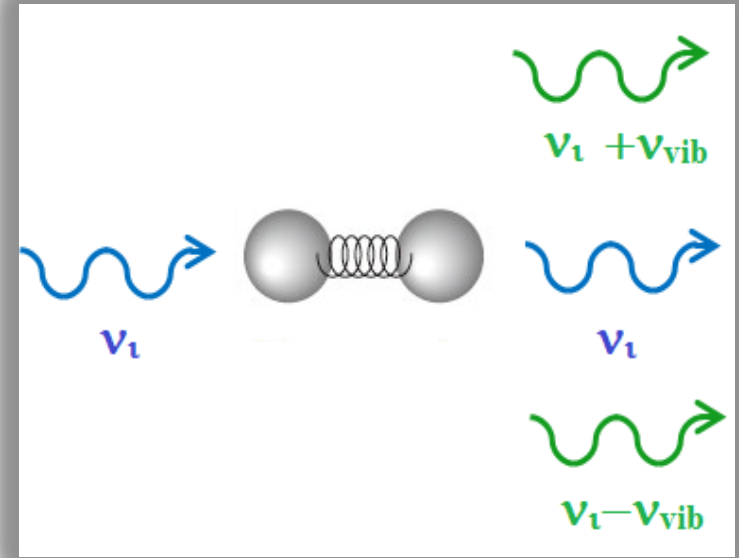
- ova relacija upravo pokazuje da je plava komponenta sunčevog zračenja najviše podložna rasejanju što je i razlog postojanja plave boje neba
- Rejljevo rasejanje u atmosferi je posledica rasejanja na molekulima vazduha (čija je dimenzija mnogo manja od talasne dužine upadnog zračenja) koji se haotično kreću odn. posledica je fluktuacija u gustini vazduha (dovodi do različitih vrednosti indeksa prelamanja u oblastima različitih gustina)

- Ramanov efekt zapažen je **1928. god. od strane Ramana i Krišnana** pri propuštanju monohromatskog zračenja iz ULj i VID (ili bliskog IC) dela spektra na neapsorbujući sloj rastvora (isto važi i za gasove i čvrste supstanca)



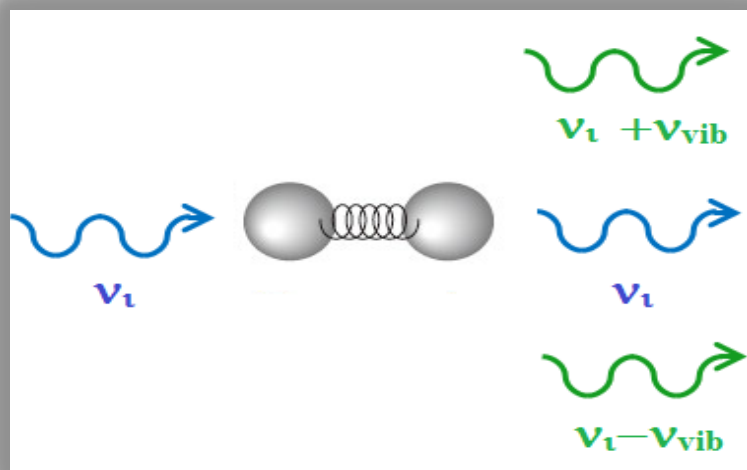
Chandrasekhra
Venkata Raman
1888-1970

- Ramanovog efekt - **neelastično rasejanje, ramansko rasejanje, monohromatskog upadnog zračenja (laserskog zračenja) iz ULJ, VID oblasti (ponekad i bliske IC)**
- deo zračenja, koji se sastoji od fotona nepromenjene energije, poznat je kao **Rejlijevo rasejanje**
- onaj mnogo manji deo upadnog zračenja koji ima promene u energiji poznat je kao **ramansko rasejanje**
- razlika u energiji upadnog i rasejanog zračenja direktno je zavisna od molekulske vrste prisutne u ispitivanom uzorku

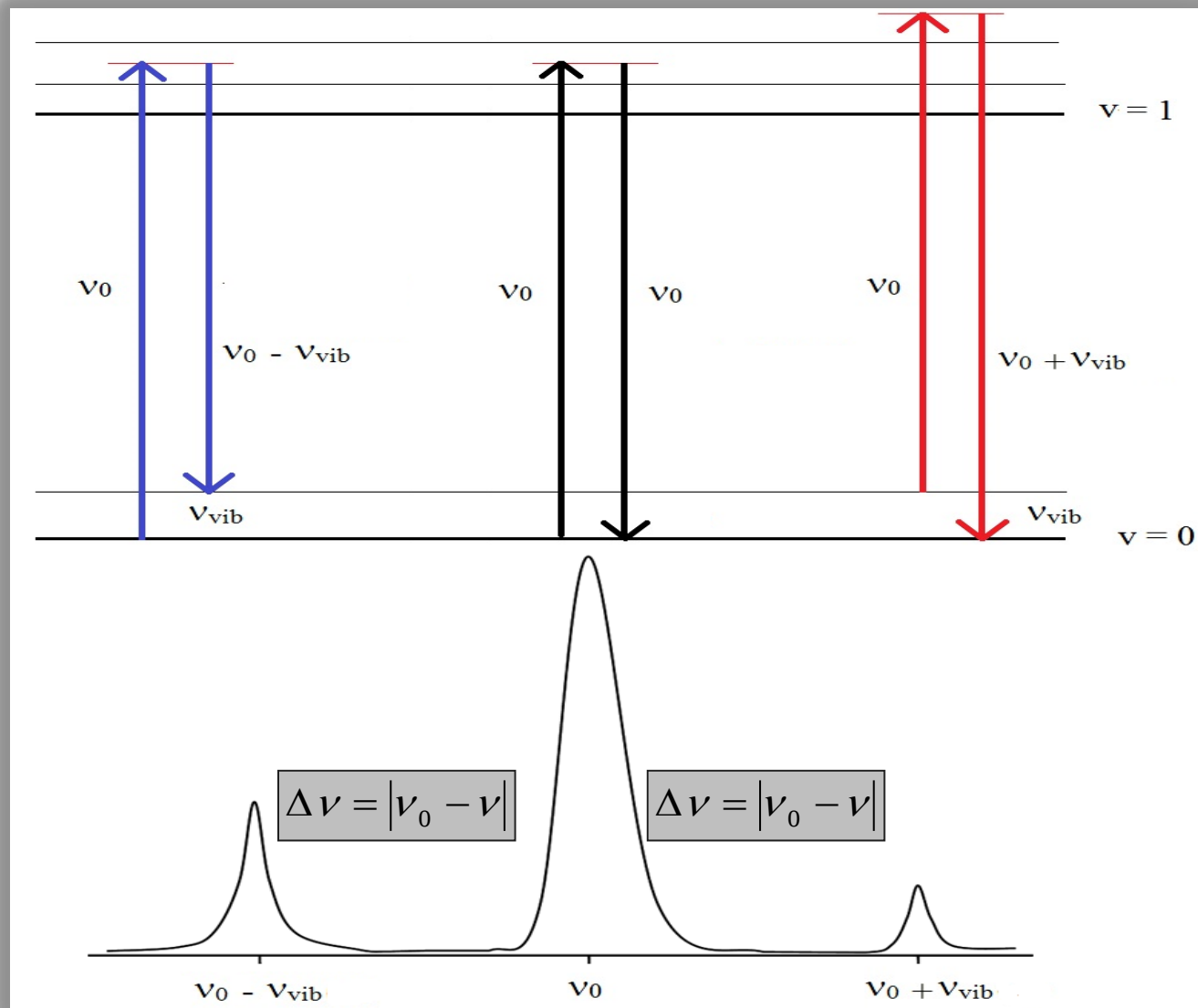


Ukoliko upadno zračenje ima diskretan spektar tada se u spektru rasutog zračenja javljaju tri komponente:

- **zračenje iste frekvencije kao i upadno zračenje (Rejlijevo rasejanje)**
- **zračenje više frekvencije od upadno zračenje (anti Stoksovo zračenje)**
- **zračenje niže frekvenciji od upadnog zračenja (Stoksovo zračenje)**



$$\frac{I_{ANTISTOKS}}{I_{STOKS}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu}{\nu_0 - \nu} \right)^4 e^{-\frac{h\nu}{kT}}$$



Mogući prelazi izazvani interakcijama foton-molekul

$$\Delta \nu = |\nu_0 - \nu|$$

Ramansko pomerenje

- **ramansko pomerenje ne zavisi od ν_0 već samo od prirode supstance**
- **položaj ramanskih linija u spektru zavisi od ν_0**
- **intenzitet ramanskog zračenja je $\approx 10^7$ puta manji od intenziteta upadnog zračenja jer se samo 1 od 10^7 upadnih fotona sudara i reaguje sa molekulima**

Primena u analizi

- **čvrstih supstanci, prahova, tečnosti, gelova**
- **neorganskih, organskih i bioloških materijala**
- **smeša i rastvora**

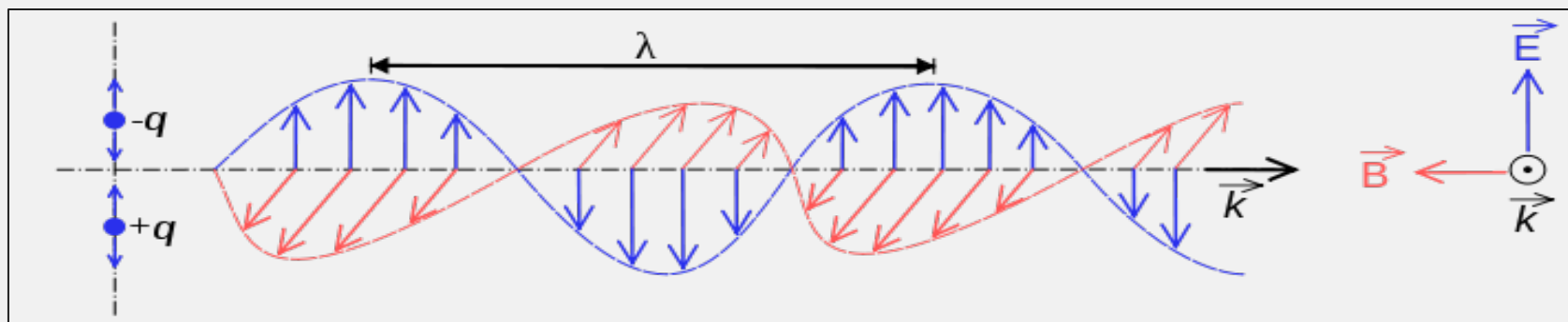
Oblasti primene

- **fizička hemija, hemija, fizika, farmacija**
- **umetnost i arheologija**
- **geologija, ...**

Objašnjenje Ramanskog efekta

- **klasična teorija**
- **kvantna teorija**

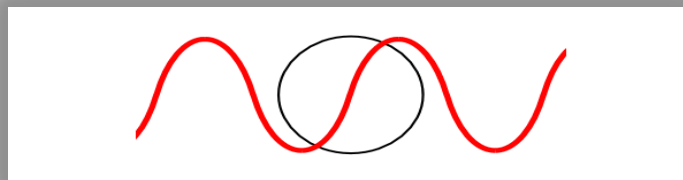
Opšte izborno pravilo za pojavu ramanskih spektara: molekul mora biti anizotropno polarizabilan



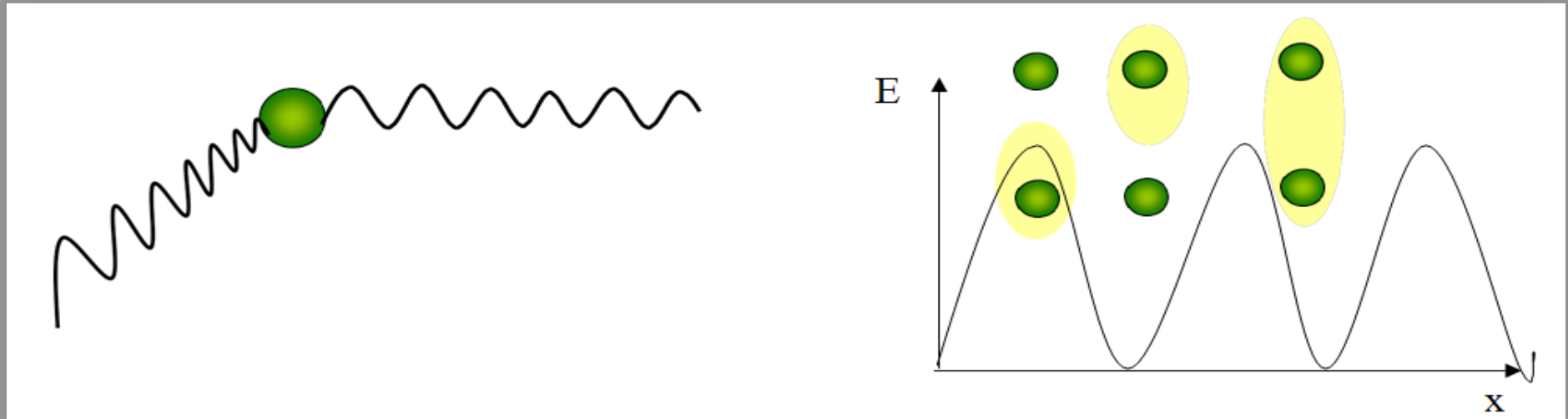
$$E = E_0 \sin 2\pi\nu_o t$$

$$\mu_{ind} = \alpha E = \alpha E_0 \sin 2\pi\nu_o t$$

α - polarizabilnost



μ_{ind}



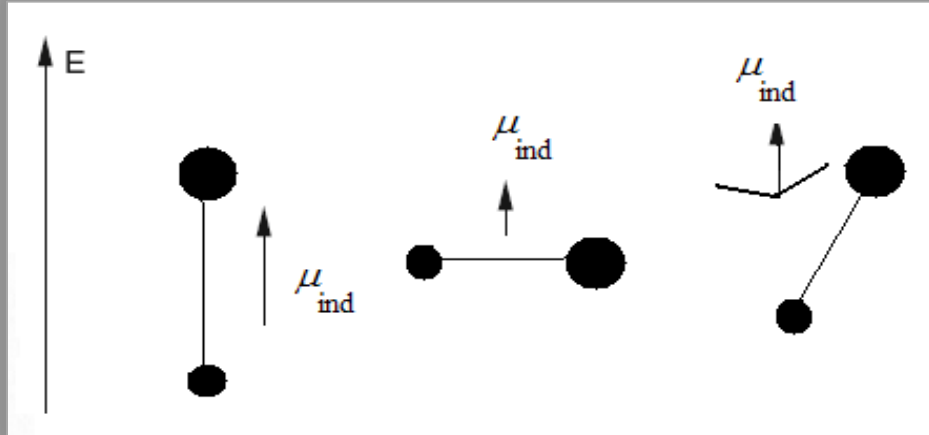
$$\mu = \mu_{\text{permanentno}} + \mu_{\text{indukovano}}$$

$$\mu = \mu_{\text{permanentno}} + \alpha E + \beta E^2 + \dots$$

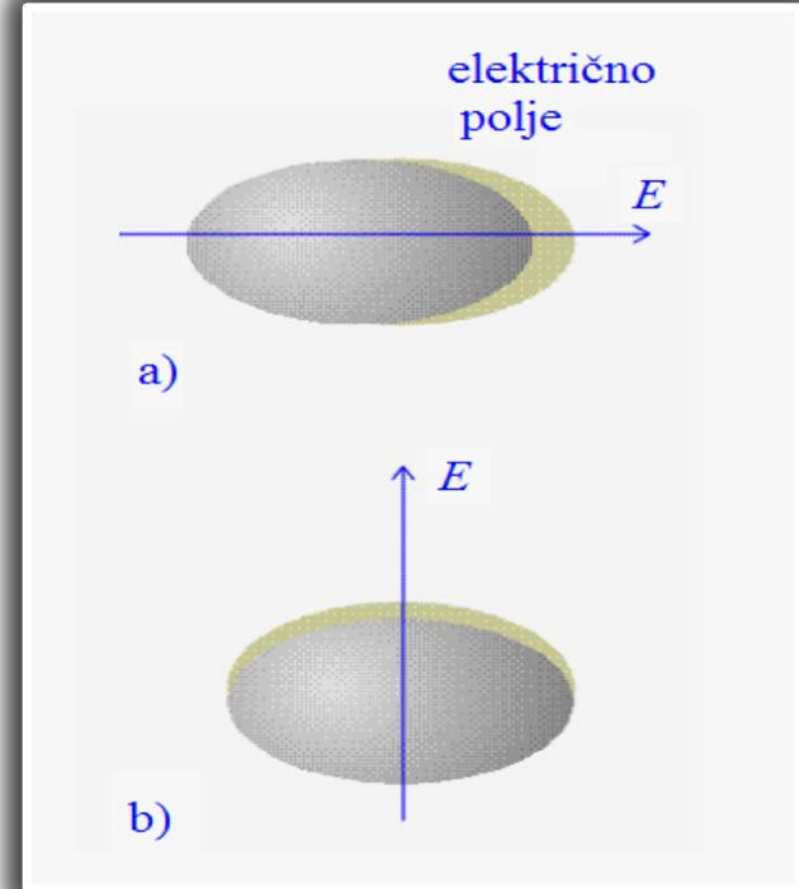
α - ukupna polarizabilnost
 β - hiperpolarizabilnost

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha E = \alpha E_0 \sin 2\pi \nu_o t$$

Moguće orijentacije dipola u polju



- veličina μ_i (a time i α) zavisi od orijentacije molekula u odnosu na pravac polja



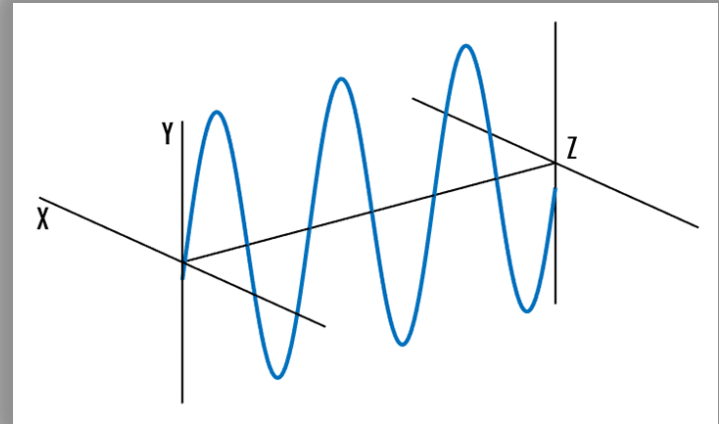
$$\mu_{ind} = \alpha E = \alpha E_0 \sin 2\pi\nu_o t$$



- **mera interakcije elektronskog oblaka sa el. poljem**
- **polarizabilnost je tenzorska veličina koja se menja sa vremenom i predstavlja „odgovor“ elektrona na oscilovanje jezgara u normalnim oblicima vibracija**

