

ساخت سریع و آسان کیت پلاسمونیک تشخیص اسیدآمین‌های تریپتوفان

وحید اسکندری^۱، نفیسه شریفی^{۲*}

۱ کارشناس ارشد، پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۲ استادیار، گروه فوتونیک و پلاسما، دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران



تاریخ دریافت:

۹۸/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش:

۹۹/۰۱/۰۴

مکاتبات

در این مطالعه تجربی، محلول کلونیدی نقره به روش شیمیایی (تولنز) ساخته شد و با استفاده از روش قطره‌افشان، محلول کلونیدی نقره بر روی زیرلایه‌ی شیشه‌ای، کیت پلاسمونیک ساخته شد. در نهایت، با استفاده از این کیت پلاسمونیک و طیف‌سنجی رامان، بهبود سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌های تریپتوفان، بررسی شد. بعد از ساخت کیت پلاسمونیک، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی آن نشان می‌دهد که تعداد زیادی از ذرات نقره اندازه بین ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر دارند. قله پلاسمونی نانوذرات نقره در حدود ۴۱۰ نانومتر و مشاهده ساختار FCC در مشخصه‌یابی XRD آن، تشکیل نانوذرات نقره را تایید کرد. با لایه‌نشانی اسیدآمین‌های تریپتوفان، روی کیت پلاسمونیک، به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات کوچک‌تر و پراکندگی نور از نانوذرات بزرگ‌تر نقره، ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌های تریپتوفان، تقویت شوند. با کالیبراسیون شدت ارتعاش‌های مولکولی بر حسب غلظت اسیدآمین‌های تریپتوفان، رابطه درجه دو به دست می‌آید که از روی آن می‌توان با اندازه‌گیری طیف SERS اسیدآمین‌های تریپتوفان به غلظت آن پی برد. در طیف‌سنجی رامان به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و پراکندگی نور از ذرات نقره بزرگ‌تر سیگنال رامان حاصل از اسیدآمین‌های تریپتوفان بهبود می‌یابد. با کاهش غلظت اسیدآمین‌های تریپتوفان، به دلیل کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی سیگنال‌های SERS نیز تضعیف می‌شود که با استفاده از کیت پلاسمونیک، شناسایی، آشکارسازی سریع و راحت اسیدآمین‌های تریپتوفان تا غلظت ۷-۱۰ مولار قابل انجام است. در ضمن، با کالیبراسیون، استفاده از کیت پلاسمونیک، و طیف‌سنجی رامان، می‌توان غلظت نامشخص از اسیدآمین‌های تریپتوفان را تخمین زد که می‌تواند منجر به توسعه نانوحسگرها شود.

اسیدآمین‌های تریپتوفان، کیت پلاسمونیک، نانو ذرات نقره،

طیف‌سنجی رامان بهبود یافته‌ی سطحی، نانوحسگر

واژگان کلیدی



AMNC

Rapid and Easy Fabrication of Tryptophan Amino Acid Plasmonic Detection Kit

V. Eskandari¹, N. Sharifi^{2*}

1. M.Sc., Nanoscience and Nanotechnology Research Center, University of Kashan, Kashan, Iran
2. Assistant Professor, Photonic and Plasma group, Physics Department, University of Kashan, Kashan, Iran

Abstract

In this experimental study, silver colloidal solution was synthesized using Tollens method. Plasmonic kit was fabricated by drop-coating of silver colloidal solution on glass substrate and finally, detection of tryptophan amino acid was performed using plasmonic kit and surface enhanced Raman spectroscopy. The field emission scanning electron microscopy (FESEM) image shows the most of silver nanoparticles on plasmonic kit have the sizes between from 1400 to 1500 nm. Plasmon peak at around 410 and observation of FCC structure in XRD characterization confirmed the formation of silver nanoparticles. Surface plasmon resonance of silver nanoparticles as well as light scattering from larger agglomerated silver particles enhance the molecular vibrations of tryptophan amino acid. By calibrating the intensity of molecular vibrations in terms of tryptophan amino acid concentration, a quadratic relationship was obtained from which the concentration of the tryptophan amino acid could be determined by measuring SERS spectra. Raman spectroscopy improves the Raman signals of tryptophan amino acid due to the resonance of surface plasmons of silver nanoparticles and the light scattering from larger silver particles. As the tryptophan amino acid concentration decreases, the SERS signals are attenuated by the decrease in the number of molecular vibrations in which rapid and convenient detection of tryptophan amino acid could be performed up to a concentration of 10^{-7} M using the silver plasmonic substrates. In addition, by calibration, the concentration of the amino acid could be determined using silver plasmonic substrates and Raman spectroscopy, which could lead to the development of nano-sensors.

Keywords

Tryptophan Amino Acid, Plasmonic Kit, Silver Nanoparticle, Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Nano-sensors.

