

## توسعه یک زیست حسگر ایمپدیمتریک مبتنی بر نانو مواد برای شناسایی تتراسایکلین در عسل

آیت محمدرزاداری<sup>1</sup>، مهدی قاسمی ورنامخواستی<sup>2</sup>، سجاد رستمی<sup>2</sup>، زهرا ایزدی<sup>3\*</sup>،  
علی اصغر انصافی<sup>4</sup>

1- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

2- دانشیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

3- استادیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

4- استاد، گروه شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: 98/06/09 تاریخ پذیرش: 99/04/07)

### چکیده

شناسایی باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی از جمله عسل از اهمیت خاصی برخوردار است. تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها در عسل و سایر فرآورده‌های دامی توسعه داده شده‌اند. در سال‌های اخیر ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی در ترکیب با نانو مواد توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در مطالعه حاضر یک زیست حسگر ایمپدیمتریک مبتنی بر نانو مواد شامل گرافن اکسید احیاشده و نانو ذرات طلا برای شناسایی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در نمونه‌های عسل توسعه داده شد. از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی برای ارزیابی سطح الکتروود کاری استفاده گردید. مقادیر پیک جریان در حالت‌های مختلف به ترتیب 0/034، 0/048، 0/069، 0/020 و 0/015 میکرو آمپر برای الکتروود اصلاح‌نشده، تثبیت گرافن، طلا، آبتامر و آنتی‌بیوتیک دست آمد. مشخصه‌های زیست حسگر شامل تکرارپذیری، تکثیر پذیری، پایداری و گزینش پذیری با استفاده از داده‌های مقاومت انتقال بار مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاکی از قابل‌قبول بودن آن‌ها داشت. به‌منظور محاسبه درصد ریکاوری غلظت‌های  $1 \times 10^{-9}$  و  $1 \times 10^{-11}$  مولار از تتراسایکلین تهیه و در نمونه‌های عسل تزریق گردید. نتایج نشان داد که زیست حسگر پیشنهادی درصد ریکاوری 94/1 تا 103/4 درصد را برای شناسایی تتراسایکلین در نمونه‌های عسل ارائه می‌دهد.

**کلید واژگان:** الکتروود مداد گرافیتی، آنتی‌بیوتیک، نانو ذرات طلا، امپدانس الکتروشیمیایی، مبدل الکتروشیمیایی.

\*مسئول مکاتبات: Izadi.1365@yahoo.com

## 1- مقدمه

عسل حاوی ترکیبات مختلفی از جمله قند، املاح معدنی و ویتامین‌ها است که ممکن است در اثر استفاده نابجا مانند باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم اثرات منفی بر روی مصرف‌کننده داشته باشد [1]. به‌منظور کنترل بیماری‌ها که ممکن است زنبورعسل به آن دچار شود از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی از جمله تتراسایکلین‌ها استفاده می‌شود [2]. معمولاً باقی‌مانده این آنتی‌بیوتیک‌ها در عسل باقی می‌ماند که علاوه بر ضررهای اقتصادی که به تجارت عسل وارد می‌کند مقاومت دارویی و مشکلات گوارشی را برای مصرف‌کننده نیز در پی دارد [3].

تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها در عسل و سایر فرآورده‌های دامی توسعه داده شده‌اند. فضل آرا و همکاران (1393) باقی‌مانده‌های تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین عسل را با استفاده از روش HPLC ردیابی کردند. این بررسی نشان داد که 23/33 درصد نمونه عسل فاقد هر دو باقی‌مانده تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین بود درحالی‌که 51/66 درصد نمونه‌ها دارای هر دو نوع باقی‌مانده بودند. در مجموع 76/67 درصد نمونه از مجموع 60 نمونه‌ی عسل مورد بررسی از نظر باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی، مثبت بوده و اختلاف معنی‌داری با مقدار صفر اعلام‌شده از سوی اتحادیه‌ی اروپا، و سازمان غذا و دارو داشتند [2]. اگرچه روش‌های مرسوم شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند HPLC و کیت‌های تشخیصی دقیق و اختصاصی هستند اما وقت‌گیر، گران‌قیمت، نیازمند کاربر متخصص و فرآیند پیچیده آماده‌سازی نمونه هستند. در طی سالیان اخیر استفاده از روش‌های سریع، اختصاصی و ارزان به‌عنوان جایگزین مناسب و کارآمد برای روش‌های مرسوم شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده‌اند [4].

یکی از ابزارهای اندازه‌گیری کاربردی برای شناسایی میزان باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی استفاده از نانو مواد برای کاربرد در ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی است که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. محمدرزاداری و همکاران (2019) یک الکتروود مغز مداد گرافیتی اصلاح‌شده با نانو ورقه‌های گرافن و نانو ذرات طلا برای شناسایی پنی‌سیلین در نمونه‌های شیر را توسعه دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در محدوده غلظتی 1 فمتو مولار تا 10 میکرو مولار با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، مقاومت انتقال بار نیز افزایش می‌یابد همچنین حد تشخیص

0/8 فمتو مولار برای شناسایی پنی‌سیلین در نمونه‌های شیر حاصل شد [5]. در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از یک زیست حسگر الکتروشیمیایی، حضور آنتی‌بیوتیک سولفادی متیوکسین در نمونه‌های گوشت شامل گوشت گاو، مرغ و ماهی ردیابی شد. تحت شرایط بهینه، زیست حسگر ساخته‌شده حد تشخیص  $10^{-17} \times 3/7$  مولار را نشان داد. درصد ریکاوری برای شناسایی نمونه‌های گوشت 92 تا 103 درصد به دست آمد [6].

