

(مقاله پژوهشی)

## توسعه یک الکترومداد گرافیت برای شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر شتر به کمک روش ولتامتری پالس تفاضلی

سیده فاطمه احمدی<sup>۱</sup>، محمد حجت‌الاسلامی<sup>۲\*</sup>، حسین کیانی<sup>۳</sup>، هومان مولوی<sup>۴</sup>

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

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

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۷

### چکیده

آفلاتوکسین‌ها از مهم‌ترین میکوتوکسین‌ها هستند که توسط گونه‌های مختلفی از قارچ‌ها تولید می‌شوند. این سموم در برابر فرآیندهای حرارتی نظیر پاستوریزه کردن از بین نرفته و غلظت آن‌ها نیز کاهش پیدا نمی‌کند. مصرف شیر و محصولات لبنی آلوده، آفلاتوکسین سلامت انسان را به خطر می‌اندازد. در پژوهش حاضر، یک الکترومداد گرافیت مبتنی بر گرافن اکسید احیاء شده و نانو ذرات طلا برای شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر خام شتر با استفاده از روش ولتامتری پالس تفاضلی معرفی شد. به کمک تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی رفتار الکترومداد کاری در مراحل مختلف ساخت بررسی شد. نتایج نشان داد که با تثبیت گرافن اکسید احیاء شده و نانو ذرات طلا، پیک جریان و مقاومت انتقال بار به ترتیب افزایش و کاهش یافتند. درحالی‌که با تثبیت آبتامر و آنالیت پیک جریان و مقاومت انتقال بار به ترتیب کاهش و افزایش پیدا کردند. مطابق نتایج تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی، در محدوده ۵ الی ۸۰۰ نانوگرم بر لیتر با افزایش غلظت، جریان به‌طور خطی کاهش یافت. ( $R^2=0.991$ ). حد تشخیص کمی زیست حسگر ۳ نانوگرم بر لیتر و درصد ریکاوری آن در نمونه‌های شیر شتر بین ۹۰ تا ۹۴/۵ به دست آمد. بررسی مشخصه‌های عملکردی شامل تکرارپذیری، تکنیرپذیری و پایداری حاکی از عملکرد قابل قبول زیست حسگر داشت.

**واژه‌های کلیدی:** آبتاحسگر الکتروشیمیایی، آفلاتوکسین، شیر شتر، گرافن اکسید احیاء شده، نانو ذرات طلا.

## ۱- مقدمه

مایکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی هستند که تحت عنوان متابولیت ثانویه به‌وسیله انواع مختلفی از قارچ‌ها تولید می‌شوند. اگرچه این مواد اثری در روند رشد و متابولیسم قارچ‌ها ندارند، اما می‌توانند زمینه‌ساز آسیب‌های جدی به سلامت انسان باشند. همچنین باعث ایجاد اثرات زیست محیطی شده و عاملی پرخطر در بهداشت مواد غذایی هستند (۱، ۱۳). مایکوتوکسین‌ها توانایی بالقوه‌ای در آلوده کردن محصولات مختلف از جمله غلات، شیر، فرآورده‌های گوشتی و میوه‌های خشک دارند. آفلاتوکسین یک ترکیب شیمیایی پایدار و مقاوم است که مقاومت آن به حرارت، به میزان رطوبت و pH محیط بستگی دارد. دمای مناسب برای رشد آفلاتوکسین‌ها ۲۵-۳۲ درجه سانتی‌گراد بوده و تولید سم در دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد، اگرچه رشد آن تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز امکان‌پذیر است (۳ و ۱۸). این ترکیبات با تحت تأثیر قرار دادن سیستم ایمنی بدن، به‌عنوان مهم‌ترین عامل سرطان کبد به‌شمار می‌آیند. آفلاتوکسین‌ها انواع مختلفی دارند که مهم‌ترین آن‌ها  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$  هستند. آفلاتوکسین  $M_1$  که مشتق هیدروکسیله شده آفلاتوکسین  $B_1$  است، در شیر حیواناتی که خوراک آلوده به آفلاتوکسین  $B_1$  را مصرف کرده‌اند، مشاهده می‌شود. بالاترین میزان تبدیل آفلاتوکسین  $B_1$  به  $M_1$  در pH برابر ۸/۹ و در کبد گاو، مرغ و انسان اتفاق می‌افتد (۴). اهمیت مصرف لبنیات از جمله شیر در سید غذایی انسان به دلیل دارا بودن ترکیبات مفید از جمله مواد معدنی، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها، بر کسی پوشیده نیست (۱۹). از آنجایی که شیر شتر از نظر ارزش غذایی بسیار مفید بوده و در درمان برخی بیماری‌ها از جمله دیابت و اختلالات کبدی مؤثر است، توجه به کیفیت آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شیر شتر نسبت به شیر گاو دارای مقادیر بالاتری از آهن و ویتامین‌های C و  $B_3$  بوده در حالی که میزان اسیدهای چرب اشباع و لاکتوز آن در مقایسه با شیر گاو کمتر است (۵، ۸).

