

تعیین مقدار گلوکوز به روش آمپرسنجی با استفاده از الکتروود اصلاح شده پلی آنیلین - گلوটারآلدهید - گلوکوز اکسیداز

علی کیهان پور، سید محمد سید محقق*، احمد جمشیدی

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

دریافت: ۹۰/۱۱/۱۲، پذیرش: ۹۱/۱۱/۴

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

چکیده

در این پژوهش، الکتروود اصلاح شده پلی آنیلین - گلوکوز اکسیداز (PANI-GOD) بررسی شده است. برای تهیه فیلم پلی آنیلین (PANI) از صفحه پلاتینی $0.4 \times 0.4 \text{ cm}$ به عنوان الکتروود کار، الکتروود میله‌ای پلاتین به عنوان الکتروود کمکی و الکتروود Ag/AgCl به عنوان الکتروود مرجع استفاده شد. برای تهیه فیلم، روش ولتسنجی چرخه‌ای از پتانسیل $V -0.1$ تا $V 1$ با سرعت پویش 50 mV/s به تعداد ۳۰ پویش در محلول حاوی 0.2 M آنیلین و 1 M سولفوریک اسید استفاده شد. خواص فیلم پلیمری تشکیل شده با روش‌های الکتروشیمیایی، طیف‌سنجی نوری UV-Vis، طیف‌سنجی تبدیل فوریه زیرقرمز و امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شده است. از روش ساده‌ای برای تولید حسگرهای گلوکوز استفاده شد. برای این کار آنزیم گلوکوز اکسیداز با استفاده از محلول 0.1 درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوটারآلدهید) در محیط بافر فسفات با pH برابر ۷ روی فیلم‌های نازک پلیمر تثبیت شد. نتایج حاصل از امپدانس الکتروشیمیایی نشان داد، آنزیم به‌طور موفقیت‌آمیزی روی فیلم‌های پلیمری تثبیت شده است. در این پژوهش، اثر بعضی از شرایط آزمایشگاهی مختلف مثل حجم عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوটারآلدهید)، pH، دما و پتانسیل کاربری به روش جریان‌سنجی بررسی شده است. نتایج نشان داد، با تغییر درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده فعالیت الکتروودهای اصلاح شده نیز تغییر می‌کند. بیشترین فعالیت در 0.1 درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوটারآلدهید) مشاهده شده است. انرژی فعال‌سازی برای الکتروود اصلاح شده پلی آنیلین، در محیط بافری استات و فسفات به ترتیب ۴۱ و 37 kJ/mol به دست آمد. بیشترین جریان الکتریکی در این زیست‌حسگرها در pH برابر ۷ و پتانسیل $V 0.65$ دیده شد.

واژه‌های کلیدی

پلی آنیلین،
گلوটারآلدهید،
آمپرسنجی،
زیست حسگر،
گلوکوز اکسیداز

مقدمه

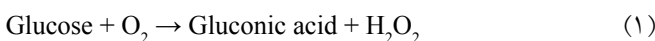
امروزه حسگرهای زیستی در زمینه‌های مختلف پزشکی، تولید فرآورده‌های دارویی و بهداشتی، صنایع غذایی، صنایع شیمیایی و پایش محیط زیست استفاده می‌شوند [۱،۲]. حسگرهای زیستی ابزارهای توانمندی در شناسایی مولکول‌های زیستی هستند. از این دیدگاه، حسگرهای زیستی کاربرد گسترده‌ای در تشخیص‌های طبی و علوم آزمایشگاهی دارند. گلوکوز نقش بسیار مهمی در سوخت‌وساز فعالیت‌های زیستی دارد، به همین منظور از بین تمام زیست‌حسگرها، زیست‌حسگرهای قند خون یکی از کاربردهای شناخته شده آنهاست. در حال حاضر با توجه به شیوع بیماری دیابت در جهان، تقاضای قابل توجهی برای حسگرهای گلوکوز در اندازه‌گیری قند خون وجود دارد. این حسگرها در پایش سطح گلوکوز خون توسط بیمار و تنظیم مقدار تزریق انسولین کمک قابل توجهی می‌کنند. اساس کار زیست‌حسگرهای گلوکوز بر پایه آنزیم گلوکوز اکسیداز، افزایش جریان بر اثر اکسایش هیدروژن پراکسید تولیدی در واکنش گلوکوز با گلوکوز اکسیداز است. بنابراین، تثبیت آنزیم روی سطح الکتروود نقش بسیار مهمی در پژوهش‌های تولید زیست‌حسگرها ایفا می‌کند. برای فراهم کردن ثبات مواد زیستی (آنزیم) در ماتریس متخلخل و تسهیل انتقال الکترون، از پلیمرهای زیست‌سازگار استفاده می‌شود. از پلیمرهای رسانا مانند پلی آنیلین، پلی تیوفن و پلی پیرول به‌طور گسترده برای تثبیت آنزیم استفاده می‌شود. پلی آنیلین به دلیل سهولت تهیه و سازگاری خوبی که با اکثر آنزیم‌ها دارد، برای تولید زیست‌حسگرها مناسب است [۳-۵]. از آنجا که فعالیت الکتروشیمیایی آن بین رسانا در حالت اکسایش (دوپه شده) و نارسانا در حالت کاهش (دوپه نشده) متغیر است، برای تولید الکتروودهای اصلاحی (حسگرها) به کار می‌رود [۶-۸]. پلیمرهای مزدوج (رسانا) به دلیل داشتن خواص بسیار مفید زیر برای کاربرد در حسگرها مناسب‌اند [۹]:

