

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Thị Thư

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VẾT CỦA ENROFLOXAXIN VÀ
CHLORAMPHENICOL BẰNG PHƯƠNG PHÁP CẢM BIẾN TÁN
XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT TRÊN TẤM NANO BẠC
HÌNH TAM GIÁC**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA PHÂN TÍCH

Hà Nội – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Thị Thu

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VẾT CỦA ENROFLOXAXIN VÀ
CHLORAMPHENICOL BẰNG PHƯƠNG PHÁP CẢM BIẾN TÁN
XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT TRÊN TẤM NANO BẠC
HÌNH TAM GIÁC**

Chuyên ngành: Hoá phân tích

Mã số: 8440118

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA PHÂN TÍCH

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Lương Trúc Quỳnh Ngân

Hà Nội – 2023

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Lương Trúc Quỳnh Ngân cùng sự cộng tác của các đồng nghiệp. Các kết quả nghiên cứu được thực hiện tại Viện khoa học vật liệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các số liệu và kết quả trong luận văn này là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất cứ luận án nào khác.

Hà Nội, ngày ... tháng ... năm 2023

Tác giả luận văn

Vũ Thị Thu

Lời cảm ơn

Để hoàn thành được Luận văn thạc sĩ này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **TS Lương Trúc Quỳnh Ngân**, trưởng phòng Phát triển thiết bị và phương pháp phân tích, Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ, gợi ý chi tiết những ý tưởng khoa học, cung cấp thông tin tư liệu, những kinh nghiệm thực nghiệm và luôn khuyến khích tôi trong suốt quá trình thực hiện hoàn thành luận văn

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn trân trọng đến các thầy cô giáo và cán bộ trong Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy, truyền đạt cho tôi nhiều kiến thức quý báu trong suốt hai năm học vừa qua.

Tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo Viện Khoa học vật liệu, GS. TS. Đào Trần Cao và các chú, các anh chị trong phòng Phát triển thiết bị và phương pháp phân tích, Viện Khoa học vật liệu đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn thạc sĩ.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè, người thân đã luôn ở bên để động viên và là nguồn cổ vũ lớn lao, là động lực giúp tôi hoàn thành luận văn này.

Một lần nữa em xin chân thành cảm ơn!

Học viên

Vũ Thị Thu

MỤC LỤC

Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn	ii
MỤC LỤC.....	iii
Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt	vi
Danh mục các hình.....	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ THUỐC KHÁNG SINH ENROFLOXAXIN VÀ CHLORAMPHENIOL.....	4
1.1.1. Giới thiệu về thuốc kháng sinh enrofloxacin.....	4
1.1.2. Giới thiệu về thuốc kháng sinh chloramphenicol	5
1.1.3. Các phương pháp phân tích enrofloxacin và chloramphenicol	6
1.2. TỔNG QUAN VỀ TÁN XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT	8
1.2.1. Giới thiệu về tán xạ Raman.....	8
1.2.2. Giới thiệu về tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS)	11
1.2.3. Yêu cầu của để SERS.....	15
1.2.4. Hệ số tăng cường SERS	16
1.2.5. Ứng dụng của SERS.....	16
1.2.6. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	17
1.3. TỔNG QUAN VỀ TẮM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC	18
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	21
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU.....	21
2.2.1. Hoá chất.....	21

2.2.2. Dụng cụ, thiết bị	22
2.3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.3.1. Chế tạo các tấm nano bạc hình tam giác	22
2.3.2. Các phương pháp khảo sát cấu trúc và tính chất của các tấm nano bạc hình tam giác chế tạo được	24
2.3.2.1. Khảo sát hình thái bằng kính hiển vi điện tử quét	24
2.3.2.2. Phổ hấp thụ UV-Vis	26
2.3.3. Đánh giá khả năng ứng dụng của các tấm nano bạc hình tam giác trong cảm biến tán xạ Raman tăng cường bề mặt	27
2.3.3.1. Khảo sát hệ số tăng cường của đế SERS AgNPLs.....	27
2.3.3.2. Khảo sát độ đồng đều, độ lặp lại, độ ổn định của đế SERS AgNPLs.	28
2.3.4. Khảo sát ứng dụng hệ các tấm nano bạc hình tam giác trong phân tích lượng vết của thuốc kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol	29
2.3.4.1. Đánh giá khả năng phát hiện của đế SERS AgNPLs đối với hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol	29
2.3.4.2. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp SERS trong phân tích hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	32
3.1. KẾT QUẢ CHẾ TẠO ĐẾ SERS CÁC TẤM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC	32
3.1.1. Kết quả đo SEM của đế SERS các tấm nano bạc hình tam giác	33
3.1.2. Kết quả phổ cộng hưởng plasmon và cấu trúc tinh thể của các tấm nano bạc hình tam giác.....	34
3.2. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA CÁC TẤM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC TRONG CẢM BIẾN TÁN XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT	37
3.2.1. Hệ số tăng cường tín hiệu SERS của các tấm nano bạc hình tam giác	37

3.2.2. Khảo sát độ lặp lại và độ ổn định của đế SERS AgNPs	41
3.3. ỨNG DỤNG HỆ CÁC TẤM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC TRONG PHÂN TÍCH LƯỢNG VẾT CỦA THUỐC KHÁNG SINH ENROFLOXAXIN VÀ CHLORAMPHENICOL.....	43
3.2.3. Ứng dụng các AgNPs làm cảm biến SERS để phân tích kháng sinh enrofloxacin	43
3.2.4. Ứng dụng các đế SERS AgNPs làm cảm biến để phân tích kháng sinh chloramphenicol.....	45
3.2.5. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp trong phân tích hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol.....	47
3.2.5.1. Xây dựng đường chuẩn	47
3.2.5.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp	49
3.2.5.3. Độ thu hồi.....	50
3.2.5.4. Khảo sát độ đồng đều của đế SERS AgNPs trong phân tích enrofloxacin và chlorampheniol	51
3.2.5.5. Khảo sát độ lặp lại của đế SERS AgNPs trong phân tích enrofloxacin và chlorampheniol	51
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	53
4.1. KẾT LUẬN	53
4.2. KIẾN NGHỊ	53
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	55

Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt

Từ viết tắt	Tên tiếng Anh	Tên tiếng việt
AgNPIs	Triangular silver nanoplates	Các tấm nano bạc hình tam giác
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội các nhà hoá học phân tích chính thống.
Chloram	Chloramphenicol	Chloramphenicol
EM	Electro Magnetic	Trường điện từ
Enro	Enrofloxacin	Enrofloxacin
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí
LC	Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	Sắc ký lỏng khối phổ
LSPR	Localized surface plasmon resonances	Cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of Quantitation	Giới hạn định lượng
MS	Mass Spectrometry	Phổ khối lượng

SERS	Surface-Enhanced of Raman Scattering	Tán xạ Raman tăng cường bề mặt
SERS EF	SERS enhancement factor	Hệ số tăng cường SERS
RSD	Relative Standard Deviation	Độ lệch chuẩn tương đối

Danh mục các bảng

Bảng 2.1. Danh mục hóa chất	21
Bảng 2.2. Các điều kiện chế tạo AgNPLs	23
Bảng 3.1. Các đỉnh SERS tương ứng với các mode dao động của Rhodamine 6G	39
Bảng 3.2. Cường độ SERS của R6G tại đỉnh 1511 cm^{-1} tương ứng với 10 vị trí ngẫu nhiên	40
Bảng 3.3. Các đỉnh đặc trưng Raman tương ứng với các mode dao động của enrofloxacin	44
Bảng 3.4. Các đỉnh đặc trưng Raman tương ứng với các mode dao động của chloramphenicol	46
Bảng 3.5. Các thông số đánh giá đường chuẩn.....	49
Bảng 3.6. Giới hạn phát hiện (LOD) enrofloxacin và chloramphenicol	49
Bảng 3.7. Giới hạn định lượng (LOQ) enrofloxacin và chloramphenicol	49
Bảng 3.8. Độ thu hồi của kháng sinh enrofloxacin.....	50
Bảng 3.9. Độ thu hồi của kháng sinh chloramphenicol	50

Danh mục các hình

Hình 1.1. Công thức cấu tạo của kháng sinh enrofloxacin	4
Hình 1.2. Công thức cấu tạo của kháng sinh chloramphenicol	5
Hình 1.3 (a) Sơ đồ biểu diễn mức năng lượng của tán xạ Raman và tán xạ Rayleigh ; (b) Sơ	9
Hình 1.4. Hình ảnh minh họa cho các mode dao động của phân tử H ₂ O	10
Hình 1.5. Giải đồ minh họa cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ cho một hạt nano hình cầu, thể.....	12
Hình 1.6. Một số loại đế SERS với hình thái cấu trúc khác nhau: các ngôi sao nano (a) [34], hoa	14
Hình 1.7. Phổ SERS của các chất kháng sinh ciprofloxacin (a) [47], amoxicillin (b) [48], và (c) tetracycline.....	17
Hình 1.8. Sơ đồ mô tả quá trình hình thành cấu trúc nano bạc hình tam giác	18
Hình 1.9. Sơ đồ mô tả quy trình tổng hợp các tấm nano Ag hình tam giác sử dụng phương.....	19
Hình 2.1. Sơ đồ chế tạo các tấm nano bạc hình tam giác bằng phương pháp khử hóa học	23
Hình 2.2. Sơ đồ khối kính hiển vi điện tử quét.....	25
Hình 2.3. Sơ đồ minh họa cho phép đo nhiễu xạ tia X.....	26
Hình 2.4. Sơ đồ minh họa hệ đo UV-Vis.....	27
Hình 2.5. Sơ đồ minh họa quy trình phân tích mẫu	31
Hình 3.1. Các mẫu dung dịch có chứa AgNPs được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học ở các.....	32
Hình 3.2. Ảnh SEM của mẫu được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học với các điều kiện AgNO ₃ (0,01M), 23,8ml DI, 700μl C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ . 2H ₂ O (30mM), 250μl.....	33
Hình 3.3. Kết quả phổ cộng hưởng plasmon của mẫu AgNPs	34

Hình 3.4. Giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu AgNPLs	35
Hình 3.5. (a,b) Ảnh SEM với hai độ phóng đại khác nhau của AgNPLs chế tạo bằng phương pháp khử.....	36
Hình 3.6. Phổ Raman của dung dịch R6G nồng độ 10^{-2} M được nhỏ lên trên bề mặt của lá	37
Hình 3.7. Hình ảnh phổ SERS của Rhodamine 6G trong khoảng nồng độ 10^{-7} M đến 10^{-12} M được phân tích sử.....	39
Hình 3.8. Hình ảnh minh họa phổ SERS của chất màu R6G nồng độ 10^{-9} M tại 10 vị trí	40
Hình 3.9. Đồ thị biểu diễn cường độ Raman của R6G tại 1511 cm^{-1} được đo tại mười vị trí.....	41
Hình 3.10. Hình ảnh minh họa phổ SERS của R6G nồng độ 10^{-9} M khi sử dụng đế SERS là AgNPLs	42
Hình 3.11. Phổ SERS của R6G nồng độ 10^{-9} M được ghi lại với đế SERS AgNPLs được phân tán trong nước.....	42
Hình 3.12. Phổ Raman của mẫu bột enrofloxacin	43
Hình 3.13. Biểu diễn phổ SERS của enrofloxacin tại nồng độ 20, 40, 60,100,150 ppb sử dụng đế SERS.....	45
Hình 3.14. Phổ Raman của bột chloramphenicol	46
Hình 3.15. Biểu diễn phổ SERS của chloramphenicol với các nồng độ 20, 40, 60,100,150 ppb sử dụng đế	47
Hình 3.16. Mối quan hệ tuyến tính giữa cường độ đỉnh SERS tại 746 cm^{-1} và nồng độ enrofloxacin	48
Hình 3.17. Mối quan hệ tuyến tính giữa cường độ đỉnh SERS tại 1596 cm^{-1} và nồng độ chloramphenicol	48
Hình 3.18. Hình ảnh minh họa phổ SERS của (a) enrofloxacin, (b) chloramphenicol nồng độ 60ppb tại 10.....	51

Hình 3.19. Hình ảnh minh họa phổ SERS của (a) enrofloxacin, (b) chloramphenicol nồng độ 60ppb khi sử dụng để..... 52

MỞ ĐẦU

Kháng sinh là những chất có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi sinh vật một cách đặc hiệu. Kháng sinh tác động lên các vi sinh vật thông qua việc ức chế sự thành lập vách tế bào, ức chế nhiệm vụ của màng tế bào, ức chế sự tổng hợp protein và ức chế sự tổng hợp axit nucleic của chúng. Kháng sinh ở Việt Nam cũng như trên thế giới thông thường được sử dụng cho động vật dưới các hình thức như dùng ở liều cao trong thời gian ngắn để điều trị bệnh cũng như phòng và ngăn chặn các bệnh (chẳng hạn, bệnh đường tiêu hóa và hô hấp).

Việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản được phổ biến từ nhiều năm qua. Sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đúng cách giúp phòng bệnh cho thủy sản, giúp vật thủy sản tăng trưởng tốt góp phần đảm bảo về sản lượng cho ngành nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, hiện nay tình trạng lạm dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam đã trở thành một vấn đề đáng báo động và được công bố hầu như hàng ngày trên báo chí và các phương tiện truyền thông. Tỷ lệ vi phạm chỉ tiêu hóa chất, kháng sinh cấm và vượt giới hạn cho phép trong các sản phẩm thủy sản vẫn còn cao, thậm chí năm sau cao hơn năm trước... Các loại hóa chất, kháng sinh bị cấm và hạn chế sử dụng vẫn đang được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản như: enrofloxacin, ciprofloxacin, difloxacin, amoxicillin...

Việc lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam gây ra nhiều hệ lụy. Những tồn dư kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản mà con người sử dụng lâu ngày tích tụ dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh gây ra việc giảm khả năng điều trị khi bị bệnh. Hơn nữa, kháng sinh cũng là một trong những nguyên nhân gây ra tình trạng mất an toàn vệ sinh thực phẩm. Dư lượng kháng sinh và các chất chuyển hóa của chúng trong môi trường nước, ngay cả ở nồng độ rất thấp (ppb) có khả năng trở thành mối đe dọa đối với hệ sinh thái. Một hệ lụy khác, quan trọng về mặt kinh tế, của việc sử dụng kháng sinh một cách bừa bãi này là thủy sản của Việt Nam gặp nhiều khó khăn khi xuất khẩu. Theo đó, trong tháng 9 và 10/2019, vẫn có 2 đến 3 lô hàng của Việt Nam bị Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ (FDA) từ chối nhập khẩu do không đảm bảo an toàn thực phẩm vì có chất kháng sinh bị cấm hoặc

do dư lượng hóa chất kháng sinh vượt mức giới hạn tối đa cho phép. Từ những hệ lụy nghiêm trọng này, việc phát triển một phương pháp để phát hiện nhanh tồn dư của các chất kháng sinh trên thực phẩm nói chung và trên các sản phẩm thủy sản nói riêng là vấn đề hết sức cần thiết.

Có nhiều phương pháp phân tích định tính và định lượng dư lượng kháng sinh, nhưng đáng tin cậy nhất là phương pháp sắc ký kết hợp với các đầu dò khác nhau nhờ khả năng định tính tốt, định lượng tương đối chính xác, đảm bảo độ đúng, độ nhạy, độ lặp lại. Tuy vậy, các phương pháp này khá đắt tiền và việc phân tích mẫu cũng tốn khá nhiều thời gian. Trước hết, thiết bị sắc ký là một thiết bị đắt tiền, chỉ có một số cơ sở phân tích kiểm nghiệm lớn mới có thể lắp đặt được. Tiếp theo, một yêu cầu quan trọng của phương pháp này là phải thực hiện tốt khâu chuẩn bị mẫu với những bước khá phức tạp. Đây là giai đoạn quyết định khả năng tách, xác nhận và nhất là định lượng được chất phân tích có hàm lượng rất nhỏ so với tạp trong nền mẫu. Chính vì vậy mà phép phân tích sắc ký thường tốn khá nhiều thời gian và kinh phí.

Tán xạ Raman là một công cụ rất hữu ích đối với việc xác định các chất hóa học, sinh học và được công nhận là một kỹ thuật đáng tin cậy để đánh giá độ an toàn và chất lượng của dược phẩm, thực phẩm [1]. Trong tán xạ Raman, các photon bị tán xạ không đàn hồi, chúng hoặc mất bớt hoặc thu thêm một lượng năng lượng đúng bằng năng lượng dao động của phân tử của vật liệu đang xét, từ đó cho ra các vạch dịch phổ Raman (Raman shift) đặc trưng riêng cho từng phân tử. Tuy vậy, tán xạ Raman là một quá trình có xác suất xảy ra rất thấp, do đó tín hiệu Raman đo được thường rất yếu. Chính vì vậy, việc phát hiện các chất có nồng độ thấp là một thách thức rất lớn đối với kỹ thuật ghi phổ Raman thông thường.

Tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) là một kỹ thuật phân tích bề mặt khắc phục được hạn chế về cường độ của tín hiệu tán xạ Raman. Trong kỹ thuật phân tích này chất phân tích được hấp phụ lên trên bề mặt một cấu trúc kim loại có độ gồ ghề ở cấp độ nano thường được gọi là đế SERS, nhờ đó tín hiệu tán xạ Raman của chất phân tích được tăng cường lên nhiều bậc. Hệ số tăng cường tín hiệu Raman của chất phân tích của SERS có thể đạt từ 10^6 đến

10^{14} và trong trường hợp tốt nhất phương pháp này có thể phát hiện đến các đơn phân tử. Nhờ vậy kỹ thuật SERS có thể phát hiện các chất phân tích ở nồng độ rất thấp (thường gọi là nồng độ vết) mà không cần phải thực hiện khâu chuẩn bị mẫu phức tạp. Ngoài ra, do mỗi một chất đều có bộ vạch (đỉnh) Raman đặc trưng của riêng nó (hay còn gọi là “dấu vân tay”), nên SERS có thể cung cấp thông tin chính xác về chất cần phân tích với độ chọn lọc rất cao.

Kỹ thuật SERS được ứng dụng nhiều lĩnh vực như y-sinh học nhằm phát hiện các DNA, protein, virus, vi khuẩn v.v., an toàn thực phẩm nhằm phát hiện các chất độc trong thực phẩm như rhodamin b, melamin, xanh malachit, tinh thể tím v.v., và môi trường nhằm phát hiện các chất gây ô nhiễm môi trường như xyanua, thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ v.v... Do đó, phương pháp SERS hoàn toàn có thể đáp ứng được việc xác định nhanh và chính xác lượng vết của các chất kháng sinh sử dụng trong nuôi trồng thủy sản ở nồng độ thấp với chi phí thấp và thời gian thực hiện ngắn. Trên cơ sở đó, chúng tôi đề xuất đề tài khoa học ***“Nghiên cứu phát hiện vết của enrofloxacin và chloramphenicol bằng phương pháp cảm biến tán xạ Raman tăng cường bề mặt trên tấm nano bạc hình tam giác”*** nhằm góp phần vào việc phát triển phương pháp SERS trở thành một công cụ hữu ích để phân tích dư lượng các chất hữu cơ độc hại trong thực phẩm và các sản phẩm nông nghiệp.

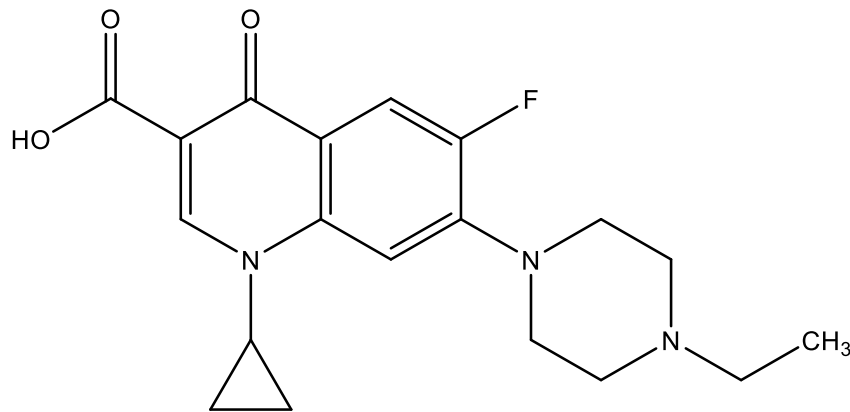
Mục tiêu của đề tài là: Chế tạo và sử dụng các tấm nano bạc hình tam giác làm các cảm biến để phát hiện lượng vết thuốc kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol thông qua kỹ thuật tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ THUỐC KHÁNG SINH ENROFLOXAXIN VÀ CHLORAMPHENIOL

1.1.1. Giới thiệu về thuốc kháng sinh enrofloxacin

Enrofloxacin (Enro) ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$) còn có tên khác là ethyl ciprofloxacin, là một fluoroquinolone thế hệ thứ ba được tổng hợp hóa học [2]. Enrofloxacin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt chống lại nhiều loại vi khuẩn Gram dương (G+) và có tác dụng đặc biệt với mycoplasma. Ưu điểm của enrofloxacin là nó có phổ kháng khuẩn rộng, khả năng diệt khuẩn mạnh, tác dụng nhanh, phân bố rộng rãi trong cơ thể, hơn nữa, enrofloxacin, như một loại thuốc fluoroquinolone cho động vật, tiêu diệt vi khuẩn bằng cách sao chép DNA của vi khuẩn [3,4]. Enrofloxacin có thể được sử dụng kết hợp với các chất chống vi trùng khác để tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh và không có kháng chéo giữa các loại kháng sinh khác. Enrofloxacin hấp thu tốt qua đường tiêu hóa của hầu hết động vật, thậm chí ở cơ thể người. Sau khi uống hoặc tiêm, thuốc sẽ phân bố chủ yếu ở gan, thận và phổi và thấp nhất là ở não.



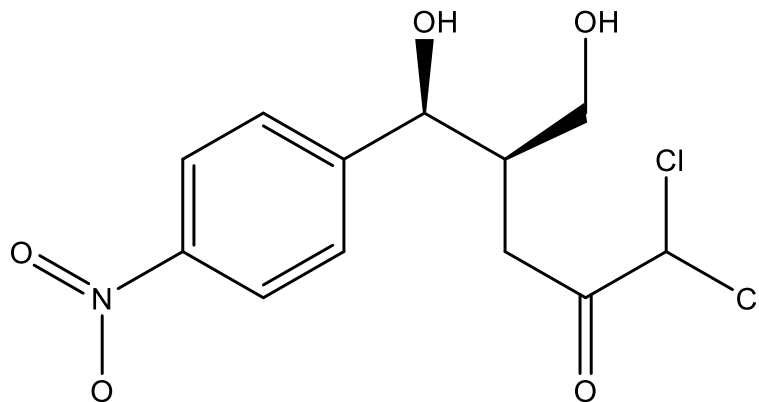
Hình 1.1. Công thức cấu tạo của kháng sinh enrofloxacin

Enrofloxacin sử dụng cho vật nuôi thường dưới dạng thuốc uống hoặc tiêm dưới da. Nó có thể hoạt động độc lập không cần kết hợp cùng một số hợp chất kháng sinh nền. Enrofloxacin trị khá tốt các bệnh liên quan tới viêm nhiễm đường tiết niệu sinh dục đặc biệt tốt nếu nhiễm khuẩn do E.Coli, bệnh phân trắng, phân vàng ở động vật. Trong nuôi trồng thủy sản, enrofloxacin là kháng sinh cho tôm phổ kháng khuẩn rộng, có hiệu quả với nhiều chủng khuẩn gây hại cho tôm. Chính vì vậy, kháng sinh này được xem là cứu cánh cho bà con

nông dân trong trường hợp vi khuẩn kháng thuốc hay điều trị không hiệu quả với các kháng sinh thông thường.

Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê duyệt enrofloxacin là kháng sinh sử dụng cho gia súc và thủy sản vào tháng 10 năm 1996. Tuy nhiên đến năm 2005 thuốc kháng sinh này bị hạn chế, thậm chí cấm sử dụng cho gia cầm do tính gây hại cao và đặc biệt hạn chế sử dụng trên các vật nuôi phát triển nhanh như chó, mèo vì có khả năng ảnh hưởng đến sụn, khớp. Theo Văn bản hợp nhất số 08/VBHN-BNNPTNT – Danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng, hạn chế sử dụng do Bộ NN&PTNT ban hành ngày 25/2/2014, enrofloxacin nằm trong danh mục hóa chất, kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản. Tuy vậy, loại kháng sinh này vẫn còn được bán trên thị trường và vẫn được sử dụng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản.

1.1.2. Giới thiệu về thuốc kháng sinh chloramphenicol



Hình 1.2. Công thức cấu tạo của kháng sinh chloramphenicol

Chloramphenicol (Chloram) ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) là kháng sinh được sử dụng rộng rãi để ngăn ngừa và điều trị bệnh truyền nhiễm của động vật vì khả năng diệt khuẩn hiệu quả và giá thành rẻ. Trong nuôi trồng thủy sản, chloramphenicol còn được dùng là thuốc đặc trị nhiều loại bệnh nhiễm khuẩn máu cho cá, nấm ở tôm và được sử dụng trong chế biến và bảo quản thủy sản. Tuy nhiên, mối nguy hại nghiêm trọng đối với sức khỏe con người bao gồm suy nhược xương tủy, gây tử vong, thiếu máu và các rối loạn máu dẫn đến thuốc kháng sinh này đã bị cấm sử dụng trong sản xuất thức ăn cho động vật ở nhiều

quốc gia, ngoài ra thuốc này còn có khả năng gây ra hội chứng xanh xám ở trẻ sơ sinh. Chloramphenicol cũng nằm trong danh mục hóa chất, kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản theo Văn bản hợp nhất số 08/VBHN-BNNPTNT – Danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng, hạn chế sử dụng do Bộ NN&PTNT ban hành ngày 25/2/2014.

1.1.3. Các phương pháp phân tích enrofloxacin và chloramphenicol

Có nhiều phương pháp phân tích định tính và định lượng dư lượng kháng sinh nói chung và hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol, nhưng đáng tin cậy nhất là phương pháp sắc ký kết hợp với các đầu dò khác nhau [5-11]. Cụ thể:

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): đây là kỹ thuật tách và định lượng các chất rất phổ biến hiện nay, trong đó các chất phân tích được tiêm vào hệ thống HPLC và di chuyển qua cột chứa các hạt (pha tĩnh) nhờ máy bơm dung môi rửa giải (pha động) qua cột. Tốc độ di chuyển của các chất phân tích khác nhau phụ thuộc vào lực tương tác của các chất này với pha tĩnh và pha động dẫn đến thứ tự rửa giải khác nhau. Chất phân tích qua khỏi cột sẽ đến đầu dò để nhận biết. Nhóm nghiên cứu của F. Salehzadeh sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để tách, phát hiện và phân tích dư lượng enrofloxacin trong các mẫu cơ, gan và thận gà với nồng độ trung bình tương ứng là $18,32 \pm 32,29$ SD, $18,34 \pm 12,36$ SD và $26,06 \pm 19,52$ SD ng/g [5]. Visky và các cộng sự đã mô tả một phương pháp HPLC để tách bảy dược chất khác nhau khỏi các tạp chất của chloramphenicol và các tạp chất của nó [6].

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò tử ngoại (UV): do kháng sinh enrofloxacin có khả năng hấp thụ bước sóng tử ngoại nên có thể dùng phương pháp HPLC- đầu dò UV để phân tích chất kháng sinh này trong thực phẩm. Cụ thể, Bilal Aslam và cộng sự đã sử dụng phương pháp HPLC kết hợp với đầu dò tử ngoại ở bước sóng 268nm sử dụng cột C18 để xác định enrofloxacin trong thịt gà với nồng độ trung bình được tìm thấy là 208 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (208ppb) [7]. Tương tự, nhóm nghiên cứu của Al-Rimawi cũng đã sử dụng đầu dò UV với bước sóng 278 nm để phân tích chloramphenicol và thu được kết quả khoảng tuyến tính tốt trong khoảng 0,04–0,16 mg/mL. Độ chính xác của

phương pháp là 100,0% với độ lệch chuẩn tương đối là 0,1%. Phương pháp này nhạy với chloramphenicol với giới hạn phát hiện 0,005% [8].

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS): đây là một phương pháp nhanh, nhạy để xác định đồng thời nhiều chất kháng sinh. Sau khi qua cột tách, chất phân tích được hóa hơi, các hợp chất hữu cơ trung hòa bị ion hóa thành các ion phân tử hay ion mảnh của phân tử mang điện dương hoặc âm, các gốc tự do. Sau đó, các ion được đưa sang bộ phận tách theo khối lượng. Từ các tín hiệu thu được, dựa vào khối lượng ion phân tử, dựa vào đồng vị, dựa vào các mảnh ion phân tử, dựa vào cơ chế tách và dựa vào ngân hàng dữ liệu các ion và mảnh ion, người ta định tính và định lượng được các chất phân tích một cách chính xác. Cụ thể, Stubbings và các cộng sự đã phân tích enrofloxacin trong thịt gà với nồng độ là 50 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [9]. Nhóm nghiên cứu của Joe đã xác định chloramphenicol trong tôm và cá với nồng độ là 0,1ppb [10]. Phạm Kim Đăng và các cộng sự cũng đã xác định được kháng sinh chloramphenicol bằng phương pháp này với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng là 0,009 ng/g và 0,03 ng/g, độ thu hồi dao động từ 83,0 - 99,2% giá trị nồng độ yêu cầu khả năng phát hiện tối thiểu của phương pháp đối với chloramphenicol [11].

Các phương pháp phân tích trên có khả năng định tính tốt, định lượng tương đối chính xác, đảm bảo độ đúng, độ lặp lại và độ nhạy. Tuy vậy, đây là các phương pháp khá đắt tiền và yêu cầu phải có bước xử lý mẫu rất phức tạp và công phu.

Phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS): enrofloxacin và chloramphenicol cũng đã được một số nhóm nghiên cứu phân tích bằng phương pháp SERS. Tán xạ Raman tăng cường bề mặt (Surface-Enhanced Raman Scattering - SERS) là hiện tượng tăng cường độ tán xạ Raman của phân tử lên rất lớn (có thể đạt 10^6 - 10^{14}) khi phân tử này được hấp phụ trên bề mặt kim loại có vi cấu trúc. Nhờ sự tăng cường độ tán xạ Raman rất mạnh, phương pháp này đang được quan tâm nghiên cứu để ứng dụng phát hiện các chất độc hại trong thực phẩm và môi trường. Nhóm nghiên cứu của Xu đã sử dụng vật liệu xốp GMA-EDMA làm đế SERS để phát hiện enrofloxacin trong thịt gà với nồng độ thấp tới 0,01 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (0,01ppm) [12]. Li đã sử dụng các hạt nano bạc

trong việc phân tích, phát hiện enrofloxacin với giới hạn phát hiện là $0,01 \text{ nmol.L}^{-1}$ ($3,59 \cdot 10^{-6} \text{ ppm}$) [13]. Cũng sử dụng các các hạt nano bạc, Fu và các cộng sự đã phát hiện enrofloxacin trong sữa với nồng độ thấp tới $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (10ppm) [14]. Nhóm nghiên cứu của Qianqian đã phát hiện được chloramphenicol với giới hạn phát hiện là 150 fM ($5 \cdot 10^{-8} \text{ ppm}$) [15]. Xiao đã phát hiện cholaramphenicol trong mật ong với giới hạn phát hiện đạt được là $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ ($1,29 \cdot 10^{-3} \text{ ppm}$) bằng cách sử dụng các hạt nano bạc trên đế AAO để [16].

Trong các nghiên cứu trên, đa số các đế SERS là các hạt nano Ag (AgNPs) được dùng để phân tích, phát hiện enrofloxacin và chloramphenicol và chưa có tài liệu nào công bố về việc sử dụng các tấm nano bạc hình tam giác để phát hiện các chất kháng sinh.

1.2. TỔNG QUAN VỀ TÁN XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT

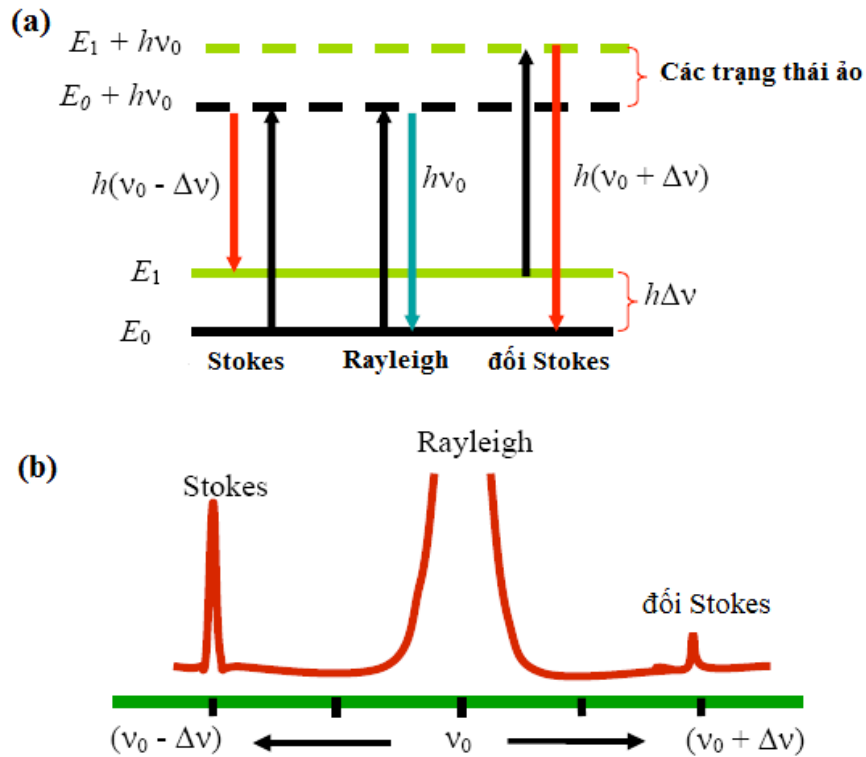
1.2.1. Giới thiệu về tán xạ Raman

Tán xạ Raman là một quá trình tán xạ không đàn hồi giữa photon (lượng tử ánh sáng) và dao động của vật chất hay mạng tinh thể được Raman và Krishnan phát hiện vào năm 1928 [1]. Tán xạ Raman được coi là một công cụ rất hữu ích đối với việc xác định các chất hóa học, sinh học và được công nhận là một kỹ thuật đáng tin cậy để đánh giá độ an toàn và chất lượng của dược phẩm, thực phẩm.

Theo cơ chế của tán xạ Raman, khi chiếu photon có tần số ν_0 tới một phân tử hoặc một tinh thể, photon bị tán xạ theo tất cả các hướng. Tán xạ có thể là đàn hồi hoặc không đàn hồi. Trong trường hợp tán xạ đàn hồi, các photon bị tán xạ có cùng tần số với photon tới (tán xạ Rayleigh) và xác suất xảy ra quá trình này là lớn. Trong trường hợp có trao đổi năng lượng, các photon bị tán xạ có tần số lớn hơn hoặc nhỏ hơn tần số của photon tới: $\Delta\nu = \nu_0 \pm \nu_i$, trong đó ν_i là tần số của dao động của phân tử (hay tinh thể). Trường hợp này được gọi là tán xạ Raman, có xác suất thấp. Nếu photon tán xạ có tần số thấp hơn tần số photon tới ($\Delta\nu = \nu_0 - \nu_i$), ta có vạch Stokes trong phổ Raman. Trường hợp

photon tán xạ có tần số lớn hơn tần số photon tới ($\Delta\nu = \nu_0 + \nu_i$) ta có các vạch đối Stokes (anti-Stokes) trong phổ Raman.

Ánh sáng phản xạ và ánh sáng chiếu vào bao giờ cũng có tần số lệch nhau một khoảng đúng bằng tần số dao động của phân tử được ánh sáng chiếu vào, không phụ thuộc vào tần số của ánh sáng chiếu vào. Do đó, tán xạ Raman được dùng để xác định sự có mặt của phân tử hay tinh thể.



Hình 1.3 (a) Sơ đồ biểu diễn mức năng lượng của tán xạ Raman và tán xạ Rayleigh ; (b) Sơ đồ minh họa cho phổ tán xạ Raman và phổ tán xạ Rayleigh.

Hình 1.3 trình bày sơ đồ mức năng lượng của tán xạ Raman và tán xạ Rayleigh. Nguyên tử trong phân tử hoặc tinh thể có thể nằm ở trạng thái cơ bản (trạng thái 0) hoặc các trạng thái kích thích (trạng thái 1, 2,...). Khi nhận được năng lượng từ photon ánh sáng, nguyên tử có thể từ mức năng lượng cơ bản nhảy lên một mức năng lượng ảo rồi trở về trạng thái kích thích và tạo ra vạch Raman Stokes. Khi các nguyên tử từ trạng thái cơ bản nhảy lên mức ảo rồi lại trở về trạng thái cơ bản thì tạo ra vạch Rayleigh và khi các nguyên tử từ trạng thái kích thích nhảy lên mức ảo rồi trở về trạng thái cơ bản thì tạo ra vạch Raman đối Stokes. Cường độ của vạch Stokes lớn hơn nhiều so với vạch đối

Stokes. Nguyên nhân là do trong điều kiện bình thường, các nguyên tử ở trạng thái cơ bản nhiều hơn rất nhiều so với các nguyên tử ở trạng thái kích thích, vì vậy số nguyên tử tham gia vào quá trình Stokes lớn hơn rất nhiều so với các nguyên tử tham gia vào quá trình đối Stokes.

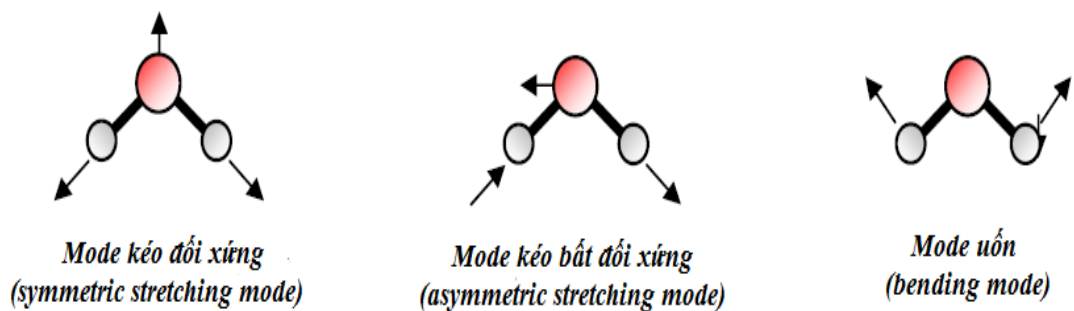
Sự chênh lệch về năng lượng giữa ánh sáng tới và ánh sáng tán xạ được gọi là dịch chuyển Raman (Raman shift) và được xác định bằng phương trình:

$$\Delta E = \frac{1}{\lambda_{tới}} - \frac{1}{\lambda_{tán\ xạ}} \quad (1.1)$$

trong đó ΔE là dịch chuyển Raman về bước sóng, $\lambda_{tới}$ là bước sóng của ánh sáng tới và $\lambda_{tán\ xạ}$ là bước sóng của photon tán xạ.

Các dao động có thể quan sát được trên phổ Raman cần phải tuân theo quy tắc chọn lọc như sau: *các dao động nào làm thay đổi độ phân cực của phân tử, nguyên tử thì mới là dao động tích cực Raman và có thể quan sát được trên phổ* [17].

Dao động của các phân tử trong đó mỗi nguyên tử của phân tử dao động cùng tần số và lệch ra khỏi vị trí cân bằng của nó cùng một lúc với tất cả các nguyên tử khác trong phân tử, được gọi là các mode dao động cơ bản. Số mode dao động cơ bản của một phân tử phụ thuộc vào số lượng của các nguyên tử trong phân tử. Hình 1.4 minh họa các mode dao động cơ bản của phân tử H_2O .



Hình 1.4. Hình ảnh minh họa cho các mode dao động của phân tử H_2O

Đối với một mode dao động được coi là tích cực Raman, sự dao động phải gây ra một số thay đổi trong sự phân cực của phân tử. Ellipsoid phân cực của các phân tử có thể thay đổi về độ lớn hoặc hình dạng hoặc hướng trong quá trình dao động.

Thông thường phổ Raman có thể cung cấp thông tin về sự dao động của các loại hóa chất vô cơ và hữu cơ. Cụ thể, phổ Raman có thể cung cấp thông tin về liên kết phối tử kim loại, dẫn đến kiến thức về thành phần, cấu trúc và tính ổn định của các phức chất này. Điều này có thể đặc biệt hữu ích trong các hợp chất kim loại có tần số hấp thụ dao động thấp trong vùng nhìn thấy và hồng ngoại gần. Phổ Raman cũng rất hữu ích để xác định các nhóm chức năng và dấu vết của các phân tử hữu cơ. Thông thường, dao động Raman có tính đặc trưng cao đối với một phân tử cụ thể, do dao động của toàn bộ phân tử, không phải trong các nhóm cục bộ [18]. Tuy nhiên, kỹ thuật này có một hạn chế đó là xác suất xảy ra tán xạ Raman rất thấp (cỡ 10^{-6} - 10^{-8} , nghĩa là cứ 10^6 - 10^8 photon tới thì mới có một photon bị tán xạ Raman), do đó cường độ của hiệu ứng Raman thường rất thấp [19]. Vì vậy rất khó để thu được tín hiệu Raman của các phân tử có nồng độ thấp. Ứng dụng của tán xạ Raman trong việc phân tích phát hiện các phân tử do vậy cũng bị hạn chế rất nhiều.

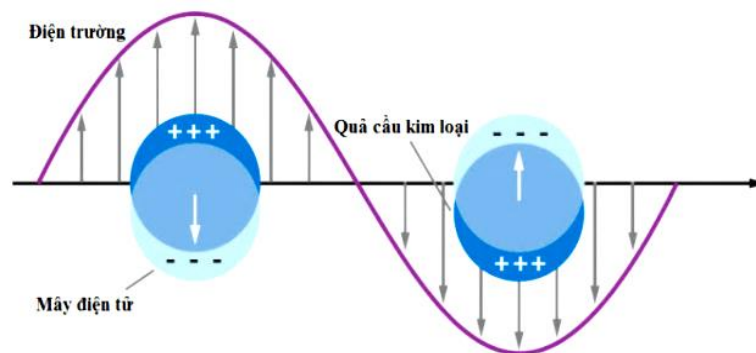
1.2.2. Giới thiệu về tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS)

Tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) là hiệu ứng mà trong đó cường độ của các vạch phổ tán xạ Raman của các phân tử phân tích tăng lên nhiều lần khi chúng nằm trong môi trường có chứa bề mặt kim loại có cấu trúc nano. Hiệu ứng này được quan sát thấy đầu tiên vào năm 1974, khi nhóm nghiên cứu của Fleischmann đã phát hiện ra rằng sự có mặt của một điện cực bạc nhám sẽ làm cho cường độ tín hiệu Raman của pyridin hấp thụ trên bề mặt điện cực đó tăng lên nhiều lần [20]. SERS đã và đang được phát triển thành một kỹ thuật để phát hiện một lượng rất nhỏ của các phân tử hóa học hữu cơ hoặc sinh học và trong một vài trường hợp, SERS thậm chí có thể phát hiện tới đơn phân tử [21,22].

Các cơ chế gây ra SERS cho đến nay vẫn còn nhiều điểm chưa được làm rõ. Tuy nhiên, cho đến nay hầu hết các các nhà khoa học đều thống nhất rằng sự tăng cường tín hiệu Raman trong hiệu ứng SERS được đóng góp chính bởi hai cơ chế: cơ chế điện từ và cơ chế hóa học trong đó sự tăng cường điện từ đóng góp chủ yếu vào cơ chế tăng cường SERS [23-27]. Cụ thể, trong một số trường hợp, sự tăng cường SERS có thể đạt đến 10^{14} [25] thì sự tăng cường

điện từ sẽ đóng góp ít nhất khoảng $10^8 - 10^{10}$ [27, 29] còn sự tăng cường hóa học chỉ đóng góp cỡ $10^1 - 10^2$ [23, 27, 30].

Cơ chế tăng cường trường điện từ (EM) có thể được giải thích là sự tăng cường tín hiệu Raman của chất phân tích trong tán xạ Raman tăng cường bề mặt phần lớn là do cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ (localized surface plasmon resonances – LSPR) (Hình 1.5). Trong các cấu trúc kim loại, các tính chất quang học chủ yếu là do các điện tử dẫn của kim loại gây ra. Sự kích thích điện từ làm cho những điện tử dẫn này dao động tập thể, tạo nên một hệ dao động được gọi là plasmon bề mặt của cấu trúc kim loại đó. Khi các plasmon bề mặt cộng hưởng với tần số của ánh sáng tới thì sẽ xảy ra LSPR. LSPR sẽ gây ra sự tăng cường trường điện từ cục bộ ở gần bề mặt của các hạt kim loại. Đối với các phân tử phân tích hấp phụ trên bề mặt của các cấu trúc nano kim loại hoặc nằm gần các bề mặt này, trường tới sẽ được tăng cường do có hiện tượng cộng hưởng với plasmon bề mặt. Bên cạnh đó, trường tán xạ Raman cũng sẽ được tăng cường nếu nó cộng hưởng với plasmon bề mặt của bề mặt kim loại và tín hiệu Raman của phân tử phân tích sẽ được tăng cường.



Hình 1.5. Giản đồ minh họa cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ cho một hạt nano hình cầu, thể hiện sự di chuyển tương đối của đám mây điện tử với hạt nhân nguyên tử.