- upadna svetlost je polarizovana u jednoj ravni **ali efekat na elektronski oblak molekula se prostire u sva tri moguća pravca (duž x, y i z ose)** jer i komponente polja imaju istu orijentaciju
- to znači da se **indukovani dipol menja duž sve tri ose, μ_x , μ_y , μ_z**

$$\mu_{\text{ind}(x,y,z)} = \alpha E_{(x,y,z)}$$

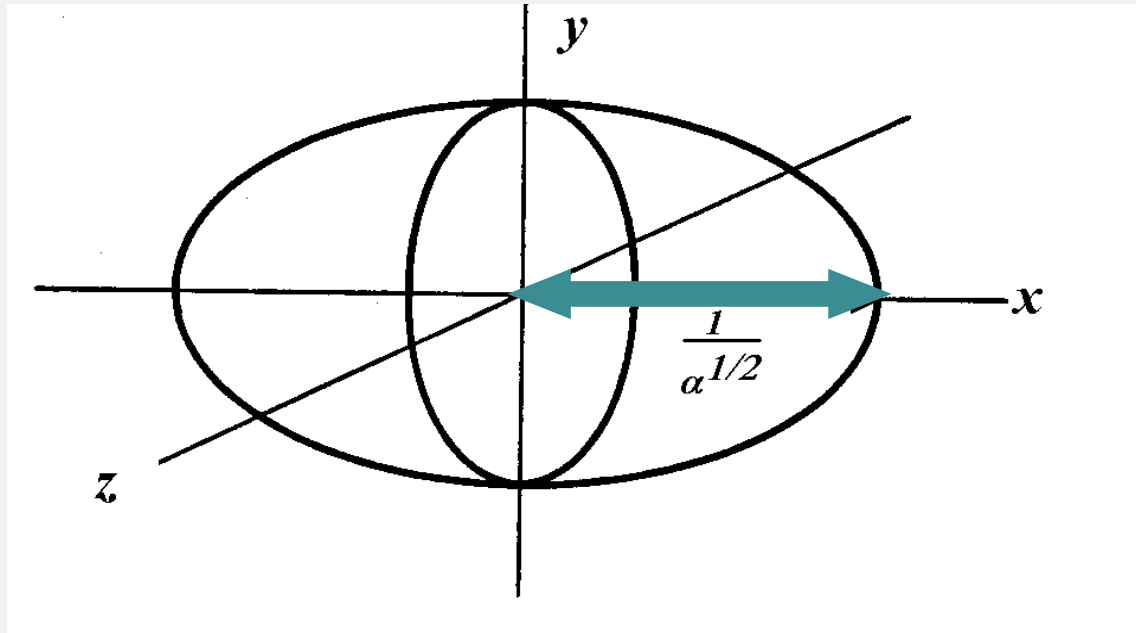


- da bi se opisala složena promena polarizabilnosti u okviru svake komponente indukovanog dipolnog momenta polarizabilnost se kao **tenzorska veličina prikazuje u obliku matrice**

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}$$

- polarizabilnost molekula u različitim pravcima se vizuelno predstavlja **elipsoidom polarizabilnosti**

Elipsoid polarizabilnosti



- α_i je najveća u pravcu najmanje ose elipsoida
- svi dvoatomski i linearni višeatomski molekuli imaju isti oblik elipsoida ali sa različitim vrednostima osa

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}$$

$$\mu_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z$$

$$\mu_y = \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z$$

$$\mu_z = \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z$$

➤ **dijagonalni elementi matrice α_{xx} , α_{yy} i α_{zz} su komponente polarizabilnosti duž x, y i z fiksnih osa molekula**

$\alpha_{yx} = \alpha_{xy}$; $\alpha_{zx} = \alpha_{xz}$; $\alpha_{zy} = \alpha_{yz}$ – simetrična matrica

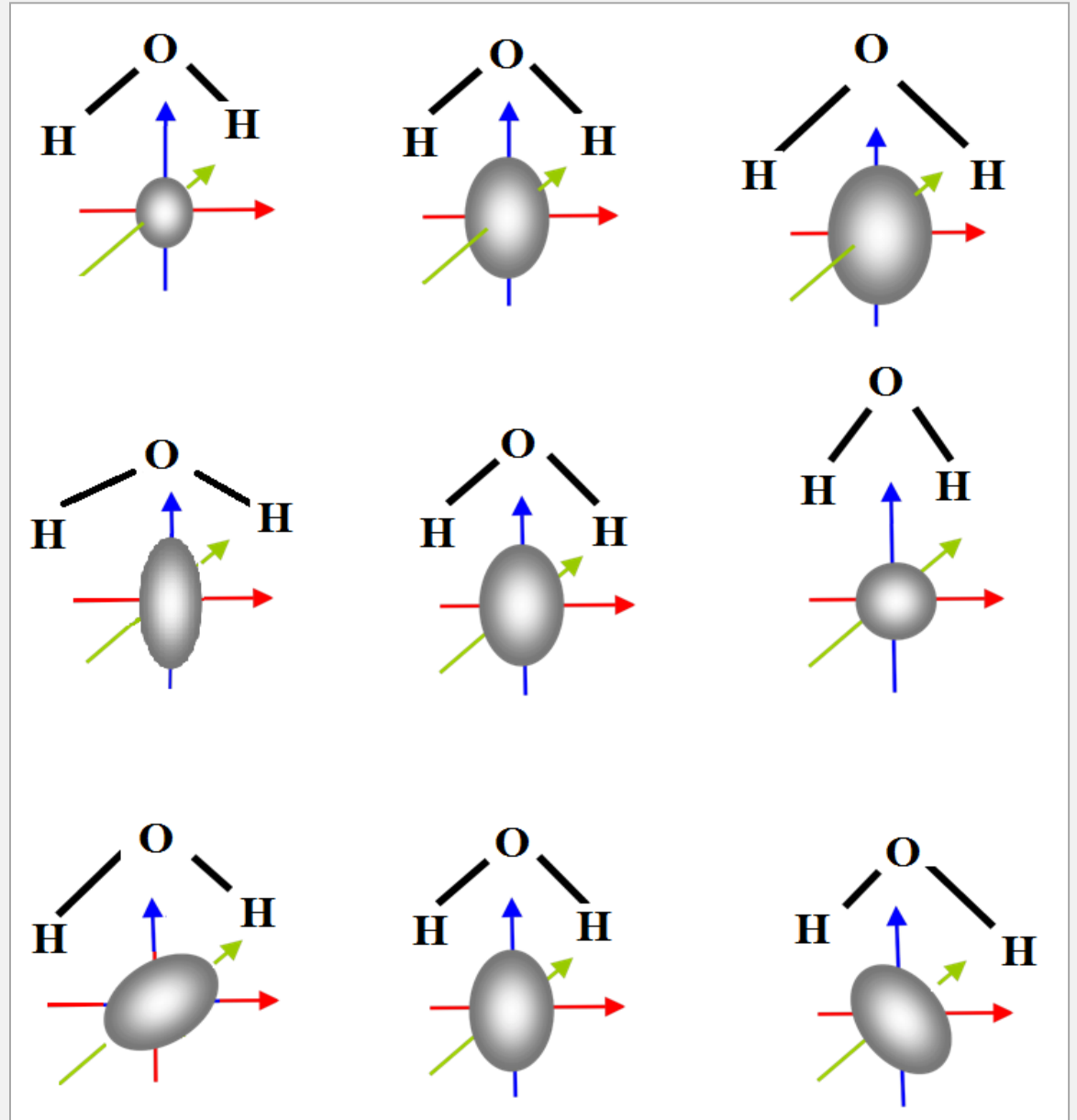
- **ramanski efekat zavisi isključivo od polarizabilnosti molekula i nezavisan je od njegovog permanentnog dipolnog momenta**
- **polarizabilnost (α) je anizotropna veličina, zavisi od usmerenosti ose molekula u odnosu na smer vektora električnog polja upadnog zračenja**

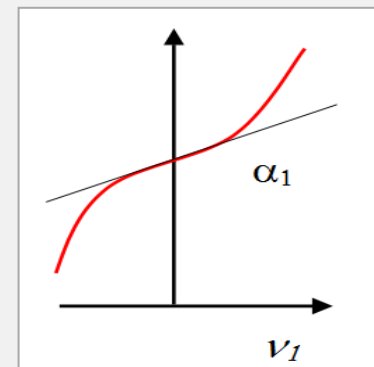
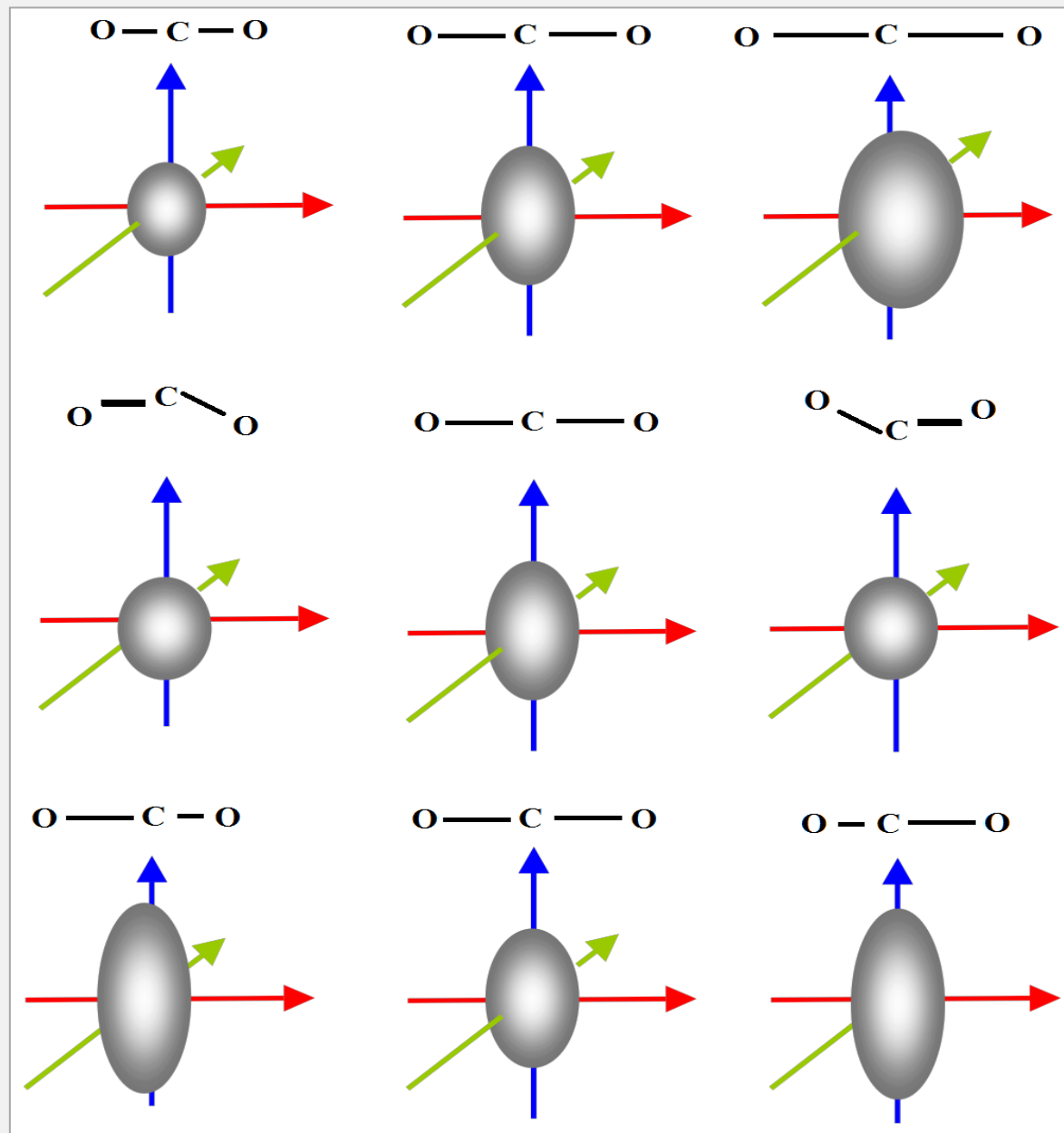
**Promena oblika elipsoida
polarizabilnosti kod vibracija
molekula H_2O**

ν_1 – simetrična istežuća

ν_2 – savijajuća deformaciona

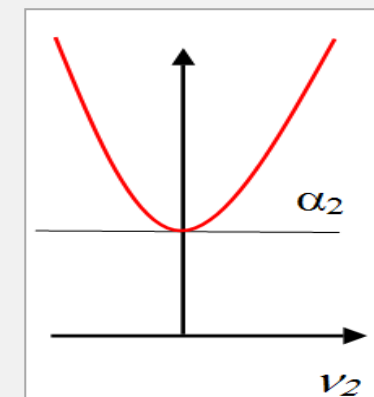
ν_3 – asimetrična istežuća



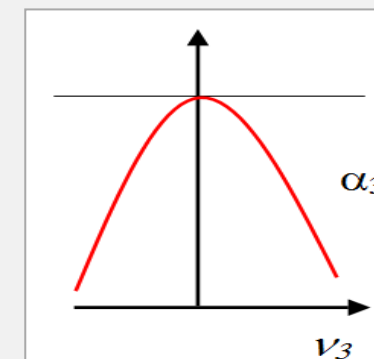


Promena oblika elipsoida polarizabilnosti kod vibracija molekula CO_2

v_1 – simetrična istežuća



v_2 – savijajuća deformaciona



v_3 – asimetrična istežuća

Klasična teorija ramanskog efekta

Ramanska aktivnost vibracija

- vibracija molekula je aktivna u ramanskom spektru samo ukoliko u molekulu **izaziva promenu polarizabilnosti**
- u određivanju koja je vibracija ramanski aktivna potrebno je posmatrati da li prilikom određene vibracije **dolazi ili ne do promene zapremine elektronskog oblaka molekula**
- kod višeatomskih molekula **ukupna polarizabilnost molekula se može posmatrati kao zbir pojedinačnih doprinosa hemijskih veza**
- ukupna polarizabilnosti se dobija sabiranjem tenzora polarizabilnosti pojedinačnih veza

Vibraciono kretanje molekula

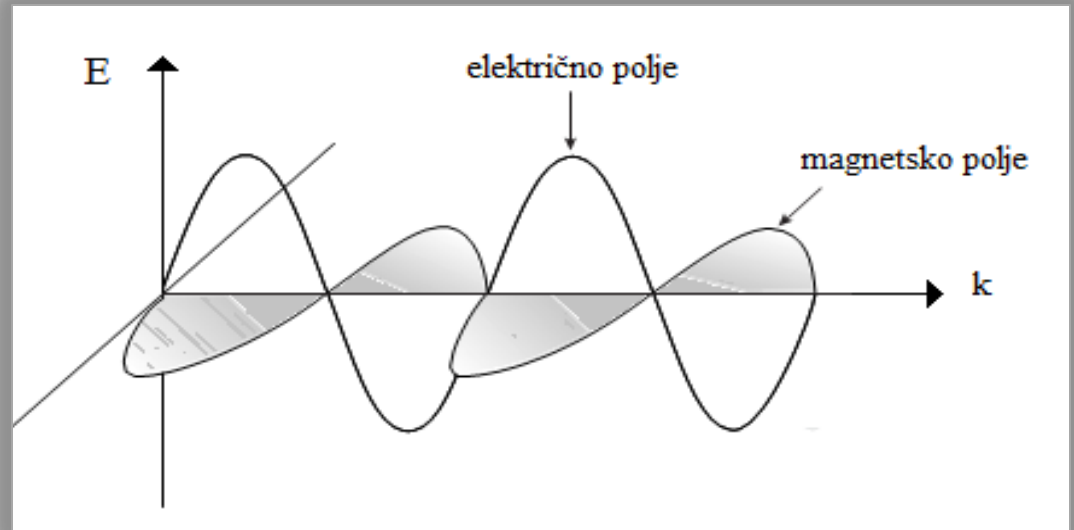
$$\begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}$$

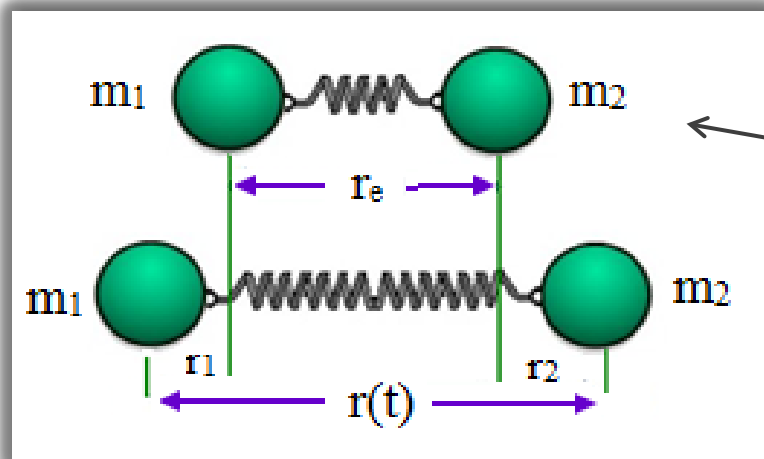
$$\mu_{ind} = \alpha E = \alpha E_0 \sin 2\pi\nu_0 t$$

E_0 - amplituda el. polja

ν_0 - frekvencija oscilovanja el. polja
(frekvencija monohromatskog uadnog zračenja)

- ukoliko molekul vrši neko unutrašnje kretanje (rotaciono ili vibraciono), polarizabilnost α će se menjati jer je uslovljena raspodelom gustine naelektrisanja u vezi





promena α uslovljena unutrašnjim (vibracionim) kretanjem molekula

$$dq = q_0 \sin 2\pi\nu_{vib}t$$

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial q} dq + \dots$$

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 \sin 2\pi\nu_{vib}t$$

$$\mu_{ind} = \alpha E = \left(\alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 \sin 2\pi\nu_{vib}t \right) (E_0 \sin 2\pi\nu_0t)$$



$$\mu_{ind} = \alpha_{vib}^0 E_0 \sin 2\pi\nu_0t + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 E_0 \sin 2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 E_0 \sin 2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t$$

Rejli

anti Stoks

Stoks

Promena dipolnog momenta prilikom rotacionog kretanja molekula

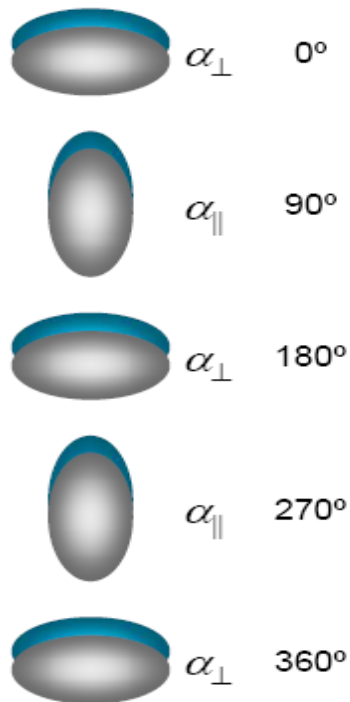
Rejli

$$\mu_{ind} = \alpha_{rot}^0 E_0 \sin 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 E_0 \sin 2\pi (\nu_0 + 2\nu_{rot}) t + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q_0 E_0 \sin 2\pi (\nu_0 - 2\nu_{rot}) t$$

anti Stoks

Stoks

električno polje



Promena oblika elipsoida polarizabilnosti (α) u toku rotacije

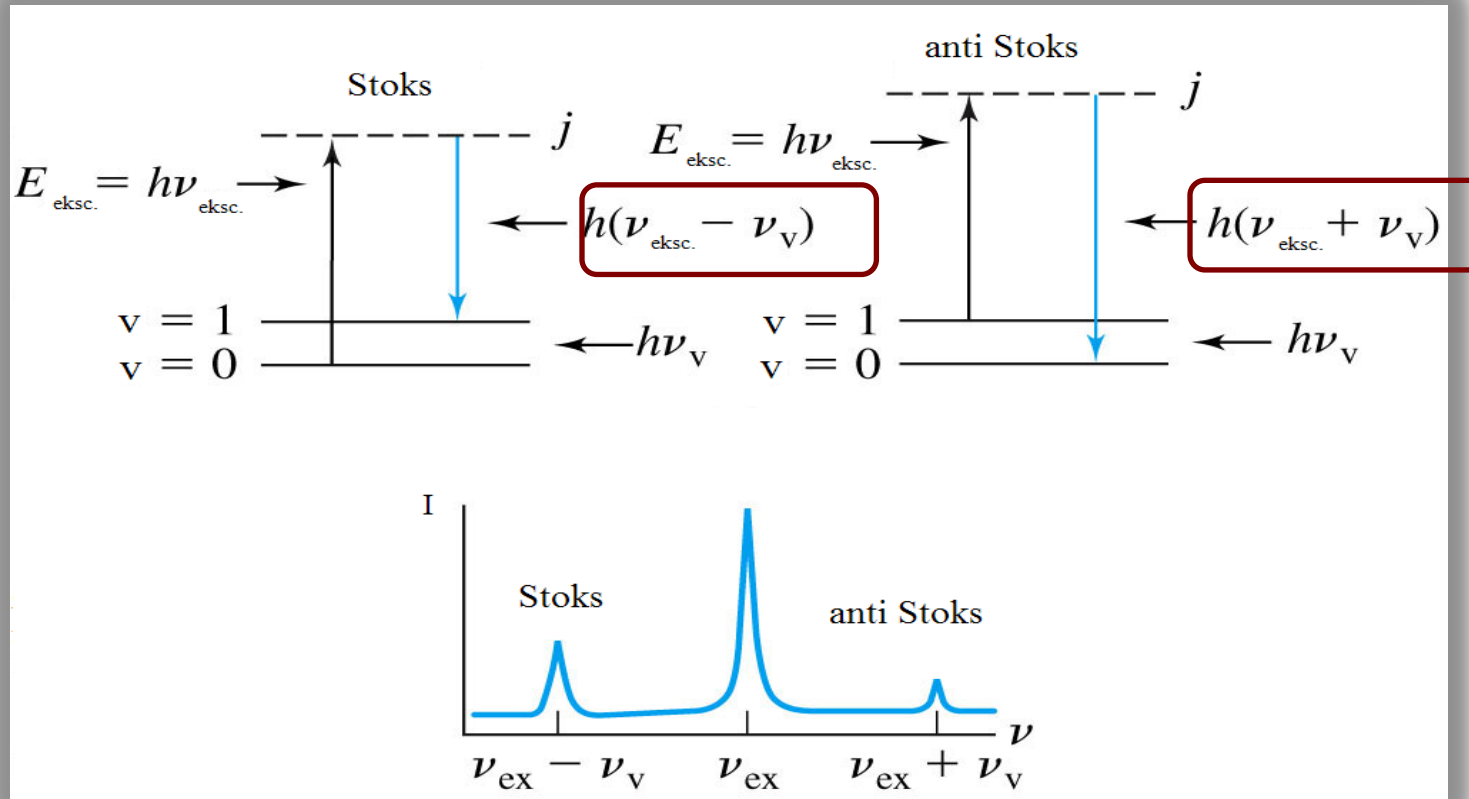
- ako je $\alpha_{\text{rot.}} = 0$ ili $\alpha_{\text{osc}} = 0$ rasejano zračenje će imati samo Rejljevu komponentu
- ramansko rasejanje se javlja samo onda kada se u toku vibracija ili rotacija molekula **menja polarizabilnost molekula**

