

Spectroscopie Raman

Travaux pratiques en biophotonique

Protocole à l'intention des étudiants au baccalauréat et aux études graduées

Prof. Daniel Côté, Daniel.Cote@crulrg.ulaval.ca
Prof. Simon Rainville, Simon.Rainville@phy.ulaval.ca

Table des matières

Préambule	2
Objectifs	3
Montage.....	3
Utilisation du logiciel WinSpec.....	5
Manipulations.....	11
Exploration du montage (30 mins)	11
Caractérisation de la CCD (1h30)	11
Caractérisation du bruit de lecture	11
Caractérisation du bruit thermique	11
Caractérisation du bruit de photon	11
Étalonnage de la caméra sur l'axe des longueurs d'onde	12
Caractérisation des échantillons (2h-4h)	13
Alignement du spectromètre par fluorescence.....	13
Prise de spectres Raman : solutions organiques.....	13
Prise de spectres Raman : huiles saturées et insaturées.....	14
Prise de spectres Raman : solutions inconnues	14
Annexe 1 : Structure chimique des substances	16
Annexe 2 : Spectre du mercure et mercure ionisé	17
Annexe 3 : Fréquences de vibration Raman	18
Annexe 4 : Détermination du degré d'insaturation des gras.....	20

Préambule

Lorsque la lumière se propage dans un milieu, elle est diffusée et ré-émise principalement à la même longueur d'onde (diffusion élastique de Rayleigh) mais aussi à d'autres longueurs d'ondes (diffusion inélastique Raman). Dans le cas de l'effet Raman les photons composant cette lumière peuvent induire une vibration dans les molécules et ainsi perdre de l'énergie: la lumière est donc ré-émise à une longueur d'onde supérieure (i.e., de plus faible énergie), ce qui est appelé émission de *Stokes*. Au contraire, les photons peuvent aussi gagner de l'énergie en acquérant l'énergie de la vibration et être ré-émis à une longueur d'onde inférieure (i.e. de plus grande énergie), phénomène appelé émission *anti-Stokes*. La spectroscopie Raman est l'étude de la ré-émission de la lumière à des longueurs d'ondes différentes de la lumière incidente, où la

différence de fréquence correspond aux fréquences propres des vibrations des molécules. En laboratoire, il s'agit d'utiliser une excitation intense et un spectromètre pour obtenir l'intensité de la lumière en fonction de la différence de fréquence (un spectre Raman). En identifiant les vibrations et leurs intensités relatives, il est possible de déduire les concentrations relatives des différents liens chimiques des molécules. Nous pouvons ainsi reconnaître la composition biochimique des échantillons.

Cette technique est très puissante et est aujourd'hui utilisée pour diagnostiquer des maladies (comme le cancer) ou pour faire l'imagerie des tissus (en utilisant les vibrations comme modes de contraste), en plus d'avoir de nombreuses applications en chimie analytique.

Dans ce laboratoire, vous vous familiariserez avec la technique et vous identifierez des composants organiques et des solutions inconnues. Vous terminerez en déduisant le pourcentage de gras saturés dans différentes huiles.

Pour plus de théorie sur l'effet Raman, utilisez le document en annexe.

Dans le texte:

-  représente une mesure ou une action que vous devez faire au laboratoire et consigner dans votre cahier
-  représente une analyse à faire au laboratoire ou plus tard et à consigner dans votre cahier

Objectifs

1. Comprendre l'origine de l'effet Raman
2. Comprendre et appliquer la conversion fréquence, nombre d'onde, longueur d'onde
3. Comprendre et expliquer les décisions de conception optique du montage de spectroscopie Raman
4. Comprendre les limites de l'équipement utilisé, en particulier la détection à l'aide d'une caméra CCD et les différents types de bruits présents.
5. Faire correctement l'acquisition de spectres Raman
6. Analyser des spectres Raman et identifier les composantes simples
7. Analyser des spectres Raman pour extraire de l'information biochimique sur les composantes
8. Faire des prédictions expérimentales et extraire des quantités physiques des mesures expérimentales: nombre de photons diffusés, nombre de photons mesurés

Montage

Le montage consiste en un laser, des miroirs pour diriger la lumière vers l'échantillon, un porte-échantillon, deux lentilles de collection mises en configuration 4f (voir note plus

bas), et le spectromètre. La dernière lentille sert à faire l'image sur la fente d'entrée du faisceau qui se propage dans l'échantillon. À l'intérieur du spectromètre, qui consiste fonctionnellement en deux blocs distincts, on retrouve un filtre entre deux lentilles pour éliminer la raie laser à 632.8 nm, suivi d'une seconde fente et d'une lentille, un réseau de diffraction et une dernière lentille avant la caméra CCD.

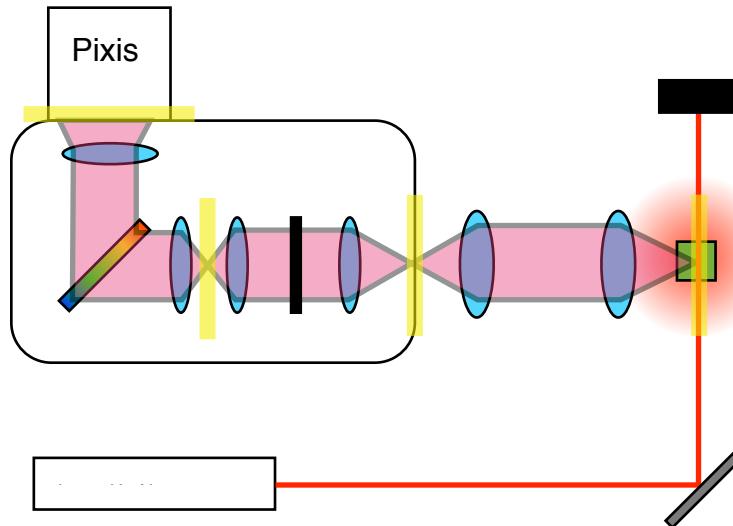


Figure 1 : Montage de l'expérience. Notez les plans en jaune sont des plans conjugués d'imagerie : le premier est l'objet, le suivant l'image.

