قابل دسترس در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

تعیین مقدار گلوکوز به روش آمپرسنجی با استفاده از الکترود اصلاح‌شده پلی‌آنیلین ـ گلوتارآلدهید ـ گلوکوز اکسیداز

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال بیست و پنجم، شماره ۶،
صفحه ۴۳۱-۴۲۱، ۱۳۹۱
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883

علی کیهان‌پور، سید محمد سید محقق*، احمد جمشیدی

تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۱۴۹۶۵

دریافت: ۹۰/۱۱/۱۲، پذیرش: ۹۱/۱۱/۴

Archive of SID

چکیده

در این پژوهش، الکترود اصلاح‌شده پلی‌آنیلن ـ گلوکوز اکسیداز (PANI-GOD) بررسی شده است. برای تهیه فیلم پلی‌آنیلین (PANI) از صفحه پلاتینی ۰/۴ cm × ۰/۴ به عنوان الکترود کار، الکترود میله‌ای پلاتین به عنوان الکترود کمکی و الکترود Ag/AgCl به عنوان الکترود مرجع استفاده شد. برای تهیه فیلم، روش ولت‌سنجی چرخه‌ای از پتانسیل ۰/۱ V- تا ۱ V با سرعت پویش ۵۰ mV/s به تعداد ۳۰ پویش در محلول حاوی ۰/۲ M آنیلین و ۱ M سولفوریک اسید استفاده شد. خواص فیلم پلیمری تشکیل شده با روش‌های الکتروشیمیایی، طیف‌سنجی نوری UV-Vis، طیف‌سنجی تبدیل فوریه زیرقرمز و امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شده است. از روش ساده‌ای برای تولید حسگرهای گلوکوز استفاده شد. برای این کار آنزیم گلوکوز اکسیداز با استفاده از محلول ۰/۱ درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوتارآلدهید) در محیط بافر فسفات با pH برابر ۷ روی فیلم‌های نازک پلیمر تثبیت شد. نتایج حاصل از امپدانس الکتروشیمیایی نشان داد، آنزیم به‌طور موفقیت‌آمیزی روی فیلم‌های پلیمری تثبیت شده است. در این پژوهش، اثر بعضی از شرایط آزمایشگاهی مختلف مثل حجم عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوتارآلدهید)، pH، دما و پتانسیل کاربری به روش جریان‌سنجی بررسی شده است. نتایج نشان داد، با تغییر درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده فعالیت الکترودهای اصلاح‌شده نیز تغییر می‌کند. بیشترین فعالیت در ۰/۱ در صد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوتارآلدهید) مشاهده شده است. انرژی فعال‌سازی برای الکترود اصلاح‌شده پلی‌آنیلین، در محیط بافری استات و فسفات به ترتیب ۴۱ و ۳۷ kJ/mol به‌دست آمد. بیشترین جریان الکتریکی در این زیست‌حسگرها در pH برابر ۷ و پتانسیل ۰/۶۵ V دیده شد.

واژه‌های کلیدی

پلی‌آنیلین،
گلوتارآلدهید،
آمپرسنجی،
زیست‌حسگر،
گلوکوز اکسیداز

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
s.m.mohaghegh@ippi.ac.ir

مقدمه

امروزه حسگرهای زیستی در زمینه‌های مختلف پزشکی، تولید فراورده‌های دارویی و بهداشتی، صنایع غذایی، صنایع شیمیایی و پایش محیط زیست استفاده می‌شوند [۱،۲]. حسگرهای زیستی ابزارهای توانمندی در شناسایی مولکول‌های زیستی هستند. از این دیدگاه، حسگرهای زیستی کاربرد گسترده‌ای در تشخیص‌های طبی و علوم آزمایشگاهی دارند. گلوکوز نقش بسیار مهمی در سوخت‌وساز فعالیت‌های زیستی دارد، به همین منظور از بین تمام زیست‌حسگرها، زیست‌حسگرهای قند خون یکی از کاربردهای شناخته شده آنهاست. در حال حاضر با توجه به شیوع بیماری دیابت در جهان، تقاضای قابل توجهی برای حسگرهای گلوکوز در اندازه‌گیری قند خون وجود دارد. این حسگرها در پایش سطح گلوکوز خون توسط بیمار و تنظیم مقدار تزریق انسولین کمک قابل توجهی می‌کنند. اساس کار زیست‌حسگرهای گلوکوز بر پایه آنزیم گلوکوز اکسیداز، افزایش جریان بر اثر اکسایش هیدروژن پراکسید تولیدی در واکنش گلوکوز با گلوکوز اکسیداز است. بنابراین، تثبیت آنزیم روی سطح الکترود نقش بسیار مهمی در پژوهش‌های تولید زیست‌حسگرها ایفا می‌کند.

برای فراهم‌کردن ثبات مواد زیستی (آنزیم) در ماتریس متخلخل و تسهیل انتقال الکترون، از پلیمرهای زیست‌سازگار استفاده می‌شود. از پلیمرهای رسانا مانند پلی‌آنیلین، پلی‌تیوفن و پلی‌پیرول به‌طور گسترده برای تثبیت آنزیم استفاده می‌شود. پلی‌آنیلین به دلیل سهولت تهیه و سازگاری خوبی که با اکثر آنزیم‌ها دارد، برای تولید زیست‌حسگرها مناسب است [۵-۳]. از آنجا که فعالیت الکتروشیمیایی آن بین رسانا در حالت اکسایش (دوپه‌شده) و نارسانا در حالت کاهش (دوپه‌نشده) متغیر است، برای تولید الکترودهای اصلاحی (حسگرها) به‌کار می‌رود [۸-٦]. پلیمرهای مزدوج (رسانا) به دلیل داشتن خواص بسیار مفید زیر برای کاربرد در حسگرها مناسب‌اند [۹]:

- رسوب‌دهی مستقیم و آسان روی الکترودهای حسگر از راه اکسایش الکتروشیمیایی مونومر،
- کنترل ضخامت و
- رسانایی زوج اکسایش - کاهش.

پلی‌آنیلین علاوه بر اکسایش آسان مونومر آن، پایداری شیمیایی خوبی نیز دارد. تخلخل موجود روی بستر پلیمر حاصل عاملی بسیار مهم برای به‌دام انداختن آنزیم مدنظر است. پیشرفت در تولید زیست‌حسگرها براساس آنزیم، می‌تواند با به‌دام‌انداختن ترکیبات زیستی (آنزیم) با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی انجام شود که روشی ساده و راحت برای به‌دام انداختن ترکیبات زیستی (آنزیم) در بستر پلیمر است. با وجود این، جزء زیستی به‌طور تصادفی در ماتریس پلیمر قرار می‌گیرد که اغلب برای ماده مورد آزمون (آنالیت) باید در دسترس باشد. نقطه ایزوالکتریک گلوکوز اکسیداز در pH برابر ٤/۳ است. بنابراین، در pHهای بیشتر از نقطه ایزوالکتریک دارای بار منفی می‌شود [۱۰]. استفاده از پلیمرهای رسانا قابلیت تولید الکترودها را با شکل‌های مختلف و ابعاد مینیاتوری فراهم می‌کند. دو عامل اساسی برای تولید حسگر، شکل‌شناسی و تخلخل پلیمر حاصل و رسانایی زیاد آن است.

