لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۹، دورهٔ ۱۷، شمارهٔ ۲، صفحات: ۳۵-۲۶.

مقاله پژوهشی

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

وحید اسکندری [۱]
نفیسه شریفی [۲]

خلاصه

مقدمه: روش پراکندگی رامان بهبودیافتهٔ سطحی (SERS[1])، یکی از روش‌های کارآمد برای شناسایی مقادیر اندک و حتی شناسایی تک مولکول است. طیف‌سنجی رامان به کمک سطوح فلزی زبر می‌تواند برای شناسایی مقادیر اندک مواد گوناگون به‌کار گرفته شود. با قرار گرفتن گونه‌های مختلف در نزدیکی سطح فلز و جذب فیزیکی آن‌ها روی سطح فلزی به علت برهم‌کنش میان پلاسمون‌های سطحی فلز و ارتعاش‌های مولکولی گونه‌ها، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد. ژلاتین نیز یکی از پرمصرف‌ترین مواد پروتئینی کلوئیدی در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و نظامی است که برای شناسایی این ماده می‌توان استفاده از تکنیک SERS را پیشنهاد کرد.

روش بررسی: در این مطالعهٔ تجربی، محلول کلوئیدی نقره و محلول کلوئیدی طلا ساخته شدند و با استفاده از روش قطره‌افشان با چکاندن محلول کلوئیدی نقره و محلول کلوئیدی طلا برروی زیرلایه‌های شیشه‌ای مجزا، بسترهای پلاسمونیکی ساخته شدند. در نهایت، با استفاده از این بسترهای پلاسمونیکی و طیف‌سنجی رامان، بهبود سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین بررسی شدند و درادامه بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا ازنظر آشکارسازی ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین مقایسه شدند.

یافته‌ها: قلهٔ پلاسمونی نانوذرات نقره و نانوذرات طلا به‌ترتیب در حدود ۴۱۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر و مشاهدهٔ ساختار FCC در مشخصه‌یابی XRD آن‌ها، تشکیل نانوذرات نقره و نانوذرات طلا را تأیید کرد. قلهٔ پلاسمونی طیف خاموشی بسترهای پلاسمونیکی نقره و بسترهای پلاسمونیکی طلا به‌ترتیب حدود ۴۴۲ نانومتر و ۵۵۳ نانومتر مشاهده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) بسترهای پلاسمونیکی نشان می‌دهد که تعداد زیادی از ذرات نقره اندازهٔ بین ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر و تعداد زیادی از ذرات طلا اندازهٔ بین ۱۳۰۰ تا ۱۴۰۰ نانومتر دارند. زبری که برای بسترهای پلاسمونیکی طلا و نقره در تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشاهده می‌شود، به پراکندگی نور از نقاط زبر کمک می‌کند. با قرار دادن مولکول ژلاتین روی بسترهای پلاسمونیکی نقره و یا طلا به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات کوچک‌تر و پراکندگی نور از نانوذرات بزرگ‌تر نقره یا طلا، ارتعاش‌های مولکول ژلاتین تقویت شوند و شدت طیف SERS این دو بستر در مقایسه با شدت طیف رامان آن‌ها افزایش می‌یابد.

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

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

1. Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

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

واژه‌های کلیدی: ژلاتین، بسترهای پلاسمونیکی، حسگر زیستی، نقره، طلا، طیف‌سنجی رامان بهبودیافتهٔ سطحی (SERS)

نویسندهٔ‌مسئول: نفیسه شریفی تلفن: ۰۳۱۵۵۹۱۳۲۲۰
پست الکترونیک: sharifi@kashanu.ac.ir

مقدمه

ژلاتین یک مادهٔ پروتئینی کلوئیدی و قدیمی‌ترین ماکرومولکولی است که از هیدرولیز کلاژن موجود در پوست، استخوان و بافت پیوندی حیوانات ازجمله دام، طیور و آبزیان به‌دست می‌آید[۱]. ژلاتین یکی از پرمصرف‌ترین مواد پروتئینی کلوئیدی است که در چهار درجهٔ متفاوت خوراکی، صنعتی، فوتوگرافی و دارویی تولید می‌شود. بخشی از ژلاتین تولیدشده در جهان از پوست و استخوان گاو، خوک، گوساله و پوست ماهی کپور تهیه می‌گردد که مصرف برخی از آن‌ها از لحاظ شرعی در کشورهای مسلمان اشکال دارد. خطر انتقال بیماری جنون گاوی به انسان که تاکنون دام‌های زیادی را در اروپا و کشورهای دیگر مبتلا کرده است، به‌وسیلهٔ ژلاتین تولیدی از پوست و استخوان دام‌ها نیز وجود دارد [۲-۴]. درحال‌حاضر، برای تعیین مقدار ژلاتین روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی گازی[1] و اسپکترومتری جرم[2][۵ و۶]، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC[3]) [۷] و طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ رامان (FT-Raman[4]) [۸-۱۰] به‌کار برده می‌شود. این روش‌ها روش‌هایی مخرب، دشوار، آلاینده، درون‌آزمایشگاهی و نیازمند آماده‌سازی نمونه، نیروی متخصص آموزش‌دیده، آزمایشگاه‌های مجهز و صرف وقت و هزینهٔ بسیار هستند. طیف‌سنج‌های مبتنی‌بر الکترون و یون نیز به خلأ بالا نیاز دارند. ازاین‌رو، توسعهٔ یک روش غیرمخرب، با کاربری ساده، سریع، کم‌هزینه، ناآلاینده با قابلیت حمل و کاربرد خارج از محیط آزمایشگاه و نیاز به آماده‌سازی کم‌تر نمونه بسیار ضروری است. ازطرفی شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک از ژلاتین نیز مورد توجه است. با استفاده از طیف‌سنجی زیرقرمز و طیف‌سنجی رامان که هر دو طیف‌سنجی اثر انگشتی محسوب می‌شوند و ارتعاش‌های مولکولی ماده را بررسی می‌کنند، می‌توان مواد و آنالیت‌های بیولوژیکی را شناسایی کرد[۱۱و۱۲]. در طیف‌سنجی زیرقرمز به‌دلیل فعال بودن ارتعاش‌های مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در طیف‌سنجی رامان نیز به‌دلیل ضعیف بودن ذاتی سیگنال حاصل از پراکندگی رامان، مطالعهٔ مولکول‌ها با غلظت‌های اندک عملاً امکان‌پذیر نیست[۱۳]. یکی از روش‌هایی که می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد، استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به‌دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی می‌توانند میدان الکتریکی قوی را در نزدیک نانوساختارها ایجاد کنند یا با افزایش میزان پراکندگی نور از این نانوساختارها، سیگنال پراکندگی را به‌طور مؤثر بهبود می‌دهند که به‌دنبال آن ارتعاش‌های مولکولی با سیگنال بهتر و بیشتری مشاهده خواهند شد. این روش طیف‌سنجی رامان بهبود یافتهٔ سطحی (SERS) نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که نتیجهٔ آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که برروی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند[۱۴]. درواقع، با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلزی،

