

ساخت یک آپتاسگر آمپرومتریک برای تعیین میزان باقی مانده آنتی بیوتیک در شیر

آیت محمدرزاداری^۱، مهدی قاسمی ورنامخواستی^{۲*}، سجاد رستمی^۲،
علی اصغر انصافی^۳، زهرا ایزدی^{۴*}، مجتبی بنیادیان^۵

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۲- دانشیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۳- استاد، گروه شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۴- استادیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۵- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۲۸)

چکیده

تشخیص کمی باقی مانده‌های دارویی در مواد غذایی با منشأ حیوانی اهمیت ویژه‌ای دارد. استفاده مفرط از داورهای دامپزشکی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها به علت باقی ماندن در فرآورده‌های دامی مثل گوشت، شیر، تخم‌مرغ، تهدید جدی برای مصرف‌کننده است. شناسایی سریع آنتی بیوتیک با استفاده از ابزاری کارآمد، سریع، مقرون به صرفه و اختصاصی برای کاهش خطر و کنترل امنیت غذایی ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر، یک آپتاسگر مبتنی بر الکتروود مداد گرافیتی اصلاح شده با نانوموادها شامل گرافن و طلا جهت تشخیص سریع آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در نمونه‌های شیر توسعه داده شد. تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و پالس تفاضلی برای ارزیابی پاسخ آپتاسگر مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور اصلاح الکتروود مداد گرافیتی نرخ‌رویش (۴۰ میلی ولت بر ثانیه) و تعداد سیکل (۱۰) و زمان تثبیت گرافن (۹۰ دقیقه) بهینه شدند. تحت شرایط بهینه، با استفاده از تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی مشخص شد که در محدوده 1×10^{-12} تا 1×10^{-5} مولار با افزایش غلظت، جریان به طور خطی افزایش می‌یابد ($R^2=0.985$). حد تشخیص کمی آپتاسگر $1/4 \times 10^{-13}$ مولار به دست آمد. بررسی مشخصه‌های عملکردی شامل تکرارپذیری، تکثیرپذیری، پایداری و انتخاب پذیری حاکی از کارایی قابل قبول آپتاسگر داشت. درصد بازیابی آپتاسگر در نمونه‌های شیر بین ۹۲/۸ تا ۹۸/۴ درصد به دست آمد. در مجموع آپتاسگر ساخته شده کارایی لازم را برای شناسایی تتراسایکلین در نمونه‌های شیر داشت.

کلید واژگان: آپتاسگر، آمپرومتریک، آنتی‌بیوتیک، نانو مواد، ولتامتری پالس تفاضلی.

۱- مقدمه

امروزه مصرف بیش از حد داورها در دامها که با اهدافی همچون درمان، پیشگیری و کنترل بیماری‌های مختلف انجام می‌شود، خطرات جبران‌ناپذیری متوجه مصرف‌کننده نهایی می‌کند [۱]. یکی از رایج‌ترین داروها آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که اگر مقدار مصرفی آن‌ها بیش از حد مجاز باشد منجر به ماندن بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت، شیر و تخم‌مرغ می‌شود. مواد غذایی آلوده با آنتی‌بیوتیک از جمله تتراسایکلین‌ها، تهدیدی جدی برای سلامت مصرف‌کننده محسوب می‌شوند و حتی در برخی موارد منجر به افزایش مقاومت باکتریایی عمومی در بدن انسان می‌شوند [۲]. به منظور جلوگیری از اثرات منفی آنتی‌بیوتیک‌ها، اکثر کشورها حداکثر میزان باقی‌مانده (MRLs) را مشخص کرده‌اند. اتحادیه اروپا MRLs را برای برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص نموده است. به عنوان مثال MRL برای پنی‌سیلین در شیر ۴ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شده است [۳].

برای تعیین میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی روش‌های مختلفی وجود دارد. بیشتر روش‌های مورد استفاده آزمایش‌های بازدارنده میکروبی هستند که تحت عنوان آزمایش‌های غربالگری معروفند. این روش‌ها شامل رشد باکتری‌هایی مانند باسیلوس استناروترموفیلوس (*Bacillus stearothermophilus*) است که در صورت وجود آنتی‌بیوتیک در شیر، رشد آن کم و یا متوقف می‌شود [۴]. انجام آزمایش‌های بازدارنده باکتریایی زمان‌بر بوده و توجیه اقتصادی ندارد. از دیگر روش‌های شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان به کروماتوگرافی مایع، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و اسپکترومتری جرمی اشاره نمود [۵]. اگرچه این روش‌ها دقیق هستند اما نیازمند تجهیزات حجیم و گران‌قیمت، آماده‌سازی پیچیده نمونه، کاربر متخصص و گرمخانه‌گذاری طولانی مدت هستند [۶].

اندازه‌گیری میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مراحل مختلف تولید و فرآوری مواد غذایی، نیازمند توسعه یک روش سریع، اختصاصی است که کنترل بهتر و کاهش ریسک در مصرف‌کنندگان را دربر داشته باشد. یکی از روش‌هایی که محدودیت روش‌های اشاره شده در بالا را ندارد، آپتاسگر اختصاصی جهت شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها است [۷]. آپتاسگرها در واقع حسگرهای مبتنی بر آپتامر (تک رشته

کوتاه DNA یا RNA) هستند که قابلیت بالایی برای اتصال به آنالیت‌های مختلف، از جمله ماکرو مولکول‌ها، ویروس‌ها و پروتئین‌ها دارند [۸].

در سال‌های اخیر استفاده از نانوموادها برای افزایش حساسیت آپتاسگرها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. از جمله نانوموادها می‌توان به نانورقه‌های گرافن و نانو ذرات طلا اشاره نمود. گرافن به خاطر داشتن هدایت الکتریکی قابل‌قبول و همچنین فعالیت‌های مکانیکی و حرارتی برای استفاده در زیست حسگرهای الکتروشیمیایی از جمله آپتاسگرها باهدف اصلاح سطح الکتروود مناسب است [۹]. از طرفی نانو ذرات طلا به خاطر داشتن ساختار منحصر به فرد، هدایت الکتریکی خوب و خواص کاتالیتیکی برای شناسایی آنالیت‌های مختلف و بهبود رسانایی آپتاسگرها ایده‌آل هستند [۱۰].