L'efficacité de la collection de la lumière Raman dépend de plusieurs facteurs. Le spectrographe Holospec f/1.8i est optimisé pour collecter le maximum de lumière tout en permettant d'enlever la lumière intense provenant de la source. Il contient des lentilles, un filtre à interférence et un réseau de diffraction à haute transmission. Le ``f-number'' (souvent indiqué f/# ou simplement N) est un paramètre important qui caractérise une lentille: il s'agit de la distance focale de la lentille en multiple de son diamètre (on peut lire $D = f/N$), ce qui est inversement proportionnel à l'angle solide du cône de collection. Ainsi, le spectromètre Holospec possède une lentille de diamètre 1.8 fois plus petit que sa distance focale et est, par le fait même, très performant.

Il s'agit donc, pour optimiser la collection, de diriger la lumière diffusée dans le cône d'acceptance de l'appareil (décrit plus bas).

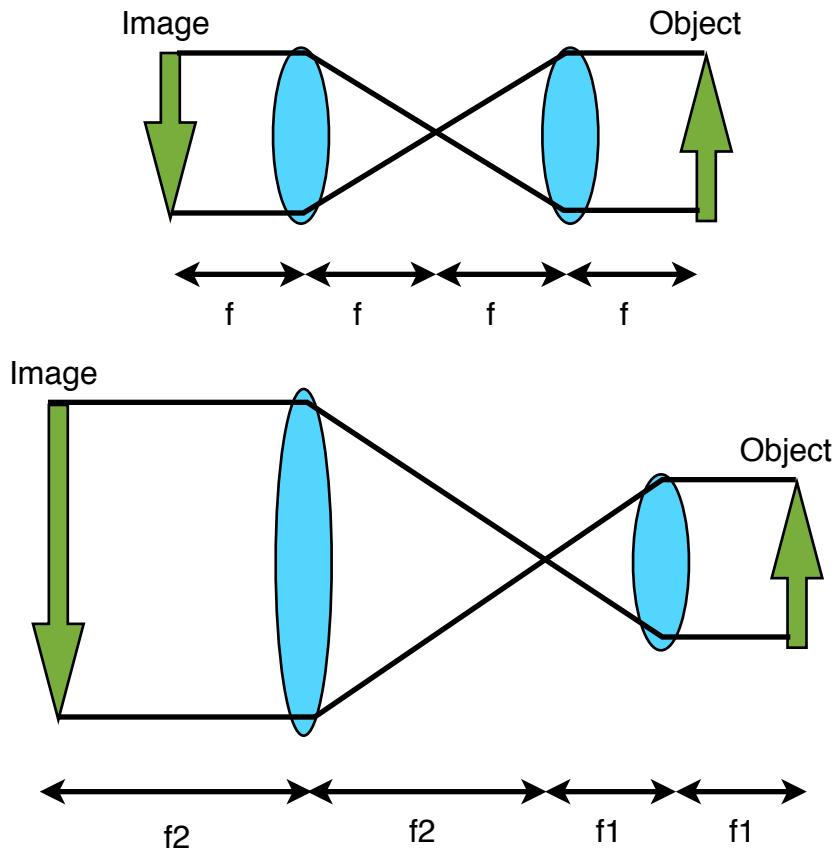


Figure 2 : Dans un arrangement de type 4f, deux lentilles sont séparées par la somme de leurs distances focales. L'objet, placé à une distance focale de la première lentille, sera imité au plan focal de la deuxième lentille avec un facteur de grossissement correspondant à f_2/f_1

Utilisation du logiciel WinSpec

Survol du logiciel et de la caméra CCD

Le logiciel WinSpec contrôle la caméra CCD rattachée au spectromètre Raman. Il s'agit d'une caméra de 100 pixels de haut par 1340 pixels de large, refroidie électroniquement. Le but de la caméra CCD (ou simplement "le CCD") est de mesurer la lumière à chaque pixel sur l'image. Un photon génère un électron de façon probabiliste à chaque fois qu'il frappe un pixel de la CCD. La probabilité d'exciter un électron est le *quantum yield*, et a une valeur typiquement de 95% pour une caméra CCD Pixis. Chaque pixel (ou "puits") ne peut contenir plus qu'un nombre maximal d'électrons correspondant à sa profondeur ("well depth") après laquelle il ne peut plus augmenter (i.e. il est saturé). Sur la Pixis, ce nombre est d'environ 500,000 électrons. La valeur des pixels est donnée en COUNT (0 à 65535 ou 16 bits), c'est-à-dire en un nombre entier proportionnel au nombre de photons incidents. La constante de proportionnalité dépend de la méthode de numérisation.

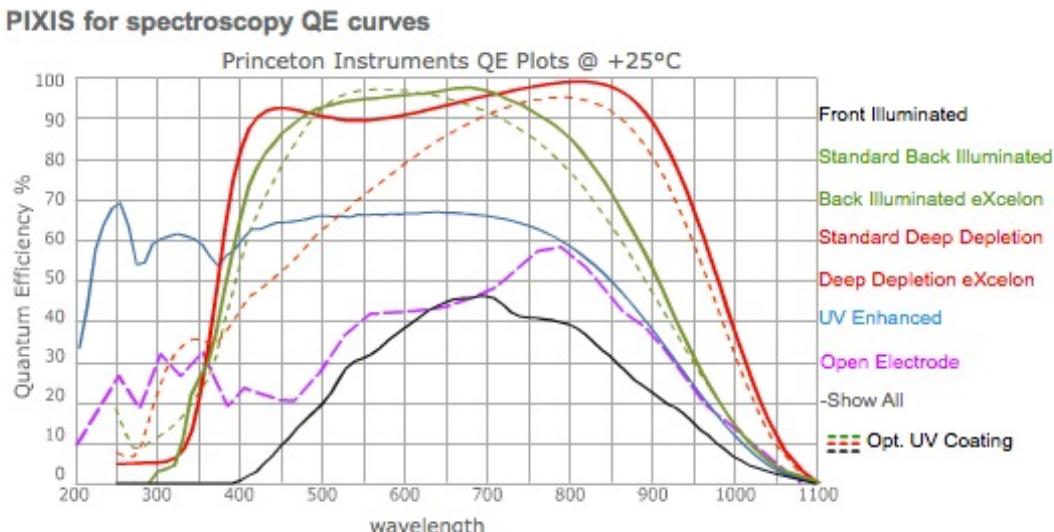


Figure 3: Graphique de l'efficacité quantique des caméras de Princeton Instruments. La montagne utilise la Standard Back Illuminated Pixis 100B.

