۱

بهبود ار تعاشات مولکولی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین با استفاده از نانوذرات نقره به هدف شناسایی آنها

وحید اسکندری*، نفیسه شریفی؛ دانشگاه کاشان، دانشکدهٔ فیزیک

پذیرش: ۹۹/۶/۳۰

دریافت: ۹۸/۳/۱۲

چکیدہ

با استفاده از روش شیمیایی (تولنز) و کاهش یونهای نقره، نانوذرات نقره روی زیرلایههای شیشهای لایهنشانی شدند تا شیشه نقره اندود شده به عنوان زیرلایه فعال در طیف سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS) برای تشخیص وشناسایی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین استفاده شود. نقره پوشش داده شده روی زیرلایههای فعال در SERS با استفاده از آنالیزهای مختلف طیف سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) بررسی شدند. با مشاهده قله پلاسمونی ذرات ساخته شده در حدود ۴۳۹ نانومتر و مشاهده ساختار FCC در مشخصه بایی TRD، تشکیل نقره تایید شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی از زیرلایههای فعال، نشان میدهد تعداد زیادی از ذرات، اندازه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند هر چند ذرات کوچکتر تا اندازه حدود ۵۰ نانومتر و ذرات بزرگتر تا اندازه حدود ۱۰۰ نانومتر نیز ساخته شده اند. حضور ذرات بزرگ تر بر روی زیرلایه فعال منجر میکروسکوپ الکترونی از زیرلایههای فعال، نشان میدهد تعداد زیادی از ذرات، اندازه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند هر چند ذرات کوچکتر تا میکروسکوپ الکترونی از زیرلایههای فعال، نشان میدهد تعداد زیادی از ذرات، اندازه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند هر چند ذرات کوچکتر تا میکروسکوپ آلکترونی از زیرلایههای فعال، نشان میدود ۱۰۰ نانومتر نیز ساخته شده ند. حضور ذرات بزرگ تر بر روی زیرلایه فعال منجر می شود نور از این ذرات بزرگتر پراکنده شود. در ادامه، غلظتهای مختلف این آمینوا سیدها روی زیرلایههای فعال حکاکی شدند تا ارتعاشات می مولکولی آنها در طیف سنجی رامان شناسایی شود. به دلیل تشدید پلاسمونهای سطحی نانوذرات کوچکتر و پراکندگی نور از ذرات بزرگتر نقره، ار تعاشهای مولکولی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین تقویت شدند و شدت طیف SERS آمینواسیدها در مقایسه نقره، ار تعاشهای مولکولی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، با وسین و گلیسین تقویت شدند و شدت طیف SES آمینواسیدها در غلظت ۲۰۰ مولار را دارند.

واژهگان كليدى: طيفسنجى رامان بهبود يافتهى سطحى (SERS)، أمينواسيد، فنيل الانين، بتاالانين، لوسين، گليسين.

مقدمه

پراکندگی رامان نتیجه پراکندگی ناکشسان نور از ماده است و با استفاده از این اثر میتوان اطلاعات بسیار جزئی در مورد ساختار یک مولکول به دست آورد. از آنجاکه طیفسنجی رامان با مسائلی مشابه سایر طیفسنجیها مواجه نیست؛ به عنوان یک روش تکمیلی به طور گسترده به کار میرود. به عنوان مثال، در طیف سنجی IR به دلیل فعال