با توجه به اهمیت امنیت غذایی و اثرات منفی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی هدف از مطالعه حاضر توسعه یک زیست حسگر ایمپدیمتریکی مبتنی بر نانو مواد شامل گرافن اکسید احیا شده و نانو ذرات طلا به منظور شناسایی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در نمونه‌های عسل بود.

## 2- مواد و روش‌ها

### 2-1-2- دستگاه‌ها

کلیه بررسی‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستات/گالوانواستات (Potentiostat/Galvanostat) و یک سیستم سه الکتروودی شامل الکتروود مغز مداد گرافیتی (با قطر 0/7 میلی‌متر) به‌عنوان الکتروود کاری به علت قیمت ارزان، سازگار بودن با محیط‌زیست، سطح مکانیکی مناسب و در دسترس بودن، الکتروود نقره/نقره کلرید به‌عنوان الکتروود مرجع و پلاتین (به طول 3 میلی‌متر) به‌عنوان الکتروود کمکی استفاده شد که در سل حاوی 1 میلی مولار فری- فروسیناید حاوی 0/10 مولار پتاسیم کلرید به‌عنوان الکتروولیت قرار داده شد (شکل 1). تمامی آزمایش‌ها در دمای 23 درجه سلسیوس انجام شد.

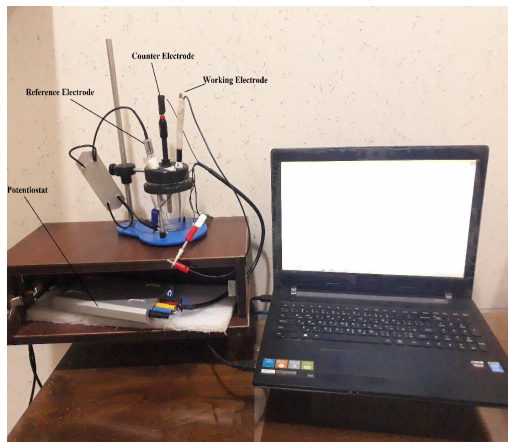


Fig 1 Picture of the measurement system

**2-2- مراحل ساخت زیست حسگر**

مراحل کلی ساخت زیست حسگر شامل فعال‌سازی و اصلاح سطح الکتروود کاری، تثبیت گرافن اکسید احیاشده، تثبیت نانو ذرات طلا، تثبیت آپتامر و تثبیت آنالیت موردنظر (آنتی‌بیوتیک) بود. در تمامی مراحل ساخت زیست حسگر از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و امپدانس الکتروشیمیایی بسته به شرایط در محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکتروولیت سدیم کلرید استفاده گردید.

**2-3- اصلاح سطح الکتروود کاری**

اصلاح سطح الکتروود مغز مداد گرافیتی با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای صورت گرفت. برای این منظور 40 میلی‌لیتر از محلول 1 مولار سدیم هیدروکسید درون سل الکتروشیمیایی ریخته شد سپس تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در پتانسیل 1/5 ولت اعمال شد. برای این منظور پتانسیل +1/5 ولت در نرخ روبش 40 میلی ولت بر ثانیه در 10 سیکل به سطح الکتروود مغز مداد گرافیتی اعمال شد. سپس در محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکتروولیت سدیم کلرید ولتا گرام جریان بر حسب پتانسیل در نرخ‌های روبش مختلف ثبت گردید.

**2-4- تثبیت RGO****2-4-1- سنتز گرافن اکسید**

به‌منظور سنتز گرافن اکسید (GO) مراحل زیر بر طبق روش اصلاح‌شده هامر انجام شد [7]:

- 1- 2 گرم از  $\text{NaNO}_3$  در 96 میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ریخته شد و سپس در بشر با مگنت استیرر در حمام یخ هم زده شد.
- 2- 2 گرم پودر گرافیت به مخلوط مرحله 1 اضافه شد.
- 3- 12/5 گرم پتاسیم پرمنگنات به تدریج در مدت 90 به مخلوط به‌دست‌آمده از مرحله قبل اضافه گردید.
- 4- بشر در دمای 35 درجه سلسیوس به مدت 1 ساعت تحت هم زدن مداوم قرار گرفت.
- 5- به آرامی 200 میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط به‌دست‌آمده از مرحله قبل در شرایط حمام یخ افزوده شد.
- 6- در حمام روغن با دمای 95 درجه سلسیوس در مدت 30 دقیقه هم زده شد.
- 7- در شرایط مرحله قبل، 600 میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه شد.

8- در دمای محیط 30 میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه به مخلوط اضافه گردید.

- 9- 10 میلی‌لیتر از HCL 5 درصد به مخلوط اضافه گردید.
- 11- به مدت 30 دقیقه هم زده شد و پس از ساکن شدن مخلوط رسوب نمود.
- 12- تا زمانی که pH محلول موردنظر به مقدار خنثی برسد تا آب مقطر شست‌وشو داده شد.
- 13- بعد از رسیدن به pH خنثی، پودر سیاه به‌دست‌آمده در دمای اتاق خشک شد.

