مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۹۷-۸۹

طراحی و ساخت یک زیست حسگر ولتامتریک در ترکیب با روش HPLC برای پایش آفلاتوکسین M1 در شیر

سیده فاطمه احمدی[۱]، محمد حجت‌الاسلامی[۲]، حسین کیانی[۳و۴]، هومان مولوی[۵]

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. پست الکترونیکی: mohojjat@gmail.com
۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۴- دانشیار آزمایشگاه زیست فراوری و زیست‌سنجش، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱

چکیده

سابقه و هدف: آفلاتوکسین M1 به‌عنوان یکی از خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های شیر است. تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی آفلاتوکسین در شیر معرفی‌شده که شامل کروماتوگرافی، الایزا و رنگ سنجی هستند. با توجه به حساسیت بالای روش های بر پایه حسگرهای الکتروشیمیایی هدف مطالعه حاضر ساخت یک زیست حسگر ولتامتریک دقیق و حساس جهت شناسایی سریع آفلاتوکسین M1 است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر یک زیست حسگر مبتنی بر الکترود مداد گرافیتی اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و نانو ذرات طلا در ترکیب با روش HPLC برای شناسایی آفلاتوکسین M1 ساخته شد. رفتار الکتروشیمیایی زیست حسگر در مراحل مختلف ساخت شامل تثبیت نانو ذرات مغناطیسی، نانو ذرات طلا، تثبیت آپتامر و آنالیت به کمک تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با تثبیت نانو ذرات، پیک جریان و مقاومت انتقال بار به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابند درحالی‌که با تثبیت آپتامر و آنالیت، پیک جریان کاهش و مقاومت انتقال بار در مقایسه با الکترود اصلاح‌نشده افزایش می‌یابند. ارزیابی مشخصه‌های عملکردی حاکی از تکرارپذیری (۴/۶٪) و تکثیر پذیری مطلوب (۸/۸٪) و همچنین پایداری مناسب (۱۴روز) زیست حسگر داشت. حد تشخیص زیست حسگر (۴۰ng/L) و محدوده درصد ریکاوری برای زیست حسگر و روشHPLC به ۸۹/۶-۹۳/۵ و ۱۰۵-۱۰۲ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: زیست حسگر پیشنهادی حد تشخیص پایین‌تر از سطح مجاز مشخص‌شده توسط استاندارد ملی ایران برای شیر (۱۰۰نانوگرم بر لیتر) را ارائه داد. آنالیز نمونه‌های شیر حاوی آفلاتوکسین M1 با استفاده از زیست حسگر نیز محدوده درصد ریکاوری نزدیک در مقایسه با روش HPLC را نشان داد.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین M1، HPLC، زیست حسگر الکتروشیمیایی، نانو ذرات طلا، نانو ذرات مغناطیسی

• مقدمه

شیر به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئین حیوانی محسوب می‌شود، به‌طوری‌که پروتئین شیر (کازئین‌ها و پروتئین‌های سرمی) حاوی اسیدهای آمینه موردنیاز بدن است. شیر حاوی ترکیباتی از جمله چربی، پروتئین، لاکتوز و مواد معدنی است که وجود آنها لزوم اهمیت شیر برای رشد و ادامه زندگی انسان را در برمی‌گیرد (۱). شیر از فرایند تولید تا بسته‌بندی در معرض آلودگی‌های مختلف ازجمله آلودگی میکروبی، مواد سمی و مضر ازجمله مایکوتوکسین‌ها، آفت‌کش‌ها، دی‌اکسین‌ها، فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک آروماتیک قرار دارد. این مواد می‌توانند از راه‌های مختلف وارد چرخه غذایی دام شده و سپس از طریق مصرف شیر به رژیم غذایی انسان راه یابند و باعث ایجاد طیف وسیعی از اختلالات عملکردی در اندام‌ها و بافت‌های زیستی انسان گردند (۲).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

