مجله علمی پژوهشی «علوم و فناوری‌های پدافند غیرعامل»
سال چهارم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲؛ ص ۲۷۷-۲۷۱

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

مصطفی نجفی[*۱]، سید حیدر موسوی[۲]، تیمور نظام الاسلام[۳]

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 الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌کربنی استفاده گردید و یک بیوحسگر حساس برای تعیین سریع‌تری اتیل تیو فسفات (شبه عامل اعصاب (VX)) تهیه شد. نانولوله‌کربنی، واکنش هیدرولیز آنزیمی را در سطح الکترود بهبود بخشید و پاسخ حسگر ولتامتری را افزایش داد. تحت شرایط بهینه، بازداری[۳۹] تری اتیل تیو فسفات روی آنزیم استیل کولین استراز با افزایش غلظت این ترکیب در دامنه غلظتی ۰/۴۴-۰/۱۳ nM رابطه خطی داشت. حد تشخیص حسگر معادل با ۱۰ درصد کاهش جریان پاسخ مقدار ۰/۰۹۳ nM به‌دست آمد. انحراف استاندارد نسبی برای تکرارپذیری زیست تحت شرایط بهینه و برای ۵ بار اندازه‌گیری ۳ درصد به‌دست 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 تایوفسفات، 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.

[*] Corresponding Author E-Mail: mnajafi@ihu.ac.ir

۱. مقدمه

ترکیبات ارگانو فسفره برای مقاصد گوناگون از جمله استفاده در سموم کشاورزی و یا استفاده درفرمولاسیون سلاح‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آشکارسازی و تعیین این ترکیبات بسیار مورد توجه قرار دارد. اثر ترکیبات ارگانوفسفره ناشی از تأثیر بر آنزیم‌های استراز بوده که مهم‌ترین آنها استیل کولین استراز است. این ترکیبات با مهار کولین استراز موجب مسمومیت و حتی مرگ فرد خواهند شد. توسعه روش‌هایی مناسب برای اندازه‌گیری میدانی ترکیبات ارگانوفسفره مستلزم روش‌هایی سریع، نسبتاً کم هزینه، حساس و بدون نیاز به مراحل آماده‌سازی نمونه می‌باشد. مطالعه منابع نشان می‌دهد تنها تعداد محدودی از روش‌ها، می‌توانند چنین خصوصیاتی را برآورده سازند. این روش‌ها بر اساس مکانیسم حسگری در سه دسته اصلی زیر طبقه‌بندی می‌شوند:

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

اولین زیست حسگر بر اساس بازداری اثر آنزیم کولین استراز برای آشکارسازی عوامل اعصاب در سال ۱۹۶۲ توسط گیلبات[1] ارائه شد [۱] و پس از آن تعداد فراوانی زیست حسگر بر اساس بازداری آنزیم کولین استراز برای آنالیت‌های مختلف از جمله فلزات سنگین، توکسین‌ها، داروها، و حشره‌کش‌های ارگانوفسفره و کاربامیک[2] گزارش شده است. بیشترین درصد مقالات منتشر شده مربوط به حشره‌کش‌ها است که از یک طرف به‌دلیل اهمیت دستیابی به حد تشخیص‌های بسیارکم (در حد ppb) برای آنالیز وجود این مواد در محیط زیست و منابع غذایی و از طرف دیگر و دستورالعمل ساده‌تر و ایمن‌تر 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 ارگانوفسفره است. واکنش‌های زیر درسطح زیست حسگر اتفاق می‌افتد و نشان دهنده مکانیزم بازداری و اساس حسگرهای الکتروشیمیایی برای تعیین ترکیبات ارگانوفسفره به‌عنوان ترکیبات بازدارنده فعالیت آنزین استیل کولین استراز را نشان می‌دهد:

(درحضور بازدارنده) استیل کولین استراز غیر فعال → استیل کولین استراز

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

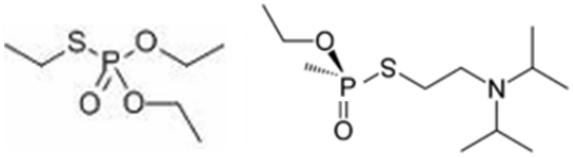
$$۲e^{-}+۲H^{+}+\text{تیولوکین دیمر شده} \rightarrow ۲\ \text{تیوکولین}$$

ترکیبات ارگانو فسفر به‌عنوان مهار کننده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز شناخته می‌شوند (واکنش۱). معمولاً نمک کلرید استیل تایکولین به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌گردد (واکنش۲) و به‌وسیله اندازه‌گیری جریان اکسیداسیون قبل و بعد از حضور ارگانو فسفر (بازدارنده)، میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری می‌شود (واکنش۳).

