

## مقاله پژوهشی

## روش نوین ارزیابی غلظت پروتئین لاکتوفرین در فرمولاسیون شیر خشک نوزادان با بهره‌گیری از فناوری حسگرهای الکتروشیمیایی

فاطمه ابراهیمی<sup>۱</sup>، سید احمد مظفری<sup>۲\*</sup>، حسین سالار آملی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۲. دانشیار شیمی تجزیه، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۳. استاد شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۷، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱)

## چکیده

صنایع غذایی دائماً با پاسخگویی به نیازهای مصرف‌کنندگان در زمینه‌ی تولید محصولات جدید غذایی سودمند، لذت بخش، سالم و مقرون به صرفه در حال تکامل است. در این راستا تولید غذاهای فراسودمند با استفاده از افزودنی‌هایی نظیر لاکتوفرین که به عنوان یک تقویت کننده‌ی سیستم ایمنی در نظر گرفته می‌شود، مورد توجه قرار گرفته است. طراحی حسگرهای الکتروشیمیایی به منظور اندازه‌گیری آنلاین برخی از اجزای بیولوژیکی موجود در ماتریس مواد غذایی کمک شایانی در کنترل کیفیت محصول تولیدی و کاهش هزینه‌های تولید است. هدف اصلی این پژوهش توسعه دستگاه تجزیه‌ای برای تعیین سریع و قابل اطمینان لاکتوفرین به عنوان یکی از گونه‌های بیولوژیکی موجود در محصولات لبنی از قبیل شیر خشک و توسعه روش‌های ارزیابی کیفیت مواد غذایی با بهره‌گیری از فناوری نوین حسگرهای الکتروشیمیایی است. در این راستا، حسگر الکتروشیمیایی لاکتوفرین بر مبنای اصلاح سطح الکتروود طلا دیسکی با استفاده از لایه نازک نانو ساختار کاپتوپریل تهیه گردید. عملکرد این حسگر بر پایه‌ی قابلیت لاکتوفرین در ایجاد کمپلکس با یون آهن موجود در ساختار لاکتوفرین و جذب بر سطح لایه نازک نانو ساختار کاپتوپریل به منظور تشخیص و ارزیابی غلظت این پروتئین در فرمولاسیون شیر خشک نوزادان استوار است. از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و اسپکتروسکوپی امیدانس الکتروشیمیایی به منظور پایش ساخت الکتروود و مکانیسم پاسخ حسگر و از تغییر در مقاومت انتقال بار سطح در روش ایمپدیمتری که در اثر جذب لاکتوفرین در سطح حسگر ایجاد می‌شود، به منظور تشخیص و تعیین مقدار لاکتوفرین با استفاده از حسگر تهیه شده استفاده شد. این حسگر قادر به تشخیص میزان غلظت لاکتوفرین در بازه‌ی غلظت ۱۲۵ nM تا ۳/۲۵۰ μM با حد تشخیص ۵۰ nM بوده و با موفقیت برای تعیین میزان لاکتوفرین در ماتریس نمونه‌ی حقیقی شیر خشک بکار گرفته شده است.

واژه‌های کلیدی: لاکتوفرین، مواد غذایی فراسودمند، فرمولاسیون شیر خشک، فناوری حسگرهای الکتروشیمیایی

## ۱. مقدمه

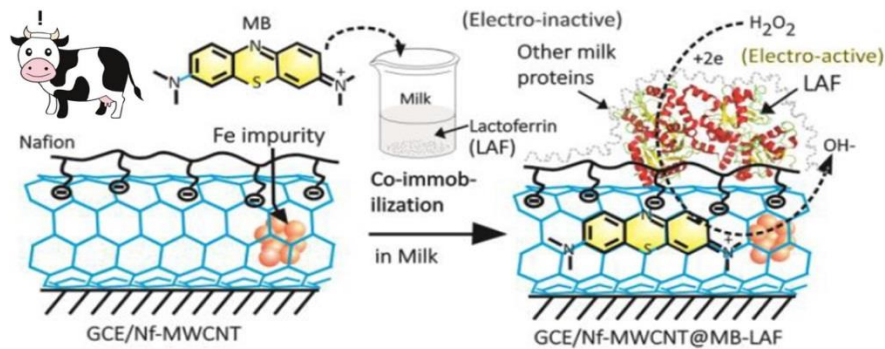
یک حسگر کنترل کیفیت مواد غذایی به عنوان وسیله‌ای تعریف می‌شود که بتواند به برخی از خواص مواد غذایی مورد بررسی پاسخ دهد و سیگنالی قابل خواندن را ایجاد کند. این سیگنال ممکن است اطلاعات مستقیمی در مورد فاکتورهای کیفی مورد سنجش و یا ارتباطی شناخته شده با این فاکتورهای تعیین کننده‌ی کیفیت داشته باشد. تاکنون موارد متعددی از کاربرد حسگرهای الکتروشیمیایی به منظور کنترل کیفیت در صنایع غذایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۰-۱۲]. با توجه به کارکردهای مهم فیزیولوژیکی و نیز مزیت‌های تغذیه‌ای منحصر به فرد لاکتوفرین، معرفی روشی سریع و دقیق برای اندازه‌گیری این پروتئین چند عملکردی در ماتریس مواد غذایی از اهمیت بسزایی برخوردار است [۱۳]. جدول (۱) روش‌های مختلف معرفی شده در سنجش لاکتوفرین و نیز مقایسه‌ی ویژگی‌های این روش‌ها را نشان می‌دهد [۱۴-۱۹].

با در نظر گرفتن اهمیت اندازه‌گیری لاکتوفرین در صنایع مختلف مورد اشاره و مزیت‌های معرفی شده در کاربرد حسگرهای الکتروشیمیایی در صنایع غذایی، معرفی یک حسگر الکتروشیمیایی دقیق و حساس با قابلیت تهیه و کاربرد پذیری آسان در ماتریس مواد غذایی ضروری می‌نماید. در این راستا دوی و همکاران [۲۰]، از تثبیت لاکتوفرین و متیلن بلو در الکترولیت شیر و خواص الکتروکاتالیستی ترکیب حاصل برای تعیین لاکتوفرین در شیر گاو با استفاده از روش الکتروشیمیایی بهره گرفتند. در این روش نانولوله‌های کربنی چند دیواره با استفاده از نفیون بر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای تثبیت شدند سپس با اعمال چندین چرخه‌ی پتانسیل در الکترولیت حاوی شیر و متیلن بلو، لاکتوفرین به همراه ترکیب اخیر به صورت همزمان بر سطح اصلاح شده تثبیت می‌شوند (شکل ۱). در این حالت نسبت مستقیمی بین میزان لاکتوفرین موجود در شیر با میزان لاکتوفرین تثبیت شده بر سطح الکتروود وجود دارد که با استفاده از نقش کاتالیزوری ترکیب حاصل در واکنش الکتروشیمیایی پراکسید هیدروژن بر سطح قابل ردیابی است.