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

پلی آنیلین علاوه بر اکسایش آسان مونومر آن، پایداری شیمیایی خوبی نیز دارد. تخلخل موجود روی بستر پلیمر حاصل عاملی بسیار مهم برای به‌دام انداختن آنزیم مدنظر است. پیشرفت در تولید زیست‌حسگرها براساس آنزیم، می‌تواند با به‌دام‌انداختن ترکیبات زیستی (آنزیم) با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی انجام شود که روشی ساده و راحت برای به‌دام انداختن ترکیبات زیستی (آنزیم) در بستر پلیمر است. با وجود این، جزء زیستی به‌طور تصادفی در

ماتریس پلیمر قرار می‌گیرد که اغلب برای ماده مورد آزمون (آنالیت) باید در دسترس باشد. نقطه ایزوالکتریک گلوکوز اکسیداز در pH برابر ۴/۳ است. بنابراین، در pHهای بیشتر از نقطه ایزوالکتریک دارای بار منفی می‌شود [۱۰]. استفاده از پلیمرهای رسانا قابلیت تولید الکتروودها را با شکل‌های مختلف و ابعاد مینباتوری فراهم می‌کند. دو عامل اساسی برای تولید حسگر، شکل‌شناسی و تخلخل پلیمر حاصل و رسانایی زیاد آن است.

به‌دام‌انداختن آنزیم با استفاده از روش‌های مختلفی مثل به‌دام‌انداختن فیزیکی، شبکه‌ای کردن و اتصال کووالانسی انجام می‌شود. به‌دام‌انداختن فیزیکی از جمله روش‌هایی است که متحمل نشت کردن آنزیم از سطح پلیمر به محلول مورد آزمون است [۹] که می‌توان با استفاده از عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوটারآلدئید) بر این مشکل غلبه کرد. از آنجا که در pHهای زیاد آنیلین قابلیت پلیمر شدن را در محلول آبی مونومر از دست می‌دهد، نمی‌توان از آنیلین برای به‌دام‌انداختن فیزیکی در pHهای زیاد استفاده کرد [۱۱-۱۳]. با توجه به اینکه پلیمرهای رسانا قابلیت باردار شدن را (با اعمال پتانسیل) دارند، بنابراین می‌توان بار کاتیونی را روی بستر فیلم پلیمری اعمال کرد (برای آنیلین پتانسیل بیش از ۰/۶۵V). وجود چنین الکتروودی درون محلولی با pHهای بیش از نقطه ایزوالکتریک (در pH نقطه ایزوالکتریک آنزیم از لحاظ بار الکتریکی خنثی و در pHهای بیشتر از آن دارای بار منفی است) موجب ایجاد جاذبه الکتروستاتیک بین بستر فیلم پلیمری (کاتیون) با آنزیم (آنیون) می‌شود. مزیت این روش، تولید حسگرهایی با فعالیت آنزیمی زیاد است. اما، چه روش الکتروستاتیکی و چه به‌دام‌انداختن فیزیکی هر دو همراه با مشکل نشت کردن آنزیم به درون محلول مورد آزمون با گذشت زمان است. برای رفع این مشکل از روش شبکه‌ای کردن با استفاده از عامل شبکه‌ای‌کننده استفاده می‌شود که این روش نیز همراه با کاهش فعالیت و حتی در بعضی موارد از دست‌دادن کامل فعالیت آنزیمی است. پلی آنیلین به تنهایی قابلیت کمی در ذخیره‌سازی آنزیم دارد. بنابراین، در اکثر مقالات از عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوটারآلدئید) استفاده می‌شود [۱۴-۱۷]. واکنش یاد شده به شکل زیر است:



