

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

رضا محمدی گل^{۱*}، رسول ملک فر^۲، منصوره میرابوالفتحی^۳، هما بهمدی^۴

- ۱- استادیار گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، نویسنده مسئول (r-mohammadigol@araku.ac.ir)
- ۲- استاد گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- ۳- استاد گروه بیماری‌های گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران
- ۴- مربی گروه صنایع غذایی، موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، کرج

چکیده

در این پژوهش امکان بکارگیری روش های طیفسنجی رامان و طیفسنجی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) برای تشخیص آفلاتوکسین (B₁) پسته بررسی شده است. ابتدا طیف رامان نمونه‌های خمیری پسته بدون آلودگی و دارای ۵ میکروگرم در لیتر از آفلاتوکسین B₁ با یکدیگر مقایسه شدند. سپس در راستای آشکارسازی طیف آفلاتوکسین B₁، طیفسنجی رامان ارتقاء یافته سطحی روی زیرلایه‌های نانوسیم‌های نقره و کلونید نانوذرات نقره روی شیشه انجام شده است. با بررسی طیف‌های رامان نمونه ۵ میکروگرم در لیتر از 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 کلونید نانو ذرات نقره روی شیشه کارآمد بود. با مقایسه عدد موج متناظر پیک‌های طیف رامان آفلاتوکسین B₁ (در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر) با مقادیر بدست آمده از روش DFT، پیک‌های واقع در عدد موج‌های ۹۴۵، ۱۰۴۸، ۱۱۴۸، ۱۲۵۲، ۱۳۹۰، ۱۵۲۷ و ۱۶۵۸ سانتی‌متر معکوس به عنوان اثر انگشت‌های طیف رامان آفلاتوکسین B₁ تایید شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که SERS پتانسیل کاربردی شدن در زمینه تشخیص آفلاتوکسین B₁ در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر را دارد.

واژگان کلیدی

آفلاتوکسین
پسته
زیرلایه
طیفسنجی رامان تقویت شده
نانوذرات نقره

مقدمه

ترکیبات آنها، از قوی‌ترین ترکیبات موتاژنیک^۲ (مواد شیمیایی که با ایجاد جهش ژنتیکی در سلول‌های بدن موجودات زنده باعث افزایش احتمال سرطانی شدن سلول‌ها می‌شوند) شناخته شده هستند. در بین آفلاتوکسین‌ها، نوع B₁ خطرناک‌ترین است و در رتبه اول مواد سرطان‌زایی قرار گرفته است. مطالعات انجام شده، رابطه‌ای بین سرطان کبد و مصرف آفلاتوکسین B₁ را تأیید کرده و مصرف مداوم غذاهای آلوده به

آفلاتوکسین‌ها^۱ به دلیل فراوانی قابل ملاحظه در طبیعت و خاصیت سمی، به عنوان سردسته مایکوتوکسین‌ها شناخته شده‌اند. تاکنون چندین نوع آفلاتوکسین شناسایی شده است که از بین آنها آفلاتوکسین‌های B₁، B₂، G₁ و G₂ دارای بیشترین اهمیت هستند (Arrus et al., 2005). ساختار و

افینیتی^۸ به طور گسترده در تشخیص آفلاتوکسین پسته و دیگر محصولات کشاورزی در عرصه‌های تحقیقاتی و تجاری استفاده می‌شود و مقالات متعددی نیز در تأیید دقت روش ذکر شده به چاپ رسیده‌اند (Dragacci *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 1999; Stroka *et al.*, 2000). در این روش مراحل جداسازی و استخراج آفلاتوکسین پیچیده است، به علاوه زمان‌بر بودن و نیاز به تجربه زیاد آزمایش کننده از خصوصیات دیگر استفاده از این روش عنوان شده است (Sinha, 1999).

با ارائه یک تعریف کوتاه می‌توان گفت روش SERS^۹ یک روش حساس و انتخابی است که نتیجه آن تقویت پراکندگی رامان^{۱۰} برای مولکول‌هایی است که بر روی نانو ذرات فلزی جذب سطحی شده‌اند. SERS علاوه بر علوم دیگر، در بیوداروها، مطالعه ویتامین‌ها (Zhang *et al.*, 2009)، مولکول‌های زیستی، ویروس‌ها و باکتری‌ها (Pavel *et al.*, 2008)، آشکارسازی مواد مخدر (Li *et al.*, 2009)، دیده‌بانی محیط (Kim *et al.*, 2003)، زمین‌شناسی (Muniz-*et al.*, 2009) و غیره کاربرد دارد.

در تحقیق Singh و همکاران (۲۰۱۴) تشخیص مایکوتوکسین سیتترینین^{۱۱} با استفاده از زیرلایه دارای نانوذرات نقره مطالعه شده است. در ساخت زیرلایه مذکور، از روش قطره نشانی^{۱۲} برای استقرار نانوذرات نقره روی فیلم تفلون استفاده شده است. پیک‌های مربوط به سیتترینین در حدود عدد موج‌های ۱۳۸۲ و ۱۵۶۸ سانتی‌متر معکوس مشاهده و نتایج به دست آمده به روش DFT^{۱۳} تأیید شدند. آنها تشخیص مستقیم سیتترینین را با استفاده از SERS توسط زیرلایه فوق امکان‌پذیر اعلام نمودند. در تحقیق Raza و Saha (۲۰۱۴) به منظور ساختن زیرلایه، محلولی شامل آگارز^{۱۴} (پلیمر پلی‌ساکارید که از علف دریایی استخراج می‌شود) و نانوذرات نقره تهیه نموده و فیلتر کاغذی را با محلول فوق پوشش دادند. یکی از موادی

مقادیر کم آفلاتوکسین B₁، شانس ابتلا به سرطان کبد را افزایش می‌دهد (Dichter, 1984; Moss, 2002).

