

طراحی حسگر زیستی اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات اکسید کادمیوم و آنزیم گلوکز اکسیداز

سعید رضایی زارچی^۱ و مسعود نگهداری^{۲*}

^۱ یزد، دانشگاه پیام نور یزد، گروه زیست‌شناسی

^۲ مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، باشگاه پژوهشگران جوان

تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۳

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۹

چکیده

در این مطالعه به معرفی حسگر زیستی جدیدی برای اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز، نانوذرات اکسید کادمیوم و الکتروود خمیر کربن پرداخته شد. نانوذرات اکسید کادمیوم که در این تحقیق تهیه و مورد بررسی قرار گرفت، دارای اندازه ۴۳ نانومتر بود. نتایج به دست آمده از این تحقیق بیانگر این است که الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات اکسید کادمیوم سنتزی، می‌تواند انتقال الکترون را در آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده روی سطح الکتروود تسهیل نماید. همچنین فرم احیاء شده آنزیم گلوکز اکسیداز می‌تواند به وسیله اکسیژن محلول با انجام یک واکنش الکترو کاتالیتیکی اکسید شود، که این اکسایش، به علت واکنش بین فرم اکسید شده گلوکز اکسیداز و گلوکز، به وسیله گلوکز مهار می‌شود. بر اساس کاهش پاسخ الکتروکاتالیتیکی آنزیم گلوکز اکسیداز در محلول اشباع از اکسیژن در حضور گلوکز، یک حسگر جدید برای گلوکز طراحی شد. حسگر طراحی شده دارای حساسیت بالا و در محدوده خطی ۲۰ تا ۳۶۰ میکرومولار می‌تواند جهت تعیین گلوکز مورد استفاده قرار گیرد. همچنین این حسگر دارای پایداری بسیار خوبی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: حسگر زیستی، نانو ذرات اکسید کادمیوم، آنزیم گلوکز اکسیداز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۹۰۰۷۲۲۷۵، پست الکترونیکی: Masoud.negahdary@hotmail.com

مقدمه

ترکیب یا ترکیباتی را شناسایی نموده، و با آنها واکنش دهند و بدین ترتیب یک پیام شیمیایی، نوری و یا الکتریکی ایجاد نمایند. بیشترین کاربرد حسگرهای زیستی در تشخیص‌های پزشکی و علوم آزمایشگاهی است. استفاده از حسگرهای زیستی به دلیل دقت و حساسیت روش و همچنین در مواردی به دلیل عدم نیاز به وسایل پیشرفته و صرف زمان و هزینه زیاد برای تشخیص آنالیتها در مراکز کوچک و در مراکز با امکانات کم و حتی در منزل نیز کاربرد دارد. عملکرد انتخابی، مهم ترین مشخصه یک حسگر می باشد. به عبارتی دیگر این مشخصه توانایی تشخیص مواد مختلف را دارد (۱۰، ۱۲ و ۱۴). حساسیت،

حسگرهای زیستی گروهی از سیستم‌های اندازه‌گیری می‌باشند و طراحی آنها بر مبنای شناسایی انتخابی آنالیتها بر اساس اجزای بیولوژیک و آشکارسازهای فیزیکوشیمیایی صورت می‌پذیرد (۲). اولین انگیزه برای پیشرفت فناوری حسگرها از قلمرو بهداشت و درمان سرچشمه می‌گیرد و مهم ترین کاربرد حسگرهای زیستی و حسگرهای شیمیایی نیز در همین موضوع می‌باشد، چرا که حسگرها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکولهای زیستی به شمار می‌روند (۱، ۲، ۴، ۱۰، ۱۲ و ۱۴). در حقیقت حسگرهای زیستی ابزارهای تجزیه‌ای به شمار می‌روند که می‌توانند با بهره‌گیری از هوشمندی مواد بیولوژیک،

سیگنالی برای شناسایی محسوب می‌شود (۸ و ۱۴). آنزیم احیاء کننده به عنوان یک الکتروکاتالیزور عمل می‌کند که سبب تسهیل شدن انتقال الکترون بین الکتروود و مولکول سوبسترا، بدون وجود هیچ واسطه‌ای می‌شود (۹). این نوع از حسگرهای زیستی معمولاً انتخاب پذیری و حساسیت بیشتری دارند، چرا که محدوده پتانسیل مورد استفاده، پتانسیل احیاء آنزیم است. سطوح برهنه الکتروود در بررسی الکتروشیمی پروتئینها مناسب نیست و باید روی سطح الکتروود گروههای لازم برقراری ارتباط فعال با درشت مولکولها (Macromolecules) را فراهم آورد. این گروهها نقش اساسی تسریع فرآیند انتقال الکترون را ایفاء می‌کنند و از انواع این گروهها می‌توان سیستین، گوگرد، آلدهید، هیدروکسید و نانوذرات را نام برد. این گروهها از لحاظ پیوند هیدروژنی یا پلهای نمکی، مکمل درشت مولکولها هستند که مولکولهای تأمین کننده گروههای مذکور را تسهیل کننده می‌گویند (۳). در این تحقیق از نانوذرات اکسید کادمیوم به عنوان تسهیل کننده استفاده گردید. تعیین غلظت گلوکز در نمونه های بالینی، بیولوژیکی و شیمیایی همچنین در تولید مواد غذایی و تخمیر بسیار مهم است (۱۸ و ۱۹). یکی از مباحث مهم و کلیدی در طراحی حسگرهای زیستی، فرآیندهای الکتروشیمیایی دخیل در آن است. الکتروودها از اجزای اصلی در هر سلول الکتروشیمیایی به حساب می‌آیند و سیستمهای الکتروشیمیایی سه الکتروودی می‌باشند که از الکتروودهای نقره-نقره کلرید یا کالومل اشباع شده به عنوان الکتروود مرجع استفاده می‌شود. از یک سیم پلاتینی به عنوان الکتروود شمارنده استفاده می‌شود و مهم ترین الکتروود، الکتروود کار نام دارد و در ابتدا در ساخت این نوع الکتروود معمولاً از فلز طلا استفاده می‌شد اما در حال حاضر الکتروودهای گرافیت، کربن شیشه-ای و خمیر کربن، عموماً به عنوان الکتروود کار به کار می‌روند. در این تحقیق از الکتروود خمیر کربن استفاده شده که دارای مزیت‌های ویژه ای نسبت به انواع دیگر است: روش تهیه