۱- مقدمه

اسیدآمینهی تریپتوفان، ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) یک بلوک سازنده پروتئینی است که بدن توانایی ساخت آن را ندارد و می‌توان از پروتئین‌های گیاهی و حیوانی آن را تامین کرد که مواد غذایی حاوی این اسیدآمینه اثرات آرام‌بخشی، مقابله با اضطراب و همچنین سوخت و ساز چربی‌های بدن را به دنبال دارد و در ساخت برخی میانجی‌های عصبی مانند سروتونین و کوآنزیم‌هایی مانند نیاسین مؤثر است [۱-۲]. مقادیر بسیار کم اسیدآمینهی تریپتوفان در خون نوزادان نشانه نقص در سیستم سوخت‌وساز بدن آن‌ها است و می‌تواند عقب ماندگی ذهنی را سبب شود [۳-۴]. در نتیجه آشکارسازی این ماده در مقادیر کم و تشخیص زود هنگام این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. در حال حاضر، برای تعیین مقدار اسیدآمینهی تریپتوفان روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی گازی و اسپکترومتری جرم [۵-۶]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) [۷] و طیف‌سنجی تبدیل فوریه رامان (FT-Raman) [۸-۱۰] به کار برده می‌شود. این روش‌ها، روش‌هایی مخرب، دشوار، آلاینده، درون آزمایشگاهی، و نیازمند آماده‌سازی نمونه، نیروی متخصص آموزش دیده، آزمایشگاه‌های مجهز و صرف وقت و هزینه بسیار هستند. از این‌رو، توسعه یک روش غیرمخرب، با کاربری ساده، سریع، کم‌هزینه، ناآلاینده، با قابلیت حمل و کاربرد خارج از محیط آزمایشگاه و نیاز به آماده‌سازی کم‌تر نمونه ضروری 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 [۱۱-۱۲]. در طیف‌سنجی زیرقرمز به دلیل فعال بودن ارتعاش‌های مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در طیف‌سنجی رامان نیز به دلیل ضعیف بودن ذاتی سیگنال حاصل از پراکندگی رامان، مطالعه مولکول‌ها با غلظت‌های اندک، عملاً امکان‌پذیر نیست [۱۳]. یکی از روش‌هایی که می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به دلیل 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 به طور مؤثر بهبود می‌دهند که به دنبال آن ارتعاش‌های مولکولی با سیگنال بهتر و بیش‌تری مشاهده خواهند شد. این روش طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS) نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند [۱۴]. در واقع با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلزی، در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبود یافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود [۱۵-۱۶]، گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است. بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار

می‌گیرد؛ بیش‌تر قطبیده می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد [۱۷]. در این روش، هنگامی که آنالیت‌های مورد مطالعه در نزدیک سطح فلز قرار می‌گیرند یا به طور فیزیکی جذب نانوذرات فلزی می‌شوند، به علت برهم‌کنش آنالیت‌ها و پلاسمون‌های سطحی فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق آنالیت‌های میکروبیولوژیکی استفاده شود. افزایش میدان‌الکترومغناطیس در حالت تشدید پلاسمونیک نانوذرات موجب افزایش برانگیختگی و نشر رامان افزایش یافته می‌شود. با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلزی، در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوساختارهای فلزی نقره به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبود یافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود. گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است [۱۸]. بنابراین، مولکول اسیدآمینهی تریپتوفان که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار می‌گیرد؛ بیش‌تر قطبیده می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد (شکل ۱).

در اولین تحقیقات در مورد SERS، از کلئید طلا، نقره و مس یا سیم‌هایی از این فلزات استفاده می‌شد که به روش الکتروشیمیایی یا شیمیایی روی آن خوردگی ایجاد می‌کردند تا سطحی با زبری خاصی که بتواند آثار SERS، را نشان دهند ایجاد شود. امروزه روش‌های مختلفی برای تهیهی بسترهای فعال SERS، از جمله: روش محلول‌های کلئیدی [۱۹-۲۰]، نانوذرات فلزی به صورت هسته-پوسته [۲۱]، فناوری جوهرافشان حرارتی [۲۱]، نانوذرات ساخته شده در شرایط خلاء [۲۱]، روش نانولیتوگرافی [۲۱]، فرسایش لیزری [۲۱] و تکنیک اسپاترینگ [۲۱]، مورد استفاده قرار می‌گیرند. پژوهش‌های اخیر جهت شناسایی و تجزیه‌وتحلیل اسیدآمینهی تریپتوفان با استفاده از روش تشدید پلاسمونیک SERS، مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۲۱]. استفاده از هر کدام از روش‌های ذکر شده جهت تهیهی بسترهای فعال SERS، در مقایسه با روش ارائه شده در این تحقیق نیاز به هزینه‌های زیاد و تجهیزات پیچیده دارند.

در این مطالعه به هدف طراحی و ساخت نانوحسگر ساده با سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش‌پذیری، تکرارپذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده، ابتدا نانوذرات نقره با عامل کاهندهی ساکاروز با استفاده از روش ساده شیمیایی (تولنز)، ساخته شد و سپس بر روی زیرلایه شیشه‌ای به روش قطره‌افشان قرار گرفتند تا کیت پلاسمونیک ساخته شده برای تشخیص و تعیین غیرمخرب اسیدآمینهی تریپتوفان در غلظت‌های مختلف استفاده شود.