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین ۸۰ کیلو دالتونی از خانواده‌ی ترانسفرین‌هاست و بعد از کازئین دومین پروتئین فراوان در شیر محسوب می‌گردد [۱]. از لاکتوفرین به عنوان ترکیب مغذی در رشد گروه خاصی از باکتری‌های مفید استفاده می‌شود [۲]؛ هم چنین اثرات این ترکیب در تقویت سیستم ایمنی بدن و کمک به گلبول‌های سفید در مقابله با عوامل بیماری‌زا اثبات شده است [۳]. لاکتوفرین از آسیب سلولی ناشی از پیری جلوگیری می‌کند [۴] و موجب ثبات کلونی باکتری‌های مفید در روده می‌شود [۵]. مطالعات اخیر نشان داده است پروتئین لاکتوفرین در درمان سرطان معده نقش داشته و فعالیت ضد توموری در انسان دارد [۶]. براساس گزارش جدید منتشر شده توسط کمپانی گرند ویو ریسرچ<sup>۱</sup>، در سال ۲۰۱۹ ارزش بازار جهانی لاکتوفرین ۲۰۳/۷ میلیون دلار گزارش شده است و پیش‌بینی می‌شود این رقم تا سال ۲۰۲۷ به ۳۷۹/۵ میلیون دلار برسد [۷]. از طریق تولید غذاهای فراسودمند غنی شده با لاکتوفرین، می‌توان از مزایای تغذیه‌ای این پروتئین ارزشمند استفاده کرد. افزایش استفاده از لاکتوفرین به عنوان یک افزودنی مهم در محصولات غذایی مختلف از جمله فرمولاسیون غذای شیرخواران، مکمل‌های غذایی، غذاهای رژیمی، مکمل‌های ورزشی، محصولات مراقبت شخصی و مواد آرایشی ارزش بازار جهانی لاکتوفرین را در بازه زمانی پیش‌بینی شده تقویت خواهد کرد [۷]. از طرفی، کنترل کیفیت در صنایع غذایی ضروری است، مصرف‌کنندگان به دنبال کیفیت، ماندگاری و قیمت مناسب هستند و بازرسین مواد غذایی به دنبال اجرای اصول GMP، ایمنی و تطابق با مقررات هستند، بنابراین تضمین کیفیت مؤثر و کارآمد اهمیت فزاینده‌ای پیدا می‌کند [۸]. همزمان با پیشرفت و تکامل فرایندهای نوین در تهیه و تولید مواد غذایی فراسودمند، توسعه‌ی فناوری‌های جدید سنجش کیفیت که فراتر از فناوری‌های موجود هستند، بویژه از طریق حسگرهای سنجش کیفیت آنلاین، به منظور پاسخگویی به نیازهای مصرف کننده و بهبود اتوماسیون و کاهش هزینه و زمان در تولید محصولات جدید رو به گسترش است [۹].

جدول (۱) مقایسه‌ی ویژگی‌های عملکردی روش‌های مختلف تشخیص لاکتوفیرین  
 Table 1. Comparison of characteristics of different lactoferrin detection methods.

منبع Reference	مشکل فنی روش Technical problem of the method	بازه‌ی غلظتی مورد ارزیابی Linear range ( $\mu\text{g/ml}$ )	حد تشخیص در اندازه‌گیری Detection limit ( $\mu\text{g/ml}$ )	تکنیک Technique
[14]	تخریب پذیری جزء بیولوژیکی، هزینه‌ی بالا، زمان ماندگاری کوتاه Biological component degradability, high cost, short shelf life	5.60 – 800	2.8	حسگر ایمنی‌سنجی Immunosensor
[15]	تخریب پذیری جزء بیولوژیکی، هزینه‌ی بالا، زمان ماندگاری کوتاه Biological component degradability, high cost, short shelf life	3.12 – 200	1.0	الایزا ELISA
[16]	تخریب پذیری جزء بیولوژیکی، هزینه‌ی بالا، زمان ماندگاری کوتاه Biological component degradability, high cost, short shelf life	0.004 – 1.0	0.002	حسگر نوری Optical sensor
[17]	هزینه‌ی بالا، زمان بر بودن، مراحل پیچیده و وقت گیر آماده سازی، نیاز به اپراتور آموزش دیده، تجهیزات سنگین و پیچیده، عدم قابلیت کاربرد در محل High cost, time consuming, complicated and time consuming preparation steps, need for trained operator, heavy and complex equipment, inability to use on site	0.20 – 30	0.2	کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با فشار بالا RHPLC
[18]	نیاز به اپراتور آموزش دیده، عدم قابلیت کاربرد در محل need for trained operator, inability to use on site	10.0 – 100	1.0	طیف سنجی Chromatography
[19]	هزینه‌ی بالا، زمان بر بودن، مراحل پیچیده و وقت گیر آماده سازی، نیاز به اپراتور آموزش دیده، تجهیزات سنگین و پیچیده، عدم قابلیت کاربرد در محل High cost, time consuming, complicated and time consuming preparation steps, need for trained operator, heavy and complex equipment, inability to use on site	20.0 – 200	12.0	کروماتوگرافی تمایلی Affinity-base chromatography



شکل (۱) اندازه‌گیری لاکتوفیرین با استفاده از تثبیت همزمان لاکتوفیرین و متیلن‌بلو در سطح الکترود اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و نفیون در سطح الکترود کربن شیشه‌ای

**Fig 1.** Determination of lactoferrin using co-immobilization of lactoferrin and methylene blue on the surface of multi-walled carbon nanotubes-nafion modified glassy carbon electrode.

لیگاند مؤثر جهت جذب لاکتوفیرین به سطح کاپتوپریل استفاده گردید. در حسگر جدید معرفی شده تثبیت کاپتوپریل بر سطح الکترود طلا با استفاده از گروه تیولی موجود در ساختار انجام و از خاصیت پیوندی ویژه این ترکیب با یون آهن موجود در ساختار لاکتوفیرین، به عنوان جزء شناساگر در اندازه‌گیری لاکتوفیرین بهره گرفته شد. در این پژوهش سعی گردید از خاصیت افزایش مقاومت انتقال بار در سطح الکترود طلای اصلاح شده با تک لایه‌ی نانو ساختار کاپتوپریل در اثر برهم‌کنش سطحی لاکتوفیرین، جهت مانیتورینگ غلظت لاکتوفیرین استفاده گردد. اساس عملکرد حسگر تهیه شده به منظور سنجش غلظت ماکرومولکول لاکتوفیرین ردیابی رفتار جذبی مذکور با استفاده از ردیاب  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  و با بهره‌گیری از تکنیک قدرتمند طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی است. این تکنیک به طور گسترده‌ای در اندازه‌گیری الکتروشیمیایی پروتئین‌ها و دیگر مواد بیولوژیکی بکار گرفته شده است [۲۲-۲۵]. مقدار مقاومت انتقال بار در سطح تک‌لایه‌ی نانو ساختار کاپتوپریل در غلظت‌های مختلف لاکتوفیرین اندازه‌گیری و محاسبه شد؛ هم چنین خطی بودن پاسخ‌ها در غلظت‌های مختلف، حساسیت و حد تشخیص تعیین گردید. روش ولتامتری چرخه‌ای نیز به منظور مطالعه‌ی رفتار و بررسی اثر برهم‌کنش ماکرومولکول پروتئینی لاکتوفیرین با سطح بکار گرفته شد.

هم‌چنین کامپانلا و همکاران [۲۱] حسگری بر مبنای کاربرد آنتی‌بادی و آنزیم برای تعیین لاکتوفیرین در شیر انسان و چندین محصول لبنی دارویی که برای رژیم غذایی نوزادان استفاده می‌شود، معرفی نمودند. در این تحقیق بررسی دقیقی در مورد توسعه حسگر ایمنی سنجی لاکتوفیرین انجام شده است. علاوه بر این، دو روش رقابتی مختلف برای تعیین لاکتوفیرین مورد استفاده قرار گرفته است که در آن یا آنتی ژن (لاکتوفیرین) یا آنتی بادی به ترتیب با آنزیم هورس رادیش پراکسیداز با استفاده از یک فرایند بیوتینیل‌سیون کانژوگه شدند. سه نوع اندازه‌گیری، هر کدام با استفاده از یکی از مبدل‌های: (۱) حسگر آمپرومتریکی هیدروژن پراکساید، (۲) حسگر کلارک و (۳) حسگر یدید انجام شدند. پس از بهینه سازی روش اندازه‌گیری و نوع مبدل مورد استفاده، از حسگر ایمنی سنجی تهیه شده برای تعیین مقدار لاکتوفیرین در شیر انسان و در انواعی از شیر خشک یا سایر محصولات لبنی استفاده شده است.

