

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

اقدس بنائی^{۱*}، ناهید پارسافر^۲ و جلیل بدرافی^۳

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

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

چکیده: ترکیب‌های آلی فسفره به‌طور طبیعی و یا پس از استفاده انسان از آن‌ها به‌عنوان سموم برای دفع آفات نباتی و یا کودهای شیمیایی، وارد محیط‌زیست و در نهایت وارد زنجیره غذایی جانداران می‌شوند. با توجه به آثار نامطلوب آن‌ها، آشکارسازی این سموم در غلظت‌های بسیار کم و پیش از آنکه وارد چرخه حیات شوند، به‌طور کامل ضروری است. زیست‌حسگرها ابزار مناسبی برای آشکارسازی این سموم هستند. بدین منظور، در این پژوهش زیست‌حسگر تک‌آنزیمی مبتنی بر مهار آنزیم کولین اکسیداز با تثبیت آن بر الکتروود اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیله ساخته شد. در حضور ۱ mM پیش‌ماده آنزیم (کولین کلرید)، کمترین حد آشکارسازی سم دیازینون ۰.۵۶ و دو گستره خطی ۱.۵ تا ۲.۴ μM و ۵.۵ تا ۱۷.۵ μM به‌دست آمد. آشکارسازی غلظت‌های پایین دیازینون با این زیست‌حسگر و سوانگاری مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه به‌دست آمده از زیست‌حسگر ساخته‌شده نسبت به سوانگاری دارای ۳/۵ درصد خطا بود.

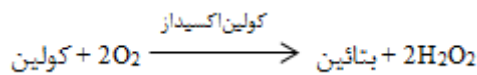
واژه‌های کلیدی: نانوزیست‌حسگر، دیازینون، آنزیم کولین اکسیداز، نانولوله کربنی کربوکسیله، سوانگاری مایع با کارایی بالا (HPLC)

مقدمه

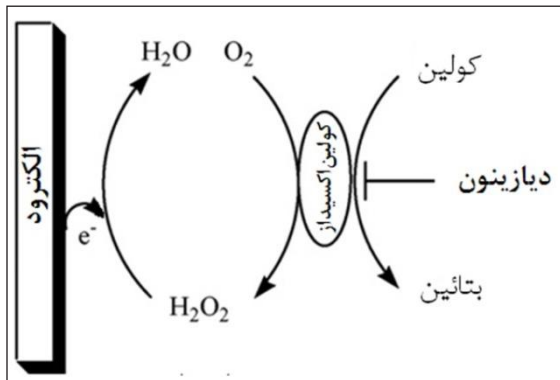
و دویست هزار مرگ می‌انجامد [۱]. همچنین، سموم کشاورزی توانایی ایجاد سمیت ژنتیکی دارند. به این معنی که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث تخریب ماده ژنتیکی می‌شوند [۲]. سموم آلی فسفره نامی عمومی برای استرهای فسفریک اسید است. دیازینون حشره‌کش و کنه‌کش غیرسامانه‌ای، نفوذی، تماسی، گوارشی و تنفسی با فرمول شیمیایی $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$ از گروه حشره‌کش‌های فسفره آلی و زیرگروه فسفروتیوئیک اسید است. توانایی این سم در

در سال‌های اخیر، استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها به‌شدت افزایش داشته است. این سموم برای مدتی در محیط‌زیست باقی خواهند ماند و اثرات نامطلوبی بر موجودات به‌ویژه انسان خواهند گذاشت. بنابراین، آشکارسازی این سموم در غلظت‌های بسیار کم پیش از آنکه وارد چرخه حیات شود به‌طور کامل ضروری است. حضور این مواد در طبیعت، سالانه به حدود سه میلیون مسمومیت

شده است. مزیت استفاده از زیست حسگر در تشخیص مواد فسفره بر روش های دیگر این است که از ویژگی های مطلوبی مانند قدرت انتخاب گری، حساسیت، سرعت، هزینه کم و قابلیت کوچک شدن و قابل حمل بودن برخوردار است [۱۹]. در اصل زیست حسگرها به گونه ای طراحی می شوند که بتوانند موادی را که با مولکول های زیستی برهم کنش دارند، به طور انتخابی تشخیص دهند [۲۰]. به طور معمول، در این ابزارهای تشخیصی یک عنصر تشخیصی زیستی در تماس مستقیم با مبدل مناسب قرار می گیرد. به این ترتیب، واکنش تشخیص زیستی با فرایند زیست کاتالیستی به نشانک قابل تشخیص تبدیل می شود. آنزیم کولین اکسیداز به عنوان یک عامل تشخیصی در زیست حسگر مواد آلی فسفره مطرح است. این آنزیم از خانواده اکسیدازهاست که نخستین بار در سال ۱۹۳۸ از کبد موش استخراج شد و با توجه به نوار جذبی آن در طول موج های ۳۶۳ و ۴۵۰ نانومتر، نوعی فلاووپروتئین است. کولین اکسیداز آنزیمی است که واکنش دو مرحله ای اکس سایش چهار الکترونی کولین را به بتائین کاتالیست می کند [۲۱].



زیست حسگر تک آنزیمی تشخیص دیازینون، بر اساس مهار آنزیم کولین اکسیداز در این واکنش طراحی می شود. مهار آنزیم کولین اکسیداز با دیازینون سبب کاهش تولید زیست کاتالیستی H_2O_2 و در نتیجه کاهش پاسخ زیست حسگر می شود (شکل ۱).



شکل ۱ طرحواره زیست حسگر آمپرسنجی تشخیص دیازینون مبتنی بر مهار کولین اکسیداز

1. In situ

مهار آنزیم کولین استراز در سامانه عصبی جانوران است. همچنین، این سم پس از ورود به بدن موجودات زنده، تحت تأثیر فرایندهای سوخت و ساز متفاوت تولید رادیکال های آزاد می کند. این رادیکال ها اغلب توانایی آسیب رساندن به ساختار مولکول های زیستی مثل ماده ژنتیکی و پروتئین ها را داشته و با جهش زایی و سرطان زایی ماده شیمیایی مرتبط است [۳].