۲- بخش تجربی

۲-۱- روش ساخت کیت پلاسمونیک

ابتدا به منظور ساخت محلول کلئیدی 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

25Lambda و دستگاه X Pert-Pro ساخت شرکت Panalyti-cal کشور هلند، با پرتو تک فام Cu K α با طول موج ۰/۱۵۴ نانومتر، جریان ۴۰ میلی آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، ساخت شرکت مالورن-انگلستان مدل EM 900 و تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به وسیلهی دستگاه Hitachi مدل 4160 S بررسی شد. دستگاه طیف سنجی رامان Takram مدل 10ROC50 ساخت شرکت تکسان با تابش نور لیزر Nd: YAG، با طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم ۷۵ میلی وات برای اندازه گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه ها استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

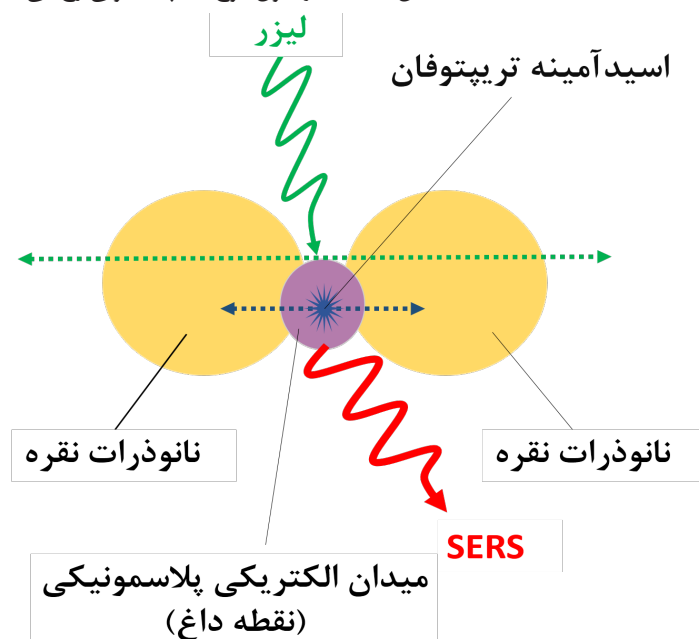
۳-۱- طیف جذب، تصویر TEM و توزیع اندازه محلول کلونیدی نقره؛ طیف خاموشی، الگوی پراش اشعه ایکس، و تصویر FESEM کیت پلاسمونیک

شکل ۲- الف (منحنی قرمز)، محلول کلونیدی نقره و طیف جذب آن را نشان می دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۱۰ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می کند [۲۳]، مشاهده یک قله جذبی در طیف های جذبی نانوذراتی مانند نقره بیانگر شکل کروی یا شبه کروی بودن نانوذرات است [۲۴]. شکل ۲- الف (منحنی آبی)، طیف خاموشی کیت پلاسمونیک نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی زیرلایه شیشه ای کیت پلاسمونیک را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۳۹ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره روی زیرلایه شیشه ای را تأیید می کند. با تغییر محیط در بردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می کند؛ جابه جایی در طول موج قله پلاسمونی رخ می دهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای

مولار و (۳) ۱۰ میلی لیتر محلول ساکاروز ۰/۰۷ مولار استفاده می شود. با افزودن محلول ساکاروز بر روی محلول آمونیاکی نقره نیترات و پتاس با دمای °C ۵۰ پس از گذشت حدود ۴ دقیقه، نانوذرات نقره، تشکیل می شود [۲۲]. سپس، قطعات شیشه ای با ابعاد ۷ cm × ۲/۵ 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 شیشه ای، در دمای °C ۴۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت دهی داده شدند تا آلودگی های آلی نیز از سطح شیشه حذف شوند و سطح آن ها آب دوست شوند. سپس با استفاده از روش قطره افشان محلول کلونیدی نقره به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به طور مجزا در شش نقطه بر روی زیرلایه شیشه ای قرار و در دمای آزمایشگاه خشک شدند و سپس به عنوان کیت نانوحسگر پلاسمونی نقره برای تشخیص و تعیین غیرمخرب اسید آمینهی تریپتوفان در غلظت های مختلف استفاده شدند. برای آشکار سازی مولکول اسید آمینهی تریپتوفان، ابتدا غلظت ۰/۱ مولار از آن با حلال آب بدون یون (DI) ساخته شد و در ادامه با استفاده از غلظت ۰/۱ مولار، غلظت های ۱۰^{-۲}، ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۴}، ۱۰^{-۵}، ۱۰^{-۶} و ۱۰^{-۷} مولار تهیه شدند. در ادامه، ۵ میکرولیتر از هر کدام از غلظت های تهیه شده به صورت جداگانه و به روش قطره افشان بر کیت پلاسمونیک به طور مجزا بر روی هر کدام از نقاط قرار گرفت و پس از خشک شدن، طیف رامان اسید آمینهی تریپتوفان، لایه نشانی شده روی شیشه و طیف SERS اسید آمینهی تریپتوفان، قرار داده شده روی کیت پلاسمونیک اندازه گیری شد.