تابحال مطالعاتی در خصوص شناسایی بقایای آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در مواد غذایی گزارش شده است که می‌توان به ژو و همکاران (۲۰۱۲)، چن و همکاران (۲۰۱۴)، ژانگ و همکاران (۲۰۱۶)، اویانگ و همکاران (۲۰۱۷)، تانگ و همکاران (۲۰۱۸) اشاره نمود [۱۱-۱۵]. در سیستم اندازه‌گیری آپتاسگرها، الکتروود کاری نقش اصلی را ایفا می‌کند چرا که تمامی واکنش‌های مورد نظر در سطح آن رخ می‌دهد. الکتروودهای کاری مختلفی تابحال برای کاربرد درزیست حسگرهای الکتروشیمیایی معرفی شده‌اند از جمله: الکتروود کربن شیشه‌ای، الکتروود صفحه چاپی، الکتروود طلا، الکتروود پلاتین و الکتروودخمیر کربنو الکتروود مغز مداد گرافیتی [۱۶، ۵] در پژوهش حاضر از مغز مداد گرافیتی الکتروود به علت قیمت ارزان، سازگار بودن با محیط زیست، سطح مکانیکی مناسب و در دسترس بودن استفاده شد.

هدف از انجام تحقیق حاضر، شناسایی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در شیر با استفاده از یک آپتاسگر مبتنی بر الکتروود مغز مداد گرافیتی اصلاح شده با نانوموادها شامل گرافن و طلا به کمک تکنیک‌های ولتامتری چرخه ای و پالس تفاضلی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- دستگاه‌ها

کلیه بررسی‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه

منظور کامل کردن واکنش حدود ۵ میلی لیتر محلول آب اکسیژنه ۳۳ درصد حجمی به مخلوط تهیه شده افزوده شد. ترکیب سنتز شده تا این مرحله گرافن اکسید می باشد که باید تا pH خنثی شسته شود. به منظور خالص سازی از روش استخراج حلال و ضد حلال استفاده گردید. گرافن اکسید را در متانول پخش کرده سپس با افزایش دی اتیل اتر، گرافن اکسید ته نشین و خالص سازی شد. سپس ۴۸ ساعت در دمای اتاق خشک شد. با توجه به اینکه احیای گرافن اکسید رسانایی بهتری نسبت به گرافن اکسید دارد، بنابراین ۱۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون گرافن اکسید (۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در آب تهیه شد. سپس سوسپانسیون گرافن اکسید در حمام یخ قرار داده شد و ۱۲/۵ گرم سدیم بورهیدرات (NaBH_4) در ۵۰ میلی لیتر در آب سرد تهیه شد (با نسبت وزنی ۵ برابر گرافن اکسید) و قطره قطره به سوسپانسیون گرافن اکسید اضافه شد (در شرایط حمام یخ) تا گرافن اکسید احیاشده بدست آید.

۲-۳- ساخت آبتاحسگر

ابتدا الکتروود کاری با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه ای فعال شد. برای این منظور پتانسیل $+1/5$ ولت در نرخ های روبش مختلف (۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی ولت بر ثانیه) به سطح الکتروود مغرمداد گرافیتی اعمال شد. پس از انتخاب نرخ روبش پتانسیل (با مقایسه جریان)، بهینه سازی تعداد سیکل های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵) در محلول سدیم هیدروکسید (۱ مولار) انجام شد. الکتروود کاری (به طول ۳ میلی متر) با نرخ روبش و تعداد سیکل بهینه برای زمان های مختلف (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ دقیقه) در محلول گرافن اکسید احیاشده در دمای اتاق قرار داده شد. سپس الکتروود کاری در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار قرار داده شد و تکنیک ولتامتری چرخه ای در محدوده پتانسیل $-0/1$ تا $+0/7$ ولت (۱۰ سیکل) بر روی آن اعمال شد. بعد از تثبیت گرافن اکسید احیاشده بر روی سطح الکتروود اصلاح شده در شرایط بهینه، نانو ذرات طلا بر روی الکتروود کاری اصلاح شده با روش ولتامتری چرخه ای در محدوده پتانسیل $-0/5$ تا $+1/5$ ولت، نرخ روبش ۵ میلی ولت بر ثانیه در محلول ۳ میلی مولار محلول نمک طلا ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) قرار گرفت. سپس

پتانسیواستات/گالوانواستات (Potentiostat/Galvanostat)، ساخت شرکت ایویوم (Ivium) هلند، مدل Vertex1 انجام شد که از یک طرف با سیستم سه الکتروودی و از طرف دیگر با کامپیوتر ارتباط داشت (شکل ۱). ولتاگرام (جریان بر حسب ولتاژ) الکتروود کاری در مراحل مختلف ساخت توسط رایانه ثبت شد. سیستم سه الکتروودی شامل الکتروود مغزمداد گرافیتی (با قطر ۰/۷ میلی متر) به عنوان الکتروود کاری، الکتروود نقره/نقره کلرید به عنوان الکتروود مرجع و پلاتین (به طول ۳ میلی متر) به عنوان الکتروود کمکی استفاده شد که در سل حاوی ۵ میلی-مولار فری-فروسپانید حاوی ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید به عنوان الکتروولیت قرار داده شد. تمامی آزمایش ها در دمای اتاق انجام شد.