به‌دام‌انداختن آنزیم با استفاده از روش‌های مختلفی مثل به‌دام‌انداختن فیزیکی، شبکه‌ای‌کردن و اتصال کووالانسی انجام می‌شود. به‌دام‌انداختن فیزیکی از جمله روش‌هایی است که متحمل نشت‌کردن آنزیم از سطح پلیمر به محلول مورد آزمون است [۹] که می‌توان با استفاده از عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوتارآلدهید) بر این مشکل غلبه کرد. از آنجا که در pHهای زیاد آنیلین قابلیت پلیمرشدن را در محلول آبی مونومر از دست می‌دهد، نمی‌توان از آنیلین برای به‌دام‌انداختن فیزیکی در pHهای زیاد استفاده کرد [۱۳-۱۱]. با توجه به اینکه پلیمرهای رسانا قابلیت باردارشدن را (با اعمال پتانسیل) دارند، بنابراین می‌توان بار کاتیونی را روی بستر فیلم پلیمری اعمال کرد (برای آنیلین پتانسیل بیش از ۰/٦۵V). وجود چنین الکترودی درون محلولی با pHهای بیش از نقطه ایزوالکتریک (در pH نقطه ایزوالکتریک آنزیم از لحاظ بار الکتریکی خنثی و در pHهای بیشتر از آن دارای بار منفی است) موجب ایجاد جاذبه الکتروستاتیک بین بستر فیلم پلیمری (کاتیون) با آنزیم (آنیون) می‌شود. مزیت این روش، تولید حسگرهایی با فعالیت آنزیمی زیاد است. اما، چه روش الکتروستاتیکی و چه به‌دام‌انداختن فیزیکی هر دو همراه با مشکل نشت‌کردن آنزیم به درون محلول مورد آزمون با گذشت زمان است. برای رفع این مشکل از روش شبکه‌ای‌کردن با استفاده از عامل شبکه‌ای‌کننده استفاده می‌شود که این روش نیز همراه با کاهش فعالیت و حتی در بعضی موارد از دست‌دادن کامل فعالیت آنزیمی است. پلی‌آنیلین به تنهایی قابلیت کمی در ذخیره‌سازی آنزیم دارد. بنابراین، در اکثر مقالات از عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوتارآلدهید) استفاده می‌شود [۱۷-۱٤]. واکنش یاد شده به شکل زیر است:

$$\text{Glucose} + O_2 \rightarrow \text{Gluconic acid} + H_2O_2 \qquad (۱)$$

$$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad (۲)$$

قابلیت شناسایی پلیمرهای رسانا با تغییر خواص نوری و الکتریکی در اثر واکنش با ماده مورد آزمون، ویژگی منحصر به فرد آنهاست. در ضمن، پلیمرهای رسانا با مولکول‌های زیستی در خون سازگارند.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدار پاسخ جریان در زیست‌حسگرها به عوامل متعددی مثل مقدار مقاومت بین فیلم پلیمری و الکترود فلزی، شکل هندسی فیلم (طول، عرض و ضخامت) روی الکترود و رسانایی فیلم پلیمری بستگی دارد که آن هم وابسته به pH، دما، پتانسیل اعمال شده بر فیلم پلیمری، غلظت سوبسترا و مقدار آنزیم وابسته است. با فرض توزیع یکنواخت آنزیم‌های به‌دام افتاده در غلظت‌های کم، پاسخ و نفوذ به‌طور هم‌زمان انجام می‌شود. اما، در غلظت‌های بیشتر، پاسخ‌دهی با تأخیر همراه می‌شود. با افزایش غلظت گلوکوز، جریان تولیدی تأخیر بیشتری پیدا می‌کند تا اینکه بالاخره مقدار آن ثابت می‌شود [۱۸]. در این پژوهش، اثر مقدار عامل شبکه‌ای‌کننده روی الکترود اصلاح‌شده که در پژوهش‌های پیشین بررسی نشده بود، ارزیابی شده است. افزون بر این، برای تثبیت فیلم پلیمری روی الکترود پلاتین از روش ولت‌سنجی چرخه‌ای استفاده شد تا با کنترل مقدار پویش، شرایط برای تمام الکترودهای اصلاح‌شده (کنترل ضخامت فیلم پلیمری) یکسان درنظر گرفته شود. همچنین، اثر دما روی فعالیت الکترود اصلاح‌شده برای به‌دست آوردن انرژی فعال‌سازی در محیط‌های بافری متفاوت بررسی شده و برای اثبات تثبیت آنزیم روی بستر پلیمری از امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) استفاده شده است.

تجربی

مواد

آنیلین، آنزیم گلوکوز اکسیداز (U/mg 80 GOD)، سولفوریک اسید، سدیم استات، استیک اسید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، تری‌سدیم فسفات، N-متیل-۲-پیرولیدون (NMP) و استون از شرکت Merck خریداری شدند. برای تهیه محیط بافری استات از سدیم استات و استیک اسید و محیط بافری فسفات از پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و دی‌سدیم هیدروژن فسفات استفاده شد. برای خالص‌سازی و جداسازی بازدارنده‌ها از آنیلین، محلول آنیلین دو مرتبه در خلأ تقطیر و دور از نور در یخچال نگه‌داری و استفاده شد. بقیه مواد به همان شکل اولیه استفاده شدند.

دستگاه‌ها

برای بررسی ولت‌سنجی چرخه‌ای و امپدانس از دستگاه پتانسیوستات - گالوانوستات Autolab مدل PGSTAT30 متصل به دستگاه رایانه (PC) و مجهز به نرم‌افزار FRA، GPES ساخت هلند به عنوان منبع اعمال پتانسیل یا جریان استفاده شد. برای انجام ولت‌سنجی چرخه‌ای و امپدانس از سامانه استاندارد سه الکترودی دارای الکترود کار از نوع پلاتین ۰/۴×۰/۴ cm، الکترود کمکی از جنس پلاتین صفحه‌ای و الکترود شاهد Ag/AgCl استفاده شد. طیف‌سنج Bruker مدل 505IF برای گرفتن طیف‌های FTIR و شناسایی گروه‌های عاملی استفاده شد. برای مشاهده طیف مولکولی هوموپلیمرآنیلین، طیف‌سنج UV-vis مدل ۱۶۱۶(Matsushita, Japan) به‌کار گرفته شد.

روش‌ها

تهیه فیلم و الکترود پلاتینی اصلاح‌شده با پلی‌آنیلین

فیلم پلی‌آنیلین از محلول آبی ۰/۲ M آنیلین و محلول ۱ M از H_2SO_4 به روش الکتروشیمیایی (ولت‌سنجی چرخه‌ای) تهیه شد. الکتروپلیمرشدن در دمای ۲۷°C و در سلول سه‌الکترودی انجام شد. از صفحه پلاتینی ۰/۴×۰/۴ cm به عنوان الکترود کار، الکترود میله‌ای پلاتین به عنوان الکترود کمکی و الکترود Ag/AgCl به عنوان الکترود مرجع استفاده شد. برای تهیه فیلم پلیمری، الکترود در محلول اسیدی حاوی مونومر آنیلین قرار گرفت و پتانسیل با استفاده از روش ولت‌سنجی چرخه‌ای از پتانسیل ۰/۱ V- تا ۱ V با سرعت پویش ۵۰ mV/s به تعداد ۳۰ مرتبه پویش تغییر داده شد. پس از آن فیلم تهیه شده با آب مقطر شست‌وشو و در هوای سرد خشک شد.