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

پتانسیل یا جریان استفاده شد. برای انجام ولتسنجی چرخه‌ای و امیدانس از سامانه استاندارد سه الکتروودی دارای الکتروود کار از نوع پلاتین $0.4 \times 0.4 \text{ cm}$ ، الکتروود کمکی از جنس پلاتین صفحه‌ای و الکتروود شاهد Ag/AgCl استفاده شد. طیف‌سنج Bruker مدل 505IF برای گرفتن طیف‌های FTIR و شناسایی گروه‌های عاملی استفاده شد. برای مشاهده طیف مولکولی هوموپلیمر آنیلین، طیف‌سنج UV-vis مدل ۱۶۱۶ (Matsushita, Japan) به کار گرفته شد.

روش‌ها

تهیه فیلم و الکتروود پلاتینی اصلاح شده با پلی آنیلین

فیلم پلی آنیلین از محلول آبی 0.2 M آنیلین و محلول 1 M از H_2SO_4 به روش الکتروشیمیایی (ولتسنجی چرخه‌ای) تهیه شد. الکتروپلیمر شدن در دمای 27°C و در سلول سه الکتروودی انجام شد. از صفحه پلاتینی $0.4 \times 0.4 \text{ cm}$ به عنوان الکتروود کار، الکتروود میله‌ای پلاتین به عنوان الکتروود کمکی و الکتروود Ag/AgCl به عنوان الکتروود مرجع استفاده شد. برای تهیه فیلم پلیمری، الکتروود در محلول اسیدی حاوی مونومر آنیلین قرار گرفت و پتانسیل با استفاده از روش ولتسنجی چرخه‌ای از پتانسیل 1 V تا -0.1 V با سرعت پوشش 50 mV/s به تعداد ۳۰ مرتبه پوشش تغییر داده شد. پس از آن فیلم تهیه شده با آب مقطر شست‌وشو و در هوای سرد خشک شد.

به‌دام‌انداختن آنزیم گلوکوز اکسیداز در فیلم پلیمری پلی آنیلین

ابتدا الکتروود پلاتینی اصلاح شده با پلی آنیلین به مدت 30 min درون محلول 0.1% حجمی از گلو تار آلدهید (عامل شبکه‌ای‌کننده) قرار گرفت تا NH_2 آزاد پلی آنیلین با گروه‌های آلدهیدی موجود روی گلو تار آلدهید واکنش دهد (واکنش همراه با آزاد شدن آب است). سپس، الکتروود اصلاح شده حاصل به مدت 2 h درون محلول بافر استات (برای ثابت نگه‌داشتن pH برابر ۷) حاوی 1 mg/mL آنزیم قرار گرفت تا سر آزاد آلدهیدی دیگر گلو تار آلدهید بتواند با NH_2 موجود روی آنزیم واکنش دهد [۱۹]. این نوع به‌دام‌انداختن باعث افزایش پایداری شیمیایی می‌شود (طرح ۱).

نتایج و بحث

بررسی ولتسنجی چرخه‌ای پلی آنیلین

پیک‌های مشاهده شده (A/A') و (C/C') (شکل ۱) را می‌توان به ساختارهای زیر مربوط دانست (طرح ۲). پاسخ ابتدایی (A/A') همراه

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

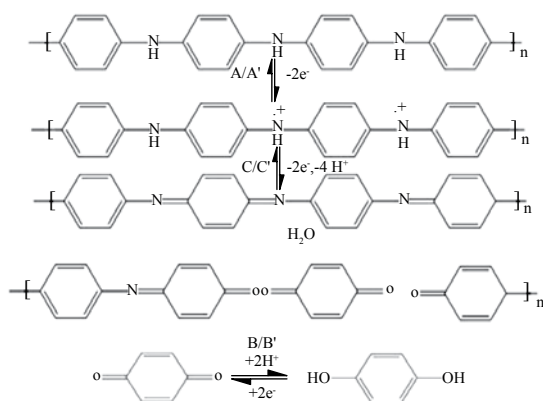
تجربی

مواد

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

دستگاه‌ها

برای بررسی ولتسنجی چرخه‌ای و امیدانس از دستگاه پتانسیوستات - گالوانوستات Auto lab مدل PGSTAT30 متصل به دستگاه رایانه (PC) و مجهز به نرم‌افزار FRA، GPES ساخت هلند به عنوان منبع اعمال



طرح ۲- ساختارهای مختلف پلی آنیلین در اثر اکسایش و کاهش الکتروشیمیایی.

