

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

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

دریافت: ۹۸/۳/۱۲

پذیرش: ۹۹/۶/۳۰

چکیده

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 طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS) برای تشخیص و شناسایی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین استفاده شود. نقره پوشش داده شده روی زیرلایه‌های فعال در SERS با استفاده از آنالیزهای مختلف طیف‌سنجی 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 مشخصه‌یابی XRD، تشکیل نقره تایید شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی از زیرلایه‌های فعال، نشان می‌دهد تعداد زیادی از ذرات، اندازه بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر دارند هر چند ذرات کوچک‌تر تا اندازه حدود ۵۰ نانومتر و ذرات بزرگ‌تر تا اندازه حدود ۱۰۰۰ نانومتر نیز ساخته شده‌اند. حضور ذرات بزرگ‌تر بر روی زیرلایه فعال منجر می‌شود نور از این ذرات بزرگ‌تر پراکنده شود. در ادامه، غلظت‌های مختلف این آمینواسیدها روی زیرلایه‌های فعال حکاکی شدند تا ارتعاشات مولکولی آن‌ها در طیف‌سنجی رامان شناسایی شود. به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات کوچک‌تر و پراکندگی نور از ذرات بزرگ‌تر نقره، ارتعاش‌های مولکولی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین تقویت شدند و شدت طیف SERS آمینواسیدها در مقایسه با شدت طیف رامان آن‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. زیرلایه‌های فعال در SERS ساخته شده، توانایی تشخیص آمینواسیدها تا غلظت 10^{-7} مولار را دارند.

واژه‌گان کلیدی: طیف‌سنجی رامان بهبود یافته‌ی سطحی (SERS)، آمینواسید، فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین، گلیسین.