**2-4-2- سنتز RGO**

- 1- 12/5 گرم سدیم بور هیدرات در 50 میلی‌لیتر آب مقطر سرد حل شد.
- 2- 0/25 گرم از گرافن اکسید در 100 میلی‌لیتر آب مقطر به مدت دقیقه در 10 سیکل سونیکیت شد.
- 3- محلول تهیه‌شده از مرحله یک، به آرامی و قطره‌قطره به مخلوط مرحله دوم در شرایط حمام یخ روی مگنت استیرر اضافه شد و به مدت 12 دقیقه با دستگاه شیکر در دمای اتاق هم زده شد سپس از فیلتر شد.
- 4- با استفاده از پمپ خلأ و فیلتر نانو، سه مرتبه با آب مقطر شسته شد.
- 5- در شرایط مرحله چهار، گرافن اکسید به مدت 12 ساعت در دمای اتاق خشک شد.

پودر به‌دست‌آمده از مرحله چهار، RGO است که 0/05 از آن در 5 میلی‌لیتر دی متیل فرم آمید به مدت 45 دقیقه در دمای 15 درجه سلسیوس در شرایط حمام یخ تحت سونیکیت شد. برای هر مرحله استفاده از RGO به مدت 25 دقیقه سونیکیت شد. به‌منظور تثبیت RGO روی سطح الکتروود کاری نیاز بود تا زمان تثبیت آن بهینه شود. برای این هدف، الکتروود کاری (به طول 3 میلی‌متر) برای 60 دقیقه در محلول RGO در دمای اتاق قرار داده شد. سپس الکتروود کاری در محلول بافر فسفات 0/1 مولار قرار داده شد و تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در محدوده پتانسیل 0/1- تا 0/7+ ولت (10 سیکل) روی آن اعمال شد.

**2-5- تثبیت نانو ذرات طلا**

بعد از اصلاح سطح الکتروود مغز مداد گرافیتی و همچنین زمان تثبیت RGO نانو ذرات طلا (GNP) روی سطح الکتروود کاری تثبیت شد. بعد از تثبیت RGO روی سطح الکتروود

یافت. کمی بعد از رسیدن به پتانسیل احیای نمونه جریان کاتدی با کاهش غلظت ذرات احیا شونده کاهش خواهد یافت. اگر زوج ردوکس برگشت پذیر باشند در طی روبش برگشت نمونه احیاشده شروع به اکسایش مجدد کرده و باعث ظهور یک جریان آندی (c-d) با قطبیت عکس نسبت به قبل (روبش رفت) می شود. هرچه مقدار ذرات جفت ردوکس برگشت پذیر بیشتر باشد شکل پیک اکسایش شباهت بیشتری به پیک احیا خواهد داشت؛ بنابراین داده های ولتامتری چرخه ای اطلاعاتی در مورد پتانسیل های ردوکس و سرعت های واکنش الکتروشیمیایی فراهم می کنند.

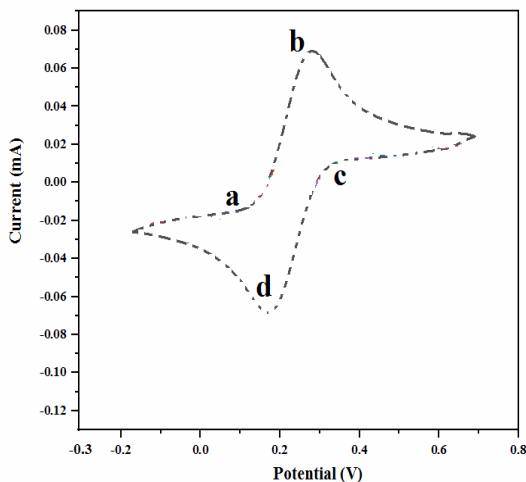


Fig 2 The CV voltammogram

### 2-6-2-2- طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی

طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی تکنیک مؤثری برای مطالعه سرعت انتقال الکترون و انتشار در واکنش های الکتروشیمیایی است. ماهیت امپدانس، مقاومت مختلطی است که به هنگام عبور جریان از مدار متشکل از مقاومت، خازن و القاگر به وجود می آید. وقایع الکتروشیمیایی در فصل مشترک الکتروده محلول به صورت اجزای مدار الکتروشیمیایی (مقاومت، خازن و القاگر) رخ می دهد [9].

طیف امپدانس چنین مداری می تواند برای مطالعه وقایع سطح الکتروده بکار رود. با اعمال ولتاژ سینوسی کوچک در فرکانس  $\omega$ ، تغییرات جریان (تحت تأثیر مقاومت) اندازه گیری می شود. طیف حاصل به صورت مقاومت موهومی ( $-Z_i$ ) بر مقاومت واقعی ( $Z_R$ ) تحت نام نمودار نایکوئیست (Nyquist plot) رسم می گردد (شکل 3). بخش نیم دایره ای در فرکانس های بالا به فرایند انتقال الکترون و قسمت خطی (که

کاری اصلاح شده در شرایط بهینه، نانو ذرات طلا روی الکتروده کاری اصلاح شده با روش ولتامتری چرخه ای در محدوده پتانسیل 0/5- تا 1/5+ ولت، در محلول 3 میلی مولار محلول نمک طلا ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) قرار گرفت. سپس الکتروده کاری با دیونیزه شسته شد. سپس در محلول 0/10 مولار پتاسیم نیترات به منظور حذف نانو ذرات اضافی، تکنیک ولتامتری چرخه ای (در محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکترولیت سدیم کلرید) در محدوده پتانسیل 0/5- تا 1/5+ ولت روی سطح الکتروده اعمال شد. علاوه بر این، استفاده از پتاسیم نیترات برای خنثی کردن بار الکترونیکی طلا بود تا بتواند از طریق پیوندهای دی سولفیدی آپتامر که بار منفی دارد را جذب سطح الکتروده کند. بعد از تثبیت نانو GNP در شرایط بهینه، محلول آپتامر اختصاصی برای هر آنتی بیوتیک روی سطح الکتروده کاری اصلاح شده با RGO و GNP قرار گرفت.