Nedostatci klasične teorije

- **ne objašnjava veći intenzitet Stoksovskih prelaza**
- **ne objašnjava diskretnost rotacionog ramanskog spektra**

Kvantna teorija ramanskog efekta

- kvantna teorija razmatra ramanski efekat kao **neelastične sudare molekula sredine i upadnih fotona**



Rotacioni ramanski spektri

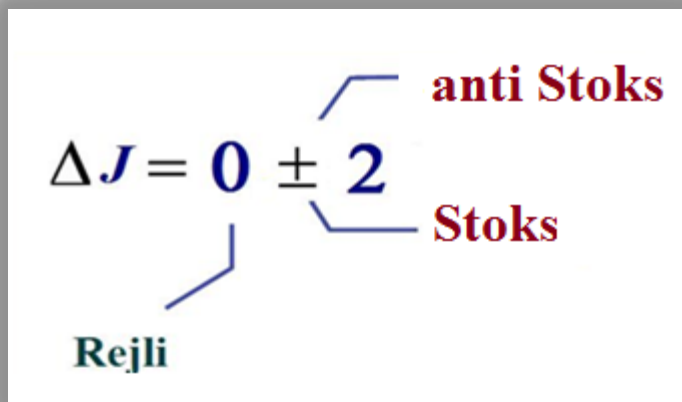
- najopštije izborna pravilo za pojavu rotacionih ramanskih spektara glasi: **molekuli u gasnoj fazi moraju biti anizotropno polarizabilni**

Rotacioni ramanski spektri dvoatomskih i linearnih višeatomskih molekula

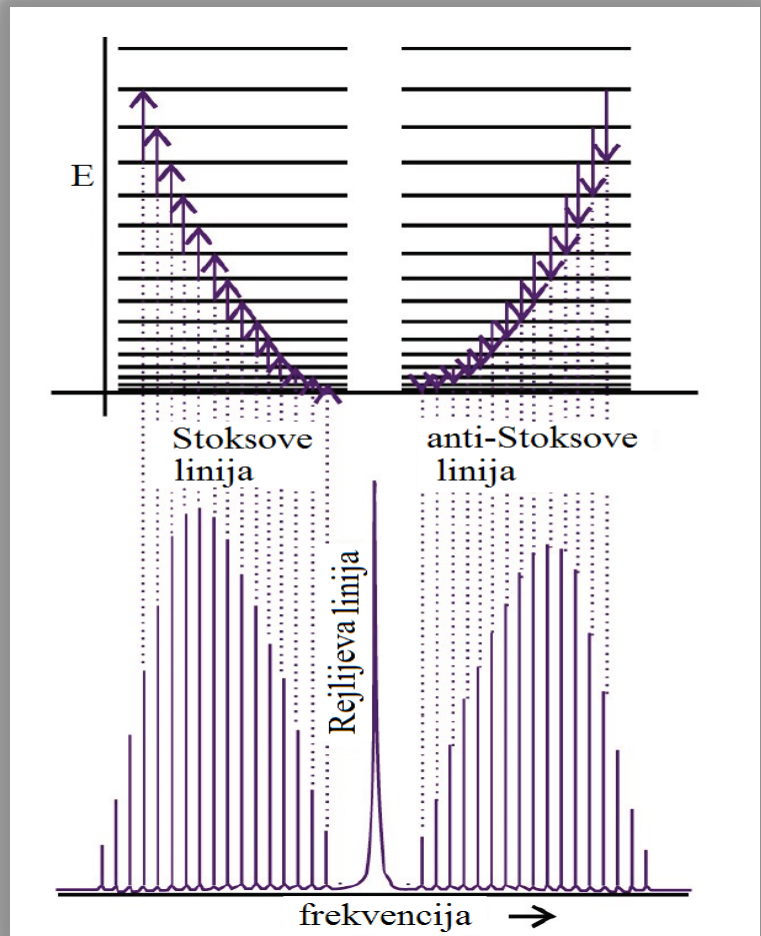
Dvoatomski molekuli u aproksimaciji krutog rotatora

- svi dvoatomski i linearni višeatomski molekuli (bez obzira da li su homonuklearni ili heteronuklearni) su anizotropno polarizabilni

$$F(J) = BJ(J+1)$$

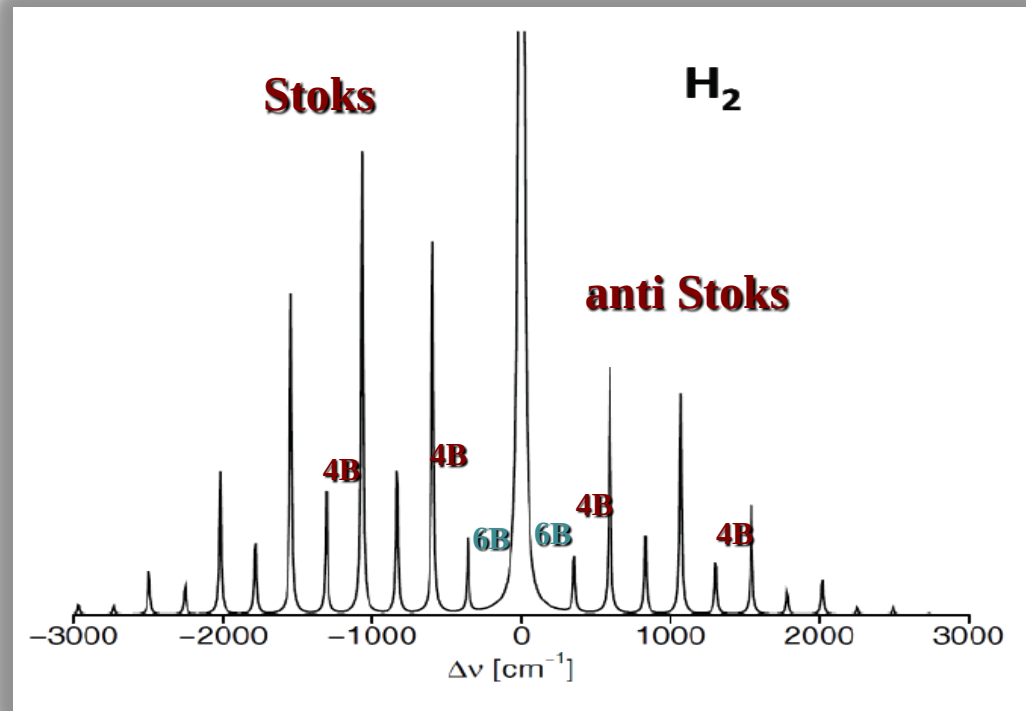


Rotacioni ramanski prelazi dvoatomaških i linearnih višeatomaških molekula



“S” grana
 $\Delta J = +2$

“O” grana
 $\Delta J = -2$



- $J' > J''$, realno je očekivati samo prelaze sa $\Delta J = +2$ (“S” grana)
- međutim, dobijaju se dve serije linija pošto donje i gornje rotaciono stanje (u okviru jednog vibracionog stanja) mogu podjednako da učestvuju u procesu rasejanja

$$\begin{aligned}\tilde{\nu} &= F(J+2) - F(J) = \\ &= B(J+2)(J+3) - BJ(J+1) =\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}&= 4B(J + 3/2) = \\ &= 4BJ + 6B\end{aligned}$$

$$\tilde{\nu}_{ROT} = \tilde{\nu}_{REJLI} \pm (6B + 4BJ)$$

anti Stoks

Stoks

Dvaotomski molekul u aproksimaciji realnog, ne krutog, rotatora

$$F(J) = BJ(J + 1) - DJ^2(J + 1)^2$$

$$\tilde{\nu}_{ROT} = F(J + 2) - F(J) =$$

$$= (4B - 6D)(J + \frac{3}{2}) - 8D(J + \frac{3}{2})^3$$

$$= 4B(J + 3/2) =$$

$$= 4BJ + 6B$$



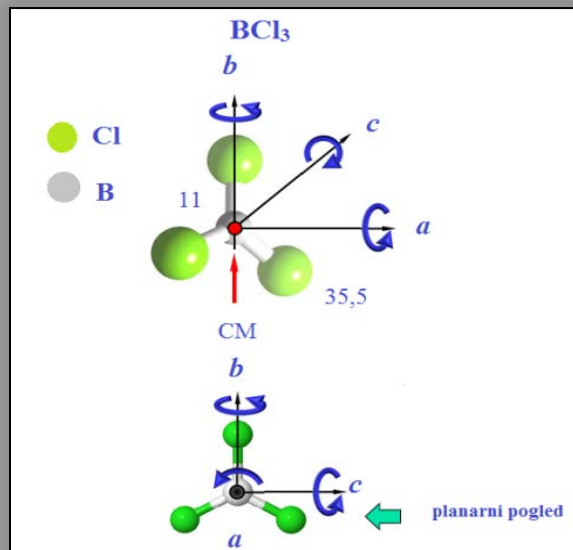
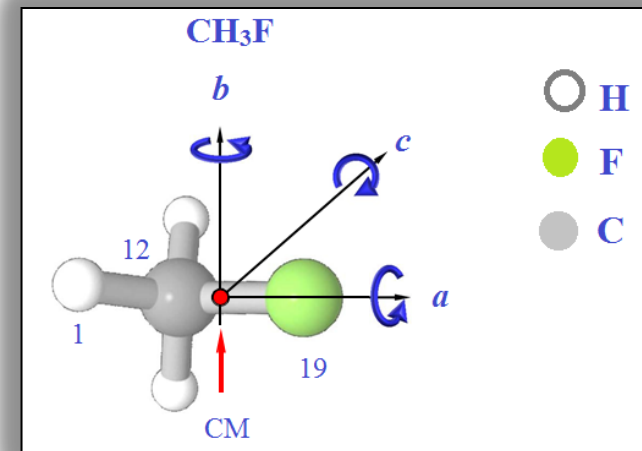
$D_0 \ll B_0$, izraz isti kao i za kruti rotator

Rotacioni ramanski spektri višeatomskih molekula tipa simetrična čigra

idužena čigra

$$F(J, K) = BJ(J + 1) + (A - B)K^2$$

$$(I_c = I_b > I_a)$$



spljoštena čigra

$$F(J, K) = BJ(J + 1) + (C - B)K^2$$

$$(I_a = I_b < I_c)$$

- izborna pravilo za rotacione ramanske prelaze **zavisi od tipa elektronskog stanja** u okviru koga se posmatraju rotacioni ramanski prelazi

$$\Lambda = 0$$

$$\Delta J = 0 \pm 2$$

Rejli

anti Stoks

Stoks

$$\Delta K = 0$$

$$\Lambda \neq 0$$

$$\Delta J = 0, \pm 1, \pm 2$$

Rejli

anti Stoks

Stoks

$$\Delta K = 0$$

$$\Delta J = +1; \Delta K = 0$$

$$\tilde{\nu}_R = F(J+1, K) - F(J, K)$$

$$\tilde{\nu}_R = 2BJ + 2B$$

$$\Delta J = +2; \Delta K = 0$$

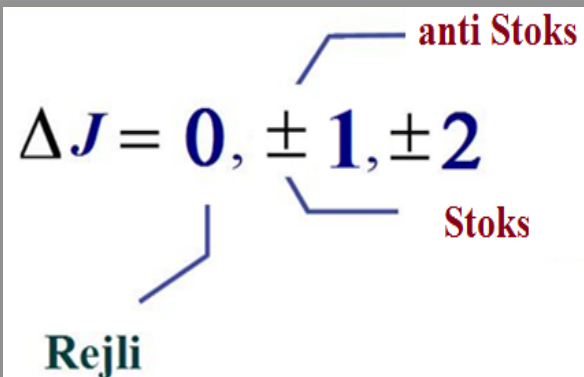
$$\tilde{\nu}_R = F(J+2, K) - F(J, K)$$

$$\tilde{\nu}_S = 4BJ + 6B$$

- kako su u čisto rotacionim ramanskim spektarima moguće samo pozitivne vrednosti ΔJ to je za očekivati pojavu Stoksovih i anti Stoksovih linija u R grani i Stoksovih i anti Stoksovih linija u S grani

Rotacioni ramanski spektri molekula tipa asimetrične čigre ($I_a \neq I_c \neq I_b$)

- rotacioni ramanski spektri su **jako komplikovani i teški za dešifraciju**
- **izborna pravila za rotacioni kvantni broj su:**


$$\Delta J = 0, \pm 1, \pm 2$$

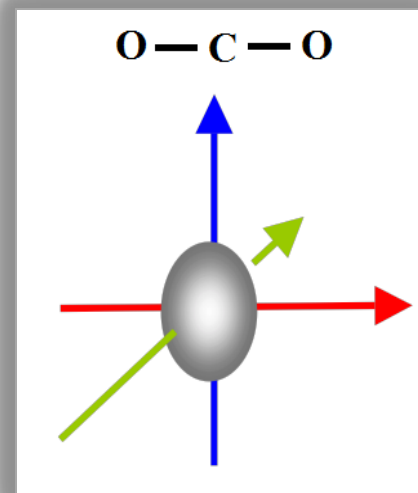
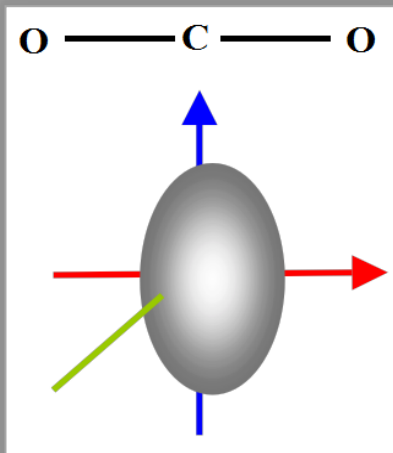
Rejli

Stoks

anti Stoks

Vibracioni ramanski spektri

- opšte izborno pravilo je da se: **polarizabilnost molekula menja u toku vibracija molekula**
- ramanski efekat zavisi isključivo od polarizabilnosti molekula i **nezavisan je od permanentnog dipolnog momenta molekula**

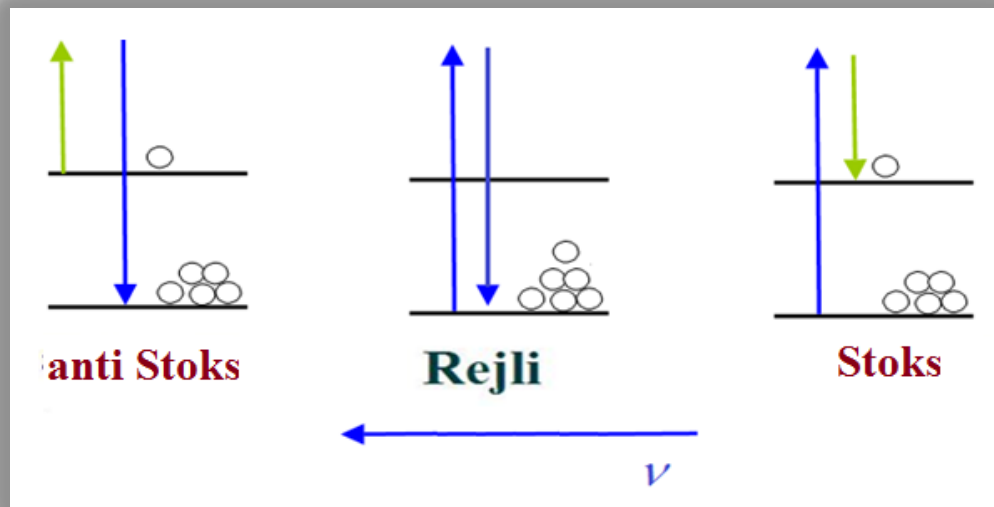


Vibracioni ramanski spektri dvoatomskih molekula u aproksimaciji harmonijskog oscilatora

- svi dvoatomski homonuklearni i heteronuklearni molekuli imaju vibracione ramanske spektre

$$\Delta v = \pm 1$$

$$|\Delta v| = G(v+1) - G(v) = \omega_e$$



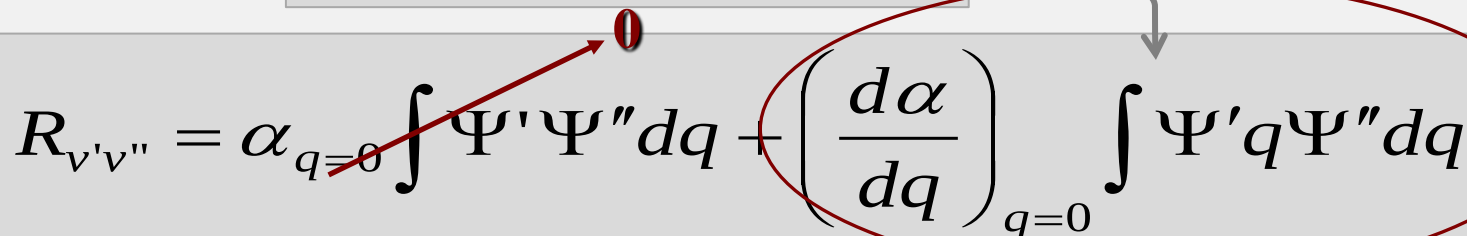
Izborna pravila za vibracione ramanske prelaze

