



SERS, CARS, IR, FTIR

Παραλλαγές της Φασματοσκοπίας Raman



- **Φασματοσκοπία Raman χωρίς συντονισμό**
 - Ορατό φως (πιο ισχυρό σήμα)
 - Εγγύς Υπέρυθρο φως (NIR) (λιγότερος φθορισμός)
- **(Υπεριώδεις) Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman**
- **Μικροσκοπία/Απεικόνιση Raman**
- **Raman μέσω οπτικών ινών**
- **Φασματοσκοπία Raman ψηλών κυματαριθμών (high wavenumber)**
- **Φασματοσκοπία Raman με Χρονική Ανάλυση (Time resolved) - παλμική (pulsed)**
- **Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS)**
- **Μη-γραμμική (Non-linear) φασματοσκοπία**
 - Σύμφωνη Anti-Stokes φασματοσκοπία Raman (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy - CARS)

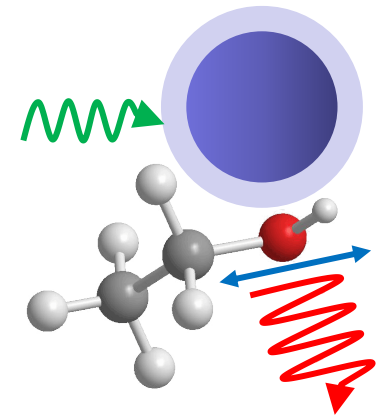
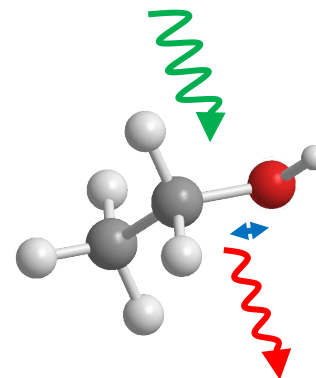
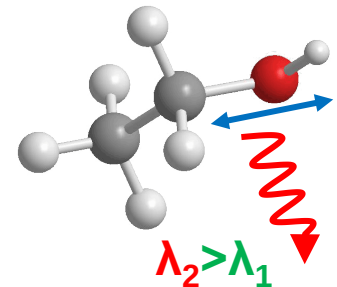
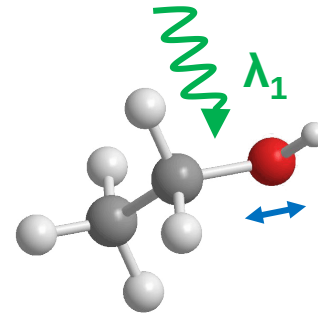


- **Περιορισμοί Raman**

- Η ένταση των φωτονίων Raman είναι 0.001% ($1:10^{-5}$, στην καλύτερη περίπτωση) της έντασης της πηγής

- **Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS)**

- Το δείγμα προσκολλάται στην επιφάνεια κολλοειδών μεταλλικών νανοσωματιδίων
- Η ένταση αυξάνεται $\times 10^3 - 10^6 (10^{14})$
- Η ενίσχυση είναι αποτέλεσμα Enhancement due to Επιφανειακών Πλασμονίων (Surface Plasmons)
- Η ενίσχυση παρουσιάζεται μόνο σε απόσταση **<10 nm** από το νανοσωματίδιο





• Φασματοσκοπία Raman με επιφανειακή ενίσχυση (SERS)

1928 Ο C.V. Raman ανακαλύπτει το “Φαινόμενο Raman” της ανελαστικής σκέδασης



1974 Ανακάλυψη ενισχυμένων σημάτων Raman (10^5 - 10^6) από μόρια προσκολλημένα σε τραχείες επιφάνειες Ag. Θεωρείται αποτέλεσμα της αυξημένης απορρόφησης λόγω μεγαλύτερου εμβαδού επιφάνειας.



1977 Η συζήτηση ξεκινά γύρω από τον ακριβή μηχανισμό της ενίσχυσης των σημάτων.

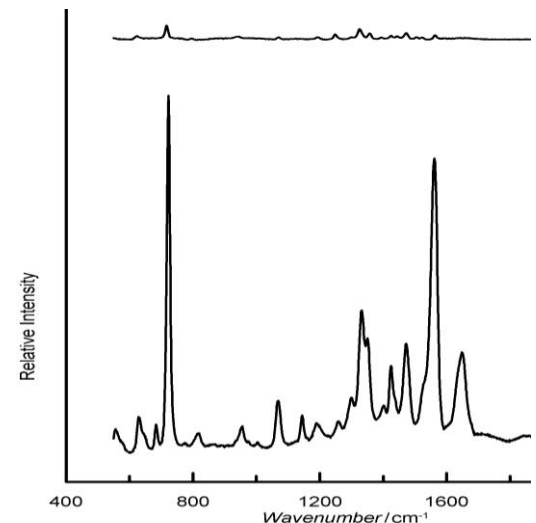
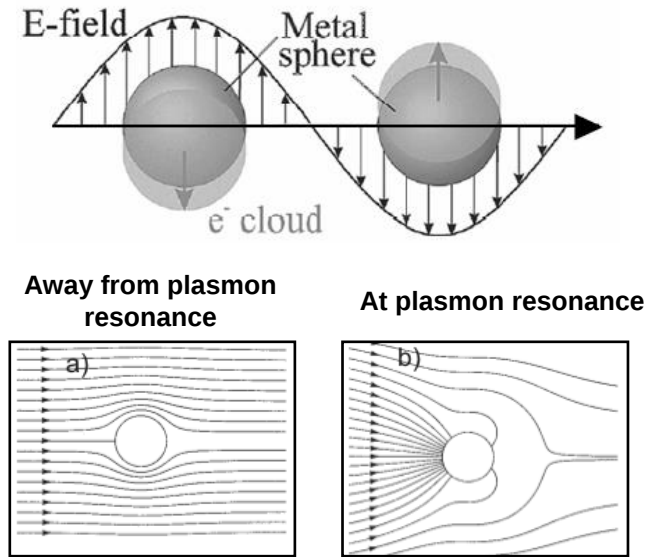


- M. Fleischmann, *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, **26** 163 (1974)
 D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, **84** 1 (1977)
 M.G. Albrecht, J. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.*, **99** 15 (1977)
 S. Schultz, *et al.*, *Surface Science*, **104** 419 (1981)
 M. Moskovits, , *Reviews of Modern Physics*, **57** 3 (1985)
 K. Kneipp, *et al.*, *Chem. Rev.*, **99** 2957 (1999)



Πως λειτουργεί η SERS;

- Ο μηχανισμός πίσω από τη SERS δεν είναι ξεκάθαρος.
 - Ηλεκτρομαγνητική ενίσχυση
 - Χημική ενίσχυση
- **Ηλεκτρομαγνητική ενίσχυση**
 - (Προτάθηκε: Jeanmarie & Van Duyne, 1977)
 - Προκύπτει από την παρουσία του επιφανειακών πλασμονίων στο υπόστρωμα (substrate)
 - Επιφανειακά πλασμόνια είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα που διαδίδονται κατά μήκος και παράλληλα με την επιφάνεια της διεπαφής μετάλλου / διηλεκτρικού
 - Παράγονται όταν το προσπίπτον φως διεγείρει το νέφος ηλεκτρονίων του μετάλλου.
 - Όταν ένα μόριο τοποθετείται σε επαφή με το μέταλλο, καλύπτεται από ενισχυμένο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και παράγει μια ενισχυμένη σκέδαση Raman
- **Χημική ενίσχυση**
 - (Προτάθηκε: Albrecht και Creighton, 1977)
 - Αφορά τη μεταφορά φορτίου μεταξύ των μορίων και της επιφάνειας του μετάλλου
 - Αυτή η βελτίωση είναι γενικά μικρότερη από έναν παράγοντα 10





- Μοντέλο του Drude για διηλεκτρικές σταθερές στα μέταλλα

$$m_e \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial t^2} + m_e \Gamma \frac{\partial \vec{r}}{\partial t} = -e \vec{E}$$