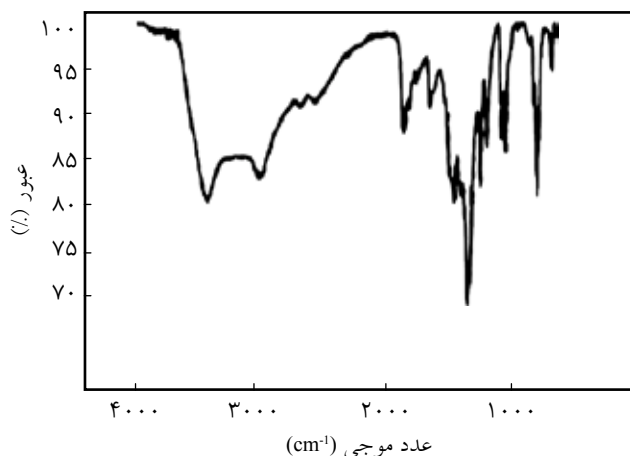
خارج از صفحه CH نسبت داد. نتایج حاصل از ارتعاش‌های مزبور تأییدی بر تشکیل فیلم پلی آنیلین است [۲۱].

طیف UV-Vis هوموپلیمر آنیلین

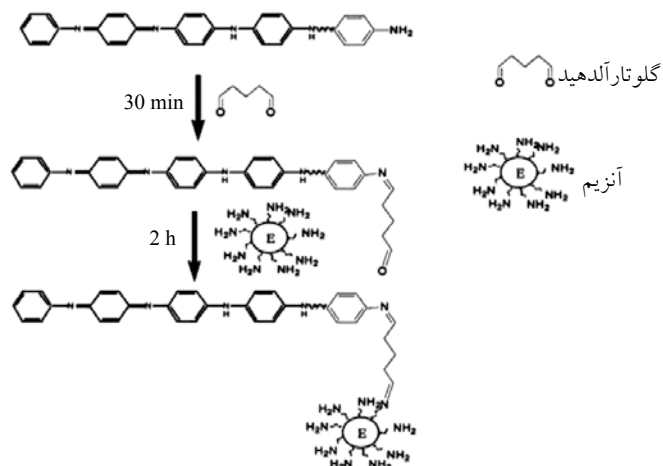
در شکل ۳ طیف UV-Vis هوموپلیمر آنیلین نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، دو نوع انتقال در این شکل رخ می‌دهد. پیک مشاهده شده در ۳۰۵ nm مربوط به انتقالات Π به Π^* حلقه‌های آروماتیک و پیک مشاهده شده در ۵۵۰ nm مربوط به انتقالات n به Π^* الکترون‌های غیرپیوندی نیتروژن به اوربیتال‌های ضدپیوندی حلقه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

منحنی نایکوئیست Pt, Pt/PANI اصلاح شده، Pt/PANI/GOD اصلاح شده

شکل ۴ نشان‌دهنده منحنی نایکوئیست Pt, Pt/PANI (Nyquist plot) و Pt



شکل ۲- طیف FTIR پلی آنیلین.

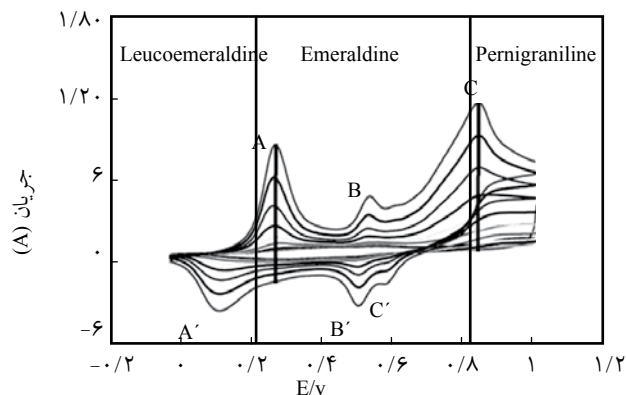


طرح ۱- واکنش گروه‌های عاملی NH_2 آزاد پلی آنیلین و آنزیم با گروه‌های آلدهیدی موجود روی گلو تار آلدهید.

