

تهیه حسگر زیستی گلوکز با به کارگیری الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربن و پلیمر ۴-آمینوتیوفنول

محمد علی کامیابی^{۱*} و صدیقه شریفی راد^۲

۱- دانشیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشگاه زنجان، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکترای شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشگاه زنجان، تهران، ایران

دریافت: بهمن ۱۳۹۴، بازنگری نخست: اردیبهشت ۱۳۹۵، پذیرش: خرداد ۱۳۹۵

چکیده: در این مقاله تهیه یک حسگر زیستی بسیار حساس گلوکز بر اساس استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز ارایه شده است. برای تثبیت آنزیم روی سطح الکتروود از پیونددهنده‌ی عرضی گلو تار آلدهید استفاده شده است. بر این اساس، نخست سطح الکتروود کربن شیشه‌ای با نانولوله‌های کربنی چند دیواره اصلاح شد. فرایند الکتروپلیمریزاسیون در سطح الکتروود، در سل الکتروشیمیایی و در تماس با محلول اتانولی حاوی ۴-آمینوتیوفنول با غلظت ۲ میلی‌مولار و سولفوریک اسید با غلظت ۰/۰۷ مولار پس از عبور دادن گاز نیتروژن، به وسیله ۱۴ چرخه‌ی ولتاموگرام چرخه‌ای با سرعت رویش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه در گستره‌ی پتانسیل ۰/۲- تا ۱/۲+ ولت نسبت به الکتروود مرجع Ag/AgCl انجام گرفت. تشکیل پلیمر بر روی سطح الکتروود ویژگی‌های الکتریکی و مکانیکی سطح را افزایش می‌دهد و باعث انتقال سریع الکترون می‌شود. با افزایش گلوکز و کم شدن جریان دماغه‌ی کاندی، رابطه‌ی خطی خوبی بین غلظت گلوکز و کاهش جریان کاندی به دست آمد. این روش حساسیت $0.021 \mu A/\mu M$ ، گستره‌ی خطی ۱ تا ۴۵۰ میکرومولار با ضریب هم‌بستگی ۰/۹۹۶، حد تشخیص ۰/۱ میکرومولار را داراست. ضریب انتقال الکترون ۰/۴۷ و ثابت انتقال الکترون s^{-1} از دیگر ویژگی‌های قابل توجه کار حاضر به‌شمار می‌رود که نشان‌دهنده‌ی انتقال الکترون آسان در این سامانه است.

واژه‌های کلیدی: حسگر گلوکز، نانولوله چند دیواره کربنی، پلی ۴-آمینوتیوفنول، گلوکز اکسیداز

مقدمه

زمینه هم‌چنان مورد توجه است. در تهیه حسگرهای زیستی، تثبیت مولکول‌های زیستی به‌ویژه آنزیم‌ها بر سطح الکتروود یکی از مهم‌ترین نکات است [۱۱ تا ۱۴]. به‌طور کلی در روش‌های فیزیکی احتمال جدا شدن آنزیم از سطح الکتروود وجود دارد درحالی‌که در روش‌های شیمیایی پیوند خوبی بین آنزیم و سطح الکتروود برقرار می‌شود. پیوند عرضی پروتئین‌ها به‌وسیله‌ی واکنش‌گرهای دوعاملی یک روش تثبیت مؤثر است، اگرچه در این روش ممکن

فناوری حسگر زیستی به‌عنوان یک علم نوین، جایگزین قدرتمندی برای فن‌های تجزیه متداول در عرصه علوم زیستی است [۱]. امروزه حسگرهای ساخته شده برای اندازه‌گیری گلوکز حدود ۸۵ درصد از کل حسگرهای زیستی را تشکیل می‌دهند [۲ و ۳]، جزء زیستی مورد نظر در این حسگر، آنزیم گلوکز اکسیداز (GOX) است [۴ تا ۱۰] و نظر به اهمیت این حسگر، پروژه‌ها در این

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از نانولوله کربنی چند دیواره با قطر داخلی ۱ تا ۸ نانومتر و قطر خارجی ۲ تا ۲۵ نانومتر از پژوهشگاه صنعت نفت ایران، دی متیل سولفوکسید و آنزیم گلوکز اکسیداز به دست آمده از اسپرژیلوس نیجر با فعالیت ۱۳۰ U/mg از شرکت فلوکا، ۴-آمینوتیوفنول، پتاسیم کلرید، سدیم هیدروکسید و گلوکز از شرکت مرک، و گلوکز آلدهید ۵۰٪ محلول در آب از شرکت سیگما، گاز N_2 با درصد خلوص ۹۹٫۹۹٪ برای اکسیژن زدایی محلول و ایجاد اتمسفر بی اثر استفاده شده است.

در همه‌ی آزمایش‌ها از محلول بافر ۰٫۱ مولار فسفات به عنوان الکترولیت کمکی استفاده شد. محلول نانولوله‌های کربنی با افزایش مقدار مشخصی از پودر آن در دی‌متیل سولفوکسید تهیه شد. به منظور تهیه‌ی محلول ۴-آمینوتیوفنول وزن‌های محاسبه شده‌ای از آن با ترازوی تجزیه‌ای توزین و همراه حجم لازم از سولفوریک اسید درون بالن حجمی افزوده شدند و پس از حل کردن در اتانول تقطیر شده بالن به حجم رسانده شد. پیش از الکتروپلیمره کردن بر روی سطح الکتروود، عمل اکسیژن زدایی محلول به مدت حداقل ۵ دقیقه با گاز نیتروژن انجام گرفت. برای تهیه‌ی محلول مادر آنزیم، وزن محاسبه شده‌ای از آنزیم گلوکز اکسیداز را در محلول ۰٫۱ مولار بافر فسفات با pH برابر ۷ حل کرده و در یک بالن به حجم رسانده شد. همین‌طور به منظور آماده کردن محلول مادر گلوکز آلدهید، حجم مشخصی از گلوکز آلدهید با بافر ۰٫۱ مولار فسفات با pH برابر ۷ رقیق شد. محلول‌های مادر در یخچال نگهداری و در حین آزمایش به کمک میکروپپیت ۰٫۵ تا ۱۰ میکرولیتری حجم لازم از آن‌ها برداشته می‌شد.