پاسخ حسگر به واحد تغییرات غلظت آنالیت است. دامنه تغییرات، محدوده ایست که در آن حسگر از حساسیت خوبی برخوردار است. گاهی به آن، محدوده دینامیک یا خطی نیز می‌گویند. معمولاً لازم است که حسگر تا کمتر از یک میلی مولار و در موارد خاص تا 10^{-15} کوادریلیوم مولار حساسیت داشته باشد (۱۲). تکرارپذیری، دقت و صحت خروجی حسگر را نشان می‌دهد. در واقع تکرار پذیری نشان دهنده توانایی یک حسگر در تشخیص یک آنالیت خاص می‌باشد. از دیگر موضوعات مهم در خصوص حسگرهای زیستی می‌توان موضوع پایداری و تأثیر عوامل تداخل گر را مطرح کرد. پایداری را بر مبنای درصد بیان می‌کنند، حسگرهای زیستی که قبلاً طراحی شده، معمولاً پایداری بین ۶۰ تا ۹۷ درصد را دارا می‌باشند و این نشان دهنده این است که در دوره های زمانی مشخص که معمولاً ۱۴ روز می‌باشد بین ۳ تا ۴۰ درصد از فعالیت کلی حسگر کاسته می‌شود. پس با توجه به هزینه های طراحی و تجاری سازی حسگرهایی با پایداری پایین مقرون به صرفه نمی‌باشند. این موضوع نیز قابل ذکر است که بازار اصلی مصرف حسگرهای زیستی در جایی است که آزمایش و بررسی مورد نیاز باشد، و در این رابطه اگر هزینه های تعمیر و نگهداری تجهیزات آزمایشگاهی در نظر گرفته شود، حسگرهای زیستی ارزان قیمت را می‌توان در تمامی موارد از خانه تا بیمارستان به کار گرفت (۸). در میان مبدلهای مورد استفاده، مبدلهای الکتروشیمیایی بیشترین کاربرد را دارند که شامل تکنیکهای ولتامتری و آمپرومتری می‌باشند. نقش حسگر ایجاد یک بستر مناسب برای تسهیل تشکیل کمپلکس پروب-هدف (تشکیل این کمپلکس در موارد پزشکی و صنعتی خیلی وسیع است و پروب عامل جستجوگری هست که به دنبال هدف خاص خود می‌باشد و اگر این کمپلکس به طور موفقیت آمیز تشکیل شود، سبب ایجاد پیام تشخیص در حسگر می‌شود، (به عنوان مثال این کمپلکس در دارورسانیهای خاص کاربرد دارد). در واقع تشکیل این کمپلکس،

شیمیایی بوده و بدون خالص سازی مجدد استفاده شدند. محلولهای بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH های مختلف با مخلوط کردن محلولهای استاندارد ذخیره (K_2HPO_4 و KH_2PO_4) و تنظیم کردن pH با H_3PO_4 یا NaOH تهیه شدند.

آماده سازی نانو ذرات اکسیدکادمیوم: در یک آزمایش محلول اول با استفاده از اسید استیک ۰/۰۶ مولار، سولفات کادمیوم ۰/۰۳ مولار و ۴۰ میلی گرم ستیل تری متیل آمونیوم بروماید به عنوان سورفکتانت در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شد. محلول دوم با دانه های سود ۰/۹ مولار و ۲۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد در یک لیتر آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. سپس محلول اول به محلول دوم همراه با هم زدن مداوم اضافه شد و رسوب به دست آمده با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن، فیلتر و سپس در ۸۰ درجه سانتی گراد در کوره هوای داغ حدود یک ساعت خشک شد. رسوب خشک شده به بوته سیلیسی (۴۱ درجه) انتقال داده شد و در ۴۰۰ درجه سانتی گراد حدود ۲ ساعت سوزانده و سپس پودر به دست آمده برای از بین بردن ناخالصیهای موجود در ذرات، ۳ تا ۴ بار با اتانول شستشو شد (۱۳). خصوصیات نانو ذرات حاصل با استفاده از تفرق اشعه ایکس، جذب طیف سنجی (مرئی-فرابنفش) بررسی شده و برای ساخت الکتروکدیمیکرکربن اصلاح شده مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی خصوصیات نانوذرات با استفاده از تفرق اشعه ایکس از معادله شرر استفاده شد، که در این معادله قله های برجسته برای تخمین اندازه دانه های نمونه به کار گرفته شدند. معادله ۱، معادله شرر می باشد که K ثابت است و برابر (۰/۹) می باشد (۵). λ طول موج است و β تمام پهنای نیمه ماکزیمم خط است و θ زاویه پراش است.

$$D = K\lambda / (\beta \cos\theta) \quad (\text{معادله ۱})$$

توصیف صفات اختصاصی: نانو ذرات به دست آمده بالا سپس با دستگاه بروکر مدل (D/MAX 2500) با تفرق اشعه

الکتروکدیمیکرکربن بسیار ساده و در تهیه آن از پودر گرافیت و پارافین استفاده می شود؛ همچنین الکتروکدیمیکرکربن نقش مؤثرتری نسبت به دیگر الکترودها در فرآیند انتقال الکترون و پدیده اکسایش و کاهش ایفاء می کند و از لحاظ جدید بودن واقعاً الکتروکدیمیکرکربن محسوب می شود و این ویژگیها باعث می شود که پایداری و بازده یک حسگر زیستی شدیداً افزایش یابد. با توجه به نانو ذره انتخاب شده، الکتروکدیمیکرکربن و ساختار پروتئینی آنزیم گلوکز اکسیداز که برای اولین بار به طور همزمان در طراحی این بیوسنسور اندازه گیری گلوکز به کار می رود، هدف از این تحقیق صرفاً طراحی بیوسنسوری کارآمدتر، پایدارتر، با دقت تشخیص بالاتر و در صورت تجاری سازی با قیمتی ارزان تر است.

مواد و روشها

دستگاهها و تجهیزات: آزمایشهای ولتامتری چرخه ای با یک الکتروآنالیزور مدل (EA-201 slemilink system) مجهز شده به یک کامپیوتر شخصی انجام شد. یک سلول الکتروشیمیایی سه قطبی در سراسر آزمایشها به کارگرفته شد. از الکتروکدیمیکرکربن خالص یا خمیرکربن اصلاح شده با نانو ذرات اکسید کادمیوم (قطر ۱ میلی متر) به عنوان الکتروکدیمیکرکربن، یک الکتروکدیمیکرکربن اصلاح شده کالومل به عنوان الکتروکدیمیکرکربن مرجع و یک الکتروکدیمیکرکربن پلاتینی به عنوان الکتروکدیمیکرکربن شمارشگر استفاده شد. از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (Shimadzu UV160) برای انجام آزمایشهای طیف مرئی-فرابنفش استفاده گردید.

