

Raman Spectroscopie

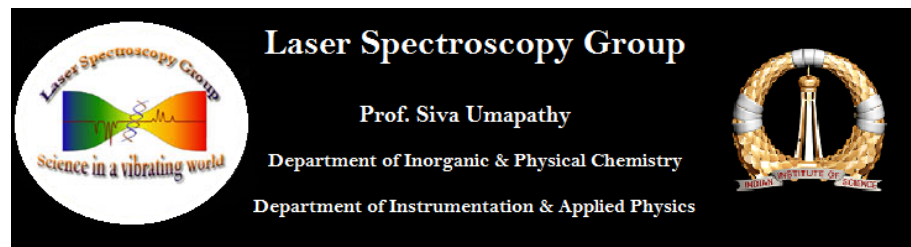
PUOZ cursus 22 nov 2016

Freek Ariese

Biophotonics & Medical Imaging

LaserLaB VU Amsterdam

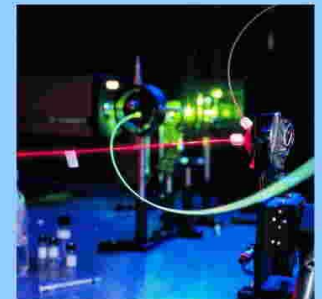
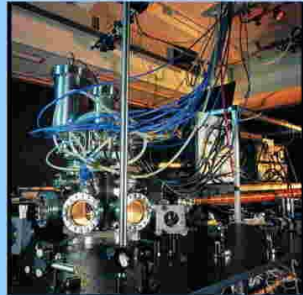
Indian Institute of Science
Bangalore, India



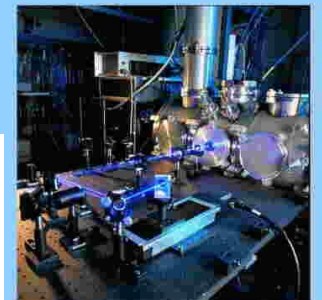
LaserLaB Amsterdam

Cross-disciplinary Research Institute between two universities, ca. 150 FTE

- Physics, biophysics, photovoltaics, medical physics
- Chemistry (physical chemistry, photochemistry, **analytical spectroscopy**)
- Biology, photosynthesis
- Academic hospitals (optical diagnosis)



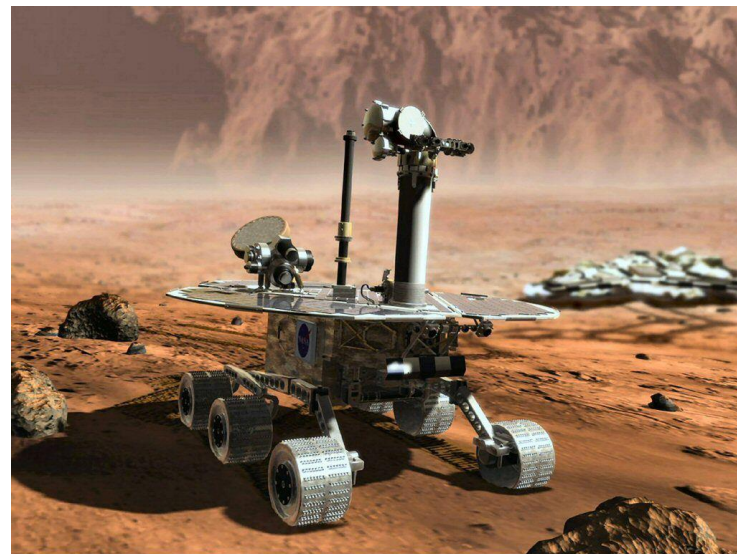
LASERLAB
Amsterdam



Our interests: (bio)molecular spectroscopy

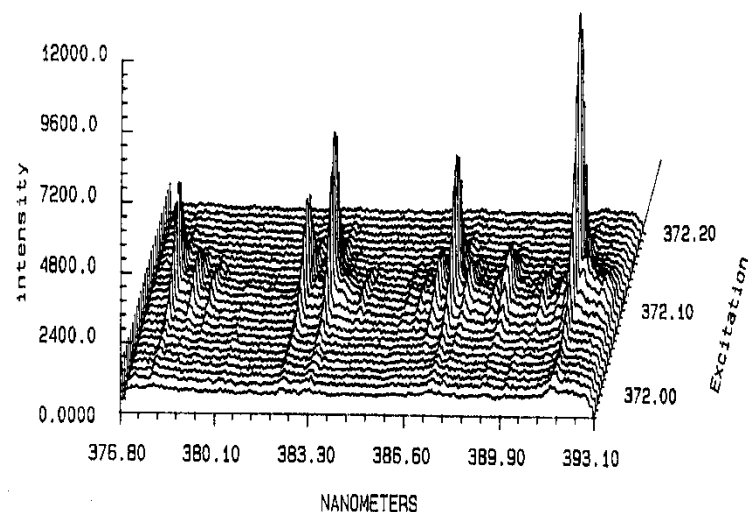
Raman Spectroscopy

Resonance Raman at flexible wavelengths
Surface-enhanced Raman
Developing Raman modes for biomarkers on Mars
Stimulated Raman imaging
Depth analysis; time-resolved Raman



Fluorescence & Phosphorescence

Low-temperature fluorescence
Chiral phosphorescence
Lifetime measurements, proton transfer



Spectroscopy at the nano-scale
Coupling with atomic force microscopy (AFM)
Scanning near-field optical spectroscopy

Applied Spectroscopy
Environmental analysis
Carcinogen-DNA reactions
Dyes, microplastics, explosives.....
Coupling to separations

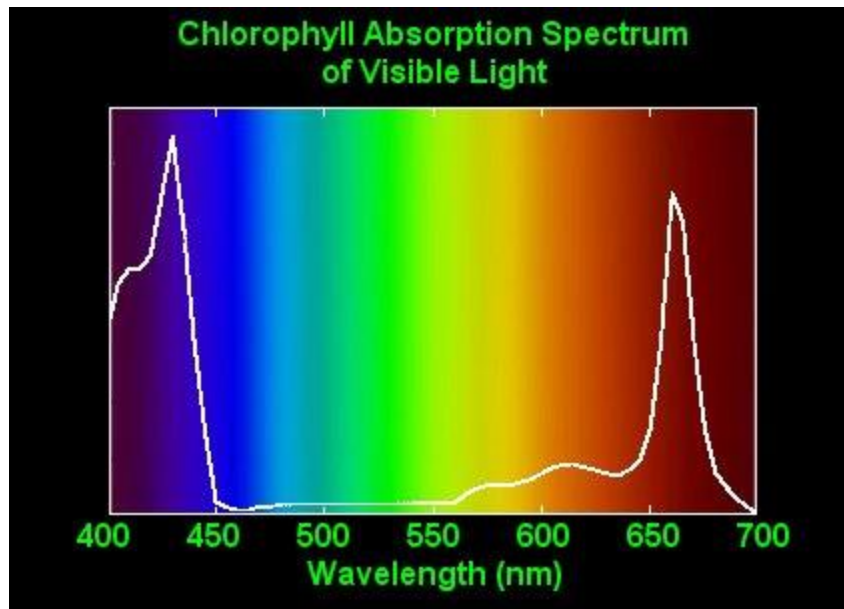
INHOUD

- Introductie; vibraties, IR en Raman spectroscopie
Voorbeelden van (conventionele) Raman toepassingen
- Resonantie Raman (RRS); fluorescentie onderdrukking
- Raman diepte analyse
- Farmaceutische toepassingen
- Conclusies

Analyse gebaseerd op UV-vis absorptie en/of fluorescentie

- UV-vis absorptie zeer algemeen toepasbaar. Eventueel kunnen monsters/weefsels worden aangekleurd
- Fluorescentie kan zeer gevoelig zijn: emissie wordt waargenomen op een donkere achtergrond.
- Echter: de spectra zijn relatief breed, en dus minder geschikt voor molecuul-specifieke identificatie.
- Bij gebruik van labeling/staining krijgen we alleen **indirecte** informatie over de oorspronkelijke chemische samenstelling

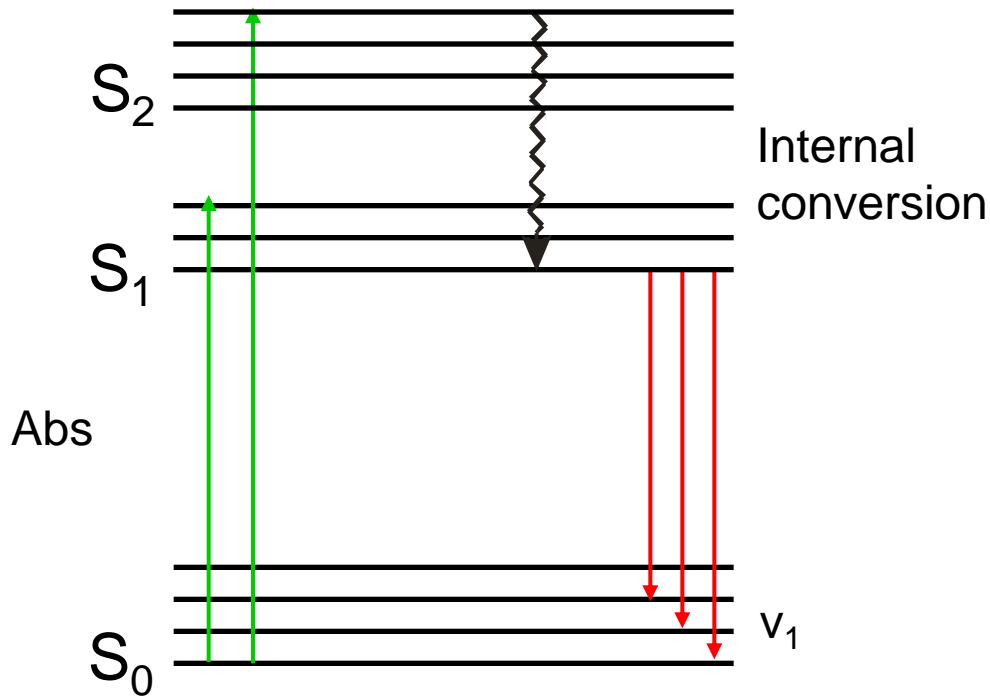
Voorbeeldspectrum: absorptiespectrum van chlorofyl



Spectra vertonen weinig fijnstructuur

Oorzaak van spectrale verbreding ??

Fluorescence

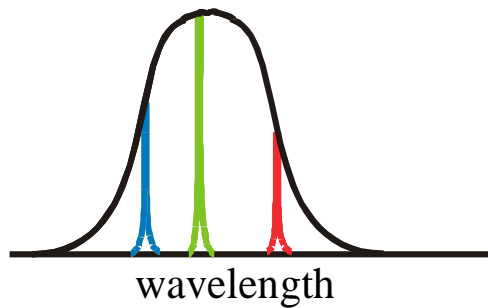
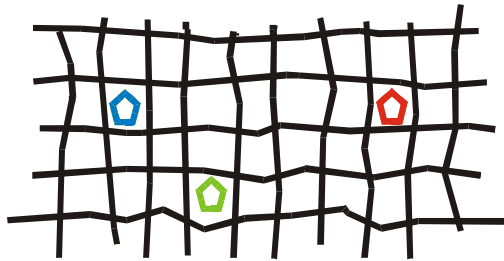


In UV-Vis absorptie en in fluorescentiespectra zien we meestal geen aparte vibratie-overgangen

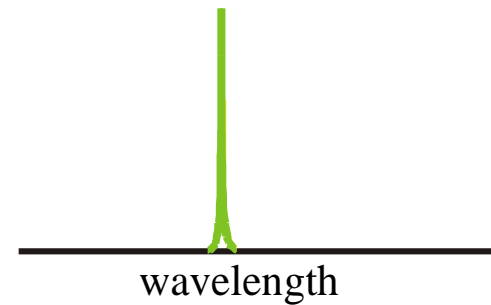
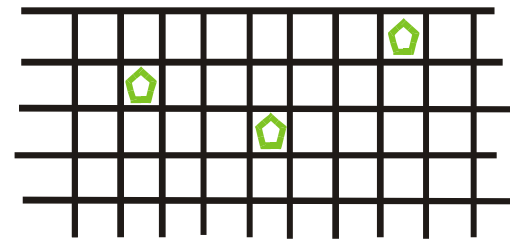
waarom niet?

Levensduur effecten?
Matrix effecten?
[instrumentele grenzen]

Oplosmiddel inhomogeniteit

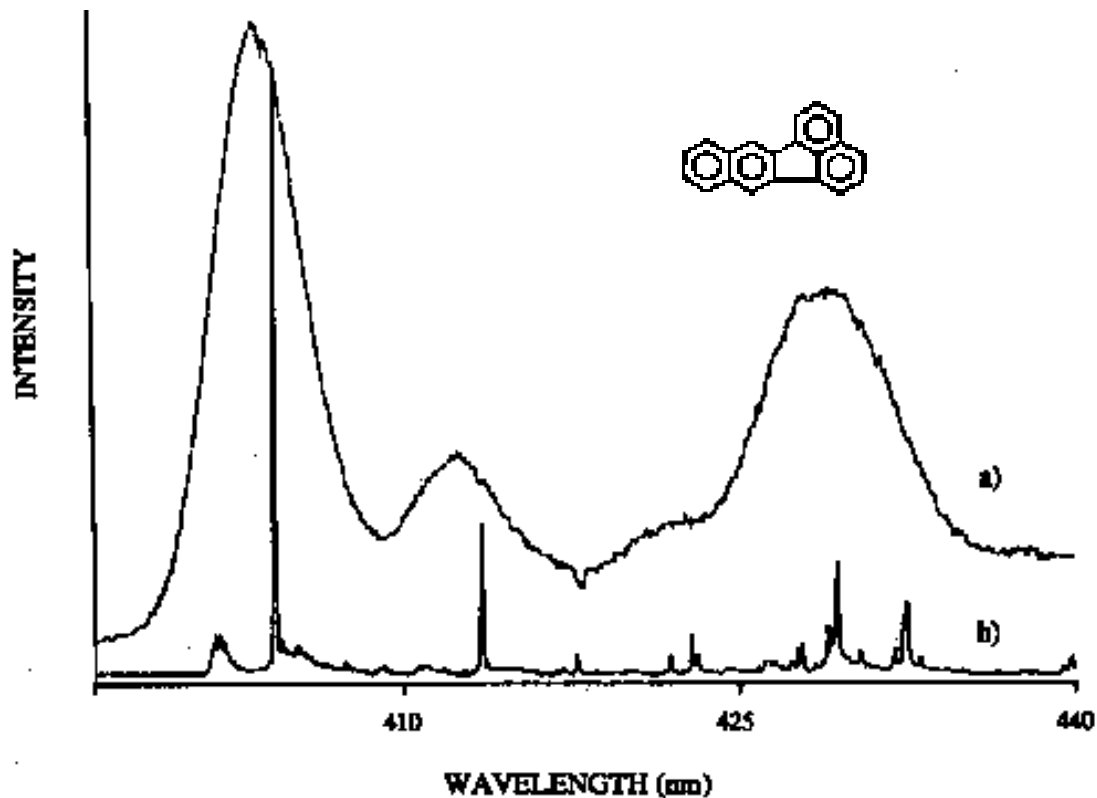


Amorphous environment



Crystalline environment

Voorbeeld: fluorescentie in een kristallijne omgeving benzo[*k*]fluorantheen in bevroren *n*-octaan

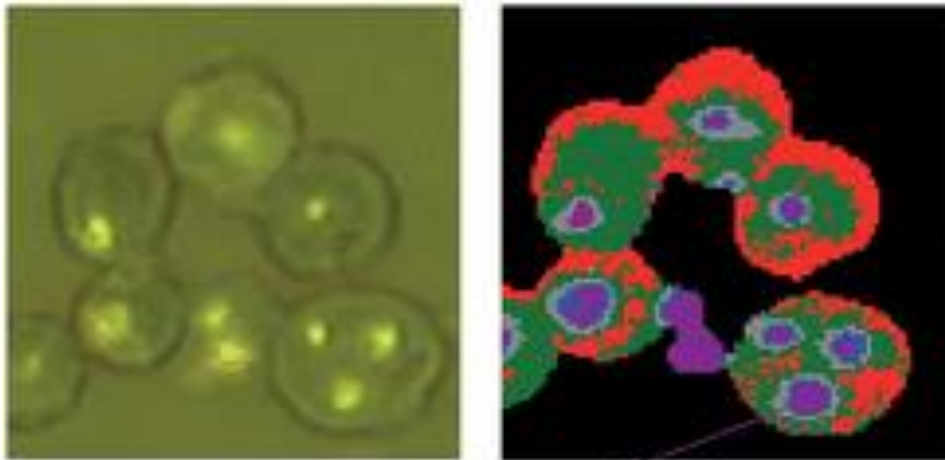


Room temp.

