لیزر در پزشکی ۱۴۰۱/ دوره ۱۹ / شماره (۲) / صفحات ۲۱-۸.

مقاله پژوهشی

تشخیص ارتعاشات مولکولی داروی سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) با استفاده از بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به عنوان حسگر رامان بهبودیافته سطحی (SERS)

معصومه مظفری[۱]
وحید اسکندری[۲]
امین هادی[۳،*]

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

نویسندهٔ مسئول: امین هادی

پست الکترونیک: amin.hadi@yums.ac.ir

شماره تماس: ۰۹۱۲۸۹۲۰۳۴۱

چکیده

مقدمه: سیپروفلوکساسین ((Ciprofloxacin (CIP) یک آنتی‌بیوتیک نسل سوم فلوروکینولون بسیار فعال با طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدباکتریایی است که برای کاربردهای مربوط به پزشکی انسانی و هم دامپزشکی تولید و مصرف می‌شود. مقدار زیادی از CIP از طریق ادرار دفع می‌شود، به‌همین‌دلیل از طریق فاضلاب شهری، صنایع داروسازی، فعالیت‌های دامداری و فاضلاب کشاورزی وارد محیط زیست می‌شود و اثرات مخربی را به همراه دارد. بنابراین، تشخیص سریع و دقیق داروی CIP در بسیاری از زمینه‌ها مخصوصاً برای سلامتی انسان بسیار مهم است .

روش بررسی: برای شناسایی داروی CIP جهت کنترل بیماری‌های ناشی از آن از زیرلایه‌های کاغذی فیلتری پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره به عنوان حسگر زیستی طیف‌سنجی رامان بهبودیافته سطحی (SERS) استفاده شد. ابتدا نانوذرات نقره با استفاده از روش شیمیایی تولنز تهیه شدند و سپس به روش غوطه‌وری بروی زیرلایه‌های کاغذی فیلتری پوشش داده شدند تا بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر زیستی SERS، در جهت شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP ساخته شوند. از آنالیزهای طیف‌سنجی فرابنفش مرئی (UV-Vis)، پراش اشعه‌ایکس(XRD) ، تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) و پراکندگی دینامیکی نور (DLS)، مشخصه‌های نانوذرات نقره ساخته‌شده بررسی شدند.

یافته‌ها: حد تشخیص بسترهای پلاسمونیکی SERS، برای شناسایی داروی CIP ۷-۱۰ مولار به‌دست‌آمد. میانگین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر ۴/۳۸ درصد محاسبه شد. با کاهش غلظت محلول به ۷-۱۰مولار، شدت مدهای رامان بسیار کاهش یافت به‌نحوی‌که تنها برخی قله‌ها مشخص هستند. فاکتور بهبود بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS برای شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP به‌صورت تجربی۱۰۷*۱/۴۶۰ محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج رامان به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که بسترهای پلاسمونیکی فعال SERS تهیه‌شده از نانوذرات نقره برای تشخیص داروی CIP با روش‌های توسعه یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی‌بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجربه توسعه حسگرهای نانویی می‌شوند. همچنین بسترهای پلاسمونیکی فعالSERS ، قابلیت بازیافت، تکرارپذیری و پایداری شیمیایی قابل توجهی را دارا هستند. درنتیجه، نانوذرات نقره را می‌توان به عنوان یک بستر بالقوه SERSبرای تشخیص داروی CIP در غلظت بسیار کم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، زیرلایه‌های کاغذی فیلتری، داروی سیپروفلوکساسین ((Ciprofloxacin (CIP)، طیف‌سنجی رامان بهبودیافته سطحی (SERS)، بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS.

مقـدمه

یکی از روش‌های کارآمد برای مطالعه غلظت‌های پایین و تشخیص حتی تک‌مولکول، روش پراکندگی رامان بهبودیافته سطحی (SERS[1]) است[۱]. SERS به‌دلیل حساسیت فوق‌العاده بالا (تک‌مولکولی)، اختصاصیت منحصربه‌فرد «اثر انگشت» و آنالیز غیرمخرب در سنجش مولکولی به یکی از تکنیک‌های تحلیلی همه‌کاره و قدرتمند تبدیل شده است[۲]. این مزیت‌های منحصربه‌فرد، SERS را به ابزاری امیدوارکننده در شاخه‌های مختلف علوم تحلیلی، مانند نظارت‌بر محیط زیست، آنالیز مواد غذایی، آنالیز سطح، تشخیص بیماری و غیره تبدیل می‌کند[۲-۴]. این مساله کاملاً بدیهی شده است که بهبود کارآمد زیرلایه‌های SERS نقش حیاتی در دستیابی به این کاربردهای پیشرفته ایفا می‌کنند. تاکنون انبوهی از زیرلایه‌ها با اجزاء، ساختارها و آرایش‌های مختلف ساخته شده‌اند که این مطالعات در حال انجام هستند و ادامه دارند. جستجوی مواد جدید (نیمه‌رسانا[۵]، گرافن[۶]، چارچوب آلی فلزی[۷] و غیره) برای دستیابی به افزایش سیگنال رامان همیشه موضوع مهمی در تحقیقات SERS است و چندین بررسی عالی در مورد این موضوع منتشر شده‌است[۸-۱۰]. اگرچه بسیاری از میکرونانوساختارهای پیشرفته Au/Ag یا ترکیبی از آنها با مواد دیگر برای آنالیز SERS توسعه یافته‌اند، اکثر آنها فقط نمونه اولیه هستند که در آنالیز آزمایشگاهی استفاده می‌شوند. ساخت این زیرلایه‌ها اغلب به تجهیزات پیچیده یا مهارت‌های بالا یا هزینه زیادی نیاز دارد که تولید انبوه را سخت می‌کند و بنابراین برای آنالیز عملی در دسترس نیست. علاوه‌بر اکتشاف مواد تشکیل‌دهنده جدید، توسعه زیرلایه‌های انعطاف‌پذیر و آسانِ آماده در سال‌های اخیر به یک روند جدید در تقاضای آنالیز عملی تبدیل شده است[۱۱-۱۳]. پیرامون این موضوع، زیرلایه SERS مبتنی بر کاغذهای فیلتری توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نانوذرات طلا یا نقره که با سنتز شیمیایی تهیه می‌شوند، می‌توانند بر روی ماتریس انعطاف‌پذیر جذب‌شده یا روی آن مونتاژ شوند تا زیرلایه انعطاف‌پذیر را تشکیل دهند. این زیرلایه دارای مقاومت مکانیکی خوبی است، کارایی بالایی در جذب و شناسایی هدف در سطوح ناهموار نشان می‌دهد و می‌تواند به اندازه و شکل دلخواه برش داده شود و به‌راحتی با سایر ساختارها یا دستگاه‌ها ادغام شود. به‌همین‌دلیل است که زیرلایه‌های انعطاف‌پذیر برای پیشبرد کاربردهای دنیای واقعی فناوری SERS حائز اهمیت هستند. درحال‌حاضر، زیرلایه‌های انعطاف‌پذیر SERS عمدتاً از جنس کاغذهای فیلتری [۱۴-۱۵]، پلیمرهای انعطاف‌پذیر[۱۶]، نانولوله‌های کربنی و مواد گرافنی [۱۷] هستند. زیرلایه‌های انعطاف‌پذیر SERS به‌طور گسترده توسعه داده شده‌اند و پیشرفت آنها با چندین مطالعه مروری خوبِ منتشرشده در سال‌های اخیر خلاصه شده است[۱۱-۱۳، ۱۸،۱۹]. در مقایسه با کاغذهای فیلتری ازنظر اجزای تشکیل‌دهنده و ساختار متنوع‌تر، ازنظر مکانیزم قوی‌تر، با فیلتراسیون سریع و با حجم زیاد کارآمدتر است[۲۰]. علاوه‌براین، می‌توان از فیلتراسیون برای دستیابی به مونتاژ سریع و یکنواخت ذرات پلاسمونیک روی کاغذهای فیلتری یا ماتریس دیگر استفاده کرد. این ویژگی‌ها تضمینی برای به‌دست‌آوردن سیگنال SERS بسیار حساس و تکرارپذیر است که برای آنالیز کمی و عملی اهمیت دارد. بنابراین، زیرلایه SERS مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری با آینده‌نگری فوق‌العاده‌ای توسعه یافته است و توجه محققان بسیاری را به این حوزه جلب کرده است. این سیستم‌ها در نظارت بر محیط زیست، آنالیز مواد غذایی و غیره امیدوارکننده به‌نظر می‌رسند[۲۰]. سیپروفلوکساسین[2] (Ciprofloxacin (CIP)) یک آنتی‌بیوتیک نسل سوم فلوروکینولون بسیار فعال با طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدباکتریایی است که برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ معرفی شد و هم برای کاربردهای مربوط به پزشکی انسانی و هم دامپزشکی تولید و مصرف می‌شود[۲۲-۲۱]. به‌دلیل هزینه کم، سهولت استفاده و اثربخشی درمانی بالا، CIP به‌طور گسترده برای درمان بیماری‌های گوارشی ناشی از باسیل‌های گرم منفی و گرم مثبت در حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد[۲۳]. به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک سنتزی رایج، CIP در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت فعال است[۲۴]. به دنبال سوءمصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، CIP نیز به‌ویژه در اروپا به‌شدت مورد استفاده قرار می‌گیرد[۲۵]. به‌عنوان مثال، مصرف سالانه CIP آلمان ۳۳ تن در سال ۲۰۰۹ بود[۲۶]. مقدار بیشتری از CIP در انسان ازطریق ادرار دفع می‌شود، به‌همین‌دلیل ازطریق فاضلاب شهری، صنایع داروسازی، فعالیت‌های دامداری و فاضلاب کشاورزی وارد محیط زیست می‌شود[۲۷]. تجزیه زیستی

