

پوشش‌دهی لایه نازک از نانوذرات طلا روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO به روش الکترونهشت به عنوان بستر فعال SERS جهت مطالعه ارتعاشات مولکولی اسید آمینه تیروزین

چکیده

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

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

یافته‌ها: نانوذرات طلای ساخته‌شده نانوذراتی کروی و شبه‌کروی هستند که با مشاهده قله تشدید پلاسمونی در ۵۳۰ نانومتر و ساختار FCC تشکیل نانوذرات طلا را تأیید می‌کند. بسترهای فعال SERS با نانوذرات، پوشش داده شده‌اند که باعث بهبود سیگنال رامان می‌شود. بهبود سیگنال رامان ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات است. بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا به صورت لایه نشانی شده روی بستر شیشه‌ای FTO برای تشخیص اسید آمینه تیروزین ساخته شدند و حد تشخیص آن ۷-۱۰ مولار و همچنین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، برای شش اندازه‌گیری مکرر در غلظت ۷-۱۰ مولار ۳/۱۷ درصد به دست آمد. بنابراین نتایج رامان به دست آمده نشان می‌دهد که بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا برای تشخیص اسید آمینه تیروزین با روش‌های توسعه‌یافته نتایج امیدوارکننده‌ای را برای مطالعات مبتنی بر SERS نشان می‌دهد و می‌تواند منجر به توسعه حسگرهای میکرونی می‌شوند.

نتیجه‌گیری: در طیف‌سنجی رامان، بسترهای فعال SERS که با نانوذرات طلا پوشش داده شده‌اند، مورد توجه هستند که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات طلا و پراکندگی نور از ذرات طلا بزرگ‌تر است چون سیگنال رامان ارتعاش‌های مولکولی اسید آمینه تیروزین را تقویت می‌کنند. با کاهش غلظت اسید آمینه تیروزین لایه نشانی شده روی بسترهای فعال SERS به دلیل کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی، سیگنال رامان نیز تضعیف می‌شود که با افزایش میزان زبری سطح بسترهای فعال SERS می‌توان سیگنال رامان را به دلیل افزایش میزان پراکندگی نور از مراکز زبر افزایش داد. این مراکز زبر، همان ذرات بزرگ‌تری هستند که در حین لایه نشانی به روش الکترونهشت ایجاد می‌شوند و در نتیجه با افزایش میزان پراکندگی نور از خود، منجر به بهبود سیگنال می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات طلا، روش الکترونهشت، اسید آمینه تیروزین، طیف‌سنجی رامان بهبودیافته سطحی (SERS)، بسترهای فعال SERS

وحید اسکندری^۱

امین هادی^{۲*}

نوشین حقیقی پور^{۳*}

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

نویسندگان مسئول:

امین هادی و نوشین حقیقی پور

پست الکترونیک:

amin.hadi@yums.ac.ir

haghighipour@pasteur.ac.ir

۰۹۱۲۸۹۲۰۳۴۱

شماره تلفن همراه:

مناسبی برای شناسایی ترکیبات مواد گوناگون از جمله گونه‌های زیستی است اما، سیگنال رامن گونه‌های زیستی به خصوص در غلظت‌های پایین، بسیار اندک است [۱۶ و ۱۵]. در روش SERS با قرار گرفتن گونه‌های بیولوژیکی و شیمیایی مختلف در نزدیکی و یا جذب فیزیکی آن‌ها روی سطح حاوی نانوذرات فلزی، به علت برهمکنش میان پلاسمون‌های سطحی فلز و گونه‌ها، شدت سیگنال رامن افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق گونه‌های بیولوژیکی نیز استفاده شود [۱۷]. امروزه، لایه‌های متشکل از نانوذرات فلزات نجیب مانند طلا و نقره به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی و خواص نوری مورد توجه قرار گرفته‌اند. در واقع نوسان‌های الکترون‌های رسانش نانوذرات فلزات نجیب با تابش نور به آن‌ها سبب افزایش چگالی انرژی میدان‌های الکتریکی یا همان نور تابش‌شده می‌شود که در حسگرهای زیستی [۱۸ و ۱۹]، سلول‌های خورشیدی [۲۰] و SERS [۲۱] کاربرد دارند. با توجه به خواص نوری فوق‌العاده این نانوذرات، روش‌های گوناگونی برای ساخت لایه‌ها متشکل از نانوذرات فلزی ارائه شده است [۲۲] که می‌توان به لیتوگرافی با استفاده از پرتوی الکترونی [۲۳ و ۲۴] اشاره کرد که این روش نیاز به تجهیزات پیچیده و گران‌قیمت دارد و برای ساخت نمونه‌هایی با اندازه کوچک کاربرد دارد. در مقابل، روش رسوب الکتروشیمیایی روشی ساده است که برای ساخت نمونه‌هایی با اندازه‌هایی با مقیاس بزرگ کاربرد فراوانی دارد [۲۵ و ۲۶]. پراکندگی رامن نتیجه پراکندگی ناکشسان نور از ماده است و با استفاده از این اثر می‌توان اطلاعات بسیار جزئی در مورد ساختار یک مولکول به دست آورد. طیف‌سنجی IR به دلیل فعال بودن ارتعاشات مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی را دشوار می‌کند و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. طیف‌سنج‌های مبتنی بر الکترون و یون نیز نیاز به خلأ بالا دارند، بنابراین طیف‌سنجی رامن نه تنها امکان مطالعه مولکول در شرایط عادی را فراهم می‌کند که با آن می‌توان فرآیندهای کاتالیستی و فرآیندهایی که در فصل مشترک فلز-الکترولیت رخ می‌دهد را نیز