Bien qu'elle peut produire des images 2D, vous l'utiliserez pour produire des spectres 1D. Ainsi, une image 2D sur la caméra:



Figure 4: Exemple d'image sur la CCD en mode imagerie

donne le spectre 1D suivant après l'utilisation du "binning" vertical, c'est à dire après avoir additionné toutes les valeurs de pixels de chaque colonne:



Figure 5: Exemple de spectre 1D en mode spectroscopie.

Pourquoi utiliser une 100 x 1340 alors qu'une ligne aurait pu donner directement la mesure d'un spectre ? Pour le même nombre de bits, le *binning* permet d'obtenir 100 mesures indépendantes sur la caméra plutôt qu'une seule. Ainsi, on peut intégrer de longues durées sans saturer les pixels, ce qui permet d'augmenter la quantité de lumière accumulée et par le fait même de diminuer le bruit relatif.

Avant de commencer : Corrections, flat field, background, fichier de sortie

Lorsque vous ouvrez le logiciel WinSpec/32, vous obtiendrez la fenêtre suivante:

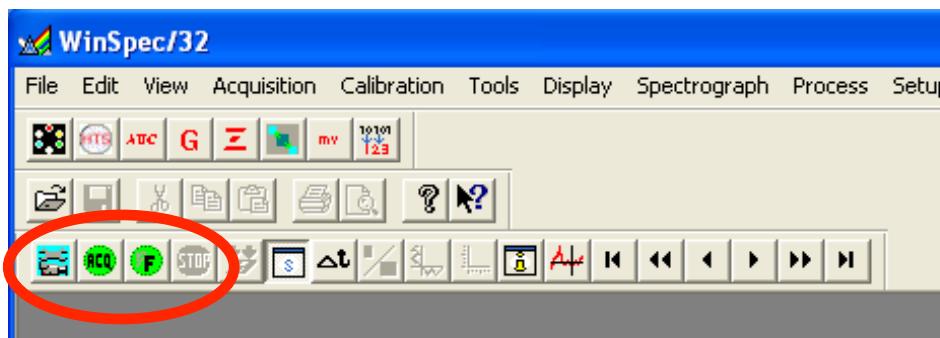


Figure 6: Interface de WinSpec.

Si un message apparaît disant que la caméra n'est pas détectée, veuille quitter le logiciel et allumer la caméra CCD, pour ensuite ouvrir le logiciel à nouveau.

Dans l'interface, notez les quatre plus importantes fonctions: Settings, ACQuisition, Focus et STOP. Pour éviter les problèmes, vérifiez d'abord les Settings suivants:

- 1) Data Correction: Aucune correction "Background" ou "Flatfield"
- 2) Data File: Name: <NOM DU FICHIER MAITRE> et son emplacement, "Enable auto Increment", "Use New Window on each run". À chaque acquisition à partir du bouton ACQ, une nouvelle fenêtre est créée. Les données seront sauvegardées dans le répertoire choisi.
- 3) Processes: ASCII Output file. À la fin de chaque acquisition, un nouveau fichier est créé dans le même répertoire que le fichier principal, avec un nom identique mais se terminant par un indice et l'extension .txt. **Vous devriez les renommer à chaque fois pour leur donner des noms significatifs qui vous permettront de les retrouver lors de l'analyse.**
- 4) Dans le menu Calibration: Setup, enlevez toute calibration.
- 5) Ensuite, Choisissez File:Save pour sauvegarder votre fichier maître dans un dossier que vous noterez.

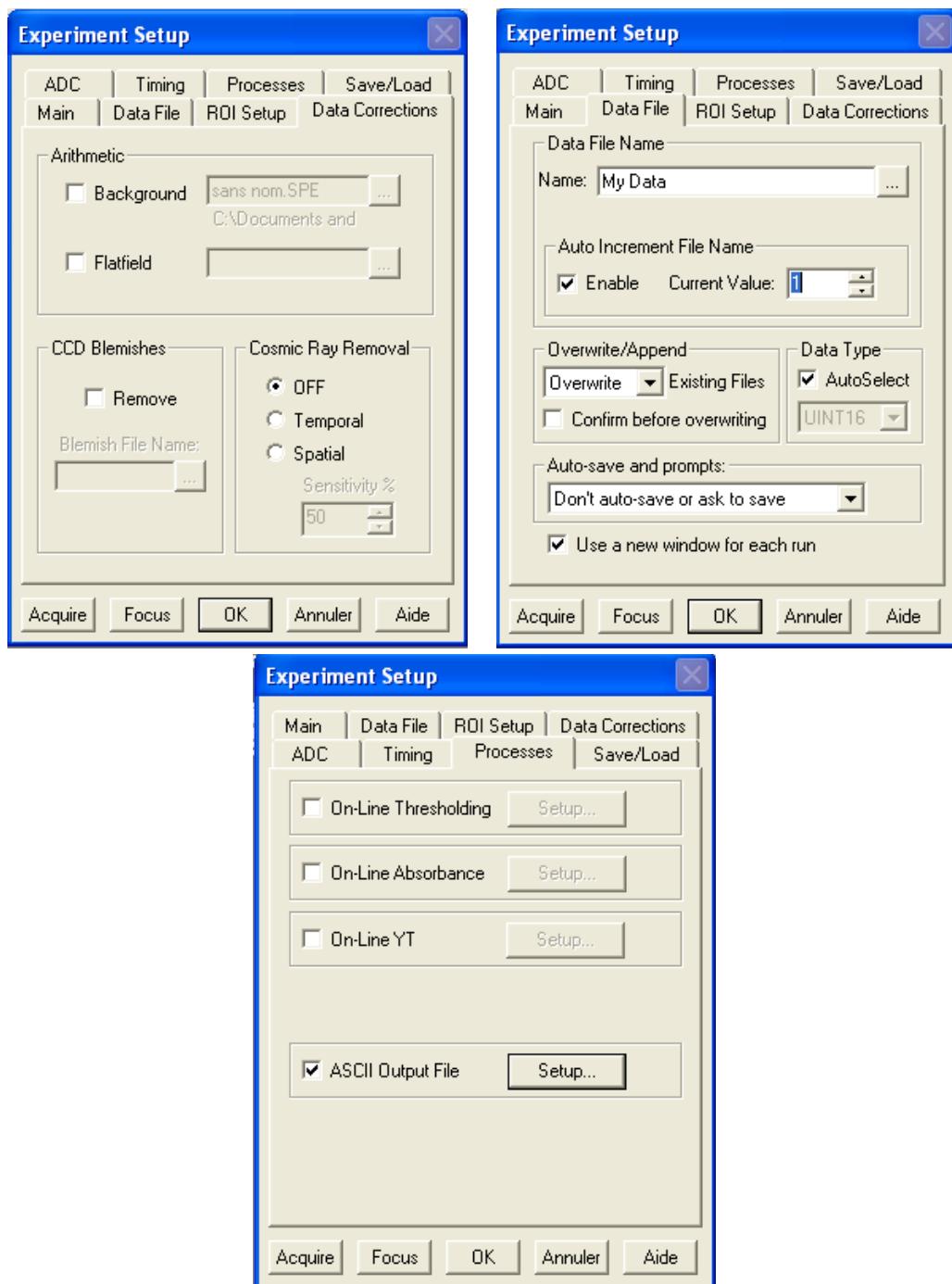


Figure 7: Les différentes fenêtres de paramètres à ajuster avant de commencer



À retenir

À chaque fois que vous utiliserez ACQ, un fichier texte ASCII sera sauvegardé dans le même répertoire que votre fichier maître.