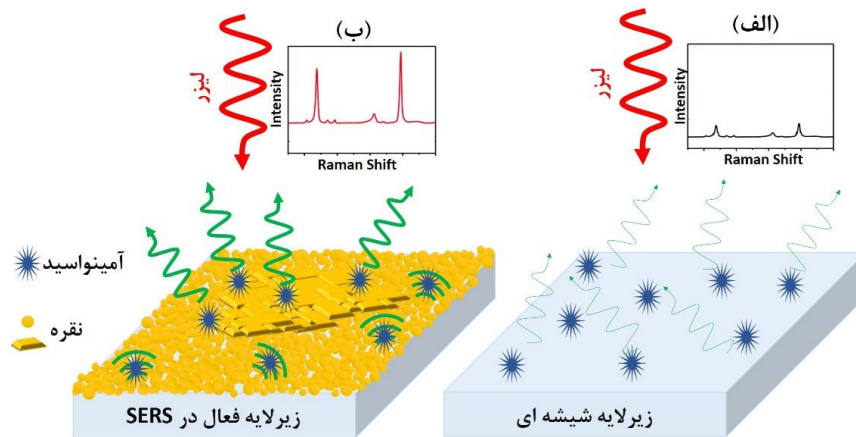
مقدمه

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 طیف‌سنجی IR به دلیل فعال

*نویسنده مسئول: vahid.22345@gmail.com

بودن ارتعاشات مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در مقایسه با طیف‌سنج مبتنی بر الکترون و یون که نیاز به خلا بالا دارد، طیف‌سنجی رامان نه تنها امکان مطالعه مولکولی در شرایط عادی را فراهم می‌کند که با آن می‌توان پروسه‌های کاتالیستی و فرایندهایی که در فصل مشترک فلز-الکترولیت 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 الکتروشیمیایی مشاهده شد. سیگنال بهبود یافته رامان، فقط بعد از قرار گرفتن الکترودهای 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 زیر شده است؛ توصیف کردند اما بهبود سیگنال رامان باید دلیلی غیر از افزایش مساحت سطح داشته باشد که در سال ۱۹۷۷، بهبود سیگنال رامان به دلیل برهم‌کنش مولکول با سطح فلز زیر گزارش شد [۴ و ۲۹]، فلزاتی مانند طلا، نقره، مس و پلاتین جهت مشاهده این پدیده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های فلز مانند نوع، شکل، اندازه و حالت کنارهم قرار گرفتن آن‌ها 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 پلی‌پپتید را تشکیل دهند. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی با هم پیوند یافته و منجر به تشکیل پروتئین‌های مختلف می‌شوند [۶]، دانشمندان طی سال‌های مختلف حدوداً ۲۰ اسیدآمینو اصلی را کشف و نام‌گذاری کرده‌اند که آمینواسیدهای فنیل‌آلانین و لوسین از طریق رژیم غذایی تامین می‌شوند و آمینواسیدهای بتا‌آلانین و گلیسین در بدن ساخته می‌شوند. آمینواسیدها نقش اساسی در کارکرد درست مغز، فرایند ریکآوری 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 [۷ و ۸] تشخیص غلظت آمینو-اسیدهای فنیل‌آلانین، بتا‌آلانین، لوسین و گلیسین جهت تشخیص زود هنگام برخی از اختلال‌های متابولیکی، دارای اهمیت است. تکنیک‌های مختلفی مانند HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [۹]، TMS (MS/MS) (Tandem Mass Spectrometry) [۱۰] و GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry) [۱۱] و SERS برای اندازه‌گیری غلظت آمینواسیدها به کار گرفته می‌شوند. 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 [۱۲ و ۱۳]، در این روش، با قرار گرفتن گونه‌ها در نزدیکی سطح و یا جذب فیزیکی آن‌ها روی نانوذرات فلزی، به علت برهم‌کنش میان پلاسمون‌های سطحی فلز و گونه‌ها، شدت سیگنال

رامان افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق گونه‌های بیولوژیکی استفاده شود [۱۴] ، ۱۵ و ۳۰]، 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، بتا آلانین، لوسین و گلیسین استفاده شود. شکل ۱، طرحواره آشکارسازی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین 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 ۵۳۲ نانومتر، سیگنال نور رامان پراکنده شده اندازه‌گیری می‌شود. همان‌طور 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 آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین قوی‌تر از سیگنال رامان حاصل از آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین حکاکی شده روی زیرلایه شیشه‌ای است. در واقع با تابش نور لیزر به سطح ناصاف فلز، در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبود یافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است [۱۶ و ۱۷]، بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار می‌گیرد؛ قطبیده‌تر می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد [۱۸، ۳۱ و ۳۲]، در ادامه، روش ساخت زیرلایه فعال در SERS، حکاکی آن‌ها به وسیله آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین و ساخت حسگر و نتایج طیف رامان ارائه می‌شود.



شکل ۱. طرحواره آشکارسازی و مشاهده (الف). سیگنال رامان حاصل از مولکول‌های آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین حکاکی شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای. (ب). سیگنال SERS آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، 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 می‌دهند.

مواد و روش‌ها

۱- روش‌های ساخت و شناسایی

۱-۱ ساخت زیرلایه‌های فعال در SERS

در لام‌های شیشه‌ای با ابعاد $2/5\text{cm} \times 1\text{cm}$ به عنوان زیرلایه برش داده شد. پس از شستشو با آب و صابون، استون و اتانول، نمونه‌ها در دمای 400°C درجه سانتی‌گراد به مدت 30 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) 12 میلی‌لیتر محلول نقره نیترات $0/1$ مولار، (۲) 20 میلی‌لیتر محلول پتاس $0/05$ مولار و (۳) 10 میلی‌لیتر محلول ساکاروز $0/07$ مولار استفاده می‌شود. با افزودن محلول ساکاروز بر روی محلول آمونیاکی نقره نیترات و پتاس با دمای 50°C درجه سانتی‌گراد که زیرلایه‌های شیشه‌ای نیز در آن قرار گرفته‌اند؛ پس از گذشت حدود 4 دقیقه، لایه‌ی نازکی از نقره بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای، تشکیل می‌شود [۱۹]، نمونه‌ها از محلول خارج، با آب بدون یون شسته و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. برای آشکار سازی آمینو اسیدهای فنیل‌آلانین، بتا‌آلانین، لو سین و گلیسین، غلظت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} و 10^{-7} مولار آن‌ها تهیه شد. در ادامه، 10 میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده به صورت جداگانه و به روش قطره‌افشان بر روی زیرلایه فعال در SERS قرار گرفت و پس از خشک شدن، طیف رامان آمینو اسیدهای حکاکی شده روی شیشه و طیف رامان بهبود یافته سطحی آمینو اسیدهای حکاکی شده روی زیرلایه فعال در SERS، اندازه‌گیری شدند.