*نويسندۂ مسئول: vahid.22345@gmail.com

بودن ارتعاشات مولکولی آب، شناسایی گونههای زیستی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در مقايسه با طيفسنج مبتنى بر الكترون و يون كه نياز به خلا بالا دارد، طيفسنجي رامان نه تنها امكان مطالعه مولكولي در شرايط عادي را فراهم مي كند كه با آن ميتوان پروسههاي كاتاليستي و فرايندهايي كه در فصل مشتر ك فلز-الكتروليت رخ میدهد را بررسی کرد [۱]، اما سیگنال مربوط به پراکندگی رامان به طور ذاتی ضعیف است که آشکارسازی را دشوار میکند [۲]، یکی از روشهایی که میتوان سیگنال رامان را بهبود داد استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به دلیل تشدید پلاسمونهای سطحی میتوانند سیگنال پراکندگی را به طور گسترده بهبود دهند که این روش طیفسنجی رامان بهبود یافته سطحی ((Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)) نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکولهایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شدهاند [۳]، در سال ۱۹۷۴، این پدیده برای اولین بار در مورد مولکول پیرادین جذب شده بر روی سطح الکترودهای نقره رشد داده شده به روش الكتروشيميايي مشاهده شد. سيگنال بهبود يافته رامان، فقط بعد از قرارگرفتن الكترود نقره در چرخه اکسایش- کاهش یا فعالسازی مشاهده میشد و برای یک سطح صاف و صیقلی، هیچ سیگنال بهبود یافتهای را نشان نمیداد؛ در ابتدا بهبود سیگنال را بر اساس افزایش تعداد مولکولهای مورد مطالعه به دلیل افزایش مساحت سطحی که زبر شده است؛ توصيف كردند اما بهبود سيگنال رامان بايد دليلي غير از افزايش مساحت سطح داشته باشد كه در سال ۱۹۷۷، بهبود سیگنال رامان به دلیل برهمکنش مولکول با سطح فلز زبر گزارش شد [۴و۲۹]، فلزاتی مانند طلا، نقره، مس و پلاتین جهت مشاهده این پدیده مورد استفاده قرار گرفتهاند. ویژگیهای فلز مانند نوع، شکل، اندازه و حالت کنارهم قرارگرفتن أنها بر پراکندگی رامان اثر میگذارد. از میان فلزات گوناگون، نقره و طلا به علت داشتن تشدید پلاسمونی در ناحیه مرئی و زیرقرمز، پایداری بیشتر و روشهای آسان تولید، بیشتر مورد توجه بودهاند [۵]، آمینواسیدها به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل میشوند و چندین آمینواسید به هم میپیوندند تا یک پلیپیتید را تشکیل دهند. زنجیرههای پلی پپتیدی با هم پیوند یافته و منجر به تشکیل پروتئینهای مختلف میشوند [۶]، دانشمندان طی سالهای مختلف حدوداً ۲۰ اسیدآمینه اصلی را کشف و نامگذاری کردهاند که آمینواسیدهای فنیل آلانین و لوسین از طریق رژیم غذائی تامین میشوند و آمینواسیدهای بتاآلانین و گلیسین در بدن ساخته میشوند. آمینواسیدها نقش اساسی در کارکرد درست مغز، فرایند ریکاوری و تامین انرژی و چربی سوزی در بدن دارند. آمینواسیدها آنزیمهایی تولید میکنند که در بهبود خلقوخو، تمرکز، خواب و اتفاقات فیزیولوژیکی بدن انسان مؤثرند [۲و۸] تشخیص غلظت آمینو-اسیدهای فنیلالانین، بتاالانین، لوسین و گلیسین جهت تشخیص زود هنگام برخی از اختلالهای متابولیکی، دارای اهمیت است. تکنیکهای مختلفی مانند (High Performance Liquid Chromatography) HPLC) [۹] (Gas Chromatography Mass Spectrometry) GC-MS [1.] (Tandem Mass Spectrometry) (MS/MS) [۱۱] و SERS برای اندازه گیری غلظت آمینواسیدها به کار گرفته می شوند. این سه تکنیک در مقایسه با روش SERS از حساسیت کمتری برخوردارند و استفاده از آنها نیازمند صرف هزینههای بالا است. اما سیگنال رامان گونههای زیستی به خصوص در غلظتهای پایین بسیار ضعیف است [۱۲و۱۳]، در این روش، با قرار گرفتن گونهها در نزدیکی سطح و یا جذب فیزیکی اُنھا روی نانوذرات فلزی، به علت برھمکنش میان پلاسمونھای سطحی فلز و گونہھا، شدت سیگنال