[1] Guilbaut
[2] Carbammic

مطالعات تجربی بیانگر ارتباط خطی بین میزان بازداری و غلظت بازدارنده در محلول می‌باشد که بر این اساس بیوحسگرهای مختلفی برای آشکارسازی ترکیبات ارگانوفسفره توسعه یافته‌اند [۲ و ۳]. به‌طور هم‌زمان انواع مختلف سیستم‌های مبدل مانند پتانسیومتری [۴]، آمپرومتری [۵] ترانزیستور اثر میدان [۶] بیوحس‌گرهای نوری [۷]، فلورسانس [۸] و شناساگرهای رنگ‌سنجی [۹] توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف در دنیا برای آشکارسازی و تعیین ترکیبات ارگانوفسفره مورد آزمایش و تحقیق قرار گرفته‌اند [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 ارگانوفسفره از جمله حسگرهایی هستند که به‌دلیل اهمیت بالای اندازه‌گیری این ترکیبات به مقدار زیادی در این حوزه مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیست حسگرهای تک آنزیمی با استفاده از الکترود پلاتین به‌عنوان الکترود کار و تثبیت آنزیم استیل کولین استراز و اندازه‌گیری تیوکولین در ۴۵۰ mV+ در مقابل الکترود مرجع Ag/AgCl توسعه یافته است [۱۱]. برای کاهش پتانسیل اعمال شده از دو روش زیر استفاده شده است. به‌کارگیری واسطه‌های ردوکس مانند کبالت فتالوسیانین [۱۲]، پروسین بلو [۱۳]، تتراسیانوکوینودی‌متان [۱۴]، کبالت هگزاسیانوفرات [۱۵]، پتاسیم فری سیانید [۱۶]، یا استفاده از مواد جدید مانند نانو لوله‌های کربنی [۲۲-۱۷]. در میان استرهای فسفات، مشتقات فسفرو تایوئات به‌عنوان ترکیبات سمی و آفت کش مورد توجه هستند. تری اتیل تیوفسفات یکی از مشتقات این دسته ترکیبات است. این ماده با نام آیوپاک O,O,S-Triethylphosphorothioate شناخته می‌شود و به‌عنوان شبه عامل اعصاب ساختاری شبیه به عوامل VX دارد (شکل ۱). در این کار تحقیقاتی یک حسگر الکتروشیمیایی بر مبنای اصلاح الکترود با نانو لوله کربنی و آنزیم استیل کولین استراز تهیه شده و توانایی آن برای آشکارسازی شبه عامل اعصاب تری اتیل تیوفسفات مورد ارزیابی قرار گرفته است.



ب الف

شکل ۱. ساختار مولکولی الف) VXو ب) تری اتیل تیوفسفات

۲. بخش تجربی

۲-۱. مواد

استیل کولین استراز(AChE 236 U/mg) و استیل تایوکولین کلراید (ATCl) از شرکت سیگما آلدریچ و نانو لوله‌های چند دیواره کربنی نیز از شرکتNanoLab خریداری شدند. سایر مواد مورد استفاده نیز دارای خلوص تجزیه‌ای بوده و از شرکت مرک یا سیگما

تهیه شده‌اند. تری اتیل تایو فسفات از واکنش تری اتیل فسفیت با تتراکلریدکربن و بروموتری‌کلرومتان در حضور بوتان- ۱- تیول سنتز شد و به‌روش‌های اسپکتروسکپی شناسایی گردید [۲۳].

۲-۲. دستگاه‌ها

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

۲-۳. آماده‌سازی الکترود کربن شیشه‌ای

الکترود کربن شیشه‌ای به‌وسیله کیت پولیش BAS و پودر Al_2O_3 پولیش داده شد تا به یک سطح آینه‌ای برسد. سپس الکترود در محلول آب و اتانول و در حمام التراسونیک به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد. در ادامه الکترود به سل الکتروشیمیایی حاوی محلول بافر (pH=۵) منتقل شده و به آن پتانسیل ۱/۷۵+ ولت به مدت ۳۰۰ ثانیه اعمال گردید. الکترود در پتانسیل‌های ۰/۳ تا ۱/۲۵ و ۰/۳تا ۱/۳- تحت روبش قرار گرفت تا الکترود جریان زمینه ثابتی را نشان دهد. سپس الکترود با آب مقطر شستشو داده شده برای اصلاح با نانولوله‌کربنی آماده گردید.