یکی از مهم‌ترین مواد آلوده‌کننده شیر مایکوتوکسین‌ها شامل آفلاتوکسین، اکراتوکسین، پاتولین تریکونسن‌ها و زرالنون‌ها می‌باشند که به‌عنوان متابولیت ثانویه قارچ‌ها هستند. از خطرناک‌ترین نوع مایکوتوکسین های موجود در شیر آفلاتوکسین بوده که سرطان‌زا و جهش‌زا بوده و مسمومیت بر اثر آفلاتوکسین می‌تواند موجب سرکوب سیستم ایمنی، سرطان و نهایتاً مرگ شود. انواع مختلفی از گونه های آفلاتوکسین شناخته‌شده که از شایع‌ترین آن‌ها در محصولات لبنی می‌توان به B1 و B2 و متابولیت های سمی آن‌ها M1 و M2 اشاره کرد. آفلاتوکسین M1 (AFM1) دارای فرمول شیمیایی $C_{17}H_{12}O_7$ بوده و از نظر شیمیایی در گروه دی فورانوکومارین ها طبقه بندی می شود. ساختار آن شامل یک حلقه بی فوران ترکیب شده با یک هسته کومارین و یک حلقه پنتون است (۴، ۳). حد مجاز اعلام شده آن بر اساس ۰/۰۵EUمیکروگرم بر کیلوگرم می‌باشد (۶، ۵). بنابراین شناسایی و تشخیص آفلاتوکسین در شیر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و تاکنون با استفاده از روش های مختلف انجام‌گرفته است. روش‌های متداول برای پایش آفلاتوکسین بر پایه کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) (۷)، کروماتوگرافی مایع (LC) (۸)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (۹) و آزمون الایزا (ELISA) (۱۰) استوار هستند. هر کدام از این روش‌ها دارای محدودیت هایی می‌باشند که نیاز به استفاده از شیوه های نوین از جمله زیست حسگرها که با توجه به‌سرعت و دقت بالا در تشخیص، نقش مهمی در حل مشکلات ایمنی و سلامت مواد غذایی دارند را دو چندان کرده است (۱۱). در روش الایزا نیاز به پر شدن تمامی جایگاه ها در دستگاه برای شناسایی نمونه وجود دارد که از نظر زمان و مقدار نمونه مقرون به صرفه نبوده و ازآنجاکه آنتی‌بادی‌های تولید شده اغلب با ترکیبات مشابه آفلاتوکسین واکنش نشان می‌دهند در بسیاری از مواقع استفاده از روش ELISA به‌تنهایی، مقادیر بالاتری را نشان داده و دقت کافی ندارد (۹، ۴). در روش HPLC به اپراتور مجرب و نیز ستون ایمونوافینیتی برای آفلاتوکسین M1 نیاز بوده و مدت زمان مراحل آماده سازی نمونه و عبور نمونه از ستون نسبت به زیست حسگر بیشتر می‌باشد بطوری که مراحل شناسایی توسط زیست حسگر حداکثر به یک ساعت زمان نیاز دارد در حالی که برایHPLC این زمان چند برابر خواهد بود. مطالعات انجام‌شده در یک پژوهش که توسط Dimitrieska و همکاران (۲۰۱۶) در رابطه با ارزیابی میزان AFM1 در شیر خام با استفاده از روش ELISA و HPLC انجام شده بود، نشان داد در ۲/۹٪ از نمونه‌ها میزان AFM1 بالاتر از حد مجاز بوده و بالاترین غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌ها ng/kg ۱۸/۴۰۸برآورد شد (۱۲). زیست حسگر یک دستگاه تجزیه ای است که شامل بخش تشخیص بیولوژیکی و مبدل فیزیکی بوده و سیگنال قابل‌اندازه‌گیری را نسبت به غلظت ترکیب مورد نظر ایجاد می‌کند (۱۴، ۱۳). مبدل پاسخ بیولوژیکی را به سیگنال الکتریکی قابل تشخیص تبدیل کرده که به‌صورت الکتروشیمیایی قابل اندازه‌گیری است(۱۵). Karczmarczyk و همکاران (۲۰۱۶) زیست حسگر تشدید پلاسمون سطحی SPR (Surface Plasmon Resonance) را برای تشخیص AFM1 در شیر طراحی کردند (۱۶). این حسگر برای مولکول‌های کوچک از محدودیت در تشخیص برخوردار بود به‌طوری‌که حد شناسایی آن‌کمتر از حداکثر میزان قابل‌قبول توسط اتحادیه اروپا بود. از طرفی چون غلظت AFM1 در شیر بالا بود سیگنال‌های مورد نظر کافی نبودند که برای افزایش حساسیت این حسگر و کاهش محدودیت، از نانو ذرات طلا در آن‌ها استفاده کردند. جدول ۱ مطالعات انجام شده برای شناسایی AFM1 در شیر با استفاده از روش های مختلف را نشان می‌دهد.

به‌منظور بهبود کارایی و حساسیت حسگرها و امکان استفاده در روش‌های تشخیصی جدید می‌توان از نانو مواد استفاده کرد. از مزایای استفاده از مقیاس‌های نانو می‌توان به کاهش هزینه به علت کاهش میزان واکنش‌گر مصرفی، کاهش زمان آزمایش، امکان آنالیز چند ترکیب به‌طور هم‌زمان و امکان ایجاد ابزارهای ایمن و سازگاربامحیط‌زیست اشاره نمود (۱۸، ۱۷). از جنبه های نوآوری تحقیق حاضر استفاده از مغز مداد گرافیتی به عنوان الکترود کاری و اصلاح سطح آن با نانو ذرات مغناطیسی MNP (Magnetic nano particles) و نانو ذرات طلا GNP (Gold nano particles) است که باعث افزایش نرخ انتقال الکترون و هدایت الکتریکی شده و روند تشخیص آنالیت را سرعت می‌بخشند و سازگاری ویژه‌ای با محیط‌های بیولوژیکی دارند. استفاده همزمان از این نانوذرات در ترکیب با الکترود مداد گرافیت جهت شناسایی AFM1 برای نخستین بار در ایران انجام پذیرفت.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

جدول ۱. مقایسه مطالعات انجام‌شده برای شناسایی AFM1 در شیر با استفاده از روش‌های مختلف

نام محقق	هدف	روش	نتیجه
Istambouliéa و همکاران (۲۰۱۶)	توسعه زیست حسگر ایمپدیمتریک جهت شناسایی AFM1 در شیر	biosensor	حد تشخیص زیست حسگر ۵۰ng/kg بود که مطابق حد مجاز EU است
Karlovsky و همکاران (۲۰۱۶)	ارزیابی AFM1 در شیر و فراورده‌های لبنی	HPLC ELISA	میزان AFM1 در پنیر پس از دوره رسیدگی ۴ برابر مقدارش در شیر بود. اما در ماست این میزان نسبت به شیر ۳برابر کاهش داشت
Daraei Garmakhany و همکاران (۲۰۱۰)	ارزیابیAFM1 در نمونه‌های شیر	HPLC	این روش از دقت بالایی برای شناسایی AFM1 برخوردار بود
Herzallah و همکاران (۲۰۰۹)	بررسی آفلاتوکسین در شیر	HPLC – FLD HPLC - UVD	غلظت AFM1 و AFM2 در شیر به ترتیب ۱/۱µg/kg و µg/kg ۰/۱ گزارش شد
Radoi و همکاران (۲۰۰۸)	ارزیابی AFM1 در نمونه‌های شیر	ELISA	مقدار AFM1 در۷۵٪ نمونه‌ها از حد مجاز EU بالاتر بود

