

## تهیه حسگرهای زیستی نانوذرات نقره بر پایه رامان بهبودیافته سطحی (SERS)، در جهت مطالعه ارتعاشات مولکولی اسید آمینه والین (Valine)

### چکیده

**مقدمه:** اسید آمینه والین یکی از ۲۲ اسید آمینه اصلی یاخته‌های زنده و از اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی انسان است. اسید آمینه والین نیز در ساخت برخی میانجی‌های عصبی مؤثر است. وجود مقادیر بسیار کم اسید آمینه والین ( $C_5H_{11}NO_2$ )، در خون نشانی از نقص در سیستم سوخت‌وساز بدن آنها است که این عمل باعث بروز بیماری‌های متابولیکی می‌شود. روش پراکندگی رامان بهبودیافته سطحی (SERS)، روشی دقیق برای شناسایی مواد زیستی و مواد شیمیایی با غلظت‌های بسیار کم می‌باشد. در این مقاله، برای شناسایی اسید آمینه والین، جهت کنترل بیماری‌های ناشی از آن از بسترهای پوشش داده شده با نانوذرات نقره استفاده شده است.

**روش بررسی:** با استفاده از نمک نقره و عامل کاهنده تری‌سدیم سیترات دوآبه، نانوذرات نقره به روش ساده شیمیایی (لی و میسل) ساخته شدند و با روش چرخشی (اسپین - کت)، نانوذرات نقره بروی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شدند. در نهایت، با استفاده از این بسترهای SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک و طیف‌سنجی رامان بهبود سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسید آمینه والین به‌وسیله بسترهای SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک و طیف‌سنجی رامان، شناسایی شدند.

**یافته‌ها:** نانوذرات نقره ساخته شده، نانوذراتی کروی و شبه‌کروی هستند که با مشاهده قله تشدید پلاسمونی در  $410$  نانومتر تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می‌کند. بسترهای فعال SERS، با نانوذرات پوشش داده شده‌اند که باعث بهبود سیگنال رامان می‌شود. بهبود سیگنال رامان، ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات است. بسترهای فعال SERS، نانوذرات نقره به صورت لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای، برای تشخیص اسید آمینه والین، ساخته شدند و حد تشخیص آن  $10^{-9}$  مولار و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت  $10^{-9}$  مولار  $4/30$  درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان بدست آمده نشان می‌دهد که بسترهای فعال SERS، نانوذرات نقره برای تشخیص اسید آمینه والین، با روش‌های توسعه یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجر به توسعه حسگرهای میکرونی می‌شوند.

**نتیجه‌گیری:** در طیف‌سنجی رامان، بسترهای فعال SERS، که با نانوذرات نقره پوشش داده شده‌اند؛ مورد توجه هستند که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و پراکندگی نور از ذرات نقره بزرگتر است چون سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسید آمینه والین را تقویت می‌کنند. با کاهش غلظت اسید آمینه والین لایه‌نشانی شده روی بسترهای فعال SERS، به دلیل کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی، سیگنال رامان نیز تضعیف می‌شود که با افزایش میزان زبری سطح بسترهای فعال SERS، می‌توان سیگنال رامان را به دلیل افزایش میزان پراکندگی نور از مراکز زبر افزایش داد. این مراکز زبر، همان ذرات بزرگتری هستند که در حین لایه‌نشانی به روش چرخشی (اسپین-کت) ایجاد می‌شوند و در نتیجه با افزایش میزان پراکندگی نور از خود، منجر به بهبود سیگنال می‌شوند و در ادامه ارتعاش‌های مولکولی اسید آمینه والین به‌وسیله بسترهای SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک و طیف‌سنجی رامان، شناسایی شدند.

**واژه‌های کلیدی:** نانوذرات نقره، روش چرخشی (اسپین - کت)، اسید آمینه والین، حسگر پلاسمونیک، طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS).

وحید اسکندری<sup>۱</sup>  
محمد رضا سعادت<sup>۲</sup>  
امین هادی<sup>۳\*</sup>

۱- فارغ التحصیل، کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران  
۲- فارغ التحصیل، کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم و فناوری نانو، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران  
۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

نویسنده مسئول: امین هادی  
پست الکترونیکی:

[amin.hadi@yums.ac.ir](mailto:amin.hadi@yums.ac.ir)

۰۹۱۲۸۹۲۰۳۴۱

شماره تماس:

<sup>1</sup> Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS)