όπου m_e η μάζα του ηλεκτρονίου, e το φορτίο του, Γ μια σταθερά απόσβεσης

- Επίσης

$$E = E_0 e^{-j\omega t} \quad r = r_0 e^{-j\omega t}$$

- Τότε

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{m_e \epsilon_0}} \quad \epsilon(\omega) = \frac{\epsilon_{\text{target}}(\omega)}{\epsilon_{\text{medium}}(\omega)} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega[\omega + i\Gamma]} \quad \text{Re}\{\epsilon(\omega)\} = 1 - \frac{\omega_p^2}{[\omega^2 + \Gamma^2]}$$

όπου N =αριθμητική πυκνότητα ηλεκτρονίων, ϵ_0 = διηλεκτρική σταθερά κενού ($8.85419 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$)

- Το επαγόμενο πεδίο (για μια μεταλλική σφαίρα) είναι

$$E_{\text{induced}} = \left\{ \frac{[\epsilon_m(\omega) - \epsilon_h]}{[\epsilon_m(\omega) + 2\epsilon_h]} \right\} E_{\text{laser}}$$

όπου $\epsilon_1(\omega)$ η μιγαδική διηλεκτρική σταθερά του μετάλλου και ϵ_h η διηλεκτρική σταθερά του περιβάλλοντος

- Συντονισμός $\rightarrow \boxed{\text{Re}\{\epsilon_m\} = -2\epsilon_h}$ και $\boxed{\text{Im}\{\epsilon_m\} \rightarrow 0}$

- Ο παράγοντας “2” διαφέρει για διαφορετικά σχήματα

Μιγαδικός δείκτης διάθλασης $m = n - jk$

Μιγαδική διηλεκτρική σταθερά $\epsilon = \epsilon_1 + j\epsilon_2$

$$n = \sqrt{\frac{(\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2)^{1/2} + \epsilon_1}{2}} \quad k = \sqrt{\frac{(\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2)^{1/2} - \epsilon_1}{2}}$$

$$\epsilon_1 = n^2 - k^2 \quad \epsilon_2 = 2nk$$



- **Συνήθη υποστρώματα SERS**

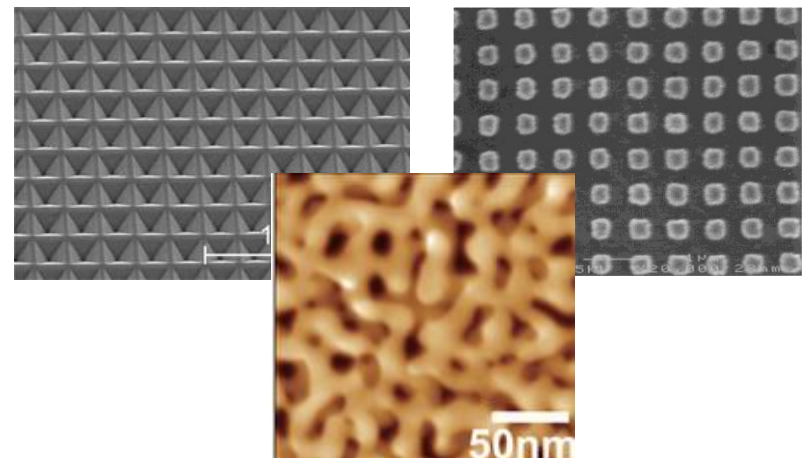
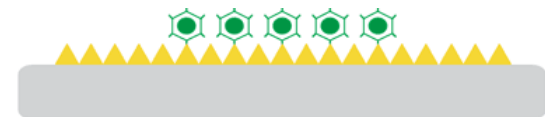
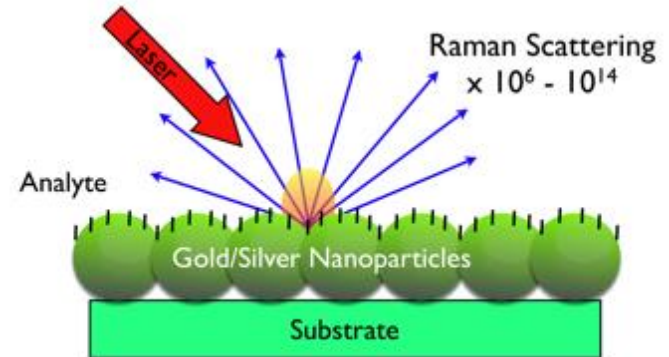
- Άργυρος (Ag), χρυσός (Au) και χαλκός (Cu)
- Η ενέργεια που απαιτείται για την παραγωγή πλάσμονίων ταιριάζει με τις πηγές φωτός που χρησιμοποιούνται συνήθως στη φασματοσκοπία Raman

- **Μεταλλικά νανοσωματίδια**

- Σφαίρες (Spheres)
- Ράβδοι (Rods)
- Νανοκέλυφος (Nanoshell)

- **Μεταλλικές Επιφάνειες**

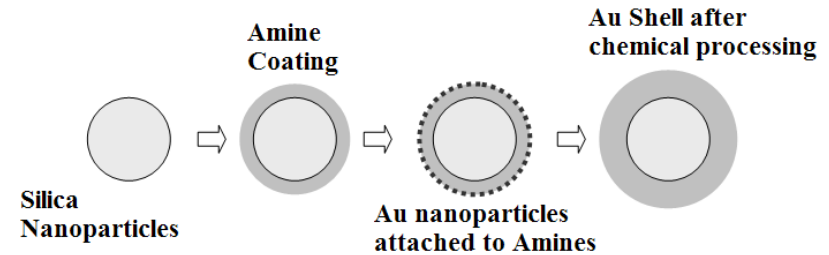
- Χημικά χαραγμένες (Chemically etched)
- Νάνο λιθογραφία (Nano lithography)
- Λιθογραφία δέσμης ηλεκτρονίων
- Αποτυπωμένες (Imprint)
- Μεγαλύτερη βελτίωση για τραχιές επιφάνειες των 10 - 100 nm



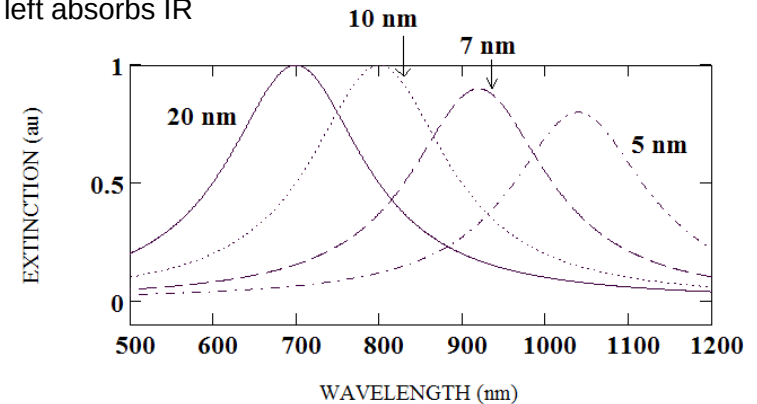


• Νανοκελύφη (Nanoshells)

- Σφαίρα από διηλεκτρικό καλυμμένη με νανοκέλυφος από μέταλλο
- Υλικά πυρήνα (Core) → AuS ή silica
 - Ακτίνα (r) μεταξύ 30-250 nm
- Κέλυφος → Μέταλλο (π.χ. χρυσός)
 - Πάχος (t) → 10-30 nm.
- Η συχνότητα πλασμονικού συντονισμού είναι συνάρτηση των δύο (r & t)
- Κατασκευή
 - Διηλεκτρική σφαίρα επικαλύπτεται με ένα στρώμα αμινών
 - Δεσμεύει 1-2 nm κολλοειδή χρυσό από το διάλυμα
 - Χημική επεξεργασία με HAuCl_4 παρουσία φορμαλδεΰδης
 - Καταλήγει σε ένα επιπλέον στρώμα του χρυσού



Vial on the left has solid gold colloids. Others have colloids with metal nano-shells with decreasing thickness. Vial on left absorbs IR