مواد شیمیایی و محلولها: سولفات کادمیوم، هیدروکسیدسدیم، پودر گرافیت، استیک اسید (۹۹،۹۵۵ درصد)، اتانول (۹۹،۵ درصد)، اسید هیدروکلریک، ستیل تری متیل آمونیوم بروماید از شرکت مرک تهیه شده است. آنزیم گلوکز اکسیداز و بتا-د-گلوکز از شرکت سیگما خریداری شد. نمونه استاندارد سرم طبق دستورالعمل آماده شد. همه مواد شیمیایی استفاده شده دارای خلوص

شد. در طول آزمایش، همه الکترودها در محلول بافر فسفات و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

سنجش‌های الکتروشیمیایی: اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی به وسیله دستگاه پتانسیواستات گالوانو استات انجام شد. سیستم سه الکترودی در برگیرنده یک الکتروود کار آماده شده، یک سیم پلاتینی به عنوان الکتروود شمارنده و یک الکتروود کالومل اشباع شده به عنوان مرجع برای همه آزمایشات الکتروشیمیایی به کار گرفته شد. همه آزمایشات در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار به عنوان الکتروولیت پشتیبانی کننده و درجه حرارت اتاق (۲۰ تا ۲۰) درجه سانتی‌گراد) انجام شدند. آزمایشها برای تعیین گلوکز و مطالعات الکتروکاتالیتیکی در محلولهای اشباع شده از هوا انجام گرفت، سایر آزمایشات در محلولهای انجام شدند که به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نیتروژن خالص قرار گرفته و به طور کامل بدون اکسیژن شدند و در تمام آزمایشات این حالت حفظ شد. و انجام این فعالیت به این علت است که حضور اکسیژن باعث ایجاد اختلال در سیستم الکتروشیمیایی می‌شود.

نتایج و بحث

پراش پرتو X برای نانو ذرات اکسیدکادمیوم: شکل ۱ منحنی پراش پرتو X برای نانو ذرات اکسیدکادمیوم را نشان می‌دهد. قله‌های پراش در مقدار 2θ جذب شده‌اند. اندازه دانه برای نانو ذرات اکسید کادمیوم مقدار ۴۳ نانومتر تخمین زده شد و افزایش در تیزی قله‌های پراش پرتو X نشان می‌دهد که ذرات در ماهیت بلورین هستند. پراشهای (۱۱۱) (۲۰۰) (۲۲۰) (۳۱۱) و (۲۲۲) به وضوح دیده می‌شوند و به طور نزدیک با الگوهای مرجع اکسید کادمیوم مطابقت می‌کند. فایل مرجع برای مطابقت در (کمیته مشترک مطالعات پراش پودر) در فایل شماره ۰۵-۰۶۴۰ موجود می‌باشد. همان طور که در شکل ۳-۱ مشخص است این محاسبه در محور عمودی برحسب

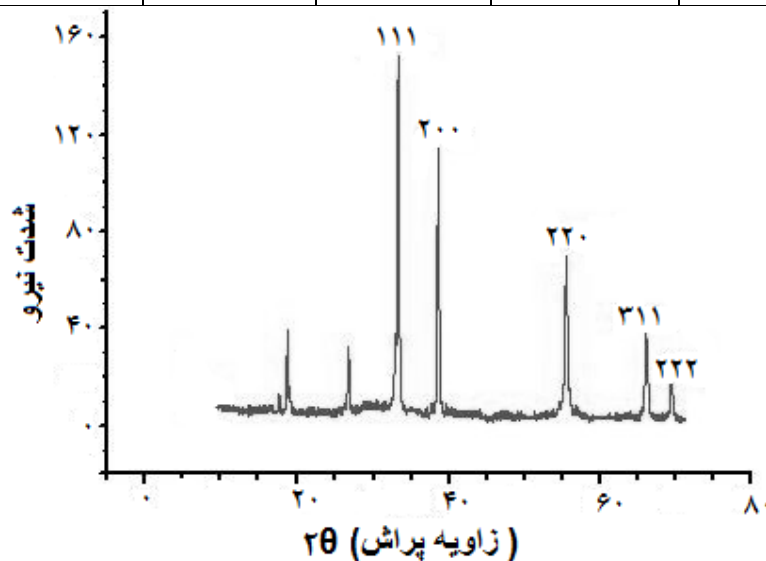
ایکس با تابش $\lambda = 1/540 \text{ \AA}$ ، جریان 250 mA و ولتاژ عمل 40 kV آزمایش شدند. نمونه‌ها پس از پخش در محلول تولوئن با استفاده از طیف سنج نوری دو پرتویی (مرئی-فرابنفش) اندازه‌گیری و ثبت شدند.

آماده سازی الکتروود: در تهیه الکتروود خمیر کربن ابتدا پودر گرافیت در دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در یک کوره استردار قرار گرفت و سپس در درجه حرارت اتاق در یک دسیکاتور در حضور ژل سیلیکای فعال شده، سرد شد؛ و در مرحله بعد خمیر کربن به وسیله مخلوط کردن پودر گرافیت کربن تولید شده توسط روش بالا با روغن پارافین به نسبت ۱ میلی گرم پودر گرافیت کربن در مقابل ۳۶. میلی لیتر روغن پارافین تهیه شد. خمیر کربن تولید شده در این مرحله مربوط به الکتروود خام خمیر کربن است. در مرحله بعد برای تولید خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات اکسید کادمیوم ابتدا صد میلی گرم از پودر گرافیت کربن تولید شده در بالا را به صورت کامل با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول نانو ذرات سنتز شده مخلوط و سپس بعد از تبخیر آب در دسیکاتور در مدت زمان ۳ ساعت، ۳۶ میکرو لیتر روغن پارافین به ترکیب اضافه گردید. یک بخش از خمیرهای فرآوری شده در سرنگهای لوله ای پلاستیکی با قطر ۰/۵ تا ۰/۵۲ میلی متر برای تولید الکتروود خام خمیر کربن و بخش دیگر برای تولید الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات گذاشته شد. تماس الکتریکی با خمیر به وسیله الحاق یک سیم مسی از سوی پایین لوله سرنگ پلاستیکی و به سوی پشت مخلوط برقرار شد. گروههای (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروود خمیر کربن/آنزیم گلوکز اکسیداز) و (الکتروود خمیر کربن/آنزیم گلوکز اکسیداز) به وسیله قطره قطره ریختن ۱۰ میکرو لیتر گلوکز اکسیداز در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار دارای PH برابر ۷ به ترتیب به (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروود خمیر کربن) و (الکتروود خمیر کربن) تهیه شد، و در نهایت نوک الکترودها به صورت دستی با کاغذ تمیز صاف گردید و آماده استفاده

شدت نیرو سنجیده شده است که در مقیاس SI و واحد سنجش آن وات / مترمربع می باشد. در محور افقی زاویه پراش با ۲θ نشان داده شده و واحد سنجش آن درجه X در جدول ۱ آورده شده است:

