لیزر در پزشکی ۱۳۹۹/ دوره ۱۷/ شماره ۳ / صفحات ۳۹-۲۸.

مقاله پژوهشی

پوشش‌دهی لایهٔ نازک از نانوذرات طلا روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO به روش الکترونهشت به عنوان بستر فعال SERS جهت مطالعهٔ ارتعاشات مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین

وحید اسکندری[۱]
امین هادی[۲*]
نوشین حقیقی‌پور[۳*]

چکیده

مقدمه: اسیدآمینهٔ تیروزین (Tyrosine Amino Acid) یکی از بیست و دو اسیدآمینهٔ اصلی یاخته‌های زنده است. این اسیدآمینه حاصل اثر آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز بر روی اسیدآمینهٔ فنیل‌لانین است. بدن، اسیدآمینهٔ تیروزین را با تغییر یک اسیدآمینهٔ دیگر به نام فنیل‌آلانین تولید می‌کند. روش پراکندگی رامان بهبودیافتهٔ سطحی (SERS) روشی دقیق برای شناسایی مواد زیستی با غلظت‌های بسیار کم می‌باشد. در این مقاله، برای شناسایی اسیدآمینهٔ تیروزین جهت کنترل بیماری‌های ناشی از آن از بسترهای پوشش داده‌شده با نانوذرات طلا استفاده شده است.

روش بررسی: با استفاده از نمک طلا و عامل کاهندهٔ تری سدیم سیترات دوآبه، نانوذرات طلا به روش سادهٔ شیمیایی ساخته شدند و به روش الکترونهشت و با اعمال ولتاژ، بسترهای شیشه‌ای رسانا (FTO) با نانوذرات طلا پوشش داده شدند. در نهایت، با استفاده از این بسترهای SERS و طیف‌سنجی رامان، بهبود سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین بررسی شدند.

یافته‌ها: نانوذرات طلای ساخته‌شده نانوذراتی کروی و شبه‌کروی هستند که با مشاهدهٔ قلهٔ تشدید پلاسمونی در ۵۳۰ نانومتر و ساختار FCC تشکیل نانوذرات طلا 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 طلا به صورت لایه نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای FTO برای تشخیص اسیدآمینهٔ تیروزین ساخته شدند و حد تشخیص آن ۷-۱۰ مولار و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت ۷-۱۰ مولار ۳/۱۷ درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان به دست آمده نشان می‌دهد که بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا برای تشخیص اسیدآمینهٔ تیروزین با روش‌های توسعه‌یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجر به توسعهٔ حسگرهای میکرونی می‌شوند.

نتیجه‌گیری: در طیف‌سنجی رامان، بسترهای فعال SERS که با نانوذرات طلا پوشش داده شده‌اند، مورد توجه هستند که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات طلا و پراکندگی نور از ذرات طلا بزرگ‌تر است چون سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین را تقویت می‌کنند. با کاهش غلظت اسیدآمینهٔ تیروزین لایه نشانی 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 لایه نشانی به روش الکترونهشت ایجاد می‌شوند و در نتیجه با افزایش میزان پراکندگی نور از خود، منجر به بهبود سیگنال می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات طلا، روش الکترونهشت، اسیدآمینهٔ تیروزین، طیف‌سنجی رامان بهبودیافتهٔ سطحی (SERS)، بسترهای فعال SERS

۱- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
۳- دانشیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

نویسندگان مسئول:
امین هادی و نوشین حقیقی‌پور
پست الکترونیک:
amin.hadi@yums.ac.ir
haghighipour@pasteur.ac.ir
شماره تلفن همراه: ۰۹۱۲۸۹۲۰۳۴۱

