

ساخت حسگر زیستی پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی بر پایه نانوساختارهای متخلخل نقره رشد یافته بر روی بستر شیشه و استفاده از آن برای آشکارسازی مولکول Lysine در غلظت‌های کم

راحله ابوالتمن^۱
رسول ملک‌فر^۱

خلاصه

مقدمه: در این پژوهش با رشد نانوساختارهای متخلخل نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای معمولی و حکاکی شده موفق به ساخت حسگری مبتنی بر اثر پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) شده‌ایم که با دقت و حساسیت بالا توانایی آشکارسازی آنالیت‌های بیولوژیکی در مقادیر بسیار کم را دارا می‌باشد. در این پژوهش منظور از حسگر زیستی SERS، حسگری ساخته شده بر پایه اثر پراکندگی رامان است که با استفاده از نانوساختارهای متخلخل از فلز نقره، سیگنال رامان ضعیف هدف بیولوژیکی جذب شده بر روی نانوساختارها را ارتقاء می‌بخشد. در نتیجه این حسگر قادر به آشکارسازی غلظت‌های بسیار کم و حتی تک‌مولکول از ماده هدف است. روش معرفی شده می‌تواند به عنوان روشی جدید، ساده و ارزان با قابلیت آشکارسازی بالا برای غلظت‌های کم جهت تشخیص زودهنگام برخی بیماری‌های متابولیکی مدنظر قرار گیرد.

روش بررسی: روش بررسی مبتنی بر اثر پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) با استفاده از طول موج لیزری ۵۳۲ نانومتر می‌باشد.

یافته‌ها: زمانی که اتصال جزیره‌ای نانوذرات نقره متخلخل به طور کامل اتفاق نمی‌افتد و سطح نانوذرات نقره یکنواخت نمی‌باشد و در حداصل جزیره‌ها دره‌هایی وجود دارد، شدت سیگنال افزایش می‌یابد. در صورتی که سطح نمونه نانوذرات متخلخل یکنواختی ایجاد گردد، شدت سیگنال به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد و ضریب ارتقاء به مراتب بیشتری در سیگنال‌های رامان مشاهده خواهد شد. نتایج طیف‌سنجی UV/Vis/NIR بر نمونه‌های مختلف نشان‌دهنده وابستگی کامل طول موج بیشینه جذب به میزان غلظت محلول نقره و کیفیت همواری زیرلایه می‌باشد. در ادامه، از این حسگر برای شناسایی آمینواسید لایزین در غلظت‌های بسیار کم تا حد 10^{-6} مولار استفاده شده است. آمینواسید لایزین یکی از پارامترهای مهم در شناسایی احتمال وجود بیماری‌های متابولیک در نوزادان است.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که همواری سطح شیشه و نانوساختار متخلخل نقره بر آن در آشکارسازی غلظت‌های کم آنالیت تأثیر به‌سزایی دارد.

واژه‌های کلیدی: حسگر زیستی، پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS)، نانوساختارهای متخلخل، بیماری متابولیک نوزادان

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، بخش فیزیک، گروه فیزیک اتمی و مولکولی

مقدمه

در سال ۱۹۲۸، سی. وی رامان نوعی از پراکندگی موسوم به اثر رامان را تشریح نمود. پیش از ارائه موفقیت آمیز رامان، این اثر در سال ۱۹۲۳ از نظر نظریه توسط اسمکال پیش بینی شده بود و بنابراین گاهی اوقات در منابع آلمانی از آن به عنوان اثر اسمکال-رامان نام برده می شود. اندرکنش امواج الکترومغناطیسی با فوتون ها با یک دستگاه اتمی و مولکولی به صورت های زیر امکان پذیر است:

۱. فوتون های تابیده شده می توانند از سطح ماده بازتاب کنند.

۲. فوتون ها می توانند از جسم عبور کنند.

۳. همچنین فوتون ها می توانند جذب مولکول ها شوند.

۴. و حتی امکان دارد فوتون های رسیده به ماده از سطح آن پراکنده شوند.