جدول ۱- اجزای فرمول شرر و اندازه محاسبه شده برای نانوذرات اکسید کادمیوم

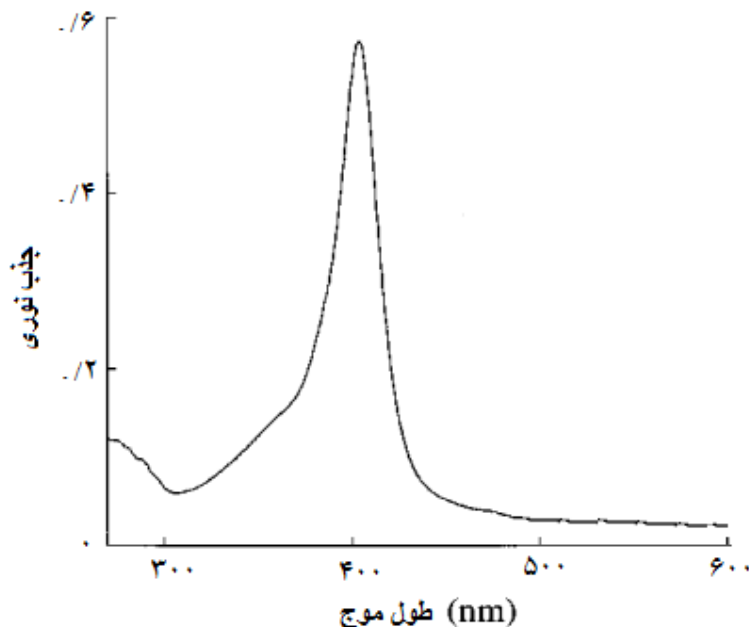
اجزای معادله شرر در محاسبه اندازه نانوذرات در روش پراش اشعه ایکس					اندازه محاسبه شده برای نانوذرات اکسید کادمیوم
$D=K\lambda/(\beta\cos\theta)$					
K:	λ:	B:	θ:	D:	۴۳ نانومتر
ثابت شرر (۰/۹)	طول موج (بر حسب نانومتر)	تمام پهنای نیمه ماکزیم خط	زاویه پراش	اندازه محاسبه شده برای نانوذرات	



شکل ۱- منحنی پراش پرتو ایکس برای نانو ذرات اکسید کادمیوم؛ افزایش در تیزی قله های پراش پرتو X ثابت می کند که نانوذرات اکسید کادمیوم در ماهیت بلورین هستند.

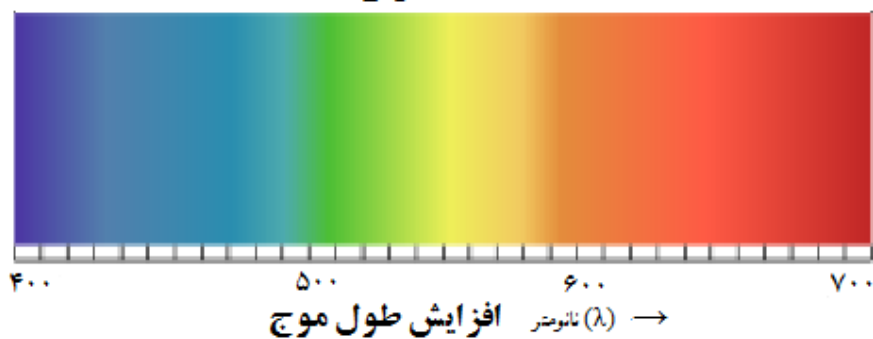
رشد هسته ذرات برای دستیابی به درجه بالایی از یکنواختی کمک می کند و این موضوع به این علت است که این سورفکتانت دارای بار منفی می باشد و نانوذرات را نیز دارای بار منفی می کند و ذرات با بارهای همنام به یکدیگر جذب نمی شوند و بین آنها نیروی دافعه به وجود می آید (۶ و ۱۶). در شکل ۳ قسمتهای مختلف طیف مرئی با رنگهای ویژه هر ناحیه نشان داده شده است. طیف مرئی بین طول موجهای ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر را پوشش می دهد و با توجه به شکل ۲ نواحی که در طول موج کمتر از ۴۰۰ نانومتر قرار دارند مربوط به ناحیه فرابنفش می باشد.

طیفهای جذبی مرئی- فرابنفش نانو ذرات اکسید کادمیوم:
طیف جذبی مرئی- فرابنفش نانو ذرات اکسید کادمیوم در شکل ۲ نشان داده شده است. اگرچه طول موج طیف سنج با منبع نور محدود می شود اما گروه جذبی نانو ذرات یک تغییر مکان واضح را در منطقه آبی رنگ (طول موج ۴۰۰ نانومتر) طیف مرئی نشان می دهند که ناشی از مقدار محدود نمونه نانوذرات در مقایسه با توده ذرات کادمیوم اکسید است. این پدیده نمایان می سازد که تشکیل این نانو ذرات به سورفکتانت و حلال آلی بستگی دارد. چون سورفکتانت ستیل تری متیل آمونیوم بروماید به سطح نانو ذرات سنتز شده می چسبد. بنابراین در اثر این عمل، سورفکتانت تثبیت کننده نانو ذرات بوده و در تشکیل یا



شکل ۲- طیف جذبی مرئی- فرابنفش برای نانو ذرات اکسید کادمیوم

طیف مرئی



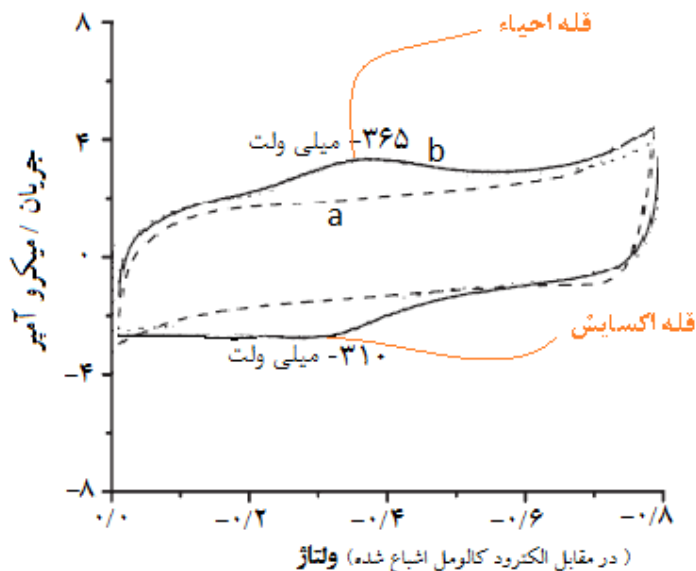
شکل ۳- قسمتهای مختلف طیف مرئی به همراه طول موج آنها و رنگهای ویژه هر ناحیه

