



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



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

رضا محمدی گل<sup>۱</sup>، رسول ملک فر<sup>۲</sup>

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 کلئوئید نانوذرات نقره روی شیشه انجام شده است. با بررسی طیف‌های رامان حاصل از نمونه ۵ ppb 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 کلئوئید نانو ذرات نقره روی شیشه موفقیت آمیز بود. با مقایسه عدد موج متناظر پیک‌های طیف رامان آفلاتوکسین B1 (در غلظت 1000 ppb) 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<sup>1</sup>, Rasoul Malekfar<sup>2</sup>

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

## ۱- مقدمه

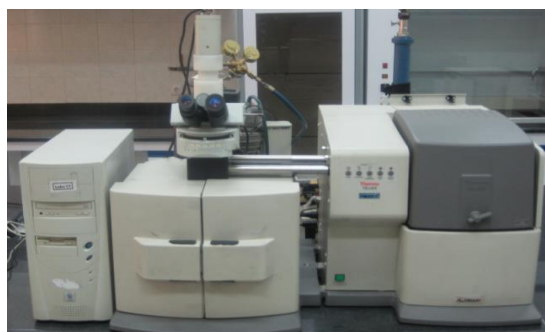
مسئله آلودگی پسته به آفاتوکسین‌های یکی از مسائل مهم تحقیقاتی و یکی از معضلات ملی و منطقه‌ای این محصول با ارزش است. آفاتوکسین‌ها از سوخت و سازهای ثانویه قارچ‌هایی چون اسپرژیلوس فلاوس<sup>۱</sup> و آ. پارازیتیکیوس<sup>۲</sup> می‌باشند [۱].

تمامی روش‌های آزمایشگاهی تشخیص آفاتوکسین‌ها به طور کلی شامل مراحل: نمونه‌گیری، استخراج، پاک‌سازی، آماده‌سازی، تشخیص، تایید و تخمین مقدار سم می‌باشند. در تحقیقی [۲] تشخیص مایکوتوکسین سیتترینین (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. پیک‌های مربوط به سیتترینین در حدود عدد موج های  $1382\text{cm}^{-1}$  و  $1568\text{cm}^{-1}$  مشاهده و نتایج به دست آمده به روش DFT<sup>۳</sup> تایید شدند. آن‌ها تشخیص مستقیم سیتترینین 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 می‌شود) 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  $10^{-9}$  مولار برای تشخیص ماده مذکور حساسیت داشته است. همچنین طبق بررسی پژوهشگران این تحقیق با گذشت زمان طولانی از ساخت زیرلایه‌های مذکور قابلیت ارتقاء آن‌ها پایدار مانده است و این مسئله را نقطه قوت زیرلایه ساخته شده دانسته‌اند.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- سامانه طیف‌سنجی رامان

در این سامانه از لیزر با طول موج  $532\text{nm}$  به عنوان منبع تحریک استفاده شده است. توان لیزر آن تا مقدار  $100\text{mW}$  قابل تنظیم است. عمل طیف برداری در محدوده طیفی  $400$  الی  $4000\text{cm}^{-1}$  در محیط نرم افزار OMNIC انجام شده است (شکل ۱).



شکل ۱ سامانه طیف‌سنجی Thermo Nicolet Omega

### ۲-۲- نمونه‌سازی

نمونه‌های مورد استفاده در (SERS)، با توجه به شرایط استفاده از زیرلایه‌ها، شامل آفاتوکسین B1 و حلال (آب) در غلظت‌های  $1000$ ،  $100$  و  $5\text{ppb}$  آماده شدند. به منظور تهیه غلظت‌های مورد نظر از قانون بیر-لامبرت (رابطه ۱) استفاده شد. این قانون تجربی ارتباط شدت نور جذب شده در اثر عبور از ماده همگن بدون پراکندگی را با خصوصیات مواد بیان می‌کند [۴].