از بین بردن آلوده کننده ها از منابع آبی به لحاظ فنی دشوار و پرهزینه است. بنابراین، پیشگیری از آلوده شدن این منابع بهتر و مقرون به صرفه تر از حذف آلودگی خواهد بود. یکی از ملزومات پیشگیری از آلودگی ها، شناسایی آن هاست. بنابراین، استفاده از روش های سریع، حساس، انتخابی و قابل اعتماد برای آشکارسازی مقدار مواد آلی فسفره در محیط ضروری است. لزوم آشکارسازی به موقع مواد آلی فسفره سبب شده تا روش های متفاوتی برای آشکارسازی این مواد مورد توجه قرار گیرد که از جمله می توان به روش هایی مانند طیف سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه- انتشار بازتاب [۴]، طیف سنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی [۵]، سوانگاری گازی- طیف سنج جرمی [۶]، سوانگاری مایع با کارایی بالا [۷]، سوانگاری گاز با آشکارساز نیتروژن فسفر [۸] و سوانگاری لایه نازک با عملکرد بالا [۹] اشاره کرد. به طور کلی این روش ها نیازمند پیش تیمارهای متفاوتی شامل استخراج، تصفیه و تغلیظ هستند. بنابراین، معایبی مانند سختی، زمان بر و هزینه بر بودن و همچنین، نیازمندی به حلال را دارند. خریداری تجهیزات گران قیمت، ایجاد امکانات آزمایشگاهی مجبزه، بهره گیری از نیروی انسانی متخصص و کارآموده نیز در این روش ها مورد نیاز است. همین موارد سبب شده است تا به روش های آسان و کم هزینه آشکارسازی مواد آلی فسفره توجه زیادی شود. به همین دلیل، روش های دیگری مانند به کارگیری زیست حسگرهای آنزیمی به عنوان ابزاری دقیق و نوین برای اندازه گیری سریع و در جا مواد آلی فسفره در غلظت های پایین مورد توجه قرار گرفته است [۱۰ و ۱۱]. آنزیم های متفاوت از جمله استیل کولین استراز [۱۲]، ارگانوفسفره هیدرولاز [۱۳ تا ۱۵]، تایروزیناز [۱۶ و ۱۷] و لپاز [۱۸] در تشخیص دیازینون به کار گرفته

آبی کمک می‌کند [۲۸]. چنان که در مقاله گزارش شده است، پراکنده شدن نانولوله‌ها اثر مطلوبی بر رسانایی آن‌ها دارد [۲۹]. ایجاد گروه‌های عاملی مناسب با توجه به گروه‌های عاملی جزء زیستی مورد نظر برای تثبیت انجام می‌شود. برای مثال، آنزیم حاوی گروه‌های عاملی چون گروه کربوکسیلیک، آمین و سولفید است، پس می‌توان با ایجاد عواملی چون گروه‌های کربوکسیل، آمین و یا تیول شرایط برهم‌کنش مناسبی را برای آنزیم در سطح نانولوله‌های کربنی به وجود آورد.

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

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

آنزیم کولین‌اکسیداز، آنزیم پراکسیداز، کولین کلراید، ۴-آمینوآنتی‌پیرین (4-AAP)، نیتریک اسید (HNO_3)، هیدروژن‌دی‌پتاسیم فسفات، دی‌هیدروژن‌پتاسیم فسفات، دی‌متیل‌فرمامید و هیدروژن پراکسیداز شرکت مرک، فنل از شرکت شارلو و نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکسیل‌دار (MWCNT) از شرکت نانوتایمز و الکترواد چاپی کربنی از شرکت ایتال سنس^۱ و سم دیازینون فنی ۹۵٪ از شرکت پلیکم خریداری شد.

با هدف پایدارسازی آنزیمی، تثبیت این ساختارهای زیستی بر بستر جامد زیست‌حسگرها به عنوان چالشی مهم در ساخت این ابزارهای دقیق وجود دارد [۲۵]. نانولوله‌های کربنی به عنوان بستر انتخابی مناسب برای تثبیت آنزیم‌ها هستند. وجود ساختار ویژه و ویژگی الکتریکی و مکانیکی استثنایی، سازگاری بالا با سامانه‌های حیاتی، رسانایی الکتریکی بالا، قطر بسیار کوچک و انتهای باز نانولوله‌های کربنی که قابلیت تشکیل پیوند کووالانسی با گروه‌های عاملی متفاوت را دارد، باعث اهمیت آن‌ها به عنوان مواد سازنده الکترودها در فرایندهای الکتروشیمیایی شده است [۲۲ تا ۲۴]. حساسیت بالا، پاسخ سریع، برگشت‌پذیری خوب و افزایش سرعت انتقال الکترون از ویژگی‌های بی‌مانند نانولوله‌های کربنی بشمار می‌روند. توانایی تثبیت پروتئین بدون تغییر در فعالیت آنزیم از جمله ویژگی‌های بی‌نظیر دیگر این نانومواد است که در سامانه‌های بیوالکتروشیمی مورد توجه قرار گرفته‌اند. از آنجایی که در نانولوله‌های کربنی پس از تهیه به دلیل وجود نیروهای واندروالسی میان آن‌ها، خود تجمعی رخ می‌دهد و به صورت خام واکنش‌پذیری شیمیایی مطلوبی ندارند، انحلال آن‌ها در یک حلال ممکن نیست. با عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی از تجمع آن‌ها در حلال جلوگیری کرده و ویژگی فیزیکوشیمیایی مورد نظر را برای واکنش با گونه‌های دیگر به آن‌ها می‌افزایند. پیوند گروه‌ها در مرحله اول به کلاهدک انتهایی نانولوله‌ها و سپس، به نواقص ساختاری دیواره آن‌ها انجام می‌شود [۲۵]. چنانچه پیوند گروه عاملی به نانولوله کربنی با پیوند کووالانسی باشد، هیبریداسیون اتم کربن از sp^2 به sp^3 تغییر می‌کند. این امر موجب تغییر شکل هندسی پیوند از سه وجهی صفحه‌ای به چهاروجهی می‌شود [۲۶]. افزون بر این، در اثر عامل‌دار کردن نانولوله‌ها، پیچش‌ها و خمش‌هایی در ساختار آن‌ها ایجاد می‌شود [۲۷]. در اثر این تغییرات، ساختار دیواره نانولوله‌های کربنی دچار تغییر می‌شود و در نتیجه، نیروهای واندروالسی بین نانولوله‌ها تضعیف می‌شود. تضعیف برهم‌کنش میان نانولوله‌ها به پراکنده شدن آن‌ها در محلول‌های

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) مورد استفاده برای بررسی شکل ظاهری الکترودهای اصلاح شده از شرکت هیتاچی مدل S-4160 با قدرت 30 kV و دقت 5 nm و دستگاه پتانسیواستات / گالوانواستات برای مطالعات الکتروشیمیایی از شرکت پالمسنس مدل 3 PalmSense و دستگاه طیف نورسنج فرابنفش - مرئی مورد استفاده در بررسی فعالیت آنزیمها از شرکت WPA مدل lightwave S2000 بوده است. به منظور سنجش دیازینون، سوانگاری در یک سامانه Agilent Technologies 1200 مجهز به گاز زدا آنالین و آشکارساز UV انجام گرفت.