معادل فرآیند احیای محاسبه شده که در اینجا برای آنزیم گلوکز اکسیداز برابر با ۳۳۷- میلی ولت می باشد. طریقه محاسبه بدین صورت است که از پتانسیلهای مذکور میانگین گرفته می شود. پتانسیل مشاهده شده در الکتروود برهنه (اصلاح نشده با نانوذرات) هیچ نوع قله کاتدی و آندی را نشان نداد (شکل ۴ منحنی a). این موضوع بیانگر این واقعیت است که نانوذرات اکسید کادمیوم به عنوان تسهیل کننده انتقال الکترون از گونه احیاء به سطح الکتروود و برعکس عمل می کند. این نتایج با کارهای قبلی که نقش نانو ذرات را برای تسهیل الکترون نشان دادند، مطابقت دارد (۷). در شکل ۴ (b) نشان داده شده است که ذرات

بهینه سازی برای تدارک الکتروود آنزیمی: همان طور که در شکل ۴ منحنی b نشان داده شده یک جفت قله احیاء با ثبات و واضح برای انتقال مستقیم الکترون از آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی ولتاموگرام چرخه ای الکتروود (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروود خمیر کربن/ آنزیم گلوکز اکسیداز) در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷، مشاهده می شود. پتانسیلهای قله های اکسید و احیاء به ترتیب در ۳۱۰- و ۳۶۵- میلی ولت در ۵۰ میلی ولت برثانیه بودند. هیچ قله قابل مشاهده ای در الکتروود (الکتروود خمیر کربن/ آنزیم گلوکز اکسیداز) نبود (شکل ۴ منحنی a). سپس از پتانسیلهای اکسید و احیاء، پتانسیل

دهد. در این تحقیق نیز نانو ذرات اکسید کادمیوم به علت داشتن خواص ویژه در سطح نانو، اثر بزرگی را در تبادل الکترون بین گلوکز اکسیداز و الکتروکد خمیر کرین بازی می‌کند (۱۵).

اکسید کادمیوم در سطح نانو می‌تواند یک نقش کلیدی را در مشاهده پاسخ ولتاموگرام چرخه ای آنزیم گلوکز اکسیداز نشان دهد. در نانوذرات نسبت سطح به حجم خیلی زیاد است و این موضوع واکنش پذیری نانوذرات را افزایش می‌دهد.



شکل ۴- ولتاموگرامهای چرخه ای (a) الکتروکد خمیر کرین-نانوذرات کادمیوم (b) الکتروکد خمیر کرین-نانوذرات اکسید کادمیوم-آنزیم گلوکز اکسیداز در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار، PH برابر ۷ و سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه می باشد.

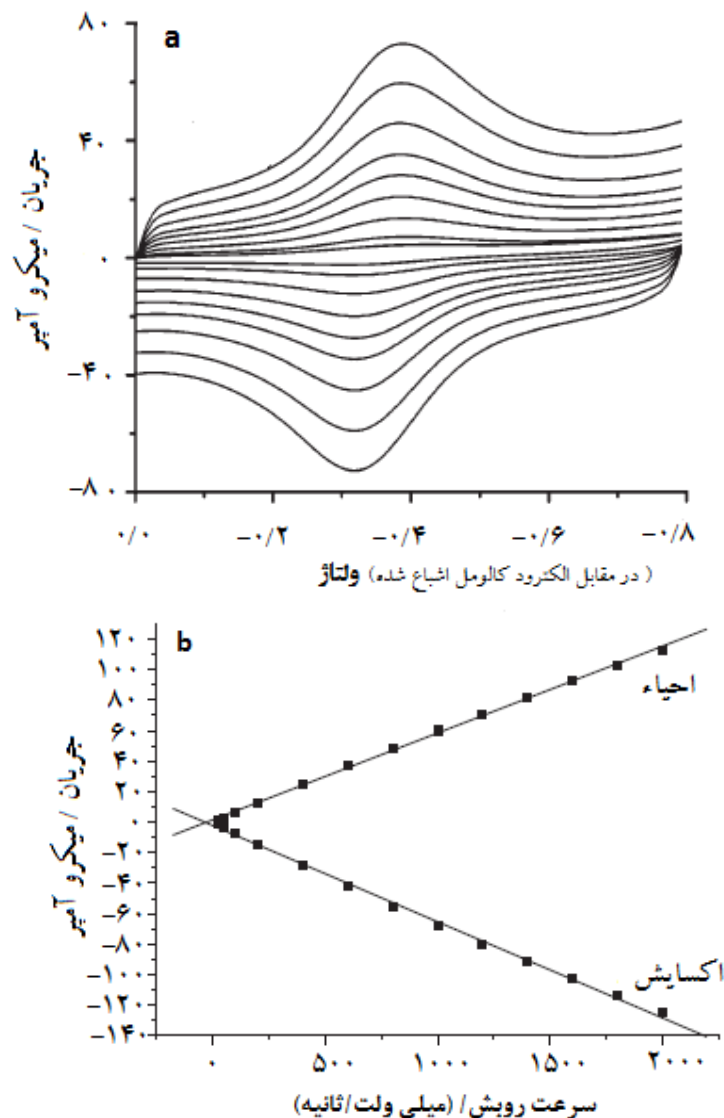
عدد صفر در محور عمودی، قله هایی که در نواحی بیشتر از صفر قرار دارند، قله های اکسایشی هستند و قله هایی که در نواحی کمتر از صفر قرار دارند، قله های کاهش می باشند (البته این گفته فقط مختص این شکل می باشد). و این قله ها در سرعتهای روبش مختلف رسم شده است. کم ارتفاع ترین قله در کمترین سرعت روبش و پر ارتفاع ترین قله در بیشترین سرعت روبش ثبت شده است. در شکل ۵ قسمت (b) نمودار خطی اکسایش و احیاء مشخص شده است.

در محدوده سرعت روبش کمتر از ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه سینتیک انتقال مستقیم الکترون با استفاده از مدل لایرون (۱۹۷۹) تشریح شد. نمودار پتانسیل پیک کاتدی در مقابل لگاریتم سرعت روبش ضریب انتقال بار الکتريکی α برابر ۰/۶۸ را می دهد. تفکیک قله به قله در سرعتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه به ترتیب ۷۵، ۸۲، ۸۸

الکتروشیمی جذب سطحی گلوکز اکسیداز بر روی الکتروکد اصلاح شده با نانو ذرات اکسید کادمیوم: در مطالعه بعدی خصوصیات انتقال الکترون آنزیم گلوکز اکسیداز روی الکتروکد خمیر کرین اصلاح شده با نانو اکسید کادمیوم بررسی گردید و اثر سرعتهای روبشی روی ولتاموگرامهای چرخه ای این آنزیم مطالعه شد. در شکل ۵ (a & b) یک وابستگی خطی بین جریانهای قله کاتدی و آندی آنزیم گلوکز اکسیداز با سرعت روبش مشاهده می شود و جریانهای قله احیاء به طور خطی با سرعت روبش افزایش می یابد. ضریب همبستگی برای پیک کاتدی برابر با ۰/۹۹۸ و برای پیک آندی برابر با ۰/۹۹۳ می باشد. این پدیده به این مطلب اشاره دارد که فرآیند احیاء تحت کنترل جذب گونه احیاء روی سطح الکتروکد می باشد و مبین تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز به طور پایدار روی سطح الکتروکد می باشد. در شکل ۵ (a) با توجه به

یک پارامتری وابسته به تفکیک قله به قله است، برابر (۳۸/۹) برثانیه برآورد شد.