۱. مقدمه

تیروزین یکی از بیست و دو اسید آمینه اصلی یاخته‌های زنده است. این اسید آمینه حاصل اثر آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز بر روی اسید آمینه فنیل‌آلانین است [۲۰]. بدن تیروزین را با تغییر یک اسید آمینه دیگر به نام فنیل‌آلانین تولید می‌کند. تیروزین در مکمل‌های پروتئینی برای درمان یک اختلال ارثی به نام فنیل‌کتونوریا (PKU) استفاده می‌شود [۳]. افرادی که با این اختلال رو به رو هستند، نمی‌توانند فنیل‌آلانین را به درستی متابولیزه کنند و در نتیجه توانایی ساخت تیروزین را ندارند [۴]. برای تأمین نیازهای بدن به آن‌ها مکمل تیروزین داده می‌شود. از مکمل تیروزین در مواردی همچون افسردگی، اختلال کمبود تمرکز (ADD)، اختلال کمبود تمرکز بیش‌فعالی، عدم توانایی در بیدار ماندن (نارکولپسی) و بهبود هوشیاری پس از خواب کم و نامناسب استفاده می‌کنند [۵]. همچنین از آن در موارد دیگری مثل استرس، بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر، سندرم خستگی مزمن (CFS) و اسکیزوفرنی استفاده می‌شود [۶]. در سال‌های اخیر، آزمایشات بالینی نشان داده است که میزان تیروزین در ادرار بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ از جمله بیماران سرطانی آدنوم به طور قابل توجهی بالاتر از افراد عادی است [۷ و ۸]. در نتیجه تشخیص با دقت بالا تیروزین در مایعات زیستی موجودات زنده مهم می‌باشد. تکنیک‌های مختلفی مانند HPLC [۹]، TMS^۲ (MS/MS) [۱۰]، ^{۱۳}C-MS [۱۱]، آمپرمتری^۴ [۱۲]، کروماتوگرافی^۵ [۱۳]، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی (MRS) [۱۴] و SERS برای شناسایی اسید آمینه تیروزین به کار گرفته می‌شوند [۸]. روش SERS در مقایسه با بقیه روش‌های نام برده از حساسیت بالاتری برخوردار است [۸]. طیف‌سنجی رامن روش

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

۲. روش بررسی

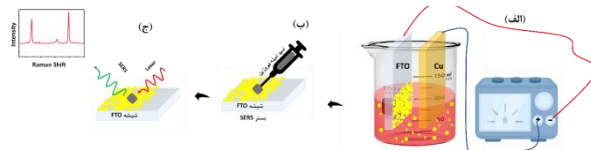
۱- روش‌های ساخت و شناسایی

۱-۱- روش ساخت بسترهای فعال SERS

شیشه‌های رسانا که شیشه پوشش داده شده با اکسید قلع آلیپده شده با فلئوئور (FTO) است، با ابعاد $2/5\text{cm} \times 1\text{cm}$ به عنوان بستر برش داده شدند. پس از شستشو با آب و صابون، استون و اتانول، نمونه‌ها در دمای 400°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت‌دهی شدند تا آلودگی‌های مواد آلی از سطح شیشه‌ها حذف شوند و در واقع، برای پوشش شیشه‌ها از نانوذرات طلا، سطوحی آب‌دوست داشته باشیم. در ادامه به منظور ساخت نانوذرات طلا به 20 میلی‌لیتر محلول 1mM نمک طلا HAuCl_4 در حال جوش و هم خوردن، 2 میلی‌لیتر محلول $3/8/8\text{ mM}$ از محلول تری‌سدیم سترات دوآبه ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) اضافه شد که کلونید ارغوانی رنگ نهایی حاوی نانوذرات طلا است [۴۴]. سپس با استفاده از روش الکترونهشت، نانوذرات طلا داخل محلول کلونیدی طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO نشانده می‌شوند. برای این منظور، بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO به کاتد یا قطب منفی منبع تغذیه و ورقه مسی به عنوان آند به قطب مثبت منبع تغذیه وصل می‌شوند و داخل محلول کلونیدی طلا قرار می‌گیرند. نشست الکترودی نانوذرات طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO با اعمال ولتاژ DC برابر با $1/5$ ولت در زمان ۵ دقیقه انجام شد تا بسترهای فعال SERS داشته باشیم. فاصله کاتد و آند ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بسترهای فعال SERS شسته و سپس در دمای آزمایشگاه خشک شدند. برای آشکارسازی اسیدآمینة تیروزین غلظت‌های $2-10$ ، $3-10$ ، $4-10$ ، $5-10$ ، $6-10$ ، $7-10$ و مولار از آن تهیه شد. به صورت جداگانه و به روش قطره‌افشان 10 میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌های تهیه‌شده بر روی بسترهای فعال SERS قرار گرفت و پس از خشک شدن در حضور هوا، طیف رامان اسیدآمینة تیروزین نشانده‌شده روی شیشه و طیف رامان بهبودیافته سطحی اسیدآمینة تیروزین نشانده‌شده روی بسترهای فعال SERS اندازه‌گیری، تحلیل و بررسی شدند.

