لیزر در پزشکی ۱۴۰۰/ دوره ۱۸ / شماره (۲) / صفحات ۳۶-۲۵.

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

وحید اسکندری[۱]
محمدرضا سعادتی[۲]
امین هادی[۳*]

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

**نویسندهٔ مسئول:** امین هادی

پست الکترونیکی:
amin.hadi@yums.ac.ir

شماره تماس: ۰۹۱۲۸۹۲۰۳۴۱

## چکیده

**مقدمه :** اسیدآمینه والین یکی از ۲۲ اسیدآمینه اصلی یاخته‌های زنده و از اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی انسان است. اسیدآمینه والین نیز در ساخت برخی میانجی‌های عصبی مؤثر است. وجود مقادیر بسیار کم اسیدآمینه 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 اسیدآمینه 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 پلاسمونیکی و طیف‌سنجی رامان بهبود سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینه والین به‌وسیله بسترهای SERS، به‌عنوان حسگرهای پلاسمونیکی و طیف‌سنجی رامان، شناسایی شدند.

**یافته‌ها:** نانوذرات نقره ساخته شده، نانوذراتی کروی و شبه‌کروی هستند که با مشاهده قله تشدید پلاسمونی در ۴۱۰ 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 اسیدآمینه والین، ساخته شدند و حد تشخیص آن $۱۰^{-۹}$ مولار و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت $۱۰^{-۹}$ مولار ۴/۳۰ درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان بدست آمده نشان می‌دهد که بسترهای فعال SERS، نانوذرات نقره برای تشخیص اسیدآمینه والین، با روش‌های توسعه‌یافته 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 اسیدآمینه والین را تقویت می‌کنند. با کاهش غلظت اسیدآمینه 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 اسیدآمینه والین به‌وسیله بسترهای SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی و طیف‌سنجی رامان، شناسایی شدند.

**واژه‌های کلیدی:** نانوذرات نقره، روش چرخشی (اسپین – کت)، اسیدآمینه والین، حسگر پلاسمونیکی، طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS[۱]).

[1] Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

## مقـدمه:

اسیدهای آمینه فعالیت‌های زیستی بسیار متنوعی را در سلول‌های زنده برعهده دارند. اسیدهای آمینه واحدهای ساختاری پروتئین‌ها هستند و به صورت منومرهایی 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 به‌وسیله سلول‌ها از سایر مواد ساخته می‌شوند. نوع اسیدهای آمینه ضروری در گونه‌های مختلف جانداران متفاوت است[۱-٦]. اسیدآمینه والین یکی از اسیدهای آمینه ضروری برای انسان و حیوان است. بدن انسان قادر به تولید این اسیدآمینه نیست بنابراین باید از طریق رژیم غذایی یا مکمل غذایی برای بدن تأمین شود[۱, ۲]. اسیدآمینه والین (amino acid valine)، در غلات، فرآورده‌های لبنی، قارچ، گوشت، بادام‌زمینی و پروتئین سویا یافت می‌شود. این اسیدآمینه باعث افزایش انرژی، افزایش استقامت، کمک به بهبود بافت‌های عضلانی، و کمک به بهبود مصدومیت‌های به‌وجودآمده در عضلات و تاندون‌ها می‌شود. اسیدآمینه 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. اسیدآمینه 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 ضدویروسی استفاده فراوانی دارد[۱-۷]. درنتیجه تشخیص با دقت بالا اسیدآمینه والین در مواد مهم می‌باشد. تکنیک‌های مختلفی مانند HPLC[1]، TMS (MS/MS)[2]، GC-MS[3]، روش جاذب ایمنی مرتبط با آنزیم (ELISA[4]) و SERS برای شناسایی اسیدآمینه 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 به‌خصوص 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[١٤]. 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[١٦,١٥]، سلول‌های خورشیدی[١٧] و SERS[١٨] کاربرد دارند. با توجه به خواص نوری فوق‌العاده این نانوذرات، روش‌های گوناگونی برای ساخت لایه‌ها متشکل از نانوذرات فلزی ارائه شده است[١٩] 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، به‌دلیل فعال‌بودن 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 فرآیندهایی که در فصل مشترک فلز - الکترولیت رخ می‌دهد؛ را نیز بررسی کرد[٢٤]. 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 به‌دلیل 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