و ۹۵ میلی‌ولت بود. ملاحظه مقدار شاخص α و تفکیک قله به قله کمتر از ۱۰۰ میلی‌ولت، ثابت سرعت انتقال الکترون (k_s) طبق فرمول $k_s = mnFv/RT$ در جایی که m

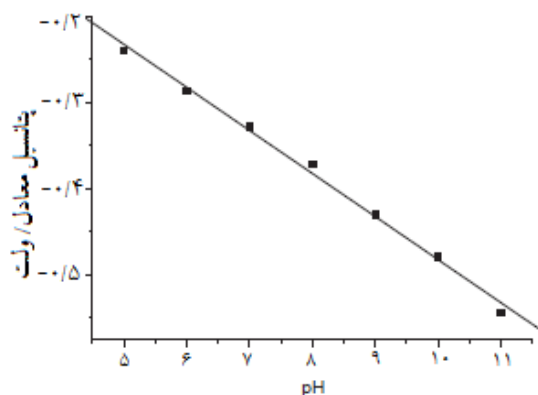


شکل ۵- قسمت (a) ولتاموگرامهای چرخه‌ای (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروکدیم/ آنزیم گلوکز اکسیداز) در سرعت‌های رویش ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌ولت برثانیه (از کم ارتفاع‌ترین قله تا پر ارتفاع‌ترین قله)، و قسمت (b) نمودارهای رسم شده با استفاده از نرم افزار اکسل و بر اساس قسمت (a) می‌باشد. این آزمایش در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار و PH برابر ۷ انجام شد.

یعنی اگر الکتروکد از یک محلول با مقادیر مختلف pH، به محلول اولیه منتقل شود ولتاموگرام چرخه‌ای یکسان به دست می‌آید. افزایش در pH محلول باعث تغییر مکان در پتانسیل‌های قله‌های کاتدی و آندی گردید. نمودار پتانسیل

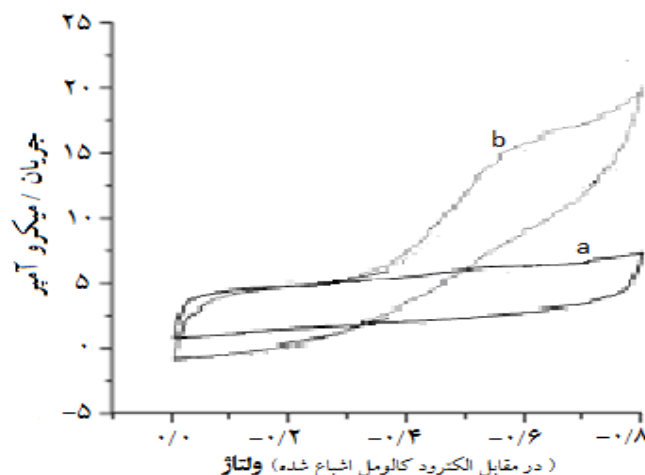
وابستگی انتقال الکترون مستقیم گلوکز اکسیداز به pH محلول: در مطالعه بعدی مشاهده شد که تغییرات به وجود آمده در پتانسیل‌های قله ولتاموگرام چرخه‌ای و جریانها به وسیله pH، در محدوده pH بین ۵ تا ۷ برگشت پذیر بودند،

به طور کلی یک پاسخ جریان بزرگ در پتانسیل ۰/۵ - ولت رخ می‌دهد.



شکل ۶- وابستگی پتانسیل معادل و pH محلول برای الکتروود اصلاح شده در محلول بافر فسفات (سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه)

تفاوت در منحنی a و منحنی b نشان دهنده این است که گلوکز اکسیداز جذب شده بر روی الکتروود، احیای اکسیژن محلول را کاتالیز کرده و باعث یک افزایش چشمگیر در جریان قله احیاء می‌شود. در فرمولهای ۱ و ۲ به ترتیب واکنش احیاء و اکسایش رخ داده است.



شکل ۷- ولتاموگرامهای چرخه ای از GOD/Au/CPE در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار و در PH برابر ۷ در غیاب (a) و در حضور اکسیژن محلول (b) در سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه

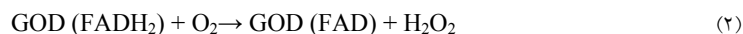
اکسیداز و فلاوین آدنین دی نوکلئوتید اکسایش است، چون واکنش دهنده ها اکسیژن جذب کرده و هیدروژن را از دست داده اند.

معادل در مقابل pH (از ۴ تا ۱۱) یک خط به وجود می‌آورد با شیبی برابر ۴۴- میلی ولت بر pH که این هم نزدیک به مقدار مورد انتظار ۵۸- میلی ولت بر pH بود، که حکایت از این موضوع دارد که ۲ پروتون و ۲ الکترون در فرآیند انتقال الکترون حضور داشتند. کاهش برگشت ناپذیر در جریان پیک در pH=۴ ناشی از دناتوره شدن پروتئین است که این موضوع هم ناشی از جدایی گروه FAD در این محدوده از pH می‌باشد، در ضمن لازم به توضیح است که FAD یک کوفاکتور احیاء می‌باشد و در واکنشهای مهمی در متابولیسم نقش دارد (۱۱). نمودار وقایع مذکور در شکل ۶ نمایش داده شده است.

الکتروکاتالیز اکسیژن حل شده در جهت انتقال الکترون

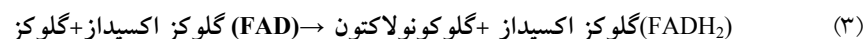
گلوکز اکسیداز جذب شده در سطح: در شکل ۷ ولتاموگرام چرخه ای برای انتقال مستقیم الکترون از آنزیم گلوکز اکسیداز در حضور اکسیژن محلول به صورت چشمگیر تغییر می‌کند و یک افزایش جریان قله احیاء و کاهش جریان قله اکسایش (منحنی b) مشاهده می‌شود و

واکنش اول برای آنزیم گلوکز اکسیداز و فلاوین آدنین دی نوکلئوتید احیاء است چون واکنش دهنده ها، الکترون و هیدروژن جذب کرده اند و واکنش دوم برای آنزیم گلوکز



افزایش یافت. با توجه به اینکه بتا-د(+) گلوکز سوبسترای گلوکز اکسیداز است و حضور آن باعث انجام یک واکنش آنزیمی برطبق معادله ۳ خواهد شد و غلظت شکل اکسید شده گلوکز اکسیداز بر روی سطح الکتروود را کاهش می‌دهد.