Một số bằng chứng thực nghiệm cho thấy có một cơ chế tăng cường thứ hai hoạt động độc lập với cơ chế tăng cường điện từ được gọi là cơ chế tăng cường hóa học (CE). Cơ chế tăng cường CE được giải thích là sự tương tác giữa các nguyên tử của bề mặt kim loại và phân tử chất phân tích xảy ra khi phân tử chất phân tích được hấp phụ lên trên bề mặt kim loại và tương tác này

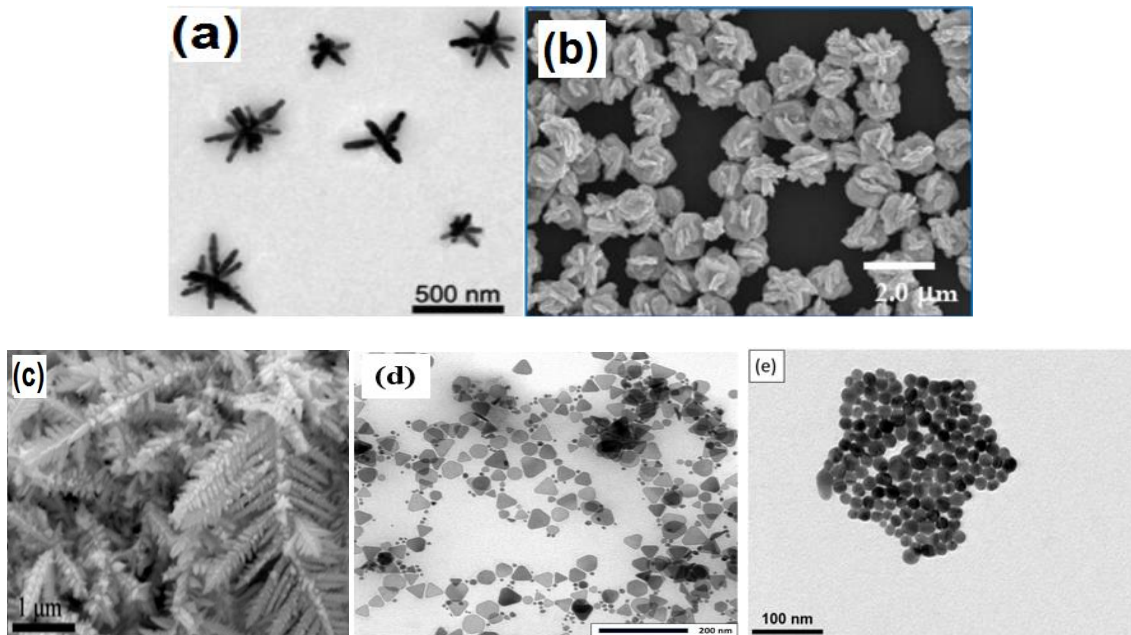
sẽ làm thay đổi phân bố mật độ điện tử của phân tử, do đó sẽ làm tăng cường mặt cắt tán xạ Raman (Raman scattering cross section) của các mode dao động của phân tử [35]. Như vậy có thể thấy rằng, trong khi sự tăng cường CE phụ thuộc vào chất phân tích và sẽ cần phải có một số loại liên kết giữa chất phân tích với bề mặt kim loại thì sự tăng cường EM sẽ như nhau đối với tất cả các chất phân tích.

Từ các cơ chế tăng cường SERS có thể thấy rằng phổ SERS có thể hiển thị một số sai lệch về cường độ tương đối giữa các đỉnh so với phổ Raman thông thường của cùng một phân tử. Do sự tương tác giữa phân tử và kim loại, các vạch SERS có thể sẽ có một chút thay đổi về tần số và thay đổi chiều rộng dải phổ so với phổ Raman thông thường. Các gradient trường mạnh có thể dẫn đến sự nới lỏng quy tắc chọn lọc và làm xuất hiện các vạch Raman bị cấm [31, 32]. Tuy nhiên phổ SERS có thể cung cấp thông tin giống như “dấu vân tay” cho các hóa chất và sinh hóa khác nhau mà không cần khâu chuẩn bị mẫu phức tạp. Nhờ vậy, SERS là một công cụ tốt và hiệu quả cao để xác định và phân tích chất hóa học.

Sự khuếch đại của tín hiệu Raman trong SERS phụ thuộc mạnh vào tính chất và đặc điểm của bề mặt kim loại gồ ghề (được gọi là đế SERS) mà các phân tử chất phân tích được hấp phụ trên đó. Các kim loại như vàng, bạc, đồng, platin,... là những kim loại được sử dụng nhiều nhất trong các nghiên cứu về SERS [33-37]. Trong số đó Ag đã được chứng minh là vật liệu thích hợp nhất và cho sự tăng cường tín hiệu trong SERS cao nhất.

Các khu vực mà trường điện từ được tăng cường mạnh thường được gọi là “điểm nóng” SERS và mật độ của các điểm nóng của đế SERS càng nhiều thì sự tăng cường tín hiệu SERS của đế đó sẽ càng mạnh. Các điểm nóng chính thường là các khe nano (nanogaps), các điểm góc cạnh (sharp edges), các điểm sắc nhọn (sharp tips) có trên cấu trúc nano kim loại. Cũng cần nhấn mạnh rằng kích thước của các cấu trúc nano kim loại cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự tăng cường SERS. Để cho sự tăng cường SERS đạt được giá trị tối ưu thì kích thước của các cấu trúc nano kim loại phải nhỏ hơn so với bước sóng ánh sáng kích thích, nhưng cũng không được nhỏ hơn quãng đường tự do trung bình điện tử (electronic mean free path) của các điện tử dẫn [38]. Khi kích

thước của các cấu trúc kim loại nhỏ hơn so với bước sóng ánh sáng kích thích, ánh sáng không chỉ kích thích các plasmon lưỡng cực mà các dao động đa cực và các quá trình khác trong kim loại cũng sẽ được kích thích. Vì vậy, các đế SERS thường được chế tạo dưới dạng các hạt nano (với hình dạng hình cầu hoặc gần hình cầu) hoặc dưới dạng các cấu trúc nano có hình dạng phức tạp với nhiều góc cạnh và đỉnh nhọn, chẳng hạn như hình tam giác, dạng các cành lá cây nano, dạng hoa nano hoặc dạng lông nhím nano..., để có được sự tăng cường SERS mạnh [33-41]. Các kết quả này mở ra một bước tiến mới trong công nghệ chế tạo các đế SERS và ứng dụng kỹ thuật SERS trong các lĩnh vực phân tích.



Hình 1.6. Một số loại đế SERS với hình thái cấu trúc khác nhau: các ngôi sao nano (a) [34], hoa nano (b) [37], cành lá nano (c) [35] hình tam giác (d) [38], và (e) hạt nano hình cầu.

Hình 1.6 minh họa một số loại đế SERS với các hình thái cấu trúc khác nhau. Trong số các loại đế SERS này, các đế SERS có dạng nano hình tam giác được đánh giá là loại đế SERS có thể cung cấp khả năng tăng cường tín hiệu Raman của các phân tử cần phân tích lên nhiều lần (thậm chí lên tới vài bậc) so với đế SERS sử dụng các hạt nano kim loại dạng cầu.

1.2.3. Yêu cầu của đế SERS

Một đế SERS lý tưởng cần đáp ứng được các yêu cầu như sau [39,40]:

1. Có hiệu suất tăng cường tín hiệu SERS tốt (với hệ số tăng cường SERS đạt được trên 10^5);
2. Có độ đồng đều trên bề mặt cao (với sự sai khác giữa các điểm khác nhau trên bề mặt nhỏ hơn 20%);
3. Có độ ổn định và độ lặp lại tốt (sự sai khác giữa các mẫu được chế tạo ở các thời điểm khác nhau nhỏ hơn 20%);
4. Chi phí chế tạo thấp;
5. Các đế phải sạch để không có tín hiệu không mong muốn từ các chất tồn dư sau chế tạo.

Tuy nhiên, cho đến nay để có thể chế tạo được một đế SERS đáp ứng được hết các yêu cầu cùng một lúc là rất khó khăn. Do đó tùy thuộc vào nhu cầu phân tích ta có thể lựa chọn loại đế phù hợp. Cụ thể, một đế SERS ổn định, có sự đồng nhất và có thể chế tạo lặp lại được sẽ được lựa chọn trong việc phân tích định lượng còn trong việc phân tích vết thì việc tăng cường tín hiệu tối đa là điều kiện cần thiết nhất. Đối với các phép phân tích trong sinh học thì một đế SERS sạch và cho tín hiệu tăng cường Raman tốt sẽ được ưu tiên lựa chọn do tính chất phức tạp trong nghiên cứu các hệ sinh học [40].

Có hai loại đế SERS chính đang được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về SERS, đó là:

- Đế huyền phù của các hạt nano kim loại (các hạt nano kim loại được phân tán trong một dung dịch lỏng nào đó).
- Đế được tạo nên bởi một hệ cấu trúc nano kim loại với các hình thái khác nhau trên một đế rắn.

Cho đến nay các đế SERS thuộc loại thứ nhất vẫn đang được sử dụng nhiều nhất [42-44]. Các điểm thu hút chính của các hạt nano huyền phù là chế tạo dễ dàng với chi phí thấp và các đế SERS này là có khả năng cung cấp sự tăng cường SERS lớn. Tuy vậy, các đế loại này có một nhược điểm lớn là có độ ổn định và độ lặp lại không tốt do các hạt kim loại nano trong dung dịch liên tục chuyển động khiến cho khoảng cách giữa chúng cũng liên tục thay đổi. Sự

tụ hợp của các hạt nano trong dung dịch cũng là một nguyên nhân làm cho khả năng tái sản xuất của đế loại này khó khăn hơn. Một cách tiếp cận để khắc phục được hạn chế về độ ổn định và sự lặp lại của các đế hạt nano kim loại huyền phù là gắn cố định các hạt nano kim loại trên một đế phẳng. Loại đế này cũng cho thấy hiệu quả tăng cường tín hiệu Raman khá tốt với độ ổn định tốt hơn so với các đế SERS huyền phù nano kim loại.

1.2.4. Hệ số tăng cường SERS

Hệ số tăng cường SERS của một phân tử chất phân tích được hiểu là sự đánh giá, so sánh cường độ của các đỉnh Raman ghi lại được trong trường hợp sử dụng đế không SERS và sử dụng đế có SERS trong một điều kiện thực nghiệm giống nhau [45]. Đây là một trong những thông số quan trọng nhất để đặc trưng cho hiệu ứng SERS.

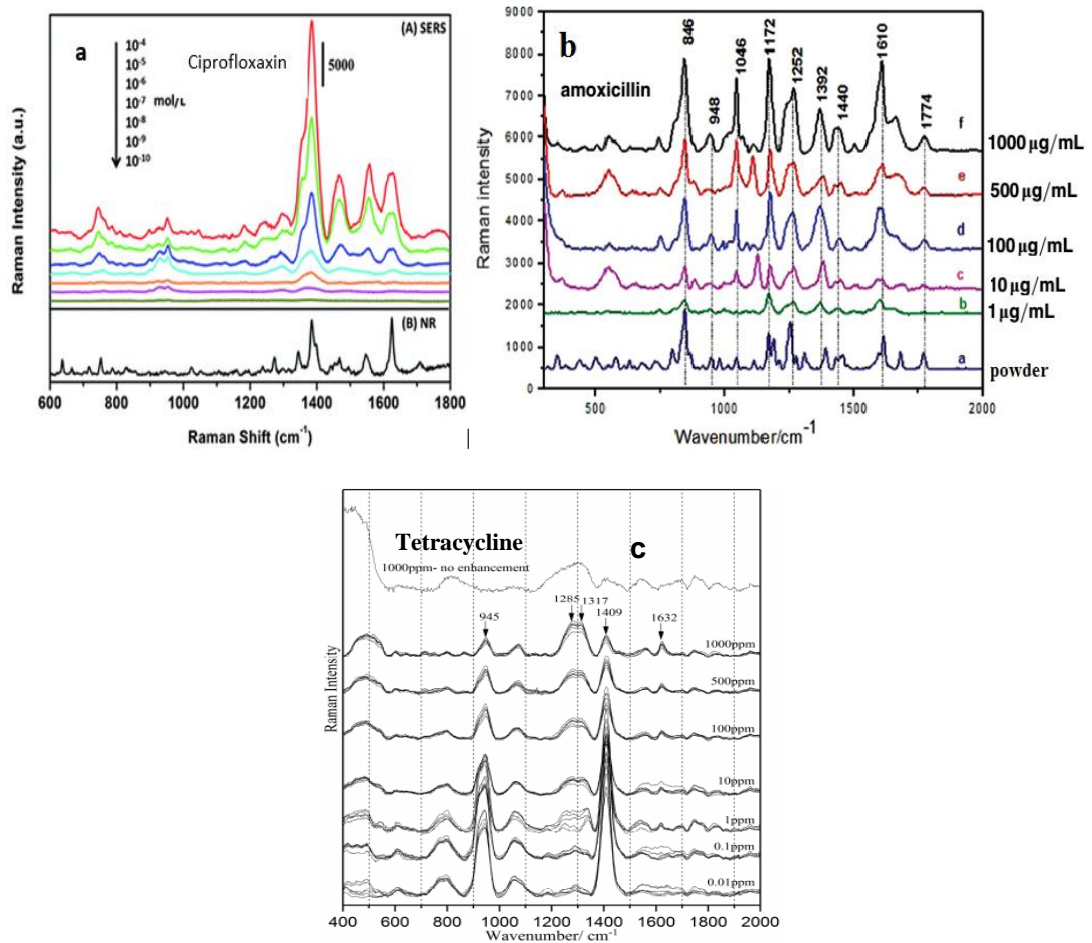
Hệ số tăng cường SERS được xác định dựa trên phương trình sau:

$$SERS\ EF = \frac{I_{SERS}C_{Normal}}{I_{Normal}C_{SERS}}$$

với I_{SERS} và I_{Normal} tương ứng là cường độ của đỉnh phổ Raman của phân tử phân tích được phụ trên đế SERS và đế không SERS, C_{Normal} là nồng độ của phân tử phân tích trong phép đo không có SERS và C_{SERS} chính là nồng độ của phân tử phân tích trong cùng một điều kiện thực nghiệm với phép đo có SERS.

1.2.5. Ứng dụng của SERS

Hiện nay trên thế giới phương pháp SERS đang được nghiên cứu để phát triển thành phương pháp phân tích, phát hiện nhanh và chính xác dư lượng của các chất màu, thuốc trừ sâu, thuốc diệt khuẩn, diệt nấm trong thực phẩm, dư lượng của các chất hữu cơ gây độc có trong nước, tồn tại của vi khuẩn, virus trong các môi trường. Các chất kháng sinh cũng là một trong các đối tượng phân tích của SERS. Nhiều loại kháng sinh sử dụng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản như (ciprofloxacin, amoxicillin, tetracycline,...) đã được phát hiện với nồng độ thấp bởi SERS [46-54]. Hình 1.7 minh họa một số ứng dụng của SERS trong phân tích các chất kháng sinh. Các kết quả này đã mở ra một triển vọng để có thể phát triển SERS trở thành một phương pháp phân tích nhanh các chất kháng sinh bên cạnh phương pháp sắc ký.



Hình 1.7. Phổ SERS của các chất kháng sinh ciprofloxacin (a) [47], amoxicillin (b) [48], và (c) tetracycline [49].

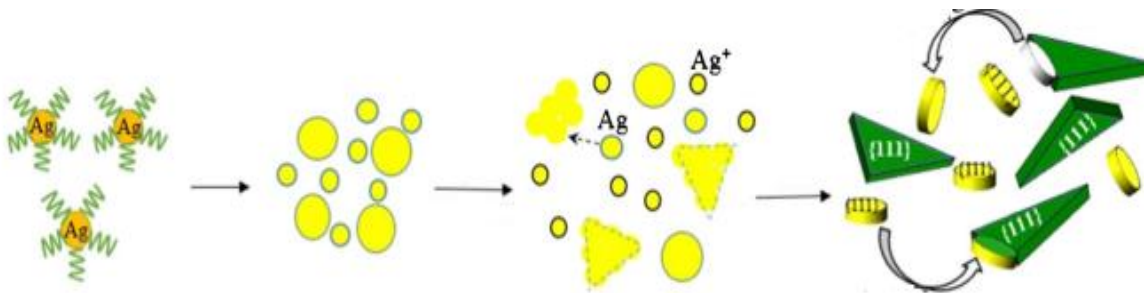
1.2.6. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, trong thời gian gần đây SERS đã trở thành một đối tượng thu hút được rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu. Có nhiều nhóm nghiên cứu tại Viện Khoa học vật liệu, Viện Vật lý, Đại học Quốc gia Hà Nội, Đại học Bách khoa Hà Nội, Đại học Quốc Gia TP.HCM... đã và đang bắt đầu triển khai rất nhiều các đề tài nghiên cứu chế tạo và ứng dụng về SERS. Bên cạnh đó, các đề SERS đã được tổng hợp bởi nhiều nhóm nghiên cứu cũng rất đa dạng bao gồm các hạt nano vàng và bạc trên đế AAO, ITO, giấy lọc và đế tinh thể opal SiO_2 , các cành lá nano trên sợi quang và các thanh nano,...[55-61]. Hiện nay hầu hết các nhóm này đều tập trung nghiên cứu phát hiện các tạp chất gây hại cho sức khỏe con người có trong thực phẩm. Liên quan đến ứng dụng SERS để phân tích, phát hiện dư lượng kháng sinh, nhóm nghiên cứu của PGS.TS Nguyễn

Thế Bình, trường Đại học Khoa học tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội hiện nay đang triển khai một đề tài cấp Nhà nước, trong đó 01 nhánh của đề tài này sử dụng SERS để phát hiện dư lượng thuốc kháng sinh tetracycline trong tôm, bước đầu cũng đạt được một số kết quả khá tốt với việc công bố 01 bài trên tạp chí quốc tế có uy tín [62]. Ngoài ra, gần đây nhất, nhóm chúng tôi đã chế tạo được hệ các sao nano bạc để phân tích thuốc kháng sinh ciprofloxacin – một chất kháng sinh được sử dụng trong thủy sản và đạt được giới hạn phân tích là 0,23 ppb và kết quả nghiên cứu này chúng tôi đã công bố với tên bài báo là : Trace detection of ciprofloxacin antibiotic using surface-enhanced Raman scattering coupled with silver nanostars, Vu Thi Thu, Nguyen Manh Cuong, Dao Tran Cao, Luu Tien Hung, Luong Truc-Quynh Ngan, Optik 260 (2022) 169043.

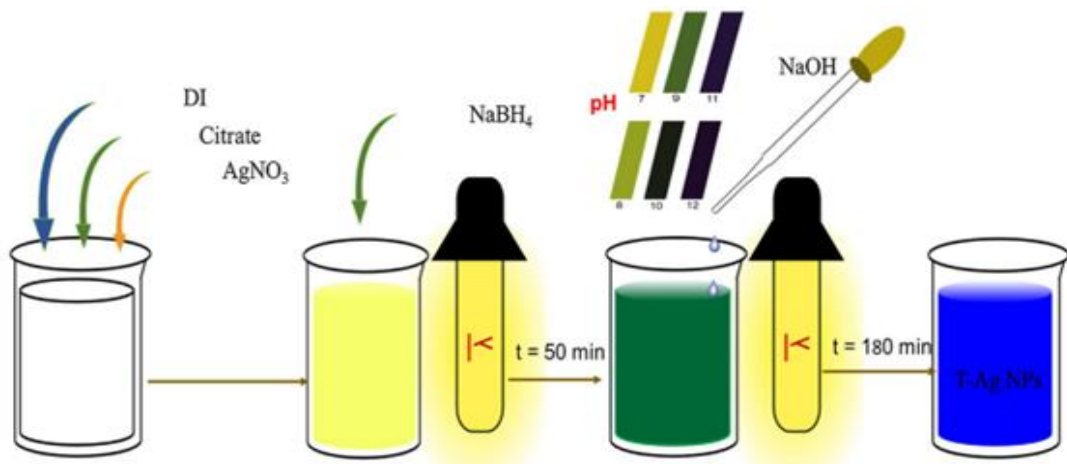
1.3. TỔNG QUAN VỀ TẤM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC

Như đã biết, hệ số tăng cường SERS được quyết định chủ yếu bởi các đặc tính hình thái của đế SERS. Người ta đã phát hiện ra rằng các đế có nhiều đầu nhọn, điểm góc cạnh và khe hẹp nano sẽ có thể cung cấp khả năng tăng cường tín hiệu Raman cao [63-65]. Chính vì vậy, các cấu trúc kim loại khác nhau với các đặc điểm như trên đã được tổng hợp, trong số đó cấu trúc nano bạc hình tam giác cũng là một trong những cấu trúc kim loại đem lại hệ số tăng cường SERS tốt. Với dạng cấu trúc hình tam giác có các góc cạnh nhọn, đế SERS các tấm nano Ag hình tam giác (AgNPIs) hứa hẹn sẽ cung cấp hiệu suất tăng cường tín hiệu Raman cao, đồng thời kích thước của các tấm nano bạc hình tam giác này nhỏ (dưới 100 nm), đế SERS này sẽ có độ lặp lại và độ đồng đều tốt.



Hình 1.8. Sơ đồ mô tả quá trình hình thành cấu trúc nano bạc hình tam giác

Qua tham khảo tài liệu, chúng tôi đã tìm thấy một số công bố trình bày về quá trình tổng hợp các cấu trúc nano bạc hình tam giác [66-71]. Cụ thể, các nhóm nghiên cứu của Jin, Andrew, Haber đều tổng hợp thành công các cấu trúc nano bạc hình tam giác bằng phương pháp khử hóa học, trong đó AgNO_3 bị khử bởi NaBH_4 với sự có mặt của chất hoạt động bề mặt PVP, H_2O_2 [66-68]. Nhóm nghiên cứu của Xue đã tạo ra hạt nano bạc tam giác có kích thước cạnh trung bình từ 70-90 nm bằng cách sử dụng phương pháp quang hóa [69]. Ở Việt Nam, đã có hai nhóm công bố về việc chế tạo thành công cấu trúc các tấm nano bạc hình tam giác. Cụ thể nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhung (Đại học KHTN TP HCM) chế tạo hạt nano Ag hình tam giác bằng phương pháp khử hóa học kết hợp với sự chiếu sáng của đèn năng lượng mặt trời. Các hạt nano tam giác do họ chế tạo có kích thước cạnh trung bình là 29,7 nm [70]. Nhóm nghiên cứu của Vũ Xuân Hòa (ĐH KHTN Thái Nguyên) đã tổng hợp các tấm nano bạc hình tam giác bằng cách sử dụng phương pháp quang hóa trong đó đèn LED có màu sắc khác nhau được chiếu sáng liên tục trong các khoảng thời gian khác nhau [71]. Có thể thấy rằng, phương pháp quang hóa là một phương pháp đơn giản, chi phí chế tạo hợp lý và tạo ra nhiều cấu trúc nano với nhiều hình dạng cấu trúc khác nhau.



Hình 1.9. Sơ đồ mô tả quy trình tổng hợp các tấm nano Ag hình tam giác sử dụng phương pháp quang hóa

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chế tạo các tấm nano Ag hình tam giác sử dụng phương pháp khử hóa học (không dùng đèn chiếu sáng), sử dụng hai

chất khử là $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và NaBH_4 . Cụ thể, trong quá trình phản ứng NaBH_4 đóng vai trò là chất khử mạnh khiến ion bạc (Ag^+) bị khử ngay lập tức thành nguyên tử bạc, đồng thời $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ đóng vai trò là chất định hình để tạo thành các hạt mầm. Tiếp theo, H_2O_2 đóng vai trò là tác nhân ăn mòn và là chất được lựa chọn sử dụng nhằm tạo điều kiện để hình thành các hình thái cấu trúc như mong muốn. Các hạt nano bạc mới hình thành kém ổn định hơn sẽ được ăn mòn bởi H_2O_2 và thiết lập trạng thái cân bằng giữa quá trình khử NaBH_4 và quá trình oxy hóa H_2O_2 của bạc [68].