26 K; 100 x lower
concentration

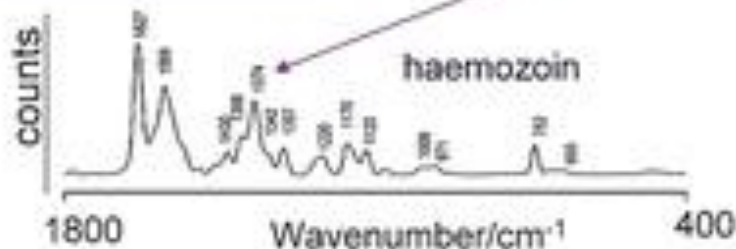
Hoe komen we aan meer molecuul-specifieke informatie?

- **Vibratie-technieken** hebben minder last van matrix-invloeden, en leveren veel specifiekere spectra. Die technieken kunnen gebruikt worden voor identificatie van homogene monsters, of in een **imaging-mode** voor niet-homogene monsters

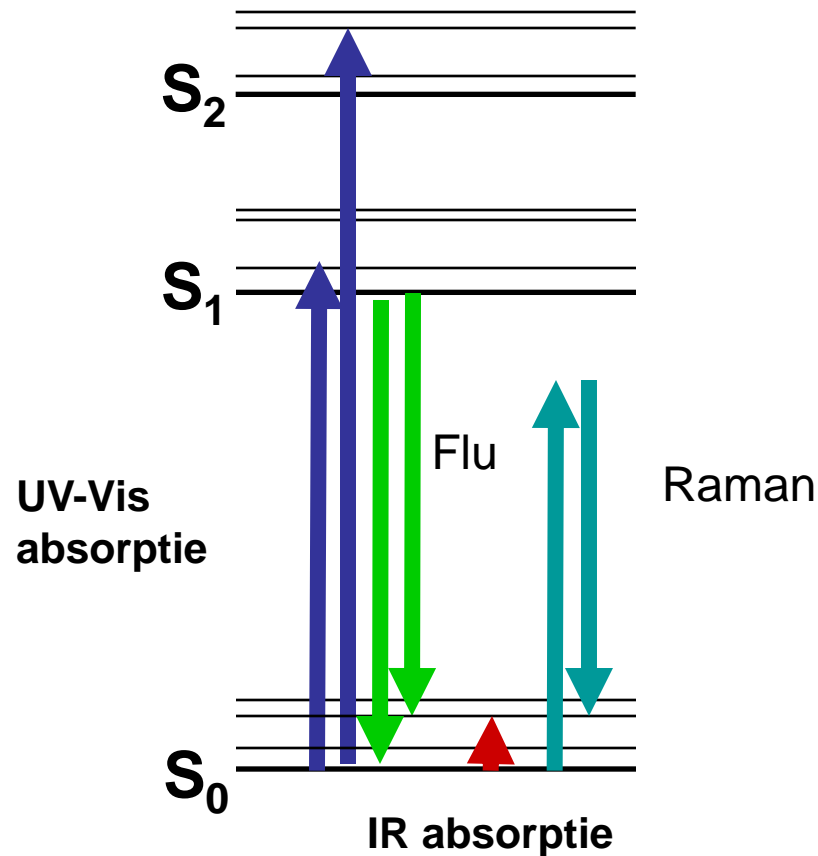


Malaria diagnostics:

Raman mapping of haemozoin in red blood cells



Jablonski diagram; elektronische en vibrationele overgangen



Elektronische overgangen zijn vaak erg breed als gevolg van de inhomogene omgeving (bv het oplosmiddel). UV-vis absorptie- en fluorescentie spectra zijn daarom minder geschikt voor moleculaire identificatie

Vibrationele overgangen zijn veel minder gevoelig voor de omgeving; **IR en Raman geven daarom veel scherpere, specifiekere spectra.**

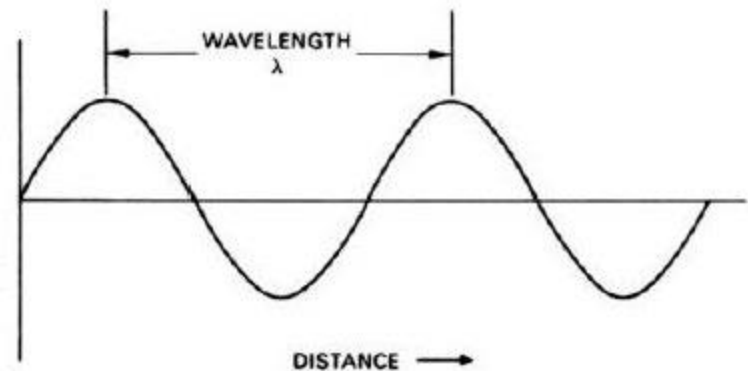
(uitzondering: groepen die H-bindingen kunnen vormen)

Spectroscopie

- Interactie elektromagnetische straling \leftrightarrow materie
- Diverse typen spectroscopie geven verschillende informatie; wat er gebeurt in het molecuul is met name afhankelijk van de **foton-energie**
- Spectroscopische technieken kunnen gebruikt worden om moleculen te **identificeren** (op grond van referentiespectra, tabellen of theoretische voorspellingen)
- Spectroscopische technieken zijn vaak ook geschikt voor **kwantificatie** (spectrometrie)
- Spectroscopische technieken geven vaak ook informatie over fysisch-chemische eigenschappen van moleculen en/of hun interactie met de omgeving

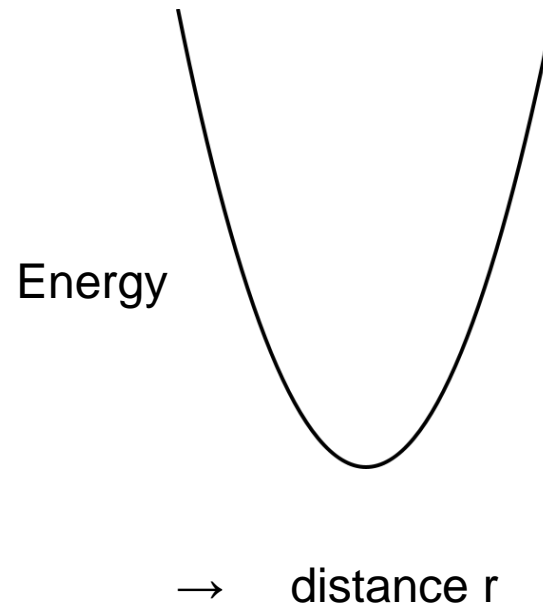
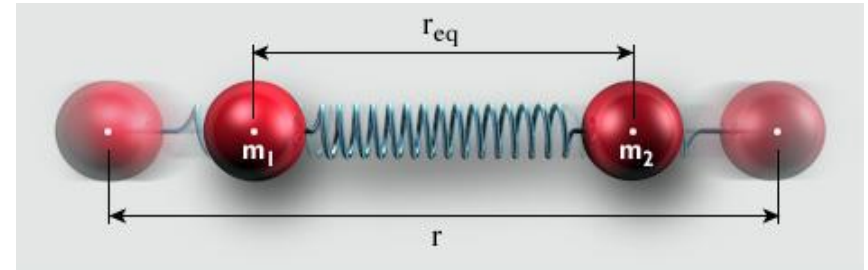
Eigenschappen licht

- Quantum mechanica essentieel, per molecuul is er meestal interactie met slechts 1 foton tegelijk
- Absorptie en emissie gekwantiseerd
- Golf/**deeltje** karakter licht
- lichtsnelheid c (m/s)
- frequentie ν (s^{-1})
- golflengte λ (m)
- richting; polarisatierichting
- In een ander medium verandert de golflengte, maar de energie/frequentie/golfgetal niet. Voor het molecuul is de energie veel relevanter !
- Energie per foton: $E = h\nu = hc/\lambda$ (Joule)
- Golfgetal (cm^{-1}) : $\bar{\nu} = 1/\lambda_0$ (neem hier de golflengte in cm, in vacuum)



Moleculaire vibraties; 2-atomig molecuul

- Model uit de klassieke mechanica: beschouw een chemische binding als een veer, die twee massa's (atomen) met elkaar verbindt
- Uitrekken of samendrukken veroorzaakt een tegenkracht die evenredig is met de uitwijking
- Bij benadering: harmonische oscillator



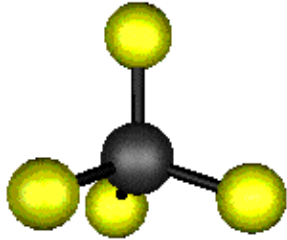
Vibratiefrekwentie 2-atomig molecuul

- Als zwaartepunt op zijn plaats blijft: lichtste atoom maakt de grootste bewegingen

$$\text{vibratiefrekwentie } \nu \text{ (Hz)} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 \times m_2}}$$

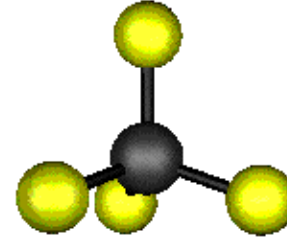
- Hogere bindingssterkte (dubbele/drievoudige binding): hogere frekwentie
- Lichtere atomen (H): hogere frekwentie

Vibraties van CF₄



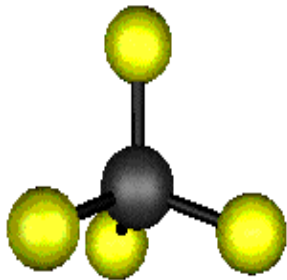
Symmetrische strek vibratie

908 cm⁻¹



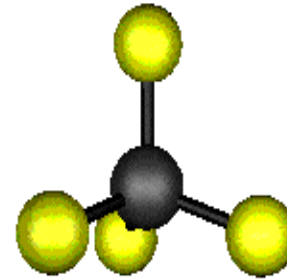
Asymmetrische strek vibratie

1283 cm⁻¹



Symmetrische buiging

434 cm⁻¹

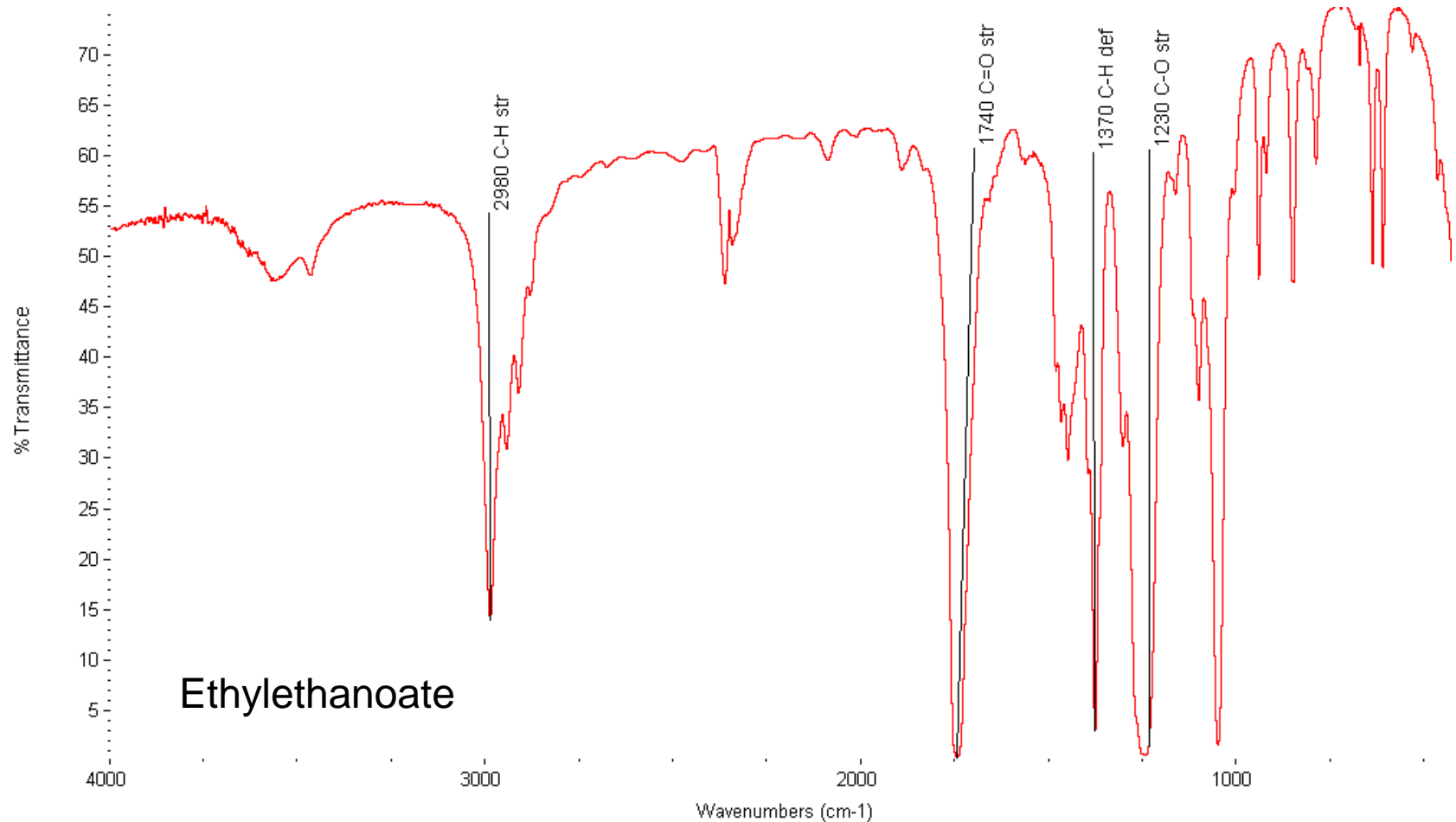


Asymmetrische buiging

631 cm⁻¹

Voorbeeld IR transmissie spectrum

Fingerprint of identificatie onbekende ?



Waar worden de grenzen links en rechts door bepaald?

Inelastische verstrooiing (scattering) ≠ absorptie/emissie

- Foton scattering betekent normaal gesproken een kortdurende vervorming van de elektronenwolk van het molecuul. Het verstrooide foton heeft dezelfde energie/frekwentie als voor de botsing, maar een andere richting (elastisch). Dit effect zorgt voor een blauwe hemel: de scattering efficiëntie neemt toe met v^4 of met λ^{-4})
- In 1923-1925 postuleerden theoretisch fysici (Smekal, Kramer, Heisenberg) dat foton scattering ook inelastisch zou kunnen gebeuren, met uitwisseling van energie met het molecuul
- Dat zou een verandering van de kwantumtoestand van het molecuul inhouden, maar vibraties werden toe nog niet genoemd

Inspiratie



De Indiase fysicus CV Raman bezocht conferenties in Europa en was gefascineerd door de blauwe tinten van de Middellandse Zee en van gletschers.