۱. مقدمه

تیروزین یکی از بیست و دو اسید آمینهٔ اصلی یاخته‌های زنده است. این اسیدآمینه حاصل اثر آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز بر روی اسیدآمینهٔ فنیل‌آلانین است[۱و۲]. بدن تیروزین را با تغییر یک اسیدآمینهٔ دیگر به نام فنیل‌آلانین تولید می‌کند. تیروزین در مکمل‌های پروتئینی برای درمان یک اختلال ارثی به نام فنیل‌کتونوریا (PKU)استفاده می‌شود[۳]. افرادی که با این اختلال رو به رو هستند، نمی‌توانند فنیل‌آلانین را به درستی متابولیزه کنند و در نتیجه توانایی ساخت تیروزین را ندارند[٤]. برای تأمین نیازهای بدن به آن‌ها مکمل تیروزین داده می‌شود. از مکمل تیروزین در مواردی همچون افسردگی، اختلال کمبود تمرکز (ADD)، اختلال کمبود تمرکز بیش‌فعالی، عدم‌توانایی در بیدارماندن (نارکولپسی) و بهبود هوشیاری پس از خواب کم و نامناسب استفاده می‌کنند[٥]. همچنین از آن در موارد دیگری مثل استرس، بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر، سندرم خستگی مزمن (CFS) و اسکیزوفرنی استفاده می‌شود[٦]. در سال‌های اخیر، آزمایشات بالینی نشان داده است که میزان تیروزین در ادرار بیماران مبتلا به سرطان رودهٔ بزرگ از جمله بیماران سرطانی آدنوم به طور قابل توجهی بالاتر از افراد عادی است[۱و۷]. در نتیجه تشخیص با دقت بالا تیروزین در مایعات زیستی موجودات زنده مهم می‌باشد. تکنیک‌های مختلفی مانند HPLC[1] [۹]، TMS[2] (MS/MS) [۱۰]، GC-MS[3] [۱۱]، آمپرمتری[4] [۱۲]. کروماتوگرافی[5] [۱۳]، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی (MRS[6]) [١٤] و SERS برای شناسایی اسیدآمینهٔ تیروزین به کار گرفته می‌شوند[۸]. روش SERS در مقایسه با بقیهٔ روش‌های نام برده از حساسیت بالاتری برخوردار است[۸]. طیف‌سنجی رامان روش مناسبی برای شناسایی ترکیبات مواد گوناگون از جمله گونه‌های زیستی است اما، سیگنال رامان گونه‌های زیستی به خصوص در غلظت‌های پایین، بسیار اندک است[۱۵و۱٦]. 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 نیز استفاده شود[۱۷]. 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 تابش‌شده می‌شود که در حسگرهای زیستی[۱۸و۱۹]، سلول‌های خورشیدی[۲۰] و SERS [۲۱] کاربرد دارند. با توجه به خواص نوری فوق‌العادهٔ این نانوذرات، روش‌های گوناگونی برای ساخت لایه‌ها متشکل از نانوذرات فلزی ارائه شده است[۲۲] که می‌توان به لیتوگرافی با استفاده از پرتوی الکترونی [۲۳و۲٤] اشاره کرد که این روش نیاز به تجهیزات پیچیده و گران‌قیمت دارد و برای ساخت نمونه‌هایی با اندازهٔ کوچک کاربرد دارد. در مقابل، روش رسوب الکتروشیمیایی روشی ساده است که برای ساخت نمونه‌هایی با اندازه‌هایی با مقیاس بزرگ کاربرد فراوانی دارد[۲۵و۲٦]. پراکندگی رامان نتیجهٔ 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 را دشوار می‌کند و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. طیف‌سنج‌های مبتنی بر الکترون و یون نیز نیاز به خلأ بالا دارند، بنابراین طیف‌سنجی رامان نه تنها امکان مطالعهٔ مولکول در شرایط عادی را فراهم می‌کند که با آن می‌توان فرآیندهای کاتالیستی و فرآیندهایی که در فصل مشترک فلز-الکترولیت رخ می‌دهد را نیز

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. Tandem Mass Spectrometry (TMS)
3. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GS-MS)
4. Amperometry
5. Chromatography
6. magnetic resonance spectroscopy

بررسی کرد[۲۷] اما، سیگنال مربوط به پراکندگی رامان به طور ذاتی ضعیف است که آشکارسازی را دشوار می‌کند[۲۸]. 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 نتیجهٔ آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند[۲۹]. این پدیده برای اولین بار در سال ۱۹۷٤، برای مولکول پیرادین جذب‌شده بر روی سطح الکترودهای نقره رشد داده‌شده به روش الکتروشیمیایی مشاهده شد. سیگنال بهبودیافتهٔ رامان، فقط بعد از قرارگرفتن الکترود نقره در چرخهٔ اکسایش- کاهش یا فعال‌سازی مشاهده می‌شد و برای یک سطح صاف و صیقلی هیچ سیگنال بهبودیافته‌ای را نشان نمی‌داد. در ابتدا بهبود سیگنال را براساس افزایش تعداد مولکول‌های مورد مطالعه به دلیل افزایش مساحت سطحی که زبر 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 برهمکنش مولکول با سطح فلز زبر نسبت دادند[۳۰]. فلزاتی مانند طلا، نقره، مس و پلاتین جهت مشاهدهٔ این پدیده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های فلز مانند نوع، شکل، اندازه و چگونگی کنار هم قرارگرفتن آن‌ها بر پراکندگی رامان مولکول مورد بررسی اثر می‌گذارد. از میان فلزات گوناگون، نقره و طلا به علت داشتن تشدید پلاسمونی در ناحیهٔ مرئی و زیرقرمز، پایداری بیشتر و روش‌های ساخت آسان، بیشتر مورد توجه بوده‌اند تا گونه‌های زیستی و مواد بیولوژیکی شناسایی شوند[۳۱]. در این مطالعه، با استفاده از روش الکترونهشت، نانوذرات طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO با قدرت چسبندگی مکانیکی بالا، سریع، کم‌هزینه و در دمای اتاق پوشش داده شدند تا از آن‌ها به عنوان بسترهای فعال SERS برای شناسایی ارتعاشات مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین در غلظت‌های پایین استفاده شود.