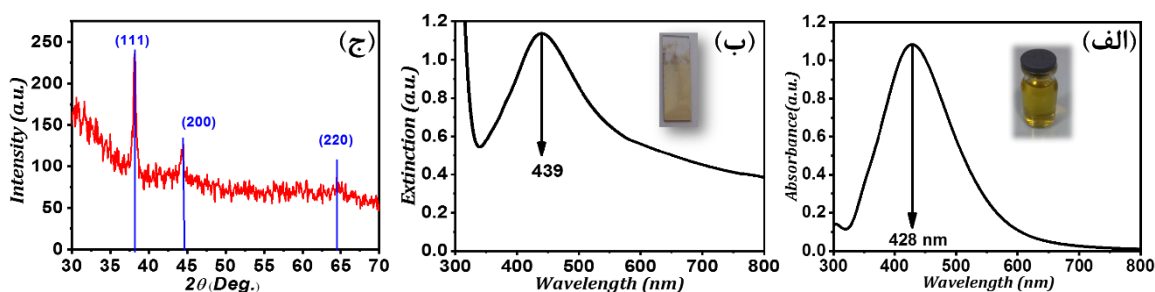
۲-۱ مشخصه‌یابی

طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتو X پوشش نقره به ترتیب به وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25، و دستگاه X Pert-Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند، با پرتو تک‌فام $\text{Cu K}\alpha$ با طول موج $0/154$ نانومتر، جریان 40 میلی‌آمپر و با ولتاژ 40 کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM) به وسیله‌ی دستگاه Hitachi مدل S4160 انجام شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان Takram مدل P50C0R10 ساخت شرکت تکسان با تابش نور لیزر Nd:YAG، با طول موج 532 نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم 75 میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

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

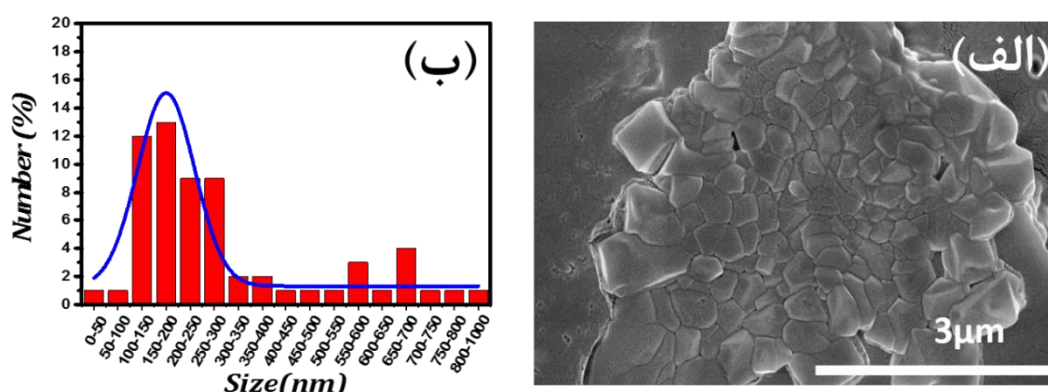
شکل ۲- (الف) طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی تولنز با عامل کاهنده ساکاروز و تصویر داخل آن، ظرف شیشه‌ای حاوی کلئوئید نقره را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۲۸ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می‌کند [۱۹]، شکل ۲- (ب)، طیف خاموشی (جذب + پراکندگی) زیرلایه فعال در SERS را نشان می‌دهد و تصویر داخل آن تصویر یکی از این زیرلایه‌ها است. قله تشدید پلاسمونی در طول موج ۴۳۹ نانومتر حضور نانو ساختارهای نقره را در زیرلایه فعال در SERS نشان می‌دهد. مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های جذبی نانوذراتی مانند نقره، بیانگر شکل کروی یا شبه کروی بودن نانوذرات است [۲۰]، همان‌طور که مشاهده می‌شود با نشان دادن نانوذرات نقره روی زیرلایه شیشه‌ای، با تغییر محیط در بردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند؛ 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 کلئوئیدی 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 می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی زیرلایه شکل می‌گیرد به گونه‌ای که می‌توان این کلوخه‌ها را ذرات بزرگتری در نظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می‌شود [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. شکل ۲- (ج)، الگوی پراش اشعه ایکس زیرلایه فعال است که با مشاهده بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه 2θ برابر با $38/38^\circ$ ، $44/87^\circ$ و $64/85^\circ$ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰) و (۲۲۰) است؛ تشکیل ساختار FCC نقره را تأیید می‌کند.



