



## سنتز آسان و سبز نانوکامپوزیت‌های زیست سازگار بر پایه گرافن اکسید کاهش یافته/اکسید آهن جهت

### اندازه‌گیری وانیلین در نمونه‌های غذایی: بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ

مهسا تبریزی<sup>۱</sup>، سید احمد شهیدی<sup>۲\*</sup>، فرشته چکین<sup>۳</sup>، آزاده قربانی حسن سرایی<sup>۴</sup>، شهرام نقی زاده رئیسی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۳- دانشیار، گروه شیمی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۵- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

#### چکیده

#### اطلاعات مقاله

#### تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۱

اندازه‌گیری افزودنی‌ها نقش مهمی در کنترل کیفیت مواد غذایی دارد و تأثیر بسیاری بر سلامت عمومی دارد؛ بنابراین، تشخیص سریع این ترکیبات در نمونه‌های غذایی در ایمنی مواد غذایی اهمیت دارد. در این پژوهش، نانوکامپوزیت گرافن اکسید احیاکننده/ $rG-Fe_3O_4-NC$   $Fe_3O_4$  از طریق عصاره پوست لیموترش در محیط آبی به‌عنوان یک عامل کاهش‌دهنده سنتز شد. در ابتدا بهینه‌سازی چند متغیره بر مبنای طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر در روش سطح پاسخ جهت تعیین شرایط بهینه متغیرهای تجربی مؤثر بر ساخت الکتروود مورد استفاده قرار گرفت. طراحی آزمایش برای تعیین شرایط بهینه pH و محتوای نانوکامپوزیت (درصد) در سنتز الکتروود انجام شد. شرایط بهینه شامل pH معادل ۶ و محتوای نانوکامپوزیت ۸ درصد تعیین شدند. سنتز نانو کامپوزیت‌ها با تکنیک‌های TEM و XRD مشخص شدند. پس‌از آن، الکتروود خمیر کربن (CPE) با  $rG-Fe_3O_4-NC$  اصلاح شد و به‌عنوان یک حسگر الکتروآنالیز برای بررسی وانیلین استفاده شد. گزینش پذیری الکتروود اصلاح‌شده از طریق تداخل ویتامین B2، متیونین، والین، گلیسین، کلرید پتاسیم (KCl)، برومید پتاسیم (KBr) و گلوکز در حضور ۲۵ میکرومولار وانیلین در سطح  $rG-Fe_3O_4-NC/CPE$  با خطای قابل قبول ۵ درصد بررسی شد. نتایج نشان داد که ۵۰۰ برابر ترکیبات فوق هیچ‌گونه تداخل مهمی در فرآیند تشخیص بر ۲۵ میکرومولار وانیلین ندارند. گستره خطی برای وانیلین در محدوده بین ۱/۰ نانومولار تا ۲۵۰ میکرومولار با حدتشخیص ۰/۳ نانومولار گزارش شد. در نهایت  $rG-Fe_3O_4-NC/CPE$  با موفقیت برای تعیین مقدار وانیلین در نمونه‌های غذایی استفاده شد. بنابراین می‌توان از حسگر پیشنهادی در خطوط تولید مواد غذایی نظیر شیرهای طعم دار و بستنی به صورت برخط در تعیین مقدار وانیلین استفاده کرد.

#### کلمات کلیدی:

حسگر الکتروشیمیایی،  
طراحی آزمایش‌ها،  
عصاره پوست لیموترش،  
وانیلین.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.283

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.26.7

\* مسئول مکاتبات:

sashahidy@yahoo.com

## ۱- مقدمه

وانیلین (۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدئید)، وانیلیک اسید، ۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید، پی هیدروکسی بنزیل الکل و ۴-هیدروکسی بنزآلدئید ترکیبات شیمیایی اصلی به دست آمده از دانه‌های وانیل هستند [۱]. این ترکیب یک افزودنی آلی معطر است که به‌طور گسترده در انواع مختلف محصولات غذایی استفاده می‌شود [۲]. وانیلین و پیرونیال موجود در وانیل مسئول طعم لذیذ بوده و اثرات مفیدی بر سلامتی دارند [۳] و به عنوان ماده اصلی طعم‌دهنده وانیل محسوب می‌شود که ۲/۴۲-۱/۵۲ درصد وزن خشک دانه را تشکیل می‌دهد [۳]. این افزودنی بیشتر به عنوان یک ماده طعم‌دهنده در غذاها، نوشیدنی‌ها و داروها استفاده می‌شود که اغلب در طعم‌های شیرین استفاده می‌شود، هرچند که مقدار کمی هم در غذاهای شور استفاده می‌شود. وانیلین، یک فنل است و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان خوب، عامل ضد میکروبی و تقویت‌کننده طعم هم عمل می‌کند. همچنین برای پوشاندن یا کم کردن طعم‌های ناخواسته نیز استفاده می‌شود. وانیلین در بین ترکیبات آروماتیک شناخته شده بیشترین مصرف جهانی را به خود اختصاص داده است [۴] و از آنجایی که اهمیت فناورانه بالایی دارد، تشخیص آن با حساسیت بالا در صنعت ضروری است.

برای اندازه‌گیری وانیلین تاکنون روش‌های مختلفی مانند میکرو استخراج مایع-مایع در ترکیب با الکتروفورز ناحیه موئینه [۵]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۶]، کروماتوگرافی لایه نازک [۷]، تکنیک‌های الکتروشیمیایی [۸-۱۰] و آنالیز اسپکتروفتومتری [۱۱] استفاده شده است.

تجهیزات در روش‌های کروماتوگرافی گران قیمت بوده و هزینه‌های عملیاتی آنها نیز بالا است. از سوی دیگر به آماده‌سازی اولیه نمونه نیاز دارند؛ اما روش‌های الکتروشیمیایی اغلب به دلیل گزینش پذیری بالا، هزینه کم، تشخیص سریع و عدم وجود یک فعالیت اولیه قابل توجه برای آماده‌سازی نمونه مورد علاقه قرار گرفته‌اند [۱۲-۱۴]. در روش‌های الکتروشیمیایی، الکترودهای کار نقش کلیدی در سنجش دارند [۱۵]. در سال‌های اخیر استفاده از مواد نانو ساختار در اصلاح سطح الکترودها توسعه یافته است [۱۶]. گرافن اکسید به دلیل داشتن هدایت الکتریکی بالا، سطح فعال بالا، نسبت سطح به حجم بالا و خواص الکتروکاتالیزوری عالی، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است [۱۷]. گرافن اکسید

می‌تواند به عنوان بستر مناسب با مزیت‌های عالی عمل کند، به‌طوری که نانو ذرات فلزی و نافلزی می‌توانند به روی سطح آن پراکنده شده و انتقال الکترون در سطح این مواد هیبریدی را تسهیل کنند [۱۸].