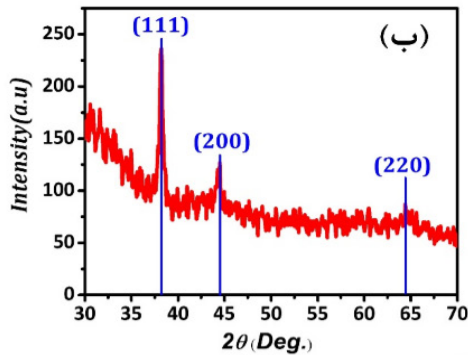
۲-۲- مشخصه یابی

دستگاه طیف سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتو X، کیت پلاسمونیک به ترتیب به وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل

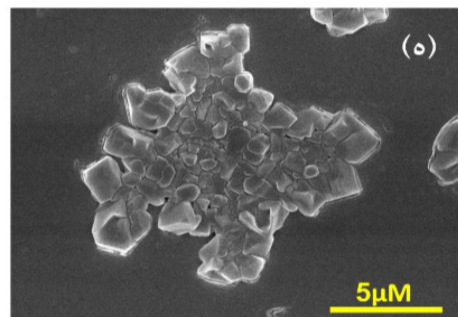
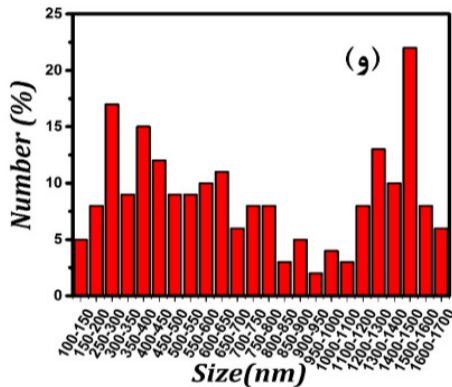
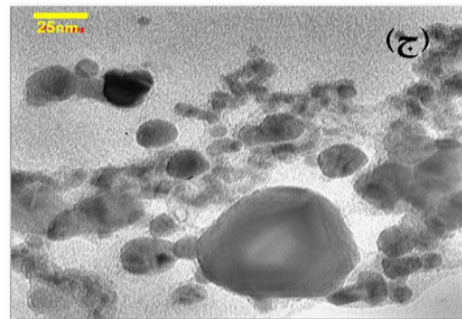
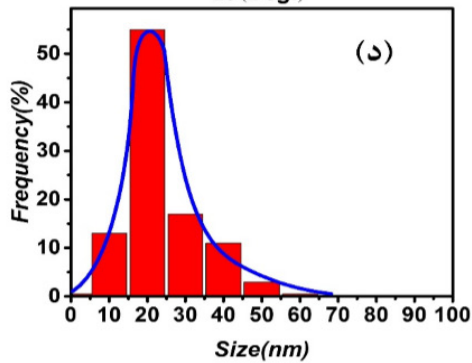
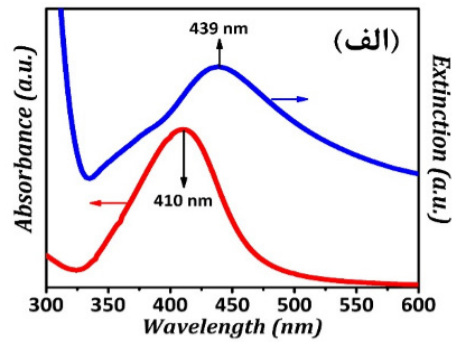


شکل ۱: بهبود سیگنال رامان اسید آمینهی تریپتوفان با استفاده از تشدید پلاسمونیک نانوذرات نقره یا نقاط داغ.

و پراکندگی نور از سطح شیشه است. شکل ۲-ب، الگوی پراش اشعه ایکس کیت پلاسمونیک است که با مشاهده بزرگترین و اصلیترین قلهها در زاویهی 2θ برابر با 38.24° ، 44.52° و 64.46° درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰) و (۲۲۰) است؛ ساختار FCC نقره را تایید می کند. شکل ۲-ج، تصویر نانوذرات نقره ساخته شده در حضور عامل کاهنده ساکاروز را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می دهد. همان طوری که در تصویر مشخص است نانوذرات نقره به شکل کره ای و شبه کره ای هستند که به طور متوسط اندازه ۲۰ نانومتر دارند. شکل ۲-د، توزیع اندازه ذرات نقره را نشان می دهد که حدودا اندازه های بین ۱۰ تا ۶۰ نانومتر دارند و تعداد ذرات با اندازه ۲۰ نانومتر بیش تر از سایر اندازه های نانوذرات است. شکل ۲-ه، تصویر FE-SEM، کیت پلاسمونیک را نشان می دهد



قلهها نیز افزایش می یابد به این دلیل که موقعیت قله پلاسمونی به ضریب شکست محیط در بردارنده آنها وابسته است [۲۵]. با توجه به شکل ۲-الف، بر خلاف محلول کلئیدی پایدار که نانوذرات نقره در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله های مشخصی از یکدیگر قرار دارند؛ با قرار گرفتن نانوذرات نقره روی زیرلایه شیشه ای، حین خشک شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می گیرند و کلوخه هایی متشکل از چندین نانوذره روی زیرلایه شکل می گیرد به گونه ای که می توان این کلوخه ها را ذرات بزرگتری در نظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می شود [۲۵]. کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است [۲۵]. این که زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) کیت پلاسمونیک، در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است ناشی از بازتاب