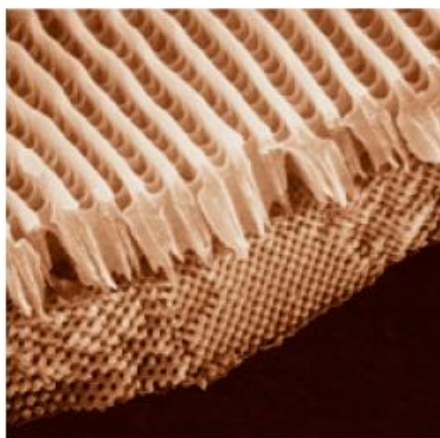


Plasmon resonance extinction for core-shell nanospheres of various shell thickness. Core radius is 60 nm



• Νανοδομές στη φύση και στην τέχνη

Φωτονικά νανοκρύσταλλα (Photonic Nanocrystals) → χρώματα στα φτερά μιας πεταλούδας (μια περιοδική σειρά σκεδαστών. Αντανακλούν το ίδιο μήκος κύματος του φωτός του ανεξάρτητα από τη γωνία πρόσπτωσης)



Yablonovitch, Sci.Am. 2001

Πλασμονική απορρόφηση από μεταλλικά νανოსωματίδια δίνουν χρώμα στα παράθυρα βιτρό, γυαλί, και κεραμικά





- **Γιατί SERS;**

- Ψηλή ευαισθησία και ειδικότητα
- Χαμηλής ισχύος λέιζερ και χαμηλή οπτική μεγέθυνση είναι κατάλληλα για συλλογή φασμάτων SERS σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (τυπικά ~ 10 s).

- **Πολλές Εφαρμογές**

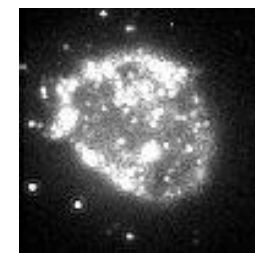
- Μοριακή “δακτυλική αποτύπωση”
 - Μοναδικό δονητικά φάσματα ξεχωρίζουν τα μόρια
- Βιοαίσθηση χωρίς δείκτες (Tagless biosensing)
 - Δεν είναι απαραίτητες φθορίζουσες ουσίες
- Πολυπλεκτικοί (Multiplexed) αισθητήρες
 - Πλασμονικός συντονισμός επιτρέπει τροποποιήσεις του μήκους κύματος του αισθητήρα
- Εφαρμογή In vivo
 - NR διέγερση και βιοσυμβατότητα
- Femtomolar και πιο κάτω
 - Φασματοσκοπία με ένα μόριο είναι δυνατή
- Οι νανοδείκτες (Nanoprobes) μπορεί να είναι πολυτροπικοί



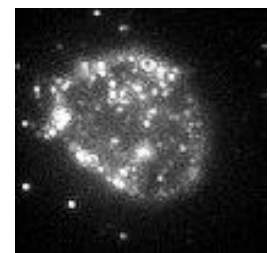
1500 cm⁻¹



1532cm⁻¹



1600cm⁻¹

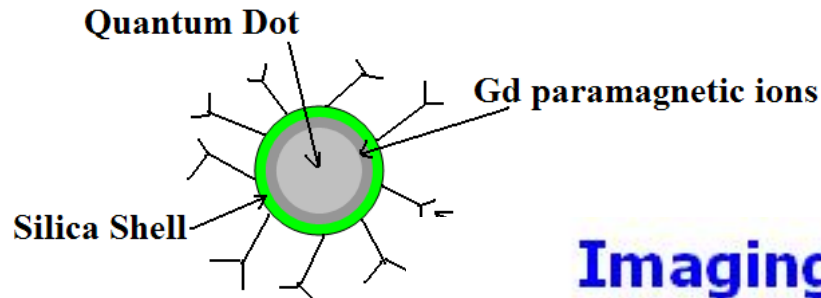


1635cm⁻¹



- **Απεικόνιση με SERS για διάγνωση του καρκίνου**

- Νανοσωματίδια επικολλημένα σε αντισώματα ή πεπτίδια τα οποία ανακαλύπτουν τον όγκο
- Παρακολουθούνται κατά την κυκλοφορία τους μέσα στο σώμα

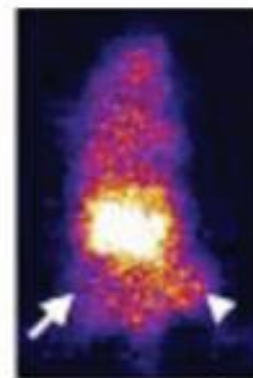


Imaging with Dual-Labeled Probes

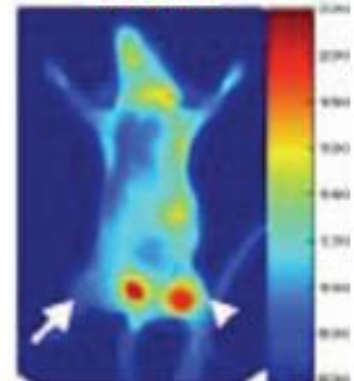
White-Light



γ - Scintigraphy



NIR

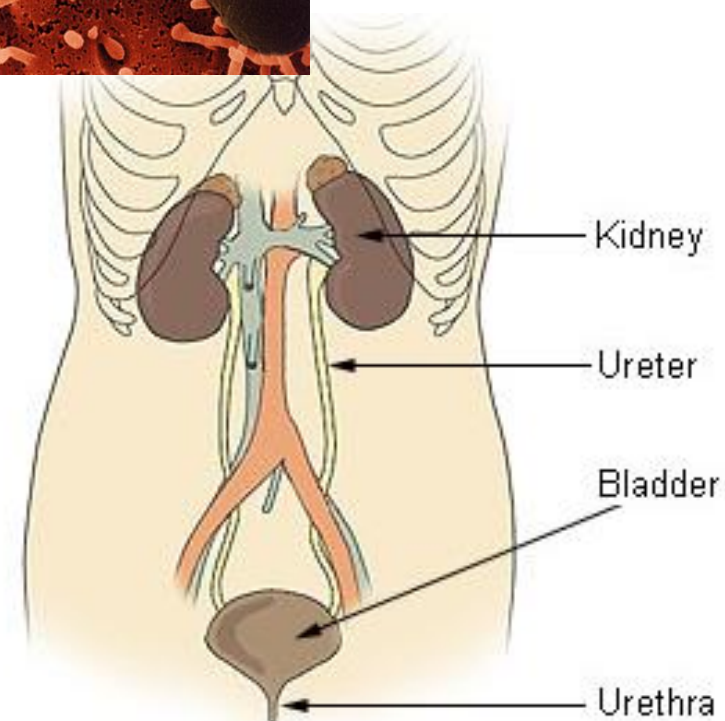


Multifunctional Nanoprobes-Louie: EAD289-Topics in Biophotonics, UC Davis



- **Διάγνωση και αντιβιογράμμα για Ουρολοιμώξεις (Urinary Tract Infection - UTI)**

- UTI : Λοίμωξη οπουδήποτε στο ΟΣ
- Προκαλούνται από βακτήρια του πεπτικού, του κόλπου ή γύρω από την ουρήθρα (συνήθως οφείλεται σε *E. coli*)
- Επηρεάζει κυρίως: τις γυναίκες και ασθενείς με χρόνιες παθήσεις
- Ένας από τους πιο κοινούς τύπους λοιμώξεων
 - 34% των ενηλίκων αναφέρουν ότι είχαν τουλάχιστον μία λοίμωξη του ουροποιητικού
 - 1 στις 2 γυναίκες και 1 στους 7 άνδρες θα παρουσιάσουν μια ουρολοίμωξη στη διάρκεια της ζωής τους





- **Διάγνωση και αντιβιόγραμμα για Ουρολοιμώξεις**

- Ταυτοποίηση βακτηρίων με καλλιέργεια: 24h
- Ειδικό αντιβιοτικό μπορεί να προσδιοριστεί μετά από αντιβιόγραμμα: άλλες 24h





- **Πλήρης διάγνωση και αντιβιογράμμα για ουρολοιμώξεις με SERS**

1. Διαχωρισμός των θετικών και αρνητικών δειγμάτων για ουρολοιμώξεις
2. Αναγνώριση του υπεύθυνου μικροβίου
3. Προσδιορισμός της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