- intenzitet Stoksovih vibracionih ramanskih prelaza ($1 \leftarrow 0$) je mnogo veći od intenziteta anti Stoksovih vibracionih ramanskih prelaza ($0 \leftarrow 1$), koji se veoma retko i javljaju (posledica naseljenosti stanja)

$$R_{v'v''} = \int \Psi' \alpha \Psi'' dx$$

$$\alpha = \alpha_{q=0} + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_{q=0} q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\alpha}{dq^2} \right)_{q=0} q^2 + \dots$$

$$R_{v'v''} = \int \Psi' \alpha \Psi'' dx$$

$$R_{v'v''} = \alpha_{q=0} \int \Psi' \Psi'' dq + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_{q=0} \int \Psi' q \Psi'' dq$$


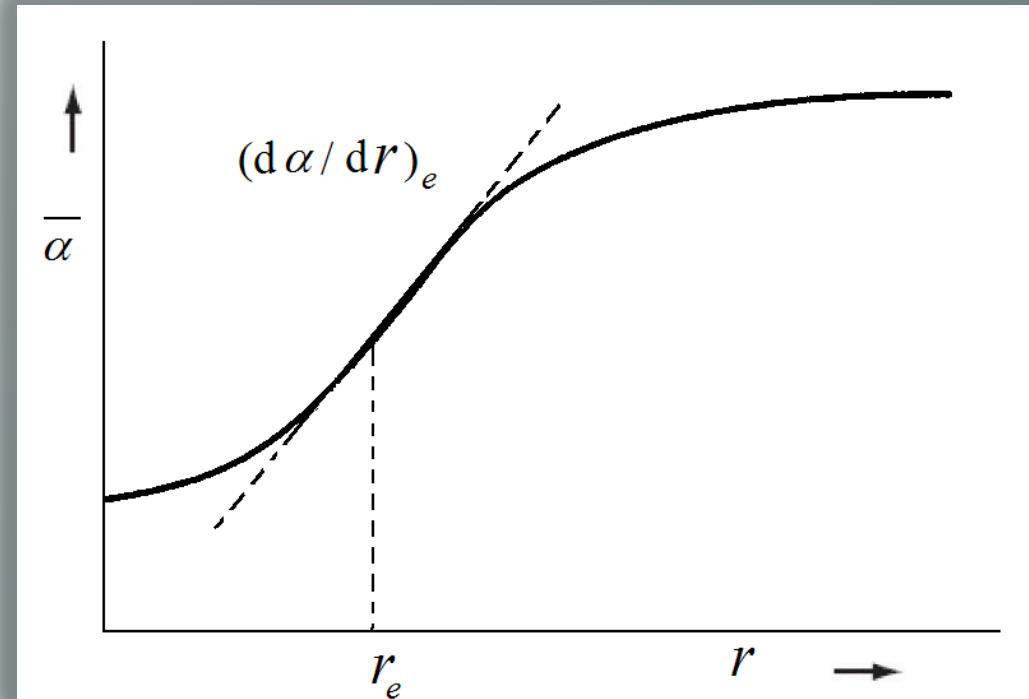
q - norma, vibraciona, koordinata

$$R_{v'v''} = \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_{q=0} \int \Psi' q \Psi'' dq$$

$$R_{v'v''} \neq 0 \Leftrightarrow \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_{q=0} \neq 0$$



$$\underline{\Delta v = \pm 1}$$



Simetrijska izborna pravila za vibracione ramanske prelaze

$$\Gamma(\Psi') \times \Gamma(\alpha_{ij}) \times \Gamma(\Psi'') = A \quad \Rightarrow \quad \text{nedegenerisane vibracije}$$

$$\Gamma(\Psi') \times \Gamma(\alpha_{ij}) \times \Gamma(\Psi'') \supset A \quad \Rightarrow \quad \text{degenerisane vibracije}$$

$$\Gamma(\Psi'') = A$$



$$\Gamma(\Psi') \times \Gamma(\alpha_{ij}) = A$$



$$\Gamma(\Psi') = \Gamma(\alpha_{ij})$$

Vibracioni ramanski spektri dvoatomskih molekula u aproksimaciji anharmonijskog oscilatora

$$\Delta v = \pm 1; \pm 2; \pm 3; \dots$$

$$|\Delta v| = G(1) - G(0) = \omega_e - 2\omega_e x_e$$

- **opšte pravilo je: u vibracionim ramanskim spektrima dvoatomskih molekula skoro nikada nema pojave traka viših harmonika**
- **nije moguće izračunati ω_e i $\omega_e x_e$ iz vibracionih ramanskih spektara dvoatomskih molekula**

- **realno je očekivati uglavnom pojavu samo Stoksovih i anti Stoksovih linije u okviru 0→1, odn. osnovne vibracione trake ($\Delta v = \pm 1$)**

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{REJLI} \pm (\omega - 2\omega_e x_e)$$

- **vibracioni ramanski spektar je relativno slabog intenziteta i uglavnom se sastoji od Stoksovih linija dok se anti Stoksove linije javljaju mnogo ređe**

Vibraciono-rotacioni ramanski spektri

- **samo kod molekula u gasovitom stanju**
- **struktura relativno nerazložena (i vibraciona i rotaciona), razložena struktura se dobija samo u slučaju jednostavnijih molekula (dvoatomskih i troatomskih)**

➤ **svaka vibraciona ramanska Stoksova ili anti Stoksova (ređe) traka se sastoji od fine strukture u kojoj se formiraju rotacione grane:**

anharmonijski
oscilator



$$\Delta v = \pm 1; \pm 2; \pm 3 \dots$$

$$\Delta J = 0; \pm 2$$



realni, ne kruti, rotator

$$\begin{aligned}\tilde{\nu}(O) &= F(J - 2) - F(J) \\ &= B(J - 2)(J - 2 + 1) - BJ(J + 1)\end{aligned}$$

$$\tilde{\nu}(O) = 2B - 4BJ$$

$$B_1 \sim B_0 \sim B$$

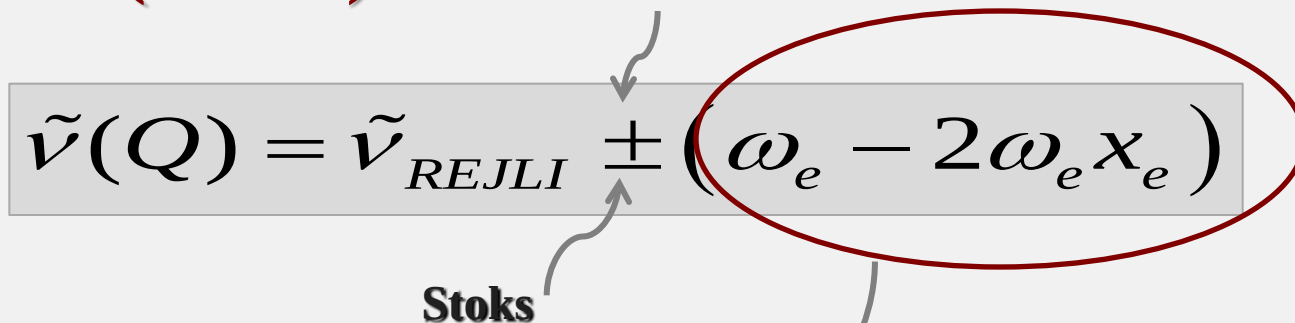
$$\tilde{\nu}(O) = \tilde{\nu}_{REJLI} \pm [\tilde{\nu}_0 - (2B - 4BJ)]$$

➤ **Q grana ($\Delta J = 0$)**

$$\tilde{\nu}(Q) = \tilde{\nu}_{REJLI} \pm (\omega_e - 2\omega_e x_e)$$

anti Stoks

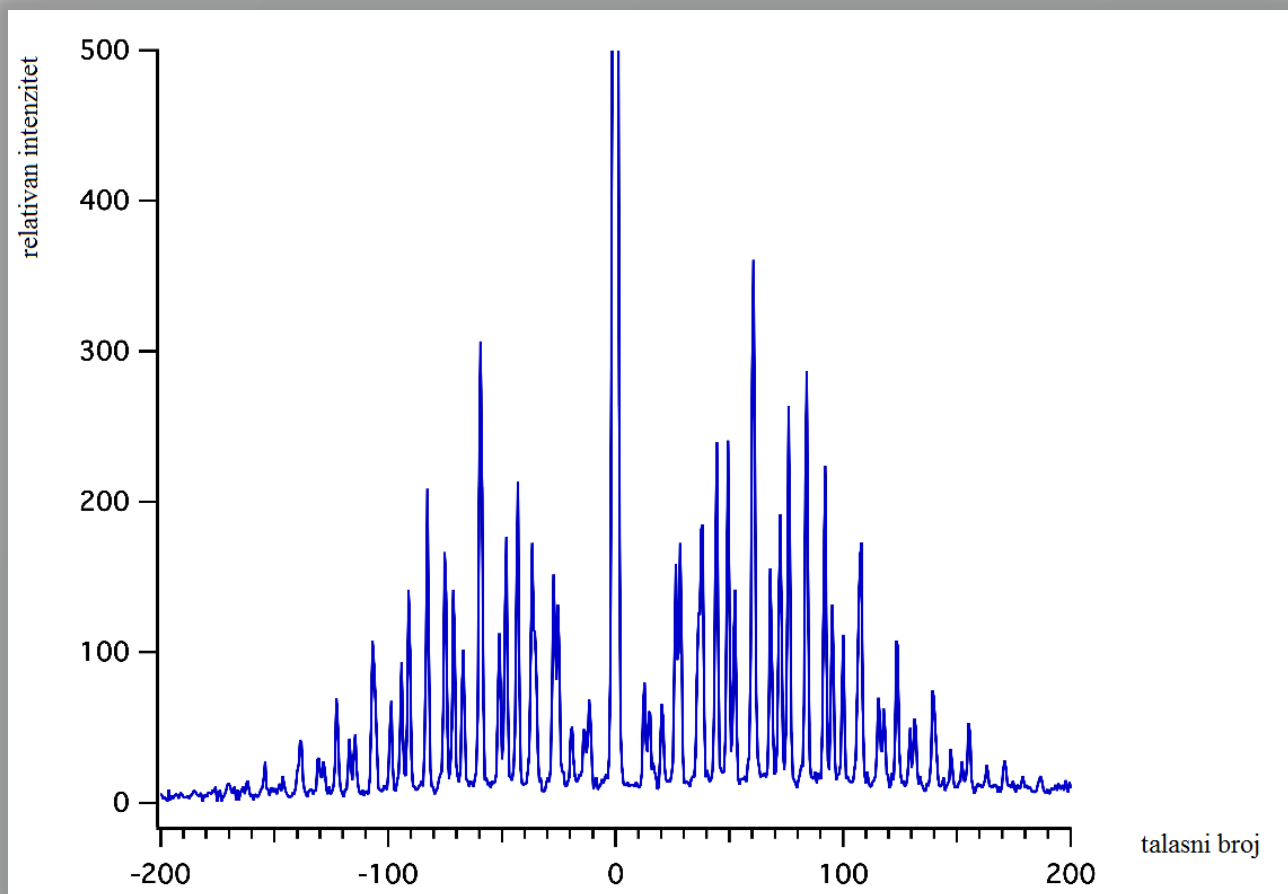
Stoks



➤ **S grana ($\Delta J = +2$)**

$$\tilde{\nu}(S) = \tilde{\nu}_{REJLI} \pm [\tilde{\nu}_0 + (6B + 4BJ)]$$


Stoksov VR spektar vazduha, O₂ + N₂



Kombinacione razlike u ramanskim spektrima molekula

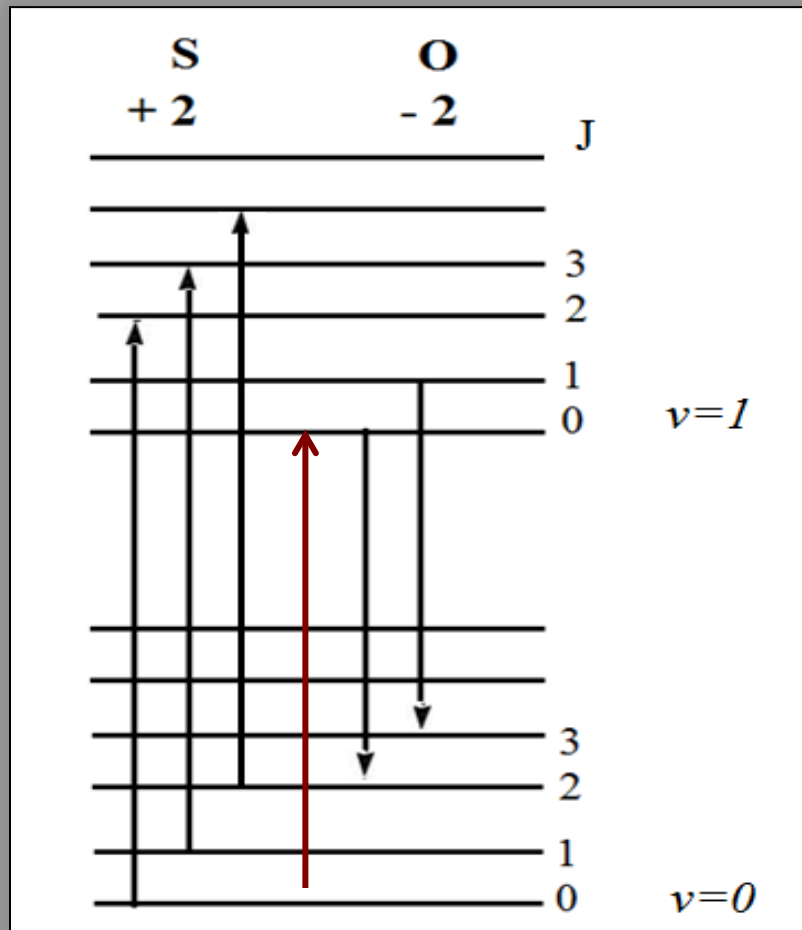
$$\Delta''F(J) = \tilde{\nu}[S(J+2)] - \tilde{\nu}[O(J-2)]$$

$$\Delta''F(J) = 8B'(J + \frac{1}{2})$$

$$\Delta'F(J) = \tilde{\nu}[S(J)] - \tilde{\nu}[O(J)]$$

$$\Delta'F(J) = 8B''(J + \frac{1}{2}) \Rightarrow \text{zanemarena konstanta D}$$

Kombinacione razlike u rotaciono-vibracionim ramanskim spektrima

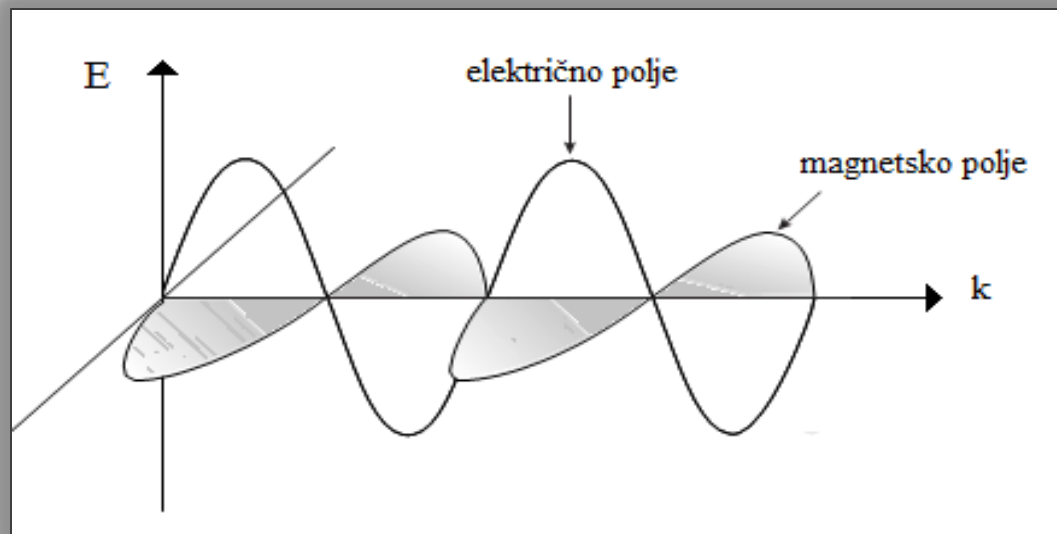


$$\Delta'F(J) = \tilde{\nu}[S(J)] - \tilde{\nu}[O(J)]$$

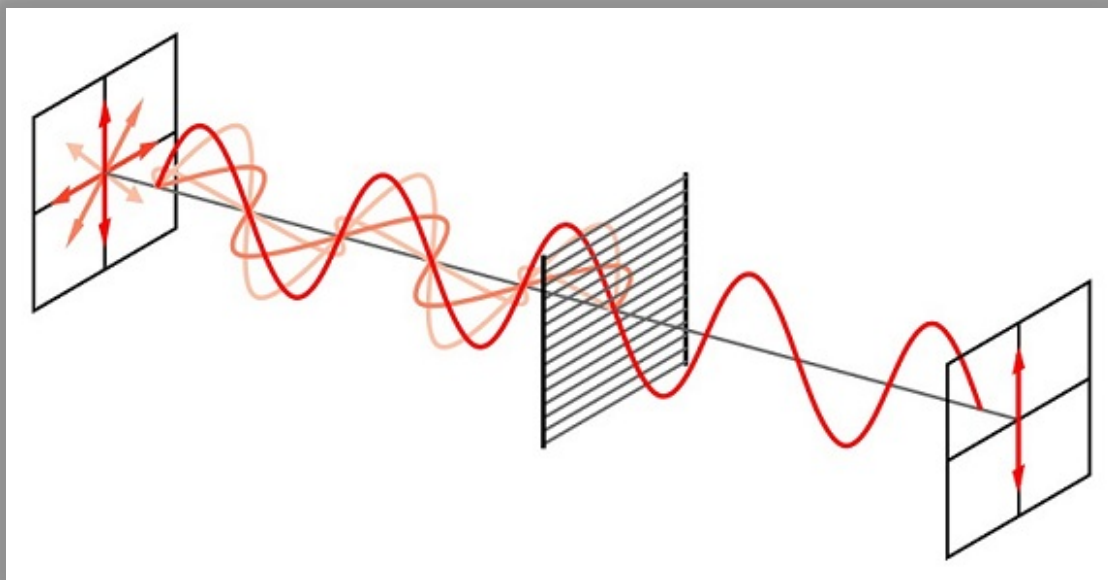
$$(\omega_e - 2\omega_e x_e)$$

Polarizacija ramanskih traka

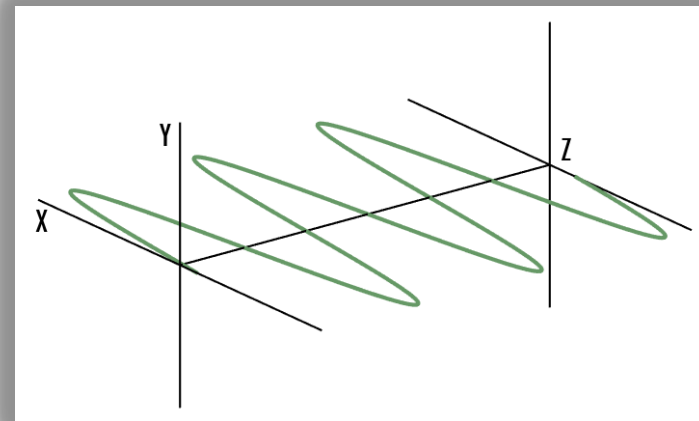
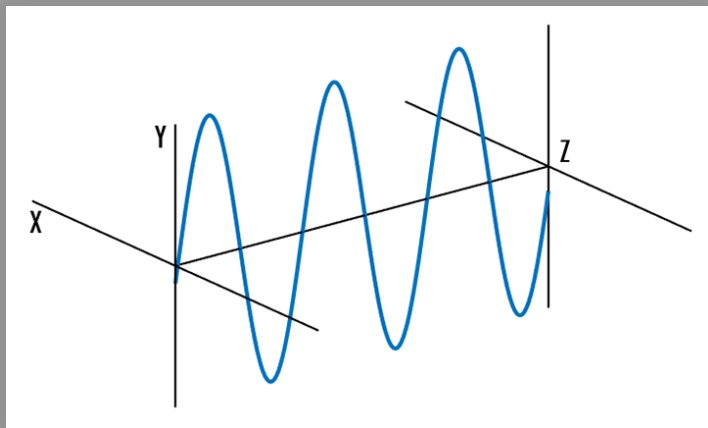
- po elektromagnetskoj teoriji bilo koji tip svetlosti se sastoji od transverzalnih talasa (elektromagnetski talasi su transverzalni talasi) sa oscilujućim električnim i magnetskim poljima koja su normalna na pravac prostiranja talasa