Le panneau “Main” et “ROI setup” permettent de passer du mode imagerie au mode spectroscopie et de choisir la durée d’intégration. En mode imagerie, une image du CCD est obtenue, et l’interface montre une image. Dans main utilisez “Full Chip”, acquisition 1 seconde, et dans ROI Setup, “Imaging mode”. Une acquisition à l’aide du bouton “ACQ” donnera par exemple:

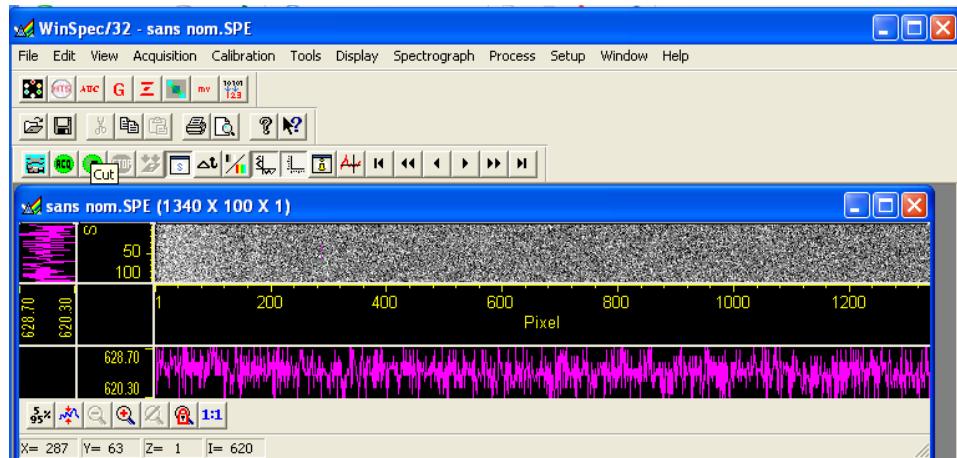


Figure 8 : Exemple d’acquisition en mode imagerie.

où on peut voir l’image au centre et deux graphiques correspondant aux profiles de lignes verticales et horizontales à l’endroit où le curseur est positionné avec la souris. Au contraire, en mode spectroscopie dans ROI setup, on obtient plutôt un seul graphique (ou spectre):

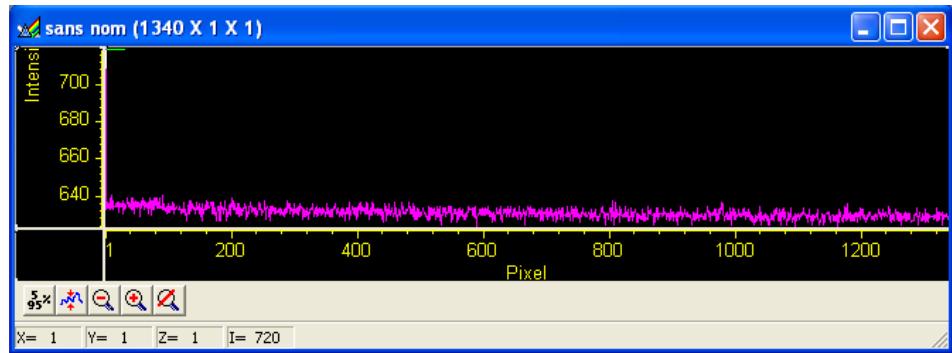


Figure 9: Exemple d'acquisition en mode spectroscopie. Notez la valeur d'environ 600-700 counts sur l'axe des Y.

Avec l'option Software Binning, il est possible d'additionner toutes les lignes et d'ainsi obtenir 100x plus de photons (notez l'axes des Y qui est maintenant 100x plus élevé):

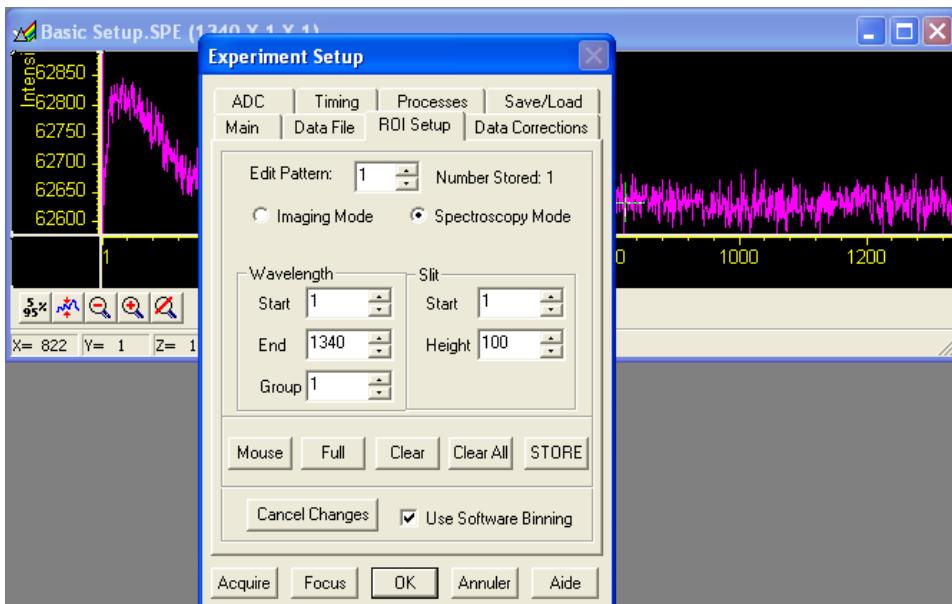


Figure 10: Exemple d'acquisition en mode spectroscopie avec le Software Binning. Notez les valeurs de counts sur l'axe des Y qui sont maintenant 100x plus élevées que sur la figure 9.