Phương pháp khử hóa học có nhiều ưu điểm nổi bật như thời gian chế tạo nhanh, quy trình tổng hợp đơn giản, không đòi hỏi các thiết bị phức tạp, có thể tổng hợp được các dạng cấu trúc nano có các hình thái đa dạng. Hơn nữa, số lượng mẫu tổng hợp được bằng phương pháp này thường khá nhiều, có độ lặp lại và độ ổn định cao. Vì vậy, phương pháp khử hóa học đã và đang được nhiều nhóm nghiên cứu lựa chọn để triển khai các đề tài xây dựng quy trình chế tạo các cấu trúc nano kim loại với hình thái khác nhau.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu chính của đề tài là ứng dụng của hệ các tấm nano bạc hình tam giác trong việc phân tích, phát hiện vết của hai thuốc kháng sinh sử dụng trong nuôi trồng thủy sản là enrofloxacin và chloramphenicol dựa trên kỹ thuật tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS). Đề tài sẽ tập trung vào việc nghiên cứu ứng dụng các tấm nano bạc hình tam giác làm các cảm biến SERS để phát hiện vết của chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol. Hiệu suất tăng cường SERS của các tấm nano bạc hình tam giác được đánh giá thông qua việc xác định hệ số tăng cường SERS của đế. Để thực hiện được việc này, chất màu hữu cơ rhodamine 6G sẽ được sử dụng làm chất phân tích.

2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.2.1. Hoá chất

Các hóa chất sử dụng trong luận văn được liệt kê trong Bảng 2.1 và đều là các loại hóa chất tinh khiết.

Bảng 2.1. Danh mục hóa chất

STT	Hóa chất	Ký hiệu	Thông số	Xuất xứ
1	Silver nitrate	AgNO ₃	≥ 99,8%	Trung Quốc
2	Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂	30wt. %	Trung Quốc
3	Trisodium citrate dihydrate	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ . 2H ₂ O	≥ 99%	Trung Quốc
4	Sodium borohydride	NaBH ₄	≥ 98%	Trung Quốc
5	Nước khử ion	DI	100%	
6	Rhodamine 6G	R6G	100%	Trung Quốc

7	Enrofloxacin	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
8	Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich

2.2.2. Dụng cụ, thiết bị

- Các thiết bị và dụng cụ sử dụng cho chế tạo mẫu: Cân phân tích Scientech với độ chính xác 0.1mg, cốc định lượng, thiết bị ly tâm, máy khuấy, con từ, pipet, đồng hồ bấm giây, nhiệt kế, tủ hút, găng tay cao su, giấy lọc định lượng, ống ly tâm....
- Các hệ thiết bị sử dụng cho khảo sát cấu trúc hình thái, tính chất và phân tích mẫu bao gồm:
 - o Hệ hiển vi điện tử quét trường phát xạ FE-SEM S-4800 (Hitachi, Nhật Bản).
 - o Hệ quang phổ hấp thụ UV-Vis (Shimadzu UV1800, Nhật Bản)
 - o Thiết bị XRD EQUINOX 5000 (Thermo Scientific, Pháp).
 - o Hệ quang phổ kế xách tay i-Raman Pro (model BWS475-785H, USA).

2.3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

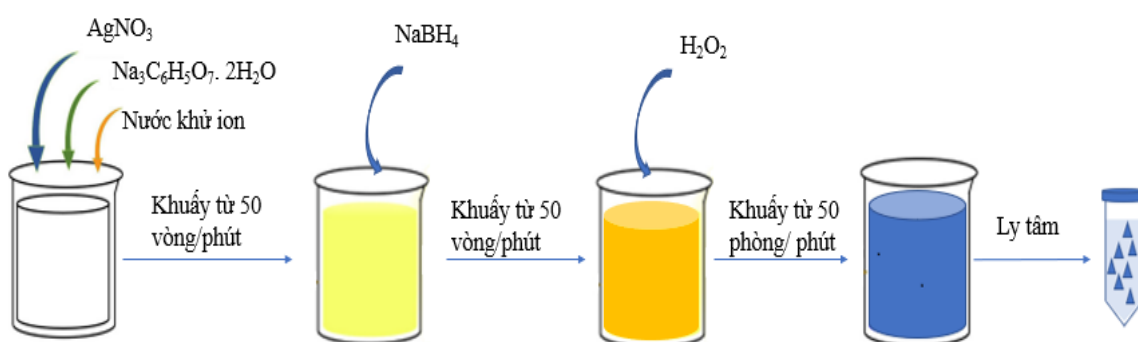
2.3.1. Chế tạo các tấm nano bạc hình tam giác

Quy trình chế tạo các tấm nano bạc hình tam giác được minh họa trong hình 2.1 và bao gồm các bước cụ thể như sau:

- Pha 250 μ l dung dịch $AgNO_3$ với nồng độ khác nhau vào 23,8ml nước khử ion (DI) và khuấy từ với tốc độ 50 vòng/phút;
- Nhỏ đồng thời nhỏ 700 μ l dung dịch $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (nồng độ 30mM) và 250 μ l dung dịch $NaBH_4$ (nồng độ thay đổi) vào dung dịch ban đầu. Lúc này dung dịch có sự thay đổi màu từ không màu lập tức chuyển sang màu vàng nhạt. Tiếp tục khuấy dung dịch trong khoảng 3-5 phút.
- Tiếp theo, dung dịch H_2O_2 (30%) với thể tích khác nhau được thêm vào hỗn hợp trên, tại thời điểm này dung dịch tiếp tục có sự thay đổi về màu từ vàng

nhạt sang vàng đậm, đỏ, tím, và cuối cùng là màu xanh dương tùy theo lượng H_2O_2 cho vào. Quá trình thay đổi màu xảy ra một cách nhanh chóng trong khoảng thời gian là 30 giây. Dung dịch sau đó tiếp tục được khuấy trong khoảng thời gian khác nhau và thu được dung dịch có chứa các tấm nano tam giác bạc.

- Mẫu sau khi được chế tạo xong được ly tâm với tốc độ 12000rpm trong 10 phút để loại bỏ các thành phần không tham gia phản ứng. Sản phẩm cuối cùng sẽ được phân tán trong nước khử ion và được bảo quản trong tủ lạnh để phục vụ cho quá trình tiếp theo.



Hình 2.1. Sơ đồ chế tạo các tấm nano bạc hình tam giác bằng phương pháp khử hóa học

Các điều kiện chế tạo mẫu được liệt kê cụ thể trong bảng 2.2.

Bảng 2.2. Các điều kiện chế tạo AgNPLs

STT	Nồng độ $AgNO_3$ (M)	DI (ml)	Thể tích $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (μ l)	Nồng độ $NaBH_4$ (M)	Thể tích H_2O_2 (30%) (μ l)	Thời gian chế tạo (phút)
1	0,01	23,8	700	0,1	65	30
2	0,01	23,8	700	0,1	75	30
3	0,01	23,8	700	0,1	100	30
4	0,02	23,8	700	0,1	75	30
5	0,01	23,8	700	0,2	75	30

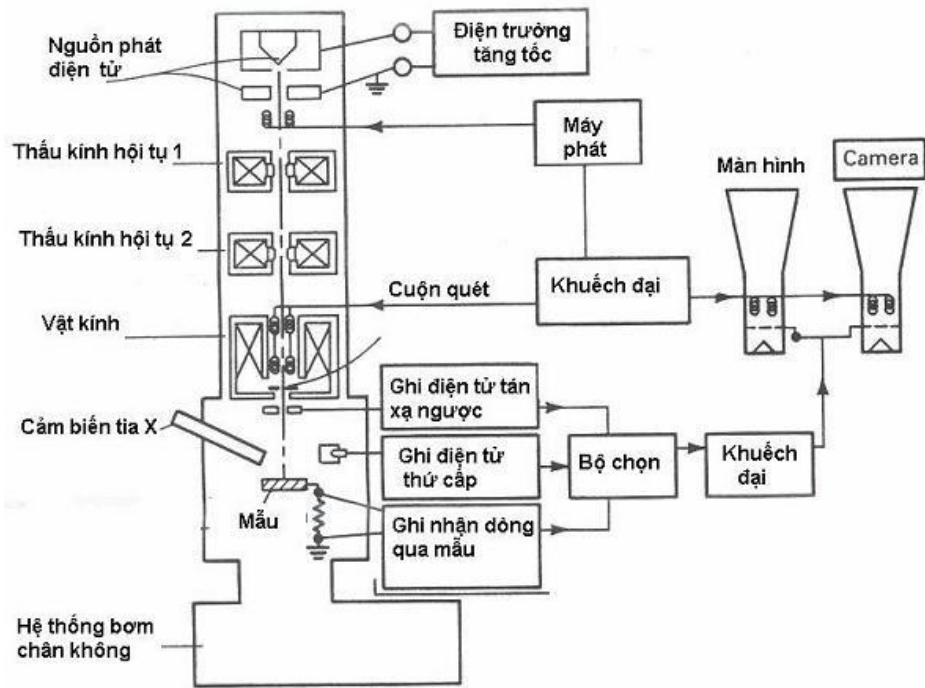
6	0,01	23,8	700	0,1	75	45
7	0,01	23,8	700	0,1	75	60
8	0,01	23,8	700	0,1	75	90

2.3.2. Các phương pháp khảo sát cấu trúc và tính chất của các tấm nano bạc hình tam giác chế tạo được

Các phương pháp khảo sát cấu trúc và tính chất của các tấm nano bạc hình tam giác đã sử dụng trong luận văn bao gồm: khảo sát hình thái bằng kính hiển vi điện tử quét, khảo sát thành phần và cấu trúc bằng nhiễu xạ tia X, khảo sát cộng hưởng plasmon bề mặt thông qua phổ hấp thụ UV-Vis và khảo sát về khả năng tăng cường SERS của đế bằng phương pháp ghi phổ Raman. Đây cũng là những phương pháp chủ yếu mà các nhóm nghiên cứu khác trên thế giới và trong nước sử dụng để nghiên cứu cấu trúc nano kim loại được sử dụng cho ứng dụng SERS.

2.3.2.1. Khảo sát hình thái bằng kính hiển vi điện tử quét

Hình thái và cấu trúc của các đế SERS sẽ được phân tích và đánh giá thông qua các phép đo hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope – SEM) sử dụng chùm điện tử năng lượng cao hội tụ để tạo ra nhiều loại tín hiệu trên bề mặt của mẫu vật rắn. Các tín hiệu xuất phát từ các tương tác điện tử-mẫu sẽ cung cấp thông tin về mẫu bao gồm hình thái bên ngoài (kết cấu), thành phần hóa học, cấu trúc tinh thể và hướng của vật liệu tạo nên mẫu. Trong hầu hết các ứng dụng, dữ liệu được thu thập trên một khu vực được chọn trên bề mặt của mẫu và hình ảnh 2 chiều được tạo để hiển thị các biên thể không gian trong các thuộc tính này. Sơ đồ khối của SEM được thể hiện trong Hình 2.2. Trong luận văn này việc chụp ảnh SEM đã được thực hiện trên hệ thiết bị FE-SEM S4800 (hãng Hitachi sản xuất) có tại Viện Khoa học vật liệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



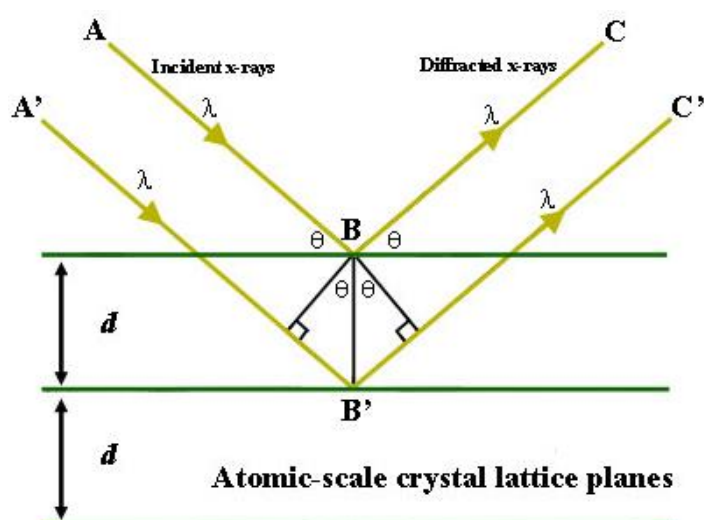
Hình 2.2. Sơ đồ khối kính hiển vi điện tử quét

Nhiễu xạ tia X là một kỹ thuật phổ biến để xác định thành phần hoặc cấu trúc tinh thể của mẫu. Đối với các tinh thể lớn hơn như đại phân tử và các hợp chất vô cơ, nó có thể được sử dụng để xác định cấu trúc của các nguyên tử bên trong mẫu. Nếu kích thước tinh thể quá nhỏ, nó có thể xác định thành phần mẫu, độ kết tinh và độ tinh khiết của pha. Các chùm tia X được chọn vì bước sóng của chúng tương tự như khoảng cách giữa các nguyên tử trong mẫu, do đó góc nhiễu xạ sẽ bị ảnh hưởng bởi khoảng cách của các nguyên tử trong phân tử, trái ngược với việc sử dụng các bước sóng lớn hơn nhiều, sẽ không bị thay đổi bởi khoảng cách giữa các nguyên tử. Sau đó, các tia X đi qua mẫu, "nhảy" ra khỏi các nguyên tử trong cấu trúc và thay đổi hướng của chùm tia ở một số góc khác, θ , so với chùm tia ban đầu. Đây là góc nhiễu xạ. Một số chùm nhiễu xạ này triệt tiêu lẫn nhau, nhưng nếu các chùm có bước sóng tương tự nhau thì sẽ xảy ra hiện tượng giao thoa tăng cường. Giao thoa kết hợp là khi các chùm tia X có cùng bước sóng cộng lại với nhau để tạo ra một chùm tia mới có biên độ cao hơn. Biên độ lớn hơn của sóng chuyển thành tín hiệu lớn hơn cho góc nhiễu xạ cụ thể này. Sau đó, góc nhiễu xạ có thể được sử dụng để xác định sự khác biệt giữa các mặt phẳng nguyên tử bằng cách sử dụng định luật Bragg:

$$\sin \theta = n\lambda / 2d$$

trong đó d là khoảng cách giữa các mặt phẳng nguyên tử. Khoảng cách giữa các tấm nguyên tử sau đó có thể được sử dụng để xác định thành phần hoặc cấu trúc tinh thể, θ là góc nhiễu xạ, n : thứ tự của nhiễu xạ và λ : là bước sóng được thêm vào.

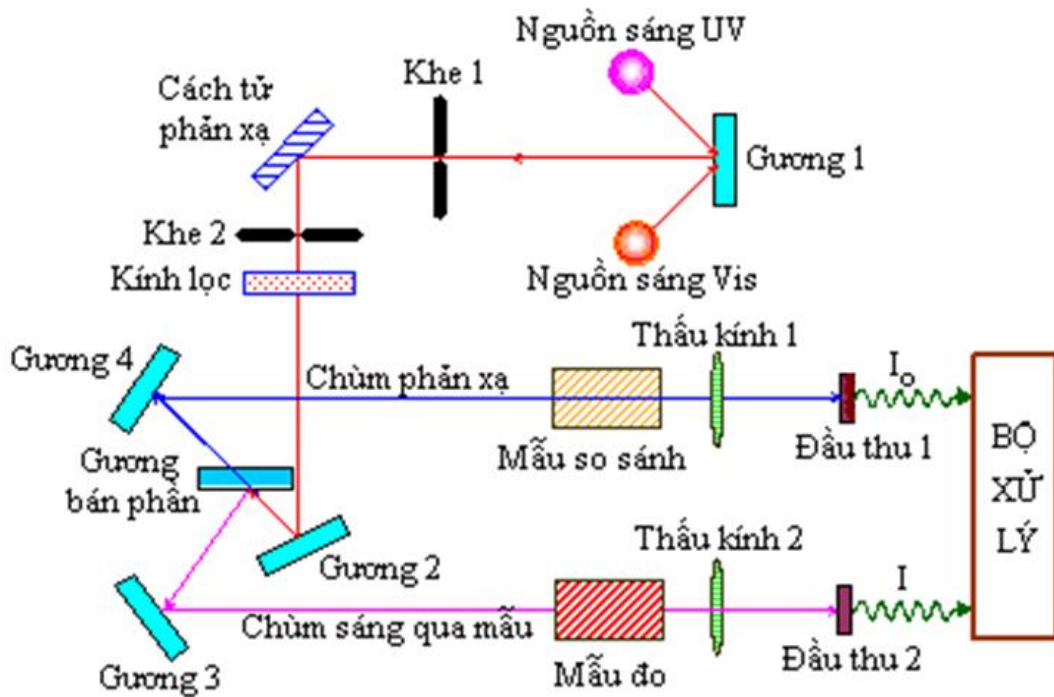
Sơ đồ nguyên tắc của phép đo nhiễu xạ tia X được minh họa trong Hình 2.3. Các giản đồ XRD thuộc nghiên cứu được thực hiện trên thiết bị XRD EQUINOX 5000 (Thermo Scientific, Pháp) tại Viện Khoa học vật liệu – Viện Hàn lâm KHCNVN.



Hình 2.3. Sơ đồ minh họa cho phép đo nhiễu xạ tia X

2.3.2.2. Phổ hấp thụ UV-Vis

Các dung dịch nano kim loại nói chung và nano bạc nói riêng thì việc phân tích phổ hấp thụ UV-Vis (hay còn gọi là phổ hấp thụ plasmon) cho biết các thông tin quan trọng về tính chất quang của chúng. Bên cạnh đó, từ kết quả phổ hấp thụ của vật liệu nano kim loại ta có thể chọn được dải phổ kích thích phù hợp nhất cho vật liệu cũng như điều kiện của trang thiết bị trong phân tích SERS. Hình 2.4 là sơ đồ minh họa hệ đo UV-Vis. Phổ hấp thụ UV-Vis của các mẫu AgNPLs được thực hiện trên thiết bị Shimadzu UV1800, Nhật Bản có tại Viện Khoa học vật liệu – Viện Hàn lâm KHCNVN.



Hình 2.4. Sơ đồ minh họa hệ đo UV-Vis

2.3.3. Đánh giá khả năng ứng dụng của các tấm nano bạc hình tam giác trong cảm biến tán xạ Raman tăng cường bề mặt

2.3.3.1. Khảo sát hệ số tăng cường của đế SERS AgNPLs

Hiệu suất tăng cường tín hiệu SERS của các đế AgNPLs được đánh giá thông qua việc ghi phổ SERS của chất màu R6G bằng cách sử dụng hệ đo Raman xách tay i-RamanPro 785 nm (Model: BWS475-785H) của hãng BWTek – USA với chùm sáng laser kích thích có bước sóng 785 nm. Công suất laser đầy đủ tại vị trí kích thích đầu dò là 427 mW và kích thước điểm chiếu laser là 105 μm (đối với độ phóng đại của vật kính của 20x). Máy quang phổ này cung cấp phổ Raman trong phạm vi 65- 2800 cm^{-1} với độ phân giải phổ tốt hơn hơn 3,5 cm^{-1} . Hệ thiết bị này hiện đang có tại Viện Khoa học vật liệu – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các phép phân tích vết của hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol bằng phương pháp SERS cũng được thực hiện trên hệ thiết bị này. Các mẫu đo SERS được chuẩn bị theo các bước sau:

Pha loãng 0,24g bột chất chuẩn Rhodamine 6G (R6G) trong 50ml nước khử ion để được dung dịch chuẩn có nồng độ 10^{-2} M. Từ dung dịch chuẩn này, pha loãng dần với nước khử ion để có được các nồng độ thấp hơn từ 10^{-7} đến 10^{-12} M.

Tiếp theo, lấy 0,25 μ l dung dịch huyền phù AgNPLs và 0,25 μ l dung dịch chất phân tích (R6G) với các nồng độ khác nhau trộn với nhau. Hỗn hợp tạo được sẽ được nhỏ lên bề mặt của miếng nhôm thương mại có đường kính 2 mm và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Các mẫu sau đó sẽ được bảo quản trong môi trường tự nhiên tại điều kiện nhiệt độ phòng và được tiến hành đo Raman.

Hệ số tăng cường SERS của các AgNPLs được tính bằng phương trình sau:

$$SERS\ EF = \frac{I_{SERS} \times C_{RS}}{I_{RS} \times C_{SERS}}$$

Trong đó, I_{SERS} và I_{RS} là cường độ Raman đặc trưng của R6G đã hấp phụ trên đế SERS và không SERS (đế Al), trong khi C_{RS} là nồng độ R6G trên chất nền không SERS (10^{-2} M) và C_{SERS} là nồng độ R6G thấp nhất mà cho phép chúng ta quan sát phổ SERS của R6G.

2.3.3.2. *Khảo sát độ đồng đều, độ lặp lại, độ ổn định của đế SERS AgNPLs*

Các phép đo khảo sát độ đồng đều, độ lặp lại và độ ổn định của đế SERS AgNPLs được thực hiện đối với dung dịch R6G tại một nồng độ nhất định. Cụ thể:

- Độ đồng đều các tấm nano bạc hình tam giác được khảo sát bằng cách đo phổ SERS của mẫu tại 10 vị trí ngẫu nhiên trên bề mặt đế SERS AgNPLs từ đó so sánh các phổ thu được với nhau;
- Độ lặp lại của quy trình chế tạo đế SERS được khảo sát bằng cách so sánh phổ SERS thu được của mẫu được đo trên ba đế SERS AgNPLs được chế tạo theo cùng một quy trình tại ba thời điểm khác nhau;

- Độ ổn định của đế SERS AgNPLs được khảo sát thông qua việc so sánh phổ SERS thu được của các mẫu được phân tích sử dụng các đế SERS được chế tạo sau khoảng thời gian 7 ngày, 14 ngày và 30 ngày.

Độ đồng đều, độ lặp lại được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%).

- Độ lệch chuẩn được xác định bởi công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

trong đó \bar{x} là giá trị trung bình số học của tập hợp các giá trị x_i , còn x_i là giá trị kết quả của mỗi lần thí nghiệm. Giá trị trung bình \bar{x} được xác định bởi công thức :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

- Độ lệch chuẩn tương đối được xác định bởi công thức:

$$RSDr = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

2.3.4. Khảo sát ứng dụng hệ các tấm nano bạc hình tam giác trong phân tích lượng vết của thuốc kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol

Bột enrofloxacin, chloramphenicol (Sigma-Aldrich) được pha loãng bằng nước khử ion để tạo được các dung dịch gốc có nồng độ 1000 mg/kg (ppm). Tiếp theo, các dung dịch enrofloxacin và chloramphenicol với các nồng độ thấp hơn sẽ thu được bằng cách pha loãng các dung dịch gốc này với nước khử ion.

2.3.4.1. Đánh giá khả năng phát hiện của đế SERS AgNPLs đối với hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol

Lấy 0,25 μ l dung dịch huyền phù AgNPLs và 0,25 μ l dung dịch chất phân tích (enrofloxacin hoặc chloramphenicol) với các nồng độ khác nhau trộn với

nhau. Hỗn hợp tạo được sẽ được nhỏ lên bề mặt của miếng nhôm thương mại có đường kính 2 mm và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Các mẫu sau đó sẽ được bảo quản trong môi trường tự nhiên tại điều kiện nhiệt độ phòng và được tiến hành đo Raman. Hình 2.5 minh họa quy trình phân tích mẫu.