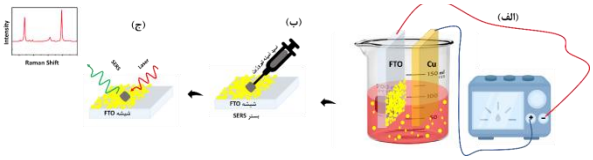
۲. روش بررسی

۱- روش‌های ساخت و شناسایی

۱-۱- روش ساخت بسترهای فعال SERS

شیشه‌های رسانا که شیشهٔ پوشش داده شده با اکسید قلع آلاییده‌شده با فلوئور (FTO)[1] است، با ابعاد ۲/۵cm×۱cm به عنوان بستر برش داده شدند. پس از شستشو با آب و صابون، استون و اتانول، نمونه‌ها در دمای ٤۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت۳۰ دقیقه در کوره حرارت‌دهی شدند تا آلودگی‌های مواد آلی از سطح شیشه‌ها حذف شوند و در واقع، برای پوشش شیشه‌ها از نانوذرات طلا، سطوحی آب‌دوست داشته باشیم. در ادامه به منظور ساخت نانوذرات طلا به ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۱mM نمک طلای HAuCl4 در حال جوش و هم خوردن، ۲ میلی‌لیتر محلول ۳۸/۸ mM از محلول تری‌سدیم سیترات دوآبه(NaC6H5O7. H2O) اضافه شد که کلوئید ارغوانی رنگ نهایی حاوی نانوذرات طلا است[٤٤]. سپس با استفاده از روش الکترونهشت، نانوذرات طلا داخل محلول کلوئیدی طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO نشانده می‌شوند. برای این منظور، بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO به کاتد یا قطب منفی منبع تغذیه و ورقهٔ مسی به عنوان آند به قطب مثبت منبع تغذیه وصل می‌شوند و داخل محلول کلوئیدی طلا قرار می‌گیرند. نشست الکترودی نانوذرات طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO با اعمال ولتاژ DC برابر با ۱/۵ ولت در زمان ۵ دقیقه انجام شد تا بسترهای فعال SERS داشته باشیم. فاصلهٔ کاتد و آند ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بسترهای فعال SERS شسته و سپس در دمای آزمایشگاه خشک شدند. برای آشکارسازی اسیدآمینهٔ تیروزین غلظت‌های ۲-۱۰، ۳-۱۰، ٤-۱۰، ۵- ۱۰، ٦-۱۰ و ۷-۱۰ و مولار از آن تهیه شد. به صورت جداگانه و به روش قطره‌افشان ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظت های تهیه‌شده بر روی بسترهای فعال SERS قرار گرفت و پس از خشک شدن در حضور هوا، طیف رامان اسیدآمینهٔ تیروزین نشانده‌شده روی شیشه و طیف رامان بهبودیافتهٔ سطحی اسیدآمینهٔ تیروزین نشانده‌شده روی بسترهای فعال SERS اندازه‌گیری، تحلیل و بررسی شدند.

1. Fluorine-doped tin oxide (FTO)



شکل۷: طرحواره (الف) ساخت بسترهای فعال SERS با نشاندن نانوذرات طلا داخل محلول کلوئیدی طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO با اعمال ولتاژ ۱/۵ ولت به روش الکترونهشت. (ب) قطره‌افشان کردن اسیدآمینهٔ تیروزین روی بسترهای فعال SERS به هدف آشکارسازی آن. (ج) سیگنال رامان و SERS اسیدآمینهٔ تیروزین نشانده‌شده بر روی شیشه و بسترهای فعال SERS که با تابش نور لیزر به آن‌ها اندازه‌گیری و ثبت می‌شود.

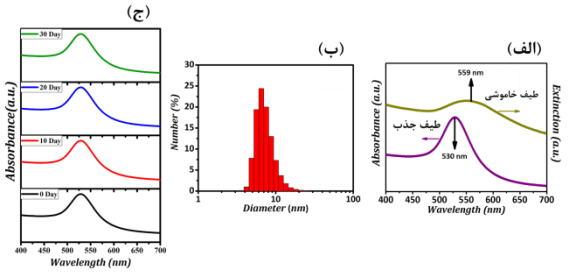
۱-۲- مشخصه‌یابی

دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتوی X محلول کلوئیدی نانوذرات طلا و بسترهای فعال SERS به ترتیب به وسیلهٔ دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 و دستگاه X Pert-Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند با پرتوی تک‌فام Cu Kα با طول موج ۰/۱۵٤ نانومتر، جریان ٤۰ میلی‌آمپر و با ولتاژ ٤۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به وسیلهٔ دستگاه Hitach مدل S4160، دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS)، مدل Zetasizer Nano-ZS ساخت کشور مالورن-انگلستان 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 طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم ۷۵ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

۱- طیف جذب نانوذرات طلا، طیف خاموشی نانوذرات طلای پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO، بسترهای فعال SERS، توزیع اندازهٔ نانوذرات طلا اندازه‌گیری‌شده به وسیلهٔ آنالیز DLS و طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی به منظور بررسی پایداری نانوذرات طلا ساخته شده است.

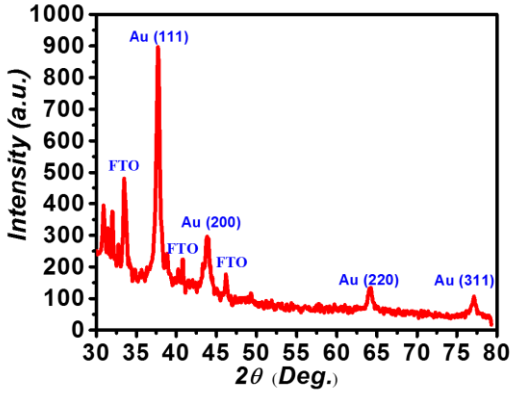
شکل۲- (الف)، طیف جذب نانوذرات طلا ساخته‌شده به روش شیمیایی با عامل کاهندهٔ تری سدیم سیترات را نشان می‌دهد. ظاهرشدن قلهٔ تشدید پلاسمونی در۵۳۰ نانومتر تشکیل نانوذرات طلا را تأیید می‌کند[۳۲]، مشاهدهٔ یک قلهٔ جذبی در طیف‌های جذبی نانوذرات طلا بیانگر شکل کروی یا شبه‌کروی بودن نانوذرات است[۳۳]. شکل۲- (الف)، طیف خاموشی نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای فعال SERS را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با نشاندن (الف)، نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO و ظاهر شدن قلهٔ تشدید پلاسمونی در ۵۵۹ نانومتر، تشکیل نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO را تأیید می‌کند. با تغییر محیط دربردارندهٔ این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند، جابه‌جایی در طول موج قلهٔ پلاسمونی رخ می‌دهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای قله‌ها نیز افزایش می‌یابد به این دلیل که موقعیت قلهٔ پلاسمونی به ضریب شکست محیط دربردارندهٔ آن‌ها وابسته است[۳٤]، با توجه به شکل ۲- (الف) برخلاف محلول کلوئیدی پایدار که نانوذرات طلا در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند، با قرار گرفتن نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای FTO 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[۳٤]، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است[۳٤]، اینکه زمینهٔ طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) بسترهای 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- ب، توزیع اندازهٔ نانوذرات طلا را نشان می‌دهد که اندازه‌هایی بین ۵ تا ٤۰ نانومتر دارند و تعداد ذرات با اندازهٔ ۷ و ۸ نانومتر بیشتر از سایر اندازه‌های نانوذرات است. شکل ۲- ج، طیف‌سنجی فرابنفش - مریی به منظور پایداری نانوذرات طلا در حضور عامل کاهنده‌تری سدیم سیترات مورد بررسی قرار داده شده است که پس از گذشت ۳۰ روز نانوذرات طلا که با عامل کاهندهٔ تری سدیم سیترات تهیه شده است، پایداری مناسبی داشتند.



