مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر به کمک آپتاسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر الکترود صفحه-چاپی و روش ولتامتری چرخه‌ای

سیده فاطمه احمدی[۱]، محمد حجت‌الاسلامی[۲]*، حسین کیانی[۳]، هومان مولوی[٤]، سیده خدیجه احمدی[۵]

۱-دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲-دانشیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استادیار، آزمایشگاه زیست فراوری و زیست سنجش، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

٤- استادیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۲۰

کلمات کلیدی:

آپتاسنسور،

بیوسنسور الکتروشیمیایی،

نانو ذرات طلا،

نانو ذرات مغناطیسی،

ولتامتری چرخه‌ای.

DOI: 10.52547/fsct.18.05.02

* مسئول مکاتبات:

mohojjat@gmail.com

چکیده

شیر از فرایند تولید تا مصرف در معرض آلودگی‌های مختلف میکروبی و شیمیایی قرار دارد. یکی از مهم‌ترین سموم آلوده‌کننده شیر آفلاتوکسین M1 است که به دلیل سرطان‌زا بودن و اثرات مخربی که برای مصرف‌کننده به همراه دارد، همواره موردتوجه بوده است. بنابراین شناسایی سریع، حساس و مقرون به صرفه آفلاتوکسین M1 در شیر امری ضروری است. در پژوهش حاضر، یک آپتاسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر الکترود صفحه-چاپی اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا جهت شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر گاو پیشنهاد گردید. الکترود صفحه-چاپی با اعمال پتانسیل در محدوده ۱/۵- تا ۱+ ولت در مقابل الکترود مرجع با سرعت روبش ۲۰۰ میلی ولت بر ثانیه در ۵ سیکل پیوسته در محلول از اسیدسولفوریک ۰/۵ مولار و پتاسیم کلرید ۰/۱ مولار بود فعال شد. به کمک تکنیک ولتامتری چرخه‌ای تغییرات سطح الکترود در مراحل مختلف آماده‌سازی ارزیابی شد. تحت شرایط بهینه، با استفاده از ولتامتری چرخه‌ای مشخص شد که آپتاسنسور محدوده غلظتی ۷۰۰-۱۰۰ نانوگرم بر لیتر و حد تشخیص ۵۰ نانوگرم بر لیتر را ارائه می‌دهد. رابطه تغییرات پیک جریان با غلظت آنالیت خطی بود و از معادله رگرسیونی $\Delta I=0.0209C+2.14$ ($R^2=0.9897$) پیروی نمود. محاسبه انحراف استاندارد نسبی (RSD=۳/۲٪) حاکی از تکرارپذیری قابل‌قبول آپتاسنسور الکتروشیمیایی بود. برای بررسی تکثیر پذیری انحراف استاندارد نسبی پیک‌های جریان ۷/٤ درصد به دست آمد که نشان از تکثیر پذیری خوب آپتاسنسور الکتروشیمیایی داشت. نتایج نشان داد که پاسخ آپتاسنسور بعد از گذشت ۸ روز تنها ۷ درصد در مقایسه با روز اول، کاهش می‌یابد که نشان از پایداری مطلوب آپتاسنسور دارد. محدوده درصد ریکاوری برای نمونه‌های شیر گاو در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر به ترتیب ۸٦/۵ و ۹۳ درصد به دست آمد که نشان از درصد ریکاوری قابل‌قبول آپتاسنسور الکتروشیمیایی پیشنهادشده داشت.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

۱- مقدمه

مصرف لبنیات مخصوصاً شیر که سرشار از کلسیم، فسفر، پروتئین و اسیدهای آمینه موردنیاز بوده همواره مورد تأکید بوده است. تحقیقات مختلفی نشان داده‌اند که ارتباط قوی بین مصرف شیر و فراورده‌های لبنی با کاهش فشارخون، افزایش ضریب هوشی، کاهش ابتلا به انواع بیماری و پیشگیری از پوکی استخوان وجود دارد. ازاین‌رو بهداشت و سلامت شیر و فرآورده‌های آن بسیار حائز اهمیت است. مصرف خوراک آلوده توسط دام سبب بروز اختلال در چرخه سلامت دام، شیر و مصرف‌کننده می‌گردد [۱]. شیر در فرایند تولید تا مصرف در معرض آلودگی‌های مختلف میکروبی و شیمیایی قرار دارد. ازجمله مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های شیر می‌توان به آفلاتوکسین M1 اشاره نمود. آفلاتوکسین سرطان‌زا بوده و در برابر پاستوریزاسیون مقاوم می باشد تا حدی که فرایند های حرارتی اعمال شده برای تولید فراوره های لبنی نمی‌تواند از میزان پایداری آن بکاهد و در فراورده هایی مانند ماست و پنیر تا حدی باقی می ماند[۲]. تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی آفلاتوکسین M1 مورد استفاده قرارگرفته است ازجمله: کروماتوگرافی مایع با کارایی بال ا[۲]، الایزا [۳] روش‌های میکروبی [٤]، کروماتوگرافی لایه‌نازک [٥] و کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی [٦]. اگرچه این روش‌ها برای شناسایی آفلاتوکسین M1 حساس، دقیق و اختصاصی هستند اما وقت‌گیر، هزینه‌بر و نیازمند کاربر آموزش‌دیده، تجهیزات حجیم و آماده‌سازی پیچیده نمونه هستند. به دلیل به‌کارگیری آسان، پاسخ سریع، تجهیزات ساده و ارزان‌قیمت آپتاسنسورهای الکتروشیمیایی توجه ویژه‌ای را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده‌اند [۸ و ۷].