Aan boord van een schip kwam hij in discussie met andere fysici over de kleur van de zee.

Terug in India stichtte hij een researchgroep om verstrooiing te bestuderen

Sir Chandrasekhara Venkata Raman

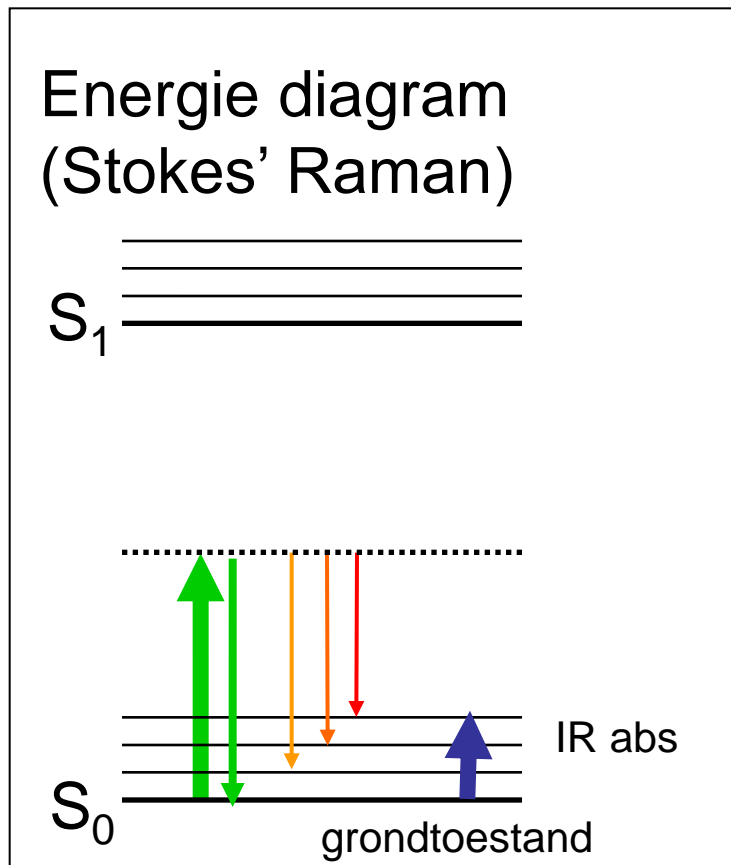
Nobel Prize Physics in 1930 "for his work on the scattering of light and for the discovery of the effect named after him"



Raman's meetopstelling bij het Indian Institute of Science, Bangalore

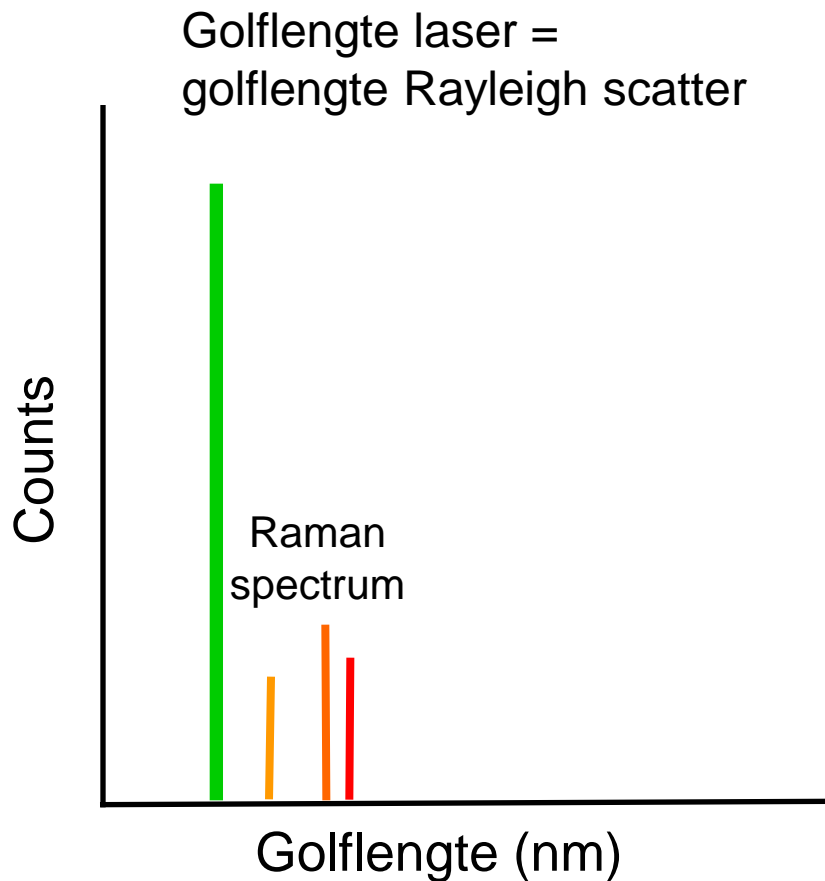


“Normale” Raman spectroscopie



- Als licht in botsing komt met moleculen kan het worden verstrooid (Rayleigh scatter, zelfde kleur)
- Nog zeldzamer: een gedeelte van de foton-energie wordt aan het molecuul overgedragen, dat daardoor (extra) gaat vibreren
- Het energieverval tussen het inkomend en uitgezonden foton komt precies overeen met een vibratiekwant
- Voorwaarde: tijdens de trilling moet de **polariseerbaarheid** veranderen

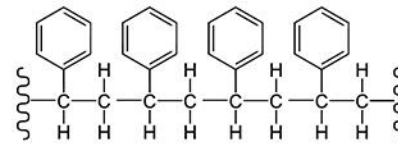
Raman spectrum



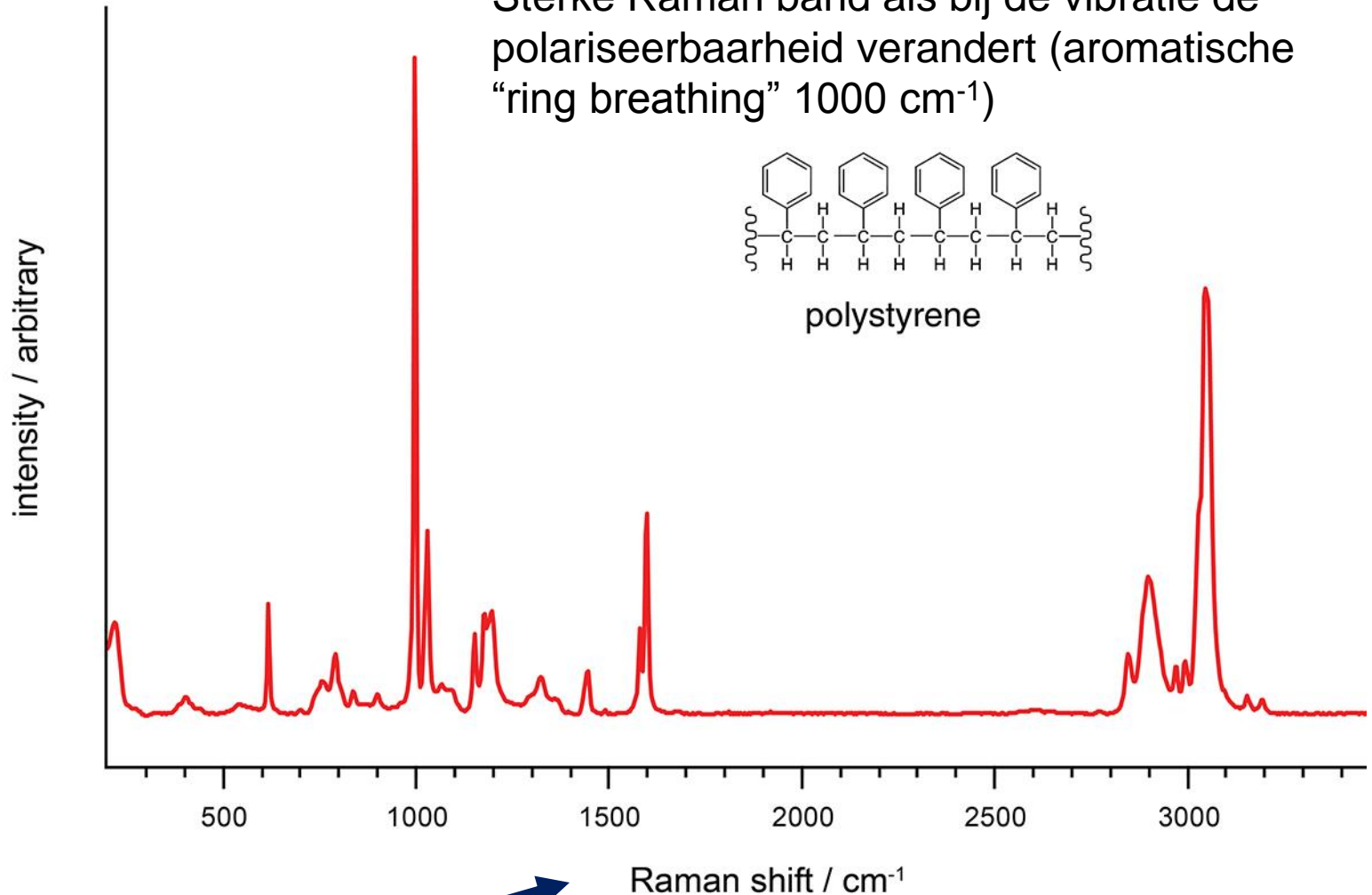
- Excitatie met bv groen licht (514.5 nm, Ar+ laser)
- Licht van de lasergolflengte (Rayleigh en reflecties) is te sterk en moet worden weggefilterd
- Kans van ca. 1 op 10^7 op inelastische scattering
- Energieverschil tussen de Ramanlijnen en de laser levert een Raman vibratiespectrum

Voorbeeldspectrum: polystyreen

Sterke Raman band als bij de vibratie de polariseerbaarheid verandert (aromatische “ring breathing” 1000 cm^{-1})



polystyrene



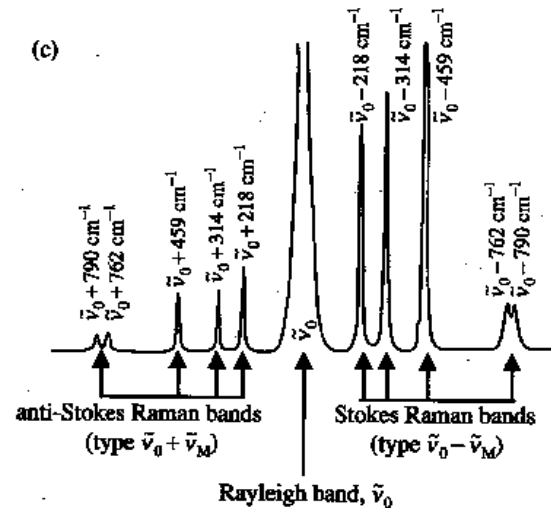
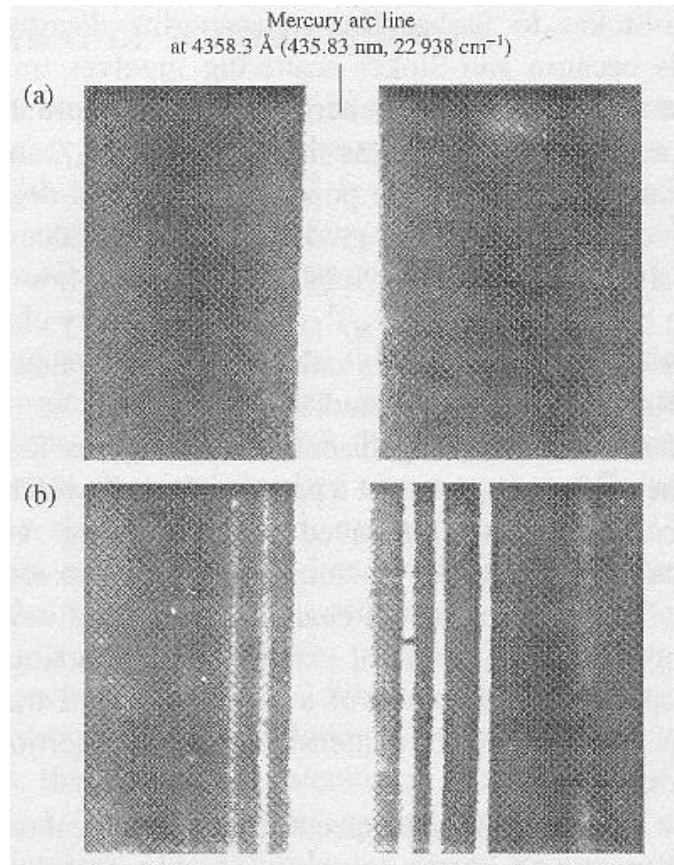
relatieve energie-as



Raman shift / cm^{-1}

Een van Raman's eerste Raman spectra; CCl_4

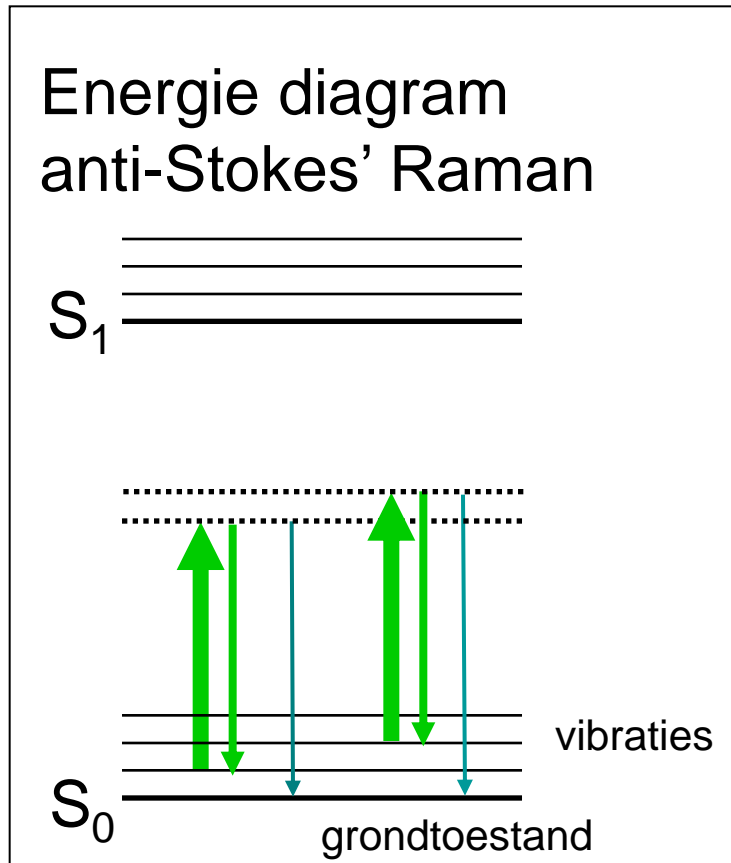
Stokes en anti-Stokes lijnen; gemeten met Hg lamp en fotografische plaat



(a) Spectrum of a mercury arc in the region of 4358.3 Å (435.83 nm, $\tilde{\nu}_0 = 22,938 \text{ cm}^{-1}$) (b) Rayleigh and Raman spectra of carbon tetrachloride (liquid) excited by mercury arc radiation, $\tilde{\nu}_0 = 22,938 \text{ cm}^{-1}$ (c) Rayleigh and Raman spectra of carbon tetrachloride (liquid) excited by an argon ion laser, $\tilde{\nu}_0 = 20,487 \text{ cm}^{-1}$ (4879.9 Å, 487.99 nm) and recorded directly. The spectra in (a) and (b) are facsimiles of spectra reported by Raman and Krishnan⁴ and were photographically recorded.