[1] Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

[2] $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

CIP در سیستم آبی فرآیند دشواری است[۲۸] و باعث می‌شود که CIP در محیط زیست و در سطح بالایی باقی بماند[۲۹]. با توجه به مقادیر زیاد از CIP در محیط زیست و اثرات سمی آن[۳۰] روی انسان، حیوانات، گیاهان و باکتری‌ها[۳۱]، اتحادیه اروپا و بسیاری از کشورها قبلاً استانداردهایی را برای حداکثر مقدار باقیمانده CIP (MRLs)[1] در آب‌های محیطی تدوین کرده‌اند[۳۲]. باتوجه به خطر بالقوه CIP برای محیط زیست و انسان‌ها، تشخیص و آنالیز CIP در محیط زیست به امری ضروری تبدیل شده است. بنابرین، در راستای این هدف، توسعه و استفاده از روش‌های شناسایی ارزان، ساده و تاییدشده برای شناسایی CIP در محیط زیست بسیار حائز اهمیت می‌باشد[۳۳]. علیرغم حساسیت بالای این روش‌ها در آشکارسازی مقادیر بسیار اندک از آلاینده‌ها، این تکنیک‌ها به فرآیندهای پیچیده آماده‌سازی نمونه و همچنین اپراتورهای متخصص و آموزش‌دیده نیاز دارند که استفاده گسترده از آنها را محدود می‌سازد[۳۴]. در این مطالعه برای حل این مشکلات و غلبه‌بر معایب ذکر شده در بالا، نانوذرات نقره تهیه شده به‌صورت ماده فعال در جهت ساخت بسترهای پلاسمونیکی فعال SERS به‌عنوان یک جایگزین بومی برای سیستم‌های کروماتوگرافی برای تشخیص سریع و آسان آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شد. نانوذرات نقره به عنوان ماده فعال SERS در این مطالعه انتخاب شدند. ابتدا، نانوذرات نقره سنتز شدند و با استفاده ازآنالیزهای طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی (UV-Vis)، پراش اشعه‌ایکس (XRD)، تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) و پراکندگی دینامیکی نور (DLS)، مشخصه‌های نانوذرات نقره ساخته‌شده بررسی شدند. در ادامه، با استفاده از روش غوطه‌وری نانوذرات نقره بر روی بسترهای کاغذی فیلتری لایه‌نشانی شدند و درنتیجه بسترهای پلاسمونیکی فعال SERS با قدرت چسبندگی مکانیکی بالا، سریع و کم‌هزینه تهیه شدند تا از آنها برای شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP در غلظت‌های پایین استفاده شود. حساسیت بسترهای پلاسمونیکی فعال SERS تهیه‌شده از نانوساختارهای نانوذرات نقره برای داروی CIP $۱۰^{-۷}$ مولار است.

[1] Maximum Residue Limits

۱- بخش تجربی

۱-۱- مواد شیمیایی

جدول-۱، لیست مواد شیمیایی استفاده‌شده در این پژوهش را نشان می‌دهد.

جدول ۱. مواد شیمیایی مورد استفاده در تحقیق حاضر.

مواد	فرمول شیمیایی	جرم مولی (g/mol)	درصد خلوص(%)	شرکت
نیترات نقره	$AgNO_3$	169.87	≥99.95	سیگما آلدریچ
ساکاروز	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	≥99.98	سیگما آلدریچ
پتاسیم هیدروکسید	KOH	56.100	≥99.98	سیگما آلدریچ
آمونیا	NH_4OH	17.031	≥99.99	سیگما آلدریچ
نیتریک اسید	HNO_3	63.01	≥99.99	سیگما آلدریچ
سیپروفلوکساسین	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	365.4	≥99.99	سیگما آلدریچ
استون	CH_3COCH_3	58.090	≥99.95	مرک
اتانول	C_2H_5OH	46.069	≥99.95	مرک
هیدروژن فلورید	HF	20.01	≥99.96	مرک
کاغذ فیلتری (اندازه ۲-۳ میکرون)	---	---	---	شرکت واتمن

۱-۲. روش سنتز نانوذرات نقره و نحوه تهیه بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری SERS

پروسه تولنز شامل سه محلول آبی است: ۲۰ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات ۰/۲ مولار، محلول فعال‌کننده: ۲۰ میلی‌لیتر محلول پتاس ۰/۵ مولار و محلول کاهنده: ۴۰ میلی‌لیتر محلول سوکروز ۰/۷ مولار که با ۱۶ قطره اسید نیتریک، اسیدی می‌شود. این محلول باید حرارت ببیند تا حجم آن نصف شود. به محلول نیترات نقره به آرامی و قطره‌قطره آمونیا اضافه می‌شود که ابتدا رنگ محلول را قهوه‌ای می‌کند و با اضافه‌کردن آمونیایی بیشتر دوباره رنگ محلول بی‌رنگ و شفاف می‌شود که نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس $Ag(NH_3)_2^+$ است. این کمپلکس احیا نقره را آسان‌تر می‌کند. سرعت احیای نقره به PH محلول بستگی دارد و برای تنظیم PH و قلیایی‌کردن محیط واکنش به آرامی و قطره‌قطره محلول پتاس به محلول آمونیاکی نقره

اضافه می‌شود که باعث کدرشدن محلول می‌شود و نشان‌دهنده تشکیل رسوب اکسید نقره است. دوباره به آن قطره‌قطره آمونیا اضافه می‌شود تا رسوبات حاصل، حل‌شده و محلول شفاف و بی‌رنگ شود. این محلول به‌دست آمده خاصیت انفجاری دارد و نباید مدت زیادی از تهیه آن بگذرد. با قراردادن نمونه‌های مورد نظر کاغذهای فیلتری در این محلول آماده‌شده و اضافه‌کردن محلول کاهنده، نقره روی سطح کاغذهای فیلتری احیا می‌شود و لایه نازك و یکنواختی از نقره روی کاغذهای فیلتری و ظرف محلول تشکیل می‌شود. در محلول رسوبات اکسید نقره نیز داریم که در لایه‌لایه کاغذهای فیلتری نفوذ کرده‌اند و با اولتراسونیك می‌توان به راحتی آنها را از میان و سطح کاغذهای فیلتری جدا کرد. در این تحقیق از آب DI، ۱۸/۲ MΩ استفاده شده است. پروسه تولنز باید در تاریکی انجام شود[۳۵]. همچنین تمیزی سطوحی که روی آنها لایه‌نشانی صورت می‌گیرد حائز اهمیت است. پس، برای تمیزکردن الیاف کاغذهای فیلتری از اسید هیدروژن فلورید، استون و اتانول، استفاده شد. برای آشکارسازی داروی CIP، غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-7} مولار از آن با محلول آب DI تهیه شد. به‌صورت جداگانه هر کدام از غلظت‌های تهیه‌شده با استفاده از دستگاه میکروپیپت به حجم ۱۰ میکرولیتر به روش قطره‌افشان، بروی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS لایه‌نشانی شد. پس از خشک‌شدن داروی CIP، لایه‌نشانی شده به روی بستر کاغذهای فیلتری و بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS در حضور هوا، طیف رامان و طیف SERS داروی CIP، اندازه‌گیری و تحلیل و بررسی شدند.