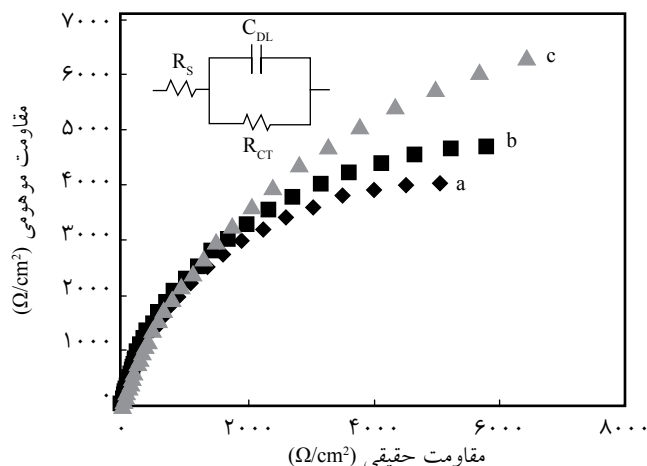
با جذب یا از دست دادن الکترون، بدون گرفتن یا از دست دادن پروتون است. اما سومین زوج پیک مشاهده شده (C/C') مربوط به حالت جذب و دفع پروتون به همراه جذب و دفع الکترون است و پیک دوم مشاهده شده در پتانسیل ۰/۵ V مربوط به آبکافت آنیلین با آب است که منجر به تشکیل ساختار کینون و هیدروکینون می‌شود [شکل‌های ۱ و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

طیف FTIR پلی آنیلین

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



شکل ۱- نمودار ولت‌سنجی چرخه‌ای (CV) پلی آنیلین از ۰/۱ V تا ۱ V با سرعت پوشش 50 mV/s به تعداد ۳۰ پوشش.

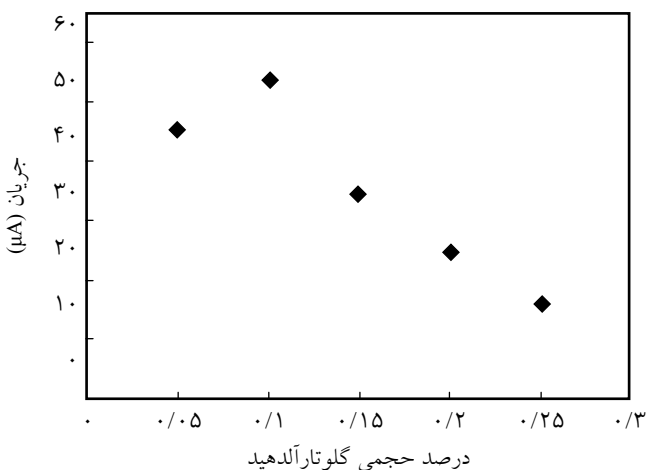


شکل ۴- نمودار امپدانس الکتروشیمیایی: (الف) Pt، (ب) Pt/PANI و (ج) Pt/PANI/GOD از بسامد ۱۰۰-۱۰ kHz در محلول تری سدیم فسفات ۱ M.

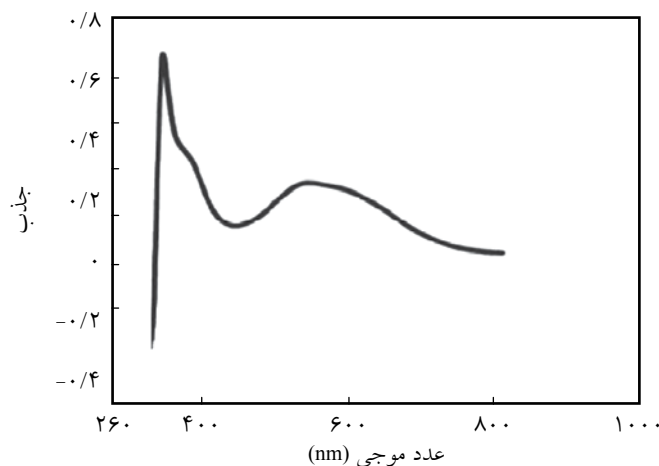
واکنش زیاد گروه‌های عاملی شبکه‌ای‌کننده، مرکز فعال آنزیم گلوکوز اکسیداز که مسئول اصلی واکنش با گلوکوز است، در امان نمی‌ماند و این عامل کاهش تند فعالیت الکترودهای اصلاحی با افزایش عامل شبکه‌ای‌کننده است.

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

در شکل‌های ۶ و ۷ مشاهده می‌شود، متناسب با افزایش مقدار غلظت گلوکوز در ابتدا، جریان حاصل از H_2O_2 تولیدی (از واکنش گلوکوز با آنزیم گلوکوز اکسیداز) است که در بستر فیلم پلیمری به دام افتاده



شکل ۵- نمودار جریان الکتروود اصلاح شده Pt/PANI/GOD بر حسب درصد حجمی عامل شبکه‌ای‌کننده (گلوکوز اکسیداز) در محیط بافری فسفات در غلظت $3 \mu M$ گلوکوز.