روش‌ها

روش سنجش فعال بودن آنزیمهای کولین اکسیداز و پراکسیداز سنجش فعال بودن آنزیم کولین اکسیداز بر اساس دستورالعمل شرکت سیگما - آلدیج انجام گرفت که اساس این سنجش بر مبنای رنگ سنجی است [30]. در این روش از 4-آمینو آنتی پیرین (4-AAP)، فنل و هیدروژن پراکسید به عنوان ترکیب‌های تولیدکننده رنگ استفاده شد. فرآورده واکنش کوئینون ایمین، ماده‌ای رنگی است که در طول موج 500 nm یک نوار جذبی قوی دارد (A_{500nm}). یک واکنش ترکیبی با محلول کولین، محلول 4-AAP، محلول فنل و آنزیم پراکسیداز در دمای تعادل 37 °C داخل یک ظرف مناسب که نور به آن نفوذ نکند، آماده و تغییرات A_{500nm} به مدت 5 دقیقه ثبت شد.

کولین (کلرید) + اکسیژن → کولین اکسیداز → بتائین آلدئید + آب
 بتائین آلدئید + اکسیژن + آب → کولین اکسیداز → بتائین + آب اکسیژنه
 2 آب اکسیژنه + 4-آمینو آنتی پیرین + فنل → پراکسیداز → کوئینون ایمین + 4 آب

با توجه به این که در سنجش فعال بودن آنزیم کولین اکسیداز، آنزیم پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت، سنجش فعال بودن آنزیم پراکسیداز نیز با روش رنگ سنجی و براساس دستور کار ورتینگتون انجام شد [31].

روش ساخت نانوزیست حسگر آنزیمی و بررسی عملکرد آن آماده سازی الکترودهای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی عامل دار و آنزیم کولین اکسیداز

در این پژوهش از الکترودهای چایی کربنی به منظور انجام مطالعات الکتروشیمیایی بهره بردیم. به منظور اصلاح الکترودها شناساگر با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار، ابتدا تعلیق نانولوله‌های کربوکسیل دار با غلظت 2 mg/ml را در حلال دی‌متیل فرمامید آماده کردیم و سپس، آن را در دمای اتاق به مدت 10 دقیقه در حمام امواج فراصوت قرار دادیم. پس از آن، 2.5 μl از این تعلیق بر سطح الکترودهای چایی کربنی چکانده و سطح الکترودها در دمای اتاق خشک شد. برای تثبیت آنزیم کولین اکسیداز بر سطح الکترودها اصلاح شده با نانولوله کربنی کربوکسیل دار، 2 μl محلول آنزیم 1 mg/ml را بر الکترودها گفته شده قرار دادیم که در دمای 4 °C با سپری شدن زمان کافی به طور کامل خشک شد.

روش بررسی انتقال الکترون مستقیم و فعالیت الکتروکاتالیستی

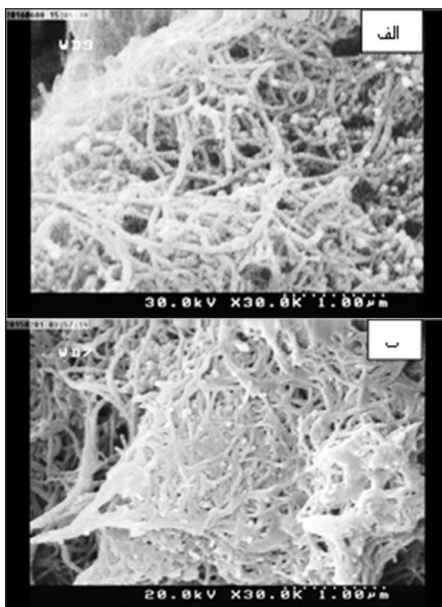
آنزیم تثبیت شده در سطح نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار رفتار الکتروشیمیایی آنزیم جذب شده بر نانولوله‌های کربنی چند دیواره در حضور کولین کلرید با استفاده از دستگاه پتانسیواستات - گالوانواستات به روش ولتاسنجی چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ولتاسنجی با اعمال پتانسیل از 0.7 V- تا 0.1 V- و با سرعت رویش 0.1 V/s رسم شد. فعالیت الکتروکاتالیستی آنزیم و پاسخ آنزیم به افزایش متوالی غلظت کولین کلرید به روش زمان-آمپرسنجی¹ با استفاده از دستگاه پتانسیواستات - گالوانواستات مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های متفاوت از پیش ماده کولین کلرید تهیه شد. با اعمال پتانسیل 0.45 V-، نمودار زمان-آمپرسنجی پاسخ به غلظت‌های متفاوت پیش ماده ترسیم شد. آنگاه مقدار نقطه اشباع جریان هر نمودار زمان-آمپرسنجی به ازای هر غلظت کولین کلرید اندازه گیری و در نهایت نمودار واسنجی جریان در مقابل غلظت کولین کلرید رسم شد.

1. Chronoamperometry

آنزیم پراکسیداز که در فرایند سنجش فعالبودن آنزیم کولین اکسیداز نقش دارد، مطمئن شد. بدین منظور، برپایه روش گفته شده تغییر A_{500nm} هر ۵ دقیقه ثبت و مقدار افزایش جذب بر حسب زمان در حضور آنزیم و بدون حضور آنزیم به دست آمد که نتایج حاکی از فعال بودن آنزیم بود. به منظور سنجش فعال بودن آنزیم کولین اکسیداز هر ۲۰ ثانیه یک بار به مدت ۱۷ دقیقه، A_{500nm} ثبت شد. نتایج افزایش A_{500nm} بیانگر افزایش مقدار تولید رنگ کوئینون ایمین ناشی از فعالیت آنزیم کولین اکسیداز و در نتیجه نشانگر فعال بودن آنزیم بود.

ساخت نانو زیست حسگر مبتنی بر آنزیم کولین اکسیداز
بررسی شکل ظاهری الکترودهای اصلاح شده

شکل ۲ تصاویر FESEM مربوط به الکترودهای اصلاح شده با (الف) نانولوله های کربنی کربوکسیل دار، (ب) نانولوله های کربنی کربوکسیل دار و کولین اکسیداز را نشان می دهد. مقایسه شکل ۲-الف با شکل ۱-ب دلالت بر افزایش ضخامت نانولوله ها در شکل ۲-ب دارد که بیانگر تثبیت موفقیت آمیز آنزیم کولین اکسیداز بر سطح نانولوله ها است [۳۳ و ۳۴].