۱-۳ - مشخصه‌یابی

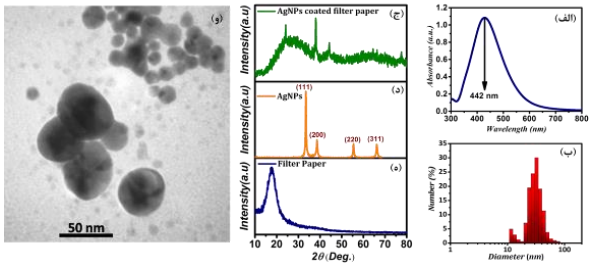
طیف جذبی نانوذرات نقره سنتزشده به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر جذب Ultraviolet–visible spectroscopy (UV-Vis) از نوع Scan Drop محصول شرکت analyticgena کشور آلمان انجام شد. برای تعیین فازهای بلورین (کریستالی) نانوذرات نقره سنتزشده، همچنین اندازگیری ثابت‌های کریستالی نانوذرات نقره و محاسبه سایز بلورک‌ها از الگوی پراش اشعه‌ایکس، X-ray Powder Diffraction (XRD) نمونه‌ها استفاده شد. برای تهیه الگوی پراش اشعه‌ایکس از دستگاه پراش‌سنج پودری اشعه‌ایکس مدل Philips X'pert Pro ساخت کشور هلند با منبع لامپ آند مسی Cu Kα با طول موج $\lambda=1.5406\ ^0A$ استفاده شد. مورفولوژی و ریخت‌شناسی نانوذرات نقره سنتزشده و نانوذرات نقره لایه‌نشانی‌شده روی زیرلایه کاغذی فیلتری توسط دستگاه Field Emission Scanning Electron Microscopes (FE-SEM) مدل Mira-Xmu مورد بررسی قرار گرفت برای آماده‌سازی نمونه تصویر برداری، پودر نانوذرات نقره و بسترهای کاغذی فیلتری پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره با لایه بسیار نازکی از طلا پوشش داده می‌شود تا باعث رسانای سطحی‌شده طوری‌که مسیر باریکه‌های الکترونی برگشتی را تغییر ندهد همچنین پودر نانوذرات نقره بایستی روی یک سطح هادی که بیشتر از جنس آلومینیوم است پخش شده باشد. برای تعیین اندازه و توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتزشده، از دستگاه Transmission electron microscopy (TEM) مدل LEO-912AB با ولتاژ اعمالی 120 kV برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد. تصاویر Atomic force microscopy (AFM) بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS نیز با استفاده از دستگاه AFM مدل FemtoScan ساخت کشور روسیه بررسی شد. از آنالیز پراکندگی دینامیکی نور (DLS) برای توزیع اندازه نانوذرات نقره در کلوئید استفاده شد که این عمل با استفاده از دستگاه Zetasizer Nano-ZS ساخت شرکت مالورن انگلستان تعیین گردید. اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق و با طول‌موج ۶۳۳ نانومتر لیزر He-Ne صورت گرفت. از دستگاه طیف‌سنجی رامان کانفوکال اسپکترومیکروسکوپی (Confocal Raman Spectroscopy)، مدل Lab Ram HR ساخت شرکت Horiba- ژاپن با تابش نور لیزر، با طول‌موج ۶۳۳ نانومتر و توان خروجی ۱۷ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

طیف‌سنجی اسپکتروفتومتری UV-Vis، آنالیز DLS، ارزیابی طیف XRD و تصویر TEM نانوذرات نقره سنتزشده و بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS

در اثر احیای یون‌های نقره و تولید نانوذرات نقره، رنگ نمونه‌ها از زرد کمرنگ به سبز تیره تبدیل شد که با منابع هم‌خوانی داشت و نشان‌دهنده تولید سوسپانسیون کلوئیدی نانوذرات نقره بود. جهت اثبات وجود نانوذرات نقره در نمونه‌ها، طیف UV-Vis، از آنها تهیه شد. یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های نانوذرات فلزی خواص نوری آنها بوده، که متناسب با شکل و اندازه نانوذرات تغییر می‌کند. در نانوذرات فلزی تشدید پلاسمون سطحی مسئول خواص نوری منحصربه‌فرد آنهاست که تحت فاکتورهایی از قبیل اندازه نانوذرات، شکل نانوذرات، فاصله آنها از همدیگر و ضریب شکست محیط پیرامون تغییر می‌کند[۳۶]. باتوجه به اینکه نانوذرات نقره بین ۴۰۰ تا۵۰۰ نانومتر جذب نور دارند، شکل۱ (الف) نشان می‌دهد که مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در ۴۴۲ نانومتر برای نانوذرات نقره رخ داده است. بنابراین وجود پیک در این محدوده که با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش تشخیص آن وجود دارد گامی در جهت ثابت‌کردن سنتزشدن نانوذرات نقره می‌باشد. جابه‌جاشدن پیک‌ها و تغییر در شدت آنها و ایجاد تغییرات در رنگ‌های مشاهده‌شده عواملی هستند که به اندازه نانوذرات وابسته‌اند. به بیان دیگر ویژگی‌های نوری نانوذرات نقره به شدت وابسته به قطر نانوذرات است. در طیف UV-Vis قله موجود در ناحیه ۴۴۲ نانومتر با جذب بالا دیده می‌شود که خواص نانوذرات نقره می‌باشد. همچنین رنگ سبز تیره بسته به‌شدت رنگ و اندازه نانوذرات نقره در محیط به وجود آمده است[۳۶-۳۷]. مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های جذبی نانوذرات پلاسمونیک مانند طلا و نقره بیانگر کروی یا شبه‌کروی‌بودن نانوذرات است[۳۸]. طیف‌سنجی UV-Vis، می‌تواند روشی ساده و قابل اعتماد برای نظارت بر پایداری محلول‌های نانوذرات مورد استفاده قرار گیرد. اما زمانی که نانوذرات بی‌ثبات شوند پیک اصلی به‌دلیل تخلیه نانوذرات پایدار به شدت کاهش می‌یابد. طیف پراکندگی دینامیکی نور (DLS) نشان‌دهنده توزیع اندازه ذرات می‌باشد. آنالیز DLS برای اندازه‌گیری اندازه نانوذرات نقره در محیط مایع مورد استفاده قرار گرفت[۳۹-۴۰]. این روش برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به‌کار می‌رود. در شکل ۱ (ب)، با توجه به نمودار پراکندگی اندازه ذرات، محدوده اندازه تمام ذرات بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر است که ۱۰۰ درصد از این نانوذرات زیر ۱۰۰ نانومتر هستند. با توجه به شکل ۱ (ب)، بیشترین توزیع فراوانی اندازه نانوذرات نقره ۴۰ تا ۵۰ نانومتر هستند. قطر به‌دست‌آمده با این روش، مربوط به کره‌ای با ضریب انتقالی معادل ذره مورد اندازه‌گیری است. ضریب نفوذ انتقالی به اندازه ذره، ساختار سطحی، غلظت و نوع یون‌های موجود در محیط بستگی دارد. این بدین معناست که اندازه به‌دست‌آمده با این روش می‌تواند بزرگ‌تر از مقدار حاصل از روش میکروسکوپ الکترونی باشد. آنالیز XRD، برای تعیین ساختار اتمی، تعیین بلورینگی، اندازه حوزه کریستالی مواد استفاده می شود که برای بررسی تشکیل‌شدن و نوع فاز جامدات روشی مطمئن و قابل اعتماد است. شکل ۱(ه)، الگوی XRD، کاغذ فیلتری به‌عنوان زیرلایه‌های SERS است همان‌طورکه مشاهده می‌شود پیکی که در زاویه ۱۵/۹۸ مشاهده می‌شود تشکیل ساختار کاغذ فیلتری را نشان می‌دهد [۴۱]. شکل ۱ (د)، الگوی XRD، نانوذرات نقره سنتزشده را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱ (د)، پیک‌هائی در زوایای 2θ برابر با ۳۸/۲۲، ۴۴/۳۸، ۶۴/۵۸ و ۷۷/۴۹ درجه به ترتیب مربوط به صفحات بلوری تشکیل‌شده (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱)، که با فاز نقره فلزی مطابقت داشته و نشان‌دهنده تولید نانوذرات نقره با ساختار کروی با وجوه پر است. الگوی XRD، به‌وضوح نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتزشده به روش شیمیایی به‌صورت کریستال وجود دارند. شماره صفحات این الگو ساختار FCC نانوذرات نقره را نشان می‌دهند. از شکل ۱ (د)، می‌توان متوجه شد که شاخه‌های مرکزی طولانی به‌صورت واضح در جهت محور (۱۱۱)، رشد یافته‌اند. شکل ۱ (د)، همچنین بیان می‌کند که نانوذرات نقره از بلورینگی بالایی برخوردار است. شکل ۱ (ج)، الگوی XRD، بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به عنوان حسگر SERS را نشان می‌دهد. از شکل ۱ (ج)، می‌توان متوجه شد که همه نانوذرات نقره یك قالب و ساختار دارند. شکل ۱ (ج)، همچنین بیان می‌کند که بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS از بلورینگی بالایی برخوردار است. با توجه به شماره صفحات

