Archive of SID

JARC

ساخت نانوزیست‌حسگر مبتنی بر آنزیم کولین اکسیداز برای آشکارسازی سم دیازینون و مقایسه عملکرد آن با سوانگاری مایع با کارایی بالا

اقدس بنائی[1و*]، ناهید پارسافر[2] و جلیل بدراقی[3]

۱- استادیار، گروه پژوهشی فیزیک، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
۲- مربی پژوهش، گروه پژوهشی فیزیک، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه پژوهشی فیزیک، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

دریافت: آذر ۱۳۹۶، بازنگری: فروردین ۱۳۹۷، پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده: ترکیب‌های آلی فسفره به‌طور طبیعی و یا پس از استفاده انسان از آن‌ها به‌عنوان سموم برای دفع آفات نباتی و یا کودهای شیمیایی، وارد محیط‌زیست و درنهایت وارد زنجیره غذایی جانداران می‌شوند. با توجه به آثار نامطلوب آن‌ها، آشکارسازی این سموم در غلظت‌های بسیار کم و پیش از آنکه وارد چرخه حیات شوند، به‌طور کامل ضروری است. زیست‌حسگرها ابزار مناسبی برای آشکارسازی این سموم هستند. بدین منظور، در این پژوهش زیست‌حسگر تک‌آنزیمی مبتنی بر مهار آنزیم کولین اکسیداز با تثبیت آن بر الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیله ساخته شد. در حضور ۱ mM پیش‌ماده آنزیم (کولین کلرید)، کمترین حد آشکارسازی سم دیازینون ۰٫۵۶ و دو گستره خطی ۱٫۵ تا ۲٫۴ µM و ۵٫۵ تا ۱۷٫۵ µM به‌دست آمد. آشکارسازی غلظت‌های پایین دیازینون با این زیست‌حسگر و سوانگاری مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه به‌دست آمده از زیست‌حسگر ساخته‌شده نسبت به سوانگاری دارای ۳٫۵ درصد خطا بود.

واژه‌های کلیدی: نانوزیست‌حسگر، دیازینون، آنزیم کولین‌اکسیداز، نانولوله کربنی کربوکسیله، سوانگاری مایع با کارایی بالا (HPLC)

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها به‌شدت افزایش داشته است. این سموم برای مدتی در محیط‌زیست باقی خواهند ماند و اثرات نامطلوبی بر موجودات به ویژه انسان خواهند گذاشت. بنابراین، آشکارسازی این سموم در غلظت‌های بسیار کم پیش از آنکه وارد چرخه حیات شود به‌طور کامل ضروری است. حضور این مواد در طبیعت، سالانه به حدود سه میلیون مسمومیت و دویست هزار مرگ می‌انجامد [۱]. همچنین، سموم کشاورزی توانایی ایجاد سمیت ژنتیکی دارند. به این معنی که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث تخریب ماده ژنتیکی می‌شوند [۲]. سموم آلی فسفره نامی عمومی برای استرهای فسفریک اسید است. دیازینون حشره‌کش و کنه‌کش غیرسامانه‌ایی، نفوذی، تماسی، گوارشی و تنفسی با فرمول شیمیایی $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ از گروه حشره‌کش‌های فسفره آلی و زیرگروه فسفروتیوئیک اسید است. توانایی این سم در

*عهده‌دار مکاتبات: banaei@acecr.ac.ir

www.SID.ir

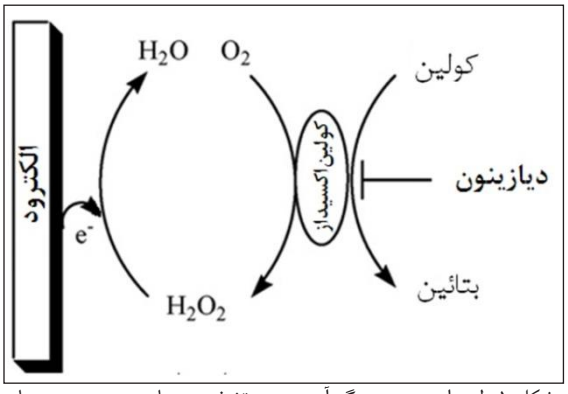
Archive of SID

مهار آنزیم کولین استراز در سامانه عصبی جانوران است. همچنین، این سم پس از ورود به بدن موجودات زنده، تحت تأثیر فرایندهای سوخت و ساز متفاوت تولید رادیکال‌های آزاد می‌کند. این رادیکال‌ها اغلب توانایی آسیب رساندن به ساختار مولکول‌های زیستی مثل ماده ژنتیکی و پروتئین‌ها را داشته و با جهش‌زایی و سرطان‌زایی ماده شیمیایی مرتبط است [۳].

از بین بردن آلوده کننده‌ها از منابع آبی به لحاظ فنی دشوار و پرهزینه است. بنابراین، پیشگیری از آلوده‌شدن این منابع بهتر و مقرون به صرفه‌تر از حذف آلودگی خواهد بود. یکی از ملزومات پیشگیری از آلودگی‌ها، شناسایی آن‌هاست. بنابراین، استفاده از روش‌های سریع، حساس، انتخابی و قابل‌اعتماد برای آشکارسازی مقدار مواد آلی فسفره در محیط ضروری است. لزوم آشکارسازی به‌موقع مواد آلی فسفره سبب شده تا روش‌های متفاوتی برای آشکارسازی این مواد موردتوجه قرار گیرد که ازجمله می‌توان به روش‌هایی مانند طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه- انتشار بازتاب [۴]، طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی [۵]، سوانگاری گازی- طیف‌سنج جرمی [۶]، سوانگاری مایع با کارایی بالا [۷]، سوانگاری گاز با آشکارساز نیتروژن فسفر [۸] و سوانگاری لایه نازک با عملکرد بالا [۹] اشاره کرد. به‌طور کلی این روش‌ها نیازمند پیش‌تیمارهای متفاوتی شامل استخراج، تصفیه و تغلیظ هستند. بنابراین، معایبی مانند سختی، زمان‌بر و هزینه‌بر بودن و همچنین، نیازمندی به حلال را دارند. خریداری تجهیزات گران‌قیمت، ایجاد امکانات آزمایشگاهی مجهز، بهره‌گیری از نیروی انسانی متخصص و کارآزموده نیز در این روش‌ها موردنیاز است. همین موارد سبب شده است تا به روش‌های آسان و کم‌هزینه آشکارسازی مواد آلی فسفره توجه زیادی شود. به همین دلیل، روش‌های دیگری مانند به‌کارگیری زیست‌حسگرهای آنزیمی به‌عنوان ابزاری دقیق و نوین برای اندازه‌گیری سریع و در جا[1] مواد آلی فسفره در غلظت‌های پایین موردتوجه قرارگرفته است [۱۰ و ۱۱]. آنزیم‌های متفاوت ازجمله استیل‌کولین‌استراز [۱۲]، ارگانوفسفره هیدرولاز [۱۳ تا ۱۵]، تایروزیناز [۱۶ و ۱۷] و لیپاز [۱۸] در تشخیص دیازینون به‌کارگرفته شده است. مزیت استفاده از زیست‌حسگر در تشخیص مواد فسفره بر روش‌های دیگر این است که از ویژگی‌های مطلوبی مانند قدرت انتخاب‌گری، حساسیت، سرعت، هزینه کم و قابلیت کوچک شدن و قابل حمل بودن برخوردار است [۱۹]. در اصل زیست‌حسگرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که بتوانند موادی را که با مولکول‌های زیستی برهم‌کنش دارند، به‌طور انتخابی تشخیص دهند [۲۰]. به‌طور معمول، در این ابزارهای تشخیصی یک عنصر تشخیصی زیستی در تماس مستقیم با مبدل مناسب قرار می‌گیرد. به این ترتیب، واکنش تشخیص زیستی با فرایند زیست کاتالیستی به نشانک قابل تشخیص تبدیل می‌شود. آنزیم کولیناکسیداز به‌عنوان یک عامل تشخیصی در زیست‌حسگر مواد آلی فسفره مطرح است. این آنزیم از خانواده اکسیدازهاست که نخستین بار در سال ۱۹۳۸ از کبد موش استخراج شد و با توجه به نوار جذبی آن در طول موج‌های ۳۶۳ و ۴۵۰ نانومتر، نوعی فلاووپروتئین است. کولین اکسیداز آنزیمی است که واکنش دو مرحله‌ای اکس سایش چهار الکترونی کولین را به بتائین کاتالیست می‌کند [۲۱].