شکل ۲. (الف). طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی تولنز با بیشینه جذب در طول موج ۴۲۸ نانومتر و تصویر ظرف حاوی محلول کلئوئیدی نانوذرات نقره، (ب). طیف خاموشی زیرلایه فعال در SERS با بیشینه خاموشی در طول موج 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 می‌شود. پوشش نقره ایجاد شده به صورت یک پارچه و یکنواخت نیست و مجموعه‌ای از ذرات کروی یا شبه کروی در بخش‌های مختلف زیرلایه مشاهده می‌شود که توزیع اندازه ذرات در شکل ۳- (ب) نشان می‌دهد که ذرات نقره اندازه‌های بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات با اندازه ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر مشاهده می‌شود. نانوذرات کوچک‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره است و چنانچه گونه‌های زیستی در این موقعیت‌ها قرار بگیرند؛ در معرض تابش میدان‌های الکتریکی نزدیک قرار می‌گیرند. ذرات بزرگ‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک ناچیزی دارند و نور تابیده شده به آن‌ها، از سطح آن‌ها پراکنده می‌شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می‌کنند [۲۲ و ۲۳].



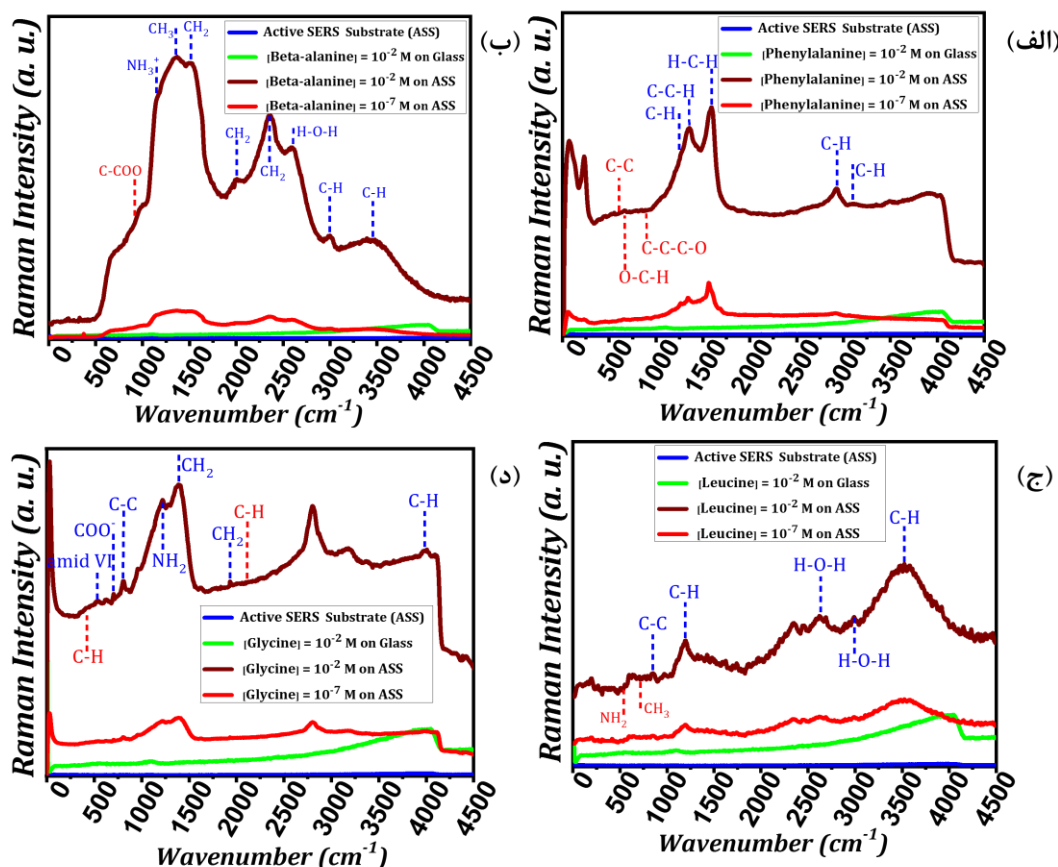
شکل ۳. (الف). تصویر FE-SEM زیرلایه فعال در SERS و (ب). توزیع اندازه ذرات نقره نمایش داده شده روی این زیرلایه فعال که اندازه‌های بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند.

