

آشکارسازی مولکولی ژلاتین و مقایسه اثر نقره و طلا در بهبود سیگنال رامان آن

خلاصه

مقدمه: روش پراکندگی رامان بهبودیافته سطحی (SERS)، یکی از روش‌های کارآمد برای شناسایی مقادیر اندک و حتی شناسایی تک مولکول است. طیف‌سنجی رامان به کمک سطوح فلزی زبر می‌تواند برای شناسایی مقادیر اندک مواد گوناگون به کار گرفته شود. با قرار گرفتن گونه‌های مختلف در نزدیکی سطح فلز و جذب فیزیکی آن‌ها روی سطح فلزی به علت برهم‌کنش میان پلاسمون‌های سطحی فلز و ارتعاش‌های مولکولی گونه‌ها، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد. ژلاتین نیز یکی از پرمصرف‌ترین مواد پروتئینی کلوئیدی در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و نظامی است که برای شناسایی این ماده می‌توان استفاده از تکنیک SERS را پیشنهاد کرد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، محلول کلوئیدی نقره و محلول کلوئیدی طلا ساخته شدند و با استفاده از روش قطره‌افشان با چکاندن محلول کلوئیدی نقره و محلول کلوئیدی طلا بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای مجزا، بسترهای پلاسمونیک ساخته شدند. در نهایت، با استفاده از این بسترهای پلاسمونیک و طیف‌سنجی رامان، بهبود سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین بررسی شدند و در ادامه بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا از نظر آشکارسازی ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین مقایسه شدند.

یافته‌ها: قلّه پلاسمونی نانوذرات نقره و نانوذرات طلا به ترتیب در حدود ۴۱۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر و مشاهده ساختار FCC در مشخصه‌یابی XRD آن‌ها، تشکیل نانوذرات نقره و نانوذرات طلا را تأیید کرد. قلّه پلاسمونی طیف خاموشی بسترهای پلاسمونیک نقره و بسترهای پلاسمونیک طلا به ترتیب حدود ۴۴۲ نانومتر و ۵۵۳ نانومتر مشاهده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) بسترهای پلاسمونیک نشان می‌دهد که تعداد زیادی از ذرات نقره اندازه بین ۱۴۰ تا ۱۵۰ نانومتر و تعداد زیادی از ذرات طلا اندازه بین ۱۳۰ تا ۱۴۰ نانومتر دارند. زبری که برای بسترهای پلاسمونیک طلا و نقره در تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشاهده می‌شود، به پراکندگی نور از نقاط زبر کمک می‌کند. با قرار دادن مولکول ژلاتین روی بسترهای پلاسمونیک نقره و یا طلا به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات کوچک‌تر و پراکندگی نور از نانوذرات بزرگ‌تر نقره یا طلا، ارتعاش‌های مولکول ژلاتین تقویت شوند و شدت طیف SERS این دو بستر در مقایسه با شدت طیف رامان آن‌ها افزایش می‌یابد.

1. Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

وحید اسکندری^۱

نفیسه شریفی^۲

۱. کارشناسی ارشد، پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۲. استادیار، گروه فوتونیک و پلاسما، دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

نتیجه‌گیری: در طیف‌سنجی رامان، بسترهای پلاسمونیک که با نانوذرات و ذرات بزرگ‌تر نقره و طلا پوشش داده شده‌اند، مورد توجه هستند و سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین را به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و نانوذرات طلا و پراکندگی نور از ذرات بزرگ‌تر نقره و طلا تقویت می‌کنند. با کاهش غلظت ژلاتین حکاکی شده روی بسترهای پلاسمونیک به دلیل کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی، سیگنال رامان نیز تضعیف می‌شود که با افزایش میزان زبری سطح بسترهای پلاسمونیک می‌توان سیگنال رامان را به دلیل افزایش میزان پراکندگی نور از مراکز زبر افزایش داد. در نتیجه با افزایش میزان پراکندگی نور از خود منجر به بهبود سیگنال می‌شوند. نتایج رامان به دست آمده نشان می‌دهد که بسترهای پلاسمونیک حاصل از نانوذرات نقره و نانوذرات طلا با روش‌های توسعه یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجر به توسعه نانوحسگرها شود.

واژه‌های کلیدی: ژلاتین، بسترهای پلاسمونیک، حسگر زیستی، نقره، طلا، طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS)

نویسنده‌مسئول: نفیسه شریفی تلفن: ۰۳۱۵۵۹۱۳۳۲۰
پست الکترونیک: sharifi@kashanu.ac.ir

مقدمه

نیاز دارند. از این رو، توسعه یک روش غیرمخرب، با کاربری ساده، سریع، کم‌هزینه، ناآلاینده با قابلیت حمل و کاربرد خارج از محیط آزمایشگاه و نیاز به آماده‌سازی کم‌تر نمونه بسیار ضروری است. از طرفی شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک از ژلاتین نیز مورد توجه است. با استفاده از طیف‌سنجی زیرقرمز و طیف‌سنجی رامان که هر دو طیف‌سنجی اثر انگشتی محسوب می‌شوند و ارتعاش‌های مولکولی ماده را بررسی می‌کنند، می‌توان مواد و آنالیت‌های بیولوژیکی را شناسایی کرد [۱۱ و ۱۲]. در طیف‌سنجی زیرقرمز به دلیل فعال بودن ارتعاش‌های مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در طیف‌سنجی رامان نیز به دلیل ضعیف بودن ذاتی سیگنال حاصل از پراکندگی رامان، مطالعه مولکول‌ها با غلظت‌های اندک عملاً امکان‌پذیر نیست [۱۳]. یکی از روش‌هایی که می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد، استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی می‌توانند میدان الکتریکی قوی را در نزدیک نانوساختارها ایجاد کنند یا با افزایش میزان پراکندگی نور از این نانوساختارها، سیگنال پراکندگی را به طور مؤثر بهبود می‌دهند که به دنبال آن ارتعاش‌های مولکولی با سیگنال بهتر و بیشتری مشاهده خواهند شد. این روش طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (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 [۱۴]. در واقع، با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلزی،

