

## نانو زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر تثبیت آنزیم استیل کولین استراز روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو لوله‌های کربنی برای تعیین تری اتیل تیوفسففات

مصطفی نجفی<sup>۱\*</sup>، سید حیدر موسوی<sup>۲</sup>، تیمور نظام الاسلام<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، ۲- کارشناس ارشد و ۳- مربی دانشگاه جامع امام حسین(ع)

(دریافت: ۹۲/۰۲/۱۰، پذیرش: ۹۲/۱۰/۰۵)

### چکیده

در این تحقیق از یک روش ساده برای تثبیت کووالانسی آنزیمروی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله کربنی استفاده گردید و یک بیوحسگر حساس برای تعیین سریع تری اتیل تیوفسففات (شبه عامل اعصاب (VX)) تهیه شد. نانولوله کربنی، واکنش هیدرولیز آنزیمی را در سطح الکتروود بهبود بخشید و پاسخ حسگر ولتامتری را افزایش داد. تحت شرایط بهینه، بازداری <sup>۳۹</sup> تری اتیل تیوفسففات روی آنزیم استیل کولین استراز با افزایش غلظت این ترکیب در دامنه غلظتی ۰/۱۳-۰/۴۴ nM رابطه خطی داشت. حد تشخیص حسگر معادل با ۱۰ درصد کاهش جریان پاسخ مقدار ۰/۰۹۳ nM به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی برای تکرارپذیری زیست تحت شرایط بهینه و برای ۵ بار اندازه‌گیری ۳ درصد به دست آمد. همچنین زیست حسگر برای مدت بیش از دو ماه پایداری نشان داد.

**کلید واژه‌ها:** نانو زیست حسگر، استیل کولین استراز، نانولوله کربنی، تری اتیل تیوفسففات، شبه عامل اعصاب.

## Electrochemical Nanobiosensor Based on Immobilization of Acetylcholinesterase to Multiwall Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode for Determination of Triethylthiophosphate

M. Najafi\*, S. H. Musavi, T. Nezamoleslam

Imam Hossein University

(Received: 30/04/2013; Accepted: 26/12/2013)

### Abstract

A simple method has been developed for immobilization of acetylcholinesterase (AChE) covalent bonding to a multiwall carbon nanotube (MWNT) modified glassy carbon electrode and a sensitive biosensor for rapid determination of triethylethiophosphate (nerve agent (VX) simulant) is proposed. MWNT improved the interface enzymatic hydrolysis reaction and increased the voltammetric response of the sensor. Under optimum conditions, the inhibition of triethylethiophosphate on AChE increased linearly to triethylethiophosphate in the 0.13 to 0.44 nM concentration range. The detection limit was 0.093 nM taken as the concentration equivalent to 10% of inhibition. The reproducibility of the biosensors obtained under optimum condition was good: RSD of 3% was observed for five replicates using the same biosensor. The sensor was found to be stable for over 2 months.

**Keywords:** Nanobiosensor, Acetylcholinesterase, Carbon Nanotube, Triethylthiophosphate, Nerve Agent.

## ۱. مقدمه

ترکیبات ارگانو فسفره برای مقاصد گوناگون از جمله استفاده در سموم کشاورزی و یا استفاده در فرمولاسیون سلاح های شیمیایی مورد استفاده قرار گرفته اند. آشکارسازی و تعیین این ترکیبات بسیار مورد توجه قرار دارد. اثر ترکیبات ارگانو فسفره ناشی از تأثیر بر آنزیم های استراز بوده که مهم ترین آنها استیل کولین استراز است. این ترکیبات با مهار کولین استراز موجب مسمومیت و حتی مرگ فرد خواهند شد. توسعه روش هایی مناسب برای اندازه گیری میدانی ترکیبات ارگانو فسفره مستلزم روش هایی سریع، نسبتاً کم هزینه، حساس و بدون نیاز به مراحل آماده سازی نمونه می باشد. مطالعه منابع نشان می دهد تنها تعداد محدودی از روش ها، می توانند چنین خصوصیتی را برآورده سازند. این روش ها بر اساس مکانیسم حسگری در سه دسته اصلی زیر طبقه بندی می شوند:

- بازداری کولین استراز
- ایمنی سنجی
- واکنش با ارگانو فسفروس هیدرولاز (OPH)

اولین زیست حسگر بر اساس بازداری اثر آنزیم کولین استراز برای آشکارسازی عوامل اعصاب در سال ۱۹۶۲ توسط گیلبات<sup>۱</sup> ارائه شد [۱] و پس از آن تعداد فراوانی زیست حسگر بر اساس بازداری آنزیم کولین استراز برای آنالیت های مختلف از جمله فلزات سنگین، توکسین ها، داروها، و حشره کش های ارگانو فسفره و کاربامیک<sup>۲</sup> گزارش شده است. بیشترین درصد مقالات منتشر شده مربوط به حشره کش ها است که از یک طرف به دلیل اهمیت دستیابی به حد تشخیص های بسیار کم (در حد ppb) برای آنالیز وجود این مواد در محیط زیست و منابع غذایی و از طرف دیگر و دستورات عمل ساده تر و ایمن تر نسبت به کار با عوامل اعصاب است. مکانیسم بازداری آنزیم بر اساس اثر بازداری آنالیت بر تعیین فعالیت آنزیم قبل و بعد از برهمکنش با ترکیب ارگانو فسفره است. واکنش های زیر در سطح زیست حسگر اتفاق می افتد و نشان دهنده مکانیسم بازداری و اساس حسگرهای الکتروشیمیایی برای تعیین ترکیبات ارگانو فسفره به عنوان ترکیبات بازدارنده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را نشان می دهد:

(در حضور بازدارنده) استیل کولین استراز غیر فعال → استیل کولین استراز

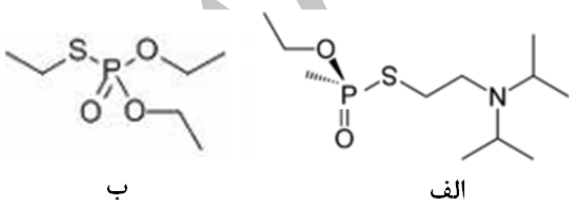
(در حضور آنزیم استیل کولین استراز) استیک اسید + تیوکولین دیمر شده → آب + استیل تایو کولین

$2e^- + 2H^+ +$  تیوکولین دیمر شده → ۲ تیوکولین

ترکیبات ارگانو فسفره به عنوان مهار کننده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز شناخته می شوند (واکنش ۱). معمولاً نمک کلرید استیل تایوکولین به عنوان سوبسترا استفاده می گردد (واکنش ۲) و به وسیله اندازه گیری جریان اکسیداسیون قبل و بعد از حضور ارگانو فسفره (بازدارنده)، میزان فعالیت آنزیم اندازه گیری می شود (واکنش ۳).

مطالعات تجربی بیانگر ارتباط خطی بین میزان بازداری و غلظت بازدارنده در محلول می باشد که بر این اساس بیوحسگرهای مختلفی برای آشکارسازی ترکیبات ارگانو فسفره توسعه یافته اند [۲ و ۳]. به طور هم زمان انواع مختلف سیستم های مبدل مانند پتانسیومتری [۴]، آمپرومتری [۵] ترانزیستور اثر میدان [۶] بیوحسگرهای نوری [۷]، فلورسانس [۸] و شناساگرهای رنگ سنجی [۹] توسط گروه های تحقیقاتی مختلف در دنیا برای آشکارسازی و تعیین ترکیبات ارگانو فسفره مورد آزمایش و تحقیق قرار گرفته اند [۱۰].

با توسعه روز افزون نانو فناوری طی دو دهه اخیر، تهیه و کاربرد نانو مواد در تحقیقات وابسته به حسگرهای شیمیایی رشد قابل توجهی داشته است. حسگرهای الکتروشیمیایی برای ترکیبات ارگانو فسفره از جمله حسگرهایی هستند که به دلیل اهمیت بالای اندازه گیری این ترکیبات به مقدار زیادی در این حوزه مورد توجه قرار گرفته اند. زیست حسگرهای تک آنزیمی با استفاده از الکتروود پلاتین به عنوان الکتروود کار و تثبیت آنزیم استیل کولین استراز و اندازه گیری تیوکولین در  $mV +450$  در مقابل الکتروود مرجع Ag/AgCl توسعه یافته است [۱۱]. برای کاهش پتانسیل اعمال شده از دو روش زیر استفاده شده است. به کارگیری واسطه های ردوکس مانند کبالت فتالوسیانین [۱۲]، پروسین بلو [۱۳]، تتراسیانوکوینودی متان [۱۴]، کبالت هگزاسیانوفرات [۱۵]، پتاسیم فری سیانید [۱۶]، یا استفاده از مواد جدید مانند نانو لوله های کربنی [۲۲-۱۷]. در میان استرهای فسفات، مشتقات فسفره تاپوئات به عنوان ترکیبات سمی و آفت کش مورد توجه هستند. تری اتیل تیوفسففات یکی از مشتقات این دسته ترکیبات است. این ماده با نام آیوپاک O,O,S-Triethylphosphorothioate شناخته می شود و به عنوان شبه عامل اعصاب ساختاری شبیه به عوامل VX دارد (شکل ۱). در این کار تحقیقاتی یک حسگر الکتروشیمیایی بر مبنای اصلاح الکتروود با نانو لوله کربنی و آنزیم استیل کولین استراز تهیه شده و توانایی آن برای آشکارسازی شبه عامل اعصاب تری اتیل تیوفسففات مورد ارزیابی قرار گرفته است.