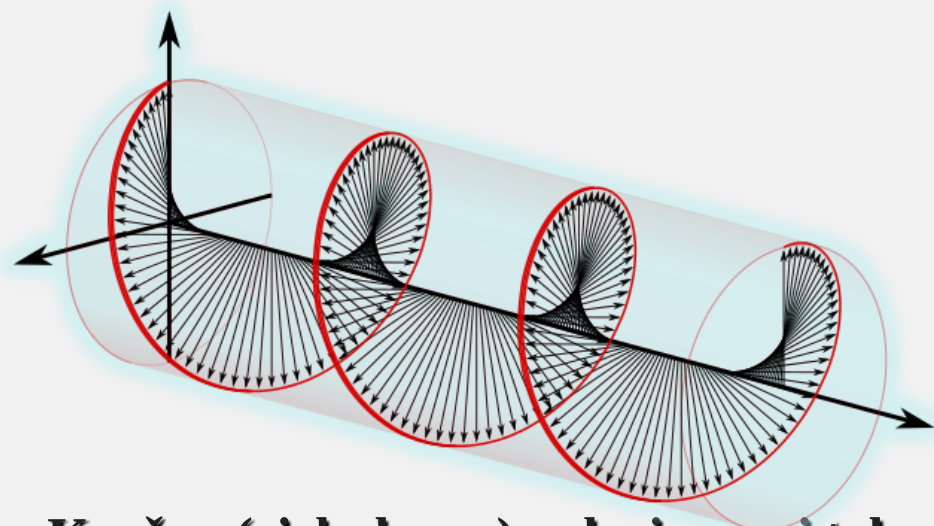
- **običnu, belu, svetlost čini mnoštvo talasa koji se prostiru u svim mogućim pravcima (svi pravci prostiranja su jednako verovatni)**
- **takva svetlost ima slučajnu orijentaciju vektora električnog polja u prostoru**



- ako su oscilacije talasa na bilo koji način uređene odn. ako orijentacija vektora električnog polja sledi neku pravilnost kaže se da je ta svetlost **polarizovana u širem smislu**
- dvodimenzioni transverzalni talasi ispoljavaju fenomen koji se naziva polarizacija (**linearna, ravanska, eliptična, kružna**)



Linearno polarizovani talasi

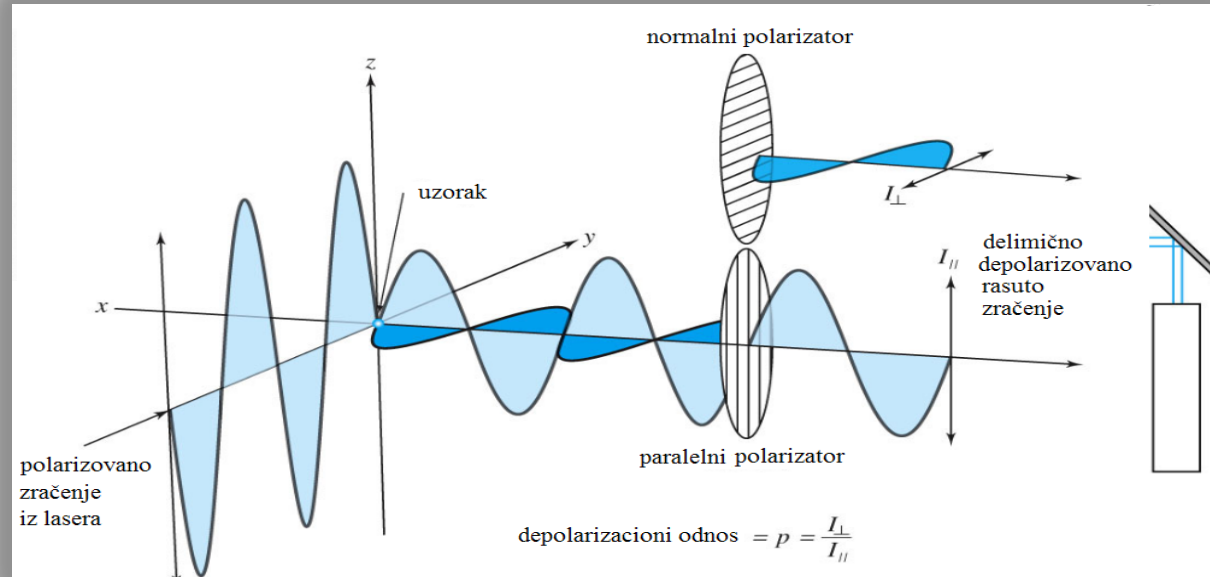


Kružno (cirkularno) polarizovani talas

- ramanski rasejano zračenje na molekulima koji vrše vibraciono kretanje može da bude u većem ili manjem stepenu polarizovano što zavisi od:
 - **tipa vibracije koja interaguje sa zračenjem i**
 - **oblika molekula (oblika elipsoida polarizabilnosti)**

- asignacija ramanskih traka vrši se po tome da li je rasejano zračenje paralelno ili normalno polarizovano u odnosu na ravan polarizacije upadnog zračenja

- **ramanska spektroskopija je idealna tehnika za polarizaciona merenja jer laseri koji se koriste kao izvori zračenja daju linearno polarizovano zračenje**
- **spektar se prvo snima sa zračenjem polarizovanim duž jedne ose, a zatim se snima drugi spektar tako što se linearno polarizovana svetlost rotira normalno na prvu osu**
- **kako rezultati dobijeni ramanskom spektroskopijom mogu biti prilično pogrešno protumačeni veoma je važno znati uslove polarizacije upadnog zračenja**
- **u praksi se može koristiti upadno zračenje koje se namenski depolarizuju da bi se dobili konzistentni rezultati bez obzira na orijentaciju uzorka (tzv. depolarizovani ramanski spektri)**
- **instrumenti naprednih tehnologija se mogu konfigurisati za snimanje depolarizovanih i polarizovanih spektara**



Uzorci:

- **izotropni** (neosetljivi na orijentaciju u odnosu na pravac spoljašnjeg polja: tečnosti, prahovi i proizvoljno orijentisani polimeri); iako nisu osetljivi na prostornu orijentaciju ovakvi uzorci ipak mogu da dovedu do polarizacije rasutog zračenja
- **anizotropni** (npr. kristali; jako osetljivi na orijentaciju u odnosu na pravac spoljašnjeg polja; ovakvi uzorci imaju osu simetrije ili optičku osu čija orijentacija u odnosu na orijentaciju vektora električnog polja upadnog zračenja može da uslovi pojavu potpuno različitih ramanskih spektara)

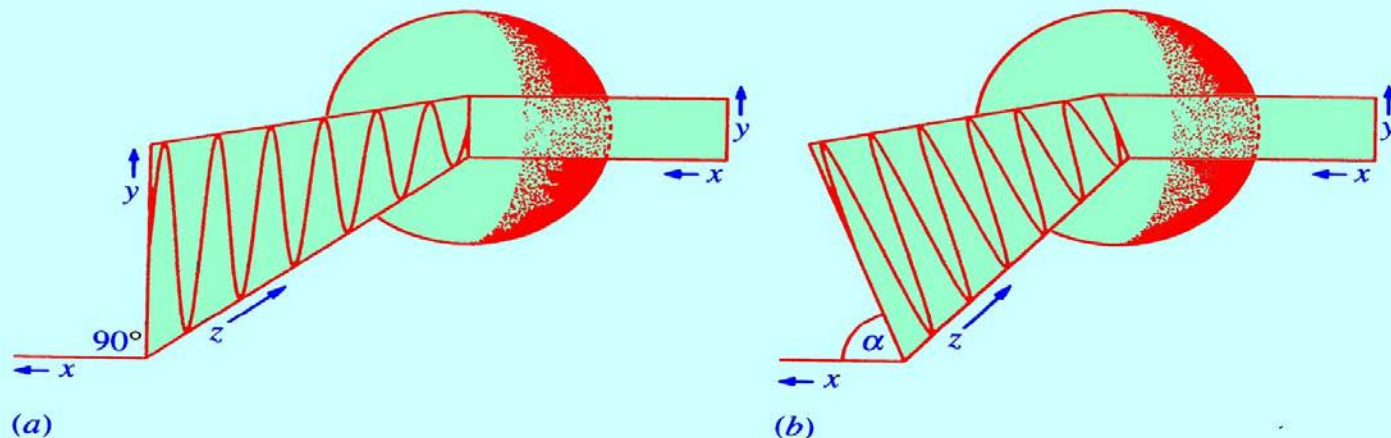
Depolarizacioni odnos, ρ

$$\rho = \frac{I_{\text{normalno}}}{I_{\text{paralelno}}} = \frac{I_{\text{depolarizovana}}}{I_{\text{polarizovana}}} = \frac{\text{anizotropno rasipanje}}{\text{izotropno rasipanje}}$$

$I_{\perp}$ - intenzitet ramanskog zračenja meren u pravcu koji je normalan na ravan polarizacije upadnog zračenja

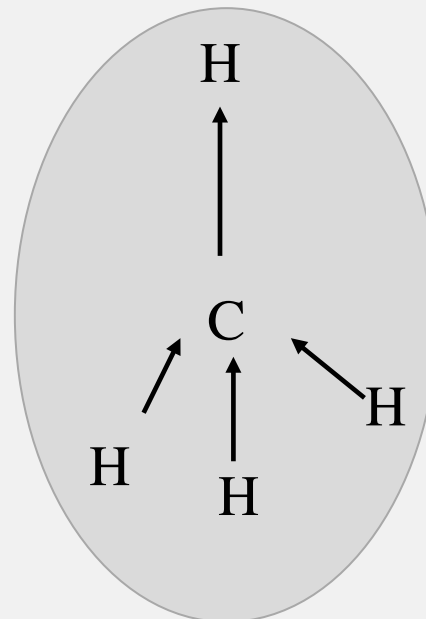
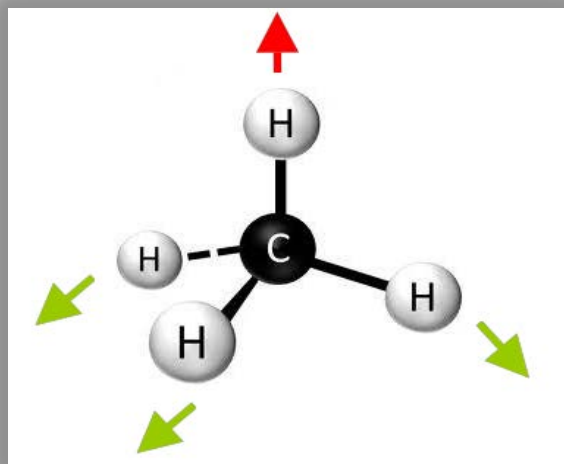
$I_{\parallel}$ - intenzitet ramanskog zračenja meren u pravcu koji je paralelan na ravan polarizacije upadnog zračenja

- **anizotropno rasipanje se meri kada je analizator normalan na ravan upadne svetlosti, α_{normalno}**
- **izotropno rasipanje se meri kada je analizator paralelan ravni upadne svetlosti, $\alpha_{\text{paralelno}}$**
- **$\rho = 0 - 0,75$ (0-3/4) – simetrične vibracije**
- **$\rho \rightarrow 3/4$ - molekuli niže simetrije (visoko anizotropni)**
- **$\rho = 0,75$ (3/4) - nesimetrične vibracije (trake su depolarizovane)**



**Elipsoid
polarizabilnosti
potpuno simetrične
vibracije molekula
sferne simetrije**

**simetrična
vibracije sferno
simetričnog
molekula -
rasejano zračenje
je polarizovano**

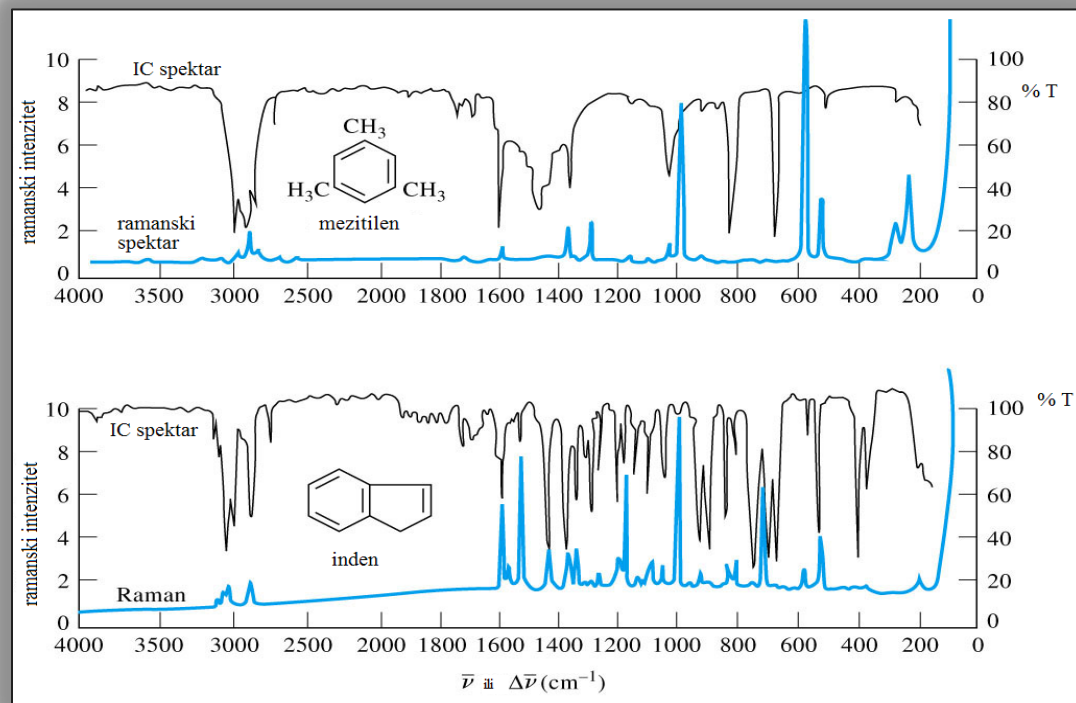


**asimetrična
vibracija sferno
simetričnog
molekula -
rasejano zračenje
je depolarizovano**

Poređenje ramanskih i IC spektara

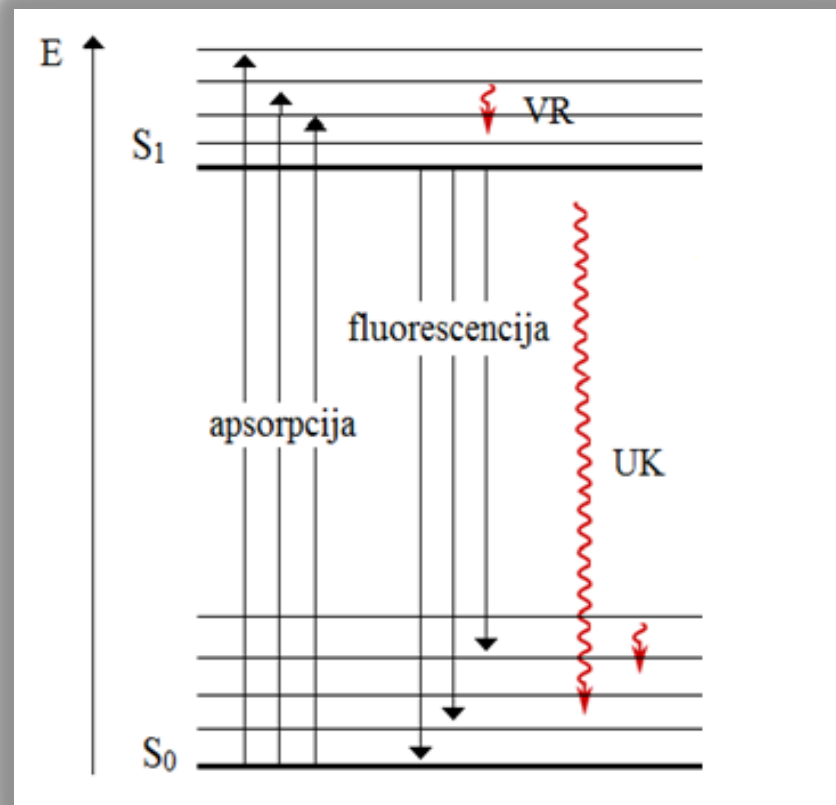
- obe tehnike daju istu vrstu informacija o molekulima, ramanska daje mogućnost detekcije vibracionih i rotacionih spektara u VID oblasti EMSZ
- mogućnost javljanje vibracionih spektara homonuklearnih molekula koji nemaju vibracione, IC apsorpcione, spektre
- jednostavnija tehnika rada u odnosu na IC
- manje komplikovani od IC spektara
- **mogućnost ispitivanja vodenih rastvora (biološki sistemi)**

- mogućnost primene u kvalitativne i kvantitativne svrhe (obe metode)
- informacije o simetriji molekula (pravilo isključenja)
- ispitivanja uzoraka velikih koncentracija
- mogućnost ispitivanja reakcija na visokim temperaturama i pritiscima



Neki od nedostataka metode

- mogućnost javljanja fluorescencije uzorka
- mala osetljivost
- nemogućnost ispitivanja obojenih rastvora u VID oblasti
- znatno skuplja oprema

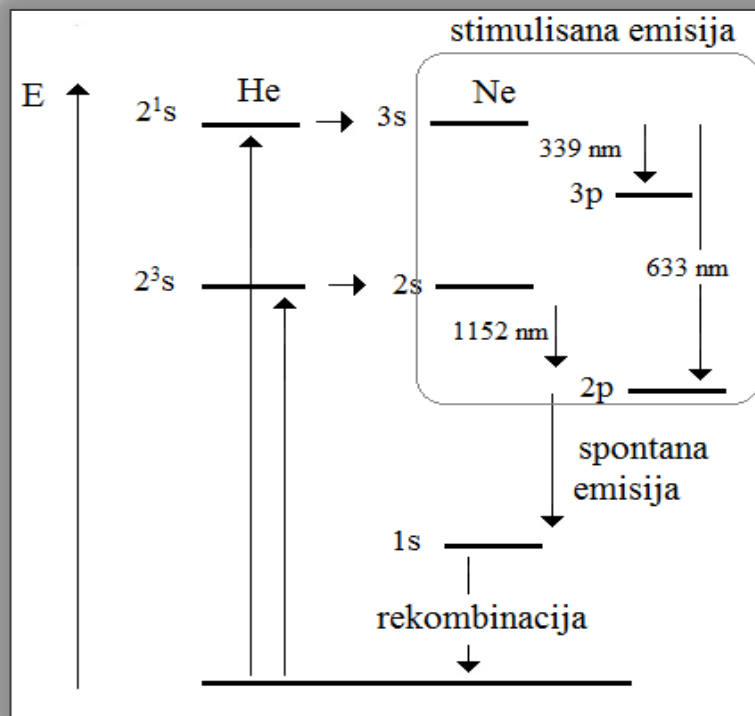


Tehnika rada

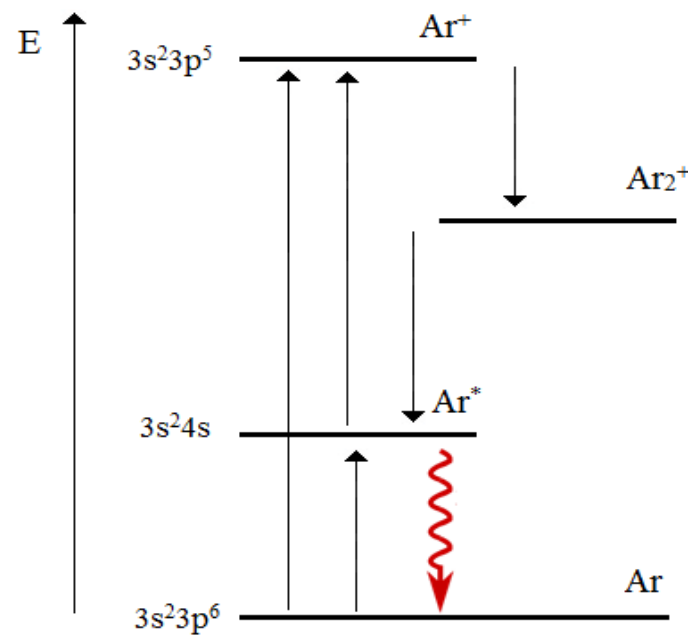
- rasejano zračenje se ispituje pod uglom od 90^0 u odnosu na pravac upadnog zračenja da bi se izbeglo oštećenje uzorka i detektora
- mogućnost ispitivanja sva tri agregatna stanja (optički materijali: staklo, kvarc, KBr pastille za čvrste supstance)
- mogućnost ispitivanja malih zapremina ($1 - 10^{-3}$ ml)
- monohromatori su uglavnom dve rešetke sa 1200 i 1800 razreza/mm
- detektori su fotomultiplikatori (kao i za standardno ULj –VID zračenje)