Hg lijn, 453.83 nm

Anti-Stokes Raman spectroscopie



- Een kleine fractie van de moleculen bevindt zich reeds in aangeslagen vibratietoestand (Boltzmann)
- Na excitatie met licht keert molecuul terug naar de grondtoestand
- Het energieverschil tussen het inkomend en uitgezonden foton komt precies overeen met een verloren vibratiekwant
- Zwakker dan Stokes' Raman, maar wel waar te nemen voor laag-energetische vibraties

Vibratiespectroscopie

- Een molecuul met N atomen kent in principe $3N - 6$ vibraties (uitzondering: $3N - 5$ voor lineaire moleculen)
- Ieder molecuul heeft zijn eigen vibratiespectrum; aan de hand van het spectrum kunnen we een stof identificeren (met behulp van een referentiespectrum of moleculaire berekeningen)

Vaak bevat het Raman spectrum ook informatie over de interactie met de omgeving, redox toestand, kristalvorm, etc

Raman vs IR absorptie

Beide technieken kunnen we gebruiken om moleculaire vibraties te bestuderen, maar de selectieregels zijn verschillend.

IR vereist een veranderend dipoolmoment; Raman vereist een veranderende polariseerbaarheid; sterke Ramanbanden bij “losgebonden elektronen” bv dubbele bindingen, aromatische ringen, grotere atomen

Sommige banden zijn sterk in IR en zwak in Raman of omgekeerd:
complementaire methodes

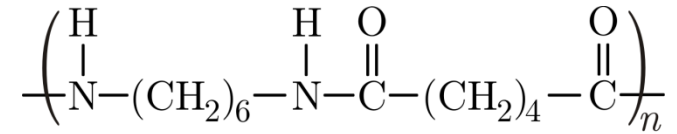
Bij Raman gebruiken we zichtbaar-licht fotonen (scherper focus, $\approx \lambda$)

Raman geschikter voor ruwe oppervlakken, geen voorbereiding nodig.

Water absorbeert sterk in IR, maar geeft een vrij zwak Raman signaal

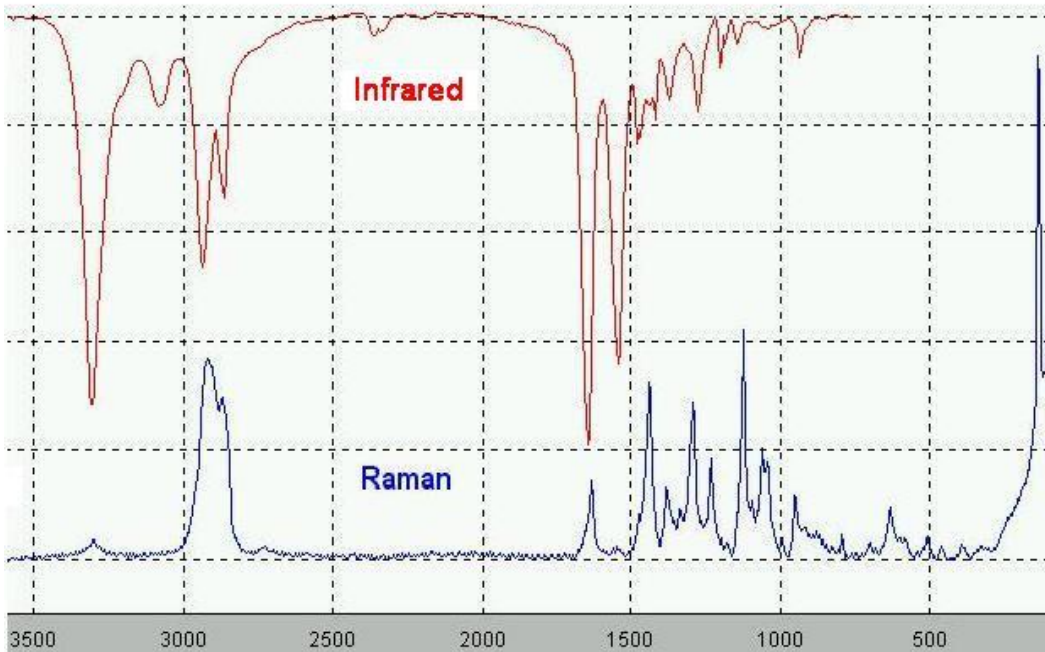
Infrarood versus Raman spectrum

absorptie versus scattering



Nylon 66

Infrared and Raman Spectra of Polyamide (Nylon 66)



Andere selectieregels, daarom totaal andere piekverhoudingen.

Complementaire technieken

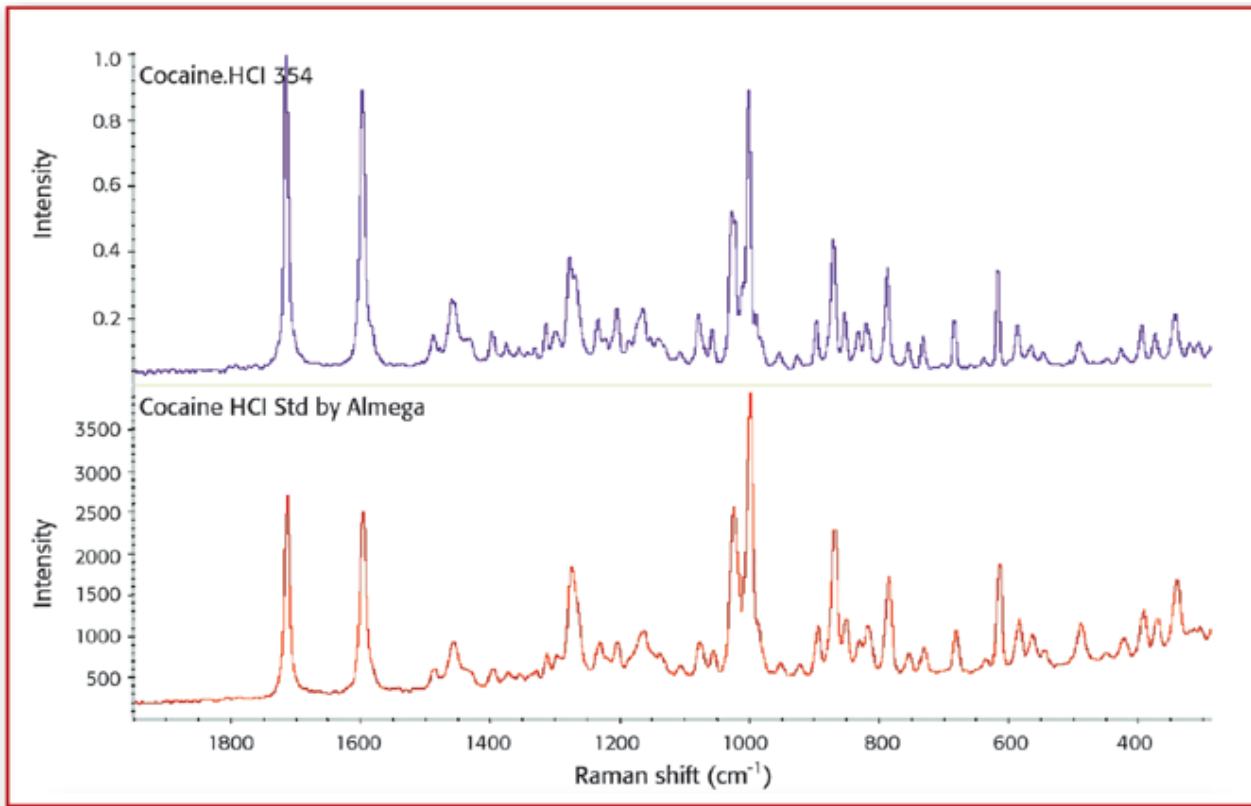
Raman effect voldoende gevoelig?

Aanvankelijk probleem: Het Raman effect is erg onwaarschijnlijk (zeer kleine moleculaire cross-section) en daardoor **ontzettend** zwak. De eerste halve eeuw waren er weinig praktische toepassingen

Enorme vlucht sinds de uitvinding van de laser, en de toenemende robuustheid, betaalbaarheid, gebruikersvriendelijkheid van lasers. Ook steeds gevoeliger detectoren en betere filters en software

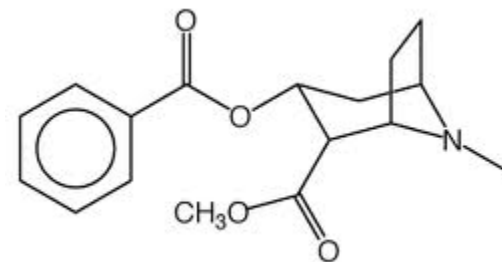
Voorbeelden: chemische analyse, geologie, proces-analyse, forensisch onderzoek, douane, kunst

Raman identificatie: narcotica



Verdacht wit poeder ??

Cocaine standaard



Raman detectie van nep-ivoor

(niet invasief is niet alleen in
het ziekenhuis een voordeel)

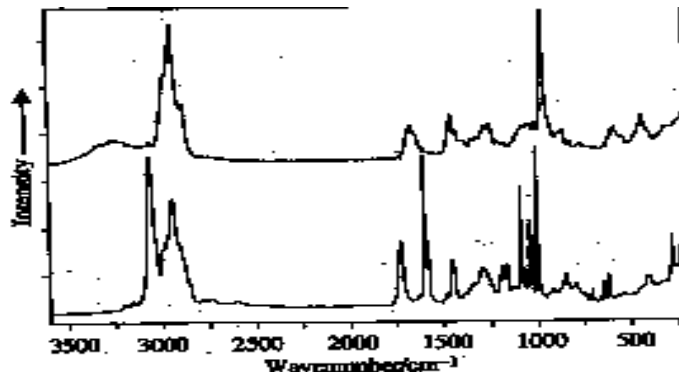
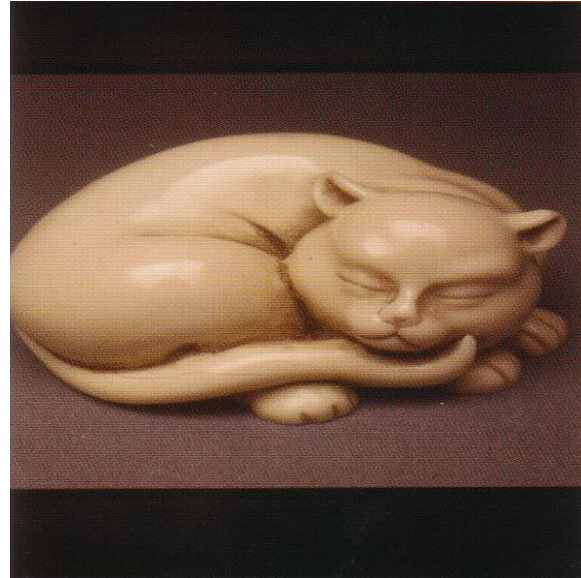
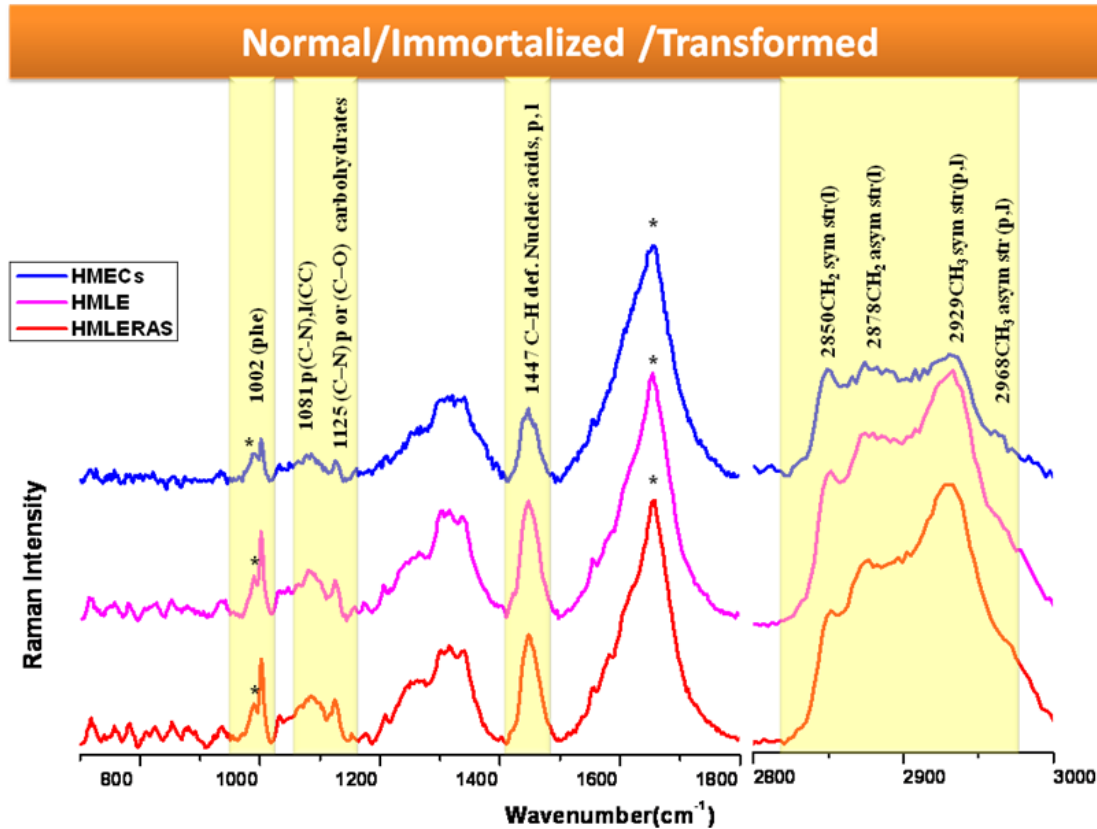


Figure 16.22 FT-Raman spectra of genuine ivory, top, and the carved cat from Figure 16.21, bottom; clearly, the cat is not ivory – bands at 3060, 1600, 1580 and 1003 cm^{-1} are characteristic of an aromatic ring compound and that at 1725 cm^{-1} is an ester. The strong band at 1086 cm^{-1} is calcite. The 'ivory cat' is therefore deemed to be a poly(methylmethacrylate)/polystyrene composite to which calcite has been added in simulation of the density, texture and appearance of ivory.

Echt ivoor

Kat spectrum: PMMA,
polystyreen, calciet

Raman diagnose voor borstkanker?