À retenir

Vous utiliserez surtout le mode Spectroscopie qui vous donnera un graphique 1D et non pas une image 2D. Si vous voyez une image comme sur la figure 8, retournez dans les Settings et ajustez 1) dans la section Main: Region Of Interest et 2) dans la section ROI Setup, le mode Spectroscopie. *Il faut parfois le faire deux fois.*
Assurez vous de bien cocher “Use Software Binning”.

Manipulations

Exploration du montage (30 mins)

- 1) Explorez le montage à l'aide du démonstrateur ou du professeur.
- 2) Bien identifier les blocs conceptuels du montage: échantillon, collection, filtre, et spectrographe.

Caractérisation de la CCD (1h30)

Il existe trois types de bruit sur une CCD:

- 1) Le bruit de lecture (READOUT noise), un bruit constant quel que soit le temps d'intégration. Ce bruit est unique aux CCD.
- 2) Le bruit thermique (THERMAL noise), un bruit provenant de l'excitation aléatoire d'électron dans chaque pixel et dépendant de la température du senseur CCD. Ce bruit est proportionnel au temps d'intégration, mais indépendant de la lumière.
- 3) Le bruit de photon (PHOTON noise ou SHOT noise), un bruit dépendant inversement de la racine carrée du nombre de photons. Plus il y a de photons, moins le bruit est important.



Caractérisation du bruit de lecture

- 1) Bloquez l'entrée du spectromètre avec un ruban noir (i.e., du *tape* électrique).
- 2) Faites l'acquisition en fonction de différents temps d'intégration **de plus en plus petits** jusqu'à 1 microseconde.
- 3) Notez le nombre fixe de COUNTs, indépendamment du temps d'intégration.



Caractérisation du bruit thermique

- 1) Bloquez l'entrée du spectromètre avec un ruban noir (i.e., du *tape* électrique).
- 2) Faites l'acquisition en fonction de différents temps d'intégration **de plus en plus longs** jusqu'à 100 secondes.
- 3) Notez le nombre de COUNTs proportionnel au temps d'intégration.



Analyse

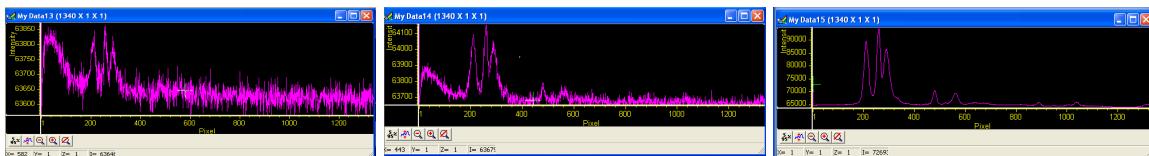
- 1) Faites un graphique du signal en fonction du temps d'intégration.
- 2) Une régression linéaire vous donnera le bruit fixe (READOUT noise) pour un temps d'intégration nul, et le bruit thermique (la pente du graphique des COUNTs en fonction du temps).



Caractérisation du bruit de photon

- 1) Travaillez avec les lumières ambiantes allumées et l'entrée du spectromètre libre. Mettez une feuille de papier blanc près de l'échantillon pour grossièrement rediriger la lumière ambiante vers le spectromètre.

- 2) Faites l'acquisition en fonction de différents temps d'intégration **de plus en plus longs** jusqu'à 10 secondes (1 ms, 100 ms et 1, 5, 10 secondes).
- 3) Notez le nombre de COUNTs proportionnel au temps d'intégration.



Analyse:

- 1) Dans une région spectrale où un signal est obtenu, tracer le signal en fonction du temps d'intégration. Faites une régression, obtenez la pente.
- 2) Dans une région spectrale où un signal est obtenu, tracer l'écart type du signal sur une bande spectrale plutôt constante divisé par la valeur moyenne sur cette bande (i.e., le bruit relatif) en fonction du temps d'intégration.

Le bruit thermique (nombre de COUNTS par secondes) vous donne approximativement la limite inférieure de la source de lumière que vous pourriez détecter. Comparez-le à une source ambiante.



À retenir

Lorsque vous allumez la lampe au mercure, ne l'éteignez pas entre vos mesures. Si vous l'éteignez vous devez attendre un certain temps (10 minutes) avant de l'allumer de nouveau.



Étalonnage de la caméra sur l'axe des longueurs d'onde

- 1) Allumez la lampe au mercure. Elle prend du temps à se réchauffer.
- 2) Mettez une feuille de papier approximativement où l'échantillon devrait être
- 3) Ajustez les Settings à Mode Imagerie, Full Chip, 1 seconde intégration.
- 4) Cliquez sur le bouton Focus.
- 5) Observez les lignes de la lampe au mercure.
- 6) Ajustez les Settings à Mode Spectroscopie, Full ROI, 10 à 30 secondes intégration.
- 7) Faites une acquisition (bouton ACQ), ceci sauvegardera vos données.



Analyse:

- 1) Utilisez le spectre du mercure en Annexe 2 entre 633 nm et 800 nm.
- 2) Identifiez les pics sur vos données.

3) Tracez un graphique de la valeur en longueur d'onde en fonction de la position en pixels

4) Obtenez la régression et l'étalonnage, qui devra être approximativement linéaire. Cette courbe, sous la forme $\lambda(x) = ax + b$, vous donnera la correspondance entre la valeur en pixel et la longueur d'onde réelle. Pour étalonner vos graphiques en terme de la fréquence Raman et non en terme de pixels, vous ferez :

$$\nu = \frac{1}{632.8 \times 10^{-7} \text{ cm}} - \frac{1}{\lambda(x)}, \text{ avec la longueur d'onde } \lambda(x) \text{ en cm, pour obtenir la fréquence Raman en } \text{cm}^{-1}.$$

Caractérisation des échantillons (2h-4h)

Vous utilisez la lampe au mercure et une feuille de papier diffusante pour vérifier le fonctionnement de la caméra. Pour aligner le montage, vous utiliserez un échantillon fluorescent (l'huile d'olive).



