

اسپکتروسکوپی رامان افزایش سطح در الکتروفورز ریز تراشه

چکیده

اتصال الکتروفورز مویرگی ریز تراشه با اسپکتروسکوپی رامان افزایش سطح (MCE-SERS) موجب ترکیب قدرت بالای جداسازی الکتروفورز مویرگی با توانایی دستیابی به طیف لرزشی جهت شناسایی اجرا می گردد. طیف سنجی رامان یک روش تشخیص توصیفی است که به طور خاص برای آنالیز شیمیایی مناسب است چون غیر مخرب بوده و قابلیت شناسایی آنالیت ها را دارد. با این وجود نقطه ضعف آن حساسیت کم می باشد و حتی گاهی به زمان های طولانی تری نسبت به پهنای پیک معمول جهت جداسازی های الکتروفورزی نیاز دارد. شدت رامان با نزدیک کردن آنالیت به سطح فلزات نانوساختار و یا کلوئیدها به شدت بهبود می یابد (علت اثر افزایش سطح). این مقاله رویکرد جدیدی در زمینه اتصال MCE-SERS بر خط ارائه می دهد. عنصر اصلی دستگاه میکروفلوئید شیشه ای پیشرفته یک ساختار دوزسنجی است که شامل دوکانال جانبی می شود. این دو کانال پس از جداسازی الکتروفورزی آنالیت ها به کانال MCE متصل می شود. کانال های دوزسنجی نانوذرات نقره (Ag-Nps) را به مناطق متفرقه الکتروفورز تیک ارائه می دهد. این مناطق ضبط از طیف SERS ترکیبات جدا شده را آسان می کند. عملکرد تراشه MCE-SERS با آنالیز یک محلول مدل رودامین در 90 ثانیه با دستیابی به RSD زمان مهاجرت زیر 1.5% ارزیابی گردید. این رویکرد به طور موفقیت آمیزی برای تجزیه و تحلیل ریبوخلوین افزودنی خوراکی در سس باربیکیو به کار برده شد.

1. مقدمه

اسپکتروسکوپی رامان یک ابزار و تحلیل ارزشمند برای تشخیص شیمیایی ترکیبات بر اساس مشاهده تغییرات لرزشی ملکول پس از پراکندگی بر الاستیک فوتون های متقابل می باشد. با این وجود از آن جایکه پراکندگی غیر الاستیک یک پدیده نادر است (به طور تخمینی 1 فوتون از 106 فوتون، سیگنال های رامان را فراهم می کند). اسپکتروسکوپی رامان دارای نقطه ضعف کمبود سیگنال است در اواخر دهه 1970 کشف شد که جذب آنالیت ها به نانو ساختارهای فلزات نجیب منجر به بهبود چشمگیر حساسیت با افزایش فاکتور تا 106-109 می شود. حتی حساسیت در حد یک ملکول نیز گزارش شده است [1,2]. این تکنیک که اسپکتروسکوپی رامان افزایش سطح (SERS) نامیده می شود اهمیت زیادی در شیمی تحلیلی مدرن دارد و همچنین در میکروفلوئیدها به کار می رود [3-10].

اثر SERS به طور گسترده حاصل ایجاد میدان مناطیسی در سطح نانو ساختار فلزی پس از برهم کنش با فوتونهای دارای انرژی می باشد. واژه Hotspot (نقطه اشتراک) به فاصله بین دو (یا چند) نانو ساختار اطلاق می شود که در آن نقطه میدان الکترومناطیسی شدت می یابد و موجب ارتقا فاکتورهای افزایش می گردد. [8] در مورد نانو ساختارهای فلزی که در منطقه تشخیص مستحکم شده اند، نقاط اشتراک با ایجاد ساختارهای دقیق (اغلب به صورت سلسه مراتبی) به دست می آید. [9]. روش های مبتنی بر نانو ذرات در محلول (NPS) پایه تجمع کنترل شده، معمولا افزایش قدرت یونی- به ویژه با افزودن کلریدها (مثل NaCl یا KCl) انجام می گیرد.

علیرغم این که گاه جداسازی ترکیبی در خط به طور فزاینده ای محدوده کاربردی های بالقوه را افزایش می دهد، ترکیب تکنولوژی های جداسازی با تشخیص SERS به ندرت مورد استفاده قرار می گیرد [4,11]. چالش هایی که از استفاده SERS به عنوان ابزار تحلیل در خط علم جداسازی جلوگیری می کند عبارت است از اقدام سوبسترا SERS مناسب و ضرورت به دست آوردن سری اطلاعات به ویژه برای نظارت همزمان در جداسازی سریع مانند HPLC یا الکتروفورز مویرگی (CE) می باشد. محدودیت های زمان ضبط طیف موجب محدود شدن حساسیت قابل دسترسی می گردد.

در یکی از اولین کارها در مورد اتصال CE-SERS، زمان انباشت با استفاده از یک میدان الکتریکی نسبتاً ضعیف (16v/cm) تا 1 ثانیه بسط داده شد [12]. اما این عمل موجب افزایش زمان جداسازی و پیک های وسیع گردید. تشخیص آنالین SERS به راحتی با افزودن محلول کلونیدی نقره به الکترلیت پس زمینه (BGE) امکان پذیر شد. با این وجود شکل پیک را تحت تاثیر قرارداد و رسوب نانوذرات نقره (NPS) در پنجره تشخیص مشکلاتی را برای آنالیزهای بعدی ایجاد کرد. برای ترکیب HPLC با آنالیز SERS، Zaffino و همکاران از یک استراتژی افزودن ستون برای دوزسنجی یک محلول NPS برای خروجی استفاده کردند [13]. یک کوئل پیچیده قبل از پنجره تشخیص SERS قرارداد شده که به عنوان میکسری برای NPS و آنالیت ها عمل می کرد. با وجود اینکه اختلاط برای جهت سیگنال SERS سودمند بود اما در دقت جداسازی اختلال ایجاد نمود.

ایجاد نقاط نقره در داخل کانال جداسازی از NPS [14] و پایش سازهای NPS [15] توسط ته نشین با استفاده از لیزر به عنوان یک روش جایگزین برای CE-SERS مورد آزمایش قرار گرفت و ضعف نانوساختارهای مستحکم شده را نمایان کرد. از آن جاییکه آنالیت ها با نقره ای ایجاد شده واکنش می دادند قله های تیزی مشاهده گردید. توسط گروه شولتز، که یک طراحی بر اساس نقل مکان سوبستری نقره به بعد از جداسازی مویرگی پیشنهاد شد و پیشرفت های چشمگیری را حاصل نمود [16]. مایع اضافی در امتداد خروجی مویرگی پمپاژ شد و آنالیت های جدا شده را در سوبسترا جمع نمود همچنین موجب رطوبت آن گردید. در این زمینه، آنالیز نمونه های بیولوژیکی را با CE-SERS [17,18] کارپیش گام در زمینه LC-SERS مویرگی، گزارش کردند [19].