از احیای شیمیایی گرافن اکسید و حذف برخی گروه‌های اکسیژن دار آن، گرافن اکسید کاهش یافته به دست می‌آید. گرافن اکسید کاهش یافته به‌واسطه زیست سازگاری مناسب در زمینه کشت سلولی، زیست حسگرها و مهندسی بافت به کار می‌رود [۱۹]. احیای گرافن اکسید با دو روش شامل احیای حرارتی و احیای شیمیایی امکان‌پذیر است. روش احیای شیمیایی گرافن اکسید، توسط هیدرازین و مشتقات آن، سدیم بوروهیدرات، هیدرویدیک اسید و مخلوط آن با استیک اسید و اسکوربیک اسید در دمای محیط یا با اعمال گرمای ملایم انجام می‌شود. در این روش، نیاز به تجهیزات و یا محیط خاصی برای احیای نیست. به همین دلیل، احیای شیمیایی روش ارزان‌تر و ساده‌تری برای احیای حجم بیشتری از گرافن اکسید در مقایسه با روش حرارتی است [۲۰]. در روش شیمیایی از معرف‌های کاهنده خطرناک و سمی استفاده می‌شود؛ اما سنتز سبز به دلیل غیر سمی و ارزان بودن به‌عنوان روشی جدید و جانشینی با ارزش برای روش‌های شیمیایی سمی و مخرب در سنتز گرافن اکسید کاهش یافته با کارایی بالا استفاده می‌شود [۲۱]. در سنتز سبز از مواد طبیعی مختلفی استفاده می‌شود که از استخراج حاصل از برگ یا ساقه گیاهان و یا میوه‌ها به‌عنوان معرف کاهنده و پایدارکننده در سنتز گرافن اکسید کاهش یافته به کار گرفته می‌شود [۲۲]. در حال حاضر ب یوستتزر نانو ذرات فلزی به‌وسیله گیاهان درحال توسعه می‌باشد. نانوفناوری سبز توجه زیادی را به خود جلب کرده و شامل طیف وسیعی از فرایندهایی می‌شود که باعث کاهش یا حذف مواد سمی بازگردانده شده به محیط زیست می‌شود. سنتز نانو ذرات فلزی با استفاده از بافت غیرفعال گیاه [۲۳]، عصاره گیاهان [۲۴] و سایر قسمت‌های زنده گیاهان [۲۵]، یک جایگزین مدرن برای تولید آن هاست. از طرفی در روش سنتز سبز نانو موادی نظیر نانو ذرات فلزی، یون‌های فلزات با استفاده از ترکیبات گیاهی معمولاً یک واکنش تک‌مرحله‌ای داده که بدون نیاز به سورفکتانت و سایر عوامل پایدارکننده به نانوذره تبدیل می‌شوند. مواد و ترکیبات فعال زیستی در

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

آهن (III) کلرید، سدیم هیدروکسید، گرافن اکسید، آهن (II) سولفات از شرکت مرک خریداری شد و برای سنتز نانوذرات  $Fe_3O_4$  استفاده شدند. لیموترش از بازار محلی (آمل، مازندران، ایران) خریداری و برای احیای گرافن اکسید استفاده شد. وانیلین، روغن پارافین، فسفریک اسید، پودر گرافیت و سایر مواد مورد استفاده از شرکت سیگماآلدریج خریداری شدند.

### ۲-۲- تهیه محلول‌ها

#### ۲-۲-۱- بافرهای فسفات

از محلول‌های بافر فسفات با غلظت کل  $M 0.1$ ، برای تثبیت pH محلول‌های آزمایشی در محدوده  $pH 2.00$  تا  $10.00$  استفاده شد [۳۰].

#### ۲-۲-۲- وانیلین

محلول وانیلین ( $0.1$  مولار) با حل کردن  $0.152$  گرم وانیلین در  $10$  میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و به‌عنوان محلول ذخیره برای تحقیقات الکتروشیمیایی بعدی نگهداری شد. برای آنالیز وانیلین از نمونه‌های بیسکویت، شکلات و شیر قهوه استفاده شد. برای نمونه‌های جامد، ابتدا پودر شده و  $1$  گرم از آن و یا  $1$  میلی‌لیتر از شیر قهوه در داخل  $10$  میلی‌لیتر اتانول به مدت  $45$  دقیقه تحت فراصوت قرار گرفت. نمونه طراحی شده به مدت  $40$  دقیقه با دور  $3000$  دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و نمونه با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۰].

#### ۲-۲-۳- تهیه عصاره لیموترش

پوست لیمو طی  $48$  ساعت با جریان هوای خشک در آن در دمای  $40$  درجه سانتی‌گراد خشک گردید و با استفاده از یک آسیاب آزمایشگاهی، آسیاب شده، سپس پوست لیمو خشک شده در بسته‌بندی‌های پلی‌اتیلنی (زیپ کیپ) قرار داده و در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد در یخچال جهت آزمون‌های بعدی نگهداری گردید [۳۱]. پوست خشک شده ( $5$  گرم) با استفاده از یک دستگاه خردکننده به قطره‌های  $1$  تا  $2$  میلی‌لیتر آسیاب شده و با افزودن  $30$  میلی‌لیتر حلال اتانول- آب ( $70:30$  V/V) در مخزن دربندی شده قرار گرفت، مخزن در حمام اولتراسونیک به مدت  $30$  دقیقه در دمای اتاق ( $25$  درجه

عصاره‌های گیاهان از جمله فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های مؤثر فعال محلول در آب می‌توانند برای احیای یون‌های فلزی به نانو ذرات در دمای اتاق مورد استفاده قرار گیرند [۲۶]. از طرفی مطالعات انجام شده توسط سایر پژوهشگران نشان داده است که نانوکامپوزیت‌های گرافن اکسید کاهش‌یافته دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس‌ها و پرتوزوئرها می‌باشند. خاصیت ضد باکتری گرافن اکسید کاهش‌یافته نسبت به باکتری گرم منفی نظیر *اشرشیاکلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* زیاد می‌باشد که میزان خاصیت ضد باکتری وابسته به مقدار گرافن اکسید کاهش‌یافته است [۲۷].

به‌منظور ساخت الکتروود اصلاح شده با نانو کامپوزیت، بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در ساخت حسگر اهمیت زیادی دارد. استفاده از روش بهینه‌سازی با یک عامل در هر زمان، تعداد آزمایش‌های زیاد، مواد شیمیایی قابل‌توجه و زمان بالا نیاز دارد. راهبرد مناسب یک رویکرد آماری است و استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) بر اساس طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه برای تعیین رابطه بین متغیرهای فرایند و پاسخ است [۱۲ و ۲۸]. روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و تجربی مفید برای ایجاد مدل و برای بهینه‌سازی فرایندها حتی در حضور فعل و انفعالات پیچیده است. به دلیل استفاده عملی در بهینه‌یابی‌ها، روش سطح پاسخ یک استراتژی کارآمد برای بهینه‌سازی یک فرایند چند متغیره است و شامل یک یا چندین متغیر وابسته تحت تأثیر فاکتورهای مختلف یا متغیرهای مستقل می‌باشد. به‌کارگیری روش RSM می‌تواند منجر به تسهیل پیچیدگی روش‌های آزمایش مورد نیاز برای ارزیابی متغیرهای چندگانه و برهمکنش آنها شود؛ بنابراین، این روش کار و زمان را نسبت به دیگر روش‌های موردنیاز برای بهینه کردن کاهش می‌دهد [۲۹].

در این مقاله سعی شده است یک روش ساده و ارزان برای سنتز نانوکامپوزیت‌های زیست سازگار گرافن اکسید کاهش‌یافته/نانو ذرات اکسید آهن با استفاده از عصاره حاصل از پوست لیموترش به عنوان یک معرف کاهنده و پایدارکننده ارائه شود. جنبه دیگر این پژوهش بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در ساخت حسگر با روش سطح پاسخ و استفاده از این حسگر در اندازه‌گیری وانیلین است.

گرافن اکسید کاهش یافته و خمیر کربن اصلاح نشده به‌عنوان الکترودهای کار استفاده شدند. از یک میله پلاتینی به‌عنوان الکتروکد کمک‌ی در ثبت ولتاموگرام‌های موج مربعی استفاده شد. از یک الکتروکد نقره/ نقره کلرید/ پتاسیم کلرید،  $\text{Ag|AgCl|KCl}(3\text{M})$  به‌عنوان الکتروکد شاهد استفاده شد.

#### ۲-۵-۱- بررسی مورفولوژی و ساختار نانو کامپوزیت

برای تعیین سایز ذرات مورد استفاده، از روش پراش پرتو X استفاده شد. تحقیق و بررسی ساختار توسط دستگاه XRD مدل ARL PERFORMIR'X انجام شد [۳۲]. منبع تشعشع دستگاه Cu-ka بود. پرتوهای تابشی از نمونه در دمای محیط در محدوده  $2\theta$  بین ۲۰ تا ۷۰ درجه با اندازه گام  $0.02$  درجه بر ثانیه در زمان ۵۰ دقیقه جمع‌آوری شد.

#### ۲-۵-۲- بررسی اثر سرعت روبش پتانسیل بر رفتار

کاتالیزوری ترکیب مورد نظر با استفاده از روش ولتامتری روبش خطی

برای بررسی نفوذی و یا جذب سطحی بودن فرآیند اکسایش آنالیت‌ها در سطح الکتروکد اصلاح‌شده از ولتامتری روبش خطی استفاده شد. بدین منظور ولتاموگرام‌های روبش خطی الکتروکد اصلاح‌شده در حضور ترکیب مورد نظر در سرعت‌های اسکن ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌ولت بر ثانیه ثبت و منحنی جریان برحسب جذر سرعت روبش رسم شد [۳۰ و ۳۲].