لذا با توجه به اهمیت تغذیه‌ای شیر، کوتاه بودن زمان تحویل شیر، تعداد بالای نمونه شیر در کارخانه‌ها، کوتاه بودن عمر نگهداری شیر و همچنین نیاز به وجود یک روش سریع، کم‌هزینه و حساس برای شناسایی آفلاتوکسین شیر که به‌عنوان یک خطر جدی در سلامت جامعه می‌باشد، هدف اصلی این تحقیق پایش سریع و دقیق AFM1 در شیر، با استفاده از زیست حسگر الکتروشیمیایی به کمک تکنیک ولتامتری چرخه‌ای و HPLC است. نقطه بحرانی ساخت این زیست حسگر تثبیت پروب DNA بر روی سطح الکترود است. سیستم‌های تشخیصی مبتنی بر DNA بسیار اختصاصی، کم‌هزینه، ساده و نوین بوده و به‌راحتی قابل استفاده هستند.

• مواد و روش‌ها

اجزای سیستم اندازه‌گیری: در این مطالعه از یک الکترود مداد گرافیت به دلیل در دسترس بودن، عدم سمیت، پایداری الکتریکی بالا، هزینه کم و سازگاری با محیط‌زیست، به‌عنوان الکترود کاری استفاده شد. از آنجایی‌که پتانسیل به‌طور مستقیم قابل‌اندازه‌گیری نیست، ازاین‌رو اندازه‌گیری پتانسیل مستلزم آن است که یک نقطه ابتدایی به‌عنوان مرجع ایجاد و پتانسیل اعمالی نسبت به آن اندازه‌گیری شود. در مطالعه حاضر از نقره/نقره کلرید به‌عنوان الکترود مرجع استفاده شد. هر واکنشی که در سطح الکترود کاری رخ می‌دهد عکس آن در الکترود کمکی رخ می‌دهد، در این مطالعه از سیم پلاتین به‌عنوان الکترود کمکی استفاده شد.

اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی: اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی به کمک دو تکنیک ولتامتری چرخه‌ای (CV) و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) با استفاده از پتانشیواستات/گالوانواستات انجام گرفت. تمامی تست‌ها در دمای اتاق (۲۵درجه سلسیوس) و با محلول ۱ میلی مولار فری- فروسیانید با ۰/۱ مولار پتاسیم کلرید انجام گردید. تکنیک CV در محدوده پتانسیل ۰/۲- تا ۰/۶ ولت با سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه انجام گرفت. تکنیک EIS در محدوده فرکانس 10^5-۰/۰۱ هرتز انجام شد.

سنتز نانو ذرات مغناطیسی: در این مطالعه نانو ذرات مغناطیسی به روش هم رسوبی تهیه شد(۱۹). به‌طور خلاصه ۱۱/۶۸۰ گرم نمک $FeCl_2.4H_2O$ و ۴/۳۰۰ گرم نمک $FeCl_3.6H_2O$، در اتمسفری از نیتروژن حل شدند. سپس محلول آمونیاک قطره‌قطره به آن اضافه شد که منجر به تغییر رنگ محلول از نارنجی به سیاه شد. پس از آن رسوب تهیه شده تا خارج شدن کامل آمونیاک شسته شد.

آماده‌سازی زیست حسگر: به‌منظور فعال‌سازی الکترود کاری، تکنیک CV در یک پتانسیل ثابت (۱/۵+ ولت) در محلول سدیم هیدروکسید اعمال گردید. برای تثبیت نانو ذرات مغناطیسی الکترود کاری به مدت ۸۰ دقیقه درون آن محلول قرار گرفت. تثبیت نانو ذرات طلا به کمک تکنیک CV درون محلول $HAuCl_4.3H_2O$ انجام شد. برای تثبیت آپتامر بر روی سطح الکترود ساخته‌شده، الکترود کاری به درون محلول آپتامر (۶ میکرو مولار) در دمای اتاق قرار داده شد و سپس با آب دیونیزه شسته و در دمای محیط خشک گردید.

شناسایی آفلاتوکسین M1: به‌منظور بررسی کاربرد عملی زیست حسگر، الکترود کاری اصلاح‌شده با نانو ذرات مغناطیسی و طلا به مدت ۳۰ دقیقه درون محلولAFM1 قرار داده شد. پس از شستشوی الکترود با آب دیونیزه، طیف CV ثبت گردید و داده‌های پیک جریان اندازه‌گیری شد. به‌منظور ارزیابی کاربرد عملی زیست حسگر، غلظت‌های مختلفی از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

