بیست و یکمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و هفتمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۲۳ تا ۲۵ دی ماه ۱۳۹۳، دانشگاه شهید بهشتی

امکان‌سنجی تشخیص آفلاتوکسین پسته (B1) با استفاده از طیف‌سنجی رامان تقویت شده سطحی (SERS) روی ۲ زیرلایه متشکل از نانوذرات نقره

رضا محمدی گل[۱]، رسول ملک فر[۲]

۱- دانشگاه اراک- دانشکده کشاورزی- گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم
r-mohammadigol@araku.ac.ir
۲- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده علوم- گروه فیزیک اتمی و مولکولی، بخش فیزیک
malekfar@modares.ac.ir

چکیده - در این پژوهش بمنظور آشکارسازی طیف آفلاتوکسین *B1* ، طیف‌سنجی رامان ارتقاء یافته سطحی (*SERS*) روی زیرلایه های: نانوسیم‌های نقره و کلوئید نانوذرات نقره روی شیشه انجام شده است. با بررسی طیف‌های رامان حاصل از نمونه *ppb* ۵ آفلاتوکسین *B1* امکان جداسازی نمونه‌های حاوی این غلظت میسر نشد. در بین ۲ نوع زیرلایه بررسی شده برای آشکارسازی طیف آفلاتوکسین *B1* ، استفاده از زیرلایه متشکل از کلوئید نانو ذرات نقره روی شیشه موفقیت آمیز بود. با مقایسه عدد موج متناظر پیک‌های طیف رامان آفلاتوکسین *B1* (در غلظت *ppb*۱۰۰۰) با مقادیر به دست آمده از روش محاسباتی *DFT*، پیک‌های واقع در cm^{-1} ۹۴۵،۱۰۴۸،۱۱۴۸،۱۲۵۲،۱۳۹۰،۱۵۲۷،۱۵۸۳،۱۶۵۸ به عنوان اثر انگشت‌های طیف رامان آفلاتوکسین *B1* تایید شدند.

کلید واژه- آفلاتوکسین، پسته، طیف‌سنجی، رامان، زیرلایه

The feasibility of pistachio aflatoxin (B1) detection by surface enhanced Raman spectroscopy using two substrates composed of silver nanoparticles

Reza Mohammadigol[1], Rasoul Malekfar[2]

1- Assistant Professor, Biosystem Engineering Mechanics Department, Arak University, Arak

2- Professor, Atomic and Molecular Group, Physics Department, Faculty of Basic sciences, Tarbiat Modares University, Tehran

Abstract- In this study, the feasibility of detection of pistachio aflatoxin (B1) by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) has been surveyed. To this end, in order to detection of aflatoxin B1, Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) using two types of substrates: Ag nanowires, and Ag nanoparticles colloid on glass were studied. The evaluating of the aflatoxin B1 sample Raman spectra at 5 ppb concentration was shown that the detection of this concentration was impossible. Among the two types of substrates that have been investigated in order to detection of aflatoxin B1 spectrum, the use of Ag nanoparticles colloid on the glass substrate, unlike the other substrate, was successful. With Comparing the corresponding peaks wave numbers of the aflatoxin B1 Raman spectrum (1000 ppb) to the values obtained from computational method, peaks in 945,1048,1148,1252,1390,1527,1583,1658 cm^{-1} as the fingerprints of aflatoxin B1 Raman spectrum were confirmed.

Keywords: Aflatoxin, Pistachio, Raman, Spectroscopy, Substrate

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-12-17]

۱- مقدمه

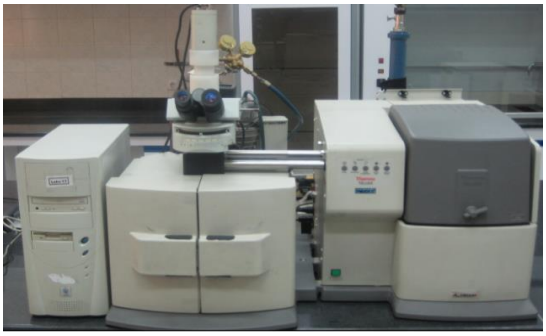
مسئله آلودگی پسته به آفلاتوکسین یکی از مسائل مهم تحقیقاتی و یکی از معضلات ملی و منطقه‌ای این محصول با ارزش است. آفلاتوکسین‌ها از سوخت و سازهای ثانوی‌ه قارچهایی چون آسپرژیلوس فلاوس[1] و آ. پارازیتیکوس[2] می‌باشند [۱].