#### ۲-۵-۳- بررسی‌های کروماتوگرافی

برای تعیین ضریب نفوذ ترکیبات مورد آنالیز از تکنیک کروماتوگرافی استفاده شد. بدین منظور نرم‌افزار دستگاه در حالت کروماتوگرافی قرار گرفت. کروماتوگرافی برای ترکیبات مورد آنالیز در حضور غلظت‌های مختلف ترکیب مورد آنالیز و با پتانسیل اعمالی مورد نظر ثبت شدند. در ادامه منحنی تغییرات جریان کاتالیزیرحسب عکس جذر زمان ثبت و از رابطه کاترل ضریب نفوذ محاسبه شد [۳۰ و ۳۲].

#### ۲-۵-۴- تعیین محدوده خطی ترکیبات مورد آنالیز با

#### استفاده از روش ولتامتری موج مربعی

برای تعیین گستره غلظت‌حسگر تهیه شده و حد تشخیص مربوط به آن از روش ولتامتری موج مربعی استفاده شد. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های یک حسگر محدوده‌ای است که به آن جواب می‌دهد. به عبارتی کمترین غلظتی که ماده در سطح آن حسگر سیگنال خود را ظاهر می‌کند که به آن محدوده خطی

سانتی‌گراد) قرار داده شد. سوسپانسیون پالایه شده و پودر باقی‌مانده دو بار دیگر با استفاده از ۲۵ میلی‌لیتر حلال اتانول- آب (۷۰:۳۰، V/V) استخراج شد. پس از تصفیه، عصاره پالایه شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر در یک بالن ژوژه (۱۰۰ میلی‌لیتر) توسط حلال اتانول-آب (۷۰:۳۰، V/V) رقیق شد و قبل از مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۳۱].

#### ۲-۳- سنتز سبز گرافن اکسید کاهش یافته

گرافن اکسید کاهش یافته (rGO) از پیش‌ماده گرافن اکسید (GO) با استفاده از عصاره پوست لیمو تهیه شد. به‌طور خلاصه، عصاره پوست لیمو (۱۰ mL) به‌صورت قطره‌ایبه مدت ۴۵ دقیقه به ۲۰ mL از سوسپانسیون آبی GO (۰/۵ mg/mL) اضافه شد و مخلوط به مدت ۶ ساعت در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  مورد رفلکس‌رگر گرفت. محصول با استفاده از سانتریفیوژ در  $15000$  دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جدا شده، به مدت چهار بار با آب شسته شد و در طول شب در  $70^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس در آون خشک گردید [۲۷].

#### ۲-۴- ساخت حسگر خمیر کربن اصلاح شده با

#### گرافن اکسید کاهش یافته (rGO/CPE)

برای تهیه خمیر کربن مقداری از پودر گرافیت را در یک هاون دستی ریخته و سپس به پودر گرافیت قطره‌قطره روغن پارافین اضافه کردیم تا خمیر کاملاً یکنواخت و دارای خواص شیشه‌ای کره به دست آید. خمیر کربن تهیه‌شده را به انتهای باز کاملاً صاف یک لوله شیشه‌ای به قطر سه میلی‌متر وارد کردیم و با مالیدن سطح آن بر روی یک ورق سفید کاغذ گلاسه، سطح کاملاً صاف و یکنواختی حاصل شد. برای اتصال الکتریکی الکتروکد، از یک سیم مسی استفاده می‌شود که با فشار دادن سیم مسی موجود در لوله به طرف پایین می‌توان خمیر کربن موجود در انتهای لوله را به راحتی از لوله خارج نمود و سطح الکتروکد را تجدید کرد. سپس ۱ میلی‌گرم از گرافن اکسید کاهش‌یافته در ۱ میلی‌لیتر اتانول برای ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت‌پراکنده‌شده و ۵ میکرولیتر از آن بر روی سطح الکتروکد خمیر کربن قطره گذاری شده و در دمای اتاق خشک شد [۲۷].

#### ۲-۵- آزمون‌ها

برای حذف مداخله افت اهمی از سیستم ۳ الکترودی استفاده شد. از الکترودهای خمیر کربن اصلاح‌شده با گرافن اکسید و

مزاخمت‌ها ثبت شد. اگر تغییر در جریان و یا پتانسیل مربوط به اکسایش آنالیت‌ها در حضور مزاخمت تغییری بیشتر از حدود ۵٪ (به اضافه و منهای پنج درصد) را نشان ندهد، آن میزان به‌عنوان مقدار مزاخمت در نظر گرفته نمی‌شود. چنانچه گونه تغییری بیش از این مقدار را نشان دهد میزان غلظت گونه مزاخمت را کاهش داده تا تغییرات در محدوده مورد نظر قرار گیرد [۳۰ و ۳۲].

## ۲-۶- روش بهینه‌سازی

طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر (RCCD) سه سطحی دو فاکتوری برای بررسی بهینه‌سازی به کار رفت. pH ( $X_1$ ) و محتوای نانوکامپوزیت الکتروود ( $X_2$ ) به‌عنوان متغیرهای مستقل انتخاب شدند (جدول ۱). جریان آندی مربوط به وائیلین به‌عنوان پاسخ آزمایش‌های طرح در نظر گرفته شد. طرح کلی آزمایش‌ها شامل ۱۳ آزمون (Run) بود که با ۵ تکرار در نقاط مرکزی انجام شد (جدول ۲).

گویند. کمترین غلظتی که در آن، ماده سیگنال‌ش را ظاهر می‌کند تا غلظتی که بعداز آن با اضافه کردن ماده مورد نظر، سیگنال ماده ثابت باقی می‌ماند و افزایشی مشاهده نمی‌شود. افزایش مقدار آنالیت تا اندازه‌ای می‌باشد که افزودن مقدار اضافه از آنالیت‌ها باعث تغییر در جریان کاتالیزوری نشود [۳۰ و ۳۲].

## ۲-۵-۵- بررسی اثر گونه‌های مزاخمت بر فرآیند کاتالیزوری ترکیب مورد آنالیز

برای بررسی اثر گونه‌های مزاخمت جهت کاربرد این حسگر در آنالیز ترکیبات مورد نظر در نمونه‌های حقیقی از روش ولتامتری موج مربعی استفاده شد. بدین منظور ویتامین B<sub>2</sub>، متیونین، والین، گلایسین، پتاسیم کلرید و گلوکز که اکثراً در نمونه‌های مورد آنالیز این آنالیت‌ها حضور دارند مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی مقدار مزاخمت، مقدار مشخصی از ترکیب مورد نظر در محلول بافر قرار گرفته و ولتاموگرام ولتامتری موج مربعی در حضور مقادیر مختلف از

**Table 1** Independent variables and their levels used in the response surface design

Independent variables	Factor level				
	-1.41421 (- $\alpha$ )	-1	0	1	1.41421 (+ $\alpha$ )
pH	4.59	5	6	7	7.41
Nanocomposite (%)	3.78	4.50	6.25	8	8.72

**Table 2** Response surface central composite design (uncoded) and results

Run Order	pH	Nanocomposite (%)	I ( $\mu$ A)		
			Actual Value	Predicted Value	Residual
1	6	6.25	5.70	5.74	-0.0400
2	6	6.25	5.80	5.74	0.0600
3	7	4.5	4.00	4.15	-0.1507
4	5	4.5	2.50	2.54	-0.0411
5	6	6.25	5.80	5.74	0.0600
6	6	8.724874	7.60	7.61	-0.0149
7	6	6.25	5.70	5.74	-0.0400
8	6	6.25	5.70	5.74	-0.0400
9	5	8	6.10	6.05	0.0507
10	7	8	6.00	6.06	-0.0589
11	6	3.775126	3.90	3.79	0.1149
12	7.414214	6.25	4.40	4.27	0.1275
13	4.585786	6.25	3.10	3.13	-0.0275

برای بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (نسخه ۱۲) و برای مقایسه آماری از نرم‌افزار مینی تب (نسخه ۱۹) استفاده شد. پس از مشخص شدن شرایط، با روش بهینه عملیات مجدد با سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل توسط روش آنالیز واریانس یک‌طرفه آزمون شده و میانگین‌ها به روش توکی مقایسه شدند. داده‌های آنالیز نمونه‌های حقیقی

شرایط عملیاتی بهینه برای افزایش جریان آندی در حسگر با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۲ بررسی گردید. بدین منظور در ابتدا شرایط بهینه توسط نرم‌افزار انتخاب گردید.