**مقدمه:**

اسیدهای آمینه فعالیت‌های زیستی بسیار متنوعی را در سلول‌های زنده برعهده دارند. اسیدهای آمینه واحدهای ساختاری پروتئین‌ها هستند و به صورت منومرهای در ساختمان زنجیره‌های پلی‌پپتیدی پروتئین‌ها شرکت می‌نمایند. از نظر تغذیه‌ای، اسیدهای آمینه را به دو دسته ضروری و غیرضروری تقسیم می‌کنند. اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای آمینه‌ای هستند که سلول‌ها قادر به ساخت آنها نیستند، در صورتی که اسیدهای آمینه غیرضروری به وسیله سلول‌ها از سایر مواد ساخته می‌شوند. نوع اسیدهای آمینه ضروری در گونه‌های مختلف جانداران متفاوت است [۱-۶]. اسید آمینه والین یکی از اسیدهای آمینه ضروری برای انسان و حیوان است. بدن انسان قادر به تولید این اسید آمینه نیست بنابراین باید از طریق رژیم غذایی یا مکمل غذایی برای بدن تأمین شود [۱، ۲]. اسید آمینه والین (amino acid valine)، در غلات، فرآورده‌های لبنی، قارچ، گوشت، بادام زمینی و پروتئین سویا یافت می‌شود. این اسید آمینه باعث افزایش انرژی، افزایش استقامت، کمک به بهبود بافت‌های عضلانی، و کمک به بهبود مصدومیت‌های به وجود آمده در عضلات و تاندون‌ها می‌شود. اسید آمینه والین در تولید و ترشح آنتی‌بادی‌ها و هورمون‌ها، بدن را یاری می‌دهد و به هماهنگی انقباضات عضلانی کمک می‌کند. همچنین برای رشد مطلوب نوزادان مهم است. اسید آمینه والین به عنوان یکی از اسیدهای آمینه شاخه‌دار، در صنایع مختلف کاربردهای فراوانی دارد مانند: مکمل محصولات غذایی انسان و دام، مرطوب‌کننده در لوازم آرایشی برای مراقبت از پوست، علف‌کش‌ها و داروهای ضد ویروسی استفاده فراوانی دارد [۱-۷]. در نتیجه تشخیص با دقت بالا اسید آمینه والین در مواد مهم می‌باشد. تکنیک‌های مختلفی مانند HPLC، TMS (MS/MS)، GC-<sup>3</sup>MS، روش جاذب ایمنی مرتبط با آنزیم (ELISA) و SERS برای شناسایی اسید آمینه والین به کار گرفته می‌شوند [۸-۱۰]. روش SERS در مقایسه با بقیه روش‌های نام برده، از حساسیت بالاتری برخوردار است [۱۱-۱۳]. طیف‌سنجی رامان روش مناسبی برای شناسایی ترکیبات مواد گوناگون از جمله گونه‌های زیستی و مواد

شیمیایی است؛ اما سیگنال رامان گونه‌های زیستی و مواد شیمیایی به خصوص در غلظت‌های پایین، بسیار اندک است. در روش SERS، با قرار گرفتن گونه‌های بیولوژیکی و شیمیایی مختلف در نزدیکی و یا جذب فیزیکی آنها روی سطح حاوی 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 و شیمیایی نیز استفاده شود [۱۴]. امروزه، لایه‌های متشکل از نانوذرات فلزات نجیب مانند طلا و نقره به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی و خواص نوری مورد توجه قرار گرفته‌اند. در واقع نوسان‌های الکترون‌های رسانش نانوذرات فلزات نجیب با تابش نور به آنها، سبب افزایش چگالی انرژی میدان‌های الکتریکی یا همان نور تابش شده می‌شود که در حسگرهای زیستی [۱۵، ۱۶]، سلول‌های خورشیدی [۱۷] و SERS [۱۸] کاربرد دارند. با توجه به خواص نوری فوق‌العاده این نانوذرات، روش‌های گوناگونی برای ساخت لایه‌ها متشکل از نانوذرات فلزی ارائه شده است [۱۹] که می‌توان به لیتوگرافی با استفاده از پرتو الکترونی [۲۰، ۲۱] اشاره کرد که این روش نیاز به تجهیزات پیچیده و گران‌قیمت دارد و برای ساخت نمونه‌هایی با اندازه کوچک کاربرد دارد. در مقابل، روش رسوب الکتروشیمیایی، روشی ساده است که برای ساخت نمونه‌هایی با اندازه‌هایی با مقیاس بزرگ کاربرد فراوانی دارد [۲۲، ۲۳]. 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. طیف‌سنجی IR، به دلیل فعال بودن ارتعاشات مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی و شیمیایی را دشوار می‌کند و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. طیف‌سنج‌های مبتنی بر الکترون و یون نیز نیاز به خلاء بالا دارند، بنابراین، طیف‌سنجی رامان نه تنها امکان مطالعه مولکول در شرایط عادی را فراهم می‌کند که با آن می‌توان فرایندهای کاتالیستی و فرایندهایی که در فصل مشترک فلز - الکترولیت رخ می‌دهد؛ را نیز بررسی کرد [۲۴]. اما سیگنال مربوط به پراکندگی رامان به‌طور ذاتی ضعیف است که آشکارسازی را دشوار می‌کند [۲۵]. 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 SERS، نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که

<sup>1</sup> High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

<sup>2</sup> Tandem Mass Spectrometry (TMS)

<sup>3</sup> Gas Chromatography Mass Spectrometry (GS-MS)

<sup>4</sup> enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA)

سیگما آلدریج، لام‌های شیشه‌ای با ابعاد  $2/5\text{cm} \times 7/5\text{cm}$  به‌عنوان بستر، استون با جرم مولی  $58/09\text{ g/mol}$  و درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵٪ و اتانول با جرم مولی  $46/069\text{ g/mol}$  و درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵٪، تهیه شده از شرکت مرک موادی هستند که در این پژوهش استفاده شده است.