در پژوهش حاضر عمدتاً بر ایجاد تک لایه‌های نانو ساختار مولکولی جهت استفاده در دستگاه‌های سنجش الکترو شیمیایی به منظور کاربرد در محصولات غذایی تمرکز گردید. برای این منظور، از اصلاح سطح الکترودهای طلا مبتنی بر مواد نانو ساختار مناسب استفاده شد. از تک‌لایه‌ی نانو ساختار کاپتوپریل برای ساخت حسگر الکتروشیمیایی لاکتوفیرین به روشی ساده، سریع و مقرون به صرفه، با بهره‌گیری از خاصیت پیوندی ویژه کاپتوپریل با یون آهن به عنوان یک

## ۲. مواد و روش‌ها

## ۱.۲. مواد و وسایل مورد نیاز

کلیه مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده در این کار درجه‌ی تجزیه‌ای بوده و بدون هیچ گونه پیش آماده‌سازی مورد استفاده قرار گرفته است. لاکتوفرین (L4040) از سیگما-آلدریچ خریداری شد. کاپتوپریل، پتاسیم هگزا سیانو فرات (II)<sup>۱</sup>، پتاسیم هگزا سیانو فرات (III)<sup>۲</sup>، سولفوریک اسید و پتاسیم کلراید از مرک (آلمان) خریداری شد. از آب مقطر دیونیزه شده برای تهیه‌ی محلول‌ها استفاده گردید و از محلول پتاسیم کلرید به عنوان الکترولیت پشتیبان استفاده شد.

اندازه‌گیری‌های ولتامتری چرخه‌ای و امپدانس با استفاده از آنالایزر الکتروشیمیایی اتولب<sup>۳</sup> (اکوشیمی<sup>۴</sup>، هلند) و با نرم‌افزار نوا انجام گردید. به منظور اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی از سیستم سه الکترودی رایج متشکل از یک الکترود نقره / نقره کلرید (۳ M پتاسیم کلراید) به عنوان الکترود مرجع، الکترود میله‌ی پلاتین به عنوان الکترود شمارنده و الکترود اصلاح شده‌ی طلا (قطر ۱/۸ mm) به عنوان الکترود کار، استفاده شد.

## ۲.۲. روش اندازه‌گیری الکتروشیمیایی

از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی روند اصلاح سطح الکترود و بررسی کاربرد حسگر در تعیین غلظت آنالیت استفاده شد. اندازه‌گیری ولتامتری چرخه‌ای با اسکن پتانسیل در بازه‌ی V (۰/۶-۰/۲) در مقابل الکترود مرجع نقره / نقره کلرید با سرعت روبش ۱۰۰ mV/s انجام شد. ثبت طیف امپدانس در پتانسیل مدار باز و در محدوده‌ی فرکانس ۱ Hz-۱۰۰ kHz و با دامنه ولتاژ متناوب ۱۰ mV انجام گرفت. منحنی‌های ولتامتری چرخه‌ای از رسم تغییرات جریان در برابر ولتاژ و منحنی‌های امپدانس با رسم منحنی نایکوئیست ("Z'- بر حسب Z'') مورد بررسی قرار گرفت.

## ۳.۲. تهیه‌ی تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل به منظور

## تهیه‌ی حسگر سنجش لاکتوفرین

تمام الکترودهای کار دیسک‌های طلای پلی کریستالی با قطر ۱/۸ mm، با استفاده از خمیر آلومینا (۰/۰۵ μm) تا رسیدن به سطح آینه‌ای پولیش داده شدند و پس از شستشو با آب دو بار تقطیر، به ترتیب در محلول‌های آب/کلروفرم/آب سونیکه شدند. سپس در محلول ۰/۵ M سولفوریک اسید تحت پولیش الکتروشیمیایی به روش ولتامتری چرخه‌ای در بازه‌ی V (۱/۵-۰/۲) در مقابل الکترود نقره/نقره کلرید با سرعت روبش ۱۰۰ mV/s قرار گرفتند تا جایی که رفتار برگشت‌پذیر مشاهده شد. تشکیل تک‌لایه‌ی نانوساختار بر روی سطوح الکترود تازه تهیه شده با انکوباسیون یک شبه در دمای اتاق در محلول ۱۰ mM کاپتوپریل در آب: اتانول (۱: ۴) انجام شد. الکترود طلا/کاپتوپریل تهیه شده، پس از شستشوی کامل با آب و اتانول در آزمایش‌های بعدی استفاده گردید.

## ۴.۲. روش اندازه‌گیری لاکتوفرین در نمونه‌ی

## شیر خشک با استفاده از حسگر تهیه شده

به منظور تهیه‌ی نمونه‌ی شیر خشک، محلول ۲۵ μg/ml از نمونه‌ی شیر خشک در آب مقطر تهیه گردید و مقدار nM ۱۲۵ از محلول لاکتوفرین به آن افزوده شد. روش اندازه‌گیری با استفاده از حسگر الکتروشیمیایی تهیه شده به این صورت است که محلولی از فرو/فری سیانید با غلظت ۳ mM و پتاسیم کلراید ۰/۱ M تهیه می‌شود و حجم مشخصی از نمونه‌ی شیر خشک به محلول افزوده می‌گردد. سپس حسگر تهیه شده (الکترود کار) و نیز الکترودهای مرجع و شمارنده درون محلول قرار گرفته و ثبت طیف امپدانس در بازه‌ی فرکانسی ۱۰۰ kHz تا ۱ Hz در ولتاژ ثابت مدار باز و با دامنه‌ی جریان متناوب ۵ mA انجام می‌گیرد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار نمایش و رسم امپدانس<sup>۵</sup> برازش شده و مدار معادل و مقادیر پارامترهای مربوط به هر یک از عناصر موجود در مدار تعیین می‌شوند. در نهایت با استفاده از مقدار به دست آمده برای R<sub>ct</sub> در روش ایمپدیمتری و با توجه

1. K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
2. K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
3. Autolab  
4. Eco-Chemie

5. Z-view/Z-plot



به نمودار سنجش (کالیبراسیون)، غلظت لاکتوفرین در نمونه تعیین می‌گردد.

### ۳. نتایج و بحث

#### ۱.۳. مکانیسم حاکم بر سنجش پروتئین لاکتوفرین با حسگر نانوساختار تهیه شده

مهم‌ترین چالش در اندازه‌گیری لاکتوفرین با استفاده از روش الکتروشیمیایی این است که برخلاف سایر پروتئین‌های حاوی گروه هم، این درشت پروتئین به دلیل ساختار پیچیده و قرار گرفتن یون آهن در بخش‌های درونی‌تر ساختار آمینواسیدی، اجازه فعالیت الکتروشیمیایی به یون آهن نمی‌دهد و لذا امکان اندازه‌گیری لاکتوفرین از طریق ردیابی ردوکس یون آهن درونی آن تقریباً ناممکن می‌باشد. با این وجود، اثر متقابل آنالیت‌های پروتئینی نظیر لاکتوفرین با لایه‌ی سنجش حسگر شیمیایی، می‌تواند منجر به تغییر پارامترهای فیزیکی از جمله جریان، مقاومت انتقال بار الکتریکی، جرم، متغیرهای صوتی یا ظرفیت خازنی شود که همگی با غلظت آنالیت ارتباط دارند [۲۶]. حسگرهای الکتروشیمیایی ایمپدیمتری که بر پایه‌ی مطالعه‌ی تغییرات مقاومت لایه‌ی سنجش توسعه یافته‌اند، ویژگی‌هایی چون هزینه پایین، حساسیت بالا و قابلیت حمل را در کنار مزایایی مانند قابلیت کوچک‌سازی و سادگی ساختار ارائه می‌دهند [۲۷] که ویژگی‌های مطلوب در کاربرد این گروه از حسگرها در اندازه‌گیری‌های اجزای بیولوژیکی مورد نظر در صنایع غذایی را فراهم می‌آورد [۲۸]. از طرفی، تک لایه‌های نانوساختار کاپتوپریل متشکل از یک لایه‌ی منظم از مولکول‌های آلی با دو گروه عاملی هستند که جذب مولکول‌های غیر اختصاصی به سطح حسگر را مسدود کرده و از این طریق باعث افزایش نسبت سیگنال به نویز می‌شوند [۲۹]. در زمینه‌ی تک‌لایه‌های نانوساختار خود سامان، تک لایه‌های با پایانه‌های کربوکسیلیک اسید به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۳۰-۳۲]. ساختار تک لایه‌های کاپتوپریل دارای پیوندهای عرضی و ساختار دو بعدی مناسب و نیز گروه‌های کربوکسیلیک اسید با تراکم سطحی بالاست که می‌تواند حساسیت حسگر را بهبود بخشد. کاپتوپریل یک