پراکندگی فوتون ها از ماده در اثر برخورد کشسان یا ناکشسان به وقوع می پیوندد که در اثر برخورد کشسان هیچ انرژی میان فوتون ها و ذرات ماده مبادله نمی شود و تنها مسیر حرکت فوتون تغییر می کند و این در حالی است که برخورد ناکشسان باعث انتقال انرژی بین فوتون های فرودی و ماده می شود. در نتیجه می توان گفت که اثر رامان، ناشی از پراکندگی ناکشسان نور از مولکول های مواد است. در نتیجه می توان با استفاده از این پراکندگی، طیف ارتعاشی مولکول را به دست آورد. این اثر به عنوان یکی از ویژگی های منحصر به فرد ماده شناخته می شود و دقیقاً مانند اثر انگشتی از مواد مختلف است و می توان با استفاده از آن اطلاعات بسیار جزئی در مورد ساختار مولکولی مواد به دست آورد. متأسفانه سیگنال مربوط به پراکندگی رامان به طور ذاتی ضعیف است و گاهی توسط نوفه و اثر فلورسانس پوشیده می شود. در نتیجه توسط این روش، مطالعه مولکول ها با غلظت کم امکان پذیر نیست و لزوم تقویت سیگنال پراکندگی رامان به وضوح احساس می شود. یکی از روش های کارآمد برای مطالعه غلظت های پایین و حتی تک مولکولی، روش پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) است. در این روش از نانوذرات فلزی برای ارتقاء سیگنال پراکندگی رامان استفاده می شود. در واقع، SERS یک روش حساس و انتخابی است که در آن پراکندگی رامان برای مولکول هایی که بر روی نانوذرات فلزی جذب سطحی شده اند، افزایش می یابد. با استفاده از این روش می توان علاوه بر تحلیل ساختارهای مولکولی، اطلاعاتی راجع به جهت جذب مولکول و فرآیند برهم کنش مولکول با سطح زیر لایه به دست آورد [۱].

از آنجا که شدت پراکندگی رامان متناسب با مربع ممان دوقطبی القایی است، ارتقاء این فرآیند به دو روش امکان پذیر است: ارتقاء میدان الکتریکی و ارتقاء قطبش پذیری [۲]. هنگامی که مولکول در نزدیکی سطح فلز قرار می گیرد یا به عبارتی به طور فیزیکی جذب نانوذرة فلزی می شود،

به علت برهم کنش مولکول و پلاسمون های سطحی (حرکت دسته جمعی الکترون های رسانش تحت تأثیر میدان نوسانی موج فرودی) افزایش شدتی در سیگنال رامان روی می دهد که به اثر الکترومغناطیسی معروف است. در حالت دیگر، مولکول به طور شیمیایی جذب نانوذرات فلزی می شود و در اثر انتقال الکترون ها از فلز به مولکول و بازگشت دوباره آن ها به فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می یابد. فلزاتی از قبیل نقره، طلا، مس و پلاتین جهت مشاهده پدیده پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی در آزمایش های مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند. در میان فلزات نام برده شده نقره به علت داشتن تشدید پلاسmoni پهن در ناحیه مرئی و فروسرخ نزدیک (Vis-NIR)، پایداری بالا و روش تهیه آسان بیشترین استفاده را داشته است [۳].

در این پژوهش منظور از حسگر زیستی SERS، حسگری ساخته شده بر پایه اثر پراکندگی رامان است که با استفاده از نانوساختارهای متخلخل از فلز نقره، سیگنال رامان ضعیف هدف بیولوژیکی جذب شده بر روی نانوساختارها را ارتقاء می بخشد. در نتیجه این حسگر قادر به آشکارسازی غلظت های بسیار کم و حتی تک مولکول از ماده هدف است.

پراکندگی رامان از سطوح صاف و یکنواخت، پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی نیست [۴]. غیر یکنواختی سطح یا همان زبری برای بروز این پدیده ضروری است. در ساخت سطوح فعال در پدیده SERS باید داشتن فاکتور ارتقاء بالا، کم هزینه بودن، تکرار پذیری و آسان بودن فرآیند ساخت را در نظر بگیریم. ساختارهای نانویی مؤثر در ارتقاء سیگنال رامان، می توانند یا به صورت محلول باشند و یا بر روی یک بستر جامد قرار گیرند. برای کاربرد در حسگرها زیر لایه های جامد به علت پایداری بالا، قابلیت تکرار پذیری و بالا بودن دقت آشکارسازی از اهمیت بیشتری برخوردارند.