## 2-6-2- تکنیک های الکتروشیمیایی

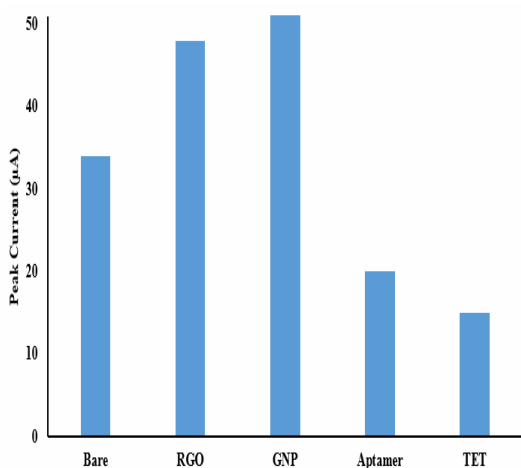
### 2-6-2-1- ولتامتری چرخه ای

تکنیک ولتامتری چرخه ای اغلب اولین تکنیک مورد استفاده در مطالعات الکتروشیمیایی در دریایی یک ترکیب، مواد بیولوژیکی و یا سطح الکتروده است. جریان ایجاد شده در الکتروده کاری بر حسب ولتاژ (پتانسیل الکتروده مرجع) رسم می شود تا نمودار ولتامتری چرخه ای به دست آید. در واقع پتانسیل الکتروده کاری در مقابل الکتروده مرجع کنترل می شود. در این تحقیق برای اعمال اختلاف پتانسیل بین الکتروده های کاری و مرجع از روش ولتامتری چرخه ای استفاده شد. در تکنیک ولتامتری چرخه ای پتانسیل الکتروده کاری به صورت خطی با زمان تغییر می کند. برخلاف ولتامتری روبش خطی، بعد از رسیدن به یک پتانسیل تعیین شده، پتانسیل الکتروده کاری در جهت عکس تغییر می کند تا به پتانسیل اولیه بازگردد. این چرخه های تغییر پتانسیل می توانند به تعداد دلخواه تکرار شوند [8].

در شکل 2 ولتا گرام CV برای محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکترولیت سدیم کلرید نشان داده شده است. در طول روبش رفت اولیه به طور فزاینده ای پتانسیل کاهش یافته اعمال شده است؛ بنابراین با فرض وجود نمونه احیا شونده در سیستم، جریان کاتدی (a-b) حداقل در مراحل اولیه در طول این دوره زمانی افزایش خواهد

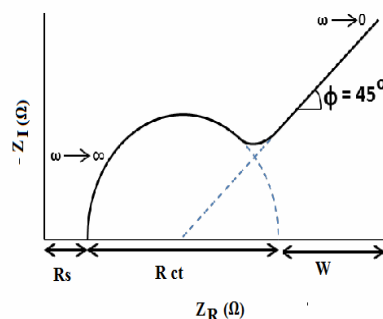
ثانیه) نشان داده شده است. با تثبیت RGO روی سطح الکتروود کاری پیک جریان به طور چشمگیری در مقایسه با الکتروود Bare افزایش یافت که حاکی از رسانایی RGO دارد. زمانی که GNP روی الکتروود کاری اصلاح شده با RGO تثبیت گردید، جریان بیشتر افزایش پیدا کرد. ایزدی و همکاران [11] گزارش کردند که با تثبیت نانو ذرات طلا روی بستر گرافیتی، رسانایی و سطح ویژه بستر گرافیتی افزایش می یابد.

بعد از تثبیت رشته آپتامر روی سطح گرافیتی اصلاح شده با RGO و GNP از طریق خودآرایی با GNP، جریان در مقایسه با حالت های قبل از آن افت کرد. علت افت جریان بعد از تثبیت آپتامر روی سطح الکتروود را می توان به دافعه الکترواستاتیک بین بارهای منفی آپتامر و فری-فرو سیانید و همچنین تشکیل لایه مقاوم در سطح الکتروود نسبت داد که باعث کاهش انتقال الکترون بین الکتروود مغز مداد گرافیتی و محلول فری-فرو سیانید می گردد. کاهش پیک جریان CV بعد از تثبیت آپتامر با نتایج ایزدی و همکاران [11] و رضوانی پناه و همکاران [12] مطابقت دارد. با تثبیت آنتی بیوتیک روی سطح الکتروود، جریان در مقایسه با حالت قبل بیشتر کاهش پیدا کرد که علت آن را می توان در تشکیل لایه مقاوم بر سطح الکتروود جويا شد که کاهش انتقال الکترون و در نتیجه کاهش جریان را در پی دارد. مقادیر پیک جریان در حالت های مختلف به ترتیب 0/034، 0/048، 0/069، 0/020، 0/015 میکرو آمپر برای Bare، RGO، GNP، Aptamer و TET به دست آمد.