تحقیقات نشان داده که شیر مهم‌ترین منبع ورود آفلاتوکسین  $M_1$  به بدن انسان است و مصرف شیر آلوده سلامت مصرف‌کننده را به خطر می‌اندازد (۱۵). با توجه به امکان آلودگی شیر با آفلاتوکسین  $M_1$  و اثرات سرطان‌زایی و مخرب آن، شناسایی مسیرهای مسدود کردن فعالیت آفلاتوکسین و ارزیابی غلظت آن در شیر ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی آفلاتوکسین  $M_1$  معرفی شده‌اند که از جمله روش‌های مرسوم می‌توان به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup> (۲) و الیزا<sup>۲</sup> (۹) اشاره نمود. اگرچه این روش‌ها از دقت مطلوبی برخوردارند، اما نیاز به تجهیزات پیشرفته و کاربر متخصص داشته و از نظر اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه نیستند. از این‌رو استفاده از یک روش سریع، مقرون به صرفه و ساده برای شناسایی آفلاتوکسین  $M_1$  ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر استفاده از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی برای شناسایی انواع مختلفی از نمونه‌های بیولوژیکی توجه ویژه‌ای را به خود معطوف ساخته است. محققان با استفاده از الکتروود صفحه-چاپی کربنی<sup>۳</sup> نوعی آنتا-حسگر ایمپدیمتریک برای شناسایی آفلاتوکسین  $M_1$  گزارش کرده‌اند. عملکرد این آنتا-حسگر نشان داد که مقدار آفلاتوکسین  $M_1$  شناسایی شده در نمونه‌های شیر از حد مجاز تعیین شده توسط اتحادیه اروپا پایین‌تر است (۱۰). پندی و همکاران (۲۰۱۷) غلظت آفلاتوکسین  $M_1$  را به کمک تثبیت آنتامر بر روی سطح الکتروود طلا ردیابی کردند. نتایج نشان داد که پیک جریان در ولتاژگرم موج مربعی<sup>۴</sup> رابطه معکوسی با لگاریتم غلظت آفلاتوکسین  $M_1$  در محدوده ۱-۱۰<sup>۵</sup> ppt دارد (۱۴). شاجو و همکاران (۲۰۱۸) یک الکتروود کربن شیشه‌ای<sup>۵</sup> اصلاح شده با نانو ذرات نقره برای شناسایی آفلاتوکسین  $M_1$  در نمونه‌های شیر پیشنهاد کردند. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظتی ۰/۰۱۵-۲۵ میلی مولار خطی بود (۱۶). کولیکوا و همکاران (۲۰۱۹) یک آنتا

1-HPLC

2-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

3-Carbon Screen-printed Electrode

4-Square Wave Voltammogram

5-Galaxy Carbon Electrode

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

اتیل استات ( $C_4H_8O_2$ )، پتاسیم کلرید (KCl)، فری/فروسیانید  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  /  $K_3$  /  $K_4$ ، هیدروژن فسفات دی سدیم ( $Na_2HPO_4$ )، سدیم دی هیدروژن فسفات ( $NaH_2PO_4$ )، هیدروکسید سدیم (NaOH)، پتاسیم نیترات ( $KNO_3$ )، هیدروکلریک اسید (HCl)، سولفوریک اسید ( $H_2SO_4$ )، سدیم نیترات ( $NaNO_3$ )، پتاسیم پرمنگنات ( $KMnO_4$ )، سدیم بور هیدرات ( $NaBH_4$ ) و متانول ( $CH_3OH$ ) از شرکت مرک، پودر گرافیت از شرکت سیگما و شیر شتر از فروشگاه معتبر در شهر کرد خریداری شد.

### ۲-۲- اندازه‌گیری ویژگی‌های الکتروشیمیایی

اندازه‌گیری ویژگی‌های الکتروشیمیایی به کمک سه تکنیک ولتامتری چرخه‌ای<sup>۴</sup> (CV)، ولتامتری پالس تفاضلی<sup>۵</sup> (DPV) و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) با استفاده از دستگاه پتانسیواستات/گالوانواستات متصل به کامپیوتر انجام شد. یک سیستم سه الکترودی متداول شامل یک الکتروود مداد گرافیت اصلاح‌نشده به عنوان الکتروود کاری، سیم پلاتین به عنوان الکتروود کمکی و  $Ag/AgCl$  به عنوان الکتروود مرجع برای اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در محلول ۱ میلی مولار فری/فروسیانید همراه با ۰/۱ مولار پتاسیم کلرید انجام گرفت. تکنیک CV در محدوده پتانسیل ۰/۳- تا ۰/۷+ ولت انجام گرفت. تکنیک DPV در محدوده پتانسیل ۰/۳- تا ۰/۵+ ولت انجام شد. همچنین تکنیک EIS در محدوده فرکانس  $10^5$ - تا  $10^1$  هرتز و دامنه ۱۰ میلی ولت اجرا گردید.

### ۲-۳- سنتز گرافن اکسید احیاء شده

سنتز گرافن طبق روش اصلاح‌شده هامرس<sup>۶</sup> انجام شد (۶). برای این منظور، پودر گرافیت و پتاسیم پرمنگنات به تدریج

حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر الکتروود کربن شیشه‌ای برای شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر و آب طراحی کردند. نتایج نشان داد که حسگر پیشنهادی گزینش پذیری قابل قبولی در حضور سایر مایکوتوکسین‌ها نسبت به آفلاتوکسین M1 دارد (۱۳). جهانگیری و همکاران (۲۰۲۰) یک آپتا حسگر الکتروشیمیایی با استفاده از نانو ذرات پلاتینیم برای شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر خشک و شیر پاستوریزه را معرفی کردند. نتایج نشان داد که با استفاده از روش طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی<sup>۱</sup> (EIS) آپتاسنگر قابلیت شناسایی آفلاتوکسین M1 در نمونه‌ها با حد تشخیص ۰/۰۰۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر را دارد (۱۱). در یک سیستم الکتروشیمیایی الکتروود کاری نقش کلیدی دارد. تاکنون الکتروودهای مختلفی مانند کربن شیشه‌ای، پلاتین، طلا، صفحه-چاپی، خمیر کربنی و مداد گرافیت در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. الکتروود مداد گرافیت به دلیل سطح بزرگ‌تر برای واکنش الکتروود، دسترسی آسان، مقاومت مکانیکی مطلوب، پراکندگی آسان، قیمت پایین و اصلاح آسان در بین الکتروودهای کربنی در سال‌های اخیر برای کاربرد در زیست حسگرهای الکتروشیمیایی به عنوان الکتروود کاری بیشتر مورد توجه بوده است (۷، ۱۲). معمولاً برای بهبود عملکرد الکتروود کاری به منظور شناسایی انواع مختلف نمونه‌های بیولوژیکی از نانو مواد مختلف استفاده می‌گردد. در بین انواع نانو مواد، گرافن اکسید احیاء شده<sup>۲</sup> (RGO) و نانو ذرات طلا<sup>۳</sup> (GNP) به دلیل خواص منحصر به فرد از جمله فعالیت شیمیایی مطلوب، در دسترس بودن، سنتز آسان و رسانایی قابل قبول برای افزایش حساسیت الکتروود کاری گزینه‌های مناسبی هستند (۱۸، ۲۰). در پژوهش حاضر یک الکتروود مداد گرافیت اصلاح‌شده با گرافن اکسید احیاء شده و نانو ذرات طلا برای شناسایی آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر شتر طراحی گردید.

4-Cyclic Voltammetry  
5-Differential Pulse Voltammetry  
6-Modified Hummers Method

1-Electrochemical Impedance Spectroscopy  
2-Reduced Graphene Oxide  
3-Gold Nanoparticles

### ۲-۵-۲- تکثیر پذیری

برای چهار زیست حسگر مستقل ساخته شده و با استفاده از تکنیک EIS آزمون انجام شد.

### ۲-۵-۳- پایداری

سه حسگر ساخته شده و برای مدت دو هفته در فواصل دو روز EIS انجام شد.

### ۲-۶- آماده سازی نمونه های حقیقی

شیر شتر به عنوان نمونه حقیقی از یک فروشگاه محلی معتبر خریداری شد. سپس AFM<sub>1</sub> با غلظت مشخص (۵۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر) به نمونه های شیر تزریق گردید. این نمونه ها با نسبت ۱:۳ در متانول رقیق و با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و با حذف لایه رویی با نسبت ۱:۱۰ در محلول بافر فسفات رقیق شد (۱۰). زیست حسگر در شرایط بهینه ساخته شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در داخل ۱۰ میکرو لیتر از شیر حاوی آنالیت با غلظت های ۵۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر قرار گرفت و درصد ریکاوری از نسبت غلظت شناسایی شده به غلظت اضافه شده به دست آمد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- بررسی رفتار الکتروشیمیایی با CV

در شکل (۱) پیک جریان مربوط به ولتاگرام CV در مراحل مختلف ساخت الکتروود شامل الکتروود اصلاح نشده، اصلاح شده با RGO، اصلاح شده با GNP، تثبیت آپتامر و تثبیت AFM<sub>1</sub> نشان داده شده است. با تثبیت RGO پیک جریان از ۷۲ میکرو آمپر به ۹۵ میکرو آمپر افزایش پیدا کرده است. با تثبیت GNP پیک جریان تا ۱۲۱ میکرو آمپر افزایش یافته است. علت افزایش جریان با تثبیت نانو مواد RGO و GNP، رسانایی بالای آن ها و افزایش سطوح فعال الکتریکی در سطح الکتروود و در نتیجه افزایش نرخ انتقال الکترون است. نتایج این تحقیق با نتایج استامبولی و همکاران (۲۰۱۶) در خصوص افزایش جریان پس از تثبیت نانو ذرات روی الکتروود همخوانی دارد (۱۰). با تثبیت آپتامر و AFM<sub>1</sub> به ترتیب تا ۶۱ و ۵۲ میکرو آمپر کاهش یافت. با تثبیت آپتامر یک لایه مقاوم در سطح الکتروود ایجاد می گردد که مانع

به محلولی از نترات سدیم و اسیدسولفوریک اضافه شد. در شرایط حمام روغن، به مخلوط به دست آمده آب مقطر اضافه شد و سپس درجایی ثابت قرار گرفت. پس از تشکیل رسوب، تا رسیدن به pH خنثی شستشو انجام شد. به منظور تهیه RGO، گرافن تهیه شده، در آب مقطر ریخته شد و تحت امواج فراصوت قرار گرفت، پس از آن سدیم بور هیدرات به گرافن اضافه شده و در دمای محیط خشک شد.