Alignement du spectromètre par fluorescence

- 1) Fermez les lumières.
- 2) Mettez un échantillon d'huile d'olive dans le porte-échantillon
- 3) Allumez le laser
- 4) Ajustez les Settings à Mode Imagerie, Full Chip, 1 seconde intégration.
- 5) La combinaison de deux lentilles permet d'imager l'objet (le laser dans l'échantillon) sur la fente d'entrée du spectromètre. Ainsi, le laser doit passer dans le plan focal de la lentille de collection. S'il est trop haut ou trop bas, la lumière ne sera pas imagée sur la fente et ne sera pas captée par la CCD. S'il est trop à gauche ou à droite, la collection sera inefficace car le faisceau ne sera pas imaginé sur la fente d'entrée.
Maximisez le signal sur le CCD en hauteur et en profondeur avec les ajustements X et Y du miroir avant l'échantillon
- 6) Faites une acquisition (bouton ACQ), ceci sauvegardera vos données



Analyse:

Pourquoi l'huile d'olive est-elle fluorescente ? Pourquoi absorbe-t-elle à 633 nm ? Indice : la couleur verte vient de la chlorophylle.



Prise de spectres Raman : solutions organiques

Il y a plusieurs échantillons : éthanol, méthanol, isopropanol, glucose, glycérol, etc... Pour ces échantillons vous pourrez les identifier grâce à la spectroscopie Raman. Ils deviendront vos références pour l'identification des composants inconnus.

- 1) Mettez un échantillon dans le porte-échantillon
- 2) Allumez le laser
- 3) Ajustez les Settings à Mode Spectroscopie, ROI, 100 secondes intégration.

4) Faites une acquisition (bouton ACQ), ceci sauvegardera vos données

5) Répétez pour l'ensemble des échantillons



Analyse:

1) Identifiez les différents pics et associez-les aux structures chimiques.

2) Référez-vous à la table en annexes 1 et 2.



Prise de spectres Raman : huiles saturées et insaturées

Vous avez plusieurs huiles différentes (olive, soya, maïs, becnel, etc...). Pour ces échantillons, vous pourrez déterminer le degré en gras saturés. Obtenez des spectres pour ces échantillons.

1) Mettez un échantillon dans le porte-échantillon

2) Allumez le laser

3) Ajustez les Settings à Mode Spectroscopie, ROI, 100 secondes intégration.

4) Faites une acquisition (bouton ACQ), ceci sauvegardera vos données

5) Répétez pour l'ensemble des échantillons



Analyse:

1) Identifiez les différents pics et associez-les aux structures chimiques.

2) Référez-vous à la table en annexe 2.



Prise de spectres Raman : solutions inconnues

Vous avez plusieurs solutions inconnues. Pour ces échantillons, vous devez déterminer l'identité de ces composantes et la concentration relative.

1) Mettez un échantillon dans le porte-échantillon

2) Allumez le laser

3) Ajustez les Settings à Mode Spectroscopie, ROI, 100 secondes intégration.

4) Faites une acquisition (bouton ACQ), ceci sauvegardera vos données

5) Répétez pour l'ensemble des échantillons



Analyse:

1) Identifiez les différents pics et associez-les aux structures chimiques.

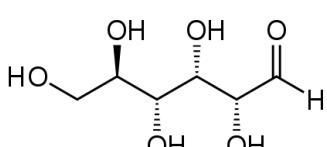
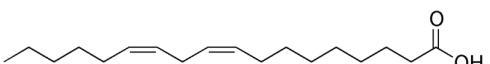
2) Référez-vous à la table en annexe, identifiez les solutions.

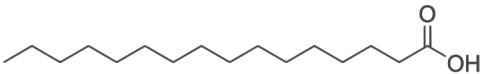
3) **Avancé:** Pour une analyse complète, utiliser une corrélation croisée normalisée pour confirmer la ressemblance entre les spectres mesurés et vos spectres de références.

4) **Avancé:** Vous pouvez utiliser des techniques d'analyse multi-variable pour extraire les concentrations.

Pour tout commentaire sur le protocole, contactez Prof. Daniel Côté à
Daniel.Cote@crulrg.ulaval.ca

Annexe 1 : Structure chimique des substances

Substance	Structure
Méthanol	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Ethanol	$\begin{array}{cc} \text{H} & \text{H} \\ & \\ \text{H}-\text{C} & -\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array}$
Isopropanol	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Glucose	
Glycerol	$\begin{array}{ccccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & \\ \text{H}-\text{C} & -\text{C} & -\text{C}-\text{H} \\ & & \\ \text{O} & \text{O} & \text{O} \\ & & \\ \text{H} & \text{H} & \text{H} \end{array}$
Acetone	$\begin{array}{ccccc} \text{H} & & \text{O} & & \text{H} \\ & & \parallel & & \\ \text{H}-\text{C} & -\text{C} & -\text{C}-\text{H} \\ & & & \\ \text{H} & & \text{H} & & \end{array}$
Lipide insaturé (acide linoléique)	

Substance	Structure
Lipide saturé (<i>acide palmitique</i>)	

Annexe 2 : Spectre du mercure et mercure ionisé

Référence : http://njsas.org/projects/atoms/spectral_lines/1/mercury_nist.html

Dans la table qui suit, Hg I, Hg II et Hg III représentent différents états d'ionisation du mercure. Le chiffre romain représente le degré d'oxidation (le nombre de charges positives).

Source	Longueur d'onde [nm]	Intensité relative
Hg I	579.066	280
Hg I	580.378	140
Hg I	585.925	60
Hg II	587.173	60
Hg I	587.198	20
Hg I	607.272	20
Hg II	614.95	1000
Hg III	622.035	25
Hg I	623.44	30
Hg III	641.898	35
Hg III	650.138	40
Hg II	652.113	80
Hg III	658.426	10
Hg III	661.012	6
Hg III	670.929	30
Hg I	671.643	160
Hg I	690.752	250
Hg I	708.19	250
Hg I	709.186	200
Hg II	734.637	40
Hg II	748.587	100

Annexe 3 : Fréquences de vibration Raman



RAMAN DATA AND ANALYSIS

Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring

The Raman scattering technique is a vibrational molecular spectroscopy which derives from an inelastic light scattering process. With Raman spectroscopy, a laser photon is scattered by a sample molecule and loses (or gains) energy during the process. The amount of energy lost is seen as a change in energy (wavelength) of the irradiating photon. This energy loss is characteristic for a particular bond in the molecule. Raman can best be thought of as producing a precise spectral fingerprint, unique to a molecule or indeed and individual molecular structure. In this respect it is similar to the more commonly found FT-IR spectroscopy. However, unlike FT-IR, there are a distinct number of advantages when using Raman.