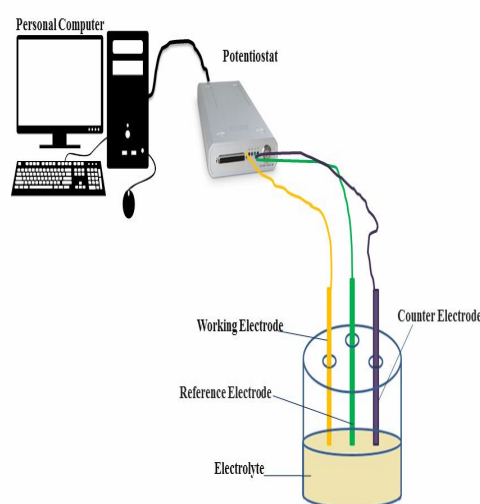


Fig 1 Schematic of the measurement system

۲-۲- روش سنتز گرافن

یک گرم پودر گرافیت (با اندازه ذرات ۷۰ میکرون و درجه خلوص ۹۹/۹۹٪) به مخلوط نیتریک اسید/سولفوریک اسید غلیظ با نسبت (۶:۱ حجمی) افزوده و در حمام یخ قرار داده شد. سپس عامل اکسنده (در این روش KMnO_4 با نسبت وزنی ۶ برابر پودر گرافیت) در حالی که مخلوط گرافیت/اسید هم زده می شد به تدریج طی ۱۰ مرتبه با فاصله زمانی ۱۵ دقیقه افزوده شد، بعد از اتمام افزوده کردن پتاسیم پرمنگنات، مخلوط یک ساعت در دمای حمام یخ و ۳ ساعت در دمای محیط به هم خورد. ۲۰۰ میلی لیتر هیدروکلریک اسید (HCl) ۱۰ درصد تهیه و به کمک حمام یخ سرد کرده سپس مخلوط گرافیت/اسید به آن افزوده شد و مخلوط یک ساعت دیگر به هم خورد. به

نشده جدا شوند. برای آماده سازی نمونه‌های شیر، ابتدا شیر در محلول بافر با نسبت حجمی ۱:۱۰ رقیق شد. با توجه به اینکه شیر حاوی چربی، کربوهیدرات و پروتئین است برای حذف لایه‌های اضافی در ۳۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس بعد از تشکیل سه لایه، لایه میانی که شیر خالص بود برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تزریق غلظت‌های مختلف تتراسایکلین در نمونه‌های شیر، از تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی استفاده شد.

۲-۶- تکنیک‌های الکتروشیمی مورد استفاده

ولتامتری چرخه‌ای: به منظور اعمال اختلاف پتانسیل بین الکترودهای کاری و مرجع از روش ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. یکی از انواع روش‌های اندازه‌گیری الکتروشیمیایی پتانسیو دینامیک می‌باشد. در تکنیک ولتامتری چرخه‌ای، پتانسیل الکتروده کاری به صورت خطی با زمان تغییر می‌کند. بر خلاف ولتامتری روبش خطی، بعد از رسیدن به یک پتانسیل تعیین شده، پتانسیل الکتروده کاری در جهت عکس تغییر می‌کند تا به پتانسیل اولیه بازگردد. این چرخه‌های تغییر پتانسیل می‌توانند به تعداد دلخواه تکرار شوند. جریان ایجاد شده در الکتروده کاری بر حسب ولتاژ (پتانسیل الکتروده مرجع) رسم می‌شود تا نمودار ولتامتری چرخه‌ای به دست آید. در پژوهش حاضر تکنیک ولتامتری چرخه‌ای حاوی ۵ میلی‌مولار فری-فروسیانید حاوی ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید انجام شد.

ولتامتری پالس تفاضلی: تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی یکی از روش‌های آمپرومتریک می‌باشد. در روش ولتامتری پالس تفاضلی پتانسیل به صورت پالس‌هایی با دامنه ثابت بر روی یک پتانسیل روبشی فزاینده اعمال می‌شود. جریان برای هر پالس در دو مرحله، قبل از اعمال پتانسیل و در انتهای عمر پالس اعمال شده و نمودار تفاضل این دو جریانبر حسب پتانسیل رسم می‌گردد. نمودار حاصل به صورت پیک می‌باشد. این روش به دلیل حذف جریان زمینه طی عمل تفاضل و پیک شکل بودن نمودار حدتشخیص پایین و حساسیت بالایی دارد [۱۷].

الکتروده کاری با دیونیزه شسته شد. بعد از تثبیت نانو ذرات طلا بر روی سطح الکتروده اصلاح شده با گرافن، در محلول ۰/۱ مولار از KNO_3 (محدوده پتانسیل ۰/۵- تا ۱/۵+ ولت) تکنیک ولتامتری چرخه‌ای اعمال شد.

به منظور استقرار آپتامر بر روی سطح الکتروده اصلاح شده با گرافن اکسید احیا شده و نانو ذرات طلا، لازم بود تا غلظت و زمان تثبیت آپتامر بهینه شوند. بعد انتخاب غلظت و زمان آپتامر بهینه بر روی سطح الکتروده، آنالیت (تتراسایکلین) بر روی الکتروده کاری تثبیت شد.

۲-۴- تثبیت آپتامر بر روی الکتروده اصلاح شده

با گرافن و نانو ذرات طلا

به منظور تثبیت آپتامر از توالی اختصاصی تتراسایکلین (5'-SH-CCC CCG GCA GGC CAC GGC TTG GGT TGG TCC CAC TGC GCG-3') با خالص سازی HPLC، چگالی نوری ۱۳/۷ که توسط شرکت Microsynth AG (Balgach, Switzerland) سنتز شده بود، استفاده شد. توالی تتراسایکلین در آب دیونیزه رقیق شد و سپس در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره شد. برای شکستن پیوندهای دی سولفیدی آپتامر، DTT با نسبت حجمی ۱:۵ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه شد. برای حذف DTT، اتیل استات با نسبت حجمی برابر با آپتامر به محلول اضافه شد. پس از سانتریفیوژ لایه بالایی حذف شد. غلظت ۲۵ میکرومولار و زمان ۶۰ دقیقه آپتامر بر روی الکتروده تثبیت شد. بعد از تثبیت آپتامر، الکتروده اصلاح شده با گرافن و نانو ذرات طلا برای مدت ۶۰ دقیقه در محلول تتراسایکلین قرار گرفت.