#### ۲-۴- آماده سازی الکتروود کاری

به منظور فعال سازی الکتروود کاری، تکنیک CV در یک پتانسیل ثابت (۱/۵+ ولت) در سدیم هیدروکسید ۱ مولار اعمال گردید. برای تثبیت RGO، الکتروود کاری به مدت ۶۰ دقیقه درون محلول آن قرار گرفت سپس تکنیک CV بر روی آن انجام شد. GNP با تکنیک CV درون محلول ۳ میلی مولار نمک طلا بر روی الکتروود کاری تثبیت شد. بعد از آن، الکتروود اصلاح شده با RGO و GNP درون محلول ۰/۱ مولار پتاسیم نترات انجام گرفت. برای تثبیت آپتامر بر روی سطح الکتروود ساخته شده، الکتروود کاری به مدت ۶۰ دقیقه درون محلول آپتامر (۵ میکرو مولار) که قبلاً RGO و GNP بر روی آن تثبیت شده بودند، در دمای اتاق قرار داده شد و سپس به منظور حذف رشته های آپتامر جذب نشده با آب دیونیزه شسته شد و بلافاصله در دمای اتاق خشک گردید.

#### ۲-۵-۵- ارزیابی زیست حسگر

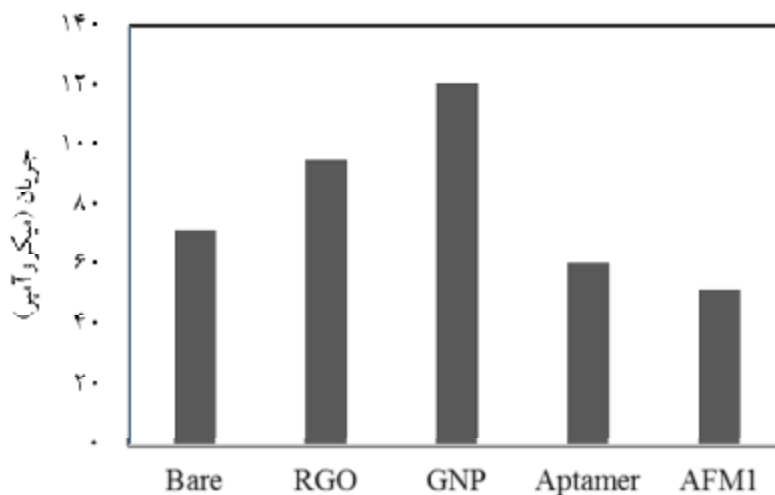
به منظور اطمینان از صحت نتایج به دست آمده توسط زیست حسگر، برخی از مشخصه های عملکردی شامل تکرار پذیری، تکثیر پذیری و پایداری زیست حسگر مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### ۲-۵-۱- تکرار پذیری

پس از طراحی و ساخت زیست حسگر، چهار مرتبه به صورت پشت سر هم با استفاده از تکنیک EIS آزمون گرفته شد.

بین محلول فری/فروسیانید و الکترومداد کاری منجر به کاهش پیک جریان می‌گردد که نتایج تحقیق حاضر با نتایج مبنی بر کاهش میزان پیک جریان بعد از تثبیت آبتامر و آنالیت در این گزارش‌ها همخوانی دارد (۱۷، ۱۹).

انتقال الکترون می‌شود و با تثبیت  $AFM_1$ ، با توجه به اینکه آنالیت با آبتامر اختصاصی خود متصل گردیده است، پیک جریان کاهش یافت. شارما و همکاران (۲۰۱۶) و اسمولکو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که دافعه الکترواستاتیک

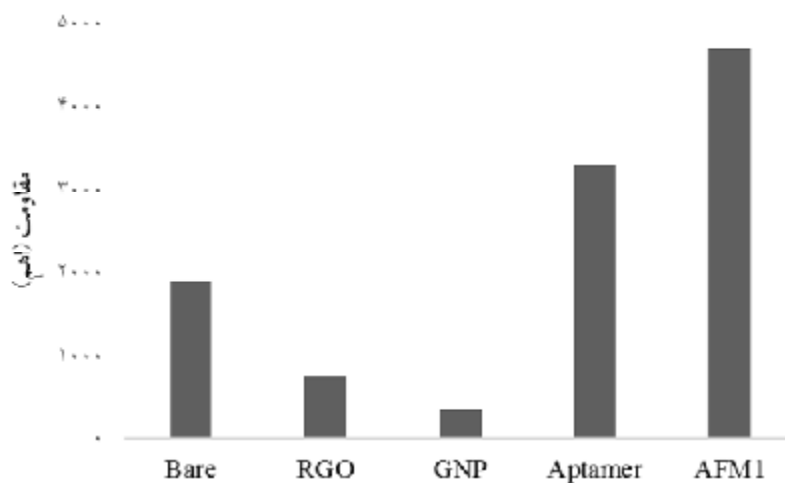


شکل ۱- پیک جریان ولتاگرام چرخه‌ای در مراحل مختلف اصلاح الکترومداد کاری: الکترومداد اصلاح نشده (Bare)، الکترومداد اصلاح شده با گرافن (RGO)، الکترومداد اصلاح شده با نانو ذرات طلا (GNP)، الکترومداد با تثبیت آبتامر (Aptamer)، الکترومداد در حضور آفلاتوکسین ( $AFM_1$ )

همچنین وقتی  $AFM_1$  روی رشته‌های آبتامر قرار می‌گیرد، فرایند انتقال الکترون را محدود می‌کند (۲). از آنجایی که پیک جریان CV و Rct مربوط به EIS به فری/فروسیانید مرتبط هستند روند تغییر در پیک جریان کاملاً با روند تغییر Rct مخالف است. به بیان دیگر نتایج CV و EIS یکدیگر را تأیید می‌کنند. به طور کلی نتایج شکل‌های (۱) و (۲) حاکی از این است که RGO و GNP، و همچنین آبتامر و  $AFM_1$  به درستی در سطح الکترومداد کاری تثبیت شده‌اند، نتایج با گزارش استامبولی و همکاران (۲۰۱۶) در رابطه با تعیین میزان  $AFM_1$  در شیر با استفاده از آبتامرسنگر ایمپدیمتریک، مطابقت دارد (۱۰).