آپتاسنسورها در حقیقت سنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر آپتامر هستند که به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصربه‌فرد مثل پایداری عالی، ساختار سه‌بعدی خاص، سازگاری با محیط‌زیست، سنتز آسان و قابلیت اتصال بالا با آنالیت خود، برای شناسایی آنالیت‌های مختلف همواره موردتوجه بوده‌اند [۹و ۱۰و ۱۱]. تکنولوژی صفحه-چاپی (Screen-printing) که به‌صورت اختصاصی برای کاربرد در میکروالکترونیک در نظر گرفته می‌شود، به‌طور قابل‌توجهی در ساخت الکترودها برای بیوسنسورهای الکتروشیمیایی یک‌بارمصرف و از قبل آماده شده نیز مورداستفاده قرار می‌گیرند. فناوری صفحه-چاپی تاثیر قابل ملاحظه ای در ظریف سازی سیستم ها و حسگرهای الکتروشیمیایی داشته است و جایگزین روشهای سنتی و حجیم قدیمی شده و با تولید انبوه حسگرهای نواری یکبار مصرف همراه با دستگاههای الکترونیکی کوچک، توانسته پاسخگوی این نیاز باشد [۱۲]. یک الکترود صفحه چاپی (SPE) ویژگی‌هایی ازجمله: ساده، ارزان، قابل‌حمل، استفاده آسان و اندازه کوچک را دارد. علاوه بر این، در الکترود صفحه چاپی فرایند تمیز کردن برخلاف الکترودهای معمولی مانند الکترود کربن شیشه‌ای حذف می‌شود[۱۳]. الکترود صفحه چاپی برخلاف اکثر سیستم‌های دو و یا سه الکترودی مرسوم که به‌طور مکرر نیازمند کالیبراسیون مجدد هستند و نیاز به شست و شو دارند، این محدودیت‌ها را ندارد [۱٤] و [۱٥]. این مشکلاتی که در کار با سیستم‌های الکترودی مرسوم وجود دارد باعث شده تا کاربردهای کمتری در مقایسه با الکترودهای صفحه چاپی داشته باشند[۱٥]. الکترودهای صفحه چاپی، بصورت انبوه برروی بستر مناسب چاپ می شوند. هر نوار حسگر از اجزای مختلفی نظیر بستر، مدار اتصال، الکترود کار، الکترود مرجع، الکترود کمکی و لایه عایق تشکیل شده که به ترتیب و بصورت جداگانه بر روی بستر چاپ می شوند[۱٦].

به منظور بهبود عملکرد آپتاسنسورهای الکتروشیمیایی معمولاً از نانو مواد استفاده می‌گردد. در میان نانو مواد مختلف، نانو ذرات مغناطیسی به علت افزایش سطح الکترود و هدایت الکتریکی و همچنین بهبود فرایند انتقال الکترون در سطح الکترود در آپتاسنسورهای الکتروشیمیایی مورداستفاده قرار گرفته است [۱۷]. نانو ذرات طلا نیز به خاطر ساختار منحصربه‌فرد، پایداری عالی و نسبت سطح به حجم بالا برای کاربرد در آپتاسنسورهای الکتروشیمیایی ایده آل هستند. ترکیب نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا فرایند الکترون و هدایت الکتریکی را بیشتر افزایش می‌دهد[۱۸].

با توجه به اهمیت توسعه روش‌های سریع و اختصاصی در زمینه امنیت و بهداشت مواد غذایی ازجمله شیر، در مطالعه حاضر یک آپتاسنسور الکتروشیمیایی ولتامتریک مبتنی بر الکترود صفحه-چاپی اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا به‌منظور سنجش غلظت AFM1 در نمونه‌های شیر بعنوان یک روش کارآمد، سریع و مقرون به صرفه معرفی شد. نقطه بحرانی این آپتاسنسور اثر مضاعف درافزایش نرخ انتقال الکترون و روند تشخیص آنالیت بدلیل استفاده همزمان از دو

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

نانو ذره بوده، بعلاوه استفاده از آپتامر بعنوان یک مولکول زیستی، موجب افزایش قابلیت اتصال به آنالیت در سنسور گردیده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-سیستم اندازه‌گیری

کلیه بررسی‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستات/گالوانواستات که ازیک‌طرف با الکترود صفحه-چاپی و از طرف دیگر با رایانه ارتباط داشت انجام شد. از الکترود کربن به‌عنوان الکترود کاری با مساحت مؤثر ۷/۰۷ میلی‌متر مربع، نقره به‌عنوان الکترود مرجع و کربن به‌عنوان الکترود کمکی استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام گردید. در شکل (۱) تصویر واقعی الکترود صفحه-چاپی آورده شده است.