- **Πλεονεκτήματα**

- Ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος
- Ανέξοδη διαδικασία
- Ταχεία διαδικασία

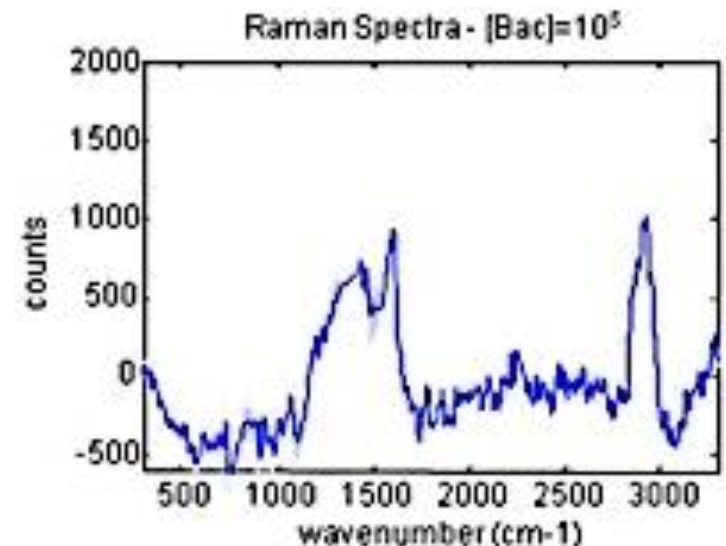
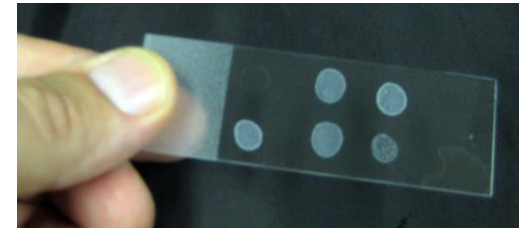


SERS



- Πλήρης διάγνωση και αντιβιογράμμα για ουρολοιμώξεις με SERS

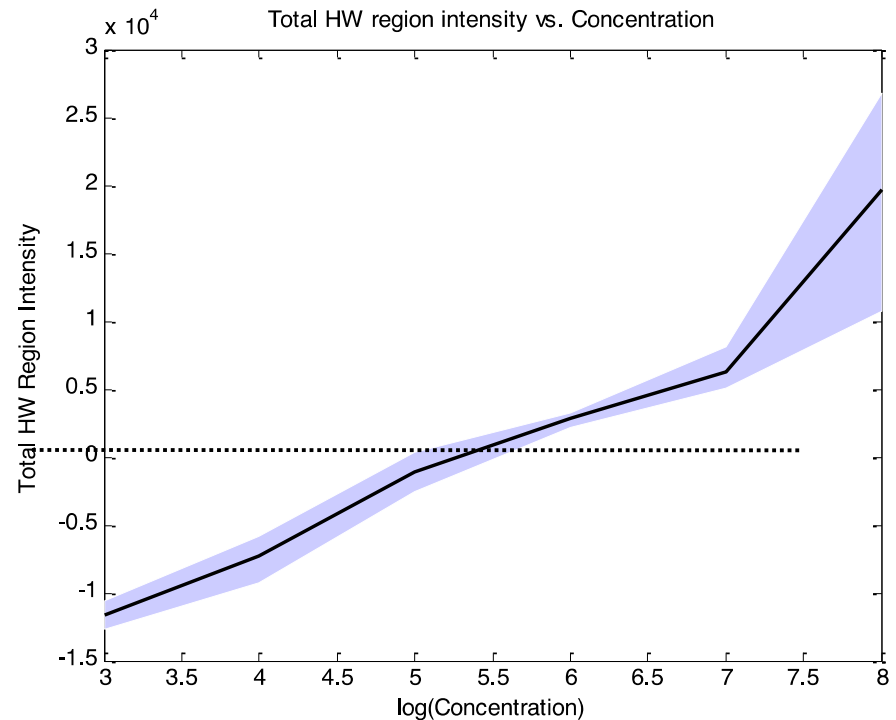
- Βακτήρια από ασθενείς με ουρολοίμωξη (n=50)
 - E. coli, Klebsiella p., Proteus spp., Enterococcus spp., Citrobacter spp.
- SERS:
 - 785 nm λέιζερ
 - 180 mW ισχύς
 - 4.5 cm⁻¹ ευκρίνεια
 - Απόκτηση δεδομένων: 20s x 30
 - Φάσματα Raman από βακτήρια και νανοσωματίδια χρυσού





1. Διαχωρισμός των θετικών και αρνητικών δειγμάτων για ουρολοιμώξεις

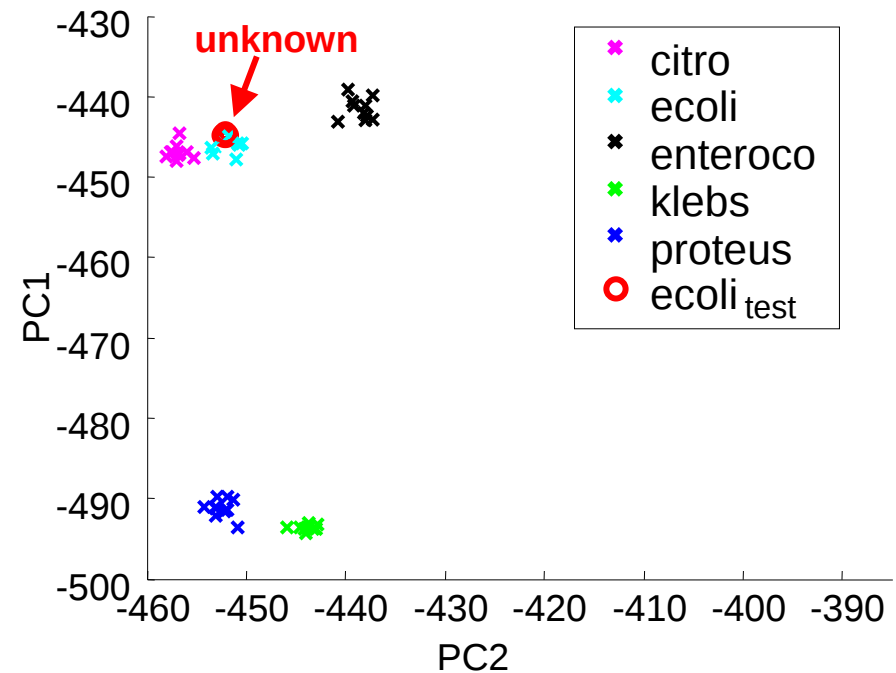
- Η ολική ένταση της περιοχής μεγάλων κυματαριθμών συσχετίζεται με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης
 - Μετά ζωνοπερατό (band-pass) φιλτράρισμα ορισμένες τιμές μπορεί να είναι αρνητικές
- Δείγματα με $I > -500$ θεωρούνται θετικά



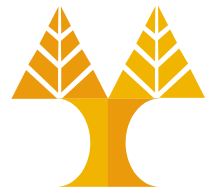


2. Αναγνώριση του υπεύθυνου μικροβίου

- Ανάλυση
 - Διάνυσμα Χαρακτηριστικών (Feature vector): Λόγοι της έντασης φασματικών περιοχών
- Κατηγοριοποίηση
 - Principal components transformation
 - Linear Discriminant Analysis
 - Leave-one-out cross validation