## ۲-۷- تجزیه و تحلیل نتایج

افزایش فاصله بین لایه‌های ترکیب می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های عاملی مبتنی بر اکسیژن بر سطح نانو صفحات تشکیل شده است و به همین دلیل فاصله بین صفحات افزایش یافته است [۳۳].

### ۳-۲- بهینه‌سازی ساخت الکتروود در الکتروکاتالیز وانیلین

به منظور ساخت الکتروود اصلاح شده با نانو کامپوزیت سنتزی ابتدا بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در ساخت حسگر مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعه تأثیر محتوای pH و نانوکامپوزیت بر جریان آندی مربوط به وانیلین حسگر، یک طرح آزمایشی مرکب مرکزی چرخش پذیر با دو فاکتور در سه سطح استفاده شد. در ادامه تک‌تک آزمایش‌ها در شرایط پیشنهاد شده در نقشه آزمایش‌ها انجام پذیرفت و میانگین نتایج حاصل از آزمون‌ها به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد تا در مرحله بعد این نتایج برای به دست آوردن شرایط بهینه، تجزیه و تحلیل شوند (جدول ۲). با توجه به جدول ۲ می‌توان گفت کمینه جریان آندی مربوط به وانیلین ( $2/5 \mu A$ ) مربوط به تیمارها با اثرات محتوای نانوکامپوزیت (۴/۵ درصد) و pH (۵) است و همچنین همان‌گونه که می‌توان دید، بیشترین جریان آندی مربوط به وانیلین ( $7/6 \mu A$ ) مربوط به تیمارها با اثرات سه‌گانه محتوای نانوکامپوزیت (۸/۷۲ درصد) و pH (۶) می‌باشد. تجزیه واریانس برای ارزیابی اثرات معنی‌داری متغیرهای فرایند بر روی هر یک از پاسخ‌ها به کمک نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۲ انجام گرفت. با انجام آنالیز رگرسیون چند متغیره، مدل‌های چندجمله‌ای درجه دوم برای پیش‌بینی هر یک از پاسخ‌ها به دست آمد. برآزش داده‌های به دست آمده برای جریان آندی مربوط به وانیلین به دست آمده، بر اساس مدل چندجمله‌ای درجه دوم صورت گرفت. نتایج جداول آنالیز واریانس در مورد جریان آندی مربوط به وانیلین در جدول ۳ مشاهده می‌شود. تجزیه واریانس اثرات خطی فاکتورها همچنین اثرات درجه دوم فاکتورها و اثرات متقابل فاکتورها بر نمونه حسگر در سطح ۹۵ و ۹۹ درصد معنی‌دار بود. در پژوهش حاضر  $R^2$  برای جریان آندی مربوط به وانیلین  $0/9970$  به دست آمد که بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برآزش شده توانسته ۹۹/۷۰ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. بالا بودن  $R^2$  تعدیل شده (۰/۹۹۴۸) در

با استفاده از روش افزایش استاندارد بررسی شدند. نمونه مورد آنالیز به دو قسمت تقسیم شد که یکی توسط حسگر پیشنهادی و قسمت دوم به وسیله حسگر دیگری که قبلاً توانایی آن به اثبات رسیده است مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- مورفولوژی و ساختار نانوکامپوزیت

برای بررسی صحت نانو کامپوزیت سنتز شده که در تهیه الکتروود اصلاح شده مورد استفاده قرار گرفته است از روش پراش پرتوی X استفاده شد. شکل ۱ تصویر پراش پرتوی X یا همان الگوی XRD را برای نان و کامپوزیت نشان می‌دهد.

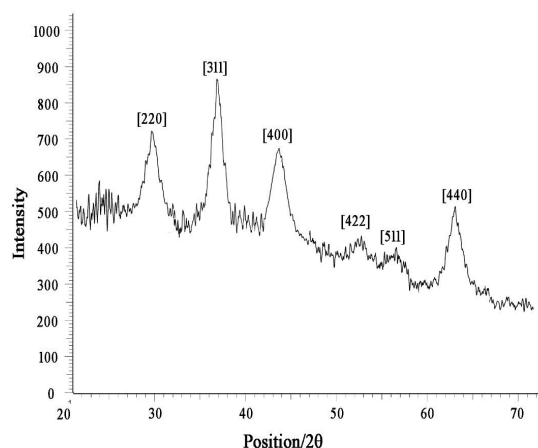


Fig 1 X-ray diffraction pattern of nanocomposite.

تکنیک پراش پرتوی X یکی از مفیدترین روش‌ها برای شناسایی و تعیین اندازه نانوکامپوزیت سنتزی است. در این پژوهش نیز برای بررسی صحت نانو کامپوزیت سنتز شده که در تهیه الکتروود اصلاح شده مورد استفاده قرار گرفته است از روش پراش پرتوی X استفاده شده است. نتایج نشان‌دهنده ساختار نانو ذرات مغناطیسی در سطح نانوصفحه گرافن احیا شده با توزیع خوب بود. طیف XRD ساختار مکعبی را برای گرافن اکسید اصلاح شده با حضور شش صفحه شاخص‌های میلر (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) سنتز نانو ذرات را با کارت شماره JCPDS No.65-3107<sup>1</sup> تأیید می‌کنند. انتقال پیک در ترکیب گرافن اکسید نسبت به ترکیب گرافیت به علت حضور گروه‌های عاملی در لایه‌های آن است که موجب می‌شود فاصله بین لایه‌ها افزایش پیدا کند. از این

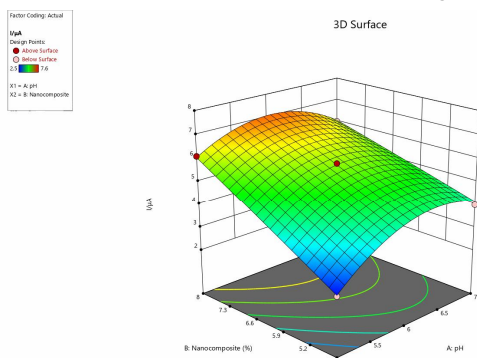
1. International Centre for Diffraction Data

این پژوهش نشان می‌دهد که عامل غیر معنی‌داری درجه اول در مدل مشاهده نشده است.

**Table 3** Analysis of variance for the fitted models

Source	df	Coefficient	Sum of Squares	Mean Square	F-value	p-value
Model	5		23.95	4.79	459.85	< 0.0001
Residual	7		0.0729	0.0104		
Lack of Fit	3		0.0609	0.0203	6.77	0.0479
Pure Error	4		0.0120	0.0030		
Cor Total	12		24.02			
R <sup>2</sup>		0.9970				
Adj-R2		0.9948				
CV		2.00				
Press		0.4519				
Standard deviation		0.1021				
Adequate precision		73.1809				

افزایش سطح ناشی از به کار بردن نانو ذرات سنتزی که سبب افزایش رسانایی در سطح الکتروده اصلاح شده می‌شوند؛ و با نظر به اینکه به کار بردن این مواد تا میزان مشخصی توانایی افزایش جریان را در سطح الکتروده اصلاح شده داشته و بعد از افزایش مازاد به دلیل اشباع شدن سطح الکتروده جریان ثابت می‌شود، نیاز به بهینه‌سازی درصد نانو مواد مورد استفاده امری ضروری می‌باشد [۱۵].