### ۳-۲- بررسی رفتار الکتروشیمیایی با EIS

مطابق شکل (۲) که مقاومت انتقال بار (Rct) برای مراحل مختلف اصلاح الکترومداد را نشان می‌دهد، بعد از تثبیت RGO و GNP مقدار Rct در مقایسه با الکترومداد اصلاح نشده کاهش پیدا کرد که علت آن را می‌توان به هدایت الکتریکی بالا و افزایش نرخ الکترون مرتبط دانست. با تثبیت آبتامر بر روی سطح الکترومداد اصلاح شده با RGO و GNP با ایجاد لایه خودآرایی انتقال الکترون کاهش یافت که منجر به افزایش Rct شده است. در اثر اتصال بین آبتامر و آنالیت، یک لایه مقاوم ایجاد می‌شود که این لایه مانع از رسیدن یون‌های فری/فروسیانید به سطح الکترومداد می‌گردد که در پی آن Rct در مقایسه با تثبیت آبتامرافزایش بیشتری می‌یابد.

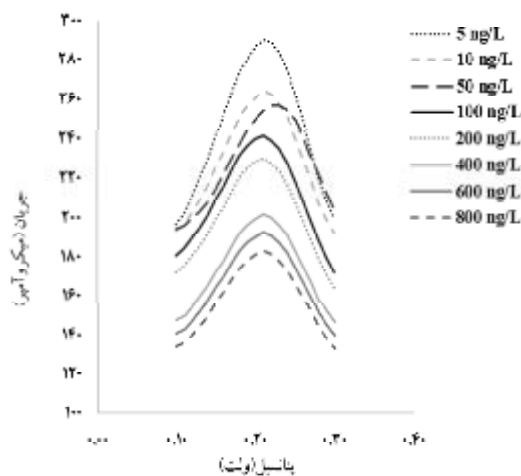


شکل ۲- مقاومت انتقال بار برای تکنیک EIS در مراحل مختلف ساخت الکتروود کاری: الکتروود اصلاح نشده (Bare)، الکتروود اصلاح شده با گرافن (RGO)، الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات طلا (GNP)، الکتروود با تثبیت آپتامر (Aptamer)، الکتروود در حضور آفلاتوکسین (AFM1)

با افزایش غلظت آنالیت پیک جریان فری-فروسایند کاهش یافته است. دلیل کاهش پیک جریان با افزایش غلظت، کاهش نرخ فرایند انتقال الکترون، با تثبیت آنالیت و اتصال به آپتامر اختصاصی خود است که در نتیجه آن یون‌ها خیلی سخت توانسته‌اند بر روی سطح الکتروود قرار گیرند (۸).

### ۳-۳- رسم منحنی کالیبراسیون با تکنیک DPV

به منظور بررسی کاربرد عملی زیست حسگر، از تکنیک DPV استفاده شد. غلظت‌های مختلفی از AFM<sub>1</sub> آماده شد و عملکرد زیست حسگر با رسم منحنی کالیبراسیون (جریان بر حسب لگاریتم غلظت) بررسی شد. مطابق شکل (۳) مشاهده گردید که



شکل ۳- منحنی DPV برای غلظت‌های مختلف AFM<sub>1</sub> (۵-۸۰۰ نانوگرم/لیتر)

محدوده غلظت خطی ۵-۸۰۰ نانوگرم بر لیتر را ارائه داد (شکل ۳). همچنین معادله رگرسیونی از رابطه ۱ تبعیت نمود:

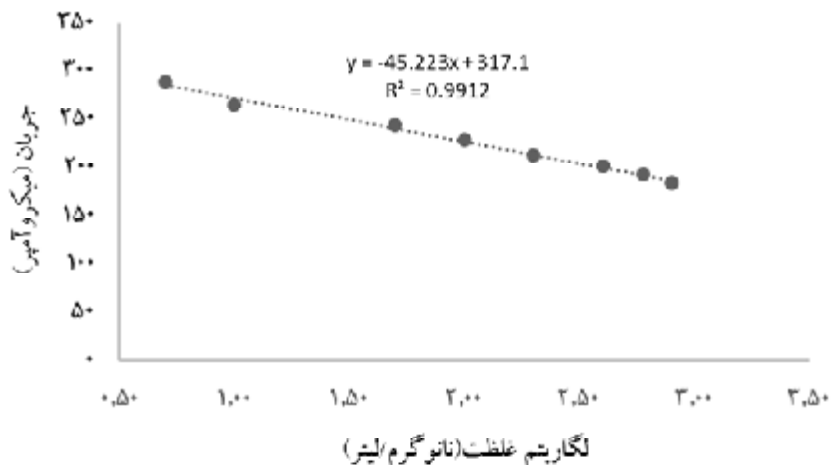
$$I = 45.2 \log C / \text{AFM}_1 + 317, R^2 = 0.991$$

با استفاده از تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی، منحنی کالیبراسیون ترسیم شد. محور عمودی جریان بر حسب میکرو آمپر و محور افقی لگاریتم غلظت‌های مختلف AFM<sub>1</sub> را نشان می‌دهد (شکل ۴). منحنی کالیبراسیون

استاندارد نمونه شاهد (بدون حضور آنالیت) و  $m$  شیب منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت خطی است. طبق رابطه (۲)، حد تشخیص برای شناسایی  $AFM_1$  ۳ نانوگرم بر لیتر به دست آمد.