بررسی کرد [۲۷] اما، سیگنال مربوط به پراکندگی رامان به طور ذاتی ضعیف است که آشکارسازی را دشوار می‌کند [۲۸]. یکی از روش‌هایی که می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد، استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی می‌توانند سیگنال پراکندگی را به طور گسترده بهبود دهند که این روش SERS نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند [۲۹]. این پدیده برای اولین بار در سال ۱۹۷۴، برای مولکول پیرادین جذب‌شده بر روی سطح الکترودهای نقره رشد داده‌شده به روش الکتروشیمیایی مشاهده شد. سیگنال بهبودیافته رامان، فقط بعد از قرارگرفتن الکتروده نقره در چرخه اکسایش-کاهش یا فعال‌سازی مشاهده می‌شد و برای یک سطح صاف و صیقلی هیچ سیگنال بهبودیافته‌ای را نشان نمی‌داد. در ابتدا بهبود سیگنال را براساس افزایش تعداد مولکول‌های مورد مطالعه به دلیل افزایش مساحت سطحی که زبر شده است، توصیف کردند. اما، بهبود سیگنال رامان باید دللی غیر از افزایش مساحت سطح داشت که در سال ۱۹۷۷، بهبود سیگنال رامان را به برهمکنش مولکول با سطح فلز زبر نسبت دادند [۳۰]. فلزاتی مانند طلا، نقره، مس و پلاتین جهت مشاهده این پدیده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های فلز مانند نوع، شکل، اندازه و چگونگی کنار هم قرارگرفتن آن‌ها بر پراکندگی رامان مولکول مورد بررسی اثر می‌گذارد. از میان فلزات گوناگون، نقره و طلا به علت داشتن تشدید پلاسمونی در ناحیه مرئی و زیرقرمز، پایداری بیشتر و روش‌های ساخت آسان، بیشتر مورد توجه بوده‌اند تا گونه‌های زیستی و مواد بیولوژیکی شناسایی شوند [۳۱]. در این مطالعه، با استفاده از روش الکترونهشت، نانوذرات طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO با قدرت چسبندگی مکانیکی بالا، سریع، کم‌هزینه و در دمای اتاق پوشش داده شدند تا از آن‌ها به عنوان بسترهای فعال SERS برای شناسایی ارتعاشات مولکولی اسیدآمینة تیروزین در غلظت‌های پایین استفاده شود.

جذبی نانوذرات طلا بیانگر شکل کروی یا شبه کروی بودن نانوذرات است [۳۳]. شکل ۲- (الف)، طیف خاموشی نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای فعال SERS را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود با نشانند (الف)، نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO و ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۵۵۹ نانومتر، تشکیل نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO را تأیید می‌کند. با تغییر محیط دربردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند، جابه‌جایی در طول موج قله پلاسمونی رخ می‌دهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای قله‌ها نیز افزایش می‌یابد به این دلیل که موقعیت قله پلاسمونی به ضریب شکست محیط دربردارنده آن‌ها وابسته است [۳۴]، با توجه به شکل ۲- (الف) برخلاف محلول کلئیدی پایدار که نانوذرات طلا در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند، با قرار گرفتن نانوذرات طلا روی بسترهای شیشه‌ای FTO حین خشک شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی بسترها شکل می‌گیرد به گونه‌ای که می‌توان این کلوخه‌ها را ذرات بزرگ‌تری در نظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می‌شود [۳۴]، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است [۳۴]، اینکه زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) بسترهای فعال در SERS در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است. شکل ۲- ب، توزیع اندازه نانوذرات طلا را نشان می‌دهد که اندازه‌هایی بین ۵ تا ۴۰ نانومتر دارند و تعداد ذرات با اندازه ۷ و ۸ نانومتر بیشتر از سایر اندازه‌های نانوذرات است. شکل ۲- ج، طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی به منظور پایداری نانوذرات طلا در حضور عامل کاهنده تری سدیم سیترات مورد بررسی قرار داده شده است که پس از گذشت ۳۰ روز نانوذرات طلا که با عامل کاهنده تری سدیم سیترات تهیه شده است، پایداری مناسبی داشتند.



شکل ۲: طرح‌واره (الف) ساخت بسترهای فعال SERS با نشانند نانوذرات طلا داخل محلول کلئیدی طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانای FTO با اعمال ولتاژ ۷/۵ ولت به روش الکترونهشت. (ب) قطره‌افشان کردن اسید آمینه تیروزین روی بسترهای فعال SERS به هدف آشکارسازی آن. (ج) سیگنال رامان و SERS اسید آمینه تیروزین نشاندهنده بر روی شیشه و بسترهای فعال SERS که با تابش نور لیزر به آن‌ها اندازه‌گیری و ثبت می‌شود.