شکل۲: (الف)، طیف جذب نانوذرات طلا ساخته‌شده به روش شیمیایی با بیشینهٔ جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر و طیف خاموشی بسترهای فعال SERS نانوذرات طلا با بیشینهٔ خاموشی در طول موج ۵۵۹. (ب)، نمودار توزیع اندازهٔ نانوذرات طلا که با استفاده از DLS اندازه‌گیری شده است. (ج)، طیف‌سنجی فرابنفش - مریی نانوذرات طلا ساخته‌شده به روش شیمیایی با عامل کاهندهٔ تری‌سدیم سیترات به منظور بررسی پایداری نانوذرات طلا (به مدت ۳۰ روز).

۱. طیف XRD نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

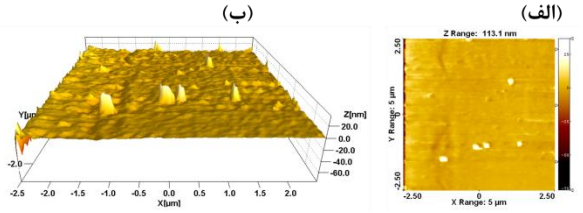
شکل۳، الگوی پراش اشعه ایکس بسترهای فعال SERS را نشان می‌دهد. با مشاهدهٔ بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویهٔ 2θ برابر با ۳۸/۳۸، ٤٤/۸۷، ٦٤/۸۵ و ۷٤/۸٦ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰) ، (۲۲۰) و (۳۱۱) است، تشکیل ساختار FCC طلا تأیید می‌شود. قله‌های اضافهٔ ظاهرشده مربوط به شیشه‌ای رسانای FTO است[۳۵].



شکل۳: الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

۲. تصاویر AFM، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

شکل٤- (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO را نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Image Plus (نسخهٔ۲/۹) میانگین زبری ۳۵/۲ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۱۸۹/۹ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۸۹/۳ به دست آمد. زبری سطحی که به وسیلهٔ بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر وی بستر شیشه‌ای رسانای FTO ایجاد شده است، می‌تواند مراکزی برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود[۳٦].

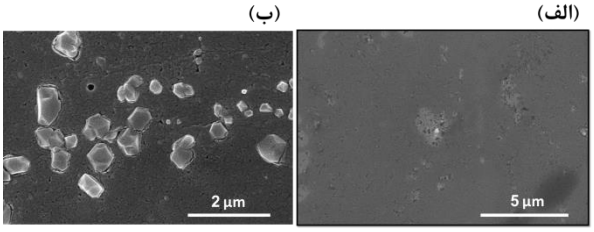


شکل٤: تصاویر AFM، (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

۳. تصاویر FE-SEM نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

در شکل۵- الف تصویر FESEM بسترهای فعال FTO مشاهده می‌شود که پوششی یکنواخت روی آن مشاهده می‌شود. شکل۵- ب، تصاویر FE-SEM بسترهای فعال SERS را در زمان ۵ دقیقه لایه نشانی نشان می‌دهد. در نمونهٔ شکل۵- ب، سطح بستر شیشه رسانای FTO با نانوذرات و ذرات بزرگ‌تر پوشیده شده است. ذرات ریزتر به رنگ تیره‌تر در پس‌زمینهٔ تصاویر مشاهده می‌شوند که اندازهٔ تقریبی ۵۰ نانومتر دارند که نشان می‌دهد با اعمال ولتاژ و تحت شرایط لایه نشانی، نانوذرات طلا داخل محلول کلوئیدی بعد از نشست روی بستر شیشهٔ رسانای FTO به صورت ذرات بزرگ‌تری روی سطح قرار می‌گیرند. پوشش حاوی نانوذرات طلا تقریباً به طور همگن و یکنواخت سطح FTO را پوشانده‌اند. شکاف و ترک‌هایی در این پوشش تقریباً همگن مشاهده می‌شود که به دلیل زمان لایه نشانی می‌باشد. ذرات درشت‌تر به رنگ روشن‌تر و سفیدتر دیده می‌شوند. در ضمن، در محلول کلوئیدی طلا یون‌های طلا که در طی فرآیند ساخت کلوئید هنوز کاهیده نشده‌اند، نیز می‌توانند با اعمال ولتاژ،

الکترون دریافت کنند و بر روی زیرلایه به طلا تبدیل شوند. این یون‌های طلا نیز می‌توانند باعث رشد ذرات از قبل تشکیل شده شوند و منجر به شکل‌گیری ذرات درشت‌تر شوند و یا خود منشأ جوانه‌زنی و تشکیل نانوذرات جدید باشند. نانوذرات کوچک‌تر طلا، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی طلا است و چنانچه گونه‌های زیستی در این موقعیت‌ها قرار بگیرند، در معرض تابش میدان‌های الکتریکی نزدیک قرار می‌گیرند. ذرات بزرگ‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیکِ ناچیزی دارند و نور تابیده‌شده به آن‌ها از سطح آن‌ها پراکنده می‌شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می‌کنند[۳۷]. بنابراین با افزایش زمان لایه‌شانی به دلیل تشکیل ذرات بزرگ‌تر اثر پراکندگی از سطح ذرات درشت‌تر در مقایسه با اثر میدان نزدیک، بیشتر است.