[1] High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
[2] Tandem Mass Spectrometry (TMS)
[3] Gas Chromatography Mass Spectrometry (GS-MS)
[4] enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA)

نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند[۲۶]. این پدیده برای اولین بار در سال ۱۹۷٤، 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 الکترود نقره در چرخه 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 به‌دلیل 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 برهم کنش مولکول با سطح فلز زبر 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 پلاسمونیکی بسترهای فعال SERS، برای شناسایی ارتعاشات مولکولی اسیدآمینه والین در غلظت‌های پایین استفاده‌شود.

## مواد و روش‌ها

### روش‌های ساخت و شناسایی

#### ۱-۱. مواد شیمیایی مورد استفاده

نمک نقره ($AgNO_3$)، با جرم مولی ۱٦۹/۸۷ g/mol و درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵%، تری‌سدیم سیترات دوآبه با جرم مولی ۲۹٤/۱ g/mol، و درصد خلوص بالای ۹۹%، اسیدآمینه والین (Valine)، با جرم مولی ۱۱۷/۱۵۱ g/mol، درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵% و ۳- آمینو پروپیل تری‌اتوکسی سیلان (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)، تهیه شده از شرکت سیگما آلدریچ، لام‌های شیشه‌ای با ابعاد ۲/۵cm×۷/۵cm به‌عنوان بستر، استون با جرم مولی ۵۸/۰۹ g/mol و درصد خلوص بالای ۹۹/۹۵% و اتانول با جرم مولی ٤٦/۰٦۹ 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 پلاسمونیکی

شیشه‌ها با ابعاد ۲cm×۲cm به عنوان بستر برش داده شدند. پس از شستشو با آب و صابون، استون و اتانول، نمونه‌ها در دمای ٤۰۰ 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 ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۱mM نمک نقره (AgNO3) در حال جوش و هم خوردن، ٤ میلی‌لیتر محلول ۱۸/۸ mM از محلول تری سدیم سیترات دوآبه (NaC6H5O7.H2O) اضافه شد مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. که در نهایت کلوئید 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 کلوئیدی نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای نشانده می‌شوند. برای این منظور، بسترهای شیشه‌ای در دستگاه چرخشی (اسپین -کت) قرار داده می‌شوند سپس، ۱۰ میکرولیتر از APTES بر روی بسترهای شیشه‌ای؛ پخش و تحت دور ۲۵۰۰rpm، به مدت زمان دو دقیقه لایه نشانی انجام گردید و در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول کلوئیدی نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای؛ پخش و تحت دور ۲۵۰۰rpm، به مدت زمان ۱۰ دقیقه لایه نشانی انجام گردید و بسترهای پوشیده شده از نانوذرات نقره در دمای آزمایشگاه خشک شدند. برای آشکارسازی اسیدآمینه والین، غلظت‌های ۱-۱۰، ۲-۱۰، ۳-۱۰، ٤-۱۰، ۵- ۱۰، ٦-۱۰، ۷-۱۰، ۸-۱۰ و ۹-۱۰ مولار از آن با محلول آب DI تهیه شد و به صورت جداگانه و به روش قطره افشان، ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های تهیه‌شده بر روی بسترهای فعال SERS به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی قرار گرفت و پس از خشک‌شدن در حضور هوا، طیف رامان اسیدآمینه

والین، نشانده‌شده روی شیشه و طیف رامان بهبودیافته سطحی اسیدآمینه والین، نشانده شده روی بسترهای فعال SERS به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی اندازه‌گیری و تحلیل و بررسی شدند.