ژلاتین یک ماده پروتئینی کلونیدی و قدیمی‌ترین ماکرومولکولی است که از هیدرولیز کلاژن موجود در پوست، استخوان و بافت پیوندی حیوانات از جمله دام، طیور و آبزیان به دست می‌آید [۱]. ژلاتین یکی از پرمصرف‌ترین مواد پروتئینی کلونیدی است که در چهار درجه متفاوت خوراکی، صنعتی، فوتوگرافی و دارویی تولید می‌شود. بخشی از ژلاتین تولیدشده در جهان از پوست و استخوان گاو، خوک، گوساله و پوست ماهی کپور تهیه می‌گردد که مصرف برخی از آن‌ها از لحاظ شرعی در کشورهای مسلمان اشکال دارد. خطر انتقال بیماری جنون گاوی به انسان که تاکنون دام‌های زیادی را در اروپا و کشورهای دیگر مبتلا کرده است، به وسیله ژلاتین تولیدی از پوست و استخوان دام‌ها نیز وجود دارد [۴-۲]. در حال حاضر، برای تعیین مقدار ژلاتین در روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی گازی^۱ و اسپکترومتری جرم^۲ [۵ و ۶]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) [۷] و طیف‌سنجی تبدیل فوریه رامان (FT-Raman) [۱۰-۸] به کار برده می‌شود. این روش‌ها روش‌هایی مخرب، دشوار، آلاینده، درون آزمایشگاهی و نیازمند آماده‌سازی نمونه، نیروی متخصص آموزش دیده، آزمایشگاه‌های مجهز و صرف وقت و هزینه بسیار هستند. طیف‌سنج‌های مبتنی بر الکترون و یون نیز به‌خلاف بالا

1. Gas Chromatography
2. Mass Spectroscopy
3. High-performance Liquid Chromatography (HPLC)
4. Fourier transform Raman methods (FT-Raman)

سطح آن‌ها آب‌دوست شوند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول‌های کلئیدی به‌طور مجزا بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای پخش و در دمای آزمایشگاه خشک شدند و سپس به‌عنوان بسترهای پلاسمونیک برای تشخیص و تعیین غیرمخرب ژلاتین در غلظت‌های مختلف استفاده شدند. برای آشکار سازی مولکول ژلاتین ابتدا غلظت 0.1 M از آن با استفاده از حلال آب بدون یون (DI) ساخته شد و غلظت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} و 10^{-7} مولار آن‌ها تهیه شد. در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های تهیه‌شده به‌صورت جداگانه و به روش قطره‌افشان بر روی بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا به‌طور مجزا قرار گرفت و پس از خشک شدن، طیف رامان مولکول ژلاتین قراردادده‌شده روی شیشه و طیف SERS مولکول ژلاتین قراردادده‌شده روی بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا اندازه‌گیری شدند.

مشخصه‌یابی

دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتوی X پودر نقره و پودر طلا به‌ترتیب به‌وسیله‌ی دستگاه Perkin-Elmer Lambda25 و دستگاه X Pert-Pro ساخت شرکت Panalytical کسور هلند با پرتوی تک‌فام $\text{Cu K}\alpha$ با طول‌موج 0.154 nm ، جریان 40 میلی‌آمپر و با ولتاژ 40 کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به‌وسیله‌ی دستگاه Hitach مدل S4160 و تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه شرکت نانوسیستم پارس ساخت ایران بررسی شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان Takram مدل P50C0R10 ساخت شرکت تکسان با تابش نور لیزر Nd:YAG، با طول‌موج 532 نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم 75 میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

طیف جذب محلول کلئیدی نقره و طلا و طیف خاموشی بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا

شکل ۱- (الف)، محلول کلئیدی نقره و طیف جذب آن و شکل ۱- (ب)، محلول کلئیدی طلا و طیف جذب آن را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله‌ی تشدید پلاسمونی به‌ترتیب در 410 نانومتر و 520 نانومتر تشکیل نانوذرات نقره و نانوذرات طلا را تأیید می‌کند [۱۹]. مشاهده‌ی یک قله‌ی جذبی در طیف‌های جذبی نانوذراتی مانند نقره و طلا بیانگر شکل کروی یا شبه کروی بودن نانوذرات است [۲۰].

پلاسمونیک زیستی SERS را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با نشانیدن (الف)، نانوذرات نقره، تصویر داخل آن، بستر شیشه‌ای پوشیده‌شده از نانوذرات نقره را نشان می‌دهد (سمت راست) و (ب)، نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای، تصویر داخل آن، بستر شیشه‌ای

در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانو ساختارهای فلزی به‌وسیله‌ی میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبودیافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود [۱۵ و ۱۶]، گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است. بنابراین مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبودیافته قرار می‌گیرد، بیش‌تر قطبیده می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد [۱۷]. در این روش هنگامی که آنالیت‌های مورد مطالعه در نزدیک سطح فلز قرار می‌گیرند یا به‌طور فیزیکی جذب نانوذرات فلزی می‌شوند، به‌علت برهمکنش آنالیت‌ها و پلاسمون‌های سطحی فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق آنالیت‌های میکروبیولوژیکی استفاده شود. در این مطالعه به هدف طراحی و ساخت حسگر ساده با سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش‌پذیری، تکرارپذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده ابتدا نانوذرات نقره و نانوذرات طلا به‌ترتیب با عامل کاهنده ساکاروز و عامل کاهنده تری‌سدیم‌سیترات دوآبه با استفاده از روش ساده شیمیایی ساخته شدند و سپس بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای قرار گرفتند تا بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا برای تشخیص و تعیین غیرمخرب ژلاتین در غلظت‌های مختلف استفاده شود. شکل ۱، طرح‌واره‌ای از روش ساخت حسگر پلاسمونیک زیستی SERS، قرار دادن ژلاتین روی آن‌ها به روش قطره‌افشان و نتایج طیف رامان ارائه می‌شود. که با تابش نور لیزر با طول‌موج 532 نانومتر، سیگنال نور رامان پراکنده‌شده اندازه‌گیری می‌شود.