#### ۱-۲. روش ساخت بسترهای فعال SERS به عنوان حسگرهای پلاسمونیک

شیشه‌ها با ابعاد  $2\text{cm} \times 2\text{cm}$  به عنوان بستر برش داده شدند. پس از شستشو با آب و صابون، استون و اتانول، نمونه‌ها در دمای  $400^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت‌دهی شدند تا آلودگی‌های مواد آلی از سطح شیشه‌ها حذف شوند و در واقع برای پوشش شیشه‌ها از نانوذرات نقره، سطوحی آب‌دوست داشته باشیم. در ادامه به منظور ساخت نانوذرات نقره، به  $20$  میلی‌لیتر محلول  $1\text{mM}$  نمک نقره ( $\text{AgNO}_3$ ) در حال جوش و هم خوردن،  $4$  میلی‌لیتر محلول  $18/8\text{ mM}$  از محلول تری سدیم سیترات دوآبه ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) اضافه شد مخلوط حاصل را به مدت  $10$  دقیقه حرارت داده شد. که در نهایت کلونید سبز مایل به خاکستری رنگ نهایی حاوی نانوذرات نقره است [۲۹]. سپس، با استفاده از روش چرخشی (اسپین - کت)، APTES و نانوذرات نقره داخل محلول کلونیدی نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای نشانده می‌شوند. برای این منظور، بسترهای شیشه‌ای در دستگاه چرخشی (اسپین - کت) قرار داده می‌شوند سپس،  $10$  میکرولیتر از APTES بر روی بسترهای شیشه‌ای؛ پخش و تحت دور  $2500\text{ rpm}$ ، به مدت دو دقیقه لایه نشانی انجام گردید و در ادامه  $100$  میکرولیتر از این محلول کلونیدی نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای؛ پخش و تحت دور  $2500\text{ rpm}$ ، به مدت زمان  $10$  دقیقه لایه نشانی انجام گردید و بسترهای پوشیده شده از نانوذرات نقره در دمای آزمایشگاه خشک شدند. برای آشکارسازی اسیدآمینه والین، غلظت‌های  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$ ،  $10^{-9}$  مولار از آن با محلول آب DI تهیه شد و به صورت جداگانه و به روش قطره افشان،  $10$  میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده بر روی بسترهای فعال SERS به عنوان حسگرهای پلاسمونیک قرار گرفت و پس از خشک شدن در حضور هوا، طیف رامان اسیدآمینه

نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند [۲۶]. این پدیده برای اولین بار در سال ۱۹۷۴، برای مولکول پیرادین جذب شده بر روی سطح الکترودهای نقره رشد داده شده به روش الکتروشیمیایی مشاهده شد. سیگنال بهبود یافته رامان، فقط بعد از قرارگرفتن الکتروده 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 داشت که در سال ۱۹۷۷، بهبود سیگنال رامان را به برهم کنش مولکول با سطح فلز زیر نسبت دادند [۲۷]. فلزاتی مانند طلا، نقره، مس و پلاتین جهت مشاهده این پدیده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های فلز مانند نوع، شکل، اندازه و چگونگی کنار هم قرار گرفتن آنها بر پراکندگی رامان مولکول مورد بررسی اثر می‌گذارد. از میان فلزات گوناگون، نقره و طلا به علت داشتن تشدید پلاسمونی در ناحیه مرئی و زیرقرمز، پایداری بیشتر و روش‌های ساخت آسان، بیشتر مورد توجه بوده‌اند تا گونه‌های زیستی و مواد شیمیایی شناسایی شوند [۲۸]. در این مطالعه، با استفاده از روش چرخشی (اسپین - کت)، نانوذرات نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای با قدرت چسبندگی مکانیکی بالا، سریع، کم‌هزینه و در دمای اتاق پوشش داده شدند تا از آنها به عنوان حسگرهای پلاسمونیک بسترهای فعال SERS، برای شناسایی ارتعاشات مولکولی اسیدآمینه والین در غلظت‌های پایین استفاده شود.

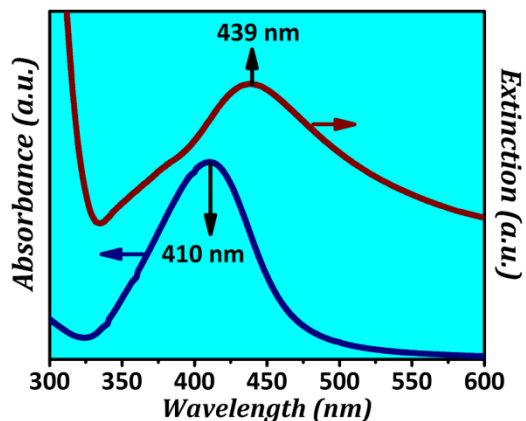
#### مواد و روش‌ها

##### روش‌های ساخت و شناسایی

##### ۱-۱. مواد شیمیایی مورد استفاده

نمک نقره ( $\text{AgNO}_3$ )، با جرم مولی  $169/87\text{ g/mol}$  و درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵٪، تری‌سدیم سیترات دوآبه با جرم مولی  $294/1\text{ g/mol}$ ، و درصد خلوص بالای ۹۹٪، اسیدآمینه والین ( $\text{Valine}$ )، با جرم مولی  $117/151\text{ g/mol}$ ، درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵٪ و ۳-آمینو پروپیل تری‌اتوکسی سیلان (3- (Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)، تهیه شده از شرکت

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 [۳۲]، با توجه به شکل ۱- (نمودار آبی)، برخلاف محلول کلئیدی پایدار که نانوذرات نقره در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند؛ با قرار گرفتن نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای حین خشک شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی بسترها شکل می‌گیرد به گونه‌ای که می‌توان این کلوخه‌ها را ذرات بزرگتری در نظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می‌شود [۳۲]، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است [۳۲]، این که زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) بسترهای فعال SERS، به‌عنوان حسگرهای پلاسمونیک در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است.



شکل ۱: طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی با بیشینه جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر (نمودار آبی) و طیف خاموشی بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک با بیشینه خاموشی در طول موج ۴۳۹ (نمودار قرمز).

## ۲. تصاویر FE-SEM و توزیع اندازه نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای، به عنوان بسترهای فعال SERS

در شکل ۲ (الف)، تصویر FE-SEM، مربوط به بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگر پلاسمونیک در اسکیل بار ۵ میکرومتر را نشان می‌دهد. در نمونه شکل ۲ (الف)، سطح بستر شیشه‌ای با نانوذرات و ذرات بزرگتر پوشیده شده است. ذرات ریزتر به رنگ

والین، نشانده شده روی شیشه و طیف رامان بهبود یافته سطحی اسید آمینه والین، نشانده شده روی بسترهای فعال SERS به عنوان حسگرهای پلاسمونیک اندازه‌گیری و تحلیل و بررسی شدند.