۱-۲- مشخصه‌یابی

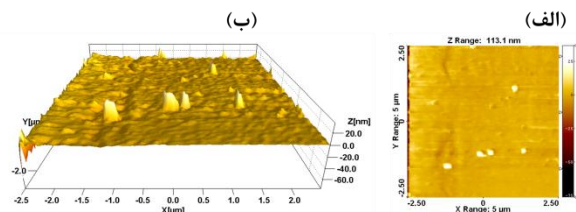
دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتوی X محلول کلئیدی نانوذرات طلا و بسترهای فعال SERS به ترتیب به وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 و دستگاه XPert-Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند با پرتوی تک‌فام Cu K α با طول موج ۰/۱۵۴ نانومتر، جریان ۴۰ میلی‌آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به وسیله دستگاه Hitach مدل S4160، دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS)، مدل Zetasizer Nano-ZS ساخت کشور مالورن-انگلستان و تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه شرکت نانوسیستم پارس ساخت ایران بررسی شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان Takram مدل P50COR10 ساخت شرکت تکسان با تابش نور لیزر Nd: YAG، با طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم ۷۵ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

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

شکل ۲- (الف)، طیف جذب نانوذرات طلا ساخته شده به روش شیمیایی با عامل کاهنده تری سدیم سیترات را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۵۳۰ نانومتر تشکیل نانوذرات طلا را تأیید می‌کند [۳۲]، مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های

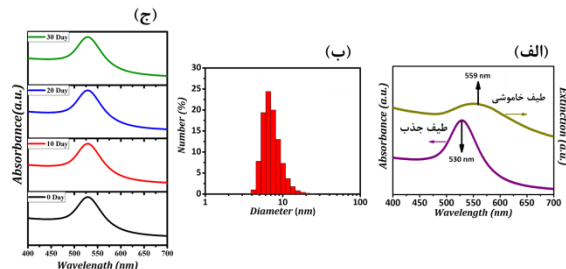
شکل ۴- (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه‌بعدی بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO را نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Image Plus (نسخه ۲/۹) میانگین زبری ۳۵/۲ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۱۸۹/۹ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۸۹/۳ به دست آمد. زبری سطحی که به وسیله بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO ایجاد شده است، می‌تواند مراکز برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود [۳۶].



شکل ۴: تصاویر AFM، (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

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

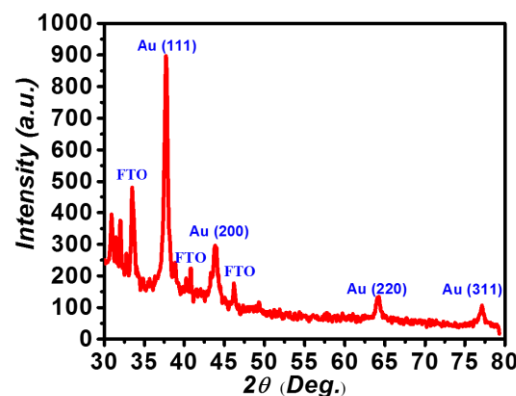
در شکل ۵- الف تصویر FESEM بسترهای فعال FTO مشاهده می‌شود که پوششی یکنواخت روی آن مشاهده می‌شود. شکل ۵- ب، تصاویر FE-SEM بسترهای فعال SERS را در زمان ۵ دقیقه لایه نشانی نشان می‌دهد. در نمونه شکل ۵- ب، سطح بستر شیشه رسانای FTO با نانوذرات و ذرات بزرگ‌تر پوشیده شده است. ذرات ریزتر به رنگ تیره‌تر در پس‌زمینه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



شکل ۵: (الف)، طیف جذب نانوذرات طلا ساخته شده به روش شیمیایی با بیشینه جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر و طیف خاموشی بسترهای فعال SERS نانوذرات طلا با بیشینه خاموشی در طول موج ۵۵۹. (ب)، نمودار توزیع اندازه نانوذرات طلا که با استفاده از DLS اندازه‌گیری شده است. (ج)، طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا ساخته شده به روش شیمیایی با عامل کاهنده تری‌سدیم سیترات به منظور بررسی پایداری نانوذرات طلا (به مدت ۳۰ روز).

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

شکل ۳، الگوی پراش اشعه ایکس بسترهای فعال SERS را نشان می‌دهد. با مشاهده بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه 2θ برابر با $38/38$ ، $44/87$ ، $64/85$ و $74/86$ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است، تشکیل ساختار FCC طلا تأیید می‌شود. قله‌های اضافه ظاهر شده مربوط به شیشه‌ای رسانای FTO است [۳۵].



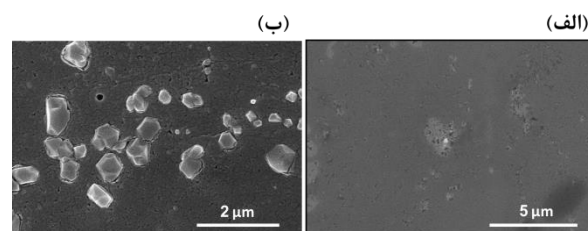
شکل ۳: الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای رسانای FTO، حسگرهای زیستی SERS