به‌دام‌انداختن آنزیم گلوکوز اکسیداز در فیلم پلیمری پلی‌آنیلین

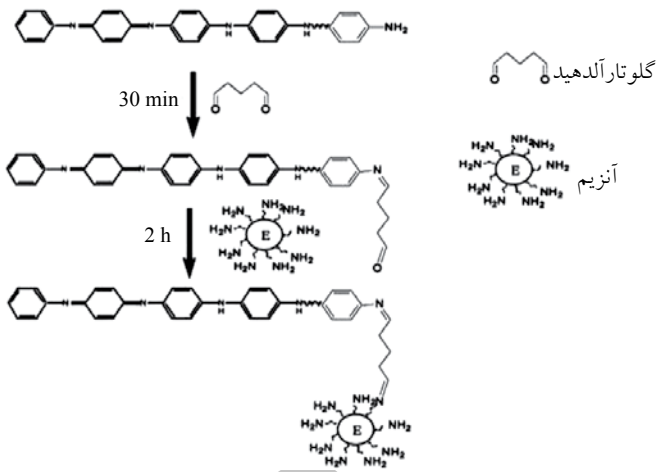
ابتدا الکترود پلاتینی اصلاح‌شده با پلی‌آنیلین به مدت ۳۰ min درون محلول ٪۰/۱ حجمی از گلوتارآلدهید (عامل شبکه‌ای‌کننده) قرار گرفت تا NH_2 آزاد پلی‌آنیلین با گروه‌های آلدهیدی موجود روی گلوتارآلدهید واکنش دهد (واکنش همراه با آزادشدن آب است). سپس، الکترود اصلاح‌شده حاصل به مدت ۲ h درون محلول بافر استات (برای ثابت نگه‌داشتن pH برابر ۷) حاوی ۱ mg/mL آنزیم قرار گرفت تا سر آزاد آلدهیدی دیگر گلوتارآلدهید بتواند با NH_2 موجود روی آنزیم واکنش دهد [۱۹]. این نوع به‌دام‌انداختن باعث افزایش پایداری شیمیایی می‌شود (طرح ۱).

نتایج وبحث

بررسی ولت‌سنجی چرخه‌ای پلی‌آنیلین

پیک‌های مشاهده شده ('A/A) و ('C/C) (شکل ۱) را می‌توان به ساختارهای زیر مربوط دانست (طرح۲). پاسخ ابتدایی ('A/A) همراه

Archive of SID

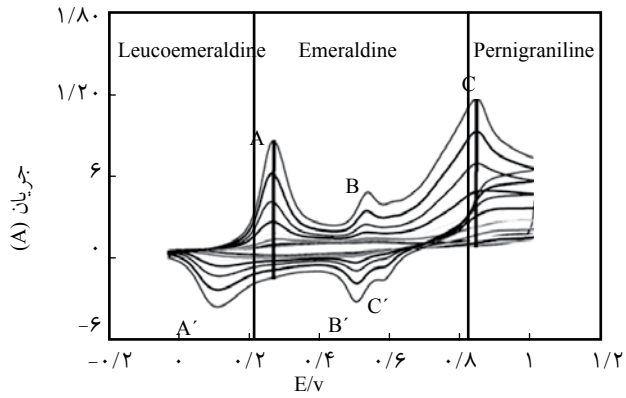


طرح ۱- واکنش گروه‌های عاملی NH_2 آزاد پلی‌آنیلین و آنزیم با گروه‌های آلدهیدی موجود روی گلوتارآلدهید.

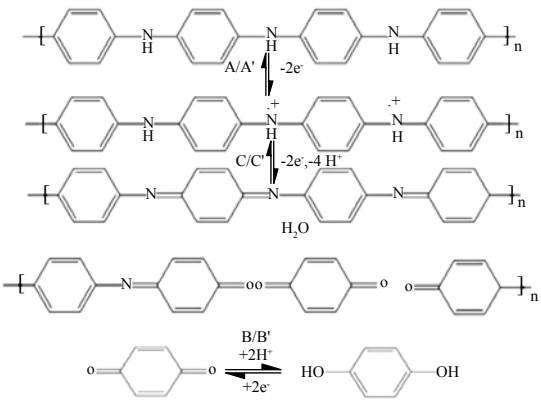
با جذب یا از دست‌دادن الکترون، بدون گرفتن یا از دست‌دادن پروتون است. اما سومین زوج پیک مشاهده شده (C/C') مربوط به حالت جذب و دفع پروتون به همراه جذب و دفع الکترون است و پیک دوم مشاهده شده در پتانسیل ۰/۵ V مربوط به آبکافت آنیلین با آب است که منجر به تشکیل ساختار کینون و هیدروکینون می‌شود [۲۰] (شکل‌های ۱ و ۲).

طیف FTIR پلی‌آنیلین

با توجه به طیف FTIR پلی‌آنیلین در شکل ۲ می‌توان پیک مشاهده شده در ناحیه $3410/82\ cm^{-1}$ را به ارتعاشات NH، $2957/07\ cm^{-1}$ را به ارتعاشات کششی CH آلیفاتیک، $1612/16\ cm^{-1}$ را به کشش C-N مربوط به ساختار کینوئیدی پلی‌آنیلین، $1498/09\ cm^{-1}$ را به ارتعاشات حالت بنزوئیدی آن، $1286/71\ cm^{-1}$ را به C-N، $1232/25\ cm^{-1}$ را به C-C و ارتعاشات بین $600-900\ cm^{-1}$ را نیز به ارتعاشات خمشی



شکل ۱- نمودار ولت‌سنجی چرخه‌ای (cv) پلی‌آنیلین از ۰/۱ V- تا ۱ V با سرعت پویش ۵۰ mV/s به تعداد ۳۰ پویش.



طرح۲- ساختارهای مختلف پلی‌آنیلین در اثر اکسایش و کاهش الکتروشیمیایی.

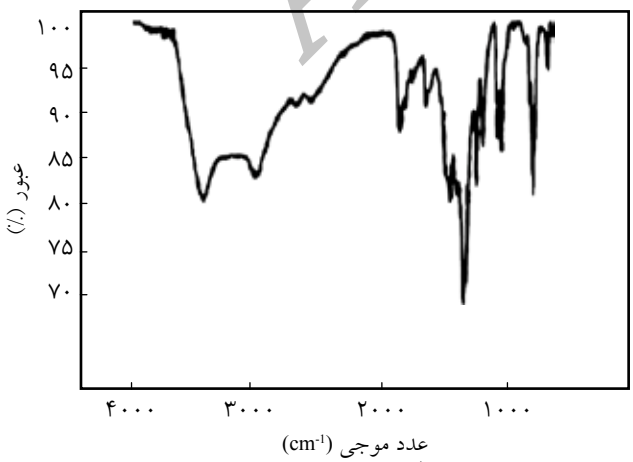
خارج از صفحه CH نسبت داد. نتایج حاصل از ارتعاش‌های مزبور تأییدی بر تشکیل فیلم پلی‌آنیلین است [۲۱].

طیف UV-Vis هوموپلیمرآنیلین

در شکل ۳ طیف UV-Vis هوموپلیمرآنیلین نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، دو نوع انتقال در این شکل رخ می‌دهد. پیک مشاهده شده در ۳۰۵ nm مربوط به انتقالات Π به *Π حلقه‌های آروماتیک و پیک مشاهده شده در ۵۵۰ nm مربوط به انتقالات n به *Π الکترون‌های غیرپیوندی نیتروژن به اوربیتال‌های ضدپیوندی حلقه آروماتیک است که این نتایج نیز تأییدی بر تهیه پلیمر پلی‌آنیلین است [۲۵-۲۲].