**Fig 4** The peak current of different modified electrodes in 1.0 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  containing 0.1 M KCl, potential range of -0.1 to 0.70 V with scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$

امپدانس واربرگ (W) نامیده می شود) در فرکانس های پایین به پدیده انتشار مربوط می شود. در منحنی نایکوئیست قطر نیم دایره نشان دهنده مقاومت انتقال بار (Resistance (Rct) و charge transfer) و  $R_s$  نشان دهنده مقاومت محلول می باشد. طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی یکی از مهمترین روش های مشخصه یابی شامل مطالعه سرعت انتقال الکترون و پدیده انتشار در واکنش های الکتروشیمیایی است. همچنین برهمکنش اختصاصی در سطح الکتروود کاری، با تأثیر بر مقاومت الکتروود در برابر جریان عبوری نیز با مطالعه طیف امپدانس قابل ردیابی است. در مطالعه حاضر به منظور اندازه گیری مقاومت انتقال بار در قبل و بعد تثبیت آنالیت از این تکنیک استفاده گردید. در تحقیق حاضر برای تکنیک امپدانس از محدوده فرکانس  $10^5$  - 0/1 هرتز و پتانسیل 0/15 ولت استفاده شد [10].



**Fig 3** The Nyquist plot

### 3- نتایج و بحث

#### 3-1- ارزیابی الکتروشیمیایی زیست حسگر

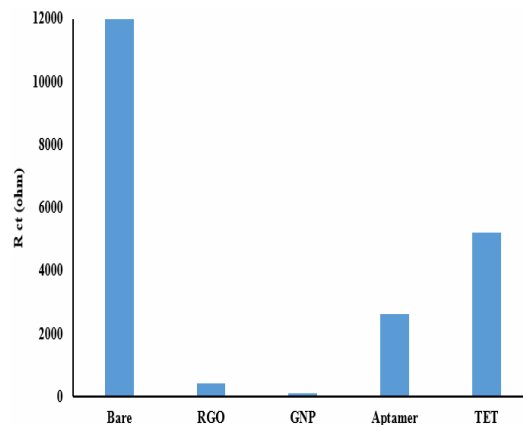
##### 3-1-1- ارزیابی با تکنیک CV

یکی از تکنیک های مؤثر و کاربردی به منظور بررسی تغییرات سطح الکتروود برای ساخت زیست حسگر CV است. در شکل 4- پیک جریان در مراحل مختلف ساخت زیست حسگر شامل الکتروود اصلاح نشده (Bare)، الکتروود اصلاح شده با RGO، الکتروود اصلاح شده با GNP، تثبیت Aptamer و TET روی سطح الکتروود در محلول 1 میلی مولار فری-فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکتروولیت سدیم کلرید (در محدوده پتانسیل 0 تا 0/7 ولت و نرخ رویش 50 میلی ولت بر

**3-1-2- ارزیابی با تکنیک EIS**

علاوه بر تکنیک CV، از تکنیک EIS نیز برای ارزیابی مقاومت انتقال بار در سطح الکتروود اصلاح شده گرافیتی با نانو مواد در مراحل مختلف ساخت و تثبیت آپتامر و آنتی بیوتیک تتراسایکلین در محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکتروولیت سدیم کلرید استفاده شد. تکنیک EIS یک روش مناسب و کارآمد برای نشان دادن تغییرات سطح الکتروود است. در منحنی نایکوئیست همانطور که در بخش 2-6-2 ذکر شد بخش نیم دایره‌ای در فرکانس‌های بالا به فرایند انتقال الکترون مرتبط است و بخش خطی به پدیده نفوذ مربوط می‌شود.

در شکل 5 داده‌های مقاومت انتقال بار در مراحل مختلف ساخت الکتروود و تثبیت آپتامر و آنتی بیوتیک تتراسایکلین نشان داده شده است. بعد از تثبیت RGO و GNP مقاومت انتقال بار کاهش بسیار چشم‌گیری داشته است که حاکی از رسانایی بالا آن‌ها دارد. در واقع بعد از اصلاح الکتروود و با تثبیت RGO و GNP روی الکتروود، به دلیل قابلیت رسانایی خوب، مقاومت انتقال بار در مقایسه با الکتروود اصلاح نشده کاهش یافته است.

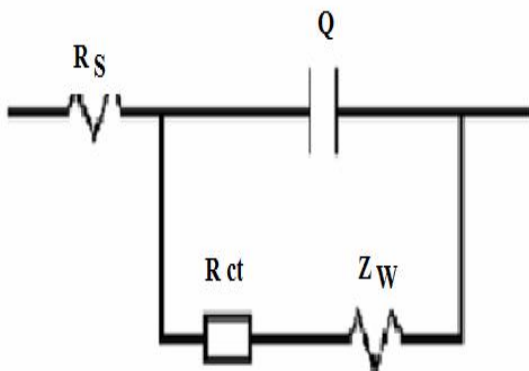


**Fig 5** The Rct value of different modified electrodes in 5.0 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}$  containing 0.1 M KCl, potential range of -0.1 to 0.70 V with scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$

بعد از تثبیت آپتامر روی سطح الکتروود اصلاح شده با RGO و GNP، با ایجاد لایه خودآرایی انتقال الکترون کاهش یافت که منجر به افزایش مقاومت انتقال بار شده است. در اثر اتصال بین آپتامر و آنتی بیوتیک تتراسایکلین، یک لایه مقاوم ایجاد شد که

این لایه مانع از رسیدن یون‌های فری- فرو سیانید به سطح الکتروود شد که در پی آن مقاومت انتقال بار در مقایسه با حالت قبل بیشتر افزایش پیدا کرد. همچنین وقتی تتراسایکلین روی مکان‌های فعال سطح الکتروود (رشته‌های آپتامر) را پر می‌کند فرایند انتقال الکترون‌ها را محدود می‌کند [13].