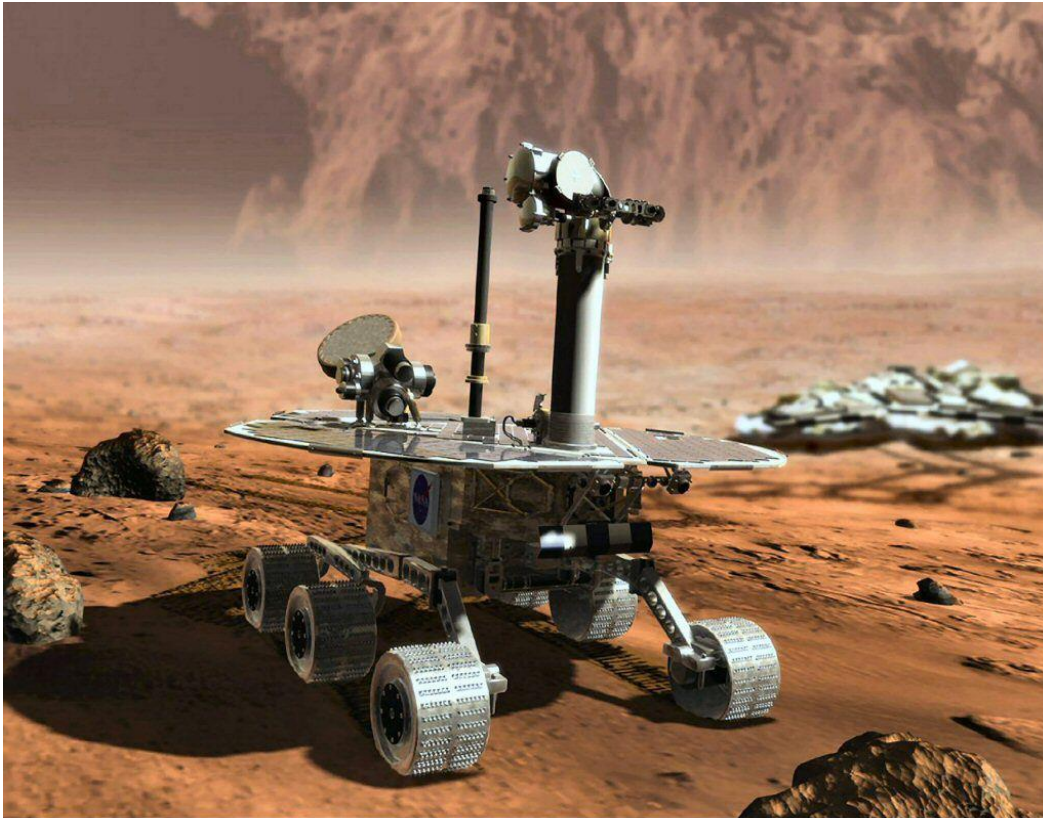
Biochemische samenstelling van gezonde en kankercellen is **grotendeels hetzelfde**

Kleine verschillen in relatieve piekintensiteiten (bv lipid/protein ratio) kunnen nuttig zijn voor diagnose

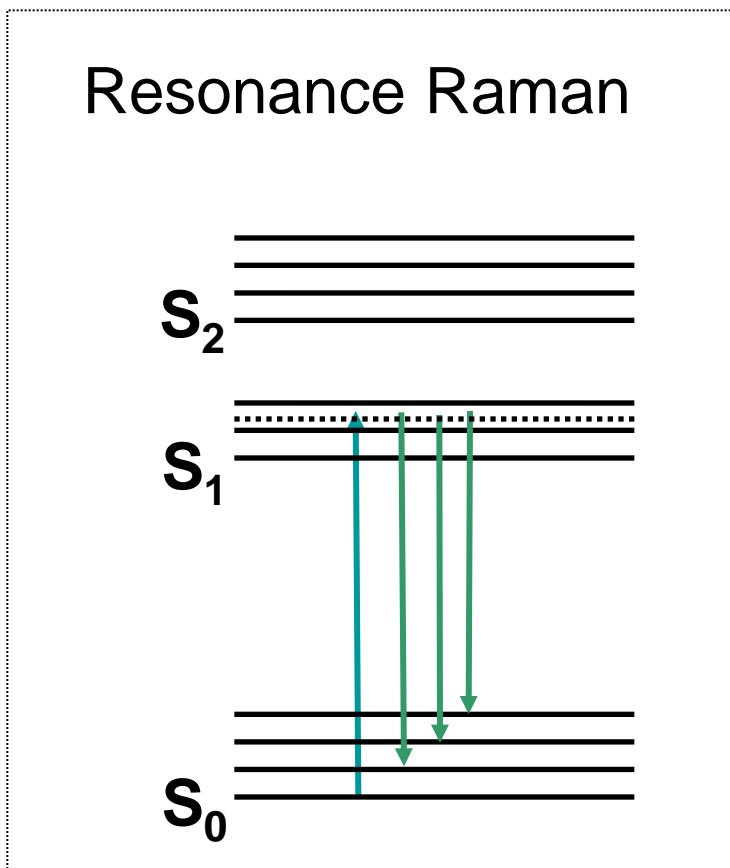
Raman spectroscopie op Mars?

Zowel ESA als NASA lanceren in 2020 een Raman spectrometer

Uitdagingen: gevoeligheid, selectiviteit tov de matrix
Sporen van leven zijn aan het oppervlak niet te verwachten



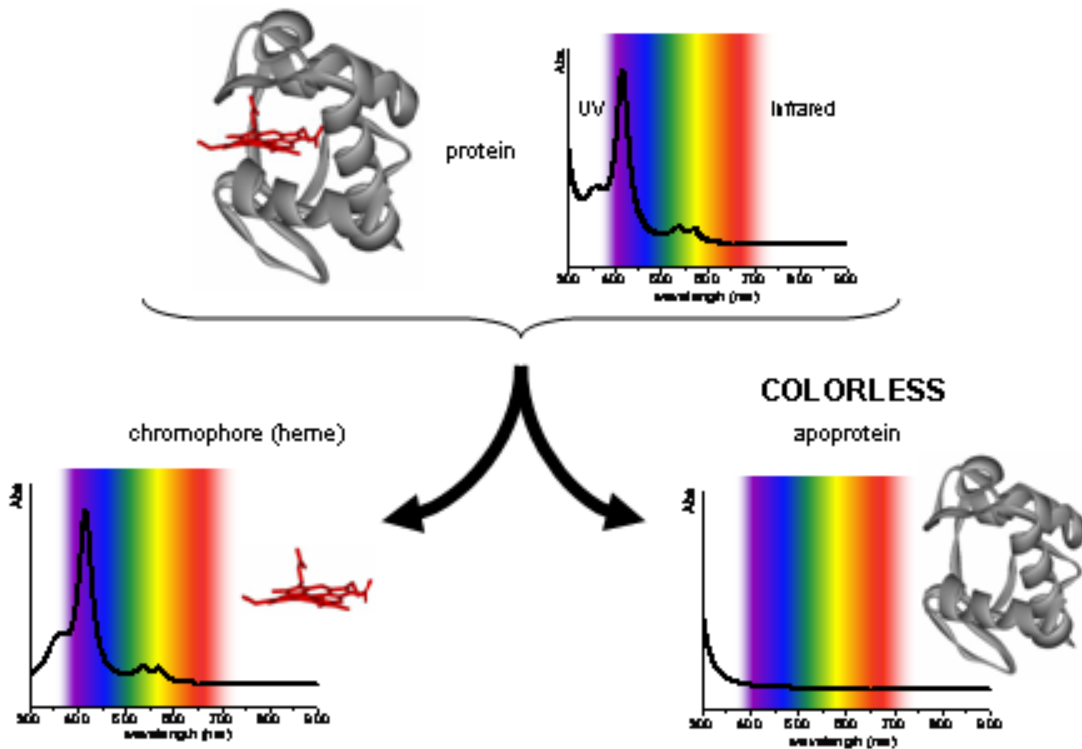
Resonance Raman spectroscopy (RRS)



- Scattering process via level close to true excited state

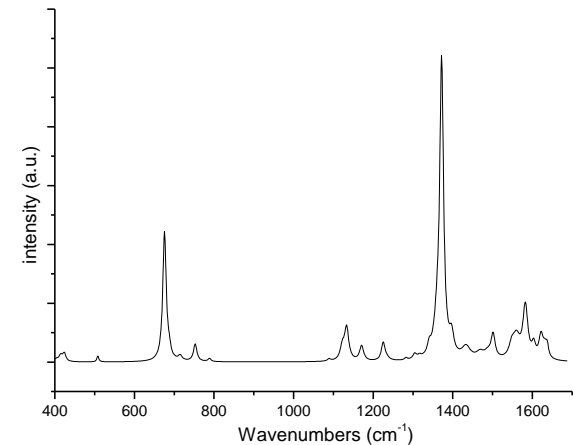
Enhancement for vibrations that match the geometry change in the excited state

Resonance Raman of redox proteins



RRS uses excitation wavelength in resonance with an electronic transition of the heme group

Signal of heme enhanced; signals of amino acids remain weak

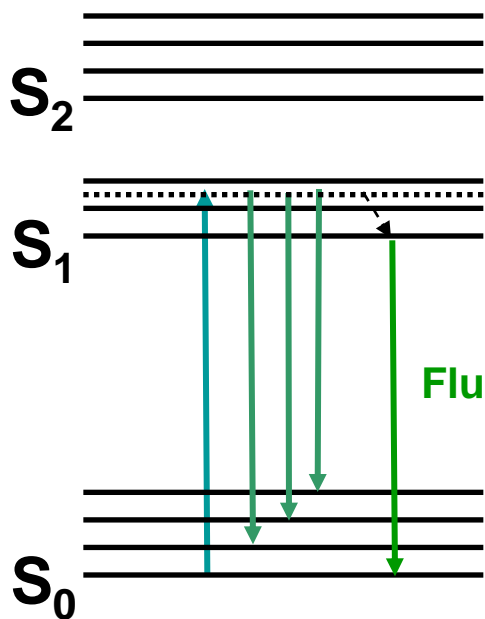


RRS; other application areas

- **Archeology, rock paintings**
- **Art: authentication and restoration**
- **Geology and jewellery: identification of minerals**
- **Forensics: documents, inks, lipstick, cloth fibers**
- **Life sciences, enzymes and pigments; photosynthesis**
- **.....**

So why is RRS not often used?

Resonance Raman



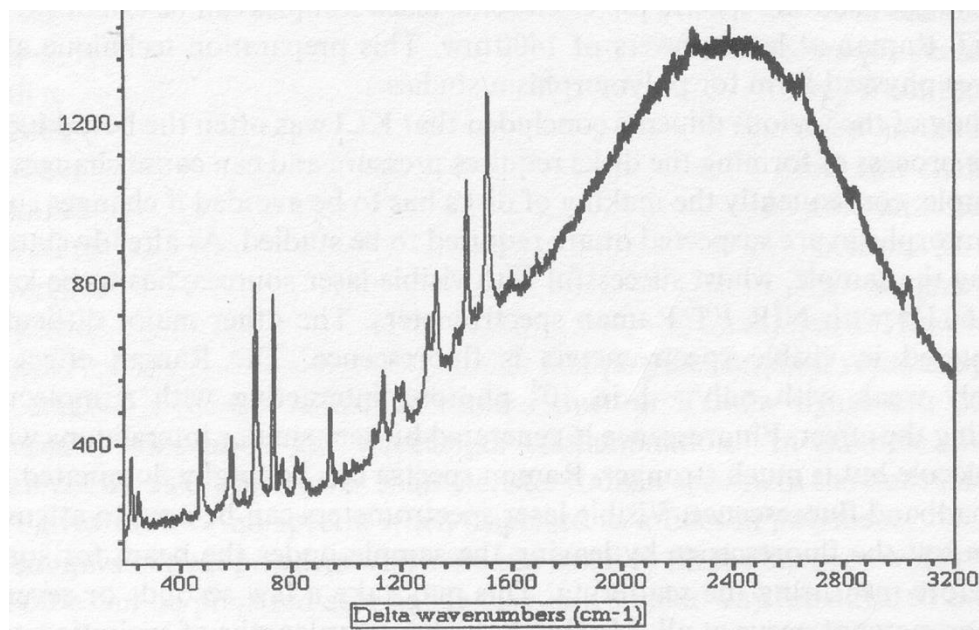
- Raman signals several orders of magnitude stronger
- Increased selectivity; less interference from solvent or matrix Raman (no resonance)
- But...loss of information, only chromophore bands are enhanced
- Flexibility in excitation wavelengths required
- Risk of photodegradation
- Often **strong interference from fluorescence** (from compound itself or from the matrix)

Major problem: fluorescence interference

Raman often has much lower probability than fluorescence

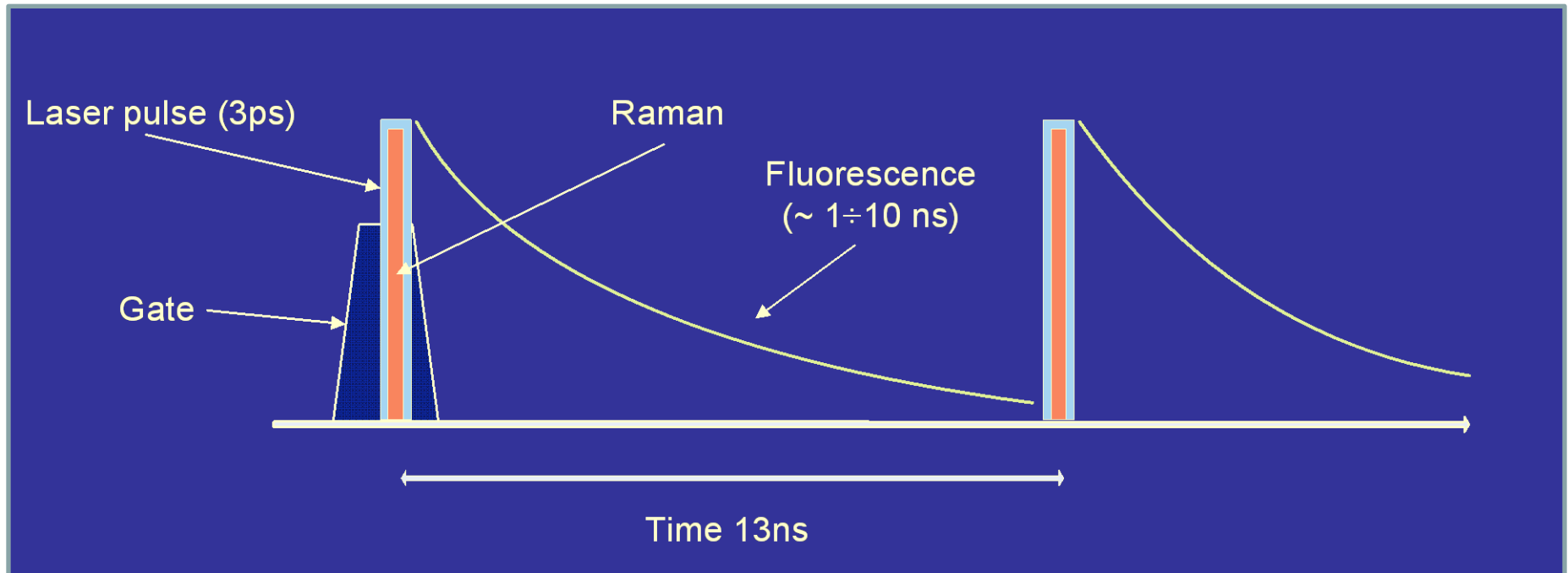
Raman spectra are therefore easily buried in fluorescence, from the analyte or from other components in the sample

Solutions: excitation at very long wavelengths or in the deep-UV range < 250 nm (quenching, time-resolved detection, chemometrics..)