- za pobuđivanje ramanskih spektara koriste se laseri (obično kontinualni laseri velikog intenziteta upadnog snopa, intenzitet rasutog zračenja između ostalog zavisi i od intenziteta upadnog zračenja)

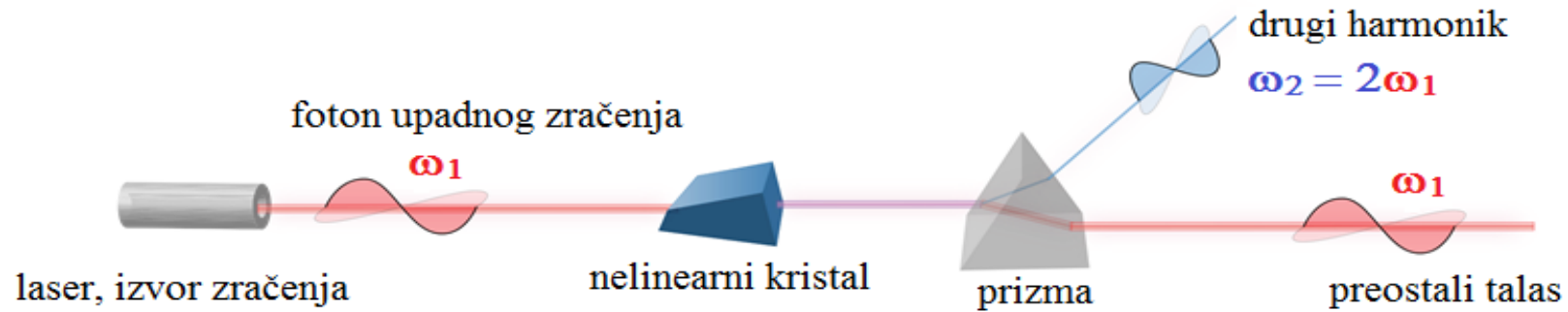
Gasni laseri



He-Ne

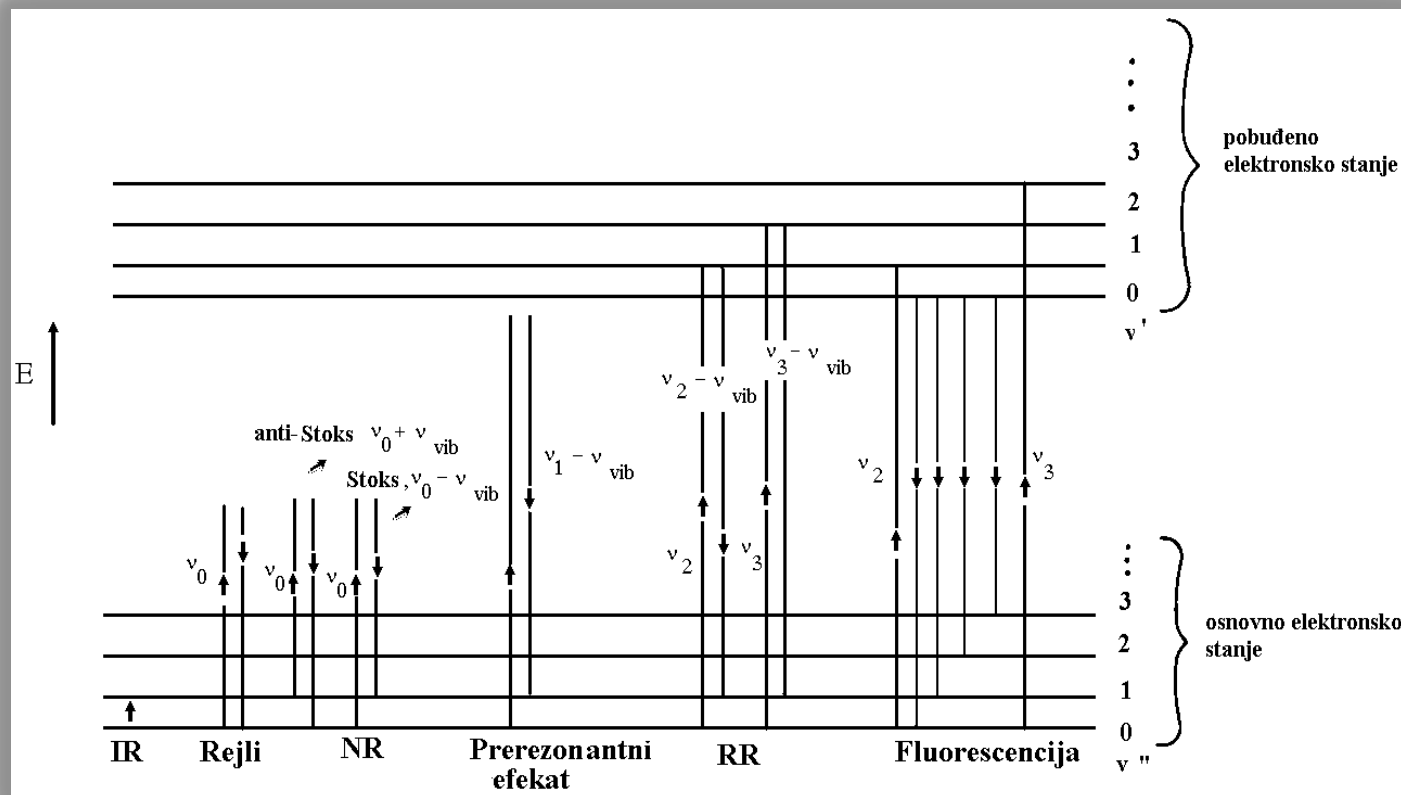


Ar jonski laser



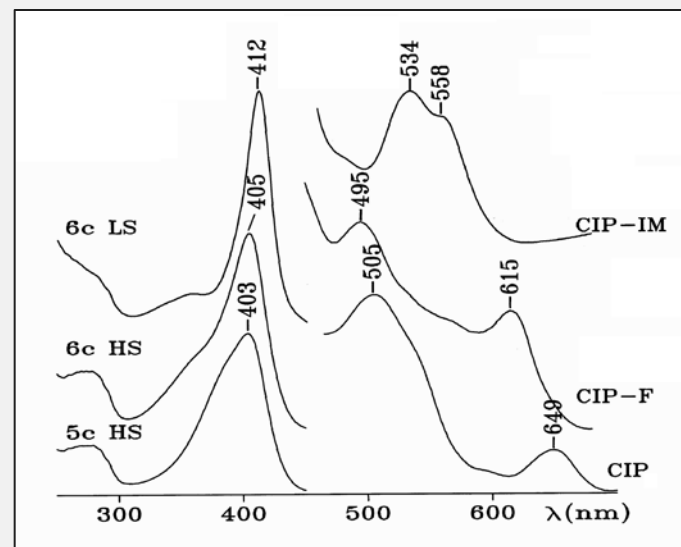
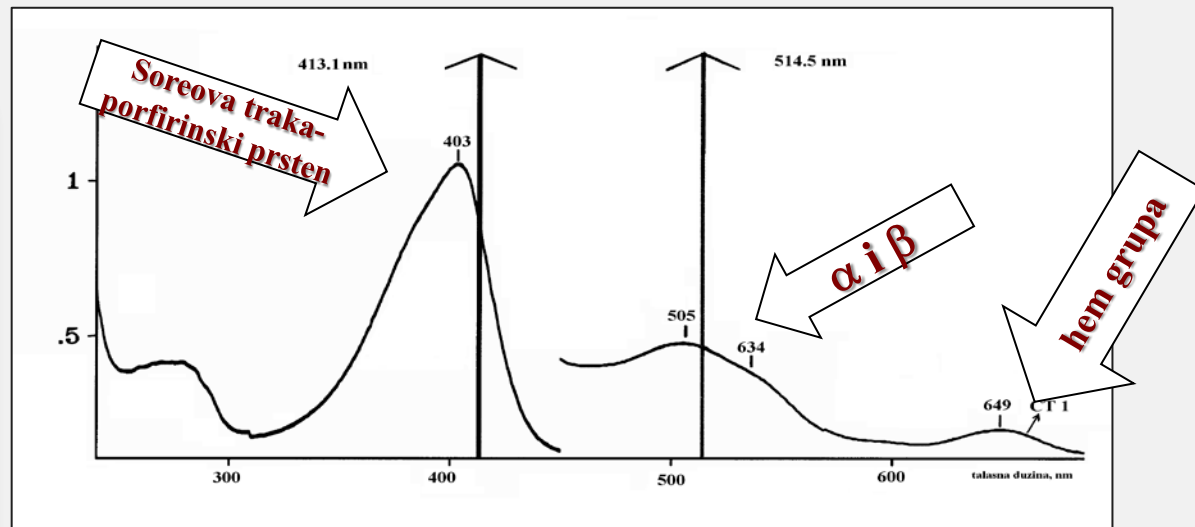
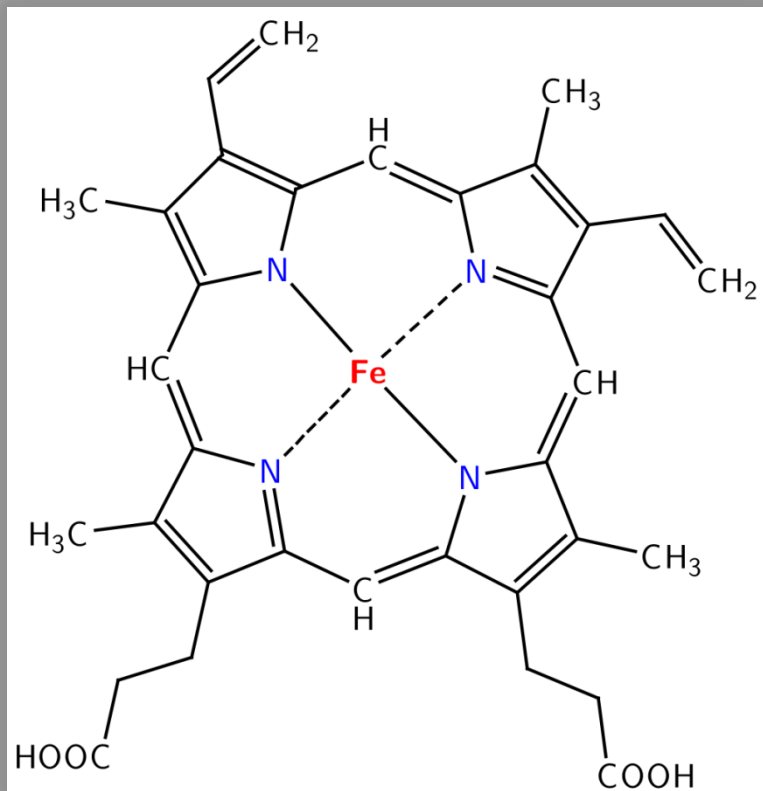
Shematski prikaz generisanja drugog harmonika

Rezonantna ramanska spektroskopija

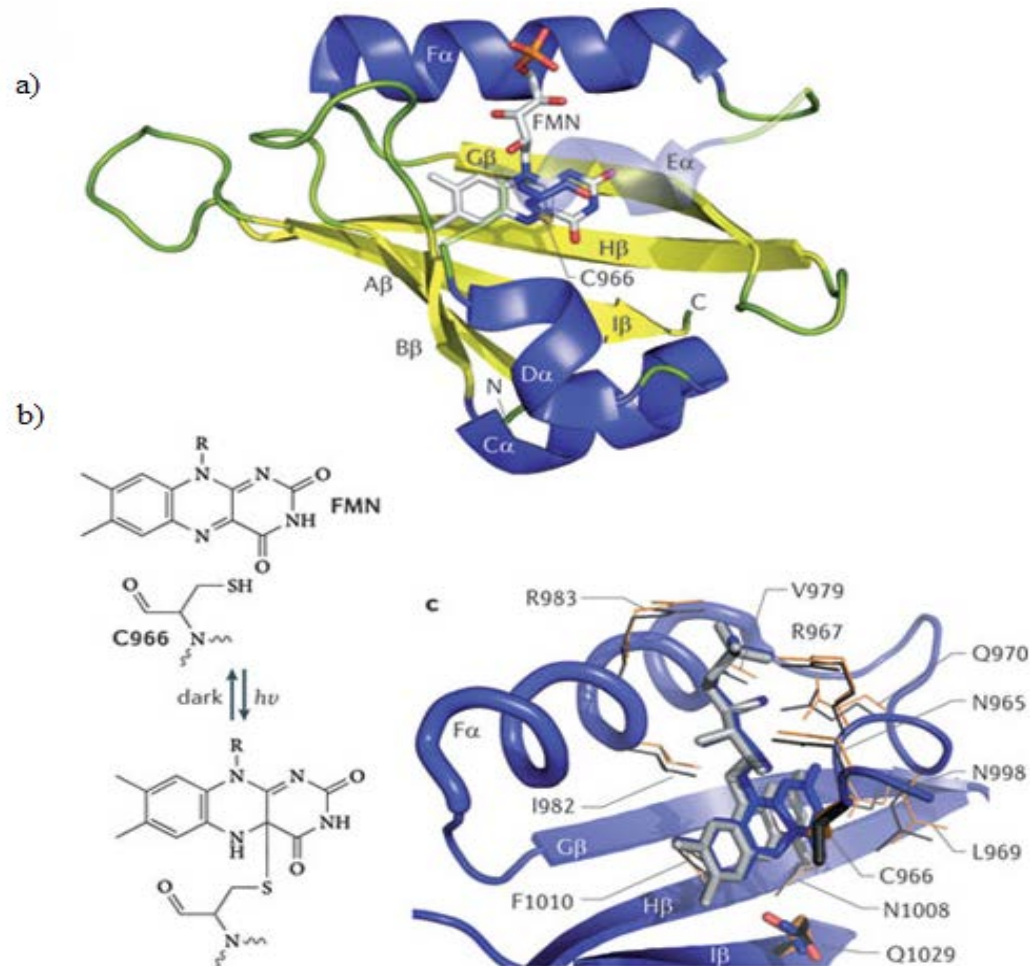
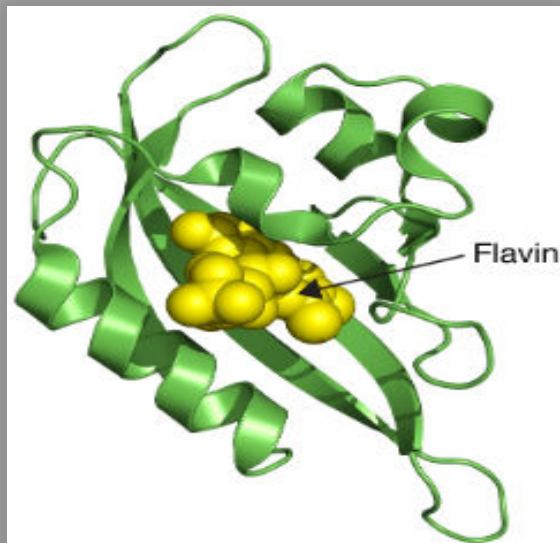


- **RR spektri nastaju ukoliko energija upadnog zračenja odgovara energiji elektronskog pobuđivanja molekula**

- pojačanje intenziteta nekih traka je posledica fenomena rezonancije i sprezanja elektronske i vibracione energije
- stepen pojačanja intenziteta zavisi od energije upadnog zračenja i dostiže maksimum kada je E upadnog zračenja približno jednaka E maksimuma apsorpcione trake
- ovaj aspekt Ramanske spektroskopije postaje od izuzetne važnosti u analizi velikih bioloških molekula sa različitim hromoforama koje su deo takvih struktura („pojedinačna analiza hromofora“)



Flavin hromofora i njeno vezivanje u strukturi proteina

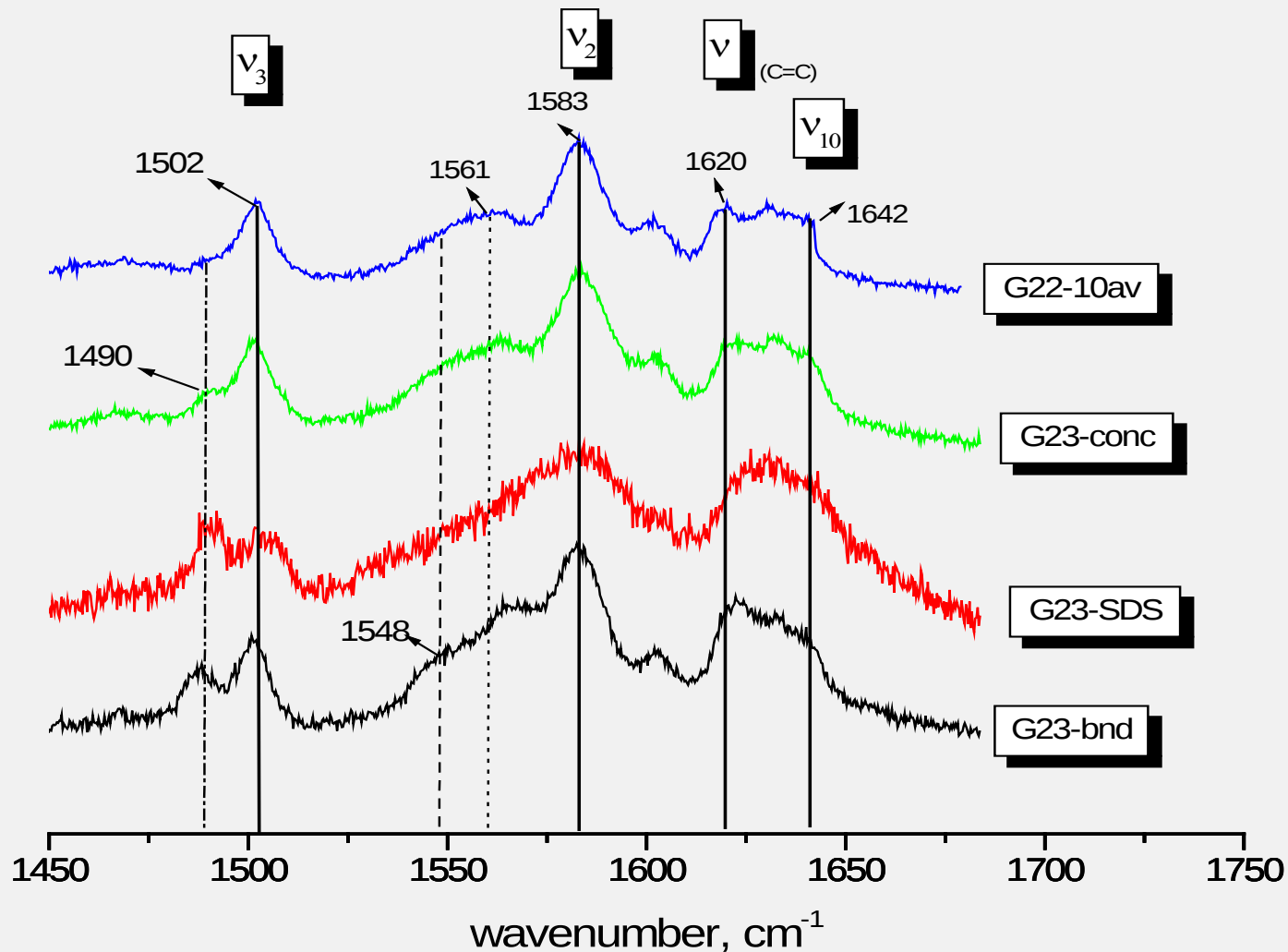


- selektivno pojačanje intenziteta rasejanog zračenja koje ide i do 10^6 puta omogućava analizu uzoraka koncentracija i do 10^{-8} M (za razliku od normalnog Ramanskog efekta koji zahteva koncentracije od 10^{-2} M)
- glavni nedostatak metode je mogućnost javljanja fluorescencije uzorka kao i eventualno oštećenje uzorka usled jačine upadnog zračenja (RR prelazi su znatno brži od fluorescencije)
- može se analizirati veoma mali broj vibracija u veoma složenim molekulima

