

2.3 表面增強拉曼散射(Surface-Enhanced Raman Scattering , SERS)

在生物/生化與生活科學中，雷射分光鏡法扮演越來越重要的角色。光譜學的應用包括生物/生化的基本研究與疾病診斷和治療控制的新方法之發展。鑑定和結構描述，包含監控分子的結構改變，扮演生物與生化光譜之中心角色。所以，振動光譜的技巧,如:拉曼光譜，提供了高結構的資訊特別地引起人們的興趣。

但是拉曼光譜在任何的應用上有一個很大的缺點就是在拉曼過程中極小的 cross section，比螢光的 cross section 小 12-14 數量級之強度。

在 1970 年，一個非預期的發現，吡啶在粗糙的銀電極表面上得到很高的拉曼訊號^[42]。特別是在許多不同實驗室的証實，訊號的增強來自拉曼散射本身而非更多地散射分子^[2,40,2,41]。而近幾年來，增強的訊號已證實可應用在許多不同的分子上^[2,42]，只要是分子吸附在各種不同的”粗糙”金屬表面上，而這種效應稱為”表面增強拉曼散射 (SERS)”，這種發明克服了傳統拉曼低靈敏度的問題^[50,51]。最早的報告，表面增強拉曼散射可達到適度的 $10^3 \sim 10^5$ 之增強級數。不久，許多作者聲稱染色分子在表面增強共振拉曼散射實驗上可達到 $10^{10} \sim 10^{11}$ 數量級之訊號^[48-50]。

經過 20 年的研究發現，新方法發現表面增強拉曼散射的 cross

section 效應可達到 $10^{-16} \text{ cm}^2/\text{molecular}$ 相當於 10^{14} 級之增強效應^[51]。

這種結果與雷射染料分子在螢光的量測，達到相同的 cross section 強度，使得表面增強拉曼散射變成量測單分子之工具^[52-55]。

另一種有趣的表面增強拉曼散射貢獻為其空間解析度。探索特別的金屬奈米顆粒其區域之光場，表面增強拉曼散射可以提供橫向解析度大於 10nm ^[52-55]，其比繞射強度之極限小 2 個等級甚至於其解析度亦小於近場顯微鏡之探針。

由於表面增強拉曼散射其高結構的選擇性與有機會量測到極微量的體積，使得許多生物學家仍追尋其分析能力，特別是藥學實驗室以表面增強拉曼散射為實驗工具與基本的生物學研究；表面增強拉曼散射均能提供新的概念與螢光光譜為互補，特別是廣泛的應用於單一分子的偵測上。另一個值得人們探討為表面增強拉曼散射能應用於快速 DNA 序列判斷，利用表面增強拉曼散射之結構辨識能力來判讀 DNA 的片段的鹼基(base)組成，而不須螢光或放射線的標示^[58]。表面增強拉曼共振散射亦提供大生物分子的偵測機會，一些需要共振探測的發色圖系統如葉綠素、胡蘿蔔素^[59-62]。

另一個表面增強拉曼散射可使用的領域，為其在生物領域之應用，其可提供吸附在表面之分子的分子結構訊息和分子在界面活動之過程，例如：'表面增強拉曼散射-活化'金或銀電極可應用於現代環境

學習生物學相關的過程，如細胞色素 C 的電荷轉移過程^[63,64]。



2.3.1 表面增強拉曼散射之簡介

表面增強拉曼散射，為一種利用現代雷射光譜來激發奈米金屬顆粒的分光鏡技術，結果當欲偵測的分子繫附在奈米尺寸的金和銀顆粒會得到增強的拉曼訊號。這種效果使得拉曼光譜達到超級限的靈敏度，可用來偵測單分子的結構訊息。而且，表面增強拉曼散射為一種可提供表面訊息和界面過程的分析技巧。在生物和生藥領域，表面增強拉曼散射提供了機會，利用其超極限的靈敏度來辨識生物/生藥相關的分子且其振動光譜具極高的空間解析度。