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

۱۰-۲ مولار و با استفاده از طیف‌سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن اسیدآمینۀ تیروزین با غلظت ۲-۱۰ مولار بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینۀ تیروزین (شکل ۶) ظاهر می‌شوند. ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینۀ تیروزین [۸] به صورت خط‌چین‌هایی بر روی طیف‌های اسیدآمینۀ تیروزین در شکل ۶- الف نمایش داده شده است. در مورد مولکول اسیدآمینۀ تیروزین قرار داده شده بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای رسانای FTO، ارتعاشات کششی COO- و خمشی C-C و خمشی C-N، ارتعاشات خمشی C-C، ارتعاشات خمشی C-H و خمشی C-N، ارتعاشات کششی C-C و ارتعاشات خمشی NH₂، ارتعاشات کششی C-C، ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH₂، ارتعاشات کششی COO-، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات خمشی NH₂، ارتعاشات کششی C-H، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات خمشی C-H، ارتعاشات خمشی C-H به ترتیب در ۶۴۷، ۸۴۳، ۹۸۲، ۱۰۵۷، ۱۲۱۲، ۱۳۳۱، ۱۳۹۵، ۱۴۹۳، ۱۵۵۱، ۱۷۴۷، ۲۳۳۱، ۲۴۵۰، ۲۹۹۱ و ۲۹۹۱ cm⁻¹ ظاهر می‌شوند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO به دلیل پراکندگی نور از نقاط زبر است. ذرات بزرگ‌تر طلا که در شکل ۵-ب، مشاهده می‌شوند، با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به اسیدآمینۀ تیروزین، سیگنال رامان آن‌ها را بهبود می‌دهند. در کنار پراکندگی نور از ذرات بزرگ‌تر طلا یکی دیگر از دلایل بهبود سیگنال رامان، تشدید پلاسمون‌های سطحی ذرات کوچک‌تر طلا یا همان میدان‌های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات طلا مشاهده شده در شکل ۵-ب، به مانند لنز اپتیکی عمل می‌کنند و نور لیزر فرودی را در اطراف خود متمرکز می‌کنند. بنابراین شدت میدان الکتریکی در نزدیکی نانوذرات افزایش می‌یابد و با قرارگیری اسیدآمینۀ تیروزین در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه می‌کنند و قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های مولکولی آن‌ها تقویت می‌شود و سیگنال‌های پرشدت‌تری را نشان می‌دهند [۳۸ و ۳۹].

شکل ۶- ب، طیف SERS اسیدآمینۀ تیروزین با غلظت‌های ۲-۱۰ (منحنی سیاه)، ۳-۱۰ (منحنی قرمز)، ۴-۱۰ (منحنی آبی)،

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



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

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

شکل ۶- الف، طیف رامان بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمینۀ تیروزین، قرار داده شده با غلظت ۲-۱۰ مولار بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS اسیدآمینۀ تیروزین، قرار داده شده با غلظت ۲-۱۰ بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی آبی) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان اسیدآمینۀ تیروزین که روی زیرلایه شیشه‌ای لایه‌شانی شده‌اند (منحنی قرمز)، نشانی از ارتعاش‌های مولکولی اسیدآمینۀ تیروزین مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این گونه حتی با غلظت

عدد موج 1 cm^{-1} ۶۴۷، 1 cm^{-1} ۱۳۳۱ و 1 cm^{-1} ۲۵۶۸ با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شدند [۴۰].

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

که $n = 6$ ، تعداد طیف‌های رامان مورد آزمایش قرار گرفته شده، I_i شدت سیگنال رامان در هر قله مشخص و \bar{I} ، میانگین شدت سیگنال رامان قله‌های مشخص شده را نشان می‌دهند. شکل ۶-د، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت ۷-۱۰ مولار اسیدآمینة تیروزین برای قله‌هایی در عدد موج 1 cm^{-1} ۶۴۷، 1 cm^{-1} ۱۳۳۱ و 1 cm^{-1} ۲۵۶۸ که به ترتیب مقدار RSD، ۲/۶۹، ۳/۱۱، ۳/۷۲ درصد محاسبه شده است و در شکل ۶-ه، تغییرات محاسبه RSD برای عدد موج 1 cm^{-1} 647، مقدار ۲/۶۹ درصد (نمودار قرمز)، برای عدد موج 1 cm^{-1} ۱۳۳۱، مقدار ۳/۱۱ درصد (نمودار سبز) و برای عدد موج 1 cm^{-1} ۲۵۶۸، مقدار ۳/۷۲ درصد (نمودار آبی) به صورت نمودار ستونی مشخص شده است. انحراف استاندارد نسبی به دست آمده در این آزمایش به صورت میانگین برابر با ۳/۱۷ درصد به دست آمد که از لحاظ آماری نشانگر عملکرد رضایت‌بخش روش به کار گرفته شده برای تعیین غلظت اسیدآمینة تیروزین است. روش‌های دیگری که برای تعیین مقدار اسیدآمینة تیروزین در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند، شامل کروماتوگرافی گازی و مایع با آشکارسازهای جرمی است که اگرچه گاهی حدود تشخیص پایینی برای آن‌ها حاصل شده است، آماده‌سازی زیادی برای نمونه در آن‌ها مورد نیاز است و همچنین هزینه و زمان آماده‌سازی و تجزیه نمونه در آن‌ها بالا است [۴۱ و ۴۲].