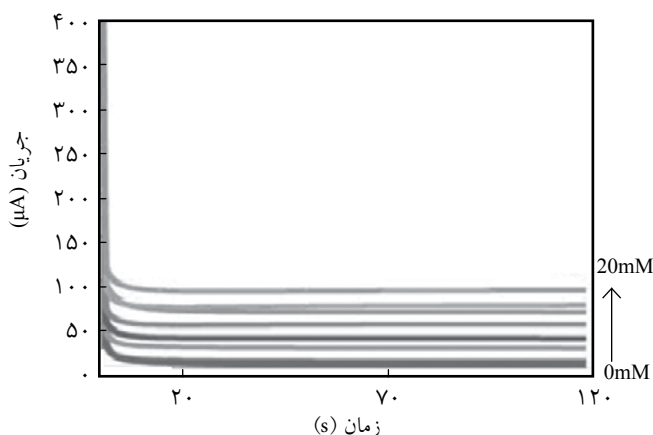
شکل ۳- طیف UV-Vis هوموپلیمر آنیلین در حلال NMP.

Pt/PANI/GOD است. نمودار تشکیل شده از مقاومت حقیقی Z' بر حسب مقاومت موهومی Z'' در محدوده بسامد ۱۰۰-۱۰ kHz ناشی از ترکیب مقاومت الکتریکی و خازن لایه دوگانه است که می‌توان با استفاده از قطر تشکیل شده از نیم دایره نایکویست به سختی یا آسانی واکنش شیمیایی پی‌برد. در مدار معادل، R_s عبارت است از مقاومت اهمی یا مقاومت جبران نشده محلول بین الکتروود مرجع و الکتروود کار (نمونه مورد آزمون) و R_{CT} عبارت است از مقاومت قطبی شدن در فصل مشترک محلول و الکتروود که گاهی از آن با عنوان مقاومت انتقال بار نام برده می‌شود. C_{DL} نیز ظرفیت لایه دوگانه الکتریکی در فصل مشترک مزبور است. مشاهده می‌شود، به دام‌افتادن آنزیم GOD روی الکتروود اصلاح شده Pt/PANI مقدار R_{CT} افزایش یافته است (شکل ۴). افزایش مقدار R_{CT} نمایانگر افزایش مقاومت پوشش در انتقال الکترون است که این مسئله هم می‌تواند ناشی از وجود ذرات آنزیم در خلل و فرج پلی آنیلین باشد. همین مسئله عاملی است تا نمک‌های محلول در آب تمایل کمتری برای نقل و انتقالات الکترونی در سطح الکتروود (کاهش نفوذپذیری) نشان دهند [۲۶].

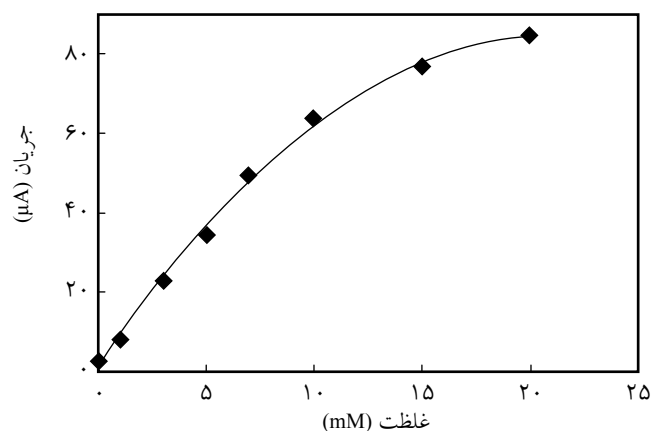
بررسی اثر عامل شبکه‌ای‌کننده بر فعالیت الکتروود اصلاح شده

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

افزایش ابتدایی به دلیل افزایش در مقدار آنزیم به دام افتاده به وسیله عامل شبکه‌ای‌کننده است که با افزایش مقدار آن موجب از بین رفتن فعالیت آنزیم‌ها به دلیل تغییر ساختار شیمیایی آنها می‌شود. چرا که با



(ب)



(الف)

شکل ۶- نمودار جریان: (الف) برحسب غلظت و (ب) برحسب زمان برای الکتروود اصلاح شده در غلظت‌های مختلفی از گلوکوز در محیط بافری فسفات و pH برابر ۷.