2.3.2 表面增強拉曼散射的原理

造成拉曼光譜的增強效應有二個基本的機制：

<1>電磁效應 (electromagnetic effect)：由於激發表面電漿的偏極性所造成的。

<2>化學效應 (chemical effect)：吸附分子 (物質) 與金屬奈米結構接觸所造成，由於其間的電荷轉移所造成 (也稱為第一層效應)。

$$P^{\text{SERS}}(\nu_S) = N' \sigma_{ads}^R |A(\nu_L)|^2 |A(\nu_S)|^2 I(\nu_L)$$

其中 $P^{\text{SERS}}(\nu_S)$ ：SER 的機率, $A(\nu_L)$ ：雷射的增強因子, $A(\nu_S)$ ：拉曼散射場的增強因子, N' ：與 SERS 發生有關的分子, σ_{ads}^R ：吸附分子

增加 cross section

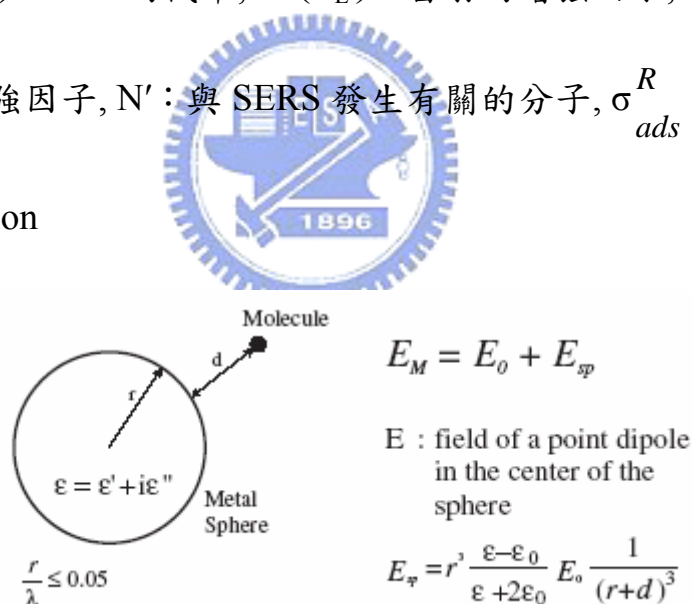


圖 2-11 為表面拉曼增強增強效應的簡圖 [42]

圖 2-11，金屬”奈米結構”為一個小球體，其複合的介電常數 $\epsilon(\nu)$ ，而其周圍介質之介電常數 ϵ_0 ，而金屬球體的直徑為 $2r$ ，此值遠小於入

射光源之波長。

一分子與圖形的金屬球體（相距 d ），其電場為 E_M ，此值為入射場 E_0 和金屬球的誘導偶極場 E_{SP} ， $E_M = E_0 + E_{SP}$ 。而場增加因子 $A(\nu)$ 是分子所在位置的場與入射場的比例

$$A(\nu) = \frac{E_M(\nu)}{E_0(\nu)} \cong \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3$$

當 $\varepsilon(\nu) = -2\varepsilon_0$ 時， $A(\nu)$ 為最大值

圖 2-12 為解釋電磁效應的模型：

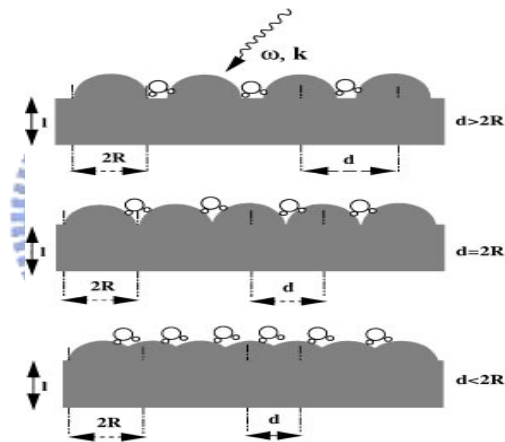


圖 2-12 為一連串的銀半圓柱置於銀之厚片上，其厚度為 t ， $t = 2R$

$= 30\text{nm}$ ，而 R 為半圓柱之半徑；圓柱中心與圓柱中心的間

距為 d ^[65]