میکروفلوئیدهای بر پایه ریز تراشه یکپارچگی سیستم را تسهیل می کند و پتانسیل بالایی را برای ترکیب جداسازی فاز مایع و تشخیص رامان یا SERS در یک دستگاه ایجاد می کند. connaster و همکاران مفهومی برای انتقال درون خطی الکتروفورز مویرگی میکرو مکونیدی (MCE) و SERS معرفی کردند [20]. جداسازی در یک پلت فرم میکروفلوئیدی PDMS شامل یک منطقه از خوشه های سه بعدی نقره انجام شد. پس از جداسازی الکتروفورزی، ولتاژ محرک جداسازی متوقف شد و قسمت نقره ای با استفاده از لیزر اسکن شده اگر چه این روش بسیار نوآورانه است و امکان زمان تجمع نامحدود را فراهم می کند اما اسکن زمان زیاد و ابزار دقیق لازم دارد.

یکی از چالش های پیش رو در اهداف SERS جذب غیر قابل برگشت آنالیت ها است که مانع اندازه گیری های SERS در جریان پیوسته می گردد. یک راه حل برای این مشکل می تواند رویکرد تازه منتشر شده برای باز سازی الکتریکی سوبستراهای SERS روی تراشه باشد [21].

تشخیص رامان در HPLC ریزتراشه اخیرا توسط Geissler و همکاران با استفاده از پراکندگی منسجم ضد استوکس رامان گزارش شده است [23] افزودن یک محلول کلوئیدی نقره به عنوان سوبسترای SERS، پس از استون، نیز همان طور که توسط فیلور و همکاران ارائه شده، در تراشه HPLC انجام شده است. آن دستگاہی با یک ستون توسعه دادند و اختلاط پس از استون، افزودن نانوذرات برای تشخیص آنلاین SERS از طریق یک کانال جانبی کنترل می کرد [22]. یک چالش در این زمینه، مقابله با فشارهای مختلف برگشتی ستون جداسازی و کانال های جانبی بود. در جداسازی های الکترواسموزی همانند الکتروفوررز ریز تراشه مسایل مربوط به فشار معکوس نگرانی ندارد.

در اینجا رویکردی برای ترکیب الکتروفوررز ریز تراشه (MCE) و SERS بر روی یک سوبسترا ارائه نموده ایم. طرح پیشنهادی تراشه شیشه ای MCE شامل دو کانال متقارن جانبی برای ورود نانو ذرات نقره پس از جداسازی الکتروفورزی است. نانوذرات به وسیله انتشار محوری با جریان آنالیت ها مخلوط می شود. و در نتیجه ریسک بالقوه گسترش منطقه که در میکسرهای جریان آشفته وجود دارد را محدود می کند. دو کانال جانبی (به جای یک کانال) باعث توزیع سریع و همگون NPها در کانال شده امکان افزودن یک افزودنی ثانویه (مثل عامل تجمع) برا پیشبرد تشخیص SERS را فراهم می کند. ویژگی ها و پتانسیل دستگاہ توسعه یافته با استفاده از یک محلول مدل از سه رودامین مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت سیستم برای شناسایی یک ترکیب در یک مخلوط پیچیده نمونه ذایی به کار برده شد.

جدول 1 پتانسیل های به کار برده شده به ترتیب برای تزریق و جداسازی MCE

	Si	SO	BI	BO	S1	S2
Injection	3.0	0.0	2.0	6.5	floating	Floating
separation	3.3	3.3	5.3	0.0	1.6	1.6

2. مواد و روش ها

2.1. ساخت دستگاه میکروفلوئید

تراشه های میکروفلوئید برای آنالیز MCE-SERS آماده شد. این تراشه ها از دو تیغه شیشه ای سدیم آهک به ضخامت 1mm تشکیل شده است (76*26mm). فوتولیتوگرافی معمولی و به دنبال آن یک روش اچینگ مرطوب و با دمای بالا انجام شد. جهت مشاهده شرح مفصل فرایند ساخت و پارامترهای دستگاه، اطلاعات پشتیبانی را ببینید. ساختار دستگاه ساخته شده را می توان بر اساس عملکرد آن به 4 قسمت تقسیم کرد: (1) منافذ نمونه برداری برای تزریق پاششی (2) کانالی برای جداسازی MCE (3) اتصال متقارن برای ورود افزودنی های SERS (4) منطقه تشخیص طراحی کلی در شکل 1 نشان داده شده است.

2.2. تشخیص MCE با فلئوئور سانس و SERS

جداسازی MCE در 20mm از 3-N- مورفولینور) پروپان سولفونیک اسید (MOPS) بافر (سیگما آلدریچ، USA) به عنوان الکترولیت پس زمینه (BGE) که در PH=6.5 تنظیم شده بود انجام شد. جهت آزمایش با محلول نمونه رودامین، 10٪ ایزوپروپانول (مرک، آلمان) به BGE افزوده شد. جهت جلوگیری از تغییر ایزوپروپانول در اثر تبخیر، این BGE قبل از هر آنالیز تهیه می شد. به منظور بازسازی سطح شیشه، بین هر آنالیز تراشه توسط 1M از HNO₃ (مرک، آلمان) و 0.1 M NaOH (سیگما آلدریچ، USA) شسته شد. در حین آنالیز MCE، دستگاه میکروفلوئیدی به منظور دستیابی به تزریق انحصاری نمونه و نیز جداسازی الکتروفورزی در پتانسیل داده شده در جدول 1 نگه داشته شد. ولتاژ توسط دو منبع تغذیه (FUGelectronik GmbH آلمان) و از طریق 6 الکتروود که توسط پیچ های تفلون به یک صفحه الکتروود پلاستیکی متصل شده بود، فراهم گردید.

برای آزمایش MCE با فلئوئورسانس، تراشه میکروفلوئیدی روی یک میکروسکوپ IX-70 (المپس - ژاپن) مجهز به هدف 40 برابر قرار داده شد. بریا برانگیخته سازی نمونه یک لامپ جیوه (HBO 103 w/s, osrom) به همراه یک فیلتر مکعبی U-MSWB2 (المپس، ژاپن) با ex:420-480nm و em>520nm و آینه کروی: 500nm