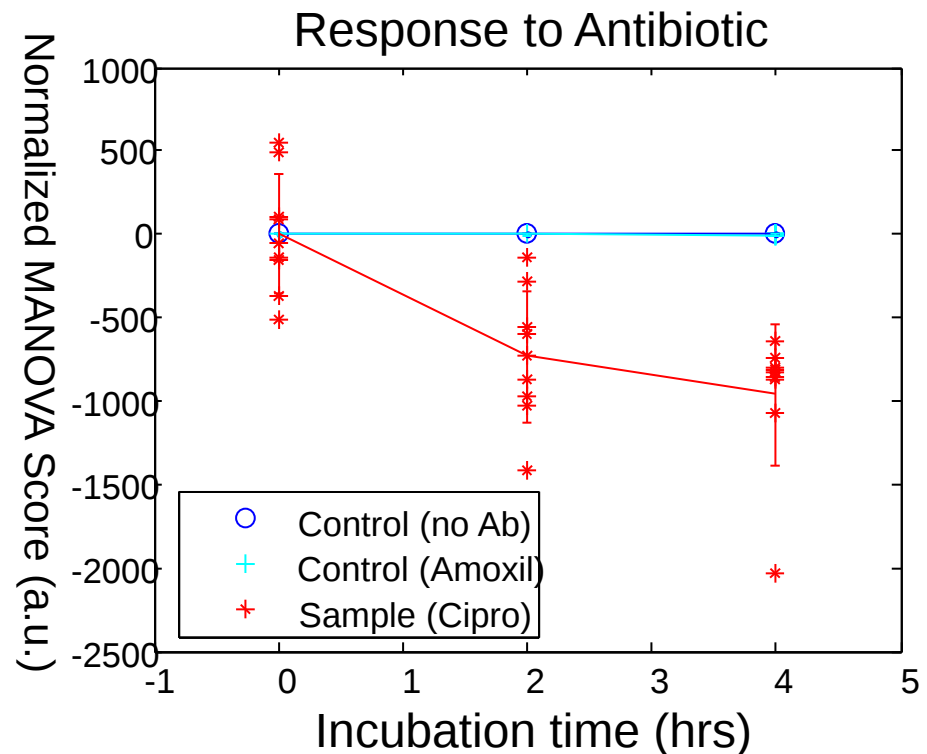


Classes	Correct Classification
3	28/30 (93%)
5	42/46 (91%)



3. Προσδιορισμός της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

- Ανάλυση
 - Principal component transformation
 - MANOVA
 - T-test
- Οι κατανομές διαφοροποιούνται μετά από 2-4 ώρες
- Αλλαγές στη δομή των βακτηρίων;;;



Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων Surface Plasmon Resonance

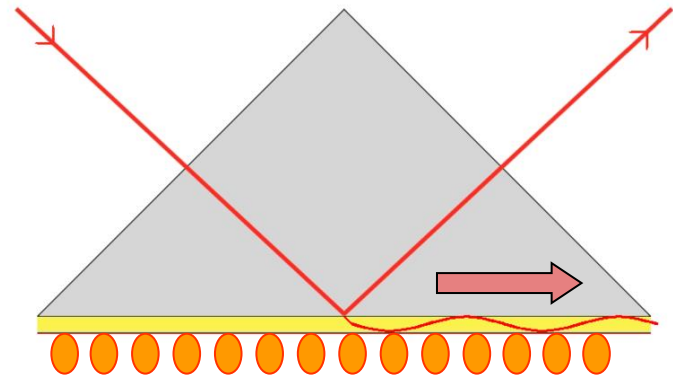
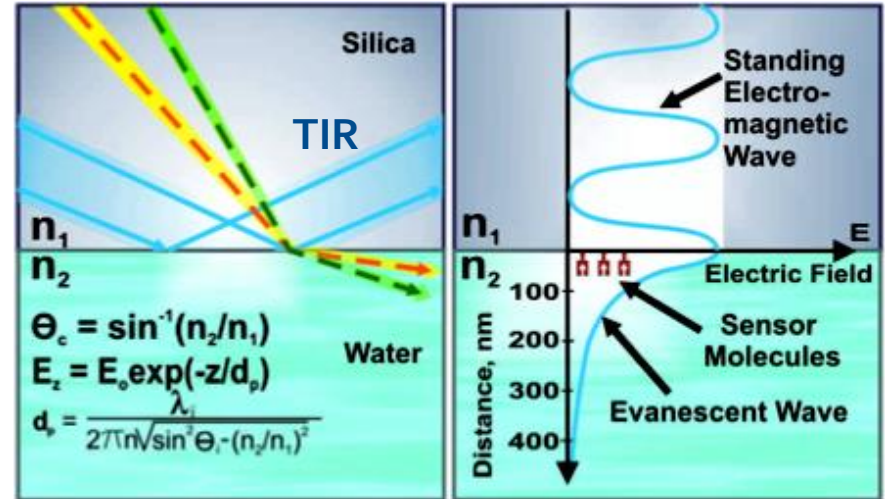


• Κύματα επιφανειακών πλασμονίων

- Μπορούν να παραχθούν οπτικά σε μεγάλες (bulk) επιφάνειες στις διεπαφές διηλεκτρικού-μετάλλου
- Χρειάζεται συγκεκριμένη γεωμετρία διέγερσης για να παραχθεί τέτοιο κύμα
- Το κύμα χαρακτηρίζεται από ένα κυματοδιάνυσμα $k(sp)$.

$$k(sp) = kn \sin(\theta)$$

- όπου $k(sp)$ είναι το κυματοδιάνυσμα του κύματος επιφανειακών πλασμονίων και $k=(2\pi/\lambda)$ του φωτός



Kretschmann configuration

Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων Surface Plasmon Resonance



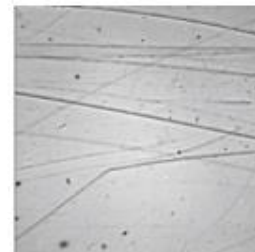
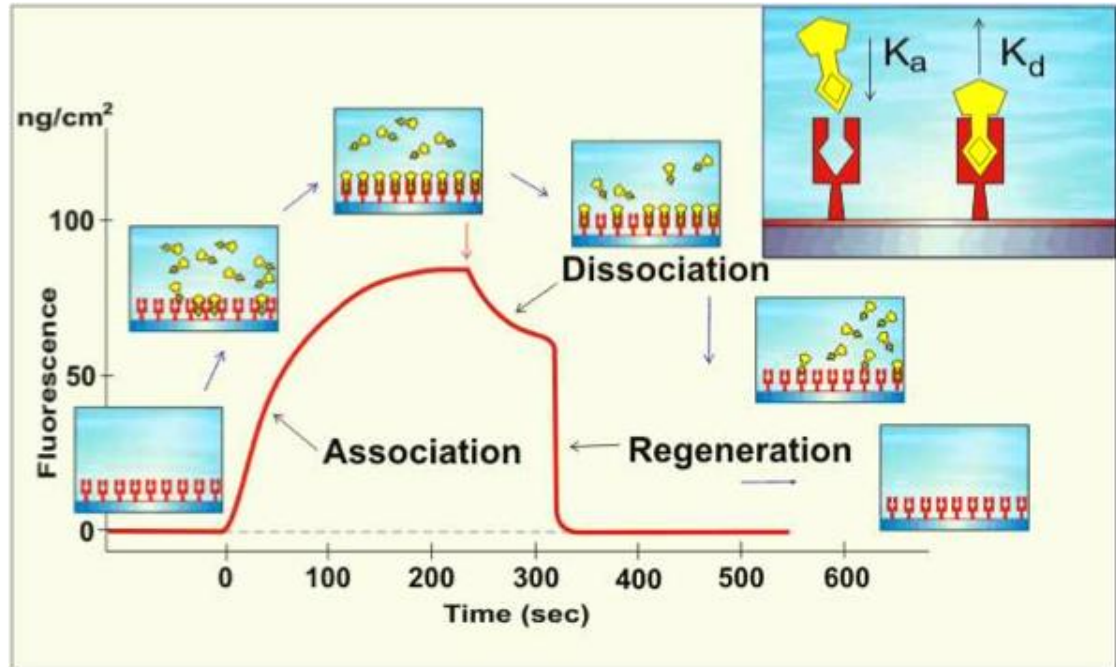
- Φθορισμός Ολικής Ανάκλασης (Total Internal Reflection Fluorescence - TIRF)