تمامی روش‌های آزمایشگاهی تشخیص آفلاتوکسین‌ها به طور کلی شامل مراحل: نمونه‌گیری، استخراج، پاک سازی، آماده سازی، تشخیص، تایید و تخمین مقدار سم می‌باشند. در تحقیقی [۲] تشخیص مایکوتوکسین سیترینین (citrinin) به روش SERS و با استفاده از زیرلایه دارای نانوذرات نقره بررسی شده است. در ساخت زیر لایه مذکور، از روش Drop-Casting برای استقرار نانوذرات نقره روی فیلم تفلون استفاده شده است. پیک های مربوط به سیترینین در حدود عددموج های $۱۳۸۲cm^{-1}$ و ۱۵۶۸ مشاهده و نتایج به دست آمده به روش DFT [3] تایید شدند. آن ها تشخیص مستقیم سیترینین را با استفاده از ارتقاء طیف رامان توسط زیرلایه فوق امکان پذیر اعلام نمودند. در تحقیق دیگری [۳] به منظور ساختن زیرلایه SERS ، محلولی شامل agarose (پلیمر پلی ساکارید که از علف دریایی استخراج می شود) و نانوذرات نقره تهیه نموده و فیلتر کاغذی را با محلول فوق پوشش دادند. یکی از موادی که برای سنجش عملکرد زیرلایه بکار رفته است، آفت کش chlorpyrifos بوده است. نتایج حاکی از آن بوده است که زیرلایه تا غلظت $۱۰^{-۹}$ مولار برای تشخیص ماده مذکور حساسیت داشته است. همچنین طبق بررسی پژوهشگران این تحقیق با گذشت زمان طولانی از ساخت زیرلایه های مذکور قابلیت ارتقاء آن ها پایدار مانده است و این مسئله را نقطه قوت زیرلایه ساخته شده دانسته‌اند.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سامانه طیف‌سنجی رامان

در این سامانه از لیزر با طول موج ۵۳۲ nm به عنوان منبع تحریک استفاده شده است. توان لیزر آن تا مقدار ۱۰۰mW قابل تنظیم است. عمل طیف برداری در محدوده طیفی ۴۰۰ الی $۴۰۰۰cm^{-1}$ در محیط نرم افزار OMNIC انجام شده است (شکل۱).



شکل۱ سامانه طیف‌سنجی Thermo Nicolet Almega

۲-۲- نمونه سازی

نمونه‌های مورد استفاده در (SERS)، با توجه به شرایط استفاده از زیرلایه‌ها، شامل آفلاتوکسین B1 و حلال (آب) در غلظت‌های ۱۰۰،۱۰۰۰و ۵ ppb آماده شدند. به منظور تهیه غلظت‌های مورد نظر از قانون بیر- لامبرت (رابطه ۱) استفاده شد. این قانون تجربی ارتباط شدت نور جذب‌شده در اثر عبور از ماده همگن بدون پراکندگی را با خصوصیات مواد بیان می‌کند [۴].

$$Log (I_0 I^{-1}) = A \qquad (۱)$$

که در آن، I_0 شدت نور اولیه، I شدت نور عبوری و A مقدار جذب ماده (بدون بعد) است. که به صورت زیر (رابطه ۲) تعریف می‌شود:

$$A= abc \qquad (۲)$$

که در آن، a ضریب جذب ماده ($L\ mol^{-1}cm^{-1}$)، b ضخامت (cm) و c غلظت ($mol\ L^{-1}$) آن است.

۲-۳- تقویت طیف‌های رامان

در این تحقیق از روش SERS برای تقویت طیف رامان نمونه‌ها استفاده شد. بدین منظور ۲ نوع زیرلایه حاوی نانو ذرات نقره مورد کاووش قرار گرفتند.