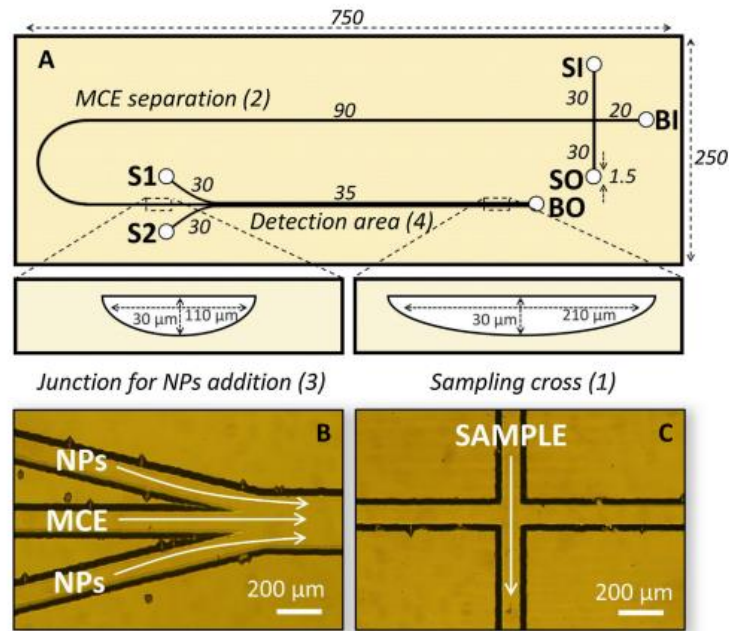
مورد استفاده قرار گرفت. سیگنال های فلئورسانس به وسیله یک لوله چندگانه آلمان H 9307-03,Hama
matsu, جمع آوری شده و به وسیله نرم افزار Charity (جمهوری چک, Data Apex) و با سرعت دریافت
25Hz, ثبت شد.

در آزمایش های MCE,SERS تراشه میکروفلوئیدی روی میکروسکوپ اپی فلئور سانس Ix-71 (ژاپن olympis)
که بخشی از یک سیستم رامان بود، قرار داده شد. ابزار رامان با استفاده از یک لیزر 473نانو متری (50 مگا وات،
کوپولت،سوئد) با وضوح 40 مگاپیکسل در مرکز کانال تراشه قرار گرفت (ژاپن، olympis). طیف رامان به وسیله یک
ریزپردازنده Action sp2750 (تجهیزات پرینسون، USA) با بزرگنمایی 600 خطی ضبط گردید. زمان انباشت در
ms250 تنظیم شد که برای منطقه آنالیت ارائه شده بیش از 7 نقطه داده را به دست می دهد.

2.3. نانو ذرات نقره

(Ag-Nps)

نانو ذرات نقره با توجه به پروتکل Lee-Meisel بر اساس کاهش نیترات نقره (Sigma-Aldrich,USA) با
سدیم سیترات دی هیدراته، سنتز شد. سوسپانسیون های کلئیدی حاصل از جذب ماکسیم 430nm و لذت نقره
0.11 mg/ml بود.



شکل 1 A- تصویر تراشه های ساخته شده جهت آزمایشات MCE-SERS نمونه های ورودی-SI، نمونه های خروجی-SO الکترولیت پس زمینه ورودی-BI الکترولیت پس زمینه خروجی-BO، کانال های جانبی-S1, S2، اعداد نشان دهنده طول بر حسب mm می باشد. پنجره تعبیه شده نشان دهنده پروفایل کانال است. تصاویر

میکروسکوپی ساختار دوزسنجی و نمونه گیری به ترتیب B, C.

تکرار پذیری سنتز نانو ذرات با استفاده اندازه گیری حاصل از سه آزمایش نانو پیوسته کلوئیدی، با استفاده از طیف سنج UV-vis ارزیابی شد. از آنجاییکه توزیع شکل و سایز نانو ذرات بر افزایش سیگنال SERS تاثیر می گذارد. این مسئله حائز اهمیت است. با ماکسیم جذب 430nm (شکل S2A) مقادیر قابل مقایسه ای به دست آمد. یک از نمونه های ناپیوسته توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن گردید (SEM) (شکل S2B).

در برخی آزمایشات جمع آوری NPS با افزودن سدیم کلرید (آلمان, Carl Roth) آغاز شد. برای افزایش غلظت نانو ذرات، 1 میلی لیتر کلوئید خام به مدت 10 دقیقه در 13000rpm سانتریفیوژ گردید (Galax 14D, USA). حجم مایع رویی با توجه به فاکتور غلظت مطلوب محاسبه شد. نانو ذرات تغلیظ شده برای رسیدن به غلظت نهایی بافر 200M محلول رودامین، برای رسیدن به غلظت (7.7) 10٪ ایزوپروپانول به کلوئید افزوده شد.

2.4. مواد

محلول های استوک رودامین 6G (Rh 6G) رودامین 123 و رودامین 110 (Rh 110) در غلظت 0.1nm از طریق حل کردن در MOPS 20mm با 10% حجمی ایزوپروپانول آماده گردید. هر سه رودامین از Sigma_Aldrich در USA خریداری شد. محلول آنالیت رودامین با رقیق سازی محلول استوک در BGE تا غلظت 10M برای Rh123 و Rh110 و 30M برای Rh 6G به دست آمد. به منظور آماده سازی یک محلول استوک ریبوفلاوین (Sigma Aldrich,USA) ، این محلول برای به دست آوردن ریبوفلاوین با غلظت 1mM در 10 mM NaOH حل شد. این محلول استوک هر هفته تهیه می شد. محلول های کاری با رقیق کردن در BGE تا غلظت 50M به دست آمد. همه محلول های استوک در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد.

یک نمونه ارنس بابیکو(سس ساندویچ آمریکایی ، H.j Heinz Gmb آلمان) با پراکندگی 1g سس در 1mL از 5mM Naoh به وسیله اولتراسونیک، تهیه شد. محلول به دست آمده در یک ویال پلاستیکی تجدید پذیر در 13000rpm به مدت 7 دقیقه سانتریفیوژ گردید و یک سیستم سه لایه به دست آمد (شکل S3). محلول سبک زرد رنگ از لایه میانی به وسیله پیپت حذف شد. قبل از آنالیز، محلول به وسیله فیلترهای قابل تجزیه با سایز حفره 0.22m فیلترشده (Restek, GmbH آلمان) و به وسیله آب دیونیزه سه برابر رقیق گردید. اطلاعات جزئی در مورد مواد تشکیل دهنده سس. در اطلاعات تکمیلی ارائه شده است.

3. بحپ و نتیجه گیری

هدف از این کار توسعه رویکرد میکروفلوئیدی برای ترکیب جداسازی الکتروفورزی و اسپکتروسکوپی رامان افزایش سطح در یک دستگاه می باشد. این عمل باید قدرت تفکیک بالای تراشه الکتروفورزی و قابلیت های SERS را به عنوان یک روش اسپکتروسکوپی ارتعاشی برای شناسایی، ترکیب کند. بدین منظور تراشه های شیشه ای را با اتصالات متقارنی در انتهای کانال جداسازی برای افزودن محلول های کلونیدی نقره، طراحی کرده و ساختیم- ساختار دوزسنجی مذکور(شکل 1) در این طرح کانال های جداسازی از Np ها خالی شده و در نتیجه از اثرات

مخرب جداسازی الکتروفورزی مانند ترسیب NP و واکنش های نامطلوب آنالیت ها و NP جلوگیری می شود. عناصر میکروفلوئیدی از دو کانال جانبی تشکیل شده که به طور متقارن از دو طرف به کنال MCE متصل می شود. دو کانال جانبی برای دستیابی به توزیع سریع و همگون NPها در طول کانال و جهت ایجاد امکان افزودن واکنش گرهای ثانویه طراحی شد. پس از اتصال (در ناحیه تشخیص) کانال به آهستگی عریض شد تا از سرعت یافتن MCE به علت افزودن مجلول های جانبی جلوگیری شود.