مسئله آلودگی پسته به زهرابه آفلاتوکسین یکی از مسائل مهم تحقیقاتی و یکی از معضلات ملی و منطقه‌ای این محصول بارزش است و همواره کشورهای صادرکننده پسته در راستای رقابت در بازار بین‌المللی از این مسئله علیه پسته ایران استفاده نموده‌اند (شرافتی، ۱۳۸۷). آفلاتوکسین‌ها از سوخت و سازهای ثانویه قارچ‌هایی چون *Aspergillus flavus*^۱ و *Aspergillus parasiticus*^۲ تولید می‌شوند (Dichter, 1984). از آنجا که حذف کامل آفلاتوکسین در زنجیره تولید پسته با روش‌های شناخته شده غیرعملی است، هدف کلیه قوانین بهداشتی موجود در این زمینه ممانعت از رشد قارچ و تولید زهرابه در حد امکان است. بنابراین، وجود حد پایینی از آفلاتوکسین پسته در تمامی کشورهای دنیا پذیرفته شده است (هاشمی عباس آبادی و صادقی ماهونک، ۱۳۸۶).

تمامی روش‌های آزمایشگاهی تشخیص آفلاتوکسین‌ها به طور کلی شامل مراحل نمونه‌گیری، استخراج، پاک‌سازی، آماده‌سازی، تشخیص، تأیید و تخمین مقدار سم هستند. در سال‌های اخیر سرعت آنالیز، مقوله‌ای است که توجه جهانی را به خود معطوف نموده است. برخی از روش‌های آزمایشگاهی تشخیص و سنجش کمی آفلاتوکسین‌ها عبارتند از: کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)^۳، کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPTLC)^۴، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^۵، کروماتوگرافی گاز-مایع (GLC)^۶ و سنجش جذب آنزیم اتصال یافته (ELISA)^۷ (Sinha, 1999).

به نقل از Sinha (۱۹۹۹)، سنجش کمی آفلاتوکسین‌ها به روش HPLC، با تحقیقات Devries و Chang (۱۹۸۲) و Tarter و همکاران (۱۹۸۴) شروع شده است. از روش HPLC و ستون‌های ایمونو-

8- Immunoaffinity

9- Surface Enhanced Raman Scattering

10- Raman

11- Citrinin

12- Drop casting

13- Differential Functional Theory

14- Agarose

1- *Aspergillus flavus*2- *A. parasiticus*

3- Thin-Layer Chromatography

4- High-Performance Thin-Layer Chromatography

5- High-Performance Liquid Chromatography

6- Gas-Liquid Chromatography

7- Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

نزدیک) به عنوان یک روش سریع تشخیص آفلاتوکسین B₁ در ذرت و جو بررسی شده است. در این تحقیق نمونه‌های با آلودگی کمتر از ۲۰ میکروگرم در لیتر به عنوان دسته منفی و نمونه‌های با آلودگی بیشتر از این مقدار دسته مثبت قلمداد شده‌اند (شاخص تشخیص ۲۰ میکروگرم در لیتر در نظر گرفته شده است). مناسب‌ترین محدوده طول موج تمایز طیف‌ها از نظر آلودگی قارچی ۸۷۰-۱۲۰۰ نانومتر نتیجه‌گیری شده است. آنها نتیجه‌گیری نموده‌اند که تکنیک NIR پتانسیل تشخیص سریع و غیرمخرب آفلاتوکسین B₁ در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر را دارد. در تحقیق دیگری از Hernández و همکاران (۲۰۰۸) قابلیت طیفسنجی بازتابی NIR برای سنجش مایکوتوکسین‌های شامل آفلاتوکسین B₁، اکراتوکسین A و مجموع آفلاتوکسین‌ها در پاپریکای قرمز بررسی شده است. آنها نتیجه گرفتند که تکنیک NIR با استفاده از ردیاب فیبر نوری به دلیل سرعت بالا و هزینه پایین می‌تواند جایگزین روش شیمیایی برای سنجش ۲ مایکوتوکسین مذکور در پاپریکا باشد. پتانسیل بالای تشخیصی طیفسنجی رامان و پیشرفت‌های صورت گرفته در فناوری ساخت تجهیزات اپتیکی و نانو که باعث توسعه و ارتقاء چشم-گیر طیفسنج‌های مزبور شده است (تا آنجا که انواع قابل انتقال آنها نیز تولید شده است) و همچنین توجه به مطالبه جهانی برای استفاده از روش‌های سریع تشخیص آلودگی در مواد غذایی و محصولات کشاورزی، زمینه‌ساز انجام پژوهش حاضر بوده است. چنانچه آفلاتوکسین B₁ در غلظت مورد نیاز پسته با روش طیفسنجی رامان تشخیص داده شود می‌توان سلامت محصول پسته را در فرآیندهای مختلف با سرعت بیشتر و هزینه کمتر پایش نمود.

مواد و روش‌ها

سامانه طیفسنجی رامان

در این تحقیق از دو سامانه طیفسنجی رامان استفاده شده که در ادامه معرفی می‌شوند.

که برای سنجش عملکرد زیرلایه بکار رفته است، آفت کش کلرپایرفس^۱ بوده است. نتایج حاکی از آن بوده است که زیرلایه تا غلظت ۱۰^{-۹} مولار برای تشخیص ماده مذکور حساسیت را افزایش داده است. همچنین طبق بررسی آنها با گذشت زمان طولانی از ساخت زیرلایه‌های مذکور قابلیت ارتقاء آنها پایدار مانده است و این مسأله را نقطه قوت زیرلایه ساخته شده اظهار نمودند.

Lu و همکاران (۲۰۱۲) استفاده از فیلم‌های تفلون آب‌دوست را برای تشخیص غلظت پایین مواد به روش SERS کارآمد دانسته‌اند. آنها با بکارگیری تفلون در ساخت زیرلایه‌ها، توانسته‌اند به حساسیت بالا دست یابند. برای ارزیابی زیرلایه مذکور از ردآمین^۲ استفاده شده است. نتایج حاکی از ارتقاء بسیار قوی سیگنال‌های SERS تا غلظت ۱۰^{-۱۵} مولار بوده است. Cheng و همکاران (۲۰۱۱) تشخیص اسپورهای قارچ *Bacillus subtilis*^۳ توسط SERS با زیرلایه‌های شامل نانو ذرات طلا را بررسی کردند. آنها نتیجه گرفتند که بکارگیری نانو ذرات طلا در زیرلایه‌ها، تشخیص، دقت و حساسیت بالا را به همراه دارد. Malekfar و همکاران (۲۰۱۰) استفاده از روش SERS و کلوئیدهای نقره را در ارزیابی کیفیت آب گوجه فرنگی بررسی نمودند. آنها در نتایج خود کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های موجود در آب گوجه فرنگی را در طیف‌های برداشت شده شناسایی نمودند. در تحقیق Wu و همکاران (۲۰۱۲) طیف رامان ارتقاء یافته آفلاتوکسین‌های نوع B₁، B₂، G₁ و G₂ با استفاده از زیرلایه‌های متشکل از نانو میله‌های نقره مطالعه شده است. طبق نظر آنها طیف حاصل از آفلاتوکسین B₁ در محدوده ۱۶۰۰-۱۲۰۰ سانتی‌متر معکوس^۴ دارای پیک‌های کلیدی است. آنها بر روی موفقیت بکارگیری SERS جهت تشخیص مایکوتوکسین‌ها تأکید نموده‌اند.