۲-۴. ساخت نانو زسیت حسگر

محلول کیتوسان ٪۰/۵ با حل کردن پودر کیتوسان در محلول آبی استیک اسید pH=۵ به‌دست آمد. این محلول در زمان‌هایی که مورد نیاز نمی‌باشد در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه‌داری می‌شود. ۵ میکرولیتر از گلوترآلدئید ٪۲۵ با یک میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم 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 به‌ترتیب برابر ۰/۱۲و۰/۴۸و ٪۰/۴۷ (v/v) می‌باشد. برای آماده‌سازی حسگر ۲ میکرولیتر از این مخلوط بر روی الکترود قرار داده شده و برای تثبیت آن الکترود به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از این زمان سطح الکترود به‌منظور پاک شدن مقادیر اضافی گلوترآلدئید به‌وسیله آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده شد. سپس ۴ میکرولیتر از محلول آنزیم استیل کولین استراز (۲۰۰ میلی واحد، حاوی ۵ میلی‌گرم در یک میلی لیتر از BSA) روی الکترود قرار گرفته و الکترود به‌منظور 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 ازتبخیر آب، حسگر به‌منظور پاک شدن مقادیر اضافی آنزیم به‌وسیله 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 ۰/۲تا ۰/۸ ولت در محلول بافر فسفات تا دستیابی به منحنی پایدار فعال‌سازی گردید. سپس الکترود 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 ($i_p$control). به منظور تعیین درصد بازداری آنزیم، الکترود اصلاح شده برای ۱۰ دقیقه در محلول‌های تری اتیل تیوفسفات باغلظت‌های متفاوت غوطه‌ور شد. الکترود پس از هر بار غوطه‌وری به سل الکتروشیمیایی حاوی ۰/۶۴ میلی‌مول سوبسترا منتقل و پس از انجام ولتامتری چرخه‌ای در هر غلظت، پاسخ الکترود ($i_p$exp) ثبت شد. درصد بازداری آنزیم از رابطه زیر محاسبه گردید:

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

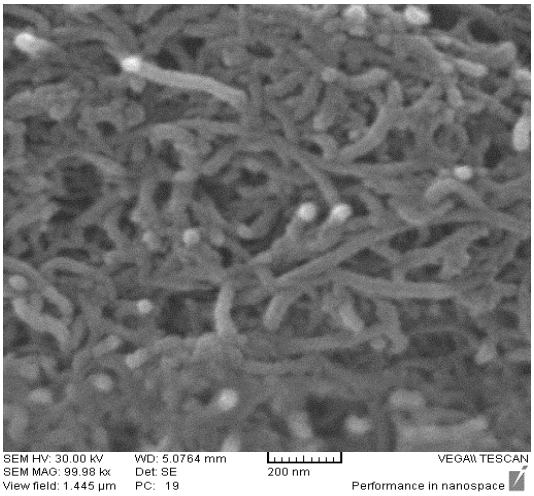
۳. نتایج و بحث

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

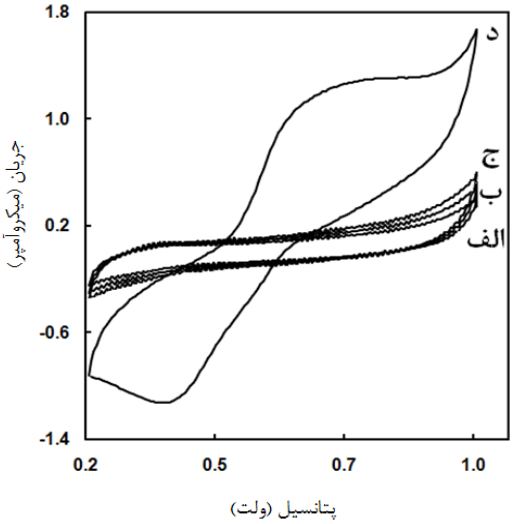
۳-۱. رفتار الکتروشیمیایی حسگر

شکل (۳) الف تا د رفتار الکتروشیمیایی الکترود کربن شیشه‌ای (GCE)، الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با مخلوط گلوتارالدهید، کیتوسان و نانو لوله کربنی (GCE/CMC) و الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با مخلوط گلوترالدهید، 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 الکترود GCE/CMC-AChE در حضور سوبسترا، برای مابقی الکترودها تنها جریان زمینه مشاهده شد. این رفتار به‌عنوان واکنش بین سوبسترا و آنزیم تنها واکنش قابل انتظار است که به‌خوبی مشاهده شده است. پیک اکسیداسیون مشاهده شده پتانسیل ۰/۷ ولت مربوط به اکسایش تایوکولین بوده که خود