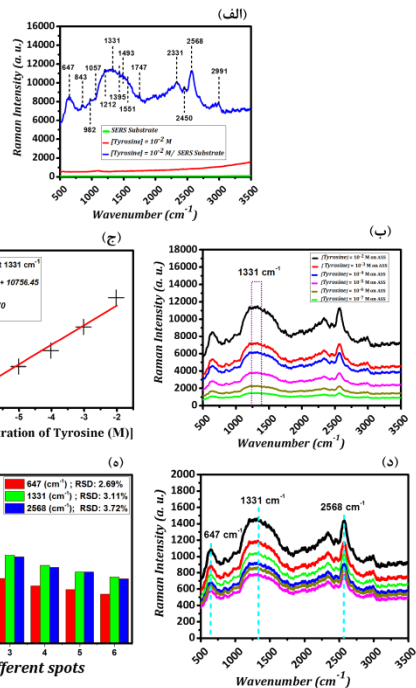
۵-۱۰ (منحنی صورتی)، ۶-۱۰ (منحنی قهوه‌ای) و ۷-۱۰ (منحنی سبز)، مولار بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO را نشان می‌دهد. با کاهش غلظت اسیدآمینة تیروزین، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول‌های اسیدآمینة تیروزین و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به گونه‌ای که در غلظت‌های کمتر از ۷-۱۰ مولار، ارتعاش‌های اسیدآمینة تیروزین به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای می‌تواند تا غلظت ۷-۱۰ مولار اسیدآمینة تیروزین را شناسایی کند. شکل ۶-ج، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH₂ در عدد موج 1 cm^{-1} 133۱ را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینة تیروزین C، نشان می‌دهد که با برازش انجام‌شده از رابطه (۱) پیروی می‌کند.

$$I = 1560/65 C + 10756/45 \quad (R2=0/970) \quad (1)$$

که ضریب رگرسیون (R₂) آن برابر با ۰/۹۷۰ است. می‌توان با استفاده از این نمودار با مشاهده شدت قله ارتعاش‌های مولکولی ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH₂ در عدد موج 1 cm^{-1} ۱۳۳۱ برای مقدار نامشخص از اسیدآمینة تیروزین، غلظت آن را به دست آورد. در ادامه، به منظور تکرارپذیری در ساخت بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO تعداد شش آزمایش پیوسته برای غلظت ۷-۱۰ مولار از اسیدآمینة تیروزین در طول یک روز انجام شد. شکل ۶-د، طیف SERS شش نقطه مجزا از اسیدآمینة تیروزین در غلظت ۷-۱۰ مولار به مقدار ۵ میکرولیتر لایه‌نشانی شده بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، تمام طیف‌های SERS، اسیدآمینة تیروزین در غلظت ۷-۱۰ مولار به خوبی با یکدیگر مطابقت دارند و هیچ تغییری در جابه‌جایی موقعیت مکانی و مشخصه طیف‌ها مشاهده نمی‌شود. انحراف استاندارد نسبی (RSD) به منظور بررسی تکرارپذیری ساخت بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO در غلظت ۷-۱۰ مولار از اسیدآمینة تیروزین برای قله‌های در

نتیجه‌گیری

به منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد عصبی که ناشی از کمبود مولکول اسیدآمینه تیروزین در بدن است، آشکارسازی این مولکول دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما، به دلیل ضعیف بودن سیگنال رامان عملاً شناسایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن مولکول اسیدآمینه تیروزین در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند طلا و پراکندگی نور از ذرات بزرگ فلزی می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. بنابراین ابتدا با استفاده از روش کاهش شیمیایی، نانوذرات طلا با اندازه تقریبی ۲۰ نانومتر ساخته شد و در ادامه با به کارگیری روش الکترونهشت که روشی ساده، سریع و ارزان است، در دمای اتاق، نانوذرات طلا بر روی بسترهای شیشه‌ای FTO با اعمال ولتاژ ۱/۵ ولت در زمان ۵ دقیقه لایه‌نشانی شدند و این بسترها به عنوان بستر فعال SERS جهت آشکارسازی مولکول اسیدآمینه تیروزین استفاده شدند. با قرار دادن تیروزین بر روی بسترهای فعال SERS، در تمامی نمونه‌ها و غلظت‌های مختلف اسیدآمینه تیروزین، سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد که ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذراتی است که در روش الکترونهشت از محلول بر روی سطح FTO نشاندگی شده‌اند که با دریافت نور لیزر فرودی، نور آن را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری مولکول اسیدآمینه تیروزین در این مناطق به دلیل دریافت میدانی الکتریکی قوی‌تر، مولکول اسیدآمینه تیروزین قطبیده‌تر می‌شود و در نتیجه ارتعاشات شدیدتری دارد. در ضمن، با افزایش زمان لایه‌نشانی به دلیل افزایش اندازه ذرات بزرگ‌تر و افزایش زبری سطح، پراکندگی نور از این ذرات افزایش می‌یابد که نتیجه آن بهبود بیشتر سیگنال رامان اسیدآمینه تیروزین است. با مشاهده قله پلاسmoni بسترهای فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، نانوذرات طلا به صورت محلول کلوئیدی فاز آبی یا لایه‌نشانی شده روی زیرلایه شیشه‌ای رسانا FTO ساخته شده به ترتیب در ۵۳۰ نانومتر ۵۵۹ نانومتر، مشاهده ساختار FCC در مشخصه‌یابی XRD، ساخت بسترهای فعال نانوحسگرهای زیستی SERS، لایه‌نشانی شده روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO تأیید شد. با مشاهده تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM)، بسترهای فعال SERS، نانوذرات طلا لایه‌نشانی شده