اثر گلوکز بر روی فرایند الکترو کاتالیتیک گلوکز در محلول اشباع از اکسیژن و تعیین غلظت آن: به محض اضافه کردن بتا-د(+) گلوکز به محلول بافر فسفات اشباع شده از هوا، پاسخ جریان احیای (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروود خمیر کربن/ آنزیم گلوکز اکسیداز) کاهش یافت (شکل ۸). این کاهش با اضافه کردن مجدد بتا-د(+) گلوکز



کند. این حسگر در صورت قطره قطره ریختن دوباره محلول گلوکز اکسیداز به سطح آن، بعد از اینکه نوک الکتروود با ملایمت روی یک کاغذ تمیز و سپس در یک سطح شیشه ای صاف برای تولید یک سطح یکنواخت و مسطح مالیده شود، قابل تولید مجدد است. پاسخ جریان سطح جدید در غلظت ۰/۲ میلی مولار بتا-د(+) گلوکز مورد آزمایش قرار گرفت. انحراف معیار نسبی برای هفت بار متوالی تجدید کردن ۵/۹ درصد بود. بنابراین این روش سریع، آسان، خیلی با اهمیت و تکرار-پذیر برای حذف سطح جدا شده از غشای گلوکز اکسیداز محسوب می‌شود. در ضمن این حسگر، قابلیت ساخت مجدد شش الکتروود، ساخت مجزا و تکرار پذیری قابل قبول با انحراف معیارهای ۶/۵ درصد برای جریان تعیین شده در غلظت ۰/۲ میلی مولار بتا-د(+) گلوکز را نشان داد.

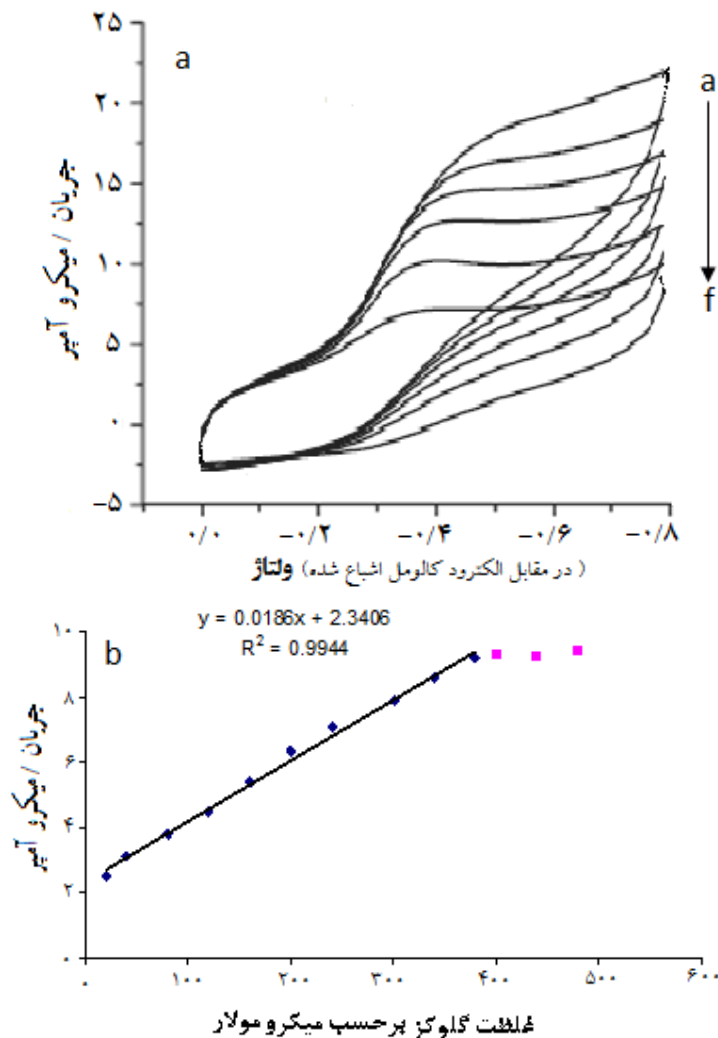
تعیین گلوکز در نمونه سرم و اثر تداخل: تعیین گلوکز در نمونه سرم با استفاده از روش اضافه کردن نمونه استاندارد بر روی حسگر انجام شد. بعد از اینکه پاسخ جریان در ۵ میلی لیتر از محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 7$ که محتوی ۴۰ میکرو لیتر نمونه سرم بوده تعیین شد، چهار تا

بنابراین اضافه کردن گلوکز انجام واکنش الکترو کاتالیتیک را مهار کرده و منجر به کاهش جریان احیا می‌شود. ولتاژهای چرخه ای (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروود خمیر کربن/ آنزیم گلوکز اکسیداز) با افزودن متوالی بتا-د(+) گلوکز به محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار اشباع شده از هوا و کاهش یافتن جریان احیاء (از بالا (a) به پایین (f) کاهش یافته) در شکل ۸ (a) نشان داده شده اند. قسمت (b) شکل ۸ منحنی شیب خطی مربوط به محدوده پاسخ خطی حسگر به غلظت بتا-د(+) گلوکز می‌باشد که از ۲۰ تا ۳۶۰ میکرومولار با ضریب همبستگی برابر ۰/۹۹۴ محاسبه شده و حد آشکار سازی در حالتی که نسبت سیگنال واقعی به سیگنال ناخواسته ۳ بود، ۱۰ میکرومولار اندازه گیری شد.

پایداری حسگر گلوکز اکسیداز: برای تعیین پایداری حسگر طراحی شده، الکتروود آنزیمی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز قرار داده شد، و پس از این مدت زمان، حسگر ۹۶ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد. همچنین این حسگر توانست یک جریان دائمی را وقتی که ۱۵۰ چرخه پی در پی در حضور گلوکز طی شود، حفظ

پاسخ بودند. سطح گلوکز ۸/۶۶ میلی مولار یعنی نزدیک به مقدار ۸/۷۴ میلی مولار که به وسیله دستگاه اسپکترومتری به دست آمده بود، تعیین شد.

محلول ۱۰ میکرو لیتری بتا-د(+)-گلوکز ۲۰ میلی مولار برای تعیین، پی در پی به سیستم اضافه شد. تمام غلظت‌های گلوکز در محلول‌های آشکار سازی در یک محدوده خطی از



شکل ۸ (a)- ولتاموگرامهای چرخه ای (نانوذرات اکسید کادمیوم/ الکتروود خمیر کربن/ آنزیم گلوکز اکسیداز) در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با PH: 7 محتوی اکسیژن محلول و غلظت‌های ۰، ۲۰، ۸۰، ۱۶۰، ۲۴۰ و ۳۴۰ میکرو مولار گلوکز (از بالا به پایین) در سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه. (b) منحنی شیب خطی مربوط به محدوده پاسخ خطی حسگر

تداخل در پاسخ این حسگر زیستی شدند که بیانگر پایداری و کارایی بالای حسگر طراحی شده می باشد.