شکل ۲ تصویر FESEM مربوط به الکترودهای کربنی اصلاح شده با نانولوله های کربنی کربوکسیل دار (الف) و نانولوله های کربنی کربوکسیل دار و کولین اکسیداز (ب)

1. Incubation

روش سنجش سم دیازینون با استفاده از زیست حسگر

به منظور تهیه دیازینون با غلظت های متفاوت، ابتدا سم دیازینون فنی با استفاده از متانول تا غلظت ۱۰۰۰ ppm رقیق شد و سپس، غلظت های کمتر با رقیق کردن غلظت ۱۰۰۰ ppm با استفاده از آب مقطر تهیه شد. برای سنجش این سم دستگاه پتانسیو استات-گالوانو استات برای آزمایش زمان-آمپرسنجی تنظیم و ابتدا پاسخ زمان-آمپرسنجی الکترودهای اصلاح شده به غلظت ۱ mM کولین کلرید با اعمال پتانسیل در ۰/۴۵- ولت اندازه گیری شد. سپس، به منظور به دست آوردن منحنی واسنجی زیست حسگر تشخیصی دیازینون، الکترودهای اصلاح شده به مدت ۳۰ دقیقه در حضور غلظت اشباع پیش ماده با غلظت های متفاوت دیازینون به دست آمده از دیازینون فنی با خلوص ۹۵٪ گرم خانه گذاری^۱ شد (به این ترتیب که غلظت های متفاوت دیازینون در غلظت اشباع کولین در ظروف مجزا تهیه شده بود) و نمودارهای زمان-آمپرسنجی ثبت شد. پس از آن مقدار مهارشدگی کولین اکسیداز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [۳۲]:

$$\text{درصد مهارشدگی} = \frac{[I_0 - I]}{I_0} \times 100$$

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

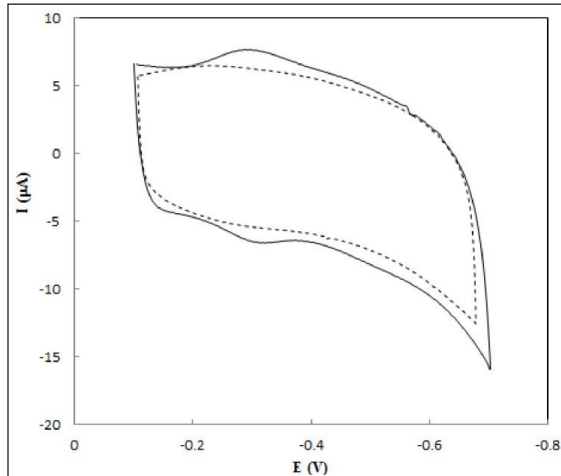
روش سنجش سم دیازینون با استفاده از سوانگاری مایع با کارایی بالا در روش سوانگاری مایع با کارایی بالا به منظور سنجش دیازینون، سوانگاری با استفاده از ستون Vydac C18 GRACE؛ (۲۵۰×mm ۴۶ mm μ m) انجام گرفت. سامانه سوانگاری مورد استفاده با نرم افزار ChemStation کنترل شد. فاز متحرک از مخلوط استونیتریل-آب (۱۰ v/v : ۹۰٪) تشکیل شده و سرعت جریان فاز متحرک 1.5 ml min^{-1} بود. حجم تزریق ۲۰ μ l بود.

نتیجه ها و بحث

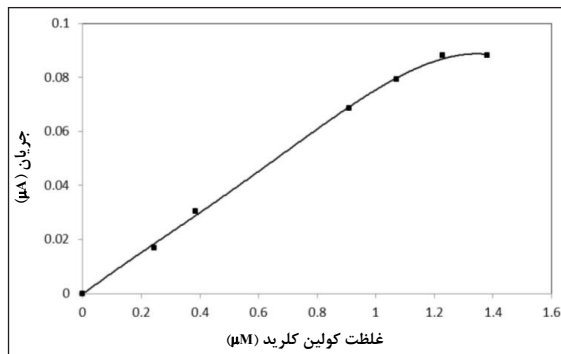
سنجش فعال بودن آنزیم ها

پیش از اطمینان از فعال بودن آنزیم کولین اکسیداز، باید از فعال بودن

کاهش آنزیم در گستره پتانسیلی حدود 0.45 V بود، پاسخ زمان-آمپرسنجی آنزیم به پیش ماده کولین در این پتانسیل بررسی شد.



شکل ۳ نمودار ولتاسنجی چرخه‌ای مربوط به الکتروود چابی کربنی اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار (خط چین) و الکتروود اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار و آنزیم کولین اکسیداز (خط توپر) را در محلول بافر فسفات 0.1 M مولار با pH برابر ۷ در سرعت روبش 0.1 V/s ولت بر ثانیه



شکل ۴ منحنی واسنجی تشخیص کولین در سطح الکتروود چابی کربنی اصلاح شده با آنزیم/ نانولوله کربنی

همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، پاسخ زیست حسگر با افزایش غلظت کولین تا غلظت 1 mM افزایش یافته و پس از آن با افزایش غلظت کولین پاسخ زیست حسگر تغییر چندانی نمی‌کند. بنابراین، در سنجش میزان مهار آنزیم با سم دیازینون، آزمایش‌ها در حضور غلظت اشباع 1 mM (غلظت بهینه) کولین انجام شد.

بررسی انتقال الکترون مستقیم آنزیم کولین اکسیداز تثبیت شده در سطح نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار

برای بررسی رفتار الکتروشیمیایی آنزیم کولین اکسیداز تثبیت شده بر نانولوله‌های کربنی چنددیواره روش ولتاسنجی چرخه‌ای به کار گرفته شد. شکل ۳ نمودار ولتاسنجی چرخه‌ای مربوط به الکتروود چابی کربنی اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار (خط چین) و الکتروود اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار و آنزیم کولین اکسیداز (خط توپر) را در محلول بافر فسفات 0.1 M مولار با pH برابر ۷ در سرعت روبش 0.1 V/s ولت بر ثانیه نشان می‌دهد. همان طور که در نمودار ولتاسنجی خط چین مشاهده می‌شود، در الکتروود اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار تنها یک جریان زمینه وجود داشت. زمانی که آنزیم کولین اکسیداز در سطح نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار تثبیت می‌شود، با توجه به نقش نانولوله‌های کربنی در تسریع انتقال الکترون بین کولین اکسیداز و سطح الکتروود [۳۵]، یک زوج اکسایش-کاهش به طور کامل مشخص و شبه برگشت پذیر مشاهده می‌شود. از آنجایی که این جفت قله تنها پس از تثبیت آنزیم دیده شد و در گستره پتانسیل اکسایش-کاهش مرکز FAD آنزیم است، بیانگر گروه اکسایش-کاهش FAD/FADH_2 متمرکز در مرکز آنزیم است [۳۶ و ۳۷]. قله آندی در پتانسیل 0.303 V و قله کاتدی در پتانسیل 0.297 V دیده می‌شود. پتانسیل فرمال یعنی میانگین پتانسیل قله‌های کاتدی و آندی، برابر با 0.3 V به دست آمد. جریان قله‌های آندی و کاتدی در این مورد به ترتیب $7.6 \times 10^{-6}\text{ A}$ و $6.4 \times 10^{-6}\text{ A}$ بود. جدایی قله‌های آندی و کاتدی آنزیم تثبیت شده بر نانولوله‌های کربنی چند دیواره 6 mV محاسبه شد.