(مان افزایش می یابد و بدین ترتیب SERS می تواند برای تشخیص سریع و دقیق گونههای بیولوژیکی استفاده شود [۱۴ ۱۹ (۲۰۰۹)، در این مطالعه، با استفاده از روش ساده شیمیایی تولنز، نقره بر روی زیرلایههای شیشهای پوشش داده شدند تا از آنها به عنوان زیرلایه فعال در SERS برای شناسایی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین استفاده شود. شکل ۱، طرحواره آشکارسازی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلاتین، با سین و گلیسین را نشان میدهد که شکل ۱– (الف) زیرلایه شیشهای حکاکی شده با آمینواسیدها و شکل ۱– (ب) زیرلایه فعال در SERS حکاکی شده با آمینواسیدها است که با تابش نور لیزر با طول موج ۵۲۲ نانومتر، سیگنال نور رامان پراکنده شده اندازه گیری می شود. SERS حکاکی شده با آمینواسیدها است که با تابش نور لیزر با طول موج ۵۲۲ نانومتر، سیگنال نور رامان پراکنده شده از زیرلایه فعال در همان طور که در ادامه مقاله و نتایج به دست آمده مشاهده خواهد شد سیگنال رامان پراکنده شده از زیرلایه فعال در SERS حکاکی شده با آمینواسیدهای فنیل آلاتین، بتاآلاتین، لوسین و گلیسین قوی تر از سیگنال رامان حاصل از آمینواسیدهای فنیل آلاتین، بتاآلاتین، لوسین و گلیسین و گلیسین قوی تر از سیگنال رامان خور ایزر به سطح ناصاف فلز، در اثر تشدید پلاسمونهای سطحی نانوساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر به سطح ناصاف فلز، در اثر تشدید پلاسمونهای سطحی نانوساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی شده است [۱۹۷۲]، بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار می گیرد؛ قطبیدهتر می شود و در شده است [۱۹۷۲]، بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار می گیرد؛ قطبیدهتر می شود و در شده است [۱۹۷۲]، بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار می گیرد؛ قطبیدهتر می شود و در میده است آنه بهبود می یابد المان آلاز ایجاد می شو ساخت زیرلایه فعال در SERS می می می نور ایز می شیرد؛ می شود و در مینویسیه آمینواسیدهای فنیل آلاتین، بتاآلاتین، و سین و ساخت زیرلایه فعال در و حاکی آنها به وسیله آمینواسیدهای فنیل آلاتین، بتاآلاتین و سین و گلیسین و ساخت حسگر و نتایج طیف رامان ارائ می هرای



شکل ۱. طرحواره آشکارسازی و مشاهده (الف). سیگنال رامان حاصل از مولکولهای آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین حکاکی شده بر روی زیرلایه شیشهای. (ب). سیگنال SERS آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین حکاکی شده روی زیرلایه فعال در SERS طیفها به صورت نوعی بهبود سیگنال SERS آمینواسیدهای حکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS را نسبت به سیگنال رامان آمینواسیدهایی که در معرض پراکندگی نور و تشدید پلاسمونهای سطحی ذرات نقره قرار نگرفته اند؛ نمایش می هدید.

مواد و روشها

۱- روشهای ساخت و شناسایی

۱-۱ روش ساخت زیرلایههای فعال در SERS

در لامهای شیشهای با ابعاد ۲۲۸۲ سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در کوره حرارتدهی شدند تا آلودگیهای آلی از و اتانول، نمونهها در دمای ۴۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارتدهی شدند تا آلودگیهای آلی از سطح شیشه حذف شوند و در واقع برای نقرهاندود کردن شیشهها، سطوحی آبدوست داشته باشیم. در روش تولنز از سه محلول آبی شامل (۱) ۱۲ میلی لیتر محلول نقره نیترات ۱/۱ مولار، (۲) ۲۰ میلی لیتر محلول پتاس ۲۰/۵ مولار و (۳) ۱۰ میلی لیتر محلول ساکاروز ۲۰/۰ مولار استفاده می شود. با افزودن محلول ساکاروز بر روی محلول آمونیا کی نقره نیترات و پتاس با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد که زیرلایههای شیشهای نیز در آن قرار گرفتهاند؛ پس از گذشت حدود ۴ دقیقه، لایهی ناز کی از نقره بر روی زیرلایههای شیشهای نیز در آن قرار گرفتهاند؛ پس از گذشت حدود ۴ ییترات و پتاس با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد که زیرلایههای شیشهای نیز در آن قرار گرفتهاند؛ پس از گذشت حدود ۴ ییون شسته و در دمای آزمای شگاه خشک شدند. برای آ شکار سازی آمینوا سیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لو سین و گلیسین، غلظتهای ۲-۱۰، ۲-۱۰، ۲-۱۰، ۵-۱۰، ۲-۱۰ و^۲ مولار آنها تهیه شد. در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظتهای تهیه شده به صورت جداگانه و به روش قطرهاف شان بر روی زیرلایه فعال در گرفته سطحی قرب از خشک شدن، طیف رامان آمینوا سیدهای حکاکی شده روی شیشه و طیف رامان بهبود یافته سطحی آمینوا سیدهای خشک شدن، میفر رامان آمینوا سیدهای حکاکی شده روی شیشه و طیف رامان بهبود یافته سطحی آمینوا سیدهای

۲-۱ مشخصه یابی

طیفسنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتو X پوشش نقره به ترتیب به وسیله دستگاه UV-Vis مدل Lambda25 و دستگاه Cu Kα ساخت شرکت Panalytical کشور هلند، با پرتو تکفام Cu Kα با طول موج ۱۵۴۰۰ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی Takram موج ۱۵۴۰۰ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی موج ۲۵۴۰ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی موج ۲۵۴۰ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی موج ۲۵۴۰ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی موج ۲۵۴۰ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. دستگاه طیف میلی میدانی (Takram مدل ۱۵۹۵ مدل ۱۵۹۵ مدل ۱۹۵۵ میلی میدانی (PE-SEM) به وسیله ی دستگاه نانومتر و با تابش نور لیزر NG:YAG، با طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل مدل ۵۵ کیلی میلی وات برای اندازه گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه ها استفاده شد.