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



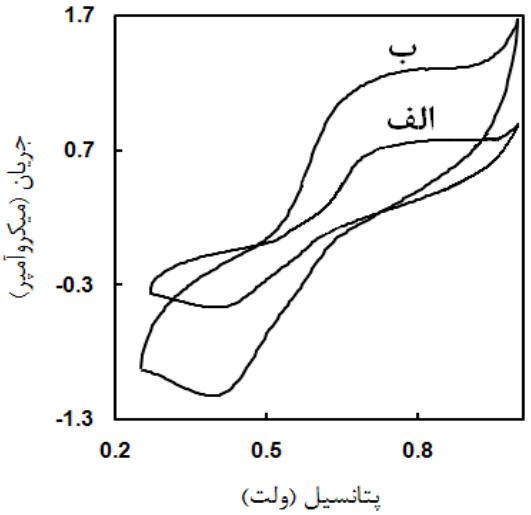
شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو لوله‌های کربنی مورد استفاده برای اصلاح الکترود



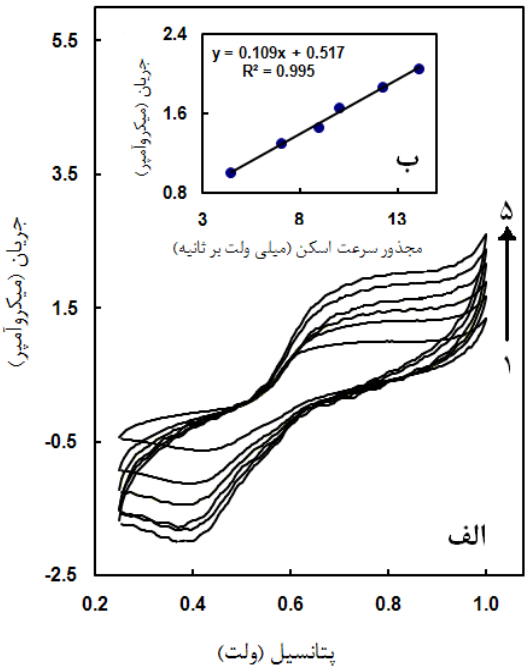
شکل ۳. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الف) AChE-CMC/GCEدر بافر فسفات pH=۷. ب) GCE ج) GCE/CMC د) AChE-CMC/GCE در بافر فسفات حاوی ۰/۶۴ mM استیل تیوکولین، سرعت اسکن $۵۰\ mVs^{-1}$

برای بررسی تأثیر نانولوله کربنی بر پاسخ الکترود، ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکترودهای GCE/CMC و AChE-CMC/GCE در بافر فسفات (pH=۷) 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، تأثیرکاتالیزوری و سطح بیشتر نانولوله‌های کربنی می‌باشد (شکل ۴).

شکل (۵) بررسی سرعت اسکن بر فرایند الکترودی حاصل از اکسایش و کاهش سوبسترا بر سطح الکترود 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.



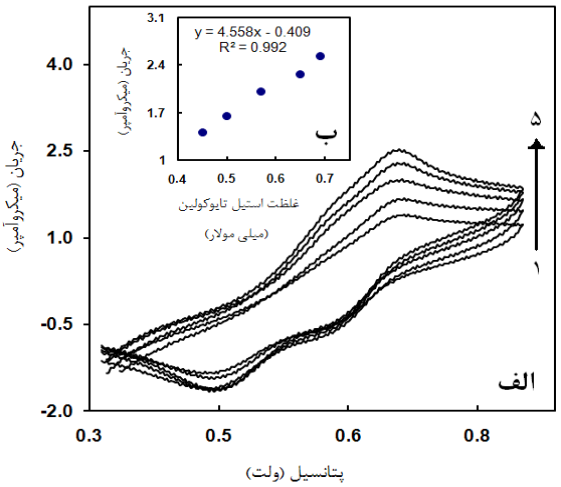
شکل ۴. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الف)CMC/GCE. ب) AChE-CMC/GCE در بافر فسفات (pH=۷) حاوی ۰/۶۴ mM استیل تیوکولین، سرعت اسکن $۵۰\ mVs^{-1}$