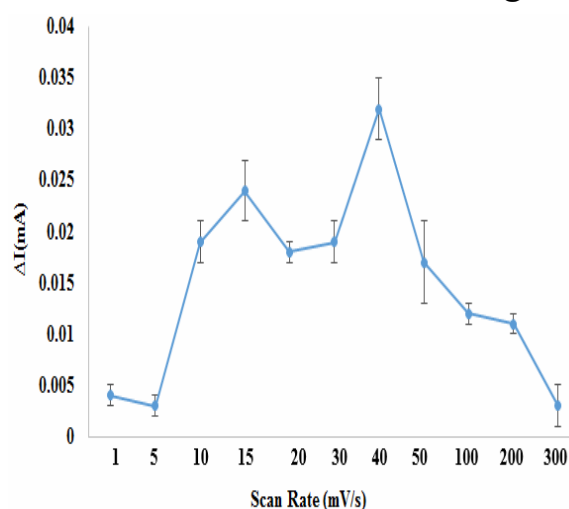
۲-۵- آماده سازی نمونه‌های حقیقی

به منظور ارزیابی آپتاسگر در شناسایی دقیق تتراسایکلین، از سایر آنتی بیوتیک‌ها مانند استرپتومایسین، پنی سیلین و سولفادایازین نیز استفاده شد. برای این هدف آپتاسگر ساخته شده در محلول ۰/۹ درصد NaCl به مدت ۹۰ دقیقه (زمان بهینه) به عنوان نمونه شاهد قرار داده شد. سپس الکتروده به آرامی با آب دیونیزه شسته شد تا آنتی بیوتیک‌های جذب

۳- نتایج و بحث

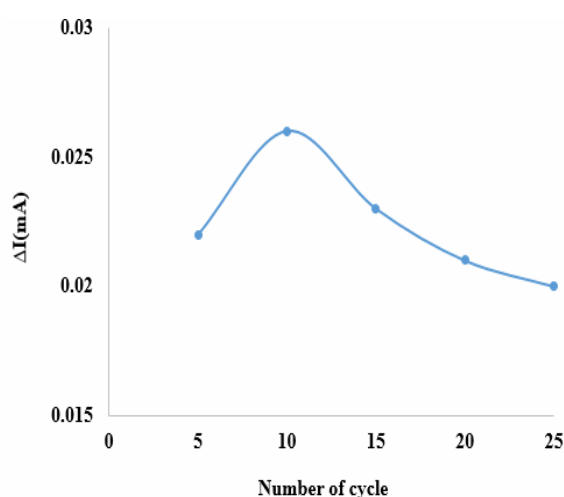
۳-۱- بهینه‌سازی نرخ روبش

به منظور انتخاب نرخ روبش بهینه برای اعمال پتانسیل بر روی الکتروود اصلاح‌نشده، نرخ روبش‌های مختلف (۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی ولت بر ثانیه) بررسی شدند. تعداد ۴ الکتروود کاری، در شرایط یکسان برای هر نرخ روبش آماده شد. تکنیک ولتامتری در محلول ۵ میلی‌مولار فری- فروسیانید حاوی ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید برای الکتروود اصلاح نشده و اصلاح شده با نرخ روبش‌های مختلف انجام شد و پیک جریان در ولتاگرام ثبت شد. از اختلاف جریان بین الکتروود اصلاح‌نشده و الکتروود اصلاح‌شده در نرخ روبش مختلف برای انتخاب نرخ روبش بهینه استفاده شد. مطابق شکل ۲، با افزایش نرخ روبش تا ۴۰ میلی ولت بر ثانیه، اختلاف جریان روند افزایشی داشته و در ۴۰ میلی ولت بر ثانیه بیش‌ترین مقدار اختلاف جریان مشاهده شد. با افزایش نرخ روبش تا ۳۰۰ میلی ولت بر ثانیه اختلاف جریان روند نزولی داشت. با توجه به اینکه ۴۰ میلی ولت بر ثانیه بیش‌ترین اختلاف جریان را داشته عنوان نرخ روبش بهینه انتخاب گردید و تمامی آپتاسیوگرام‌های مورد استفاده با ۴۰ میلی ولت بر ثانیه اصلاح شدند.

Fig 2 The influence of different scan rates on ΔI .

۳-۲- بهینه‌سازی تعداد سیکل

پس از انتخاب نرخ روبش بهینه، تعداد سیکل‌های مربوط به اعمال روش ولتامتری چرخه با تست تعداد سیکل‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵) بهینه شد. روش اندازه‌گیری اختلاف جریان مشابه بخش بهینه‌سازی نرخ روبش بود. میانگین اختلاف جریان مربوط به ۴ الکتروود با نرخ روبش ۴۰ میلی ولت بر ثانیه، در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که قابل استنباط است پس اعمال ۱۰ سیکل بر روی الکتروودها، اختلاف جریان بیشتری در مقایسه با سایر تعداد سیکل‌ها مشاهده شد؛ بنابراین تعداد ۱۰ سیکل به عنوان پارامتر بهینه برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

Fig. 3. The effect of cycle number on ΔI .

۳-۳- بهینه‌سازی مدت تثبیت گرافن اکسید

احیا شده

بعد از آماده سازی الکتروود اصلاح‌شده در محلول سدیم هیدروکسید در شرایط بهینه (نرخ روبش ۰/۱۰ mV/s با ۱۰ سیکل)، زمان تثبیت گرافن اکسید احیا شده بر روی الکتروود کاری اصلاح‌شده بهینه شد. برای این منظور الکتروود در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ دقیقه در محلول حاوی گرافن اکسید احیا شده قرار گرفت سپس جریان در دو مرحله شامل بعد از اصلاح در محلول سدیم هیدروکسید و بعد از قرار گرفتن در محلول گرافن اکسید با استفاده از روش

نانو ذرات طلا رسانا شد. در مراحل بعدی آپتامر و آنالیت (آنتی بیوتیک) بر روی سطح الکتروود قرار می‌گیرند که در ادامه شرح داده شده است.

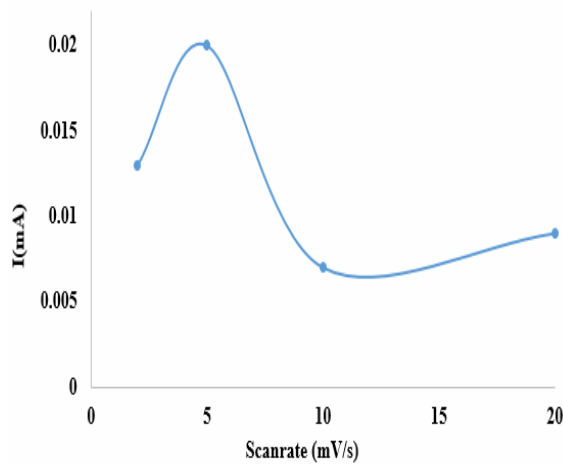


Fig 5 The effect of different scan rate on current.