$$\text{Log}(I_0 I^{-1}) = A \quad (1)$$

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:

$$A = abc \quad (2)$$

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

### ۲-۴- زیرلایه متشکل از نانو سیم‌های نقره

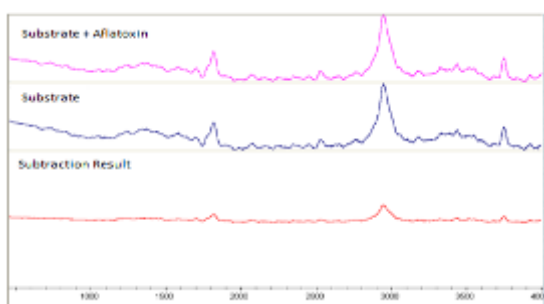
زیرلایه‌های جامد پوشیده شده با نانو ساختارهای فلزی به طور گسترده در آزمایش‌های SERS به کار می‌روند. یکی از

1 *Aspergillus flavus*  
2 *A. parasiticus*  
3 Differential Function Theory

### 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 ۵ ppb در شکل آورده شده است. بررسی ظاهری طیف‌های میانگین نشان می‌دهد که در بازه  $1600 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  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 ۱۰۰ ppb نیز انجام و نتایج کاملاً مشابهی دیده شد.



شکل ۲. تفاضل میانگین طیف‌های زمینه (زیرلایه) از میانگین طیف‌های 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 می‌شوند. تقویت میدان وقتی که فرکانس پلاسمون ( $\omega_p$ ) در تشدید با فرکانس نور تابشی است بیشینه می‌شود. اینکه سطح فلزی باید از چه ماده‌ای انتخاب شود توسط فرکانس تشدید پلاسمون تعیین می‌شود. با توجه به این نکته برای فهمیدن فرکانس تشدید پلاسمون اقدام به اخذ طیف جذبی UV-Vis زیرلایه در محدوده ۱۱۰۰-۱۹۰ nm گردید. همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، پیک جذب زیرلایه که پیک نازک و پالسی شکل است در طول موج ۳۱۷ nm وجود دارد. در حالی که طول موج لیزر سامانه طیف‌سنجی (۵۳۲ nm) در قسمتی واقع شده که زیرلایه مورد استفاده در آن بازه جذب ضعیف دارد. اگر وجود پیک جذب دلیل بر وقوع پلاسمون تشدید باشد، می‌توان عدم تقویت طیف رامان آفلاتوکسین روی زیرلایه را (طبق نظریه الکترو

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  $5 \times 5 \times 1 \text{ mm}$  بوده است. پس از استقرار نمونه (آفلاتوکسین + حلال) روی آن درون نگهدارنده قرار گرفته و سپس اقدام به اخذ طیف‌ها گردید.

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

در این تحقیق برای تهیه نانوذرات کلئیدی 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 ۸۱ mg نیترات نقره ( $30 \text{ NgA}$ ) در ۰.۰۱ L آب دو بار تقطیر حل گردید. محلول حاصل را در حمام یخ قرار داده و سپس ۷ Lm محلول آبی تری‌سدیم سیترات ( $3\text{aN}_7\text{O}_5\text{H}_6\text{C}$ ) 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 کلئید نقره به رنگ زرد به دست آمد [۵]. پس از تهیه محلول کلئید نقره برای استقرار آنالیت مورد نظر نیاز به بستر حاوی غلظت مناسب نانوذرات نقره بود. برای این منظور طی چند پیش‌آزمایش 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 B1) روی بسترهای ایجاد شده و پس از خشک شدن آن اقدام به بررسی طیف‌های رامان اخذ شده گردید. نتایج پیش‌آزمایش‌ها حاکی از برتری بسترهای شکل گرفته روی لامل شیشه‌ای نسبت به فیلتر کاغذی 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، ۰.۱، ۰.۲ و ۰.۳ بررسی شدند و در نهایت بستر با تعداد ۰.۱ قطره از محلول، طیف رامان بهتری نسبت به بقیه تراکم‌ها از خود نشان داد.