شکل ۵. الف) ولتاموگرام‌های چرخه‌ای AChE-CMC/GCE در بافر فسفات (pH=۷) حاوی ۰/۶۴ mM استیل تایوکولین در سرعت اسکن ۱) ۲۰، ۲) ۵۰، ۳) ۸۰، ۴) ۱۰۰ و ۵) ۱۵۰ mVs^{-1}. ب) رابطه بین مجذور سرعت اسکن و جریان‌های پیک

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

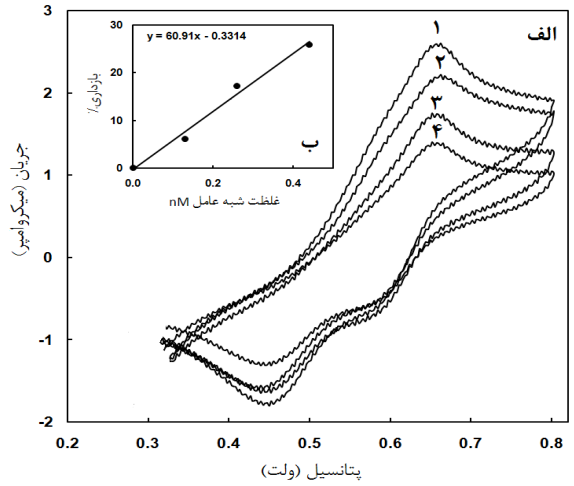
اثر مقدار نانو لوله کربنی بر پاسخ حسگر مورد بررسی قرار گرفته است. با افزایش مقدار نانولوله کربنی جریان پاسخ حسگر افزایش می‌یابد ولی مقادیر بیش از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر احتمالاً به‌دلیل کلوخه شدن نانولوله‌ها و افزایش مقاومت و ظرفیت لایه دوگانه الکتریکی الکترود اصلاح شده سبب کاهش جریان می‌گردد. بنابراین مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان مقدار بهینه برای اصلاح سطح الکترود انتخاب شد. زمان انکوباسیون به‌صورت زمان واکنش آنزیم با بازدارنده تعریف می‌شود. برای بازداری برگشت ناپذیر امکان رسیدن به حد تشخیص‌های پایین‌تر با افزایش زمان انکوباسیون وجود دارد، در واقع معمولاً درجه بازداری آنزیم با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد تا در نهایت یک حالت ثابت ایجاد شود. انتخاب زمان انکوباسیون معمولاً با در نظر گرفتن حالت مناسبی بین حساسیت و زمان کلی آنالیز انتخاب می‌شود. در این تحقیق زمان‌های ۲-۲۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. بهترین زمان انکوباسیون که در آن بهترین بازداری آنزیم مشاهده شد ۱۰ دقیقه به‌دست آمد. بررسی مقالات منتشر شده در زمینه حسگرهای مبتنی بر آنزیم AChE [۲۵] نشان داد بهترین pH که درآن بیشترین پاسخ برای حسگر مشاهده می‌شود pH خنثی بین ۷تا ۷/۴ است. بر این اساس محلول بافر فسفات با pH=۷ برای بررسی پاسخ حسگر انتخاب گردید. بررسی تأثیر غلظت سوبسترا (ATCl) 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 ۰/۶۴ میلی مولار 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 ۰/۶۴ میلی‌مولار می‌باشد. بنابراین غلظت ۰/۶۴ میلی‌مولار به‌عنوان غلظت سوبسترا برای بررسی پاسخ حسگر انتخاب شد.