شکل ۶: (الف)، طیف رامان بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی سبز)، طیف رامان اسیدآمینه تیروزین قرار داده شده با غلظت ۱۰^{-۲} مولار بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی قرمز)، طیف SERS اسیدآمینه تیروزین قرار داده شده با غلظت ۱۰^{-۲} بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای رسانا FTO (منحنی آبی). (ب)، طیف SERS اسیدآمینه تیروزین با غلظت‌های ۱۰^{-۲} (منحنی سیاه)، ۱۰^{-۳} (منحنی قرمز)، ۱۰^{-۴} (منحنی آبی)، ۱۰^{-۵} (منحنی صورتی)، ۱۰^{-۶} (منحنی قهوه‌ای)، ۱۰^{-۷} (منحنی سبز)، مولار بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای رسانا FTO (شکل ج)، منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت I_{SERS} سیگنال SERS مربوط به ارتعاشات مولکولی ارتعاشات کششی C-C و خمشی CH₂ در عدد موج ۱۳۳۱ cm⁻¹ را برحسب تغییرات لگاریتمی غلظت اسیدآمینه تیروزین، C بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO که برگرفته از شکل (ب) است. (د)، طیف SERS شش نقطه مجزا از اسیدآمینه تیروزین در غلظت ۱۰^{-۷} مولار به مقدار ۵ میکرولیتر اضافه شده بر روی بستر فعال SERS، نانوذرات طلا پوشش داده شده بر روی بسترهای شیشه‌ای رسانا FTO، نمودار تغییرات تعداد شش آزمایش پیوسته از غلظت ۱۰^{-۷} مولار تیروزین برای قله‌هایی در عدد موج ۱۳۳۱ cm⁻¹، ۲۵۶۸ cm⁻¹ و ۶۴۷ cm⁻¹ که به ترتیب مقدار RSD ۲/۶۹، ۳/۱۱ و ۳/۷۲ درصد محاسبه شده است و در شکل (ه)، تغییرات محاسبه RSD برای عدد موج ۱۳۳۱ cm⁻¹، مقدار ۲/۶۹ درصد (نمودار قرمز)، برای عدد موج ۱۳۳۱ cm⁻¹، مقدار ۳/۱۱ درصد (نمودار سبز) و برای عدد موج ۶۴۷ cm⁻¹، مقدار ۳/۷۲ درصد (نمودار آبی) به صورت نمودار ستونی مشخص شده است.

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

References:

1. Yudong L. Diazotization-coupling reaction-based determination of tyrosine in urine Using Agnanocubes by surface-enhanced Raman spectroscopy: *Nanomaterials* 2018; 8(6): 400.
2. Lichter-Konecki U , Jerry V. Phenylketonuria: current treatments and future developments. *Drugs* 2019; 79(5): 495-500.
3. Wegberg V. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases* 2017; 12(1): 162.
4. Hadi B, Salimi H, Ganjali MR. Simultaneous voltammetric determination of droxidopa, acetaminophen, and tyrosine on hematoxylin and graphene oxide/ZnO nanocomposite-modified glassy carbonelectrode. *Ionics* 2018; 24(5): 1487-95.
5. Cinzia M. Activation of tyrosine phosphorylation signaling in erythrocytes of patients with alzheimer's disease. *Neuroscience* 2020; 127(5): 1387-99.
6. Joyal G, Olivier B, Ismail N. Effect of LPS treatment on tyrosine hydroxylase expression and Parkinson-like behaviors. *Hormones and behavior* 2017; 89: 1-12.
7. Mohammad Mahdi M. Preparation of monolithic molecularly imprinted polymer sol-gel packed tips for high-throughput bioanalysis: Extraction and quantification of l-tyrosine in human plasma and urine samples utilizing liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2014; 967: 168-73.
8. Madzharova F, Heiner Z, Kneipp J. surface-enhanced Hyper- Raman scattering of the Amino Acids Tryptophan, Histidine, Phenylalanine, and Tyrosine: the *Journal of Physical Chemistry* 2017; 121: 1235-42.
9. Cheng ML, Tsai BC, Yang J. Silver nanoparticle-treated filter paper as a highly sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate for detection of tyrosine in aqueous solution: *Analytica. Chimica. Acta* 2011; 708: 89-96.
10. B anta-wright S, Steiner R. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening: A. *Primer. for. Neonatal. and. Nurses* 2004; 18: 41-7.
11. Escobar-Morreale HF, Samino S, Insenser M, Vinaixa M, Luque-Ramírez M, Lasuncion, MA, Correig X. Metabolic Heterogeneity in Polycystic Ovary Syndrome Is Determined by Obesity: Plasma Metabolomic Approach Using GC-MS: *Clinical. Chemistry* 2012; 58: 999-1005.
12. Njagi J, Chernov MM, Leiter JC, Andreescu S. Amperometric Detection of Dopamine in Vivo with an Enzyme Based Carbon Fiber Microbiosensor: *American Chemical Society-Analytical Chemistry* 2010; 82: 989-97.
13. Phillips TM. Measurement of Bioactive Neuropeptides Using a Chromatographic Immunosensor Cartridge: *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY* 1996; 10: 331-6.
14. Kondo DG, Hellem TL, Sung YH, Kim N, Jeong EK, DelMastro K. Review: Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Pediatric Major Depressive Disorder: *Hindawi Publishing Corporation Depression Research and Treatment* 2011; 14: 13.
15. Wang C, Meloni MM, Wu X, Zhuo M, He T, Wang J, Dong P. Magnetic plasmonic particles for SERS-based bacteria sensing A review: *A.I.P. Advances* 2019; 9: 010701.
16. Su SR, Chen YY, Li KY, Fang YC, Wang CH, Yang CY, Chau LK, Wang SC. Electrohydrodynamically enhanced drying droplets for concentration of Salmonella bacteria prior to their detections using antibody-functionalized SERS-reporter submicron beads: *Sensors and Actuators. B. Chemical* 2019; 283: 384-9.
17. Zhou H, Yang D, Ivleva NP, Mircescu NE, Niessner R, Haisch C. SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles: *Analytical. Chemistry* 2014; 86(3): 1525-33.
18. Shrivastava S, Dash D. Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver: *NANO-Micro Letters* 2010; 2: 164-8.
19. Krasteva N, Besnard I, Guse B, E. Bauer R, Mullen K, Yasuda A. Self-Assembled Gold Nanoparticle/ Dendrimer Composite Films for Vapor Sensing Applications: *NANO Letters* 2002; 2: 551-5.
20. Wu J, Mangham SC, Reddy VR, Manasreh MO, Weaver BD. Surface plasmon enhanced intermediate-band based quantum dots solar cell: *Solar Energy Materials & Solar Cells* 2012; 102: 44-9.