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

در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوساختارهای فلزی به‌وسیلهٔ میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبودیافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود[۱۵و ۱۶]، گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت‌شده است. بنابراین مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبودیافته قرار می‌گیرد، بیش‌تر قطبیده می‌شود و درنتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد[۱۷]. در این روش هنگامی‌که آنالیت‌های مورد مطالعه در نزدیک سطح فلز قرار می‌گیرند یا به‌طور فیزیکی جذب نانوذرات فلزی می‌شوند، به‌علت برهمکنش آنالیت‌ها و پلاسمون‌های سطحی فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد و بدین‌ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق آنالیت‌های میکروبیولوژیکی استفاده شود. در این مطالعه به هدف طراحی و ساخت حسگر ساده با سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش‌پذیری، تکرارپذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده ابتدا نانوذرات نقره و نانوذرات طلا به‌ترتیب با عامل کاهندهٔ ساکاروز و عامل کاهندهٔ تری‌سدیم‌سیترات‌دوآبه با استفاده از روش سادهٔ شیمیایی ساخته شدند و سپس برروی زیرلایه‌های شیشه‌ای قرار گرفتند تا بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا برای تشخیص و تعیین غیرمخرب ژلاتین در غلظت‌های مختلف استفاده شود. شکل۱، طرح‌واره‌ای از روش ساخت حسگر پلاسمونیکی زیستی SERS، قرار دادن ژلاتین روی آن‌ها به روش قطره‌افشان و نتایج طیف رامان ارائه می‌شود. که با تابش نور لیزر با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر، سیگنال نور رامان پراکنده‌شده اندازه‌گیری می‌شود.

روش بررسی

روش‌های ساخت و شناسایی

روش ساخت بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا

ابتدا به‌منظور ساخت محلول کلوئیدی نقره از روش شیمیایی تولنز استفاده شد که در روش تولنز از سه محلول آبی شامل (۱)۱۲ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات ۰/۱ مولار، (۲)۲۰ میلی‌لیتر محلول پتاس ۰/۰۵ مولار و (۳)۱۰ میلی‌لیتر محلول ساکاروز ۰/۰۷ مولار استفاده می‌شود. با افزودن محلول ساکاروز برروی محلول آمونیاکی نقره نیترات و پتاس با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد پس از گذشت حدود ۴ دقیقه نانوذرات نقره تشکیل می‌شود[۱۸]، درادامه به‌منظور ساخت محلول کلوئیدی طلا به ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۱ mM نمک طلای $HAuCl_4$ در حال جوش و هم‌خوردن، ۲ میلی‌لیتر محلول ۳۸/۸ mM از محلول تری‌سدیم‌سیترات دوآبه ($NaC_6H_5O_7.H_2O$) اضافه شد که کلوئید ارغوانی‌رنگ نهایی حاوی نانوذرات طلا است. سپس، قطعات شیشه‌ای با ابعاد ۲ cm × ۲ cm پس از شستشو با شوینده و آب با استون شستشو داده شدند که همزمان از امواج فراصوت نیز استفاده شد. پس از خشک شدن این قطعات شیشه‌ای در دمای ۴۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت‌دهی شدند تا آلودگی‌های آلی نیز از سطح شیشه حذف شوند و سطح آن‌ها آب‌دوست شوند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول‌های کلوئیدی به‌طور مجزا برروی زیرلایه‌های شیشه‌ای پخش و در دمای آزمایشگاه خشک شدند و سپس به‌عنوان بسترهای پلاسمونیکی برای تشخیص و تعیین غیرمخرب ژلاتین در غلظت‌های مختلف استفاده شدند. برای آشکارسازی مولکول ژلاتین ابتدا غلظت ۰/۱ M از آن با استفاده از حلال آب بدون یون (DI) ساخته شد و غلظت‌های 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6} و 10^{-7} مولار آن‌ها تهیه شد. در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌های تهیه‌شده به‌صورت جداگانه و به روش قطره‌افشان برروی بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا به‌طور مجزا قرار گرفت و پس از خشک شدن، طیف رامان مولکول ژلاتین قراردادهشده روی شیشه و طیف SERS مولکول ژلاتین قراردادهشده روی بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا اندازه‌گیری شدند.