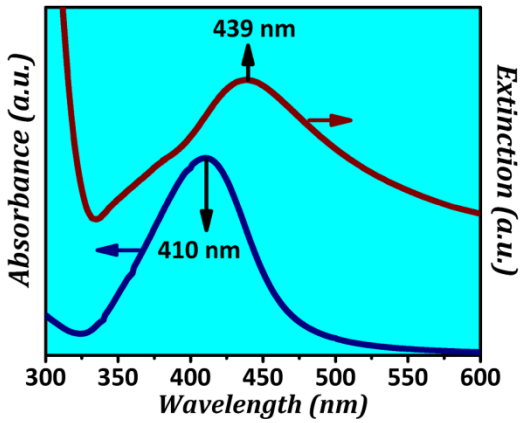
### ۱-۳. مشخصه‌یابی

دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتو X محلول کلوئیدی نانوذرات نقره و بسترهای فعال SERS، به ترتیب به‌وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 و دستگاه X Pert -Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند، با پرتو 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 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 ٦۳۳ نانومتر و توان خروجی ۱۷ میلی وات برای اندازه گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه ها 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 ساخته‌شده به روش شیمیایی با عامل کاهنده‌تری سدیم سیترات دوآبه را نشان می‌دهد. ظاهرشدن قله تشدید پلاسمونی در ٤۱۰ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره را تائید می‌کند[۳۰]، مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های جذبی نانوذرات نقره بیانگر شکل کروی یا شبه‌کروی بودن نانوذرات است[۳۱]. شکل۱- (نمودار قرمز)، طیف خاموشی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود با نشاندن شکل ۱ (نمودار آبی)، نانوذرات نقره، روی بسترهای شیشه‌ای و ظاهرشدن قله تشدید پلاسمونی در ٤۳۹ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای را تائید می‌کند. با تغییر محیط دربردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند؛ جابه جایی 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 کلوئیدی پایدار که نانوذرات نقره در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند؛ با قرارگرفتن نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای حین خشک‌شدن، 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 پلاسمونیکی در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است.

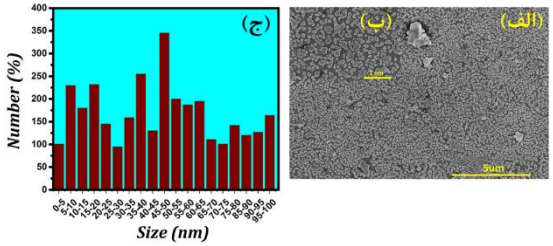



**شکل ۱:** طیف جذب نانوذرات نقره ساخته‌شده به روش شیمیایی با بیشینه جذب در طول موج ٤۱۰ نانومتر (نمودار آبی) و طیف خاموشی بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی با بیشینه خاموشی در طول موج ٤۳۹ (نمودار قرمز).

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

در شکل ۲ (الف)، تصویر FE-SEM، مربوط به بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگر پلاسمونیکی 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

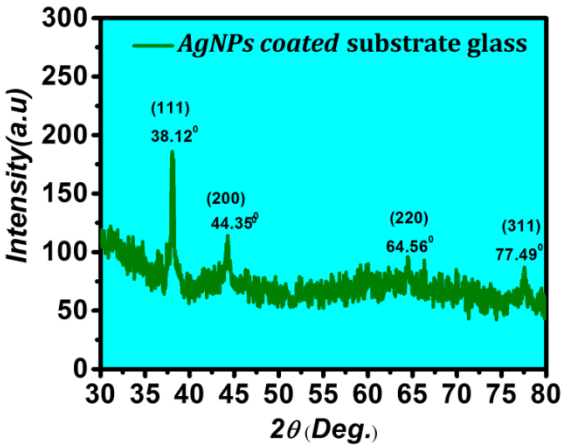
تیره‌تر، در پس زمینه تصاویر مشاهده می‌شوند که اندازه تقریبی ۵۰ نانومتر دارند. پوشش حاوی نانوذرات نقره تقریباً به‌طور همگن و یکنواخت سطح شیشه را پوشانده‌اند. شکل ۲ (ب)، تصویر FE-SEM، مربوط به بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگر پلاسمونیکی در اسکیل بار یک میکرومتر را نشان می‌دهد. ذرات درشت‌تر به رنگ روشن‌تر 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 اسیدآمینه آلین 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[۳۳]. بنابراین، با افزایش زمان لایه نشانی، به مدت ۱۰ دقیقه به‌دلیل تشکیل ذرات بزرگتر اثر پراکندگی از سطح ذرات درشت‌تر در مقایسه با اثر میدان نزدیک، بیشتر است. شکل ۲-(ج)، توزیع اندازه نانوذرات نقره را با استفاده از نرم‌افزارDigimizer (نسخه ۴٫۲) اندازه‌گیری شده است، نشان می‌دهد که اندازه‌هایی بین ۵ تا ۱۰۰ نانومتر دارند و تعداد ذرات با اندازه ۴۵ و ۵۰ نانومتر بیشتر از سایر اندازه‌های نانوذرات است.