در پژوهش Fernández و همکاران (۲۰۰۹) بکارگیری روش طیفسنجی NIR^۵ (فرو سرخ نزدیک)

1- Chlorpyrifos

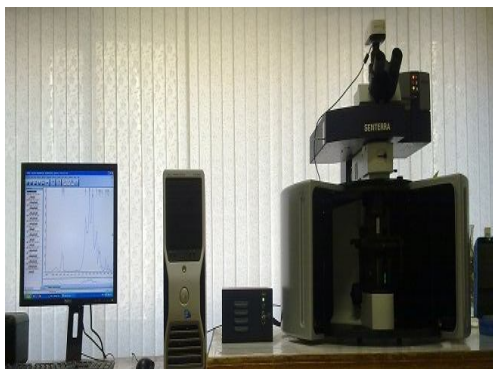
2- Rhodamine

3- *Bacillus Subtilis*

4- cm⁻¹ (Raman shift-Wave number)

5- Near Infra Red

برای اخذ طیف از نمونه‌های خمیری مغز پسته و سامانه آلمگا برای برداشت طیف تقویت شده رامان مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۲- سامانه طیف سنجی سنترابروکر

نمونه‌سازی

با بررسی مقدماتی طیف‌های به دست آمده و بررسی منابع، نمونه‌هایی از مغز سبز پسته و آفلاتوکسین B₁، در غلظت صفر (بدون آلودگی) و ۵ میکروگرم در لیتر به فرم خمیری ساخته شدند (Stroka et al., 2000). در انتخاب میزان آلودگی، حد قابل قبول آفلاتوکسین B₁ در پسته مد نظر بوده است. نمونه‌های مورد استفاده در SERS، با توجه به شرایط استفاده از زیر-لایه‌ها، شامل آفلاتوکسین B₁ استاندارد و حلال (آب) در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۵ میکروگرم در لیتر آماده شدند. به منظور تعیین غلظت‌های مورد نظر از محلول استاندارد آفلاتوکسین B₁ مورد تایید موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و قانون بیر- لامبرت^۵ استفاده شد (Parnis & Oldham, 2013). از آنجا که آفلاتوکسین‌ها جزو سموم خطرناک هستند در کلیه مراحل تحقیق سعی شد ملاحظات ایمنی آزمایشگاهی رعایت شود همچنین برای پاک‌سازی، ظروف و ابزارهای استفاده‌شده در محلول هیپوکلریت سدیم قرار داده شدند.

تقویت طیف‌های رامان

کاربرد موفق نانو ذرات فلزی در زیرلایه‌های ارتقاء دهنده، وابسته به ویژگی‌های فلز از قبیل

اولین سامانه، سامانه طیف‌سنجی ترمو نیکلت آلمگا^۱ ساخت کشور آمریکا بود. در این سامانه از لیزر با طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شده و عمل تنظیم مسیر اپتیکی و کالیبراسیون به طور خودکار انجام می‌گیرد و توان لیزر آن تا ۱۰۰ میلی‌وات قابل تنظیم است. عمل طیف‌برداری در محدوده طیفی ۴۰۰ الی ۴۰۰۰ سانتی‌متر معکوس در محیط نرم افزار امنیک^۲ انجام شده است (شکل ۱).



شکل ۱- سامانه طیف‌سنجی ترمو نیکلت آلمگا

سامانه سنترابروکر^۳ ساخت آلمان نیز برای به دست آوردن طیف‌های رامان مورد استفاده قرار گرفت. این سامانه برداشت طیف رامان از مایعات و جامدات را در محدوده طیفی ۱۴۰ الی ۳۷۰۰ سانتی‌متر معکوس فراهم کرده و سیستم کاوش میکروسکوپی آن امکان بررسی میکروسکوپی مواد و بلورها را میسر می‌کند. لیزر سامانه دارای طول موج ۷۸۵ نانومتر و توان حداکثر ۱۰۰ میلی‌وات است. بکارگیری لیزر با طول موج ۷۸۵ نانومتر به عنوان منبع تهییج در طی فرآیند طیف‌برداری رامان علاوه بر داشتن حساسیت مناسب به طور معنی‌داری سبب کاهش پدیده فلورسانس در طیف حاصله می‌گردد. البته در هر صورت وجود مقداری فلورسانس در طیف رامان اجتناب‌ناپذیر است که توسط نرم افزار عملگر این سامانه به نام اپیوس^۴ قابل حذف است. در شکل ۲ تصویر سامانه آمده است. پس از انجام پیش آزمایش‌های مقدماتی، سامانه طیف‌سنجی بروکر به علت فلورسانس کمتر نمونه،

1- Thermo Nicolet Almega

2- OMNIC

3- Senterra Bruker

4- OPUS

5- Beer-Lambert

میلی‌لیتر محلول آبی تری‌سدیم سیترات^۲ ۱ درصد تحت شرایط هم‌زدن، قطره قطره اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در حمام یخ در شرایط هم‌زدن قرار گرفت و در نهایت کلونید نقره به رنگ زرد بدست آمد (Ling et al., 2008). پس از تهیه محلول کلونید 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 نشانده شدند (Raza & Saha, 2014; Lu et al., 2012). 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 دریافت تراکم مناسب از قطره‌های محلول تهیه شده روی بسترها، تعداد قطره‌های ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بررسی شدند (روش قطره‌نشانی) و در نهایت بستر با تعداد ۱۰ قطره از محلول، طیف رامان بهتری نسبت به بقیه تراکم‌ها از خود نشان داد.