- Raman can be used to analyse aqueous solutions since it does not suffer from the large water absorption effects found with FT techniques.*
- The intensity of spectral features in solution is directly proportional to the concentration of the particular species*
- Raman spectra are generally robust to temperature changes*
- Raman requires little or no sample preparation. It does not need the use of Nujol, or KBr matrices and is largely unaffected by sample cell materials such as glass.*
- The use of a Raman microscope such as the LabRAM provides very high level of spatial resolution and depth discrimination, not found with the FT methods of analysis*

These advantages and its highly specific nature, mean that Raman has become a very powerful tool for analysis and chemical monitoring. Depending upon instrumentation, it is a technique which can be used for the analysis of solids, liquids and solutions and can even provide information on physical characteristics such as crystalline phase and orientation, polymorphic forms, and intrinsic stress.

Functional Group/ Vibration	Region	Raman	InfraRed
Lattice vibrations in crystals, LA modes	10 - 200 cm ⁻¹	strong	strong
δ (CC) aliphatic chains	250 - 400 cm ⁻¹	strong	weak
ν (Se-Se)	290 - 330 cm ⁻¹	strong	weak
ν (S-S)	430 - 550 cm ⁻¹	strong	weak
ν (Si-O-Si)	450 - 550 cm ⁻¹	strong	weak
ν (Xmetal-O)	150-450 cm ⁻¹	strong	med-weak
ν (C-I)	480 - 660 cm ⁻¹	strong	strong
ν (C-Br)	500 - 700 cm ⁻¹	strong	strong
ν (C-Cl)	550 - 800 cm ⁻¹	strong	strong
ν (C-S) aliphatic	630 - 790 cm ⁻¹	strong	medium
ν (C-S) aromatic	1080 - 1100 cm ⁻¹	strong	medium
ν (O-O)	845 - 900 cm ⁻¹	strong	weak
ν (C-O-C)	800 - 970 cm ⁻¹	medium	weak
ν (C-O-C) asym	1060 - 1150 cm ⁻¹	weak	strong



Raman Bands

$\nu(\text{CC})$ alicyclic, aliphatic chain vibrations	600 - 1300 cm^{-1}	medium	Medium
$\nu(\text{C=S})$	1000 - 1250 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{CC})$ aromatic ring chain vibrations	*1580, 1600 cm^{-1}	strong	medium
	**1450, 1500 cm^{-1}	medium	medium
	*1000 cm^{-1}	strong/medium	weak
$\delta(\text{CH}_3)$	1380 cm^{-1}	medium	strong
$\delta(\text{CH}_2)$			
$\delta(\text{CH}_3)$ asym	1400 - 1470 cm^{-1}	medium	medium
$\delta(\text{CH}_2)$	1400 - 1470 cm^{-1}	medium	medium
$\delta(\text{CH}_3)$ asym	1400 - 1470 cm^{-1}	medium	medium
$\nu(\text{C-(NO}_2))$	1340 - 1380 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{C-(NO}_2))$ asym	1530 - 1590 cm^{-1}	medium	strong
$\nu(\text{N=N})$ aromatic	1410 - 1440 cm^{-1}	medium	-
$\nu(\text{N=N})$ aliphatic	1550 - 1580 cm^{-1}	medium	-
$\delta(\text{H}_2\text{O})$	~1640 cm^{-1}	weak broad	strong
$\nu(\text{C=N})$	1610 - 1680 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{C=C})$	1500 - 1900 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C=O})$	1680 - 1820 cm^{-1}	medium	strong
$\nu(\text{C=C})$	2100 - 2250 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C=N})$	2220 - 2255 cm^{-1}	medium	strong
$\nu(\text{-S-H})$	2550 - 2600 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C-H})$	2800 - 3000 cm^{-1}	strong	strong
$\nu(\text{=(C-H)})$	3000 - 3100 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{=(C-H)})$	3300 cm^{-1}	weak	strong
$\nu(\text{N-H})$	3300 - 3500 cm^{-1}	medium	medium
$\nu(\text{O-H})$	3100 - 3650 cm^{-1}	weak	strong

HORIBA JOBIN YVON

(All HORIBA Jobin Yvon companies were formerly known as Jobin Yvon)

France : HORIBA Jobin Yvon S.A.S., 231 rue de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq. Tel : +33 (0)3 20 59 18 00.
USA : HORIBA Jobin Yvon Inc., 3880 Park Avenue, Edison, NJ 08820-3012. Tel : +1-732-494-8660,
Fax : +1-732-549-2571. Email : raman@jobinyvon.com www.jobinyvon.com
Japan : HORIBA Ltd., JY Optical Sales Dept., 1-7-8 Higashi-kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0031.
Tel : +81 (0)3 3861 8231. Fax : +81 (0)3 3861 8259. Email: raman@horiba.com
Germany: +49 (0) 6251 84 75-0 **Italy:** +39 02 57603050 **UK:** +44 (0)20 8204 8142
China: +86 (0) 10 6849 2216

2/2

Explore the future

HORIBA

Annexe 4 : Détermination du degré d'insaturation des gras

Determination of Unsaturation in Food Oils and Fats

RAMANRXN SYSTEMS™ Application Note

Number 500

Key Issues

- Straightforward determination of total unsaturation and *cis* isomer content
- High water content, preventing use of FTIR
- Rapid on-line process control

Introduction

Knowing the degree of unsaturation and relative amounts of *cis* and *trans* isomerization in edible oils and fats is important in today's foods industry. This is necessary for both process and quality control, and is required nutritional information in food labeling.

Total oil and fat unsaturation is presented as the Iodine Value (IV). The IV is currently determined by traditional titration methods. FTIR is the standard technique to determine *trans* isomer content. GC is used to estimate lipid fatty acid composition. However, IR absorption by water and chromatographic time constraints, along with stringent sampling requirements, make these techniques unsuitable for on-line process control.

Raman spectroscopy has been proposed as a technique suited for the rapid on-line determination of both *cis/trans* isomer content and total unsaturation in oils and fats.¹⁻³ An off-line demonstration of this analysis has appeared using FT-Raman.³ We present evidence that this analysis can be conducted with dispersive Raman instrumentation designed for process control.