**شکل ۲:** (الف)، تصویر FE-SEM مربوط به بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی در اسکیل بار ۵ میکرومتر که به روش چرخشی (اسپین-کت) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نانوذرات نقره در زمان ۱۰ دقیقه ساخته شده‌اند. (ب)، تصویر FE-SEM مربوط به بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی در اسکیل بار ۱ میکرومتر را نشان می‌دهد. (ج)، نمودار توزیع اندازه نانوذرات نقره تصویر FE-SEM مربوط به بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی در اسکیل بار ۵ میکرومتر که با استفاده از نرم‌افزار Digimizer (نسخه ۴٫۲) اندازه‌گیری شده است.

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

شکل ۳، الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای به عنوان بستر فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، است که با مشاهده بزرگترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه $2\theta$ برابر با ۳۸/۱۲، ۴۴/۳۵، ۶۴/۵۶ و ۷۷/۴۹ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است؛ ساختار FCC نقره را تایید می کند [۳۴]



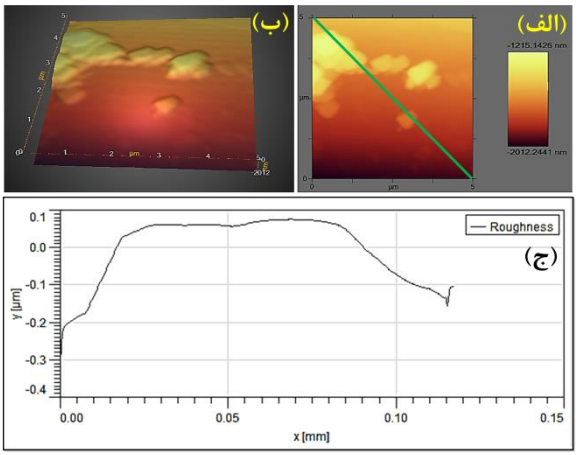

**شکل-۳:** الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای به عنوان بستر فعال نانوحسگرهای زیستی SERS.

### ۴. تصاویر AFM، نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS

شکل ٤- (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی مربوط به بسترهای فعال در SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای را نشان می‌دهد. شکل ٤- (ج)، نمودار رافنس سطح بسترهای فعال SERS، به عنوان حسگرهای پلاسمونیکی نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بستر شیشه‌ای را نشان می‌دهد، که با کشیدن خط سبز از قطر شکل ٤- (الف)، مشخصات مربوط به رافنس سطح با استفاده از نرم‌افزار Image Plus، (نسخه۲٫۹) محاسبه شد. میانگین زبری ۷۶/۱ نانومتر «Ram[1]): 0.0761 $\mu$m»، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۱۵۰ نانومتر «Rtm[2]): 0.1500 $\mu$m» و میانگین عمیق‌ترین زبری ۹۶/۱ نانومتر «Rvm[3]): 0.0964 $\mu$m» به‌دست آمد. زبری سطحی که به‌وسیله بسترهای فعال در SERS ، به عنوان حسگرهای

[1] Roughness average (Ra)
[2] Average maximum height of the roughness (Rtm)
[3] Average maximum roughness valley depth (Rvm)

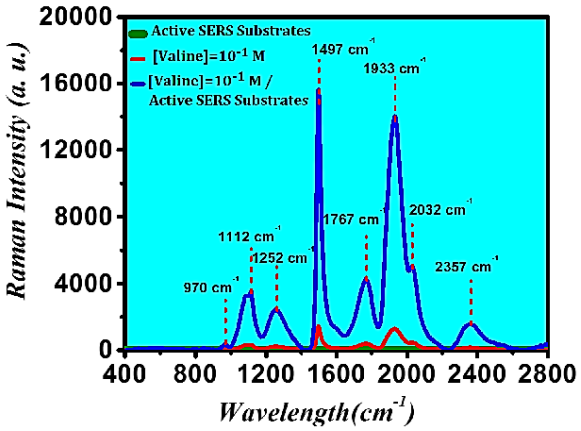
پلاسمونیکی نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای، ایجاد شده است؛ می‌تواند مراکزی برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود[۳۱].