نتايج و بحث

۱- طیف جذب نانوذرات نقره، طیف خاموشی و الگوی XRD زیرلایه فعال در SERS

شکل۲– (الف) طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی تولنز با عامل کاهنده ساکاروز و تصویر داخل آن، ظرف شیشهای حاوی کلوئید نقره را نشان میدهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۲۸ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره را تائید می کند [۱۹]، شــکل۲- (ب) ، طیف خاموشــی (جذب + پراکندگی) زیرلایه فعال در SERS را ن شان میدهد و تصویر داخل اَن تصویر یکی از این زیرلایهها ا ست. قله ت شدید پلا سمونی در طولموج ۴۳۹ نانومتر ح ضور نانو ساختارهای نقره را در زیرلایه فعال در SERS نه شان میدهد. م شاهده یک قله جذبی در طیفهای جذبی نانوذراتی مانند نقره، بیانگر شـکل کروی یا شـبه کروی بودن نانوذرات اسـت [۲۰]، همانطور که مشـاهده میشـود با نشاندن نانوذرات نقره روی زیرلایه شیشهای، با تغییر محیط در بردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می کند؛ جابهجایی در طول موج قله پلاسمونی رخ میدهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای قله نیز افزایش مییابد به این دلیل که موقعیت قله پلاسمونی به ضریب شکست محیط در بردارنده آن وابسته است [۲۱]، بر خلاف محلول کلوئیدی پایدار که نانوذرات نقره در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصلههای مشخصی از یکدیگر قرار دارند؛ با قرار گرفتن نانوذرات نقره روی زیرلایه شیشهای، حین خشک شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می گیرند و کلوخههایی متشــکل از چندین نانوذره روی زیرلایه شــکل میگیرد به گونهای که میتوان این کلوخهها را ذرات بزرگتری در نظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می شود [۲۱]، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است [۲۱]، این که زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) زیرلایه فعال در SERS، در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است. شکل۲- (ج) ، الگوی پراش اشـعه ایکس زیرلایه فعال اسـت که با مشـاهده بزرگترین و اصـلیترین قلهها در زاویهی ۲θ برابر با ۳۸/۳۸، ۴۴/۸۷ ۶۴/۸۵ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰) و (۲۲۰) است؛ تشکیل ساختار FCC نقره را تایید مي کند.



شکل ۲. (الف). طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی تولنز با بیشینه جذب در طولموج ۴۲۸ نانومتر و تصویر ظرف حاوی محلول کلوئیدی نانوذرات نقره، (ب). طیف خاموشی زیرلایه فعال در SERS با بیشینه خاموشی در طولموج ۴۳۹ نانومتر و تصویر یکی از زیرلایههای فعال و (ج). الگوی پراش اشعه ایکس زیرلایه فعال در SERS.

۲- تصویر FE-SEM زیرلایه فعال در SERS و توزیع اندازه ساختارهای نقره

در شکل ۳- (الف) تصویر FE-SEM زیرلایه فعال در SERS مشاهده می شود. پو شش نقره ایجاد شده به صورت یک پارچه و یکنواخت نیست و مجموعهای از ذرات کروی یا شبه کروی در بخشهای مختلف زیرلایه مشاهده می شود که توزیع اندازه ذرات در شکل ۳- (ب) نشان می دهد که ذرات نقره اندازههای بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات با اندازه ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر مشاهده می شود. نانوذرات کوچک تر، میدانهای الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می کنند که حاصل تشدید پلا سمونهای سطحی نقره است و چنانچه گونههای زیستی در این موقعیت ها قرار بگیرند؛ در معرض تابش میدانهای الکتریکی نزدیک قرار می گیرند. ذرات بزرگ تر، میدانهای الکتریکی نزدیک ِ ناچیزی دارند و نور تابیده شده به آنها، از سطح آنها پراکنده می شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می کنند [۲۳و۲۲].



شکل۳. (الف). تصویر FE-SEM زیرلایه فعال در SERS و (ب). توزیع اندازه ذرات نقره نمایش داده شده روی این زیرلایه فعال که اندازههای بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند.