**Fig 3** Response surface (3-D) showing the effect of the pH (X1) and Nanocomposite (X2) on the I (μA).

همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است، بهترین شرایط برای آنالیز در حضور حدود ۸ درصد نانوکامپوزیت اتفاق افتاده است، به طوری که پس از انجام بهینه‌سازی با این مقادیر جریان به بیشترین حد ممکن رسیده است.

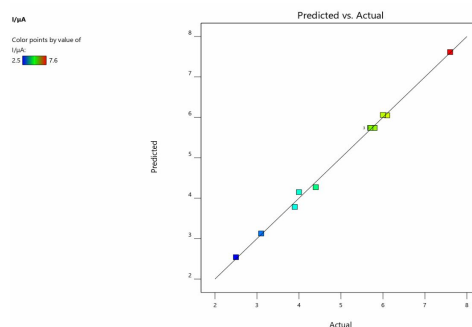
از آنجایی که وانیلین جزء دسته ترکیبات فنولی محلول در آب بوده و نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که پاسخ ردوکس (اکسایش-احیا) آن به pH بستگی دارد [۳۰]. با توجه به ساختار فنولی و حضور پروتون در مبدله الکترون یافتن pH بهینه ساخت الکتروده برای به دست آوردن بیشینه حساسیت و کاهش ولتاژ اضافی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این

با اعمال تحلیل رگرسیون چندگانه بر رویدادهای تجربی، متغیر پاسخ و متغیرهای آزمون با مدل چندجمله‌ای مرتبه دوم زیر (معادله ۱) بیان شدند:

(۱)

$$I (\mu A) = -47.07137 + 14.07338 \text{ pH} + 2.22682 \text{ Nanocomposite} - 0.228571 \text{ pH}^2 - 1.02000 \text{ pH}^2$$

مقادیر پیش‌بینی شده محاسبه شده از معادله فوق مطابقت بسیار خوبی با مقادیر تجربی داشتند (شکل ۲). از این‌رو، این مدل درجه دوم برای این آزمایش مناسب بود.



**Fig 2** Actual I (μA) vs. the predicted I (μA) under optimum conditions.

شکل ۳ نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ جریان آندی مربوط به وانیلین به عنوان تابعی از محتوای نانوکامپوزیت و pH را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش محتوای نانوکامپوزیت در کنار افزایش pH جریان آندی مربوط به وانیلین افزایش می‌یابد. همان‌گونه که مشخص است جریان آندی مربوط به وانیلین با افزایش pH تا محدوده ۶ افزایش می‌یابد اما پس از آن کاهش می‌یابد.

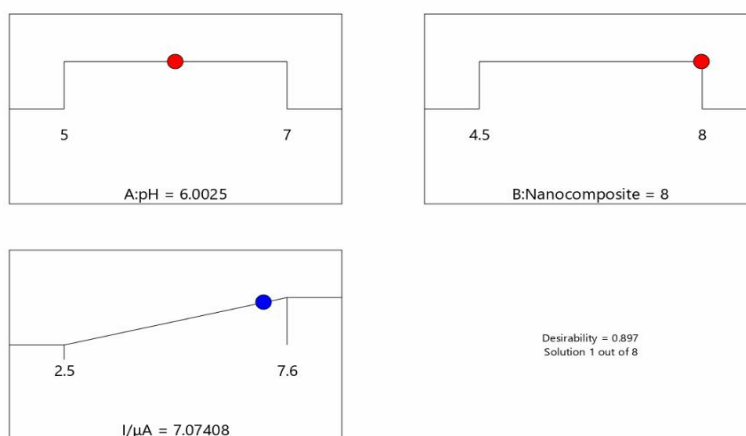
یکی از فاکتورهای مهم در تهیه حسگرها ایجاد شرایط بهینه برای به دست آوردن بهترین شرایط در آنالیز است. با توجه به

شرایط عملیاتی بهینه برای افزایش جریان آندی در حسگر با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۲ بررسی گردید. بدین منظور در ابتدا شرایط بهینه توسط نرم‌افزار انتخاب گردید. شرایط بهینه در جدول ۴ ذکر شده است. در شرایط بهینه پیشنهادی جریان آندی محاسبه شد (شکل ۴).

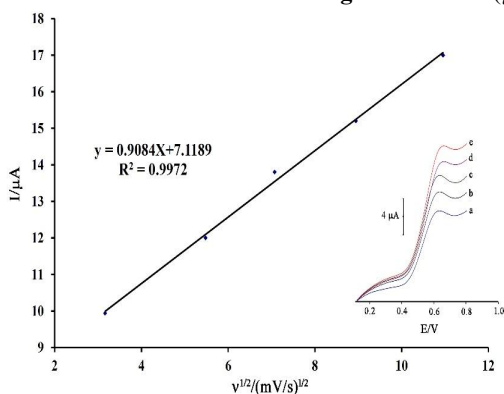
موضوع انتظار می‌رود برطبق اصل لوشاتولیه با افزایش pH پتانسیل اکسایش اینگونه به سمت مقادیر منفی‌تر جابه‌جا شود. رابطه خطی بین پتانسیل و تغییرات pH برای الکترواکسیداسیون وانیلین نشان داد که یک شیب منفی تقریباً نزدیک به مقدار  $-55/3$  میلی ولت/pH است و برابری تعداد الکترون‌ها و پروتون‌های دخیل در فرایند الکترواکسیداسیون وانیلین را تأیید می‌کند. نتایج پژوهش حاضر با نتایج ذبیح پور و همکاران [۳۰] و الپر و همکاران [۳۴] مطابقت داشت.

**Table 4** Optimized conditions for I ( $\mu\text{A}$ ) using RSM

Factors	The coded optimized values	The actual optimized values
pH	0	6.00
Nanocomposite (%)	1	8.00



**Fig 4** Predicted I ( $\mu\text{A}$ ) under optimum conditions.



**Fig 5** I- $v^{1/2}$  plot for electro-oxidation of 300  $\mu\text{M}$  vanillin. Inset: Linear sweep voltammograms of 300  $\mu\text{M}$  vanillin at scan rates a) 10; b) 30; c) 50; d) 80 and e) 120 mV/s.

جریان اکسیداسیون وانیلین با افزایش سرعت روبش با معادله  $I=0.9084v^{1/2}+7.1189$  با  $R^2=0.9972$  بهبود یافت که نشان دهنده یک فرآیند انتشار برای واکنش احیا وانیلین در

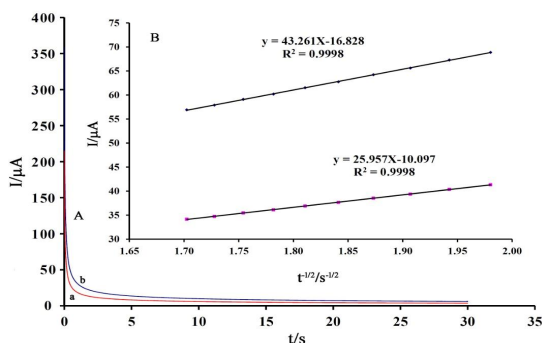
سپس برای بررسی درستی و صحت نتایج حاصل از مدل، در شرایط آزمایشگاه در نقاط بهینه‌ای که نرم‌افزار داده بود یک آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. اختلاف معنی‌داری بین نتیجه پیش‌بینی شده توسط مدل ( $7/07\mu\text{A}$ ) و نتیجه به‌دست‌آمده از کار آزمایشگاهی ( $7/05\pm 0/07\mu\text{A}$ ) مشاهده نشد.

### ۳-۳- بررسی اثر سرعت روبش

برای بررسی نفوذی و یا جذب سطحی بودن فرایند اکسایش وانیلین از روش ولتامتری در سرعت‌های روبش مختلف استفاده شد شکل (۵- داخلی). ولتاموگرام اکسایش وانیلین در سرعت‌های روبش ۱۰ تا ۱۲۰ میلی ولت بر ثانیه را نشان می‌دهد. در ادامه شکل (۵- بیرونی) منحنی تغییرات شدت جریان اکسایشی برحسب جذر سرعت روبش را برای الکتروود اصلاح شده برای وانیلین نشان می‌دهد.



میانگین ضریب نفوذ برای اکسایش وانیلین در محلول<sup>۵۰</sup>  
 $D = 3/2 \times 10^{-5}$  سانتی متر مربع بر ثانیه محاسبه شد.