**شکل ٤:** (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 می دهد.

## ۵. طیف رامان و آشکارسازی 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، ارتعاش های 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 پوشش داده شده به عنوان بستر فعال SERS، ارتعاشات کششی C-C و ارتعاشات کششی $COO^-$، ارتعاشات کششی C-C و ارتعاشات خمشی $NH_2$ و $NH_3$، ارتعاشات خمشی $CH_2$، ارتعاشات خمشی C-H و $CH_3$، ارتعاشات خمشی C-H و ارتعاشات کششی $COO^-$، ارتعاشات خمشی $NH_2$ و Amid II، ارتعاشات خمشی C-H و ارتعاشات خمشی C-H به ترتیب در ۹۷۰، ۱۱۱۲، ۱۲۵۲، ۱۴۹۷، ۱۷۶۷، ۱۹۳۳، ۲۰۳۲ و ۲۳۵۷، $cm^{-1}$ ظاهر می‌شوند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بسترهای شیشه‌ای نانوذرات نقره پوشش داده شده به عنوان بستر فعال SERS، به‌دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر است. ذرات بزرگتر نقره که در شکل ۲- (الف)، مشاهده می‌شوند؛ با پراکنده‌کردن 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 ۱-۱۰ مولار بر روی بسترهای شیشه ای (منحنی قرمز)، طیف SERS، اسیدآمینه والین، قرار داده‌شده با غلظت ۱-۱۰ بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS (منحنی آبی).

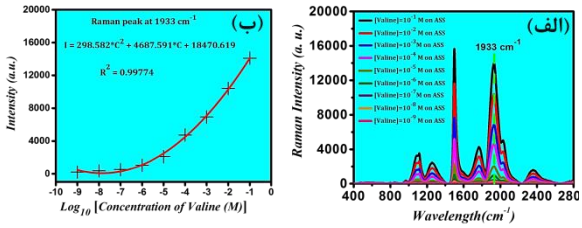
### ۶. طیف رامان و آشکارسازی اسیدآمینه والین و منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت با استفاده از نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS

شکل ٦- (الف)، طیف SERS اسیدآمینه والین، با غلظت‌های ۱-۱۰ (منحنی سیاه)، ۲-۱۰(منحنی قرمز)، ۳-۱۰ (منحنی آبی)، ٤-۱۰ (منحنی صورتی)، ٥-۱۰ (منحنی قهوه‌ای)، ٦-۱۰ (منحنی سبز)، ۷-۱۰ (منحنی بنفش)، ۸-۱۰ (منحنی نارنجی) و ۹-۱۰ (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 اسیدآمینه والین، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول‌های اسیدآمینه والین، و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به گونه‌ای که در غلظت‌های کمتر از ۹-۱۰ مولار، ارتعاش‌های اسیدآمینه والین، به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS، می‌تواند تا غلظت ۹-۱۰ اسیدآمینه والین، را شناسایی کند.

شکل ٦ - (ب)، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS، ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات خمشی NH2 و Amid II، در عدد موج 1- ۱۹۳۳ cm را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینه والین، C، نشان می‌دهد که با برازش انجام شده از رابطه (۱) پیروی می‌کند.

$$I = 29۸/۵۸۲\ C2 + 4687/591\ C + 18470/619\ (R2 = 0/99774) \qquad (۱)$$

که ضریب رگراسیون (R2) آن برابر با 0/99774 است. از آن جا که هدف از ساخت حسگرهای پلاسمونیکی بسترهای فعال در SERS، آشکارسازی غلظت بسیار پایین اسیدآمینه والین، است، خطی‌بودن 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.