۳- طیف رامان، طیف SERS و آ شکار سازی آمینوا سیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لو سین و گلیسین

در شکل ۴، طیف رامان زیرلایه فعال در SERS (منحنی آبی)، طیف رامان آمینواسیدهای حکاکی شده با غلظت ^۲-۱۰ مولار بر روی زیرلایه شیشهای (منحنی سبز) و طیف SERS آمینواسیدهای حکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS با غلظت ^۲-۱۰ (منحنی قهوهای) و ^۷-۱۰ مولار (منحنی قرمز) مشاهده می شوند. در طیف رامان (منحنیهای سبز) آمینوا سیدهای (الف) فنیل آلانین، (ب) بتاآلانین، (ج) لو سین و (د) گلیسین که روی زیرلایههای شیشهای حکاکی شدهاند؛ نشانی از ارتعا شات مولکولی مربوط به هر آمینوا سید مشاهده نمی شود. بنابراین عملا شنا سایی این گونهها با حتی با غلظت ^۲-۱۰ مولار و با استفاده از طیف سنجی رامان امکان پذیر نیست. ارتعا شات مولکولی هر یک از امینواسیدها [۲۴ و۲۵]، به صورت خط-چینهایی بر روی طیفهای امینواسیدها در شکل ۴ نمایش داده شدهاند. در مورد فنیل الانین، ارتعاشات کششی C-C، خمشی O-C-H، کششی C-C-C-C و خمشی C-C-H به ترتیب در ۶۰۰، ۶۵۴، ۸۹۹ و ۱۳۴۱ ^{۲۰} cm ظاهر می شوند. ارتعا شات که شهی C-H نیز در موقعیتهای ۱۲۶۲، ۲۹۲۰ و ۳۰۶۲ و ۳۰۶۲ م شاهده می شوند. برای بتاآلانین، در مورد بتاآلانین، ارتعا شات کاششی C-COO، خم شی 'NH_r، خم شی CH و خمشــی H-O-H به ترتیب در ۹۳۷، ۱۱۲۳، ۱۳۷۰ و ۲۵۸۹ ^۲۰ cm ظاهر میشـوند. ارتعاشــات خمشــی CH_۲ نیز در موقعیتهای ۱۵۱۸، ۲۰۱۸ و ۲۳۶۶ ^{۲۰}m^{-۱} و ارتعاشـات کشـشـی C-H نیز در موقعیتهای ۳۰۰۰ و ۳۴۴۷ cm مشاهده می شوند. در مورد لوسین، ارتعاشات خمشی NH_۲، خمشی CH_۳ و کششی C-C به ترتیب در ۵۳۶، ۷۲۳ و ۸۵۸ ^{۲۰} m^{-۱} ظاهر می شوند. ارتعاشات خمشی H-O-H نیز در موقعیتهای ۲۶۷۸ و ۳۰۰۰ cm و ارتعاشات کششی C-H نیز در موقعیتهای ۱۱۸۶ و ۱۵۸۷ د m^{-۱} ۳۵۱۷ م شاهده می شوند. در مورد گلیا سین، ارتعاش amid VI، ارتعا شات کششی ⁻COO، کششی C-C و خمشی NH_۲، به ترتیب در ۵۲۷، ۶۹۶، ۸۰۳ و ۱۲۱۵ cm⁻ ظاهر می شوند. ارتعاشات خمشی CH_r نیز در موقعیتهای ۱۳۹۳ و ۱۹۳۷ ^۲ cm^{-۱} و ارتعاشات کششی C-H نیز در موقعیتهای ۴۱۹، ۲۱۰۳ و ۲۹۷۳ ^{۲۰} m۹۷۳ مشاهده می شوند. ارتعاشاتی که در طیفها ظاهر شدهاند؛ با خط-چین های آبی و ارتعاشاتی که در طیفها ظاهر نشــدهاند با خطچینهای قرمز نمایش داده شــدهاســت. با حکاکی فنیل اًلانین با غلظت ۲-۱۰ مولار بر روی زیرلایهفعال در SERS، ارتعاشات مولکولی فنیلآلانین (شکل ۴— (الف)) ظاهر می شوند. معمولا در دماهای پایین با از بین بردن افت و خیزهای حرارتی، ارتعاشاتی که به خصوص در عددموجهای کمتر اتفاق میافتند؛ قابل اُشکارسازی مي شوند [۲۶]، بنابراين، به اين دليل كه طيف سنجي در دماي اتاق انجام شده ا ست؛ ارتعا شات مولكولي كه با خط-چینهای قرمز نمایش داده شـدهاند؛ در طیف SERS ظاهر نشـدهاند. اسـتفاده از زیرلایههای فعال در SERS نه تنها منجر به ظاهر شدن ارتعا شات مولكولي فنيل الانين (شكل ۴- (الف)) مي شود، بلكه اين روند براي بتااًلانين (شكل ۴-(ب))، لو سین (شکل ۴-(ج)) و گلیسین (شکل ۴-(د)) نیز مشاهده می شود. بهبود سیگنال رامان در اثر ا ستفاده از زیرلایههای فعال در SERS، به دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر روی سـطح شـیشـه اسـت. نقاط زبری که با نقرهاندود كردن شيشه ايجاد شده است. ذرات بزرگتر نقره كه در شكل ٣- (الف) مشاهده مي شوند؛ با پراكنده كردن نور ليزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به آمینواسیدها، سیگنال رامان آنها را بهبود میدهند. در کنار پراکندگی نور از ذرات بزرگتر نقره، یکی دیگر از دلایل بهبود سیگنال رامان، تشدید پلاسمونهای سطحی ذرات کوچکتر نقره یا همان ميدانهاي الكتريكي قوى اطراف اين نانوذرات است. نانوذرات نقره مشاهده شده در شكل ٣- (الف) به مانند لنز اپتيكي عمل میکنند و نور لیزر فرودی را در اطراف خود متمرکز میکنند. بنابراین شدت میدان الکتریکی در نزدیکی نانوذرات افزایش مییابد و با قرارگیری آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه میکنند و قطبیدهتر میشـوند و در نتیجه ارتعاش های مولکولی آن ها تقویت میشـود و سیگنالهای پر شدت تری را نشان میدهند [۳۱،۲۸،۲۷و۳] همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود با کاهش غلظت آمینواسـیدها، تعداد مولکولهای آمینواسـیدهای فنیلاًلانین، بتااًلانین، لوسـین و گلیسـین و در نتیجه تعداد ارتعاشات مولکولی آن نیز کاهش مییابد. بنابراین، با کاهش غلظت از آمینواسیدها از ۲۰۰۲ مولار به ۲۰۰۲ مولار، از شدت سیگنالهای SERS آمینواسیدهای فنیل آلانین (شکل ۴- (الف)) ، بتاآلانین (شکل ۴- (ب))، لوسین (شکل ۴-(ج)) و گلیسین (شکل ۴- (د)) نیز کاسته می شود اما همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود با استفاده از زیرلایههای فعال در SERS، با وجود کاهش تعداد ارتعاشات مولکولی، هم چنان ارتعاشات مولکولی آمینواسیدها قابل آشکارسازی است.