3.1. موقعیت یابی پنجره تشخیص

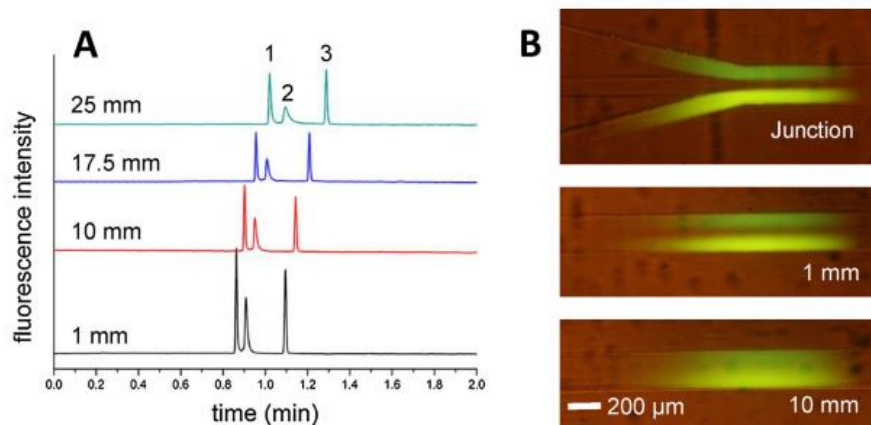
یک پیش شرط برای دستیابی به سیگنال های چشمگیر SERS ترکیبات جدا شده عبارت است از تماس ترکیب NPها و آنالیت های مربوطه است. به کار بردن ساختارهای میکسر روشی برای نزدیک کردن NPها و آنالیت ها پس از جداسازی است [5,25]. متاسفانه میکسرهای بر پایه جریان متلاطم منجر به کاهش بازدهی جداسازی می شود [13]. میکسرهای بر پایه پراکندگی جایگزین بهتری می باشد [22,26]. کاربرد آن ها بر اساس دو جریان پیشرو و راندن آنها به وسیله حرکت براونی می باشد. از آن جایکه انتشار یک پدیده وابسته به زمان است، مکان یابی دقیق پنجره انتشار حائز اهمیت است. در سیستم پیشنهادی MCE-SERS اختلاط سه جریان الزامی است. جریان میانی محلول کانال الکتروفورز است که توسط دو جریان جانبی همراه محلول های کلوئیدی نقره اضافه شده است. اگر چه اضافه کردن NPها برای بهبود اثر سطحی حیاتی است، جریان های جانبی می تواند به تغییرات در شکل و یا شدت پیک گردد. برای بررسی تاثیر جریان جانبی، چهار پنجره تشخیص در فاصله 1، 10، 17.5 و 25 میلی متر پس از اتصال انتخاب گردید. در یک سری از آزمایشات MCE اثر با استفاده از تصویر برداری میکروسکوپ فلوئورسانس و تشخیص فلوئور سانس مورد مطالعه قرار گرفت. جهت تمرکز کامل بر اثر جریان های جانبی و حذف فاکتور برهم کنش NP-آنالیت، هر دو کانال جانبی در این آزمایش توسط BGE پر شد.

با توجه به پتانسیل تشخیص فلوئور سانس و SERS یک محلول آزمایشی از 3 رودامین (Rh 110, Rh6G, Rh123) برای سنجش مشخصات دستگاه میکروفلوئیدی انتخاب گردید. در PH انتخابی، Rh 6G

Rh123 (PH=6.5) دارای بار مثبت اما Rh110 از نظر بار خنثی بود و در نتیجه به عنوان نشانگری برای جریان الکتوراسمزی شناخته شد.

داده های حاصل از جداسازی MCE نشانگر افت چشمگیری در شدت از 1mm به 10mm بود (افت مشاهده شده حدود 35٪ ارتفاع پیک بود). در حالیکه بیشتر نقاط، شدت بدون تغییر باقی می ماند (شکل 2A) این بدان معنی است که آنالیت ها به طور کامل به دو طرف در 10 میلی متداول نفوذ کرده اند. این نتیجه گیری توسط مشاهدات میکروسکوپی تایید شد. دو رنگ آلی برای رنگ آمیزی فلوئورسنت BGE پر شد. با پیاده سازی شرایط ولتاژ آزمایشات قبلی محلول های MCE ویال های S1,S2 به سمت محل اتصال رانده شده و با جریان الکتورلیت حاصل از الکتروفورز ادغام گردید. تصاویر میکروسکوپ فلوئورسانس در محل اتصال کانال در فاصله 1 و 10 میلی متر پس از اتصال به طور واضح نشان دهنده تفاوت توزیع غلظت (شکل 2B) است. در حالیکه مستقیماً در محل اتصال و در فاصله 1 میلی متر هر سه جریان هنوز آشکار شده بود، در فاصله 10 میلی متر، ترکیب فلوئورسنت به طور مساوی در مرکز کانال پخش شده بود.

با تغییر مکان پنجره تشخیص علاوه بر کاهش شدت تاثیر منفی در عرض پیک نیز مشاهده شد. این نتیجه بیشتر مورد Rh 6G مشهود است. که تغییر پنجره تشخیص از 1mm تا 25mm موجب کاهش تعداد صفحات نظری از 28.000 تا 10.000 می شود. برای اولین پیک مهاجرت (یعنی Rh123) بازدهی جداسازی از 60.000 به 50.000 کاهش یافت. عریض شدن پیک می تواند به انتشار محوری و افزودن احتمالی با مشارکت برهمکنش دیواره آنالیت نسبت داده شود.



شکل 2. A-جداسازی MCE (1) رودامین 123 (2) رودامین 6G و (3) رودامین 110 با تشخیص فلوئورسانس در محل نقطه مختلف (17.5، 10، 25 میلی متر) پس از اتصال، افزودن BGE با اتصال دوز سنج. تصویر میکروسکوپی جریان درون تراشه میکروفلوئیدی با استفاده از محلول های رنگی فلوئورسانس