Phthalocyanine; $\lambda_{\text{exc}} = 632.8 \text{ nm}$

Picosecond time-resolved RRS: suppressing fluorescence in the time domain

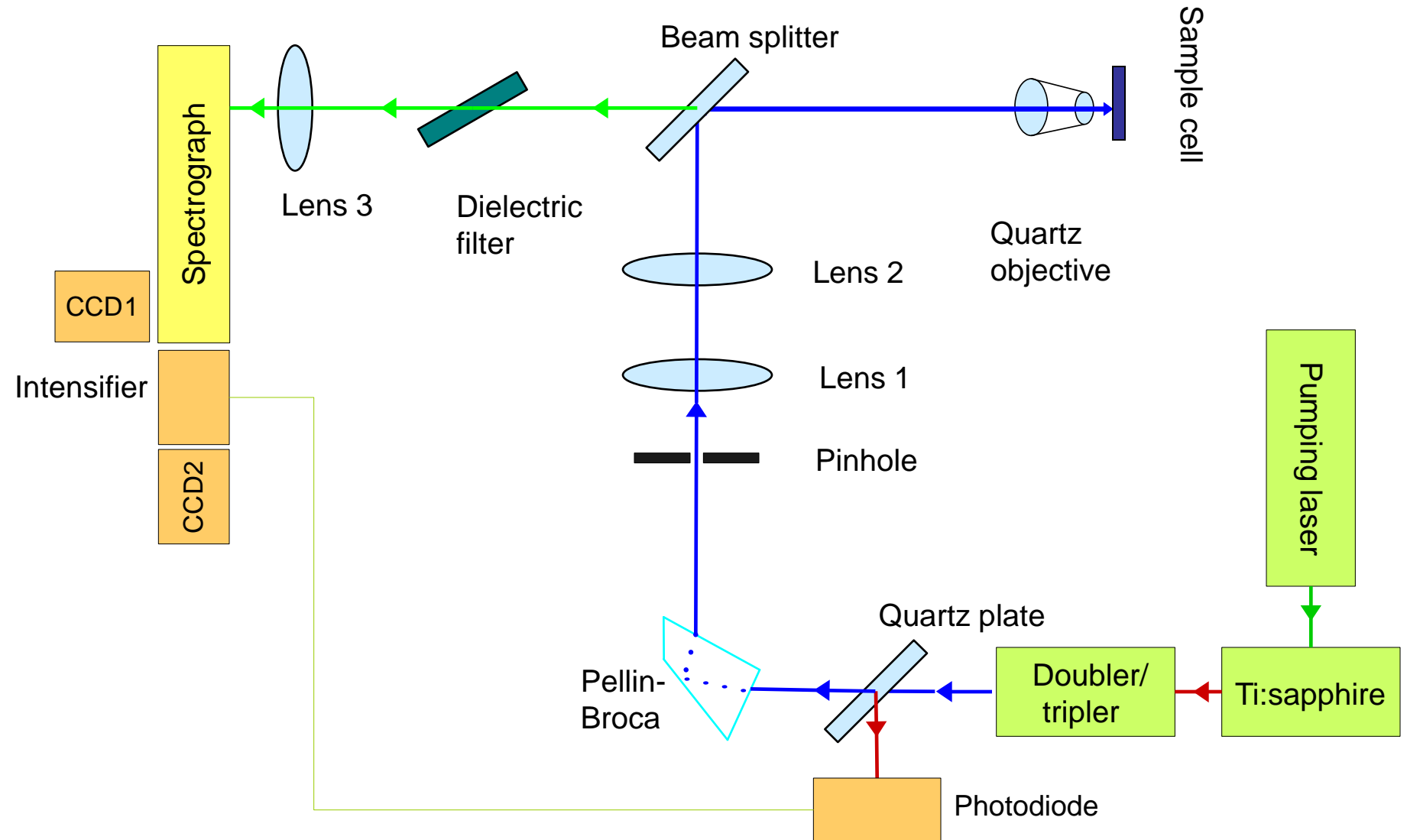


Excitation source: ps pulsed laser system, 76 MHz repetition rate

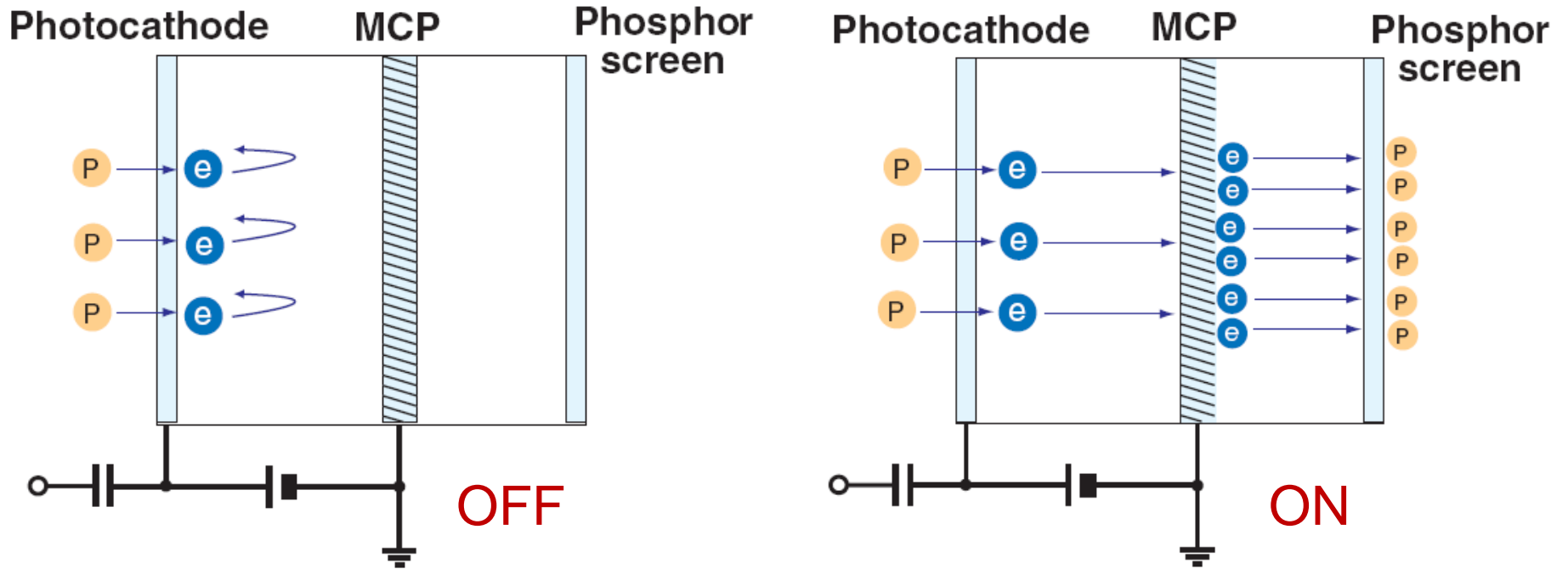
Raman process is instantaneous, faster than fluorescence

Gated detector may be opened before the laser pulse, but closing time of detector is critical

Setup picosecond time-resolved RRS



Intensified CCD camera



LaVision Picostar ICCD

Operation independent from laser power or wavelength

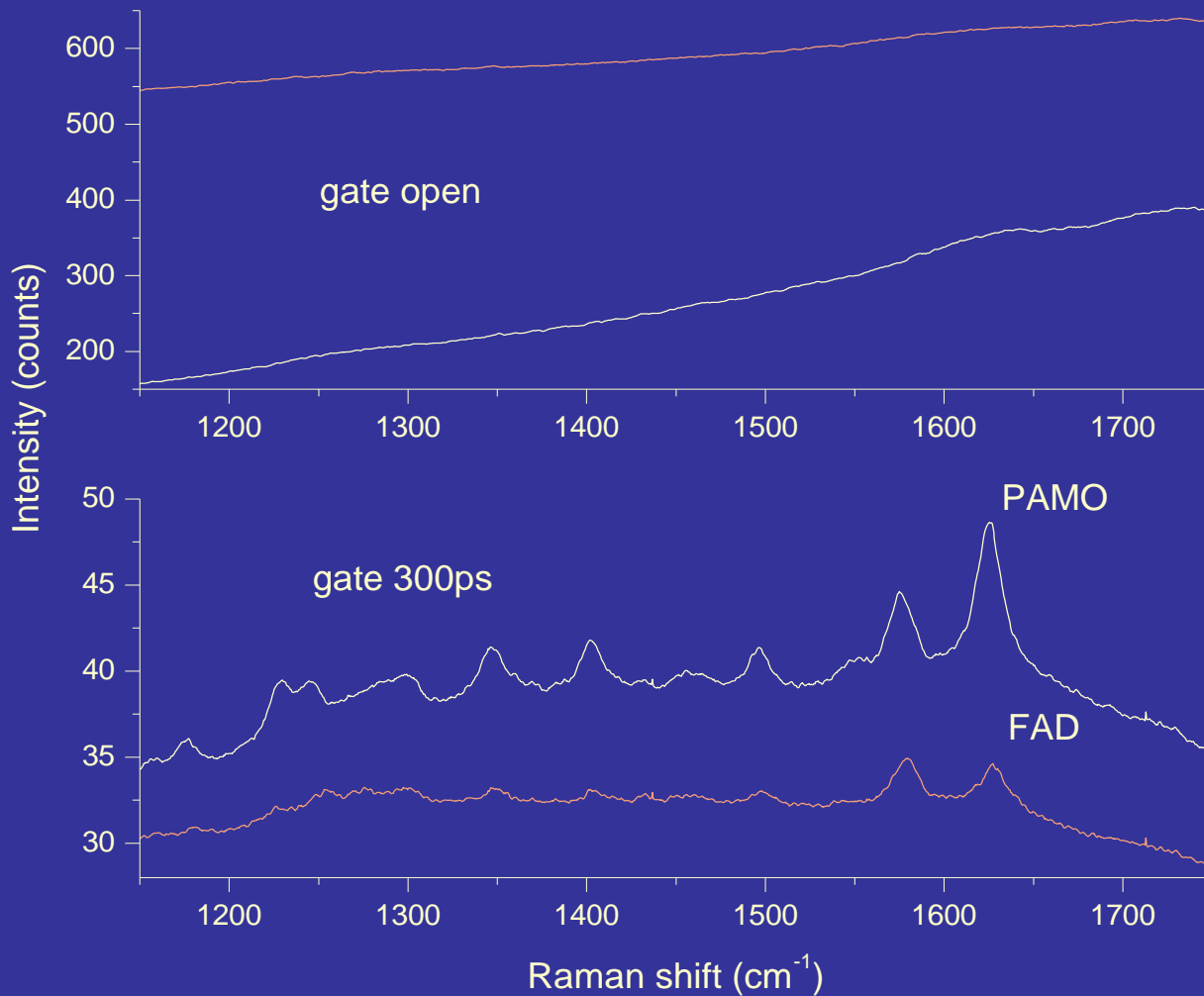
Compatible with 76 MHz repetition rate

but the proof of the pudding is in the eating...



Fluorescence rejection – flavin enzyme

Non-gated and gated detection of Phenylacetone monooxygenase (PAMO) and its cofactor - flavin adenine dinucleotide (FAD).
Excitation 405 nm; exp. time 10 min



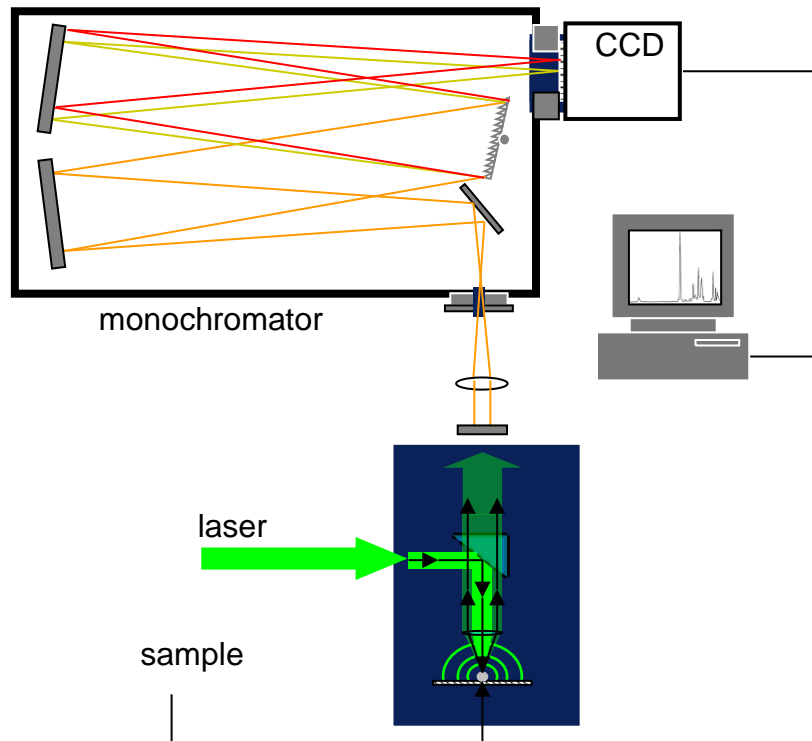
Non-gated

Gated

Raman imaging and mapping: homogeneous vs heterogeneous samples

- For homogeneous samples the spatial resolution is not a critical factor; nevertheless for Raman spectroscopy a microscope is often used to increase the collection efficiency.
- For heterogeneous samples, mixed spectra are obtained with larger spot sizes
- Adapt the spot size and spatial resolution to the level of heterogeneity

Raman microscope



A microscope objective focuses the laser on the sample and collects the backscattered light

A filter removes the unwanted laser light; longer wavelengths are focused on the entrance slit of a spectrograph

A CCD camera chip registers the Raman intensity as a function of wavelength

Spatial resolution
(diffraction limited spot size) $\approx \lambda$

Example: Raman microscopy (mapping)

emulsion of oil/alkane/water 200 x 200 points

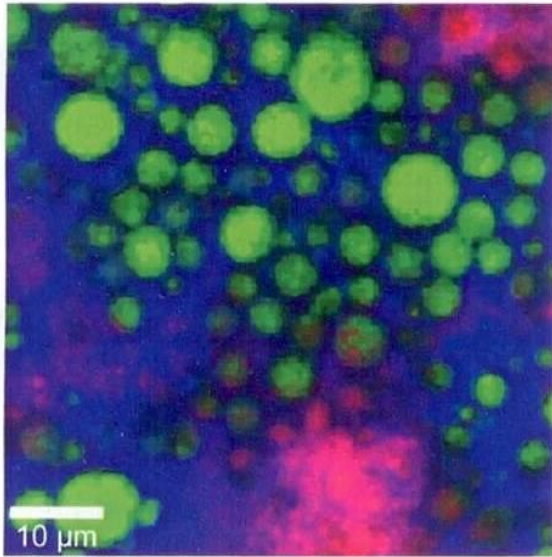


Fig. 3a: Raman image of oil-alkane-water; scan range: 60 x 60 μm, 200 x 200 pixels, 40,000 spectra, 760 μs/spectrum, 42 seconds/image, excitation: 532 nm Nd:Yag, Green: oil, Red: alkane Blue: water.

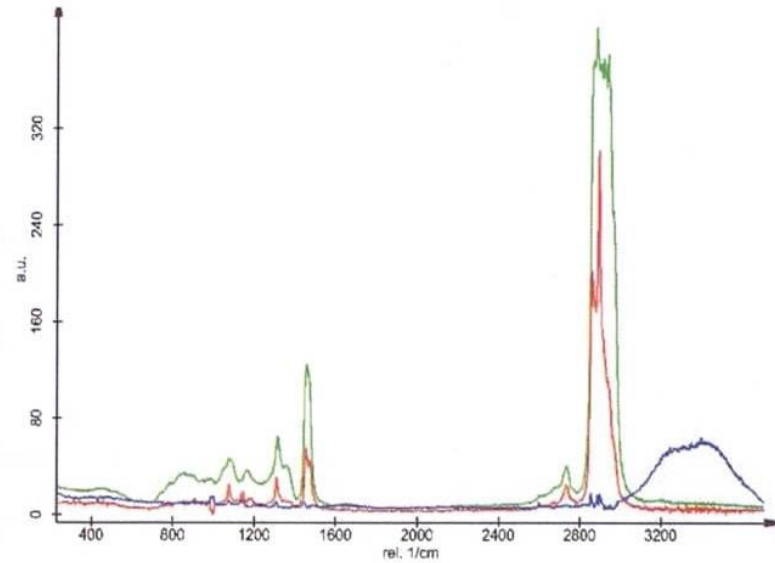
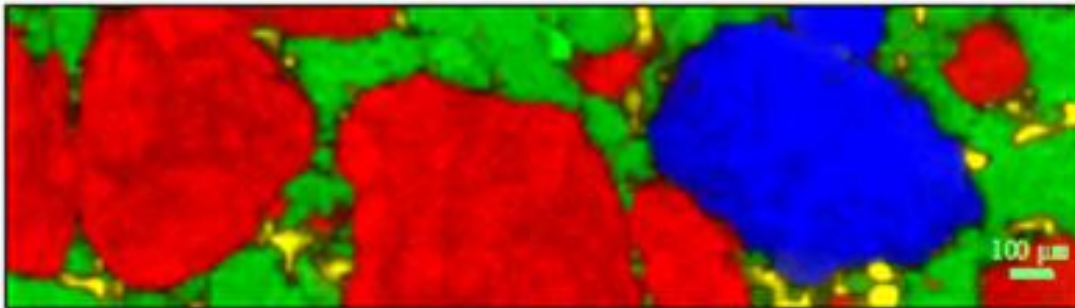


Fig. 3b: Corresponding spectra; Green: oil, Red: alkane, Blue: water.