به منظور فیت کردن داده‌های امپدانس الکتروشیمیایی از یک مدار الکتريکی معادل استفاده شد. در این تحقیق از مدل رندلس (Randles) برای این هدف استفاده شد. لازم به ذکر است که برای تمامی داده‌ها از این مدل استفاده گردید که در شکل 6 طرح شماتیک آن آورده شده است که در آن،  $R_s$  معرف مقاومت محلول،  $Q$  مربوط به لایه دوگانه خازنی در فصل مشترک محلول و الکتروود که به طور موازی با مقاومت انتقال بار ( $R_{ct}$ ) و امپدانس واربرگ ( $Z_w$ ) هستند.



**Fig 6** Equivalent circuit used to fitting of EIS data

**3-2- بررسی مشخصه‌های زیست حسگر****3-2-1- تکرارپذیری**

تکرارپذیری با ساخت یک زیست حسگر در شرایط بهینه که RGO و GNP و آپتامر روی آن تثبیت شده بودند درون محلول آنتی بیوتیک با غلظت  $1 \times 10^{-9}$  مولار ارزیابی شد و سپس EIS در پنج مرتبه اندازه‌گیری متوالی برای آن ثبت گردید. مقدار RSD برای داده‌های مقاومت انتقال بار 4/2 درصد محاسبه گردید که نشان از تکرارپذیر بودن زیست حسگر نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین دارد. در شکل 7 مقدار تغییرات مقاومت انتقال بار برای هر مرتبه اندازه‌گیری نشان داده شده است.

محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکترولیت سدیم کلرید با تکنیک EIS ثبت گردید. همان‌طور که در جدول 1 آورده شده است بعد از گذشت 21 روز تنها 5/3 درصد از پاسخ اولیه زیست حسگر کم شده است که پایداری مطلوب زیست حسگر را نشان می‌دهد. بهات و همکاران [14] نشان دادند که سرعت واکنش‌های رهاسازی DNA در دمای 4 درجه سلسیوس از سطح الکتروود کاهش می‌یابد.

**Table 1.** Biosensor stability on different days of storage

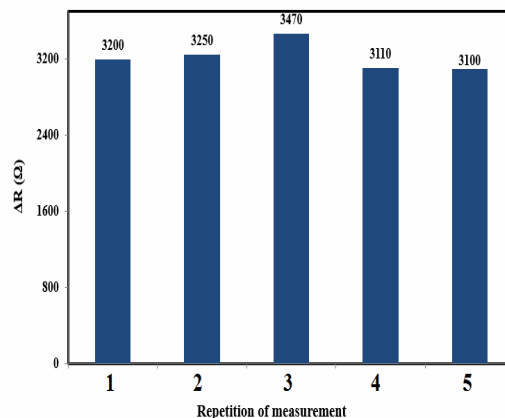
days of storage	Rct ( $\Omega$ )
1	3370
3	3311
6	3296
9	3261
12	3231
15	3204
18	3200
21	3191

علت پایداری الکتروود را می‌توان به محافظت از آپتامر توسط نانو ذرات طلا در سطح الکتروود نسبت داد؛ بنابراین دمای 4 درجه سلسیوس به‌عنوان بهترین دمای ذخیره‌سازی زیست حسگر در نظر گرفته شد.

### 3-2-4-گزینش پذیری

برای بررسی گزینش پذیری زیست حسگر نسبت به تتراسایکلین، آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شامل استرپتومایسین (STP)، سولفادیازین (SUL) و پنی‌سیلین جی (PEN) مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور سه زیست حسگر در شرایط بهینه ساخته شدند و بعد از تثبیت RGO و GNP و آپتامر روی آن‌ها، الکتروود به مدت 90 دقیقه درون غلظت مشخصی از آنتی‌بیوتیک‌های مذکور قرار گرفت. همان‌طور که در شکل 9 نشان داده شده است، زیست حسگر اختصاصی تتراسایکلین پاسخ قابل توجهی به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان نداد که نشان‌دهنده این است که زیست حسگر به‌خوبی توانست با آنالیت خود اتصال پیدا کند بنابراین زیست حسگر ساخته‌شده را می‌توان برای شناسایی کمی و کیفی تتراسایکلین در نمونه‌های عسل بکار گرفت.