شکل۵: (الف) - تصویر FESEM بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO و (ب) - تصویر FE-SEM بسترهای فعال SERS که به روش الکترونهشت با اعمال ولتاژ ۱/۵ ولت و فاصلهٔ کاتد و آند برابر با ۱ سانتی‌متر در زمان ۵ دقیقه ساخته شده‌اند.

٤. طیف رامان و آشکارسازی اسیدآمینهٔ تیروزین با استفاده از نانوذرات طلا پوشش داده‌شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO به عنوان حسگرهای زیستی SERS

شکل٦- الف، طیف رامان بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمینهٔ تیروزین، قرار داده شده با غلظت ۲-۱۰ مولار بر روی زیرلایهٔ شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS اسیدآمینهٔ تیروزین، قرار داده شده با غلظت ۲-۱۰ بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی آبی) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان اسیدآمینهٔ تیروزین که روی زیرلایهٔ شیشه‌ای لایه‌شانی شده‌اند (منحنی قرمز)، نشانی از ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این گونه حتی با غلظت ۲-۱۰ مولار و با استفاده از طیف‌سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن اسیدآمینهٔ تیروزین با غلظت ۲-۱۰ مولار بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین (شکل٦) ظاهر می‌شوند. ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینهٔ تیروزین[۸] به صورت خط‌چین‌هایی بر روی طیف‌های اسیدآمینهٔ تیروزین در شکل٦- الف نمایش داده شده است. در مورد مولکول اسیدآمینهٔ تیروزین قرار داده شده بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای رسانای FTO، ارتعاشات کششی COO- و خمشی C-C و خمشی C-N، ارتعاشات خمشی C-C، ارتعاشات خمشی C-C و خمشی C-H، ارتعاشات خمشی C-N و ارتعاشات خمشی NH2، ارتعاشات کششی C-C، ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH2، ارتعاشات کششی COO-، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات خمشی NH2، ارتعاشات کششیCOO، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات خمشی C-H و ارتعاشات خمشی C-H به ترتیب در ٦٤٧، ٨٤٣، ٩٨٢، ١٠٥٧، ١٢١٢، ١٣٣١، ١٣٩٥، ١٤٩٣، ١٥٥١، ١٧٤٧، ٢٣٣١، ٢٤٥٠، ٢٥٦٨، ٢٩٩١ cm-1 ظاهر می‌شوند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO به دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر است. ذرات بزرگ‌تر طلا که در شکل۵-ب، مشاهده می‌شوند، با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به اسیدآمینهٔ تیروزین، سیگنال رامان آن‌ها را بهبود می‌دهند. در کنار پراکندگی نور از ذرات بزرگ‌تر طلا یکی دیگر از دلایل بهبود سیگنال رامان، تشدید پلاسمون‌های سطحی ذرات کوچک‌تر طلا یا همان میدان‌های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات طلا مشاهده شده در شکل۵- ب، 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 اسیدآمینهٔ تیروزین 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[۳۸و۳۹].

شکل٦- ب، طیف SERS اسیدآمینهٔ تیروزین با غلظت‌های ۲-۱۰ (منحنی سیاه)، ۳-۱۰(منحنی قرمز)، ٤-۱۰ (منحنی آبی)،

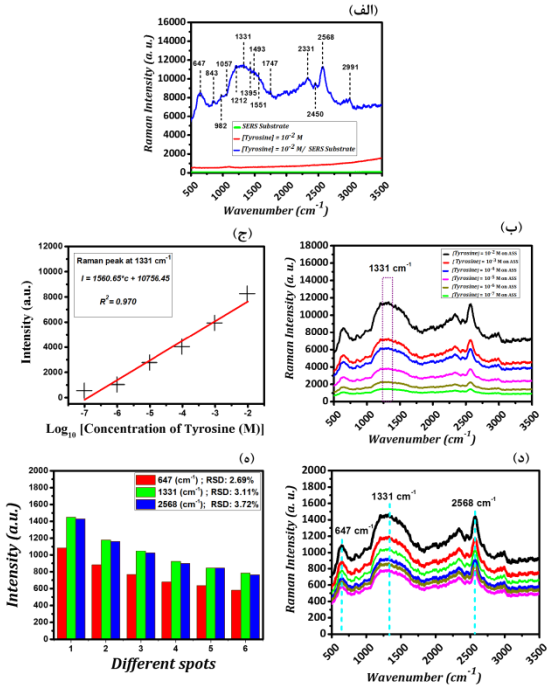
۵-۱۰ (منحنی صورتی)،۶-۱۰ (منحنی قهوه‌ای) و ۷-۱۰ (منحنی سبز)، مولار بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO را نشان می‌دهد. با کاهش غلظت اسیدآمینهٔ تیروزین، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول‌های اسیدآمینهٔ تیروزین و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به گونه‌ای که در غلظت‌های کمتر از ۷-۱۰ مولار، ارتعاش‌های اسیدآمینهٔ تیروزین به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای می‌تواند تا غلظت ۷-۱۰ مولار اسیدآمینهٔ تیروزین را شناسایی کند. شکل۶- ج، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH2 در عدد موج 1331 cm-1 را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینهٔ تیروزین C، نشان می‌دهد که با برازش انجام‌شده از رابطهٔ (۱) پیروی می‌کند.