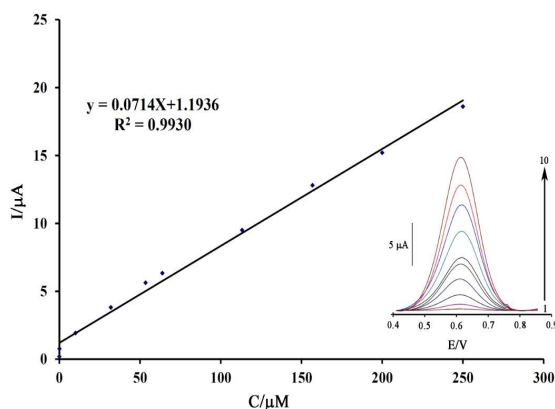


**Fig 6 A:** Chronoamperograms obtained at the rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE in the solution containing (a) 300 and (b) 500 μM vanillin. **B:** Cottrell plots obtained from chronoamperometry.

### ۳-۵- تعیین محدوده خطی و حد تشخیص

#### وانیلین با استفاده از الکترواد اصلاح شده

از روش ولتامتری موج مربعی به علت حساسیت بالای آن نسبت به ولتامتری چرخه‌ای برای تعیین گستره خطی و حد تشخیص وانیلین استفاده شد. شکل ۷ ولتاموگرام موج مربعی به همراه منحنی تغییرات غلظت برای الکترواکسیداسیون وانیلین در سطح الکترواد اصلاح شده را نشان می‌دهد.



**Fig 7** The plots of the  $I_p$  as a function of vanillin concentration. Inset: Square wave voltammograms of rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE containing different concentrations of vanillin.

سیگنال اکسیداسیون وانیلین در سطح rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE یک محدوده دینامیکی خطی بین ۱/۰ نانومولار تا ۲۵۰ میکرو مولار با  $Y = 0.0714X + 1.1936$  و  $R^2 = 0.9930$  با حد تشخیص ۰/۳ نانومولار نشان داد.

سطح rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE است [۳۵ و ۳۶]. افزایش خطی جریان اکسیداسیون وانیلین بر روی  $v^{1/2}$  نشان می‌دهد که واکنش الکترواکسیداسیون وانیلین تحت کنترل فرایند نفوذی است. به عبارتی، منحنی تغییرات شدت جریان اکسایشی این ترکیبات با جذر سرعت روبش رابطه خطی داشته که نشان دهنده نفوذی بودن فرایند اکسایش این ترکیبات در سطح الکترواد اصلاح شده است. از طرفی با افزایش سرعت روبش، پتانسیل پیک آندی این ترکیبات به سمت مقادیر مثبت تر جابه‌جا شده که تأییدی بر محدودیت سینتیکی اکسایش این ترکیب با افزایش سرعت روبش می‌باشد [۳۰].

باتوجه به نتایج فوق مشاهده می‌گردد که جریان پیک اکسایش وانیلین تحت تأثیر سرعت روبش پتانسیل قرار دارد و جریان اکسایش وانیلین تقریباً به طور خطی با افزایش سرعت روبش پتانسیل، کاهش می‌یابد؛ بنابراین می‌توان این گونه نتیجه گرفت که در سرعت روبش پتانسیل کم، وانیلین مورد اندازه‌گیری زمان کافی و مورد نیاز را برای رسیدن به سطح الکترواد با اکسید شدن را دارا است ولی در سرعت روبش پتانسیل بالا با توجه به زمان کمتر برای انجام واکنش الکتروشیمیایی مقدار کمتری از گونه مورد اندازه‌گیری فرصت رسیدن به سطح الکترواد و انجام واکنش الکتروشیمیایی را دارند [۳۷].

### ۳-۴- مطالعه کروآمپرومتری

برای تعیین ضریب نفوذ ترکیب مورد مطالعه از روش کروآمپرومتری استفاده شد. شکل (۶-۱) کروآمپروگرام‌های الکترواد اصلاح شده را در حضور غلظت‌های مختلف وانیلین نشان می‌دهند. به منظور ثبت کروآمپروگرام‌ها پتانسیل ۸۰۰ میلی ولت به سیستم اعمال شد. باتوجه به نفوذی بودن فرایند اکسایش وانیلین و به منظور تعیین ضریب نفوذ، منحنی کاترلین ترکیب در غلظت‌های مختلف رسم شد. همان‌طور که مشاهده شده است منحنی‌هایی دست آمده بر طبق رابطه کاترل حالت خطی دارد. با توجه به معادله کاترل (معادله ۲):

$$I = \frac{nFACD^{1/2}}{t^{1/2}\pi^{1/2}} \quad (2)$$

در این رابطه  $n$  الکترون‌های مبادله شده،  $A$  سطح فعال الکترواد ( $\text{cm}^2$ )،  $D$  ضریب نفوذ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )،  $C$  غلظت ترکیب مورد آنالیز ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )،  $t$  زمان (s) و  $F = 96485$  می‌باشد. مقدار

تشخیص ۰/۳ نانومولار گزارش شد. نتایج در مطابقت با نتایج ذبیح پور و همکاران [۳۰] و الپر و همکاران [۳۴] قرار داشت. در جدول ۵ حد تشخیص و محدوده خطی حسگر پیشنهادی در مقایسه با روش‌های سایر محققین برای تشخیص وانیلین ارائه گردیده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد حسگر ساخته شده حد تشخیص پایین‌تر و محدوده خطی وسیع‌تری دارد که علت حد تشخیص پایین مطالعه حاضر نسبت به سایر مطالعات پیشین را می‌توان به اثر هم‌افزایی ترکیبات عصاره پوست لیمو ترش در رابطه با افزایش حساسیت نسبت داد.

دیگر فاکتورهایی که در ارائه و پیشنهاد یک حسگر جدید بسیار حائز اهمیت هستند شامل بررسی گستره خطی کاربردی حسگر (LDR) و حد تشخیص (LOD) آن است. یکی از حساس‌ترین روش‌های ولتامتری برای بررسی این دو فاکتور روش ولتامتری موج مربعی و با ولتامتری پالس تفاضلی می‌باشند. در این پروژه از روش ولتامتری موج مربعی برای این امر استفاده گردید و در نهایت گستره خطی برای وانیلین در محدوده بین ۱/۰ نانومولار تا ۲۵۰ میکرو مولار با حد

**Table 5** The analytical data obtained by some previous works for vanillin determination

Electrode	LDR	LOD	Ref.
Glassy carbon: MoS <sub>2</sub> /PANI@g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /GCE	0.22 – 8.5 μM	0.043 μM	[38]
Glassy carbon: ZnSF-PdZn	0.05 – 150 μM	20 μM	[39]
Copper particles were coated on an indium tin oxide (ITO)	0.5 μM – 2 mM	0.15 nM	[40]
Carbon paste: NiO-SWCNTs and ionic liquid	0.01 – 350 μM	0.007 μM	[10]
Carbon paste: rG-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NC/CPE	1 nM – 250 μM	0.3 nM	This work

به‌منظور بررسی توانایی حسگر پیشنهادی در آنالیز نمونه‌های حقیقی و تشخیص‌پذیری آن تأثیر برخی گونه‌های مهم غذایی و ترکیبات موجود مورد بررسی قرار گرفت. گزینش پذیری الکترواد اصلاح شده برای تعیین ۲۵/۰ میکرومولار وانیلین با استفاده از روش DPV با خطای قابل قبول ۵ درصد در جریان بررسی شد. نتایج در جدول ۶، نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده شده است مزاحمت قابل توجهی در آنالیز گونه‌های نام برده شده وجود ندارد؛ و نتایج گزینش‌پذیری خوبی را برای الکترواد اصلاح‌شده جهت تعیین وانیلین در نمونه‌های مواد غذایی تأیید می‌کنند.

### ۳-۶- تکرارپذیری حسگر rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE

به‌منظور مطالعه تکرارپذیری در ساخت حسگر برای تعیین ولتامتری وانیلین، ولتامتری موج مربعی محلول وانیلین ۲۵ μM توسط ۴ حسگر که با یک روش تهیه شده بودند، ثبت گردید. انحراف استاندارد نسبی حدود ۴/۸٪ برای ۴ حسگر محاسبه گردید که نشان از تکرارپذیری خوب حسگر در اندازه‌گیری وانیلین می‌باشد.