Prednosti RR spektroskopije u odnosu na normalnu ramansku spektroskopiju

- trake su znatno intenzivnije
- jednostavniji spektri
- granica detekcije se pomera ($10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$)
- mogu se selektivno pobuđivati apsorpcije pojedinih hromofora ako se znaju njihove λ_{max}

**RR spektar hem
proteina P 450, praćenje
uticaja koncentracije
SDS-a na trake koje
potiču od
vibracija hem jezgra**



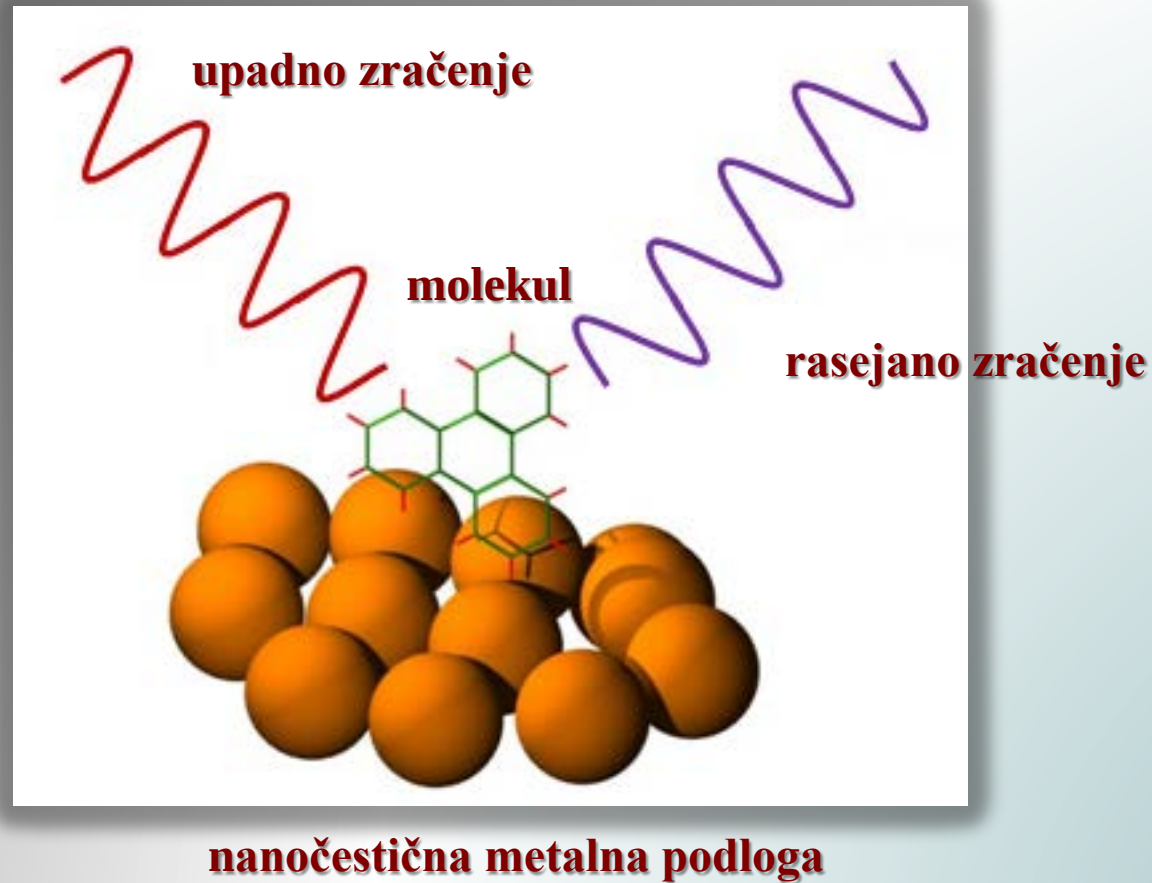
Površinski pojačana ramanska spektroskopija **(SERS - Surface Enhanced Raman Spectroscopy)**

- **ime ukazuje na to da se ovom metodom dobijaju iste informacije kao i primenom ramanske spektroskopije ali uz znatno pojačanje intenziteta signala**
- **efekat je slučajno otkriven 1974. od strane Flaishman-a, Hendra i Macquillan-a sa Univerziteta Southampton, Velika Britanija, kada su pokušali da dobiju ramanski spektar piridina na srebrenoj eletrodi grube (i velike) površine**
- **pojačanjem efikasnosti ramanskog rasejanja koje ide i do 10^5 - 10^6 puta u odnosu na signal u NR spektrima**

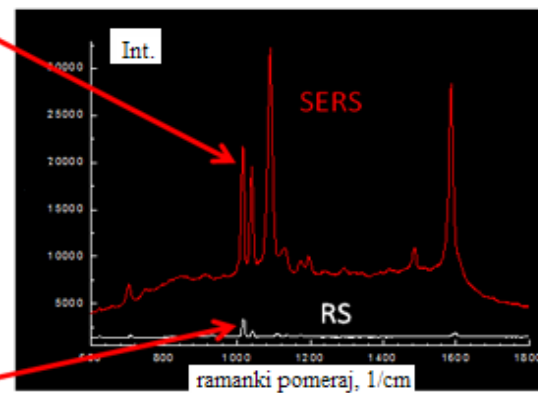
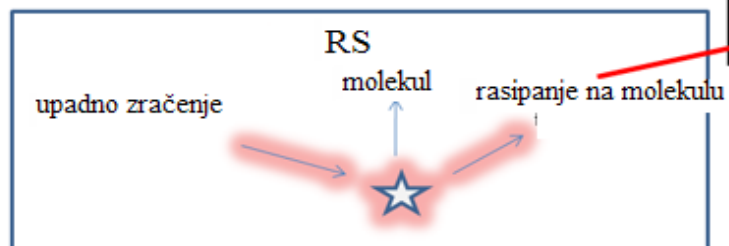
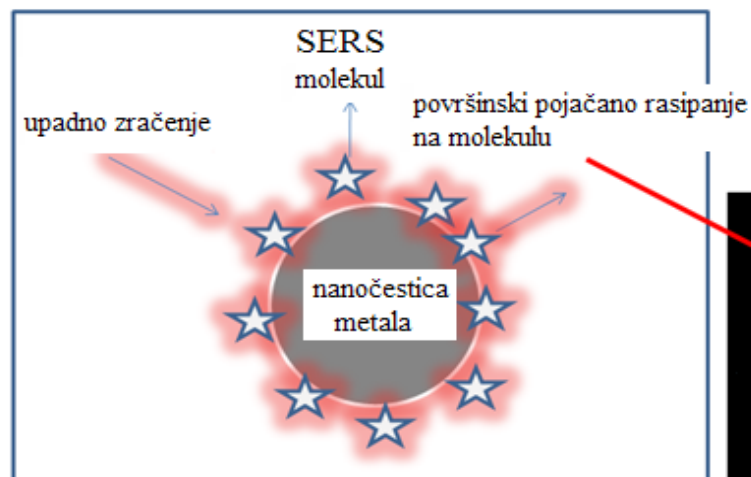
Glavne karakteristike SERS-a

- izuzetno osetljiva, nedestruktivna, *in situ* vibraciona tehnika
- SERS efekat se javlja kada se molekul nanese na površinu SERS aktivnog supstrata različitih morfologija
- SERS aktivnost zavisi od vrste i morfologije supstrata
- najčešće se kao supstrati koriste metalni koloidi Au, Ag i Cu koji se dobijaju redukcijom
- ekscitacioni profil, $I_{\text{rasejanja}}/v_0$, odstupa od četvrtog stepena kao što je slučaj kod NR efekta

Shematski prikaz SERS-a



Uporedni prikaz SERS i NR spektra



Prednosti SERS tehnike

- **izuzetno velika osetljivost da omogućava tzv. „single molecule” detekciju**
- **posebna prednost SERS metode je u biofizičkim ispitivanjima koja se obično izvode u kombinaciji sa RR spektroskopijom (SERRS)***

** SERRS efekat se javlja ukoliko je upadna talasna dužina lasera u rezonanciji sa površinskim plazmonom i odedenim elektronskim prelazom molekula čiji se vibracioni spektar selektivno pobuđuje. U tom slučaju dolazi do dvostruke rezonancije i pojačanja intenziteta koje ide i do 10^{10} u odnosu na NR efekat*

Primena tehnika ramanske spektroskopije u kvalitativnoj analizi

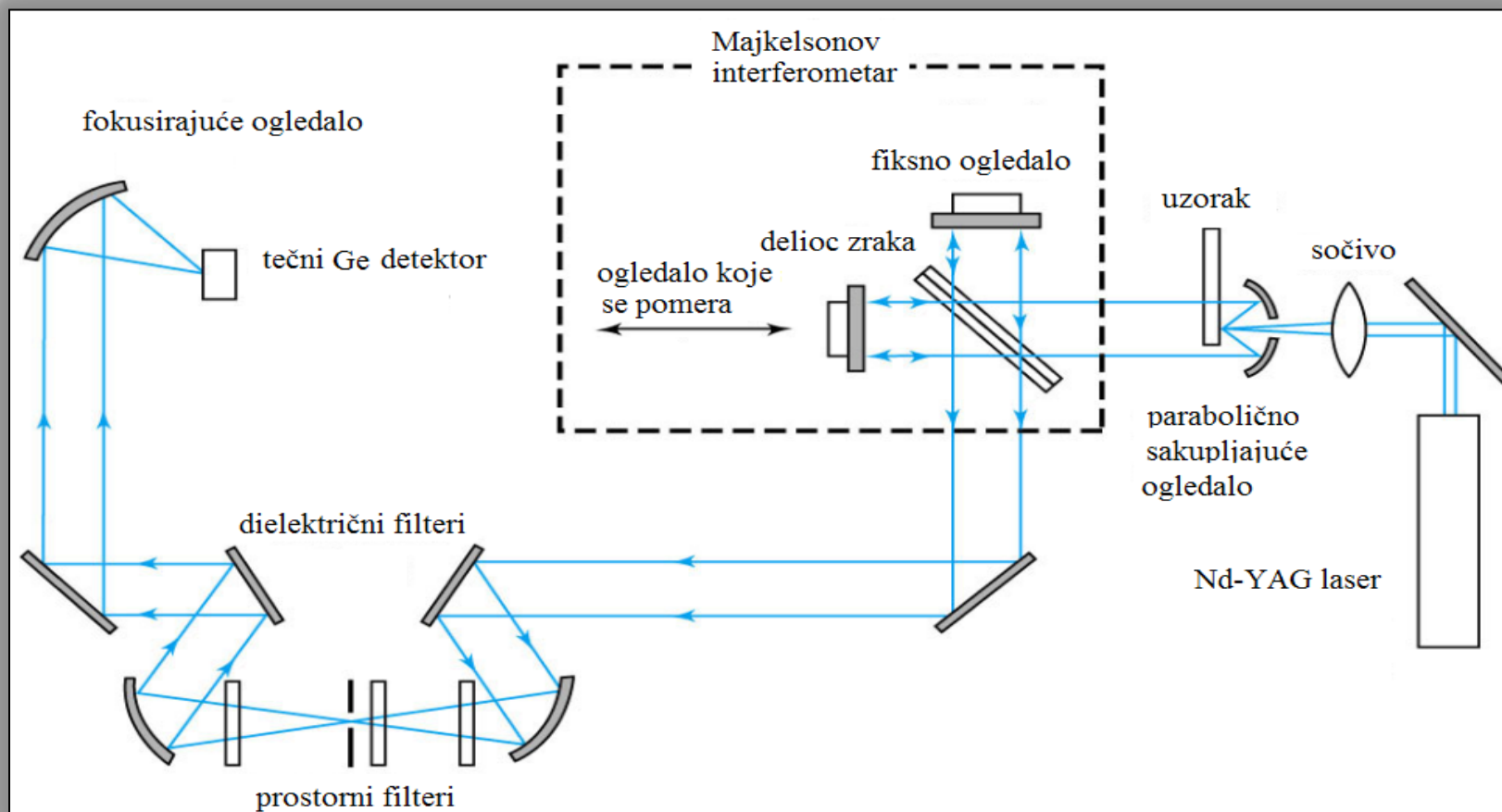
Šta podrazumeva početak merenja

- izbor instrumenta
- kalibraciju instrumenta
- izbor načina pobuđivanja uzorka
- poznavanje i pripremu uzorka

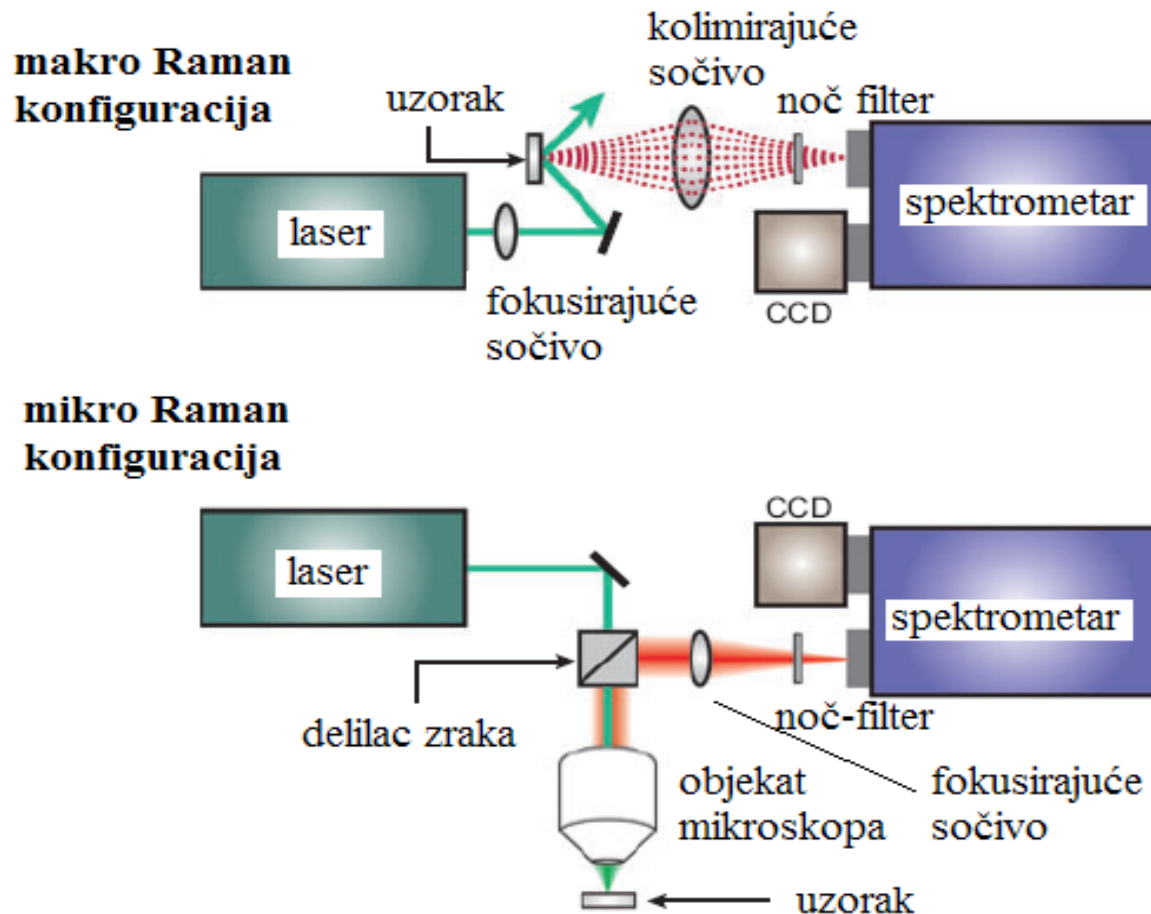
Izbor instrumenata

- **disperzioni ili FT spektrofotometri**
- **kod instrumenata sa mikroskopom postoji mogućnost oštećenja uzorka jer je intenzitet svetlosti na fokalnoj tački jako velik**
- **$I = kP\alpha^2v^4$**
- **korišćenjem lasera koji emituju u ULj oblasti:**
 - **izbegava se mogućnost javljanja fluorescencije**
 - **povećava se rizik od oštećenja uzorka uz prisutan i rizik od rada sa ULj laserima**

Optička shema ramanskog spektrometra sa Furijeovom transformacijom



Shematski prikaz makro- i mikro- konfiguracije elemenata u ramanskim eksperimentima