- **Πλεονεκτήματα**

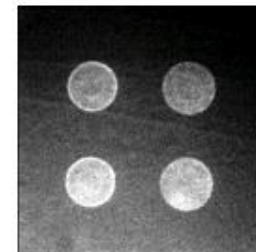
- Ψηλός λόγος σήματος προς θόρυβο (πολύ λίγη δευτεροβάθμια εκπομπή από το διάλυμα)
- Εξαιρετικά εύρωστη, χαμηλού κόστους, φορητή

- **Μειονεκτήματα**

- Ανάγκη για βιοδείκτες (tags)
- Υψηλή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (εξ ου και δεν είναι εύκολο να πετύχουμε πολυπλεκτικότητα)



Epifluorescence



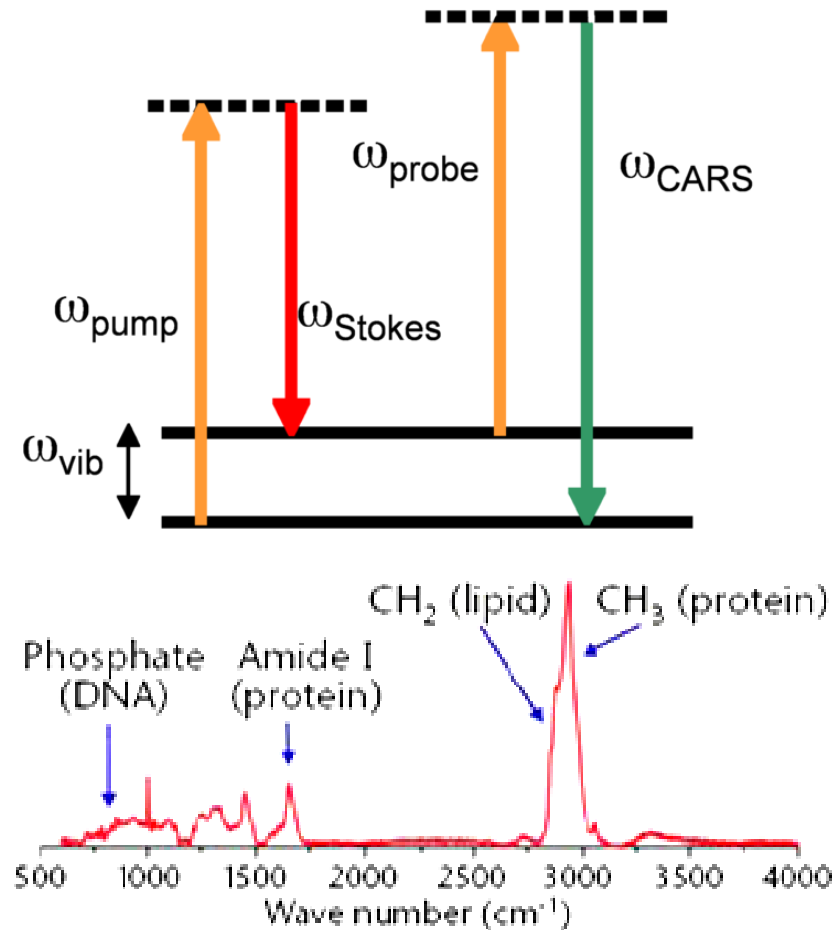
TIRF



- Σύμφωνη Anti-Stokes φασματοσκοπία Raman (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy - CARS)

- Μη-γραμμική Raman
- Παρουσιάζεται μόνο στο εστιακό σημείο της ακτίνας
- $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$
- Το σήμα είναι σύμφωνο (coherent)

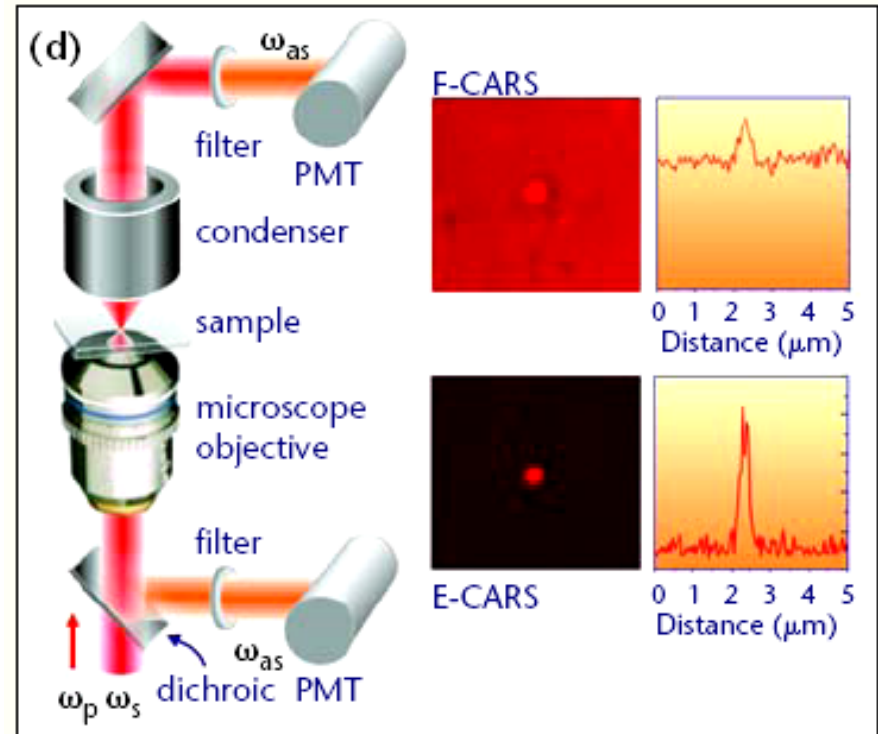
$$P_{as} = \chi^{(3)} E_p^2 E_s^* \quad I \propto (I_p)^2 I_s$$





• Μικροσκοπία CARS

- Δύο λέιζερ σε διαφορετικές συχνότητες
- ps ή fs παλμούς με υψηλή ένταση κορυφής
- Δύο ακτίνες που χωρικά επικαλύπτονται στα σημεία εστίασης
- Δύο ακτίνες που επικαλύπτονται χρονικά





• Πλεονεκτήματα

- Ενδογενής δονητική αντίθεση
- Πολύ κατευθυντικό σήμα → Ευαισθησία
- Απαιτεί μέτρια μέση ένταση → καλό για βιολογικά δείγματα
- Δημιουργείται μόνο στο εστιακό σημείο → δυνατότητα 3d τομών
- Ψηλότερη συχνότητα από τον φθορισμό → ανιχνεύεται εύκολα ακόμα και στην παρουσία ισχυρού φθορισμού
- NIR
 - Μικρή σκέδαση → βαθιά διείσδυση στους ιστούς
 - Μικρή απορρόφηση → λιγότερες φωτοβλάβες