۳-۷- بررسی اثر مزاحمت

**Table 6** The interference study results in the presence of 25.0 μM vanillin

Species	Tolerant limits (W/vanillin)
KCl, KBR	500
Glucose	500
Vitamin B2, Methionine, Valine, Glycine	600

در نهایت برای بررسی توانایی حسگر پیشنهادی برای آنالیز در نمونه‌های حقیقی از روش ولتامتری موج مربعی استفاده شد. نمونه‌های شکلات و بیسکویت از بازار محلی خریداری و در هاون توسط دسته هاون ساییده و پودر شد. نمونه با استفاده از روش افزایش استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های نتایج در جدول ۷ ارائه شده است. الکترواد اصلاح شده به‌عنوان یک حسگر جدید به‌منظور اندازه‌گیری وانیلین در نمونه‌های غذایی حقیقی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج روش افزایش استاندارد برای تعیین وانیلین در نمونه‌های غذایی به

در آنالیز وانیلین و دیگر ترکیبات غذایی شناخته شده یکی از مهم‌ترین مراحل، شناسایی عوامل مزاحم در انجام آنالیز است زیرا با شناسایی آن‌ها می‌توان آن‌ها را از محیط آنالیز حقیقی خارج نمود و محیطی کاربردی و بهینه‌تر برای حسگر پیشنهادی ارائه داد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهشگران نظیر ذبیح پور و همکاران [۳۰] و الپر و همکاران [۳۴] مطابقت داشت.

### ۳-۸- آنالیز نمونه‌های حقیقی

وضوح توانایی و عملکرد بالای حسگر را برای تعیین وانیلین در نمونه‌های حقیقی تأیید می‌کنند.

**Table 7** Monitoring of vanillin in real samples

Sample	Vanillin added ( $\mu\text{M}$ )	Vanillin expected ( $\mu\text{M}$ )	Vanillin founded ( $\mu\text{M}$ )	Recovery%
Coffee milk	---	---	3.51±0.34	---
	10.00	13.51	13.41±0.42	99.25
Biscuit	---	---	5.35±0.38	---
	10.00	15.35	15.75±0.89	102.6
Chocolate	---	---	2.85±0.41	---
	10.00	12.85	13.25±0.83	103.11

#### ۴- نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ابتدا گرافن‌اکسید کاهش یافته در حضور عصاره حاصل از پوست لیموترش (به‌عنوان پایدارکننده و احیاکننده طبیعی) که حاوی مقدار زیادی پلی‌فنل و فلاونوئید بود سنتز گردید. مشخصات گرافن‌اکسید کاهش‌یافته سنتزی با استفاده از روش‌های مختلف (مورفولوژی، ولتامتری و ...) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. روش‌های استفاده شده تأیید کردند که فیتومولکول‌های موجود در عصاره پوست لیموترش نه تنها به‌عنوان معرف احیاکننده عمل می‌کنند بلکه صفحات گرافن‌اکسید کاهش‌یافته را عامل دار می‌کنند. اصلاح الکتروود توسط رویه سطح پاسخ بهینه شد. چنین حسگر اصلاح‌شده‌ای با حساسیت و انتخاب‌گری بالا برای اندازه‌گیری و تشخیص الکتروشیمیایی وانیلین در محیط غذایی آبی به کار گرفته شد. از طرفی روش پیشنهادی با روش استاندارد برای اندازه‌گیری وانیلین در مواد غذایی مقایسه شد. صحت و دقت روش پیشنهادی بررسی گردید و نشان داده شد که تفاوت معنی‌داری بین صحت و دقت روش پیشنهادی و روش استاندارد وجود ندارد. با توجه به نتایج حاصل و مزایای مختلف آن نظیر دقت اندازه‌گیری بالا، حساسیت، ارزان بودن و ... می‌توان از این حسگر به شکل بر خط یا به‌صورت کیت آزمایشگاهی در تعیین مقدار وانیلین در کارخانه‌های تولید مواد غذایی نظیر شکلات، بیسکویت، شیر طعم دار و بستنی استفاده کرد.

#### منابع

- [1] Leong, G., Uzio, R., & Derbesy, M. (1989). Synthesis, identification and determination of glucosides present in green vanilla beans (*Vanilla fragrans* Andrews). *Flavour and fragrance journal*, 4(4), 163-167.
- [2] Banerjee, G., & Chattopadhyay, P. (2019). Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 499-506.
- [3] Ranadive, A. (2006). Vanilla-Inside look: Chemistry and Biochemistry of Vanilla Flavor-A survey of the latest research. *Perfumer and Flavorist*, 31(3), 38-45.
- [4] Havkin-Frenkel, D. (2022). Vanillin. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Inc (Ed.).
- [5] Shu, M., Man, Y., Ma, H., Luan, F., Liu, H., & Gao, Y. (2016). Determination of vanillin in milk powder by capillary electrophoresis combined with dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1706-1712.
- [6] Pérez-Esteve, É., Lerma-García, M. J., Fuentes, A., Palomares, C., & Barat, J. M. (2016). Control of undeclared flavoring of cocoa powders by the determination of vanillin and ethyl vanillin by HPLC. *Food Control*, 67, 171-176.
- [7] Hingse, S. S., Digole, S. B., & Annapure, U. S. (2014). Method development for simultaneous detection of ferulic acid and vanillin using high-performance thin layer chromatography. *Journal of Analytical Science and Technology*, 5(1), 1-9.
- [8] Chen, L., Chaisiwamongkhol, K., Chen, Y., & Compton, R. G. (2019). Rapid electrochemical detection of vanillin in natural vanilla. *Electroanalysis*, 31(6), 1067-1074.
- [9] Zabihpour, T., Shahidi, S. A., Karimi-Maleh, H., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2020). An ultrasensitive electroanalytical sensor based on MgO/SWCNTs-1-Butyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide paste electrode for the determination of ferulic acid in the presence sulfite in food