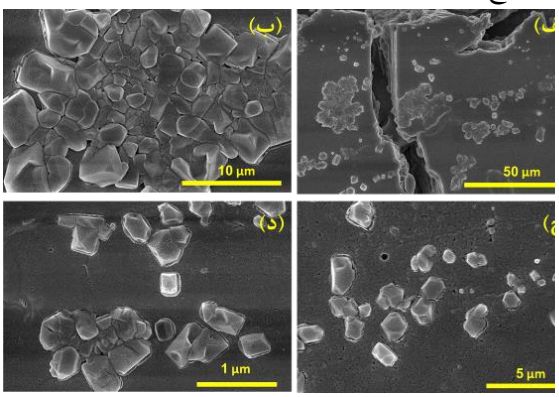
مشخص شد که نانوذرات نقره تشکیل شده برروی کاغذهای فیلتری ساختار FCC دارند. متوسط اندازه دانه‌های واقع در صفحه (۱۱۱) با استفاده از رابطه ۱ (دبای- شرر)، $d_{XRD} = \frac{0/9\lambda}{\beta Cos\theta}$ حدود ۱± ۵۸ نانومتر به‌دست آمد. زاویه 2θ مربوط به صفحه (۱۱۱) برابر ۳۸/۲۱ درجه با پهنای قله در نیمه‌ارتفاع (FWHM) ۰/۴۱۳ است. بزرگترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه با ۳۸/۲۱، ۴۴/۵۱، ۶۴/۴۳ و ۷۷/۴۸ ظاهر شد که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است. صفحات بلوری ظاهرشده روی کاغذی فیلتری حضور نانوذرات نقره را تائید می‌کند. همان‌طورکه مشاهده می‌شود پیکی که در زاویه ۱۵/۹۸ ظاهر شده است حضور ساختار کاغذ فیلتری به عنوان زیرلایه SERS را نشان می‌دهد [۴۱-۴۲]. شکل ۱ (و)، تصویر TEM نانوذرات نقره، که با عامل کاهنده ساکاروز، به روش شیمیایی (تولنز) ساخته شده است در اسکیل‌بار ۵۰ نانومتر را نشان می‌دهد. همان‌طوری‌که در شکل ۱ (و)، مشخص است نانوذرات نقره به شکل کروی و شبه‌کروی هستند. اندازه نانوذرات نقره با استفاده از نرم‌افزار (Digimizer)، اندازه‌گیری شد. توزیع اندازه‌های آن بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر بود. تعداد نانوذرات نقره با توزیع اندازه ۴۰-۵۰ نانومتر بیشتر از سایر اندازه‌های نانوذرات نقره است که به‌طور متوسط نانوذرات نقره سنتزشده اندازه ۴۰-۵۰ نانومتر دارند.



شکل ۱: (الف)، طیف جذبی UV-Vis، نانوذرات نقره سنتز با بیشینه جذب در طول‌موج ٤٤٢ نانومتر، (ب)، نمودار DLS، نانوذرات نقره سنتزشده، (ه)، طیف الگوی XRD، کاغذ فیلتری، (د)،-طیف الگوی XRD، نانوذرات نقره سنتزشده، (ج)،- طیف الگوی XRD بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، (و)،-تصویر TEM نانوذرات نقره، ساخته‌شده به روش شیمیایی (تولنز) و با عامل کاهنده ساکاروز را نشان می‌دهد.

تصویر FE-EM نانوذرات نقره سنتزشده به روش شیمیایی (تولنز) و با عامل کاهنده ساکاروز

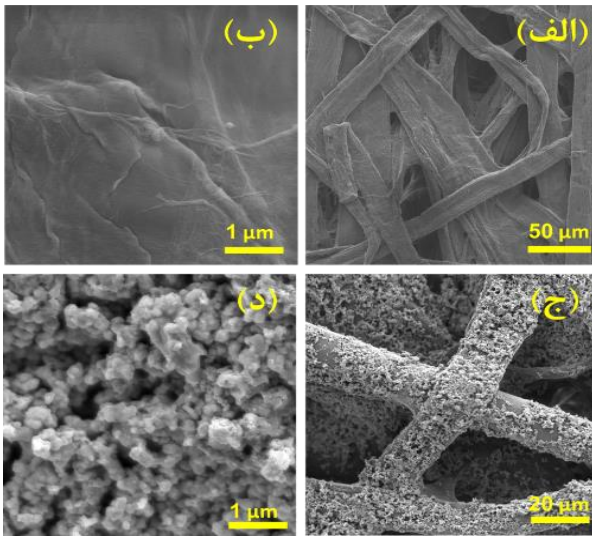
از تصاویر FE-SEM، می‌توان برای تعیین اندازه، ریخت‌شناسی و مورفولوژی ذرات استفاده کرد. شکل۲- (الف)، شکل۲- (ب)، شکل۲- (ج) و شکل۲- (د)، به ترتیب تصاویر FE-SEM، نانوذرات نقره سنتزشده به روش شیمیایی (تولنز) با عامل کاهنده ساکاروز را در اسکیل بار ۵۰ میکرومتر، ۱۰ میکرومتر، ۵ میکرومتر و ۱ میکرومتر، نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود نانوذرات نقره دارای ساختار کروی به‌صورت یکنواخت، غیریکنواخت و به هم چسبیده هستند. ازآنجاکه نانوذرات نقره به صورت محلول کلوییدی هستند درنتیجه برای رسوب‌گیری از آن به تجهیزات گران‌قیمت و زمان زیادی احتیاج بود. برای حل این مشکل و بررسی دقیق‌تر خواص، ویژگی‌ها، مورفولوژی و شکل نانوذرات نقره از دستگاه TEM هم در این پژوهش استفاده گردید. بسیاری از واکنش‌های ساخت نانوذرات نقره به روش شیمیایی در مقیاس آزمایشگاهی، به‌راحتی قابل ارتقاء به سطح تولید انبوه اقتصادی هستند و نیازی به تجهیزات پیشرفته ندارند. هر چند در عین سادگی، نیازمند دقت، زمان و نبوغ پژوهش‌گر است تا بتواند نانوذرات نقره کاملاً هم شکل و با توزیع اندازه کوچک و یکسان به‌دست آورد. نانوذرات نقره بسیار به تغییر شرایط آزمایش حساس می‌باشند. تغییرات بسیار اندک در دمای آزمایش، غلظت محلول‌های اولیه و نوع عامل کاهنده می‌توانند عامل ایجاد اشکال مختلفی غیر از کروی باشند. در این مقاله سعی بر ساخت نانوذرات نقره کاملاً هم شکل و با توزیع اندازه کوچک و یکسان شده است.