روش بررسی

روش‌های ساخت و شناسایی

روش ساخت بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا

ابتدا به‌منظور ساخت محلول کلئیدی نقره از روش شیمیایی تولنز استفاده شد که در روش تولنز از سه محلول آبی شامل $12(1)$ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات 0.1 مولار، $20(2)$ میلی‌لیتر محلول پتاس 0.05 مولار و $10(3)$ میلی‌لیتر محلول ساکاروز 0.07 مولار استفاده می‌شود. با افزودن محلول ساکاروز بر روی محلول آمونیاکی نقره نیترات و پتاس با دمای 50 درجه سانتی‌گراد پس از گذشت حدود 4 دقیقه نانوذرات نقره تشکیل می‌شود [۱۸]. در ادامه به‌منظور ساخت محلول کلئیدی طلا به 20 میلی‌لیتر محلول 1 mM نمک طلا HAuCl_4 در حال جوش و هم‌خوردن، 2 میلی‌لیتر محلول $38/8 \text{ mM}$ از محلول تری‌سدیم‌سیترات دوآبه $(\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})$ اضافه شد که کلئید ارغوانی‌رنگ نهایی حاوی نانوذرات طلا است. سپس، قطعات شیشه‌ای با ابعاد $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ پس از شستشو با شوینده و آب با استون شستشو داده شدند که هم‌زمان از امواج فراصوت نیز استفاده شد. پس از خشک شدن این قطعات شیشه‌ای در دمای 400 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 دقیقه در کوره حرارت‌دهی شدند تا آلودگی‌های آلی نیز از سطح شیشه حذف شوند و

در زاویه 2θ برابر با $38/38$ ، $45/52$ ، $64/89$ و $77/83$ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است. ساختار FCC طلا را تأیید می‌کند.

تصاویر FE-SEM بسسترهای پلاسمونیک نقره و طلا و توزیع اندازه آن‌ها

شکل ۳- (الف) و (ج) به ترتیب بسسترهای پلاسمونیک نقره و طلا را نشان می‌دهد و مجموعه‌ای از ذرات کروی یا شبه کروی در بخش‌های مختلف بسسترها مشاهده می‌شود که توزیع اندازه ذرات در شکل ۳- (ب) نقره و (د) طلا نشان می‌دهد که ذرات نقره اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات اندازه ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر دارند. ذرات نقره نیز اندازه‌های بین ۵۰ تا ۱۶۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات نقره اندازه ۱۳۰۰ تا ۱۴۰۰ نانومتر دارند. نانوذرات کوچک‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره و طلا است و چنانچه مولکول‌های ژلاتین 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].

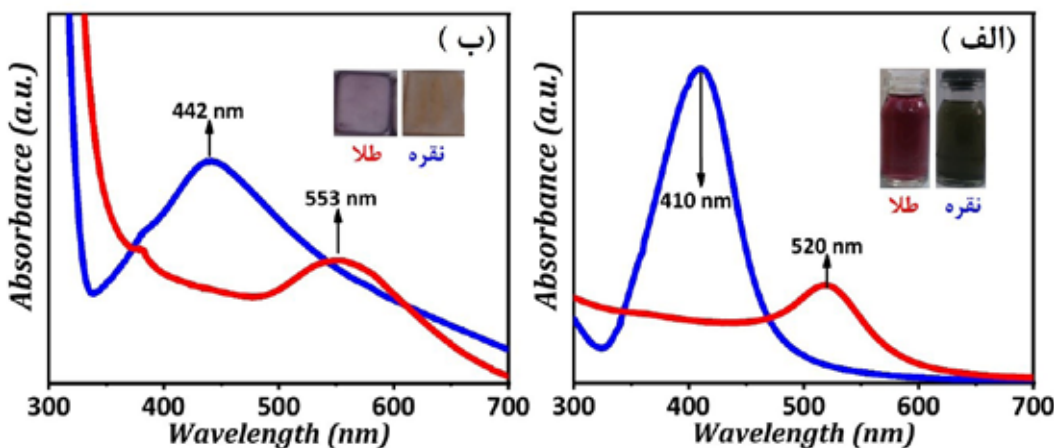
تصاویر AFM بسسترهای پلاسمونیک نقره و طلا

شکل ۴- الف و ب، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی بسسترهای پلاسمونیک نقره را نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Image Plus، (نسخه ۹/۱۲) میانگین زبری ۴/۴۲ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۹/۲۳۸ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۳/۱۲۹ به دست آمد. شکل ۴- ج و د، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی بسسترهای پلاسمونیک طلا را نشان می‌دهد. میانگین زبری ۲/۲۰ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری

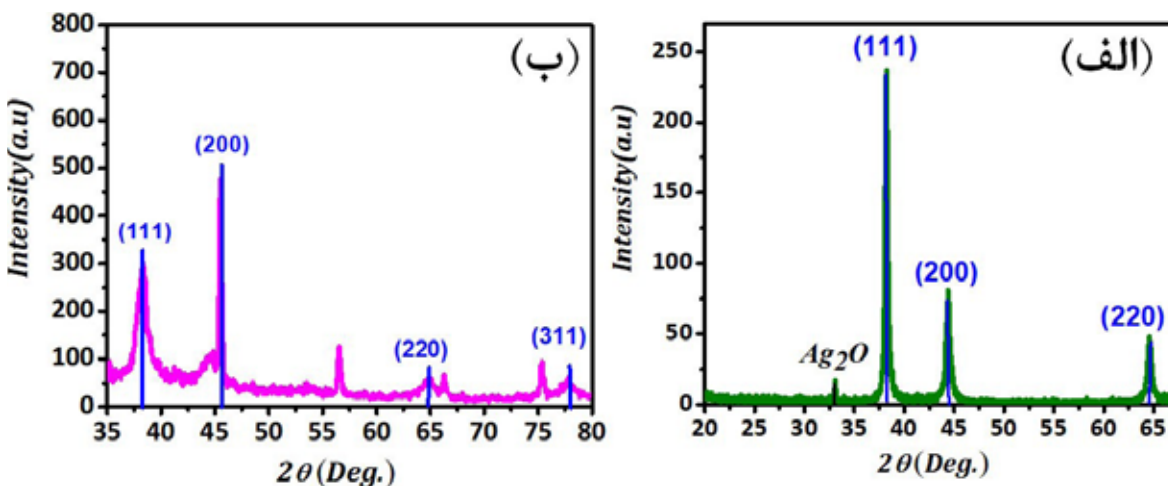
پوشیده شده از نانوذرات طلا را نشان می‌دهد (سمت راست). ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۴۲ نانومتر و ۵۵۳ نانومتر به ترتیب تشکیل نانوذرات نقره و نانوذرات طلا روی بسسترهای شیشه‌ای را تأیید می‌کند. با تغییر محیط دربردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند، جابه‌جایی در طول موج قله پلاسمونی رخ می‌دهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای قله‌ها نیز افزایش می‌یابد به این دلیل که موقعیت قله پلاسمونی به ضریب شکست محیط دربردارنده آن‌ها وابسته است [۲۱]. با توجه به شکل ۱، بر خلاف محلول کلئیدی پایدار که نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند، با قرار گرفتن نانوذرات نقره و نانوذرات طلا روی بسسترهای شیشه‌ای، حین خشک شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی بسسترها 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]، اینکه زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) بسسترهای فعال در SERS در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است، ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است.

طیف الگوی XRD نانوذرات نقره و نانوذرات طلا

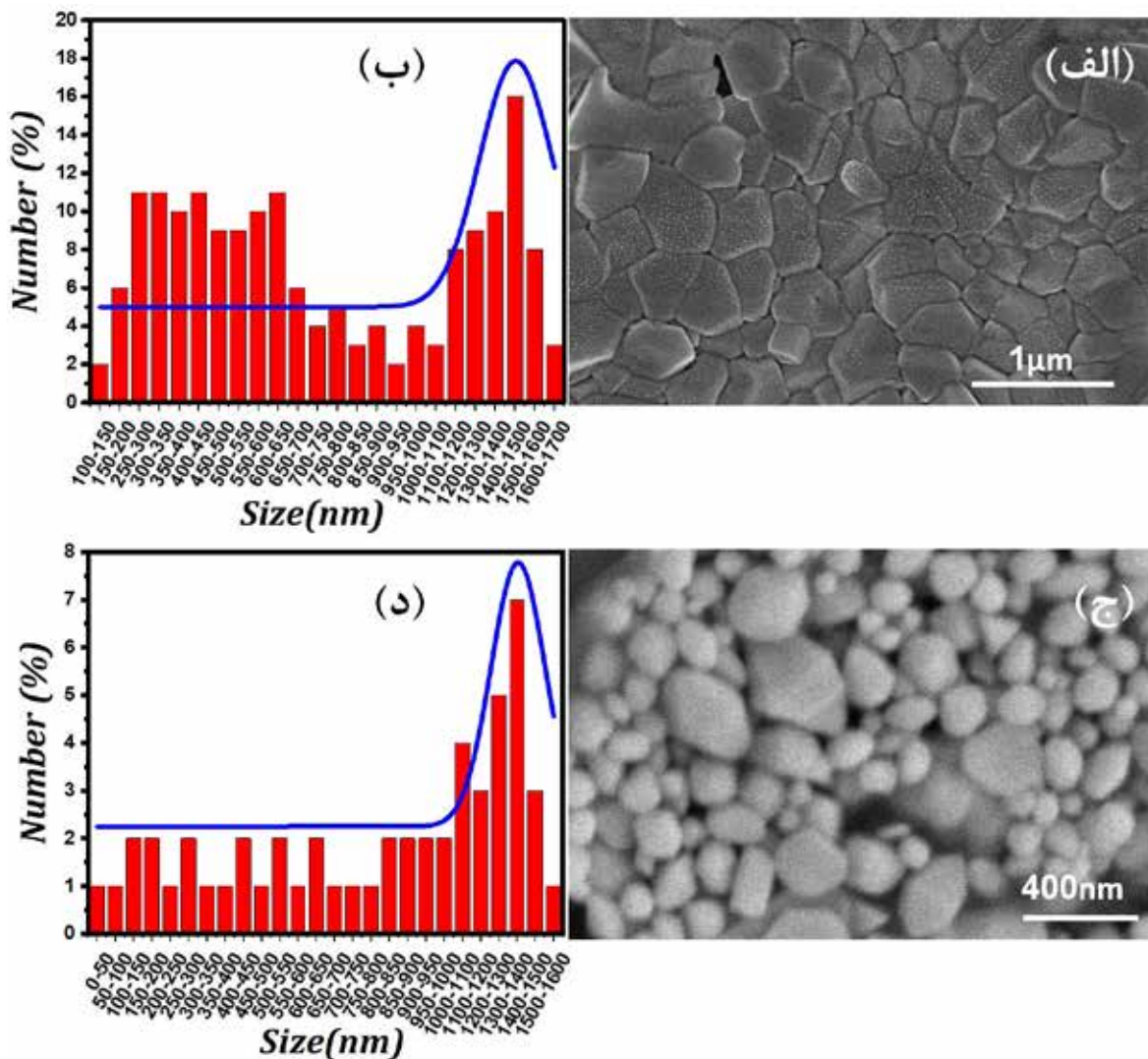
شکل ۲- (الف)، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره است که با مشاهده بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه 2θ برابر با $38/38$ ، $44/32$ و $64/57$ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰) و (۲۲۰) است، ساختار FCC نقره را تأیید می‌کند. قله ظاهر شده در زاویه 2θ برابر با $33/11$ درجه نقره اکسید است که به دلیل شرایط محیطی آزمایشگاه ظاهر شده است. شکل ۲- ب، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات طلا است که با مشاهده بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها



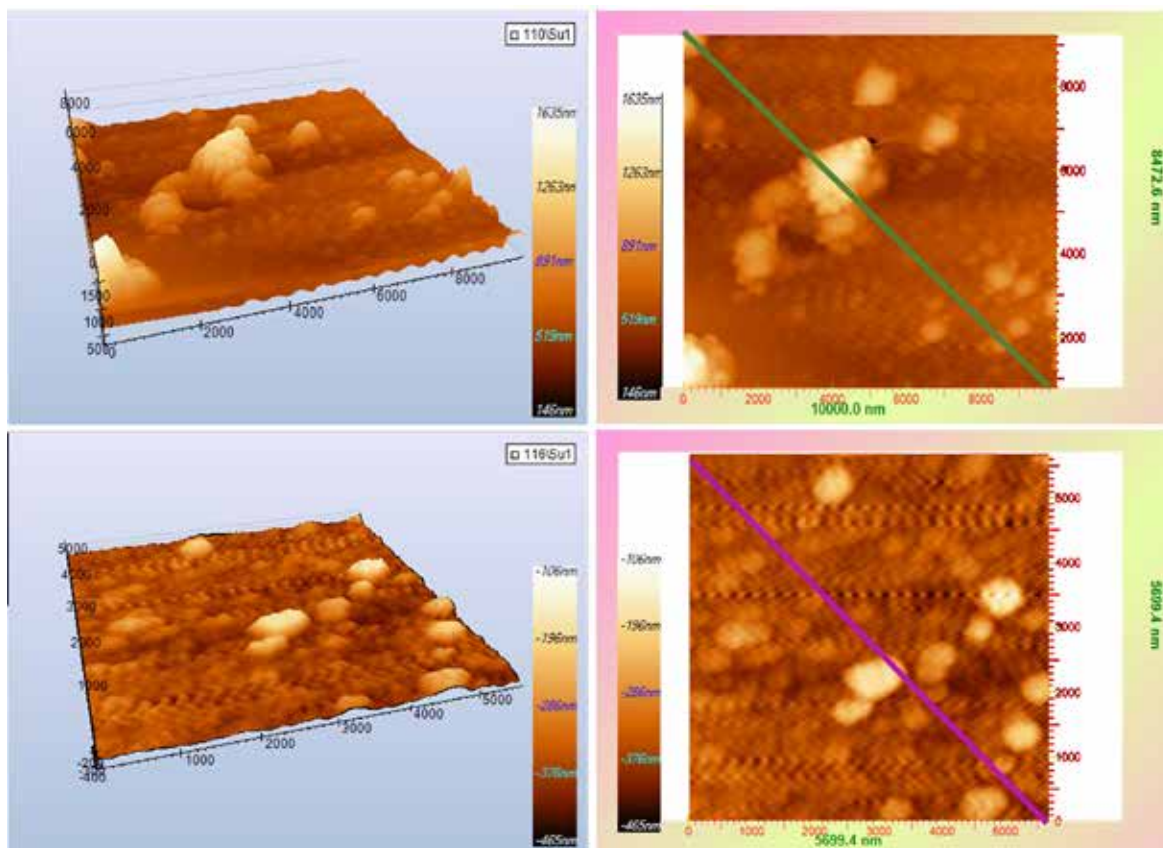
شکل ۱: (الف)، طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی تولنز با پیشینه جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر (منحنی آبی) و تصویر ظرف حاوی محلول کلئیدی نانوذرات نقره (سمت راست) و طیف جذب نانوذرات طلا ساخته شده به روش شیمیایی با پیشینه جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر (منحنی قرمز) و تصویر ظرف حاوی محلول کلئیدی نانوذرات طلا (سمت چپ). (ب) طیف خاموشی بسستر پلاسمونیک نقره (منحنی آبی) و تصویر این بسستر (سمت راست) و طیف خاموشی بسستر پلاسمونیک طلا (منحنی قرمز) و تصویر این بسستر (سمت چپ)



شکل ۲: (الف)، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره و (ب)، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات طلا



شکل ۳: (الف) تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیک نقره، (ب) توزیع اندازه ساختارهای بستر پلاسمونیک نقره که اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند. (ج) تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیک طلا، (ب) توزیع اندازه ساختارهای بستر پلاسمونیک طلا که اندازه‌های بین ۵۰ تا ۱۶۰۰ نانومتر دارند.



شکل ۴: تصویر AFM (الف) دوبعدی و (ب) سه‌بعدی بسترهای پلاسمونیک نقره و تصویر AFM (ج) دوبعدی و (د) سه‌بعدی بسترهای پلاسمونیک طلا

ظاهر می‌شوند. ارتعاشات مولکولی مولکول ژلاتین [۲۵ و ۲] به صورت خط‌چین‌هایی بر روی طیف‌های مولکول ژلاتین در شکل ۵ نمایش داده شده است. در مورد مولکول ژلاتین قرار داده شده روی بستر پلاسمونیک نقره و طلا، ارتعاشات Tryptophan، ارتعاشات کششی C-N، کششی C-N، کششی N-H، خمشی H-C-H، کششی N-H و کششی N-H به ترتیب در ۸۸۳، ۱۱۸۹، ۱۴۷۹، ۱۷۲۶، ۲۷۰۹، ۳۰۷۵، ۳۶۷۶ و ۴۵۴۳ cm^{-1} ظاهر می‌شوند. ارتعاشاتی که در طیف‌ها ظاهر شده‌اند، با خط‌چین‌های آبی نمایش داده شده است. بنابراین استفاده از نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در بسترهای پلاسمونیک، بهبود ارتعاشات مولکولی مولکول ژلاتین را به دنبال دارد. با محاسبه فاکتور بهبود (EF)، بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا مقایسه شدند که برای محاسبه فاکتور بهبود (EF) از رابطه (۱) استفاده شده است [۲۶].

$$EF = \frac{N_{vol} \times I_{surf}}{N_{surf} \times I_{vol}} \quad (1)$$

در رابطه (۱)، N_{surf} و N_{vol} به ترتیب غلظت ژلاتین قرار داده شده روی شیشه و قرار گرفته روی بسترهای پلاسمونیک است. I_{vol} و I_{surf} نیز به ترتیب شدت طیف رامان و شدت طیف SERS است.