ریخت‌شناسی (شکل، اندازه و حالت انبوهش) و ماهیت فلزی است که به عنوان زیرلایه به کار رفته است. از میان فلزات گوناگون، نقره به علت داشتن تشدید پلاسمونی، پایداری بالا و روش تهیه آسان، بیشترین استفاده را داشته است (Canameres et al., 2008). در این تحقیق از روش SERS برای تقویت طیف رامان نمونه‌ها استفاده شد و دو نوع زیرلایه حاوی نانو ذرات نقره مورد کاوش قرار گرفتند.

زیرلایه‌های جامد پوشیده شده با نانو ساختارهای فلزی به طور گسترده در آزمایش‌های SERS به کار می‌روند. یکی از زیرلایه‌های بررسی شده در این پژوهش زیرلایه (تجاری- تحقیقاتی) ارائه شده توسط شرکت رامان سیستم^۱ بوده است. طبق ادعای شرکت سازنده، لایه‌نشانی نانوسیم‌های نقره به گونه‌ای انجام شده که بیشترین ارتقاء طیفی حاصل شود (شکل ۳). ابعاد زیرلایه‌های مورد استفاده ۱×۵×۵ میلی‌متر بوده است. پس از استقرار نمونه (آفلاتوکسین + حلال) روی آن اقدام به اخذ طیف‌ها گردید.



شکل ۳- تصویر قسمت کوچکی از سطح زیرلایه نانوسیم-های نقره

در این تحقیق برای تهیه نانوذرات کلونیدی از روش کاهش شیمیایی استفاده شد (عباسیان، ۱۳۸۸). در این روش از نیترات نقره (به عنوان نمک شروع کننده) و یک ماده کاهنده برای تولید نانوذرات نقره استفاده می‌شود. برای این منظور ۱۸ میلی‌گرم نیترات نقره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. محلول حاصل را در حمام یخ قرار داده و سپس ۷

1- Raman System - 15 Presidential Way, Woburn, MA 01801, USA, <http://www.ramansystems.com/index.htm>

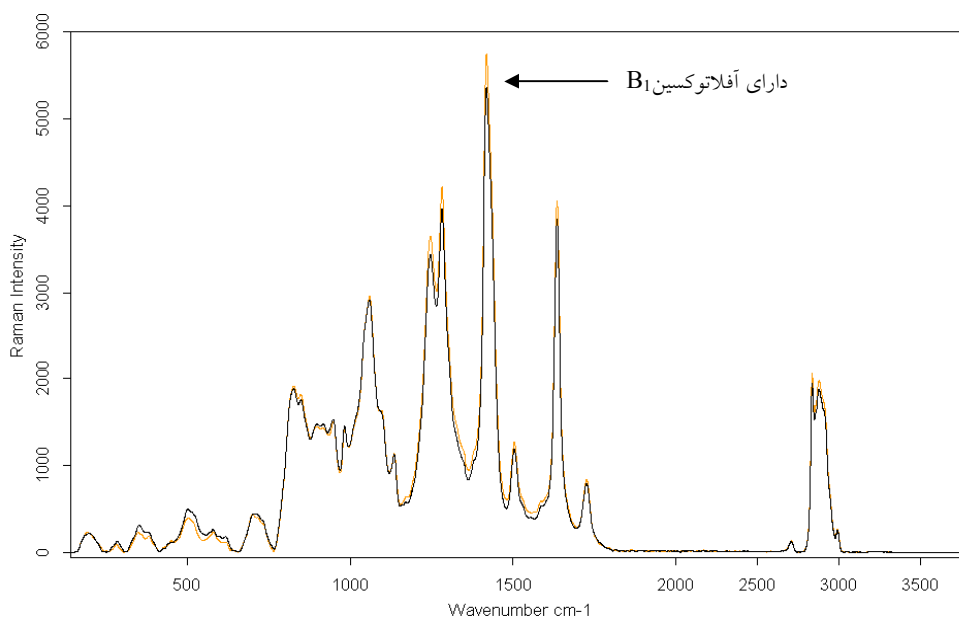
2- C₆H₅O₇Na₃

نتایج و بحث

توان لیزر

پس از بررسی طیف حاصل از توان‌های مختلف در حالت پیش نمایش نرم افزار OPUS توان لیزر برای اخذ طیف از نمونه‌های خمیری ۱۰۰ میلی‌وات در نظر گرفته شد. در شکل ۴ میانگین طیف‌ها (۱۶ عدد) آورده شده‌اند. بر اساس وضعیت نسبی طیف‌های میانگین، تفاوتی که بتوان آن را مدل‌سازی کرد وجود

نداشت. لذا نتیجه‌گیری شد که طیف‌های رامان در تشخیص نمونه‌های حاوی این غلظت از آفلاتوکسین B₁ کارایی ندارد. البته باید توجه داشت که اثر طیف رامان آفلاتوکسین B₁ نسبت به انواع دیگر (G₁ و G₂) ضعیف‌تر بوده و در عمل، تشخیص آن نسبت به بقیه نیز دشوارتر است (Wu *et al.*, 2012).



شکل ۴- میانگین طیف‌های رامان حاصل از نمونه‌های خمیری پسته عاری و حاوی آفلاتوکسین B₁ با غلظت ۵ میکروگرم در لیتر

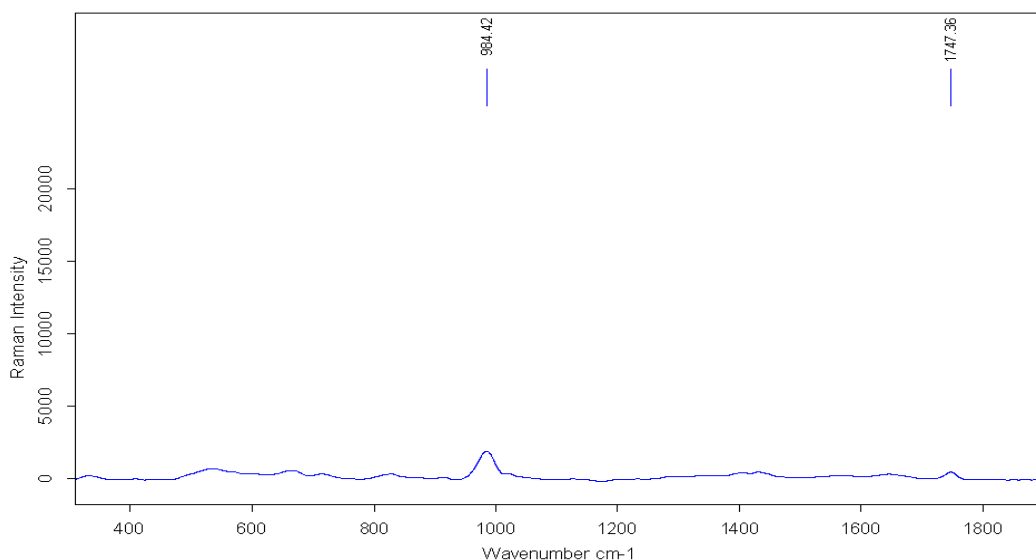
تقویت طیف رامان (SERS)