$$\text{کولین} + 2O_2 \xrightarrow{\text{کولین‌اکسیداز}} \text{بتائین} + 2H_2O_2$$

زیست‌حسگر تک آنزیمی تشخیص دیازینون، بر اساس مهار آنزیم کولین‌اکسیداز در این واکنش طراحی می‌شود. مهار آنزیم کولین‌اکسیداز با دیازینون سبب کاهش تولید زیست کاتالیستی H2O2 و درنتیجه کاهش پاسخ زیست‌حسگر می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱ طرحواره زیست‌حسگر آمپرسنجی تشخیص دیازینون مبتنی بر مهار کولین‌اکسیداز

1. In situ

www.SID.ir

Archive of SID

با هدف پایدارسازی آنزیمی، تثبیت این ساختارهای زیستی بر بستر جامد زیست‌حسگرها به‌عنوان چالشی مهم در ساخت این ابزارهای دقیق وجود دارد [۲۵]. نانولوله‌های کربنی به‌عنوان بستر انتخابی مناسب برای تثبیت آنزیم‌ها هستند. وجود ساختار ویژه و ویژگی الکتریکی و مکانیکی استثنایی، سازگاری بالا با سامانه‌های حیاتی، رسانایی الکتریکی بالا، قطر بسیار کوچک و انتهای باز نانولوله‌های کربنی که قابلیت تشکیل پیوند کووالانسی با گروه‌های عاملی متفاوت را دارد، باعث اهمیت آن‌ها به‌عنوان مواد سازنده الکترودها در فرایندهای الکتروشیمیایی شده است [۲۲ تا ۲۴]. حساسیت بالا، پاسخ سریع، برگشت‌پذیری خوب و افزایش سرعت انتقال الکترون از ویژگی‌های بی‌مانند نانولوله‌های کربنی بشمار می‌روند. توانایی تثبیت پروتئین بدون تغییر در فعالیت آنزیم ازجمله ویژگی‌های بی‌نظیر دیگر این نانومواد است که در سامانه‌های بیوالکتروشیمی موردتوجه قرارگرفته‌اند. ازآنجایی‌که در نانولوله‌های کربنی پس از تهیه به دلیل وجود نیروهای واندرولسی میان آن‌ها، خود تجمعی رخ می‌دهد و به صورت خام واکنش‌پذیری شیمیایی مطلوبی ندارند، انحلال آن‌ها در یک حلال ممکن نیست. با عامل‌دارکردن نانولوله‌های کربنی از تجمع آن‌ها در حلال جلوگیری کرده و ویژگی فیزیکوشیمیایی موردنظر را برای واکنش با گونه‌های دیگر به آن‌ها می‌افزایند. پیوند گروه‌ها در مرحله اول به کلاهک انتهایی نانولوله‌ها و سپس، به نواقص ساختاری دیواره آن‌ها انجام می‌شود [۲۵]. چنانچه پیوند گروه عاملی به نانولوله کربنی با پیوند کووالانس باشد، هیبریداسیون اتم کربن از sp^2 به sp^3 تغییر می‌کند. این امر موجب تغییر شکل هندسی پیوند از سه وجهی صفحه‌ای به چهاروجهی می‌شود [۲۶]. افزون بر این، در اثر عامل‌دارکردن نانولوله‌ها، پیچش‌ها و خمش‌هایی در ساختار آن‌ها ایجاد می‌شود [۲۷]. در اثر این تغییرات، ساختار دیواره نانولوله‌های کربنی دچار تغییر می‌شود و درنتیجه، نیروهای واندروالسی بین نانولوله‌ها تضعیف می‌شود. تضعیف برهم‌کنش میان نانولوله‌ها به پراکنده شدن آن‌ها در محلول‌های آبی کمک می‌کند [۲۸]. چنان که در مقاله گزارش‌شده است، پراکنده‌شدن نانولوله‌ها اثر مطلوبی بر رسانایی آن‌ها دارد [۲۹]. ایجاد گروه‌های عاملی مناسب با توجه به گروه‌های عاملی جزء زیستی موردنظر برای تثبیت انجام می‌شود. برای مثال، آنزیم حاوی گروه‌های عاملی چون گروه کربوکسیلیک، آمین و سولفید است، پس می‌توان با ایجاد عواملی چون گروه‌های کربوکسیل، آمین و یا تیول شرایط برهم‌کنش مناسبی را برای آنزیم در سطح نانولوله‌های کربنی به‌وجود آورد.

در این پژوهش زیست‌حسگر تک‌آنزیمی متشکل از آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده بر الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار برای آشکارسازی سم دیازینون طراحی و ساخته شد. پس از رسم منحنی واسنجی درصد مهار آنزیم با غلظت‌های متفاوت سم دیازینون با زیست‌حسگر ساخته‌شده، منحنی واسنجی به کمک روش HPLC نیز رسم شد. درنهایت درصد سم دیازینون در یک نمونه صنعتی با استفاده از زیست‌حسگر و روش متداول HPLC به‌دست آمد و نتایج به‌دست آمده با هم مقایسه شد. با توجه به درصد خطای کم مقدار اندازه‌گیری شده با زیست‌حسگر نسبت به روش رایج HPLC، این زیست‌حسگر به‌عنوان ابزاری دقیق برای تشخیص مقدار سم به‌صورت درجا و بدون نیاز به آزمایشگاه مجهز و افراد متخصص قابل به‌کارگیری است.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

آنزیم کولین‌اکسیداز، آنزیم پراکسیداز، کولین کلراید،۴-آمینوآنتی‌پیرین(4-AAp)،نیتریک‌اسید(HNO_3)،هیدروژن‌دی‌پتاسیم فسفات، دی‌هیدروژن‌پتاسیم فسفات، دی‌متیل‌فرمامید و هیدروژن پراکسید از شرکت مرک، فنل از شرکت شارلو و نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکسیل‌دار (MWCNT) از شرکت نانوتایمز و الکترود چاپی کربنی از شرکت ایتال‌سنس[1] و سم دیازینون فنی ۹۵٪ از شرکت پلیکم خریداری شد.

1. ItalSens

www.SID.ir

Archive of SID

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) مورداستفاده برای بررسی شکل ظاهری الکترودهای اصلاح‌شده از شرکت هیتاچی مدل S-4160 باقدرت ۳۰ kV و دقت ۵ nm و دستگاه پتانسیواستات/ گالوانواستات برای مطالعات الکتروشیمیایی از شرکت پالمسنس مدل Palmsence 3 و دستگاه طیف‌نورسنج فرابنفش- مرئی مورداستفاده در بررسی فعالیت آنزیم‌ها از شرکت WPA مدل lightwave S2000 بوده است. به منظور سنجش دیازینون، سوانگاری در یک سامانه Agilent Technologies 1200 مجهز به گاز زدا آنلاین و آشکارساز UV انجام گرفت.

روش‌ها

روش سنجش فعال‌بودن آنزیم‌های کولین‌اکسیداز و پراکسیداز

سنجش فعال‌بودن آنزیم کولین‌اکسیداز بر اساس دستورالعمل شرکت سیگما - آلدریچ انجام گرفت که اساس این سنجش بر مبنای رنگ‌سنجی است [۳۰]. در این روش از ۴- آمینو آنتی‌پیرین (4-AAp)، فنل و هیدروژن پراکسید به‌عنوان ترکیب‌های تولیدکننده رنگ استفاده شد. فراورده واکنش کوئینون‌ایمین، ماده‌ای رنگی است که در طول موج ۵۰۰ nm یک نوار جذبی قوی دارد (A_{500nm}). یک واکنش ترکیبی با محلول کولین، محلول 4-AAp، محلول فنل و آنزیم پراکسیداز در دمای تعادل ۳۷ °C داخل یک ظرف مناسب که نور به آن نفوذ نکند، آماده و تغییرات A_{500nm} به مدت ۵ دقیقه ثبت شد.