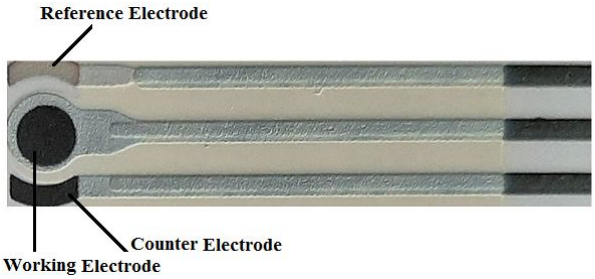

Fig 1 Real image of the screen-printed electrode (SPE) used.

۲-۲-تکنیک ولتامتری چرخه‌ای

تکنیک ولتامتری چرخه‌ای روشی مؤثر و کاربردی برای به دست آوردن اطلاعات مهم از مکانسیم واکنش‌ها و رفتارهای الکتروشیمیایی در سطح الکترود کاری در محفظه الکتروشیمیایی است. در این مطالعه به‌منظور فعال‌سازی الکترود صفحه-چاپی و مطالعه رفتار الکتروشیمیایی مراحل مختلف اصلاح الکترود درون محلول ۱ میلی مولار فری-فروسیانید در محدوده پتانسیل ۰/۳- تا ۰/۷ ولت استفاده گردید.

۲-۳-فعال‌سازی الکترود صفحه-چاپی

مطالعات بسیاری فرایند فعال‌سازی را قبل از مشخصه یابی الکترود کاری به‌خصوص الکترود صفحه-چاپی در تحلیل‌های الکتروشیمیایی پیشنهاد کرده‌اند [۱۹و ۲۰]. برای این هدف، قبل از اصلاح سطح الکترود با نانو ذرات مغناطیسی و طلا، الکترود صفحه-چاپی با اعمال پتانسیل در محدوده ۱/۵- تا ۱+ ولت در مقابل الکترود مرجع در محلولی که ترکیبی از اسیدسولفوریک و پتاسیم کلرید بود فعال‌سازی شد[۲۱و ۲۲].

۲-٤-آماده‌سازی و تثبیت نانو ذرات مغناطیسی

در این مطالعه نانو ذرات مغناطیسی به روش هم رسوبی تهیه شد [۲۳]. بطور خلاصه، برای این منظور کلرید آهن(II) و (III) در اتمسفری از نیتروژن در دمای ۸۵ درجه سلسیوس در آب دو بار تقطیر حل شدند. قبل از شروع آزمایش‌ها نانوذره مغناطیسی در متانول حل و در معرض اولتراسونیک قرار گرفت. برای تثبیت نانو ذرات مغناطیسی میزان ٤ میکرو لیتر بر روی سطح الکترود کاری چکانده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق خشک شد[۲٤].

۲-۵-تثبیت نانو ذرات طلا

تثبیت نانو ذرات طلا به روش رسوب‌دهی الکتریکی انجام شد. در این راستا بعد از فعال‌سازی الکترود صفحه چاپی و تثبیت نانو ذرات مغناطیسی بر روی آن، در پتانسیل ۰/۳- ولت درون محلول $HAuCl_4.3H_2O$ در زمان‌های مختلف رسوب‌دهی (٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ ثانیه) تکنیک ولتامتری چرخه‌ای اعمال گردید. پس ازآن تکنیک ولتامتری چرخه ای برای الکترود اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا درون محلول نیترات پتاسیم در محدوده ۰/۵- تا ۱/۵+ ولت انجام گرفت.

۲-٦-تثبیت آپتامر

جهت تثبیت آپتامر از توالی اختصاصی آفلاتوکسین M1 با ۲۱ نوکلئوتید (5′-SH-ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAT-3′) با خالص‌سازی HPLC، با وزن مولکولی ٦۷۰۹/۰۳ که توسط شرکت Bioneer (Daejeon, South Korea) سنتز شده بود، استفاده شد. ابتدا توالی آفلاتوکسین M1 در آب دیونیزه رقیق شد و سپس در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای شکستن پیوندهای دی سولفیدی آپتامر، دی تیو تریتول با نسبت حجمی ۱:۵ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه شد. سپس غلظت ٦ میکرو مولار بر روی سطح الکترود کاری چکانده شد و در دمای اتاق خشک شد. بعد از تثبیت آپتامر، الکترود اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا، آفلاتوکسین M1 چکانده شده و در دمای اتاق خشک شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

۲-۷-آماده‌سازی نمونه‌های شیر

از نمونه های شیر گاو که از یک فروشگاه محلی تهیه‌شده بود، به‌عنوان نمونه حقیقی استفاده گردید. سپس آفلاتوکسین M1 با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر به نمونه‌ها تزریق گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط حمام آب (٤٠ درجه سلسیوس) قرار گرفت. بعدازآن در متانول رقیق شد و با دور ۵۰۰۰ دور در رقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. با محاسبه درصد ریکاوری از نسبت مقدار شناسایی‌شده به مقدار تزریق‌شده، عملکرد آپتاسنسور الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-اثر فعال‌سازی الکترود صفحه-چاپی بر جریان