روش پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی به علت حساسیت بالا و قدرت تفکیک طیفی مناسب و به عنوان یک روش غیر مخرب اخیراً به یک روش بسیار جذاب در تجزیه و تحلیل مولکول های تشکیل دهنده یک نمونه زیستی و پزشکی تبدیل شده است [۵-۷]. بیماری های متابولیک به علت ناشناخته بودن، برای مدت زمان طولانی نادیده گرفته می شدند. متولد شدن نوزادانی با نقص جسمی مانند میکروسفالی (کوچکی غیر طبیعی سر)، هیدروسفالی (بزرگی غیر طبیعی سر)، نوزادانی که در ماه های اولیه دچار حملات قلبی شدید و سکت های مغزی منجر به مرگ می شدند، کودکانی که در ماه های اولیه طبیعی بودند ولی به مرور دچار فلج و ناهنجاری های حرکتی می شدند و کودکان و نوزادانی که ناگهانی می مردند، همگی دانشمندان علم پزشکی را مشکوک به وجود بیماری هایی کرد که به صورت نهان فرد را مبتلا می کنند پس از مطالعات فراوان به نقص های آنزیمی پی بردند و از آنجا بیماری های متابولیک شناخته شدند. نکته مهمی که در ارتباط با بیماری های متابولیک وجود دارد، این است که در صورت تشخیص به موقع این بیماری ها می توان با رژیم درمانی و

روش کار

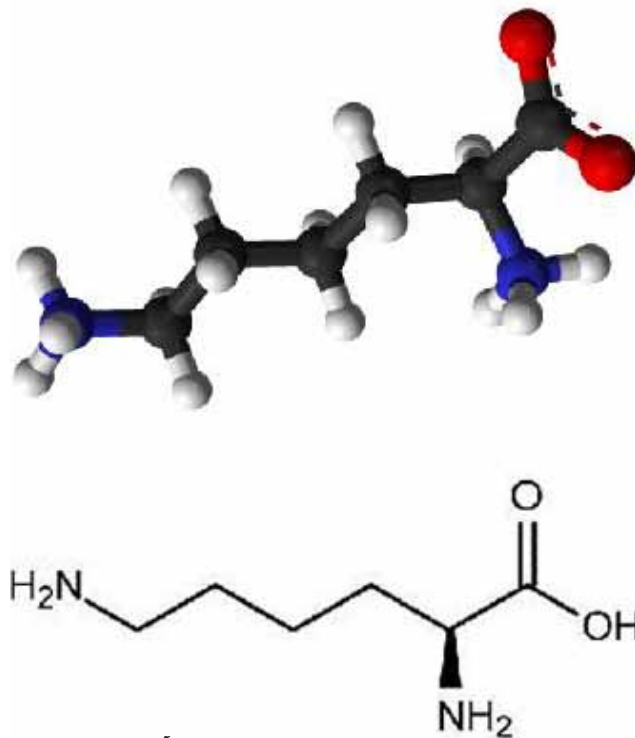
(۱) تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده

دستگاه طیف‌سنجی رامان مورد استفاده در این آزمایش‌ها از نوع طیف‌سنجی پس از پراکندگی است، بدین معنی که نور پراکنده‌شده در خلاف جهت نور فرودی با قطبشی در راستای قطبش نور فرودی مورد بررسی قرار می‌گیرد. این دستگاه مجهز به نور لیزر Nd: YLF است که دارای طول موجی برابر ۱۰۶۴ نانومتر می‌باشد که توسط یک دوبرابرکننده بسامد به طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم چنده میلی‌وات و توان نهایی یک‌صد میلی‌وات می‌رسد. این دستگاه ساخت شرکت Thermo Nicolet است. درمورد طیف‌های حاصل از دستگاه طیف‌سنج رامان می‌توان گفت که طیف به‌دست‌آمده درواقع نشان‌دهنده اختلاف بسامدی است که نور پس‌پراکنده با نور فرودی پیدا کرده است. این اختلاف اغلب برحسب واحد cm^{-1} بیان می‌شود و توسط یک نرم‌افزار رایانه‌ای تحت عنوان OMNIC که قادر است شدت نور پراکنده‌شده را برحسب این اختلاف به‌صورت یک طیف رسم کند، محاسبه می‌گردد.

همچنین برای داشتن طیف ماوراء بنفش، نمونه‌های شیشه‌ای پوشیده‌شده از نانوساختارهای نقره از دستگاه دانشگاه تربیت مدرس با نام T80⁺ UV/VIS Spectrometer ساخت شرکت P.G. Instruments استفاده شده‌است و سامانه فوق قابلیت طیف‌سنجی به‌صورت عبوری و جذبی را دارا می‌باشد.