شکل-۲: (الف)، (ب)، (ج) و (د)، به‌ترتیب تصاویر FE-SEM، نانوذرات نقره سنتزشده به روش شیمیایی (تولنز) با عامل کاهنده ساکاروز را در اسکیل بار ۵۰ میکرومتر، ۱۰ میکرومتر، ۵ میکرومتر و ۱ میکرومتر، نشان می‌دهد.

تصاویر FE-EM بستر کاغذی فیلتری و بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS

شکل۳– (الف) و شکل۳– (ب)، به ترتیب تصاویر FE-SEM، بستر کاغذی فیلتری در اسکیل بار ۵۰ میکرومتر و ۱ میکرومتر را نشان می‌دهد. همان‌طورکه به‌وضوح در شکل۳– (الف) و شکل۳– (ب)، مشخص است بسترهای کاغذی فیلتری دارای سطوح زبری و دارای شیارهای بزرگ و کوچکی هستند. از طرفی چون بسترهای کاغذی فیلتری زیست تخریب‌ناپذیرند و در طبیعت به‌راحتی تجزیه می‌شوند و از همه مهمتر به خاطر سطوح غیریکنواخت زیرلایه‌ای مناسبی جهت ساخت حسگرهای پلاسمونیکی SERS محسوب می‌شود. شکل۳– (ج) و شکل۳–(د)، به ترتیب تصاویر FE-SEM، بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS در اسکیل بار ۲۰ میکرومتر و ۱ میکرومتر را نشان می‌دهد. ساخت بستر فعال SERS، یکی از فرآیندهای مهم و کلیدی جهت استفاده در تجزیه‌وتحلیل مواد بیولوژیکی و مواد شیمیایی محسوب می‌شود. کاغذهای فیلتری به‌دلیل جامدبودن، کم‌هزینه، قابلیت حمل، جذب خوب، به‌عنوان بستری مناسب جهت لایه‌نشانی نانوذرات به عنوان حسگر زیستی SERS محسوب می‌شود [۴۳]. همان‌طورکه شکل۳– (ج) و شکل۳– (د)، مشخص است مقدار زیادی از نانوذرات نقره به‌طور یکنواخت روی بستر کاغذهای فیلتری پراکنده شده‌اند تا جذب متراکم نسبتاً بالایی از نانوذرات نقره روی سطح بستر کاغذهای فیلتری داشته باشند. شکل۳– (د)، نشان می‌دهد که نانوذرات نقره در سطح بستر کاغذهای فیلتری پراکنده و جذب‌شده و نقاط داغ را تشکیل می دهند، که نشان می‌دهد حتی اگر کاغذ دارای یک سطح با بار منفی ضعیف است (گروه‌های هیدروکسیل سلولز)، نانوذرات نقره را می‌توان بر روی سطح بستر کاغذهای فیلتری توسط نیروی واندروالسی حفظ کرد[۴۴]. نانوذرات نقره تمایل به تجمع در سطح بستر کاغذهای فیلتری دارند همان‌طورکه در شکل۳– (د)، با بزرگنمایی بیشتر دیده می‌شود. تصویر FE-SEM با بزرگنمایی بالا، خوشه‌ای از نانوذرات نقره را نشان می‌دهد (شکل۳– (د))، که رزونانس پلاسمون سطح موضعی را منشا می‌گیرد و به نوبه خود باعث افزایش شدت SERS زیاد به‌دلیل تشکیل نقاط داغ می‌شود. به‌نظر می‌رسد که شکاف‌های بیشتری بین نانوذرات نقره در بستر بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS وجود دارد که برای اثر SERS افزایش‌یافته مفید خواهد بود.



شکل-۳: (الف) و (ب)، به ترتیب تصاویر FE-SEM، بستر کاغذی فیلتری در اسکیل بار ۵۰ میکرومتر و ۱ میکرومتر و (ج) و (د)، به‌ترتیب تصاویر FE-SEM، بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS در اسکیل بار ۲۰ میکرومتر و ۱ میکرومتر را نشان می‌دهد.

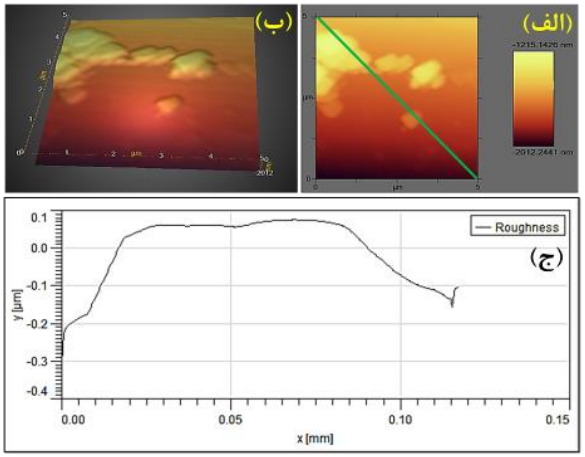
تصاویر AFM بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS

از آنالیز AFM، برای تشخیص رافنس (زبری) و توپوگرافی سطح بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS استفاده شد. ازجمله کاربردها و مزیت‌های استفاده از AFM در تعیین ویژگی‌های نانوساختارهای جامد، عدم نیاز به تجهیزات گران‌قیمت برای آماده‌سازی نمونه و همچنین عدم نیاز به پمپ‌های گران‌قیمت جهت درست‌کردن خلا در زمان تصویربرداری است. ازسوی‌دیگر میکروسکوپ نیروی اتمی که بررسی سه‌بعدی نانوساختارها را ممکن ساخته، می‌تواند مکمل مناسبی برای میکروسکوپ الکترونی باشد[۴۵]. شکل ۴- (الف) و شکل ۴- (ب)، به‌ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی و شکل ۴-(ج)، نمودار رافنس بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS را نشان می‌دهد. تجزیه‌وتحلیل آنالیز AFM همچنین حضور نانوذرات نقره بروی کاغذ فیلتری را به‌صورت خوشه‌ای نشان می‌دهد. با کشیدن خط سبز از قطر شکل ۴- (الف)، مشخصات مربوط به رافنس سطح بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری

به‌عنوان حسگر SERS با استفاده از نرم‌افزار Image Plus، (نسخه ۲٫۹) محاسبه شد. پارامترهای توپوگرافی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS در جدول-۲، مشاهده می‌شوند. پارامترهای جدول-۲، تأیید می‌کند که زیرلایه‌های کاغذهای فیلتری با نانوذرات نقره تزئین شده‌اند. زبری سطحی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS ایجاد شده است؛ می‌تواند مراکزی برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود[۴۶].

جدول ۲: مشخصات آنالیز AFM بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS را نشان می‌دهد.

میانگین عمیق‌ترین زبری Average maximum roughness valley depth (R_{vm}, nm)	میانگین مرتفع‌ترین زبری Average maximum height of the roughness (R_{tm}, nm)	ریشه میانگین زبری مربع Root mean square roughness (R_q, nm)	میانگین زبری Roughness Average (R_a, nm)
213.8	519.6	49.8	38.9



شکل ٤: (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی و (ج)، نمودار رافنس سطح بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS را نشان می‌دهد.