۳- طیف رامان، طیف SERS و آشکار سازی آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین

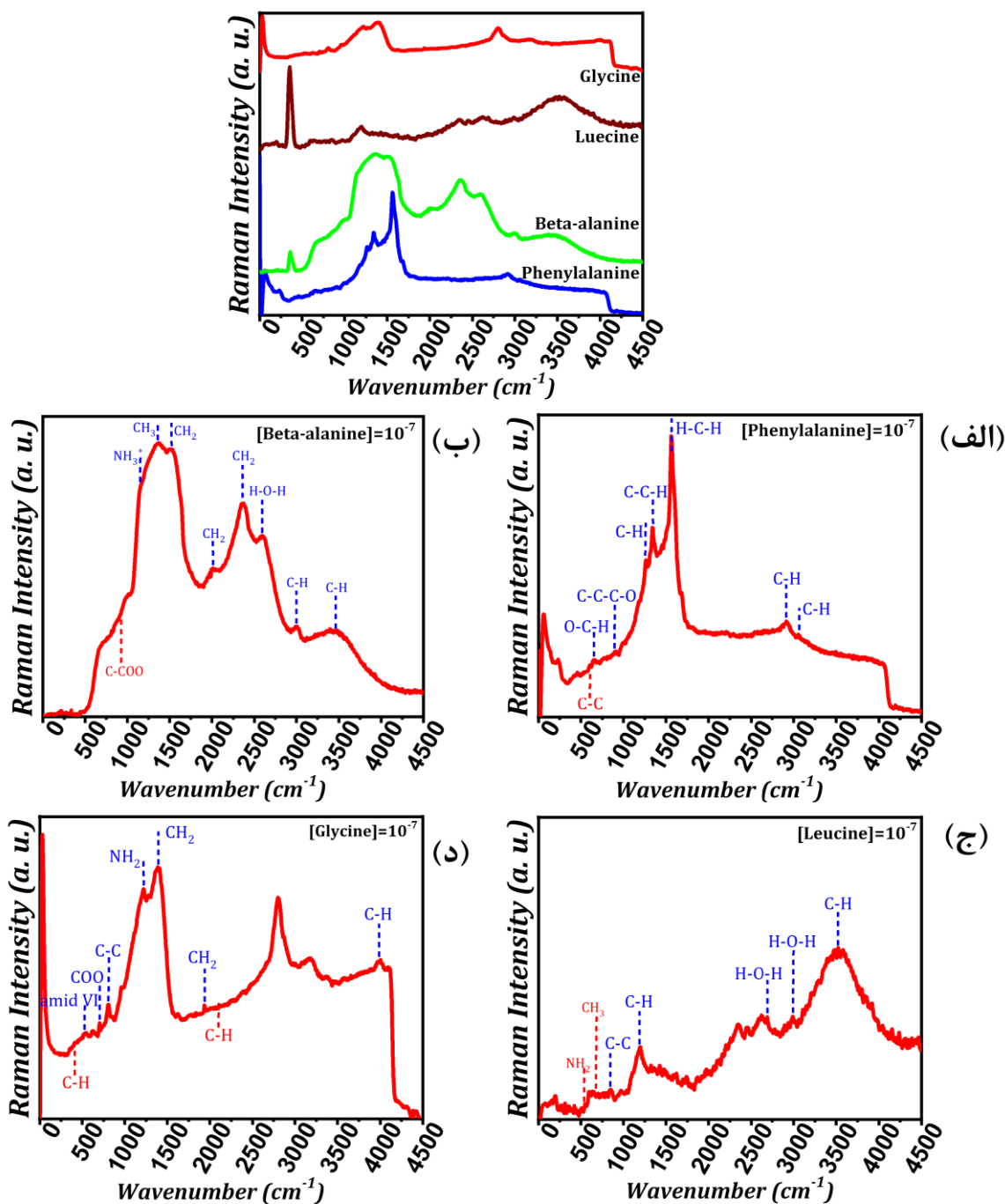
در شکل ۴، طیف رامان زیرلایه فعال در SERS (منحنی آبی)، طیف رامان آمینواسیدهای حاکاکی شده با غلظت 10^{-2} مولار بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی سبز) و طیف SERS آمینواسیدهای حاکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS با غلظت 10^{-2} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} مولار (منحنی قرمز) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان (منحنی‌های سبز) آمینواسیدهای (الف) فنیل آلانین، (ب) بتا آلانین، (ج) لوسین و (د) گلیسین که روی زیرلایه‌های شیشه‌ای حاکاکی شده‌اند؛ نشانی از ارتعاشات مولکولی مربوط به هر آمینواسید مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این گونه‌ها با حتی با غلظت 10^{-2} مولار و با استفاده از طیف سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. ارتعاشات مولکولی هر یک از