کولین (کلرید) + اکسیژن $\xrightarrow{\text{کولین‌اکسیداز}}$ بتائین آلدئید + آب

بتائین آلدئید + اکسیژن + آب $\xrightarrow{\text{کولین‌اکسیداز}}$ بتائین + آب‌اکسیژنه

۲ آب‌اکسیژنه + ۴-آمینو آنتی‌پیرین + فنل $\xrightarrow{\text{پراکسیداز}}$ کوئینون‌ایمین + ۴ آب

با توجه به این‌که در سنجش فعال‌بودن آنزیم کولین‌اکسیداز، آنزیم پراکسیداز مورداستفاده قرار گرفت، سنجش فعال‌بودن آنزیم پراکسیداز نیز با روش رنگ‌سنجی و براساس دستور کار ورتینگتون انجام شد [۳۱].

روش ساخت نانوزیست‌حسگر آنزیمی و بررسی عملکرد آن

آماده‌سازی الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی عامل‌دار و آنزیم کولین‌اکسیداز

در این پژوهش از الکترود چاپی کربنی به منظور انجام مطالعات الکتروشیمیایی بهره بردیم. به منظور اصلاح الکترود شناساگر با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار، ابتدا تعلیق نانولوله‌های کربوکسیل‌دار با غلظت ۲ mg/ml را در حلال دی‌متیل‌فرمامید آماده کردیم و سپس، آن را در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در حمام امواج فراصوت قرار دادیم. پس از آن، ۲٫۵ µl از این تعلیق بر سطح الکترود چاپی کربنی چکانده و سطح الکترود در دمای اتاق خشک شد. برای تثبیت آنزیم کولین‌اکسیداز بر سطح الکترود اصلاح‌شده با نانولوله کربنی کربوکسیل‌دار، ۲ µl محلول آنزیم ۱ mg/ml را بر الکترود گفته‌شده قرار دادیم که در دمای ۴ °C با سپری شدن زمان کافی به‌طور کامل خشک شد.

روش بررسی انتقال الکترون مستقیم و فعالیت الکتروکاتالیستی آنزیم تثبیت‌شده در سطح نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار

رفتار الکتروشیمیایی آنزیم جذب‌شده بر نانولوله‌های کربنی چند دیواره در حضور کولین کلرید با استفاده از دستگاه پتانسیواستات- گالوانواستات به روش ولتاسنجی چرخه‌ای موردبررسی قرار گرفت. نمودار ولتاسنجی با اعمال پتانسیل از ۰٫۷ V- تا ۰٫۱ V- و با سرعت روبش ۰٫۱ V/s رسم شد. فعالیت الکتروکاتالیستی آنزیم و پاسخ آنزیم به افزایش متوالی غلظت کولین کلرید به روش زمان-آمپرسنجی[1] با استفاده از دستگاه پتانسیواستات- گالوانواستات موردبررسی قرار گرفت. غلظت‌های متفاوت از پیش‌ماده کولین کلرید تهیه شد. با اعمال پتانسیل ۰٫۴۵ V- نمودار زمان-آمپرسنجی پاسخ به غلظت‌های متفاوت پیش ماده ترسیم شد. آنگاه مقدار نقطه اشباع جریان هر نمودار زمان-آمپرسنجی به ازای هر غلظت کولین کلرید اندازه‌گیری و درنهایت نمودار واسنجی جریان در مقابل غلظت کولین کلرید رسم شد.

1. Chronoamperometry

www.SID.ir

Archive of SID

روش سنجش سم دیازینون با استفاده از زیست‌حسگر

به منظور تهیه دیازینون با غلظت‌های متفاوت، ابتدا سم دیازینون فنی با استفاده از متانول تا غلظت ppm ۱۰۰۰ رقیق شد و سپس، غلظت‌های کمتر با رقیق‌کردن غلظت ppm ۱۰۰۰ با استفاده از آب مقطر تهیه شد. برای سنجش این سم دستگاه پتانسیواستات–گالوانواستات برای آزمایش زمان–آمپرسنجی تنظیم و ابتدا پاسخ زمان–آمپرسنجی الکترود اصلاح‌شده به غلظت mM ۱ کولین کلرید با اعمال پتانسیل در ۰٫۴۵– ولت اندازه‌گیری شد. سپس، به منظور به‌دست آوردن منحنی واسنجی زیست‌حسگر تشخیصی دیازینون، الکترود اصلاح‌شده به مدت ۳۰ دقیقه در حضور غلظت اشباع پیش‌ماده با غلظت‌های متفاوت دیازینون به‌دست آمده از دیازینون فنی با خلوص ۹۵ ٪ گرم‌خانه‌گذاری[1] شد (به این ترتیب که غلظت‌های متفاوت دیازینون در غلظت اشباع کولین در ظروف مجزا تهیه‌شده بود) و نمودارهای زمان–آمپرسنجی ثبت شد. پس از آن مقدار مهارشدگی کولین‌اکسیداز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [۳۲]:

درصد مهارشدگی = $[(I_0-I)/I_0)]\times 100$

که در این رابطه I_0 جریان پاسخ در غیاب دیازینون و I جریان پاسخ در حضور دیازینون است. با ترسیم درصد مهارشدگی محاسبه‌شده بر غلظت، منحنی واسنجی دیازینون به‌دست آمد.

روش سنجش سم دیازینون با استفاده از سوانگاری مایع با کارایی بالا

در روش سوانگاری مایع با کارایی بالا به منظور سنجش دیازینون، سوانگاری با استفاده از ستون VydacC18 GRACE؛ (۲۵۰×mm ۴٫۶ mm μm۵) انجام گرفت. سامانه سوانگاری مورداستفاده با نرم‌افزار ChemStation کنترل شد. فاز متحرک از مخلوط استونیتریل–آب (۱۰ ٪ v/v : ۹۰ ٪) تشکیل‌شده و سرعت جریان فاز متحرک $1.5\ ml\ min^{-1}$ بود. حجم تزریق ۲۰ μl بود.

نتیجه‌ها و بحث

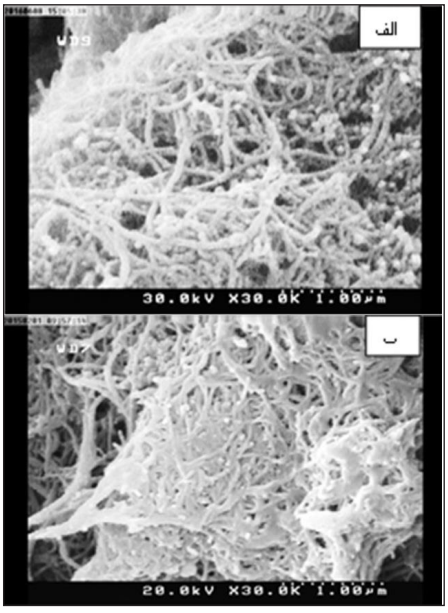
سنجش فعال بودن آنزیم‌ها

پیش از اطمینان از فعالبودن آنزیم کولین‌اکسیداز، باید از فعال بودن آنزیم پراکسیداز که در فرایند سنجش فعالبودن آنزیم کولین‌اکسیداز نقش دارد، مطمئن شد. بدین منظور، برپایه روش گفته‌شده تغییر A_{500nm} هر ۵ دقیقه ثبت و مقدار افزایش جذب بر حسب زمان در حضور آنزیم و بدون حضور آنزیم به‌دست آمد که نتایج حاکی از فعال‌بودن آنزیم بود. به منظور سنجش فعال‌بودن آنزیم کولین‌اکسیداز هر ۲۰ ثانیه یک‌بار به مدت ۱۷ دقیقه، A_{500nm} ثبت شد. نتایج افزایش A_{500nm} بیانگر افزایش مقدار تولید رنگ کوئینون ایمین ناشی از فعالیت آنزیم کولین‌اکسیداز و درنتیجه نشانگر فعال‌بودن آنزیم بود.