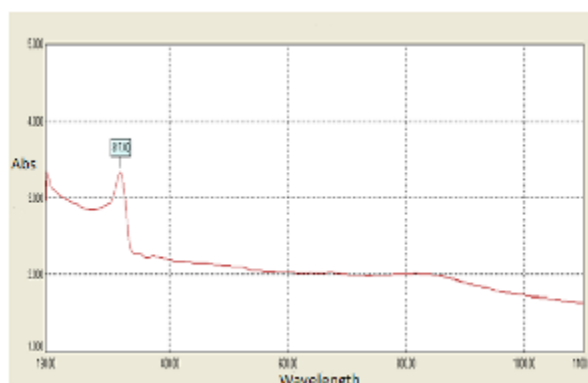
DFT (Wu et al., 2012)	نتایج به دست آمده	نوار مربوط (Wu et al., 2012)
cm <sup>-1</sup>	cm <sup>-1</sup>	
۹۴۸	۹۴۵	$\beta(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{C})$
۱۰۶۸	۱۰۴۸	$\nu(\text{C}-\text{C}-\text{C})$ ring deformation
۱۱۶۷	۱۱۴۸	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})(\text{H}3), \nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ (ring)
۱۲۵۲	۱۲۵۲	$\nu(\text{C}-\text{H})$ (ring)
۱۴۰۴	۱۳۹۰	$\nu(\text{C}-\text{C})$ ring(s) skeleton vibration
۱۵۰۸	۱۵۲۷	$\beta(\text{C}-\text{H})(\text{CH}3), \beta(\text{C}-\text{H})(\text{ring})$
۱۵۷۲	۱۵۸۳	$\nu(\text{C}-\text{C}_s)$ , ring deformation
۱۶۵۷	۱۶۵۸	$\nu(\text{C}-\text{C})$ and $\nu(\text{C}-\text{C}-\text{C})$

با کاهش غلظت آفلاتوکسین به ۱۰۰ ppb از تعداد پیکها کاسته شده است و پیکهای متناظر رامان شیفتهای  $933, 1382$  و  $619$  cm<sup>-1</sup> نمود پیدا کردند که از آنها پیکهای  $933$  و  $1382$  cm<sup>-1</sup> 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.

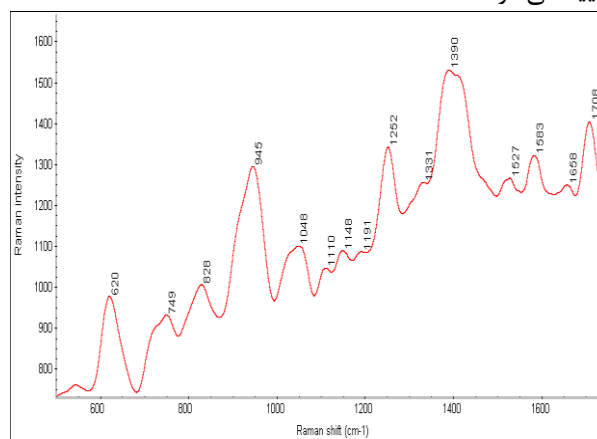
مغناطیس) برانگیخته نشدن پلاسمونهای سطحی که لازمه ارتقاء سیگنال رامان ماده است، توجیه نمود.



شکل ۳ طیف جذب زیرلایه متشکل از نانو سیمهای نقره در بازه ۱۱۰۰-۱۹۰ (UV-Vis)

## ۳-۲- زیرلایه متشکل از کلونید نانو ذرات نقره روی شیشه

در شکل (۴) طیف رامان آفلاتوکسین B1 (غلظت ۱۰۰۰ ppb در محدوده  $500-1750$  cm<sup>-1</sup> که با استفاده از زیرلایه کلونیدهای 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  $1658, 1583, 1527, 1431, 1331, 1282, 1191, 1148, 1110, 1048, 949$  cm<sup>-1</sup> به روش محاسباتی تایید می‌شوند.



شکل ۴ طیف آفلاتوکسین B1 (غلظت ۱۰۰۰ ppb) به دست آمده با استفاده از زیرلایه متشکل از کلونید 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