آمینواسیدها [۲۴ و ۲۵]، به صورت خط-چین‌هایی بر روی طیف‌های آمینواسیدها در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند. در مورد فنیل آلانین، ارتعاشات کششی C-C، خمشی O-C-H، کششی C-C-C-O و خمشی C-C-H به ترتیب در ۶۰۰، ۶۵۴، ۸۹۹ و ۱۳۴۱ cm^{-1} ظاهر می‌شوند. ارتعاشات کششی C-H نیز در موقعیت‌های ۱۲۶۲، ۲۹۲۰ و ۳۰۶۲ cm^{-1} مشاهده می‌شوند. برای بتا آلانین، در مورد بتا آلانین، ارتعاشات کششی C-COO، خمشی NH_3^+ ، خمشی CH_3 و خمشی H-O-H به ترتیب در ۹۳۷، ۱۱۲۳، ۱۳۷۰ و ۲۵۸۹ cm^{-1} ظاهر می‌شوند. ارتعاشات خمشی CH_3 نیز در موقعیت‌های ۱۵۱۸، ۲۰۱۸ و ۲۳۶۶ cm^{-1} و ارتعاشات کششی C-H نیز در موقعیت‌های ۳۰۰۰ و ۳۴۴۷ cm^{-1} مشاهده می‌شوند. در مورد لوسین، ارتعاشات خمشی NH_2 ، خمشی CH_3 و کششی C-C به ترتیب در ۷۲۳، ۵۳۶، ۸۵۸ cm^{-1} ظاهر می‌شوند. ارتعاشات خمشی H-O-H نیز در موقعیت‌های ۲۶۷۸ و ۳۰۰۰ cm^{-1} و ارتعاشات کششی C-H نیز در موقعیت‌های ۱۱۸۶ و ۳۵۱۷ cm^{-1} مشاهده می‌شوند. در مورد گلیسین، ارتعاش amid VI، ارتعاشات کششی COO^- ، کششی C-C و خمشی NH_2 ، به ترتیب در ۵۲۷، ۶۹۶، ۸۰۳ و ۱۲۱۵ cm^{-1} ظاهر می‌شوند. ارتعاشات خمشی CH_3 نیز در موقعیت‌های ۱۳۹۳ و ۱۹۳۷ cm^{-1} و ارتعاشات کششی C-H نیز در موقعیت‌های ۴۱۹، ۲۱۰۳ و ۳۹۷۳ cm^{-1} مشاهده می‌شوند. ارتعاشاتی که در طیف‌ها ظاهر شده‌اند؛ با خط-چین‌های قرمز نمایش داده شده‌است. با حکاکی فنیل آلانین با غلظت 10^{-2} مولار بر روی زیرلایه فعال در SERS، ارتعاشات مولکولی فنیل آلانین (شکل ۴-الف)) ظاهر می‌شوند. معمولاً در دماهای پایین با از بین بردن افت و خیزهای حرارتی، ارتعاشاتی که به خصوص در عدم‌موج‌های کم‌تر اتفاق می‌افتند؛ قابل آشکارسازی می‌شوند [۲۶]، بنابراین، به این دلیل که طیف سنجی در دمای اتاق انجام شده است؛ ارتعاشات مولکولی که با خط-چین‌های قرمز نمایش داده شده‌اند؛ در طیف SERS ظاهر نشده‌اند. استفاده از زیرلایه‌های فعال در SERS نه تنها منجر به ظاهر شدن ارتعاشات مولکولی فنیل آلانین (شکل ۴-الف)) می‌شود، بلکه این روند برای بتا آلانین (شکل ۴-ب))، لوسین (شکل ۴-ج)) و گلیسین (شکل ۴-د)) نیز مشاهده می‌شود. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از زیرلایه‌های فعال در SERS، به دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر روی سطح شیشه است. نقاط زبری که با نقره‌اندود کردن شیشه ایجاد شده است. ذرات بزرگ‌تر نقره که در شکل ۳-الف) مشاهده می‌شوند؛ با پراکنده کردن نور لیزر 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 میدان‌های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات نقره مشاهده شده در شکل ۳-الف) به مانند لنز اپتیکی 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، بتا آلانین، لوسین و گلیسین در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه می‌کنند و قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاشات مولکولی آن‌ها تقویت می‌شود و سیگنال‌های پر شدت‌تری را نشان می‌دهند [۲۷، ۲۸، ۳۱ و ۳۲] همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود با کاهش غلظت آمینواسیدها، تعداد مولکول‌های آمینواسیدهای فنیل آلانین، بتا آلانین، لوسین و گلیسین و در نتیجه تعداد