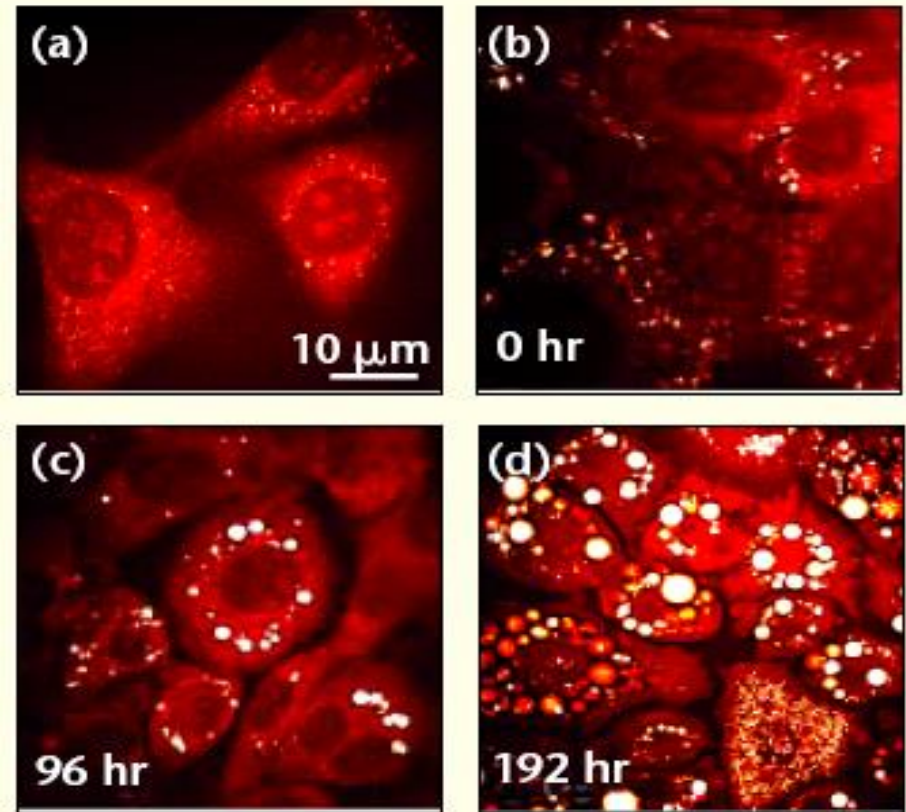
• Μειονεκτήματα

- Μη συντονισμένο σήμα από τον περιβάλλοντα χώρο πολύ ισχυρό
- Ακριβές πηγές λέιζερ
- Πρέπει να γνωρίζεις εκ των προτέρων την δονητική ζώνη ενδιαφέροντος
- Επί του παρόντος περιορίζεται από τις δυνατότητες ρύθμισης του μήκους κύματος (tunability) των πηγών – βελτιώνεται καθώς βελτιώνονται και οι πηγές λέιζερ



• Εφαρμογές

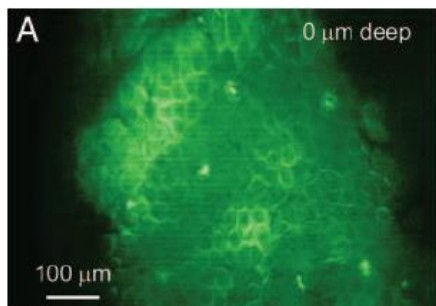
- Ευαισθησία στα λιπίδια
- Λιπιδική διπλοστοιβάδα, λεπτά αντικείμενα, μικρά αντικείμενα
- Γρήγορη δυναμική παρακολούθηση διεργασιών σε ζωντανά κύτταρα
- In vivo δυνατότητες



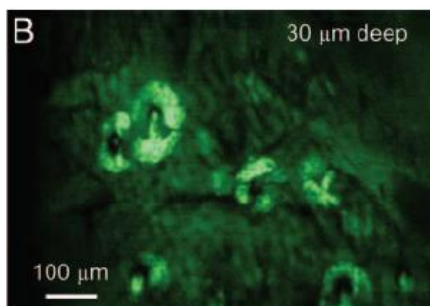


Images of a hairless mouse ear

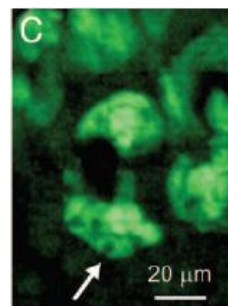
Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy C. Evans et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (46) 16807 (2005)



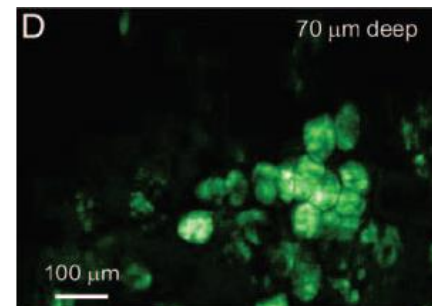
Stratum corneum with bright signals from the lamellar lipid intercellular space that surrounds the polygonal corneocytes. Bright punctuated dots are ducts of sebaceous glands.



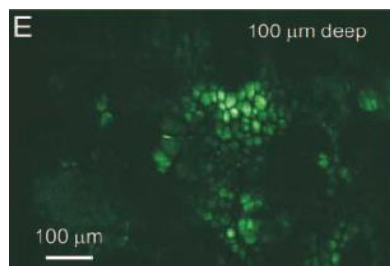
Sebaceous glands at ~30 μm from skin surface.



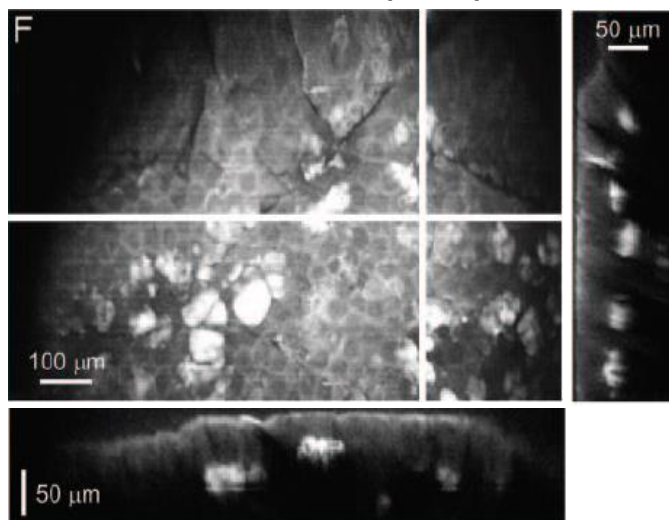
Individual cells of the gland compartment can be recognized, with nuclei visible as dark holes (arrow).



Adipocytes of the dermis at ~60 μm from skin surface.

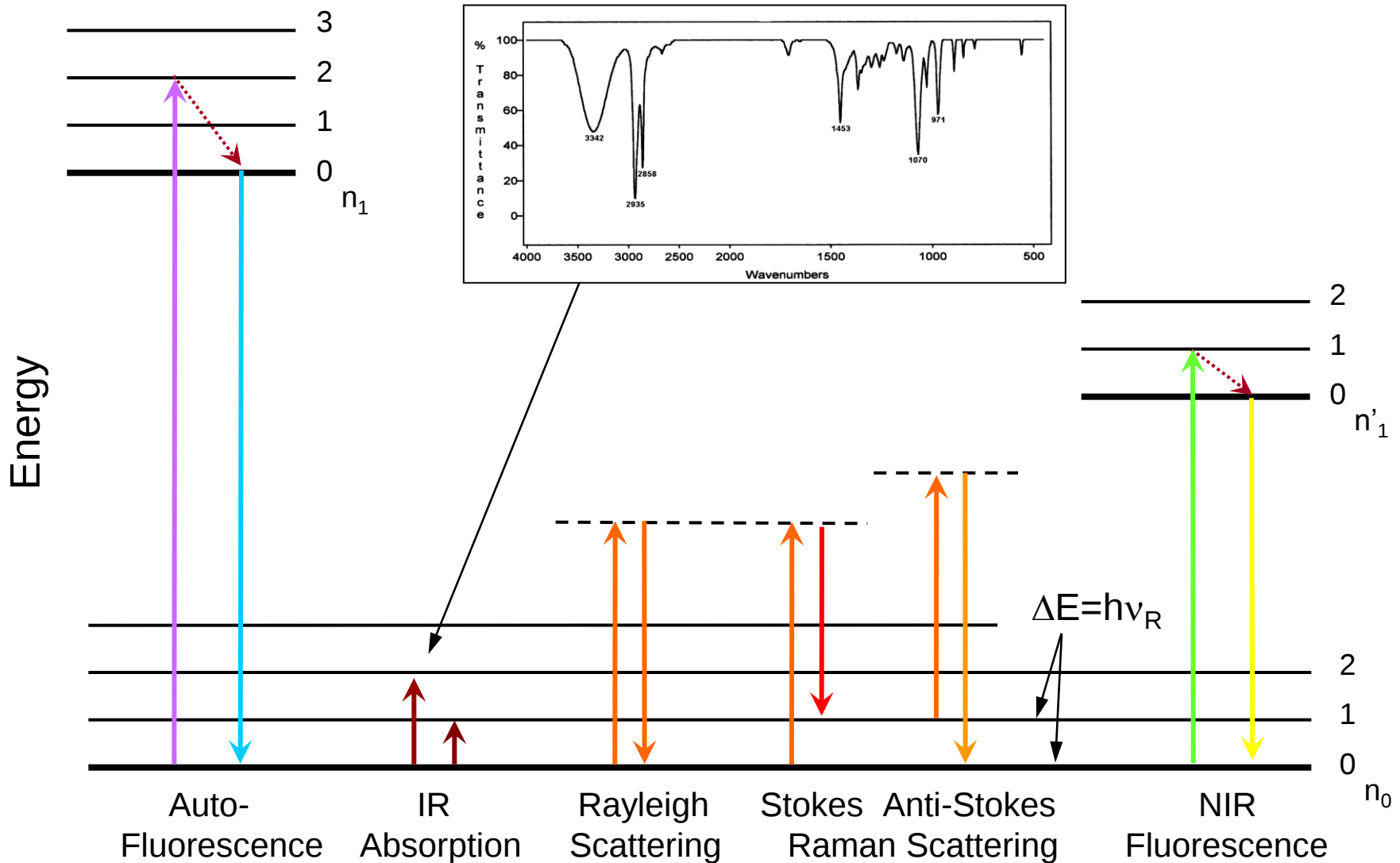


Adipocytes of the subcutaneous layer at a depth of ~100 μm.