به منظور بررسی فعالیت الکتروکاتالیستی آنزیم کولین اکسیداز تثبیت شده بر الکتروود اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار، پاسخ آنزیم به افزایش متوالی کولین کلراید، پیش ماده آنزیم، به روش زمان-آمپرسنجی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به پاسخ زمان-آمپرسنجی منحنی واسنجی پاسخ به پیش ماده ترسیم شد (شکل ۴). از آنجایی که پتانسیل اکسایش-

متفاوت (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ دقیقه) در مجاور غلظت $2.4 \mu\text{M}$ دیازینون قرار داده شد. درصد مهار با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ۳۰ دقیقه افزایش یافت و پس از آن با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری، افزایش چشمگیری نداشت. به همین دلیل، ۳۰ دقیقه به عنوان زمان گرمخانه‌گذاری بهینه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

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

برای محاسبه مقدار مهارشدگی آنزیم کولین‌اکسیداز، با ترسیم درصد مهارشدگی محاسبه‌شده بر غلظت دیازینون، منحنی واسنجی درصد مهارشدگی آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده در سطح الکتروده چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار همراه با آنزیم تثبیت شده با دیازینون به دست آمد (شکل ۶-الف). حد آشکارسازی با استفاده از فرمول $DL = 3 \sigma/S$ به دست می‌آید که در آن DL حد آشکارسازی، S انحراف استاندارد پاسخ آمپرسنجی پیش از افزودن دیازینون و σ شیب منحنی واسنجی جریان بر حسب غلظت سم است. با توجه به اینکه شیب ناحیه خطی اول منحنی واسنجی $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ 0.567 و انحراف استاندارد 0.106 بود، غلظت $0.56 \mu\text{M}$ دیازینون به عنوان حد آشکارسازی زیست‌حسگر به دست آمد و پاسخ حسگر به دیازینون در دو گستره $1.5 \mu\text{M}$ تا $2.4 \mu\text{M}$ و $5.5 \mu\text{M}$

سنجش دیازینون

سنجش دیازینون با استفاده از زیست‌حسگر ساخته‌شده

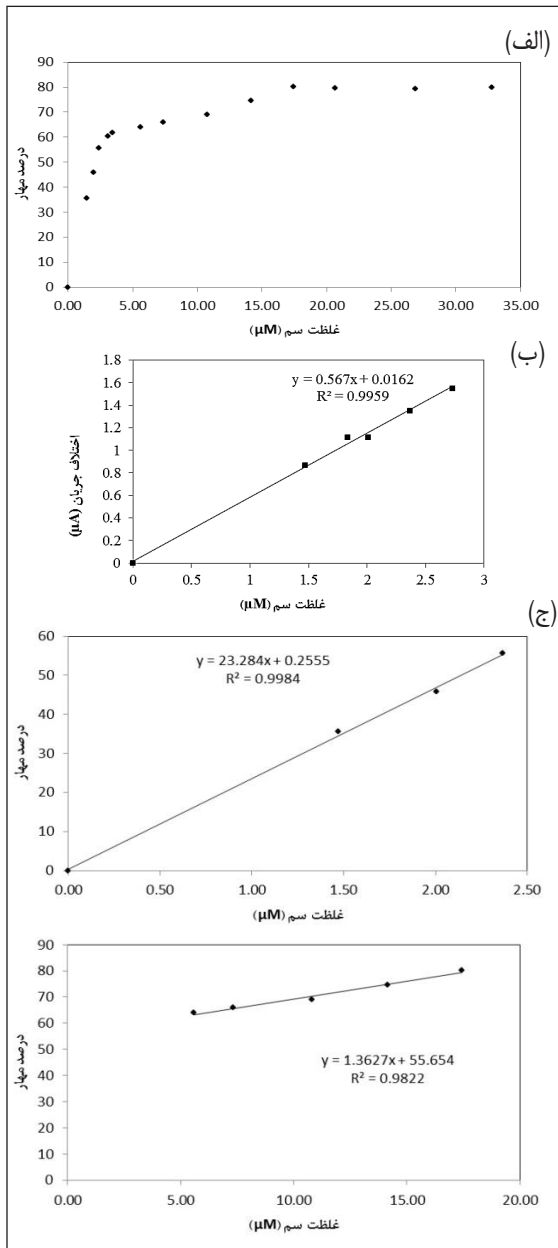
به منظور بهینه‌سازی پاسخ زیست‌حسگر به دیازینون، پس از به دست آوردن غلظت بهینه پیش‌ماده، غلظت آنزیم به عنوان یک عامل مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، چهار الکتروده چاپی کربنی اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار تهیه و مقادیر متفاوتی از غلظت‌های آنزیم کولین‌اکسیداز بر آن‌ها تثبیت شد. نتایج این آزمایش در جدول ۱ خلاصه شده است. در غلظت آنزیمی کمتر از 0.24 mg/ml نسبت جریان به نوفه^۱ به حدی کم بود که بررسی روند مهار ممکن نبود. درصد مهار در شرایطی برای غلظت‌های متفاوت آنزیم کولین‌اکسیداز به دست آمد که الکترودها در معرض غلظت اشباع کولین ۱ mM و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری با $2.4 \mu\text{M}$ میکرومولار دیازینون قرار گرفتند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت آنزیم درصد مهار کاهش یافته است. این نتیجه قابل انتظار است چراکه یک غلظت مشخص از سم توان مهار بیشتری برای مقدار آنزیم تثبیت شده کمتر را دارد. بنابراین، غلظت آنزیم 0.24 mg/ml برای ساخت زیست‌حسگر به کار برده شد.

جدول ۱ درصد مهار به دست آمده به ازای مقادیر متفاوت آنزیم کولین‌اکسیداز

تثبیت شده

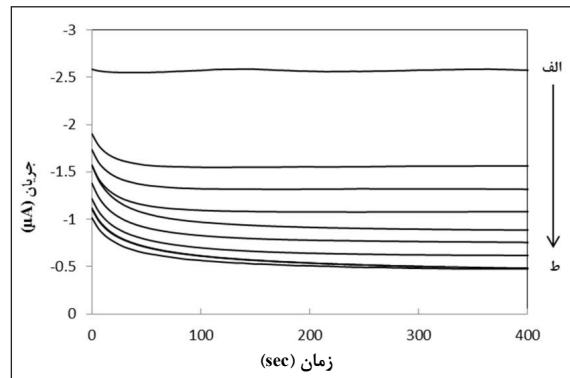
جدول ۱ درصد مهار به دست آمده به ازای مقادیر متفاوت آنزیم کولین‌اکسیداز تثبیت شده		
الکتروده	غلظت آنزیم کولین‌اکسیداز (mg/ml)	درصد مهار
۱	۰.۱۵	مطالعه روند مهار غیرممکن
۲	۰.۲۴	۴۵
۳	۰.۳۲	۴۰
۴	۰.۴۷	۳۲