۳-۵- ارزیابی آپتاسنجر با استفاده از

تکنیک‌های الکتروشیمیایی

به منظور ارزیابی آپتاسنجر ساخته شده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. در شکل ۶، رفتار الکتروودهای اصلاح شده در مراحل مختلف، در محلول حاوی ۵ میلی‌مولار فری-فروسیانید با ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید، با نرخ روبش ۵۰ mV/s نشان داده شده است. اصلاح سطح گرافیتی الکتروود با گرافن اکسید احیا شده (RGO) و نانو ذرات طلا (AuNPs)، باعث افزایش فرایند انتقال الکترون و در نتیجه افزایش جریان در مقایسه با الکتروود اصلاح نشده (Bare) شد. افزایش جریان نانو ذرات طلا در مقایسه با گرافن اکسید احیا شده را می‌توان با توجه هدایت الکتریکی عالی طلا و افزایش سطوح فعال بیشتر در سطح الکتروود توجیه نمود [۱۶]. با تثبیت آپتامر (Aptamer) و تتراسایکلین (TET) بر روی سطح الکتروود، پیک جریان نسبت به الکتروود اصلاح نشده کاهش یافت. این امر را می‌توان به دافعه الکترواستاتیک بین پروب آهن $(Fe(CN)_6^{4-/3-})$ و آپتامر که هر دو دارای بار منفی هستند، نسبت داد [۱۸].

ولتامتری چرخه‌ای ثبت شد. با افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه اختلاف جریان افزایش یافت بعد از ۹۰ دقیقه تقریباً روند اختلاف جریان روند کاهشی مشاهده شد (شکل ۷). دلیل افزایش جریان تا ۹۰ دقیقه می‌تواند به دلیل اشباع شدن سطح الکتروود باشد. با توجه به نتایج به دست آمده زمان ۹۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه برای تثبیت گرافن اکسید احیا شده در نظر گرفته شد.

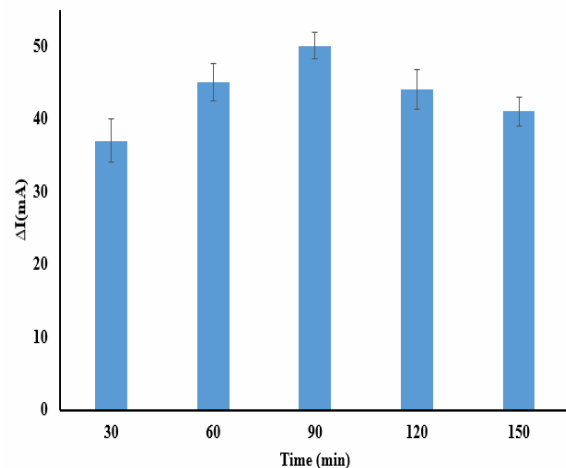


Fig 4 The effect of different immobilization times on ΔI (mean of three measurements with standard deviation).

۳-۴- تثبیت نانو ذرات طلا

بعد اصلاح سطح الکتروود مغز مداد گرافیتی و تثبیت گرافن اکسید احیا شده در شرایط بهینه که در بخش‌های قبل ذکر شد، نانو ذرات طلا بر روی سطح الکتروود تثبیت شد. تثبیت نانو ذرات طلا ابتدا در نرخ روبش‌های مختلف (۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌ولت بر ثانیه) انجام شد. سپس در محلول ۰/۱۰ مولار پتاسیم نترات به منظور حذف نانو ذرات اضافی، تکنیک ولتامتری چرخه‌ای بر روی سطح الکتروود اعمال شد. علاوه بر این، استفاده از پتاسیم نترات برای خنثی کردن بار الکتریکی طلا است تا بتواند از طریق پیوندهای دی سولفیدی آپتامر که بار منفی دارد را جذب سطح الکتروود کند. همان‌طور که در شکل ۵ قابل مشاهده است استفاده از نرخ روبش ۵ میلی‌ولت بر ثانیه جریان را به طور قابل توجهی افزایش داد. تا این مرحله بستر گرافیتی به خوبی با استفاده از گرافن اکسید احیا شده و

با استفاده از تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی، منحنی کالیبراسیون ترسیم شد. محور عمودی تغییر جریان بین آپتامر و تتراسایکلین، و محور افقی لگاریتم غلظت های مختلف تتراسایکلین را نشان می دهد. منحنی کالیبراسیون آپتاسنجر رنج خطی 1×10^{-12} تا 1×10^{-5} مولار را نشان داد (شکل ۸). همچنین معادله رگرسیونی از رابطه ۱ تبعیت نمود:

$$y = 6.869x + 87.012, R^2 = 0.985 \quad (1)$$

که در آن، x لگاریتم غلظت تتراسایکلین، y تغییرات جریان است. حد تشخیص کمی به عنوان حساسیت حسگر تعریف می شود و بیانگر کمترین مقدار قابل اندازه گیری توسط حسگر است. برای محاسبه حد تشخیص کمی از رابطه ۲ استفاده شد:

$$\text{LOD} = 3S_b/m \quad (2)$$

در رابطه ۲، LOD ، حد تشخیص کمی، S_b انحراف استاندارد نمونه شاهد (بدون حضور تتراسایکلین) و m شیب منحنی کالیبراسیون در محدوده خطی است. بر اساس رابطه ۲، حد تشخیص کمی $1/8 \times 10^{-13}$ مولار بدست آمد. در جدول ۱، عملکرد آپتاسنجر پژوهش حاضر با سایر نتایج محققان مورد مقایسه قرار گرفته است. همانطور که مشاهده می گردد تاکنون از الکتروود مداد گرافیتی برای شناسایی تتراسایکلین استفاده نشده است، همچنین سایر الکتروودهای کاری در مقایسه با الکتروود مداد گرافیتی محدوده خطی محدودتر و حد تشخیص بالاتری دارند.