مشق L-پرولین است که در آن L-پرولین با یک گروه (۲S)-۲-متیل-۳-سولفانیل پروپانویل بر روی نیتروژن جایگزین شده است [۳۳]. به دلیل حضور گروه‌های کربوکسیلیک اسید و نیتروژن، کاپتوپریل به عنوان یک لیگاند قوی برای پیوند با یون‌های فلزی از جمله مس و آهن مورد مطالعه قرار گرفته و خواص منحصر به فردی را در پیوند با این فلزات نشان داده است [۳۴-۳۵]. از سویی، لاکتوفرین در ساختار خود دارای یون آهن سه ظرفیتی است که توسط سایت‌های پیوندی آمینواسیدهای آرژنین، آسپارژین، هیستیدین، تیروزین و یک یا دو گروه کربنات احاطه شده است [۳۶]؛ بنابراین در این پژوهش از قابلیت کاپتوپریل در اتصال با مراکز فعال یونی آهن موجود در ساختار لاکتوفرین برای جذب اختصاصی این پروتئین به سطح و اندازه‌گیری تغییرات مقاومت ایجاد شده در سطح بر اثر جذب این پروتئین، به منظور اندازه‌گیری غلظت لاکتوفرین در ماتریس نمونه‌ی شیر خشک استفاده گردید.

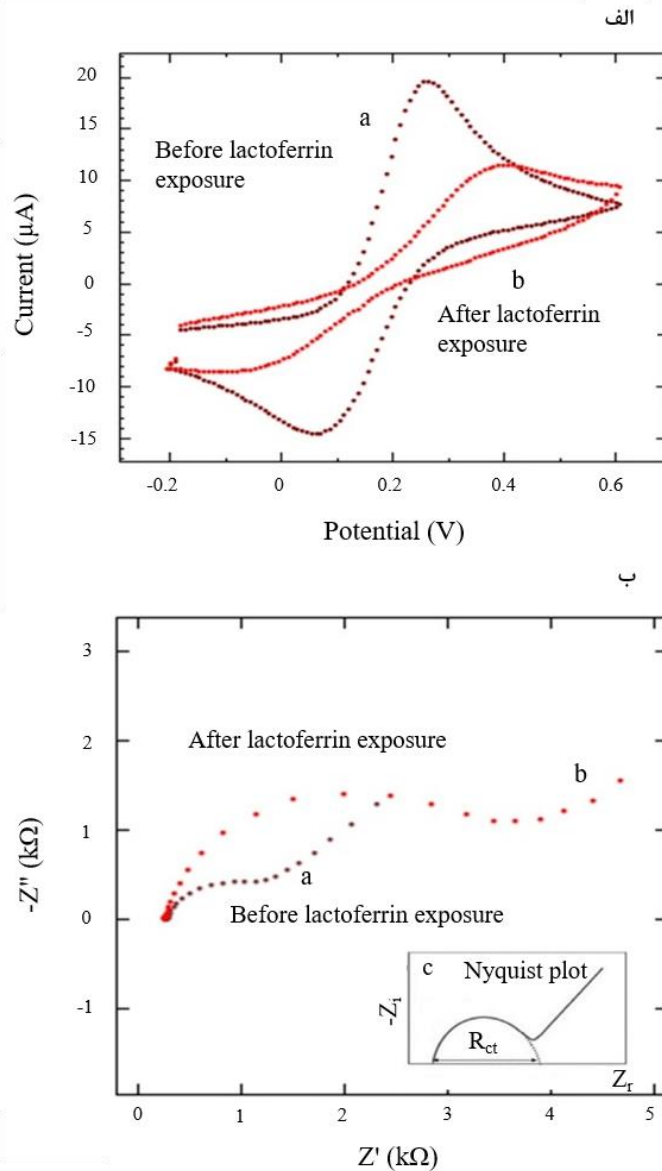
در ابتدا از آنجا که صافی و تمیزی سطح در شکل‌گیری تک لایه بسیار مؤثر است، به منظور به دست آوردن یک لایه همگن و مناسب، سطح الکتروود با دقت با روش‌های فیزیکی و شیمیایی که در بخش تجربی توضیح داده شد تمیز گردید. سپس سطح صیقلی الکتروود در محلول کاپتوپریل در دمای محیط و در یک مکان تاریک به مدت یک شب قرار داده شد. این مرحله منجر به تشکیل تک لایه‌ای منظم از کاپتوپریل از طریق تشکیل پیوند کووالانسی بین گروه‌های گوگردی اتم‌های کاپتوپریل و الکتروود طلا می‌شود. تک‌لایه‌ی نانوساختار تهیه شده می‌تواند یک رابط کاملاً مناسب و با تمایل بالا برای ایجاد کمپلکس با درشت مولکول‌های پروتئینی لاکتوفرین را فراهم کند. با افزودن غلظت‌های مختلف لاکتوفرین و دنبال کردن سیگنال‌های ولتامتری و ایمپدیمتری زوج ردوکس الکتروشیمیایی فرو/فری سیانید به عنوان ردیاب، یک حسگر الکتروشیمیایی تمایلی برای اندازه‌گیری لاکتوفرین با موفقیت ارائه شد.

#### ۲.۳. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی

دو روش ولتامتری چرخه‌ای و طیف سنجی ایمپدانس

لاکتوفیرین و  $1/5 \mu\text{M}$  لاکتوفیرین قرار می‌گیرد (شکل ۲-الف-ولتاموگرام a و b)، کاهش چشمگیر جریان پیک و افزایش تفکیک پتانسیل پیک مشاهده می‌شود که متناسب با غلظت لاکتوفیرین است. این امر نشانگر جذب لاکتوفیرین در سطح الکتروود اصلاح شده با کاپتوپریل به عنوان یک لایه مسدود کننده انتقال جرم و نفوذ فرو/فری سیانید به سطح الکتروود است.

الکتروشیمیایی به منظور ارزیابی رفتار لاکتوفیرین بر سطح حسگر تهیه شده مورد استفاده قرار گرفت. در روش ولتامتری (شکل ۲-الف) کاهش جریان پیک و افزایش فاصله‌ی جدایش پیک‌های آنودی و کاتدی پس از قرارگیری الکتروود در محلول لاکتوفیرین اتفاق می‌افتد که نشانگر اتصال موفقیت‌آمیز لاکتوفیرین به سطح اصلاح شده با کاپتوپریل است. وقتی الکتروود اصلاح شده به ترتیب در محلول بدون



شکل (۲) نمودارهای ولتامتری چرخه‌ای (الف) و نایکوئیست (ب) حسگر نانوساختار طلا / کاپتوپریل پس از قرارگیری در محلول a: بدون لاکتوفیرین و b:  $1/5 \mu\text{M}$  لاکتوفیرین، در حضور فرو/فری سیانید  $3 \text{ mM}$  و پتاسیم کلراید  $0.1 \text{ M}$

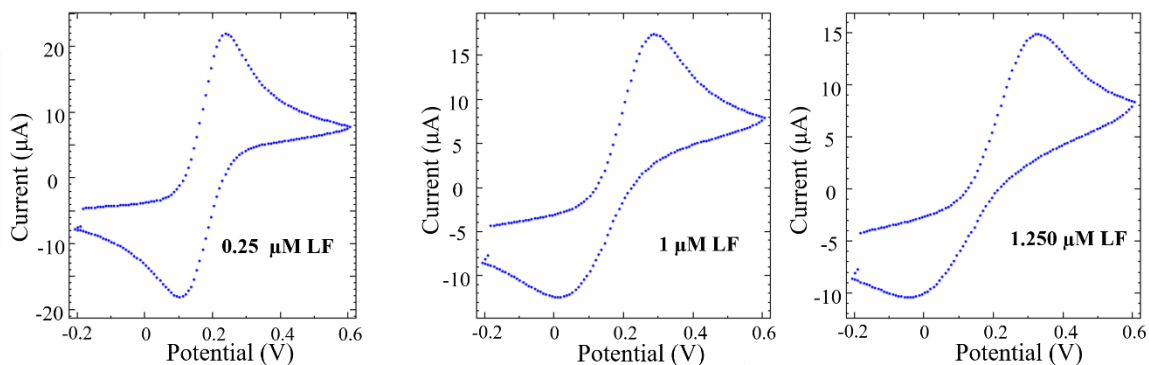
**Fig 2.** Cyclic voltammetry (a) and Nyquist diagrams (b) Au / Capt nanostructured sensor after exposure to solution a: without Lactoferrin and b:  $1.5 \mu\text{M}$  Lactoferrin, in the presence of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $3 \text{ mM}$  and  $\text{KCl}$   $0.1 \text{ M}$ .