2.3.4.2. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp SERS trong phân tích hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol

Các thông số sau đây sẽ được tính toán và sử dụng để đánh giá giá trị sử dụng của phương pháp SERS trong phân tích hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol:

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính: Các thông số này được sử dụng để khảo sát sự phụ thuộc của cường độ đỉnh phổ SERS và nồng độ của các chất phân tích. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của cường độ đỉnh phổ SERS và nồng độ của các chất phân tích được xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Đường chuẩn được xây dựng được phải có hệ số tương quan tuyến tính $1 \geq R^2 \geq 0,99$ và độ lệch các điểm nồng độ dùng xây dựng đường chuẩn không được vượt quá $\pm 15\%$ cho tất cả các nồng độ và $\leq 20\%$ tại giá trị giới hạn định lượng (LOQ).

Giới hạn phát hiện (LOD): là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà phương pháp phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền. LOD được xác định bởi công thức: $LOD = 3.3\sigma/S$, trong đó S là độ dốc của đường chuẩn và σ là độ lệch chuẩn của đường hồi quy.

Giới hạn định lượng (LOQ): là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà phương pháp phân tích định lượng được với tín hiệu phân tích khác có ý nghĩa định lượng với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền. LOQ được ước tính bằng công thức: $LOQ = 10\sigma/S$.

Độ thu hồi: Độ thu hồi được xác định dựa trên việc thêm một lượng chất đã biết của chất phân tích. Lượng chất chuẩn thêm vào mẫu phân tích phải đảm bảo sao cho nồng độ của chất cần nghiên cứu sau khi thêm chuẩn nằm trong khoảng đã khảo sát. Độ thu hồi (R%) được tính như sau:

$$R\% = \frac{C_s - C}{S} \times 100(\%)$$

Trong đó:

R (%): độ thu hồi

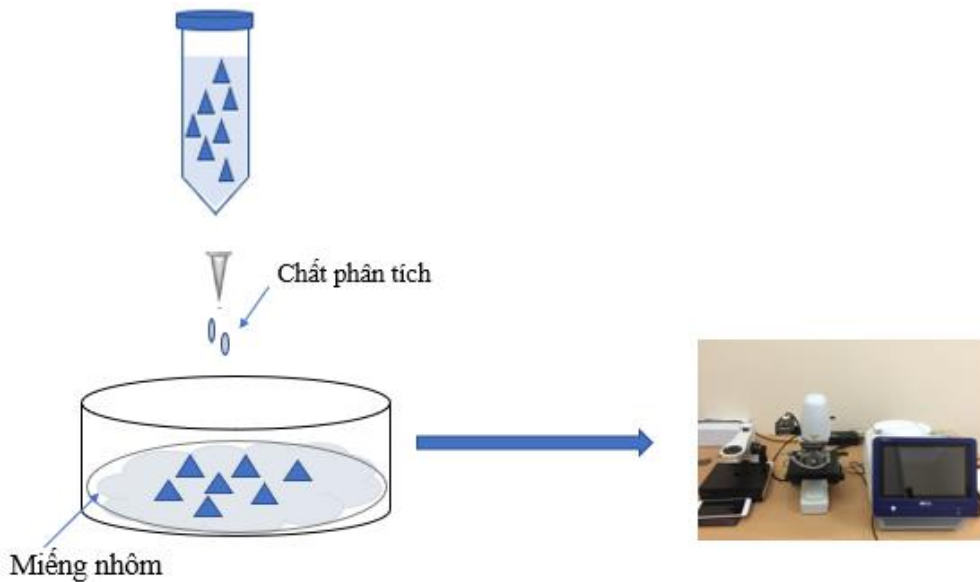
C_s : Nồng độ trong mẫu mẫu thêm chuẩn

C: Nồng độ của mẫu nền

S: Nồng độ thêm chuẩn

Tại mỗi nồng độ thêm chuẩn tiến hành làm lặp lại 3 lần. Các thông số về độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, độ thu hồi được tham chiếu với tiêu chuẩn AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ở mức nồng độ tương ứng [72].

Độ đồng đều, độ lặp lại: độ đồng đều và độ lặp lại của đế SERS trong phân tích enrofloxacin và chloramphenicol được thực hiện tương tự như đối với R6G.

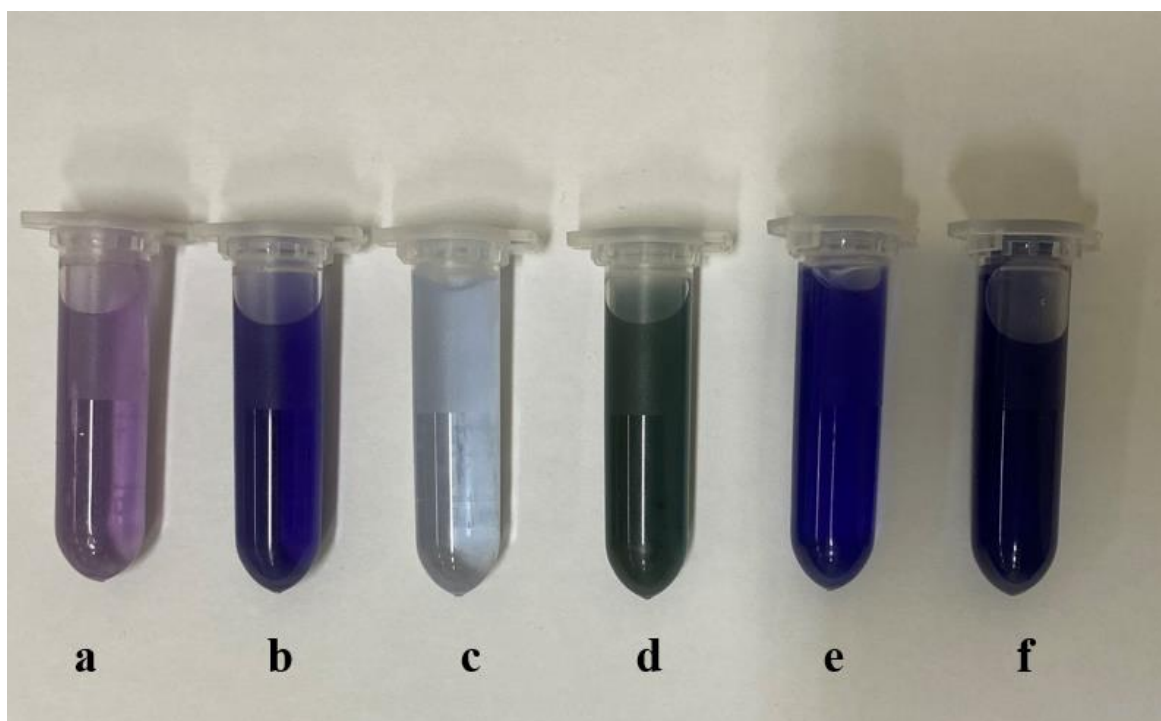


Hình 2.5. Sơ đồ minh họa quy trình phân tích mẫu

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ CHẾ TẠO ĐỂ SERS CÁC TẮM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC

Hình 3.1 thể hiện ảnh chụp của các mẫu dung dịch chứa các tấm nano bạc hình tam giác (AgNPIs) được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học ở một số điều kiện chế tạo khác nhau và tương ứng với mỗi màu dung dịch là các AgNPIs có hình dạng và kích thước khác nhau.



Hình 3.1. Các mẫu dung dịch có chứa AgNPIs được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học ở các điều kiện chế tạo khác nhau

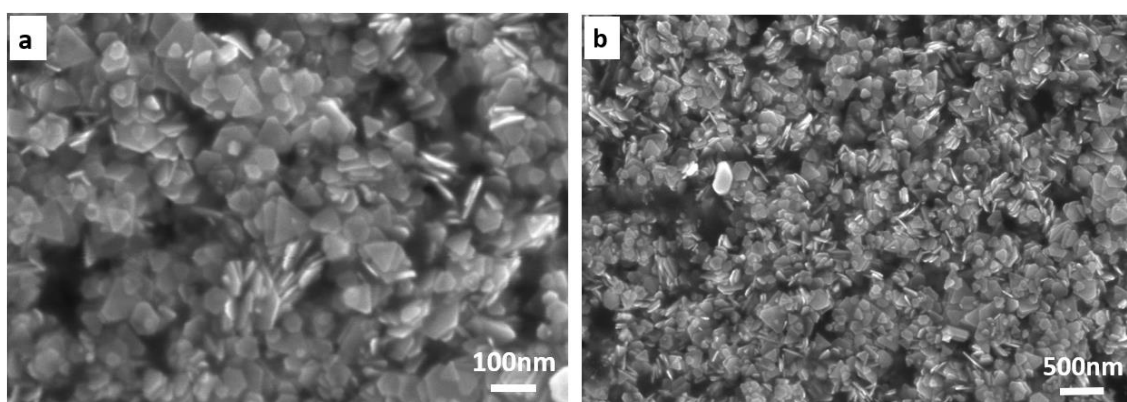
Các mẫu a, b, c tương ứng là các mẫu AgNPIs được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp khử hóa học theo quy trình được trình bày trong mục 2.3.1 với nồng độ AgNO_3 là 0,01 M, nồng độ của dung dịch NaBH_4 là 0,1 M, thời gian chế tạo là 30 phút và thể tích dung dịch H_2O_2 được thay đổi lần lượt là 65 μl , 75 μl và 100 μl

Các mẫu d, e, f tương ứng là các mẫu được chế tạo với các điều kiện: nồng độ AgNO_3 là 0,01M, nồng độ dung dịch NaBH_4 là 0.1M, thể tích dung

dịch H_2O_2 (30%) là 75 μ l và thời gian phản ứng được thay đổi lần lượt là 45 phút, 60 phút, 90 phút.

Các kết quả thu được cho thấy rằng khi điều kiện chế tạo thay đổi sẽ hình thái cấu trúc của AgNPLs và qua khảo sát, chúng tôi đã lựa chọn được các điều kiện chế tạo thích hợp đáp ứng mục đích tạo ra các tấm nano bạc hình tam giác với các góc nhọn, kích thước nhỏ (<100 nm) và đồng đều. Cụ thể mẫu AgNPLs được chế tạo với các điều kiện: dung dịch bao gồm 250 μ l $AgNO_3$ (0,01M), 23,8ml DI, 700 μ l $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (30mM), 250 μ l dung dịch $NaBH_4$ (0,1M) và 75 μ l H_2O_2 (30%), thời gian thực hiện phản ứng là 45 phút là mẫu có cấu trúc hình thái tốt nhất cho ứng dụng SERS. Dung dịch thu được sau chế tạo có màu xanh lục đậm (Hình 3.1 (d))

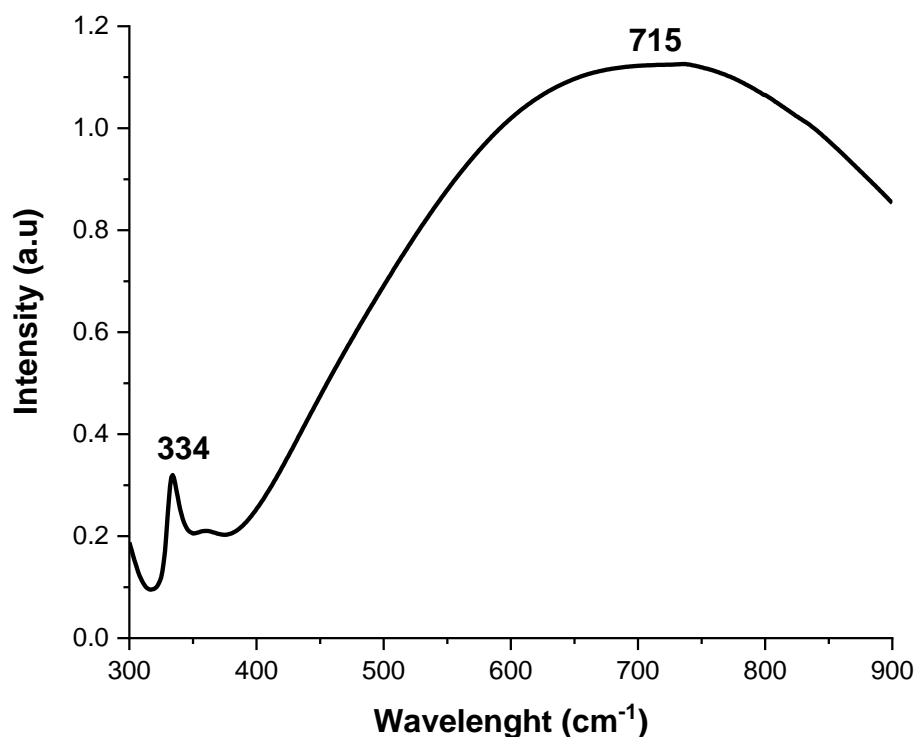
3.1.1. Kết quả đo SEM của để SERS các tấm nano bạc hình tam giác



Hình 3.2. Ảnh SEM của mẫu được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học với các điều kiện $AgNO_3$ (0,01M), 23,8ml DI, 700 μ l $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (30mM), 250 μ l dung dịch $NaBH_4$ (0,1M) và 75 μ l H_2O_2 (30%), thời gian thực hiện phản ứng là 45 phút.

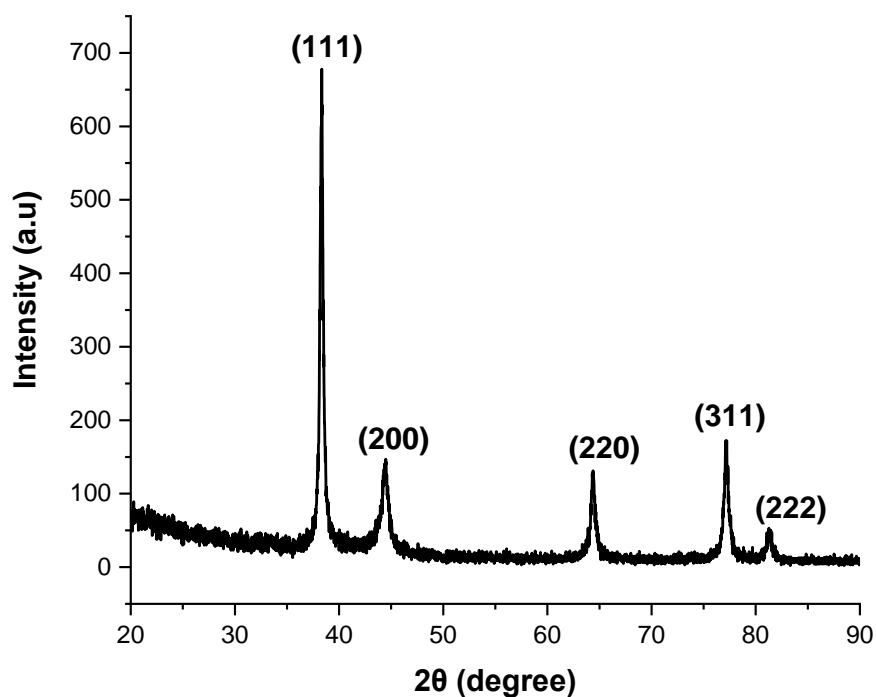
Hình 3.2 thể hiện ảnh SEM của mẫu AgNPLs được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học với các điều kiện là $AgNO_3$ (0,01M), 23,8ml DI, 700 μ l $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (30mM), 250 μ l dung dịch $NaBH_4$ (0,1M) và 75 μ l H_2O_2 (30%), thời gian thực hiện phản ứng là 45 phút. Có thể thấy rằng, mẫu thu được là các tấm nano bạc hình tam giác có với các cạnh sắc nhọn và mật độ khá dày với kích thước khoảng 80-90 nm.

3.1.2. Kết quả phổ cộng hưởng plasmon và cấu trúc tinh thể của các tấm nano bạc hình tam giác



Hình 3.3. Kết quả phổ cộng hưởng plasmon của mẫu AgNPLs

Hình 3.3 biểu diễn phổ cộng hưởng plasmon của mẫu AgNPLs tối ưu. Có thể thấy rằng, phổ UV-Vis thu được của mẫu trên có hai đỉnh cộng hưởng: một đỉnh nhọn thấp ở khoảng 334 nm và một đỉnh rộng ở vùng bước sóng dài tại 715 nm. Đỉnh cộng hưởng ở 334 nm cho thấy trong mẫu có các hạt nano bạc hình cầu. Với mục đích tăng cường tín hiệu phổ tán xạ Raman, để đạt được hiệu quả tốt nhất ngoài những điều kiện về độ đồng đều, độ lặp lại, độ ổn định của đế SERS thì một số tài liệu cũng đưa ra rằng vị trí hấp thụ ánh sáng cực đại của các hạt nano càng gần bước sóng của nguồn laser trong phép đo Raman thì khả năng tăng cường càng mạnh [73]. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, chúng tôi đã sử dụng thiết bị quang phổ Raman với nguồn laser có bước sóng 785 nm, do đó mẫu có đỉnh cực đại tại 715nm là thích hợp với điều kiện nghiên cứu.

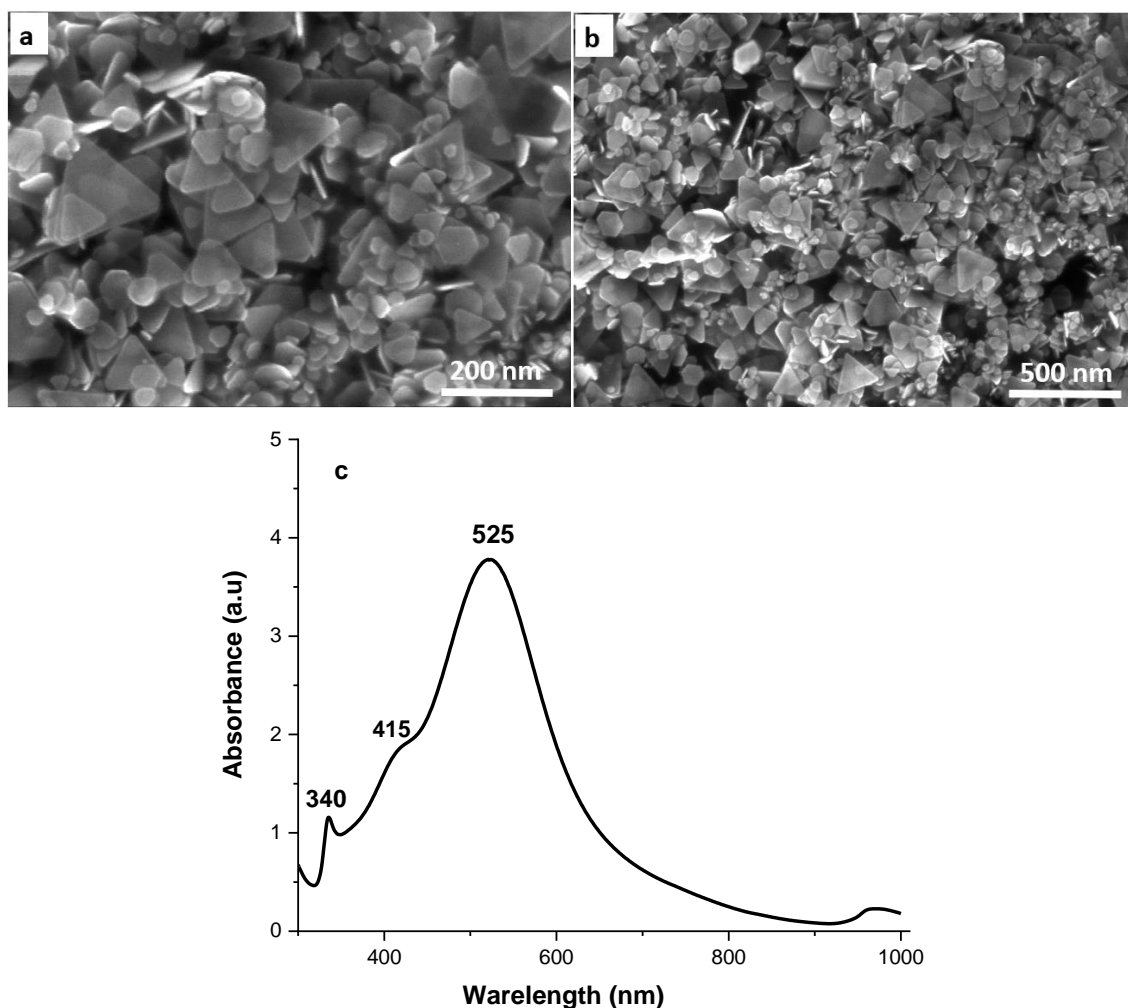


Hình 3.4. Giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu AgNPLs

Để kiểm tra cấu trúc tinh thể của các AgNPLs, các AgNPLs được phủ lên trên bề mặt Si và sau đó tiến hành phân tích trên hệ nhiễu xạ tia X (XRD). Hình 3.4 thể hiện kết quả XRD của các mẫu AgNPLs, lớp AgNPLs trên Si cho thấy các đỉnh (111), (200) và (220) của tinh thể bạc lập phương tâm mặt [74,75]. Các cực đại nhiễu xạ mạnh và sắc nét cho thấy bạc được kết tinh tốt.

Ngoài ra, với mục đích thay đổi kích thước cũng như hình dạng của các AgNPLs chúng tôi đã tiến hành cho thêm polyvinylpyrrolidone (PVP). Đây là một chất hoạt hóa bề mặt giúp tạo ra được các hình thái cấu trúc khác nhau của kim loại. Cụ thể các AgNPLs đã được chế tạo với các điều kiện như sau: dung dịch bao gồm 25ml AgNO_3 (0,1mM), 1,5ml $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (30mM), 1,5ml PVP (73mM) và 65 μl H_2O_2 (30%) được khuấy từ 50 vòng/phút trong thời gian 2-3 phút. Sau đó thêm nhanh 250 μl NaBH_4 (100mM) để thực hiện quá trình khử, dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt và sau 5 phút chuyển sang màu xanh lam, tiếp tục khuấy trong 60 phút. Các mẫu sau đó được ly tâm và được bảo quản trong tủ lạnh. Kết quả SEM trong hình 3.5 (a, b) cho thấy rằng mẫu được chế tạo khi có thêm PVP gồm có AgNPLs được hình thành với mật độ dày. Ngoài ra, có thể quan sát thấy một số tấm nano hình tam giác bị ăn mòn ở

các góc và trở nên tù hơn. Bên cạnh đó, còn xuất hiện thêm một số hạt nano bạc hình cầu và hình lục giác. Hình 3.5 (c) cho thấy phổ UV-vis của AgNPLs trong vùng bước sóng kích thích từ 300 nm đến 1000 nm. Có thể thấy rằng, phổ UV-Vis của mẫu chế tạo được xuất hiện các dải hấp thụ ở 340 nm, 415 nm và 525 nm. Kết quả này đã được chúng tôi được trình bày trong báo cáo tại Hội nghị Quang học quang phổ toàn quốc lần thứ 12 [76]. Tuy vậy có thể thấy rằng việc cho thêm PVP vào trong quá trình chế tạo chưa đạt được hiệu quả như mong muốn hoặc chúng tôi chưa tìm ra được nồng độ PVP thích hợp để tạo ra được các tấm nano bạc hình tam giác với kích thước và hình dạng có thể điều khiển được. Những vấn đề này sẽ được giải quyết trong các nghiên cứu tiếp theo.