3.2. آزمایشات MCE-SERS

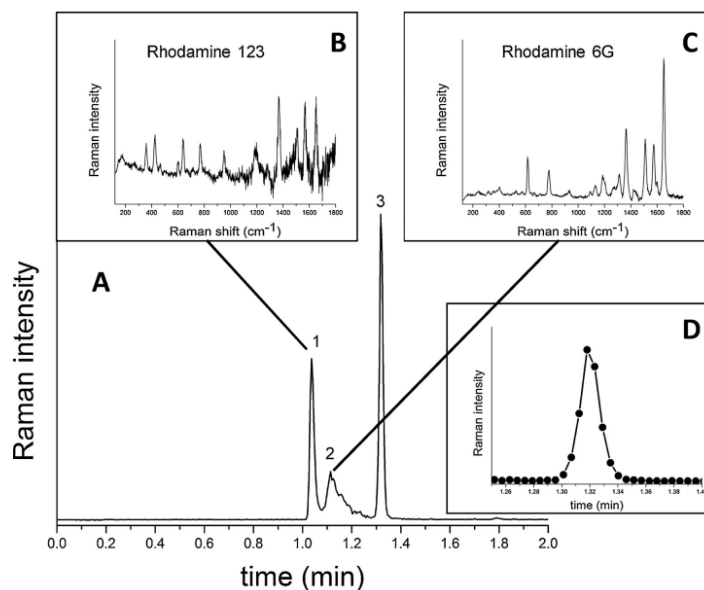
در مطالعات قبلی از فلوئورسانس روشن ترکیبات برای تصویر برداری و تشخیص مناسب و حساس مورد استفاده قرار دادیم. محتوای اطلاعاتی اندازه گیری های SERS بسیار حساس مورد استفاده قرار دادیم. محتوای اطلاعاتی اندازه گیری های SERS بسیار بالاتر است طیف لرزشی است که برای شناسایی ترکیبات استفاده می شود. یکی دیگر از مزایای تشخیص رامان در مقایسه با فلوئورسانس این است که در اصل یک روش بدون برچسب است.

با توجه به نتایج فصل 3.1 نزدیک بودن موقعیت پنجره به محل اتصال با توجه به حساسیت تشخیص و شکل پیک نوارهای جدا شده می تواند مفید باشد. با این حال همان طور که تصاویر میکروسکوپی مشخص است (در شکل 2B) موقعیت 1 میلی متری پس از اتصال مناسب نیست چون اجازه نفوذ NP ها را به جریان MCE نمیدهد. در نتیجه نقطه شناسایی برای آزمایشات MCE-SERS در 10 میلی متری نقطه اتصال قرار داده شد.

قبل از آزمایش MCE_SERS تعامل رودامین با محلول های کلئیدی نقره (110,123,Rh6G) توسط مشاهدات میکروسکوپی مورد آزمایش قرار گرفت شکل 4 هر سه رودامین به طور جداگانه به کلئید غلیظ افزوده شد.

مشخص شد که در این شرایط، آنالیت های دارای بار مثبت (Rh 123 , Rh 6G) با جذب نانو ذرات Ag موجب تجمع NP ها گردیدند. در نقطه مقابل حضور Rh110 خنثی تاثیری در ظهور کلی کلوئیدی نداشت. این امر را می توان به علت خنثی بودن بار آن و کاهش شدید تمایل به جذب بار منفی و در نتیجه کاهش تجمع داشت. محلول رودامین به عنوان نمونه مدل برای تشخیص مشخصات دستگاه میکروفلوئیدی MCE_SERS استفاده شد. هر دو کانال جانبی با نانو ذرات Ag با 0.1mg/mL از نقره پر شد. به طور شگفت با وجود اینکه فاصله 10 میلی متری برای جریان های آنالیت و نانو ذره کافی است اما نتایج کاملاً نا امید کننده بود. از سه رودامین مورد استفاده تنها Rh 6G طیف رامان بسیار ضعیفی ارائه داد در حالیکه Rh110 و Rh123 فقط فلئورسانس نشان داد. برای نتایج به شکل S5 مراجعه کنید.

در SERS بالاترین افزایش سیگنال را می توان در نقاطی که نقطه اشتراک (Hotspot) نامیده می شود و بین دو یا سه NP قرار می گیرد به دست آورد [8]. به منظور تجمع نانوذرات افزودن کلرید به عنوان راهی بالقوه برای بهبود سیگنال SERS مورد آزمایش قرار گرفت. در حالیکه کانال دوم برای نگه داری 100mm از NaCl به کار رفت. داده های به دست آمده در شکل 3A نشان داده شده است.



شکل 3. A- جداسازی MCE (1) رودامین 123 (2) رودامین 6G و (3) رودامین 110 با مشخص SERS (نوار تشخیصی 1650cm^{-1}). نقطه تشخیص در 10 میلی متری اتصال قرار داده شده. نانوذرات Ag و محلول NaCl

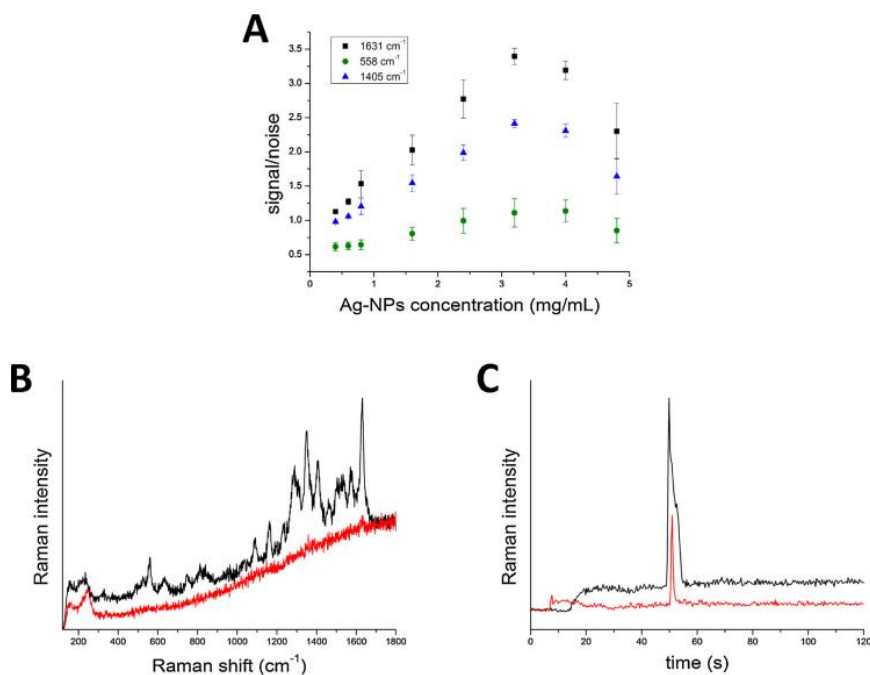
توسط تزریق وارد گردید. B- طیف اصلاح شده SERS رودامین 123 بر گرفته از پیک ماکسیم C- طیف اصلاح شده SERS رودامین 6G بر گرفته از پیک ماکسیم D- در پنجره نصب شده فرکانس نمونه گیری جمع آوری نشان داده شد.