محلول مادر گلوکز با حل کردن وزن محاسبه شده‌ای از گلوکز در بافر ۰٫۱ مولار فسفات با pH برابر ۷ و فرصت دادن برای انجام چرخش نوری به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق تهیه و سپس در یخچال نگهداری شد. در حین آزمایش به کمک میکروپپیت (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) حجم لازم از نمونه برداشته می‌شد، تا حجم نهایی آن در سل الکتروشیمیایی غلظت موردنظر را تأمین کند.

است بخشی از فعالیت آنزیم کم شود [۱۵ تا ۱۷]. در میان گستره‌ی بزرگ واکنش‌گرهای پیونددهنده‌ی پروتئین، گلوکز آلدهید بیشترین کاربرد را پیدا کرده است. گلوکز آلدهید یک دی آلدهید پنج کربنه خطی است. مایعی بی‌رنگ است و به هر نسبتی در آب، الکل و حلال‌های آلی حل می‌شود. موفقیت بزرگ گلوکز آلدهید به‌خاطر فراهم بودن در بیشتر آزمایشگاه‌های بیوشیمیایی، ارزان بودن و واکنش‌پذیری بالای آن است. با گروه‌های آمینی در حوالی pH طبیعی به سرعت واکنش می‌دهد و پیوندهای عرضی مؤثرتری نسبت به سایر آلدهیدها به‌وجود می‌آورد [۱۸].

استفاده از نانوساختارها برای تهیه حسگر در سال‌های اخیر به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات ویژگی‌های منحصر به فرد زیادی مانند نسبت سطح به حجم بزرگ، فعالیت سطحی بالا، کارایی الکتروکاتالیزوری زیاد و توانایی جذب سطحی قوی دارند. در نتیجه تبادل الکترون بین آنالیت و سطح الکتروود به سرعت انجام می‌شود و برای انتقال الکترون به حدواسط یا واکنشگر ویژه‌ای نیاز نیست. افزون بر آن داشتن سازگاری زیستی زیاد، پایداری زیاد، تکرارپذیری عالی باعث شده تا نانوساختارها کارایی خوبی برای تعیین گلوکز در نمونه‌های حقیقی داشته باشند. در این پروژه، از نانولوله‌های کربنی به‌عنوان نانوساختارها استفاده می‌شود. به کارگیری نانولوله‌های کربنی برای اصلاح سطح الکتروود، منجر به بهبود سرعت فرایند انتقال الکترون می‌شود. در نتیجه موجب کاهش اضافه ولتاژ و افزایش کارایی الکتروود می‌شود. نانولوله‌های کربنی ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله: ویژگی الکترونیکی ویژه، پایداری حرارتی و شیمیایی، قابلیت ارتجاعی و استحکام زیاد دارند. اما بارزترین ویژگی این مواد رسانایی الکترونیکی بالای آن‌ها نسبت به نانو ساختارهای دیگر است [۱۹ تا ۲۲].

در این مطالعه حسگر زیستی آنزیمی جدید برای اندازه‌گیری گلوکز معرفی شده است. برای این منظور تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز به کمک پیونددهنده‌ی عرضی گلوکز آلدهید روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چنددیواره و پلی ۴-آمینوتیوفنول انجام شد.

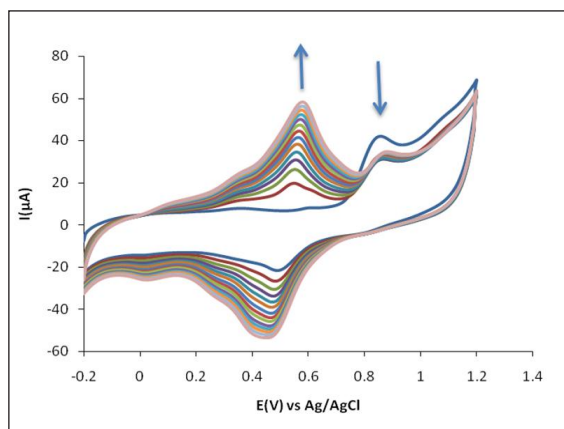
بخش تجربی

دستگاه‌های الکتروشیمیایی

در یخچال قرار گرفت تا به‌طور کامل خشک شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول مادر گلو تار آلدهید به کمک میکروپیپت بر روی الکتروود قرار داده شد و پس از ۴ ساعت در یخچال ماندن به‌منظور اندازه‌گیری گلوکز استفاده شد.