由圖 2-13, 而當 $d \geq 2R$ 時，我們發現在相同的能量 (eV) 下，當 $d = 2R$ 時，也就半球柱與半球柱之間為接觸沒有空間時，可以得到最大的增強效應。

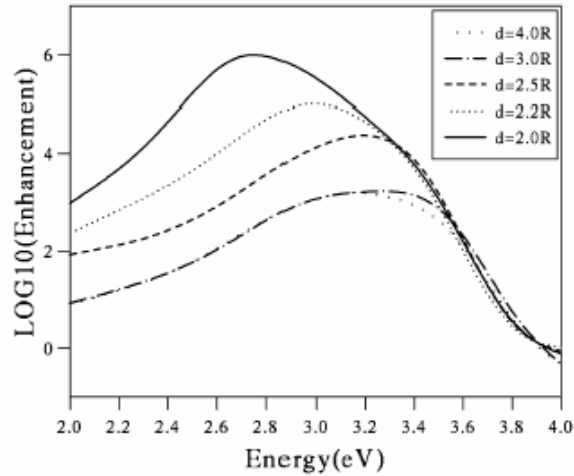


圖 2-13 為圖 2-12 銀半圓柱的表面增強效應之平均值， $r=2R=$

30nm，圓柱中心與圓柱中心的間距為 d ， d 值由 $4R$ 到 $2R$ [65]

而圖 2-14，為當 $d=2R$ ，能量為 2.7eV 時，造成最大增強效應條件

下，其電場的分歧情形，白色為正電價，黑色為負電價。

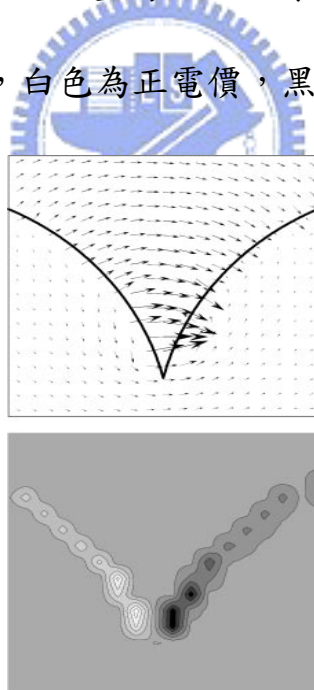


圖 2-14 為當 $d=2R$ ，能量為 2.7eV 時，造成最大增強效應條件下，

其電場的分歧情形，白色為正電價，黑色為負電價

另外再由圖 2-15,討論 $d \leq 2R$ 時，由於其表面粗糙度下降，使得其

表面增強效應亦下降。

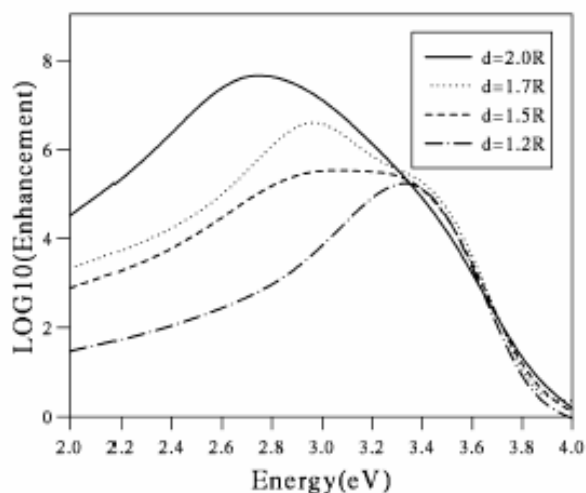


圖 2-15 為圖 2-12 銀半圓柱的表面增強效應之平均值, $\tau=2R=30\text{nm}$, 圓柱中心與圓柱中心的間距為 d , d 值由 $2R$ 到 $1.2R$ ^[65]