شکل ۱. ساختار مولکولی الف (VX) و ب) تری اتیل تیوفسففات

## ۲. بخش تجربی

## ۲-۱. مواد

استیل کولین استراز (AChE 236 U/mg) و استیل تایوکولین کلراید (ATCI) از شرکت سیگما آلدریج و نانو لوله های چند دیواره کربنی نیز از شرکت NanoLab خریداری شدند. سایر مواد مورد استفاده نیز دارای خلوص تجزیه ای بوده و از شرکت مرک یا سیگما

<sup>1</sup>Guilbaut

<sup>2</sup>Carbammic

۴ میکرولیتر از محلول آنزیم استیل کولین استراز (۲۰۰ میلی واحد، حاوی ۵ میلی گرم در یک میلی لیتر از BSA) روی الکتروود قرار گرفته و الکتروود به منظور تثبیت آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار می‌گیرد. در این مدت پیوندهای کووالانسی بین آنزیم و CMC توسط گروه‌های آزاد CHO که گلوترآلدئید را به مولکول‌های کیتوسان متصل کرده‌اند برقرار می‌شود. پس از تبخیر آب، حسگر به منظور پاک شدن مقادیر اضافی آنزیم به وسیله محلول بافر فسفات (pH=۷) شستشو داده شد. در این زمان حسگر آماده شده و می‌تواند در آزمایش مورد استفاده قرار گیرد. این حسگر در زمان‌هایی که مورد نیاز نمی‌باشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

#### ۲-۵. روش کار و محاسبات

حسگر آماده شده با روبش‌های ولتامتری چرخه‌ای بین ۰/۲ تا ۰/۸ ولت در محلول بافر فسفات تا دستیابی به منحنی پایدار فعال‌سازی گردید. سپس الکتروود اصلاح شده به سل الکتروشیمیایی حاوی محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار و ATCl ۰/۶۴ میلی مولار منتقل شده و پاسخ الکتروشیمیایی با روش ولتامتری چرخه‌ای ثبت گردید (i<sub>p,control</sub>). به منظور تعیین درصد بازداری آنزیم، الکتروود اصلاح شده برای ۱۰ دقیقه در محلول‌های تری اتیل تیوفسفات باغلظت‌های متفاوت غوطه‌ور شد. الکتروود پس از هر بار غوطه‌وری به سل الکتروشیمیایی حاوی ۰/۶۴ میلی مول سوبسترا منتقل و پس از انجام ولتامتری چرخه‌ای در هر غلظت، پاسخ الکتروود (i<sub>p,exp</sub>) ثبت شد. درصد بازداری آنزیم از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$Inhibition(\%) = 100 \times (i_{p,control} - i_{p,exp}) / i_{p,control}$$

#### ۳. نتایج و بحث

شکل (۲) تصویر میکروسکوپ الکترونی پویشی نانو لوله‌های کربنی مورد استفاده برای اصلاح سطح الکتروود را نشان می‌دهد. قطر نانو لوله‌های کربنی با توجه به شکل (۲) حدود ۶۰-۴۰ nm تخمین زده می‌شود.

#### ۳-۱. رفتار الکتروشیمیایی حسگر

شکل (۳) الف تا د رفتار الکتروشیمیایی الکتروود کربن شیشه‌ای (GCE)، الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با مخلوط گلوترآلدئید، کیتوسان و نانو لوله کربنی (GCE/CMC) و الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با مخلوط گلوترآلدئید، کیتوسان و نانو لوله کربنی به اضافه آنزیم استیل کولین استراز (GCE/CMC-AChE) را در محلول بافر فسفات در حضور و عدم حضور استیل تایوکولین (سوبسترا) نشان می‌دهد. به جز الکتروود GCE/CMC-AChE در حضور سوبسترا، برای باقی الکتروودها تنها جریان زمینه مشاهده شد. این رفتار به عنوان واکنش بین سوبسترا و آنزیم تنها واکنش قابل انتظار است که به خوبی مشاهده شده است. پیک اکسیداسیون مشاهده شده پتانسیل ۰/۷ ولت مربوط به اکسایش تایوکولین بوده که خود

تهیه شده‌اند. تری اتیل تایو فسفات از واکنش تری اتیل فسفات با تتراکلرید کربن و بروموتری کلرومتان در حضور بوتان-۱- تیول سنتز شد و به روش‌های اسپکتروسکوپی شناسایی گردید [۲۳].

#### ۲-۲. دستگاه‌ها

اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی به وسیله دستگاه پتانسیوستا/گالوانواستا مدل μAutolabtype III Far 2 ساخت شرکت ECO CHEMIE و با استفاده از سیستم سه الکتروودی شامل الکتروود SCE به عنوان الکتروود مرجع، الکتروود پلاتین به عنوان کمکی و الکتروود کربن شیشه‌ای (GCE) اصلاح شده به عنوان الکتروود کار انجام شده است. از نرم‌افزار GPES برای کنترل دستگاه پتانسیوستا و ثبت داده‌ها استفاده شده است. الکتروود GC با قطر ۲ میلی متر ساخت شرکت متروهم بود. دستگاه اولتراسونیک مدل VGT-173-QTD ساخت کشور کره جنوبی برای تمیزسازی سطح الکتروود استفاده شده است. همچنین از دستگاه میکروسکوپ الکترونی مدل (SEMmodelVEGA) برای تعیین مشخصات نانولوله کربنی استفاده شده است.