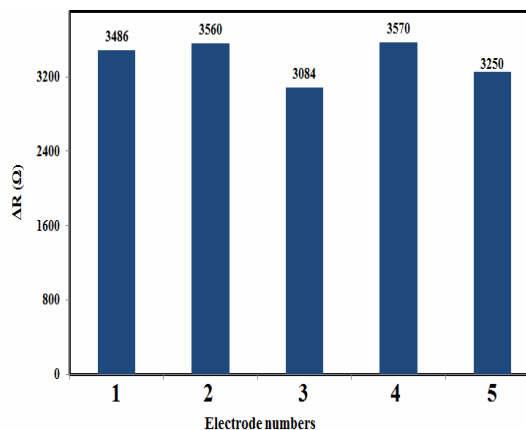
علت این موضوع را می‌توان به تثبیت آپتامر اختصاصی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین روی سطح الکتروود و اتصال با آنالیت مورد نظر خود (تتراسایکلین) نسبت داد [5].



**Fig 7** Biosensor repeatability results for five measurement times for detection of tetracycline

### 3-2-2-تکثیر پذیری

به‌منظور بررسی تکثیر پذیری زیست حسگر، تعداد پنج الکتروود کاری به‌طور مستقل تحت شرایط بهینه ساخته شد و برای مدت 90 دقیقه درون محلول آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین  $10^{-9}$  مولار غوطه‌ور شد. با ثبت داده‌های مقاومت انتقال بار مشخص گردید که درصد RSD برای این پنج زیست حسگر 5/6 می‌باشد که حاکی از تکثیر پذیر بودن زیست حسگر دارد. در شکل 8 مقدار تغییرات مقاومت انتقال بار برای پنج الکتروود نشان داده شده است.



**Fig 8** Reproducibility results of five biosensors for tetracycline detection

### 3-2-3-پایداری

به‌منظور بررسی پایداری زیست حسگر، به‌طور مستقل چهار زیست حسگر در شرایط یکسان ساخته شد و به مدت سه هفته در دمای 4 درجه سلسیوس ذخیره شد. میانگین داده‌های مقاومت انتقال بار در فاصله زمانی هر سه روز یک‌بار در

تتراسایکلین در نمونه‌های عسل ارزیابی شد. برای این منظور در محلول 1 میلی مولار فری- فرو سیانید با نسبت 1:1 و 0/1 مولار الکترولیت سدیم کلرید با تکنیک EIS داده‌های مقاومت انتقال بار ثبت گردید. برای این منظور غلظت‌های  $1 \times 10^{-9}$  و  $1 \times 10^{-11}$  مولار از تتراسایکلین تهیه و در نمونه‌های عسل تزریق شد. بر طبق نتایج به دست آمده از داده‌های مقاومت انتقال بار، درصد ریکاوری زیست حسگر از نسبت مقدار شناسایی شده به مقدار تزریق شده به نمونه‌های عسل در محدوده 94/1 تا 103/4 برای شناسایی تتراسایکلین محاسبه شد (جدول 2).

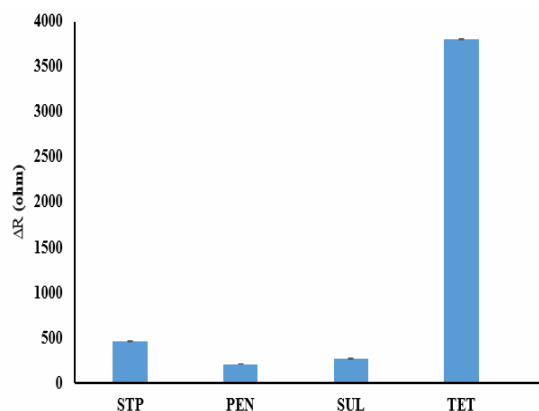


Fig 9 Selectivity of biosensor towards TET in the presence of other antibiotics

### 3-3- شناسایی تتراسایکلین در نمونه‌های عسل

کاربرد عملی زیست حسگر از طریق شناسایی آنتی‌بیوتیک

Table 2 Determination of TET by means of impedimetric biosensor in honey samples

Added value (M)	Detected <sup>a</sup> (M)	Recovery (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
$1 \times 10^{-9}$	$(0.941 \pm 0.062) \times 10^{-9}$	94.1	6.6
$1 \times 10^{-11}$	$(1.034 \pm 0.083) \times 10^{-11}$	103.4	8.0

<sup>a</sup> Average of three measurements  $\pm$  standard deviation. <sup>b</sup> relative standard deviation

### 5- منابع

- [1] Li, J., Chen, L., Wang, X., Jin, H., Ding, L., Zhang, K., and Zhang, H. (2008). Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 75(5), 1245-1252.
- [2] Fazlara, A., Najafzadeh Varzi, H., and Izadi, B. (2014). Survey on tetracycline and oxytetracycline antibiotic residues in honeys produced in some honey hives in Khuzestan province using HPLC method. *Iranian Veterinary Journal*, 10, 65-73.
- [3] Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., and Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.
- [4] Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Ensafi, A., Izadi, Z., and Bonyadian, M. (2019). Fabrication of an amperometric aptasensor for determination of antibiotic amount residues in milk. *Food Science and Technology*, 16(89), 47-57.
- [5] Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Izadi, Z., Ensafi, A. A., Rostami, S., and Siadat, M. (2019). An