منحنی نایکویست Pt/PANI، Pt اصلاح شده، Pt/PANI/GOD اصلاح‌شده

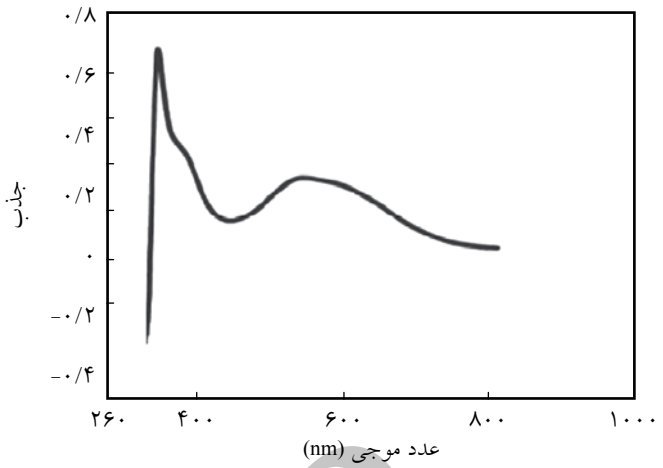
شکل ٤ نشان‌دهنده منحنی نایکویست (Nyquist plot) Pt/PANI، Pt و



شکل۲- طیف FTIR پلی‌آنیلین.

Archive of SID

www.SID.ir



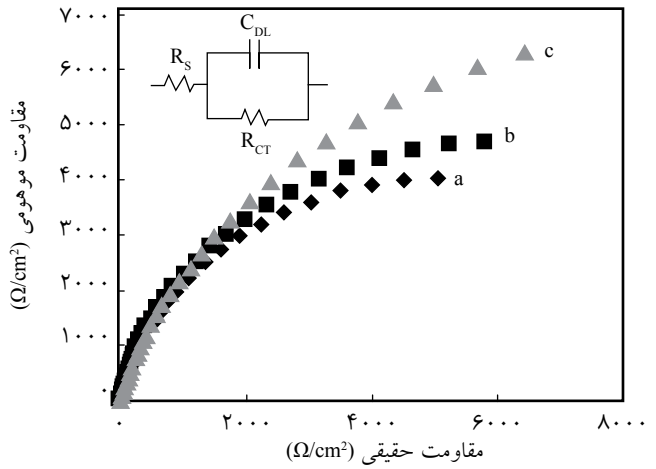
شکل۳- طیف UV-Vis هوموپلیمرآنیلین در حلال NMP.

Pt/PANI/GOD است. نمودار تشکیل شده از مقاومت حقیقی 'z بر حسب مقاومت موهومی "z در محدوده بسامد kHz ۱۰۰-۱۰ ناشی از ترکیب مقاومت الکتریکی و خازن لایه دوگانه است که می‌توان با استفاده از قطر تشکیل شده از نیم دایره نایکویست به‌سختی یا آسانی واکنش شیمیایی پی‌برد. در مدار معادل، R_S عبارت است از مقاومت اهمی یا مقاومت جبران نشده محلول بین الکترود مرجع و الکترود کار (نمونه مورد آزمون) و R_{CT} عبارت است از مقاومت قطبی‌شدن در فصل مشترک محلول و الکترود که گاهی از آن با عنوان مقاومت انتقال بار نام برده می‌شود. C_{DL} نیز ظرفیت لایه دوگانه الکتریکی در فصل مشترک مزبور است. مشاهده می‌شود، با به‌دام‌افتادن آنزیم GOD روی الکترود اصلاح شده Pt/PANI مقدار R_{CT} افزایش یافته است (شکل ٤). افزایش مقدار R_{CT} نمایانگر افزایش مقاومت پوشش در انتقال الکترون است که این مسئله هم می‌تواند ناشی از وجود ذرات آنزیم در خلل و فرج پلی‌آنیلین باشد. همین مسئله عاملی است تا نمک‌های محلول در آب تمایل کمتری برای نقل و انتقالات الکترونی در سطح الکترود (کاهش نفوذپذیری) نشان دهند [٢٦].

بررسی اثر عامل شبکه‌ای‌کننده بر فعالیت الکترود اصلاح‌شده

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، با تغییر درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده فعالیت الکترودهای اصلاح‌شده افزایش می‌یابد که بیشترین فعالیت در ٪۰/۱ حجمی از گلوتارآلدهید مشاهده می‌شود. پس از آن با افزایش بیشتر عامل شبکه‌ای‌کننده، فعالیت الکترود اصلاح‌شده (در تولید جریان) با شیب بسیار تند کاهش می‌یابد.

افزایش ابتدایی به دلیل افزایش در مقدار آنزیم به‌دام افتاده به‌وسیله عامل شبکه‌ای‌کننده است که با افزایش مقدار آن موجب از بین‌رفتن فعالیت آنزیم‌ها به دلیل تغییر ساختار شیمیایی آنها می‌شود. چرا که با

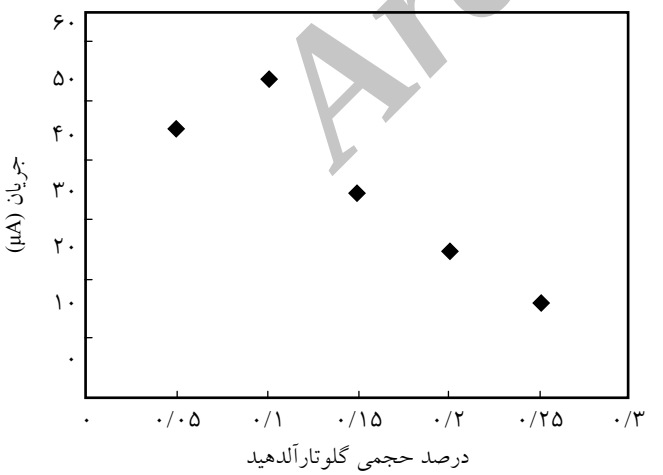


شکل٤- نمودار امپدانس الکتروشیمیایی: (الف) Pt، (ب) Pt/PANI و (ج) Pt/PANI/GOD از بسامد kHz ۱۰۰-۱۰ در محلول تری‌سدیم فسفات M ۱.

واکنش زیاد گروه‌های عاملی شبکه‌ای‌کننده، مرکز فعال آنزیم گلوکوز اکسیداز که مسئول اصلی واکنش با گلوکوز است، در امان نمی‌ماند و این عامل کاهش تند فعالیت الکترودهای اصلاحی با افزایش عامل شبکه‌ای‌کننده است.