Sample is moved under microscope; best spatial resolution ca. 300 nm; very short exposure time per datapoint to save time and avoid photodegradation. Chemometrics to extract component spectra.

Mapping of tablet components

Raman spectral image of a 0.6 x 2.4 mm² area of a pharmaceutical tablet, showing the distribution of aspirin (red), paracetamol (green), caffeine (blue) and cellulose (yellow)



Also curious to see what's inside?

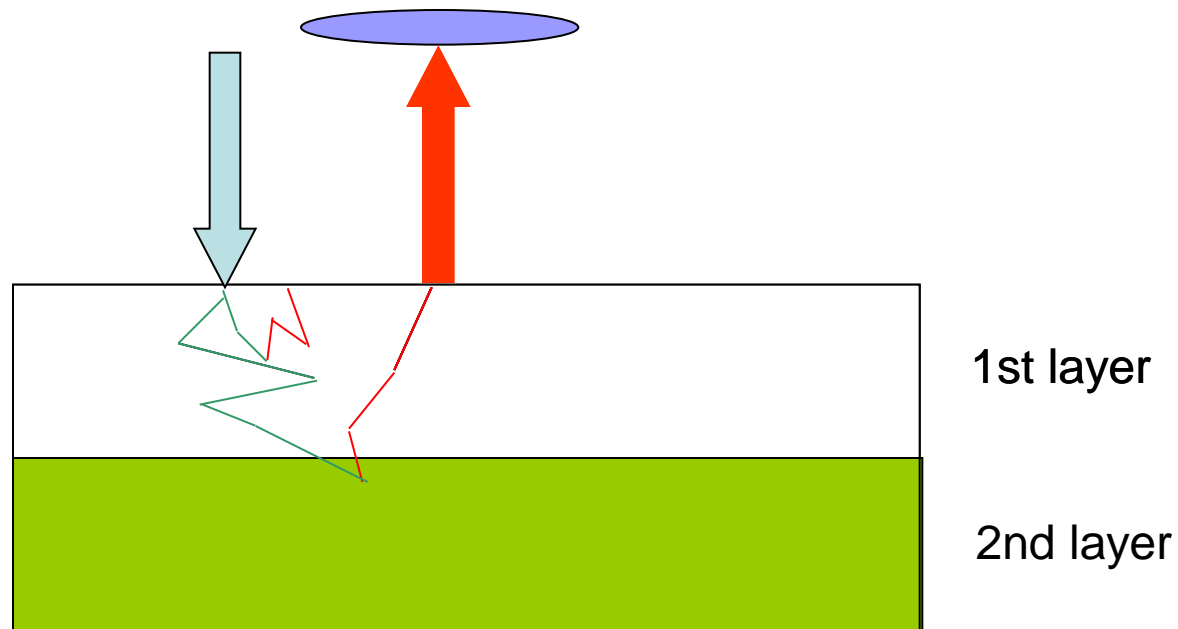


Raman spectroscopy of non-transparent samples

- Raman is a powerful tool for identifying substances based on molecular vibrations
- Through transparent layers/windows, Raman spectra are easily obtained using a confocal setup
- Through opaque layers, focusing is not possible due to random scattering processes. Spectra are often strongly dominated by surface components
- How can we selectively enhance the weaker signals from the 2nd layer?

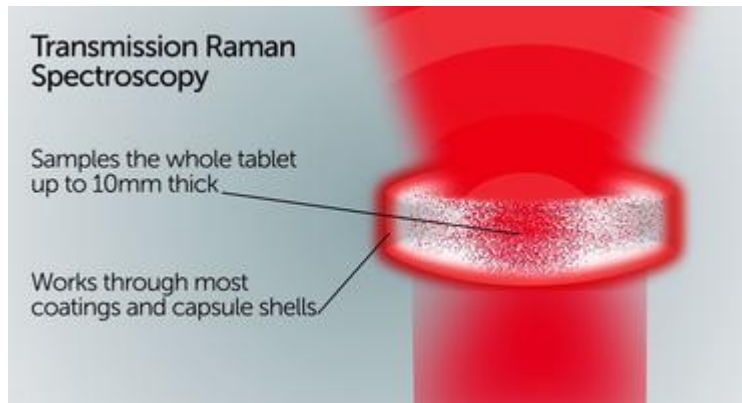
One option: Spatially offset Raman spectroscopy (SORS)

Raman photons from the deeper layer on average move further **SIDEWAYS** than Raman signals from the surface
Record spectra with/without offset and calculate difference



Transmission Raman

- Speciaal voor niet-transparante monsters waarvan de inhoud belangrijker is dan de buitenkant (bv gecoate tabletten)
- Bij een confocale Raman microscoop wordt het signaal hoofdzakelijk bepaald door de buitenste laag
- In transmissie Raman dragen alle lagen bij tot het totale spectrum
- Ander voordeel: ruimtelijke verdelingen worden uitgemiddeld



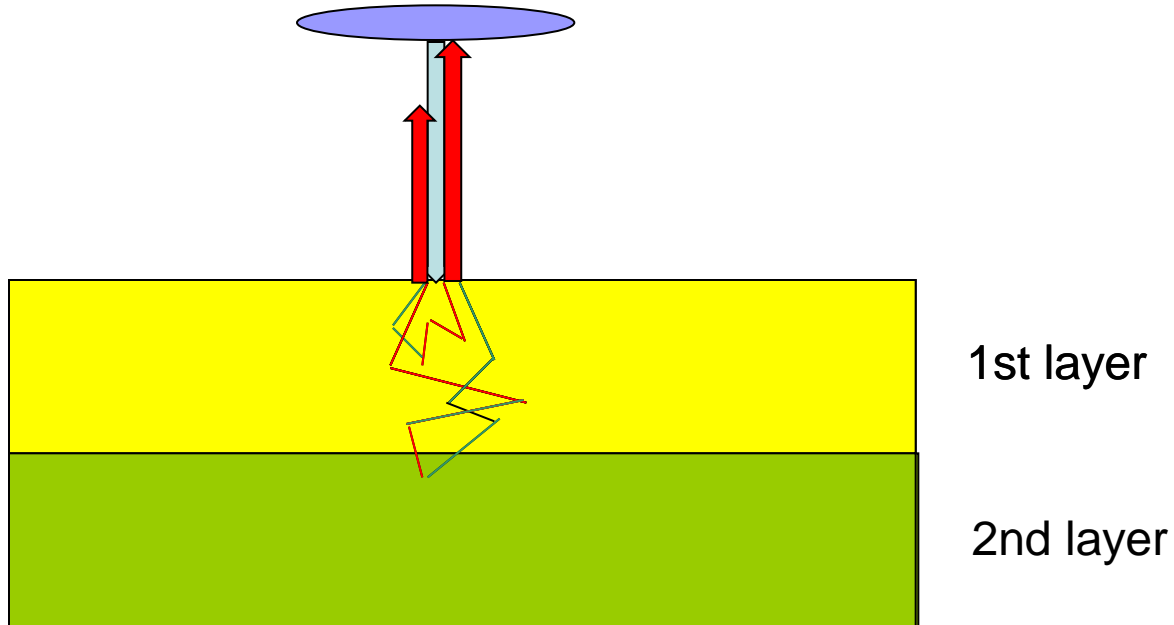
Laser Illumination



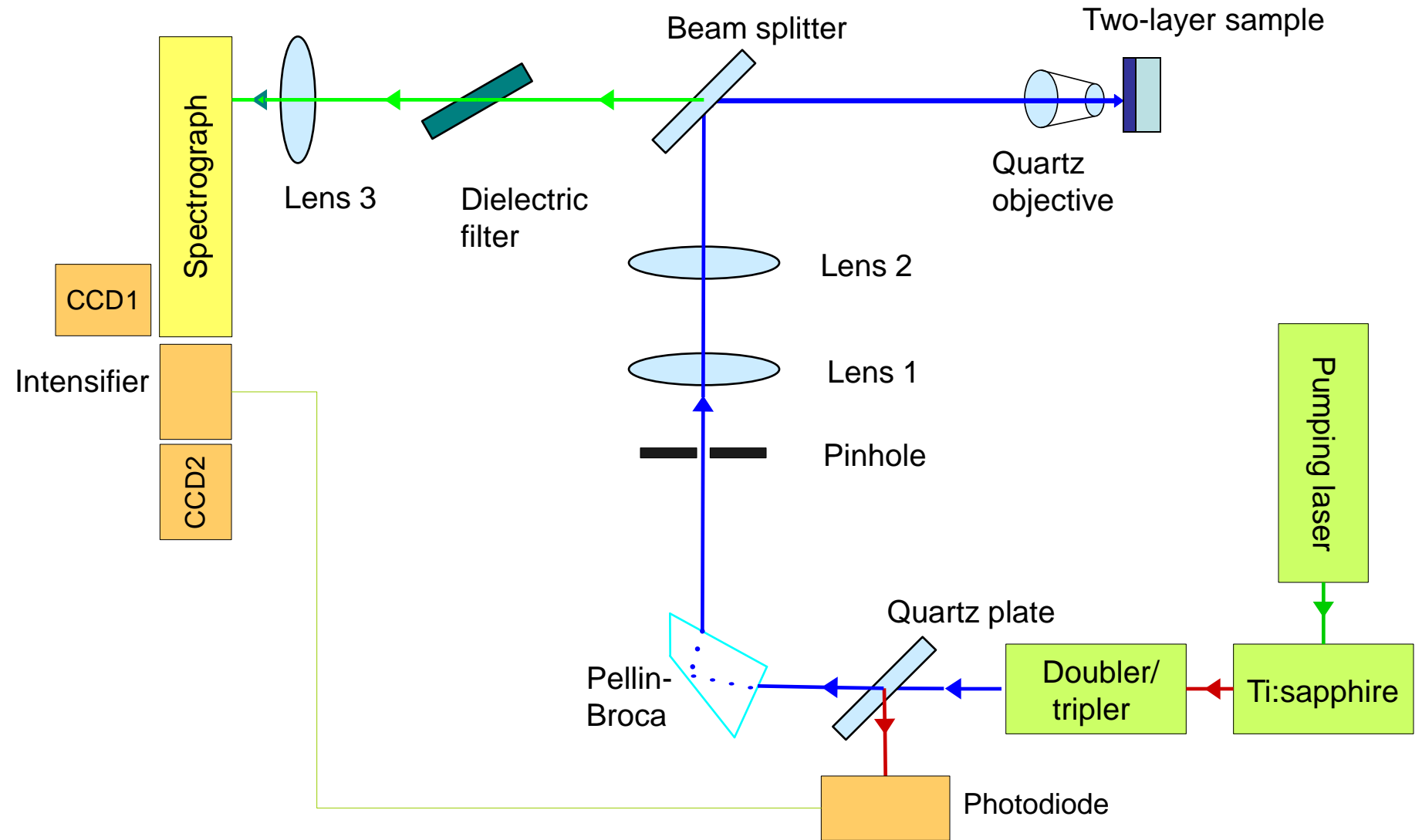
Signal Collection

Amsterdam approach: Time resolved Raman spectroscopy (TRRS)

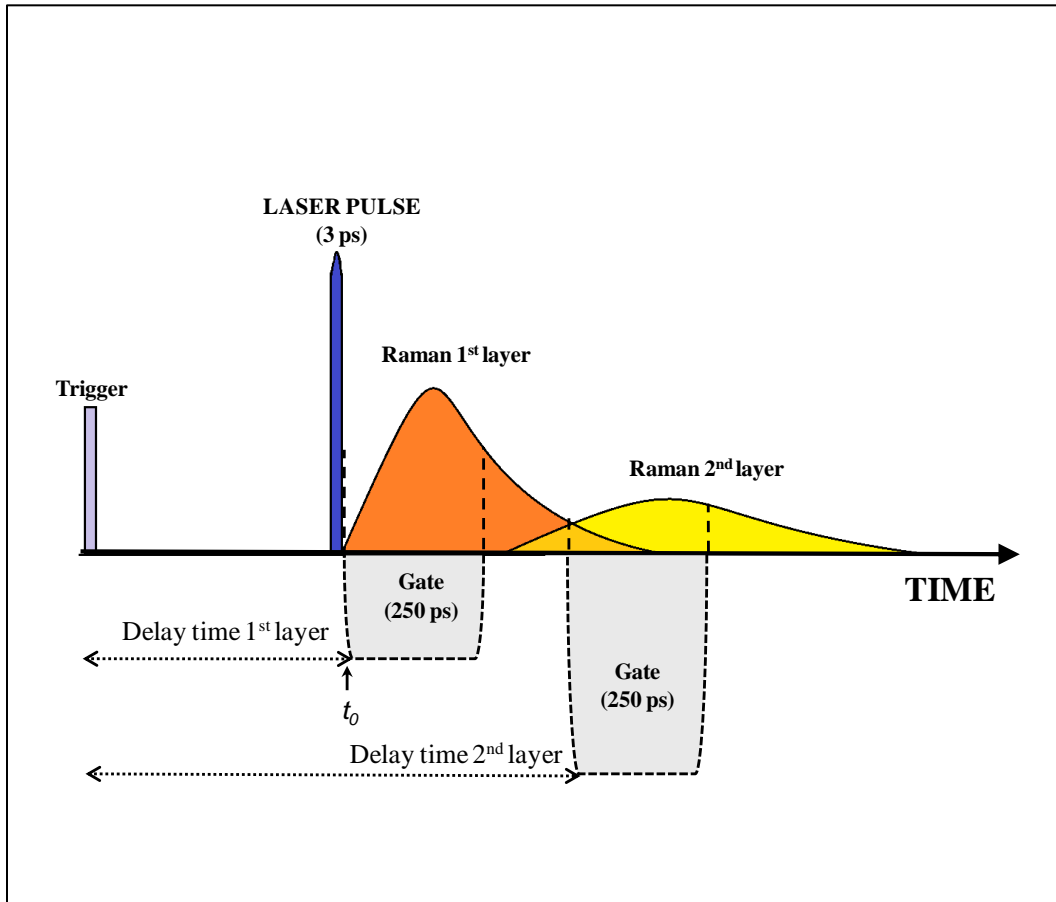
In a backscatter geometry, Raman photons from the deeper layer arrive LATER at the detector than Raman signals from the surface