5. Enhanced Factor

۹/۲۷۴ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۹/۱۶۳ به دست آمد. زبری سطحی که به وسیله نانوذرات نقره و نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای حسگرهای پلاسمونیک زیستی SERS ایجاد شده است، می‌تواند مراکز برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود [۲۴].

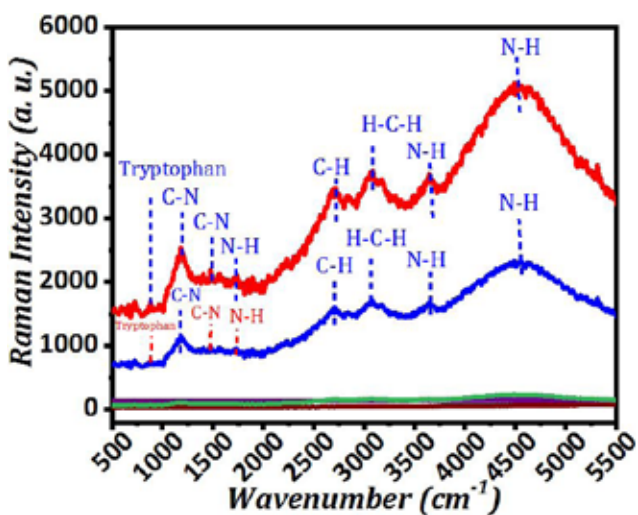
طیف رامان، طیف SERS و آشکارسازی مولکول ژلاتین با استفاده از بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا

در شکل ۵ طیف رامان بسترهای پلاسمونیک نقره (منحنی قهوه‌ای) و طیف رامان بسترهای پلاسمونیک طلا (منحنی بنفش)، طیف رامان مولکول ژلاتین قرار داده شده با غلظت 10^{-1} مولار بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی سبز)، طیف SERS مولکول ژلاتین قرار داده شده با غلظت 10^{-2} بر روی بسترهای پلاسمونیک نقره (منحنی آبی) و طیف SERS مولکول ژلاتین با غلظت 10^{-2} قرار داده شده بر روی بسترهای پلاسمونیک طلا (منحنی قرمز) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان مولکول ژلاتین که روی زیرلایه‌های شیشه‌ای قرار داده شده‌اند (منحنی سبز)، نشانی از ارتعاشات مولکولی مولکول ژلاتین مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این گونه حتی با غلظت 10^{-2} مولار و با استفاده از طیف‌سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن ژلاتین با غلظت 10^{-2} مولار بر روی بسترهای پلاسمونیک، ارتعاشات مولکولی ژلاتین (شکل ۵)

این رابطه خطی است و ضریب رگرسیون (R^2) آن برابر با ۰/۸۹ است. می توان با استفاده از این نمودار با مشاهده شدت قله ارتعاشی مولکول C-H در طیف رامان، غلظت آن را به دست آورد. هدف از ساخت بسترهای پلاسمونیک، آشکار سازی غلظت های بسیار پایین ژلاتین است، خطی بودن منحنی کالیبراسیون غلظت های پایین از اهمیت بیشتری برخوردار است که در این مطالعه قابل مشاهده است و شکل ۶-ب، طیف SERS ژلاتین با غلظت های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه ای) و 10^{-7} (منحنی بنفش) مولار قرار داده شده بر روی بسترهای پلاسمونیک طلا را نشان می دهد. مانند بسترهای پلاسمونیک نقره کاهش شدت قله های ارتعاشی مولکولی ژلاتین با کاهش غلظت مشاهده می شود که ناشی از کاهش ارتعاشی مولکولی است که در نتیجه کاهش غلظت ژلاتین رخ می دهد. ارتعاشی مولکولی ژلاتین در غلظت های کمتر از 10^{-7} مولار به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بسترهای پلاسمونیک طلا می توانند تا غلظت 10^{-7} مولار از مولکول ژلاتین را شناسایی کنند. در داخل شکل ۶-ب، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش مولکولی C-H در عدد موج 1185 cm^{-1} را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C نشان می دهد که با برازش انجام شده از رابطه (۳) تبعیت می کند.

$$I = 1514/4 C + 262/1 \quad (R^2 = 0/95) \quad (3)$$

رابطه خطی است و ضریب رگرسیون (R^2) آن برابر با ۰/۹۵ است که محاسبه غلظت ژلاتین با توجه به شدت طیف SERS را فراهم می آورد.