شکل ۴- طیفهای رامان و SERS زیرلایه فعال در SERS و آمینواسیدهای (الف). فنیل آلانین، (ب). بتاآلانین، (ج). لوسین و (د). گلیسین. طیف رامان زیرلایه فعال در SERS (منحنی آبی)، طیف رامان آمینواسید حکاکی شده بر روی زیرلایه شیشهای (منحنی سبز) و طیف SERS آمینواسید حکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS با غلظت ^۲-۱۰ (منحنی قهوهای) و ^۷-۱۰ مولار (منحنی قرمز). ارتعاشات مولکولی که در طیف SERS ظاهر شدهاند؛ با خط-چین آبی و ارتعاشات مولکولی که در ظاهر نشدهاند؛ با خط-چین قرمز مشخص شده است.



شکل ۵- طیفهای SERS آمینواسیدهای (الف). فنیل آلانین، (ب). بتاآلانین، (ج). لوسین و (د). گلیسین با غلظت ^۲-۱۰ مولار و حکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS. ار تعاشات مولکولی که در طیف SERS ظاهر شدهاند؛ با خط-چین آبی و ار تعاشات مولکولی که در ظاهر نشدهاند؛ با خط-چین قرمز مشخص شده است.

نتيجهگيرى

به منظور شنا سایی و کنترل بیماریهای متابولی سمی که نا شی از کمبود یا افزایش آمینوا سیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لو سین و گلیسین در بدن است، آ شکار سازی این آمینوا سیدها دارای اهمیت است. روش طیف سنجی رامان رو شی غیرمخرب برای شنا سایی مولکولها است اما به دلیل ضعیف بودن سیگنال رامان، عملا شنا سایی غلظتهای اندک مولکولها امکان پذیر نیست. با قرار دادن مولکولها در معرض تشدید پلاسمونهای سطحی نانوذرات فلزی مانند نقره و پراکندگی نور از ذرات بزرگ فلزی، میتوان سیگنال رامان را بهبود داد. در این پژوهش، با استفاده از کاهش شیمیایی نقره روی زیرلایههای شیشهای که رو شی ارزان قیمت و آ سان است؛ زیرلایههای فعال در SERS ساخته شدند. ذرات نقره تشکیل شده بر روی زیرلایه شیشهای، اندازههای بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند که به دلیل تشدید پلاسمونهای سطحی نانوذرات نقره و پراکندگی نور از ذرات نقرهی