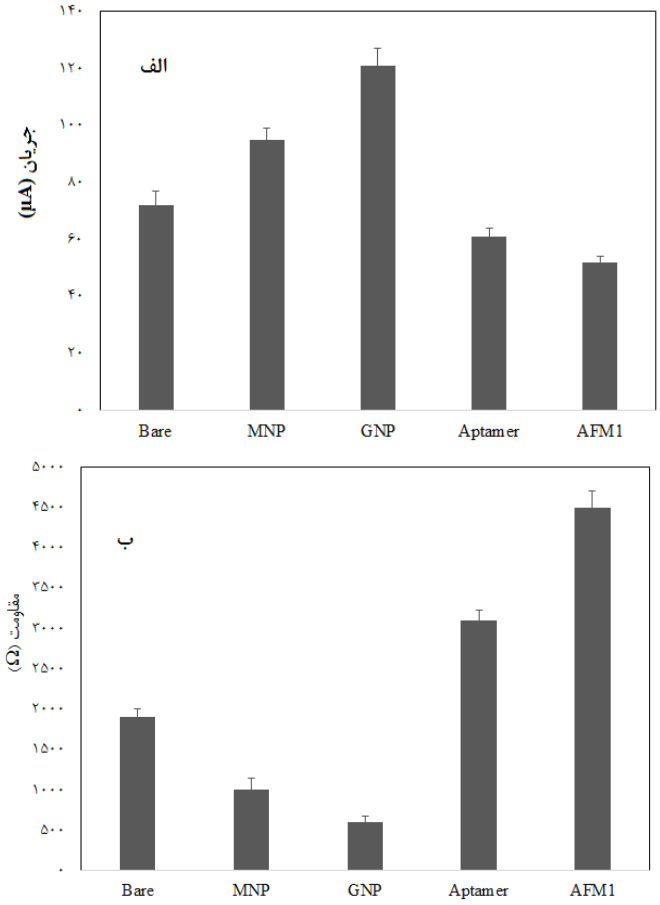
AFM1(۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ نانوگرم/ لیتر) تهیه و منحنی کالیبراسیون با استفاده از داده‌های پیک جریان در مقابل غلظت AFM1 رسم شد.

آماده‌سازی نمونه‌های شیر: نمونه‌های شیر خام از یک فروشگاه محلی خریداری شد. سپس AFM1 با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم/ لیتر به نمونه‌ها تزریق گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط حمام آب (۴۰ درجه سلسیوس) قرار گرفت. بعداز آماده سازی نهایی شیر (۲۱، ۲۰) با محاسبه درصد ریکاوری از نسبت مقدار شناسایی‌شده به مقدار تزریق‌شده، عملکرد زیست حسگر مورد بررسی قرار گرفت.

روش HPLC: از دستگاه HPLC مدل ۲۶۹۵ ساخت کمپانی WATERSو ستون C18، ابعاد ۱۵۰×۴/۶ mm^2، با آشکارساز فلورسانس مدل ۲۴۷۵ با سرعت جریان ۱۰ میکرو لیتر بر دقیقه استفاده گردید. برای انجام روش HPLC مطابق روش مرجع ارائه شده عمل گردید. بطور خلاصه ابتدا ۱۰۰ میلی-لیتر از شیر خام با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت۵ دقیقه در دمای۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد محلول بافر فسفات از ستون ایمونوافینیتی AFM1 عبور داده شده و سپس شیر از ستون عبور داده‌شده و پس از طی تمامی مراحل آزمایش، ۲۰ میکرولیتر از محلول نهایی به دستگاه HPLC تزریق شد (۲۲). محلول‌های استاندارد با استفاده از AFM1 با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰ نانوگرم/ لیتر تهیه و سپس با استفاده از شدت فلورسانس هریک از آن‌ها در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

• یافته‌ها

بررسی رفتار الکتروشیمیایی: مطابق شکل۱(الف) با تثبیت MNP و GNP بر روی الکترود مداد گرافیت پیک جریان به ترتیب از ۵۹ به ۸۲ میکرو آمپر و از ۸۲ به ۹۸ میکرو آمپر افزایش و بااتصال رشته‌های آپتامر به نانو ذرات طلا پیک جریان تا ۴۹ میکرو آمپر کاهش پیدا کرد که این روند کاهشی بااتصال آنالیت (AFM1) به آپتامر اختصاصی خود ادامه یافت. همان‌طور که از شکل۱(ب) استنباط می‌شود با تثبیت MNP بر روی الکترود مداد گرافیت، مقاومت انتقال بار از ۱۹۰۰ به ۱۰۰۰ اهم کاهش پیدا کرد و با تثبیت GNP مقاومت انتقال بار کاهش بیشتری یافت. بعد از تثبیت آپتامر بر روی سطح الکترود اصلاح‌شده با MNP وGNP مقاومت انتقال بار تا ۳۱۰۰ اهم افزایش پیدا کرد. همچنین با قرار گرفتن AFM1 در جایگاه‌های فعال آپتامر مقاومت انتقال بار تا ۴۵۰۰ اهم افزایش یافت.



شکل ۱ .پیک جریان (الف) و مقاومت انتقال بار (ب) در مراحل مختلف اصلاح الکترود کاری

رسم منحنی کالیبراسیون: غلظت‌های مختلفی از AFM1 (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ نانوگرم بر لیتر) تهیه گردید و سپس پیک جریان بعد از تثبیت آنالیت ثبت شد. با رسم نمودار خطی بین غلظت AFM1 (محور افقی) و پیک جریان (محور عمودی) منحنی کالیبراسیون به دست آمد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است با افزایش غلظت آنالیت پیک جریان به‌صورت خطی افزایش یافت و از معادله خط رابطه (۱) پیروی کرد:

رابطه (۱)

$$I\ (\mu A) = -0.0285C/AFM1 + 41.8$$
$$R^2 = 0.9858$$

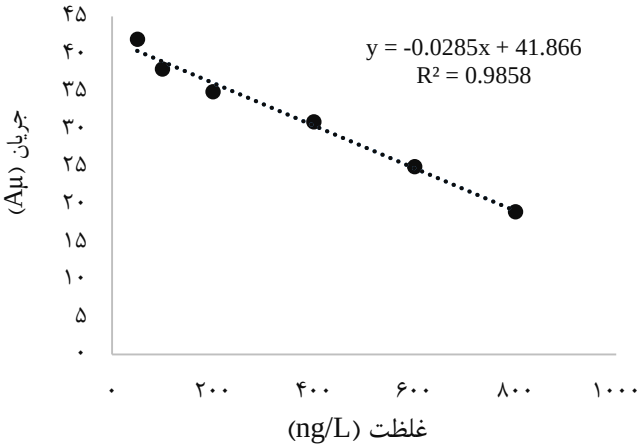
با توجه به اینکه در محدوده ۵۰ تا ۸۰۰ نانوگرم بر لیتر رابطه بین پیک جریان به‌دست‌آمده از تکنیک CV، از یک رابطه خطی پیروی کرد بنابراین رنج غلظت دینامیکی زیست حسگر برای شناسایی AFM1 محدوده ۵۰ تا ۸۰۰ نانوگرم بر لیتر است. تخمین حد تشخیص به کمک رابطه (۲) صورت گرفت که مطابق آن حد تشخیص ۴۰ نانوگرم بر لیتر به دست آمد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