ساخت نانو زیست‌حسگر مبتنی بر آنزیم کولین‌اکسیداز

بررسی شکل ظاهری الکترودهای اصلاح‌شده

شکل ۲ تصاویر FESEM مربوط به الکترود اصلاح‌شده با (الف) نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار، (ب) نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار و کولین‌اکسیداز را نشان می‌دهد. مقایسه شکل ۲–الف با شکل ۱–ب دلالت برافزایش ضخامت نانولوله‌ها در شکل ۲–ب دارد که بیانگر تثبیت موفقیت‌آمیز آنزیم کولین‌اکسیداز بر سطح نانولوله‌ها است [۳۳ و ۳۴].



شکل ۲ تصویر FESEM مربوط به الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار (الف) و نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار و کولین‌اکسیداز (ب)

1. Incubation

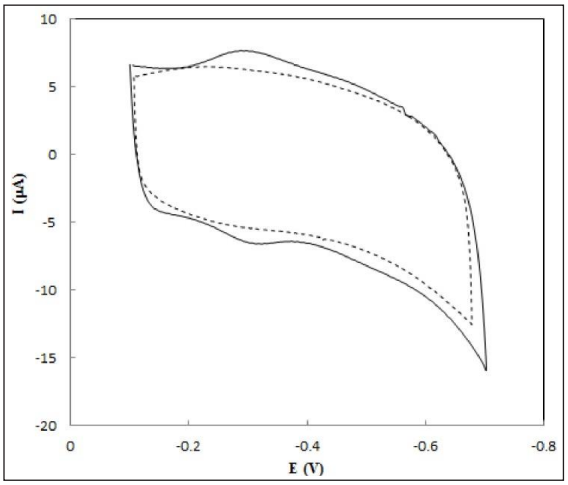
www.SID.ir

Archive of SID

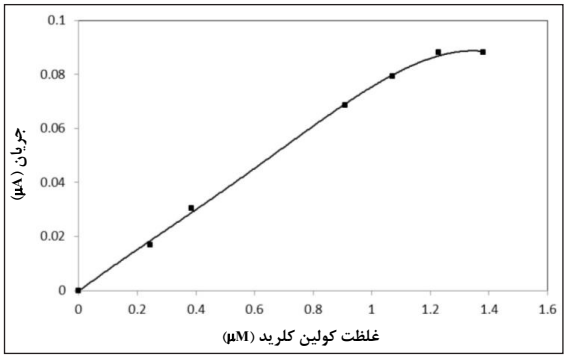
بررسی انتقال الکترون مستقیم آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده در سطح نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار

برای بررسی رفتار الکتروشیمیایی آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده بر نانولوله‌های کربنی چنددیواره روش ولتاسنجی چرخه‌ای به‌کارگرفته شد. شکل ۳ نمودار ولتاسنجی چرخه‌ای مربوط به الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار (خط‌چین) و الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار و آنزیم کولین‌اکسیداز (خط توپر) را در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۷ در سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار ولتاسنجی خط‌چین مشاهده می‌شود، در الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار تنها یک جریان زمینه وجود داشت. زمانی‌که آنزیم کولین‌اکسیداز در سطح نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار تثبیت می‌شود، با توجه به نقش نانولوله‌های کربنی در تسریع انتقال الکترون بین کولین‌اکسیداز و سطح الکترود [۳۵]، یک زوج اکسایش-کاهش به‌طور کامل مشخص و شبه‌برگشت‌پذیر مشاهده می‌شود. ازآنجایی‌که این جفت قله تنها پس از تثبیت آنزیم دیده شد و در گستره پتانسیل اکسایش-کاهش مرکز FAD آنزیم است، بیانگر گروه اکسایش-کاهش $FAD/FADH_2$ متمرکز در مرکز آنزیم است [۳۶ و ۳۷]. قله آندی در پتانسیل ۰/۳۰۳ V- و قله کاتدی در پتانسیل ۰/۲۹۷ V- دیده می‌شود. پتانسیل فرمال یعنی میانگین پتانسیل قله‌های کاتدی و آندی، برابر با ۰/۳ V- به‌دست آمد. جریان قله‌های آندی و کاتدی در این مورد به ترتیب $7/6\times10^{-6}$ A و $6/4\times10^{-6}$ A- بود. جدایی قله‌های آندی و کاتدی آنزیم تثبیت شده بر نانولوله‌های کربنی چند دیواره ۶ mV محاسبه شد.

به منظور بررسی فعالیت الکتروکاتالیستی آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده بر الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار، پاسخ آنزیم به افزایش متوالی کولین کلراید، پیش‌ماده آنزیم، به روش زمان-آمپرسنجی موردبررسی قرار گرفت. با توجه به پاسخ زمان-آمپرسنجی منحنی واسنجی پاسخ به پیش ماده ترسیم شد (شکل ۴). ازآنجاییکه پتانسیل اکسایش-کاهش آنزیم در گستره پتانسیلی حدود۰/۴۵ V- بود، پاسخ زمان-آمپرسنجی آنزیم به پیش‌ماده کولین در این پتانسیل بررسی شد.



شکل ۳ نمودار ولتاسنجی چرخه‌ای مربوط به الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار (خط‌چین) و الکترود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار و آنزیم کولین‌اکسیداز (خط توپر) را در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ در سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه



شکل ۴ منحنی واسنجی تشخیص کولین در سطح الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با آنزیم/ نانولوله کربنی

همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، پاسخ زیست‌حسگر با افزایش غلظت کولین تا غلظت ۱ mM افزایش‌یافته و پس از آن با افزایش غلظت کولین پاسخ زیست حسگر تغییر چندانی نمی‌کند. بنابراین، در سنجش میزان مهار آنزیم با سم دیازینون، آزمایش‌ها در حضور غلظت اشباع ۱ mM (غلظت بهینه) کولین انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش دیازینون

سنجش دیازینون با استفاده از زیست‌حسگر ساخته‌شده

به منظور بهینه‌سازی پاسخ زیست حسگر به دیازینون، پس از به‌دست آوردن غلظت بهینه پیش‌ماده، غلظت آنزیم به‌عنوان یک عامل موردبررسی قرار گرفت. در این راستا، چهار الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار تهیه و مقادیر متفاوتی از غلظت‌های آنزیم کولین‌اکسیداز بر آن‌ها تثبیت شد. نتایج این آزمایش در جدول ۱ خلاصه‌شده است. در غلظت آنزیمی کمتر از ۰٫۲۴ mg/ml نسبت جریان به نوفه[1] به حدی کم بود که بررسی روند مهار ممکن نبود. درصد مهار در شرایطی برای غلظت‌های متفاوت آنزیم کولین‌اکسیداز به‌دست آمد که الکترودها در معرض غلظت اشباع کولین ۱ mM و ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری با ۲٫۴ میکرومولار دیازینون قرار گرفتند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت آنزیم درصد مهار کاهش‌یافته است. این نتیجه قابل‌انتظار است چراکه یک غلظت مشخص از سم توان مهار بیشتری برای مقدار آنزیم تثبیت شده کمتر را دارد. بنابراین، غلظت آنزیم ۰٫۲۴ mg/ml برای ساخت زیست‌حسگر به‌کاربرده شد.