بزرگتر، سیگنال رامان ارتعاشهای مولکولی آمینوا سیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لو سین و گلیسین تقویت شدند. بنابراین، این زیرلایههای فعال در SERS، انتخاب مناسبی برای آشکارسازی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین به شمار می آیند تا بیماریهای متابولیسمی شناسایی و کنترل شوند. با کاهش غلظت آمینواسیدهای حکاکی شده روی زیرلایههای فعال، سیگنالهای SERS نیز به دلیل کاهش تعداد ارتعاشهای مولکولی کاهش می یابد اما هم چنان ارتعا شات مولکولی آنها قابل شناسایی است. این زیرلایههای فعال در SERS، می توانند به تشخیص کم هزینه و زود هنگام بیماریهای متابولیسمی ناشی از بر هم خوردن غلظت آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتاآلانین، لوسین و گلیسین کمک کند.

قدردانی

نویسندگان بر خود لازم میدانند تا از همکاری خانم دکتر زهرا عقیلی، بابت اندازه گیری طیفهای رامان قدردانی نمایند.

منابع

1. Cyrankiewicz M., wybranowski T., and Kruszewski S., "Study of SERS efficiency of metallic colloidal systems", Journal Physics, 79 (2007) 012013.

2. Duan, N., Chang, B., Zhang, H., Wang, Z., and Wu, S., "Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor", International Journal Food Microbiology, 218 (2016) 38–43.

3. Wang, L.R., and Fang, Y., "IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles", Spectrochim. Acta. Part. A. Mol. Biomol.

Spectrosc. 63 (3) (2006) 614-618.

4. Jing, C., and Fang, Y., "Simple method for electrochemical preparation of silver dendrites used as active and stable SERS substrate", Journal. Of. Colloid .and .Interface. Science. 314 (2007) 46–51.

5. Cañamares, M.V., Garcia-Ramos, J. V., Sanchez-Cortes, S., Castillejo, M. and Oujja, M., "Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties", J. Colloid. Interface. Sci. 326 (2008) 103–109.

 Ryadnov, M., Hudecz, F., Antonatou, E., Chiba, P., Farkas, E., Fearn, S., Gunnoo, S.B., Hegedus, T., Madder, A., Nice, E.C., Ohashi, N., Ravi, J., Ray, S., Ryadov, M.G., So'va'ga, I., Stockner, T., Szaka'cs, G., Szo"llosi, D., Tamamura, H. and Vannecke, W.," Amino Acids, Peptides and Proteins", The. Royal. Society. of. Chemistry. 41 (2017) 290.

7. D'MeIIo, G.P.F., "Amino Acids in Human Nutrition and Health", Formerly. of. S.A.C. University. of. Edinburgh. King's. Buildings. Campus. Edinburgh. U.K, (2012) 544 PP.

8. Lemke, E.A., "Noncanonical Amino Acids Methods and Protocols", tructural. and. Computational. Biology. Unit. & Cell. Biology. and Biophysics. Unit. E.M.B.L. Heidelberg. Germany. Departments. of Biology. and Chemistry. Pharmacy. and Geosciences. Johannes. Gutenberg. University. Mainz. Germany. Institute. of Molecular. Biology. (I.M.B). Mainz. Germany. (2018) 401 PP.

9. Cheng, M.L., Tsai, B.C. and Yang, J. "Silver nanoparticle-treated filter paper as a highly sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate for detection of tyrosine in aqueous solution". Analytica. Chimica. Acta. 708 (2011) 89-96.

 B anta-wright, S. and Steiner, R. "Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening", A. Primer. for. Neonatal. and. Nurses. 18 (2004) 41-60.

11. Escobar-Morreale, H.F., Samino, S., Insenser, M., Vinaixa, M., Luque-Rami'rez, M., 12.

Lasuncion, M.A. and Correig, X. "Metabolic Heterogeneity in Polycystic Ovary Syndrome Is Determined by Obesity : Plasma Metabolomic Approach Using GC-MS", Clinical. Chemistry. 58: 999 (2012) 1009.

12. Wang, C., Meloni, M.M., Wu, X., Zhuo, M., He, T., Wang, J. and Dong, P. "Magnetic plasmonic particles for SERS-based bacteria sensing A review." A.I.P. Advances. 9 (2019) 010701.