مشخصه‌یابی

دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتوی X پودر نقره و پودر طلا به‌ترتیب به‌وسیلهٔ دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 و دستگاه X Pert -Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند با پرتوی تک‌فام Cu Kα با طول‌موج ۰/۱۵۴ نانومتر، جریان ۴۰ میلی‌آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به‌وسیلهٔ دستگاه Hitach مدل S4160 و تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه شرکت نانوسیستم پارس ساخت ایران بررسی شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان Takram مدل P50C0R10 ساخت شرکت تکسان با تابش نور لیزر Nd:YAG، با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم ۷۵ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

طیف جذب محلول کلوئیدی نقره و طلا و طیف خاموشی بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا

شکل۱- (الف)، محلول کلوئیدی نقره و طیف جذب آن و شکل۱- (ب)، محلول کلوئیدی طلا و طیف جذب آن را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قلهٔ تشدید پلاسمونی به‌ترتیب در ۴۱۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر تشکیل نانوذرات نقره و نانوذرات طلا را تأیید می‌کند[۱۹]. مشاهدهٔ یک قلهٔ جذبی در طیف‌های جذبی نانوذراتی مانند نقره و طلا بیانگر شکل کروی یا شبه کروی بودن نانوذرات است[۲۰].

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

پوشیده‌شده از نانوذرات طلا را نشان می‌دهد (سمت راست). ظاهر شدن قلهٔ تشدید پلاسمونی در ۴۴۲ نانومتر و ۵۵۳ نانومتر به‌ترتیب تشکیل نانوذرات نقره و نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای را تأیید می‌کند. با تغییر محیط دربردارندهٔ این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند، جابه‌جایی در طول‌موج 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] ۲۱[. باتوجه به شکل ۱، بر خلاف محلول کلوئیدی پایدار که نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند، با قرارگرفتن نانوذرات نقره و نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای، حین خشک شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی بسترها شکل می‌گیرد به‌گونه‌ای‌که می‌توان این کلوخه‌ها را ذرات بزرگ‌تری درنظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می‌شود] ۲۱[، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است] ۲۱[، 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.

طیف الگوی XRD نانوذرات نقره و نانوذرات طلا

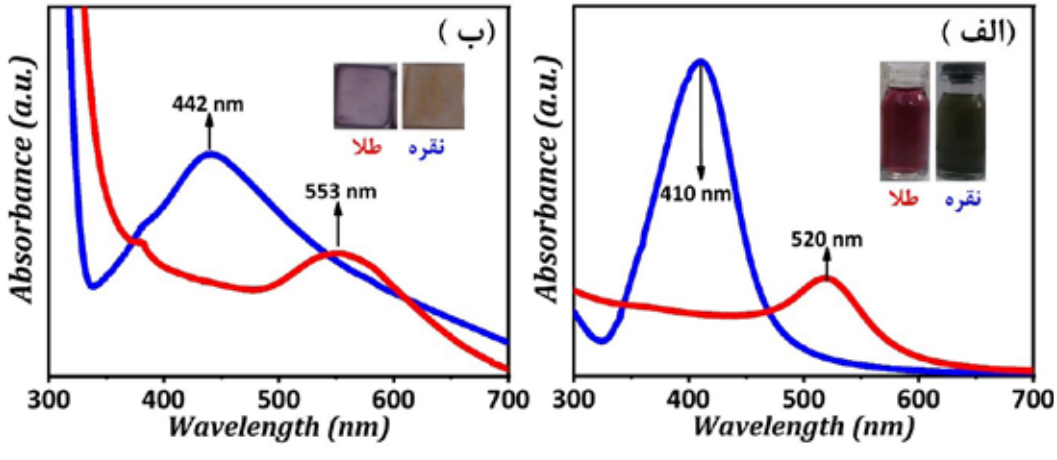
شکل-۲ (الف)، الگوی پراش اشعهٔ ایکس نانوذرات نقره است که با مشاهدهٔ بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویهٔ 2θ برابر با ۳۸/۲۴، ۴۴/۳۲ و ۶۴/۵۷ درجه که به‌ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰) و (۲۲۰) است، ساختار FCC نقره را تأیید می‌کند. (قلهٔ ظاهرشده در زاویهٔ 2θ برابر با ۳۳/۱۱ درجه نقره‌اکسید است که به‌دلیل شرایط محیطی آزمایشگاه ظاهر شده است). شکل۲- ب، الگوی پراش اشعهٔ ایکس نانوذرات طلا است که با مشاهدهٔ بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویهٔ 2θ برابر با ۳۸/۳۸، ۴۵/۵۲، ۶۴/۸۹ و ۷۷/۸۳ درجه که به‌ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است، ساختار FCC طلا را تأیید می‌کند.

تصاویر FE-SEM بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا و توزیع اندازهٔ آن‌ها

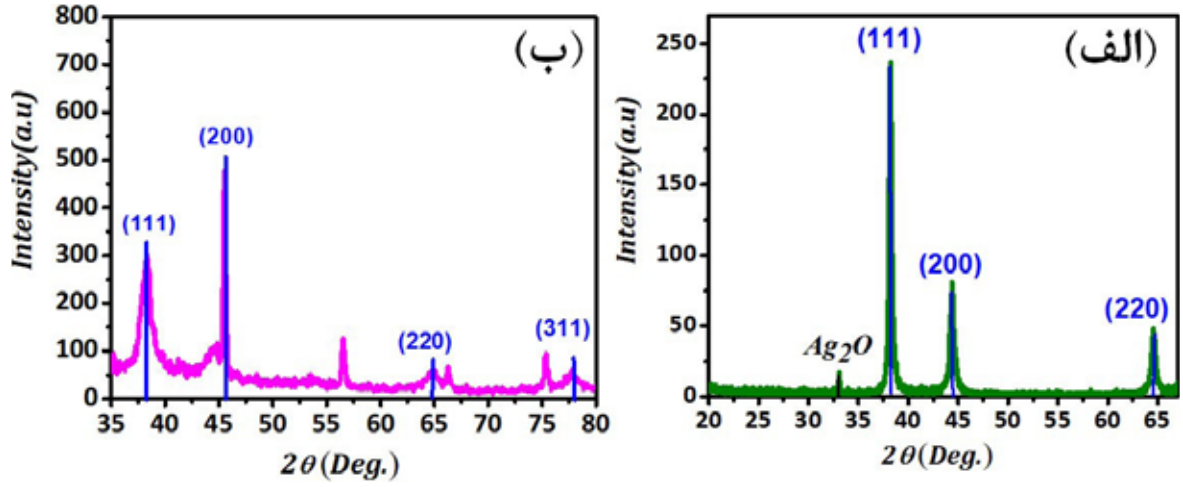
شکل ۳- (الف) و (ج) به‌ترتیب بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا را نشان می‌دهد و مجموعه‌ای از ذرات کروی یا شبه کروی در بخش‌های مختلف بسترها مشاهده می‌شود که توزیع اندازهٔ ذرات در شکل ۳- (ب) نقره و (د) طلا نشان می‌دهد که ذرات نقره اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات اندازهٔ ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر دارند. درمورد ذرات نقره نیز اندازه‌های بین ۵۰ تا ۱۶۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات نقره اندازهٔ ۱۳۰۰ تا ۱۴۰۰ نانومتر دارند. نانوذرات کوچک‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل‌توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره و طلا است و چنانچه مولکول‌های ژلاتین در این موقعیت‌ها قرار بگیرند، در معرض تابش میدان‌های الکتریکی نزدیک قرار می‌گیرند. ذرات بزرگ‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیکِ ناچیزی دارند و نور تابیده‌شده به آن‌ها از سطح آن‌ها پراکنده می‌شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می‌کنند [۲۲و۲۳].