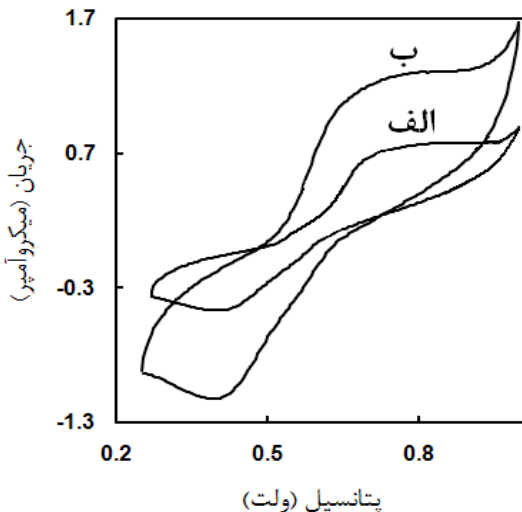
#### ۲-۳. آماده‌سازی الکتروود کربن شیشه‌ای

الکتروود کربن شیشه‌ای به وسیله کیت پولیش BAS و پودر Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> پولیش داده شد تا به یک سطح آینه‌ای برسد. سپس الکتروود در محلول آب و اتانول و در حمام التراسونیک به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد. در ادامه الکتروود به سل الکتروشیمیایی حاوی محلول بافر (pH=۵) منتقل شده و به آن پتانسیل ۱/۷۵+ ولت به مدت ۳۰۰ ثانیه اعمال گردید. الکتروود در پتانسیل‌های ۰/۳ تا ۱/۲۵ و ۰/۳ تا ۱/۳- تحت روبش قرار گرفت تا الکتروود جریان زمینه ثابتی را نشان دهد. سپس الکتروود با آب مقطر شستشو داده شده برای اصلاح با نانولوله کربنی آماده گردید.

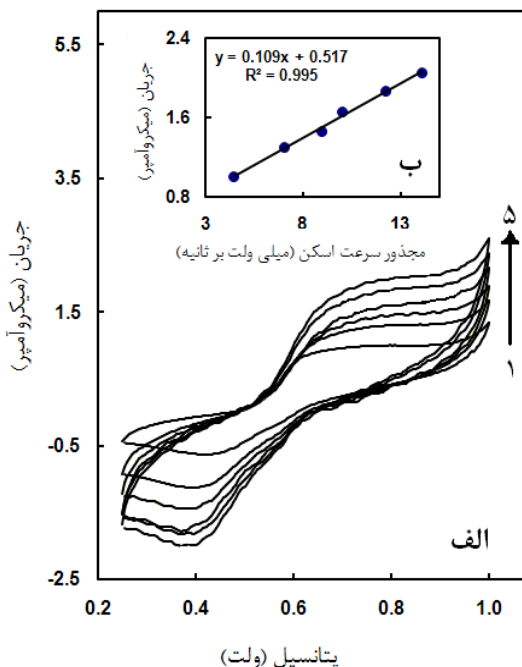
#### ۲-۴. ساخت نانو زیست حسگر

محلول کیتوسان ۰/۵٪ با حل کردن پودر کیتوسان در محلول آبی استیک اسید pH=۵ به دست آمد. این محلول در زمان‌هایی که مورد نیاز نمی‌باشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. ۵ میکرولیتر از گلوترآلدئید ۲۵٪ با یک میلی لیتر محلول کیتوسان ۰/۵٪ مخلوط شده و این مخلوط به مدت ۲ دقیقه هم زده شد تا بین کیتوسان و گروه‌های CHO آزاد پیوند برقرار شود. ۰/۱ میلی گرم نانولوله کربنی چند دیواره به این مخلوط اضافه گردید و برای دستیابی به یک محلول یکنواخت به مدت ده دقیقه در حمام التراسونیک قرار داده شد. ترکیب نسبی نانولوله کربنی چند دیواره، کیتوسان و گلوترآلدئید (CMC) در مخلوط به ترتیب برابر ۰/۱۲ و ۰/۴۷ و ۰/۴۱ (v/v) می‌باشد. برای آماده‌سازی حسگر ۲ میکرولیتر از این مخلوط بر روی الکتروود قرار داده شده و برای تثبیت آن الکتروود به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از این زمان سطح الکتروود به منظور پاک شدن مقادیر اضافی گلوترآلدئید به وسیله آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده شد. سپس

شکل (۵) بررسی سرعت اسکن بر فرایند الکترودی حاصل از اکسایش و کاهش سوپسترا بر سطح الکتروده را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل (۵-ب) مشخص است، جریان آندی با افزایش سرعت اسکن پتانسیل افزایش یافته و با مجذور سرعت اسکن رابطه خطی دارد که نشان دهنده کنترل این فرایند الکترودی با پدیده انتشار است.