نتیجه‌ها و بحث

اصلاح سطح الکتروود و تثبیت آنزیم "گلوکز اکسیداز" روی آن پس از اصلاح سطح الکتروود با نانولوله کربنی چند دیواره، فرایند الکتروپلیمره کردن ۴-آمینوتیوفنول با ثبت ۱۴ ولتاموگرام چرخه‌ای در سرعت روبش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه (در گستره پتانسیل ۰٫۲- تا ۱٫۲+ ولت نسبت به الکتروود Ag/AgCl) مطابق شکل ۱ انجام گرفت. مطابق بخش تجربی، آنزیم بر روی الکتروود اصلاح‌شده قرار داده شد و به‌وسیله ترکیب گلو تار آلدهید با تشکیل پیوندهای عرضی بر روی سطح الکتروود اصلاح‌شده تثبیت شد. همچنین، تصویرهای به‌دست آمده با از میکروسکوپ الکترونی روشی با بزرگ‌نمایی‌های متفاوت، تشکیل فیلم پلیمری همراه با آنزیم را در سطح الکتروود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی را نشان می‌دهد (شکل ۲).

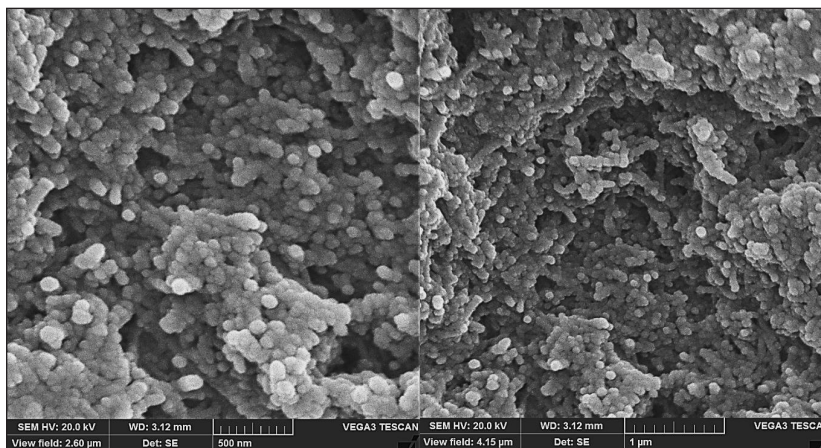


شکل ۱ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای ثبت شده در حین الکترو پلیمره کردن ۴-آمینو تیو فنول در روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره، غلظت ۴-آمینو تیو فنول در محلول اتانولی ۲ میلی‌مولار از سولفوریک اسید ۰٫۰۷ مولار، ۱۴ ولتاموگرام چرخه‌ای ثبت شده برای الکترو پلیمره کردن در سرعت روبش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه

آزمایش‌های ولتامتری با استفاده از دستگاه متروم (Metrohm) مدل VA757 با یک سل سه الکتروودی انجام شد. سامانه سه الکتروودی شامل الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح نشده و اصلاح‌شده به‌عنوان الکتروود کار، الکتروود مرجع Ag/AgCl و سیم پلاتین به‌عنوان الکتروود کمکی بود. از یک دستگاه pH متر Metrohm مدل ۷۸۰ برای تهیه محلول‌های بافر و از یک ترازوی تجزیه‌ای Ohaus با دقت ± 0.0001 گرم مدل GA200D برای توزین استفاده شد. هم‌چنین از یک دستگاه فراصوت با قدرت ۸۰ وات برای پخش و همگن کردن کامل ذرات نانولوله‌های کربنی و پاک کردن سطح الکتروود استفاده شد. وسایل شیشه‌ای متداول برای انجام تمام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

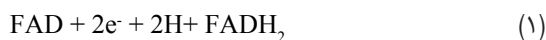
آماده کردن الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و ۴-آمینوتیوفنول

تمیز کردن سطح الکتروود کربن شیشه‌ای نخست با مالش بر روی ذرات پودر آلومینا و سپس قرار دادن در محلول اتانول و به‌وسیله دستگاه فراصوت به مدت ۴۸۰ ثانیه انجام گرفت تا ذرات ریز جامد از روی آن برداشته شود و در آخر با آب مقطر شستشو داده شد، در مرحله‌ی بعد ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی نانولوله‌های کربنی چند دیواره پخش شده با غلظت ۱ mg/ml در حلال دی‌متیل سولفوکسید که به مدت ۳۰ دقیقه در فراصوت قرار گرفته بود، بر روی این الکتروود گذاشته شد، این الکتروود به مدت ۴ ساعت در آن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. در مرحله بعد، الکتروود کربن شیشه‌ای را در داخل سل حاوی محلول ۴-آمینوتیوفنول با غلظت ۲ میلی‌مولار و سولفوریک اسید با غلظت ۰٫۰۷ مولار قرار داده شد و فرایند الکتروپلیمره کردن با ثبت ۱۴ ولتاموگرام چرخه‌ای در سرعت روبش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه (در گستره پتانسیل ۰٫۲- تا ۱٫۲+ ولت نسبت به الکتروود Ag/AgCl) انجام گرفت. مقدار ۷ میکرولیتر از محلول ۲٫۵ mg/ml آنزیم (۲۲۷ unit) به کمک میکروپیپت بر روی الکتروود اصلاح‌شده قرار داده شد و الکتروود به‌دست آمده به مدت ۲ ساعت

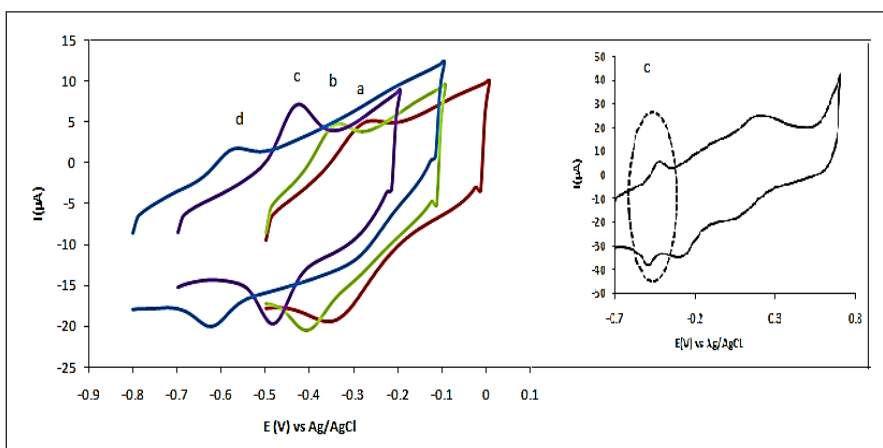


شکل ۲ تصویرهای SEM به دست آمده از سطح الکتروود اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی، فیلم پلیمری و آنزیم گلوکز اکسیداز