طیف رامان، طیف SERS، انحراف استاندارد نسبی (RSD) و منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت SERS، بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS در جهت شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP

طیف رامان نانوذرات نقره پوشش داده‌شده روی کاغذهای فیلتری به عنوان حسگر SERS (منحنی سبزرنگ)، طیف SERS محلول ۰/۰۱ مولار از داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS (منحنی آبی‌رنگ) و طیف رامان داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی کاغذهای فیلتری (منحنی قرمزرنگ) در شکل ۵-(الف) نشان داده شده است. در طیف رامان داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی کاغذهای فیلتری (منحنی قرمزرنگ) هیچ نوع ارتعاشی برای داروی CIP، دیده نشده است. بنابراین شناسایی این‌گونه شیمیایی حتی با طیف‌سنجی رامان در غلظت کمتر از ۰/۰۱ مولار ممکن نیست. با لایه‌نشانی‌کردن محلول داروی CIP، روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS ارتعاشات داروی CIP، مشاهده شده است [۴۷-۴۸]. ارتعاشات مولکولی داروی CIP و مقادیر جابه‌جایی (شیفت) رامان در طیف SERS این داروی CIP، در جدول-۳ گزارش شده است.

جدول ۳- ارتعاشات مولکولی داروی CIP و مقادیر جابجایی (شیفت) رامان در طیف SERS این داروی CIP.

ارتعاشات مولکولی	رامان شیفت (cm^{-1})
C-C stretch	٦٣٥
C-N stretch	٧٤٠
C-F bending	٨٩٢
O-C-O stretch	٩٤٤
C-C-O bending	١٠٥٧
N-H bending	١٠٩٩
C-F stretch	١١٢٨
CH_3 bending	١٢٩٤
C-C-O bending and methylene	١٤٣٧
C=O stretch	١٤٦٠
H-N-H bending	١٦٠٨

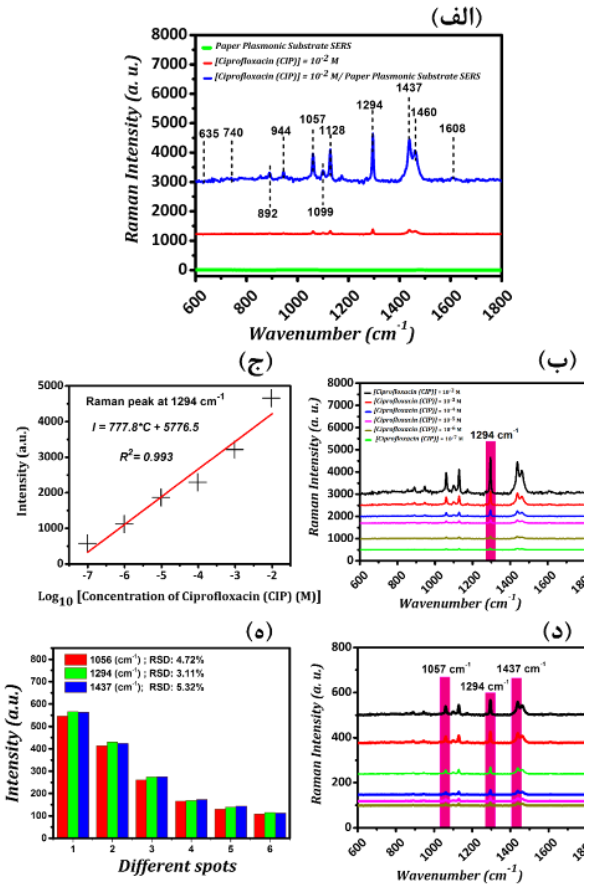
با بکاربردن بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، به‌دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر روی بستر، سیگنال طیف رامان تقویت شده است. ذرات بزرگتر نقره در شکل شکل ۳-(ج)، با پراکندگی نور لیزر برخورد کرده به داروی CIP، باعث تقویت سیگنال رامان شده‌اند. میدان الکتریکی قوی که اطراف نانوذرات نقره وجود دارد دلیل دیگری برای تقویت سیگنال رامان است. در واقع نانوذرات نقره در شکل ۳-(ج)، مشابه یک لنز نوری عمل می‌کنند که نور لیزر تابیده‌شده را متمرکز می‌کنند. بنابراین شدت میدان الکتریکی اطراف نانوذرات افزایش پیدا می‌کند و داروی CIP که اطراف این نانوذرات قرار می‌گیرند میدان الکتریکی قوی را تجربه می‌کنند و بیشتر قطبیده می‌شوند و درنتیجه ارتعاشات مولکولی و سیگنال رامان تقویت خواهد شد[۵۰-۴۹]. طیف رامان داروی CIP لایه‌نشانی‌شده روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، را در غلظت بین 10^{-2} تا 10^{-7} مولار در شکل ۵-(ب) نشان داده شده است. با کاهش غلظت داروی CIP با توجه به این که تعداد مولکول‌ها کم می‌شود، ارتعاشات مولکولی و شدت پیک نیز کاهش می‌یابد. بنابراین با کاهش غلظت، ارتعاشات کاهش می‌یابد و ارتعاشات مولکولی داروی CIP در غلظت کمتر از 10^{-7} مولار قابل شناسایی نیست. بنابراین بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، قابلیت شناسایی تا غلظت 10^{-7} مولار را دارند. شکل ۵-(ج) منحنی کالیبراسیون شدت پیک برحسب غلظت داروی CIP را نشان می‌دهد که بهترین منحنی برازش‌شده برای این نمودار در رابطه ۲ داده شده است که ضریب همگرایی این رابطه برابر با ۰/۹۹۲۶۹ است.

$$I = 777.8\,C + 5776.5 \quad (R^2 = 0.993) \qquad (۲)$$

در ادامه برای ارزیابی تکرارپذیری آزمایش با بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، غلظت ۷-۱۰ مولار داروی CIP، ۶ مرتبه در یک روز تکرار شد. شکل ۵-(د)، طیف رامان داروی CIP ، در غلظت ۷-۱۰ مولار و حجم ۱۰ میکرولیتر در ۶ تکرار روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، را نشان می‌دهد. همان‌طورکه نشان داده‌شده همه طیف‌های داروی CIP، در غلظت ۷-۱۰ مولار با هم همخوانی دارند و تفاوت و جابجایی در پیک‌ها مشاهده نمی‌شود. به‌منظور ارزیابی تکرارپذیری آزمایش بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، در پیک‌ها با اعدد موجی1-cm ۱۰۵۷، 1-cm ۱۲۹۴ و 1-cm ۱۴۳۷، از انحراف استاندار نسبی (RSD)، طبق رابطه ۳ استفاده شد[۵۲].

$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(I_i - I)^2}{n-1}}}{I} \qquad (۳)$$

در رابطه ۳، n تعداد طیف‌های رامان بررسی شده است که برابر با ۶ است، Ii شدت سیگنال رامان در هر پیک و همچنین I متوسط شدت سیگنال رامان در پیک‌های مشخص شده است. باتوجه به شکل ۵-(د)، تغییرات منحنی مربوط به ۶ آزمایش تکرارشده از غلظت ۷-۱۰ مولار در پیک‌های مشخص در اعدد موجی-cm ۱۰۵۷، 1-cm ۱۲۹۴ و 1-cm ۱۴۳۷، مقدار انحراف استاندارد نسبی به ترتیب برابر ۴/۷۲%، ۳/۱۱% و ۵/۳۲% است. علاوه بر این، شکل ۵-(ه)، نمودار میله‌ای تغییرات RSD را برای هر عدد موجی نشان می‌دهد. متوسط انحراف استاندارد نسبی برابر با ۴/۳۸%، است که نشان می‌دهد روش استفاده شده برای تعیین غلظت داروی CIP، ازنظر آماری بازدهی بالایی دارد. روش‌های تجزیه‌ای متنوعی مانند: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (chromatographi chigh-performance liquid) [۵۲]، طیف‌سنجی جرمی کروماتوگرافی مایع liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [۵۲]، برای تعیین غلظت داروی CIP، در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. معمولاً این روش‌ها limit of detection (LOD) کمی دارند و ازطرف‌دیگر آماده‌سازی نمونه و زمان تست طولانی است که باعث می‌شود هزینه تست هم افزیش پیدا کند.