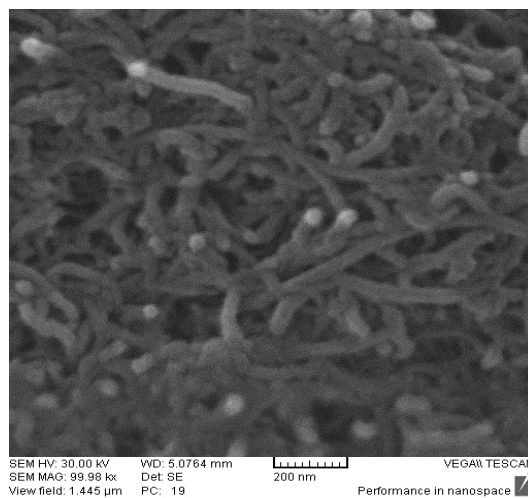


شکل ۴. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الف) AChE-CMC/GCE (ب) AChE- CMC/GCE در بافر فسفات (pH=7) حاوی ۰/۶۴ mM استیل تیوکولین، سرعت اسکن  $50 \text{ mVs}^{-1}$

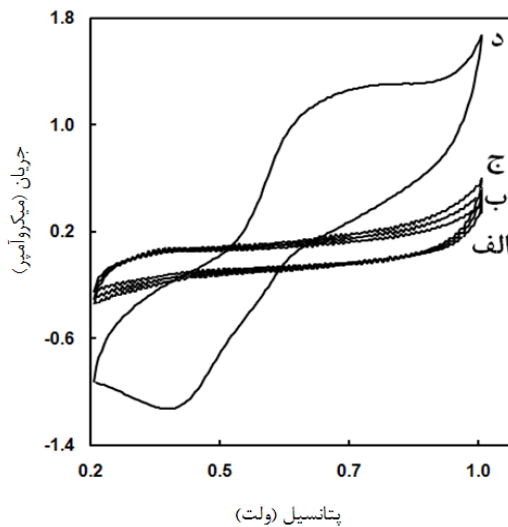


شکل ۵. الف) ولتاموگرام‌های چرخه‌ای AChE-CMC/GCE در بافر فسفات (pH=7) حاوی ۰/۶۴ mM استیل تیوکولین در سرعت اسکن (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰  $\text{mVs}^{-1}$ ) ب) رابطه بین مجذور سرعت اسکن و جریان‌های پیک

محصول هیدرولیز استیل تیوکولین توسط آنزیم تثبیت شده روی الکتروده است. چنین رفتاری برای الکترودهای مشابه در منابع علمی گزارش شده است [۲۴].



شکل ۶. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو لوله‌های کربنی مورد استفاده برای اصلاح الکتروده



شکل ۷. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الف) AChE-CMC/GCE در بافر فسفات (pH=7) GCE/CMC (ب) GCE/CMC (ج) AChE-CMC/GCE در بافر فسفات حاوی ۰/۶۴ mM استیل تیوکولین، سرعت اسکن  $50 \text{ mVs}^{-1}$

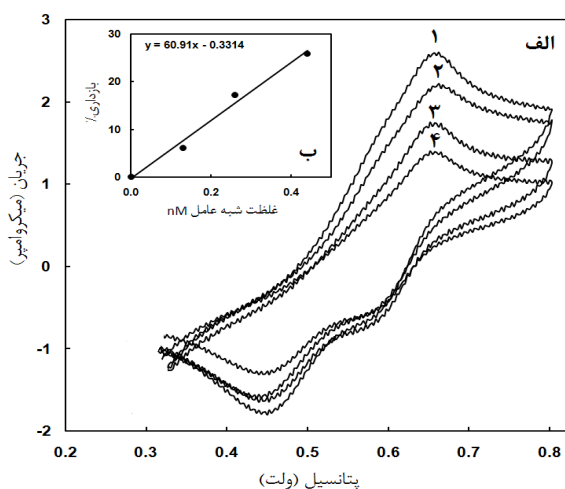
برای بررسی تأثیر نانولوله کربنی بر پاسخ الکتروده، ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکترودهای GCE/CMC و AChE-CMC/GCE در بافر فسفات (pH=7) حاوی ۰/۶۴ mM استیل تیوکولین ثبت شد شکل (۴) همان‌گونه که در شکل (۴) مشاهده می‌شود پیک جریان در حضور نانو لوله کربنی افزایش یافته بزرگ‌تر و پتانسیل اکسایش تا حدودی به سمت منفی جابه‌جا شده است. علت این امر خواص ذاتی هدایت الکتریکی، تأثیر کاتالیزوری و سطح بیشتر نانولوله‌های کربنی می‌باشد (شکل ۴).