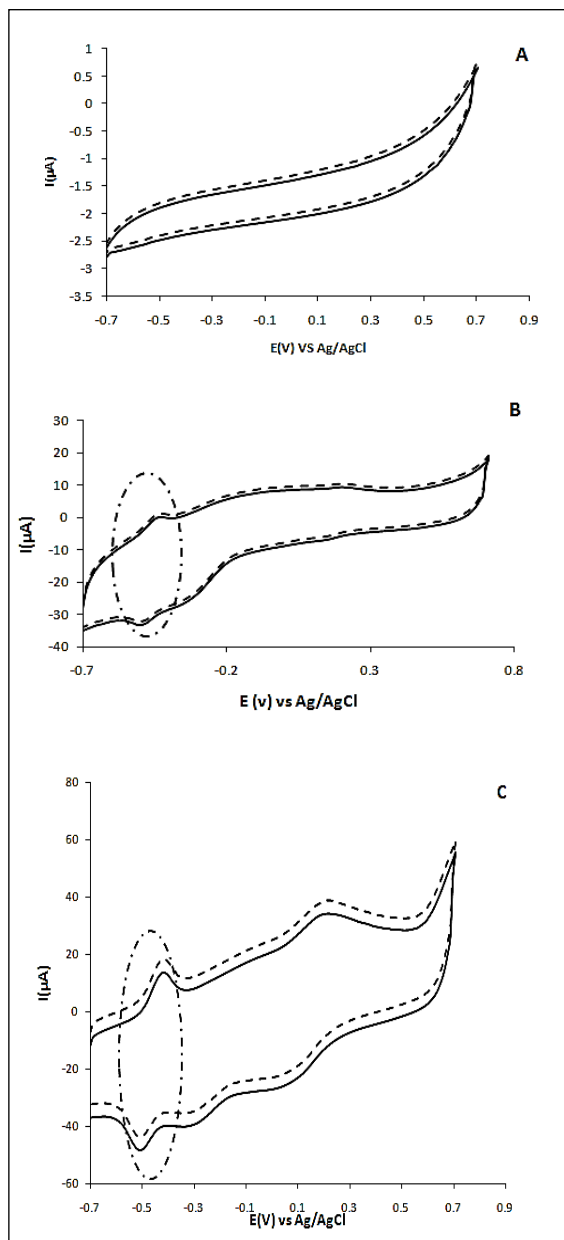
مقدارهای منفی تر جابه‌جا می‌شود. بررسی اثر pH بر روی پتانسیل فرمال آنزیم تثبیت شده نشان می‌دهد که پتانسیل فرمال آنزیم با pH تغییر می‌کند. در نتیجه، در واکنش ردوکس آن، مبادله‌ی پروتون صورت می‌گیرد. شیب نرنستی به دست آمده برای این فیلم برابر با 51 mV/pH بود (شکل ۴)، که بیان‌کننده‌ی نسبت ۱:۱ الکترون به پروتون مبادله شده در طی فرایند ردوکس برای آن است (رابطه‌ی ۱).



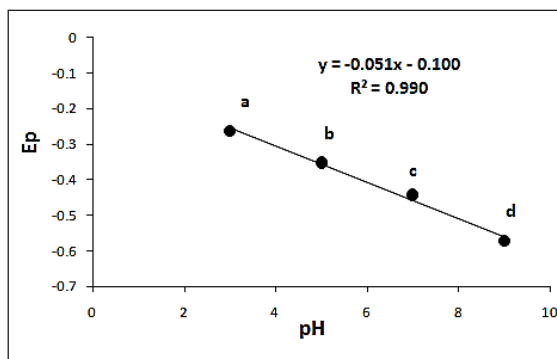
بررسی ویژگی‌های فیلم آنزیم تثبیت شده ولتاموگرام‌های چرخه‌ای ثبت شده از الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده (با نانولوله‌های کربنی چند دیواره، فیلم الکتروپلیمره و قرار دادن آنزیم و تثبیت شده با گلوکز آلدهید) در محلول بافر فسفات در شکل ۳ آورده شده است. ولتاموگرام چرخه‌ای در محلول بافر فسفات با pH برابر ۷ نشان‌دهنده‌ی یک پیک اکسایش و کاهش برگشت‌پذیر به ترتیب در پتانسیل -0.442 و -0.482 ولت نسبت به الکتروود مرجع Ag/AgCl است. همان گونه که از این شکل مشخص است پتانسیل پیک‌ها با افزایش pH به سمت



شکل ۳ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربن چند دیواره و پلی ۴-آمینوتیوفنول، آنزیم و گلوکز آلدهید در محلول‌های بافر فسفات با pH برابر با (a) ۳، (b) ۵، (c) ۷ و (d) ۹ در سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه



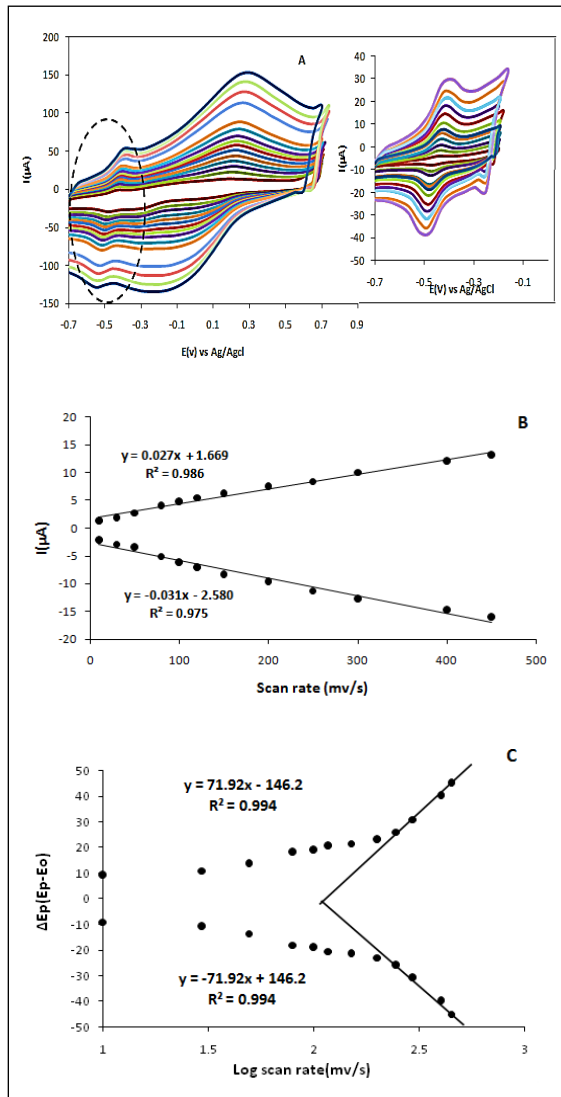
شکل ۵ ولتاموگرام چرخه‌ای گلوکز ۱۰۰ میکرومولار در بافر فسفات با pH برابر ۷ پس از تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز به کمک پوشش گلاتارآلدئید در حضور و عدم حضور گلوکز (به ترتیب با خط چین و خط پر) روی سطح (A) الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح نشده، (B) الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و (C) کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و پلی ۴-آمینو تیوفنول با تزریق هوا



شکل ۴ نمودار پتانسیل برحسب pH برای آنزیم تثبیت شده روی سطح الکتروود در محلول‌های بافر فسفات با pH (a) ۳، (b) ۵، (c) ۷ و (d) ۹

انتقال الکترون مستقیم آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده بر روی پلی ۴-آمینوتیوفنول/نانولوله کربنی/ الکتروود کربن شیشه‌ای شکل ۵ (A) ولتاموگرام چرخه‌ای گلوکز بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح نشده پس از تثبیت آنزیم را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که آنزیم بر روی سطح این الکتروود توانایی انتقال الکترون مناسبی با الکتروود ندارد و پاسخ قابل مشاهده‌ای را نسبت به گلوکز نمی‌دهد. در شکل ۵ (B) ولتاموگرام چرخه‌ای گلوکز بر روی سطح الکتروود کربنی شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی پس از تثبیت آنزیم قابل مشاهده است. در این شکل توانایی انتقال الکترونی سامانه آنزیمی با سطح الکتروود به علت افزایش سطح الکتروود افزایش یافته اما پاسخها بسیار کوچک هستند. قسمت (C) شکل ۵، ولتاموگرام چرخه‌ای گلوکز بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی و پلی ۴-آمینوتیوفنول پس از تثبیت آنزیم نشان می‌دهد. در این سامانه به بهترین شکل هم انتقال الکترون مستقیم آنزیم و هم اکسایش الکتروکاتالیستی پراکسید هیدروژن تولید شده مشاهده می‌شود. همان طور که در این شکل مشاهده می‌شود ویژگی مناسب بسیار آماده‌سازی شده برای گلوکز باعث شد تا در ادامه‌ی کار از سامانه الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی، پلی ۴-آمینوتیوفنول و آنزیم گلوکز اکسیداز با پوشش گلاتارآلدئید برای اندازه‌گیری گلوکز استفاده شود.

کاهش می‌یابد و با دنبال کردن کاهش در جریان کاتدی می‌توان گستره‌ی پاسخ‌دهی الکتروکد به تغییر غلظت گلوکز را تعیین کرد.



شکل ۶ ولتاموگرام‌های (A) چرخه‌ای ثبت شده الکتروکد کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با فیلم پلی ۴-آمینو تیو فنل قرار دادن آنزیم و گلوکز آلدهید در سرعت‌های روبش متفاوت (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۴۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه) در محلول بافر فسفات با pH برابر ۷، (B) نمودار جریان‌های آندی و کاتدی به‌دست آمده در سرعت‌های روبش پتانسیل متفاوت برحسب سرعت روبش و (C) نمودار تفاوت پتانسیل پیک از پتانسیل تعادلی برحسب لگاریتم سرعت روبش

ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از فیلم آنزیم تثبیت شده در سرعت‌های روبش پتانسیل متفاوت در محلول بافر فسفات با pH برابر ۷ ثبت شد. شکل ۶-A ولتاموگرام‌های چرخه‌ای ثبت شده را نمایش می‌دهد. نمودار جریان آندی و کاتدی ولتاموگرام‌های به‌دست آمده نسبت به سرعت روبش پتانسیل در شکل ۶-B آورده شده است. مشخص است که رابطه‌ی خطی خوبی بین جریان‌های آندی و کاتدی با سرعت روبش در گستره‌ی سرعت روبش پتانسیل از ۱۰ تا ۴۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه وجود دارد و این موضوع نشان‌دهنده‌ی قرار داشتن گونه‌ی الکتروفعال (آنزیم) بر روی سطح الکتروکد است. هم‌چنین نمودار تفاوت پتانسیل دماغه از پتانسیل تعادلی برای دماغه‌هایی آندی و کاتدی نسبت به لگاریتم سرعت روبش در شکل ۶-C نشان داده شده است. در این نمودار رابطه‌ی خطی مشخصی بین تفاوت پتانسیل آندی و کاتدی از پتانسیل تعادلی با لگاریتم سرعت روبش در سرعت‌های روبش بالاتر از ۲۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه وجود دارد. از این رابطه‌ی خطی ضریب انتقال الکترون (α) ۰٫۴۷، در سرعت روبش $450 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ با $\Delta E_p = 45 \text{ mV}$ ثابت سرعت انتقال الکترون 3.2 Ks محاسبه شد. این شواهد نشان‌دهنده‌ی توانایی بالای انتقال الکترون الکتروکد اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی و پلیمر پلی ۴-آمینوتیوفنول است.

بررسی ولتامتری چرخه‌ای زیست حسگر در حضور گلوکز

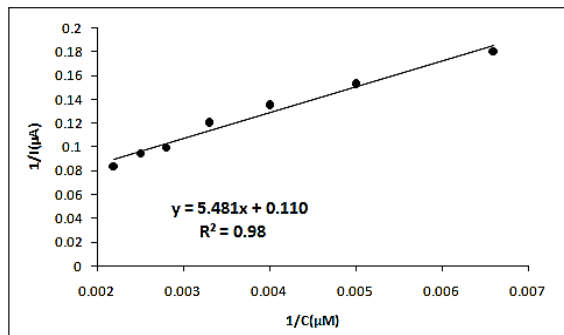
در شکل ۷ ولتاموگرام‌های ثبت شده در غلظت‌های متفاوت از گلوکز بر روی الکتروکد اصلاح‌شده نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این الکتروکد اصلاح‌شده توانایی انتقال الکترون مستقیم بین آنزیم و سطح الکتروکد و نیز انتقال الکترون غیرمستقیم از طریق اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید تولیدی را داراست. برای دنبال کردن تغییرات غلظت گلوکز به کمک الکتروکد اصلاح‌شده محلول از هوا اشباع شد. چون در ناحیه‌ی انتقال الکترون مستقیم آنزیم، آنزیم پیک کاهش اکسیژن را الکتروکاتالیز می‌کند و جریان پیک کاتدی آنزیم به‌شدت افزایش می‌یابد و پیک اکسایش آنزیم کوچک می‌شود. با افزایش گلوکز، جریان کاتدی

و حدتشخیص ۰٫۱ میکرومولار برای نسبت علامت به نوفه‌ی ۳ به‌دست آمد. (۲) ناحیه‌ی پتانسیل ۰٫۲۲۲ ولت نسبت به مرجع که مربوط به اکسایش پراکسید هیدروژن تولیدی است. در این مورد نیز در گستره‌ی ۰٫۱ تا ۰٫۲ میلی‌مولار الکتروود اصلاح‌شده نسبت به گلوکز پاسخ می‌دهد (با ضریب هم‌بستگی ۰٫۹۹۶).

ضریب میکائیلیس-متنن از ثابت‌های مهم در بررسی کارهای آنزیمی به‌شمار می‌رود. ثابت میکائیلیس-متنن، معرف غلظتی از پیش ماده است که موجب پیدایش سرعتی برابر نصف سرعت حداکثر واکنش آنزیمی می‌شود و هر چه تمایل آنزیم و پیش ماده به یکدیگر بیشتر باشد این ضریب کوچک‌تر به‌دست می‌آید. برای محاسبه‌ی این ثابت که نمادی از تمایل آنزیم و پیش ماده به یکدیگر است از رابطه‌ی ۲ (رابطه‌ی لینویور-برک) استفاده شد [۲۳ و ۲۴].

$$(1/I_{ss}) = (1/I_{max}) + (K_m/I_{max})(1/C) \quad (2)$$

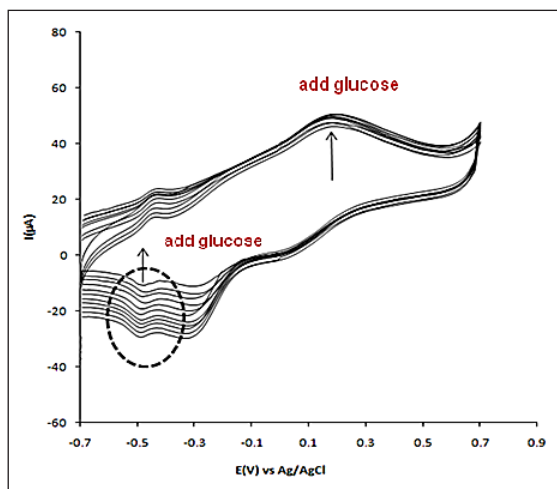
با استفاده از شیب به‌دست آمده در شکل ۹ (نمودار لینویور-برک) که از رسم معکوس جریان نسبت به معکوس غلظت گلوکز به‌دست آمده است، ثابت میکائیلیس-متنن در این بخش ۴۹٫۸۲ میکرومولار محاسبه شد. مقدار کوچک این ثابت نشان‌دهنده تمایل آنزیم و پیش ماده به یکدیگر است.