حسگر با تهیه مستقل پنج الکتروود طلا / کاپتوپریل و اندازه‌گیری ماکزیمم جریان ولتامتری پالس دیفرانسیلی پس از قرار گرفتن در معرض غلظت ۷۵۰ nM از لاکتوفیرین انجام شد. نتایج تقریباً یکسانی برای همه الکتروودها یافت شد و مقدار انحراف استاندارد حدود ۴/۵٪ به دست آمد که نشانگر تکرارپذیری خوب حسگر تهیه شده است.

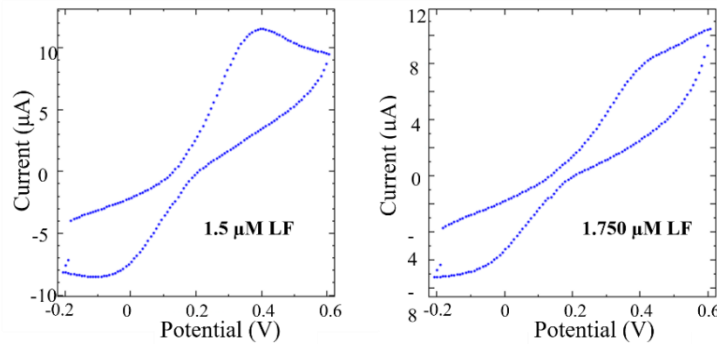
### ۳.۳. مطالعه‌ی ولتامتری رفتار لاکتوفیرین بر سطح تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل

شکل (۳) بررسی اثر تغییرات غلظت لاکتوفیرین بر رفتار زوج ردوکس فرو/فری سیانید را بر سطح الکتروود اصلاح شده توسط تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل در محلولی از زوج ردوکس فرو/فری سیانید ۳ mM و پتاسیم کلراید ۰/۱ M با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای نشان می‌دهد. همچنان که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت لاکتوفیرین از ۱/۷۵۰  $\mu\text{M}$  تا ۰/۲۵۰  $\mu\text{M}$ ، ارتفاع پیک آندی و کاتدی به تدریج کاهش یافته و در نهایت این پیک‌ها ناپدید می‌شوند. هم چنین فاصله‌ی پیک‌های آندی و کاتدی با افزایش غلظت لاکتوفیرین افزایش یافته است. روند تدریجی و منظم کاهش ارتفاع پیک‌ها و نیز افزایش فاصله‌ی آن‌ها نشانگر جذب مؤثر ماکرومولکول پروتئینی لاکتوفیرین بر سطح تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل می‌باشد. با جذب تدریجی پروتئین میزان دسترسی زوج ردوکس به سطح الکتروود به منظور تبادل الکترون به تدریج محدود می‌شود و زمانی که تشکیل یک تک لایه از پروتئین بر سطح کامل می‌شود انتقال الکترون بسیار کند می‌شود به گونه‌ای که در سرعت روبش ۰/۱ V/s پیک‌ها دیگر قابل مشاهده نیستند.

روند تشکیل کمپلکس لاکتوفیرین با ثبت طیف‌های امپدانس نیز مورد بررسی قرار گرفت. نمودارهای نایکوئیست شکل متداول مورد استفاده در طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی به منظور تفسیر رفتار گونه بر سطح می‌باشند. نمودار نوعی نایکوئیست (شکل ۲-۲) از دو بخش تشکیل شده است که شامل یک بخش نیم دایره مانند و یک خط با زاویه‌ی تقریبی ۴۵ درجه است. در این نمودار قطر بخش نیم دایره‌ای نشانگر مقاومت انتقال بار در سطح حسگر است. بدین معنا که قطر بزرگتر نماینده‌ی مقاومت بیشتر در انتقال بار است. مقاومت انتقال بار در طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی با  $R_{ct}$  نشان داده می‌شود. هنگامی که حسگر مبتنی بر تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل در معرض محلول‌های بدون لاکتوفیرین و ۱/۵  $\mu\text{M}$  لاکتوفیرین قرار گرفت، افزایش قابل توجهی در  $R_{ct}$  مشاهده شد (به ترتیب ۱/۹ k $\Omega$  و ۴/۲ k $\Omega$ ) که حاکی از تشکیل کمپلکس بین کاپتوپریل و هسته‌های آهن در ساختار لاکتوفیرین است. (شکل ۲-۲، a و b). این نتایج نشان می‌دهد که اتصال پروتئین می‌تواند انتقال الکترون سطحی را تحت تأثیر قرار دهد؛ بنابراین، متناسب با غلظت لاکتوفیرین جذب شده در سطح الکتروود اصلاح شده، سینتیک انتقال الکترون کاهش می‌یابد و  $R_{ct}$  افزایش می‌یابد. لذا الکتروود اصلاح شده مبتنی بر مکانیسم تمایلی هسته‌های آهن لاکتوفیرین و کاپتوپریل را می‌توان به عنوان یک حسگر ایمپدیمتریک کارآمد برای تشخیص لاکتوفیرین استفاده کرد. داده‌های مقاومت به دست آمده در اینجا با نتایج قبلی به دست آمده توسط ولتامتری چرخه‌ای مطابقت دارند و هر دو نشان می‌دهند که رابط سنسج با موفقیت ساخته شده است. تکرارپذیری ساخت







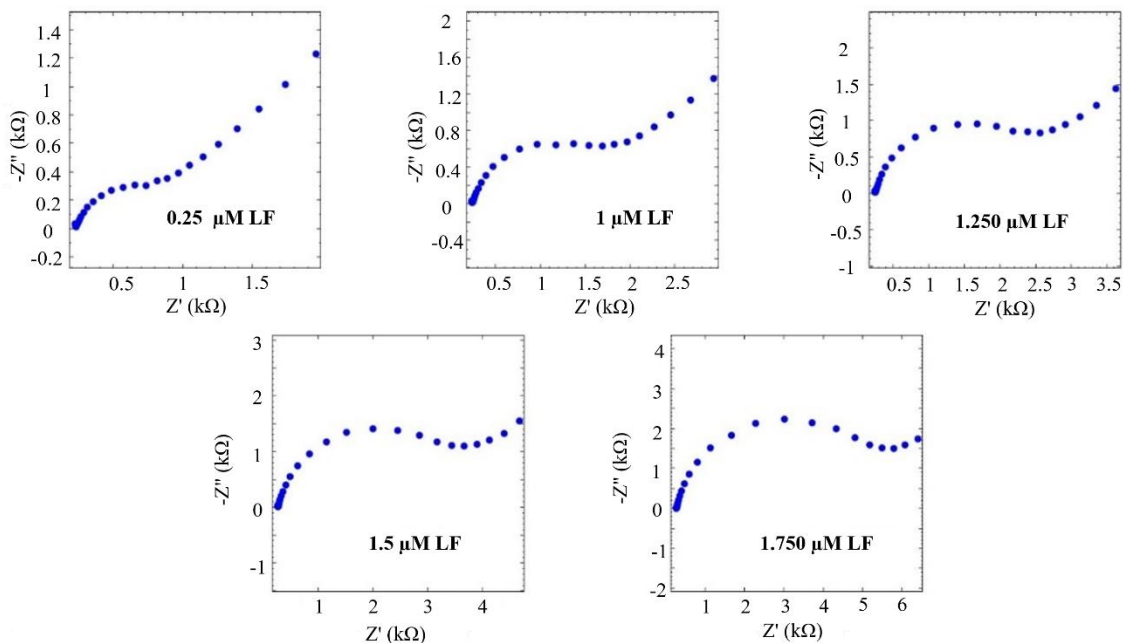
شکل (۳) بررسی اثر افزایش غلظت لاکتوفیرین با استفاده از منحنی‌های ولتامتری چرخه‌ای در حضور زوج ردوکس فروافری سیانید ۳ mM و پتاسیم کلراید ۰/۱ M، محدوده‌ی روبش پتانسیل  $V (-0/۶ - 0/۲)$ ، سرعت روبش  $0/۱ V/s$ ، نمودار a منحنی سنجش مربوطه را نشان می‌دهد.