## ۱-۳. مشخصه‌یابی

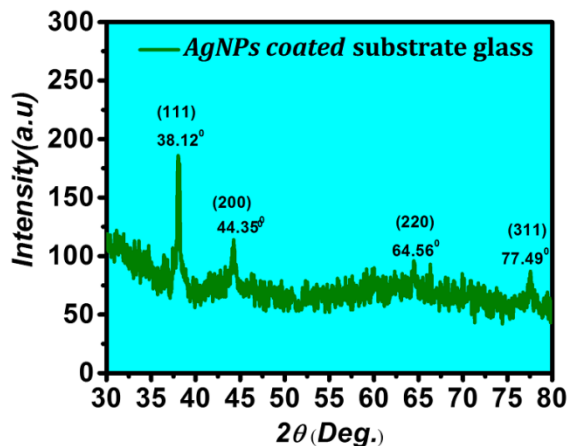
دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتو X محلول کلئیدی نانوذرات نقره و بسترهای فعال SERS، به ترتیب به وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 و دستگاه X Pert-Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند، با پرتو تک‌فام  $\text{Cu K}\alpha$  با طول موج ۰/۱۵۴ نانومتر، جریان ۴۰ میلی‌آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به وسیله دستگاه Hitach مدل S4160 و تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه شرکت نانو سیستم پارس ساخت ایران بررسی شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان کانفوکال اسپکترومیکروسکوپی (Confocal Raman Spectroscopy)، مدل Lab Ram HR ساخت شرکت Horiba-ژاپن با تابش نور لیزر، با طول موج ۶۳۳ نانومتر و توان خروجی ۱۷ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

## نتایج و بحث

### ۱. طیف جذب نانوذرات نقره و طیف خاموشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS

شکل ۱- (نمودار آبی)، طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی با عامل کاهنده تری سدیم سیترات دوآبه را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۱۰ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می‌کند [۳۰]، مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های جذبی نانوذرات نقره بیانگر شکل کروی یا شبه‌کروی بودن نانوذرات است [۳۱]. شکل ۱- (نمودار قرمز)، طیف خاموشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با نشان دادن شکل ۱ (نمودار آبی)، نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای و ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۳۹ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای را تأیید می‌کند. با تغییر محیط دربردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا

SERS، است که با مشاهده بزرگترین و اصلی ترین قله ها در زاویه  $2\theta$  برابر با  $38/12^\circ$ ،  $44/35^\circ$ ،  $64/56^\circ$  و  $77/49^\circ$  درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است؛ ساختار FCC نقره را تایید می کند [۳۴]

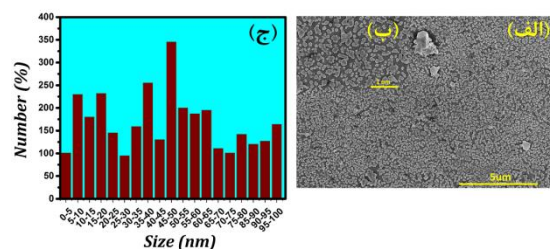


شکل-۳: الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای به عنوان بستر فعال نانوحسگرهای زیستی SERS.

#### ۴. تصاویر AFM، نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستری شیشه‌ای به عنوان بستری فعال در SERS

شکل ۴- (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه بعدی مربوط به بستری فعال در SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای را نشان می‌دهد. شکل ۴- (ج)، نمودار رافنس سطح بستری فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای را نشان می‌دهد، که با کشیدن خط سبز از قطر شکل ۴- (الف)، مشخصات مربوط به رافنس سطح با استفاده از نرم‌افزار Image Plus، (نسخه ۲/۹) محاسبه شد. میانگین زبری  $1/76$  نانومتر « $R_{am}$ :  $0.0761 \mu m$ »، میانگین مرتفع ترین زبری  $150$  نانومتر « $R_{tm}$ :  $0.1500 \mu m$ » و میانگین عمیق ترین زبری  $1/96$  نانومتر « $R_{vm}$ :  $0.0964 \mu m$ » به دست آمد. زبری سطحی که به وسیله بستری فعال در SERS، به عنوان حسگرهای

تیره تر، در پس زمینه تصاویر مشاهده می‌شوند که اندازه تقریبی  $50$  نانومتر دارند. پوشش حاوی نانوذرات نقره تقریباً به طور همگن و یکنواخت سطح شیشه را پوشانده‌اند. شکل ۲ (ب)، تصویر FE-SEM، مربوط به بستری فعال SERS، به عنوان حسگر پلاسمونیک در اسکیل بار یک میکرومتر را نشان می‌دهد. ذرات درشت تر به رنگ روشن تر و سفیدتر دیده می‌شوند. نانوذرات کوچکتر نقره، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره است و چنان چه گونه‌های شیمیایی اسید آمینه آلین 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 [۳۳]. بنابراین، با افزایش زمان لایه نشانی، به مدت  $10$  دقیقه به دلیل تشکیل ذرات بزرگتر اثر پراکنده‌گی از سطح ذرات درشت تر در مقایسه با اثر میدان نزدیک، بیشتر است. شکل ۲- (ج)، توزیع اندازه نانوذرات نقره را با استفاده از نرم‌افزار Digimizer (نسخه ۴/۲) اندازه‌گیری شده است، نشان می‌دهد که اندازه‌هایی بین  $5$  تا  $100$  نانومتر دارند و تعداد ذرات با اندازه  $45$  و  $50$  نانومتر بیشتر از سایر اندازه‌های نانوذرات است.



شکل ۲: (الف)، تصویر FE-SEM مربوط به بستری فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک در اسکیل بار  $5$  میکرومتر که به روش چرخشی (اسپین-کنت) به مقدار  $100$  میکرولیتر نانوذرات نقره در زمان  $10$  دقیقه ساخته شده‌اند. (ب)، تصویر FE-SEM مربوط به بستری فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک در اسکیل بار  $1$  میکرومتر را نشان می‌دهد. (ج)، نمودار توزیع اندازه نانوذرات نقره تصویر FE-SEM مربوط به بستری فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیک در اسکیل بار  $5$  میکرومتر که با استفاده از نرم‌افزار Digimizer (نسخه ۴/۲) اندازه‌گیری شده است.