افزودن کلرید به محلول: به طور چشمگیری شدت سیگنال رامان را افزایش داد با وجود اینکه هر سه رودامین حاوی پس زمینه ی فلئورسانس نسبتاً قوی بودند(شکل ۵ را ببینید) هر دو آنالیت با بار مثبت(RH123, RHSG) دارای باندهای رامان واضح بودند(شکل C و B3). از این مشاهدات نتیجه گرفتیم که امیدوارکننده ترین نتایج ممکن است با اضافه شدن همزمان NPها و کلرید ها از طریق دو کانال جانبی و با قراردادن پنجره تشخیص در ۱۰ میلی متری بعد از اتصال باشد. پس دستگاه برای تکرارپذیری در یک سری آنالیزهای مکرر MCE-SERS مورد ارزیابی قرار گرفت. RSD زمان تایم به محدوده 0.9-1.3 (N=7) رسید و نتایج به دست آمده بسیار امیدوارکننده بود. شدت باندهای RSD رامان 15-20٪ (n=7) بود. این RSD نسبتاً بالا در سیگنال های رامان را می توان به این امر مربوط دانست که شکل گیری NP های ناشی از کلرید به طور خاص منجر به افزایش مقاومت می شود.

زمان دریافت اطلاعات سیگنال رامان بر حساسیت ارزیابی های MCE-SERS تاثیر میگذارد. برای توصیف یک پیک کروماتوگرافیکی با الکتروفورزی حداقل ۷ نقطه داده مورد نیاز است. برای رسیدن به این امر زمان تشخیص رامان انباشت برابر M250 منعکس کننده ی فرکانس Hz4 انتخاب شد که تضمین کننده حداقل ۷ نقطه داده در منطقه تحلیل است. فرکانس نمونه برداری داده ها در پنجره داده شده در شکل D3 نشان داده شده است. در تشخیص فلئورسانس با استفاده از Hz25 داده های بیشتری را می توان به دست آورد.

لازم به ذکر است که همچنین در تجزیه و تحلیل رودامین ها غلظت های بالاتری از کلئید(بیش از 0.1 میلی گرم بر میلی لیتر نقره) مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۶) علیرغم اینکه غلظت های بالاتر نقره حساسیت را بالاتر میبرد موجب گسترش شدید پیک Rh6G نیز میگردد که به شدت بر دقت جداسازی تاثیر میگذارد. این گسترش می تواند به جذب Rh6G به سطح و به ویژه به Ag-Np مربوط باشد [8و27] که می تواند در دیواره های کانال رسوب کند و انباشته شود. درحالی که Rh123 و Rh110 به طور برگشت پذیر به نانو ذرات جذب شده بودند و یا در امتداد

NP ها بودند، Rh6G برهمکنش های قوی تری با NP داشته و موجب گسترش پیک شده است. بنابراین غلظت NP از 0.1 mg/ml ها به عنوان مناسبترین غلظت برای آنالیز MCE-SERS در مدل انتخابی تعیین شده است.



شکل 4. A. تاثیر غلظت کلئوئید نقره بر ریبو فلاوین (Mm50) که به عنوان مقدار S/N برای سه باند رامان تعیین

شده است. نوارهای خط نشان دهنده انحراف معیار (B,C). تعیین تاثیر کلریدها بر سیگنال SERS

ریبوفلاوین. آنالیز MCE با تشخیص SERS محلول استاندارد ریبوفلاوین (Mm50) با افزودن NaCl (مشکی) در

کانال های جانبی 3- طیف SERS که پیک ماکسیمم گرفته شده است. C- الکتروفروگرام MCE با تشخیص

SERS محلول استاندارد ریبوفلاوین (باند تشخیص // 1163 cm⁻¹).

3.3. آنالیز MCE-SERS ریبوفلاوین

پس از اینکه توانستیم عملکرد این رویکرد را به وسیله یک مدل نسبتا ساده اثبات کنیم ، دستگاه را برای آنالیز یک

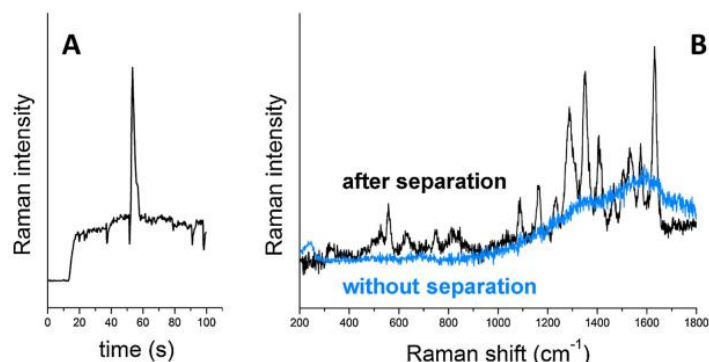
ترکیب در یک محلول پیچیده مورد بررسی قرار دادیم که معمولا قبل از تجزیه و تحلیل SERS مورد نیاز است .

ریبوفلاوین (ویتامین B) یک ترکیب محلول در آب متعلق به یک بخش ضروری از رژیم غذایی انسان با مصرف

روزانه توصیه شده 1 تا 4/1 میلی گرم است [۲۸] اگر چه به طور طبیعی در بسیاری از منابع (مثل شیر ، تخم مرغ،

آجیل ، ماهی،گوشت گاو و...) وجود دارد، بخش متداولی از بسیاری از مکمل های غذایی است . در صنایع غذایی همچنین به عنوان یک رنگ خوراکی زرد- سبز به کار می رود. در نتیجه تعیین ریبوفلاوین جنبه مهمی از کنترل کیفی غذا و داروست . روش های متعددی برای آنالیز آن در گذشته وجود داشته است- فلئورسانس [12,29] ، روش های الکتروآنالیزی [30] ، [19] UV-VIS و اسپکروسکوپی جرمی از متداولترین روش ها بوده است. متأسفانه این تکنیکها تنها سیگنال های غیر انتخابی را ارائه می دهند و یا به ابزار آلات گران قیمتی نیاز دارند. در مقابل SERS با توجه به اطلاعات اثر انگشتی اش امکان شناسایی دقیق آنالیت را بدون نیاز به ابزار دقیق پیچیده فراهم می کند. علاوه بر این باندهای باریک می توانند به طور خاص تجزیه و تحلیل ویژگی های بیشتر را در همان زمان [6,31] و / یا امکان شناسایی آنالیت از یک ماتریس یا تداخل کنند[32]. علیرغم این واقعیت، نمونه هایی از یک ماتریس پیچیده تر یا تداخل کننده، قبل از بررسی SERS نیاز به جدا سازی دارد. این موضوع در مثال زیر در تجزیه ریبوفلاوین در سس باریکیو نشان داده شده است. هدف این قسمت از کار کمی سازی ریبوفلاوین نیست بلکه بر اهمیت گام جداسازی قبل از تشخیص SERS تاکید می کند.