$$I = ۱۵۶۰/65\ C + ۱۰۷۵۶/۴۵ \quad (R2=0/۹۷۰) \qquad (۱)$$

که ضریب رگراسیون (R2) آن برابر با ۰/۹۷۰ است. می‌توان با استفاده از این نمودار با مشاهدهٔ شدت قلهٔ ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH2 در عدد موج 1331 cm-1 برای مقدار نامشخص از اسیدآمینهٔ تیروزین، غلظت آن را به دست آورد. در ادامه، به منظور تکرارپذیری در ساخت بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO تعداد شش آزمایش پیوسته برای غلظت ۷-۱۰ مولار از اسیدآمینهٔ تیروزین در طول یک روز انجام شد. شکل۶- د، طیف SERS شش نقطهٔ مجزا از اسیدآمینهٔ تیروزین در غلظت ۷-۱۰ مولار به مقدار ۵ میکرولیتر لایه‌نشانی شده بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO را نشان می‌دهد. همان طور که مشخص است، تمام طیف‌های SERS، اسیدآمینهٔ تیروزین در غلظت ۷-۱۰ مولار به خوبی با یکدیگر مطابقت دارند و هیچ تغییری در جابه‌جایی موقعیت مکانی و مشخصهٔ طیف‌ها مشاهده نمی‌شود. انحراف استاندارد نسبی (RSD) به منظور بررسی تکرارپذیری ساخت بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO در غلظت ۷-۱۰ مولار از اسیدآمینهٔ تیروزین برای قله‌های در عدد موج 647 cm-1 ، 1331 cm-1و 2568 cm-1 با استفاده از رابطهٔ (۲) محاسبه شدند[۴۰].

$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(I_i - I)^2}{n-1}}}{I} \qquad (۲)$$

که n = 6، تعداد طیف‌های رامان مورد آزمایش قرارگرفته شده، Ii، شدت سیگنال رامان در هر قلهٔ مشخص و I، میانگین شدت سیگنال رامان قله‌های مشخص‌شده را نشان می‌دهند. شکل۶- د، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت ۷-۱۰ مولار اسیدآمینهٔ تیروزین برای قله‌هایی در عدد موج 647 cm-1، 1331 cm-1و 2568 cm-1 که به ترتیب مقدار RSD، ۲/۶۹، ۳/۱۱ و ۳/۷۲ درصد محاسبه شده است و در شکل۶- ه، تغییرات محاسبهٔ RSD برای عدد موج 647 cm-1، مقدار ۲/۶۹ درصد (نمودار قرمز)، برای عدد موج 1331 cm-1، مقدار ۳/۱۱ درصد (نمودار سبز) و برای عدد موج 2568 cm-1، مقدار ۳/۷۲ درصد (نمودار آبی) به صورت نمودار ستونی مشخص شده است. انحراف استاندارد نسبی به دست آمده در این آزمایش به صورت میانگین برابر با ۳/۱۷ درصد به دست آمد که از لحاظ آماری نشانگر عملکرد رضایت‌بخش روش به کار گرفته شده برای تعیین غلظت اسیدآمینهٔ تیروزین است. روش‌های دیگری که برای تعیین مقدار اسیدآمینهٔ تیروزین 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 تجزیهٔ نمونه در آن‌ها بالا است[۴۱و۴۲].



شکل٦: (الف)، طیف رامان بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمینهٔ تیروزین قرار داده شده با غلظت ۲-۱۰ مولار بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی قرمز)، طیف SERS اسیدآمینهٔ تیروزین قرار داده شده با غلظت ۲-۱۰ بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی آبی). (ب)، طیف SERS اسیدآمینهٔ تیروزین با غلظت‌های ۲-۱۰ (منحنی سیاه)، ۳-۱۰(منحنی قرمز)،٤-۱۰ (منحنی آبی)، ٥-۱۰ (منحنی صورتی)،٦-۱۰ (منحنی قهوه‌ای)،۷-۱۰ (منحنی سبز)، مولار بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای رسانا FTO شکل (ج)، منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH2 در عدد موج ۱۳۳۱ cm-1 را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینهٔ تیروزین، C بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO که برگرفته از شکل (ب) است. شکل (د)، طیف SERS شش نقطهٔ مجزا از اسیدآمینهٔ تیروزین در غلظت ۷-۱۰ مولار به مقدار ٥ میکرولیتر اضافه‌شده بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت ۷-۱۰ مولار تیروزین برای قله‌هایی در عدد موج ۱-cm ٦٤۷، ۱-cm ۱۳۳۱و ۱-cm ۲٥٦۸ که به ترتیب مقدار RSD ۲/٦۹، ۳/۱۱ و ۳/۷۲ درصد محاسبه شده است و در شکل(ه)، تغییرات محاسبهٔ RSD برای عدد موج ۱-cm ٦٤۷، مقدار ۲/٦۹ درصد (نمودار قرمز)، برای عدد موج ۱-cm ۱۳۳۱، مقدار ۳/۱۱ درصد (نمودار سبز) و برای عدد موج -cm ۲٥٦۸۱،مقدار ۳/۷۲ درصد (نمودار آبی) به صورت نمودار ستونی مشخص شده است.