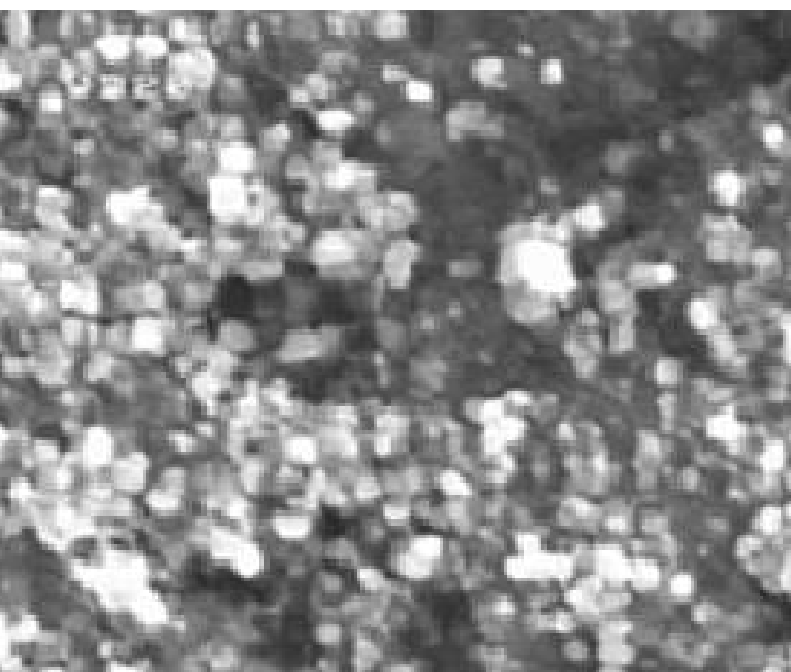
(۲) روش ساخت زیرلایه‌های شیشه‌ای در این پژوهش از شیشه‌های لام به‌عنوان بستر استفاده شده‌است. شیشه‌ها در ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده می‌شوند و قبل از استفاده توسط محلول شامل آب و مایع شوینده، استون و اتانول هرکدام به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دستگاه تمیزکننده اولتراسونیک شستشو داده و در معرض هوا خشک می‌شوند. پس از شستشو، توسط HF ۲۰ درصد روی نمونه‌ها حکاکی انجام می‌شود تا جهت افزایش سطح و افزایش چسبندگی پوشش در سطح خلل‌و‌فرج ایجاد گردد. برای پوشش‌دهی نقره از محلول کلونیدی نقره ساخته‌شده توسط شرکت نانوپوشش‌فلز و حاوی نیترات نقره، ماده احیاءکننده سدیم‌بوروهیدرات و پایدارکننده PVP استفاده شده است. این محلول در حجم نهایی ۴۰۰۰ ppm ساخته شده‌است. برروی هرکدام از نمونه‌ها مقداری از این محلول کلونیدی را توسط قطره‌چکان می‌ریزیم و نمونه‌ها را در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار می‌دهیم تا آب موجود در محلول لایه‌نشانی شده تبخیر شود. برای نمونه اول ۲ سی‌سی و برای نمونه دوم ۴ سی‌سی از محلول ۴۰۰۰ ppm برمی‌داریم. مدت‌زمان حرارت‌دهی نمونه‌ها به حجم آب موجود در آن‌ها بستگی دارد

جایگزین کردن آنزیم‌های ازدست‌رفته و هورمون‌درمانی همچنین با خارج‌سازی توکسیک‌ها از بدن مبتلایان، تا حد زیادی از بروز عوارض فاجعه‌بار این بیماری‌ها جلوگیری کرد. وجود مقادیر بسیار کم لایزین ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$) در خون نوزادان نشانی از نقص در سیستم سوخت‌وساز بدن آن‌ها است. در نتیجه توانایی آشکارسازی این ماده در مقادیر کم و تشخیص زودهنگام بیماری متابولیک از اهمیت بسیاری برخوردار است. ازجمله روش‌های مورد استفاده برای تشخیص بیماری‌های متابولیک می‌توان به $^1\text{GC-MS}$ [۸]، $^2\text{TMS(MS/MS)}$ [۹] و $^2\text{HPLC}$ [۱۰] اشاره کرد. تمامی این روش‌ها در کارکرد آزمایشگاهی درمقایسه با روش SERS از حساسیت کمتری برخوردار هستند و استفاده از آن‌ها منوط به پرداخت هزینه گزاف از طرف متقاضیان می‌باشد. ما در حسگر زیستی SERS با روشی ساده توانسته‌ایم زیرلایه‌هایی تولید کنیم که با استفاده از آن‌ها تا غلظت 10^{-6} مولار آمینواسید لایزین را به‌راحتی و با صرف هزینه اندک می‌توان آشکارسازی کرد. آمینواسید به گروهی از مولکول‌های ارگانیکی که شامل گروه آمینو ($-\text{NH}_2$) و گروه اسیدی کربوکسیل ($-\text{COO}^-$) و گروه R هستند، اطلاق می‌شود. تفاوت آمینواسیدها ناشی از تفاوت در ساختمان گروه R در آن‌ها است. در آمینواسید Lysine گروه R شامل $(-\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ است