۲-۴- زیرلایه متشکل از نانو سیم‌های نقره

زیرلایه‌های جامد پوشیده شده با نانو ساختارهای فلزی به طور گسترده در آزمایش‌های SRES به‌کار می‌روند. یکی از

1 Aspergillus flavus
2 A.parasiticus
3 Deferential Function Theory

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-12-17]

زیرلایه‌های بررسی شده در این پژوهش زیرلایه (تجاری) ارائه شده توسط شرکت رامان سیستم بوده است. طبق ادعای شرکت سازنده لایه‌نشانی نانوسیم‌های نقره در زیر-لایه به گونه‌ای انجام شده که بیشترین ارتقاء طیفی حاصل شود. ابعاد زیرلایه‌های مورد استفاده mm ۱×۵×۵ بوده است.پس از استقرار نمونه (آفلاتوکسین + حلال) روی آن درون نگه‌دارنده قرار گرفته و سپس اقدام به اخذ طیف‌ها گردید .

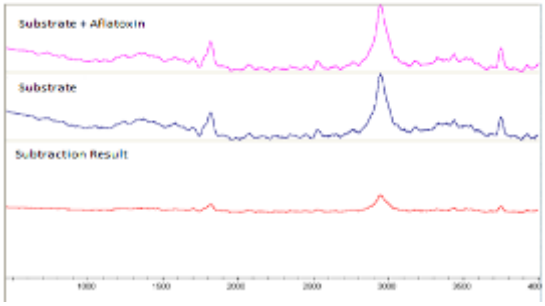
۲-۵- زیرلایه متشکل از نانو ذرات نقره روی شیشه

در این تحقیق برای تهیه نانوذرات کلوئیدی از روش کاهش شیمیایی استفاده شد. در این روش از نیترات نقره (به عنوان نمک شروع کننده) و یک ماده کاهنده برای تولید نانوذرات نقره استفاده می‌شود. برای این منظور gm 81 نیترات نقره (3oNgA) در Lm ۰۰۱ آب دو بار تقطیر حل گردید. محلول حاصل را در حمام یخ قرار داده و سپس Lm ۷ محلول آبی تری‌سدیم سیترات ($_3aN_7O_5H_6C$) ٪۱ تحت شرایط هم زدن، قطره قطره اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۵۴ دقیقه در حمام یخ در شرایط هم زدن قرار گرفت و در نهایت کلویید نقره به رنگ زرد به دست آمد [۵]. پس از تهیه محلول کلوئید نقره برای استقرار آنالیت مورد نظر نیاز به بستر حاوی غلظت مناسب نانوذرات نقره بود. برای این منظور طی چند پیش آزمایش قطره‌هایی از محلول مذکور به تناوب با فواصل زمانی (پس از خشک شدن یک قطره، قطره بعدی اضافه شد) در محل مشخص روی فیلتر کاغذی و لامل شیشه‌ای چکانده شدند [۳، ۶]. با استقرار آنالیت (آفلاتوکسین 1B) روی بسترهای ایجاد شده و پس از خشک شدن آن اقدام به بررسی طیف‌های رامان اخذ شده گردید. نتایج پیش آزمایش‌ها حاکی از برتری بسترهای شکل گرفته روی لامل شیشه‌ای نسبت به فیلترکاغذی بود لذا در ادامه تحقیق زیرلایه نانوذرات نقره روی لامل شیشه‌ای ایجاد شدند. برای ایجاد غلظت مطلوب نانوذرات نقره و دریافتن تراکم مناسب از قطره‌های محلول تهیه شده روی بسترها، تعداد قطره‌های ۲، ۵، ۰۱، ۰۲ و ۰۳ بررسی شدند و در نهایت بستر با تعداد ۰۱ قطره از محلول، طیف رامان بهتری نسبت به بقیه تراکم‌ها از خود نشان داد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- زیرلایه نانوسیم‌های نقره

تفاضل میانگین طیف‌های زیرلایه (زمینه) بدون حضور آفلاتوکسین B1 و میانگین طیف‌های حاصل از زیرلایه‌های دارای آفلاتوکسین B1 در غلظت ppb ۵ در شکل آورده شده است. بررسی ظاهری طیف‌های میانگین نشان می-دهد که در بازه cm^{-1} ۱۶۰۰- ۱۲۰۰ که بایستی اثر انگشت‌های طیف آفلاتوکسین B1 را در آن جستجو نمود عملاً پیکی وجود ندارد شکل(۲). لازم به ذکر است اقدامات فوق‌الذکر برای غلظت ppb ۱۰۰ نیز انجام و نتایج کاملاً مشابهی دیده شد.