نتیجه‌گیری

به منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد عصبی که ناشی از کمبود مولکول اسیدآمینهٔ تیروزین 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 قرار دادن مولکول اسیدآمینهٔ تیروزین در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند طلا و پراکندگی نور از ذرات بزرگ فلزی می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. بنابراین ابتدا با استفاده از روش کاهش شیمیایی، نانوذرات طلا با اندازهٔ تقریبی ۲۰ نانومتر ساخته شد و در ادامه با به کارگیری روش الکترونهشت که روشی ساده، سریع و ارزان است، در دمای اتاق، نانوذرات طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای FTO با اعمال ولتاژ ۱/٥ ولت در زمان ٥ دقیقه لایه‌نشانی شدند و این بسترها به عنوان بستر فعال SERS جهت آشکارسازی مولکول اسیدآمینهٔ تیروزین استفاده شدند. با قرار دادن تیروزین بر روی بسترهای فعال SERS، در تمامی نمونه‌ها و غلظت‌های مختلف اسیدآمینهٔ تیروزین، سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد که ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذراتی است که در روش الکترونهشت از محلول بر روی سطح FTO نشانده شده‌اند که با دریافت نور لیزر فرودی، نور آن را در منطقهٔ کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری مولکول اسیدآمینهٔ تیروزین در این مناطق به دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر، مولکول اسیدآمینهٔ تیروزین قطبیده‌تر می‌شود و در نتیجه ارتعاشات شدیدتری دارد. در ضمن، با افزایش زمان لایه‌نشانی به دلیل افزایش اندازهٔ ذرات بزرگ‌تر و افزایش زبری سطح، پراکندگی نور از این ذرات افزایش می‌یابد که نتیجهٔ آن بهبود بیشتر سیگنال رامان اسیدآمینهٔ تیروزین است. با مشاهدهٔ قلهٔ پلاسمونی بسترهای فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، نانوذرات طلا به صورت محلول کلوئیدی فاز آبی یا لایه‌نشانی شده روی زیرلایهٔ شیشه‌ای رسانا FTO ساخته‌شده به ترتیب در۵۳۰ نانومتر ۵۵۹ نانومتر، مشاهدهٔ ساختار FCC در مشخصه‌یابی XRD، ساخت بسترهای فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، لایه‌شانی شده روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO تأیید شد. با مشاهدهٔ تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM)، بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه‌نشانی شده

روی بستر شیشه‌ای رسانا FTO تأیید شد و زبری بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای رسانا FTO که حاصل از یکنواخت نبودن نانوذرات طلا است، منجر به پراکندگی نور از نقاط مشاهده‌شده در تصویر میکروسکوپ الکترونی می‌شود. زبری که برای بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای در تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشاهده می‌شود به پراکندگی نور از نقاط زبر کمک می‌کند. بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای رسانا FTO برای تشخیص اسیدآمینهٔ تیروزین ساخته شدند و حد تشخیص آن‌ها ۷-۱۰ مولار بررسی و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت ۷-۱۰ مولار ۳/۱۷ درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان به دست آمده که بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای رسانا FTO برای تشخیص اسیدآمینهٔ تیروزین با روش‌های توسعه‌یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجر به توسعهٔ حسگرهای میکرونی می‌شوند. از مزایای بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه‌نشانی شده روی بستر شیشه‌ای رسانا FTO معرفی شده، سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش‌پذیری، تکرارپذیری استفادهٔ آسان و توانایی تشخیص سریع غلظت‌های اندک است که برای ساخت آن نیز هزینهٔ چندانی صرف نمی‌شود و با آن‌ها می‌توان انواع پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی و مواد بیولوژیکی را شناسایی کرد[۴۳].

References:

1. Yudong L. Diazotization-coupling reaction-based determination of tyrosine in urine Using Ag nanocubes by surface-enhanced Raman spectroscopy: Nanomaterials 2018; 8(6): 400.

2. Lichter-Konecki U , Jerry V. Phenylketonuria: current treatments and future developments. Drugs 2019; 79(5): 495-500.

3. Wegberg V. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. Orphanet journal of rare diseases 2017; 12(1): 162.

4. Hadi B, Salimi H, Ganjali MR. Simultaneous voltammetric determination of droxidopa, acetaminophen, and tyrosine on hematoxylin and graphene oxide/ZnO nanocomposite-modified glassycarbonelectrode.Ionics2018;24(5):1487-95.

5. Cinzia M. Activation of tyrosine phosphorylation signaling in erythrocytes of patients with alzheimer's disease. Neuroscience 2020; 127(5): 1387-99.

6. Joyal G, Olivier B, Ismail N. Effect of LPS treatment on tyrosine hydroxylase expression and Parkinson-like behaviors. Hormones and behavior 2017; 89: 1-12.

7. Mohammad Mahdi M. Preparation of monolithic molecularly imprinted polymer sol–gel packed tips for high-throughput bioanalysis: Extraction and quantification of l-tyrosine in human plasma and urine samples utilizing liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 2014; 967: 168-73.

8. Madzharova F, Heiner Z, Kneipp J. surface-enhanced Hyper- Raman scattering of the Amino Acids Tryptophan, Histidine, Phenylalanine, and Tyrosine: the Journal of Physical Chemistry 2017; 121: 1235-42.

9. Cheng M L, Tsai BC, 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 2011; 708: 89-96.

10. B anta-wright S, Steiner R. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening: A. Primer. for. Neonatal. and. Nurses 2004; 18: 41-7.

11. Escobar-Morreale HF, Samino S, Insenser M, Vinaixa M, Luque-Ramı´rez M, Lasuncion, MA, Correig X. Metabolic Heterogeneity in Polycystic Ovary Syndrome Is Determined by Obesity: Plasma Metabolomic Approach Using GC-MS: Clinical. Chemistry 2012; 58: 999-1005.

12. Njagi J, Chernov MM, Leiter JC, Andreescu S. Amperometric Detection of Dopamine in Vivo with an Enzyme Based Carbon Fiber Microbiosensor: American Chemical Society-Analytical Chemistry 2010; 82: 989-97.