2D projection of 60 depth-resolved slices separated by 2 μm. Panels to the right and under *F* show the *yz* and *xz* cross sections taken at the white lines, respectively.

Φωτο-Μοριακές Αλληλεπιδράσεις

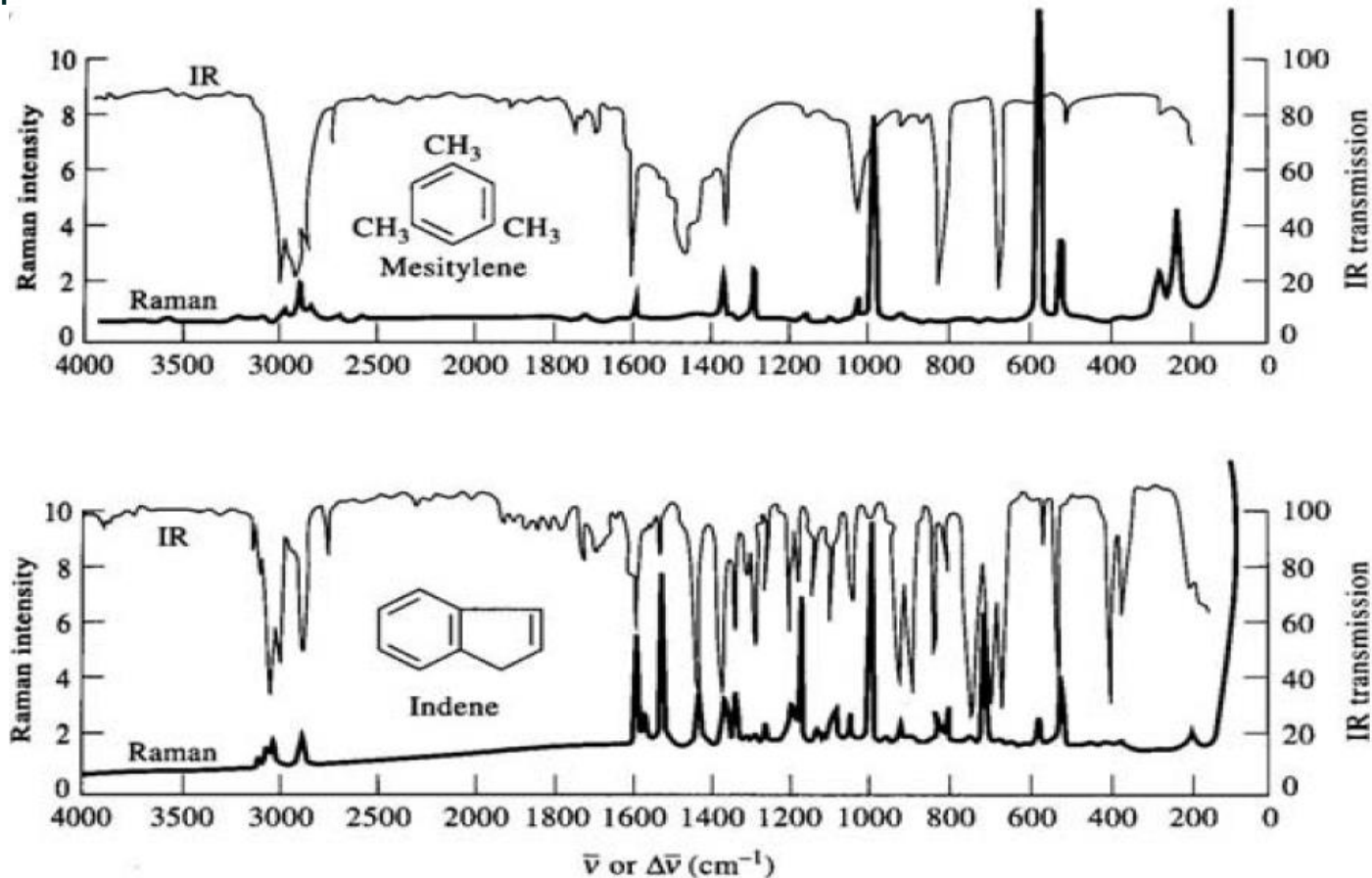


Υπέρυθρη Απορρόφηση



- IR

- Μία απορροφητική διαδικασία (αντί της Raman, η οποία είναι μια διαδικασία σκέδασης)
- Άμεσα διερευνά τις μοριακές δονήσεις





- **IR και Raman είναι συμπληρωματικές τεχνικές**
 - Συμμετρικά μόρια έχουν δονητικά επίπεδα τα οποία ενεργοποιούνται είτε στη Raman είτε στην IR αλλά όχι και στις δύο (π.χ. benzene)
 - Μόρια χωρίς συμμετρία ενεργοποιούνται και στις δύο μεθόδους

(N)IR absorption	Raman
Absorption	Scattering
Requires change in dipole moment (No symmetric stretches observed, No diatomic activity)	Requires a change in polarizability with vibrational motion
Only observed in NIR and IR spectral regions	Occurs at all wavelengths
Strong signal	Weak signal
High water absorption	Water not a problem
Broad spectral features	Sharp spectral features for molecular fingerprinting
Requires some sample preparation in most cases	Does not require sample preparation

Υπέρυθρη Απορρόφηση



	Near-IR	Mid-IR	Raman
Spectral range (cm^{-1})	13,300–3300	4000–400	4000–50
Analysis of:			
Gases	No	Yes	Yes
Liquids	Yes	Yes	Yes
Solids	Yes	Yes	Yes
Aqueous systems	Difficult	Very difficult	Yes
Macroscopic samples	Yes	Yes	Yes
Microscopic samples	No	Yes	Yes
Signal	Strong	Strong	Weak
Sampling	Easy	Difficult	Easy
Through glass windows	Yes	No	Yes
In situ	No	No	Yes
Quantitative	Yes	Difficult	Yes
Noninvasive	Yes	No	Yes
Fiber optic interfacing	Yes	No	Yes
Information content	Low. Limited to O–H, N–H, and C–H vibrations	High	High
Reaction monitoring and modeling	Requires chemometrics	Yes	Yes



- **Υπέρυθρη Απορρόφηση Μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared (FTIR) Absorption)**

- Συμβολομετρική (interferometric) μέτρηση αντί με φασματογράφο
- συμβολόμετρο
 - Ένας οπτικός μετασχηματισμού Fourier του εκπεμπόμενου φωτός
 - Διαμορφώνει το εκπεμπόμενο φως → ένα συμβολόγραμμα (interferogram) που έχει όλες τις IR συχνότητες κωδικοποιημένες σε αυτό
- Πλεονεκτήματα
 - Το σύνολο του υπέρυθρου φάσματος μετράται σε υψηλή ταχύτητα
 - Η φασματική περιοχή συνεχώς βαθμονομείται (calibrated) με λέιζερ HeNe
 - Γρήγορες, εξαιρετικά ακριβείς μετρήσεις
- Συμβολόμετρο Michelson → Διάλεξη OCT