另一個效應為化學增強效應，亦稱為第一層效應，因為此機制需要金屬與分子之間的直接接觸^[46,67,18]。增強機制可能是來自於特定相互作用，也就是分子與金屬之電子耦合效應，形成被吸附物一表面複合物，此複合物中的吸附分子比在一般拉曼實驗中的自由分子有較大的 cross section 效應。另一個可能的電子-表面增強拉曼散射機制是共振拉曼效應，能達成此效果是由於吸附分子電子轉移和電子能階變寬或由於在”分子-金屬系統”中新電子轉變（價電轉移）所造成^[69,70]。

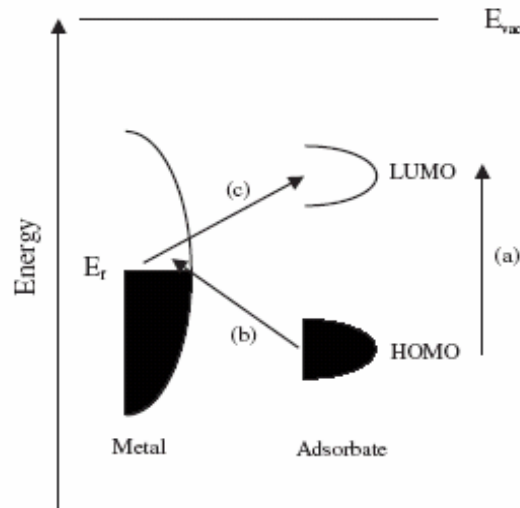


圖 2-16 為'分子-金屬系統'之典型能階圖，顯示共振的拉曼過程包含分子狀態（路徑 (a)）與分子和金屬狀態（路徑 (b), (c)）^[68]

圖 2-16,為'分子-金屬系統'之典型能階圖，其能量於最高佔據分子軌域（highest occupied molecular orbital, HOMO）和最低位未佔據分子軌域（lowest unoccupied molecular orbital, LUMO）與金屬費米能階大致成相對稱之比例，會發生共振的拉曼過程包含分子狀態(路徑(a))與分子和金屬狀態（路徑 (b), (c)）^[68]。此圖亦可解釋成當費米能階變動，共振條件（路徑 (b) + 路徑 (c)）亦隨之改變，也就是依電位而定的表面增強拉曼散射增強。

另一個第一層表面增強拉曼散射效應歸因於動力的價電轉移，可分 4 個步驟：

1. 光子滅絕，將電子激發進入"熱...電子"狀態。
2. 將熱電子轉移入分子 LUMO 狀態。

3. 熱電子由 LUMO 狀態回到金屬。

4. 電子回到最初狀態且創造 stokes 光子。

最近學者為了要探討單一分子的極大表面增強拉曼散射增強因子而回歸到此動力電荷轉移機制，而原子模式粗糙為此機制的必要條件。一般，化學表面增強拉曼散射增強因子，被認為其增強因子達 $10^8 \sim 10^{10}$ 。

最近，動力的電荷轉移體制，已被討論電子穿隧藕合比分子振動的 cross section 約增強 $10^{10} \sim 10^{14}$ 倍^[71]，這便可以解釋單一分子之表面增強拉曼散射增強實驗。



2.3.3 表面增強拉曼散射的應用

2.3.3.1 SERS-單一分子工具

表面增強拉曼散射增強效應達 10^{14} 級，相當於 cross section $10^{-16} \text{ cm}^2/\text{molecular}$ ，此值允許表面增強拉曼散射來偵測單分子。圖 2-17, 為利用近紅外線雷射光源來做單一分子表面增強拉曼散射的實驗之簡圖。表面增強拉曼散射-活化基，質為金或銀的膠體群聚，結構如圖 2-17^[72]。這些群聚可以使用於水中或乾燥的表面，均可用表面增強拉曼散射量測^[52]。