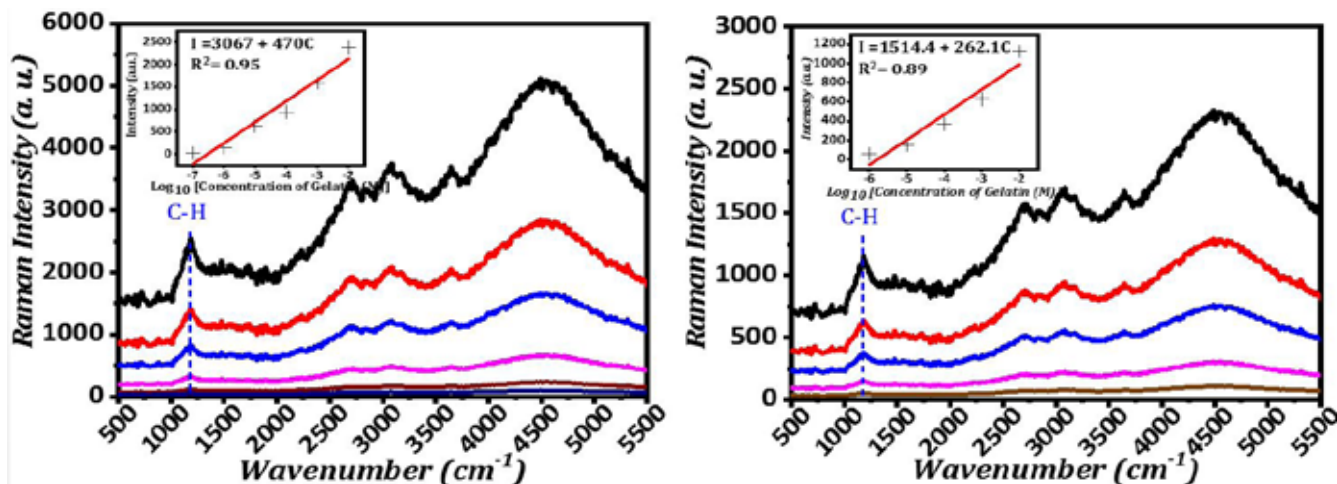


شکل ۵: طیف رامان بستر پلاسمونیک نقره (منحنی قهوه ای)، طیف رامان بستر پلاسمونیک طلا (منحنی بنفش)، طیف رامان ژلاتین با غلظت 10^{-2} قرار داده شده بر روی بستر شیشه ای (منحنی سبز)، طیف SERS ژلاتین قرار داده شده با غلظت 10^{-2} بر روی بستر پلاسمونیک نقره (منحنی آبی) و طیف SERS ژلاتین قرار داده شده با غلظت 10^{-2} بر روی بستر پلاسمونیک طلا با غلظت 10^{-2} (منحنی قرمز). ارتعاشات مولکولی که در طیف SERS ظاهر شده اند، با خط چین آبی و ارتعاشات مولکولی که ظاهر نشده اند، با خط چین قرمز مشخص شده است.

با جای گذاری داده های بسترهای پلاسمونیک در رابطه (۱)، فاکتور بهبود (EF) برای بسترهای پلاسمونیک نقره و طلا به ترتیب $8/9 \times 10^3$ و $19/8 \times 10^3$ به دست آمد که عملکرد بسترهای پلاسمونیک طلا در مقایسه با بسترهای پلاسمونیک نقره دارای فاکتور بهبود (EF) بالاتری است که تقویت بیشتر ارتعاشات مولکولی ژلاتین را سبب می شود. ارتعاشاتی از ژلاتین که در طیف ها ظاهر نشده اند با خط چین های قرمز نمایش داده شده است. معمولاً در دماهای پایین با از بین بردن افت و خیزهای حرارتی، ارتعاشاتی که به خصوص در عدد موج های کمتر اتفاق می افتند، قابل آشکار سازی می شوند [۲۷]. بنابراین، به این دلیل که طیف سنجی در دمای اتاق انجام شده است، ارتعاشات مولکولی که با خط چین های قرمز نمایش داده شده اند، در طیف SERS ظاهر نشده اند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بسترهای پلاسمونیک به دلیل پراکندگی نور از نقاط زیر روی سطح شیشه است. نقاط زیری که با نقره اندود و طلا اندود کردن شیشه ایجاد شده است. ذرات بزرگ تر نقره و طلا که در شکل ۳- الف) و ب) مشاهده می شوند، با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به مولکول ژلاتین، سیگنال رامان آن ها را بهبود می دهند. در کنار پراکندگی نور از ذرات بزرگ تر نقره و طلا یکی دیگر از دلایل بهبود سیگنال رامان، تشدید پلاسمون های سطحی ذرات کوچک تر نقره و طلا یا همان میدان های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات نقره و طلای مشاهده شده در شکل ۳- الف) و ب) مانند لنز اپتیکی عمل می کنند و نور لیزر فرودی را در اطراف خود متمرکز می کنند. بنابراین شدت میدان الکتریکی در نزدیکی نانوذرات افزایش می یابد و با قرار گیری مولکول ژلاتین در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه می کنند و قطبیده تر می شوند و در نتیجه ارتعاش های مولکولی آن ها تقویت می شود و سیگنال های پر شدت تری را نشان می دهند [۲۸ و ۲۹].

شکل ۶-الف، طیف SERS ژلاتین با غلظت های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه ای) مولار قرار داده شده بر روی بسترهای پلاسمونیک نقره را نشان می دهد. با کاهش غلظت مولکول ژلاتین، شدت قله های ارتعاشی مولکولی آن کاهش می یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول های ژلاتین و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش های مولکولی آن است به گونه ای که در غلظت های کم تر از 10^{-6} مولار، ارتعاش های ژلاتین به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بستر پلاسمونیک نقره می تواند تا غلظت 10^{-6} مولار ژلاتین را شناسایی کند. در داخل شکل ۶-الف، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش مولکولی C-H در عدد موج 1185 cm^{-1} را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C نشان می دهد که با برازش انجام شده از رابطه (۲) پیروی می کند.

$$I = 1514/4 C + 262/1 \quad (R^2 = 0/89) \quad (2)$$



شکل ۶- الف) طیف SERS ژلاتین قرار داده شده با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) بر روی بسترهای پلاسمونیک نقره. داخل شکل الف، منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت، I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش C-H در عدد موج 1185 cm^{-1} ، بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C برای بسترهای پلاسمونیک نقره نمایش داده شده است. ب) طیف SERS ژلاتین قرار داده شده با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} (منحنی بنفش) بر روی بسترهای پلاسمونیک طلا. داخل شکل (ب) منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت، I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش C-H در عدد موج 1185 cm^{-1} ، بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C برای بسترهای پلاسمونیک طلا نمایش داده شده است.

نتیجه گیری

نقره و طلا، مولکول‌های سازنده ژلاتین قطبیده تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های شدیدتری ظاهر می‌شوند. از مزایای بسترهای حسگرهای پلاسمونیک زیستی SERS معرفی شده استفاده آسان و توانایی تشخیص سریع غلظت‌های اندک است که برای ساخت آن نیز هزینه چندان کمی صرف نمی‌شود و با آن‌ها می‌توان انواع پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی و مواد بیولوژیکی را شناسایی کرد.

به منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد ناشی از مولکول ژلاتین، تشخیص مولکول ژلاتین در غلظت‌های کم دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما، به دلیل ضعیف بودن سیگنال رامان عملاً شناسایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن مولکول ژلاتین در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند نقره و طلا و همچنین نور پراکنده شده از ذرات بزرگ فلزی می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. بنابراین، ابتدا نانوذرات نقره و نانوذرات طلا با استفاده از احیای شیمیایی نمک نقره و نمک طلا ساخته شدند و در ادامه با به‌کارگیری روش قطره‌چکان که روشی ساده، سریع و ارزان است، نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در دمای اتاق بر روی بسترهای شیشه‌ای لایه‌نشانی شدند و این بسترها به عنوان بسترهای حسگرهای پلاسمونیک زیستی SERS جهت آشکارسازی مولکول ژلاتین استفاده شدند. با کاهش غلظت مولکول ژلاتین سیگنال رامان آن‌ها نیز کاهش می‌یابد که این بسترهای پلاسمونیک ساخته شده از نانوذرات نقره و نانوذرات طلا قادر به شناسایی مولکول ژلاتین به ترتیب تا غلظت 10^{-6} مولار و 10^{-7} مولار هستند. بهبود سیگنال رامان مولکول ژلاتین ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و نانوذرات طلا که با دریافت نور لیزر فرودی، نور را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری مولکول ژلاتین در این مناطق و در نتیجه به دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر و یا رسیدن نور حاصل از پراکندگی از نقاط زیر پوشش

References:

- Zhang D, Yang H. Gelatin-stabilized copper nanoparticles: Synthesis, morphology, and their surface-enhanced Raman scattering properties. *Physica B*. 2013; 415: 44-8.
- Lee CH, Zhang P. Facile synthesis of gelatin-protected silver nanoparticles for SERS applications. *J. Raman Spectroscopy*. 2013; 44: 823-6.
- Bagrov DV, Nikishin II, Pavlova ER, Klinov DV. Distribution of Polylactide and Gelatin in Single Electrospun Nanofibers Studied by Raman Spectroscopy. *J. Applied Physics*. 2019; 2064: 040001-4.
- Duconseille A, Gaillard C, Santé-Lhoutellier V, Astruc T. Molecular and structural changes in gelatin evidenced by Raman microspectroscopy. *J. Food Hydrocolloids*. 2018; 77: 777-86.
- Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou EJ. Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1998; 740: 83-98.
- Goncalves C, Alpendurada MF. Solid-phase micro-extraction-gas-chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *Journal of Chromatography*. 2004; 1020: 239-50.
- Papadopoulou-Mourkidou E, Patsias JJ. Development of asemi-automated high-performance liquid chromatographic-diode array detection system for screening pesticides at trace levels in aquatic systems of the Axios River basin. *Journal of Chromatography*. 1996; 726: 99-113.
- Skoulika SG, Georgiou CA. Univariate and Multivariate Calibration for the Quantitative Determination of Methyl-parathion in Pesticide Formulations by FT-Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2000; 54: 747-52.
- Sato-Berru RY, Medina-Valtierra J, Medina Gutierrez C, Frausto-Reyes C. Quantitative NIR-Raman analysis of methyl-parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004; 60: 2231-4.
- Alak-Ala M, Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman spectrometry of organo phosphorus chemical agents. *ACS Publication Analytical Chemistry*. 1987; 59: 2149-53.
- Ivanov AN, Evtugin GA, Brainina KZ, Budnikov GK, Stenina LE. Cholinesterase Sensors Based on Thick-Film Graphite Electrodes for the Flow-Injection Determination of Organophosphorus Pesticides. *Journal of Analytical Chemistry*. 2002; 57: 1042-8.
- Alizadeh T. High Selective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*. 2009; 21: 1490-8.
- Duan N, Chang B, Zhang H, Wang Z, Wu S. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor. *International Journal Food Microbiology*. 2016; 218: 38-43.
- Wang LR, 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*. 2006; 63: 614-8.
- Ren B, Liu GK, Lian XB, Yang ZL, Tian ZQ. Raman spectroscopy on transition metals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007; 388: 29-45.
- Matricardi C, Hanske C, Garcia-Pomar JL, Langer J, Mihi A, Liz-Marzan LM. Gold Nanoparticle Plasmonic Superlattices as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates. *ACS Nano*. 2018; 12: 8531-9.
- Lin KQ, Yi J, Hu S, Liu BJ, Liu JY, Wang X, Ren B. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120: 20806-3.
- Sharifi N, Taghavinia N. Silver nano-islands on glass fibers using heat segregation method. *Materials. Chemistry. and Physics*. 2009; 113: 63-6.
- Ngumbi PK, Mugo SW, Ngaruiya JM. Determination of Gold Nanoparticles Sizes via Surface Plasmon Resonance. *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*. 2018; 11: 25-9.
- Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-9.
- Bohren CF, Huffman DR. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley. New York. 1983; 306: 625.
- Wang LR, 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*. 2006; 63: 614-8.
- Canamares MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M, 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*. 2008; 326: 103-9.
- Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-

9.

25. Brown GM, Hope G A. SERS study of the adsorption of gelatin at a copper electrode in sulfuric acid solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1995; 397: 293-300.

26. Le Ru EC, Blackie E, Meyer M, Etchegoin PG. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007; 137: 13794-803.

27. Surovtsev NV, Adichtchev SV, Malinovsky V K, Ogienko AG, Drebuschchak VA, Yu. Manakov A, Ancharov AI, Yunoshev AS, Boldyreva EV. Glycine phases formed from frozen aqueous solutions: Revisited. *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*. 2012; 137: 1065103.

28. Chen HY, Lin MH, Wang CY, Chang YM, Gwo S. Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 42: 13698-705.

29. Granger JH, Schlotter NE, Crawford AC, Porter MD. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Chemical Society Reviews*. 2016; 45: 3865-82.