Experimental Setup



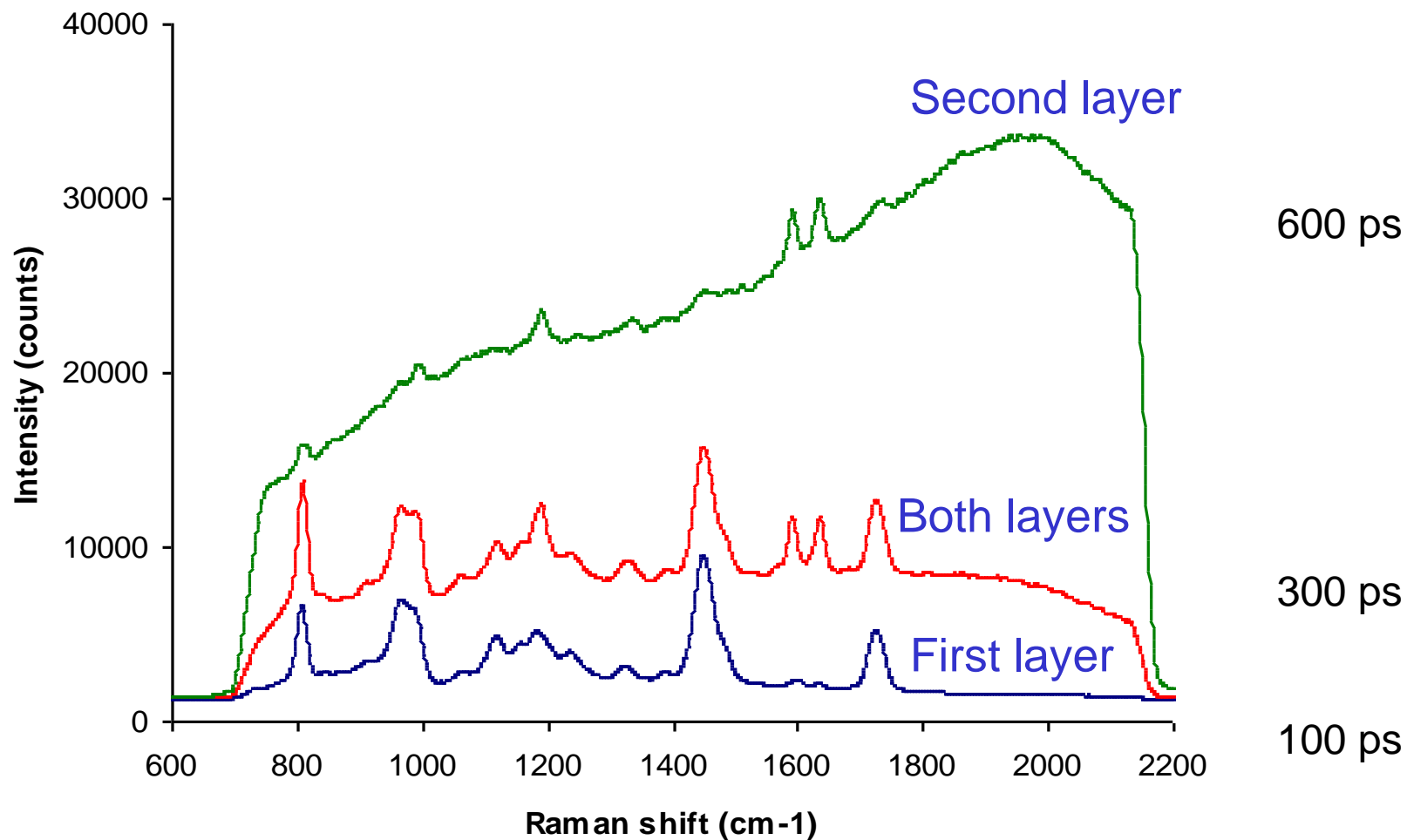
Temporal selectivity in TRRS



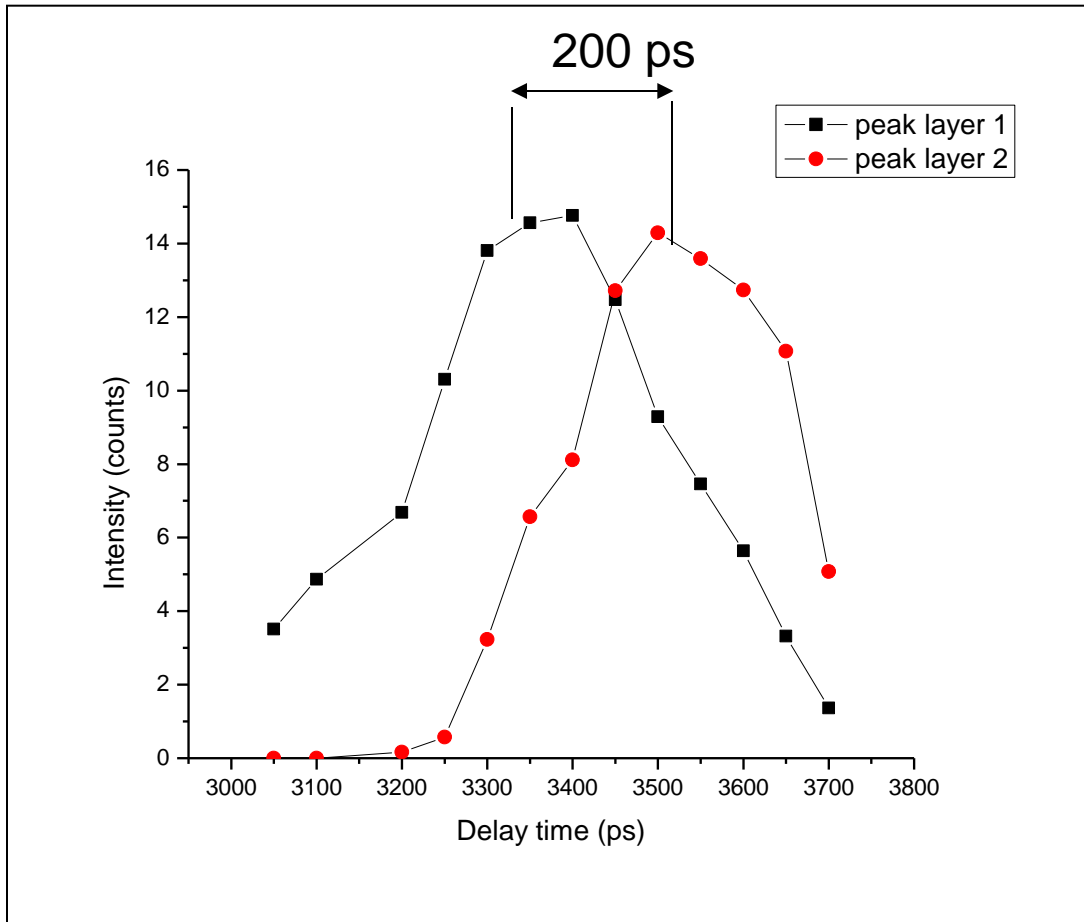
- Raman photons from a deeper layer arrive later, and with a broader distribution
- Optimize delay for signals from different depths
- The short-delay spectrum corresponds with the surface layer, and can be subtracted from mixed spectra if needed

First tests: two-layer system

PMMA (1st) and trans-stilbene (2nd)



Estimate of **effective** photon migration speed



Photon scattering: relatively slow forward speed 'random walk' in scattering medium.

Consequently, Raman signals from the second layer reach the detector MUCH LATER than Raman signals from the first layer.

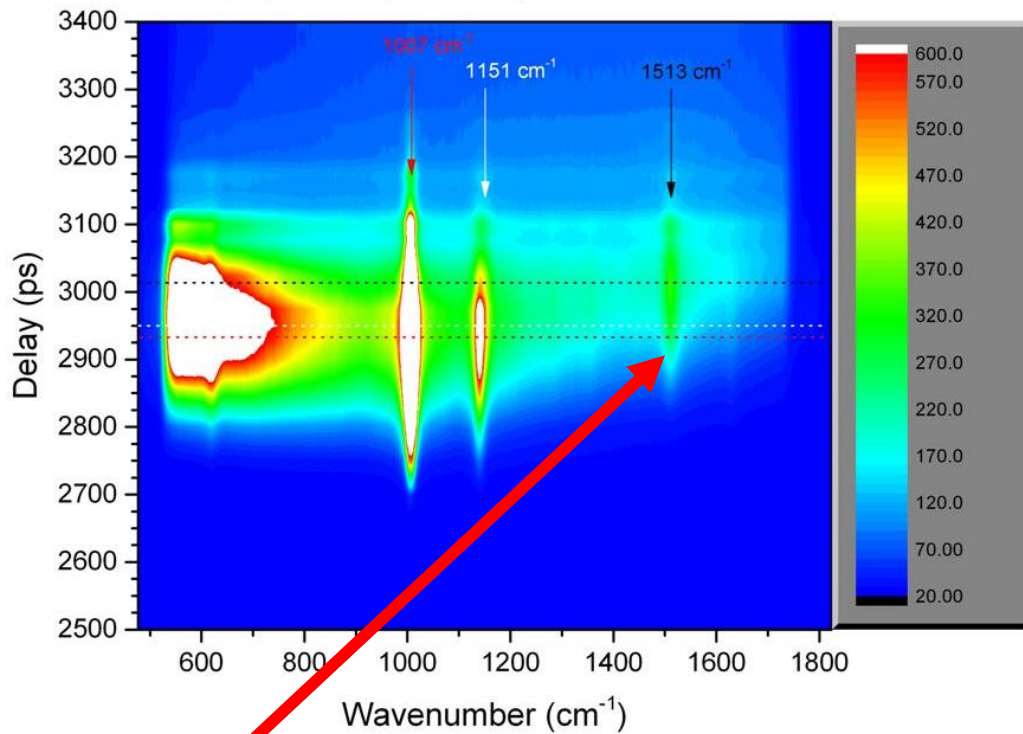
Speed of light in clear media $\approx 2 \times 10^8$ m/s (2 mm = 10 ps)

In powdered PMMA the effective photon velocity $\approx \underline{1 \times 10^7}$ m/s

detection through minerals on Mars
because Life may be hidden.....



Detecting extremophile bacteria through minerals



Detected after 100 picosecond delay: carotenoids in *Deinococcus radiodurans*

Verkaaik, Hooijschuur et al.

Toekomstige Raman ontwikkelingen? citius, altius, fortius

sneller: stimulated Raman imaging

sneller: femtoseconde pump-probe experimenten

kleiner: losse moleculen op nanoschaal?

lichter: draagbare Raman spectrometers

slapper: low-frequency Raman

dieper??

Draagbare Raman scanners



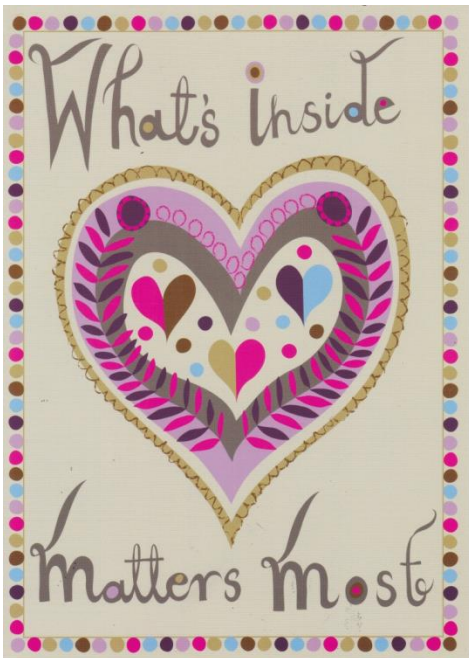
Portable Raman ID through opaque and coloured sacks, tubs and bottles
Avoid contamination and sampling
Compatible with most APIs and excipients
Typical measurement time 5-20 seconds



Raman is a flexible inspection technology that is capable of accurate performance scanning both liquids and solids.

Eindconclusie

- Raman fotonen kunnen op de meest uiteenlopende complexe vragen een gedetailleerd antwoord geven, niet-invasief, zelfs van binnenin niet-transparante monsters, en met de snelheid van het licht!!



Raman collega's VU



Maria
Lopez-Lopez

Ingeborg
Iping Petterson



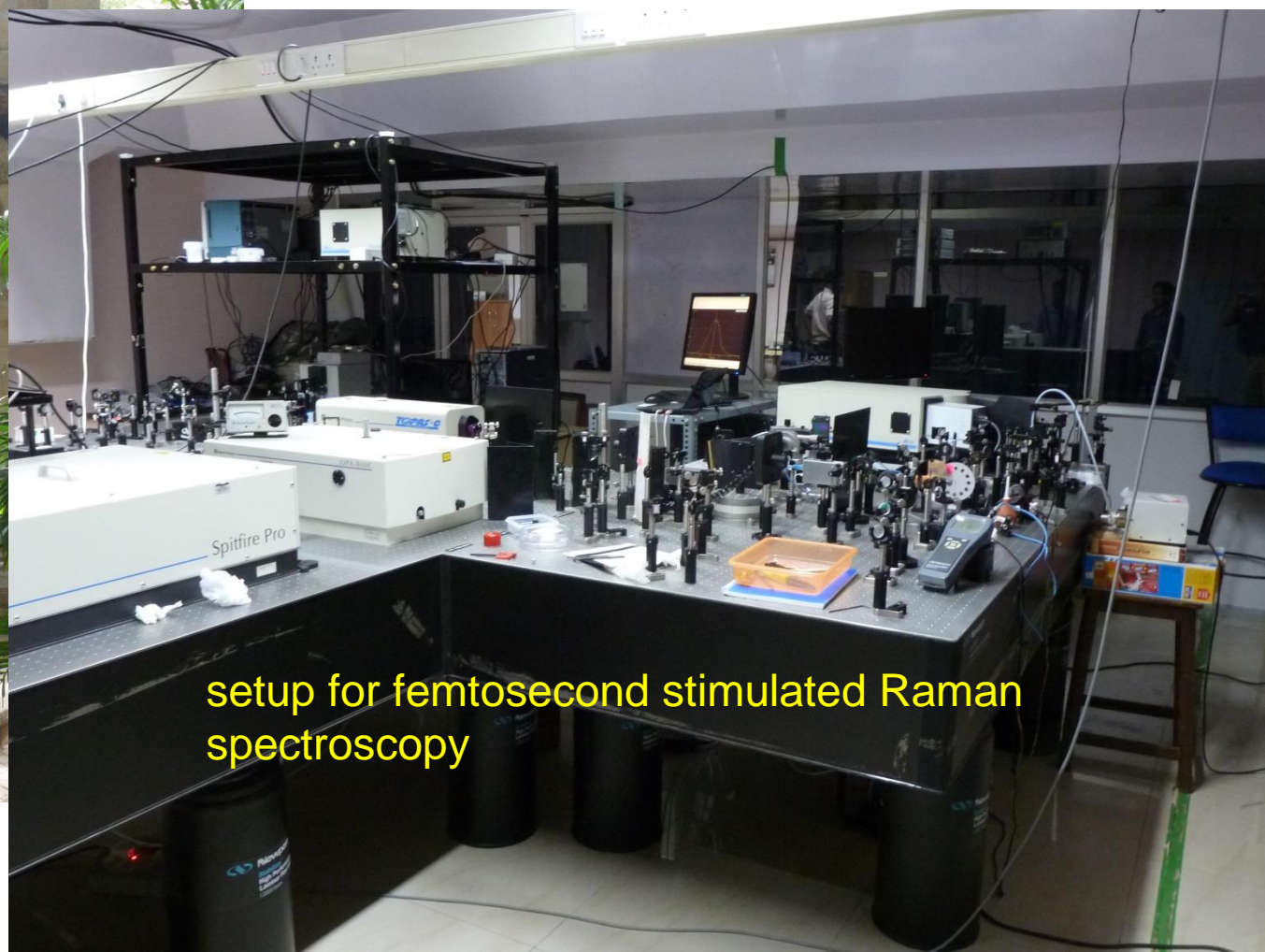
Joost Buijs



Jan-Hein Hooijschuur

Cees Gooijer
Gert van der Zwan
Evtim Efremov
Marleen Kerssens
Heleen Meuzelaar
Maarten Fokker
Erik vd Nieuwehuijzen
Vincent van Eif
Wouter de Wilde
Thijs Verkaaik
Camiel van Hoorn
Bram Mooij

Raman's lab today



Umapathy's group at IISc Bangalore



A photograph of a laboratory setup on an optical table. The scene is dominated by a strong blue laser light that illuminates various components, including lenses, mirrors, and mounts. A large, semi-transparent blue box is positioned in the center-left. To the right, there are several black rectangular boxes, one of which has the text 'Rayz Techno' partially visible. A green fiber optic cable is connected to a small black box on the table. The overall atmosphere is technical and focused on precision optics.

Questions?