13. Phillips TM. Measurement of Bioactive Neuropeptides Using a Chromatographic Immunosensor Cartridge: BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY 1996; 10: 331-6.

14. Kondo DG, Hellem TL, Sung YH, Kim N, Jeong EK, DelMastro K. Review:Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of PediatricMajor Depressive Disorder: Hindawi Publishing Corporation DepressionResearchandTreatment2011;14:13.

15. Wang C, Meloni MM, Wu X, Zhuo M, He T, Wang J, Dong P. Magnetic plasmonic particles for SERS-based bacteria sensing A review: A.I.P. Advances 2019; 9: 010701.

16. Su SR, Chen YY, Li KY, Fang YC, Wang CH, Yang CY, Chau LK, Wang SC. 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: 384-9.

17. Zhou H, Yang D, Ivleva NP, Mircescu NE, Niessner R, Haisch C. SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles: Analytical. Chemistry 2014; 86(3): 1525-33.

18. Shrivastava S, Dash D. Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver: NANO-Micro Letters 2010; 2: 164-8.

19. Krasteva N, Besnard I, Guse B, E. Bauer R, Mullen K, Yasuda A. Self-Assembled Gold Nanoparticle/ Dendrimer Composite Films for Vapor Sensing Applications: NANO Letters 2002; 2: 551-5.

20. Wu J, Mangham SC, Reddy VR, Manasreh MO, Weaver BD. Surface plasmon enhanced intermediate-band based quantum dots solar cell: SolarEnergyMaterials&SolarCells2012;102:44-9.

21. McLellan MJ, Li ZY, Andrew RS, Xia Y. The SERS Activity of a Supported Ag Nanocube Strongly Depends on Its Orientation Relative to Laser Polarization: NANO Letters 2007; 4: 1013-7.

22. Yu X, Wang L, Di J. Electrochemical Deposition of High Density Gold Nanoparticles on Indium/Tin Oxide Electrode for Fabrication of Biosensors: Nanoscience and Nanotechnology 2011; 11: 11084-8.

23. Berkovitch N, Ginzburg P, Orenstein M. Concave Plasmonic Particles: Broad-Band Geometrical Tunability in the Near-Infrared. ACS NANO 2010; 10: 1405-9.

24. By Brandon DL, Kim JS, Chin C, Guo LJ. Nanoimprint Lithography Based Approach for the Fabrication of Large-Area, Uniformly Oriented Plasmonic Arrays: ADVANCED MATERIALS 2008; 20: 1129-35.

25. Zhang XY, Hu A, Zhang T, Lei W, Xue XJ, Zhou Y, Duley W. Self-Assembly of Large-Scale and Ultrathin Silver Nanoplate Films with Tunable Plasmon Resonance Properties: ACS NANO 2011; 5: 9082-93.

26. Liang C L, Zhong K, Liu M, Jiang L, Liu SK, Xing DD. Synthesis of morphology-controlled silver nanostructures by electrodeposition: NANO-MICRO LETTERS 2010; 2: 6-11.

27. Cyrankiewicz M, wybranowski T, Kruszewski S. Study of SERS efficiency of metallic colloidal systems: Journal Physics 2007; 79: 012013.

28. 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.

29. Wang LR, 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 2006; 63 (3): 614-8.

30. Jing C, Fang Y. Simple method for electrochemical preparation of silver dendrites used as active and stable SERS substrate: Journal of Colloid and Interface. Science 2007; 314: 46-51.

31. Cañamares 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: J. Colloid. Interface. Sci 2008; 326: 103-9.

32. 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.

33. 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.

34. Bohren CF, Huffman DR. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley. New York. 1983; 306: 625.

35. Liu L, Xu X, Ye Y, Ma M, Liu Y, Lei J, Yin N. Electrolysis synthetic silver nanoparticles enhanced light emission from CdSe quantum dots: Thin Solid Films 2012; 526: 127-32.

36. 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.

37. S.Y. Ding, E.M. You, Z.Q. Tian, M. Moskovits. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. Journal of Chemical Society Reviews. 2017; 46: 4042-76.

38. H.Y. Chen, M.H. Lin, C.Y. Wang, Y.M. Chang, S. Gwo. Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale. Journal of the American Chemical Society. 2015; 42: 13698-705.

39. J.H. Granger, N.E. Schlotter, A.C. Crawford, M.D. Porter. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). Chemical Society Reviews. 2016; 45: 3865-82.

40. H.M. Parsons, D.R. Ekman, T.W. Collette, M.R. Viant. Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics. Analyst. 2009; 134: 478–85.

41. F. al-Taher, R. Juskelis, Y. Chen, J. Kapposso. Comprehensive Pesticide analysis in Juice Using a Combination of GC-MS and LC-MS Methods.

Application note, Food Safety, Aligent Technologies. 2012; 23(6): 579-86.

42. H. Fang, C.X. Zhang, L. Liu, Y.M. Zhao, H.J. Xu. Recyclable three-dimensional Ag nanoparticle-decorated TiO2 nanorod arrays for surface-enhanced Raman scattering. Biosens Bioelectron. 2015;64:434–41.

43. Kirsty Milligan, Neil C. Shand, Duncan Graham, and Karen Faulds. Detection of Multiple Nitroaromatic Explosives via Formation of a Janowsky Complex and SERS. Anal. Chem. 2020; 92: 3253−61.

44. Lqbal M, Usanase G, Oulmi K, Aberkane F, Bendaikha T, Fessi H, Zine N, Agusti G, Errachid E and Elaissari A. Preparation of gold nanoparticles and determination of their particles size via different methods. Materials Research Bulletin. 2016; 79: 97-104.