همان‌طور که در بخش ۲-۳ اشاره شد فعال‌سازی الکترود کاری از جنس صفحه-چاپی ضروری است. به همین دلیل اثر فعال‌سازی الکترود صفحه-چاپی در سولفوریک اسید و ضرورت آن در این بخش موردبحث قرارگرفته است. قبل از فعال‌سازی، الکترود صفحه-چاپی توسط روش ولتامتری چرخه‌ای در محدوده ۰/۲- تا ۰/۷ ولت در محلول ۱ میلی مولار فری-فرو سیانید با سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه مشخصه یابی شد. متعاقباً فرایند فعال‌سازی محدوده ۱/۵- تا ۱+ در محلول اسیدسولفوریک و پتاسیم کلرید انجام شد و به‌طور مشابه ولتاگرام چرخه‌ای در محدوده ۰/۲- تا ۰/۷ ولت در محلول ۱ میلی مولار فری-فرو سیانید برای آن ثبت گردید. با فعال‌سازی الکترود، لایه‌های اکسیداسیون حذف و سطوح با مکان‌های فعال بیشتری در سطح الکترود صفحه-چاپی در مقایسه با الکترود فعال نشده مشاهده شد که برای بهبود عملکرد الکتروشیمیایی آپتاسنسورها کاربردی هستند[۲۱] و [۲۵]. همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده شده است پیک جریان برای الکترود صفحه-چاپی فعال نشده و فعال‌شده به ترتیب ۳۲ و ٤١/٥ میلی‌آمپر به دست آمد که با فعال‌سازی، پیک جریان ۳۰ درصد در مقایسه با حالت قبل افزایش یافته است.

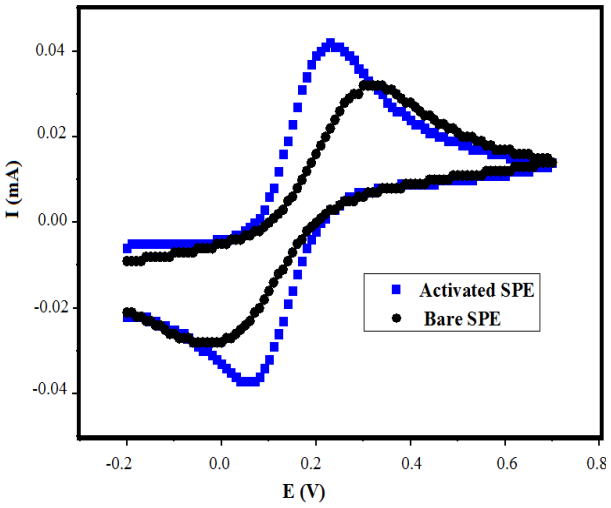

Fig 2 Cyclic voltammograms of activated and bare SPEs.

۳-۲-بهینه‌سازی زمان تثبیت نانو ذرات طلا

رسوب نانو ذرات طلا به دلیل نقش حساسی که در شناسایی و تحلیل آنالیت‌های مختلف دارند بسیار مهم است. زمان رسوب‌دهی می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر اندازه و مقدار رسوب نانو ذرات طلا روی الکترود صفحه چاپی داشته باشد[۱۳]. ولتاگرام چرخه‌ای در شکل (۳) برای زمان‌های مختلف نشان داده شده است. با افزایش زمان رسوب‌دهی پیک اکسایش و کاهش از ٦٠ تا ١٥٠ ثانیه افزایش یافته و در ۱۸۰ ثانیه کاهش یافته است (شکل ٤). برای اطمینان از رفتار الکتروشیمیایی بهتر الکترود صفحه-چاپی، زمان ۱۵۰ ثانیه با توجه به حداکثر پیک جریان به‌دست‌آمده برای آن، به‌عنوان زمان بهینه برای رسوب‌دهی نانو ذرات طلا انتخاب گردید.

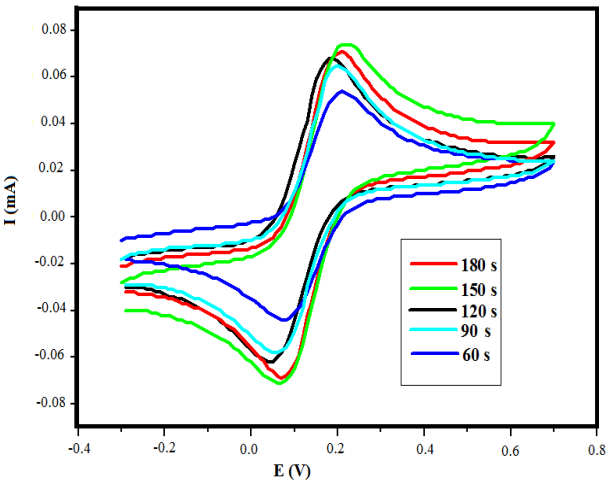

Fig 3 Cyclic voltammograms of GNPs modified SPE with different deposition time from 60 s to 180 s in 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6$/ $K_4Fe(CN)_6$ (0.1 M KCl).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