تصاویر AFM بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا

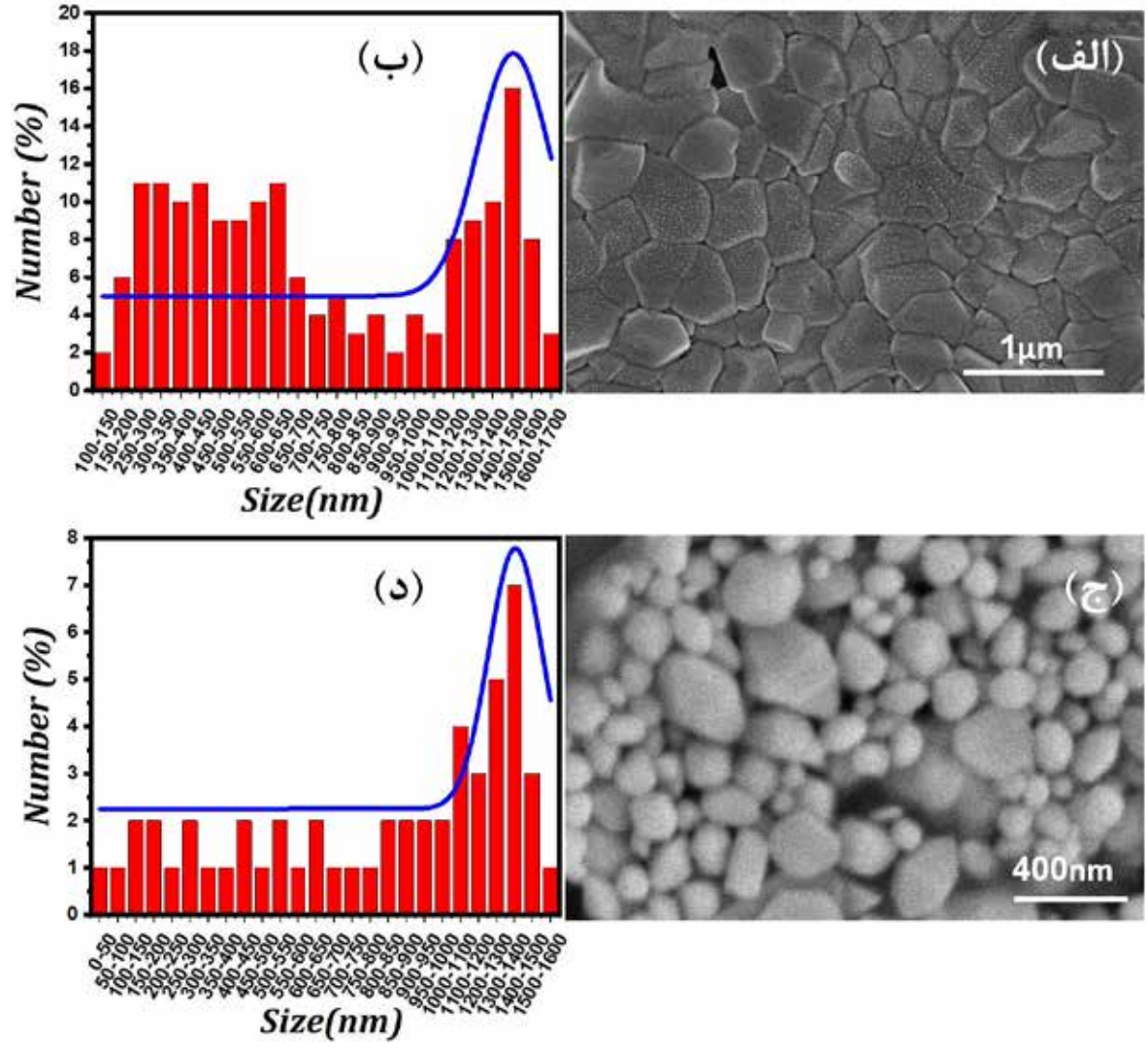
شکل ۴- الف و ب، به‌ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی بسترهای پلاسمونیکی نقره را نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Image Plus، (نسخهٔ ۹/۲) میانگین زبری ۴/۴۲ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۹/۲۳۸ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۳/۱۲۹ به‌دست آمد. شکل ۴-ج و د، به‌ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی بسترهای پلاسمونیکی طلا را نشان می‌دهد. میانگین زبری ۲/۲۰ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری



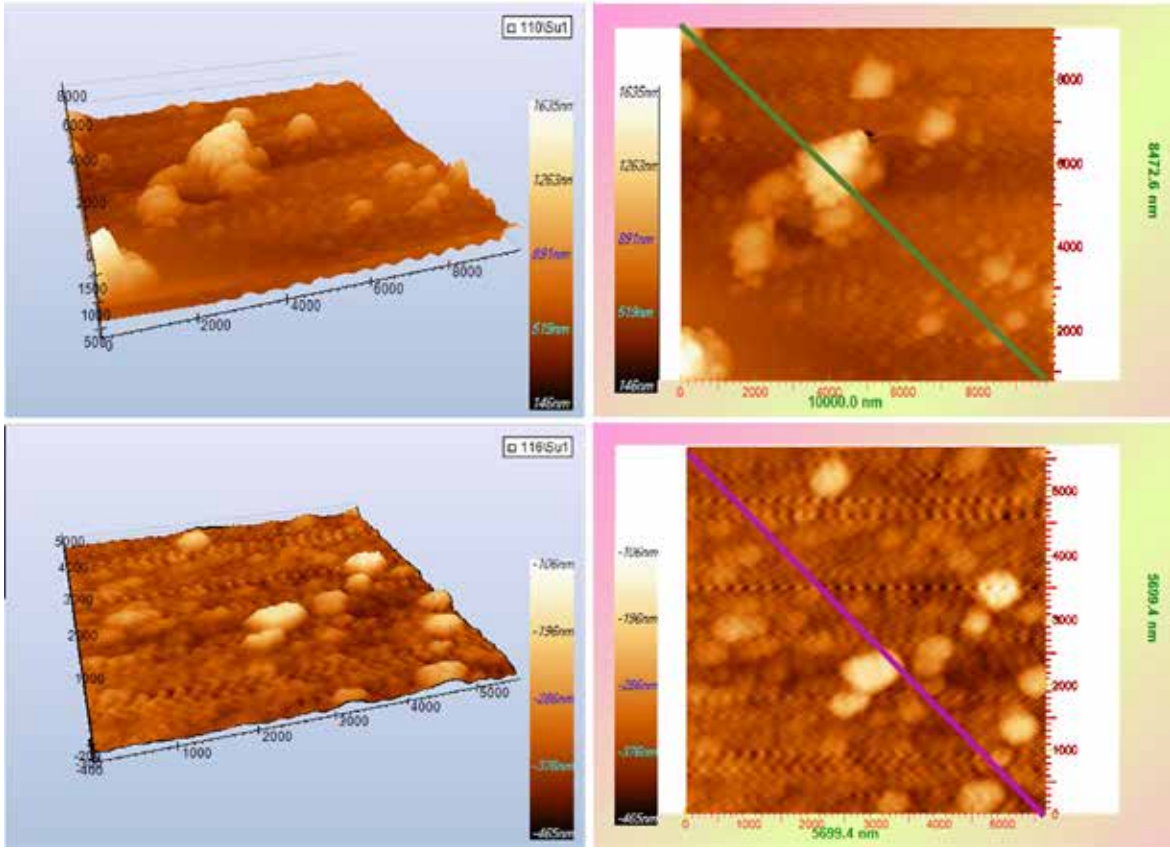
شکل۱: (الف)، طیف جذب نانوذرات نقره ساخته‌شده به روش شیمیایی تولنز با بیشینهٔ جذب در طول‌موج ۴۱۰ نانومتر (منحنی آبی) و تصویر ظرف حاوی محلول کلوئیدی نانوذرات نقره (سمت راست) و طیف جذب نانوذرات طلا ساخته‌شده به روش شیمیایی با بیشینهٔ جذب در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر (منحنی قرمز) و تصویر ظرف حاوی محلول کلوئیدی نانوذرات طلا (سمت چپ). (ب) طیف خاموشی بستر پلاسمونیکی نقره (منحنی آبی) و تصویر این بستر (سمت راست) و طیف خاموشی بستر پلاسمونیکی طلا (منحنی قرمز) و تصویر این بستر (سمت چپ)



شکل۲: (الف)، الگوی پراش اشعهٔ ایکس نانوذرات نقره و (ب)، الگوی پراش اشعهٔ ایکس نانوذرات طلا



شکل۳: (الف) تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیکی نقره، (ب) توزیع اندازهٔ ساختارهای بستر پلاسمونیکی نقره که اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند. (ج) تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیکی طلا، (ب) توزیع اندازهٔ ساختارهای بستر پلاسمونیکی طلا که اندازه‌های بین ۵۰ تا ۱۶۰۰ نانومتر دارند.



شکل۴: تصویر AFM (الف) دوبعدی و (ب) سه‌بعدی بسترهای پلاسمونیکی نقره و تصویر AFM (ج) دوبعدی و (د) سه‌بعدی بسترهای پلاسمونیکی طلا

۹/۲۷۴ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۹/۱۶۳ به‌دست آمد. زبری سطحی که به‌وسیلهٔ نانوذرات نقره و نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای حسگرهای پلاسمونیکی زیستی SERS ایجاد شده‌است، می‌تواند مراکزی برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود[۲۴].