شکل ۵: (الف)، طیف رامان نانوذرات نقره پوشش داده‌شده روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به عنوان حسگر SERS، (منحنی سبزرنگ)، طیف رامان محلول ۰/۰۱ مولار از داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی کاغذهای فیلتری (منحنی قرمزرنگ)، طیف رامان محلول ۰/۰۱ مولار از داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، (منحنی آبی‌رنگ). (ب)- طیف رامان داروی داروی CIP، در غلظت‌های مختلف روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS . (ج)- منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت پیک مطابق با ارتعاشات مولکولی داروی داروی CIP، CH3 bending لایه‌نشانی‌شده روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، در عدد موجی۱۲۹٤ cm-1. (د)- طیف رامان ٦ نقطه تکرارشده از داروی CIP، در غلظت ۱۰-۷ مولار و حجم ۱۰ میکرولیتر که RSD در اعداد موجی عدد موجی ۱۰۵۷ cm-1، cm-1 ۱۲۹٤ و cm-1 ۱٤۳۷، مقدار انحراف استاندارد نسبی به‌ترتیب برابر ۳/۱۱%، ٤/۷۲% و ۵/۳۲% است. (ه)- نمودار میله‌ای تغییرات RSD داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی روی بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS نسبت به تغییرات غلظت بین ۱۰-۲ تا ۱۰-۷ مولار.

محاسبات آزمایشگاهی فاکتور تشدید بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS

بسترهای فعال انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری به‌عنوان حسگر SERS، یک سنسور است که ارتعاشات مولکولی داروی CIP، لایه‌نشانی‌شده روی نانوذرات نقره پوشش داده‌شده روی کاغذهای فیلتری را ارزیابی می‌کند. این نوع بسترهای پوشش داده‌شده با نانوذرات برای محاسبه فاکتور تشدید (EF) طبق رابطه ۴ مورد استفاده قرار می‌گیرند [۵۳]:

$$EF_{exp} = \left(\frac{I_{SERS}}{I_{RS}}\right)\left(\frac{C_{RS}}{C_{SERS}}\right) \qquad (۴)$$

که در این رابطه، ISERS شدت پیک SERS، IRS شدت پیک رامان معمولی، CRS غلظت داروی CIP، در تست رامان معمولی و CSERS غلظت داروی CIP، روی بستر SERS را نشان می‌دهد. در این مطالعه مقدار ISERS برای عدد موجی ۱۳۵۵ cm-1 و غلظت ۱۰-۶ مولار برابر با ۱۸۰۵/۶۲۷ است. مقدار IRS در غلظت ۱۰-۲ مولار برابر با ۱۲۳۶/۲۵۰ است. با استفاده از رابطه ۴ مقدار EF برابر با ۱/۴۶۰*۱۰۷ است.

نتیجه‌گیری

با توجه به خطر بالقوه داروی CIP برای محیط زیست و انسان‌ها، تشخیص و آنالیز داروی CIP در محیط زیست به امری ضروری تبدیل شده است. بنابرین، در راستای این هدف، توسعه و استفاده از روش‌های شناسایی ارزان، ساده و تاییدشده برای شناسایی داروی CIP در محیط زیست بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به‌منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد که ناشی از داروی CIP، آشکارسازی این مولکول دارای اهمیت است. طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی و تشخیص گونه‌های مهم بیوشیمیایی (به‌ویژه پزشکی و زیستی) است. ساخت زیرلایه‌های فعال SERS، به‌علت سادگی فرآیند ساخت، کم‌هزینه‌بودن و قابلیت آشکارسازی مواد با غلظت‌های کم روش نوینی برای تشخیص مواد سمی، مواد مخدر، مواد شیمیایی سمی صنعتی، آنالیت‌های بیولوژیکی تجزیه‌وتحلیل گونه‌های زیستی و غیرزیستی دیگر در غلظت‌های کم است. توسعه زیرلایه جدید SERS همیشه یک موضوع داغ در تحقیقات SERS است. علاوه‌بر پیگیری ساختار اجزا و مونتاژ آنها، توسعه زیرلایه SERS انعطاف‌پذیر با عملکرد

چندگانه یک روند جدید در سال‌های اخیر بوده است. به‌طور خلاصه ما در این مقاله موفق به ساخت بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری با چندین ویژگی جذاب مانند آماده‌سازی ساده، عملیات آسان، هزینه‌کم، راندمان بالا در غلظت و جداسازی و زمان تشخیص کوتاه را از خود نشان می‌دهند شده‌ایم. با قراردادن داروی CIP 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 ساخته شد. با استفاده از روش غوطه‌وری نانوذرات نقره بر روی زیرلایه‌های کاغذی فیلتری لایه‌نشانی شدند. با قراردادن داروی CIP بر روی بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS مبتنی بر کاغذهای فیلتری و با تابش لیزر رامان سیگنال رامان به‌دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره که در روش شیمیایی، از محلول بر روی سطح کاغذهای فیلتری، نشانده شده‌اند بهبود می‌یابد و موجب شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP شد. با مشاهده قله تشدید پلاسمونی محلول کلوییدی فاز آبی در ۴۴۲ نانومتر حضور نانوذرات نقره در محلول کلوییدی فاز آبی تایید شد. مورفولوژی و ریخت‌شناسی نانوذرات نقره سنتزشده و نانوذرات نقره لایه‌نشانی‌شده روی زیرلایه کاغذی فیلتری با استفاده از تصویر FE-SEM، مشخص گردید. با مشاهده تصاویر FE-SEM، نانوذرات نقره سنتزشده به شکل نانوذرات کروی غیریکنواخت هستند. در ادامه با مشاهده تصاویر FE-SEM، بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS مبتنی‌بر کاغذهای فیلتری نانوذرات کروی به‌صورت غیریکنواخت بروی زیرلایه‌های کاغذی فیلتری زبر و غیریکنواخت لایه‌نشانی شده‌اند. با استفاده از آنالیز XRD فازهای بلورین (کریستالی) و همچنین ساختار FCC نانوذرات نقره سنتزشده و همچنین لایه‌نشانی‌شده بروی زیرلایه‌های کاغذی فیلتری به‌عنوان بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS تایید شد. تصاویر دوبعدی و سه‌بعدی بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS با استفاده آنالیز AFM مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز AFM نشان داد که نانوذرات کروی نقره به‌صورت کروی غیریکنواخت بر روی کاغذ فیلتری با رافنس (زبری) زیاد قرار گرفته‌اند. حد تشخیص بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS برای شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP ۷-۱۰ مولار به‌دست آمد. میانگین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای ۱۰ اندازه‌گیری از داروی CIP در غلظت ۷-۱۰ مولار ۴/۳۸ درصد محاسبه شد. فاکتور بهبود بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS برای شناسایی ارتعاشات مولکولی داروی CIP به‌صورت تجربی ۱/۴۶۰*۱۰۷ محاسبه گردید. درنتیجه، مشاهده گردید که با استفاده از بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS می‌توان انواع داروها را ازجمله: داروی CIP را با حساسیت خیلی زیاد در غلظت‌های خیلی اندک تشخیص داد و روش SERS در مقایسه با روش‌هایی مانند MRLs روش ساده‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر است. بنابراین نتایج رامان به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که بستر انعطاف‌پذیر پلاسمونیکی فعال SERS به هدف تشخیص داروی CIP، با روش‌های توسعه یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی‌بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجربه توسعه حسگرهای نانویی می‌شوند.