#### ۳. طیف XRD، نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستری شیشه‌ای به عنوان بستری فعال در SERS

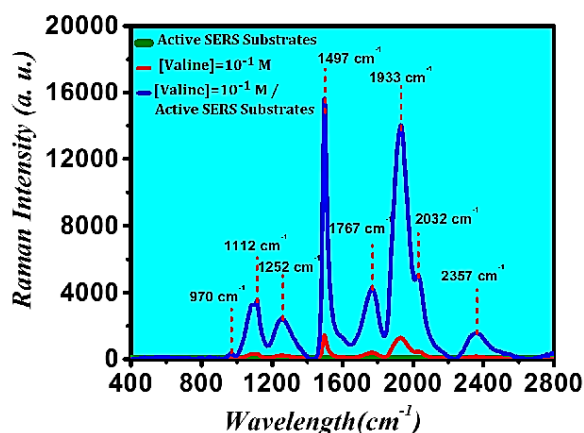
شکل ۳، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای به عنوان بستر فعال نانوحسگرهای زیستی

<sup>1</sup> Roughness average (Ra)

<sup>2</sup> Average maximum height of the roughness (Rtm)

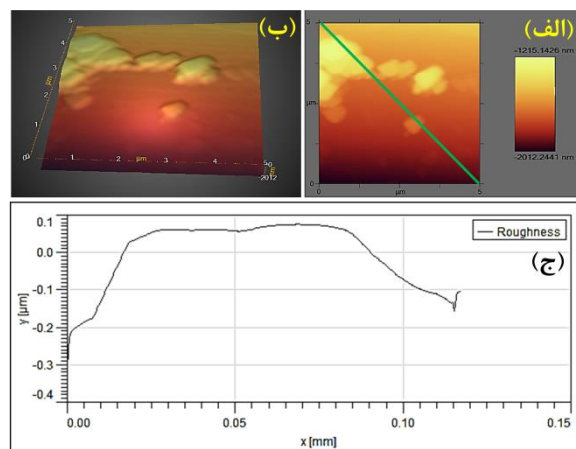
<sup>3</sup> Average maximum roughness valley depth (Rvm)

پوشش داده شده به عنوان بستر فعال SERS، ارتعاشات کششی C-C و ارتعاشات کششی  $\text{COO}^-$ ، ارتعاشات کششی C-C و ارتعاشات خمشی  $\text{NH}_2$  و  $\text{NH}_3$ ، ارتعاشات خمشی  $\text{CH}_2$ ، ارتعاشات خمشی C-H و  $\text{CH}_3$ ، ارتعاشات خمشی C-H و ارتعاشات خمشی  $\text{NH}_2$  و Amid II، ارتعاشات خمشی C-H و ارتعاشات خمشی C-H به ترتیب در  $1497$ ،  $1933$ ،  $1767$ ،  $2032$ ،  $1112$ ،  $1252$ ،  $970$ ،  $2357$  و  $2357$   $\text{cm}^{-1}$  ظاهر می‌شوند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بسترهای شیشه‌ای نانوذرات نقره پوشش داده شده به عنوان بستر فعال SERS، به دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر است. ذرات بزرگتر نقره که در شکل ۲- (الف)، مشاهده می‌شوند؛ با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به اسیدآمین‌ه والین، 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 ۲- (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 اسیدآمین‌ه والین، در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه می‌کنند و قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های مولکولی آنها تقویت می‌شود و سیگنال‌های پرشدت‌تری را نشان می‌دهند [۳۶، ۳۷]



شکل ۵: طیف رامان نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بسترهای شیشه‌ای (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمین‌ه والین، قرار داده‌شده با غلظت  $10^{-1}$  مولار بر روی بسترهای شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS، اسیدآمین‌ه والین، قرار داده‌شده با غلظت  $10^{-1}$  بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS (منحنی آبی).

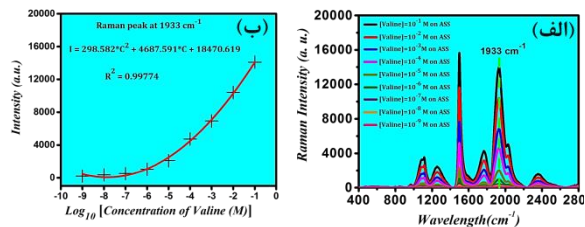
پلاسمونیک نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای، ایجاد شده است؛ می‌تواند مرکزی برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود [۳۱].



شکل ۴: (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دو بعدی و سه‌بعدی و (ج)، نمودار رافنس سطح نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای به عنوان بستر فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، را نشان می‌دهد.

## ۵. طیف رامان و آشکار سازی اسیدآمین‌ه والین با استفاده از نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS

شکل ۵، طیف رامان نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمین‌ه والین، قرار داده شده با غلظت  $10^{-1}$  مولار بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS، اسیدآمین‌ه والین، قرار داده شده با غلظت  $10^{-1}$  بر روی بسترهای شیشه‌ای نانوذرات نقره پوشش داده شده به عنوان بستر فعال SERS، (منحنی آبی) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان اسیدآمین‌ه والین که روی زیرلایه شیشه‌ای لایه نشانی شده‌اند (منحنی قرمز)، ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌ه والین، با شدت خیلی کمی مشاهده می‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این مواد شیمیایی حتی با غلظت  $10^{-1}$  مولار و با استفاده از طیف سنجی رامان امکان‌ش کمتر است. با قرار دادن اسیدآمین‌ه والین، با غلظت  $10^{-1}$  مولار بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال SERS، ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌ه والین ظاهر می‌شوند. ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌ه والین [۳۵] به صورت خط - چین‌هایی بر روی طیف‌های اسیدآمین‌ه والین در شکل ۵ نمایش داده شده است. در مورد اسیدآمین‌ه والین قرار داده شده روی بسترهای شیشه‌ای نانوذرات نقره