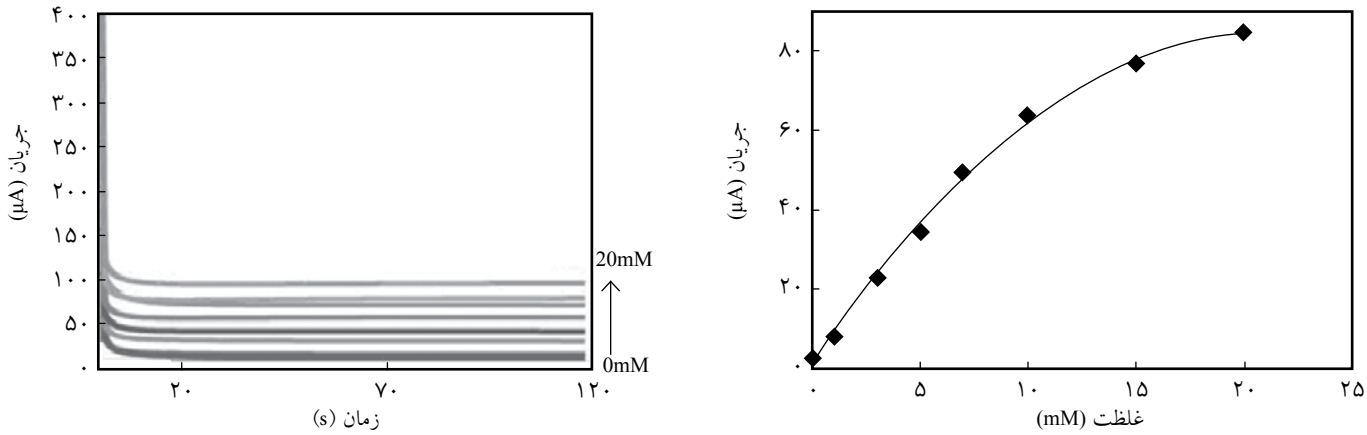
نمودار جریان بر حسب غلظت و جریان بر حسب زمان در غلظت‌های مختلف گلوکوز در محیط بافری

در شکل‌های ٦ و ٧ مشاهده می‌شود، متناسب با افزایش مقدار غلظت گلوکوز در ابتدا، جریان حاصل از H_2O_2 تولیدی (از واکنش گلوکوز با آنزیم گلوکوز اکسیدازی است که در بستر فیلم پلیمری به‌دام افتاده



شکل۵- نمودار جریان الکترود اصلاح‌شده Pt/PANI/GOD برحسب درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوتارآلدهید) در محیط بافری فسفات در غلظت μM ۳ گلوکوز.

Archive of SID



(الف) (ب)

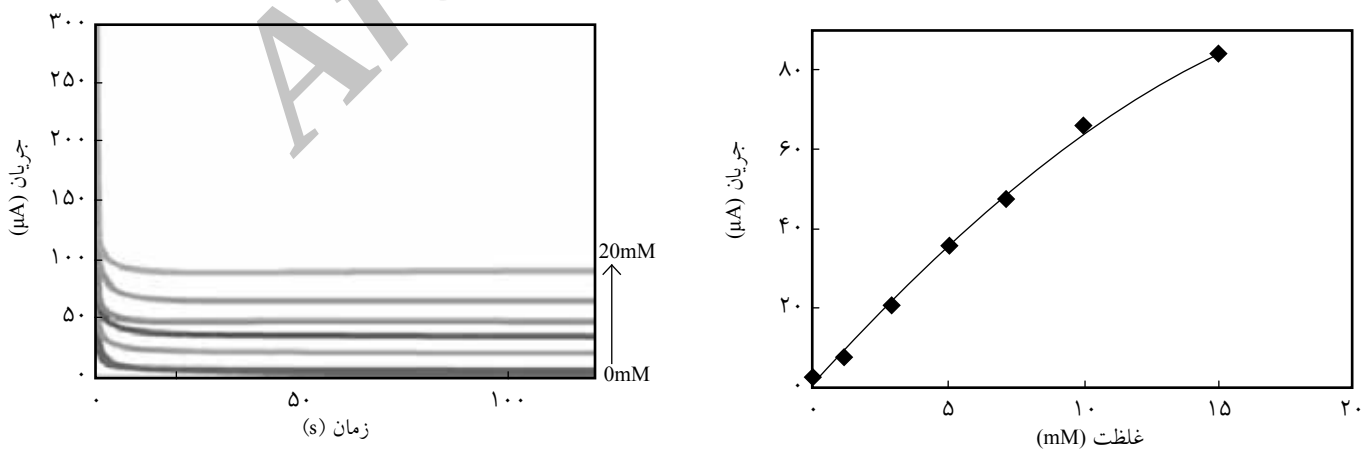
شکل ٦- نمودار جریان: (الف) برحسب غلظت و (ب) برحسب زمان برای الکترود اصلاح‌شده در غلظت‌های مختلفی از گلوکوز در محیط بافری فسفات و pH برابر ۷.

است) افزایش می‌یابد. اما، با افزایش بیشتر گلوکوز جریان حاصل تقریباً ثابت می‌شود با فرض اینکه آنزیم یکنواخت در طول سطح فیلم پلیمری پخش شده است. از آنجا که جریان تولیدی تحت تأثیر غلظت واکنش‌دهنده در سطح فیلم و پدیده نفوذ رخ می‌دهد، بنابراین در غلظت‌های کم این دو پدیده هم‌زمان و به راحتی اتفاق می‌افتد. اما، در غلظت‌های زیاد بین پدیده نفوذ و پاسخ جریان حاصل از H_2O_2 تأخیر زمانی به‌وجود می‌آید که این عامل سبب شده است تا جریان حاصل تقریباً ثابت بماند.

با توجه به شکل‌های ٦ و ۷ محدوده خطی الکترود اصلاح‌شده برای سنجش مقدار گلوکوز mM ۱۰-۱ به‌دست آمد. ثابت Michaelis-Menten (K_m) برای اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم به‌دام افتاده به‌کار می‌رود. برای محاسبه این ثابت (K_m)، معکوس جریان برحسب معکوس غلظت براساس معادله (۱) رسم می‌شود [۲۷]:

$$1/I_{ss}=1/I_{max}+K_m/I_{max}\times 1/C \qquad (۱)$$

در این معادله 1، C و I_{max} به ترتیب جریان، غلظت ماده مورد آزمون (گلوکوز) و بیشترین جریان حاصل (منظور جریانی است که با افزایش بیشتر مقدار غلظت گلوکوز تقریباً ثابت می‌ماند) است. از شیب معادله K_m/I_{max} و عرض از مبدأ آن I/I_{max} به‌دست می‌آید که با تقسیم شیب بر عرض از مبدأ آن می‌توان ثابت K_m را استخراج کرد. هنگامی که غلظت ماده مورد آزمون کم باشد ($[C]<<K_m$)، $I=C\ I_{max}/K_m$ می‌شود. بدین معنی است که سرعت به غلظت گلوکوز وابسته است.

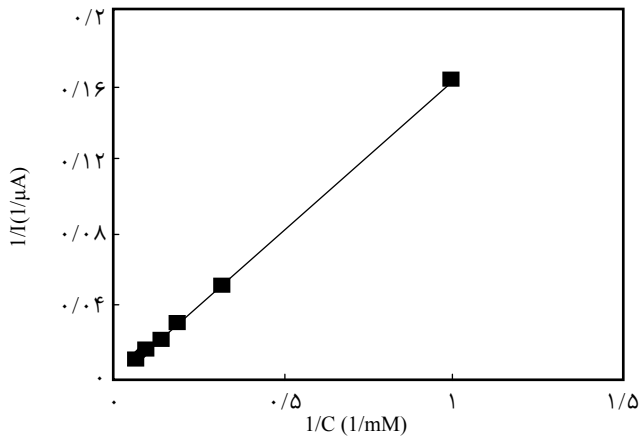


(الف) (ب)

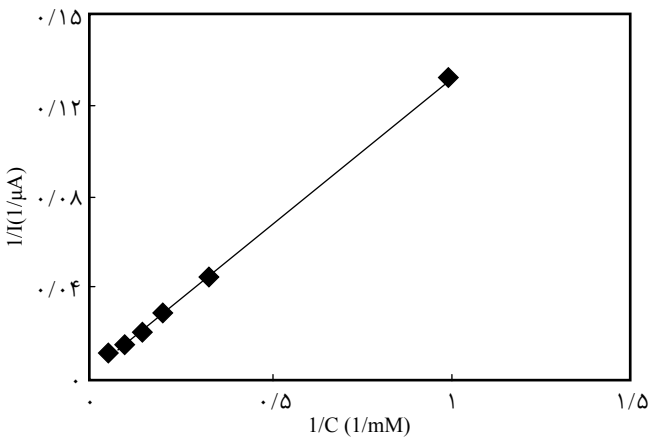
شکل ۷- نمودار جریان: (الف) برحسب غلظت و (ب) برحسب زمان برای الکترود اصلاح‌شده در غلظت‌های مختلفی از گلوکوز در محیط بافری استات و pH برابر ۵/٦.