رابطه(۲)

$$3 \times SD_{blank}/\mathrm{m}$$

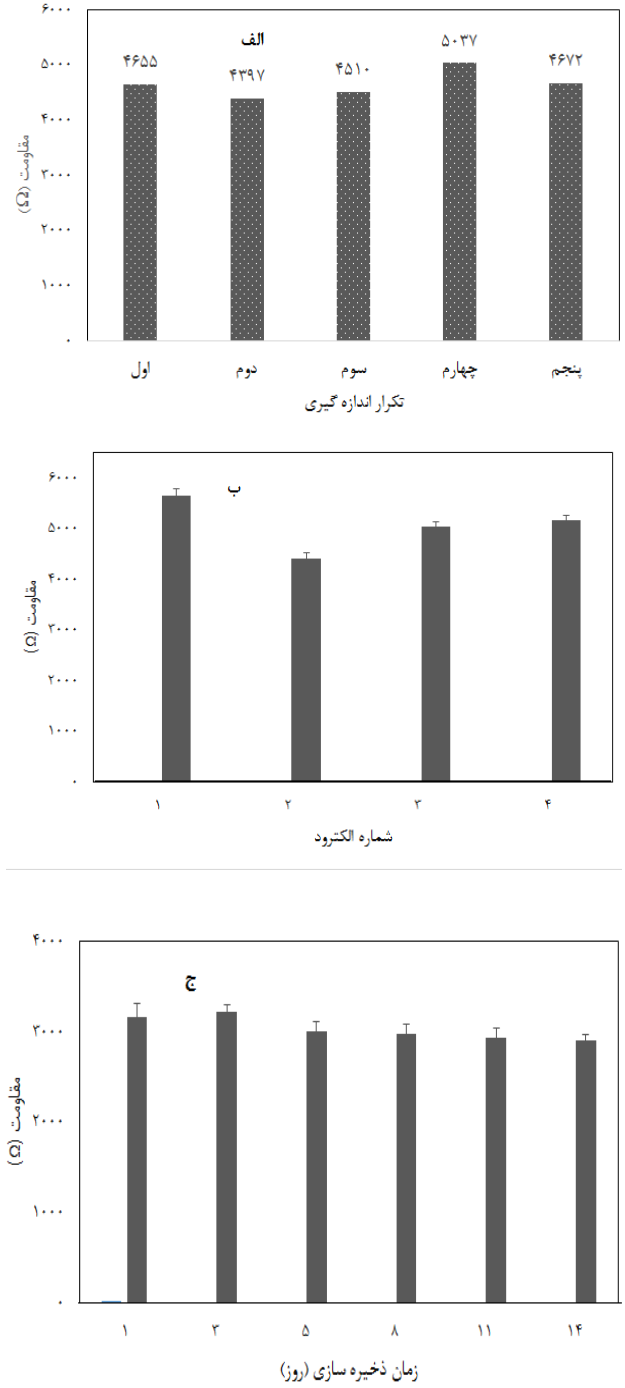
در این فرمول SD انحراف استاندارد نمونه شاهد (غلظت صفر آنالیت) و m شیب منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت دینامیکی است.



شکل ۲. منحنی کالیبراسیون برای غلظت های مختلف AFM1

ارزیابی زیست حسگر: در شکل۳ (الف) اثر پنج اندازه‌گیری مکرر بر روی مقاومت انتقال بار نشان داده‌شده است. مقاومت انتقال بار در اندازه‌گیری‌های اول تا پنجم به ترتیب ۴۶۵۵، ۴۳۹۷، ۴۵۱۰، ۵۰۳۷ و ۴۶۷۲ اهم به دست آمد. جهت بررسی تکثیر پذیری مطابق شکل۳ (ب) اثر پاسخ چهار الکترود بر مقاومت انتقال بار بررسی شد که انحراف استاندارد نسبی (۸/۸ درصد) مربوط به مقاومت انتقال بار حاصل گردید. نتایج مربوط به پایداری زیست حسگر در شکل۳ (ج) نشان داده شده است. مطابق شکل، بعد از گذشت ۱۴ روز زیست حسگر تنها ۸ درصد از پاسخ اولیه خود را از دست داده است.

آنالیز نمونه‌های واقعی: همان‌طور که در جدول ۲ آورده شده است درصد ریکاوری برای نمونه‌های شیر برای روش سنسوری ۸۹/۶ تا ۹۳/۵ درصد و برای روش HPLC ۱۰۲ تا ۱۰۵ درصد به ترتیب برای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر حاصل شد.