شکل ۱: تصاویری از آمینواسید L-Lysine

با توجه به شکل‌های ۲، ۳ و ۴ و محل قله تشدید پلاسمون‌های سطحی نشان داده شده در آن‌ها به وضوح حضور فلز نقره بر روی سطح دیده می‌شود زیرا قله تشدید پلاسمون‌های سطحی فلز نقره تقریباً در محدوده ۴۲۵-۴۳۵ نانومتر است. این طور به نظر می‌رسد که تفاوت در محل قله‌ها ناشی از افزایش اندازه نانوذرات و چسبیدن آن‌ها به هم و تشکیل جزیره است که در اثر فرآیند حرارت‌دهی به وقوع می‌پیوندد. از دیگر عوامل این تفاوت می‌توان به فاصله نانوذرات و شکل آن‌ها اشاره نمود. از آنجاکه در این حالت از روش قطره‌چکانی استفاده شده است، پیش‌بینی می‌شود که سطح شیشه‌ها پوشیده از نانوساختارهای جزیره‌ای نقره باشد و به علت فرآیند تبخیر آب و PVP سراسر سطح دارای خلل و فرج یا پستی و بلندی باشد.

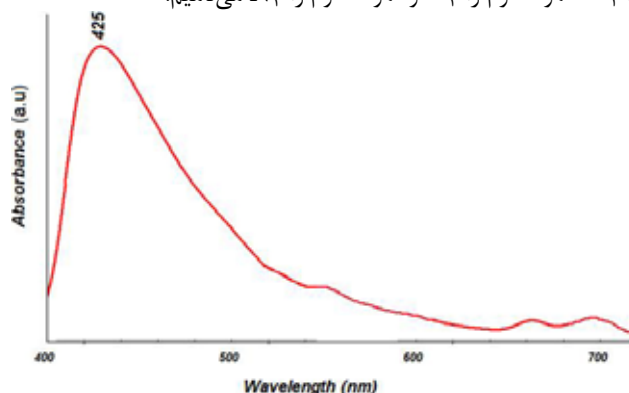


شکل ۵: ساختار متخلخل نقره بر روی شیشه حکاکی نشده (نمونه N_۲) در مقیاس میکرومتر

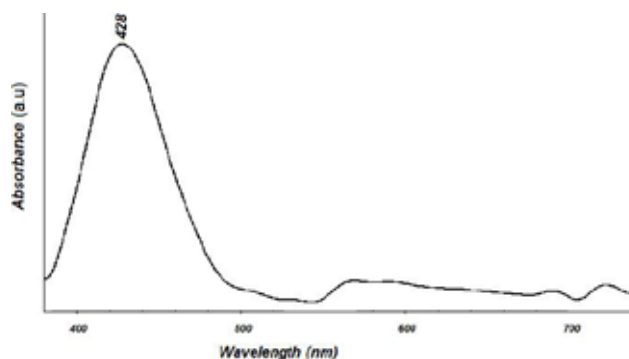
یافته‌ها

در این روش برای آشکارسازی ماده هدف، ابتدا محلول پایه از ماده مورد نظر را در غلظت ۰/۱ مولار ساختیم و سپس از این محلول پایه برای ساخت غلظت‌های مختلف (۱۰^{-۴}، ۱۰^{-۵} و ۱۰^{-۶}) مولار استفاده می‌کنیم. در ادامه، مقدار ۳ μl از هر کدام از غلظت‌های نام برده شده را جداگانه بر روی بسترهایی که ساختیم، می‌چکانیم و اجازه می‌دهیم در معرض هوا خشک شوند. سپس توسط دستگاه رامان، طیف SERS آن‌ها را می‌گیریم. نتایج به دست آمده به صورت طیف ارتعاشی ماده مورد نظر ارائه می‌شود و این بدین معنی است که حسگر حضور ماده را در این غلظت‌های کم احساس کرده است.