 Su, S.R., Chen, Y.Y., Li, K.Y., Fang, Y.C., Wang, C.H., Yang, C.Y., Chau, L.K. and Wang,
 S.C. "Electrohydrodynamically enhanced drying droplets for concentration of Salmonella bacteria prior to their detections using antibody-functionalized SERS-reporter submicron beads".
 Sensors. and. Actuators. B. Chemical. 283 (2019) 384-389.

14. Zhou, H., Yang, D., Ivleva, N.P., Mircescu, N.E., Niessner, R. and Haisch, C. "SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles". Analytical. chemistry. 86(3) (2014) 1525-1533.

15. Mosier-Boss, P. "Review on SERS of Bacteria." Biosensors. 7(4) (2017) 51.

16. Ren, B., Liu, G.K., Lian, X.B., Yang, Z.L. and Tian, Z.Q. "Raman spectroscopy on transition metals." Analytical. and. bioanalytical. chemistry. 388 (2007) 29-45.

17. Matricardi, C., Hanske, C., Garcia-Pomar, J.L., Langer, J., Mihi, A. and Liz-Marzan, L.M.
"Gold Nanoparticle Plasmonic Superlattices as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates." A.C.S. Nano. 12 (8) (2018.) 8531-5839.

18. Lin, K.Q., Yi, J., Hu, S., Liu, B.J., Liu, J.Y., Wang, X. and Ren, B. "Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy". The Journal. of .Physical. Chemistry. C. 120 (37) (2016) 20806-20813.

19. Sharifi, N. and Taghavinia, N. "Silver nano-islands on glass fibers using heat segregation method. "Materials. Chemistry. and. Physics. 113(2009) 63-66.

20. António, M., Nogueira, J., Vitorino, R. and Daniel-da-Silva, A. "Functionalized Gold Review Nanoparticles for the Detection of C-Reactive Protein." Nano. materials. 8 (4) (2018)

200.

Bohren, C.F. and Huffman, D.R. "Absorption and Scattering of Light by Small Particles."
 Wiley. New York. 306 (1983.) 625 PP.

22. Wang, L.R. and Fang, Y. "IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles". Spectrochimica. Acta. Part. A: Molecular. and. Biomolecular. Spectroscopy. 63 (2006) 614-618.

23. Canamares, M.V., Garcia-Ramos, J.V., Sanchez-Cortes, S., Castillejo, M. and Oujja, M. "Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties." Journal. of. colloid. and. interface. science. 326 (2008) 103-109.

24. Stewart, S. and Fredericks, P.M. "Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface." Spectrochimica. Acta. Part. A. Molecular. And. Biomolecular. Spectroscopy. 55 (1999) 1641–1660.

25. Podstawka, E., Ozaki, Y. and Proniewicz, L.M. "Part I: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Amino Acids and Their Homodipeptides Adsorbed on Colloidal Silver." Applied Spectroscopy. 58 (2004) 581-590.

26. Surovtsev, N.V., Adichtchev, S.V., Malinovsky, V.K., Ogienko, A.G., Drebushchak, V.A., Manakov, A.Yu., Ancharov, A.I., Yunoshev, A.S. and Boldyreva, E.V. "Glycine phases formed from frozen aqueous solutions: Revisited." THE. JOURNAL.OF. CHEMICAL. PHYSICS. 137 (2012) 065103.

27. Chen, H.Y, Lin, M.H, Wang, C.Y, Chang, Y.M. and Gwo, S. "Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale". Journal of the American Chemical Society. 137 (42) (2015) 13698-13705.

28. Granger, J.H., Schlotter, N.E., Crawford, A.C. and Porter, M.D. "Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS)." Chemical Society Reviews. 45 (2016) 3865-3882.

29. Madzharova, F., Heiner, Z. and Kneipp, J. " Surface Enhanced Hyper-Raman Scattering of the Amino Acids Tryptophan, Histidine, Phenylalanine, and Tyrosine." American Chemical Society ACS. 121 (2) 2016 1235-1242.

30. Kandakkathara, A., Utkin, I. and Fedosejevs, R. "Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Detection of Low Concentrations of Tryptophan Amino Acid in Silver Colloid." Applied Spectroscopy. 65 (2011) 507-513.

31. Luo, Y., Wen, G., Ma, L., Liang, A. and Jiang, Z. " A Sensitive SERS Quantitative AnalysisMethod for Amino Acids Using Ruhemann's Purple as Molecular Probe in Triangle Nanosilver Sol Substrate." Applied Spectroscopy. 12 (2017) 299-308.

32. Podstawka, E., Ozaki, Y. and Proniewicz, L.M. "Part III: Surface-Enhanced Raman Scattering of Amino Acids and Their Homodipeptide Monolayers Deposited onto Colloidal Gold Surface." Applied Spectroscopy. 59 (2005) 1516-1526.