شکل ۲: (الف)، (منحنی قرمز) طیف جذب محلول کلئیدی حاوی نانوذرات نقره که به روش شیمیایی تولنز ساخته شده است با بیشینه جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر؛ (منحنی آبی) طیف خاموشی کیت پلاسمونیک با بیشینه خاموشی در طول موج ۴۳۹ نانومتر، (ب)، الگوی پراش اشعه ایکس کیت پلاسمونیک، (ج)، تصویر TEM نانوذرات نقره، ساخته شده به روش شیمیایی و با عامل کاهنده محلول ساکاروز، (د)، نمودار توزیع اندازه نانوذرات نقره که حدودا اندازه های بین ۱۰ تا ۶۰ نانومتر، (ه)، تصویر FE-SEM کیت پلاسمونیک و (و)، شکل توزیع اندازه ساختارهای کیت پلاسمونیک که حدودا اندازه های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند.

میدان‌های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات نقره مشاهده شده در شکل ۲-ه، 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 مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان، 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 [۲۷-۲۸].

شکل ۳-ب، طیف SERS اسیدآمین‌های تریپتوفان، با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی)، 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} (منحنی سبز) مولار لایه‌نشانی شده بر روی کیت پلاسمونیک را نشان می‌دهد. با کاهش غلظت مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول‌های اسیدآمین‌های تریپتوفان، و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به گونه‌ای که در غلظت‌های کمتر از 10^{-7} مولار، ارتعاش‌های اسیدآمین‌های تریپتوفان، به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین کیت پلاسمونیک می‌تواند تا غلظت 10^{-7} مولار اسیدآمین‌های تریپتوفان، را شناسایی کند. شکل ۳-ج، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش‌های مولکولی کششی COO- و خمشی C-H، در عدد موج 1354 cm^{-1} را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمین‌های تریپتوفان، C، نشان می‌دهد که با برازش انجام شده از رابطه (۱) پیروی می‌کند.

$$I = 775/75 C^2 + 9407/66 C + 28638/11 \quad (R^2=0/97) \quad (1)$$

که ضریب رگرسیون (R^2) آن برابر با ۰/۹۷ است. می‌توان با استفاده از این نمودار با مشاهده شدت قله ارتعاش‌های مولکولی کششی COO- و خمشی C-H، در عدد موج 1354 cm^{-1} برای مقدار نامشخص از اسیدآمین‌های تریپتوفان، غلظت آن را به دست آورد. در ادامه به منظور تکرارپذیری در ساخت کیت پلاسمونیک، تعداد شش آزمایش پیوسته برای غلظت 10^{-7} مولار از اسیدآمین‌های تریپتوفان در طول یک روز انجام شد. شکل ۳-د، طیف SERS، شش نقطه مجزا از اسیدآمین‌های تریپتوفان در غلظت 10^{-7} مولار به مقدار ۵ میکرولیتر لایه‌نشانی شده بر روی کیت پلاسمونیک، را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است تمام طیف‌های SERS، اسیدآمین‌های تریپتوفان در غلظت 10^{-7} مولار به خوبی با یکدیگر مطابقت دارند و هیچ تغییری در جابجایی موقعیت مکانی و مشخصه‌ی طیف‌ها مشاهده نمی‌شود. انحراف استاندارد نسبی (RSD)، به منظور بررسی تکرارپذیری ساخت کیت پلاسمونیک در غلظت 10^{-7} مولار از اسیدآمین‌های تریپتوفان برای قله‌های در عدد موج 1763 cm^{-1} ، 1354 cm^{-1} و 1554 cm^{-1} ، با استفاده از رابطه (۲)، محاسبه شدند [۲۹].

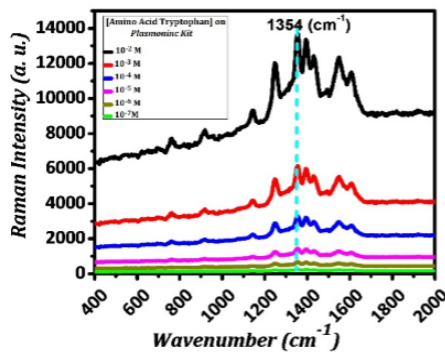
و مجموعه‌ای از ذرات کرومی یا شبه کرومی در بخش‌های مختلف بستر مشاهده می‌شود که توزیع اندازه ذرات در شکل ۲-و، نشان می‌دهد که ذرات نقره حدوداً اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات اندازه ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر دارند. نانوذرات کوچک‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره است و چنانچه مولکول‌های اسیدآمین‌های تریپتوفان در این موقعیت‌ها قرار بگیرند؛ در معرض تابش میدان‌های الکتریکی نزدیک قرار می‌گیرند. ذرات بزرگ‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک ناچیزی دارند و نور تابیده شده به آن‌ها، از سطح آن‌ها پراکنده می‌شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می‌کنند [۲۶].