زیرلایه نانوسیم‌های نقره

سامانه بروکر

میانگین طیف‌های حاصل از زیرلایه‌های دارای آفلاتوکسین B₁ با غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر و میانگین طیف‌های زیرلایه (زمینه) بدون حضور ماده مذکور در شکل ۵ آمده است. با تفاضل میانگین‌های ذکر شده طیف باقیمانده در واقع طیف رامان آفلاتوکسین B₁ با استفاده از زیرلایه‌های مذکور بوده است. Wu و همکاران (۲۰۱۲) اعلام نموده‌اند که اثر انگشت^{۱۱}های طیف رامان آفلاتوکسین B₁ در محدوده عدد موج ۱۶۰۰-۱۲۰۰ وجود دارند و پیکی در طیف

شکل ۵ در محدوده ذکر شده مشاهده نشد لذا زیرلایه مورد بررسی در ارتقاء سطحی طیف رامان آفلاتوکسین B₁ با غلظت ۵ میکروگرم در لیتر و با استفاده از لیزر ۷۸۵ نانومتر (به عنوان منبع تهییج سامانه) کارآمد نبود.

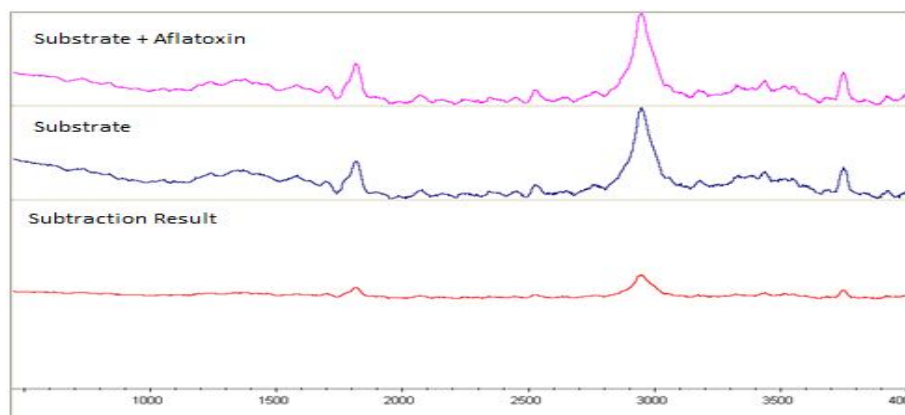


شکل ۵- طیف حاصل از تفاضل میانگین طیف‌های زمینه (زیرلایه) از میانگین طیف‌های زیرلایه + آفلاتوکسین B₁ (۵ میکروگرم در لیتر)

سامانه ترمو نیکلت آلمگا

طبق تئوری طیفسنجی رامان با کاهش طول موج لیزر، طیف رامان مطلوب‌تری مشروط به عدم فلورسانس نمونه به دست می‌آید. لذا برای بالا بردن احتمال وقوع تشدید پلاسمونی (در ادامه توضیح داده می‌شود) در ادامه پژوهش و بررسی زیرلایه دیگر، طیف‌های بعدی با سامانه آلمگا اخذ گردیدند. تفاضل میانگین طیف‌های زیرلایه (زمینه) بدون حضور آفلاتوکسین B₁ و میانگین طیف‌های حاصل از زیر-

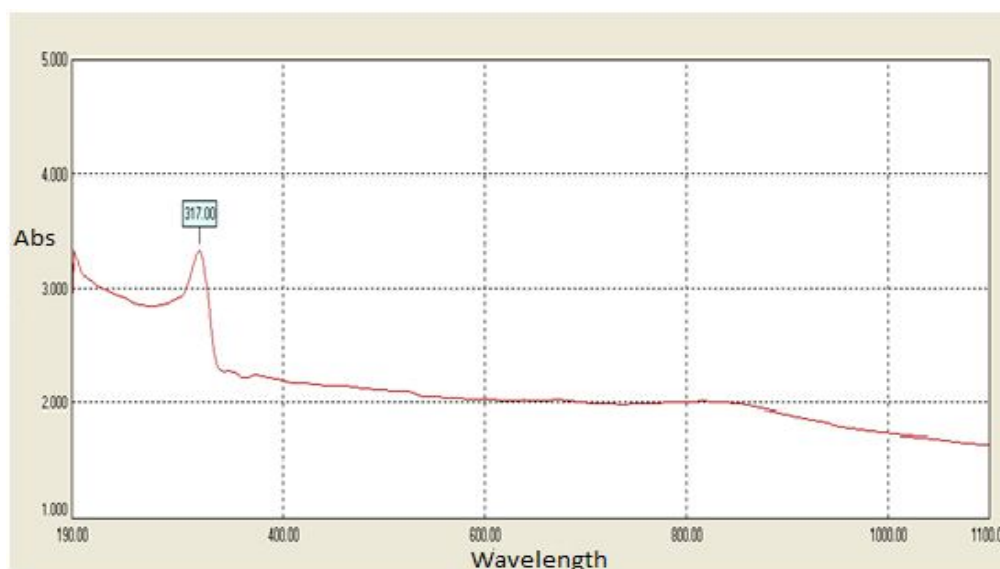
لایه‌های دارای آفلاتوکسین B₁ در غلظت ۵ میکروگرم در لیتر در شکل ۶ آورده شده است. بررسی ظاهری طیف‌های میانگین نشان می‌دهد که در محدوده ۱۶۰۰-۱۲۰۰ سانتی‌متر معکوس که بایستی اثر انگشت‌های طیف آفلاتوکسین B₁ را در آن جستجو نمود عملاً پیکی وجود ندارد. لازم به ذکر است اقدامات فوق‌الذکر برای غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نیز انجام و نتایج کاملاً مشابهی دیده شد.