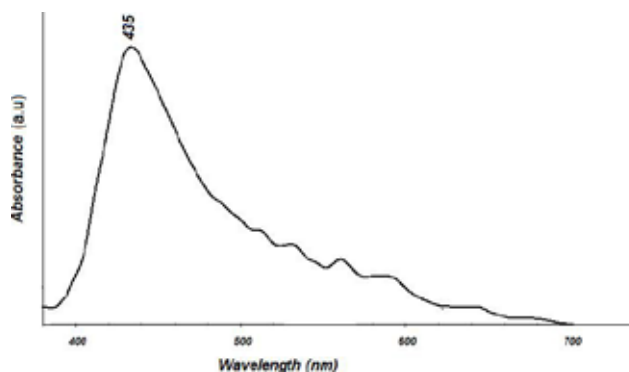
به طوری که نمونه دوم نسبت به نمونه اول به زمان حرارت‌دهی بیشتری احتیاج دارد. حرارت‌دهی به نمونه‌ها تا تبخیر کل آب موجود در آن‌ها باید ادامه یابد. سپس نمونه‌های نهایی را به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا هم پوشش پلیمری پایدارکننده اولیه از بین برود و هم نانوذرات به هم جوش بخورند. در نهایت، دو نمونه با پوشش‌های مختلف از نظر ضخامت یا مقدار نانوذرات بر روی سطح شیشه داریم. در نمونه بعدی از یک لام بدون حکاکی استفاده می‌کنیم و ۴ سی‌سی از محلول کلوئیدی را بر روی آن می‌چکانیم. فرآیند حرارت‌دهی دقیقاً مانند روش توضیح داده شده در بالا است. برای سادگی، نمونه اول را H_۱، نمونه دوم را H_۲ و نمونه سوم را N_۲ می‌نامیم.



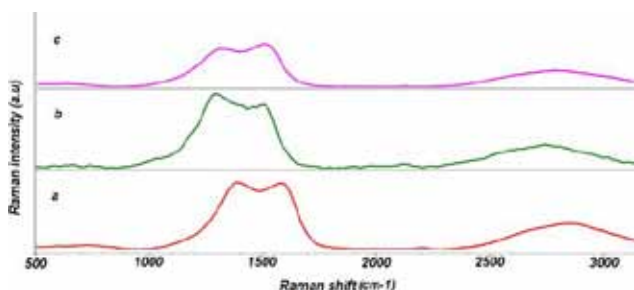
شکل ۲: تصویر طیف جذبی نمونه H_۱ با قله تشدید پلاسمونی در ۴۲۵ نانومتر



شکل ۳: تصویر طیف جذبی نمونه H_۲ با قله تشدید پلاسمونی در ۴۲۸ نانومتر

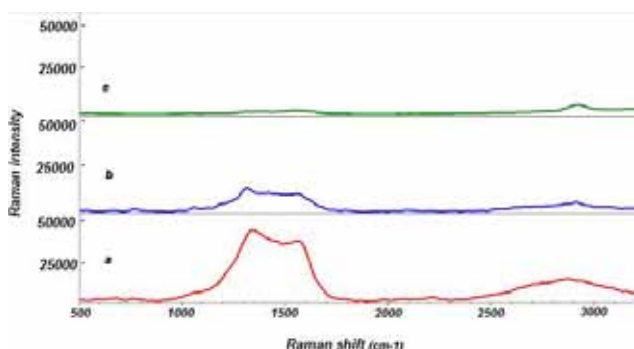


شکل ۴: تصویر طیف جذبی نمونه N_۲ با قله تشدید پلاسمونی در ۴۳۵ نانومتر



شکل ۸: طیف SERS مولکول Lysine جذب شده بر روی نمونه N_2 (a): 10^{-4} مولار، (b) 10^{-5} مولار و (c) 10^{-6} مولار.

توسط حسگر SERS ساخته شده توسط نمونه N_2 نیز به راحتی می توان تا غلظت 10^{-6} مولار را آشکارسازی کرد. در شکل ۹ مقایسه ای بین شدت طیف های SERS مولکول Lysine با غلظت 10^{-4} مولار جذب شده بر روی نمونه های H_1 ، H_2 و N_2 انجام شده است.