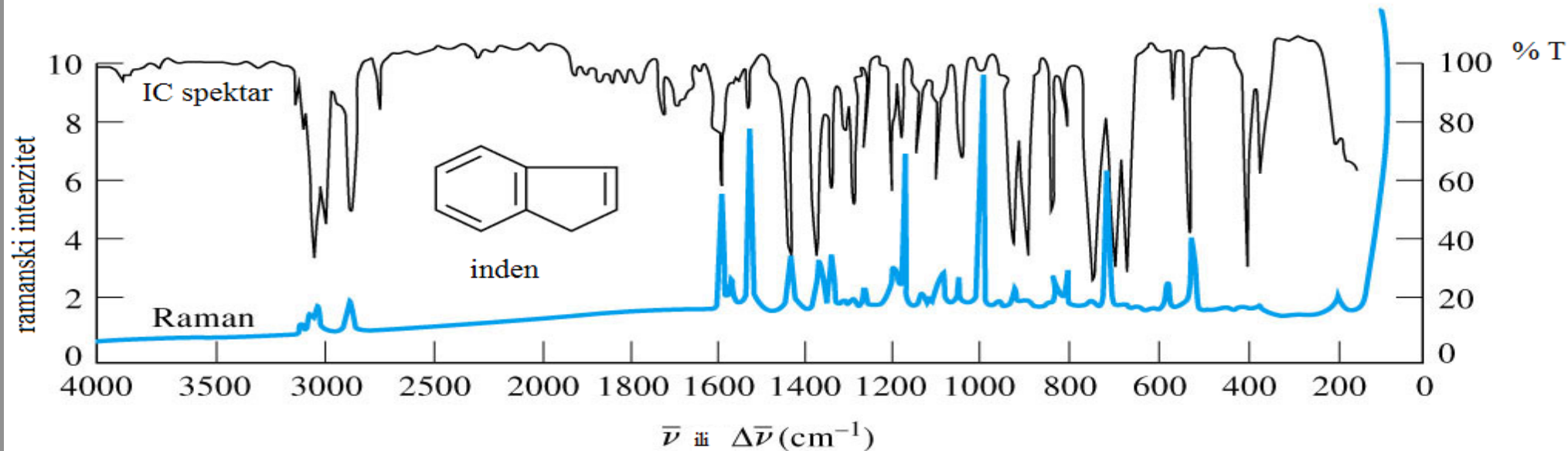
Kalibracija

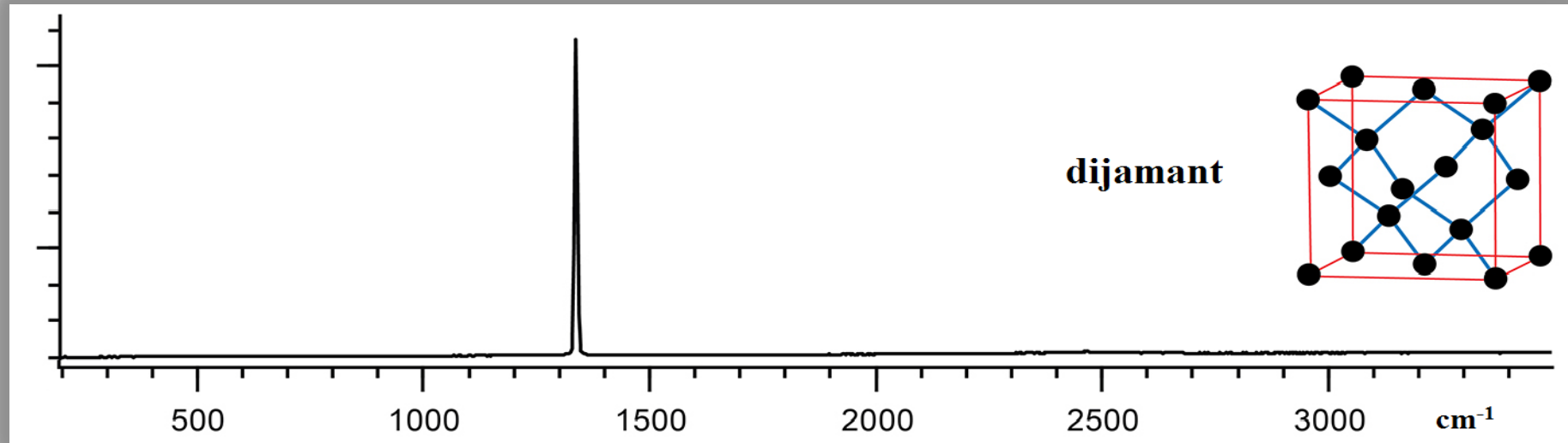
➤ **provera prvenstveno x-ose instrumenta**

➤ **standardi u disperzionim instrumentima:**

- **barijum sulfat (988 cm^{-1})**
- **dijamant (1332 cm^{-1})**
- **silicijum (520 cm^{-1})**
- **inden**
- **cikloheksan**
- **sumpor**

IC i ramanski spektar indena



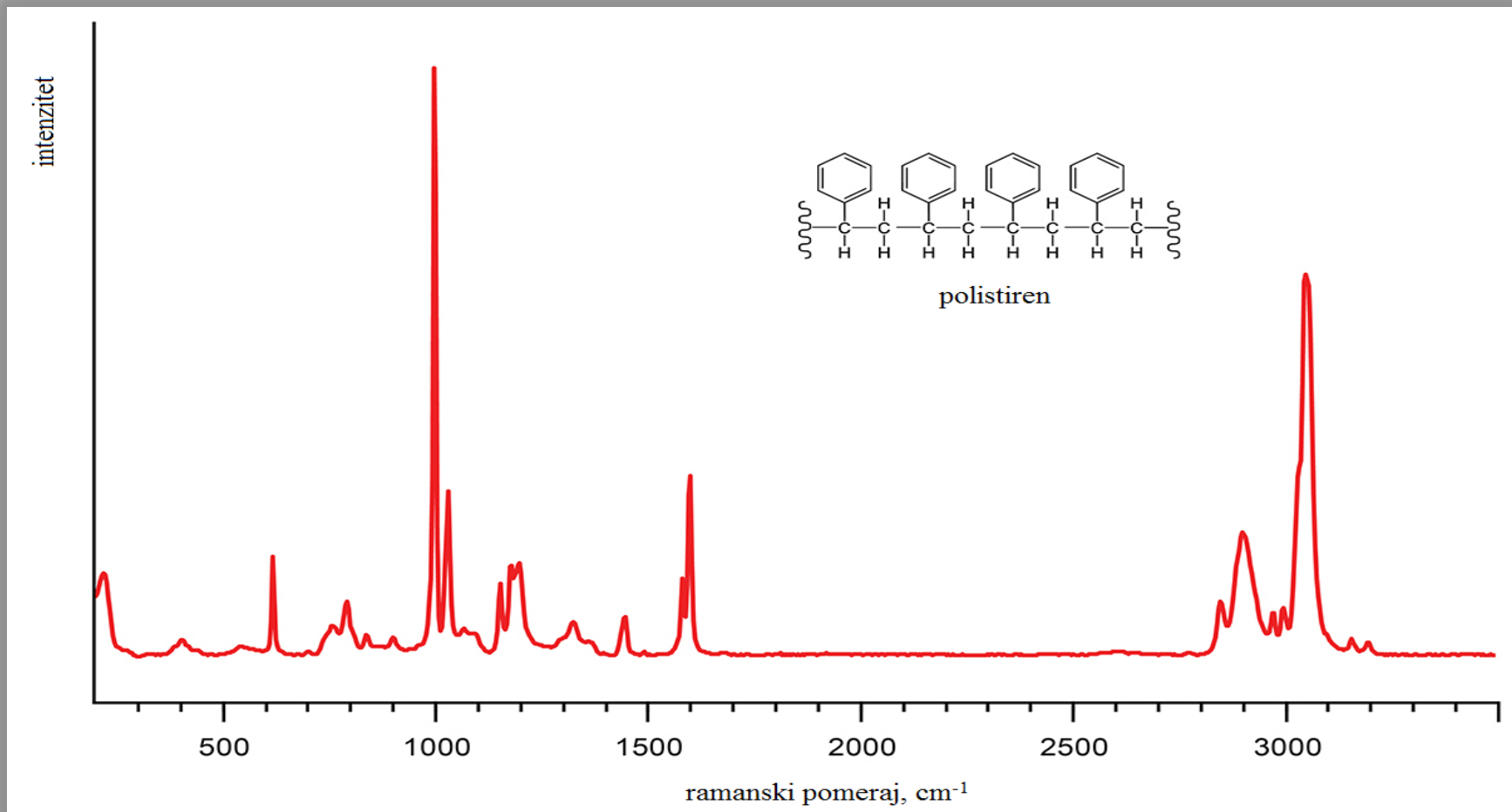


U kalibraciji FT/NIR instrumenata koriste se:

- **Si ($520,7 \pm 0,5 \text{ cm}^{-1}$)**
- **vazduh (O_2 , ($1555 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$); N_2 , ($2332 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$))**
- **org. supstance (cikloheksan, polistiren)**

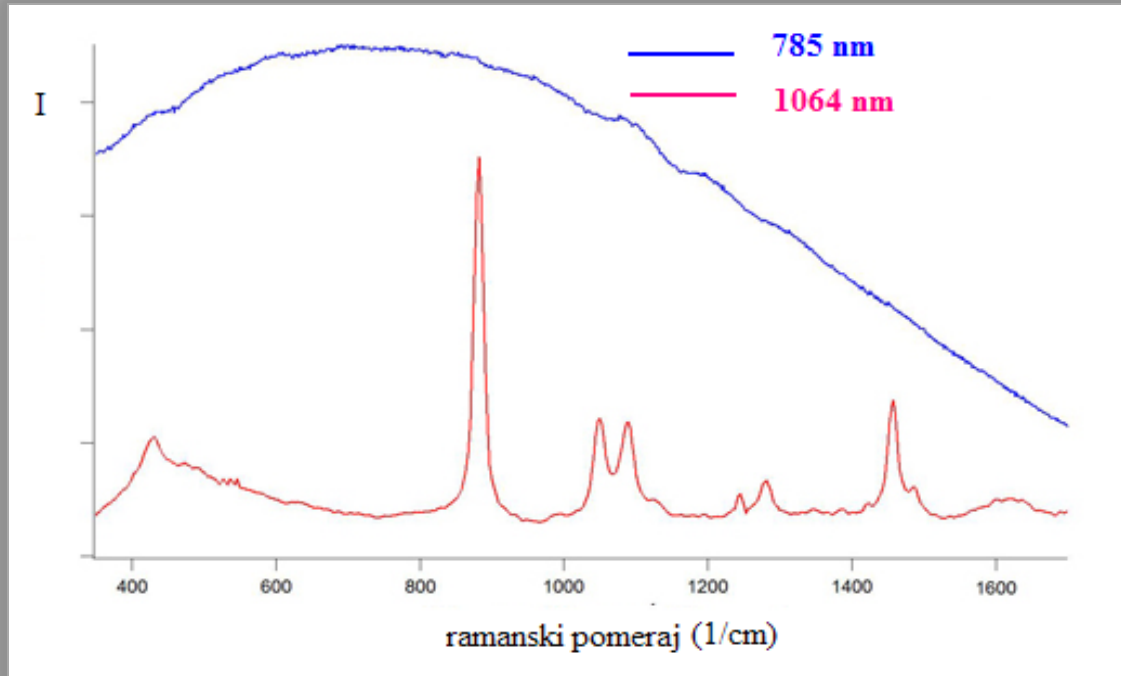
- **Ne, Ar, Hg lampe**
- **gasni laseri (He-Ne, Ar,...)**

Ramanski spektar polistirena



Pobuđivanje uzorka

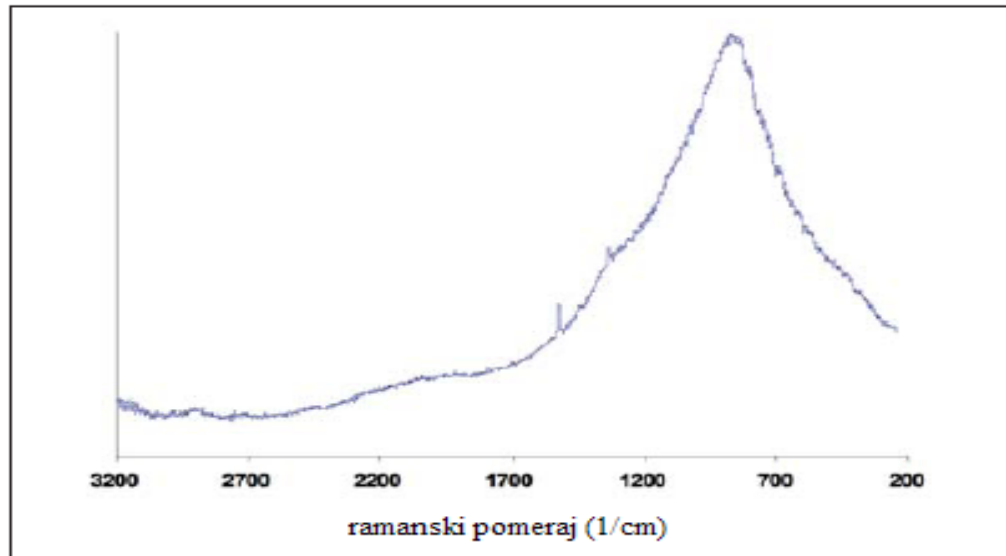
- pobuđivanje u VID oblasti
- pobuđivanje u NIR oblasti



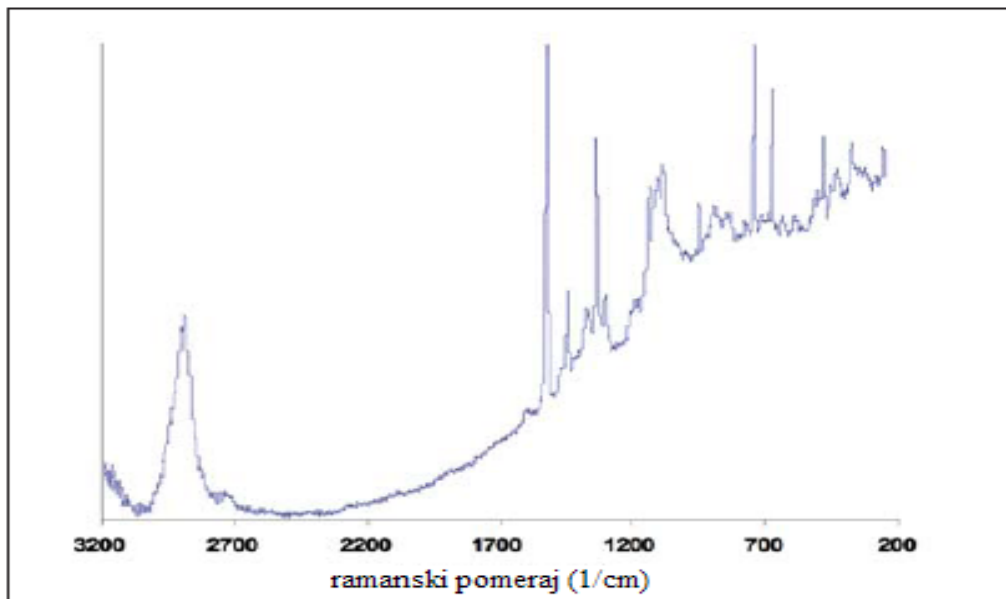
**SERS spektar uzorka
crnog vina**

Priprema uzoraka

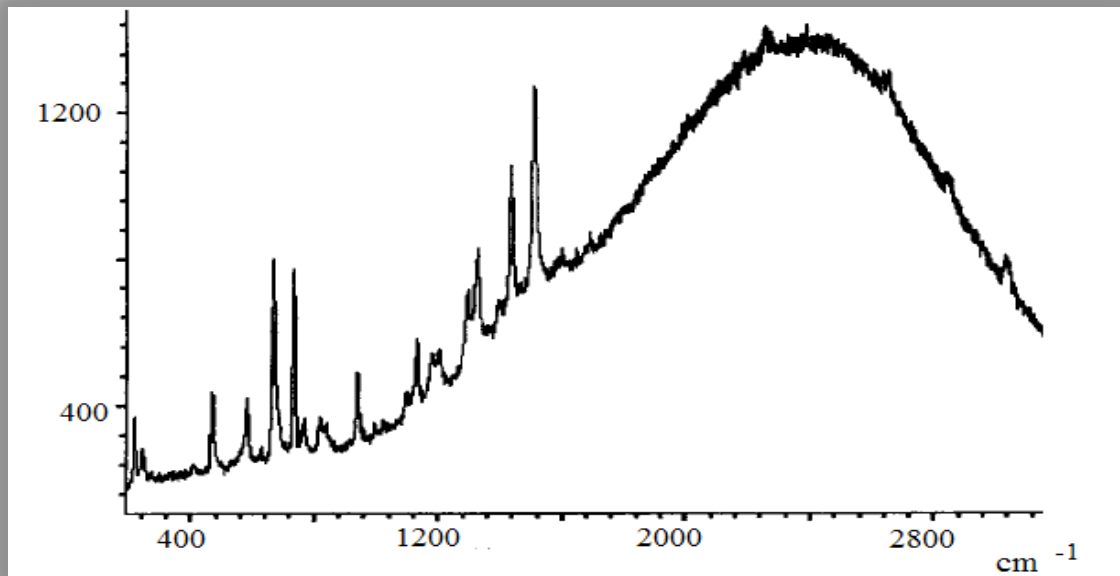
- **ramanske spektre mogu imati: organski i neorganski uzorci, čvrsti uzorci, tečnosti, polimeri i pare**
- **najveći problemi se javljaju: usled fluorescencije, nečistoća ili oštećenja uzorka**
- **pojava fluorescencije (eliminacija radom u „photobleaching“ modu)**
- **mora se voditi računa o apsorpciji obojenih uzoraka**
- **KBr ili KCl pastile**



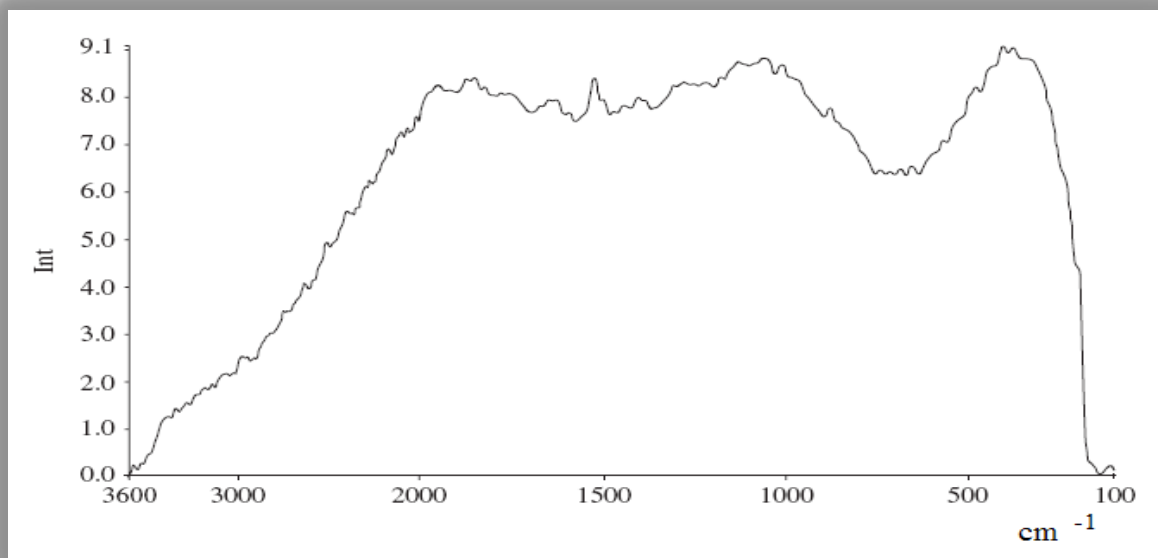
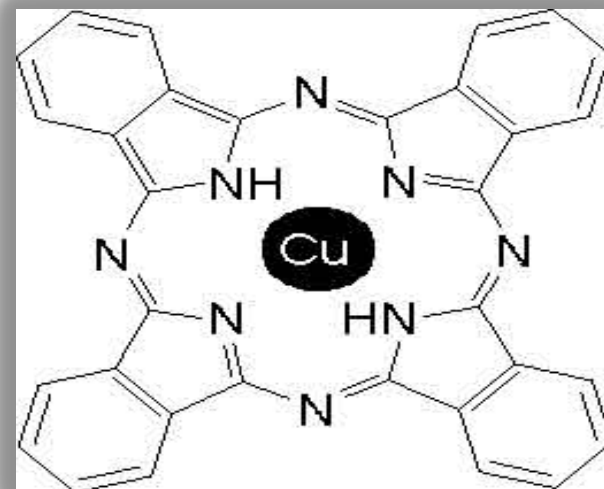
**ramanski spektar uzorka
mastila sa intenzivnom fluorescencijom**



**ramanski spektar istog uzorka
mastila snimljen posle
primene *photobleaching* moda**



RS Cu-ftalocijanina
 ($\lambda_{\text{ex}} = 632 \text{ nm}$)



RS Cu-ftalocijanina
 ($\lambda_{\text{ex}} = 1064 \text{ nm}$, vidljiva je
 intenzivna fluorescencija)

Ono što treba znati o uzorku

- **kako je proizveden, ima li sporednih reakcija**
- **da li su u uzorku prisutni rastvarači**
- **koja je čistoća uzorka, da li sadrži N, S ili halogene**
- **ako je uzorak čvrst, da li je suv ili u obliku paste**
- **da li je ispran ili rekristalizovan rastvaračem**
- **ako je tečan, da li je isparljiv, alkalan, neutralan ili kiseo**
- **da li može da polimerizuje, da li može da se javi orijentacija molekula uzorka, kakav je uticaj temperature**