Archive of SID

www.SID.ir



(الف)



(ب)

شکل ۸- نمودار معکوس جریان بر حسب معکوس غلظت گلوکوز برای الکترود اصلاح‌شده در محیط بافری: (الف) استات و (ب) فسفات.

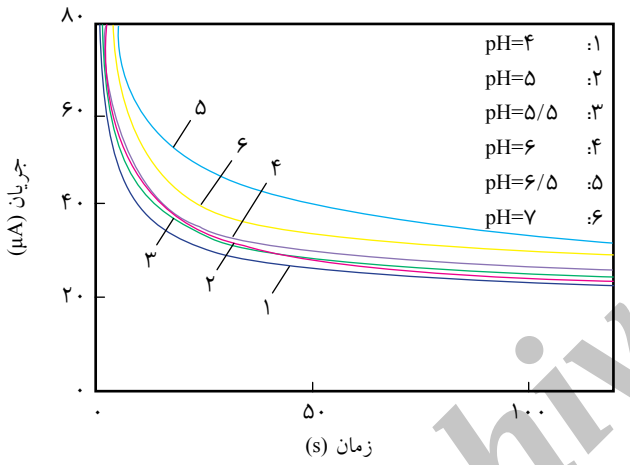
اما، در غلظت‌های بیشتر گلوکوز، یعنی هنگامی که $[C]>>K_m$ باشد، $I = I_{max}$ می‌شود. در این هنگام جریان تولیدی دیگر وابسته به مقدار غلظت ماده مورد آزمون نیست. K_m مساوی با نسبت آنزیم آزاد به آنزیم کمپلکس‌شده است. بنابراین هر چه مقدار آن کمتر شود، بیان‌کننده تشکیل بیشتر آنزیم‌های کمپلکس شده نسبت به آنزیم‌های کمپلکس‌نشده است [۲۶]. با توجه به شکل ۸ و جدول ۱ مشاهده می‌شود، ثابت K_m برای محیط بافری فسفات کمتر از بافر استات است. بنابراین نشان‌دهنده این موضوع است که مقدار آنزیم‌های کمپلکس‌شده نسبت به آنزیم‌های کمپلکس‌نشده در محیط بافری فسفات بیشتر از بافر استات است.

اثر pH روی الکترود اصلاح‌شده

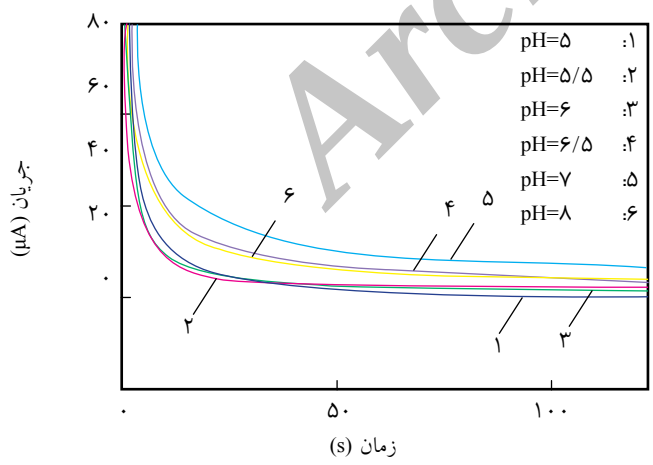
برای تهیه محیط بافری استات با pHهای مختلف از سدیم استات و استیک اسید به مقدار مختلف و محیط بافری فسفات از پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و دی‌سدیم هیدروژن فسفات به مقدار مختلف استفاده شد. pHهای مختلف می‌تواند بر اتصال آنزیم به سوبسترا، فعالیت کاتالیزوری آنزیم [۲۸]، یونش بستر پلیمری و

جدول ۱- مقدار پارامترهای اندازه‌گیری‌شده با استفاده از داده‌های تجربی.

پارامتر	محیط بافری	
	استات	فسفات
K_m(mM)	۸۵/٤	۳۹/۲۵
I_{max} (μA)	۵۲۰	۳۰۵/۹
ناحیه خطی (mM)	۱-۱۰	۱-۱۰
حساسیت (μA/ mM)	٦/٤۲٦	٦/۲۱۷



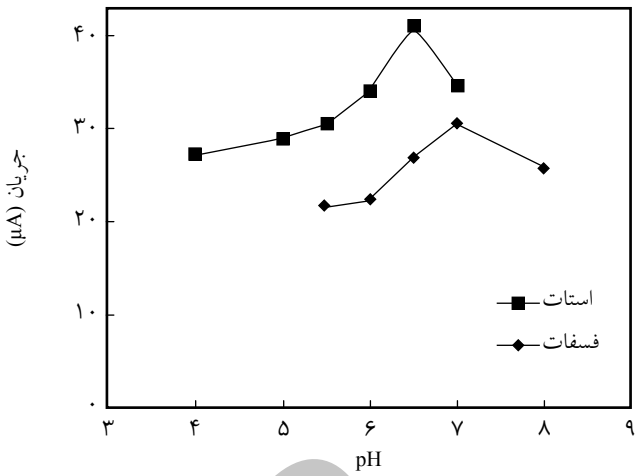
(الف)



(ب)

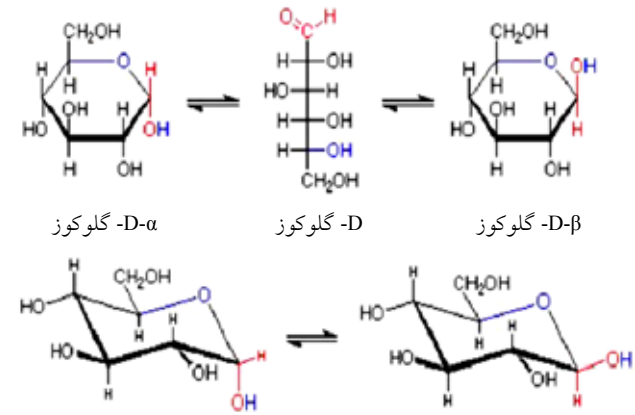
شکل۹- نمودار جریان برحسب زمان برای الکترود اصلاح‌شده در محلول حاوی ۳ mM از گلوکوز در محیط بافری: (الف) استات و (ب) فسفات در pHهای مختلف.