**Fig 3.** Investigating of increasing lactoferrin concentration using cyclic voltammery curves in the presence of 3 mM  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  and 0.1 M KCl, potential scan range (-0.2-0.6) volts, scan rate 0.1 V/s, The inset shows a diagram of the corresponding measurement curve.

تهیه شده برای اندازه‌گیری کمی لاکتوفیرین استفاده شد و عملکرد حسگر الکتروشیمیایی لاکتوفیرین برای تشخیص غلظت‌های مختلف آنالیت مورد بررسی قرار گرفت. شکل (۴) نمودارهای نایکوئیست ثبت شده برای حسگر را در حضور غلظت‌های مختلف لاکتوفیرین ( $0/۱۲۵ \mu M$  تا  $۳/۲۵۰ \mu M$ ) نشان می‌دهد.

### ۴.۳. اندازه‌گیری لاکتوفیرین با استفاده از روش ایمپدیمتری

با توجه به قابلیت‌های تکنیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) برای بررسی خصوصیات در سطح مشترک الکتروود/ محلول، از اندازه‌گیری EIS به عنوان یک سیستم تشخیص کارآمد به منظور ارزیابی دقیق‌تر حسگر

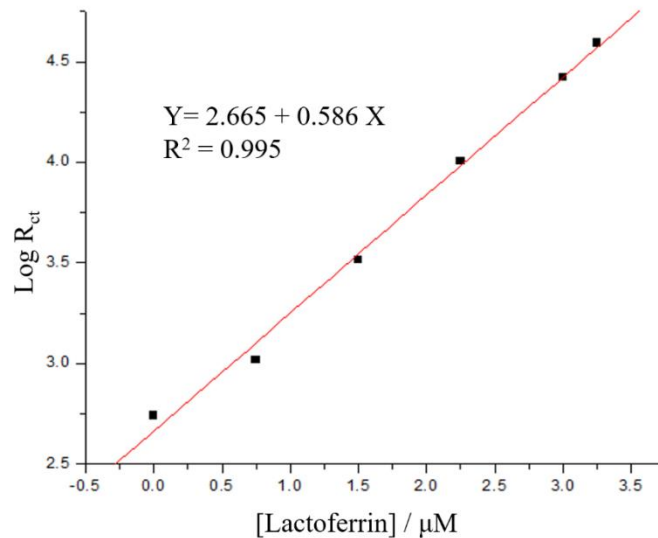


شکل (۴) بررسی اثر افزایش غلظت لاکتوفیرین با استفاده از منحنی‌های نایکوئیست در محدوده‌ی غلظت  $0/۱۲۵ \mu M$  تا  $۳/۲۵۰ \mu M$  در حضور زوج ردوکس فروافری سیانید ۳ mM و پتاسیم کلراید ۰/۱ M، محدوده‌ی فرکانس اعمالی  $۱۰۰ kHz$  تا  $۱ Hz$  در پتانسیل ثابت مدار باز و دامنه‌ی جریان متناوب  $۱۰ mV$ .

**Fig 4.** Investigation of the effect of increasing lactoferrin concentration using Nyquist plots in the range of 125 nM to 3.250  $\mu M$  in the presence of 3mM  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  redox pair and 0.1 M KCl, frequency range 100 kHz to 1 Hz at a constant open circuit potential and an alternating current amplitude of 10 mV.

همچنان که مشاهده می‌شود با استفاده از روش ایمپدیمتری، در مقایسه با روش ولتامتری چرخه‌ای مقدار محدودی خطی و حساسیت اندازه‌گیری حسگر بهبود پیدا کرده و اندازه‌گیری لاکتوفیرین در محدوده‌ی خطی گسترده‌تر از  $\mu\text{M}$   $0.125$  تا  $3.250$  را امکان‌پذیر می‌سازد.

همان‌طور که نشان داده شده است برهم‌کنش بین تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل و لاکتوفیرین بر سطح الکتروود به گونه‌ای است که افزایش غلظت لاکتوفیرین مانع از انتقال الکترون زوج ردوکس در سطح حسگر و در نتیجه افزایش مقاومت انتقال بار ( $R_{ct}$ ) می‌شود. شکل (۵) وابستگی خطی مقادیر  $\text{Log } R_{ct}$  به غلظت لاکتوفیرین را نشان می‌دهد.



شکل (۵) وابستگی خطی مقادیر  $\text{Log } R_{ct}$  به غلظت لاکتوفیرین در محدوده‌ی  $0.125$  تا  $3.250$   $\mu\text{M}$ .  
**Fig 5.** Linear dependence of  $\text{Log } R_{ct}$  values on lactoferrin concentration in the range of (0.125 to 3.250)  $\mu\text{m}$ .

نفوذ پروب به سمت سطح الکتروود می‌شود، بنابراین پاسخ حسگر پیشنهادی به غلظت لاکتوفیرین قابل ردیابی است.

### ۵.۳. اندازه‌گیری لاکتوفیرین در ماتریس شیر خشک نوزادان با استفاده از حسگر تهیه شده

لاکتوفیرین جدا شده از شیر گاو در بسیاری از کشورها مانند آمریکا و چین به فرمولاسیون شیر خشک نوزادان اضافه می‌شود. مطالعات انجام شده نشان داده است که وجود لاکتوفیرین در شیر خشک می‌تواند تأثیر بسزایی در رشد و بالا بردن ایمنی نوزادان داشته باشد. کیفیت فرمولاسیون شیر خشک نوزادان را می‌توان از طریق تعیین مقدار لاکتوفیرین با استفاده از حسگر معرفی شده به روش ایمپدیمتری تعیین نمود. بدین منظور محلول  $25 \mu\text{g/ml}$  از نمونه‌ی شیر خشک تهیه گردید و مقدار مشخصی از محلول

مطابق شکل، رابطه خطی بین مقادیر  $\text{Log } R_{ct}$  و غلظت لاکتوفیرین در محدوده‌ی غلظت  $0.125$  تا  $3.250$  مشاهده می‌شود. معادله رگرسیون  $Y = 2.665 + 0.586 X$  و ضریب همبستگی  $R^2 = 0.995$  است. همچنان که مشاهده می‌شود با جذب تدریجی پروتئین لاکتوفیرین در سطح تک‌لایه‌ی کاپتوپریل مقدار مقاومت انتقال بار افزایش یافته است. دلیل این افزایش، ممانعت از انتقال الکترون ردیاب در سطح بر اثر مسدود شدن سطح با جذب درشت مولکول پروتئینی لاکتوفیرین است. حد تشخیص سیستم  $50 \text{ nM}$  (براساس  $S/N = 3$ ) محاسبه شد. ظرفیت جذب بالای لاکتوفیرین در تک‌لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل تثبیت شده بر روی الکتروود طلا به وابستگی خاص بین کاپتوپریل و مولکول‌های پروتئین لاکتوفیرین نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، لاکتوفیرین یک ترکیب پروتئینی بزرگ است که به عنوان لایه مسدود کننده انتقال جرم عمل می‌کند و مانع از