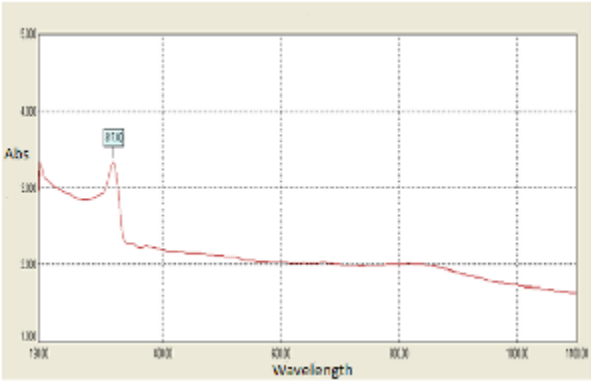


شکل۲ تفاضل میانگین طیف‌های زمینه (زیرلایه) از میانگین طیف های زیرلایه‌های حاوی آفلاتوکسین B1 (۵ ppb)

افزایش شدت در سیگنال رامان، برای موادی که روی سطوح خاصی جذب سطحی شده‌اند به خاطر تقویت در میدان الکترومغناطیسی رخ می‌دهد. این تقویت میدان توسط سطح صورت می‌گیرد. وقتی که نور تابیده به سطح برخورد می‌کند، پلاسمون‌های سطحی برانگیخته می-شوند .تقویت میدان وقتی که فرکانس پلاسمون (ωp) در تشدید با فرکانس نور تابشی است بیشینه می‌شود. اینکه سطح فلزی باید از چه ماده ای انتخاب شود توسط فرکانس تشدیدی پلاسمون تعیین می‌شود. با توجه به این نکته برای فهمیدن فرکانس تشدیدی پلاسمون اقدام به اخذ طیف جذبی UV-Vis زیرلایه در محدوده nm ۱۱۰۰-۱۹۰ گردید. همان طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، پیک جذب زیرلایه که پیک نازک و پالسی شکل است در طول موج nm ۳۱۷ وجود دارد. در حالی که طول موج لیزر سامانه طیف‌سنجی (۵۳۲nm) در قسمتی واقع شده که زیرلایه مورد استفاده در آن بازه جذب ضعیف دارد. اگر وجود پیک جذب دلیل بر وقوع پلاسمون تشدیدی باشد، می‌توان عدم تقویت طیف رامان آفلاتوکسین روی زیرلایه را (طبق نظریه الکترو

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-12-17]

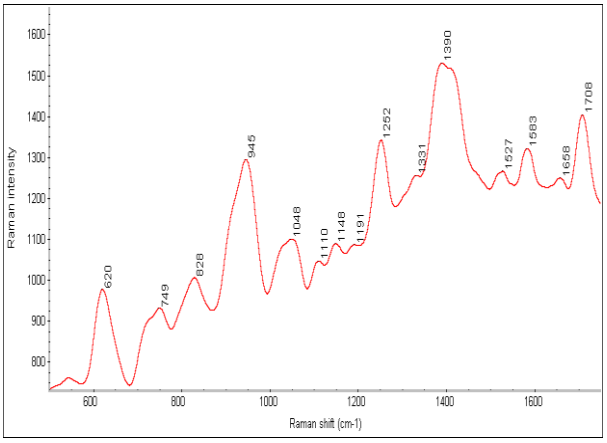
مغناطیس) برانگیخته نشدن پلاسمون‌های سطحی که لازمه ارتقاء سیگنال رامان ماده است، توجیه نمود.