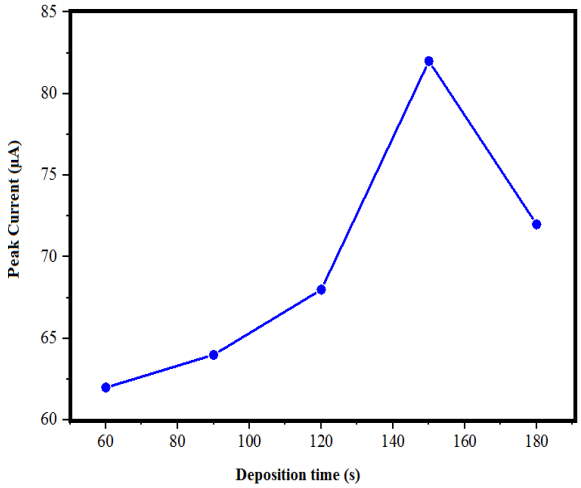

Fig 4 Curve of reduction current *vs* deposition time

۳-۳-بررسی رفتار الکتروشیمیایی

به‌منظور بررسی عملکرد آپتاسنسور الکتروشیمیایی پیشنهادی از روش ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. در شکل (۵)، پیک جریان مربوط به روش ولتامتری چرخه‌ای در مراحل مختلف آماده‌سازی شامل الکترود فعال نشده، الکترود فعال شده، تثبیت نانو مغناطیسی، نانو ذرات طلا، آپتامر و آفلاتوکسین M1 درون محلول حاوی ۱ میلی مولار فری- فرو سیانید با ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید، با سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه آورده شده است. بر طبق شکل (۵) بعد از فعال‌سازی الکترود، پیک جریان از ۳۵ میکرو آمپر به ٤۱ میکرو آمپر افزایش یافته است. با تثبیت نانو ذرات مغناطیسی بر روی الکترود کاری کربن پیک جریان به دلیل افزایش فرایند انتقال الکترون از ٤۱ به ۵۳ میکرو آمپر افزایش پیدا کرد. با قرار گرفتن نانو ذرات طلا، روی الکترود اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی پیک جریان مربوط به الکترولیت فری- فرو سیانید از ۵۳ به ۸۲ میکرو آمپر افزایش یافت که علت آن را می‌توان در هدایت الکتریکی بالای نانو ذرات طلا نسبت به نانو ذرات مغناطیسی دانست که با نتایج Tig و همکاران ۲۰۲۰مطابقت دارد. با تثبیت آپتامر بر روی سطح الکترود اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا، پیک جریان به دلیل دافعه الکترواستاتیک بین فری- فرو سیانید و آپتامر که هر دو دارای بار منفی هستند تا ۳۲ میکرو آمپر کاهش پیدا کرد. با قرار گرفتن آفلاتوکسین M1 بر روی سطح الکترود اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی، نانو ذرات طلا و آپتامر به دلیل پر شدن جایگاه‌های فعال از طریق اتصال به آپتامر پیک جریان در مقایسه با حالت قبل (تثبیت آپتامر) کاهش بیشتری یافت.

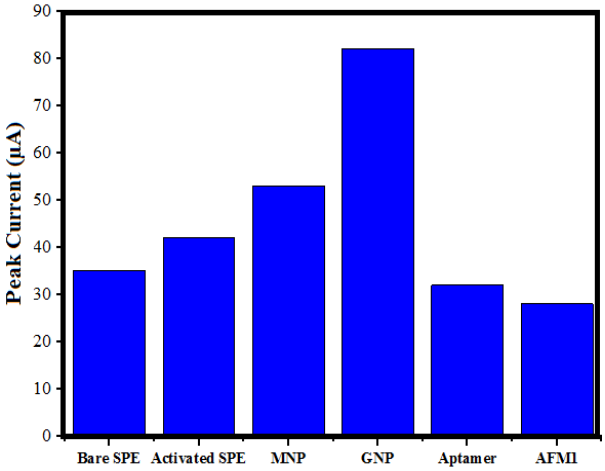

Fig 5 Peak current obtained by CV method for bare SPE, activated SPE, magnetic nanoparticle (MNP), gold nanoparticle (GNP), Aptamer, and Aflatoxin M1 (AFM1)

۳-٤-منحنی کالیبراسیون

با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای، منحنی کالیبراسیون بر تفاضل پیک جریان در قبل و بعد از تثبیت آفلاتوکسین M1 ترسیم شد. محور عمودی تغییرات پیک جریان بر حسب میکرو آمپر و محور افقی غلظت‌های مختلف AFM1 را نشان می‌دهد (شکل ٦). منحنی کالیبراسیون رنج غلظت خطی ۷۰۰-۱۰۰ نانوگرم بر لیتر را ارائه داد. همچنین رابطه خطی بین غلظت و تغییرات پیک جریان از رابطه (۱) تبعیت نمود:

$$R^2 = 0.9897 \quad y = 0.0209.x + 2.14$$ رابطه (۱)