جدول ۱ درصد مهار به‌دست‌آمده به ازای مقادیر متفاوت آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده

جدول ۱ درصد مهار به‌دست‌آمده به ازای مقادیر متفاوت آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده		
الکترود	**غلظت آنزیم کولین‌اکسیداز (mg/ml)**	**درصد مهار**
۱	۰٫۱۵	مطالعه روند مهار غیرممکن
۲	۰٫۲۴	۴۵
۳	۰٫۳۲	۴۰
۴	۰٫۴۷	۳۲

از طرف دیگر الکترود اصلاح‌شده‌ای که آنزیم کولین‌اکسیداز با غلظت بهینه بر آن تثبیت شده بود در ۹ زمان گرم‌خانه‌گذاری متفاوت (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰،۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰و ۴۵ دقیقه) در مجاور غلظت ۲٫۴ µM دیازینون قرار داده شد. درصد مهار با افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری تا ۳۰ دقیقه افزایش یافت و پس از آن با افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری، افزایش چشمگیری نداشت. به همین دلیل، ۳۰ دقیقه به عنوان زمان گرم‌خانه‌گذاری بهینه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

پس از به دست آوردن شرایط بهینه انتقال الکترون با آنزیم کولین‌اکسیداز، اثر مهاری دیازینون بر عملکرد آنزیم موردبررسی قرار گرفت. لازم به یادآوری است ازآنجایی‌که در مطالعات پیش‌ازاین [۳۸] سازوکار مهار آنزیم کولین‌اکسیداز با سموم فسفره، ضدرقابتی گزارش‌شده است؛ آزمایش در حضور غلظت اشباع پیش ماده (۱ mM) انجام شد. به این ترتیب که غلظت‌های متفاوت دیازینون در کولین ۱ mM تهیه شد. پس از ثبت هر نمودار زمان–آمپرسنجی، الکترود شسته شده و نمودار زمان–آمپرسنجی غلظت بعدی دیازینون رسم شد. در شکل ۵ منحنی الف پاسخ حسگر در محلول کولین ۱ mM و منحنی‌های "ب" تا "ح" پاسخ زمان–آمپرسنجی الکترود گرم‌خانه‌گذاری شده با غلظت‌های متفاوت دیازینون را نشان می‌دهند.

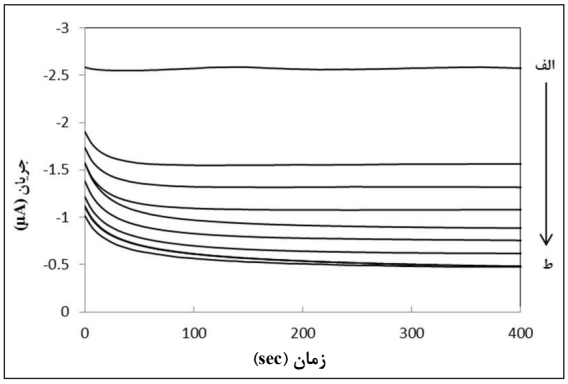
برای محاسبه مقدار مهارشدگی آنزیم کولین‌اکسیداز، با ترسیم درصد مهارشدگی محاسبه‌شده بر غلظت دیازینون، منحنی واسنجی درصد مهارشدگی آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده در سطح الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار همراه با آنزیم تثبیت شده با دیازینون به دست آمد (شکل ۶–الف). حد آشکارسازی با استفاده از فرمول $DL = 3\ \sigma/S$ به‌دست می‌آید که در آن DL حد آشکارسازی، S انحراف استاندارد پاسخ آمپرسنجی پیش از افزودن دیازینون و σ شیب منحنی واسنجی جریان بر حسب غلظت سم است. با توجه به اینکه شیب ناحیه خطی اول منحنی واسنجی µA/ µM ۰٫۵۶۷ و انحراف استاندارد ۰٫۱۰۶ بود، غلظت µM ۰٫۵۶ دیازینون به‌عنوان حد آشکارسازی زیست‌حسگر به‌دست آمد و پاسخ حسگر به دیازینون در دو گستره µM ۱٫۵ تا ۲٫۴ و µM ۵٫۵

1. Noise

www.SID.ir

Archive of SID

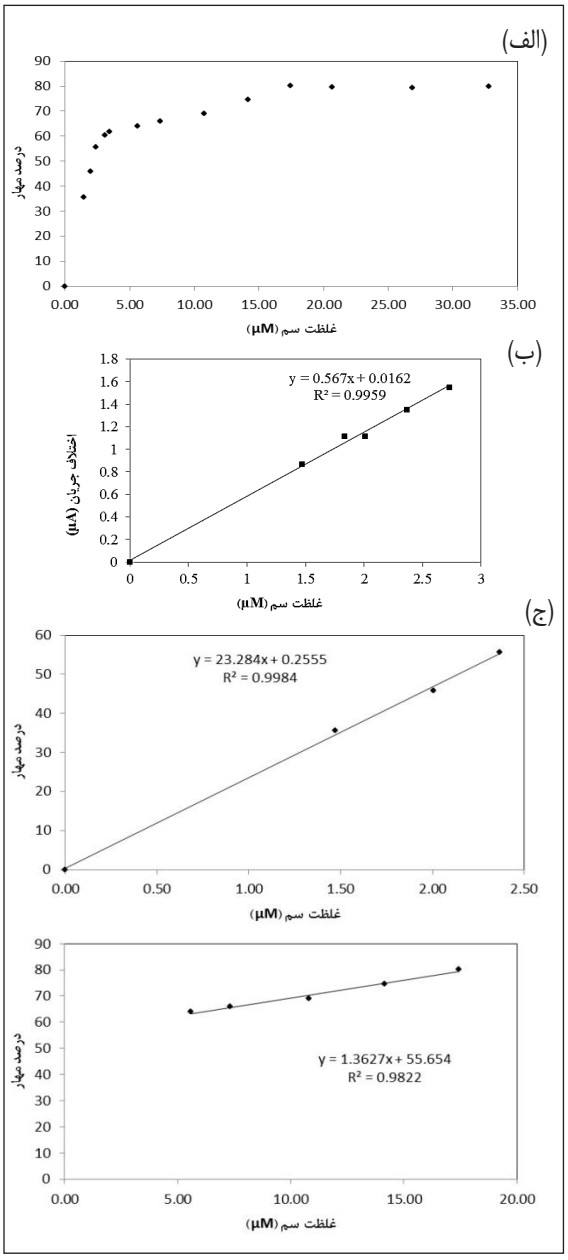
تا ۱۷٫۵ خطی بود. به منظور تعیین مقدار حساسیت زیست‌حسگر تک‌آنزیمی برای آشکارسازی دیازینون، شیب خط منحنی واسنجی در گستره خطی محاسبه شد. حساسیت محاسبه‌شده ۲۳٫۳ ٪ مهار به ازای هر میکرومولار دیازینون به‌دست آمد.



شکل ۵ پاسخ زمان–آمپرسنجی الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار همراه با کولین‌اکسیداز تثبیت شده در الف) محلول کولین ۱ mM، سایر پاسخ‌های زمان–آمپرسنجی مربوط به الکترود در محلول ۱ mM کولین پس از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری با غلظت‌های متفاوت دیازینون می‌باشند. غلظت‌های دیازینون گرم‌خانه‌گذاری شده بر حسب میکرومولار عبارت‌اند از: ۱٫۵ (ب)، ۱٫۸ (ج)، ۲ (د)، ۲٫۴ (ه)، ۳ (و)، ۱۱ (ز)، ۲۷ (ح) و ۳۳ (ط)

شکل ۶–الف منحنی واسنجی الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار همراه با کولین‌اکسیداز تثبیت شده را نشان می‌دهد. داده‌ها با تحلیل منحنی‌های زمان–آمپرسنجی به‌دست آمده و بر حسب درصد مهارشدگی بیان‌شده است. همچنین نمودار اختلاف جریان بر حسب غلظت سم در ناحیه خطی اول در شکل ۶–ب نشان داده‌شده است. در شکل ۶–ج نمودارهای درصد مهار بر حسب غلظت سم در ناحیه خطی اول و دوم و خط برازش شده بر نتایج مشاهده می‌شود.