ارتعاشات مولکولی آن نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، با کاهش غلظت از آمینواسیدها از 10^{-2} مولار به 10^{-7} مولار، از شدت سیگنال‌های SERS آمینواسیدهای فنیل‌آلانین (شکل ۴-الف))، بتا‌آلانین (شکل ۴-ب))، لوسین (شکل ۴-ج)) و گلیسین (شکل ۴-د)) نیز کاسته می‌شود اما همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با استفاده از زیرلایه‌های فعال در SERS، با وجود کاهش تعداد ارتعاشات مولکولی، همچنان ارتعاشات مولکولی آمینواسیدها قابل آشکارسازی است.



شکل ۴- طیف‌های رامن و SERS زیرلایه فعال در SERS و آمینواسیدهای (الف). فنیل‌آلانین، (ب). بتا‌آلانین، (ج). لوسین و (د). گلیسین. طیف رامن زیرلایه فعال در SERS (منحنی آبی)، طیف رامن آمینواسید حکاکی شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی سبز) و طیف SERS آمینواسید حکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS با غلظت 10^{-2} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} 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). بتا آلانین، (ج). لوسین و (د). گلیسین با غلظت 10^{-7} مولار و حکاکی شده بر روی زیرلایه فعال در SERS. 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.

نتیجه‌گیری

به منظور شنا سایی و کنترل بیماری‌های متابولیک سمی که ناشی از کمبود یا افزایش آمینو اسیدهای فنیل‌آلانین، بتا‌آلانین، لوسین و گلیسین در بدن است، آشکار سازی این آمینو اسیدها دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما به دلیل ضعیف بودن سیگنال رامان، عملاً شناسایی غلظت‌های اندک مولکول‌ها امکان‌پذیر 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 روشی ارزان قیمت و آسان 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 آمینو اسیدهای فنیل‌آلانین، بتا‌آلانین، لوسین و گلیسین تقویت شدند. بنابراین، این زیرلایه‌های فعال در SERS، انتخاب مناسبی برای آشکار سازی آمینو اسیدهای فنیل‌آلانین، بتا‌آلانین، لوسین و گلیسین به شمار می‌آیند تا بیماری‌های متابولیک شناسایی و کنترل شوند. با کاهش غلظت آمینو اسیدهای حکاکی شده روی زیرلایه‌های فعال، سیگنال‌های SERS نیز به دلیل کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی کاهش می‌یابد اما همچنان ارتعاشات مولکولی آن‌ها قابل شناسایی است. این زیرلایه‌های فعال در SERS، می‌توانند به تشخیص کم هزینه و زود هنگام بیماری‌های متابولیک ناشی از برهم خوردن غلظت آمینو اسیدهای فنیل‌آلانین، بتا‌آلانین، لوسین و گلیسین کمک کند.

قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری خانم دکتر زهرا عقیلی، بابت اندازه‌گیری 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.

6. 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'MeIlo, 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.

10. 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.
13. 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.

21. 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., Drebuschak, 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 Analysis Method 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.