که در آن y نشان‌دهنده تغییرات پیک جریان بر حسب میکرو آمپر و x غلظت آنالیت است. به‌منظور محاسبه حد تشخیص (LOD) از رابطه (۲) استفاده شد.

$$\text{Limit of detection}=3S_{blank}/a$$ رابطه (۲)

در رابطه ۲، LOD، حد تشخیص کمی، S_{blank} انحراف استاندارد نمونه شاهد (بدون حضور آفلاتوکسین M1) a شیب منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت خطی است. طبق رابطه (۲)، حد تشخیص برای شناسایی AFM1 ۵۰ نانوگرم بر لیتر تخمین زده شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

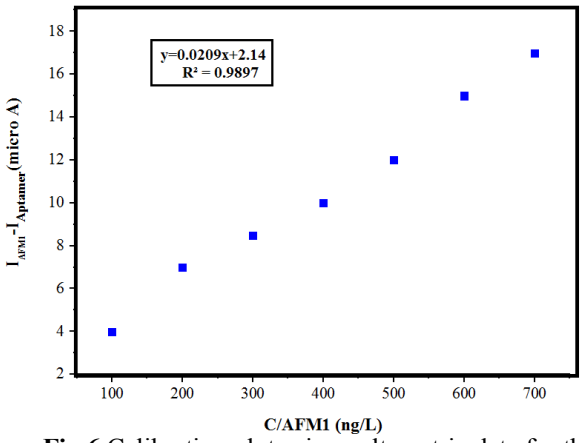

Fig.6 Calibration plot using voltametric data for the aptasensor in the presence of different concentrations of AFM1 (100, 200, 300, 400, 500,600 and 700 ng/L).

۳-۵-تکرارپذیری، تکثیر پذیری و پایداری آپتاسنسور

جهت ارزیابی تکرارپذیری آپتاسنسور، ابتدا یک الکترود که نانو ذرات مغناطیسی و طلا بر روی آن تثبیت شده بودند، آپتامر و آنالیت تحت شرایط مشخص بر روی آن چکانده شدند. با اندازه‌گیری درصد انحراف استاندارد نسبی (۳/۲) با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای، تکرارپذیر بودن آپتاسنسور برای شناسایی آفلاتوکسین تأیید گردید.

به‌منظور سنجش تکثیر پذیری آپتاسنسور، ابتدا چهار الکترود به‌صورت کاملاً مستقل تحت شرایط یکسان ساخته شد. برای این منظور، ابتدا نانو ذرات مغناطیسی و طلا و سپس محلول آپتامر بر روی آن تثبیت شدند. در ادامه ۲ میکرو لیتر از محلول آنالیت بر روی آن چکانده شد و در دمای اتاق خشک شد. با اندازه‌گیری انحراف استاندارد نسبی (۷/٤ درصد) مربوط به پیک جریان با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای، مشخص گردید که تکثیر پذیری آپتاسنسور نسبتاً قابل‌قبول است.

اثر مدت‌زمان ذخیره‌سازی آپتاسنسور بر داده‌های پیک جریان به‌منظور بررسی پایداری آپتاسنسور موردبررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی پایداری زیست حسگر، ابتدا الکترود کاری با نانو ذرات مغناطیسی و طلا اصلاح شد. سپس به ۲ میکرو لیتر از محلول آپتامر با غلظت ٦ میکرو مولار بر روی آن چکانده شد و به مدت ۸ روز در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری گردید. با اندازه‌گیری داده‌های پیک جریان بعد از گذشت ۸ روز مشخص گردید که آپتاسنسور توانسته است ۹۳ درصد از پاسخ اولیه خود را حفظ کند. بنابراین می‌توان گفت که پایداری آپتاسنسور تا ۸ روز با مقایسه پاسخ اولیه و نهایی قابل‌قبول است. Kaur و همکاران ۲۰۱۹ نتایج مشابهی در رابطه با بررسی عملکرد آپتاسنسور الکتروشیمیایی ساخته شده جهت شناسایی اکراتوکسین A ارائه دادند[۹].

۳-٦-آنالیز نمونه‌های حقیقی

کاربرد عملی آپتاسنسور ساخته‌شده برای شناسایی آفلاتوکسین در شیر گاو مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا آپتاسنسور در شرایط بهینه ساخته شد و نمونه شیر به حجم ۲ میکرو لیتر با غلظت‌های مشخصی از آنالیت (۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر) بر روی الکترود کاری چکانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شد، سپس روش ولتامتری چرخه‌ای درون محلول فری-فروسانید برای آن ثبت گردید. درصد ریکاوری از نسبت غلظت اندازه‌گیری‌شده به غلظت تزریق‌شده محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول (۱) آورده شده است محدوده ریکاوری برای نمونه‌های شیر ۸٦/۵ تا ۹۳ درصد برای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر حاصل شد که حاکی از درصد ریکاوری مطلوب آپتاسنسور پیشنهادی دارد.

Table 1 Detection of AFM1 using aptasensor in real samples.