۶. طیف رامان و آشکار سازی اسید آمینه والین و منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت با استفاده از نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS

شکل ۶- (الف)، طیف SERS اسید آمینه والین، با غلظت‌های ۱۰-۱ (منحنی سیاه)، ۱۰-۲ (منحنی قرمز)، ۱۰-۳ (منحنی آبی)، ۱۰-۴ (منحنی صورتی)، ۱۰-۵ (منحنی قهوه‌ای)، ۱۰-۶ (منحنی سبز)، ۱۰-۷ (منحنی بنفش)، ۱۰-۸ (منحنی نارنجی) و ۱۰-۹ (منحنی صورتی پرنگ)، مولار نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS، را نشان می‌دهد. با کاهش غلظت اسید آمینه والین، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول‌های اسید آمینه والین، و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به گونه‌ای که در غلظت‌های کمتر از ۱۰-۹ مولار، ارتعاش‌های اسید آمینه والین، به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS، می‌تواند تا غلظت ۱۰-۹ اسید آمینه والین، را شناسایی کند.

شکل ۶: (الف)، طیف SERS، اسید آمینه والین، با غلظت‌های ۱۰-۱ (منحنی سیاه)، ۱۰-۲ (منحنی قرمز)، ۱۰-۳ (منحنی آبی)، ۱۰-۴ (منحنی صورتی)، ۱۰-۵ (منحنی قهوه‌ای)، ۱۰-۶ (منحنی سبز)، ۱۰-۷ (منحنی بنفش)، ۱۰-۸ (منحنی نارنجی) و ۱۰-۹ (منحنی صورتی پرنگ)، مولار، بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS و شکل (ب)، منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت، I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات خمشی NH<sub>2</sub> و Amid II، در عدد موج ۱۹۳۳ cm<sup>-1</sup> را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسید آمینه والین، C، بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS که برگرفته از شکل ۶- (الف) است.

۷. طیف رامان و بررسی تکرارپذیری نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS، با آشکار سازی اسید آمینه والین

به منظور تکرارپذیری در ساخت بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، تعداد ۶ آزمایش پیوسته برای غلظت ۱۰<sup>-۹</sup> مولار از اسید آمینه والین، در طول یک روز انجام شد. شکل ۷- (الف)، طیف SERS، شش نقطه مجزا از اسید آمینه والین، در غلظت ۱۰<sup>-۹</sup> مولار به مقدار ۱۰ میکرو لیتر لایه نشانی شده بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است تمام طیف‌های SERS، اسید آمینه والین، در غلظت ۱۰<sup>-۹</sup> مولار به خوبی با یکدیگر مطابقت دارند و هیچ تغییری در جابجایی موقعیت مکانی و مشخصه طیف‌ها مشاهده نمی‌شود. انحراف استاندارد نسبی (RSD)، به منظور بررسی تکرارپذیری ساخت بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، در غلظت ۱۰<sup>-۹</sup> مولار از اسید آمینه والین، برای قله‌های در عدد موج ۱۱۱۲ cm<sup>-1</sup>، ۱۴۹۷ cm<sup>-1</sup> و ۱۹۳۳ cm<sup>-1</sup>، با استفاده از رابطه (۲)، محاسبه شدند [۳۸].

شکل ۶- (ب)، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS، ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات خمشی NH<sub>2</sub> و Amid II، در عدد موج ۱۹۳۳ cm<sup>-1</sup> را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسید آمینه والین، C، نشان می‌دهد که با برازش انجام شده از رابطه (۱) پیروی می‌کند.

$$I = 298.582 C^2 + 4687.591 C + 18470.619 \quad (R^2 = 0.99774) \quad (1)$$

که ضریب رگرسیون (R<sup>2</sup>) آن برابر با 0/99774 است. از آن جا که هدف از ساخت حسگرهای پلاسمونیک بسترهای فعال در SERS، آشکار سازی غلظت بسیار پایین اسید آمینه والین، است، خطی بودن منحنی کالیبراسیون غلظت‌های پایین از اهمیت بیشتری برخوردار است که در این مطالعه قابل مشاهده است و می‌توان با استفاده از این نمودار با مشاهده شدت قله ارتعاشی مولکول در طیف رامان، غلظت آن را به دست آورد.

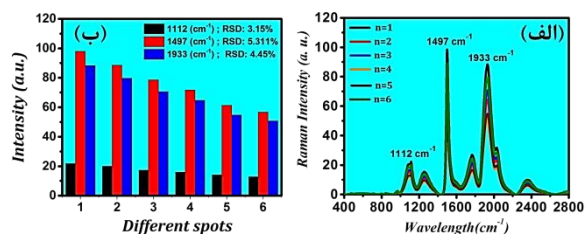
$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(I_i - \bar{I})^2}{n-1}}}{\bar{I}} \quad (2)$$