### 4- نتیجه گیری

در این مطالعه، یک زیست حسگر ایمپدیمتریک مبتنی بر نانو مواد شامل گرافن اکسید احیاشده و نانو ذرات طلا برای شناسایی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در نمونه‌های عسل توسعه داده شد. نتایج حاصل از تکنیک CV نشان داد که تثبیت نانو مواد بر روی سطح الکتروود مغز مداد گرافیتی پیک جریان افزایش می‌یابد درحالی‌که با تثبیت آپتامر و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بر روی الکتروود پیک جریان به‌طور چشم‌گیری کاهش پیدا می‌کند. نتایج حاصل از تکنیک EIS نیز تأییدکننده نتایج CV بود به‌عبارت‌دیگر با تثبیت نانو مواد، مقاومت انتقال بار کاهش یافت درحالی‌که با تثبیت آپتامر و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقدار مقاومت انتقال بار افزایش یافت. ارزیابی ارقام شایستگی نشان داد که زیست حسگر ساخته شده برای شناسایی عسل تکرارپذیری، تکثیرپذیری، پایداری و گزینش پذیری قابل قبولی دارد. با تزریق غلظت‌های مختلف تتراسایکلین کاربرد عملی زیست حسگر در نمونه‌های عسل ارزیابی شد بر طبق نتایج به دست آمده از داده‌های مقاومت انتقال بار، درصد ریکاوری زیست حسگر در محدوده 94/1 تا 103/4 برای شناسایی تتراسایکلین حاصل شد.



- [10] Hajkova, A., Barek, J., and Vyskocil, V. (2017). Electrochemical DNA biosensor for detection of DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Bioelectrochemistry*. 116: 1-9.
- [11] Izadi, Z., Sheikh-Zeinoddin, M., Ensafi, A. A., and 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.
- [12] Razavipanah, I., Rounaghi, G.H., Deiminiat, B., Damirchi, S., Abnous, K., Izadyar, M., and Khavani, M. (2019). A new electrochemical aptasensor based on MWCNT-SiO<sub>2</sub>@ Au core-shell nanocomposite for ultrasensitive detection of bisphenol A. *Microchemical Journal*. 146: 1054-1063.
- [13] Ensafi, A. A., Akbarian, F., Heydari-Soureshjani, E., and Rezaei, B. (2018). A novel aptasensor based on 3D-reduced graphene oxide modified gold nanoparticles for determination of arsenite. *Biosensors and Bioelectronics*, 122, 25-31.
- [14] Bhatt, N., Huang, P.J.J., Dave, N., and Liu, J. (2011). Dissociation and degradation of thiol-modified DNA on gold nanoparticles in aqueous and organic solvents. *Langmuir*. 27: 6132-6137.
- impedimetric aptasensor for ultrasensitive detection of Penicillin G based on the use of reduced graphene oxide and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 186(6), 372.
- [6] Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Izadi, Z., Rostami, S., Ensafi, A. A., Siadat, M., and Losson, E. (2019). Detection of sulfadimethoxine in meat samples using a novel electrochemical biosensor as a rapid analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103252.
- [7] Rezaei, B., Jamei, H.R., and Ensafi, A.A. (2018). An ultrasensitive and selective electrochemical aptasensor based on RGO-MWCNTs/Chitosan/carbon quantum dot for the detection of lysozyme. *Biosensors and Bioelectronics*. 115: 37-44.
- [8] Zhang, J., Li, Z., Zhao, S., and Lu, Y. (2016). Size-dependent modulation of graphene oxide-aptamer interactions for an amplified fluorescence-based detection of Aflatoxin B1 with a tunable dynamic range. *Analyst*. 141: 4029-4034.
- [9] Mandli, J., Mohammadi, H., and Amine, A. (2017). Electrochemical DNA sandwich biosensor based on enzyme amplified microRNA-21 detection and gold nanoparticles. *Bioelectrochemistry*. 116:17-23.

## Development of an impedimetric biosensor based on nanomaterial for determination of tetracycline in honey

Mohammad-Razdari, A. <sup>1</sup>, Ghasemi-Varnamkhasti, M. <sup>2</sup>, Rostami, S. <sup>2</sup>, Izadi, Z. <sup>3\*</sup>,  
Ensafi, A. <sup>4</sup>

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. Assistant Professor, Department of Mechanical Engineering of Biosystems, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.
4. Professor, Department of Chemistry, Isfahan University of Technology

(Received: 2019/08/31 Accepted: 2020/06/27)

Determination of antibiotic residues in food including honey is very important. To date, various methods have been developed to determine antibiotics in honey and other animal products. In recent years, the fabrication of electrochemical biosensors in combination with nanomaterial has attracted much attention. In the present study, an impedimetric biosensor based on nanomaterial including reduced oxide graphene (RGO) and gold nanoparticles (GNP) was developed for antibiotic detection of tetracycline in honey samples. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques were used to evaluate the working electrode surface. Peak current values in different modes were 0.034, 0.048, 0.09, 0.020 and 0.015  $\mu\text{A}$  for unmodified electrode, RGO, GNP, aptamer and antibiotic, respectively. Biosensor characteristics including reproducibility, stability, and selectivity were evaluated using resistance charge transfer data, the results showed that they were acceptable. In order to calculate recovery percentage, concentrations of  $1 \times 10^{-9}$  and  $1 \times 10^{-11}$  M were prepared from tetracycline and injected into honey samples. The results showed that the proposed biosensor provides 94.1% to 104.4% recovery rate for tetracycline in honey samples.

**Keyword:** Pencil Graphite Electrodes, Antibiotic, Gold Nanoparticles, Electrochemical Impedance, Electrochemical Transducer.

---

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