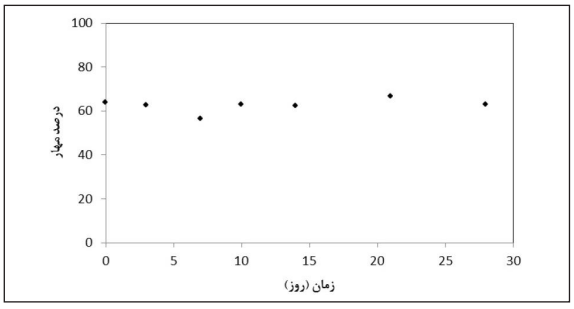
به منظور بررسی پایداری ذخیره‌ای زیست‌حسگر ساخته‌شده، زیست‌حسگر در بافر فسفات با pH برابر ۷ در یخچال نگهداری شد و پاسخ آن به ۲٫۴ µM دیازینون در حضور غلظت اشباع کولین (۱ mM) در روزهای متفاوت بررسی شد. نتیجه این آزمون در شکل ۷ نشان داده‌شده است که بیانگر پایداری نسبی مناسب زیست‌حسگر است.



شکل ۶ منحنی واسنجی درصد مهارشدگی کولین‌اکسیداز تثبیت شده در سطح الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار همراه با آنزیم تثبیت شده که از نمودارهای زمان–آمپرسنجی شکل ۵ به‌دست‌آمده است (الف)، نمودار اختلاف جریان بر حسب غلظت سم در ناحیه خطی اول (ب) و نمودارهای درصد مهار بر حسب غلظت سم در ناحیه‌های خطی اول و دوم (ج)

www.SID.ir

Archive of SID



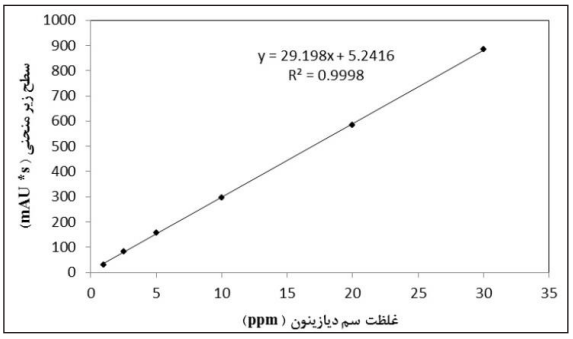
شکل ۷ پایداری ذخیره‌ای حسگر ساخته‌شده در pH=۷

در بررسی تکرارپذیری کوتاه مدت، الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده در معرض ۱٫۴۷ میکرومولار از سم دیازینون قرار گرفت و آزمایش در شرایط یکسان ۳ بار تکرار شد. اختلاف جریان نسبت به عدم حضور سم در سه حالت ذکرشده برابر ۰٫۲۸۸۰، ۰٫۳۰۱۸ و ۰٫۲۸۷۵میکروآمپر به‌دست آمد که تکرارپذیری کوتاه مدت نسبی مناسبی را نشان می‌دهد. این الکترود ۸ روز پیش از این آزمون نیز در معرض همین مقدار سم قرارگرفته بود و اختلاف جریان نسبت به عدم حضور سم برابر ۰٫۴۰۷۴ میکروآمپر مشاهده شد. مقایسه نتایج به‌دست آمده به فاصله ۸ روز حاکی از این است که تکرارپذیری بلندمدت نیز تا حدی قابل‌قبول است.

سنجش دیازینون با استفاده از HPLC

در این روش، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از نمونه سم دیازینون فنی با خلوص ۹۵ ٪ به‌عنوان استاندارد ساخته شد. سپس، براساس سطح زیر پیک به‌دست آمده از سوانگارهای مربوط به نمونه‌های دیازینون فنی با غلظت‌های ۱، ۲٫۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در میلیون (ppm) در حلال استونیتریل، منحنی واسنجی (منحنی سطح زیر پیک بر حسب غلظت) رسم شد (شکل ۸). حد آشکارسازی سم با این روش ppm ۰٫۱یا µM ۰٫۳۳به‌دست آمد و در گستره ۱ تا ppm ۳۰ یا ۳٫۳ تا µM ۹۸٫۴ خطی بود.

جدول ۲ برخی روش‌های متفاوت برای تشخیص سم دیازینون را ارائه می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ارقام شایستگی حسگر ساخته‌شده قابل‌رقابت با حسگر مبتنی بر مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز است. افزون‌بر این، هزینه تهیه آنزیم کولین‌اکسیداز به‌طور تقریب



شکل ۸ منحنی واسنجی سطح زیر پیک سوانگارهای مربوط به نمونه‌های دیازینون فنی با غلظت‌های ۱، ۲٫۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در میلیون (ppm) در حلال استونیتریل بر حسب غلظت سم

۱۰ ٪ هزینه تهیه آنزیم استیل‌کولین‌استراز است. همچنین، در پژوهش حاضر از پیش ماده طبیعی آنزیم استفاده‌شده است. در حالی‌که در حسگرهای تک‌آنزیمی مبتنی بر مهار استیل‌کولین‌استراز از پیش ماده تهیه تیوکولین استفاده می‌شود. تیوکولین پایدار نبوده و خودبه‌خود آب‌کافت می‌شود. این امر از دقت اندازه‌گیری حسگرهای مبتنی بر مهار استیل کولین استراز می‌کاهد. از سوی دیگر، حسگر ساخته‌شده به‌طور انتخابی مواد آلی فسفره را تشخیص می‌دهد. این در حالی است که حسگرهای مبتنی بر مهار استیل‌کولین‌استراز نمی‌توانند تمایزی میان مواد آلی فسفره و برخی دیگر از سموم همانند کاربامات‌ها قائل شوند [۳۹]. با مشاهده جدول ۲ می‌توان دریافت که حد مجاز مقدار دیازینون در آب (ppm ۰٫۵ یا ۱٫۶ میکرومولار) در گستره خطی حسگر ساخته‌شده قرار دارد. در حالی‌که سایر زیست‌حسگرهای اشاره‌شده در جدول از این مزیت برخوردار نیستند و این موضوع می‌تواند زمینه استفاده کاربردی از این زیست‌حسگر را فراهم کند. افزون‌بر این، آنزیم کولین‌اکسیداز به‌طور تجاری در دسترس است ولی آنزیم هیدرولاز قابل خریداری نیست و برای تولید یا تخلیص آن به آزمایشگاه‌های مجهز و افراد حرفه‌ای نیاز است.

مقایسه نتایج زیست‌حسگر تک‌آنزیمی کولین‌اکسیداز با نتایج به‌دست آمده از HPLC برای یک نمونه مجهول

برای مقایسه نتایج زیست‌حسگر ساخته‌شده با نتایج بهدست آمده از HPLC برای یک نمونه دیازینون صنعتی با غلظت مجهول،

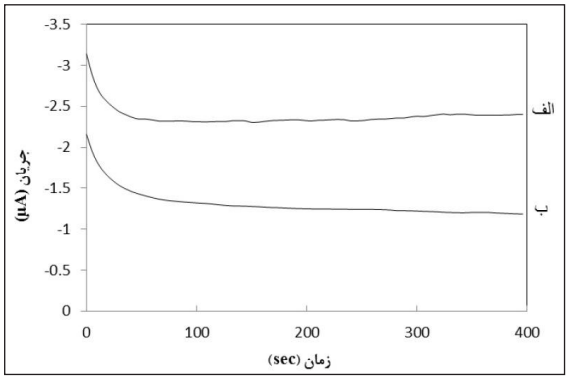
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲ روش‌های متفاوت برای تشخیص سم دیازینون