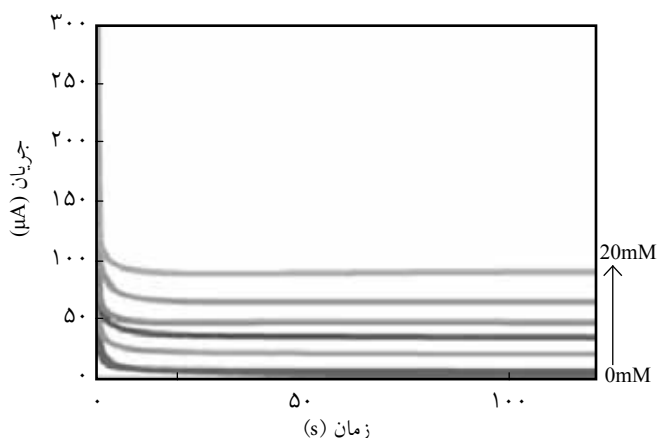
افزاده به کار می‌رود. برای محاسبه این ثابت (K_m)، معکوس جریان برحسب معکوس غلظت براساس معادله (۱) رسم می‌شود [۲۷]:

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

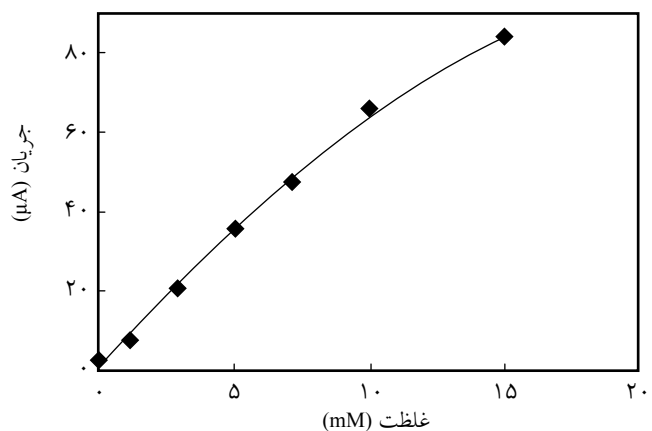
در این معادله 1 ، C و I_{max} به ترتیب جریان، غلظت ماده مورد آزمون (گلوکوز) و بیشترین جریان حاصل (منظور جریانی است که با افزایش بیشتر مقدار غلظت گلوکوز تقریباً ثابت می‌ماند) است. از شیب معادله K_m/I_{max} و عرض از مبدأ آن I/I_{max} به دست می‌آید که با تقسیم شیب بر عرض از مبدأ آن می‌توان ثابت K_m را استخراج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

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

با توجه به شکل‌های ۶ و ۷ محدوده خطی الکتروود اصلاح شده برای سنجش مقدار گلوکوز ۱۰-۱ mM به دست آمد. ثابت Michaelis-Menten (K_m) برای اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم به دام

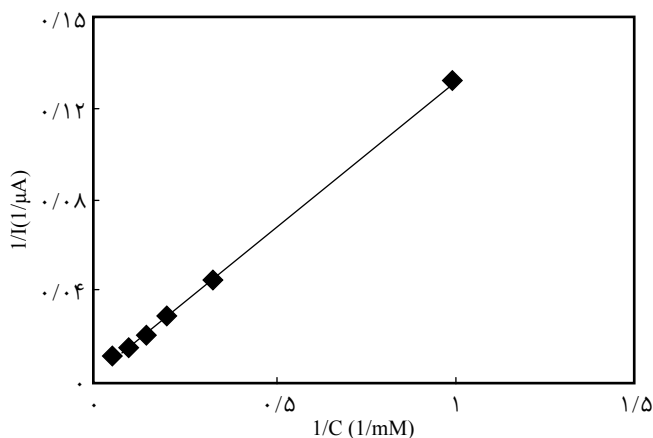


(ب)

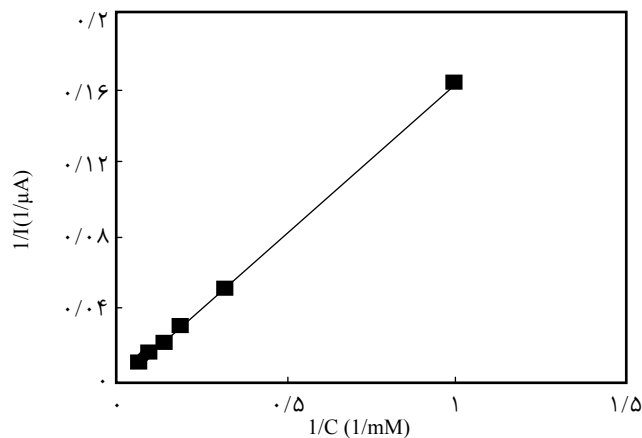


(الف)

شکل ۷- نمودار جریان: (الف) برحسب غلظت و (ب) برحسب زمان برای الکتروود اصلاح شده در غلظت‌های مختلفی از گلوکوز در محیط بافری استات و pH برابر ۶/۵.