21. McLellan MJ, Li ZY, Andrew RS, Xia Y. The SERS Activity of a Supported Ag Nanocube Strongly Depends on Its Orientation Relative to Laser Polarization: *NANO Letters* 2007; 4: 1013-7.
22. Yu X, Wang L, Di J. Electrochemical Deposition of High Density Gold Nanoparticles on Indium/Tin Oxide Electrode for Fabrication of Biosensors: *Nanoscience and Nanotechnology* 2011; 11: 11084-8.
23. Berkovitch N, Ginzburg P, Orenstein M. Concave Plasmonic Particles: Broad-Band Geometrical Tunability in the Near-Infrared. *ACS NANO* 2010; 10: 1405-9.
24. By Brandon DL, Kim JS, Chin C, Guo LJ. Nanoimprint Lithography Based Approach for the Fabrication of Large-Area, Uniformly Oriented Plasmonic Arrays: *ADVANCED MATERIALS* 2008; 20: 1129-35.
25. Zhang XY, Hu A, Zhang T, Lei W, Xue XJ, Zhou Y, Duley W. Self-Assembly of Large-Scale and Ultrathin Silver Nanoplate Films with Tunable Plasmon Resonance Properties: *ACS NANO* 2011; 5: 9082-93.
26. Liang C L, Zhong K, Liu M, Jiang L, Liu SK, Xing DD. Synthesis of morphology-controlled silver nanostructures by electrodeposition: *NANO-MICRO LETTERS* 2010; 2: 6-11.
27. Cyrankiewicz M, wybranowski T, Kruszewski S. Study of SERS efficiency of metallic colloidal systems: *Journal Physics* 2007; 79: 012013.
28. Duan N, Chang B, Zhang H, Wang Z, Wu S. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor: *International Journal Food Microbiology* 2016; 218: 38-43.
29. Wang LR, Fang Y. IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles: *Spectrochim. Acta. Part. A. Mol. Biomol. Spectrosc* 2006; 63(3): 614-8.
30. Jing C, Fang Y. Simple method for electrochemical preparation of silver dendrites used as active and stable SERS substrate: *Journal of Colloid and Interface. Science* 2007; 314: 46-51.
31. Cañamares MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M, Oujja M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties: *J. Colloid. Interface. Sci* 2008; 326: 103-9.
32. Ngumbi PK, Mugo SW, Ngaruiya JM. Determination of Gold Nanoparticles Sizes via Surface Plasmon Resonance. *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*. 2018; 11: 25-9.
33. Tarik Baytekin H , Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-9.
34. Bohren CF, Huffman DR. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley. New York. 1983; 306: 625.
35. Liu L, Xu X, Ye Y, Ma M, Liu Y, Lei J, Yin N. Electrolysis synthetic silver nanoparticles enhanced light emission from CdSe quantum dots: *Thin Solid Films* 2012; 526: 127-32.
36. Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-9.
37. S.Y. Ding, E.M. You, Z.Q. Tian, M. Moskovits. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Chemical Society Reviews*. 2017; 46: 4042-76.
38. H.Y. Chen, M.H. Lin, C.Y. Wang, Y.M. Chang, S. Gwo. Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 42: 13698-705.
39. J.H. Granger, N.E. Schlotter, A.C. Crawford, M.D. Porter. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Chemical Society Reviews*. 2016; 45: 3865-82.
40. H.M. Parsons, D.R. Ekman, T.W. Collette, M.R. Viant. Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics. *Analyst*. 2009; 134: 478-85.
41. F. al-Taher, R. Juskelis, Y. Chen, J. Kapposo. Comprehensive Pesticide analysis in Juice Using a Combination of GC-MS and LC-MS Methods.

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

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

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

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