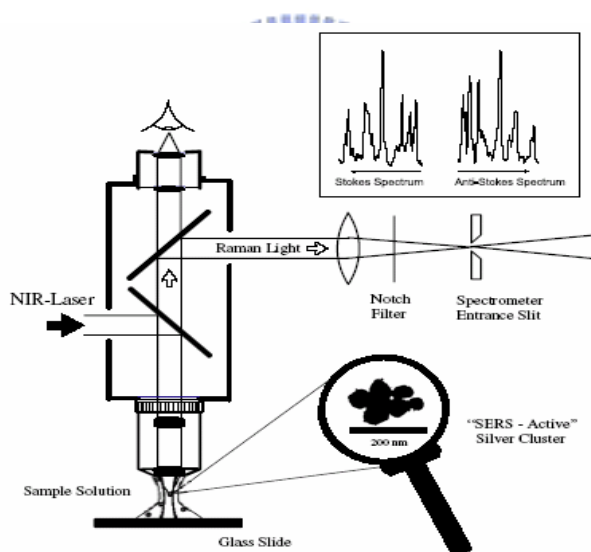


圖 2-17 利用近紅外線雷射光源來做單一分子表面增強拉曼散射的實驗之簡圖^[72]

以往的單分子大都用螢光來量測，但由於拉曼之振動舒緩時間相對於螢光的電子舒緩時間是較短的，所以每一固定的時間間距，用拉曼來完成偵測單分子會優於螢光^[73]。所以，在飽和條件下每單位時間分

子放射出的拉曼散射光子約為螢光分子的 $10^2 \sim 10^3$ 倍，這樣的條件允許在短暫的時間偵測單分子。且由於其較短的振動週期，飽和強度於 SERS 過程中會比螢光高，但此激發強度卻不會造成偵測分子的光分解，因其共振並非發生在分子上。圖 2-18 為單一血紅素分子的表面增強拉曼散射光譜量測實例。

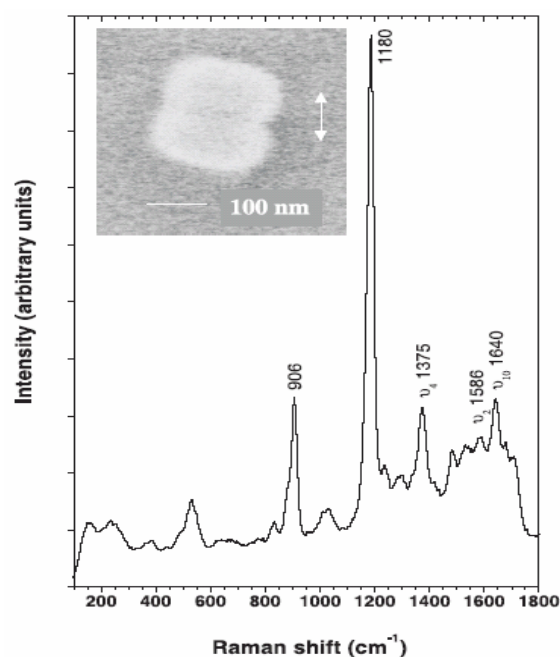


圖 2-18 為單一血紅素分子在銀奈米顆粒雙聚物上(Dimer,如插圖)的表面增強拉曼散射量測實例,使用波長為 514.5nm 的雷射激發光譜量測時間 200s

2.3.3.2 SERS 更廣泛的應用於生物、生化和生藥上

在 1990 年代中期，許多論文中討論出表面增強拉曼散射被應用於生物、生化和生藥領域。這些論文探討了表面增強拉曼散射應用於小分子胺基酸、胜肽與嘌呤、嘧啶鹼基上，和一些較大分子如：蛋白質、

去氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。亦應用於具有顏色的生物分子如葉綠素和其他色素。

表面增強拉曼散射不只是一個超靈敏的偵測器和分子生物的結構辨識工具，其亦可應用於有趣的生物過程，如需測薄膜之間的穿透行為。這顯示了表面增強拉曼散射可以區別不同分子於薄膜間的穿透移動行為且觀察不同介面之到達時間^[75]。

圖 2-19 為表面增強拉曼散射偵測兩種神經傳送素，多巴胺 (dopamine) 和正腎上腺素 (norepinephrine) 的例，其濃度於 5×10^{-6} 到 5×10^{-9} M 之間，其累聚的時間約為 0.025s^[77]。儘管它們的化學分子結構非常地相似，但以透過 SERS 依然可以很清楚的區別它們的不同。

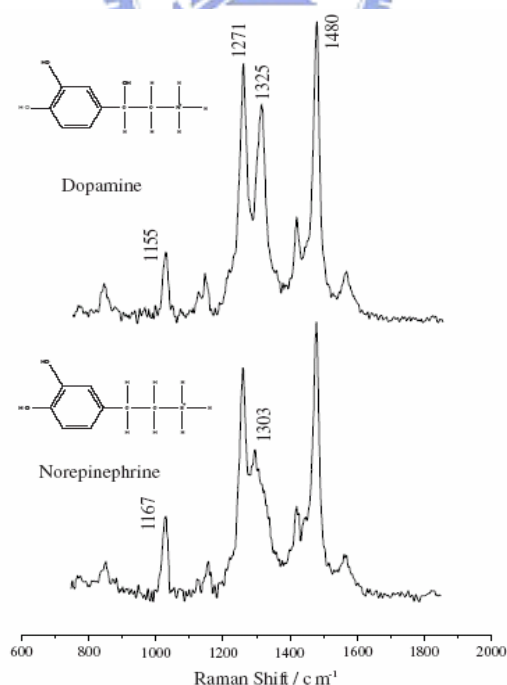


圖 2-19:於膠體溶液中，表面增強拉曼散射偵測兩種神經傳送素之

圖譜^[76]

表面增強拉曼散射亦可應用於免疫分析上，在許多免疫分析的個案上，須要許多標定分子來偵測許多複雜的抗原。因為 SERS 的結構高選擇性與高靈敏度使其幾乎可以完美地讀出這些標定分子。

在 1989 年，最早將表面增強拉曼散射應用於免疫分析的為人類的促甲狀腺刺激素 (Thyroid-Stimulating-Hormone, TSH) [77]。在這早期的實驗”表面增強拉曼散射-活化基質”為銀膜，將抗甲狀腺刺激素抗體 (anti-TSH) 塗在上面，使之和 TSH 發展反應。第二種抗甲狀腺刺激素抗體利用對一雙甲基氨基苯來標定與 TSH 結合。標定的表面增強拉曼拉曼散射訊號用來定量 TSH。

而另一種分析的形式為將膠體金當成表面增強拉曼散射的活化基質。將抗體定置於金的表面抓取溶液中的抗原。藉著定置不同的抗體和使用不同的辨識物，則存在溶液中不同的抗原可經不同的辨識物透過 SERS 光譜讀出。如圖 2-20。

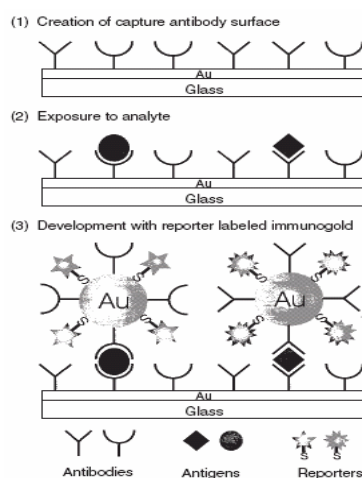


圖 2-20:利用兩種表面增強拉曼散射標定的免疫分析系統簡圖^[42]