لاکتوفیرین به آن افزوده شد. مقدار لاکتوفیرین در ماتریس شیر خشک با استفاده از منحنی استاندارد در شکل (۶) محاسبه شد. به منظور برآورد دقت آزمایش، هر آزمایش ۵ بار تکرار شد. برای آزمایش صحت این روش، مقادیر بازیابی

با استفاده از روش افزایش استاندارد [۳۷-۳۸] و با افزایش‌های ۱۰۰ µl از محلول ۱ mg/ml لاکتوفیرین مورد آزمایش قرار گرفت. داده‌ها در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول (۲) نتایج آزمایش بازیابی در اندازه‌گیری غلظت لاکتوفیرین در نمونه‌ی شیر خشک (هر اندازه‌گیری ۵ بار تکرار شده است)

Table 2. Results of the Lactofarin recovery tests in milk powder (Each measurement was repeated 5 times)

انحراف معیار (%) RSD (%)	بازیابی (%) Recovery (%)	مقدار اندازه‌گیری شده توسط حسگر (nM) Sensor read (nM)	لاکتوفیرین افزوده شده (nM) Lactoferrin Addition (nM)
4.5	92.00	125.5	125.0
4.7	95.70	250.6	250.0
5.3	103.0	375.3	375.0
2.2	109.0	501.0	500.0

عملکرد بالا و الیزا<sup>۱</sup> که به طور معمول برای اندازه‌گیری این ترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند در کنار مزایای ارزشمند خود مانند دارا بودن دقت و حساسیت خوب اندازه‌گیری، دارای معایبی چون زمان طولانی و هزینه بالای آنالیز، کاربرد اجزای بیولوژیکی و نیز نیازمند تجهیزات پیچیده و سنگین هستند که کاربرد این روش‌ها را در اندازه‌گیری لاکتوفیرین محدود و دشوار می‌سازد. در این میان حسگرهای الکتروشیمیایی، راهبردی مقرون به صرفه با کاربری آسان و آنالیز سریع را در اندازه‌گیری ترکیبات پروتئینی نظیر لاکتوفیرین ارائه می‌دهند و از این رو بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در پژوهش حاضر روشی ساده و مقرون به صرفه به منظور ساخت حسگر لاکتوفیرین با استفاده از تکنیک قدرتمند ایمپدیمتری ارائه شده است که علاوه بر سهولت در تهیه و ساخت، معایب ناشی از تثبیت جزء بیولوژیک که در سایر حسگرهای لاکتوفیرین وجود دارد را نداشته و به راحتی قابل کاربرد و نگهداری طولانی مدت است. تشخیص و

میزان بازیابی از ۹۲٪ تا ۱۰۹٪ با RSD های ۵/۳ - ۲/۲٪ محاسبه شد. این نتایج بیانگر صحت و دقت خوب حسگر تهیه شده است و نشان می‌دهد که حسگر تهیه شده بر پایه‌ی تک لایه‌ی نانوساختار کاپتوپریل برای تشخیص لاکتوفیرین به روش ایمپدیمتری در ماتریس شیر خشک کارآمد بوده و به غلظت لاکتوفیرین بسیار حساس است.

#### ۴. نتیجه‌گیری

در بسیاری از کشورها لاکتوفیرین به عنوان یک افزودنی مفید در فرمولاسیون شیر خشک نوزادان وارد شده است و تحقیقات انجام شده اثرات مفید وجود این ماده در فرمولاسیون را بر رشد و افزایش ایمنی نوزادان در برابر بیماری‌های عفونی نشان داده است. اندازه‌گیری لاکتوفیرین در صنایع غذایی و دارویی نیز مورد توجه قرار گرفته است. از این رو معرفی یک روش ساده و مؤثر در اندازه‌گیری لاکتوفیرین به نیاز فزاینده‌ای در صنایع غذایی و دارویی تبدیل شده است. روش‌هایی مانند کروماتوگرافی مایع با

1. ELISA: Enzyme-linked immunosorbent Assay



برای اندازه‌گیری لاکتوفیرین در ماتریس شیر خشک نوزادان مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر بازیابی از ۹۲٪ تا ۱۰۹٪ با RSD های ۵/۳ - ۲/۲ محاسبه شد که حساسیت حسگر به غلظت لاکتوفیرین و کارآمدی آن در این اندازه‌گیری را نشان می‌دهد. روش معرفی شده می‌تواند برای تشخیص و اندازه‌گیری میزان لاکتوفیرین در سایر محصولات غذایی و دارویی مشابه نیز مورد استفاده قرار گیرد.

اندازه‌گیری لاکتوفیرین در حسگر معرفی شده بر مبنای خواص ویژه‌ی تک‌لایه‌ی نانو ساختار کاپتوپریل در ایجاد پیوند غیرکوالانسی با یون آهن مرکزی موجود در ساختار ماکرومولکول پروتئینی لاکتوفیرین استوار است. حد تشخیص حسگر معرفی شده در اندازه‌گیری لاکتوفیرین ۵۰ nM و دامنه‌ی خطی آن ۰/۱۲۵ μM تا ۳/۲۵۰ μM است که برای کاربرد در صنایع غذایی مناسب است. این حسگر با موفقیت

## منابع

- [1] Iglesias-Figueroa, B. F., Espinoza-Sánchez, E. A., Siqueiros-Cendón, T. S., & Rascón-Cruz, Q. (2019). Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International Dairy Journal*, 89, 37-41.
- [2] Tian, H., Maddox, I. S., Ferguson, L. R., & Shu, Q. (2010). Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. *Biometals*, 23(3), 593-596.
- [3] Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(4), 580-596.
- [4] Jiang, R., Suzuki, Y. A., Du, X., & Lönnardal, B. (2017). Lactoferrin and the lactoferrin-sophorolipids-assembly can be internalized by dermal fibroblasts and regulate gene expression. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 110-118.
- [5] Kim, W. S., Ohashi, M., Tanaka, T., Kumura, H., Kim, G. Y., Kwon, I. K., ... & Shimazaki, K. I. (2004). Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals*, 17(3), 279-283.
- [6] Bo, L. Y., Li, T. J., & Zhao, X. H. (2019). Effect of Cu/Mn-fortification on in vitro activities of the peptic hydrolysate of bovine lactoferrin against human gastric cancer BGC-823 cells. *Molecules*, 24(7), 1195.
- [7] Lactoferrin Market Size, Share & Trends Analysis Report By Function (Iron Absorption, Anti-inflammatory, Intestinal Flora Protection, Antibacterial), By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2020-2027. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactoferrin-market>. Accessed 2020-07-02.
- [8] Stella Cosio, M. & Iametti, S. (2015). *Electrochemical sensors for assessment of food quality and safety*, PhD programme in Food Science; Technology and Biotechnology, Graduate School in Molecular Sciences and Plant, Department of Food and Environmental Biotechnology.
- [9] Bunney, J., Williamson, S., Atkin, D., Jeanneret, M., Cozzolino, D., & Chapman, J. (2017). The use of electrochemical biosensors in food analysis. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(3), 183-195.
- [10] Naderi-Boldaji, M., Mokhtari, M., 2 Ghasemi-Varnamkhasti, M., Tohidi, M., (2019). Feasibility of using a cylindrical resonator sensor for adulteration detection in sesame oil, *Innov. Food Technol.* 6, 409-420. [In Persian]
- [11] Mohammad-Razdari, A., Rostami, S., Izadi, Z., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Ensafi, A., bonyadian, M., (2019). Fabrication and implementation of a biosensor for health evaluation in raw milk, *Innov. Food Technol.* [In Persian]
- [12] Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Yoosefian, S. H., Siadat, M., Izadi, Z., Rostami, S., (2018). Detection of pumpkin puree adulteration in tomato paste using a gas sensor array, *Innov. Food Technol.* 6, 137-148. [In Persian]
- [13] Kell, D. B., Heyden, E. L. & Pretorius, E. (2020). The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Front. Immunol.* 11, 1221.
- [14] Campanella, L., Martini, E., Pintore, M. & Tomassetti, M. (2009). Determination of lactoferrin and immunoglobulin G in animal milks by new immunosensors. *Sensors* 9, 2202-2221.
- [15] Bezwoda, W. R., Baynes, R. D., Khan, Q. & Mansoor, N. (1985). Enzyme linked immunosorbent assay for lactoferrin. Plasma and tissue measurements. *Clin. Chim. Acta.* 151, 61-69.
- [16] Indyk, H. E. & Filonzi, E. L. (2005). Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *Int. Dairy J.* 15, 429-438.
- [17] Palmano, K. P. & Elgar, D. F. (2002). Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid

- chromatography on polystyrene–divinylbenzene. *J. Chromatogr. A* 947, 307–311.
- [18] Adam, V., Zitka, O., Dolezal, P., Zeman, L., Horna, A., Hubalek, J., ... & Kizek, R. (2008). Lactoferrin isolation using monolithic column coupled with spectrometric or micro-amperometric detector. *Sensors*, 8(1), 464–487.
- [19] Tu, Y., Chen, C., Chang, J. & Chang, H. (2002). Characterization of Lactoferrin (LF) from Colostral Whey Using Anti-LF Antibody Immunoaffinity Chromatography. *J. Food Sci.* 67, 996–1001.
- [20] Devi, K. S. S., Mahalakshmi, V. T., Ghosh, A. R. & Kumar, A. S. (2017). Unexpected co-immobilization of lactoferrin and methylene blue from milk solution on a Nafion/MWCNT modified electrode and application to hydrogen peroxide and lactoferrin biosensing. *Electrochim. Acta* 244, 26–37.
- [21] Tomassetti, M., Martini, E., Angeloni, R., Campanella, L. & Merola, G. (2017). Determination of lactoferrin content and the total antioxidant capacity, in animal, or powdered milks and food supplements available in drugstore, using biosensors. Study of the possible correlation between them. *Curr. Pharm. Anal.* 13, 224–231.
- [22] Shabani, R., Mozaffari, S. A., Husain S. W., & Saber, T. M. (2009). Selective nanosensing of copper (II) ion using L-Lysine functionalized gold cysteamine self-assembled monolayer. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.*, 33(4), 335–347.
- [23] Asrami, P. N., Azar, P. A., Tehrani, M. S., & Mozaffari, S. A. (2020). Glucose oxidase/Nano-ZnO/thin film deposit FTO as an innovative clinical transducer: a sensitive glucose biosensor. *Front. Chem.*, 8, 00503.
- [24] Alizadeh, M., Azar, P. A., Mozaffari, S. A., Karimi-Maleh, H., & Tamaddon, A. M. (2020). A DNA based biosensor amplified with ZIF-8/ionic liquid composite for determination of mitoxantrone anticancer drug: an experimental/docking investigation. *Front. Chem.*, 8, 00814.
- [25] Mozaffari, S. A., Amoli, H. S., Simorgh, S., & Rahmanian, R. (2015). Impedimetric thiourea sensing in copper electrorefining bath based on DC magnetron sputtered nanosilver as highly uniform transducer. *Electrochimica Acta*, 184, 475–482.
- [26] Leva-Bueno, J., Peyman, S. A. & Millner, P. A. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med. Microbiol. Immunol.* 209, 343–362.
- [27] Moro, G., Bottari, F., Liberi, S., Covaceuszach, S., Cassetta, A., Angelini, A., ... & Moretto, L. M. (2020). Covalent immobilization of delipidated human serum albumin on poly (pyrrole-2-carboxylic) acid film for the impedimetric detection of perfluorooctanoic acid. *Bioelectrochemistry*, 107540.
- [28] Nikoleli, G.-P. (2020). Advanced lipid based biosensors for food analysis. in *Advances in Food and Nutrition Research*. 91, 301–321.
- [29] Mozaffari, S. A., Chang, T. & Park, S.-M. (2009). Diffusional electrochemistry of cytochrome c on mixed captopril/3-mercaptopropyl self-assembled monolayer modified gold electrodes. *J. Phys. Chem. C* 113, 12434–12442.
- [30] Arnold, R., Azzam, W., Terfort, A. & Wöll, C. (2002). Preparation, modification, and crystallinity of aliphatic and aromatic carboxylic acid terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* 18, 3980–3992.
- [31] Hu, K. & Bard, A. J. (1997). Use of atomic force microscopy for the study of surface acid–base properties of carboxylic acid-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* 13, 5114–5119.
- [32] Leopold, M. C. & Bowden, E. F. (2002). Influence of gold substrate topography on the voltammetry of cytochrome c adsorbed on carboxylic acid terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* 18, 2239–2245.
- [33] Vidt, D. G., Bravo, E. L. & Fouad, F. M. (1982). Captopril. *N. Engl. J. Med.* 306, 214–219.
- [34] Li, W., Zhang, Z., Zhai, Y., Ruan, L., Zhang, W., & Wu, L. (2020). Electrochemical and Computational Studies of Proline and Captopril as Corrosion Inhibitors on Carbon Steel in a Phase Change Material Solution. *Int. J. Electrochem. Sci.* 15, 722–739.
- [35] Fernandez, M. T., Silva, M. M., Mira, L., Florêncio, M. H., Gill, A., & Jennings, K. R. (1998). Iron and copper complexation by angiotensin-converting enzyme inhibitors. A study by ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *Journal of inorganic biochemistry*, 71(1-2), 93–98.
- [36] Hao, L., Shan, Q., Wei, J., Ma, F. & Sun, P. (2019). Lactoferrin: major physiological functions and applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 20, 139–144.
- [37] J. Huang *et al.*, “Electrochemical immunosensor detection for lactoferrin in milk powder,” *Int. J. Electrochem. Sci.* 13, 7816–7826, 2018.
- [38] L. Campanella, E. Martini, and M. Tomassetti, “New immunosensor for lactoferrin determination in human milk and several pharmaceutical dairy milk products recommended for the unweaned diet,” *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2), 278–287, 2008.

*Research Article*

# New method for evaluating the concentration of lactoferrin protein in infant formula using electrochemical sensors technology

Fateme Ebrahimi<sup>1</sup>, Sayed Ahmad Mozaffari<sup>2\*</sup>, Hossein Salar Amoli<sup>3</sup>

1. PhD Student in Analytical Chemistry, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

2. Associated Professor in Analytical Chemistry, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

3. Professor in Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

## Abstract

The food industry is constantly evolving to meet the needs of consumers in the production of new, profitable, enjoyable, healthy and affordable food products. In this regard, the production of functional foods with the use of additives such as lactoferrin, which is an immuno-booster protein, has been considered. The design of electrochemical sensors for on-line determination of some of the biological components in the food matrix helps to control the quality of the products and reduce production costs. The main goal of this study is to develop an analytical device for rapid and reliable determination of lactoferrin as one of the biological species in dairy food and to evaluate the quality of food using new technology of electrochemical sensors. In this work, the electrochemical sensor of lactoferrin were prepared based on the ability of this protein to form a complex with iron ions and adsorption on the surface of the of nanostructured monolayer of captopril and was used to detect and evaluate the concentration of lactoferrin in infant formula. Changes in the surface charge transfer resistance in the impedimetric method which is caused by the absorption of lactoferrin at the sensor surface are the basis of the work of detecting and determining the amount of lactoferrin using the prepared sensor. The developed sensor is capable of detecting lactoferrin concentrations in the concentration range of 125 nM to 3.250  $\mu$ M with a detection limit of 50 nM and were successfully used to determine the amount of lactoferrin in milk powder matrix.

**Keywords:** Lactoferrin, Functional foods, Infant formula, Electrochemical sensors

---

\* Corresponding author: mozaffari@irost.ir