به منظور محاسبه حد تشخیص (LOD) از رابطه (۲) استفاده شد.

رابطه (۲)  $LOD=3S_{bl}/m$  در رابطه ۲، LOD، حد تشخیص کمی،  $S_{bl}$  انحراف

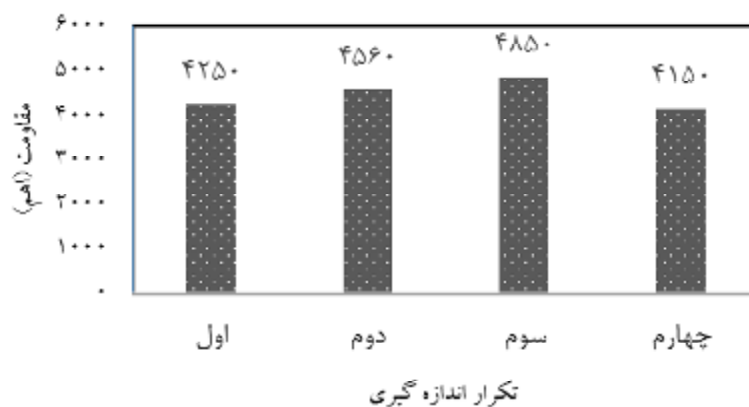


شکل ۴- منحنی کالیبراسیون، جریان در مقابل لگاریتم غلظت آفلاتوکسین

سنجش تکرارپذیری یک الکتروود تحت شرایط بهینه ساخته شد و چهار بار Rct اندازه گیری شد (شکل ۵). مطابق نتایج، انحراف استاندارد نسبی ۶/۲ درصد به دست آمد که نشان دهنده تکرارپذیری مطلوب زیست حسگر است.

### ۳-۴- سنجش مشخصه‌های عملکردی زیست حسگر

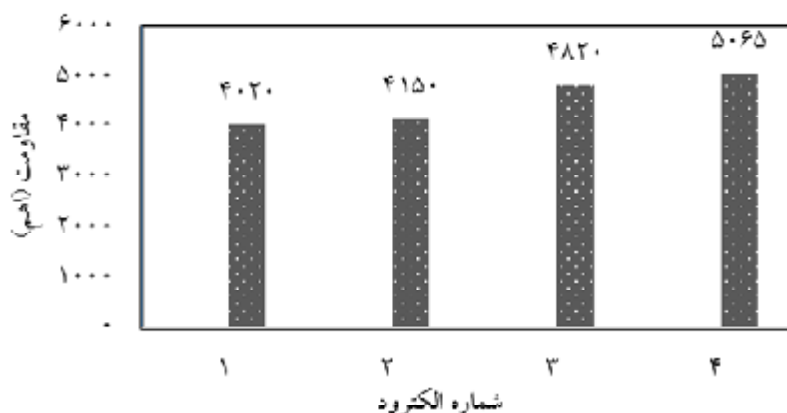
تکرارپذیری نشان دهنده تفاوت در میزان اندازه گیری‌های مکرر انجام شده در شرایط کاملاً یکسان است و هر چه نتایج به هم نزدیک تر باشند؛ سیستم اندازه گیری تکرارپذیری بیشتری خواهد داشت. در این پژوهش، برای



شکل ۵- اثر تکرار اندازه گیری بر مقاومت انتقال بار

ساخته شد. سپس داده‌های Rct به کمک تکنیک EIS ثبت گردید. نتایج نشان داد که انحراف استاندارد نسبی ۹/۷ درصد برای چهار الکتروود حاصل شد (شکل ۶).

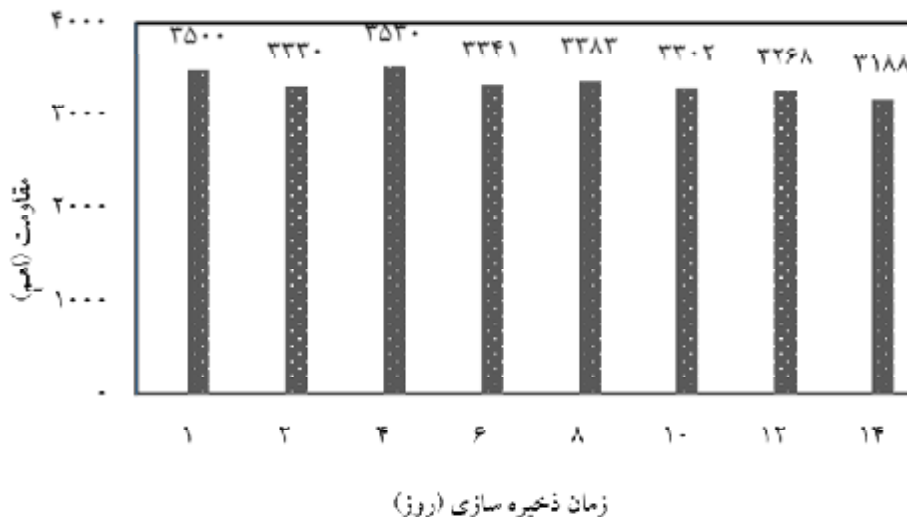
تکثیر پذیری در واقع نشان دهنده تکرارپذیری سیستم اندازه گیری تحت شرایط گسترده تر است. به منظور سنجش تکثیر پذیری تعداد چهار الکتروود در شرایط یکسان به طور مستقل



شکل ۶- تکثیر پذیری زیست حسگر با چهار الکتروود مستقل

دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و به فاصله هر دو روز یک بار داده های Rct به کمک تکنیک EIS ثبت شد. نتایج نشان داد که پس از گذشت ۱۴ روز سیستم تنها ۹ درصد از پاسخ اولیه خود را ازدست داده است که پایداری قابل قبول زیست حسگر را نشان می دهد (شکل ۷).