另一個使用表面增強拉曼散射來取代螢光標定的判讀 DNA 片段的例子，如圖 2-21。將已知標的(target)且標定過(label)的 DNA 片段，與 DNA Sample 混合;若 DNA Sample 中具與標的(target)的 DNA 片段成互補的片段則會出現雜交(hybridization)反應，此時便會透過標定物(label)在 SERS 光譜中顯現出來，證實 DNA Sample 中含有欲測的 DNA 片段。

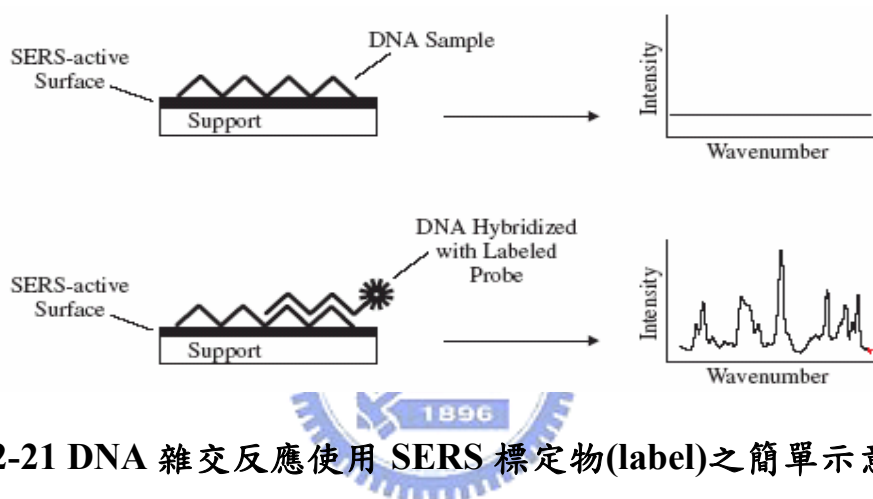


圖 2-21 DNA 雜交反應使用 SERS 標定物(label)之簡單示意圖

最新的發展，表面增強拉曼散射可直接判讀核苷酸的鹼基，而不須要螢光的標定 (label)，只須將單一的核苷酸繫於奈米金屬膠體，則可讀出此 DNA 的片段^[21,31]，如圖 2-22 所示。只要將單股 DNA 的序列,利用酵素切成單一鹼基(base)置於流動的奈米膠體金或銀溶液中，使單一鹼基繫於這些金或銀之奈米顆粒上，利用雷射激發光譜進行 SERS 的分析，可讀出單一鹼基的特定拉曼圖譜，便可以快速地判讀 DNA 序列。

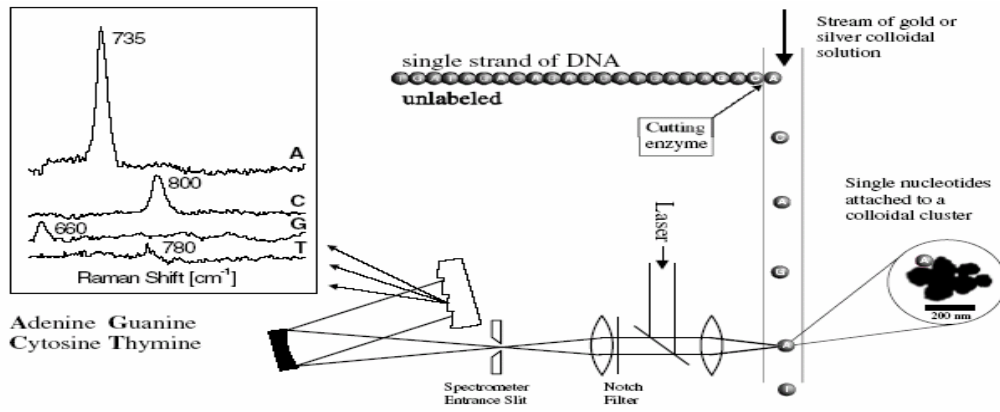


圖 2-22 使用 SERS 快速判讀 DNA 序列之簡圖^[21,31]