شکل ۳. تکرارپذیری (الف)، تکثیر پذیری (ب) و پایداری (ج) زیست حسگر

جدول ۲. شناسایی AFM1 در شیر به کمک زیست حسگر و HPLC

نمونه شیر	مقدار تزریق‌شده (ng/L)	مقدار شناسایی‌شده (ng/L)		درصد ریکاوری		RSD%	
		زیست حسگر	HPLC	زیست حسگر	HPLC	زیست حسگر	HPLC
شیر خام	۱۰۰	۴۴/۸	۱۰۲	۸۹/۶	۱۰۲	۸/۴	۶/۲
	۲۰۰	۱۸۷	۲۱۰	۹۳/۵	۱۰۵	۶/۹	۸/۱

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

• بحث

شیر و فراورده های لبنی به عنوان ماده غذایی فراسودمند شناخته شده اند به طوری که استفاده از آن ها اثر مستقیم و قابل توجهی بر سلامتی دارد. مطابق بررسی های انجام شده توسط Blanco و همکاران (۲۰۰۸) و Pleadin و همکاران (۲۰۱۵)، آفلاتوکسین به راحتی در خلال رشد و انبار داری مواد غذایی به وجود می آید و از آنجایی که در برابر پاستوریزاسیون بسیار مقاوم بوده و اعمال فرایند های حرارتی جهت تولید محصولات لبنی نیز نمی‌تواند از میزان پایداری آن بکاهد، شناسایی سریع آن در شیر از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۵، ۳). به نظر می رسد حضور سم آفلاتوکسین با تغذیه دام‌های شیرده مرتبط باشد. جهت رسیدن به کیفیت مطلوب شیر باید غذای دام فاقد آلودگی آفلاتوکسین B1 باشد. در ایران شیوع AFM1 در شیر دام، گسترش فراوانی داشته و به این دلیل لازم است شیر به طور مستمر مورد پایش قرار گیرد (۴). برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین، روش‌های متفاوت ایمونولوژیکی و اندازه گیری کمی وجود دارند اما جدیدترین و سریع‌ترین روش استفاده از روشهای الکتروشیمیایی می باشد.

بررسی رفتار الکتروشیمیایی با CV: برای سنجش عملکرد زیست حسگر پیشنهادی از روش‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده گردید. پیک جریان مربوط به روش ولتامتری چرخه‌ای در مراحل مختلف آماده‌سازی شامل تثبیت MNP، GNP، آپتامر و AFM1 درون محلول حاوی ۱ میلی‌مولار فری- فروسیانید با ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید، در شکل۱(الف) آورده شده است. با تثبیت MNP بر روی الکترود مداد گرافیت پیک جریان به دلیل افزایش فرایند انتقال الکترون افزایش یافت. علت افزایش پیک جریان بر اثر قرارگیری GNP روی الکترود مغز مداد گرافیت اصلاح‌شده با MNP به هدایت الکتریکی بالاتر نانو ذرات طلا نسبت به نانو ذرات مغناطیسی نسبت داده می شود. کاهش پیک جریان بر اثر اتصال رشته‌های آپتامر به نانو ذرات طلا دافعه الکترواستاتیک بین فری- فروسیانید و آپتامر که هر دو دارای بار منفی هستند می باشد. همچنین بااتصال آنالیت به آپتامر به علت پر شدن جایگاه‌های فعال از طریق اتصال به آپتامر پیک جریان کاهش بیشتری یافت که با نتایج Farzadfard و همکاران (۲۰۲۰) مبنی بر کاهش جریان بعد از تثبیت آپتامر و آنالیت همخوانی دارد (۲۳).

بررسی رفتار الکتروشیمیایی با EIS: در شکل۱(ب)، مقاومت انتقال بار مربوط به تکنیک EIS در مراحل مختلف آماده‌سازی شامل تثبیت MNP، GNP، آپتامر و AFM1 درون محلول حاوی ۱ میلی مولار فری- فروسیانید با ۰/۱۰ مولار پتاسیم کلرید، در محدوده فرکانس 10^{5}-۰/۰۱ هرتز و پتانسیل ۱۵۰ میلی ولت نشان داده‌شده است. تثبیت MNP بر روی الکترود مداد گرافیت باعث کاهش مقاومت انتقال بار گردید. علت کاهش بیشتر مقاومت انتقال بار با تثبیت GNP را بایستی در هدایت الکتریکی بالای GNP در مقایسه با MNPجست‌وجو نمود. افزایش مقاومت انتقال بار پس از تثبیت آپتامر به دلیل ایجاد یک‌لایه مقاوم منفی ناشی از دافعه الکترواستاتیک بین آپتامر و الکترولیت بر روی سطح الکترود است و در نهایت با اتصال آنالیت به آپتامر خود، یون‌ها به‌سختی می‌توانند بر روی سطح الکترود قرار بگیرند که به افزایش مقاومت انتقال بار و درنتیجه کاهش پیک جریان نسبت به حالت‌های قبلی منتج شده است که با نتایج Gökçe و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت دارد(۲۴).

بررسی تکرارپذیری: به‌منظور سنجش تکرارپذیری زیست حسگر، ابتدا یک الکترود که نانو ذرات مغناطیسی و طلا بر روی آن تثبیت‌شده بودند، درون محلول آپتامر با غلظت ۶ میکرو مولار قرار گرفت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول AFM1 قرار داده شد. همان‌طور که در شکل ۳ (الف) مشاهده می‌شود با اندازه‌گیری درصد انحراف استاندارد نسبی (۴/۶) با استفاده از تکنیکEIS، تکرارپذیر بودن زیست حسگر برای شناسایی AFM1 تأیید گردید.

بررسی تکثیر پذیری: در شکل۳ (ب) اثر پاسخ چهار الکترود بر مقاومت انتقال بار نشان داده‌شده است. به‌منظور سنجش تکثیر پذیری زیست حسگر، ابتدا چهار الکترود به‌صورت کاملاً مستقل تحت شرایط یکسان ساخته شد. سپس درون محلول آپتامر با غلظت ۶ میکرو مولار قرار گرفت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول AFM1 قرار داده شد تا آنالیت به آپتامر اختصاصی خود متصل گردد. با اندازه‌گیری انحراف استاندارد نسبی (۸/۸ درصد) مربوط به مقاومت انتقال بار با استفاده از روش EIS، مشخص گردید که تکثیر پذیری زیست حسگر قابل‌قبول است.