شکل۳ طیف جذب زیرلایه متشکل از نانو سیم‌های نقره در بازه nm ۱۹۰-۱۱۰۰ (UV-Vis)

۳-۲- زیرلایه متشکل از کلوئید نانو ذرات نقره روی شیشه

در شکل (۴) طیف رامان آفلاتوکسین B1 (غلظت ppb ۱۰۰۰) در محدوده $۵۰۰-۱۷۵۰ cm^{-1}$ که با استفاده از زیرلایه کلوئیدهای نانوذرات نقره روی شیشه به دست آمده نشان داده شده است. در جدول (۱) با مقایسه عدد موج متناظر پیک‌ها با اعداد ارائه شده در تحقیق دیگر محققان [۷] که به روش DFT محاسبه شده‌اند، مشاهده می‌شود که پیک‌های واقع در $۱۶۵۸ cm^{-1}$، ۱۵۸۳، ۱۵۲۷، ۱۳۹۰، ۱۲۵۲، ۱۱۴۸، ۱۰۴۸، ۹۴۵ به روش محاسباتی تایید می‌شوند.



شکل۴ طیف آفلاتوکسین B1 (غلظت ppb ۱۰۰۰) به دست آمده با استفاده از زیرلایه متشکل از کلوئید نانوذرات نقره روی شیشه

جدول ۱ موقعیت پیک‌های کمپلکس نقره و مولکول آفلاتوکسین B1 ، به دست آمده از آزمایش و محاسبه شده به روش DFT

نوار مربوط (Wu *et al.*, 2012)	نتایج به دست آمده cm^{-1}	DFT (Wu *et al.*, 2012) cm^{-1}
β(C–O), υ(C–C)	۹۴۵	۹۴۸
υ(C–C–C) ring deformation	۱۰۴۸	۱۰۶۸
υ(C–O–C)(H3), υ(C–O–C) (ring)	۱۱۴۸	۱۱۶۷
ɤ(C–H) (ring)	۱۲۵۲	۱۲۵۲
υ(C–C) ring(s) skeleton vibration	۱۳۹۰	۱۴۰۴
β(C–H)(CH3), β(C–H)(ring)	۱۵۲۷	۱۵۰۸
$υ(C_7=C_8)$, ring deformation	۱۵۸۳	۱۵۷۲
υ(C–C) and υ(C–C–C)	۱۶۵۸	۱۶۵۷

با کاهش غلظت آفلاتوکسین به ۱۰۰ppb از تعداد پیک‌ها کاسته شده است و پیک‌های متناظر رامان شیفت‌های cm^{-1} ۹۳۳، ۱۳۸۲ و ۶۱۹ نمود پیدا کردند که از آنها پیک‌های cm^{-1} ۱۳۸۲ و ۹۳۳ با روش DFT برگرفته از جدول ۱ [۷] تایید شدند. در نهایت با کاهش ۲۰ برابری غلظت آفلاتوکسین به ۵ ppb طیف به دست آمده تعداد کافی از پیک‌های مربوط به آفلاتوکسین نمایان نشد. لذا برای آشکارسازی پیک‌های مربوطه در این غلظت بایستی روی ویژگی‌های زیرلایه از قبیل اندازه نانوذرات، شکل نانوذرات و طول موج لیزر سامانه طیف‌سنجی رامان، تحقیقات بیشتری صورت پذیرد.

منابع

[1] Dichter, C., *Risk estimates of liver cancer due to aflatoxin exposure from peanuts and peanut products*. Food and chemical toxicology, 1984. 22(6): p. 431-437.

[2] Singh, D.K., et al., *Detection of the mycotoxin citrinin using silver substrates and Raman spectroscopy*. Journal of Hazardous Materials, 2014. 265(0): p. 89-95.

[3] Raza, A. and B. Saha, *In situ silver nanoparticles synthesis in agarose film supported on filter paper and its application as highly efficient SERS test stripes*. Forensic Science International, 2014. 237(0): p. e42-e46.

[4] Parnis, J.M. and K.B. Oldham, *Beyond the Beer–Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2013. 267: p. 6-10.

[5] Ling, J., Y. Sang ,and C.Z. Huang, *Visual colorimetric detection of berberine hydrochloride with silver nanoparticles*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2008. 47(4): p. 860-864.

[6] Lu, L.-Q., et al., *Hydrophobic Teflon films as concentrators for single-molecule SERS detection*. J. Mater. Chem., 2012. 22(39): p. 20986-20990.

[7] Wu, X., et al., *The surface-enhanced Raman spectra of aflatoxins: spectral analysis, density functional theory calculation, detection and differentiation*. Analyst, 2012. 137(18): p.226-234.

[Downloaded from www.opsi.ir on 2025-12-17]