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

در شکل ۵ طیف رامان بسترهای پلاسمونیکی نقره (منحنی قهوه‌ای) و طیف رامان بسترهای پلاسمونیکی طلا (منحنی بنفش)، طیف رامان مولکول ژلاتین قرارداده‌شده با غلظت 10^{-1} مولار برروی زیرلایهٔ شیشه‌ای (منحنی سبز)، طیف SERS مولکول ژلاتین قرارداده‌شده با غلظت 10^{-2} برروی بسترهای پلاسمونیکی نقره (منحنی آبی) و طیف SERS مولکول ژلاتین با غلظت 10^{-2} قرارداده‌شده برروی بسترهای پلاسمونیکی طلا (منحنی قرمز) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان مولکول ژلاتین که روی زیرلایه‌های شیشه‌ای قرار داده شده‌اند (منحنی سبز)، نشانی از ارتعاشات مولکولی مولکول ژلاتین مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این‌گونه حتی با غلظت 10^{-2} مولار و با استفاده از طیف‌سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن ژلاتین با غلظت 10^{-2} مولار برروی بسترهای پلاسمونیکی، ارتعاشات مولکولی ژلاتین (شکل۵) ظاهر می‌شوند. ارتعاشات مولکولی مولکول ژلاتین[۲و۲۵] به‌صورت خط‌چین‌هایی برروی طیف‌های مولکول ژلاتین در شکل ۵ نمایش داده شده است. در مورد مولکول ژلاتین قرارداده‌شده روی بستر پلاسمونیکی نقره و طلا، ارتعاشات Tryptophan، ارتعاشات کششی C-N، کششی C-N، کششی N-H، کششی C-H، خمشی H-C-H، کششی N-H و کششی N-H به‌ترتیب در ۸۸۳، ۱۱۸۹، ۱۴۷۹، ۱۷۲۶، ۲۷۰۹، ۳۰۷۵، ۳۶۷۶و ۴۵۴۳ cm^{-1} ظاهر می‌شوند. ارتعاشاتی که در طیف‌ها ظاهر شده‌اند، با خط‌چین‌های آبی نمایش داده شده است. بنابراین استفاده از نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در بسترهای پلاسمونیکی، بهبود ارتعاشات مولکولی مولکول ژلاتین را به‌دنبال دارد. با محاسبهٔ فاکتور بهبود (EF)، بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا مقایسه شدند که برای محاسبهٔ فاکتور بهبود (EF[۵]) از رابطهٔ (۱) استفاده شده است[۲۶].

$$EF = \frac{N_{vol} \times I_{surf}}{N_{surf} \times I_{vol}} \qquad (۱)$$

در رابطهٔ (۱)، Nvol و Nsurf به‌ترتیب غلظت ژلاتین قرارداده‌شده روی شیشه و قرارگرفته روی بسترهای پلاسمونیکی است. Ivol و Isurf نیز به‌ترتیب شدت طیف رامان و شدت طیف SERS است.

5. Enhanced Factor

با جای‌گذاری داده‌های بسترهای پلاسمونیکی در رابطهٔ (۱)، فاکتور بهبود (EF) برای بسترهای پلاسمونیکی نقره و طلا به‌ترتیب ۸/۹×۱۰۳ و ۱۹/۸×۱۰۳ به‌دست آمد که عملکرد بسترهای پلاسمونیکی طلا در مقایسه با بسترهای پلاسمونیکی نقره دارای فاکتور بهبود (EF) بالاتری است که تقویت بیشتر ارتعاشات مولکولی ژلاتین را سبب می‌شود. ارتعاشاتی از ژلاتین که در طیف‌ها ظاهر نشده‌اند با خط‌چین‌های قرمز نمایش داده شده است. معمولاً در دماهای پایین با از بین بردن افت و خیزهای حرارتی، ارتعاشاتی که به‌خصوص در عدد موج‌های کمتر اتفاق می‌افتند، قابل آشکارسازی می‌شوند[۲۷]. بنابراین، به این دلیل که طیف‌سنجی در دمای اتاق انجام شده است، ارتعاشات مولکولی که با خط‌چین‌های قرمز نمایش داده شده‌اند، در طیف SERS ظاهر نشده‌اند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بسترهای پلاسمونیکی به‌دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر روی سطح شیشه است. نقاط زبری که با نقره‌اندود و طلااندود کردن شیشه ایجاد شده است. ذرات بزرگ‌تر نقره و طلا که در شکل ۳- (الف) و (ب) مشاهده می‌شوند، با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده‌شده به مولکول ژلاتین، سیگنال رامان آن‌ها را بهبود می‌دهند. در کنار پراکندگی نور از ذرات بزرگ‌تر نقره و طلا یکی دیگر از دلایل بهبود سیگنال رامان، تشدید پلاسمون‌های سطحی ذرات کوچک‌تر نقره و طلا یا همان میدان‌های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات نقره و طلای مشاهده‌شده در شکل ۳- (الف) و (ب) 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 مولکول ژلاتین در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه می‌کنند و قطبیده‌تر می‌شوند و درنتیجه ارتعاش‌های مولکولی آن‌ها تقویت می‌شود و سیگنال‌های پرشدت‌تری را نشان می‌دهند [۲۸و۲۹].

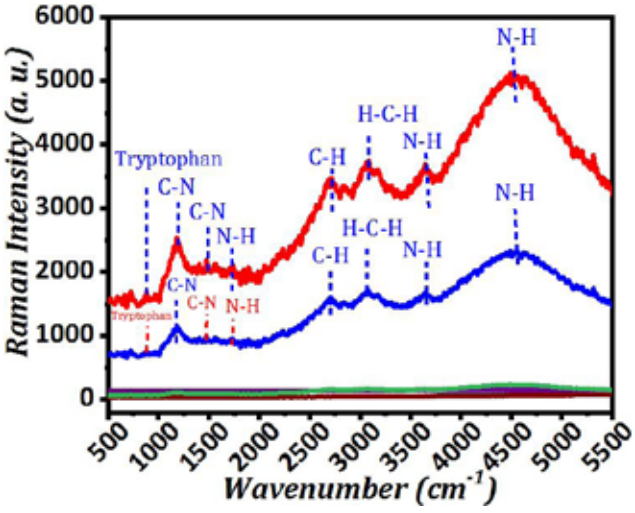
شکل۶-الف، طیف SERS ژلاتین با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) مولار قرارداده‌شده برروی بسترهای پلاسمونیکی نقره را نشان می‌دهد. با کاهش غلظت مولکول ژلاتین، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به‌دلیل کاهش تعداد مولکول‌های ژلاتین و درنتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به‌گونه‌ای که در غلظت‌های کم‌تر از 10^{-6} مولار، ارتعاش‌های ژلاتین به‌راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بستر پلاسمونیکی نقره می‌تواند تا غلظت 10^{-6} مولار ژلاتین را شناسایی کند. در داخل شکل۶-الف، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش مولکولی C-H در عدد موج ۱۱۸۵ cm^{-1} را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C نشان می‌دهد که با برازش انجام‌شده از رابطهٔ (۲) پیروی می‌کند.