در حالیکه در مورد آنالیز محلول رودامین کلوئیدها حاوی بیش از 0.1mg/ml نقره منجر به از دست دادن وضوح جداسازی می شود، برای ریبوفلاوین افزایش قابل توجهی از پاسخ SERS را بدون گسترش قابل توجه پیک به همراه دارد (شکل S7) در نتیجه غلظت های کلوئید نقره در محدوده $0.4\text{-}4.8\text{ mg/mL}$ به طور سیستماتیک برای آنالیز ریبو MCE-SERS ریبوفلاوین ارزیابی شد. نتایج یک سیگنال خطی افزایش تا غلظت 3.2 mg/L و متعاقب آن یک افت سیگنال در غلظت های بالاتر را نشان داد (شکل 4A). ما این کاهش شدت را به حذف سیترات پایدار کننده از کلوئید (با توجه به گام غلظت)نسبت دادیم که موجب تجمع زیاد NP ها می شود. بر اساس این مشاهدات برای آزمایش های بیشتر با ریبوفلاوین، یک مخلوط کلوئیدی با 3.2mg/ml نقره استفاده شد. در یک سری آزمایشات RSD زمان مهاجرت کمتر از 0.5% ($n=5$) تعیین شد. و حد تشخیص (LOD) در سطح 1M بود.



شکل 5 A- جداسازی MCE با تشخیص SERS ریبوفلاوین در سس BBQ متناظر با داده های ناحیه ماکسیمم ریبوفلاوین (روند مشکی رنگ)

محلول استاندارد ریبوفلاوین با MCE-SERS با استفاده از تراشه پیشرفته میکروفلوئیدی با طراحی دو کانال جانبی برای نگه داری NP ها و کلریدها به صورتی که در فصل قبلی بهیته سازی شد، آنالیز گردید. با کمال تعجب، افزودن کلرید به طور چشمگیری سیگنالهای SERS ریبوفلاوین را کاهش داد این پدیده غیر منتظره در شکل B4 و C نشان داده شده که یک ناحیه ریبوفلاوین با MCE-SERS بدون (خط مشکی) افزودن کلریدها و با افزودن کلریدها (خط قرمز) از طریق یک کانال جانبی ارزیابی شده است. با وجود اینکه افزودن Ag-Np به تنهایی طیف های SERS واضحی را به وجود می آورد. (شکل B4). افزودن کلرید به طور کامل نوارهای رامان را کاهش داده و الکترو پروگراف ضبط شده (شکل C4) موجب افزایش چشمگیر فلورسانس گردید تاثیر یدیدها، کلریدها و برومیدها بر طیف SERS ریبوفلاوین به طور مفصل توسط لیو و همکاران مطالعه شده است. آنان برای هر سه هالید افت شدید شدت و تغییرات کمی در انتقال رامان مشاهده نمودند [۳۳]. این رفتار به جذب رقابتی بین هالیدها و NP ها نسبت داده می شود. با توجه به این موضوع هر دو کانال جانبی برای تامین نانوذرات نقره استفاده شد و کلریدها از آزمایشهای ریبوفلاوین حذف شدند

پس از این روش ریبوفلاوین از یک نمونه سس باریکیو آنالیز شد. در سس ریبوفلاوین به عنوان رنگ زرد-سبز به کار برده می شود قابل ذکر است که علاوه بر سایر مواد (اطلاعات تکمیلی را ببینید). سدیم کلرید نیز در سس وجود دارد.

یک آنالیز مستقیم SERS از سس باربیکو بدون پیش جداسازی نشان داد که ماتریس به شدت در آنالیز طیف سنجی اختلال ایجاد میکند (شکل B5 روند آبی رنگ). آنالیز مربوط در تراشه MCE-SERS ما نشان دهنده پتانسیل بالای این نوع جداسازی ترکیبی و دستگاه SERS است. در حین جداسازی الکتروفورز آنالیت به طور موثر از ماتریس متداخل جدا شد. این امر منجر به یک طیف مشخص از طیف الکتروفورزی (شکل A5) به صورتی که در شکل B5 با خطوط مشکی نشان داده شده می گردد .

این مثال بسیار ساده نشان دهنده مفید بودن مرحله جداسازی MCE قبل از تحلیل SERS برای نمونه هایی با ماتریس متداخل است. این رویکرد همچنین بایستی برای سایر ماتریس های مختلط حاوی هالید مثل نمونه های ادراری نیز مفید خواهد بود [34].

4. نتایج

دستگاه شیشه ای معرفی شده یک کانال الکتروفورزی و یک کانال تشخیص SERS را برای دستیابی به طیف رامان یکپارچه سازی می کند. طراحی دستگاه بر اساس دو کانال جانبی است که محلول نانو ذره و یک عامل تجمعی را برای جریان خروجی الکتروفورز تامین می کند. از آن جا که اختلاط هر سه جریان تنها از طریق نفوذ امکان پذیر می گردد، در ای روش در مقایسه با میکسره های متلاطم گسترش پیک و نقص وضوح جداسازی کاهش می یابد. یکپارچه سازی کل کانال های مایع در یک تراشه در مقایسه با روش های سنتی که از اتصالات استفاده می شده، تحقق فنی را ساده تر نموده است.

ویژگی های تراشه SERS الکتروفورزی یکپارچه از طریق آنالیز سه محلول رودامین مشخص گردید. موقعیت صحیح پنجره تشخیص و نیز غلظت بهینه کلئید برای عملکرد مناسب دستگاه ضروری است. پتانسیل چنین دستگاهی بریا آنالیز SERS ترکیبات درون محلول پیچیده با آنالیز ریوفلاوین در سس باربیکو مشخص شد.

علیرغم اینکه دستگاه RSD های مناسبی از زمان های مهاجرت (کمتر از 1.5٪) به دست می دهد اما همچنان پتانسیل هایی برای بهبود حساسیت وجود دارد. برای افزایش حساسیت، در کارهای آینده تمایل داریم بر اجرای یک

مرحله غلظت (مثل انبساط میدان مغناطیسی یا اصطکاک گذرا) و یا طراحی دستگاه با سنتز روی تراشه ای NP ها
تمرکز کنیم [3,5].