نتیجه گیری

حسگر زیستی طراحی شده برای اندازه گیری غلظت گلوکز در محدوده خطی از ۲۰ تا ۳۶۰ میکرومولار ارائه شده است. در طراحی این حسگر از الکتروود خمیرکربن،

اثرات تداخل به وسیله آزمایش پاسخهای ۰/۱ میلی مولار گلوکز در حضور اسید اوریک و اسیدآسکوربیک با افزایش تدریجی غلظت مورد تحقیق قرار گرفتند. ۰/۱۶ میلی مولار اسیداوریک و ۰/۳۶ میلی مولار اسیدآسکوربیک باعث افزایش به ترتیب ۳/۳ درصد و ۵/۱ درصد در جریان احیاء شدند. بنابراین این مواد به سختی باعث ایجاد مقدار کمی

اکسایش می‌باشد. در نهایت باید ذکر کرد که حسگر طراحی شده پایداری بسیار بالا و مقاومت زیاد در مقابل عوامل تداخلگر را در محیط آزمایشگاهی نشان داد. و در صورت تجاری سازی می‌تواند کاربردهای پزشکی و صنعتی زیادی داشته باشد.

نانوذرات اکسید کادمیوم و آنزیم گلوکز اکسیداز استفاده شد. داده‌های به دست آمده از مطالعه پراش اشعه ایکس نشان داد که اندازه نانوذرات تهیه شده اکسید کادمیوم ۴۳ نانومتر بود. نقش مؤثر نانوذرات در طراحی حسگرهای زیستی، افزایش سرعت انتقال الکترون بین گونه‌های احیاء و

منابع

- مرتضوی، علی، ضیاءالحق، حمید رضا، وکاشانی نژاد، مهدی. ۱۳۷۷. بهینه‌سازی فرآیندهای صنایع غذایی به کمک بیوسنسورها. مجموعه مقالات ارائه شده در همایش بزرگ صنایع غذایی کشور « نقش و اهمیت طراحی مهندسی در صنایع غذایی » صفحه: ۳۳۰ - ۲۹۱.
۱. وطن خواه دولت سرا، جعفر. ۱۳۸۳. نانوتکنولوژی علم پایه و تکنولوژی نوظهور (تألیف ویلسون و همکاران). انتشارات طراح. تهران. مقدمه کتاب.
۲. C. Fan, H. Wang, S. Sun, D. Zhu, G. Wagner, G. Li, Electron transfer reactivity and enzymatic activity of hemoglobin in a SP sephadex membrane, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2850-2854.
۳. Chaplin, M. 2006. what are Biosensors? available on line. www.isbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html.
۴. Controlled synthesis of monodispersed CuO nanocrystals, Haiming Fan, Lintao Yang, *Nanotechnology*, 15 (2004) 37.
۵. E.A. Meulenkamp, *J. Phys. Chem.*, 102 (1998) 7764.
۶. Eddowes M J, Hill H A O 1977 Novel method for the investigation of the electrochemistry. of metalloproteins: cytochrome c; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21, 771- 772.
۷. Eggins, B.R.: "CHEMICAL SENSORS AND BIOSENSORS". John Wiley & Sons, England, PP: 1-9, 89-124, 197-205, 2002.
۸. Gilardi, G. and Fantuzzi, A. (2001) Manipulating redox systems: application to nanotechnology. *Trends Biotechnol.* 19, 468-476.
۹. Jlanrong, c.et.al. 2004. Nanotechnology and biosensors. *Nanotechnology Advances*. 22:505-518.
۱۰. Kulys, J., 1999. The carbon paste electrode encrusted with a microreactor as glucose biosensor. *Biosensors Bioelectron.* 14, 473-479.
۱۱. Malhotra, B.D.et.al. 2005. Recent Trends in biosensors. *Current Applied physics*. 5:92-97.
۱۲. Sathish Reddy, B.E. Kumara Swamy, Umesh Chandra, B.S.Sherigara, H.Jayadevappa Synthesis of CdO Nanoparticles and their Modified Carbon Paste Electrode for Determination of Dopamine and Ascorbic acid by using Cyclic Voltammetry Technique *Int. J. Electrochem. Sci.*, 5 (2010) 10.
۱۳. Scott, A.O. 1988. Biosensors for food Analysis: Perspectives In "Biosensors for food analysis" ed: Scott, A.o. Royal Society chemistry. Cambridge. u.k. pp: 181-187.
۱۴. Scouten, W.H., Luong, J.H.T. and Brown, R.S. (1995) Enzyme or protein immobilization. techniques for applications in. biosensor design. *Trends Biotechnol.* 13, 178-185.
۱۵. Testsuya Kida, Takanori Oka, *J. Am. Ceram. Soc.*, 90 (2007) 107.
۱۶. X. R. Ye, C. Daraio, C. Wang, J. B. Talbot, *Jin Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (2006) 852.
۱۷. Xu, J.J., Chen, H.Y., 2000. Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized in electrochemically generated poly(ethacridine). *Anal. Chim. Acta* 423, 101-106.
۱۸. Yoshimura, K., Hozumi, K., 1996. Response characteristics of a glucose electrode with a sensing membrane prepared by plasma polymerization. *Microchem. J.* 53, 404-412.

Designing a glucose biosensor to measure glucose by modified electrode with cadmium oxide nanoparticles and glucose oxidase enzyme

Rezaei-Zarchi S.¹ and Negahdary M.²

¹ Biology Dept., PayameNoor University, Yazd, I.R. of Iran

² Young Researchers Club, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I.R. of Iran

Abstract

In this study, we introduced a new biosensor for measurement of glucose by using of glucose oxidase enzyme, cadmium oxide nanoparticles and carbon paste electrode. Size of cadmium oxide nanoparticles were about 43 nm. The results indicated that produced carbon paste electrode modified with cadmium oxide nanoparticles, can facilitates electron transfer in stabilized glucose oxidase enzyme on the electrode surface. In addition, the reduced form of glucose oxidase enzyme could oxidize by solutions oxygen with an electro catalytic reaction, that this oxidation, due to reaction between the oxidized form of glucose and glucose oxidase and this reaction inhibited by glucose. Based on electro catalytic decrease of glucose oxidase enzyme in saturated oxygen solution in the presence of glucose, a new sensor was designed for glucose. Designed sensor has high sensitivity and in linear range of 20 μM to 360 μM and can be used to determine glucose. This biosensor also has very good stability.

Key words: biosensor, cadmium oxide nanoparticles, glucose oxidase enzyme