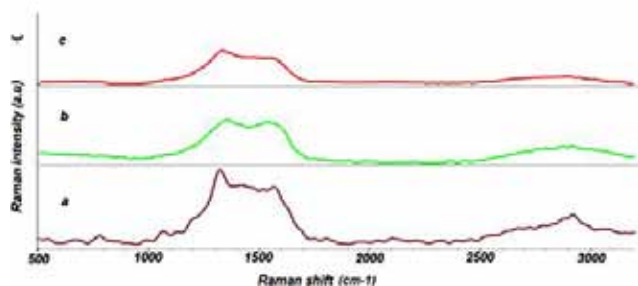
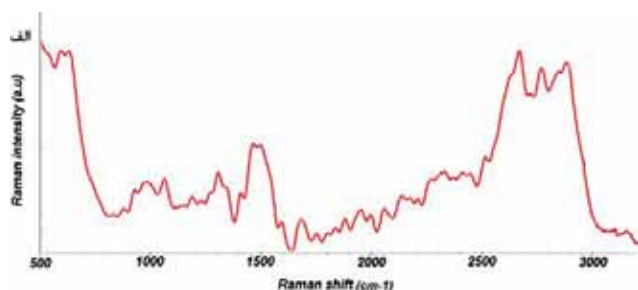


شکل ۹: طیف SERS مولکول Lysine جذب شده بر روی نمونه N_2 (a): 10^{-4} مولار، (b) 10^{-5} مولار و (c) 10^{-6} مولار.

آنچه که از شکل ۹ استنباط می شود این است که طیف SERS مولکول Lysine جذب شده بر نمونه N_2 نسبت به نمونه های دیگر از شدت بیشتری برخوردار است و همچنین این شدت برای نمونه H_1 از نمونه H_2 بیشتر است.

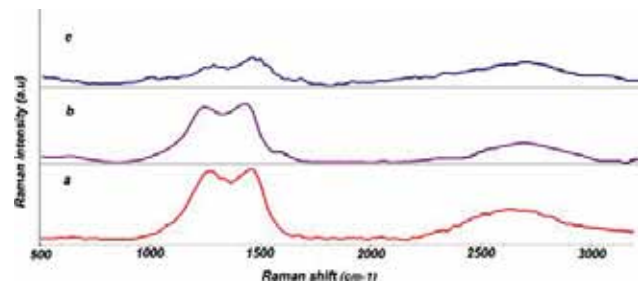
بحث و نتیجه گیری:

در میان نمونه های حکاکی شده H_1 و H_2 که خود دارای پستی و بلندی های اولیه ای هستند، نمونه اول دارای غلظت نقره کمتری است (۲ سی سی از محلول کلئیدی) در نتیجه شاید بتوان این طور استدلال کرد که در این نمونه به علت غلظت کم در زمان حرارت دهی و رشد جزیره های ذرات نقره، اتصال جزیره های به طور کامل اتفاق نمی افتد و حداثات این جزیره ها دره های پدید می آید که ماده هدف با قرار گرفتن در این دره ها در احاطه کامل ذرات نقره قرار می گیرد و شدت سیگنال رامان به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. از آنجا که تعداد این دره ها به علت عدم اتصال کامل جزیره ها در نمونه H_1 بیشتر از نمونه H_2 است، ارتقاء بیشتری در سیگنال رامان ایجاد می شود. در نمونه N_2 و به علت تبخیر آب و PVP



شکل ۶: الف) طیف رامان زیر لایه شیشه با پوششی از نقره بدون حضور مولکول Lysine. (ب) طیف SERS مولکول Lysine جذب شده بر روی نمونه H_1 (a): 10^{-4} مولار، (b) 10^{-5} مولار و (c) 10^{-6} مولار.

باتوجه به نتایج SERS به دست آمده با استفاده از این زیر لایه دیده می شود که در غلظت 10^{-4} مولار نوارهای ارتعاشی مربوط به مولکول Lysine به خوبی نمایش داده می شوند و با کاهش غلظت از شدت سیگنال رامان ارتعاشات کاسته می شود. ارتعاش C-H در 2925 cm^{-1} کشش متقارن گروه کربوکسیل در 1581 cm^{-1} ، مدهای ارتعاشی گروه آمین و کربوکسیل در $1500-1439 \text{ cm}^{-1}$ ، مدهای خمش NH_2 در ناحیه $1351-1144 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاشات آلیفاتیک C-C و C-N در 948 cm^{-1} روی می دهند که این ارتعاشات تا غلظت 10^{-6} مولار نیز دیده می شوند.



شکل ۷: طیف SERS مولکول Lysine جذب شده بر روی نمونه H_2 (a): 10^{-4} مولار، (b) 10^{-5} مولار و (c) 10^{-6} مولار.

از شکل ۷ دیده می شود که طیف SERS به دست آمده با استفاده از نمونه H_2 برای مولکول Lysine در غلظت 10^{-6} مولار دارای شدت بسیار کمتر از طیف به دست آمده در غلظت های دیگر است همچنین در مقایسه با نمونه H_1 تعداد ارتعاشات محدودتری آشکارسازی می شوند.