شکل ۶- تفاضل میانگین طیف‌های زمینه (زیرلایه) از میانگین طیف‌های زیرلایه‌های حاوی آفلاتوکسین B₁ (۵ میکروگرم در لیتر)

نانومتر اخذ شد. در شکل ۷ پیک جذب زیرلایه که پیک نازک و پالسی شکل است در طول موج ۳۱۷ نانومتر نشان داده شده است. در حالی که طول موج لیزر هر دو سامانه طیف‌سنجی (۵۳۲ و ۷۸۵ نانومتر) در قسمتی واقع شده‌اند که زیرلایه مورد استفاده در آن محدوده جذب ضعیف دارد. اگر (طبق نظریه الکترومغناطیس) وجود پیک جذب دلیل بر وقوع پلاسمون تشدید باشد، می‌توان عدم تقویت طیف رامان آفلاتوکسین روی زیرلایه را برانگیخته نشدن پلاسمون‌های سطحی که لازمه ارتقاء سیگنال رامان ماده است، توجیه نمود.

افزایش شدت در سیگنال رامان، برای موادی که روی سطوح خاصی جذب سطحی شده‌اند به خاطر تقویت در میدان الکترومغناطیسی و قطبش‌پذیری مولکول 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 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 طیف جذبی UV-Vis زیرلایه در محدوده ۱۱۰۰-۱۹۰

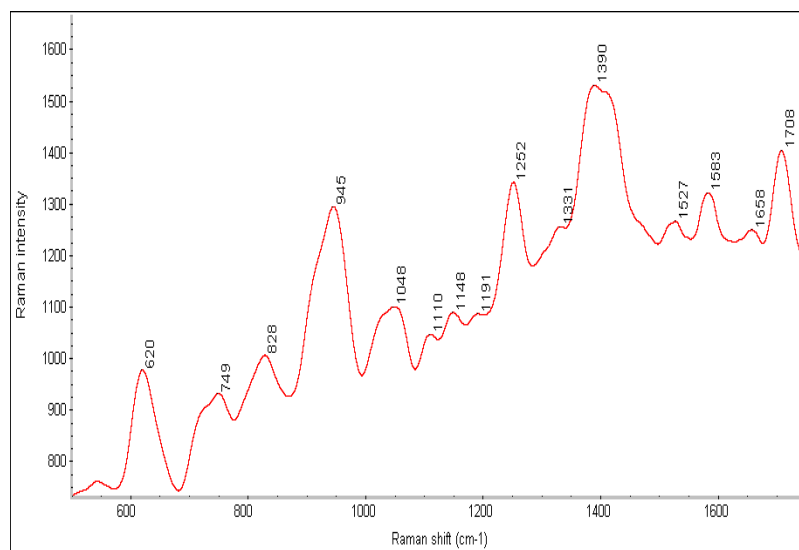


شکل ۷- طیف جذب زیرلایه متشکل از نانو سیم‌های نقره در محدوده ۱۱۰۰-۱۹۰ نانومتر

در شکل ۸ طیف رامان آفلاتوکسین B₁ (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر) در محدوده ۱۷۵۰-۵۰۰ سانتی‌متر معکوس که با استفاده از زیرلایه کلئیدهای 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 Wu و همکاران (۲۰۱۲) که به روش DFT محاسبه شده‌اند، پیک‌های واقع در ۱۶۵۸، ۱۵۸۳، ۱۵۲۷، ۱۳۹۰، ۱۲۵۲، ۱۱۴۸، ۱۰۴۸، ۹۴۵ سانتی‌متر معکوس تأیید شدند.

زیرلایه متشکل از کلئید نانو ذرات نقره روی شیشه در صورت عملکرد مطلوب این زیرلایه، بایستی با تفاضل میانگین طیف‌های به دست آمده از زیرلایه و زیرلایه + آفلاتوکسین B₁، اثر انگشت‌های طیف رامان آفلاتوکسین B₁ ظاهر شوند. برای این منظور روند مذکور در ۳ غلظت ۵، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر انجام شد.

تحلیل کیفی طیف آفلاتوکسین B₁



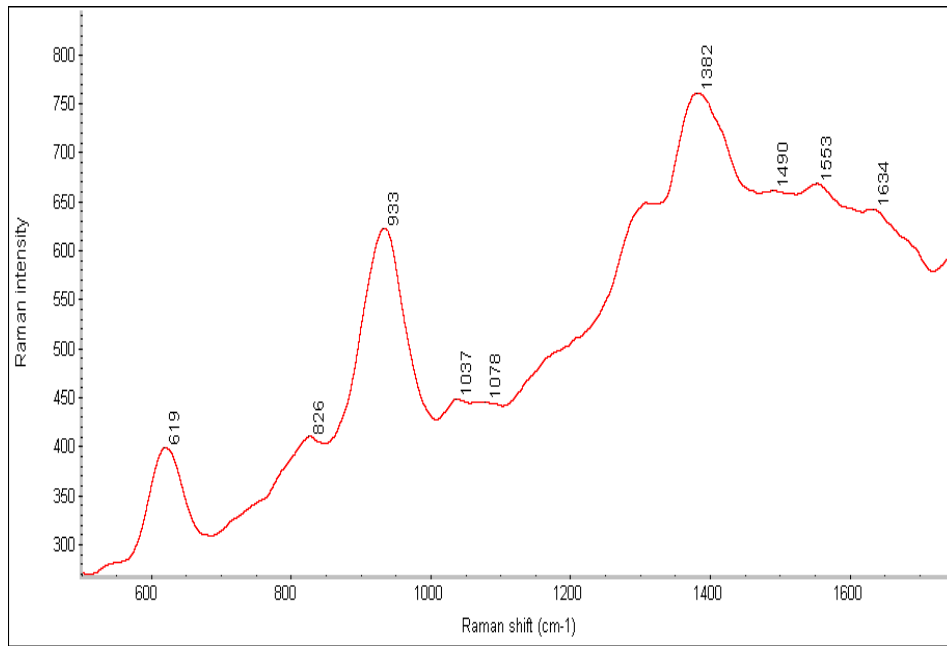
شکل ۸- طیف آفلاتوکسین B₁ (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر) بدست آمده با استفاده از زیرلایه متشکل از کلئید نانوذرات نقره روی شیشه