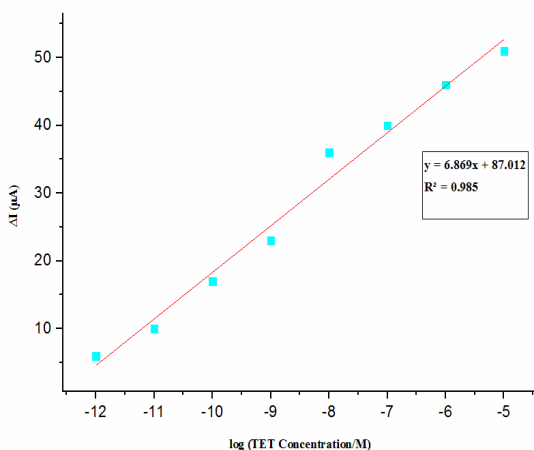


Fig 8 calibration plot, ΔI vs Log concentration of TET for different concentration, 1.0×10^{-12} , 1.0×10^{-11} , 1.0×10^{-10} , 1.0×10^{-9} , 1.0×10^{-8} , 1.0×10^{-7} , 1.0×10^{-6} and 1.0×10^{-5} M. In 5.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ containing 0.1 M KCl solution.

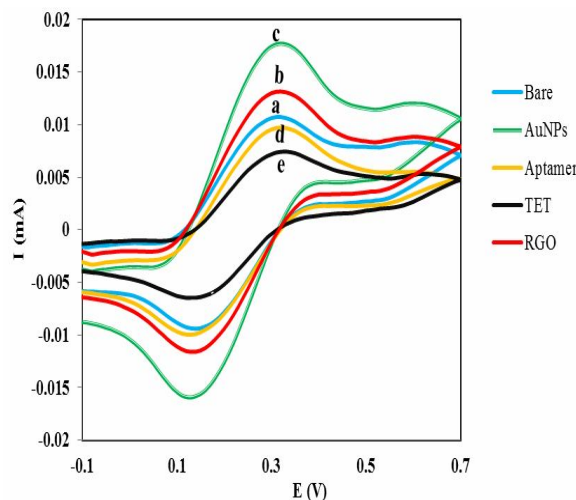


Fig 6 The cycle voltammograms of different modified electrodes in 5.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ containing 0.1 M KCl, potential range of -0.1 to 0.70 V with scan rate of 50 mV s^{-1} : (a) bare PGE, (b) RGO (c) AuNP/ (d) Aptamer, and (e) TET

به منظور ارزیابی آپتاسنجر، از تکنیک ولتامتری نیز پالس تفاضلی استفاده شد. غلظت های مختلفی از تتراسایکلین تهیه شد و کارایی آپتاسنجر با رسم منحنی کالیبراسیون (جریان بر حسب غلظت) بررسی شد. همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است با افزایش غلظت تتراسایکلین پیک جریان فری-فروسیانید کاهش یافته است. دلیل کاهش پیک جریان با افزایش غلظت تتراسایکلین این دلیل است که در حضور تتراسایکلین یون ها خیلی سخت می توانند بر روی سطح الکتروود قرار بگیرند [۱۵].

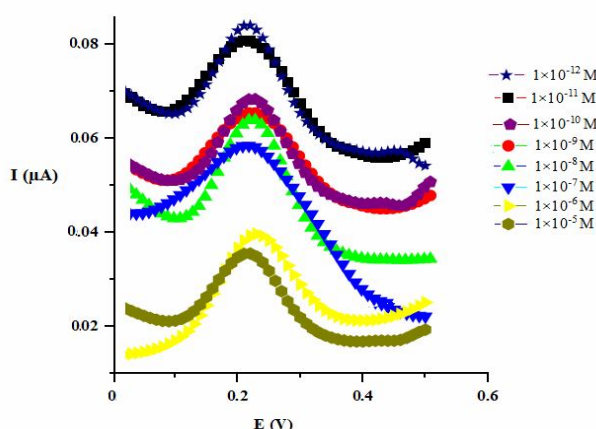


Fig 7 Differential pulse voltammograms recorded for aptasensor in the presence of different concentrations of TET (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M (mol. L^{-1})).

Table 1 Comparison of the performance of different working electrodes for determination of TET

Working electrode	Method	Dynamic range (M)	LOD (M)	Reference
GCE	DPV ^a	1×10^{-9} - 1×10^{-7}	1.0×10^{-9}	[18]
GCE	EIS	5×10^{-9} - 5×10^{-6}	1.0×10^{-9}	[12]
GE	DPV	1.5×10^{-9} - 3.5×10^{-6}	0.45×10^{-9}	[19]
GE	EIS	2×10^{-8} - 2250×10^{-6}	6.75×10^{-9}	[20]
GE	DPV	1×10^{-8} - 5×10^{-5}	5×10^{-9}	[11]
GE	EIS	2.25×10^{-8} - 6.75×10^{-6}	2.5×10^{-9}	[21]
SPCE	DPV	1×10^{-6} - 5×10^{-6}	6×10^{-10}	[13]
GCE	DPV	1×10^{-10} - 5×10^{-3}	5.6×10^{-12}	[22]
PGE	DPV	1×10^{-12} - 1×10^{-5}	1.4×10^{-13}	This work

GCE: glassy carbon electrode, DPV: differential pulse voltammetry, EIS: electrochemical impedance spectroscopy, GE: gold electrode, SPCE: screen-printed carbon electrodes, PGE: pencil graphite electrode

زیست حسگر بعد از گذشت دو هفته ۳ درصد کاهش یافته است.

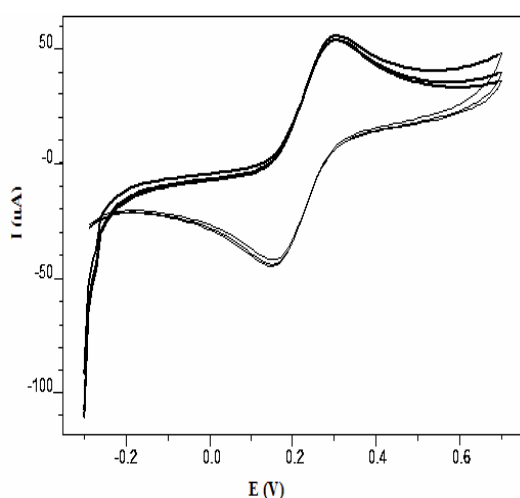


Fig. 9. Repeatability of the aptasensor for three measurements (cycle voltogram).