روش	گستره خطی	حد تشخیص	مرجع
زیست حسگر آپتامر DNA با ساختار کوادروپلکس (آپتامر مورداستفاده با روش‌های محاسباتی انتخاب و برای ساخت زیست‌حسگر استفاده شد.)	۰٫۶۵ -۰٫۱۴۱ nM	۱۷٫۹۰۳ nM	[۴۰]
زیست‌حسگر امپدومتری مبتنی برآنزیم لیپاز با منشأ میکروبی* و با منشأ حیوانی** تثبیت شده روی الکترود طلای عامل‌دار شده	تا ۵۰ µM	* ۱۰ nM ** ۰٫۱ µM	[۱۸]
زیست‌حسگر آنزیمی آمپرسنجی مبتنی بر آنزیم تایروزیناز	۵-۵۰µM	۵ µM	[۱۶]
زیست‌حسگر آنزیمی آمپرسنجی مبتنی بر آنزیم تایروزیناز	۰٫۰۶-۰٫۱۶ µM	-	[۱۷]
زیست‌حسگر آنزیمی پتانسیل‌سنجی مبتنی بر آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز (OPH)	۰٫۱۳- ۲٫۸ mM	۵ µM	[۱۳]
زیست‌حسگر آنزیمی آمپرسنجی مبتنی بر آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز (OPH)	۰٫۴۶ -۸٫۵۶ mM	۲ µM	[۱۴]
زیست‌حسگر فوتولومینسانس دو آنزیمی کولین‌اکسیداز و استیل‌کولین استراز تثبیت شده برالکترود اصلاح‌شده با نقاط کوانتومی سیلیکون	–	۰٫۲ nM	[۴۱]
زیست‌حسگر رسانایی‌سنجی مبتنی بر آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز (OPH)	–	۰٫۱۳ µM	[۱۵]
حسگر الکتروشیمیایی بر مبنای نانوذرات بسپاری حکاکی شده مولکولی (MIP)	دو گستره خطی ۲٫۵ -۱۰۰ nM و ۱۰۰nM - ۲ µM	۰٫۸ nM	[۴۲]
زیست‌حسگر مبتنی بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز	۰٫۰۶ – ۶۲ µM	۰٫۳ µM	[۱۲]
HPLC	۳٫۳-۹۸٫۴ µM	۰٫۳۳ µM	پژوهش حاضر
زیست‌حسگر	دو گستره خطی ۲٫۴µM – ۱٫۵ و ۵٫۵ – ۱۷٫۵ µM	۰٫۵۶ µM	پژوهش حاضر

ابتدا پاسخ زمان–آمپرسنجی الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار همراه با کولین‌اکسیداز تثبیت شده در محلول ۱ mM کولین و در محلول ۱ mM کولین پس از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری با نمونه مجهول به‌دست آمد (شکل ۹). به منظور اندازه‌گیری مقدار دیازینون نمونه مجهول، اختلاف جریان دو نمودار زمان–آمپرسنجی شکل ۹ به‌دست آورده شد و با قرار دادن مقدار جریان در فرمول خط به‌دست آمده از منحنی واسنجی شکل ۸، مقدار دیازینون در نمونه مجهول، ۶۰ درصد به‌دست آمد.



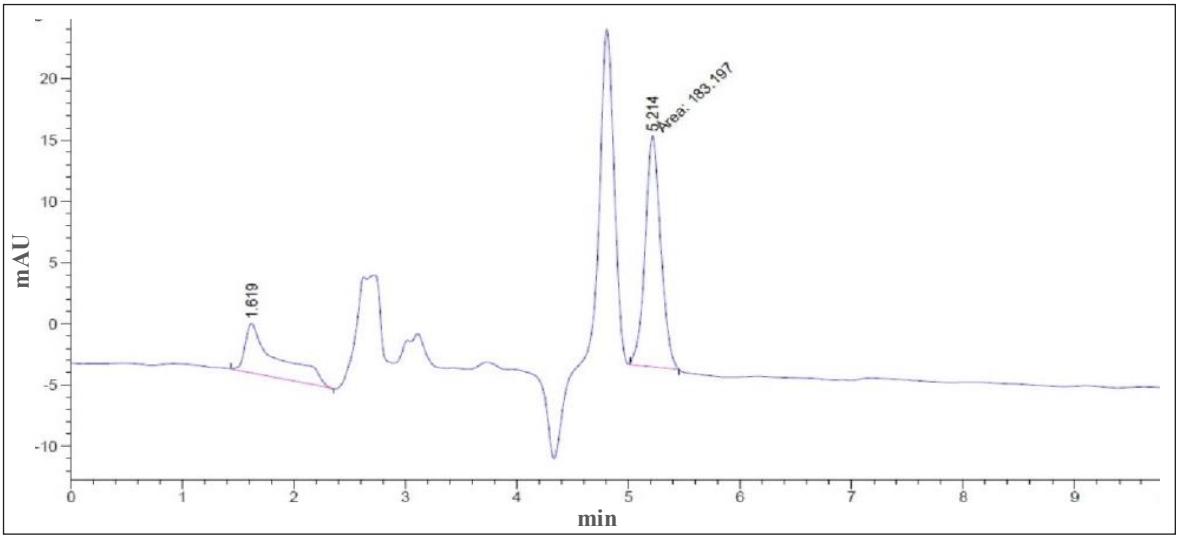
شکل ۹ پاسخ زمان–آمپرسنجی الکترود چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی همراه با کولین‌اکسیداز تثبیت شده در محلول کولین ۱ mM (الف) و در محلول ۱ mM کولین پس از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری با نمونه مجهول (ب)

www.SID.ir

Archive of SID

سپس، سوانگار مربوط به نمونه مجهول با غلظت ppm ۱۰ در حلال استونیتریل با استفاده از روش HPLC به‌دست آمد (شکل ۱۰). با استفاده از منحنی واسنجی سطح زیر پیک سوانگارهای مربوط به نمونه‌های دیازینون فنی و مقدار سطح زیر پیک نمونه مجهول، مقدار دقیق سم دیازینون موجود در نمونه مجهول محاسبه شد.

با قرار دادن سطح زیر پیک نمونه مجهول یعنی ۱۸۳٫۱۹۷ mAU*S در معادله خط منحنی واسنجی (y= ۲۹٫۱۹۸ x + ۵٫۲۴۱۶) با لحاظ کردن درصد دیازینون در نمونه فنی (۹۵٪)، مقدار دیازینون موجود در نمونه مجهول ۵۷٫۹٪ به‌دست آمد. از مقایسه این مقدار با مقدار ۶۰ ٪ به‌دست آمده از زیست‌حسگر تک‌آنزیمی کولین‌اکسیداز برای نمونه مجهول، درصد خطای زیست‌حسگر ساخته‌شده نسبت به نتیجه به‌دست آمده از سوانگاری ۳٫۵ ٪ است.



شکل ۱۰ سوانگار مربوط به نمونه مجهول با غلظت ppm ۱۰ در حلال استونیتریل

نتیجه‌گیری

در میان مواد بسیار سمی شناخته‌شده، ترکیب‌های آلی فسفره مانند دیازینون پس از استفاده انسان از آن به‌عنوان سم برای دفع آفات نباتی، وارد محیط‌زیست و درنهایت زنجیره غذایی جانداران می‌شود. زیست‌حسگرها ابزار مناسبی برای تشخیص این سم هستند. در پژوهش حاضر، به‌منظور تشخیص سریع مقادیر کم آفت‌کش دیازینون، زیست‌حسگر تک آنزیمی مبتنی بر مهار آنزیم کولین‌اکسیداز طراحی و ساخته شد. با به‌کارگیری نانولوله‌های کربنی (MWCNTs) در ساختار حسگر، به دلیل افزایش سطح مؤثر الکترود ناشی از کاربرد نانوساختارها و نیز بهبود انتقال الکترونی بین الکترود (حسگر) و الکترولیت حامل سم، پاسخ گزینش‌پذیر آن برای تعیین مقدار دیازینون به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در این پژوهش، نشان داده شد که درصد خطای تعیین مقدار دیازینون در نمونه مجهول با استفاده از زیست‌حسگر تک آنزیمی نسبت به نتیجه به‌دست آمده از سوانگاری ۳٫۵ ٪ است. با توجه به نتایج به‌دست آمده این حسگر پایداری و تکرارپذیری نسبی مناسب و مزایای کاربردی برای تشخیص مقدار دیازینون است.

www.SID.ir

Archive of SID

مراجع

[1] Fernando, R.; Clinical toxicology 33, 677-682, 1995.

[2] Barong, G.; Ling, L.; Qiujin, Z.; Bijin Z.; Asian Herptological Research 1 (2), 118-122, 2010.

[3] Mitchelmore, C.L.; Chipman J.K.; Mutation research 399, 135-47, 1998.