Actual sample	Spiked (ng/L)	measured (ng/L)	Recovery (%)
Cow milk	100	86.5	86.5
	200	186	93.0

٤-نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، یک آپتاسنسور الکتروشیمیایی اقتصادی، پرتابل، تکثیر پذیر، تکرارپذیر و پایدار برای شناسایی حساس و دقیق آفلاتوکسین M1 پیشنهاد شد. برای ساختن آپتاسنسور الکتروشیمیایی از یک الکترود صفحه چاپی به‌عنوان سیستم اندازه‌گیری متصل به دستگاه پتانسیواستات به‌عنوان مبدل و رایانه که با نانو مواد شامل نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا اصلاح شده بود، استفاده شد. بعد از چکاندن آپتامر اختصاصی و آنالیت بر روی سطح الکترود کاری از جنس کربن اصلاح‌شده، از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای برای پایش رفتار الکتروشیمیایی تغییرات سطح الکترود در مراحل مختلف بهره برده شد. به‌طورکلی نتایج نشان داد که نانو ذرات و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

همچنین آپتامر به‌صورت موفقیت‌آمیزی بر روی سطح الکترود کاری تثبیت شده‌اند. بررسی مشخصه‌های عملکردی آپتاسنسور شامل تکراری پذیری، تکثیر پذیری و پایداری قابلیت آپتاسنسور الکتروشیمیایی را برای شناسایی دقیق و حساس آفلاتوکسین M1 تائید کرد. آنالیز نمونه‌های شیر حاوی آفلاتوکسین M1 با استفاده از آپتاسنسور الکتروشیمیایی نیز محدوده درصد ریکاوری قابل‌قبول را نشان داد.

۵- منابع

[1] Ranjbar, S., Noori, M., Nazari, R, 2010, Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province, *Journal of Cell & Tissue*, 1(1), 9-18 (in Persian).

[2] da Silva Alves, A. M., de Souza Lima, P. H., da Costa, M. A. S., da Silva, C. B., dos Santos Sousa, J., Pereira, D. D. S. T., & de Freitas, J. D, 2018, Determination of aflatoxin M1 in bovine milk from the Alagoas/Brazil State dairy belt by high performance liquid chromatography (HPLC), *African Journal of Microbiology Research,* 12(25), 580-586.

[3] Schwartzbord, J., Severe, L., & Brown, D, 2017, Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC, *Biomarkers*, 22(1), 1-4.

[4] Assaf, J. C., Nahle, S., Chokr, A., Louka, N., Atoui, A., & El Khoury, A, 2019, Assorted methods for decontamination of aflatoxin M1 in milk using microbial adsorbents, Toxins, 11(6), 304.

[5] Scussel, V. M, 2003, Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M1 in milk and B1 in eggs, *Food Science and Technology*, 23, 46-52.

[6] Wang, H., Zhou, X. J., Liu, Y. Q., Yang, H. M., & Guo, Q. L, 2011, Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography− tandem mass spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3532-3538.

[7] Niazi, S., Khan, I. M., Yu, Y., Pasha, I., Lv, Y., Mohsin, A., & Wang, Z. 2020. A novel fluorescent aptasensor for aflatoxin M1 detection using rolling circle amplification and g-C3N4 as fluorescence quencher. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 128049.

[8] He, L., Shen, Z., Wang, J., Zeng, J., Wang, W., Wu, H., & Gan, N, 2020, Simultaneously responsive microfluidic chip aptasensor for determination of kanamycin, aflatoxin M1, and 17β-estradiol based on magnetic tripartite DNA assembly nanostructure probes, *Microchimica Acta*, 187(3), 1-11.

[9] Kaur, N., Bharti, A., Batra, S., Rana, S., Rana, S., Bhalla, A., Prabhakar, N, 2019, An electrochemical aptasensor based on graphene doped chitosan nanocomposites for determination of Ochratoxin A, *Microchemical Journal*, 144, 102–109.

[10] Kang, M., Li, Z., Hu, M., Oderinde, O., Hu, B., He, L., & Du, M, 2020, Bimetallic MnCo oxide nanohybrids prepared from Prussian blue analogue for application as impedimetric aptasensor carrier to detect myoglobin, *Chemical Engineering Journal*, 125117.

[11] Azri, F. A., Eissa, S., Zourob, M., Chinnappan, R., Sukor, R., Yusof, N. A., & Jinap, S, 2020, Electrochemical determination of zearalenone using a label-free competitive aptasensor, *Microchimica Acta*, 187, 1-10.

[12] Tangkuaram, T., Ponchio, C., Kangkasomboon, T., Katikawong, P., & Veerasai, W, 2007, Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10), 2071-2078.

[13] Renedo, O. D., & Martinez, M. J. A, 2007, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes, *Analytica chimica acta*, 589(2), 255-260.

[14] Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martínez, M. A, 2007, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta*, 73(2), 202-219.

[15] Thiyagarajan, N., Chang, J. L., Senthilkumar, K., & Zen, J. M, 2014, Disposable electrochemical sensors: A mini review, *Electrochemistry communications*, 38, 86-90.

[16] Chan, K. F., Lim, H. N., Shams, N., Jayabal, S., Pandikumar, A., & Huang, N. M,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

[21] Wan, H., Sun, Q., Li, H., Sun, F., Hu, N., & Wang, P, 2015, Screen-printed gold electrode with gold nanoparticles modification for simultaneous electrochemical determination of lead and copper, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 336-342.