Archive of SID

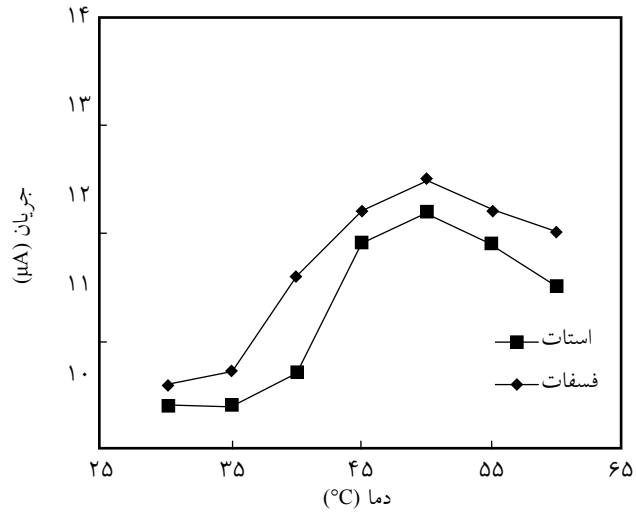


شکل ۱۰- نمودار جریان برحسب pH برای الکترود اصلاح‌شده در محیط بافری استات و فسفات.

تنوع در ساختار پروتئین مؤثر باشد. بنابراین، داشتن بهترین pH که در آن الکترود اصلاح‌شده بیشترین فعالیت را داشته باشد، از اهمیت بسیاری برخوردار است. به همین دلیل، نمودار جریان برحسب pHهای مختلف در دمای آزمایشگاهی ۲۵°C و پتانسیل ثابت ۰/۶۵ V، هم در محیط بافری استات و هم در محیط بافری فسفات رسم و بهترین pH در محیط بافری استات ۶/۵ و برای بافر فسفات ۷ مشاهده شد (شکل‌های ۹ و ۱۰). افزایش ابتدایی جریان با pH وابسته به فعالیت کاتالیزوری آنزیم و افزایش اتصال آنزیم به سوبستراست. چرا که با افزایش pH، آنزیم‌هایی که در نقطه بالاتر از نقطه ایزوالکتریک‌اند، افزایش می‌یابند. بنابراین، آنزیم‌هایی با بار منفی تمایل بیشتری برای اتصال با سوبسترا با بار مثبت پیدا می‌کنند و کاهش انتهایی جریان با pH وابسته به کاهش فعالیت کاتالیزوری آنزیم است.



طرح ۳- ساختارهای مختلف گلوکوز.

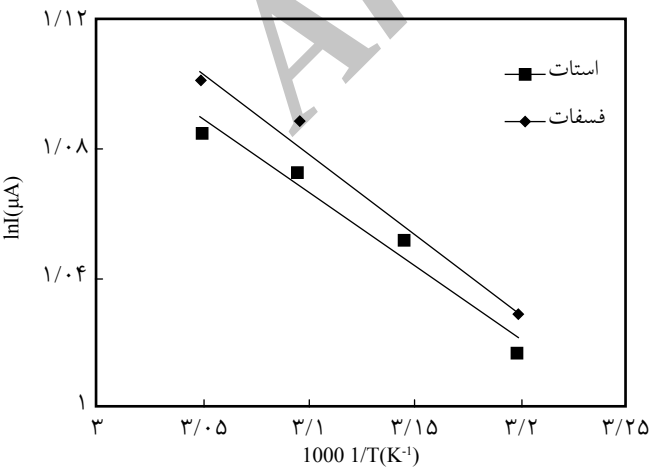


شکل ۱۱- نمودار جریان بر حسب دما برای الکترود اصلاح‌شده در محلول ۳ mM گلوکوز در محلول بافری استات و فسفات.

اثر دما روی الکترود اصلاح‌شده

برای اندازه‌گیری فعالیت الکترود آنزیمی در دماهای مختلف، جریان الکتریکی حاصل از الکترودهای اصلاح‌شده با روش جریان‌سنجی از دمای ۳۰ تا ۶۰°C ثبت شد. مقدار شدت واکنش نسبی شکل‌های مختلف گلوکوز با آنزیم گلوکوز اکسیداز متفاوت است و تنها نوع β گلوکوز قابلیت واکنش را با آنزیم گلوکوز اکسیداز دارد. این در حالی است که همیشه سه شکل گلوکوز (طرح ۳) با هم در تعادل‌اند. این شکل‌ها با دما و pH تغییر می‌کنند.

با افزایش دما و pH، شکل β بر نوع α غالب می‌شود که می‌تواند عاملی بر افزایش فعالیت الکترود آنزیمی با افزایش ابتدایی دما باشد [۲۹]. افزایش دما، فعالیت را افزایش می‌دهد. اما، پس از دمای ۵۰°C



شکل ۱۲- نمودار LnI بر حسب 1/T برای الکترود اصلاح‌شده PANI/GOD در محیط بافری فسفات و استات.

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت آنها شروع به کاهش می‌کند، چرا که آنزیم‌ها پروتئین هستند و در دماهای بیش از ۵۰°C شروع به تخریب می‌کنند [۳۰]. با استفاده از معادله آرنیوس می‌توان انرژی فعال‌سازی آنزیم‌های به دام افتاده را در الکترود اصلاح‌شده محاسبه کرد [۳۱]:

$$I(T) = I_0 \exp(-E_a/RT) \quad (۲)$$

$$LnI(T) = LnI_0 - E_a/RT \quad (۳)$$

در این معادله I_0، I، E_a، R و T به ترتیب جریان ابتدایی، جریان، انرژی فعال‌سازی، ثابت سرعت و دما برحسب کلوین است. با رسم LnI برحسب 1/T، معادله‌ای به شکل Y= A-BX به‌دست می‌آید و انرژی فعال‌سازی از معادله $E_a = B \times R$ محاسبه می‌شود. انرژی فعال‌سازی برای الکترود اصلاح‌شده پلی‌آنیلین، در محیط بافری فسفات و استات به ترتیب ۳۷ و ۴۱ kJ/mol به‌دست آمد. هر اندازه مقدار انرژی فعال‌سازی کمتر باشد، بدین معنی است که آنزیم‌های به‌دام افتاده در بستر پلیمری مدنظر، فعالیت بیشتری دارند. بنابراین، به انرژی کمتری برای گذر از سد انرژی نیاز است (شکل‌های ۱۱ و ۱۲).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش به‌طور موفقیت‌آمیز الکترود اصلاح‌شده PANI-GOD به روش ولت‌سنجی چرخه‌ای در الکترولیت سولفوریک اسید تهیه شد. برای سنجش مقدار گلوکوز، گلوتارآلدهید به عنوان عامل شبکه‌ای‌کننده برای به‌دام‌انداختن آنزیم استفاده شد. بهترین فعالیت الکترود اصلاح‌شده در محیط بافری فسفات در pH برابر ۷ و برای محیط بافری استات در pH برابر ۵/۶ مشاهده شد. ثابت Michaelis-Menten ارزیابی شد که مقدار آن در محیط بافری فسفات کمتر از محیط بافری استات به‌دست آمد. این موضوع حاکی از سرعت بیشتر تولید جریان در محیط بافری فسفات است. محدوده خطی الکترود اصلاح‌شده برای سنجش مقدار گلوکوز ۱۰-۱ mM به‌دست آمد. بهترین فعالیت الکترود اصلاح‌شده در محیط بافری استات و فسفات در دمای ۵۰°C مشاهده شد که این مسئله ناشی از افزایش فعالیت آنزیم گلوکوز اکسیداز با افزایش دما و افزایش شکل β گلوکوز در محلول بافری با افزایش دماست. انرژی فعال‌سازی برای الکترود اصلاح‌شده پلی‌آنیلین، در محیط بافری فسفات و استات به ترتیب ۳۷ و ۴۱ kJ/mol به‌دست آمد.