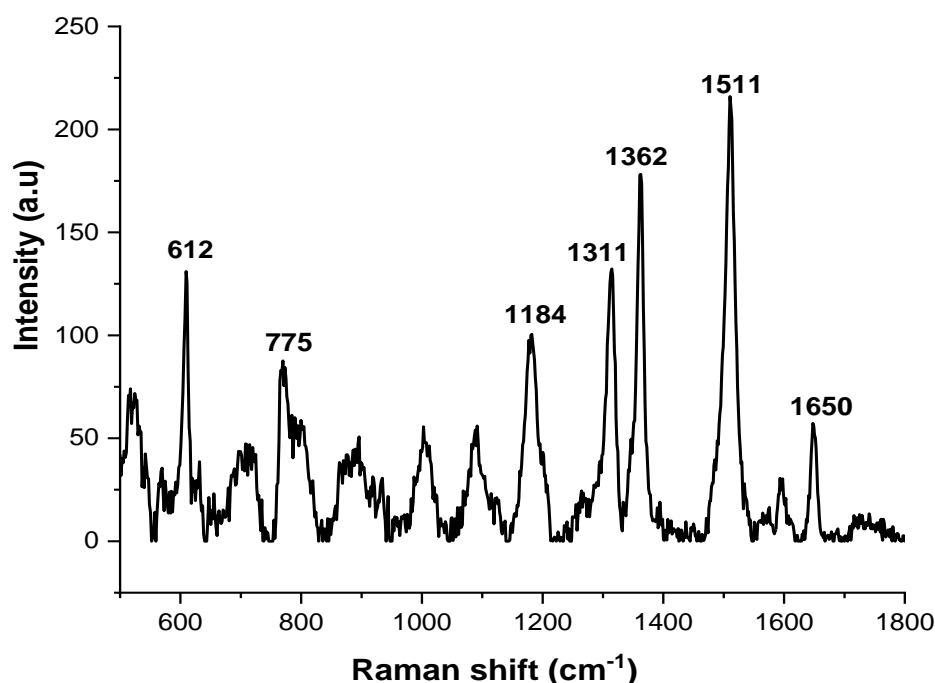


Hình 3.5. (a,b) Ảnh SEM với hai độ phóng đại khác nhau của AgNPLs chế tạo bằng phương pháp khử hóa học. (c) Phổ hấp thụ UV-Vis của AgNPLs

3.2. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA CÁC TẤM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC TRONG CẢM BIẾN TÁN XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT

3.2.1. Hệ số tăng cường tín hiệu SERS của các tấm nano bạc hình tam giác

Để đánh giá khả năng tăng cường tín hiệu Raman của đế SERS, hệ số tăng cường tín hiệu SERS của đế sẽ được khảo sát và chất màu hữu cơ Rhodamine 6G được sử dụng làm chất phân tích. Rhodamine 6G (R6G) là chất màu được sử dụng phổ biến trong công nghệ nhuộm dệt may và được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ sinh học làm kính hiển vi huỳnh quang, đo dòng tế bào, quang phổ huỳnh quang tương quan. R6G cũng là chất phân tích đã và đang được sử dụng rất nhiều trong các nghiên cứu về SERS và nó đóng vai trò là chất thăm dò, đánh giá hệ số tăng cường SERS của các đế.

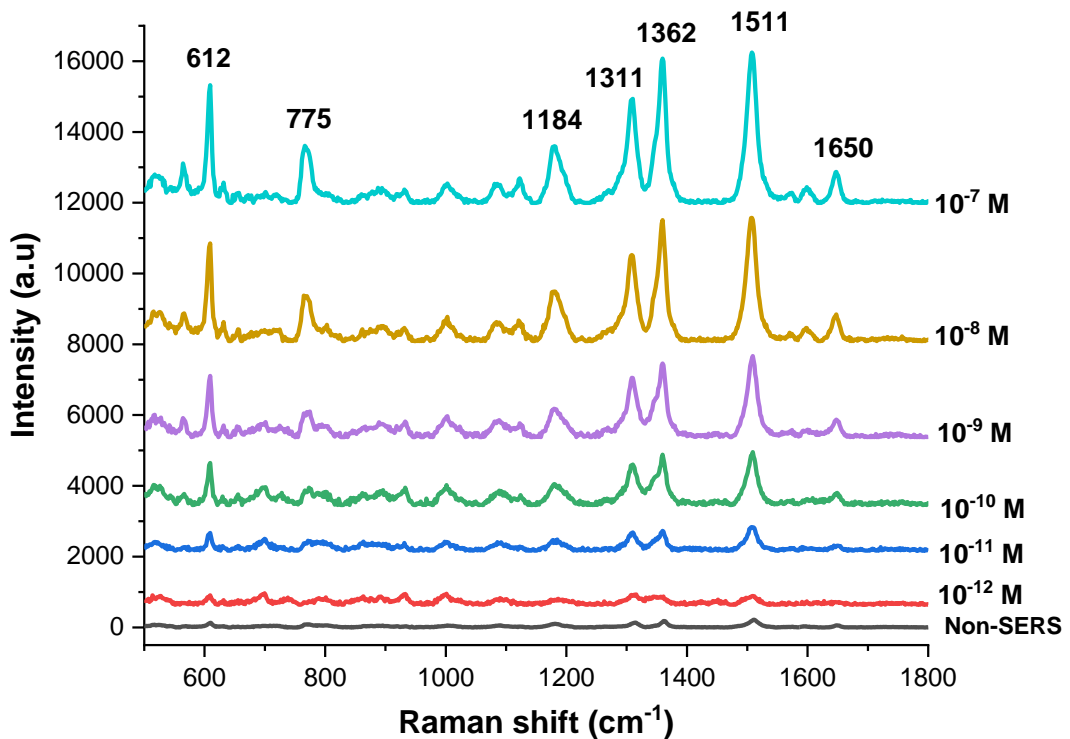


Hình 3.6. Phổ Raman của dung dịch R6G nồng độ 10^{-2} M được nhỏ lên trên bề mặt của lá nhôm

Hình 3.6 là phổ Raman của R6G với nồng độ 10^{-2} M được nhỏ lên trên bề mặt của lá nhôm. Trước tiên, có thể thấy rằng phổ Raman của R6G bao gồm các đỉnh ở 612, 775, 1184, 1311, 1362, 1511, 1650 cm^{-1} . Trong đó, đỉnh đặc

trung ở 612 cm^{-1} được gán cho vòng C-C-C trong mặt phẳng. Đỉnh ở 775 cm^{-1} là do chuyển động uốn cong ngoài mặt phẳng của các nguyên tử hydro của khung xanthere. Các đỉnh ở 1184 cm^{-1} tương ứng với các dao động trong mặt phẳng của các liên kết C-H. Các đỉnh tại 1311 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} , 1511 cm^{-1} và 1650 cm^{-1} được gán cho độ kéo dài C-C của vòng thơm [64, 77]. Các mode dao động tương ứng với các đỉnh đặc trưng của R6G được liệt kê trong bảng 3.6.

Hình 3.7 là phổ SERS của dung dịch R6G nồng độ 10^{-12} M - 10^{-7} M được phân tích sử dụng để SERS các tấm nano tam giác bạc. Có thể thấy rằng, tất cả các phổ SERS ghi được đều hiển thị các đỉnh đặc trưng của R6G. Ngoài ra, cường độ của các đỉnh đặc trưng của R6G giảm dần khi nồng độ của R6G trong dung dịch phân tích giảm. Khi nồng độ R6G trong dung dịch phân tích giảm xuống 10^{-12} M các đỉnh đặc trưng này vẫn còn được quan sát thấy khá rõ ràng chỉ ra rằng để SERS các tấm nano tam giác bạc chế tạo được cho phép phát hiện R6G với nồng độ thấp đến 10^{-12} M .



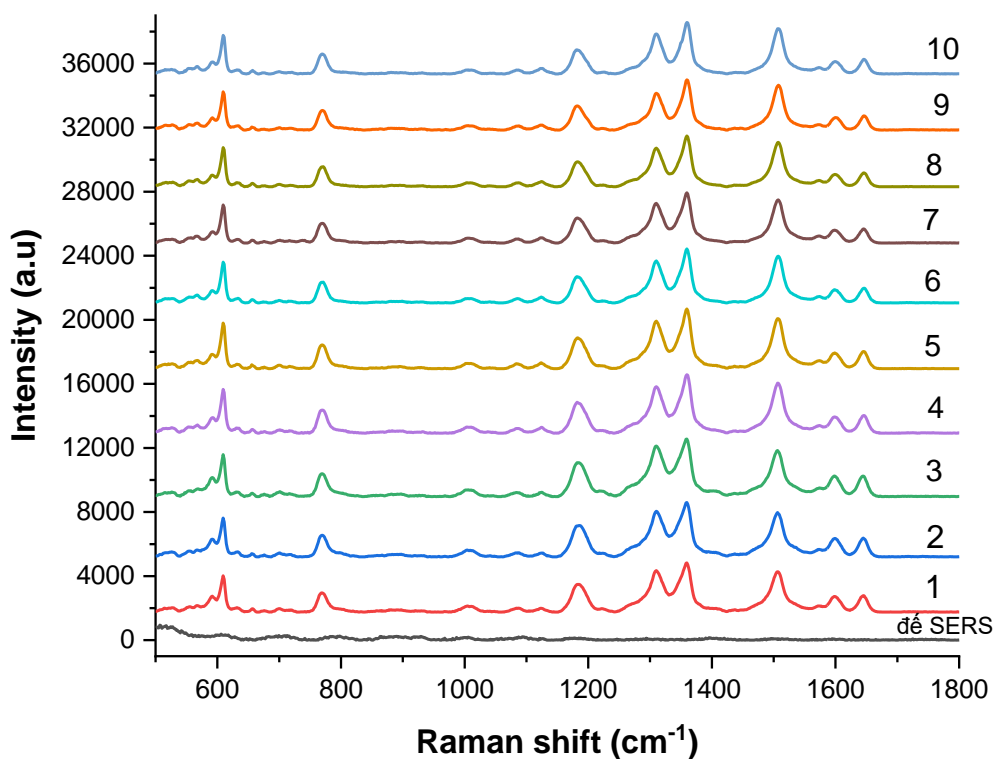
Hình 3.7. Hình ảnh phổ SERS của Rhodamine 6G trong khoảng nồng độ $10^{-7}M$ đến $10^{-12}M$ được phân tích sử dụng các AgNPLs

Bảng 3.1. Các đỉnh SERS tương ứng với các mode dao động của Rhodamine 6G

Dịch chuyển Raman (cm^{-1})	Mode dao động
612	Dao động của vòng C-C-C trong mặt phẳng
775	Uốn cong ngoài mặt phẳng của các nguyên tử hydro của khung xanthene
1184	Dao động trong mặt phẳng của các liên kết C-H
1311, 1362, 1511, 1650	độ kéo căng C-C của vòng thơm

Dựa trên phổ Raman và SERS thu được của R6G, chúng tôi tính toán được hệ số tăng cường SERS của các AgNPLs bằng phương trình đã được đưa ra trong mục 2.3.3.1. Trong trường hợp ở đây, nồng độ $10^{-12} M$ được chọn làm C_{SERS} còn C_{RS} là $10^{-2} M$. Dải ở $1511 cm^{-1}$ được chọn để tính hệ số tăng cường SERS vì đây là đỉnh đơn và có cường độ mạnh trong phổ SERS của R6G. Cường độ của R6G tại $1511 cm^{-1}$ ở nồng độ $10^{-2} M$ trên đế Al là khoảng 182 đơn vị tùy ý (a.u.). Trong khi đó, cường độ đỉnh SERS của R6G tại $1511 cm^{-1}$ ở nồng độ $10^{-12} M$ là khoảng 350 a.u. Từ những dữ liệu này, chúng tôi tính toán rằng R_{EF} của đế đạt khoảng $1,9 \times 10^{10}$.

Tiếp theo, độ đồng đều của các tấm nano bạc hình tam giác đã được khảo sát tại 10 vị trí ngẫu nhiên trên bề mặt đế SERS AgNPLs ở nồng độ R6G $10^{-9} M$ và kết quả được chỉ ra trong hình 3.8. Quan sát trên hình 3.8 ta thấy hình dáng phổ và cường độ các đỉnh phổ SERS của R6G tại 10 vị trí ngẫu nhiên là tương đối đồng đều nhau.

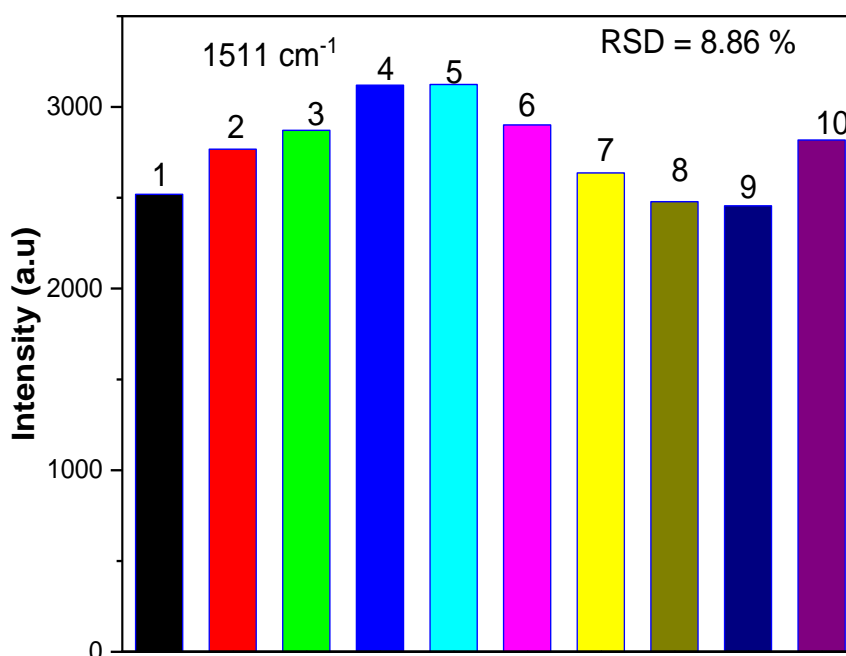


Hình 3.8. Hình ảnh minh họa phổ SERS của chất màu R6G nồng độ 10^{-9} M tại 10 vị trí bất kì trên cùng một nền chất AgNPLs

Bảng 3.2. Cường độ SERS của R6G tại đỉnh 1511 cm^{-1} tương ứng với 10 vị trí ngẫu nhiên

Nồng độ R6G	đỉnh phổ SERS	Vị trí đo	Cường độ SERS của các vị trí (a.u)
10^{-9} M	Đỉnh 1511 cm^{-1}	1	2519.16667
		2	2767.83333
		3	2871.33333
		4	3120.5
		5	3123.83333
		6	2901.52777
		7	2673.68056
		8	2379.48717
		9	2356.60256
		10	2818.33333

Để thuận lợi cho việc đánh giá, chúng tôi tiến hành lập đồ thị so sánh cường độ tại đỉnh 1511 cm^{-1} tại 10 vị trí tương ứng với số liệu trong Bảng 3.2. Hình 3.9 biểu diễn kết quả so sánh cường độ SERS của 10 vị trí bất kì. Giá trị RSD% được ước tính bởi công thức được trình bày trong mục 2.3.3.2 là 8,86% cho thấy để SERS AgNPLs có độ đồng đều tốt.



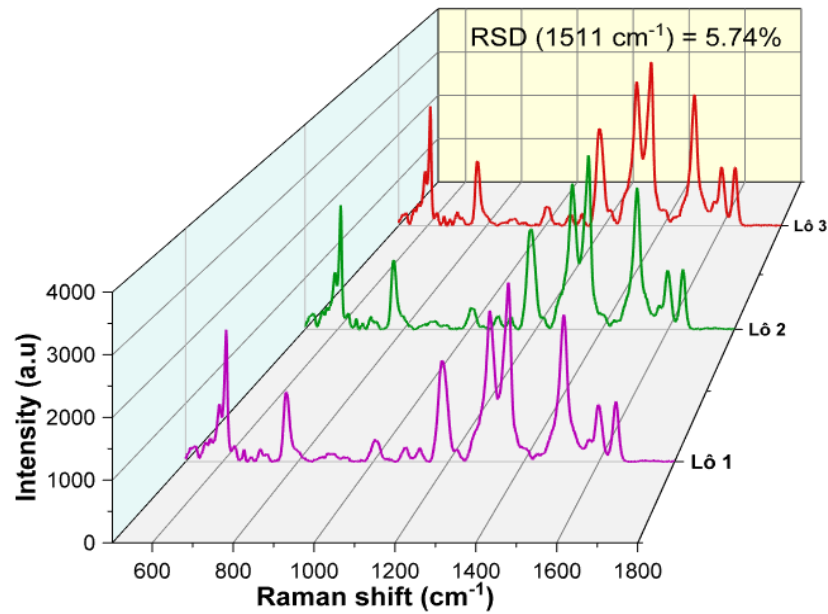
Hình 3.9. Đồ thị biểu diễn cường độ Raman của R6G tại 1511 cm^{-1} được đo tại mười vị trí bất kì trên cùng bề mặt để AgNPLs.

Ngoài ra, có thể quan sát trên phổ ghi được của đế SERS (không có chất phân tích) không thấy xuất hiện đỉnh phổ Raman nào do đó có thể thấy rằng là đế SERS AgNPLs chế tạo được là sạch.

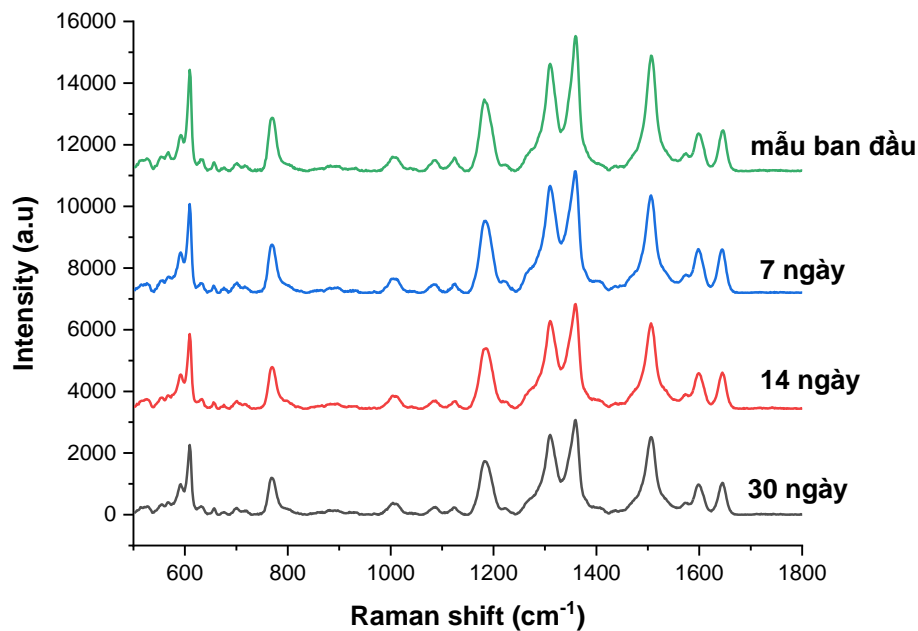
3.2.2. Khảo sát độ lặp lại và độ ổn định của đế SERS AgNPLs

Để khảo sát độ lặp lại của quy trình chế tạo đế SERS, chúng tôi tiến hành chế tạo riêng rẽ các AgNPLs theo cùng một quy trình tại ba thời điểm khác nhau và đồng thời nhỏ dung dịch R6G với nồng độ 10^{-9} M lên bề mặt mẫu để tiến hành khảo sát. Hình 3.10 biểu diễn kết quả đánh giá độ ổn định của các đế SERS AgNPLs. Kết quả cho thấy hình dáng phổ và cường độ các đỉnh phổ SERS của R6G thu được trên ba lô mẫu có sự tương đồng và giá trị độ lệch

chuẩn tương đối (RSD) của cường độ của dải ở 1511 cm^{-1} của ba phổ trên là 5,47% chứng tỏ độ lặp lại của đế SERS AgNPLs là rất tốt.



Hình 3.10. Hình ảnh minh họa phổ SERS của R6G nồng độ $10^{-9}M$ khi sử dụng đế SERS là AgNPLs tương ứng với ba lô mẫu chế tạo ở ba thời điểm khác nhau

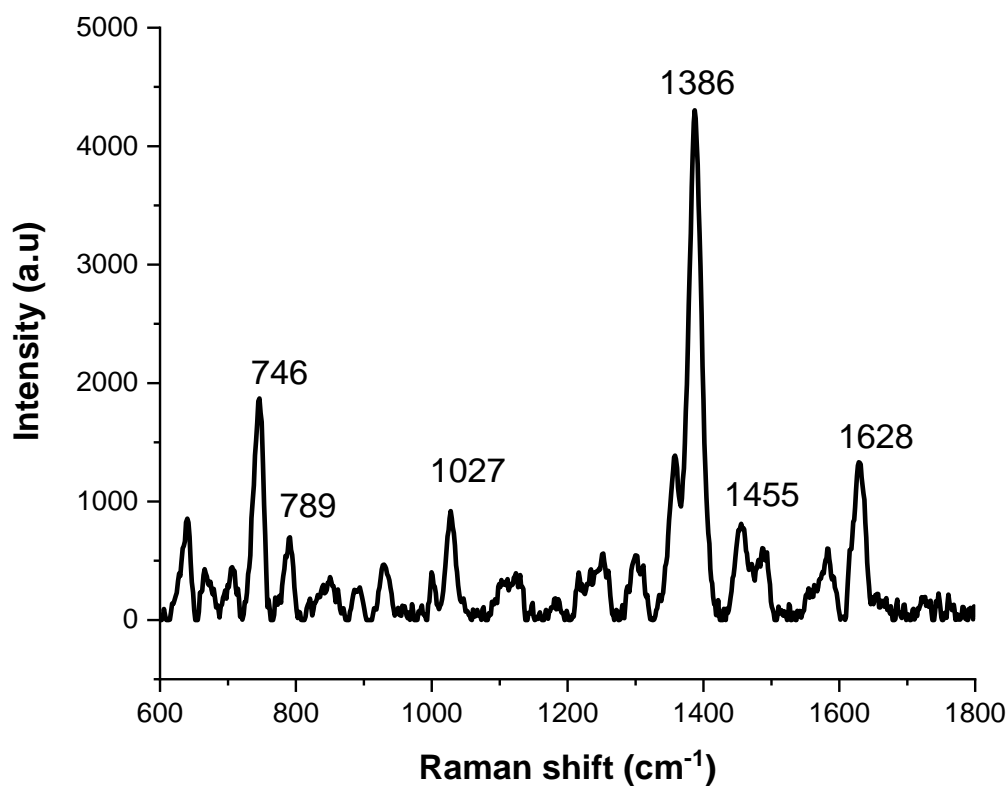


Hình 3.11. Phổ SERS của R6G nồng độ $10^{-9} M$ được ghi lại với đế SERS AgNPLs được phân tán trong nước khử ion ở $11\text{ }^{\circ}C$ tương ứng với các mốc thời gian tương ứng với ban đầu, 7, 14 và 30 ngày.