شکل ۶. الف) ولتاموگرام‌های چرخه‌ای AChE-CMC/GCE در بافر فسفات(pH=۷) حاوی غلظت‌های متفاوت استیل تایوکولین ۱)۰/۴، ۲) ۰/۴۵، ۳) ۰/۵۲، ۴)۰/۶، ۵) ۰/۶۴میلی مولار. سرعت اسکن $50 mVs^{-1}$ و ب) رابطه بین غلظت و جریان‌های پیک

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

شبه عامل‌تری اتیل تایو فسفات به‌عنوان یک مهار کننده واکنش بین استیل تایوکولین و آنزیم استیل کولین استراز شناخته می‌شود. اندازه‌گیری بازداری بعد از انکوباسیون لایه آنزیم موجود در سطح الکترود 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 ۰/۱۳ تا ۰/۴۴ نانو مولار انجام شد. همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت شبه عامل در محلول انکوباسیون پاسخ حسگر به‌طور خطی تغییر می‌یابد. حد تشخیص به‌عنوان غلظتی از شبه عامل که ۱۰٪ در فعالیت AChE بازداری ایجاد کند تعریف می‌شود[۲۶]. مطابق با این تعریف حد تشخیص نانو زیست حسگر ۰/۰۹۳ نانو مولار به‌دست آمد.



شکل ۷. الف) نمودار ولتامتری چرخه‌ای AChE-CMC/GCE در محلول ۰/۶۴ میلی‌مولار استیل تیوکولین (۱) قبل از انکوباسیون با شبه عامل(۴-۲) به‌ترتیب پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون با شبه عامل در غلظت‌های ۰/۱۳، ۰/۲۶ و ۰/۴۴نانو مولار، سرعت اسکن $50 mVs^{-1}$ و ب) منحنی کالیبراسیون شبه عامل

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

نانو زیست حسگر برای مطالعه پایداری در محلول۰/۶۴ میلی مولار استیل تایو کولین و پس از انکوباسیون با محلول ۰/۲۶ نانو مولار شبه عامل در یک دوره زمانی دو ماهه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دهنده ایجاد پاسخی حدود ۹۰ درصد پاسخ نانو زیست حسگر اولیه می‌باشد. برای بررسی تکثیرپذیری، ۵ حسگر در شرایط مشابه و در روزهای متفاوت تهیه و پاسخ آنها در شرایط مشابه اندازه‌گیری شد. انحراف استاندارد نسبی بین پاسخ این حسگرها ۸٪ به‌دست آمد. همچنین تکرارپذیری حسگر با تعیین ۵ پاسخ یکی از حسگرها در یک روز مورد بررسی قرار گرفت. انحراف استاندارد نسبی به‌دست

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 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.

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	۱×۱۰^{-۱۳} تا ۱×۱۰^{-۷}	۴×۱۰^{-۱۳}	۱۸
آمپرومتری تزریق در جریان	Sulfotep	۸۰×۱۰^{-۶} تا $۱/۵\times۱۰^{-۶}$	۱×۱۰^{-۹}	۱۹
آمپرومتری	Methyl Parathion	۱۰×۱۰^{-۶} تا ۲×۱۰^{-۶}	۸۰×۱۰^{-۸}	۲۰
	Paraoxan	۱۰×۱۰^{-۶} تا ۲×۱۰^{-۶}	۱۵×۱۰^{-۸}	۲۰
ولتامتری	Carbaryl	۱۵×۱۰^{-۶}تا ۲×۱۰^{-۶}	$۳/۰\times۱۰^{-۸}$	۲۷
	Parathion	۱۵×۱۰^{-۶}تا ۲×۱۰^{-۶}	$۳/۵\times۱۰^{-۸}$	۲۷
ولتامتری	Carbaryl	$۴/۹\times۱۰^{-۶}$ تا $۹/۹\times۱۰^{-۵}$	$۱/۹\times۱۰^{-۷}$	۲۲
ولتامتری	O,O,S-Triethylphosphorothioate	$۴/۴\times۱۰^{-۱۰}$ تا $۱/۳\times۱۰^{-۱۰}$	$۹/۳\times۱۰^{-۱۱}$	کار حاضر

۴. نتیجه‌گیری

در این مقاله یک روش ساده و مؤثر برای تثبیت آنزیم کولین استراز بر روی الکترود اصلاح شده با نانولوله کربنی ارائه شده است. ماتریکس مورد استفاده در این روش مانع از نشت آنزیم از سطح الکترود شده و به‌دلیل 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 Bienzymatic Sensor Basedon Sol-Gel Immobilized *Nippostrongylusbrasiliensis* 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 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 Dichlovos 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.

[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. "AcetylcholinesteraseVoltammetric Biosensors Based on Carbon Nanostructure Chitosan Composite Material for Organophosphate Pesticides"; Materials Sci. Eng. 2010, 30, 817-821.

[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.