که  $n = 6$ ، تعداد طیف‌های رامان مورد آزمایش قرار گرفته شده،  $I_i$

### نتیجه‌گیری

به منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد که ناشی از اسیدآمین‌ها والین در بدن است، آشکارسازی این مولکول 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 قراردادن اسیدآمین‌ها والین در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند نقره و پراکندگی نور از ذرات بزرگ فلزی، می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. بنابراین، ابتدا با استفاده از روش کاهش شیمیایی، نانوذرات نقره با اندازه تقریبی ۲۰ نانومتر ساخته شد و در ادامه با به‌کارگیری روش چرخشی (اسپین - کت)، که روشی ساده، سریع، ارزان است؛ در دمای اتاق، نانوذرات نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای با اعمال دور ۲۸۰۰ rpm در زمان ۱۰ دقیقه لایه نشانی شدند و این بسترها به عنوان بسترهای فعال در SERS جهت آشکارسازی اسیدآمین‌ها والین استفاده شدند. با قرار دادن اسیدآمین‌ها والین بر روی بسترهای فعال در SERS در تمامی نمونه‌ها و غلظت‌های مختلف اسیدآمین‌ها والین سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد که ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذراتی است که در روش چرخشی (اسپین - کت)، از محلول بر روی سطح شیشه نشانه شده‌اند که با دریافت نور لیزر فرودی، نور آن را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با فرارگیری اسیدآمین‌ها والین در این مناطق، به دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر، اسیدآمین‌ها والین قطبیده‌تر می‌شود و در نتیجه ارتعاشات شدیدتری دارد. با مشاهده قله پلاسمونی بسترهای فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، نانوذرات نقره به صورت محلول کلوییدی فاز آبی یا لایه‌نشانی شده روی زیرلایه شیشه‌ای ساخته شده به ترتیب در ۴۰۹ نانومتر ۴۳۹ نانومتر، لایه‌نشانی شدن نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای تایید شد. با مشاهده تصویر میکروسکوپ گسیل میدانی (FESEM)، بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه نشانی شده روی بستر شیشه‌ای تایید شد و زبری بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای که حاصل از یکنواخت نبودن نانوذرات نقره است منجر به پراکندگی نور از نقاط مشاهده شده در تصویر FESEM می‌شود. زبری که برای بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای در

شدت سیگنال رامان در هر قله مشخص و I، میانگین شدت سیگنال رامان قله‌های مشخص شده را نشان می‌دهند. شکل ۷- (الف)، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت  $10^{-9}$  مولار اسیدآمین‌ها والین، برای قله‌هایی در عدد موج  $1112 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1497 \text{ cm}^{-1}$  و  $1933 \text{ cm}^{-1}$ ، که به ترتیب مقدار RSD،  $3/15$ ،  $5/311$  و  $4/45$  درصد محاسبه شده است و در شکل ۴- (ب)، تغییرات محاسبه RSD، برای عدد موج  $1112 \text{ cm}^{-1}$ ، مقدار  $3/15$  درصد (نمودار سیاه)، برای عدد موج  $1497 \text{ cm}^{-1}$ ، مقدار  $5/311$  درصد (نمودار قرمز) و برای عدد موج  $1933 \text{ cm}^{-1}$ ، مقدار  $4/45$  درصد (نمودار آبی)، به صورت نمودار ستونی مشخص شده است. انحراف استاندارد نسبی به دست آمده در این آزمایش به صورت میانگین برابر با  $4/30$  درصد به دست آمد که از لحاظ آماری نشانگر عملکرد رضایت‌بخش روش به‌کار گرفته شده برای تعیین غلظت اسیدآمین‌ها والین، است. روش‌های دیگری که برای تعیین مقدار اسیدآمین‌ها والین، در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل کروماتوگرافی گازی و مایع با آشکارسازهای جرمی است که اگرچه گاهی حدود تشخیص پایینی برای آنها حاصل شده است، آماده‌سازی زیادی برای نمونه در آنها مورد نیاز است و همچنین هزینه و زمان آماده‌سازی و تجزیه نمونه در آنها بالا است [۸-۱۰].



شکل ۷: (الف)، طیف SERS، شش نقطه مجزا از اسیدآمین‌ها والین، در غلظت  $10^{-9}$  مولار به مقدار ۱۰ میکرولیتر اضافه شده بر روی بسترهای شیشه‌ای، پوشش داده شده نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، بر روی نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت  $10^{-9}$  مولار اسیدآمین‌ها والین، برای قله‌هایی در عدد موج  $1112 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1497 \text{ cm}^{-1}$  و  $1933 \text{ cm}^{-1}$ ، که به ترتیب مقدار RSD،  $3/15$ ،  $5/311$  و  $4/45$  درصد محاسبه شده است و در شکل (ب)، تغییرات محاسبه RSD، برای عدد موج  $1112 \text{ cm}^{-1}$ ، مقدار  $3/15$  درصد (نمودار سیاه)، برای عدد موج  $1497 \text{ cm}^{-1}$ ، مقدار  $5/311$  درصد (نمودار قرمز) و برای عدد موج  $1933 \text{ cm}^{-1}$ ، مقدار  $4/45$  درصد (نمودار آبی)، به صورت نمودار ستونی مشخص شده است.

تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشاهده می‌شود به پراکندگی نور از نقاط زبر کمک می‌کند. بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای برای تشخیص اسیدآمینه والین ساخته شدند و حد تشخیص آنها  $10^{-9}$  مولار بررسی و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت  $10^{-9}$  مولار  $4/33$  درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان به دست آمده که بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای برای تشخیص اسیدآمینه والین با روش‌های توسعه یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجر به توسعه حسگرهای میکرونی می‌شوند. از مزایای بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای معرفی شده، سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش پذیری، تکرارپذیری استفاده آسان و توانایی تشخیص سریع غلظت‌های اندک است که برای ساخت آن نیز هزینه چندانی صرف نمی‌شود و با آنها می‌توان انواع پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی، مواد بیولوژیکی و مواد شیمیایی را شناسایی کرد.