شکل ۹ نمودار لینویور-برک [۲۳ و ۲۴]

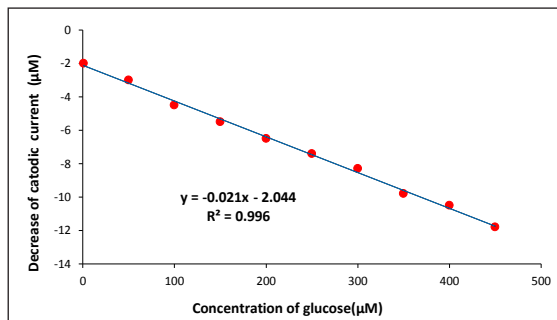
بررسی پایداری زیست حسگر و مزاحمت‌ها

بررسی پایداری طولانی‌مدت تا ۱۴ روز بررسی شد که در ۷ روز اول تا ۸۵٪ از پاسخ خود را نسبت به گلوکز حفظ می‌کند و تا ۱۴ روز این پاسخ بدون تغییر باقی می‌ماند.



شکل ۷ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای ثبت شده الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و فیلم پلی ۴ آمینو تیوفنول و قرار دادن آنزیم و گلوکز آلدئید در غلظت‌های متفاوت از ۱، ۵، ۱۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار. زمان تزریق هوا: ۱۵ دقیقه و سرعت روبش: ۰٫۱ ولت بر ثانیه

به‌منظور تعیین گستره‌ی خطی پاسخ الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با ۴-آمینو تیوفنول از روش ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. در این کار ناحیه‌ی خطی و حدتشخیص در دو ناحیه بررسی شد. (۱) در ناحیه‌ی دماغه‌ی کاتدی آنزیم (انتقال الکترون مستقیم آنزیم با سطح الکتروود) که در این مورد، در گستره‌ی غلظتی ۱ تا ۴۵۰ میکرومولار الکتروود اصلاح‌شده پاسخ‌دهی خوبی نسبت به گلوکز دارد که نمودار درجه‌بندی آن در شکل ۸ نمایش داده شده است (با ضریب هم‌بستگی ۰٫۹۹۶). حساسیت این الکتروود ۰٫۲۱ μA/μM



شکل ۸ نمودار کاهش جریان در دماغه‌ی کاتدی آنزیم در ۰٫۴۸ ولت نسبت به الکتروود مرجع با افزایش غلظت گلوکز در محلول بافر فسفات با pH برابر ۷ اشباع از هوا

جدول ۲ غلظت گلوکز در نمونه‌های سرم خون

بازده درصدی	غلظت گزارش شده (M) آزمایشگاه طبی	غلظت اندازه‌گیری شده (M)	نمونه
۰٫۹۵	$۱٫۷۷ \times ۱۰^{-۴}$	$۱٫۶۸ (\pm ۰٫۱۲) \times ۱۰^{-۴}$	۱
۰٫۹۸	$۱٫۰۷ \times ۱۰^{-۴}$	$۱٫۰۵ (\pm ۰٫۱۰) \times ۱۰^{-۴}$	۲

نتیجه‌ها نشان می‌دهد که مقدار گلوکز اندازه‌گیری شده برای نمونه‌ی سرم خون به این روش تا حد زیادی نزدیک به مقدار گزارش شده‌ی آزمایشگاه تشخیص طبی است. پاسخ نزدیک به دست آمده در اندازه‌گیری نمونه‌ی سرم خون از طریق این روش با روش استاندارد (داده‌ی آزمایشگاه تشخیص طبی)، از ویژگی‌های مثبت کار حاضر به حساب می‌آید.

نتیجه‌گیری

در کار انجام شده سطح الکتروود کربن شیشه‌ای را با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و ۴-آمینو تیو فنول اصلاح شده و برای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز از گلوکارآلدئید استفاده شده است. زیست حسگر مذکور توانایی انتقال الکترون مستقیم گلوکز اکسیداز با سطح اصلاح شده الکتروود را دارد که مزایای زیادی از جمله کاهش مزاحمت‌ها و افزایش حساسیت اندازه‌گیری را باعث می‌شود. این زیست حسگر توانایی اندازه‌گیری گلوکز در نمونه‌های حقیقی را نیز داراست. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که مقدار گلوکز اندازه‌گیری شده برای نمونه‌ی سرم خون به این روش تا حد زیادی نزدیک به مقدار گزارش شده‌ی آزمایشگاه تشخیص طبی است. پاسخ نزدیک به دست آمده در اندازه‌گیری نمونه‌ی سرم خون از طریق این روش با روش استاندارد، از ویژگی‌های مثبت کار حاضر است.

اندازه‌گیری گلوکز در نمونه‌های زیستی مورد اهمیت است. بنابراین، بررسی اثر مزاحمت گونه‌های دیگر که به‌طور معمول همراه با این ترکیب اندازه‌گیری شده در نمونه‌های زیستی وجود دارند، یک امر ضروری است، لذا به‌منظور مشخص کردن قابلیت کاربرد الکتروود اصلاح‌شده برای اندازه‌گیری نمونه‌های حقیقی، اثر مزاحمت ترکیبات معمول در سامانه‌های زیستی روی عملکرد آن مورد بررسی قرار گرفت. مقدار مزاحمت گونه‌های مورد بررسی روی محلول شامل ۱۰۰ میکرومولار گلوکز بررسی شد و حد مزاحمت به‌صورت غلظتی از گونه‌ی مزاحم در نظر گرفته شد که به مقدار ۵٪ خطا در اندازه‌گیری گونه‌ی مورد نظر ایجاد کند. نتیجه‌ها آن در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱ مقدار حد تحمل گونه‌های مزاحم