پایداری ثابت پاسخ یک سیستم اندازه گیری طی زمان را نشان می دهد و هرچقدر پاسخ یک سیستم در طی زمان به پاسخ اولیه نزدیک تر باشد؛ سیستم پایدارتر است. در این پژوهش، سه الکتروود اصلاح شده با RGO و GNP انتخاب و آبتامر روی آنها تثبیت گردید، سپس به مدت ۱۴ روز در



شکل ۷- پایداری بعد از گذشت ۱۴ روز

حاصل شد که حاکی از قابل قبول و مطلوب بودن زیست حسگر پیشنهادی برای تعیین آنالیت مورد نظر است، شارما و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از توسعه ساختارهای آبتامری جهت شناسایی  $AFM_1$  در نمونه های شیر نتایج مشابهی ارائه دادند (۱۷).

### ۳-۵- آنالیز نمونه های حقیقی

کاربرد عملیاتی زیست حسگر پیشنهادی از طریق شناسایی  $AFM_1$  در شیر شتر مورد بررسی قرار گرفت. درصد ریکاوری از نسبت غلظت شناسایی شده به غلظت اضافه شده به دست آمد. بر اساس جدول ۱، درصد ریکاوری برای نمونه های شیر شتر در دو غلظت برای نمونه شیر ۹۰ و ۹۴/۵ درصد



جدول ۱- تعیین میزان آفلاتوکسین M1 در شیر شتر با استفاده از زیست حسگر آمپرومتریک

نمونه واقعی	مقدار اضافه شده (نانوگرم/لیتر)	مقدار شناسایی شده (نانوگرم/لیتر)	بازیابی (%)
شیر خام شتر	۵۰	۴۵	۹۰
	۲۰۰	۱۸۹	۹۴/۵

#### ۴- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، یک زیست حسگر مبتنی بر الکتروود مداد گرافیت اصلاح شده با گرافن اکسید احیاء شده و نانو ذرات طلا برای شناسایی AFM<sub>1</sub> در نمونه شیر شتر پیشنهاد شد. روش پیشنهادی در مقایسه با سایر روش های شناسایی مرسوم AFM<sub>1</sub> ارزان قیمت و سریع تر بوده و حد تشخیص پایین تر از سطح مجاز آفلاتوکسین در شیر دارد. به کمک تکنیک DPV محدوده غلظت خطی ۵-۸۰۰ نانوگرم بر لیتر و حد تشخیص ۳ نانوگرم بر لیتر حاصل شد. همچنین نتایج نشان داد که زیست حسگر تکرارپذیری و تکثیر پذیری و پایداری مطلوبی دارد. لذا با توجه به اهمیت نظارت بر کیفیت شیر و همچنین محدودیت های سایر روش های تشخیصی امکان پیاده سازی زیست حسگر حاضر در صنعت لبنیات وجود داشته و همچنین می توان از آن در جهت پایش آفلاتوکسین ها در سایر محصولات کشاورزی و غذایی نیز بهره برد.

#### ۵- منابع

۳. محمودی، ر.، گلچین، ع.، حسین زاده، ن. و قجریگی، پ. ۱۳۹۳. آلودگی مواد غذایی با منشأ دامی به آفلاتوکسین M1 و B1 در ایران. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، جلد ۱۸، شماره ۴، ۵۹-۴۹م
۴. عینیان، خ.، یغمائیان، ک. و قربانی، ر. ۱۳۹۲. غلظت آفلاتوکسین M1 در شیر خام تولیدی در شهرستان های استان سمنان. کومش، جلد ۱۵، شماره ۲، ۱۸۱-۱۷۶
5. A.Al haj, O. and A.AlKanh, H. 2010. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20(12): 811-821.
6. Alam, S. N. Sharma, N. and Kumar, L. 2017. Synthesis of graphene oxide (GO) by modified hummers method and its thermal reduction to obtain reduced graphene oxide (RGO). *Graphene*, 6(1): 1-18.
7. Appaturi, J. N. Pulingam, T. Thong, K. L. Muniandy, S. Ahmad, N. and Leo, B. F. 2020. Rapid and sensitive detection of Salmonella with reduced graphene oxide-carbon nanotube based electrochemical aptasensor. *Analytical biochemistry*, 589: 113489.
8. Bekel, T. Zelek, M. and Baars, R. M. T. 2004. Milk production performance of the one humped camel (camelus dromedaries) under pastoral management in semi-arid eastern Ethiopia. *Livestock Production Science*, 76: 37-44.
9. Camaj, A. Arbnesi, T. Berisha, B. Haziri, A. and Camaj, A. 2019. Evaluation of aflatoxin M1 by ELISA in raw milk in Kosovo during 2016. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(1): 124-128.