مراجع

1. Shirale D.J., Gade V.K., Gaikwad P.D., Kharat H.J., Kakde K.P., Savale P.A, Hussaini S.S., Dhumane N.R., and Shirsat M.D., Synthesis of P(NMP) Film for Glucose Oxidase Electrode, *Transaction Saest*, **40**, 128-133, 2005.
2. Trojanowicz M., Geschke O., Krawczynski K.T., and Cammann K., Biosensors Based on Oxidases Immobilized in Various Conducting Polymers, *Sensor. Actuator. B*, **28**, 191-199, 1995.
3. Bartlett P.N. and Birkin P.R., A Microelectrochemical Enzyme Transistor Responsive to Glucose, *Anal. Chem.,* **66**, 1552-1559, 1994.
4. Lvovich V. and Scheeline A., Amperometric Sensors for Simultaneous Superoxide and Hydrogen Peroxide Detection, *Anal. Chem.,* **69**, 454-462, 1997.
5. Cosnier S., Biomolecule Immobilization on Electrode Surfaces by Entrapment or Attachment to Electrochemically Polymerized Films, A Review, *Biosens. Bioelectron*., **14**, 443-456, 1999.
6. Schuhmann W., Conducting Polymers and their Application in Amperometric Biosensors, *Mikrochim. Acta*, **121**, 1-29, 1995.
7. Liu Y. and Yu T., Polymers and Enzyme Biosensors, *J. Macromol. Sci.,* **37**, 459-500, 1997.
8. Foulds N.C. and Lowe C.R., Immobilization Glucose Oxidase in Ferrocene-Modified Pyrrole Polymers, *Anal. Chem.,* **60**, 2473-2478, 1988.
9. Savale P.A. and Shirsat M.D., Synthesis Poly(*o*-anisidine)/ H_2SO_4 Film for the Development Glucose Biosensor, *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **159**, 299-309, 2009.
10. Shaolin M., Huaiguo X., and Bidong Q., Bioelectrochemical Responses of the Polyaniline Glucose Oxidase Electrode, *J. Electroanal. Chem.,* **304**, 7-16, 1991.
11. Tiwari A. and Gong S., Electrochemical Detection a Breast Cancer Susceptible Gene Using cDNA Immobilized Chitosan-*co*-Polyaniline Electrode, *Talanta*, **77**, 1217-1222, 2009.
12. Gospodinova N., Terlemyzyan L., Mokreva P., and Kossev K., On the Mechanism Oxidative Polymerization Aniline, *Polymer*, **34**, 2434-2439, 1993.
13. Gospodinova N., Mokreva P., and Terlemezyan L., Chemical

Archive of SID

Oxidative Polymerization of Aniline in Aqueous Medium without Added Acids, *Polymer*, **34**, 2438-2439, 1993.

14. Fortier G. and Belanger D., Characterization the Biochemical Behavior Glucose Oxidase Entrapped in a Polypyrrole Film, *Biotechnol. Bioeng.,* **37**, 854-858, 1991.
15. Uang Y.M. and Chou T.C., Fabrication Glucose Oxidase/Polypyrrole Biosensor by Galvanostatic Method in Various pH Aqueous Solutions, *Biosens. Bioelectron.,* **19**, 141-147, 2003.
16. Iroh J.O., Zhu Y., Shah K., Levine K., Rajagopalan R., and Uyar T., Electrochemical Synthesis: A Novel Technique for Processing Multi-Functional Coatings, *Prog. Org. Coat.* **47**, 365-375, 2003.
17. Gaikwad P.D., Shirale D.J., Gade V.K., Savale P.A., Kharat H.J., Kakde K.P., and Shirsat M.D., Immobilization GOD on Electrochemically Synthesized PANI Film by Cross-linking via Glutaraldehyde for Determination Glucose, *Int. J. Electrochem. Sci.,* **1**, 425-434, 2006.
18. Vastarella W., Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors, *Facolta A Discienze Matematiche Fisiche Naturail Dipartimentio Di Chimica*, Tesi di Dottorato di Ricerca in Chimica dei Materiali Innovativi, XIV Ciclo- A.A., March 2001.
19. Tiwari A. and Shukla S.K., Chitosan-*g*-Polyaniline: A Creatine Amidinohydrolase Immobilization Matrix For Creatine Biosensor, *Express Polym. Lett.,* **9**, 553-559, 2009.
20. Ansari R. and Keivani M.B., Polyaniline Conducting Electroactive Polymers: Thermal and Environmental Stability Studies, *E-J. Chem.,* **3**, 202-217, 2006.
21. Geng Y., Li J., Sun Z., Jing X., and Wang F., Polymerization of Aniline in an Aqueous System Containing Organic Solvents, *Synth. Met,* **96**, 1-6, 1998.
22. Ruckenstein E. and Yin W., Polyaniline Co-Doped with Camphor Sulfonic and Hydrochloric Acids by Chemical Oxidation in Aqueous Solution, *J. Appl. Polym. Sci.,* **79**, 80-85, 2001.
23. Athawale A.A., Kulkarni M.V., and ChabukswarV.V., Studies on Chemically Synthesized Soluble Acrylic Acid Doped Polyaniline, *Mat. Chem. Phys.,* **73**, 106-111, 2002.
24. Rao P.S., Anand J., Palaniappan S., and Sathyanarayan D.N., Effect Sulphuric Acid on the Properties Polyaniline-HCl Salt and Its Base, *Eur. Polym. J.,* **36**, 915-921, 2000.
25. Kim Y.H., Foster C., Chiang J., and Heeger A., Localized Charged Excitations in Polyaniline: Infrared Photoexcitation and Protonation Studies, S*ynth. Met.,* **29**, 285-291, 1989.
26. Salimi A., Zand Karimi R., Noorbakhash A., and Soltanian S., Glucose Biosensor Based on Silicon Nitride Nanoparticles, *Electroanalysis*, **20**, 2434-2442, 2010.
27. Akundy G.S., Rajagopalan R., and Iroh J.O., Electrochemical Deposition Polyaniline–Polypyrrole Composite Coatings on Aluminum, *J. Appl. Polym. Sci.,* **83**, 1970-1976, 2002.
28. Shobha Jeykumari D.R. and Sriman Narayanan S., Fabrication Bienzyme Nanobiocomposite Electrode Using Functionalized Carbon Nanotubes for Biosensing Applications, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1686-1693, 2008.
29. Lee Sh.H., Fang H.Y., and Chen W.C., Amperometric Glucose Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrodes Mediated with Hexacyanerrate–Chitosan Oligomers Mixture, *Sensor. Actuator. B,* **117**, 236-243, 2006.
30. Bayramoglu. G., Karakısla M., Altıntas B., Metin U.A., Sacak M., and Arıca M.Y., Polyaniline Grafted Polyacylonitrile Conductive Composite Fibers for Reversible Immobilization Enzymes: Stability and Catalytic Properties Invertase, *Proc. Biochem.,* **44**, 880-885, 2009.
31. Turkarslan Ö., *Amperometric Cholesterol and Alcohol Biosensors Based on Conducting Polymers*, PhD Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University, April 2010.

Archive of SID

www.SID.ir