References

- [1] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, Surface Raman spectroelectrochemistry: part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 84 (1977) 1–20, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
- [2] J.A. Dieringer, R.B. Lettan, K.A. Scheidt, R.P. Van Duyne, A frequency domain existence proof of single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 16249–16256, <http://dx.doi.org/10.1021/ja077243c>.
- [3] I.J. Jahn, O. Zukovskaja, X.-S. Zheng, K. Weber, T.W. Bocklitz, D. Cialla-May, J. Popp, Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications, *Analyst* 142 (2017) 1022–1047, <http://dx.doi.org/10.1039/C7AN00118E>.
- [4] A. Tycova, J. Prikryl, F. Foret, Recent strategies toward microfluidic-based surface-enhanced Raman spectroscopy, *Electrophoresis* 38 (2017) 1977–1987, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201700046>.
- [5] L. Chen, J. Choo, Recent advances in surface-enhanced Raman scattering detection technology for microfluidic chips, *Electrophoresis* 29 (2008) 1815–1828, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200700554>.
- [6] T.-A. Meier, R.J. Beulig, E. Klinge, M. Fuss, S. Ohla, D. Belder, On-chip monitoring of chemical syntheses in microdroplets via surface-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Commun.* 51 (2015) 8588–8591, <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC09595B>.
- [7] N. Choi, J. Lee, J. Ko, J.H. Jeon, G. Rhie, A.J. deMello, J. Choo, Integrated SERS-based microdroplet platform for the automated immunoassay of F1 antigens in yersinia pestis, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8413–8420, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01822>.
- [8] P. Hildebrandt, M. Stockburger, Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 5935–5944, <http://dx.doi.org/10.1021/j150668a038>.
- [9] H. Hwang, S.-H. Kim, S.-M. Yang, Microfluidic fabrication of SERS-active microspheres for molecular detection, *Lab Chip* 11 (2011) 87–92, <http://dx.doi.org/10.1039/C0LC00125B>.
- [10] A. Walter, A. März, W. Schumacher, P. Rösch, J. Popp, Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device, *Lab Chip* 11 (2011) 1013–1021, <http://dx.doi.org/10.1039/C0LC00536C>.
- [11] R.J. Dijkstra, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.T. Brinkman, Raman spectroscopy as a detection method for liquid-separation techniques, *TrAC—Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 304–323, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.022>.
- [12] W.F. Nirode, G.L. Devault, M.J. Sepaniak, R.O. Cole, On-column surface-enhanced Raman spectroscopy detection in capillary electrophoresis using running buffers containing silver colloidal solutions, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1866–1871, <http://dx.doi.org/10.1021/ac991248d>.
- [13] C. Zaffino, G.D. Bedini, G. Mazzola, V. Guglielmi, S. Bruni, Online coupling of high-performance liquid chromatography with surface-enhanced Raman spectroscopy for the identification of historical dyes, *J. Raman Spectrosc.* 47 (2016) 607–615, <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.4867>.
- [14] J. Prikryl, K. Klepárník, F. Foret, Photodeposited silver nanoparticles for on-column surface-enhanced Raman spectrometry detection in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1126 (2012) 43–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.045>.
- [15] N. Leopold, B. Lendl, On-column silver substrate synthesis and surface-enhanced Raman detection in capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2341–2348, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3468-3>.

- [16] P. Negri, K.T. Jacobs, O.O. Dada, Z.D. Schultz, Ultrasensitive surface-enhanced raman scattering flow detector using hydrodynamic focusing, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10159–10166, <http://dx.doi.org/10.1021/ac401537k>.
- [17] P. Negri, Z.D. Schultz, Online SERS detection of the 20 proteinogenic L-amino acids separated by capillary zone electrophoresis, *Analyst* 139 (2014) 5989–5998, <http://dx.doi.org/10.1039/c4an01177e>.
- [18] C.M. Riordan, K.T. Jacobs, P. Negri, Z.D. Schultz, FDVIBSPC16: sheath flow SERS for chemical profiling in urine, *Faraday Discuss.* 187 (2016) 473–484, <http://dx.doi.org/10.1039/c5fd00155b>.
- [19] A. Nguyen, Z.D. Schultz, Quantitative online sheath-flow surface enhanced Raman spectroscopy detection for liquid chromatography, *Analyst* 141 (2016) 3630–3635, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN00155F>.
- [20] R.M. Connatser, M. Cochran, R.J. Harrison, M.J. Sepaniak, Analytical optimization of nanocomposite surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering detection in microfluidic separation devices, *Electrophoresis* 29 (2008) 1441–1450, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200700585>.
- [21] T.-A. Meier, E. Poehler, F. Kemper, O. Pabst, H.-G. Jahnke, E. Beckert, A. Robitzki, D. Belder, Fast electrically assisted regeneration of on-chip SERS substrates, *Lab Chip* 15 (2015) 2923–2927, <http://dx.doi.org/10.1039/C5LC00397K>.
- [22] L.C. Taylor, T.B. Kirchner, N.V. Lavrik, M.J. Sepaniak, Surface enhanced Raman spectroscopy for microfluidic pillar arrayed separation chips, *Analyst* 137 (2012) 1005, <http://dx.doi.org/10.1039/c2an16239c>.
- [23] D. Geissler, J.J. Heiland, C. Lotter, D. Belder, Microchip HPLC separations monitored simultaneously by coherent anti-Stokes Raman scattering and fluorescence detection, *Microchim. Acta* 184 (2017) 315–321, <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-016-2012-3>.
- [24] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391–3395, <http://dx.doi.org/10.1021/j100214a025>.
- [25] J. Novotny, F. Foret, Fluid manipulation on the micro-scale: basics of fluid behavior in microfluidics, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 383–394, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201600905>.
- [26] C. Andreou, M.R. Hoonejani, M.R. Barmi, M. Moskovits, C.D. Meinhardt, Rapid detection of drugs of abuse in saliva using surface enhanced raman spectroscopy and microfluidics, *ACS Nano* 7 (2013) 7157–7164, <http://dx.doi.org/10.1021/nn402563f>.
- [27] P. Li, X. Zhou, H. Liu, L. Yang, J. Liu, Surface-enhanced Raman evidence for Rhodamine 6 G and its derivative with different adsorption geometry to colloidal silver nanoparticle, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 999–1003, <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.4319>.
- [28] K. Hälvin, T. Paalme, I. Nisamedtinov, Comparison of different extraction methods for simultaneous determination of B complex vitamins in nutritional yeast using LC/MS-TOF and stable isotope dilution assay, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1213–1222, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6538-x>.
- [29] J. Hühner, Á. Ingles-Prieto, C. Neusüß, M. Lämmerhofer, H. Janovjak, Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in mammalian model cells by CE with LED-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 36 (2015) 518–525, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400451>.
- [30] Y.-Y. Yu, J.-X. Wang, R.-W. Si, Y. Yang, C.-L. Zhang, Y.-C. Yong, Sensitive amperometric detection of riboflavin with a whole-cell electrochemical sensor, *Anal. Chim. Acta* 985 (2017) 148–154, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.053>.
- [31] C. Domes, R. Domes, J. Popp, M.W. Pletz, T. Frosch, Ultrasensitive detection of antiseptic antibiotics in aqueous media and human urine using deep UV resonance raman spectroscopy, *Anal. Chem.* 89 (2017) 9997–10003, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02422>.
- [32] A.I. Radu, M. Kuellmer, B. Giese, U. Huebner, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) in food analytics: detection of vitamins B2 and B12 in cereals, *Talanta* 160 (2016) 289–297, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.027>.
- [33] F. Liu, H. Gu, Y. Lin, Y. Qi, X. Dong, J. Gao, T. Cai, Surface-enhanced Raman scattering study of riboflavin on borohydride-reduced silver colloids: dependence of concentration, halide anions and pH values,

Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 85 (2012) 111–119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2011.09.043>.

[34] L. Hu, X. Yang, C. Wang, H. Yuan, D. Xiao, Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection, J. Chromatogr. B 856 (2007) 245–251, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.011>.

[35] R. Wilson, S.A. Bowden, J. Parnell, J.M. Cooper, Signal enhancement of surface enhanced raman scattering and surface enhanced resonance Raman scattering using in situ colloidal synthesis in microfluidics, Anal. Chem. 82 (2010) 2119–2123, <http://dx.doi.org/10.1021/ac100060g>.