[22] Istamboulié, G., Paniel, N., Zara, L., Granados, L. R., Barthelmebs, L., & Noguer, T, 2016, Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk, *Talanta*, 146, 464-469.

[23] Radoń, A., Drygała, A., Hawełek, Ł., & Łukowiec, D, 2017, Structure and optical properties of Fe_3O_4 nanoparticles synthesized by co-precipitation method with different organic modifiers, *Materials Characterization*, 131, 148-156.

[24] Hemmati, M. H., & Ekrami-Kakhki, M. S, 2018, Electrochemical sensor for sulfite determination based on a nanostructured Fe_3O_4 modified electrode, *Analytical & bioanalytical electrochemistry*, 10(5), 576-586.

[25] Su, W. Y., Wang, S. M., & Cheng, S. H, 2011, electrochemically pretreated screen-printed carbon electrodes for the simultaneous determination of aminophenol isomers, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 651(2), 166-172.

2016, Fabrication of graphene/gold-modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen, *Materials Science and Engineering: C,* 58, 666-674.

[17] Fang, S., Dong, X., Liu, S., Penng, D., He, L., Wang, M., & Zhang, Z, 2016, A label-free multi-functionalized electrochemical aptasensor based on a Fe_3O_4@ 3D-rGO@ plasma-polymerized (4-vinyl pyridine) nanocomposite for the sensitive detection of proteins in whole blood, *Electrochimica Acta*, 212, 1-9.

[18] Tıg, G. A., & Pekyardımc, Ş, 2020, An electrochemical sandwich-type aptasensor for determination of lipocalin-2 based on graphene oxide/polymer composite and gold nanoparticles, *Talanta*, 210, 120666.

[19] Bernalte, E., Sánchez, C. M., & Gil, E. P, (2011), Determination of mercury in ambient water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes, *Analytica chimica acta*, 689(1), 60-64.

[20] Rueda-Holgado, F., Bernalte, E., Palomo-Marín, M. R., Calvo-Blazquez, L., Cereceda-Balic, F., & Pinilla-Gil, E, (2012), Miniaturized voltammetric stripping on screen printed gold electrodes for field determination of copper in atmospheric deposition, *Talanta*, 101, 435-439.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Detection of aflatoxin M1 in milk using electrochemical aptasensor based on screen printed electrode and cyclic voltammetry method

Ahmadi, S. F. [1], Hojatoleslami, M. [2*], Kiani, H. [3], Molavi, H. [4], Ahmadi, S. Kh. [5]

1. PHD Student, Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University,Shahrekord, Iran.
2. Assoc. Prof.,Department of Food Science and Technology, Shahrekord branch,Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Assist. Prof., Bioprocessing and Biodetection Lab, Department of Food science and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran. Assist.
4. Assist. Prof., Department of Food Science and Technology, Shahrekord branch,Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
5. M.Sc. Student, Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2020/ 10/ 06
Accepted 2020/ 11/ 10

Keywords:

Aptasensor,
Electrochemical Biosensor,
Gold Nanoparticles,
Magnetic Nanoparticles,
Cyclic Voltammetry.

DOI: 10.52547/fsct.18.05.02

*Corresponding Author E-Mail:
mohojjat@gmail.com

ABSTRACT

Milk, from its production to consumption, is exposed to a variety of microbial and chemical contaminants. Aflatoxin M1 (AFM1) is one of the most important contaminants in milk, which has always received attention due to its carcinogenic and destructive effects on the consumer. Accordingly, the rapid, sensitive, and cost-effective identification of AFM1 in milk is essential. In the present paper, an *electrochemical aptasensor based* on screen printed electrode (SPE) modified with magnetic nanoparticles (MNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) was proposed to identify AFM1 in cow milk samples. SPE was activated by applying a potential within the range of -1.5 to +1 V versus the reference electrode at a scan rate of 200 mV/s for 5 continuous cycles in the 0.5 M sulfuric acid and 0.1 M potassium chloride solution. Changes of the electrode surface at different stages of preparation were assessed using cyclic voltammetry (CV) technique. Using CV in optimal conditions, it was found that the aptasensor presents a concentration range of 100-700 ng/l and a limit of detection (LOD) of 50 ng/l. There was a linear relationship between changes of the current peak (ΔI) and analyte concentration. This relationship follows the regression equation of $\Delta I=0.0209C+2.14$ ($R^2=0.9897$). Calculation of the relative standard deviation (RSD=3.2%) indicated the acceptable repeatability of the electrochemical aptasensor. The current peak was obtained to be 7.4% in the investigation of RSD reproducibility, indicating the good reproducibility of the electrochemical aptasensor. The obtained results showed that the aptasensor response after 8 days has only reduced by 7% compared to the first day, indicating the desirable stability of the aptasensor. The recovery percentage range for cow milk samples at concentrations of 100 and 200 ng/l was obtained to be 86.5 and 93%, respectively, showing the acceptable recovery percentage of the electrochemical aptasensor.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.15]