## References:

- Chen, L., et al., *Efficacy and safety of oral branched-chain amino acid supplementation in patients undergoing interventions for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis*. Nutrition journal, 2015. 14(1): p. 1-11.
- Bifari, F. and E. Nisoli, *Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view*. British journal of pharmacology, 2017. 174(11): p. 1366-1377.
- Swain, L.M., T. Shiota, and M. Walser, *Utilization for protein synthesis of leucine and valine compared with their keto analogues*. The American journal of clinical nutrition, 1990. 51(3): p. 411-415.
- Reeds, P., *The Catabolism of valine in the malnourished rat. Studies in vivo and in vitro with different labelled forms of valine*. British Journal of Nutrition, 1974. 31(2): p. 259-270.
- Holeček, M., et al., *Leucine and protein metabolism in rats with chronic renal insufficiency*. Experimental and Toxicologic Pathology, 2001. 53(1): p. 71-76.
- Alvestrand, A., P. Fürst, and J. Bergström, *Plasma and muscle free amino acids in uremia: influence of nutrition with amino acids*. Clinical nephrology, 1982. 18(6): p. 297-305.
- Zhang, S., et al., *Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs*. Amino acids, 2013. 45(5): p. 1191-1205.
- Yu, X., et al.,  *$\beta$ -cyclodextrin non-covalently modified ionic liquid-based carbon paste electrode as a novel voltammetric sensor for specific detection of bisphenol A*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. 186: p. 648-656.
- Wang, Q., et al., *Voltammetric detection of bisphenol a by a chitosan-graphene composite modified carbon ionic liquid electrode*. Thin Solid Films, 2012. 520(13): p. 4459-4464.
- Fan, H., et al., *Electrochemical bisphenol A sensor based on N-doped graphene sheets*. Analytica chimica acta, 2012. 711: p. 24-28.
- Madzharova, F., Z. Heiner, and J. Kneipp, *Surface enhanced hyper-Raman scattering of the amino acids tryptophan, Histidine, Phenylalanine, and Tyrosine*. The Journal of Physical Chemistry C, 2017. 121(2): p. 1235-1242.
- Wang, C., et al., *Magnetic plasmonic particles for SERS-based bacteria sensing: A review*. AIP Advances, 2019. 9(1): p. 010701.
- Su, S.-R., et al., *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, 2019. 283: p. 384-389.
- Zhou, H., et al., *SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles*. Analytical chemistry, 2014. 86(3): p. 1525-1533.
- Shrivastava, S. and D. Dash, *Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver*. Nano-Micro Letters, 2010. 2(3): p. 164-168.
- Krasteva, N., et al., *Self-assembled gold nanoparticle/dendrimer composite films for vapor sensing applications*. Nano Letters, 2002. 2(5): p. 551-555.
- Wu, J., et al., *Surface plasmon enhanced intermediate band based quantum dots solar cell*. Solar energy materials and solar cells, 2012. 102: p. 44-49.
- McLellan, J.M., et al., *The SERS activity of a supported Ag nanocube strongly depends on its orientation relative to laser polarization*. Nano letters, 2007. 7(4): p. 1013-1017.
- Yu, X., L. Wang, and J. Di, *Electrochemical deposition of high density gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of biosensors*. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2011. 11(12): p. 11084-11088.
- Berkovitch, N., P. Ginzburg, and M. Orenstein, *Concave plasmonic particles: broad-band geometrical tunability in the near-infrared*. Nano letters, 2010. 10(4): p. 1405-1408.
- Lucas, B.D., et al., *Nanoimprint Lithography Based Approach for the Fabrication of Large-Area, Uniformly-Oriented Plasmonic Arrays*. Advanced Materials, 2008. 20(6): p. 1129-1134.

22. Zhang, X.-Y., et al., *Self-assembly of large-scale and ultrathin silver nanoplate films with tunable plasmon resonance properties*. ACS nano, 2011. 5(11): p. 9082-9092.
23. Liang, C., et al., *Synthesis of morphology-controlled silver nanostructures by electrodeposition*. Nano-Micro Letters, 2010. 2(1): p. 6-10.
24. Cyrankiewicz, M., T. Wybranowski, and S. Kruszewski. *Study of SERS efficiency of metallic colloidal systems*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2007. IOP Publishing.
25. Duan, N., et al., *Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor*. International journal of food microbiology, 2016. 218: p. 38-43.
26. Wang, L.-R. and Y. Fang, *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(3): p. 614-618.
27. Jing, C. and Y. Fang, *Simple method for electrochemical preparation of silver dendrites used as active and stable SERS substrate*. Journal of colloid and interface science, 2007. 314(1): p. 46-51.
28. Cañamares, M., et al., *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(1): p. 103-109.
29. Wan, Y., et al., *Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method*. Journal of colloid and interface science, 2013. 394: p. 263-268.
30. Ngumbi, P.K., S.W. Mugo, and J.M. Ngaruiya, *Determination of gold nanoparticles sizes via surface plasmon resonance*. IOSR J Appl Chem, 2018. 11: p. 25-29.
31. Baytekin, H.T., et al., *Mechanochemical activation and patterning of an adhesive surface toward nanoparticle deposition*. Journal of the American Chemical Society, 2015. 137(5): p. 1726-1729.
32. Bohren, C.F. and D.R. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*. 2008: John Wiley & Sons.
33. Ding, S.-Y., et al., *Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy*. Chemical Society Reviews, 2017. 46(13): p. 4042-4076.
34. Arjunan, N.K., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles for the control of mosquito vectors of malaria, filariasis, and dengue*. Vector-borne and zoonotic diseases, 2012. 12(3): p. 262-268.
35. Guicheteau, J., et al. *Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids and nucleotide bases for target bacterial vibrational mode identification*. in *Chemical and Biological Sensing VII*. 2006. International Society for Optics and Photonics.
36. Chen, H.-Y., et al., *Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale*. Journal of the American Chemical Society, 2015. 137(42): p. 13698-13705.
37. Granger, J.H., et al., *Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Chemical Society Reviews, 2016. 45(14): p. 3865-3882.
38. Parsons, H.M., et al., *Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics*. Analyst, 2009. 134(3): p. 478-485.