$$I = ۱۵۱۴/۴\ C + ۲۶۲/۱ \quad (R^2 = ۰/۸۹) \qquad (۲)$$

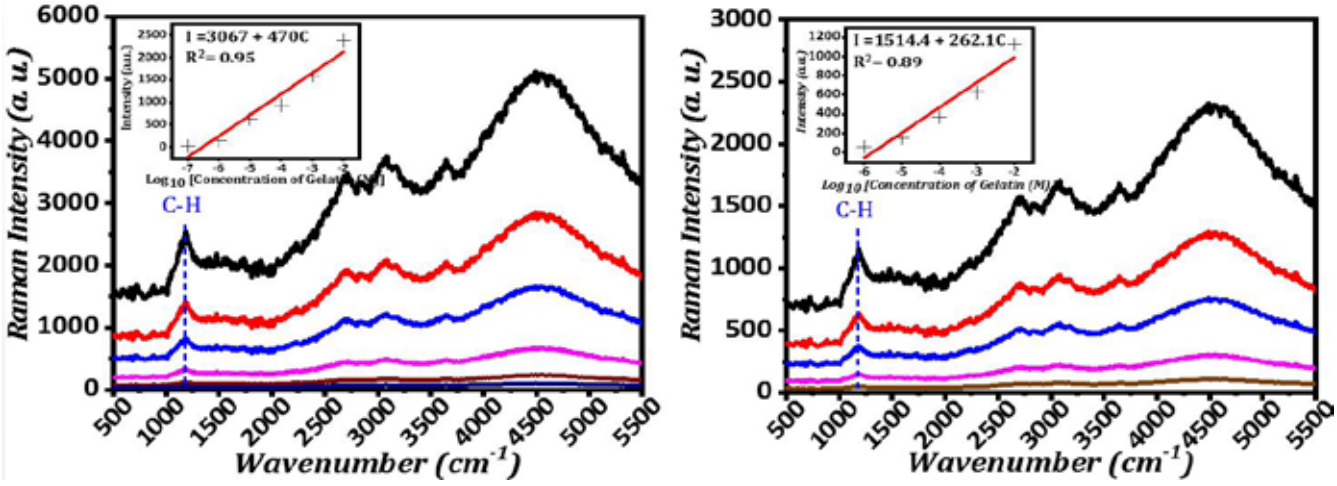
این رابطه خطی است و ضریب رگراسیون (R^2) آن برابر با ۰/۸۹ است. می‌توان با استفاده از این نمودار با مشاهدهٔ شدت قلهٔ ارتعاشی مولکول C-H در طیف رامان، غلظت آن را به‌دست آورد. هدف از ساخت بسترهای پلاسمونیکی، آشکارسازی غلظت‌های بسیار پایین ژلاتین است، خطی بودن منحنی کالیبراسیون غلظت‌های پایین از اهمیت بیشتری برخوردار است که در این مطالعه قابل مشاهده است و شکل ۶-ب، طیف SERS ژلاتین با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} (منحنی بنفش) مولار قرارداده‌شده برروی بسترهای پلاسمونیکی طلا را نشان می‌دهد. مانند بسترهای پلاسمونیکی نقره کاهش شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین با کاهش غلظت مشاهده می‌شود که ناشی از کاهش ارتعاش‌های مولکولی است که درنتیجه کاهش غلظت ژلاتین رخ می‌دهد. ارتعاش‌های مولکولی ژلاتین در غلظت‌های کمتر از 10^{-7} مولار به‌راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بسترهای پلاسمونیکی طلا می‌توانند تا غلظت 10^{-7} مولار از مولکول ژلاتین را شناسایی کند. در داخل شکل ۶-ب، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش مولکولی C-H در عدد موج ۱۱۸۵ cm^{-1} را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C نشان می‌دهد که با برازش انجام‌شده از رابطهٔ (۳) تبعیت می‌کند.

$$I = ۱۵۱۴/۴\ C + ۲۶۲/۱ \quad (R^2 = ۰/۹۵) \qquad (۳)$$

رابطه خطی است و ضریب رگراسیون (R^2) آن برابر با ۰/۹۵ است که محاسبهٔ غلظت ژلاتین با توجه به شدت طیف SERS را فراهم می‌آورد.



شکل۵: طیف رامان بستر پلاسمونیکی نقره (منحنی قهوه‌ای)، طیف رامان بستر پلاسمونیکی طلا (منحنی بنفش)، طیف رامان ژلاتین با غلظت 10^{-2} قرارداده‌شده برروی بستر شیشه‌ای (منحنی سبز)، طیف SERS ژلاتین قرارداده‌شده با غلظت 10^{-2} برروی بستر پلاسمونیکی نقره (منحنی آبی) و طیف SERS ژلاتین قرارداده‌شده با غلظت 10^{-2} برروی بستر پلاسمونیکی طلا با غلظت 10^{-2} (منحنی قرمز). ارتعاشات مولکولی که در طیف SERS ظاهر شده‌اند، با خط‌چین آبی و ارتعاشات مولکولی که ظاهر نشده‌اند، با خط‌چین قرمز مشخص شده است.



شکل۶- (الف) طیف SERS ژلاتین قرارداده‌شده با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) برروی بسترهای پلاســمونیکی نقره. داخل شکل الف، منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت، I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش C-H در عدد موج $1185\ cm^{-1}$، برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C برای بســترهای پلاسمونیکی نقره نمایش داده شده است. (ب) طیف SERS ژلاتین قرارداده‌شــده با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی) و 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} (منحنی بنفش) برروی بســترهای پلاسمونیکی طلا. داخل شکل (ب) منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت، I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش C-H در عدد موج $1185\ cm^{-1}$، برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت ژلاتین، C برای بسترهای پلاسمونیکی طلا نمایش داده شده است.