Độ ổn định của đế SERS AgNPIs đã được khảo sát bằng cách sử dụng các AgNPIs được chế tạo sau những khoảng thời gian 7 ngày, 14 ngày và 30 ngày làm đế SERS để phân tích R6G tại nồng độ 10^{-9} M. Các kết quả cho thấy cường độ phổ SERS tại đỉnh 1511 cm^{-1} của R6G giảm khoảng 10% sau 30 ngày chế tạo (hình 3.11). Như vậy, độ ổn định của các mẫu AgNPIs là khá tốt.

3.3. ỨNG DỤNG HỆ CÁC TẤM NANO BẠC HÌNH TAM GIÁC TRONG PHÂN TÍCH LƯỢNG VẾT CỦA THUỐC KHÁNG SINH ENROFLOXAXIN VÀ CHLORAMPHENICOL

3.2.3. Ứng dụng các AgNPIs làm cảm biến SERS để phân tích kháng sinh enrofloxacin



Hình 3.12. Phổ Raman của mẫu bột enrofloxacin

Hình 3.12 biểu diễn phổ Raman của mẫu bột enrofloxacin. Có thể thấy rằng, phổ Raman của enrofloxacin bao gồm các đỉnh tại 746, 789, 1027, 1386, 1455, 1628 cm^{-1} . Các đỉnh phổ này tương ứng với các dao động sau: đỉnh 746 cm^{-1} tương ứng với các dao động rung của methylene. Các dao động tại 789 cm^{-1} được coi là đặc trưng của vòng benzen. Đỉnh 1027 cm^{-1} được gán cho do

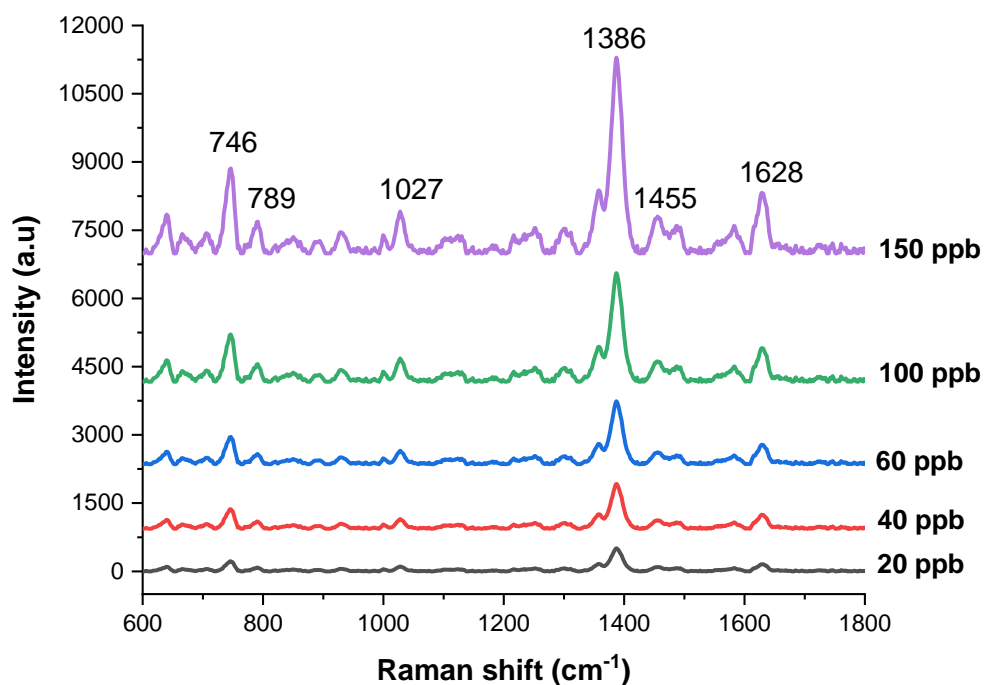
dao động của liên kết C–H, và đỉnh tại 1386 cm^{-1} là dao động kéo dài đối xứng của liên kết O–C–O. Đỉnh 1455 cm^{-1} được quy cho dao động kéo dài của vòng benzen, trong khi đỉnh tại 1628 cm^{-1} là do dao động kéo căng của liên kết C – O [78].

Các đỉnh Raman đặc trưng của enrofloxacin và mode dao động tương ứng được tổng hợp lại trong bảng 3.3.

Bảng 3.3. Các đỉnh đặc trưng Raman tương ứng với các mode dao động của enrofloxacin

Dịch chuyển Raman (cm^{-1})	Mode dao động
746	Dao động rung của methylene
789	Dao động đặc trưng của vòng benzen
1027	Dao động của liên kết C–H
1386	Dao động kéo căng đối xứng của liên kết O–C–O
1455	Dao động kéo căng của vòng benzen
1628	Dao động kéo căng của liên kết C – O

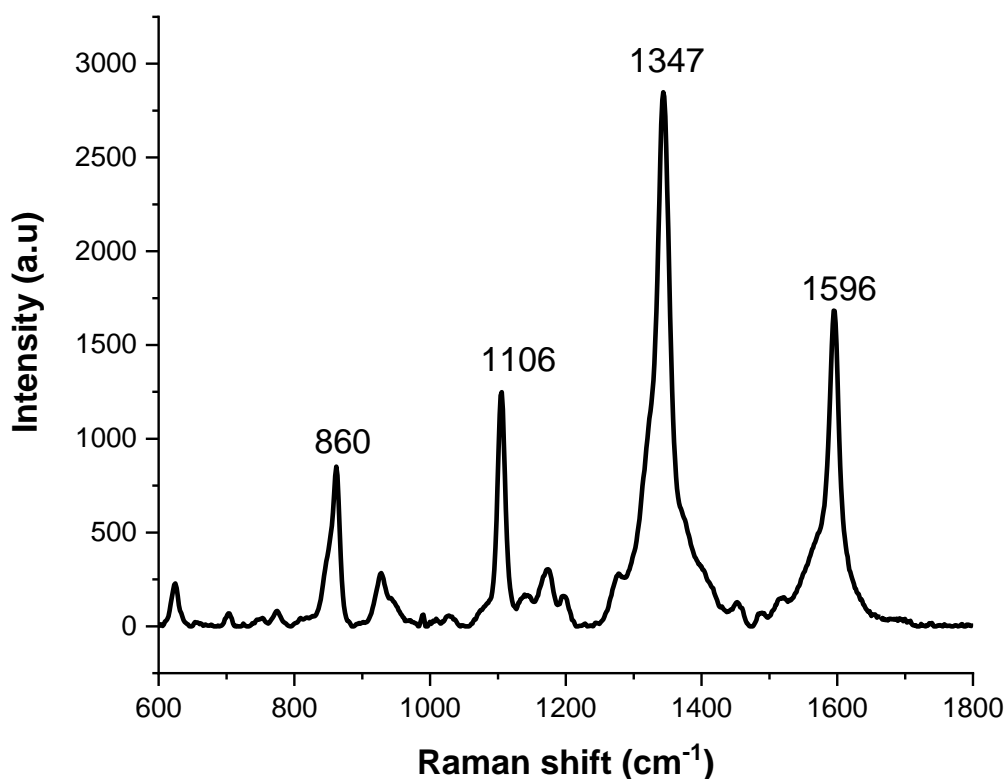
Hình 3.13 là phổ SERS của enrofloxacin với các nồng độ từ 20 ppb đến 150 ppb được phân tích sử dụng để SERS AgNPIs. Trước tiên có thể thấy rằng, tất cả các phổ SERS thu được đều hiển thị các đỉnh đặc trưng của enrofloxacin và cường độ các đỉnh đặc trưng này giảm dần khi nồng độ Enro giảm đi. Khi nồng độ enrofloxacin trong dung dịch phân tích giảm xuống 20 ppb thì các đỉnh tại 746 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} và 1628 cm^{-1} vẫn hiển thị khá rõ cho thấy rằng các đế SERS AgNPIs cho phép phát hiện enrofloxacin với nồng độ thấp đến 20 ppb.



Hình 3.13. Biểu diễn phổ SERS của enrofloxacin tại nồng độ 20, 40, 60, 100, 150 ppb sử dụng để SERS AgNPLs

3.2.4. Ứng dụng các đế SERS AgNPLs làm cảm biến để phân tích kháng sinh chloramphenicol

Hình 3.14 biểu diễn phổ Raman của bột chloramphenicol. Từ hình vẽ ta thấy phổ Raman của chloramphenicol bao gồm các đỉnh đặc trưng tại 860, 1106, 1347, 1596 cm⁻¹. Trong đó, đỉnh đặc trưng tại 860 cm⁻¹ do dao động kéo căng của liên kết N–O, và tại đỉnh 1106 cm⁻¹ được gán cho dao động uốn trong mặt phẳng của liên kết N–H và dao động kéo căng của liên kết C–H trên vòng benzen. Đỉnh đặc trưng tại 1347 cm⁻¹ là được gán cho dao động uốn của nhóm -NO₂ và liên kết C–H trên vòng benzen và dao động kéo dài của chuỗi carbon của phân tử Chloramphenicol, trong khi đỉnh đặc trưng tại 1596 cm⁻¹ được quy cho dao động kéo căng của 24C-25O và 24C-22 N [79,80].



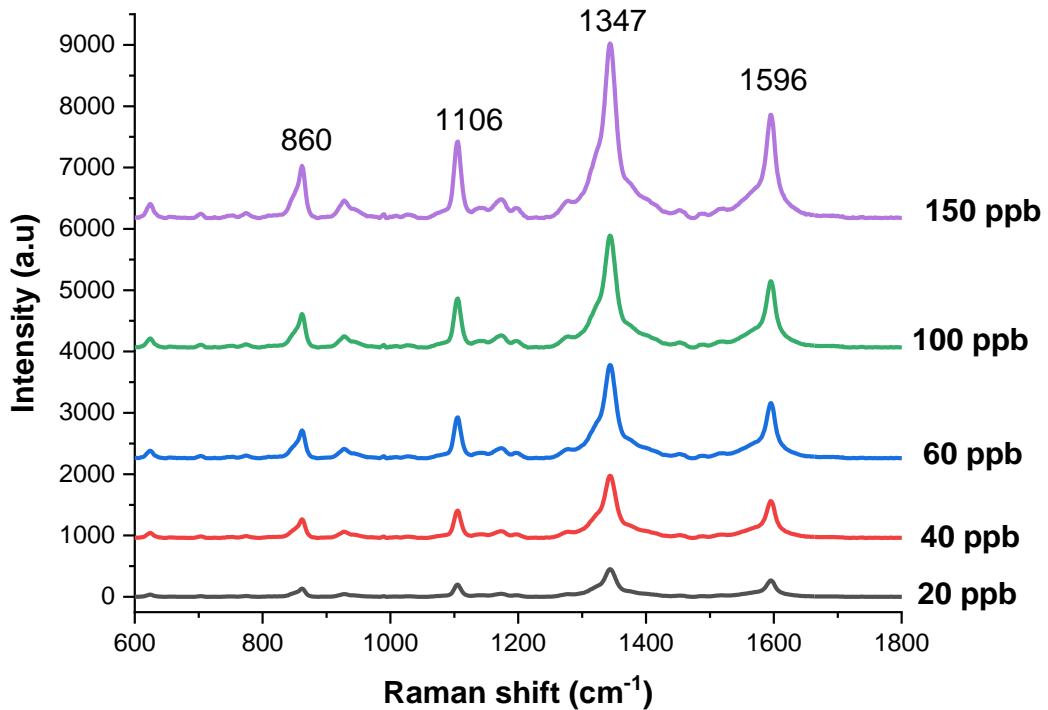
Hình 3.14. Phổ Raman của bột chloramphenicol

Các mode dao động của chloramphenicol và các đỉnh phổ tương ứng được liệt kê trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. Các đỉnh đặc trưng Raman tương ứng với các mode dao động của chloramphenicol

Dịch chuyển Raman (cm ⁻¹)	Mode dao động
860	Dao động kéo căng của liên kết N-O
1106	Uốn trong mặt phẳng của N-H và dao động kéo căng của C-H trên vòng benzen
1347	Uốn của -NO ₂ và C-H trên vòng benzen
1596	Dao động kéo căng của C-O và C-N

Các phổ SERS của chloramphenicol với các nồng độ khác nhau được phân tích bằng cách sử dụng để SERS AgNPLs hiển thị tất cả các đỉnh Raman đặc trưng của chloramphenicol (Hình 3.15). Cường độ các đỉnh phổ đặc trưng này giảm dần khi nồng độ chloram giảm từ 150 ppb xuống 20 ppb.

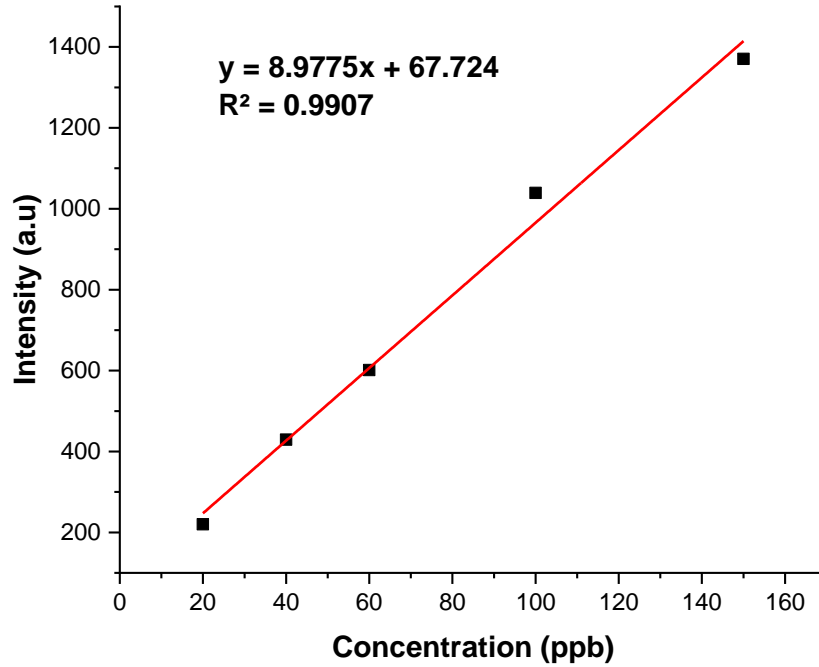


Hình 3.15. Biểu diễn phổ SERS của chloramphenicol với các nồng độ 20, 40, 60, 100, 150 ppb sử dụng để SERS AgNPLs

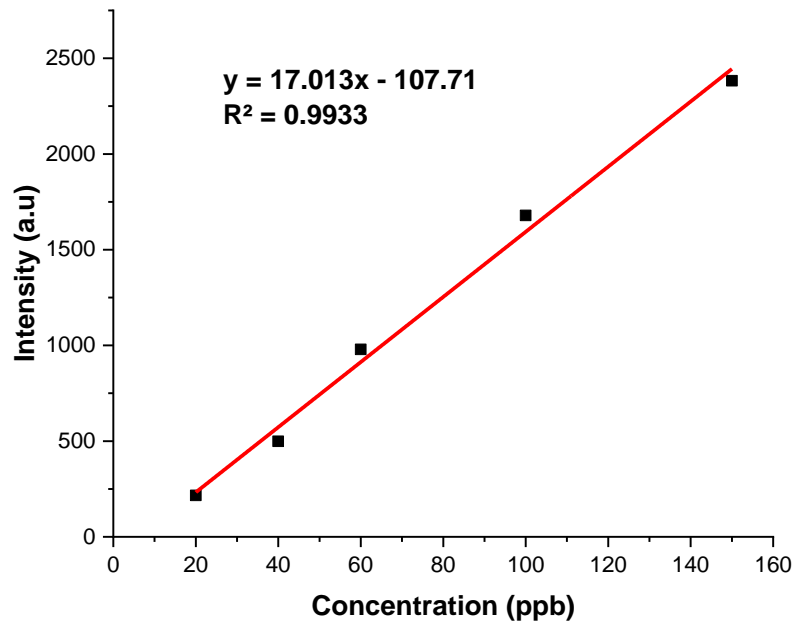
3.2.5. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp trong phân tích hai chất kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol

3.2.5.1. Xây dựng đường chuẩn

Từ các kết quả thu được, đường chuẩn biểu diễn tương quan giữa cường độ đỉnh SERS và nồng độ của từng chất kháng sinh đã được xây dựng. Kết quả được thể hiện như các hình dưới đây:



Hình 3.16. Mối quan hệ tuyến tính giữa cường độ đỉnh SERS tại 746 cm^{-1} và nồng độ enrofloxacin trên bề mặt SERS AgNPLs.



Hình 3.17. Mối quan hệ tuyến tính giữa cường độ đỉnh SERS tại 1596 cm^{-1} và nồng độ chloramphenicol trên bề mặt SERS AgNPLs.

Phương trình đường chuẩn, hệ số hồi quy tuyến tính và khoảng tuyến tính tương ứng của mỗi đường chuẩn xây dựng được được thể hiện ở bảng sau:

Bảng 3.5. Các thông số đánh giá đường chuẩn

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan
Enrofloxacin	20-150ppb	$y = 8,9775x + 67,724$	0,9907
Chloramphenicol	20-150ppb	$y = 17,013x - 107,71$	0,9933

Hai đường chuẩn xây dựng được đều cho hệ số tương quan $R^2 > 0,99$, tại mức nồng độ chuẩn thấp nhất, đáp ứng tốt yêu cầu về định lượng với khoảng tuyến tính là 20 – 150 ppb. Mỗi điểm trong Hình 3.16, Hình 3.17 là kết quả của việc lấy trung bình của ba phép đo tại các điểm khác nhau trên cùng một mẫu.

3.2.5.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được tính toán dựa theo đường chuẩn xây dựng được và được tính toán như bảng sau:

Bảng 3.6. Giới hạn phát hiện (LOD) enrofloxacin và chloramphenicol

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện (LOD)
Enrofloxacin	19,07 ppb
Chloramphenicol	16,1 ppb

Bảng 3.7. Giới hạn định lượng (LOQ) enrofloxacin và chloramphenicol

Chất phân tích	Giới hạn định lượng (LOQ)
Enrofloxacin	57,2 ppb
Chloramphenicol	48,3 ppb

Từ các bảng 3.6 và 3.7 có thể thấy rằng, giới hạn phát hiện của phương pháp SERS đối với enrofloxacin và chloramphenicol là rất thấp cho thấy rằng SERS phù hợp để ứng dụng trong việc phân tích, kiểm tra hàm lượng hai loại kháng sinh trên trong thực phẩm.

3.2.5.3. Độ thu hồi

Độ thu hồi hay độ đúng của phương pháp là một trong những thông số để đánh giá độ chính xác của phương pháp phân tích. Độ thu hồi của phương pháp được xác định bằng cách thêm chuẩn tại ba nồng độ 50 ppb, 80 ppb, 120 ppb của từng chất phân tích. Tại mỗi mức thêm chuẩn thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả thu được được chỉ ra trong Bảng 3.8 và Bảng 3.9

Bảng 3.8. Độ thu hồi của kháng sinh enrofloxacin

STT	Nồng độ thêm vào (ppb)	Nồng độ trung bình phát hiện (n=3) (ppb)	Độ thu hồi (%)
1	0	–	–
2	50	47,93	95,86
3	80	79,04	98,8
4	120	128,70	107,25

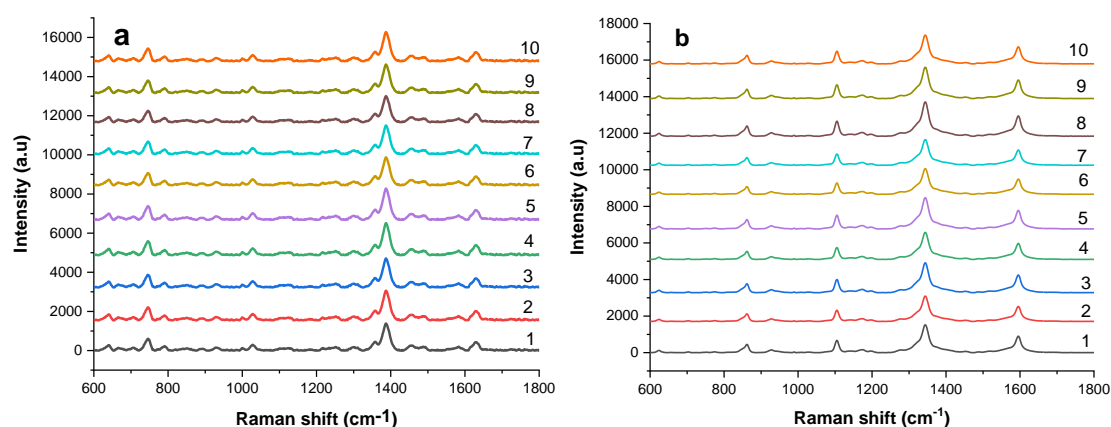
Bảng 3.9. Độ thu hồi của kháng sinh chloramphenicol

STT	Nồng độ thêm vào (ppb)	Nồng độ trung bình phát hiện (n=3) (ppb)	Độ thu hồi (%)
1	0	–	–
2	50	52,86	105,72
3	80	78,18	97,73
4	120	114,72	95,6

Có thể thấy rằng, sau khi thêm enrofloxacin và chloramphenicol với nồng độ biết trước, độ thu hồi trung bình đo được tương ứng nằm trong khoảng từ 95,86% đến 107,25% với enrofloxacin và 95,6 % đến 105,72% với chloramphenicol. Kết quả cho thấy độ thu hồi của hai chất tại ba nồng độ đều nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn AOAC [72].

3.2.5.4. Khảo sát độ đồng đều của đế SERS AgNPLs trong phân tích enrofloxacin và chloramphenicol

Độ đồng đều của đế SERS AgNPLs đã được khảo sát tại 10 vị trí ngẫu nhiên trên bề mặt đế SERS AgNPLs đối với enrofloxacin và chloramphenicol ở nồng độ 60ppb và kết quả được chỉ ra trong Hình 3.18.



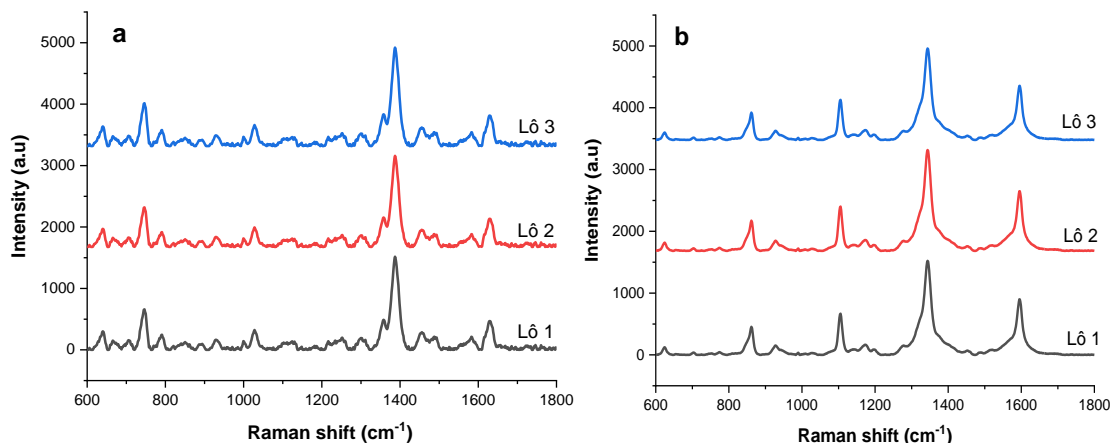
Hình 3.18. Hình ảnh minh họa phổ SERS của (a) enrofloxacin, (b) chloramphenicol nồng độ 60ppb tại 10 vị trí bất kì trên cùng một nền chất AgNPLs

Quan sát trên Hình 3.18 ta thấy hình dáng phổ và cường độ các đỉnh phổ SERS của enrofloxacin và chloramphenicol tại 10 vị trí ngẫu nhiên là tương đối đồng đều nhau cho thấy sự trùng khớp của phổ rất là tốt. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) lần lượt là 8,86% và 9,98% tương ứng cho enrofloxacin và chloramphenicol cho thấy đế SERS AgNPLs có độ đồng đều tốt.