از طرف دیگر الکتروده اصلاح‌شده‌ای که آنزیم کولین‌اکسیداز با غلظت بهینه بر آن تثبیت شده بود در ۹ زمان گرمخانه‌گذاری



شکل ۶ منحنی واسنجی درصد مهارشدگی کولین اکسیداز تثبیت شده در سطح الکتروود چایی کربنی اصلاح شده با نانولوله های کربنی کربوکسیل دار همراه با آنزیم تثبیت شده که از نمودارهای زمان-آمپرسنجی شکل ۵ به دست آمده است (الف)، نمودار اختلاف جریان بر حسب غلظت سم در ناحیه خطی اول (ب) و نمودارهای درصد مهار بر حسب غلظت سم در ناحیه های خطی اول و دوم (ج)

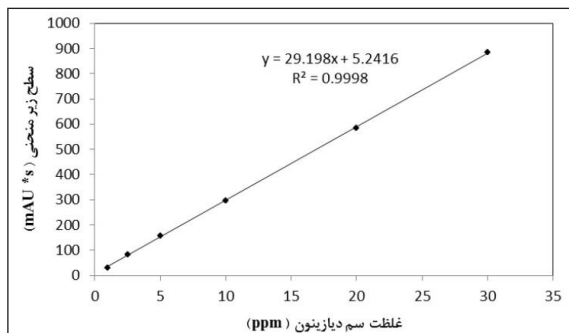
تا ۱۷٫۵ خطی بود. به منظور تعیین مقدار حساسیت زیست حسگر تک آنزیمی برای آشکارسازی دیازینون، شیب خط منحنی واسنجی در گستره خطی محاسبه شد. حساسیت محاسبه شده ۲۳٫۳٪ مهار به ازای هر میکرومولار دیازینون به دست آمد.



شکل ۷ پاسخ زمان-آمپرسنجی الکتروود چایی کربنی اصلاح شده با نانولوله های کربنی کربوکسیل دار همراه با کولین اکسیداز تثبیت شده در الف) محلول کولین ۱ mM، سایر پاسخ های زمان-آمپرسنجی مربوط به الکتروود در محلول ۱ mM کولین پس از ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری با غلظت های متفاوت دیازینون می باشند. غلظت های دیازینون گرم خانه گذاری شده بر حسب میکرومولار عبارت اند از: ۱٫۵ (ب)، ۱٫۸ (ج)، ۲ (د)، ۲٫۴ (ه)، ۳ (و)، ۱۱ (ز)، ۲۷ (ح) و ۳۳ (ط)

شکل ۶-الف منحنی واسنجی الکتروود چایی کربنی اصلاح شده با نانولوله های کربنی کربوکسیل دار همراه با کولین اکسیداز تثبیت شده را نشان می دهد. داده ها با تحلیل منحنی های زمان-آمپرسنجی به دست آمده و بر حسب درصد مهارشدگی بیان شده است. همچنین نمودار اختلاف جریان بر حسب غلظت سم در ناحیه خطی اول در شکل ۶-ب نشان داده شده است. در شکل ۶-ج نمودارهای درصد مهار بر حسب غلظت سم در ناحیه خطی اول و دوم و خط برازش شده بر نتایج مشاهده می شود.

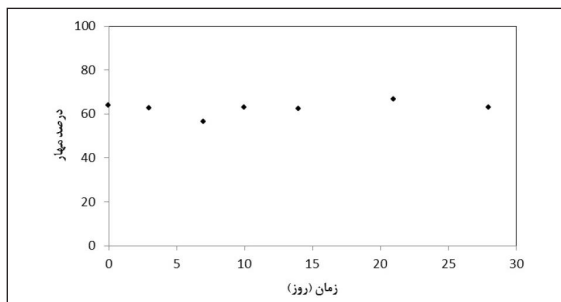
به منظور بررسی پایداری ذخیره ای زیست حسگر ساخته شده، زیست حسگر در بافر فسفات با pH برابر ۷ در یخچال نگهداری شد و پاسخ آن به ۲٫۴ μM دیازینون در حضور غلظت اشباع کولین (۱ mM) در روزهای متفاوت بررسی شد. نتیجه این آزمون در شکل ۷ نشان داده شده است که بیانگر پایداری نسبی مناسب زیست حسگر است.



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

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

مقایسه نتایج زیست‌حسگر تک‌آنزیمی کولین‌اکسیداز با نتایج به‌دست آمده از HPLC برای یک نمونه مجهول
برای مقایسه نتایج زیست‌حسگر ساخته شده با نتایج به‌دست آمده از HPLC برای یک نمونه دیازینون صنعتی با غلظت مجهول،



شکل ۷ پایداری ذخیره‌ای حسگر ساخته شده در pH=7

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

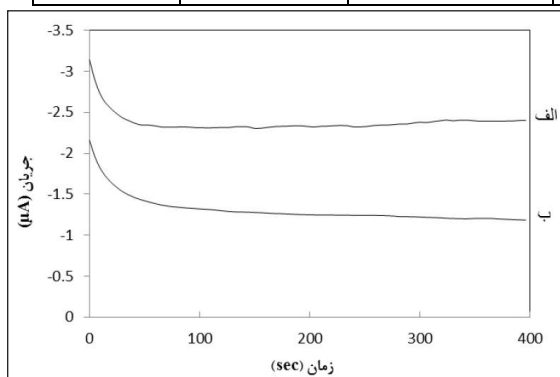
سنجش دیازینون با استفاده از HPLC

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

جدول ۲ برخی روش‌های متفاوت برای تشخیص سم دیازینون را ارائه می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ارقام شایستگی حسگر ساخته شده قابل‌رقابت با حسگر مبتنی بر مهار آنزیم استیل کولین استراز است. افزون بر این، هزینه تهیه آنزیم کولین‌اکسیداز به‌طور تقریب