۳-۲- طیف رامان و آشکارسازی اسیدآمین‌های تریپتوفان

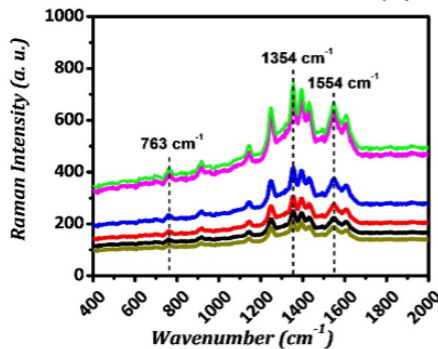
شکل ۳-الف، طیف رامان بستر فعال SERS (منحنی سبز)، طیف رامان مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان قرار داده شده با غلظت 10^{-2} مولار بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان قرار داده شده با غلظت 10^{-2} بر روی کیت پلاسمونیک (منحنی آبی) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان که روی زیرلایه شیشه‌ای لایه‌نشانی شده‌اند (منحنی قرمز)؛ نشانی از ارتعاش‌های مولکولی مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این گونه حتی با غلظت 10^{-2} مولار و با استفاده از طیف‌سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن اسیدآمین‌های تریپتوفان با غلظت 10^{-2} مولار بر روی کیت پلاسمونیک، ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌های تریپتوفان (شکل ۳) ظاهر می‌شوند. ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمین‌های تریپتوفان [۳] به صورت خط-چین‌هایی بر روی طیف‌های مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان در شکل ۳-الف، نمایش داده شده است. در مورد مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان لایه‌نشانی شده روی کیت پلاسمونیک، ارتعاشات کششی COO-C، ارتعاشات خمشی N-H، ارتعاشات کششی N-H، ارتعاشات کششی COO-C، ارتعاشات کششی C-H، ارتعاشات کششی CH₂ و خمشی C-H، ارتعاشات کششی COO- و خمشی C-H، ارتعاشات کششی COO-C، و ارتعاشات کششی C-N-H، و ارتعاشات کششی H-N-H، و ارتعاشات کششی COO-C، به ترتیب در ۵۴۹، ۵۷۵، ۷۶۰، ۹۱۶، ۱۱۴۱، ۱۲۵۲، ۱۳۵۴، ۱۴۰۳، ۱۴۳۳، ۱۵۵۱ و 1604 cm^{-1} ظاهر می‌شوند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از کیت پلاسمونیک، به دلیل پراکندگی نور از نقاط زیر روی سطح شیشه است. نقاط زیری که با نقره‌اندود کردن شیشه ایجاد شده است. ذرات بزرگ‌تر نقره که در شکل ۲-ه، مشاهده می‌شوند؛ با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به مولکول اسیدآمین‌های تریپتوفان، 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

۱۳۵۴ و ۱۵۵۴ cm^{-1} ، که به ترتیب مقدار RSD، ۴/۰۵، ۵/۵۹ و ۳/۹۴ درصد محاسبه شده است و در شکل ۳-و، تغییرات محاسبه‌ی RSD، برای عدد موج 763 cm^{-1} ، مقدار ۴/۰۵ درصد (نمودار قرمز)، برای عدد موج 1354 cm^{-1} ، مقدار ۵/۵۹ درصد (نمودار سبز) و برای عدد موج 1554 cm^{-1} ، مقدار ۳/۹۴ درصد (نمودار آبی)، به صورت نمودار ستونی مشخص شده است. انحراف استاندارد نسبی به دست آمده در این آزمایش به صورت میانگین برابر با ۴/۵۲ درصد به دست آمد که از لحاظ آماری نشانگر عملکرد رضایت بخش، روش به کار گرفته

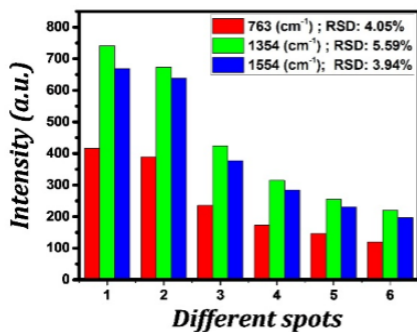
(ب)



(د)



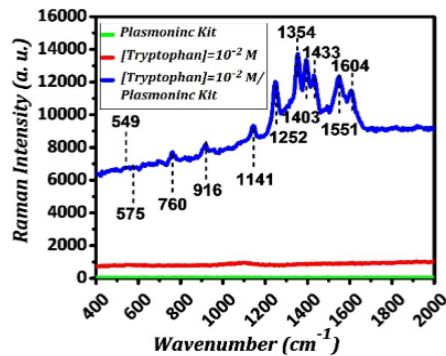
(و)



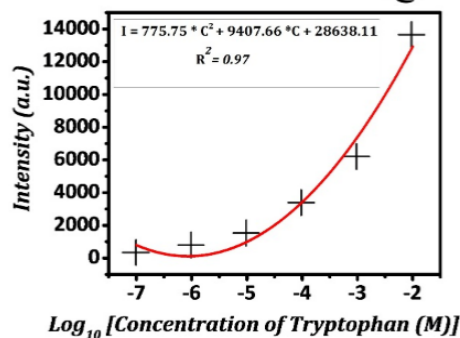
$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (I_i - I)^2}}{I} \quad (2)$$

که $n = 6$ تعداد طیف‌های رامان مورد آزمایش قرار گرفته شده، I_i شدت سیگنال رامان در هر قله‌ی مشخص و I ، میانگین شدت سیگنال رامان قله‌های مشخص شده را نشان می‌دهند. شکل ۳-ه، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت 10^{-7} مولار اسیدآمینهای تریپتوفان برای قله‌هایی در عدد موج 763 cm^{-1} ،