References:

1. Vo-Dinh T.Surface-enhanced Ramanspectroscopy using metallic nanostructures, Trends in Analytical Chemistry,1998;17:557.
2. Fan MK, Andrade GFS, Brolo AG. A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry. Anal Chim Acta. 2020; 1097:1-29.
3. Schlücker S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications. Angew Chem Int Ed.2014;53(7):4756-95.
4. Wallace GQ, Masson J-F. From single cells to complex tissues in applications of surface-enhanced Raman scattering. Analyst. 2020; 145 (22):7162-85.
5. Yang B, Jin SL, Guo S, Yeonju P, Chen L, Zhao B, et al. Recent development of SERS technology: semiconductor-based study. ACS Omega. 2019; 4:20101-8.
6. Xu FG, Xie S, Cao RT, Feng YN, Ren CJ, Wang L. Prepare poly-dopamine coated graphene@silver nanohybrid for improved surface enhanced Raman scattering detection of dyes. Sens Actuators B-Chem. 2017; 243:609-16.
7. Lai HS, Shang WJ, Yun YY, Chen DJ, Wu LQ, Xu FG. Uniform arrangement of gold nanoparticles on magnetic core particles with a metal-organic framework shell as a substrate for sensitive and reproducible SERS based assays: Application to the quantitation of Malachite Green and thiram. Microchim Acta. 2019; 186:144.
8. Han XX, Ji W, Zhao B, Ozaki Y. Semiconductor-enhanced Raman scattering: active nanomaterials and applications. Nanoscale. 2017; 9 (15):4847-61.
9. Lai HS, Xu FG, Zhang Y, Wang L. Recent progress on graphene-based substrates for surface-enhanced Raman scattering applications. J Mater Chem B. 2018;6:4008-28.
10. Lai HS, Li GK, Xu FG, Zhang ZM. Metal-organic frameworks: opportunities and challenges for surface-enhanced Raman scattering-a review. J. Mater. Chem. C. 2020;8:2952-63.
11. Xu KC, Zhou R, Takei K, Hong MH. Toward flexible surface-enhanced Raman scattering (SERS) sensors for point-of-care diagnostics. Adv Sci. 2019; 6(16):1900925.
12. Restaino SM, White IM, A critical review of flexible and porous SERS sensors for analytical chemistry at the point-of-sample. Anal Chim Acta. 2019; 1060:17-29.
13. Tay L-L, Poirier S, Ghaemi A, Hulse J, Wang S, Paper-based surface-enhanced Raman spectroscopy sensors for field applications. J Raman Spec. 2021; 52:563-72.
14. Ying HN, Li D, George PS, Gil G. Gold nanoparticle-paper as a three-dimensional surface. Langmuir. 2012; 28:8782-90.
15. Zhao B, Lu Y, Zhang CY, Fu YZ, Moeendarbari S, Shelke SR, et al. Silver dendrites decorated filter membrane as highly sensitive and reproducible three dimensional surface enhanced Raman scattering substrates. Appl Surf Sci. 2016; 387(30):431-6.
16. Kong LS, Dong NX, Tian GF, Qi SL, Wu DZ. Highly enhanced Raman scattering with good reproducibility observed on a flexible PI nanofabric substrate decorated by silver nanoparticles with controlled size. Appl Surf Sci. 2020; 511:145443.
17. Dong J, Zhao X, Cao E, Han QY, Liu L, Zhang WW, et al. Flexible and transparent Au nanoparticle/graphene/Au nanoparticle 'sandwich' substrate for surface-enhanced Raman scattering. Mater Today Nano. 2020; 9:100067.
18. Huang CC, Cheng CY, Lai YS. Paper-based flexible surface enhanced Raman scattering platforms and their applications to food safety. Trends Food Sci Tech. 2020; 100: 349-58.
19. Ogundare SA, Zyl WEV. A review of cellulose-based substrates for SERS: fundamentals, design principles, applications. Cellulose. 2019; 26(11):6489-528.

20. Yu WW, White IM. A simple filter-based approach to surface enhanced Raman spectroscopy for trace chemical detection. Analyst. 2012; 137(5):1168-73.

21. Barry, A.L. and P.C. Fuchs, Anti-staphylococcal activity of temafloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin and enoxacin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1991. 28(5): p. 695-699.

22. Kümmerer, K., Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I . Chemosphere, 2009. 75(4): p. 417-434.

23. Thu, V.T., et al., Trace detection of ciprofloxacin antibiotic using surface-enhanced Raman scattering coupled with silver nanostars. Optik, 2022. 260: p. 169043.

24. Turiel, E., G. Bordin, and A.R. Rodríguez, Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography–ultraviolet detection. Journal of Chromatography A, 2003. 1008(2): p. 145-155.

25. Ferech, M., et al., European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006. 58(2): p. 401-407.

26. Ebert, I., et al., Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011. 30(12): p. 2786-2792.

27. Girardi, C., et al., Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. Journal of Hazardous Materials, 2011 :۱۹۸ .p. 22-30.

28. Al-Ahmad, A., F.D. Daschner, and K. Kümmerer, Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Sulfamethoxazole and Inhibition of Waste Water Bacteria. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1999 :(۲)۳۷ .p. 158-163.

29. Davies, J. and D. Davies, Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010. 74(3): p. 417-433.

30. Stahlmann, R. and H. Lode, Toxicity of Quinolones. Drugs, 1999. 58(2): p. 37-42.

31. Halling-Sørensen, B., et al., Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. (1460-2091 (Electronic)).

32. Liu, X., J.C. Steele, and X.-Z. Meng, Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. Environmental Pollution, 2017. 223: p. 161-169.

33. Huang, W., et al., Colorimetric detection of ciprofloxacin in aqueous solution based on an unmodified aptamer and the aggregation of gold nanoparticles. Analytical Methods, 2021. 13(1): p. 90-98.

34.W. Ji, L. Wang, H. Qian, W. Yao, Quantitative Analysis of Amoxicillin Residues in Foods by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, Spectrosc.Lett.47(6)(2014)451–457.

35. Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, and S. Venkateswaran, "Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process," Journal of Materials Chemistry, vol. 12, pp. 522-527, 2002.

36. Yin, H., Langford, R., and Burrell, R. (1999) Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing, The Journal of burn care & rehabilitation. 20, 195.

37. N. A. Begum, S. Mondal, S. Basu, R. A. Laskar and D. Mandal. "Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2009; 71: 113-118.

38. Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, et al. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle

Deposition. Journal of the American Chemical Society. 2015; 137: 1726-9.

39. S. Jafarirad, M. Mehrabi, B. Divband and M. Kosari-Nasab. "Biofabrication of zinc oxid nanoparticles using fruit extract of rosa canina and their toxic potential against bacteria: a mechanistic approach" Materials Science and Engineering: C 2016; 59, 296–302.

40. S. Jafarirad and S. Poorgholi. "Application of CuO nanoparticles which synthesized using Fumaria officinalis plant extract in preparing hair color to enhance health". Nanomaterials 2015; 7: 95-103.

41. Beyene D, Chae M, Dai J, Danumah C, Tosto F, Demesa AG, Bressler DC. Characterization of cellulase-treated fibers and resulting cellulose nanocrystals generated through acid hydrolysis. Materials. 2018 Aug; 11(8):1272.

42. Singh H, Du J, Singh P, Yi TH. Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by Euphrasia officinalis leaf extract and its biomedical applications. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2018 Aug 18; 46(6):1163-70.

43. Wei W, Huang Q. Rapid fabrication of silver nanoparticle-coated filter paper as SERS substrate for low-abundance molecules detection. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017 May 15; 179:211-5.

44. Villa JE, Santos DP, Poppi RJ. Fabrication of gold nanoparticle-coated paper and its use as a sensitive substrate for quantitative SERS analysis. Microchimica Acta. 2016 Oct; 183(10):2745-52.

45. Wei W, Huang Q. Rapid fabrication of silver nanoparticle-coated filter paper as SERS substrate for low-abundance molecules detection. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017 May 15; 179:211-5.

46. 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.

47. Yang L, Qin X, Jiang X, Gong M, Yin D, Zhang Y, Zhao B. SERS investigation of ciprofloxacin drug molecules on TiO 2 nanoparticles. Physical Chemistry Chemical Physics. 2015;17(27):17809-15.

48. Sahoo SU, Chakraborti CK, Behera PK. FTIR and Raman spectroscopic investigations of a controlled release Ciprofloxacin/Carbopol940 mucoadhesive suspension. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2012;5(1):125-30.

49. 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.

50. 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.

51. 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.

52. Thu VT, Cuong NM, Cao DT, Hung LT, Ngan LT. Trace detection of ciprofloxacin antibiotic using surface-enhanced Raman scattering coupled with silver nanostars. Optik. 2022 Jun 1; 260:169043.

53. T. Liyanage et al., "Optimization of electromagnetic hot spots in surface-enhanced Raman scattering substrates for an ultrasensitive drug assay of emergency department patients' plasma," Analyst, vol. 145, no. 23, pp. 7662–7672, 2020, doi: 10.1039/D0AN01372B.