جدول ۲ روش‌های متفاوت برای تشخیص سم دیازینون

مرجع	حد تشخیص	گستره خطی	روش
[۴۰]	۱۷,۹۰۳ nM	۰,۶۵ - ۰,۱۴۱ nM	زیست حسگر آپتامر DNA با ساختار کوادروپلکس (آپتامر مورد استفاده با روش‌های محاسباتی انتخاب و برای ساخت زیست حسگر استفاده شد.)
[۱۸]	* ۱۰ nM ** ۰,۱ μM	تا ۵۰ μM	زیست حسگر امیدومتری مبتنی بر آنزیم لیپاز با منشأ میکروبی* و با منشأ حیوانی** تثبیت شده روی الکتروود طلای عامل دار شده
[۱۶]	۵ μM	۵-۵۰ μM	زیست حسگر آنزیمی آمپرسنجی مبتنی بر آنزیم تایروزیناز
[۱۷]	-	۰,۰۶-۰,۱۶ μM	زیست حسگر آنزیمی آمپرسنجی مبتنی بر آنزیم تایروزیناز
[۱۳]	۵ μM	۰,۱۳- ۲,۸ mM	زیست حسگر آنزیمی پتانسیل سنجی مبتنی بر آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز (OPH)
[۱۴]	۲ μM	۰,۴۶ - ۸,۵۶ mM	زیست حسگر آنزیمی آمپرسنجی مبتنی بر آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز (OPH)
[۴۱]	۰,۲ nM	-	زیست حسگر فوتولومینسانس دو آنزیمی کولین اکسیداز و استیل کولین استراز تثبیت شده بر الکتروود اصلاح شده با نقاط کوانتومی سیلیکون
[۱۵]	۰,۱۳ μM	-	زیست حسگر رسانایی سنجی مبتنی بر آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز (OPH)
[۴۲]	۰,۸ nM	دو گستره خطی ۱۰۰-۲,۵ nM ۱۰۰ nM - ۲ μM	حسگر الکتروشیمیایی بر مبنای نانوذرات بسپاری حکاکی شده مولکولی (MIP)
[۱۲]	۰,۳ μM	۰,۰۶ - ۶۲ μM	زیست حسگر مبتنی بر آنزیم استیل کولین استراز
پژوهش حاضر	۰,۳۳ μM	۳,۳-۹۸,۴ μM	HPLC
پژوهش حاضر	۰,۵۶ μM	دو گستره خطی ۱,۵ - ۲,۴ μM ۵,۵ - ۱۷,۵ μM	زیست حسگر

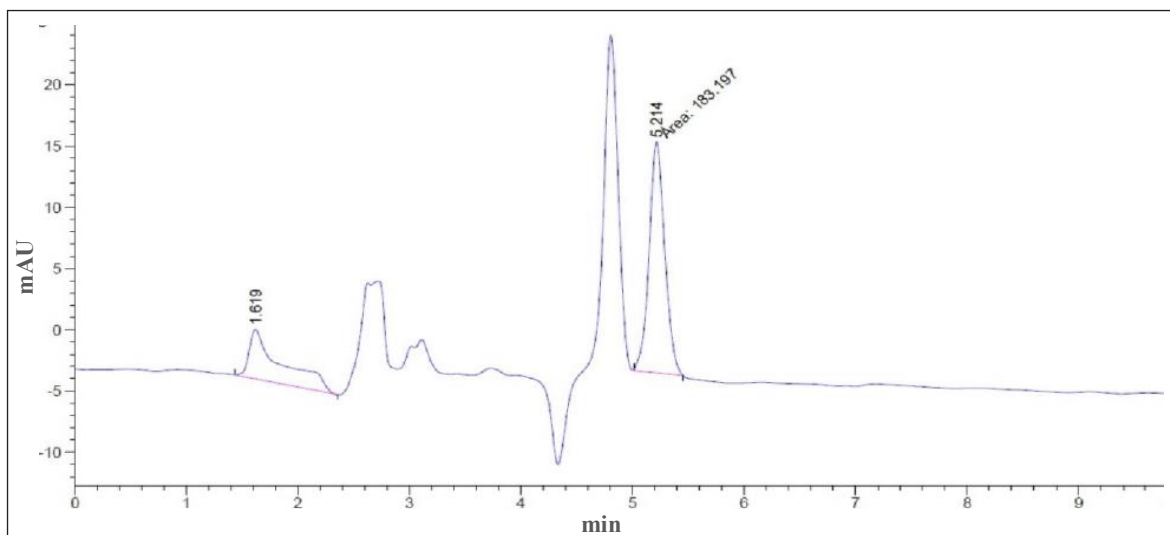


شکل ۹ پاسخ زمان-آمپرسنجی الکتروود چاپی کربنی اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی همراه با کولین اکسیداز تثبیت شده در محلول کولین ۱ mM (الف) و در محلول ۱ mM کولین پس از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری با نمونه مجهول (ب)

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

سپس، سوانگار مربوط به نمونه مجهول با غلظت ۱۰ ppm در حلال استونیتریل با استفاده از روش HPLC به دست آمد (شکل ۱۰). با استفاده از منحنی واسنجی سطح زیر پیک سوانگارهای مربوط به نمونه‌های دیازینون فنی و مقدار سطح زیر پیک نمونه مجهول، مقدار دقیق سم دیازینون موجود در نمونه مجهول محاسبه شد. با قرار دادن سطح زیر پیک نمونه مجهول یعنی 183.197 mAU*S در معادله خط منحنی واسنجی $(y = 29.198x + 5.2416)$ با لحاظ کردن درصد دیازینون در نمونه فنی (۹۵٪)، مقدار دیازینون موجود در نمونه مجهول ۵۷٫۹٪ به دست آمد. از مقایسه این مقدار با مقدار ۶۰٪ به دست آمده از زیست‌حسگر تک‌آنزیمی کولین‌اکسیداز برای نمونه مجهول، درصد خطای زیست‌حسگر ساخته شده نسبت به نتیجه به دست آمده از سوانگاری ۳٫۵٪ است.

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



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

مؤثر الکتروود ناشی از کاربرد نانوساختارها و نیز بهبود انتقال الکترونی بین الکتروود (حسگر) و الکتروولیت حامل سم، پاسخ گزینش‌پذیر آن برای تعیین مقدار دیازینون به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در این پژوهش، نشان داده شد که درصد خطای تعیین مقدار دیازینون در نمونه مجهول با استفاده از زیست‌حسگر تک‌آنزیمی نسبت به نتیجه به دست آمده از سوانگاری ۳٫۵٪ است. با توجه به نتایج به دست آمده این حسگر پایداری و تکرارپذیری نسبی مناسب و مزایای کاربردی برای تشخیص مقدار دیازینون است.