## ۲-۳ اثر پارامترهای مختلف بر پاسخ نانو زیست حسگر

اثر مقدار نانو لوله کربنی بر پاسخ حسگر مورد بررسی قرار گرفته است. با افزایش مقدار نانولوله کربنی جریان پاسخ حسگر افزایش می‌یابد ولی مقادیر بیش از  $0.1$  میلی‌گرم بر لیتر احتمالاً به دلیل کلوخه شدن نانولوله‌ها و افزایش مقاومت و ظرفیت لایه دوگانه الکتریکی الکترواد اصلاح شده سبب کاهش جریان می‌گردد. بنابراین مقدار  $0.1$  میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان مقدار بهینه برای اصلاح سطح الکترواد انتخاب شد. زمان آنکوباسیون به‌صورت زمان واکنش آنزیم با بازدارنده تعریف می‌شود. برای بازداری برگشت ناپذیر امکان رسیدن به حد تشخیص‌های پایین‌تر با افزایش زمان آنکوباسیون وجود دارد، در واقع معمولاً درجه بازداری آنزیم با افزایش زمان آنکوباسیون افزایش می‌یابد تا در نهایت یک حالت ثابت ایجاد شود. انتخاب زمان آنکوباسیون معمولاً با در نظر گرفتن حالت مناسبی بین حساسیت و زمان کلی آنالیز انتخاب می‌شود. در این تحقیق زمان‌های  $2-20$  دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. بهترین زمان آنکوباسیون که در آن بهترین بازداری آنزیم مشاهده شد  $10$  دقیقه به‌دست آمد. بررسی مقالات منتشر شده در زمینه حسگرهای مبتنی بر آنزیم AChE [۲۵] نشان داد بهترین pH که در آن بیشترین پاسخ برای حسگر مشاهده می‌شود pH خنثی بین  $7.4$  تا  $7.4$  است. بر این اساس محلول بافر فسفات با  $pH=7$  برای بررسی پاسخ حسگر انتخاب گردید. بررسی تأثیر غلظت سوبسترا (ATCI) بر رفتار حسگر مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آن در شکل (۶) نشان داده شده است. نتایج نشان داد افزایش غلظت سوبسترا تا غلظت  $0.64$  میلی‌مولار سبب افزایش جریان حسگر می‌شود و از آن به بعد ثابت می‌ماند. علت این امر احتمالاً تکمیل ظرفیت سایت‌های فعال آنزیم در غلظت‌های بالاتر از  $0.64$  میلی‌مولار می‌باشد. بنابراین غلظت  $0.64$  میلی‌مولار به‌عنوان غلظت سوبسترا برای بررسی پاسخ حسگر انتخاب شد.

## ۳-۳ اثر شبه عامل بر پاسخ الکتروشیمیایی نانو زیست حسگر

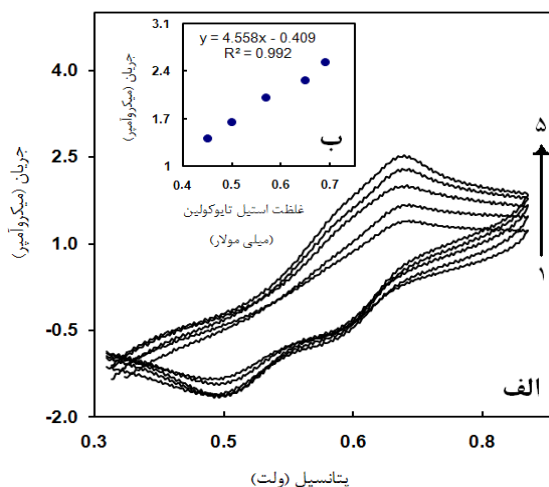
شبه عامل تری اتیل تایو فسفات به‌عنوان یک مهار کننده واکنش بین استیل تایوکولین و آنزیم استیل کولین استراز شناخته می‌شود. اندازه‌گیری بازداری بعد از آنکوباسیون لایه آنزیم موجود در سطح الکترواد با غلظت‌های مختلف سوبسترا انجام می‌شود. در این شرایط کاهش در پاسخ حسگر تنها به برهم کنش بین آنزیم و بازدارنده وابسته می‌باشد. بر این اساس تعیین پاسخ نانو زیست حسگر در محدوده غلظتی  $0.13$  تا  $0.44$  نانو مولار انجام شد. همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت شبه عامل در محلول آنکوباسیون پاسخ حسگر به‌طور خطی تغییر می‌یابد. حد تشخیص به‌عنوان غلظتی از شبه عامل که  $10\%$  در فعالیت AChE بازداری ایجاد کند تعریف می‌شود [۲۶]. مطابق با این تعریف حد تشخیص نانو زیست حسگر  $0.93$  نانو مولار به‌دست آمد.



شکل ۷. الف) نمودار ولتامتری چرخه‌ای AChE-CMC/GCE در محلول  $0.64$  میلی‌مولار استیل تایوکولین (۱) قبل از آنکوباسیون با شبه عامل (۴-۲) به ترتیب پس از  $10$  دقیقه آنکوباسیون با شبه عامل در غلظت‌های  $0.13$ ،  $0.26$  و  $0.44$  نانو مولار، سرعت اسکن  $50 \text{ mVs}^{-1}$  (ب) منحنی کالیبراسیون شبه عامل

## ۳-۴ پایداری، تکثیرپذیری و تکرارپذیری پاسخ نانو زیست حسگر

نانو زیست حسگر برای مطالعه پایداری در محلول  $0.64$  میلی‌مولار استیل تایوکولین و پس از آنکوباسیون با محلول  $0.26$  نانو مولار شبه عامل در یک دوره زمانی دو ماهه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دهنده ایجاد پاسخی حدود  $90\%$  درصد پاسخ نانو زیست حسگر اولیه می‌باشد. برای بررسی تکثیرپذیری،  $5$  حسگر در شرایط مشابه و در روزهای متفاوت تهیه و پاسخ آنها در شرایط مشابه اندازه‌گیری شد. انحراف استاندارد نسبی بین پاسخ این حسگرها  $8\%$  به‌دست آمد. همچنین تکرارپذیری حسگر با تعیین  $5$  پاسخ یکی از حسگرها در یک روز مورد بررسی قرار گرفت. انحراف استاندارد نسبی به‌دست



شکل ۶. الف) ولتاموگرام‌های چرخه‌ای AChE-CMC/GCE در بافر فسفات ( $pH=7$ ) حاوی غلظت‌های متفاوت استیل تایوکولین (۱)  $(0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0)$  میلی‌مولار. سرعت اسکن  $50 \text{ mVs}^{-1}$  و رابطه بین غلظت و جریان‌های پیک (ب)

شبه عامل‌ها یا ترکیبات ارگانوفسفره را نشان می‌دهد. همان‌گونه که از جدول مشخص است، زیست حسگر تهیه شده دارای داده‌هایی قابل مقایسه و در برخی موارد بهتر از آنچه برای گونه‌های مشابه در منابع علمی گزارش شده است می‌باشد.