[4] Hiroaki, I.; Toyonori, N.; Eiji, T.; IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement 51, 886 – 890, 2002.

[5] Yu, I.S.; Lee, J.S.; Kim, S.D.; Kim, Y.H.; Park, H.W.; Ryu, H.J.; Lee, J.H.; Lee, J.M.; Jung, K.; Na, C. Joung, J.Y.; Son, C.G.; BMC Complement Altern Med. 17, 154-162, 2017.

[6] Emami, A.; Mousavi, Z.; Ramezani, V.; Shoeibi, S.; Rastegar, H.; Amirahmadi, M.; Emami, I.; Iranian Journal of Toxicology 11 (2), 1-6, 2017.

[7] *

*محمدی ، ش. و ایمانی، س.، فصلنامه گیاه پزشکی، ۴، ۵۷-۶۶، ۱۳۹۱.

[8] Husain, S.W.; Kiarostami, V.; Morrovati, M.; Tagebakhsh, M.R.; Acta Chromatographica 13, 208-214, 2003.

[9] Hazratian, T.; Abai, M.R.; Jalilian, A.; Bazrafkan, S.; Tavassoli, M.; Bakhshi, H.; Pirmohammadi, M.; Vatandoost, H.; Shayeghi, M.; Shayeghi, F.; Journal of Entomology and Zoology Studies 3, 412-415, 2015.

[10] Merkoci, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Perez, B.; Valle, M.; Alegret, S.; Trac-Trends in Analytical Chemistry, 24, 826-838, 2006.

[11] Li, F.; Wang, Z.; Shan, C.; Song, J.; Han, D.; Niu, L.; Biosensors and Bioelectronics 24, 1765-1770, 2008.

[12] *

*بنائی، ا.؛ پارسافر، ن.؛ غفوری، و.؛ بدراقی، ج.؛ پورفخرایی، ا.؛ نانومقیاس، (۲) ۴، ۲۴۷-۲۶۰، ۱۳۹۶.

[13] Mulchandani, P.; Mulchandani, A.; Kaneva, I.; Chen, W.; Biosensors & Bioelectronics 14, 77–85, 1999.

[14] Mulchandani, A.; Mulchandani, P.; Kaneva, I.; Chen, W.; Anal. Chem. 70, 4140-4145, 1998.

[15] Mulyasuryani, A.; Prasetyawan, S.; Anal Chem Insights. 10, 23–27, 2015.

[16] Everett, W.R.; Rechnitz, G.A.; Analytical Letters 32, 1-10, 1999.

[17] Albuquerque, Y.D.T.; Ferreira, L.F.; Analytica Chimica Acta 596, 210–221, 2007.

[18] Zehani, N.; Dzyadevych, S.V.; Kherrat, R.; Jaffrezic-Renault, N.J.; Frontiers In Chemistry 2 (44), 1-7, 2014.

[19] Vo-Dinh, T.; Cullum, B.; Fresenius journal of analytical chemistry 336, 540-551, 2000.

[20] Scouten, W.H.; Luong,, J.H.T.; Brown, R.S.;Trends in Biotechnolgy. 13, 178-185, 1995.

[21] Sajjadi, S.; Ghourchian, H.; Tavakoli, H.; Biosensors and Bioelectronics 24, 2509–2514, 2009.

[22] Palecek, E.; Fojta, M.; Analytical Chemistry 73, 74a-83a, 2001.

[23] Merkoci, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Perez, B.; Valle, M.; Alegret, S.; Trac-Trends in Analytical Chemistry 24, 826-838, 2005.

[24] Ciolkowski, M.L.; Fang, M.M.; Lund, M.E.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 22, 1037-1045, 2000.

[25] Sham, M.L.; Kim, J.K.; Carbon 44, 768-777, 2006.

[26] Lau, C.H.; Cervini, R.; Clarke, S.R.; Markovic, M.G.; Matisons, J.G.; Hawkins, S.C.; Huynh, C.P.; Simon, G.P.; Journal of Nanoparticle Research 10, 77-88, 2008.

www.SID.ir

Archive of SID

[27] Wang, C.; Zhou, G.; Liu, H.; Wu, J.; Qiu, Y.; Gu, B.L.; Duan, W.; The Journal of Physical Chemistry B 110 (21), 10266-10271, 2006.

[28] Sears, A.; Batra, R.C.; Phys. Rev. B Condensed matter. 73, 085410, 2006.

[29] Song, Y.S.; Polymer engineering and science 46, 1350-1357, 2006.

[30] https://www.sigmaaldrich.com

[31] Worthington, C.C.; The Worthington Manual, Worthington Biochemical Co.; Lakewood, 1988.

[32] Kok, F.N.; Bozoglu, F.; Hasirci, V.; Biosensors and Bioelectronics 17(6), 531-539, 2002.

[33] Karimi, S.; Ghourchian, H.; Rahimi, P.; Rafiee-Pour, H.A.; Anal. Methods 4, 3225-3231, 2012.

[34] Tavares, A.P.M.; Silva, C.G.; Drazic, G.; Silva, A.M.T.; Loureiro, J.M.; Faria, J.L.; Journal of Colloid and Interface Science 454, 52–60, 2015.

[35] Jiang, H.J.; Yang, H.; Akins, D.L.; Journal of Electroanalytical Chemistry 623, 181-186, 2008.

[36] Xiao, F.; Zhao, F.Q.; Li, J.W.; Yan, R.; Yu, J.J.; Zeng, B.Z.; Analytica Chimica Acta 596, 79-85, 2007.

[37] Bodmann, O.; Walter, M.; Biochimica Et Biophysica Acta 110, 496-506, 1965.

[38] Tavakoli, H.; Ghourchian, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Chilaka, F.C.; International journal of biological macromolecules 36 (5), 318-323, 2005.

[39] Trojanowicz, M.; Electroanalysis 14 (1920), 1311-1328, 2002.

[40] Jokar, M.; Safaralizadeh, M.H.; Hadizadeh, F.; Rahmani, F.; Kalani, M.R.; J Biomol Struct Dyn. 35 (2), 343-353, 2017.

[41] Yi, Y.; Zhu, G.; Liu, C.; Huang, Y.; Zhang, Y.; Li, H.; Zhao, J.; Yao, S.; Anal. Chem. 85 (23), 11464–11470, 2013.

[42] Motaharian, A.; Motaharian, F.; Abnous, K.; Hosseini, M.R.; Hassanzadeh-Khayyat, M., Anal Bioanal. Chem. 408 (24), 6769-79, 2016.

www.SID.ir

Archive of SID

JARC

Fabrication of choline oxidase enzyme-based nanobiosensor for the detection of diazinon and comparing its performance with the high performance liquid chromatography

Aghdas Banaei[1,*], Nahid Parsafar[2], Jalil Badraghi[1]

1. Assistant Prof. of Physics, Physics research group, Research Institute of Applied Science, Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR), University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran
2. Research coach, Physics research group, Research Institute of Applied Science, Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR), University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran

Recieved: November 2017, Revised: March 2018, Accepted: April 2018

Abstract: Organophosphorus compounds enter the environment naturally or after human use as pesticides or chemical fertilizers, and ultimately enter the food chain of organisms. Due to their undesirable effects, it is absolutely necessary to detect these toxins at very low concentrations before they enter the life cycle. Biosensors are suitable tools for detecting these toxins. In this study, a mono-enzyme biosensor based on inhibiting the cholineoxidase enzyme with its immobilization on a modified electrode with carboxylate carbon nanotubes was fabricated and in the presence of 1mM enzyme substrate (choline chloride), the minimum detection limit for diazinon was obtained (0.56 μM) and two linear ranges (1.5- 2.4 μM and 5.5-17.5 μM) was observed. The detection of low concentrations of diazinon by this biosensor and high performance liquid chromatography (HPLC) were compared. The result of the biosensor had 3.5% error relative to HPLC.

Keywords: Nanobiosensor, Diazinon, Cholineoxidase enzyme, Carboxylated carbon nanotube, HPLC

*Corresponding author Email: banaei@acecr.ac.ir

www.SID.ir