**شکل ٦:** (الف)، طیف SERS، اسیدآمینه والین، با غلظت‌های ۱-۱۰ (منحنی سیاه)، ۲-۱۰ (منحنی قرمز)، ۳-۱۰ (منحنی آبی)، ٤-۱۰ (منحنی صورتی)، ٥-۱۰ (منحنی قهوه‌ای)، ٦-۱۰ (منحنی سبز)، ۷-۱۰ (منحنی بنفش)، ۸-۱۰ (منحنی نارنجی) و ۹-۱۰ (منحنی صورتی پررنگ)، مولار، بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده‌شده 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 NH2 و Amid II، در عدد موج 1-۱۹۳۳cm را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینه والین، C، بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS که برگرفته از شکل ٦- (الف) است.

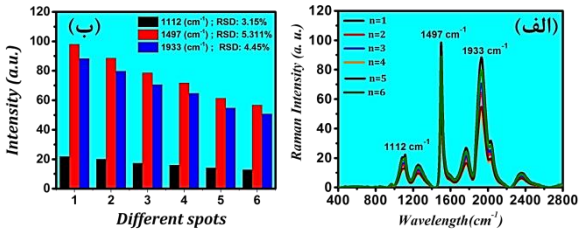
### ۷. طیف رامان و بررسی تکرارپذیری نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان بسترهای فعال در SERS، با آشکارسازی اسیدآمینه والین

به‌منظور تکرارپذیری در ساخت بسترهای شیشه‌ای پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، تعداد ٦ آزمایش پیوسته برای غلظت $10^{-9}$ مولار از اسیدآمینه والین، در طول یک روز انجام شد. شکل ۷- (الف)، طیف SERS، شش نقطه مجزا از اسیدآمینه والین، در غلظت $10^{-9}$ مولار به مقدار ۱۰ میکرولیتر لایه نشانی شده بر روی بسترهای شیشه‌ای پوشش داده شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشخص است تمام طیف‌های SERS، اسیدآمینه والین، در غلظت $10^{-9}$ مولار به خوبی با یکدیگر مطابقت دارند و هیچ تغییری در جابجایی موقعیت مکانی و مشخصه طیف‌ها مشاهده نمی‌شود. انحراف استاندارد نسبی (RSD)، به‌منظور بررسی تکرارپذیری ساخت بسترهای شیشه‌ای پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره به عنوان بسترهای فعال در SERS، در غلظت $10^{-9}$ مولار از اسیدآمینه والین، برای قله‌های در عدد موج $1112\ cm^{-1}$، $1497\ cm^{-1}$ و $1933\ cm^{-1}$، با استفاده از رابطه (۲)، محاسبه شدند[۳۸].

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

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

شدت سیگنال رامان در هر قله مشخص و I، میانگین شدت سیگنال رامان قله‌های مشخص‌شده را نشان می‌دهند. شکل ۷- (الف)، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت $10^{-9}$ مولار اسیدآمینه والین، برای قله‌هایی در عدد موج $cm^{-1}$ ۱۱۱۲، $cm^{-1}$ ۱۴۹۷و $cm^{-1}$ ۱۹۳۳، که به ترتیب مقدار RSD، ۳/۱۵، ۵/۳۱۱ و ۴/۴۵ درصد محاسبه شده است و در شکل ٤- (ب)، تغییرات محاسبه RSD، برای عدد موج $cm^{-1}$ ۱۱۱۲، مقدار ۳/۱۵ درصد (نمودار سیاه)، برای عدد موج $cm^{-1}$ ۱۴۹۷، مقدار ۵/۳۱۱ درصد (نمودار قرمز) و برای عدد موج $cm^{-1}$ ۱۹۳۳، مقدار ٤/٤٥ درصد (نمودار آبی)، به صورت نمودار ستونی مشخص شده است. انحراف استاندارد نسبی به دست آمده در این آزمایش به صورت میانگین برابر با ٤/۳۰ درصد به دست آمد که از لحاظ آماری نشانگر عملکرد رضایت‌بخش روش به‌کار گرفته‌شده برای تعیین غلظت اسیدآمینه والین، است. روش‌های دیگری که برای تعیین مقدار اسیدآمینه 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 اسیدآمینه والین، در غلظت ۹-۱۰ مولار به مقدار ۱۰ میکرولیتر اضافه‌شده بر روی بسترهای شیشه‌ای، پوشش داده شده نانوذرات نقره به عموان بسترهای فعال در SERS، بر روی نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت ۹-۱۰ مولار اسیدآمینه والین، برای قله‌هایی در عدد موج cm-1 ۱۱۱۲، cm-1 ۱۴۹۷ و cm-1 ۱۹۳۳، که به ترتیب مقدار RSD، ۳/۱۵، ۵/۳۱۱ و ٤/٤٥ درصد محاسبه شده است و در شکل (ب)، تغییرات محاسبه RSD، برای عدد موج cm-1 ۱۱۱۲، مقدار ۳/۱۵ درصد (نمودار سیاه)، برای عدد موج cm-1 ۱۴۹۷، مقدار ۵/۳۱۱ درصد (نمودار قرمز) و برای عدد موج cm-1 ۱۹۳۳، مقدار ٤/٤٥ درصد (نمودار آبی)، به صورت نمودار ستونی مشخص شده است.