بررسی پایداری: در شکل۳ (ج) اثر مدت‌زمان بر پاسخ زیست حسگر بر مقاومت انتقال بار آورده شده است. به‌منظور بررسی پایداری زیست حسگر، ابتدا الکترود کاری با نانو ذرات مغناطیسی و طلا اصلاح شد. سپس درون محلول آپتامر با غلظت ۶ میکرو مولار قرار گرفت و به مدت ۱۴ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. با اندازه‌گیری داده‌های مقاومت انتقال بار در روزهای اول، سوم، پنجم، هشتم، یازدهم و چهاردهم به کمک تکنیک EIS، مشخص گردید که با توجه به

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

شکل می‌توان گفت پایداری زیست حسگر با مقایسه پاسخ اولیه و نهایی بعد از گذشت دو هفته قابل‌قبول است.

نتایج بدست آمده در قسمت تکرار پذیری، تکثیرپذیری و پایداری در مقایسه با زیست حسگر طراحی شده برای شناسایی ملامین و اوره در شیر توسط Ezhilan و همکاران(۲۰۱۷) و Gökçe و همکاران (۲۰۲۰) در رابطه با تعیین میزان اکراتوکسینA در شیر با استفاده از زیست حسگر ایمپدیمتریک بر پایه الکترود مغز مداد از روند مشخصی برخوردار بوده و با نتایج حاصل از آن پژوهش ها مشابهت دارند (۲۵، ۲۴).

آنالیز نمونه‌های واقعی: کاربرد عملی زیست حسگر ساخته‌شده برای شناسایی AFM1 در مقایسه با روش HPLC در شیر مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا زیست حسگر در شرایط بهینه ساخته شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در داخل شیر حاوی آنالیت با غلظت‌های۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر قرار گرفت. درصد ریکاوری از نسبت غلظت شناسایی‌شده به غلظت اضافه‌شده برای دو روش حسگر و HPLC محاسبه گردید. نتایج بدست آمده در جدول ۲ نشان‌دهنده درصد ریکاوری نسبتاً مطلوب زیست حسگر در مقایسه با روش HPLC است. Istambouliéa و همکاران (۲۰۱۶) و Dinçkaya و همکاران (۲۰۱۱) در رابطه با شناسایی AFM1 در نمونه های شیر با استفاده از زیست حسگرهای ساخته شده بر پایه DNA نتایج مشابهی را ارائه دادند که با نتایج حاصل از این پژوهش از نظر شناسایی آنالیت و سرعت عمل زیست حسگر مطابقت دارند (۲۱، ۲۰).

در پژوهش حاضر، یک زیست حسگر اقتصادی، سریع و حساس برای شناساییAFM1 پیشنهاد گردید. برای توسعه زیست حسگر، یک الکترود مداد گرافیت با نانو ذرات مغناطیسی و طلا اصلاح شد. بررسی رفتار الکتروشیمیایی در سطح الکترود به کمک تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی نشان داد که بعد از تثبیت آپتامر و آنالیت پیک جریان و مقاومت انتقال بار به ترتیب کاهش و افزایش یافتند. به کمک روش ولتامتری چرخه‌ای محدوده غلظت دینامیکی و حد تشخیص به ترتیب ۸۰۰-۵۰ و ۴۰ نانوگرم بر لیتر به دست آمد. با اندازه‌گیری داده‌های مقاومت انتقال بار بعد از تثبیت آنالیت، تکرارپذیری و تکثیر پذیری زیست حسگر به کمک تکنیک EIS تأیید شد. آنالیز نمونه‌های شیر حاوی AFM1 با استفاده از زیست حسگر نیز محدوده درصد ریکاوری نزدیک در مقایسه با روش HPLC را نشان داد.

• References

1. Hashemi M. A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran. J Food Drug Anal 2016; 24(4): 888-893.
2. Flores-Flores ME, Lizarraga E, de Cerain AL, González-Peñas E. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. Food Control 2015; 53: 163-176.
3. Pleadin J, Staver MM, Vahčić N, Kovačević D, Milone S, Saftić L, et al. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. Food control 2015; 52: 71-77.
4. Sadeghi E, Mohammadi M, Sadeghi M, Mohammadi R. Systematic review study of Aflatoxin M1 level in raw, pasteurized and UHT milk in Iran. Iranian J Nutr Sci Food Tech 2013; 7 (5): 599-612 [in Persian].
5. Blanco J, Domingues L. Behavior of Aflatoxin during the manufacture ripening and Storage. J. Food Sci 2008; 53: 73-76.
6. Karlovsky P, Suman M, Berthiller F, De Meester J, Eisenbrand G, Perrin I, et al. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. Mycotoxin Res 2016; 32(4): 179-205.
7. Stroka J, Anklam E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer J. Chromatogr. A 2000; 904(2): 263-268.
8. Blesa J, Soriano JM, Molto JC, Marın R, Manes J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. J Chromatogr A 2003; 1011(1-2): 49-54.
9. Herzallah SM. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat productsusing HPLC fluorescent and UV detectors. Food Chem 2009; 114: 1141–1146.
10. Radoi A, Targa M, Prieto-Simon B, Marty JL. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection. Talanta 2008; 77(1): 138-143.
11. Sharma A, Catanante G, Hayat A, Istamboulie G, Bhand S. Development of structure switching aptamer assay for detection of Aflatoxin M1in milk sample. Talanta 2016; 158: 35–41.
12. Dimitrieska-Stojkovic, E, Stojanovska-Dimzoska B, Ilievska G, Uzunov R, Stojkovi G, Hajrulai-Musliu Z. Jankuloski D. Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. Food Control 2016; 59: 201-206.
13. Danesh NM, Bostan HB, Abnous K, Ramezani M, Youssefi K, Taghdisi SM, et al. Ultrasensitive detection of aflatoxin B1 and its major metabolite aflatoxin M1 using aptasensors: A review. TrAC 2018; 99: 117-128.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

14. Mirmoghtadaie L, Mirza nasiri N, Kadivar M. Determining folic acid content of food using a double strand nucleic acid biosensor. Iranian J Nutr Sci Food Tech 2014; 8 (4):189-198 [in Persian].