آمده برای این اندازه‌گیری‌ها ۳٪ به‌دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد حسگر از نظر پایداری و قابلیت تکرارپذیری در تهیه و اندازه‌گیری‌ها بسیار مناسب می‌باشد.

جدول (۱) مقایسه برخی داده‌های حاصل از زیست حسگر تهیه شده برای تری اتیل تیو فسفات و زیست حسگرهای دیگر برای برخی

جدول ۱. مقایسه داده‌های حاصل از زیست حسگر تهیه شده با برخی کارهای قبلی مشابه

روش	آنالیت	محدوده غلظتی (M)	حد تشخیص (M)	مرجع
آمپرومتری تزریق در جریان	Paraoxan	$1 \times 10^{-13}$ تا $1 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-13}$	۱۸
آمپرومتری تزریق در جریان	Sulfotep	$1/5 \times 10^{-6}$ تا $8 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-9}$	۱۹
آمپرومتری	Methyl Parathion	$2 \times 10^{-6}$ تا $1 \times 10^{-6}$	$8 \times 10^{-8}$	۲۰
	Paraoxan	$2 \times 10^{-6}$ تا $1 \times 10^{-6}$	$15 \times 10^{-8}$	۲۰
ولتامتری	Carbaryl	$2 \times 10^{-6}$ تا $15 \times 10^{-6}$	$3/0 \times 10^{-8}$	۲۷
	Parathion	$2 \times 10^{-6}$ تا $15 \times 10^{-6}$	$3/5 \times 10^{-8}$	۲۷
ولتامتری	Carbaryl	$9/9 \times 10^{-5}$ تا $4/9 \times 10^{-6}$	$1/9 \times 10^{-7}$	۲۲
ولتامتری	O,O,S-Triethylphosphorothioate	$1/3 \times 10^{-10}$ تا $4/4 \times 10^{-10}$	$9/3 \times 10^{-11}$	کار حاضر

Hydrolase on Silica Supports"; Biosens. Bioelectron. 1999, 14, 703-713.

- [7] Andreou, V. G.; Clonis, Y. D. "A Portable Fiber-Optic Pesticide Biosensor Based on Immobilized Cholinesterase and Sol-Gel Entrapped Bromocresol Purple for In-Field Use"; Biosens. Bioelectron. 2002, 17, 61-69.
- [8] Tsai, H.; Doong, R. "Simultaneous Determination of PH, Urea, Acetylcholine and Heavy Metals using Array-Based Enzymatic Optical Biosensor"; Biosens. Bioelectron. 2005, 20, 1796-1804.
- [9] Wong, F. C. M.; Ahmad, M.; Heng, L. Y.; Peng, L. B. "An Optical Biosensor for Dichlofos Using Stacked Sol-Gel Films Containing Acetylcholinesterase and A Lipophilic Chromoionophore"; Talanta 2006, 69, 888-893.
- [10] Jaffrezic-Renault, N. "New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides"; Sensors 2001, 1, 60-74.
- [11] Pohanka, M.; Dobes, P.; Dritinova, L.; Kuca, K. "Nerve Agents Assay Using Cholinesterase Based Biosensor"; Electroanal. 2009, 21, 1177-1182.
- [12] Hart, J. P.; Hartley, I. C. "Voltammetric and Amperometric Studies of Thiocholine at a Screen-Printed Carbon Electrode Chemically Modified with Cobalt Phthalocyanid: Studies Towards a Pesticide Sensor"; Analyst 1994, 119, 259-263.
- [13] Ricci, F.; Arduini, F.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, P. "Characterization of Prussian Blue Modified Screen Printed Electrodes for Thiol Detection"; J. Electroanal. Chem. 2004, 563, 229-237.
- [14] Hernandez, S.; Palchetti, I.; Mascini, M. "Determination of Anticholinesterase Activity for Pesticides Monitoring Using a Thiocholine Sensor"; Int. J. Environ. Anal. Chem. 2000, 78, 263-278.
- [15] Arduini, F.; Cassisi, A.; Amine, A.; Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, P. "Electrocatalytic Oxidation of Thiocholine at Chemically Modified Cobalt Hexacyanoferrate Screen-Printed Electrodes"; J. Electroanal. Chem. 2009, 626, 66-74.
- [16] Neufeld, T.; Eshkenazi, I.; Cohen, E.; Rishpon, J. A. "Micro Flow Injection Electrochemical Biosensor for Organophosphorus Pesticides"; Biosens. Bioelectron. 2000, 15, 323-329.