مقدار حد تحمل (میکرومولار)	گونه‌ی مزاحم
۲۲۰	گلایسین
۱۲۰	اوریک اسید
۳۰۰	آسکوربیک اسید

اندازه‌گیری گلوکز در نمونه‌ی حقیقی

برای اندازه‌گیری نمونه‌های حقیقی برای گلوکز از سرم‌های خون استفاده شد. برای این منظور از نمونه‌های سرم خون افرادی که مبتلا به بیماری دیابت بودند، استفاده شد. هر دو نمونه در بافر فسفات با pH برابر ۷ رقیق شدند. هر نمونه به روش افزایش استاندارد با افزایش گلوکز اندازه‌گیری شد. برای بررسی تکرارپذیری کار هر نمونه ۴ بار اندازه‌گیری شد و نتیجه‌های این اندازه‌گیری‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

مراجع

- [1] Huang, X.J.; Choi, Y.K.; Chemical sensors based on nanostructured materials, Sensors and Actuators B; 122, 659-671, 2007.
- [2] Wang, J.; Mo, J.W.; Li, S.F.; Porter, J.; Anal. Chim. Acta., 441, 183-189, 2001.
- [3] Kozan, J.V.B.; Silva, R.P.; Anal. Chim. Acta., 591, 200-207, 2007.
- [4] Ricci, F.; Amine, A.; Palleschi, G.; Moscone,

- D.; Biosens. Bioelectron., 18, 165-174, 2003.
- [5] Emr, S.; Yacynych, A.; Electroanalysis, 7, 913-923, 1995.
- [6] Periasamy, A.P.; Chang, Y.J.; Chen, S.M.; Bioelectrochemistry, 80, 114-120, 2011.
- [7] Wang, J.; Musameh, M.; Lin, Y.; J. Am. Chem. Soc, 125, 2408-2409, 2003.
- [8] Zhang, M.; Smith, A.; Gorski, W.; Anal. Chem, 76, 5045-5050, 2004.
- [9] Liu, C.; Lu, G.; Jiang, L.; Jiang, L.; Zhou, X.; Electroanalysis, 18, 291-297, 2006.
- [10] Zhao, H.; Q, Sheng; Zheng, j.; Original paper, 58, 346-352, 2011.
- [11] Wang, L.; Bai, J.; Bo, X.; Zhang, X.; Guo, L.; Talanta, 83, 1386-1391, 2011.
- [12] Wilson, G.S.; Gifford, R.; Biosens, Bioelectron, 20, 2388-2403, 2005.
- [13] Wang, J.; Chem. Rev, 108, 814-825, 2008.
- [14] Arkady, A.K.; Electroanalysis, 13, 813-819, 2001.
- [15] Bowes, J.H.; Cater, C.W.; Biochim. Biophys. Acta, 168, 341-352, 1968.
- [16] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M.J.; Waldron, K.C.; Bio Techniques, 37, 790-802, 2004.
- [17] Liu, Y.; Chu, Z.; Zhang, Y.; Jin, W.; Electrochim, Acta, 54, 7490-7494, 2009.
- [18] Hecht, H.J.; Schomburg, D.; Kalisz, H.; Schmid, R.D.; Biosens. Bioelectron, 8, 197-203, 1993.
- [19] Sherigara, B.S.; Kutner, W.; Dsouza, F.; Electroanalysis, 15, 753-772, 2003.
- [20] Moulton, S.E.; Minett, A.I.; Wallace, G.G.; Sensor Lett, 3, 183-193, 2005.
- [21] Balasubramanian, K.; Burghard, M.; Small, 1, 180-192, 2005.
- [22] Bandaru, P.R.; Journal of NanoScience and Nanotechnology, 7, 1239-1267, 2007.
- [23] Baronas, R.; Ivanauskas, F.; Kulys, J.; Sensors, 3, 248-262, 2003.
- [24] Njagi, J.; Warner, J.; Andreescu, S.J.; Chem. Educ, 84, 1180-1182, 2007.

Glucose biosensor using covalently immobilised glucose-oxidase on a poly(4-aminothiophenol)/multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode

M.A. Kamyabi^{1,*} and S. Sharifi-Rad²

1. Associate Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. PhD student of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: February 2016, Revised: May 2016, Accepted: June 2016

Abstract: A highly-sensitive glucose biosensor was fabricated by immobilization of glucose oxidase (GOX), onto a poly(4-aminothiophenol)/multi-walled carbon nanotube/glassy carbon electrode (poly(4-ATP)/MWCNT/GCE). Cyclic voltammetry was used for both the electrochemical synthesis of poly-(2,6-DP) on the surface of a MWCNT-modified GC electrode, and characterization of the polymers deposited on the GC electrode. The synergistic effect of the high active surface area of both the conducting polymers, i.e., poly-(4-ATP) and MWCNT gave rise to a remarkable improvement in the electrocatalytic properties of the biosensor. The transfer coefficient (α), heterogeneous electron transfer rate constant, and Michaelis–Menten constant were calculated to be 0.47, 3.2 s^{-1} , and $49.82 \text{ }\mu\text{M}$ at pH 7.4, respectively. The GOx/poly(4-ATP)/MWCNT/GC electrode exhibited a linear response to glucose in the concentration ranging from 1 to $450 \text{ }\mu\text{M}$ with a correlation coefficient of 0.996, sensitivity of $0.021 \text{ }\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, which could make it a promising bioelectrode for precise detection of glucose in the biological samples.

Keywords: Glucose biosensor, glucose oxidase, multi-walled carbon nanotube, poly-(4-aminothiophenol)