جدول ۱- مقایسه موقعیت پیک‌های به دست آمده و محاسبه شده به روش DFT (Wu et al., 2012)

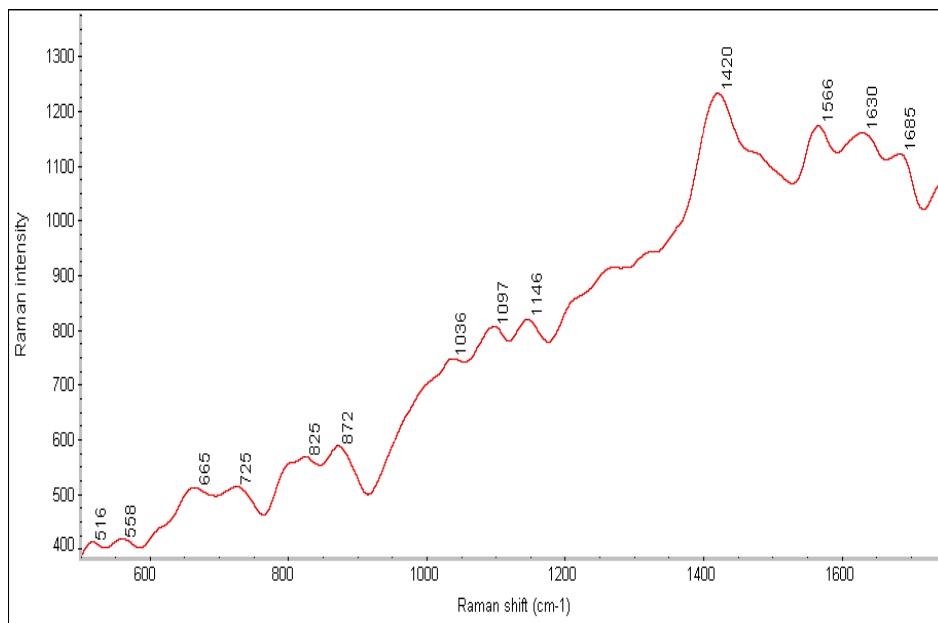
DFT (Wu et al., 2012) cm ⁻¹	نتایج به دست آمده cm ⁻¹	نوار مربوط (Wu et al., 2012)
۹۴۸	۹۴۵	β(C-O), (C-C)
۱۰۶۸	۱۰۴۸	(C-C-C) ring deformation
۱۱۶۷	۱۱۴۸	(C-O-C)(H3), (C-O-C) (ring)
۱۲۵۲	۱۲۵۲	(C-H) (ring)
۱۴۰۴	۱۳۹۰	(C-C) ring(s) skeleton vibration
۱۵۰۸	۱۵۲۷	β(C-H)(CH3), β(C-H)(ring)
۱۵۷۲	۱۵۸۳	(C=C), ring deformation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

تحقیق (Wu et al., 2012) تایید شدند (شکل ۹). در نهایت با کاهش ۲۰ برابری غلظت آفلاتوکسین (B₁) به ۵ میکروگرم در لیتر، طیف به دست آمده تعداد کافی از پیک‌های کلیدی به آفلاتوکسین را نمایان نکرده است (شکل ۱۰).

با کاهش غلظت آفلاتوکسین به ۱۰۰ میکروگرم در لیتر از تعداد پیک‌ها کاسته شده است و پیک‌های متناظر عدد موج‌های ۹۳۳، ۱۳۸۲ و ۶۱۹ سانتی‌متر معکوس نمود پیدا کردند که از آنها پیک‌های ۱۳۸۲ و ۹۳۳ سانتی‌متر معکوس با روش DFT برگرفته از



شکل ۹- طیف آفلاتوکسین B₁ (غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) با استفاده از زیرلایه متشکل از کلئید نانوذرات نقره روی شیشه



شکل ۱۰- طیف آفلاتوکسین B₁ (غلظت ۵ میکروگرم در لیتر) با استفاده از زیرلایه متشکل از کلئید نانوذرات نقره روی شیشه

نتیجه‌گیری

آشکارسازی طیف رامان آن تایید شد اما هر دو زیرلایه مورد بررسی در آشکارسازی پیک‌های طیف رامان آفلاتوکسین B₁ در غلظت ۵ میکروگرم در لیتر موفق نبودند. لذا برای آشکارسازی پیک‌های مربوطه (اثر انگشت‌های طیفی) در این غلظت بایستی روی ویژگی‌های زیرلایه متشکل از کلوئید نانوذرات نقره، از قبیل اندازه و شکل نانوذرات و طول موج لیزر سامانه طیفسنجی رامان، تحقیقات بیشتری انجام شود.

استفاده از سامانه طیفسنجی رامان با لیزر ۷۸۵ نانومتر در اخذ طیف رامان نمونه‌های (خمیری) مغز پسته، در مقایسه با سامانه طیفسنجی رامان با لیزر ۵۳۲ نانومتر، فلورسانس کمتری ایجاد کرده و طیف رامان بهتری به دست داد. با مشاهده اثر انگشت‌های طیف رامان آفلاتوکسین B₁ (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر) در طیف اخذ شده روی زیرلایه متشکل از کلوئید نانوذرات نقره، قابلیت این زیرلایه در تقویت و