15. Wang X, Dong S, Gai P, Duan R, Li F. Highly sensitive homogeneous electrochemical aptasensor for antibiotic residues detection based on dual recycling amplification strategy. Biosens Bioelectron 2016; 82: 49-54.

16.Karczmarczyk A, Dubiak-Szepietowska M, Vorobii M, Rodriguez-Emmenegger C, Dostálek J. Feller k. Sensitive an drapiddetection of Aflatoxin M1 in milk utilizing enhanced SPR and p(HEMA)brushes. Biosens Bioelectron 2016; 81: 159–165.

17. Rosati G, Ravarotto M, Scaramuzza M, De Toni A, Paccagnella A. Silver nanoparticles inkjet-printed flexible biosensor for rapid label-free antibiotic detection in milk. Sens Actuators B Chem 2019; 280: 280-289.

18. Proenca MP, Sousa CT, Ventura J, Araujo JP. "Electrochemical synthesis and magnetism of magnetic nanotubes."In Magnetic Nano-and Microwires. Woodhead Publishing 2015; p. 727-781.

19. Radoń A, Drygała A, Hawełek Ł, Łukowiec D. Structure and optical properties of Fe3O4 nanoparticles synthesized by co-precipitation method with different organic modifiers. Mater Charact 2017; 131: 148-156.

20. Istambouliéa G, Nathalie P, Zara L, Granados LR, Barthelmebs L. Nogue T. Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk. Talanta 2016; 146: 464-469.

21. Dinçkaya E, Kınık O, Sezgintürk MK, Altuğ C, Akkoc A. Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. Biosens Bioelectron 2011; 26: 3806-3811.

22. Daraei Garmakhany A, Zighamian H, Rasti Ardakani M, Sarhangpour R, Amiri SS. Investigation of Aflatoxin M1 contamination in milk samples collected from Esfahan and Yazd provinces. J FOOD PROCESS PRES 2010; 2(3): 31-42 (in Persian).

23. Farzadfard A, Shayeh JS, Habibi-Rezaei M, Omidi M. Modification of reduced graphene/Au-aptamer to develop an electrochemical based aptasensor for measurement of glycated albumin. Talanta 2020; 211: 120722.

24. Gökçe G, Aissa SB, Nemčeková K, Catanante G, Raouafi N, Marty JL. Aptamer-modified pencil graphite electrodes for the impedimetric determination of ochratoxin A. Food Control 2020; 107271.

25. Ezhilan M, Gumpu MB, Ramachandra BL, Nesakumar N, Babu KJ, Krishnan UM, et al. Design and development of electrochemical biosensor for the simultaneous detection of melamine and urea in adulterated milk samples. Sens Actuators B Chem 2017; 238: 1283-92.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]

Fabrication of a Voltammetric Biosensor in Combination with HPLC to Detection of Aflatoxin M1 in Milk

Ahmadi F[1], Hojjatoleslamy M[2], Kiani H[3,4], Molavi H[5]*

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

*2- *Corresponding author: Assoc. Prof., Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Email: mohojjat@gmail.com*

3- Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4- Assoc. Prof., Bioprocessing and Biodetection Lab, Department of Food science and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran.

5- Assist. Prof., Department of Food Science and Technology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received 6 Oct, 2020 **Accepted 20 Jan, 2021**

Background and Objectives: Aflatoxin M1 is one the most important mycotoxin contaminants of milks. Various methods have been described to detect aflatoxins in milks, including chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay and colorimetry. Regarding high sensitivity of electrochemical sensor based methods, the aim of the present study was to fabricate an accurate sensitive voltametric biosensor for the rapid detection of aflatoxin M1.

Materials & Methods: In the present study, a biosensor based on magnetic and gold nanoparticles modified with pencil graphite electrodes was combined with high-performance liquid chromatography to identify aflatoxin M1. Electrochemical behaviors of the biosensor were investigated at various stages of fabrication, including immobilization of magnetic nanoparticles, gold nanoparticles, aptamers and analytics using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques.

Results: Results showed that the current peak and charge transfer resistance respectively increased and decreased as the nanoparticles were immobilized, while the current peak and charge transfer resistance increased, compared to the unmodified electrode with the aptamer and analytics immobilization. Assessment of the functional characteristics revealed that the biosensor desirable repeatability (4.6%), reproducibility (8.8%) and acceptable stability (14 days). The biosensor limit of detection was 40 ng/l and the recovery proportion range was reported 93.5–89.6 and 102–105 for biosensor and high-performance liquid chromatography, respectively.

Conclusion: The suggested biosensor presented a limit of detection lower than that of Iranian national standard for milk (100 ng/l). Analysis of aflatoxin M1 contaminated milk samples using the biosensor showed a recovery proportion range close to that of high-performance liquid chromatography.

Keywords: Aflatoxin M1, high-performance liquid chromatography, Electrochemical biosensors, Gold nanoparticles, Magnetic nanoparticles

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.52547/nsft.16.2.89]