3.2.5.5. Khảo sát độ lặp lại của đế SERS AgNPLs trong phân tích enrofloxacin và chloramphenicol

Để khảo sát độ lặp lại của quy trình chế tạo đế SERS, chúng tôi tiến hành chế tạo riêng rẽ các AgNPLs theo cùng một quy trình tại ba thời điểm khác nhau

và đồng thời nhỏ dung dịch enrofloxacin và chloramphenicol với nồng độ 60ppb lên bề mặt mẫu để tiến hành khảo sát và thu được kết quả như trong Hình 3.19



Hình 3.19. Hình ảnh minh họa phổ SERS của (a) enrofloxacin, (b) chloramphenicol nồng độ 60ppb khi sử dụng đế SERS là AgNPLs tương ứng với ba lô mẫu chế tạo ở ba thời điểm khác nhau

Từ Hình 3.19 ta thấy rằng, các đế SERS thuộc các lô mẫu khác nhau cho kết quả tương đối giống nhau về hình dáng phổ và cường độ các đỉnh phổ SERS của enrofloxacin và chloramphenicol. Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của cường độ SERS là 5,53% và 5,47% tương ứng với enrofloxacin và chloramphenicol, cho thấy độ lặp lại của đế SERS AgNPLs là rất tốt. Từ các kết quả trên cho thấy đế SERS làm từ AgNPLs có thể sử dụng kết hợp với kỹ thuật tán xạ Raman tăng cường bề mặt trong việc phân tích định lượng thuốc kháng sinh enrofloxacin và chloramphenicol trong thực phẩm một cách chính xác và nhanh chóng.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nghiên cứu tổng hợp thành công cấu trúc các tấm nano bạc hình tam giác (AgNPIs) bằng phương pháp khử hóa học với các điều kiện tối ưu là 250 μ l AgNO₃ (0,01M), 23,8ml DI, 700 μ l C₆H₅Na₃O₇. 2H₂O (30mM), 250 μ l dung dịch NaBH₄ (0,1M) và 75 μ l H₂O₂ (30%), thời chế tạo là 45 phút. Các AgNPIs với các góc nhọn, kích thước nhỏ (80 - 90 nm) và đồng đều.

Cảm biến SERS được làm từ các AgNPIs có hệ số tăng cường SERS lớn (khoảng 10¹⁰) với độ đồng đều, độ lặp lại tốt với giá trị %RSD <10% và độ ổn định khá tốt với sự suy giảm cường độ các đỉnh SERS sau 30 ngày chế tạo là khoảng 10%.

Giá trị sử dụng của phương pháp phân tích với hai chất enrofloxacin và chloramphenicol đã được khảo sát với các thông số cụ thể như sau: đường chuẩn được xây dựng với khoảng tuyến tính là 20-150 ppb, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của enrofloxacin tương ứng là 19,07 ppb, 51,2 ppb và của chloramphenicol tương ứng là 16,1 ppb và 48,3 ppb. Độ thu hồi của phương pháp đối với enrofloxacin và chloramphenicol tương ứng nằm trong khoảng 95,86 - 107,25% và 95,6 - 105,72%. Độ đồng đều, độ lặp lại của đế SERS đối với cả hai chất kháng sinh đều đạt giá trị độ lệch chuẩn RSD% < 10%. Các kết quả cho thấy rằng các AgNPIs đáp ứng tốt trong việc ứng dụng làm cảm biến SERS để phân tích enrofloxacin và chloramphenicol.

4.2. KIẾN NGHỊ

Các kết quả của đề tài mở ra triển vọng cho việc sử dụng đế SERS AgNPIs cho ứng dụng làm cảm biến tán xạ Raman tăng cường bề mặt trong phân tích nhanh, chính xác các hợp chất hữu cơ ở nồng độ thấp. Vì vậy, nhóm nghiên cứu chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu, triển khai ứng dụng kỹ thuật SERS trong phân tích, phát hiện dư lượng các chất độc hại trong môi trường cũng như trong thực phẩm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Vu Thi Thu, Luong Truc Quynh Ngan, Dao Tran Cao, Nguyen Anh Vu, 2022, Study on fabrication of triangular silver nanoplates for application as surface-enhanced Raman scattering sensors, *Advances in Optics, Photonics, Spectroscopy & Applications XII*, ISBN: 978-604-357-120-2, pp. 339-343.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. V. Raman, K. S. Krishnan, 1928, A new type of secondary radiation, *Science*, 121, pp. 501-502.
- [2] A. R. Attili, S. Preziuso, V. N. Ngu, et al. 2016, Clinical evaluation of the use of enrofloxacin against *Staphylococcus aureus* clinical mastitis in sheep, *Small Ruminant Research*, 136, pp. 72–77.
- [3] W. A. Zordok, S. A. Sadeek, 2016, Synthesis, thermal analyses, characterization and biological evaluation of new enrofloxacin vanadium(V) solvates(L) (L = An, DMF, Py, Et₃N and o-Tol). *Journal of Molecular Structure*, 1120, pp. 50–61.
- [4] E. K. Efthimiadou, A. Karaliota, G. Psomas, 2008, Mononuclear metal complexes of the second-generation quinolone antibacterial agent enrofloxacin: synthesis, structure, antibacterial activity and interaction with DNA, *Polyhedron*, pp. 271729–1738.
- [5] F. Salehzadeh, A. Salehzadeh, N. Rokni, R. Madani, Fariba Golchinefar, 2007, Enrofloxacin Residue in Chicken Tissues from Tehran Slaughterhouses in Iran, *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, pp. 409-413.
- [6] D. Visky, E. Haghedooren, P. Dehouck et al., 2006, Facilitated column selection in pharmaceutical analyses using a simple column classification system, *Journal of Chromatography A*, 1101, pp. 103–114.
- [7] B. Aslam, N. Kousar, I. Javed, A. Raza, A. Ali, T. Khaliq, F. Muhammad, A. J. Khan, 2016, Determination of Enrofloxacin Residues in Commercial Broilers Using High Performance Liquid Chromatography, *International Journal of Food Properties*, 19, pp. 2463-2470.
- [8] F. Al-Rimawi and K. Maher, 2011, Analysis of Chloramphenicol and Its Related Compound 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)propane-1,3-diol by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Chromatography Research International*, 2011, 482308.
- [9] G. Stubbings, T. Bigwood, 2009, The development and validation of a

multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637, pp. 68–78.

[10] S. Joe, P. Al, T. Sherri, N. Gene, L. Rebecca, B. Cathy, M. Mark, 2003, Determination of Chloramphenicol Residues in Shrimp and Crab Tissues by Electrospray Triple Quadrupole LC/MS/MS, *Science & Research (Food)*, 19, 6.

[11] P. K. Đang, V. T. Ngan, P. H. Ngan, 2014, A Method for The Simultaneous Determination The Residues of Chloramphenicol (CAP), Florfenicol (FF) and Thiamphenicol (TAP) in Animals Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LS-MS/MS), *Journal of Science and Technology Development*, 12, pp. 165-176

[12] Y. Xu, Y. Du, Q. Li, X. Wang, Y. Pan, H. Zhang, T. Wu, H. Hu, 2014, Ultrasensitive Detection of Enrofloxacin in Chicken Muscles by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Amino-Modified Glycidyl Methacrylate-Ethylene Dimethacrylate (GMA-EDMA) Powdered Porous Material, *Food Analytical Methods*, 7, 1219.

[13] H. Li, M. Wang, X. Shen, S. Liu, Y. Wang, L. Yue, Q. Wang, G. Che, 2019, Rapid and sensitive detection of enrofloxacin hydrochloride based on surface enhanced Raman scattering-active flexible membrane assemblies of Ag nanoparticles, *Journal of Environmental Management*, 249, 109387.

[14] X. Fu, Z. Wang, J. Li, S. Ma, G. Fu, W. Jin, W. Bi, Y. Dong, 2021, Microcavity Fiber SERS Probe Coated With Ag Nanoparticles For Detecting Antibiotic in Milk, *IEEE Photonics Journal*, 13.

[15] F. Qianqian, L. Yingying, M. Xinxing, Z. Yiqiu, Y. Jun, Y. Tainrong and L. Jian, 2019, Sensitive detection of antibiotics using aptamer conformation cooperated enzyme-assisted SERS technology, *Analyst*, 144, 3649.

- [16] D. Xiao, Z. Jie, Z. Ma, Y. Ying, X. Guo, Y. Wen, H. Yang, 2020, Fabrication of homogeneous waffle-like silver composite substrate for Raman determination of trace chloramphenicol, *Microchimica Acta*, 187,591.
- [17] D. A. Long (2002), *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons.
- [18] J. T. Motz, M. Fitzmaurice, A. Miller, et al, 2006, In vivo Raman spectral pathology of human atherosclerosis and vulnerable plaque, *Journal of Biomedical Optics*, 11, 021003-9.
- [19] W. E. Smith and G. Dent, 2005, *Modern Raman Spectroscopy—A Practical Approach* (New York: Wiley).
- [20] K. N. Minh, D. T. Cao, C. T. Anh, L. V. Vu and L.T.Q. Ngan, Fabrication of silver flower-like microstructures on silicon and their use as surface-enhanced raman scattering substrates to detect melamine traces, *The 6th Asian Symposium on Advanced Materials: Chemistry, Physics & Biomedicine of Functional and Novel Materials (ASAM-6)*, September 27-30, 2017, Hanoi, Vietnam
- [21] Đ. T. Cao, K. N. Minh, L. T. Q. Ngân, C. T. Anh, N. N. Hai and L. V. Vu, 2018, Modification of the SERS spectrum of cyanide traces due to complex formation between cyanide and silver, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology (ANSN)*, 9, 025006-5.
- [22] Đ. T. Cao, L. T. Q. Ngân, C. T. Anh and K. N. Minh, 2019, High-sensitive SERS detection of thiram with silver nanodendrites substrate, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology (ANSN)*, 10, 025012 (4pp).
- [23] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld ,2002, Surface enhanced Raman scattering and biophysics, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14, pp. R597 – R624.
- [24] D. L. Jeanmaire, and R. P. V. Duyne, 1977, Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines

adsorbed on the anodized silver electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 84, pp. 1–20

[25] M. Moskovits, 1985, Surface-enhanced spectroscopy, *Reviews of Modern Physics*, 57, pp. 783 – 826.

[26] M. Moskovits, 2006, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: a Brief Perspective, *Topics in Applied Physics*, 103, pp. 1 – 17.

[27] R. J. C Brown, J. Wang, R. Tantra, R. E Yardley, and M. J. T. Milton 2006, Electromagnetic modelling of raman enhancement from nanoscale substrates: a route to estimation of the magnitude of the chemical enhancement mechanism in SERS, *Faraday Discussions*, 132, pp. 201 – 213

[28] U. K. Sur, and J. Chowdhury ,2013, Surface-enhanced Raman scattering: overview of a versatile technique used in electrochemistry and nanoscience, *Current Science*, 105, pp. 923 – 939.

[29] H. Xu, J. Aizpurua, M. Kall, and P. Apell, 2000, Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced raman scattering, *Physical Review E*, 62, pp. 4318 – 4324.

[30] J. Jiang, K. Bosnick, M. Maillard, and L. Brus, 2003, Single Molecule Raman Spectroscopy at the Junctions of Large Ag Nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry B*, 107, pp. 9964 – 9972

[31] E. J. Ayars, H. D. Hallen, and C. L. Jahncke ,2000, Electric Field Gradient Effects in Raman Spectroscopy, *Physical Review Letters*, 85, pp. 4180 – 4183.

[32] J. K. Sass, H. Neff, M. Moskovits, and S. Holloway, 1981, Electric field gradient effects on the spectroscopy of adsorbed molecules, *Journal of Chemical Physics*, 85, pp. 621 – 623.

[33] D. T. Cao and L. T. Q. Ngan, 2020, Fabrication of uniform arrays of silver nanoparticles on silicon by electrodeposition in ethanol solution and their use in sers detection of difenoconazole pesticide, *RSC Advances*, 10, 40940.

[34] G. L. Adianez, V. R. Garcia Jose and S. C. Santiago, 2013, Silver Nanostars with High SERS Performance, *The Journal of Physical Chemistry*

C, 117, 7791.

[35] J. Yang and Z. Jiang, 2014, Facile fabrication of dendritic silver structures and their surface enhanced Raman spectroscopic properties, *Indian Academy of Sciences*, 127, 173.

[36] T. T. Nhung and S.W. Lee, 2014, Green synthesis of asymmetrically textured silver meso-flowers (AgMFs) as highly sensitive SERS substrates, *ACS applied materials & interfaces*, 6, 21335.

[37] N. M. Cuong, D. T. Cao, V. T. Thu, L. T. Q. Ngan, 2021, Direct detection of melamine in liquid milk and infant formula using surface-enhanced Raman scattering combined with silver nanodendrites, *Optik*, 243, 167504.

[38] N. T. H Nhung, N.T. Dat, C. M. Thi, P. V. Viet, 2020, Fast and simple synthesis of triangular silver nanoparticles under the assistance of light, *Colloids and Surfaces A*, 594, 124659.

[39] M. Fan, G. F. S. Andrade, A. G. Brolo, 2011, A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 693, pp. 7-25.

[40] R. Pilot, 2018, SERS detection of food contaminants by means of portable Raman instruments, *Journal of Raman Spectroscopy*, 49, pp. 954-981.

[41] M. Moskovits, 2005, Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, pp. 485-496.

[42] Y. Zhang, B. Walkenfort, J. H. Yoon et al, 2015, Gold and silver nanoparticle monomers are non-SERS-active: a negative experimental study with silica-encapsulated Raman-reporter-coated metal colloids, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17, pp. 21120-21126.

[43] M. K. Oh, Y. S. Shin, C. L. Lee, et al, 2015, Morphological and SERS properties of silver nanorod array films fabricated by oblique thermal evaporation at various substrate temperatures, *Nanoscale Research Letters*, 10, pp. 1-9.

- [44] S. Hong, X. Li, 2013, Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions, *Journal of Nanomaterials*, 49, 790323-9.
- [45] E. C. L. Ru, E. Blackie, M. Meyer, et al, 2007, Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study, *Journal of Physical Chemistry C*, 111, pp. 13794-13803.
- [46] N. M. Cuong, D. T. Cao, V. T. Thu, L. T. Q. Ngan, 2021, Direct detection of melamine in liquid milk and infant formula using surface-enhanced Raman scattering combined with silver nanodendrites, *Optik*, 243, 167504.
- [47] Z. Guo, L. Chen, L. Haiming, Z. Yu and B. Zhao, 2014, Magnetic imprinted surface enhanced Raman scattering (MI-SERS) based ultrasensitive detection of ciprofloxacin from a mixed sample, *Analytical Methods*, 6, 1627.
- [48] W. Ji, L. Wang, H. Qian and W. Yao, 2014, Quantitative Analysis of Amoxicillin Residues in Foods by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Spectroscopy Letters*, 47, 451.
- [49] D. Sagar, C. Kuanglin, H. Qing, K. Moon, S. Walter, Q. Jianwei and B. Leigh, 2018, A Simple Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Method for on-Site Screening of Tetracycline Residue in Whole Milk, *Sensors*, 18, 424.
- [50] Y. Zhang, W. Yu, L. Pei, K. Lai, B. A. Rasco and Y. Huang, 2015, Rapid analysis of malachite green and leucomalachite green in fish muscles with surface-enhanced resonance Raman scattering, *Food Chemistry*, 169, 80.
- [51] A. W. Layla, K. H. Khulood and M. A. Alwan, 2019, Rapid and Highly Efficient Detection of Ultra-low Concentration of Penicillin G by Gold Nanoparticles/Porous Silicon SERS Active Substrate, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy*, 206, 31.
- [52] J. Chen, M. Liu, H. Yuan, X. Chen, J. Zhao, 2021, Rapid detection of sulfamethazine and ofloxacin residues in duck meat using synchronous fluorescence spectroscopy coupled with chemometric methods, *Poultry Science*, 100, 101378.

- [53] C. Y. Liu, Y. Y. Han, P. H. Shih, W. N. Lian, H. H. Wang, C. H. Lin, P. R. Hsueh, J. K. Wang and Y. L. Wang, 2016, Rapid bacterial antibiotic susceptibility test based on simple surface-enhanced Raman spectroscopic biomarkers, *Scientific Reports*, 6, 1.
- [54] V.T. Thu, M. N. Cuong, D. T. Cao, L. T. Hung, L. T. Q. Ngan, 2022, Trace detection of ciprofloxacin antibiotic using surface-enhanced Raman scattering coupled with silver nanostars, *Optik*, 260, 169043.
- [55] L. T. Q. Ngan, D. T. Cao, C. T. Anh, K. N. Minh, N. N. Hai and L. V. Vu, 2019, Electrochemical synthesis of flower-like gold nanoparticles for SERS application, *Journal of Electronic Materials*, 48, 5328.
- [56] L. T. Q. Ngan, D. T. Cao, C. T. Anh, K. N. Minh, N. N. Hai and L. V. Vu, 2019, High-sensitive SERS detection of thiram with silver nanodendrites substrate, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 10, 025012.
- [57] U. T. D. Thuy, N. T. Hoa and N. Q. Liem, 2016, Large 2D-arrays of size-controllable silver nanoparticles prepared by hybrid deposition, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 035013.
- [58] P. T. Binh, H. T. H. Cam, P. V. Hai, N. V. Chuc, N. T. Van, V. D. Chinh, P. V. Hoi and B. Huy, 2019, Detection of permethrin pesticide using silver nano-dendrites SERS on optical fibre fabricated by laserassisted photochemical method, *Scientific reports*, 9, 12590.
- [59] N. T. T. Mai, N. H. Doanh, P. T. My, P. V. Hai and H. D. Chinh, 2019, Synthesis and Vertical Self-Assembly of Gold Nanorods for Surface Enhanced Raman Scattering, *Journal of Electronic Materials*, 48, 4970.
- [60] U. T. D. Thuy, N. T. Thuy, N. T. Tung, E. Janssens, N. Q. Liem, 2019, Large-area cost-effective lithographyfree infrared metasurface absorbers for molecular detection, *APL Materials*, 7, 071102.

- [61] P. T. T. Ha, N. D. Dien and V. X. Hoa, 2021, Facile synthesis of silver/gold alloy nanoparticles for ultra-sensitive rhodamine B detection, *RSC Advances*, 11, 21475.
- [62] N.T. Binh, N. N. Anh, N. G. Long, 2020, A Simple and Rapid Method to Produce SERS Substrates Using Au Nanoparticles Prepared by Laser Ablation and DVD Template, *Journal of Electronic Materials*, 49, 311.
- [63] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari and M. S. Feld, 1997, Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Physic Review Letters*, 78, 1667.
- [64] U. K. Sur and J. Chowdhury, 2013, Surface-enhanced Raman scattering: overview of a versatile technique used in electrochemistry and nanoscience, *Current Science*, 105, 923.
- [65] T. C. Dao and T. Q. N. Luong, 2020, Fabrication of uniform arrays of silver nanoparticles on silicon by electrodeposition in ethanol solution and their use in sers detection of difenoconazole pesticide, *RSC Advances*, 10, 40940.
- [66] R. Jin, Y. Cao, C. A. Mirkin, K. Kelly, G. C. Schatz and J. Zheng, 2001, Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms, *Science*, 294, pp. 1901–1903.
- [67] J. F. Andrew, C. Nicole, E. M. Kenneth, and K. Vladimir, 2010, Synthesis of Silver Nanoprisms with Variable Size and Investigation of Their Optical Properties: A First-Year Undergraduate Experiment Exploring Plasmonic Nanoparticles, *Journal of Chemical Education*, 87, pp. 1098-1101.
- [68] Jason M. Haber, and Konstantin Sokolov, 2017, Synthesis of Stable Citrate-Capped Silver Nanoprisms, *Langmuir*, 33, pp. 10525-10530.
- [69] B. Xue, D. Wang, J. Zuo, X. Kong, Y. Zhang, X. Liu, L. Tu, Y. Chang, C. Li, F. Wu, Q. Zeng, H. Zhao, H. Zhao, H. Zhang, 2015, Towards high quality triangular silver nanoprisms: improved synthesis, six-tip based hot spots and ultra-high local surface plasmon resonance sensitivity, *Nanoscale*, 7, pp. 8048–8057.

- [70] N. T. H. Nhung , N. T. Dat , C. M. Thi, P. V. Viet, 2020, Fast and simple synthesis of triangular silver nanoparticles under the assistance of light, *Colloids and Surfaces A*, 594, 124659.
- [71] Vu Xuan Hoa, 2021, *TNU Journal of Science and Technology*, 226, pp. 143 – 150.
- [72] AOAC, 2016, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements
- [73] L.T. Hoang, H.V. Pham, M.T.T. Nguyen, 2020, Investigation of the Factors Influencing the Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Silver Nanoparticles, *Journal of Electronic Materials*, 49, pp. 1864-1871
- [74] C. Zhang, R. Hao, B. Zhao, 2017, *Novel synthesis of hierarchical flower-like silver assemblies with assistance of natural organic acids for surface-enhanced Raman spectroscopy*, *J. Mater. Sci*, 52, pp. 11391-11401.
- [75] S. Roy, C. M. Ajmal, S. Baik, 2017, *Silver Nanoflowers for Single-Particle SERS with 10 pM Sensitivity*, *Nanotechnology*, 28, 465705-24.
- [76] V. T. Thu, L. T. Q. Ngan, Đ. T. Cao, N. A. Vu, 2022, Study on fabrication of triangular silver nanoplates for application as surface-enhanced Raman scattering sensors, *Advances in Optics, Photonics, Spectroscopy & Applications XII*, ISBN: 978-604-357-120-2, pp. 339-343.
- [77] J. Wang, C. Qiu, X. Mu, H. Pang, X. Chen, and D. Liu, 2020, Ultrasensitive SERS detection of rhodamine 6G and p-nitrophenol based on electrochemically roughened nano-Au film, *Talanta*, 210, 120631.
- [78] L. He, M. Lin, H. Li, N. J. Kim, 2010, Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with dendritic silver nanosubstrate for detection of restricted antibiotics, *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, pp. 739 - 744
- [79] Y. Pan, D. Fei, P. Liu, X. Guo, L. Peng, Y. Wang, N. Xu and X. Wei, 2021, Surface-Enhanced Raman Scattering–Based Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Chloramphenicol Antibiotics Using Au@Ag Nanoparticles, *Food Analytical Methods*, 14, pp. 2642–2650

[80] Y. Ding, X. Zhang, H. Yin, Q. Meng, Y. Zhao , L. Liu, Z. Wu, Ha. Xu, 2017, Quantitative and Sensitive Detection of Chloramphenicol by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Sensors*, 17, 2962.