نتیجه‌گیری

در میان مواد بسیار سمی شناخته‌شده، ترکیب‌های آلی فسفره مانند دیازینون پس از استفاده انسان از آن به‌عنوان سم برای دفع آفات نباتی، وارد محیط‌زیست و در نهایت زنجیره غذایی جانداران می‌شود. زیست‌حسگرها ابزار مناسبی برای تشخیص این سم هستند. در پژوهش حاضر، به‌منظور تشخیص سریع مقادیر کم آفت‌کش دیازینون، زیست‌حسگر تک‌آنزیمی مبتنی بر مهار آنزیم کولین‌اکسیداز طراحی و ساخته شد. با به‌کارگیری نانولوله‌های کربنی (MWCNTs) در ساختار حسگر، به دلیل افزایش سطح

مراجع

- [1] Fernando, R.; *Clinical toxicology* 33, 677-682, 1995.
- [2] Barong, G.; Ling, L.; Qiujin, Z.; Bijin Z.; *Asian Herptological Research* 1 (2), 118-122, 2010.
- [3] Mitchelmore, C.L.; Chipman J.K.; *Mutation research* 399, 135-47, 1998.
- [4] Hiroaki, I.; Toyonori, N.; Eiji, T.; *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 51, 886 – 890, 2002.
- [5] Yu, I.S.; Lee, J.S.; Kim, S.D.; Kim, Y.H.; Park, H.W.; Ryu, H.J.; Lee, J.H.; Lee, J.M.; Jung, K.; Na, C. Joung, J.Y.; Son, C.G.; *BMC Complement Altern Med.* 17, 154-162, 2017.
- [6] Emami, A.; Mousavi, Z.; Ramezani, V.; Shoeibi, S.; Rastegar, H.; Amirahmadi, M.; Emami, I.; *Iranian Journal of Toxicology* 11 (2), 1-6, 2017.
- [7] *
*محمدی، ش. و ایمانی، س.، فصلنامه گیاه پزشکی، ۴، ۵۷-۶۶، ۱۳۹۱.
- [8] Husain, S.W.; Kiarostami, V.; Morrovati, M.; Tagebakhsh, M.R.; *Acta Chromatographica* 13, 208-214, 2003.
- [9] Hazratian, T.; Abai, M.R.; Jalilian, A.; Bazrafkan, S.; Tavassoli, M.; Bakhshi, H.; Pirmohammadi, M.; Vatandoost, H.; Shayeghi, M.; Shayeghi, F.; *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3, 412-415, 2015.
- [10] Merkoci, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Perez, B.; Valle, M.; Alegret, S.; *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 24, 826-838, 2006.
- [11] Li, F.; Wang, Z.; Shan, C.; Song, J.; Han, D.; Niu, L.; *Biosensors and Bioelectronics* 24, 1765-1770, 2008.
- [12] *
*بنائی، ا.؛ پارسافر، ن.؛ غفوری، و.؛ بدرقی، ج.؛ پورفخرایی، ا.؛ نانومقیاس، ۴ (۲)، ۳۴۷-۲۶۰، ۱۳۹۶.
- [13] Mulchandani, P.; Mulchandani, A.; Kaneva, I.; Chen, W.; *Biosensors & Bioelectronics* 14, 77-85, 1999.
- [14] Mulchandani, A.; Mulchandani, P.; Kaneva, I.; Chen, W.; *Anal. Chem.* 70, 4140-4145, 1998.
- [15] Mulyasuryani, A.; Prasetyawan, S.; *Anal Chem Insights.* 10, 23-27, 2015.
- [16] Everett, W.R.; Rechnitz, G.A.; *Analytical Letters* 32, 1-10, 1999.
- [17] Albuquerque, Y.D.T.; Ferreira, L.F.; *Analytica Chimica Acta* 596, 210-221, 2007.
- [18] Zehani, N.; Dzyadevych, S.V.; Kherrat, R.; Jaffrezic-Renault, N.J.; *Frontiers In Chemistry* 2 (44), 1-7, 2014.
- [19] Vo-Dinh, T.; Cullum, B.; *Fresenius journal of analytical chemistry* 336, 540-551, 2000.
- [20] Scouten, W.H.; Luong, J.H.T.; Brown, R.S.; *Trends in Biotechnology.* 13, 178-185, 1995.
- [21] Sajjadi, S.; Ghourchian, H.; Tavakoli, H.; *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2509-2514, 2009.
- [22] Palecek, E.; Fojta, M.; *Analytical Chemistry* 73, 74a-83a, 2001.
- [23] Merkoci, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Perez, B.; Valle, M.; Alegret, S.; *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24, 826-838, 2005.
- [24] Ciolkowski, M.L.; Fang, M.M.; Lund, M.E.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22, 1037-1045, 2000.
- [25] Sham, M.L.; Kim, J.K.; *Carbon* 44, 768-777, 2006.
- [26] Lau, C.H.; Cervini, R.; Clarke, S.R.; Markovic, M.G.; Matisons, J.G.; Hawkins, S.C.; Huynh, C.P.; Simon, G.P.; *Journal of Nanoparticle Research* 10, 77-88, 2008.

- [27] Wang, C.; Zhou, G.; Liu, H.; Wu, J.; Qiu, Y.; Gu, B.L.; Duan, W.; *The Journal of Physical Chemistry B* 110 (21), 10266-10271, 2006.
- [28] Sears, A.; Batra, R.C.; *Phys. Rev. B Condensed matter*. 73, 085410, 2006.
- [29] Song, Y.S.; *Polymer engineering and science* 46, 1350-1357, 2006.
- [30] <https://www.sigmaaldrich.com>
- [31] Worthington, C.C.; *The Worthington Manual*, Worthington Biochemical Co.; Lakewood, 1988.
- [32] Kok, F.N.; Bozoglu, F.; Hasirci, V.; *Biosensors and Bioelectronics* 17(6), 531-539, 2002.
- [33] Karimi, S.; Ghourchian, H.; Rahimi, P.; Rafiee-Pour, H.A.; *Anal. Methods* 4, 3225-3231, 2012.
- [34] Tavares, A.P.M.; Silva, C.G.; Drazic, G.; Silva, A.M.T.; Loureiro, J.M.; Faria, J.L.; *Journal of Colloid and Interface Science* 454, 52-60, 2015.
- [35] Jiang, H.J.; Yang, H.; Akins, D.L.; *Journal of Electroanalytical Chemistry* 623, 181-186, 2008.
- [36] Xiao, F.; Zhao, F.Q.; Li, J.W.; Yan, R.; Yu, J.J.; Zeng, B.Z.; *Analytica Chimica Acta* 596, 79-85, 2007.
- [37] Bodmann, O.; Walter, M.; *Biochimica Et Biophysica Acta* 110, 496-506, 1965.
- [38] Tavakoli, H.; Ghourchian, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Chilaka, F.C.; *International journal of biological macromolecules* 36 (5), 318-323, 2005.
- [39] Trojanowicz, M.; *Electroanalysis* 14 (1920), 1311-1328, 2002.
- [40] Jokar, M.; Safaralizadeh, M.H.; Hadizadeh, F.; Rahmani, F.; Kalani, M.R.; *J Biomol Struct Dyn.* 35 (2), 343-353, 2017.
- [41] Yi, Y.; Zhu, G.; Liu, C.; Huang, Y.; Zhang, Y.; Li, H.; Zhao, J.; Yao, S.; *Anal. Chem.* 85 (23), 11464-11470, 2013.
- [42] Motaharian, A.; Motaharian, F.; Abnous, K.; Hosseini, M.R.; Hassanzadeh-Khayyat, M., *Anal Bioanal. Chem.* 408 (24), 6769-79, 2016.

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

Aghdas Banaei^{1,*}, Nahid Parsafar², Jalil Badraghi¹

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

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

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

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