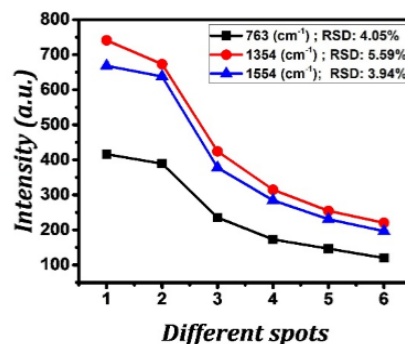
(الف)



(ج)



(ه)



شکل ۳: (الف) طیف رامان کیت پلاسمونیک (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمینهای تریپتوفان با غلظت 10^{-2} لایه‌نشانی شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS اسیدآمینهای تریپتوفان لایه‌نشانی شده با غلظت 10^{-2} بر روی کیت پلاسمونیک (منحنی آبی)، (ب) طیف SERS اسیدآمینهای تریپتوفان لایه‌نشانی شده با غلظت‌های 10^{-2} (منحنی سیاه)، 10^{-3} (منحنی قرمز)، 10^{-4} (منحنی آبی)، 10^{-5} (منحنی صورتی)، 10^{-6} (منحنی قهوه‌ای) و 10^{-7} (منحنی سبز) بر روی کیت پلاسمونیک. (ج) منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت، I ، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش‌های مولکولی کششی COO^- و خمشی C-H ، در عدد موج 1354 cm^{-1} ، بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینهای تریپتوفان، C لایه‌نشانی شده بر روی کیت پلاسمونیک، که برگرفته از شکل (ب) است. (د) طیف SERS، شش نقطه مجزا از اسیدآمینهای تریپتوفان در غلظت 10^{-7} مولار به مقدار ۵ میکرولیتر لایه‌نشانی شده بر روی کیت پلاسمونیک. (ه) نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت 10^{-7} مولار اسیدآمینهای تریپتوفان برای قله‌هایی در عدد موج 763 cm^{-1} و 1354 cm^{-1} ، که به ترتیب مقدار RSD، ۴/۰۵، ۵/۵۹، ۳/۹۴ درصد محاسبه شده است و در شکل (و)، تغییرات محاسبه‌ی RSD، برای عدد موج 763 cm^{-1} ، مقدار ۴/۰۵ درصد (نمودار قرمز)، برای عدد موج 1354 cm^{-1} ، مقدار ۵/۵۹ درصد (نمودار سبز) و برای عدد موج 1554 cm^{-1} ، مقدار ۳/۹۴ درصد (نمودار آبی)، به صورت نمودار ستونی مشخص شده است.

۵- مراجع

- [1]. M. Friedman, Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan. *International Journal Tryptophan Research*. 2018; 11: 1178646918802282.
- [2]. A. Kandakkathara, I. Utkin, R. Fedosejevs. Surface-enhanced raman scattering (SERS) detection of low concentrations of tryptophan amino acid in silver colloid. *Applied Spectroscopy*. 2011; 65(5): 507-513.
- [3]. F. Madzharova, H. Zsuzsanna, K. Janina. Surface Enhanced Hyper-Raman Scattering of the Amino Acids Tryptophan, Histidine, Phenylalanine, and Tyrosine. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2017; 121(2): 1235-1242.
- [4]. E.L. Twomey, E.R. Naughten, V.B. Donoghue Ryan. Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. *Pediatric Radiology*. 2003; 33: 823-830.
- [5]. J. Patsias, E.J. Papadopoulou-Mourkidou. 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]. C. Goncalves, M.F. Alpendurada. 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: 239-250.
- [7]. S. Zavatski, N. Khinevich, K. Girel, S. Redko, N. Kovalechuk, I. Komissarov, V. Lukashevich, I. Semak, K. Mamatkulov, V. Vorobyeva, G. Arzumanyan, H. Bandarenka. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Lactoferrin Adsorbed on Silvered Porous Silicon Covered with Graphene. *Biosensors*. 2019; 9(1): 34.
- [8]. S.G. Skoulika, C.A. Georgiou. Univariate and Multivariate Calibration for the Quantitative Determination of Methyl-parathion in Pesticide Formulations by FT-Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2000; 54: 747-752.
- [9]. R.Y. Sato-Berru, J. Medina-Valtiera, C. Medina Gutierrez, C. Frausto-Reyes. Quantitative NIR-Raman analysis of methyl-parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004; 60: 2231-2234.
- [10]. M. Alak-Ala, T. Vo-Dinh. Surface-enhanced Raman spectrometry of organo phosphorus chemical agents. *ACS Publication Analytical Chemistry*. 1987; 59: 2149-2153.
- [11]. A.N. Ivanov, G.A. Evtyugin, K.Z. Brainina, G.K. Budnikov, L.E. Stenina. Cholinesterase Sensors Based on Thick-Film Graphite Electrodes for the Flow-Injection Determination of Organophosphorus Pesticides. *Journal of Analytical Chemistry*. 2002; 57: 1042-1048.
- [12]. T. Alizadeh. High Selective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*. 2009; 21: 1490-1498.