منابع

- ۱- شرافتی، ع. ۱۳۸۷. پسته کاری کاربردی (چالش‌ها و راهکارها). چاپ اول، انتشارات سروا.
- ۲- عباسیان، س. ۱۳۸۸. بیناب‌نمایی اثر رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) با استفاده از نانوذرات کلوئیدی و خوشه‌های خود سامانده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیک، دانشگاه تربیت مدرس. نهران.
- ۳- هاشمی عباس آبادی، ر. و صادقی ماهونک، ع. ۱۳۸۶. آفلاتوکسین پسته، عوامل و تکنیک‌های حذف آن. اولین همایش ملی فرآوری و بسته بندی پسته، ۱۳ و ۱۴ آذر ۱۳۸۶. خلاصه مقالات و سخنرانی‌های ارائه شده. دانشگاه فردوسی مشهد.
- 4- Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R. & Holley, R. 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 41: 513-527.
- 5- Canamares, M. V., Garcia-Ramos, J. V., Sanchez-Cortes, S., Castillejo, M. & Oujja, M. 2008. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: a study of the enhancement factor and the interfacial properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326: 103-109.
- 6- Cheng, H. W., Chen, Y. Y., Lin, X., Huan, S., Wu, H., Shen, G. & Yu, R. 2011. Surface-enhanced Raman spectroscopic detection of *Bacillus subtilis* spores using gold nanoparticle based substrates. *Analytica Chimica Acta*, 707: 155-163.
- 7- Devries, J. & Chang, H. 1982. Comparison of rapid high pressure liquid chromatographic and CB methods for determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 65: 206-209.
- 8- Dichter, C. 1984. Risk estimates of liver cancer due to aflatoxin exposure from peanuts and peanut products. *Food and Chemical Toxicology*, 22: 431-437.
- 9- Dragacci, S., Grosso, F. and Gilbert, J. 2001. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M₁ in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84: 437-443.
- 10- Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. & De La Roza-Delgado, B. 2009. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B₁ in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry*, 113: 629-634.
- 11- Hernández-Hierro, J., García-Villanova, R. & González-Martín, I. 2008. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta*, 622: 189-194.

- 12- Kim, M. S., Kang, J. S., Park, S. B. & Lee, M. S. 2003. Surface-enhanced Raman spectroscopy of quinomethionate adsorbed on silver colloids. *Bulletin-Korean Chemical Society*, 24: 633-637.
- 13- Li, P.-W., Zhang, J., Zhang, L. & Mo, Y.-J. 2009. Surface-enhanced Raman scattering and adsorption studies of morphine on silver island film. *Vibrational Spectroscopy*, 49: 2-6.
- 14- Ling, J., Sang, Y. & Huang, C. Z. 2008. Visual colorimetric detection of berberine hydrochloride with silver nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47: 860-864.
- 15- Lu, L. Q., Zheng, Y., Qu, W. G., Yu, H. Q. & Xu, A. W. 2012. Hydrophobic Teflon films as concentrators for single-molecule SERS detection. *Journal of Materials Chemistry*, 22: 20986-20990.
- 16- Malekfar, R., Nikbakht, A., Abbasian, S., Sadeghi, F. & Mozaffari, M. 2010. Evaluation of tomato juice quality using surface enhanced Raman spectroscopy. *Acta Physica Polonica*, 117: 971-973.
- 17- Moss, M. O. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50: 137-142.
- 18- Muniz-Miranda, M., Gellini, C. & Bindi, L. 2009. Surface-enhanced Raman spectroscopy for identifying rock composition. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73: 456-459.
- 19- Parnis, J. M. & Oldham, K. B. 2013. Beyond the Beer-Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 267: 6-10.
- 20- Pavel, I., Mccarney, E., Elkhaled, A., Morrill, A., Plaxco, K. & Moskovits, M. 2008. Label-free SERS detection of small proteins modified to act as bifunctional linkers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112: 4880-4883.
- 21- Pearson, S., Candlish, A., Aidoo, K. & Smith, J. 1999. Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection. *Biotechnology Techniques*, 13: 97-99.
- 22- Raza, A. & Saha, B. 2014. In situ silver nanoparticles synthesis in agarose film supported on filter paper and its application as highly efficient SERS test stripes. *Forensic Science International*, 237: e42-e46.
- 23- Singh, D. K., Ganbold, E. O., Cho, E. M., Cho, K. H., Kim, D., Choo, J., Kim, S., Lee, C. M., Yang, S. I. and Joo, S. W. 2014. Detection of the mycotoxin citrinin using silver substrates and Raman spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*, 265: 89-95.
- 24- Sinha, K. K. 1999. Testing methods for aflatoxins in foods. *Food & Nutrition Bulletin*, 20: 458-464.
- 25- Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U. & Gilbert, J. 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83: 320-340.
- 26- Tarter, E. J., Hanchay, J.-P. & Scott, P. M. 1984. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67: 597-600.

-
- 27- Wu, X., Gao, S., Wang, J. S., Wang, H., Huang, Y. W. & Zhao, Y. 2012. The surface-enhanced Raman spectra of aflatoxins: spectral analysis, density functional theory calculation, detection and differentiation. *Analyst*, 137: 4226-4234.
- 28- Zhang, Z., Wang, B., Yin, Y. & Mo, Y. 2009. Surface-enhanced Raman spectroscopy of Vitamin B₁₂ on silver particles in colloid and in atmosphere. *Journal of Molecular Structure*, 927: 88-90.

Evaluation of pistachio aflatoxin (B₁) detection by raman and surface enhanced raman spectroscopy (SERS) using two substrates composed of silver nanoparticles

Reza Mohammadigol^{1*}, Rasoul Malekfar², Mansoureh Mirabolfathi³, Homa Behmadi⁴

1- Assistant Professor, Department of Biosystem Mechanics Engineering, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran

*Corresponding author (r-mohammadigol@araku.ac.ir)

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

3- Professor, Department of Plant Disease, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

4- Department of Food Science, Agricultural Engineering Research Institute, Karaj, Iran

Abstract

In this study, the feasibility of detection of pistachio aflatoxin (B₁) using Raman spectroscopy and Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) was investigated. For this purpose, the pistachio samples were used in paste form and infected with B₁ aflatoxin in concentration of 5 ppb. Raman spectra of healthy and infected pistachio samples were compared. In order to detect aflatoxin B₁, the SERS was applied to two types of substrates: Ag nanowires and Ag nanoparticles colloid on glass. The results showed that the detection of 5 ppb concentration of aflatoxin B₁ was not feasible. Between the two studied substrates, Ag nanoparticles colloid showed better results to detect aflatoxin B₁. Comparing the corresponding peaks of wave numbers of the aflatoxin B₁ Raman spectrum (1000 ppb) to the values obtained from computational method (DFT), peaks in 945, 1048, 1148, 1252, 1390, 1527, 1583, 1658 cm⁻¹ were confirmed as the fingerprints of aflatoxin B₁ Raman spectrum. We conclude that the Raman spectroscopy has the potential to detect the infection of the aflatoxin B₁ in 1000 ppb concentration.

Keywords: Aflatoxin, Ag Nanoparticles, Enhanced Raman Spectroscopy, Pistachio, Substrate