## نتیجه‌گیری

به‌منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد که ناشی از اسیدآمینه والین در بدن است، آشکارسازی این مولکول دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما به‌دلیل ضعیف‌بودن سیگنال رامان، عملاً شناسایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیست. با قراردادن اسیدآمینه 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 rpm ۲۸۰۰ در زمان ۱۰، دقیقه لایه نشانی شدند و این بسترها به عنوان بسترهای فعال در SERS جهت آشکارسازی اسیدآمینه والین استفاده شدند. با قرار دادن اسیدآمینه والین بر روی بسترهای فعال در SERS در تمامی نمونه‌ها و غلظت‌های مختلف اسیدآمینه 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 نشانده شده‌اند که با دریافت نور لیزر فرودی، نور آن را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری اسیدآمینه والین در این مناطق، به‌دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر، اسیدآمینه والین قطبیده‌تر می‌شود و درنتیجه ارتعاشات شدیدتری دارد. با مشاهده قله پلاسمونی بسترهای فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، نانوذرات نقره به صورت محلول کلوییدی فاز آبی یا لایه‌نشانی‌شده روی زیرلایه شیشه‌ای ساخته‌شده به ترتیب در ۴۰۹ نانومتر ٤۳۹ نانومتر، لایه‌نشانی‌شدن 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 لایه‌نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای که حاصل از یکنواخت‌نبودن نانوذرات نقره است منجر به پراکندگی نور از نقاط مشاهده‌شده در تصویر FESEM می‌شود. زبری که برای بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای در

تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشاهده می‌شود به پراکندگی نور از نقاط زبر کمک می‌کند. بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای برای تشخیص اسیدآمینه والین ساخته شدند و حد تشخیص آنها $۱۰^{-۹}$ مولار بررسی و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت $۱۰^{-۹}$ مولار ٤/۳۳ درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان به‌دست‌آمده که بسترهای فعال SERS نانوذرات نقره لایه‌نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای برای تشخیص اسیدآمینه والین با روش‌های توسعه‌یافته 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 لایه‌نشانی‌شده روی بستر شیشه‌ای معرفی‌شده، سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش‌پذیری، 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:

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. Reeds, P., *The Catabolism of valine in the malnourished rat. Studies in vivio and in vitro with different labelled forms of valine.* British Journal of Nutrition, 1974. 31(2): p. 259-270.

5. Holeček, M., et al., *Leucine and protein metabolism in rats with chronic renal insufficiency.* Experimental and Toxicologic Pathology, 2001. 53(1): p. 71-76.

6. 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.

7. 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.

8. Yu, X., et al., *β-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.

9. 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.

10. Fan, H., et al., *Electrochemical bisphenol A sensor based on N-doped graphene sheets.* Analytica chimica acta, 2012. 711: p. 24-28.

11. 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.

12. Wang, C., et al., *Magnetic plasmonic particles for SERS-based bacteria sensing: A review.* AIP Advances, 2019. 9(1): p. 010701.

13. 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.

14. 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.

15. Shrivastava, S. and D. Dash, *Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver.* Nano-Micro Letters, 2010. 2(3): p. 164-168.

16. Krasteva, N., et al., *Self-assembled gold nanoparticle/dendrimer composite films for vapor sensing applications.* Nano Letters, 2002. 2(5): p. 551-555.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. 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.