Experimental

The data was acquired using a fully integrated, remote Kaiser Optical Systems, Inc. HoloProbe™ analyzer with 10 mW of 532-nm incident laser light. A HoloPlex™ grating was used to acquire the full Raman spectrum in one exposure, allowing quantitative analysis across the entire measured range. Integration times ranged from 60 to 300 s, depending on the sample.

Determination of Total Unsaturation

Figure 1 shows the Raman spectra of butter, margarine, vegetable oil and vegetable shortening

between 1150 and 1775 cm⁻¹. Total unsaturation can be determined quantitatively by measuring the ratio of the C=C stretch (ν C=C) centered at 1661 cm⁻¹ to the CH₂ scissoring deformation (δ CH₂) at 1444 cm⁻¹.¹⁻³ When comparisons are made between the relative intensities of ν C=C and δ CH₂ in Figure 1, it is clear that butter has the highest percentage of saturated fat. Conversely, vegetable oil has the least saturation. Vegetable shortening and margarine fall between these two extremes. This matches what we know qualitatively. Vegetable oils and shortenings are nutritionally preferable to animal shortenings because they contain less saturated fat.

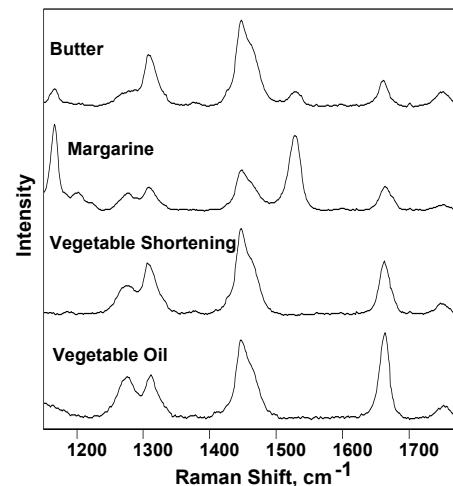


Figure 1. Background-corrected Raman spectra of commercial food oils and fats. The bands at 1165 and 1525 cm⁻¹ of the butter and margarine spectra are attributed to the coloring β -carotene.

Cis Isomer Content

Cis isomer content can also be determined from the Raman spectrum. The band at 1272 cm⁻¹ is attributed to in-plane =C–H deformation in an unconjugated *cis* double bond. The intensity of this band ratioed to the in-phase methylene twisting

RAMANRXN SYSTEMS
REACTION ANALYSIS, MONITORING AND CONTROL

vibration at 1306 cm^{-1} provides a direct *cis* isomer measurement. This is illustrated by comparing the Raman spectrum of vegetable oil with that of partially hydrogenated vegetable shortening. Hydrogenation results in a preferential decrease in the *cis/trans* isomer ratio.³ In Figure 1, unhydrogenated vegetable oil contains significantly more *cis* isomer character than partially hydrogenated vegetable shortening.

Background Correction in Highly Fluorescent Samples

Figure 2 shows the background-corrected, full Raman spectra of vegetable and peanut oils. The ratio of background level to the δCH_2 vibration intensity appears in parentheses by each spectrum. The fluorescence observed from commercial samples has been attributed to assorted coloring agents.¹⁻³ Figure 2 illustrates that, even in the presence of significant background, Raman spectra from these sample classes are readily observable.

In those instances where fluorescence is not overwhelming, dispersive Raman with visible excitation offers distinct advantages over FT-Raman.

Sensitivity is enhanced due to both the v^4 Raman intensity dependence and the more efficient CCD detector. Alternatively, fluorescence can often be significantly reduced or eliminated by using a longer incident wavelength. A **RAMANRXN1™** analyzer

equipped with a 785-nm NIR laser, is well-suited for this purpose.

Conclusion

The high-throughput **RAMANRXN1** analyzer permits the use of low laser powers and short exposure times for remote Raman measurements. Its small size, rugged construction, and minimal utility needs make it well suited to applications outside the laboratory environment. This technique is well suited to the online determination of total unsaturation and *cis* isomer level in commercial oil and fat samples.

*Current model is **RAMANRXN1** analyzer

References:

1. Sadeghi-Jorabchi, H.; Hendra, P. J.; Wilson, R. H.; Belton, P. S.; Journal of the American Oil Chemistry Society, Vol. 67, 1990, 483.
2. Goral, J.; Zichy, V.; Spectrochimica Acta, Vol. 46A, 1990, 253.
3. Sadeghi-Jorabchi, H.; Wilson, R. H.; Belton, P. S.; Spectrochimica Acta, Vol. 47A, 1991, 1449.
4. Lewis, I.R. Process Raman Spectroscopy. In *Handbook of Raman Spectroscopy*; Lewis, I.R., Edwards, H.G.M., Eds. Marcel Dekker: New York, 2001; pp. 919-973.

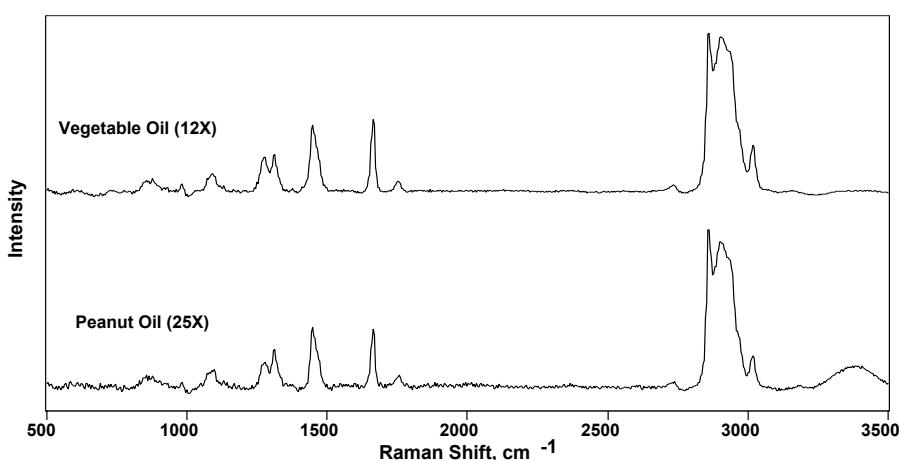


Figure 2. Background-corrected spectra of vegetable and peanut oils.

RamanRxn Systems, RamanRxn1, and HoloPlex are trademarks of Kaiser Optical Systems, Inc. All rights reserved.
Copyright © 2001 Kaiser Optical Systems, Inc. All rights reserved.



WWW.KOSI.COM

371 Parkland Plaza
Ann Arbor, MI 48103
phone (734)665-8083 / fax (734)665-8199