۱. غریبی، ح.، تکدستان، ا.، نیسی، ع.، رضازاده، ح. و کوهپایی، ح. ۱۳۹۵. بررسی سم آفلاتوکسین M1 در شیر گاو میش با استفاده از روش ایمنواسی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، جلد ۲۶، شماره ۱، ۲۵۶-۲۴۸
۲. فرهمندفر، ر.، رشیدایی ابدان سری، س.، مقصود لو، ا. و اثنی عشری، م. ۱۳۹۷. تعیین میزان آلودگی میکروتوکسین ها در گندم های وارداتی به استان مازندران به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا. سلامت و محیط زیست، جلد ۱۱، شماره ۱، ۲۴-۱۵

- and dairy products. *Food and chemical toxicology*, 47(5): 984-991.
16. Shadjou, R. Hasanzadeh, M. Heidar-poor, M. and Shadjou, N. 2018. Electrochemical monitoring of aflatoxin M1 in milk samples using silver nanoparticles dispersed on  $\alpha$ -cycLODextrin-GQD s nanocomposite. *Journal of Molecular Recognition*, 31(6) :e2699
  17. Sharma, A. Catanante, G. Hayat, A. Istamboulié, A. Ben Rejeb, I. Bhand, S. et al. 2016. Development of structures witching aptamer assay for detection of aflatoxin M1 in milk sample. *Talanta*, 158: 35-41.
  18. Shephard, G. S. Berthiller, F. Burdaspal, P. A. Crews, C. Jonker, M. A., Krska, R. et al. 2013. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2011-2012. *World Mycotoxin Journal*, 6(1): 3-30.
  19. Smolko, V. Shurpik, D. Porfireva, A. Evtugyn, G. Stoikov, I. and Hianik, T. 2018. Electrochemical aptasensor based on poly (neutral red) and carboxylated pillar [5] arene for sensitive determination of aflatoxin M1. *Electroanalysis*, 30(3): 486-496.
  20. Tiğ, G. A. and Pekyardımcı, Ş. 2020. An electrochemical sandwich-type aptasensor for determination of lipocalin-2 based on graphene oxide/polymer composite and gold nanoparticles. *Talanta*, 210: 120666.
  10. Istamboulié, G. Paniel, N. Zara, L. Granados, L. R. Barthelmebs, L. and Noguer, T. 2016. Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk. *Talanta*, 146: 464-469.
  11. Jahangiri-Dehaghani, F. Zare, H. R. and Shekari, Z. 2020. Measurement of aflatoxin M1 in powder and pasteurized milk samples by using a label-free electrochemical aptasensor based on platinum nanoparticles loaded on Fe-based metal-organic frameworks. *Food Chemistry*, 310: 125820.
  12. Jin, H. Zhao, C., Gui, R. Gao, X. and Wang, Z. 2018. Reduced graphene oxide/nile blue/gold nanoparticles complex-modified glassy carbon electrode used as a sensitive and label-free aptasensor for ratiometric electrochemical sensing of dopamine. *Analytica chimica acta*, 1025: 154-162.
  13. Kulikova, T. N. Porfireva, A. V. Evtugyn, G. A. and Hianik, T. 2019. Electrochemical aptasensor with layer-by-layer deposited polyaniline for aflatoxin M1 voltammetric determination. *Electroanalysis*, 31(10): 1913-1924.
  14. Pandey, A. K. Rajput, Y. S. Sharma, R. and Singh, D. 2017. Immobilized aptamer on gold electrode senses trace amount of aflatoxin M1. *Applied nanoscience*, 7(8): 893-903.
  15. Prandini, A. Tansini, G. I. N. O. Sigolo, S. Filippi, L. A. U. R. A. Laporta, M. and Piva, G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk

(Original Research Paper)  
**Development of a Graphite Pencil Electrode for Detection of  
Aflatoxin M1 in Camel Milk Using Differential Pulse  
Voltammetry**

Seyyede Fatemeh Ahmadi<sup>1</sup>, Mohammad Hojjatoleslami<sup>2\*</sup>, Hossein Kiani<sup>3</sup>, Hooman Molavi<sup>4</sup>

1-PhD Student of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran.

4-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received:17/08/2020

Accepted:11/01/2021

**Abstract**

Aflatoxins are important mycotoxins produced by some fungus *spp* and are resistant to heat treatments such as pasteurization; their concentration remains unchanged, causing threats for humans. In the present study, using differential pulse voltammetry, a pencil graphite electrode based on reduced graphene oxide and gold nanoparticles has been developed to identify aflatoxin in raw camel milk. The behavior of functional electrodes in several processes has been analyzed using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Results showed that stabilization of reduced graphene oxide and gold nanoparticles caused a reduction in current peak and increment in impedance, while by aptamer stabilization and analyte, the current peak has been lowered and impedance increased. According to the differential pulse voltammetry technic, in the 5-800 ng/lit range, electrical current indicated a linear decrease by increasing concentration ( $R^2=0.991$ ). Recovery was 90-94.5% for a produced biosensor in camel milk. The obtained quantitative detection limit was 3ng/lit. Investigation of functional characteristics, including reproducibility and repeatability, expressed acceptable results for a biosensor.

**Keywords:** Electrochemical Aptasensor, Aflatoxin, Camel Milk, Reduced Graphene Oxide, Gold Nanoparticles.

---

\*Corresponding Author: [mohojjat@gmail.com](mailto:mohojjat@gmail.com)