References:

1. Wang LR, Fang Y. Molecular and Biomolecular Spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A*, 2006; 63: 614-8.
2. Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures, *Trends in Analytical Chemistry*, 1998; 17: 557.
3. Canameres MV, Ramos JVG., Sanchez S, Cortes SS, Castillejo M, Quija 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*, 2008; 326: 103-9.
4. Aroca R. Surface-Enhanced vibrational Spectroscopy, John Wiley, England 2006.
5. Lin CC. A filter-like AuNPs@MSSERS substrate for *Staphylococcus aureus* detection, *Biosensors and Bioelectronics*. 2014; 53: 519-27.
6. McAughtrie S, Faulds K., Graham, D. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): Potential applications for disease detection and treatment, *Journal of Photochemistry and Photochemistry*, 2014; 21: 40-53.
7. Wu Z. A simple and universal "turn-on" detection platform for proteases based on surface enhanced Raman scattering (SERS), *Biosensors and Bioelectronics*, 2015; 65: 375-81.
8. Shotelersuk V. Establishing gas chromatography-mass spectrometry to diagnose organic acidemias in Thailand, *Southeast Asian J Trop MED Public Health*, 2000; 31(3): 566-70.
9. Banta-Wright AS, Steiner R, Robert DS. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening, A Primer for Neonatal and Perinatal Nurses, *Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*, 2004; 18(1): 41-58.
10. Skoog DA, West Holt DM, Principle of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Sixth edition, 1994.

در اثر حرارت، خلل و فرجی بر روی سطح ایجاد می‌شود و از آنجا که سطح این نمونه برعکس نمونه‌های قبلی دارای ناهمواری‌های اولیه با شکل‌های تصادفی نیست، در اثر حرارت‌دهی ساختار متخلخل تقریباً یکنواختی بر روی سطح ایجاد می‌گردد. امکان دارد این پدیده باعث ارتقاء شدت سیگنال در این نمونه باشد. اگر هدف، یافتن ارتعاشات مولکولی باشد استفاده از نمونه H_2 در حسگر SERS بهتر است ولی اگر هدف تنها آشکارسازی مولکول باشد، نمونه N_2 به علت ایجاد ارتقاء بیشتر مطلوب‌تر است.

طیف UV/Vis/NIR مربوط به کلئید نقره نشان می‌دهد که طول موج بیشینه جذب در ۴۳۰ نانومتر رخ می‌دهد. همچنین نتایج طیف UV/Vis/NIR مربوط به زیر لایه‌های شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوساختارهای متخلخل نقره نشان می‌دهد که بیشینه جذب آن‌ها بسته به میزان غلظت محلول نقره لایه‌نشانی شده و سطح اولیه شیشه‌ها (سطح حکاکی شده و سطح طبیعی) مقادیر متغیری دارد. به طوری که برای نمونه H_2 بیشینه جذب در ۴۲۵ نانومتر و برای نمونه H_2 در ۴۲۸ نانومتر و برای نمونه N_2 در ۴۳۵ نانومتر اتفاق می‌افتد. همچنین تفاوت در بیشینه جذب ذرات نقره در محلول کلئیدی و در حالتی که به صورت یک پوشش بر روی شیشه قرار دارند، به خوبی دیده می‌شود. که این پدیده نشان‌دهنده تأثیر فرآیند حرارت‌دهی بر روی اندازه ذرات نقره است. نتایج ارائه شده باتوجه به داده‌های دریافت‌شده طیفی و انجام مکرر آزمایش‌ها تنظیم گردیده است و قابلیت تکرارپذیری مناسبی را در این زمینه تأیید می‌نماید.

با در نظر گرفتن داده‌های ارائه شده در این تحقیق، می‌توان به جرأت ادعا نمود که استفاده از حسگرهای زیستی SERS ساخته شده از نانوساختارهای متخلخل رشد یافته بر روی بسترهای شیشه‌ای به علت سادگی فرآیند ساخت، کم هزینه بودن و قابلیت آشکارسازی مواد با غلظت‌های کم، روش نوینی برای تشخیص زود هنگام بیماری‌های متابولیکی ارائه می‌دهد. پیش‌بینی می‌گردد که روش ارائه شده می‌تواند برای شناسایی و تجزیه و تحلیل نمونه‌ها و بیماری‌های دیگر زیستی و پزشکی که در آن‌ها مولکول‌هایی در غلظت‌های کم وجود دارند و یا ایجاد می‌شوند با حساسیت زیاد به کار گرفته شود.