نتیجه‌گیری

به‌منظور شناســایی و کنترل بیماری‌های متعدد ناشــی از مولکول ژلاتین، تشــخیص مولکول ژلاتین در غلظت‌هــای کم دارای اهمیت اســت. روش طیف‌ســنجی رامان روشــی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها اســت اما، بــه دلیل ضعیف بــودن ســیگنال رامان عملاً شناســایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیســت. با قرار دادن مولکــول ژلاتین در معرض تشــدید پلاســمون‌های ســطحی نانــوذرات فلــزی مانند نقره و طــلا و همچنین نور پراکنده‌شــده از ذرات بــزرگ فلزی می‌توان ســیگنال رامان را بهبــود داد. بنابراین، ابتــدا نانوذرات نقره و نانوذرات طلا با اســتفاده از احیای شــیمیایی نمک نقره و نمک طلا ســاخته شــدند و در ادامه با به‌کارگیری روش قطره‌چکان که روشــی ســاده، سریع و ارزان اســت، نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در دمای اتاق برروی بســترهای شیشــه‌ای لایه‌نشانی شــدند و این بســترها به عنوان بسترهای حســگرهای پلاسمونیکی زیســتی SERS جهت آشکارســازی مولکول ژلاتین استفاده شدند. با کاهــش غلظت مولکول ژلاتین ســیگنال رامان آن‌هــا نیز کاهش می‌یابــد که این بســترهای پلاســمونیکی ساخته‌شــده از نانوذرات نقــره و نانوذرات طلا قادر به شناســایی مولکول ژلاتیــن به‌ترتیب تا غلظــت ۱۰-۶ مولار و ۱۰-۷ مولار هســتند. بهبود ســیگنال رامان مولکول ژلاتین ناشی از تشــدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و نانــوذرات طــلا که با دریافت نــور لیزر فرودی، نــور را در منطقهٔ کوچکــی در اطراف خود متمرکــز می‌کنند و بــا قرارگیری مولکول ژلاتین در ایــن مناطق و درنتیجه به‌دلیل دریافــت میدان الکتریکی قوی‌تــر و یا رســیدن نور حاصــل از پراکندگی از نقاط زبر پوشــش نقــره و طــلا، مولکول‌های ســازندهٔ ژلاتیــن قطبیده‌تر می‌شــوند و درنتیجه ارتعاش‌های شــدیدتری ظاهر می‌شوند. از مزایای بسترهای حسگرهای پلاسمونیکی زیســتی SERS معرفی‌شده استفادهٔ آسان و توانایی تشــخیص 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 شناســایی کرد.

References:

1. Zhang D, Yang H. Gelatin-stabilized copper nanoparticles: Synthesis, morphology, and their surface-enhanced Raman scattering properties. Physica B. 2013; 415: 44-8.

2. Lee CH, Zhang P. Facile synthesis of gelatin-protected silver nanoparticles for SERS applications. J. Raman Spectroscopy. 2013; 44: 823-6.

3. Bagrov DV, Nikishin II, Pavlova ER, Klinov DV. Distribution of Polylactide and Gelatin in Single Electrospun Nanofibers Studied by Raman Spectroscopy. J. Applied Physics. 2019; 2064: 040001-4.

4. Duconseille A, Gaillard C, Santé-Lhoutellier V, Astruc T. Molecular and structural changes in gelatin evidenced by Raman microspectroscopy. J. Food Hydrocolloids. 2018; 77: 777-86.

5. Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou EJ. Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1998; 740: 83-98.

6. Goncalves C, Alpendurada MF. Solid-phase micro-extraction–gas¬chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. Journal of Chromatography. 2004; 1020: 239-50.

7. Papadopoulou-Mourkidou E, Patsias JJ. Development of asemi-automated high-performance liquid chromatographic-diode array detection system for screening pesticides at trace levels in aquatic systems of the Axios River basin. Journal of Chromatography.1996; 726: 99-113.

8. Skoulika SG, Georgiou CA .Univariate and Multivariate Calibration for the Quantitative Determination of Methyl-parathion in Pesticide Formulations by FT-Raman Spectroscopy. Applied Spectroscopy. 2000; 54: 747-52.

9. Sato-Berru RY, Medina-Valtierra J, Medina Gutierrez C, Frausto-Reyes C. Quantitative NIR–Raman analysis of methyl-parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.2004; 60: 2231-4.

10. Alak-Ala M, Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman spectrometry of organo phosphorus chemical agents. ACS Publication Analytical Chemistry.1987; 59: 2149-53.

11. Ivanov AN, Evtyugin GA, Brainina KZ, Budnikov GK, Stenina LE. Cholinesterase Sensors Based on Thick-Film Graphite Electrodes for the Flow-Injection Determination of Organophosphorus Pesticides. Journal of Analytical Chemistry. 2002; 57: 1042-8.

12. Alizadeh T. HighSelective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode. Electroanalysis. 2009; 21: 1490-8.

13. 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.

14. Wang LR, Fang Y. IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2006; 63: 614-8.

15. Ren B, Liu GK, Lian XB, Yang ZL, Tian ZQ. Raman spectroscopy on transition metals. Analytical and bioanalytical chemistry. 2007; 388: 29-45.

16. Matricardi C, Hanske C, Garcia-Pomar JL, Langer J, Mihi A, Liz-Marzan LM. Gold Nanoparticle Plasmonic Superlattices as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates. ACS Nano. 2018; 12: 8531-9.

17. Lin KQ, Yi J, Hu S, Liu BJ, Liu JY, Wang X, Ren B. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry C. 2016; 120: 20806-3.

18. Sharifi N, Taghavinia N. Silver nano-islands on glass fibers using heat segregation method. Materials. Chemistry. and. Physics. 2009; 113: 63-6.

19. 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.

20. 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.

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

22. Wang LR, Fang Y. IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2006; 63: 614-8.

23. Canamares MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M, Oujja M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties. Journal of colloid and interface science. 2008; 326: 103-9.

24. Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. Journal of the American Chemical Society. 2015; 137: 1726-

9.

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

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

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

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

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