- Fabrication of Vanillin Electrochemical Sensor in Food Products Analysis and Anticancer Activity. *Topics in Catalysis*, 65, 726–732.
- [18] Vatandost, E., Ghorbani-HasanSaraei, A., Chekin, F., Raeisi, S. N., & Shahidi, S. A. (2020). Green tea extract assisted green synthesis of reduced graphene oxide: Application for highly sensitive electrochemical detection of sunset yellow in food products. *Food Chemistry: X*, 6, 100085.
- [19] Zhao, Q., Lin, Y., Han, N., Li, X., Geng, H., Wang, X., ... & Wang, S. (2017). Mesoporous carbon nanomaterials in drug delivery and biomedical application. *Drug Delivery*, 24(2), 94-107.
- [20] Choi, W., Lahiri, I., Seelaboyina, R., & Kang, Y. S. (2010). Synthesis of graphene and its applications: a review. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 35(1), 52-71.
- [21] Navyatha, B., Kumar, R., & Nara, S. (2016). A facile method for synthesis of gold nanotubes and their toxicity assessment. *Journal of environmental chemical engineering*, 4(1), 924-931.
- [22] Wang, J., Yang, B., Zhang, K., Bin, D., Shiraiishi, Y., Yang, P., & Du, Y. (2016). Highly sensitive electrochemical determination of Sunset Yellow based on the ultrafine Au-Pd and reduced graphene oxide nanocomposites. *Journal of colloid and interface science*, 481, 229-235.
- [23] Padil, V. V. T., & Černík, M. (2013). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. *International journal of nanomedicine*, 8, 889.
- [24] Shameli, K., Ahmad, M. B., Zamanian, A., Sangpour, P., Shabanzadeh, P., Abdollahi, Y., & Zargar, M. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. *International journal of nanomedicine*, 7, 5603.
- [25] Parsons, J. G., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2007). Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. *Developments in environmental science*, 5, 463-485.
- [26] Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic samples. *Microchemical Journal*, 154, 104572.
- [10] Gupta, V. K., Karimi-Maleh, H., Agarwal, S., Karimi, F., Bijad, M., Farsi, M., & Shahidi, S. A. (2018). Fabrication of a food nano-platform sensor for determination of vanillin in food samples. *Sensors*, 18(9), 2817.
- [11] Altunay, N. (2018). Development of vortex-assisted ionic liquid-dispersive microextraction methodology for vanillin monitoring in food products using ultraviolet-visible spectrophotometry. *Lwt*, 93, 9-15.
- [12] Nazari, F., Ghoreishi, S. M., & Khoobi, A. (2020). Bio-based Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan nanocomposite sensor for response surface methodology and sensitive determination of gallic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 456-469.
- [13] Mehdizadeh, Z., Shahidi, S. A., Ghorbani-HasanSaraei, A., Bagher, M., & Limooei, M. B. (2021). An Electroanalytical Determination of Sunset Yellow in Food Product by Amplified Nanostructure Carbon Paste Electrode as Sensor. *International Journal of Electrochemical Science*, 16(4).
- [14] Ebrahimi, P., Shahidi, S. A., & Bijad, M. (2020). A rapid voltammetric strategy for determination of ferulic acid using electrochemical nanostructure tool in food samples. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3389-3396.
- [15] Karimi-Maleh, H., Karimi, F., Rezapour, M., Bijad, M., Farsi, M., Beheshti, A., & Shahidi, S. A. (2019). Carbon paste modified electrode as powerful sensor approach determination of food contaminants, drug ingredients, and environmental pollutants: A review. *Current Analytical Chemistry*, 15(4), 410-422.
- [16] Vatandost, E., Ghorbani-Hasan Saraei, A., Chekin, F., Raeisi, S. N., & Shahidi, S. A. (2021). Electrochemical sensor based on magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-reduced graphene oxide hybrid for sensitive detection of binaphthol. *Russian Journal of Electrochemistry*, 57(5), 490-498.
- [17] Tabrizi, M., Shahidi, S. A., Chekin, F., Ghorbani-HasanSaraei, A., & Raeisi, S. N. (2022). Reduce Graphene Oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocomposite Biosynthesized by Sour Lemon Peel; Using as Electro-catalyst for

- [34] Alpar, N., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2018). Selective and simultaneous determination of total chlorogenic acids, vanillin and caffeine in foods and beverages by adsorptive stripping voltammetry using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 257, 398-408.
- [35] Karimi-Maleh, H., Hatami, M., Moradi, R., Khalilzadeh, M. A., Amiri, S., & Sadeghifar, H. (2016). Synergic effect of Pt-Co nanoparticles and a dopamine derivative in a nanostructured electrochemical sensor for simultaneous determination of N-acetylcysteine, paracetamol and folic acid. *Microchimica Acta*, 183(11), 2957-2964.
- [36] Moghaddam, A., Zamani, H. A., & Karimi-Maleh, H. (2021). A new electrochemical platform for dasatinib anticancer drug sensing using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SWCNTs/ionic liquid paste sensor. *Micromachines*, 12(4), 437.
- [37] Behrouzifar, F., Shahidi, S. A., Chekin, F., Hosseini, S., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2021). Preparation and Electrochemical Performance of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SWCNTs/ionic Liquid Nanocomposites as Sensor for Determination of Tert-Butylhydroquinone. *International Journal of Electrochemical Science*, 16(4).
- [38] Murugan, E., & Dhamodharan, A. (2021). Separate and simultaneous determination of vanillin, theophylline and caffeine using molybdenum disulfide embedded polyaniline/graphitic carbon nitride nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Diamond and Related Materials*, 120, 108684.
- [39] Dong, M., Zhao, S., Lv, Y., Chen, F., Wang, A., Fu, L., & Lin, C. T. (2021). Electroanalytical determination of vanillin using PdZn particles decorated ZnS fibers. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4718-4725.
- [40] Karakaya, S., & Kaya, İ. (2021). A Novel Sensitive and Selective Amperometric Detection Platform for the Vanillin Content in Real Samples. *Electroanalysis*, 33(6), 1615-1622.
- nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.
- [27] Vatandost, E., Saraei, A. G. H., Chekin, F., Raeisi, S. N., & Shahidi, S. A. (2020). Antioxidant, antibacterial and anticancer performance of reduced graphene oxide prepared via green tea extract assisted biosynthesis. *ChemistrySelect*, 5(33), 10401-10406.
- [28] Ramezanpour, M., Raeisi, S. N., Shahidi, S. A., & Ramezanpour, S. (2020). Trace analysis of Pb (II) in milk samples by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@3-chloropropyltriethoxysilane@o-phenylenediamine nanoparticles as an unprecedented adsorbent for magnetic dispersive solid phase extraction. *Micro & Nano Letters*, 15(6), 390-395.
- [29] Shahidi, S. A. (2022). Effect of solvent type on ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from *Ficaria verna*: Optimization by response surface methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 163, 112981.
- [30] Zabihpour, T., Shahidi, S. A., Karimi-Maleh, H., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2020). Voltammetric food analytical sensor for determining vanillin based on amplified NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle/ionic liquid sensor. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 1039-1045.
- [31] Huang, X., Lu, J., Lu, C., Wei, L., & Li, Q. (2014). Separation and enrichment of flavonoids from orange peel using magnetic nanoparticles. *Asian Journal of Chemistry*, 26(4), 1189-1194.
- [32] Shahidi, S. A., Ebrahimi, P., Zabihpour, T., & NaghizadehRaeisi, S. (2021). Electrochemical Analysis of Sunset Yellow Based on NiO-SWCNTs NC/IL Modified Carbon Paste Electrode in Food Samples. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 11(2), 11-22.
- [33] Li, X., Feng, J., Du, Y., Bai, J., Fan, H., Zhang, H., ... & Li, F. (2015). One-pot synthesis of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/graphene oxide hybrids and their conversion into FeCo/graphene hybrids for lightweight and highly efficient microwave absorber. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(10), 5535-5546.



## Facil and green synthesis of biocompatible nanocomposites based on iron oxide/reduced graphene oxide for determination of Vanillin in Food Samples: Response surface methodology optimization

Tabrizi, M. <sup>1</sup>, Shahidi, S. A. <sup>2\*</sup>, Chekin, F. <sup>3</sup>, Ghorbani-HasanSarai, A. <sup>4</sup>,  
Naghizadeh Raesi, Sh. <sup>5</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
3. Associate Professor, Department of Chemistry, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
4. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

### ABSTRACT

Additives analysis plays important role in food quality control and has a great impact on public health. Therefore, rapid detection of these compounds in food samples is important in food safety. In this study, reduced graphene oxide /Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite (rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC) was synthesized in the presence of sour lemon peel extract as a reducer and stabilizer agent in aqueous solution. For the first time multivariate optimization based on rotatable central composite design (RCCD) coupled with response surface methodology (RSM) was used to optimize effective experimental variables for fabrication of electrode. An experimental design has been used to examine and optimize the impacts of diverse experimental parameters like the pH and concentration of the nanocomposite in rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC. The optimal conditions were pH: 6 and the concentration of the nanocomposite: 8%. The synthesized nanocomposites were characterized by TEM and XRD techniques. The rGO modified carbon paste electrode (rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE) was used as a highly sensitive electrochemical sensor for the detection of vanillin. Interference of vitamin B<sub>2</sub>, methionine, valine, glycine and KBR, KCl and glucose were checked in the presence of 25 μM vanillin at surface of rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE with acceptable error 5%. Results confirmed that 500-folde of above compounds have not any important interference in monitoring process of 25 μM vanillin. The vanillin sensor showed linear range between 01 nM – 250 μM and a low detection limit of 0.3 nM. Finally, the rG-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NC/CPE was successfully used for determining vanillin in food samples. Therefore, this sensor can be used in food industry to the online determination of vanillin in flavored milks and ice cream.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2022/ 02/ 24  
Accepted 2022/ 06/ 22

#### Keywords:

Electrochemical sensor,  
Experimental design,  
Sour lemon peel extract,  
Vanillin.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.283  
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.26.7

\*Corresponding Author E-Mail:  
sashahidy@yahoo.com