۷-۳-۷- آزمون نمونه‌های حقیقی

کاربرد عملیاتی آپتاسنسر ساخته‌شده از طریق شناسایی تتراسایکلین در محیط شیر مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا آپتاسنسر در شرایط بهینه ساخته شد و برای مدت ۹۰ دقیقه در داخل ۱۰ میکرو لیتر از شیر حاوی آنتی بیوتیک با غلظت مشخص قرار گرفت. درصد بازیابی با استفاده از رابطه ۳ برای نمونه‌های شیر محاسبه شد:

$$\text{Recovery}\% = (C_{\text{found}}/C_{\text{spike}}) \times 100 \quad \text{رابطه (۳)}$$

در رابطه ۳، C_{found} بیانگر غلظت شناسایی شده توسط آپتاسنسر و C_{spike} غلظت تزریق شده به نمونه‌های شیر است. همان طور که در جدول ۲ آورده شده است درصد بازیابی برای نمونه‌های شیر در دو غلظت برای دو نمونه شیر گاو ۹۲/۸ تا ۹۸/۴ درصد به دست آمد که حاکی از درصد بازیابی قابل قبول برای آپتاسنسر ساخته شده دارد.

۶-۳- ارزیابی ارقام شایستگی آپتاسنسر

به منظور ارزیابی ارقام شایستگی (Figure of merit) آپتاسنسر، تکراری پذیری، تکثیر پذیری، انتخاب پذیری و پایداری مورد بررسی قرار گرفتند. تکراری پذیری آپتاسنسر با اندازه‌گیری مکرر در سه مرتبه با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای ثبت شد. همان طور که در شکل ۹ نشان داده شده است پیک‌های مربوط به سه مرتبه اندازه‌گیری همپوشانی نزدیکی به هم دارند و آپتاسنسر از تکرارپذیری قابل قبولی برخوردار است. به منظور بررسی تکثیر پذیری آپتاسنسر، تعداد پنج زیست حسگر مستقل در شرایط یکسان ساخته شد و پیک جریان آن‌ها با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در محلول ۵ میلی مولار فری- فروسیانید حاوی ۰/۱ مولار پتاسیم کلرید ارزیابی شد. نتایج نشان داد که انحراف استاندارد نسبی پیک‌های جریان ۳/۲ درصد می‌باشد که نشان از تکثیر پذیری بالای آپتاسنسر است. بررسی انتخاب پذیری آپتاسنسر به منظور بررسی اثرات مداخله گر و مزاحم در شناسایی تتراسایکلین صورت پذیرفت. برای این هدف سه نوع آنتی-بیوتیک دیگر شامل استرپتومایسین، پنی سیلین و سولفادیازین با استفاده از آپتاسنسر ساخته‌شده آزمون شد. همان طور که انتظار می‌رفت با توجه به اینکه آپتامر اختصاصی مربوط به تتراسایکلین بر روی الکتروود اصلاح شده با RGO و AuNPs تثبیت شده بود، پاسخ آپتاسنسر به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، قابل توجه نبود که مبین انتخاب پذیر بودن آپتاسنسر نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین می‌باشد. به منظور ارزیابی پایداری آپتاسنسر ابتدا سه زیست حسگر در شرایط بهینه و یکسان در دمای محیط ساخته شد. سپس به مدت دو هفته پاسخ آپتاسنسر به فاصله زمانی هر سه روز یک بار ثبت شد و با پاسخ روز اول مقایسه شد. نتایج نشان داد که پاسخ

Table 2 Determination of TET in cow milk samples using the amperometric aptasensor.

RSD ^b (%)	Recovery (%)	found ^a (M)	Spiked value (M)	Sample
6.5	94.2	$(0.942 \pm 0.057) \times 10^{-9}$	1×10^{-9}	Milk 1
6.3	96.1	$(0.961 \pm 0.061) \times 10^{-11}$	1×10^{-11}	
7.6	92.8	$(0.928 \pm 0.071) \times 10^{-9}$	1×10^{-9}	Milk 2
4.3	98.4	$(0.984 \pm 0.042) \times 10^{-11}$	1×10^{-11}	

^a Average of three measurements \pm standard deviation. ^b relative standard deviation

[5] Ezhilan M. Gumpu M.B. Ramachandra B.L. Nesakumar N. Babu K.J. Krishnan U.M. and Rayappan J.B.B. (2017). Design and development of electrochemical biosensor for the simultaneous detection of melamine and urea in adulterated milk samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* 238: 1283-1292.

[6] Xu M. Wang R. and Li Y. (2017). Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Talanta*, 162, 511-522.

[7] Pacheco J.G. Barroso M.F. Nouws H.P.A. Morais S. and Delerue-Matos C. (2017). 21-Biosensors A2-Larroche. In: Maria A.S. et al. (eds.) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. pp. 627-648.

[8] Bahreyni, A., Tahmasebi, S., Ramezani, M., Alibolandi, M., Danesh, N. M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2019). A novel fluorescent aptasensor for sensitive detection of PDGF-BB protein based on a split complementary strand of aptamer and magnetic beads. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 280, 10-15.

[9] Song, Y., Luo, Y., Zhu, C., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2016). Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 195-212.

[10] Tian, L., Qian, K., Qi, J., Liu, Q., Yao, C., Song, W., & Wang, Y. (2018). Gold nanoparticles superlattices assembly for electrochemical biosensor detection of microRNA-21. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 564-570.

[11] Zhou, L., Li, D. J., Gai, L., Wang, J. P., & Li, Y. B. (2012). Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 162(1), 201-208.

[12] Chen, D., Yao, D., Xie, C., & Liu, D.

۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، یک آپتاسنسر مبتنی بر الکتروود مداد گرافیتی که سطح آن گرافن اکسید احیاء شده و نانوذرات طلا اصلاح شده بود، برای تشخیص باقیمانده آنتی بیوتیک تتراسایکلین در شیر معرفی شد. آپتاسنسرها در مقایسه با سایر روش‌های شناسایی مرسوم آنتی بیوتیک‌ها از جمله کیت‌های تشخیصی و روش‌های میکروبی، سریع و ارزان قیمت بوده، و حد تشخیص پایین آنتی بیوتیک را دارا هستند. با استفاده از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و ولتامتری پالس تفاضلی پیک‌های جریان آپتاسنسر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آپتاسنسر تکراری پذیری و تکثیر پذیری و پایداری قابل قبولی دارد. همچنین در حضور سایر آنتی بیوتیک‌ها، آپتاسنسر پیشنهاد شده توانایی انتخاب پذیری بالایی برای تشخیص تتراسایکلین دارد.

۵- منابع

- [1] Berruga M.I. Molina A. Althaus R.L. and Molina M.P. (2016). Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. *Small Ruminant Research* 142: 38-43.
- [2] Leibovici L. Paul M. Garner P. Sinclair D.J. Afshari A. Pace N.L. and Del Mar C. (2016). Addressing resistance to antibiotics in systematic reviews of antibiotic interventions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71: 2367-2369.
- [3] Hou, J., Zhang, H., Yang, Q., Li, M., Jiang, L., & Song, Y. (2015). Hydrophilic-Hydrophobic Patterned Molecularly Imprinted Photonic Crystal Sensors for High-Sensitive Colorimetric Detection of Tetracycline. *Small*, 11(23), 2738-2742.
- [4] Lan L. Yao Y. Ping J. and Ying Y. (2017). Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosensors and Bioelectronics* 91: 504-514.

- and Fe₃O₄ nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, 421-429.
- [18] Zhang, Juankun, Binbin Zhang, Yan Wu, Shiru Jia, Ting Fan, Ziyi Zhang, and Chaozheng Zhang. (2010). Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor. *Analyst* 135, no. 10 2706-2710.
- [19] Taghdisi, S. M., Danesh, N. M., Ramezani, M., & Abnous, K. (2016). A novel M-shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of tetracyclines. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 509-514.
- [20] Xu, Q. C., Zhang, Q. Q., Sun, X., Guo, Y. M., & Wang, X. Y. (2016). Aptasensors modified by antimony tin oxide nanoparticle-chitosan based on interdigitated array microelectrodes for tetracycline detection. *RSC Advances*, 6(21), 17328-17335.
- [21] Le, T. H., Pham, V. P., La, T. H., Phan, T. B., & Le, Q. H. (2016). Electrochemical aptasensor for detecting tetracycline in milk. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(1), 015008.
- [22] Guo, Y., Shen, G., Sun, X., & Wang, X. (2015). Electrochemical aptasensor based on multiwalled carbon nanotubes and graphene for tetracycline detection. *IEEE Sensors Journal*, 15(3), 1951-1958.
- (2014). Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline. *Food Control*, 42, 109-115.
- [13] Zhan, X., Hu, G., Wagberg, T., Zhan, S., Xu, H., & Zhou, P. (2016). Electrochemical aptasensor for tetracycline using a screen-printed carbon electrode modified with an alginate film containing reduced graphene oxide and magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Microchimica Acta*, 183(2), 723-729.
- [14] Ouyang, Q., Liu, Y., Chen, Q., Guo, Z., Zhao, J., Li, H., & Hu, W. (2017). Rapid and specific sensing of tetracycline in food using a novel upconversion aptasensor. *Food Control*, 81, 156-163.
- [15] Tang, Y., Liu, P., Xu, J., Li, L., Yang, L., Liu, X., ...& Zhou, Y. (2018). Electrochemical aptasensor based on a novel flower-like TiO₂ nanocomposite for the detection of tetracycline. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 258, 906-912.
- [16] Izadi, Z., Sheikh-Zeinoddin, M., Ensafi, A. A., & Soleimani-Zad, S. (2016). Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 582-589.
- [17] Chen M. Hou C. Huo D. Fa H. Zhao Y. and Shen C. (2017). A sensitive electrochemical DNA biosensor based on three-dimensional nitrogen-doped graphene

Fabrication of an amperometric aptasensor for determination of antibiotic amount residues in milk

Mohammad-Razdari, A.¹, Ghasemi-Varnamkhasti, M.², Rostami, S.², Ensafi, A. A.³, Izadi, Z.^{4*}, Bonyadian, M.⁵

1. Ph.D. student, Department of Mechanical Engineering Biosystems, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Associate Professor, Department of Mechanical Engineering of Biosystems, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
3. Professor, Department of Chemistry, Isfahan University of Technology.
4. Assistant Professor, Department of Mechanical Engineering of Biosystems, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
5. Associate Professor, Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University.

(Received: 2019/02/04 Accepted: 2019/05/18)

Quantitative detection of drug residues in animal food stuffs is very important. Excessive use of veterinarian veterinarians, like antibiotics are a serious threat to consumers, due to the residence of livestock products such as meat, milk, eggs. Rapid detection of antibiotics is essential by using an efficient, fast, affordable, and specific tool for risk reduction and food safety control. In the present study, an aptasensor based on pencil graphite electrode modified with nanomaterial including grapheme and gold, for rapid detection of tetracycline antibiotic was developed in milk samples. Cycle voltammetry and differential pulse voltammetry (DPV) techniques were used for response evaluation of aptasensor. In order to modification the graphite pencil electrode, the scanrate (40 mV/s) and the number of cycles (10) and immobilization time of graphene (90 min) were optimized. Under optimum conditions, using differential pulse voltammetry technique was found to increase linearly in the range of 1×10^{-12} to 1×10^{-5} M, with increasing concentration ($R^2 = 0.985$). The detection limit of the aptasensor was found to be 1.4×10^{-13} M. A review of functional characteristics including repeatability, reproducibility, satability, and selectivity suggests acceptable performance for aptasensor. Overall, the fabricated aptasensor has efficiency required to detect tetracycline in milk samples.

Keyword: Aptasensor, Amperometric Antibiotic, Nanomaterial, Differential Pulse Voltammetry (DPV).

* Corresponding Author E-Mail Address: Izadi.1365@yahoo.com