شده برای تعیین غلظت اسیدآمینوی تریپتوفان است. روش‌های دیگری که برای تعیین مقدار اسیدآمینوی تریپتوفان در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل کروماتوگرافی گازی و مایع با آشکارسازهای جرمی است که اگر چه 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 [۳۰-۳۱].

۴- نتیجه‌گیری

به منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد ناشی از مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان، تشخیص مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان در غلظت‌های کم دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما به دلیل ضعیف بودن سیگنال رامان، عملاً شناسایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان، در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند نقره و همچنین نور پراکنده شده از ذرات بزرگ فلزی، می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. بنابراین، ابتدا نانوذرات نقره با استفاده از احیای شیمیایی نمک نقره ساخته شدند و در ادامه با به کارگیری روش قطره‌افشان که روشی ساده، سریع و ارزان است؛ در دمای اتاق، نانوذرات نقره بر روی زیرلایه شیشه‌ای لایه‌نشانی شدند، کیت پلاسمونیک جهت آشکارسازی مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان استفاده شدند. با کاهش غلظت مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان سیگنال رامان آن‌ها نیز کاهش می‌یابد که این کیت پلاسمونیک ساخته شده از نانوذرات نقره قادر به شناسایی مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان تا غلظت 10^{-7} مولار هست. بهبود سیگنال رامان مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره که با دریافت نور لیزر فرودی، نور را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری مولکول اسیدآمینوی تریپتوفان در این مناطق و در نتیجه به دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر، و یا رسیدن نور حاصل از پراکندگی از نقاط زبر پوشش نقره، مولکول‌های سازنده اسیدآمینوی تریپتوفان قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های شدیدتری ظاهر می‌شوند. از مزایای کیت پلاسمونیک معرفی شده، 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 و مواد بیولوژیکی را شناسایی کرد.

- [13]. N. Duan, B. Chang, H. Zhang, Z. Wang, S. Wu. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor. *International Journal Food Microbiology*. 2016; 218: 38-43.
- [14]. L.R. Wang, 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: 614-618.
- [15]. B. Ren, G.K. Liu, X.B. Lian, Z.L. Yang, Z.Q. Tian. Raman spectroscopy on transition metals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007; 388: 29-45.
- [16]. C. Matricardi, C. Hanske, J.L. Garcia-Pomar, J. Langer, A. Mihi, L.M. Liz-Marzan. Gold Nanoparticle Plasmonic Superlattices as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates. *ACS Nano*. 2018; vol. 12: 8531-8539.
- [17]. K.Q. Lin, J. Yi, S. Hu, B.J. Liu, J.Y. Liu, X. Wang, B. Ren. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120: 20806-20811.
- [18]. D. Darya Radziuk, H. Moehwald. Prospects for plasmonic hot spots in single molecule SERS towards the chemical imaging of live cells. *Journal of Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015; 17: 21072-21093.
- [19]. N. Biswas, S. Kapoor, H.S. Mahal, T. Mukherjee. Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study. *Chemical Physics Letters*. 2007; 444: 338-345.
- [20]. S.S.R. Dasary, U.S. Rai, H. Yu, Y. Anjaneyulu, M. Dubey, P. C. Ray. Gold nanoparticle based surface enhanced fluorescence for detection of organophosphorus agents. *Chemical Physics Letters*. 2008; 460: 187-190.
- [21]. R. Botta, A. Rajanikanth, C. Bansal. Surface Enhanced Raman Scattering studies of l-amino acids adsorbed on silver nanoclusters. *Chemical Physics Letters*. 2015; 618: 14-19.
- [22]. N. Sharifi, N. Taghavinia. Silver nano-islands on glass fibers using heat segregation method. *Materials. Chemistry. and. Physics*. 2009; 113: 63-66.
- [23]. P.K. Ngumbi, S.W. Mugo, J.M. Ngaruiya. Determination of Gold Nanoparticles Sizes via Surface Plasmon Resonance. *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*. 2018; 11: 25-29.
- [24]. H. Tarik Baytekin, B. Baytekin, S. Huda, Z. Yavuz, B.A. Grzybowski. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-1729.
- [25]. C.F. Bohren, D.R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley. New York. 1983; 306: 625.
- [26]. S.Y. Ding, E.M. You, Z.Q. Tian, M. Moskovits. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Chemical Society Reviews*. 2017; 46: 4042-4076.
- [27]. H.Y. Chen, M.H. Lin, C.Y. Wang, Y.M. , Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 42: 13698-13705.
- [28]. 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: 3865-3882.
- [29]. H.M. Parsons, D.R. Ekman, T.W. Collette, M.R. Viant. Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics. *Analyst*. 2009; 134: 478-485.
- [30]. F. al-Taher, R. Juskelis, Y. Chen, J. Kapposso. *Comprehensive Pesticide analysis in Juice Using a Combination of GC-MS and LC-MS Methods*. Application note, Food Safety, Aligent Technologies. 2012; 23(6): 579-586.
- [31]. H. Fang, C.X. Zhang, L. Liu, Y.M. Zhao, H.J. Xu. Recyclable three-dimensional Ag nanoparticle-decorated TiO₂ nanorod arrays for surface-enhanced Raman scattering. *Biosens Bioelectron*. 2015; 64: 434-441.