#### ۴. نتیجه‌گیری

در این مقاله یک روش ساده و مؤثر برای تثبیت آنزیم کولین استراز بر روی الکترواد اصلاح شده با نانولوله کربنی ارائه شده است. ماتریکس مورد استفاده در این روش مانع از نشت آنزیم از سطح الکترواد شده و به دلیل خواص غیرسمی بودن و زیست سازگار بودن باعث حفظ خواص بیولوژیکی آنزیم می‌گردد. پاسخ سریع، حساسیت بالا، پایداری قابل قبول مشاهده شده برای این نانو زیست حسگر می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای آشکارسازی ترکیبات ارگانوفسفره در آب مورد استفاده قرار گیرد.

#### ۵. مراجع

- [1] Guilbault, G. G.; Kramer, D. N.; Cannon, P. L. "Electrochemical Determination of Organophosphorus Compounds"; Anal. Chem. 1962, 34, 1437-1439.
- [2] Andreescu, S.; Marty, J. L. "Twenty Years Research in Cholinesterase Biosensors: from Basic Research to Practical Applications"; Biomol. Eng. 2006, 23, 1-15.
- [3] Schulze, H.; Vorlov, S.; Villatte, F.; Bachmann, T. T.; Schmid, R. D. "Design of Acetylcholinesterases for Biosensor Applications"; Biosens. Bioelectron. 2003, 18, 201-209.
- [4] Suwansa-ard, S.; Kanatarana, P.; Asawatreratanakul, P.; Limsakul, C.; Wongkittisuksa, B.; Thavarungkul, P. "Semi Disposable Reactor Biosensors for Detecting Carbamate Pesticides in Water"; Biosens. Bioelectron. 2005, 21, 445-454.
- [5] Waibel, M.; Schulze, H.; Huber, N.; Bachmann, T. T. "Screen-Printed Bionzymatic Sensor Based on Sol-Gel Immobilized *Nippostrongylus brasiliensis* Acetylcholinesterase and a Cytochrome P450BM-3 (CYP102-A1) Mutant"; Biosens. Bioelectron. 2006, 21, 1132-1140.
- [6] Singh, A.; Flounders, A.; Volponi, J.; Ashley, C.; Wally, K.; Shoeniger, J. "Development of Sensors for Direct Detection of Organophosphates. Part I: Immobilization, Characterization and Stabilization of Acetylcholinesterase and Organophosphate

- [22] Cai, J.; Du, D. "A Disposable Sensor Based on Immobilization of Acetylcholinesterase to Multiwall Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Electrode for Determination of Carbary"; *J. Appl. Electrochem.* 2008, 38, 1217-1222
- [23] Ali-Hosseini, M. "Formulation of Activated Hydrogen Peroxide Gel and Investigation of VX Nerve Agent Stimulant Decontamination"; MS Thesis, Imam Hossein University, 2010, (In Persian).
- [24] Du, D.; Huang, X.; Cai, J.; Zhang, A. "Comparison of Pesticide Sensitivity by Electrochemical Test Based on Acetylcholinesterase Biosensor"; *Biosen. Bioelectron.* 2007, 23, 285-289.
- [25] Tumturk, H.; Sahin, F.; Demirel G. "A New Method for Immobilization of Acetylcholinesterase"; *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2007, 30, 141-145.
- [26] Arvent, A.; Rotariu, L.; Bala, C. "Development of a Pesticides Biosensor Using Carbon-Based Electrode System"; *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats NATO Security through Science Series*, 2006, 337-343.
- [27] Pedrosa, V. A.; Caetano, J.; Machado, S. A. S.; Freire, R. S.; Bertotti, M. "Acetylcholinesterase Immobilization on 3-Mercaptopropionic Acid Self Assembled Monolayer for Determination of Pesticides"; *Electroanal.* 2007, 19, 1415-1420.
- [17] Wang, J.; Timchalk, L. Y. "Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensor for Assay of Salivary Cholinesterase Enzyme Activity: An Exposure Biomarker of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents"; *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 2688-2693.
- [18] Liu, G.; Lin, Y. "Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents"; *Anal. Chem.* 2006, 78, 835-843.
- [19] Kandimalla, V. B.; Ju, H. "Binding of Acetylcholinesterase to Multiwall Carbon Nanotube-Cross-Linked Chitosan Composite for Flow-Injection Amperometric Detection of an Organophosphorous Insecticide"; *Chem. Eur. J.* 2006, 12, 1074-1080
- [20] Deo, R. P.; Wang, J.; Block, I.; Mulchandani, A.; Joshi, K. A.; Trojanowicz, M.; Scholz, F.; Chen, W.; Lin, Y. "Determination of Organophosphate Pesticides at a Carbon Nanotube/Organophosphorus Hydrolase Electrochemical Biosensor"; *Analytica Chimica Acta* 2005, 530, 185-189.
- [21] Ion, A. C.; Ion, I.; Culetu, A.; Gherase, D.; Moldovan, C. A.; Iosub, R.; Dinescu, A. "Acetylcholinesterase Voltammetric Biosensors Based on Carbon Nanostructure Chitosan Composite Material for Organophosphate Pesticides"; *Materials Sci. Eng.* 2010, 30, 817-821.

Archive of SID