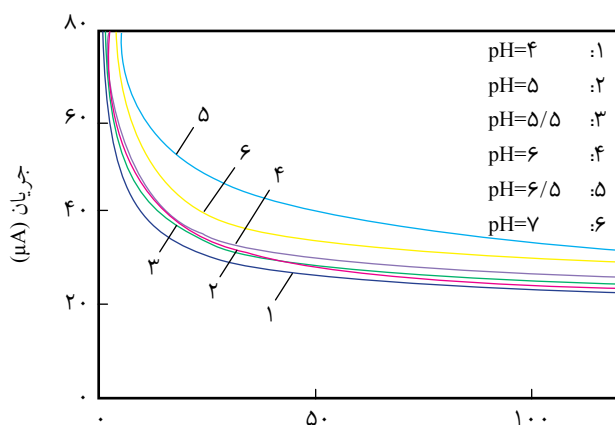


(ب)



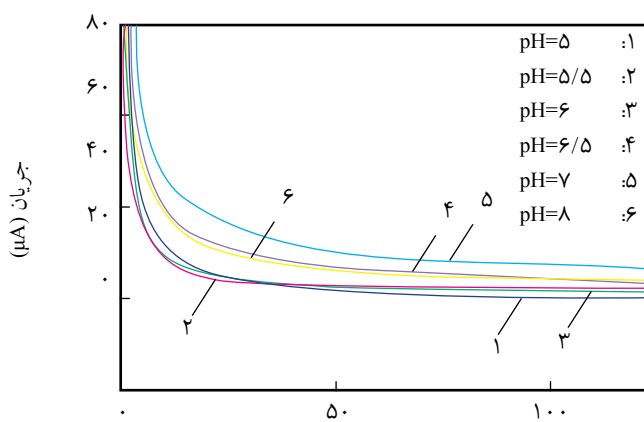
(الف)

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



(s) زمان

(الف)



(s) زمان

(ب)

شکل ۹- نمودار جریان بر حسب زمان برای الکترود اصلاح شده در محلول حاوی ۳ mM از گلوکوز در محیط بافری: (الف) استات و (ب) فسفات در pHهای مختلف.

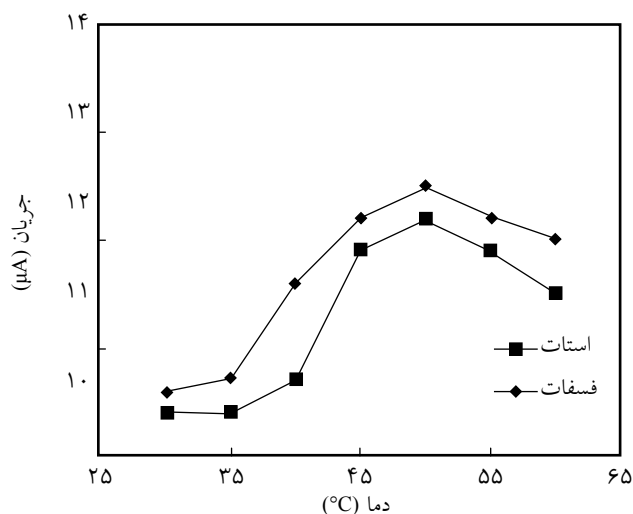
اما، در غلظت‌های بیشتر گلوکوز، یعنی هنگامی که $[C] \gg K_m$ باشد، $I_{max} = I$ می‌شود. در این هنگام جریان تولیدی دیگر وابسته به مقدار غلظت ماده مورد آزمون نیست. K_m مساوی با نسبت آنزیم آزاد به آنزیم کمپلکس شده است. بنابراین هر چه مقدار آن کمتر شود، بیان‌کننده تشکیل بیشتر آنزیم‌های کمپلکس شده نسبت به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

اثر pH روی الکترود اصلاح شده

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

جدول ۱- مقدار پارامترهای اندازه‌گیری شده با استفاده از داده‌های تجربی.

محیط بافری		پارامتر
فسفات	استات	
		K_m (mM)
۳۹/۲۵	۸۵/۴	I_{max} (μA)
۳۰۵/۹	۵۲۰	ناحیه خطی (mM)
۱-۱۰	۱-۱۰	حساسیت ($\mu A / mM$)
۶/۲۱۷	۶/۴۲۶	

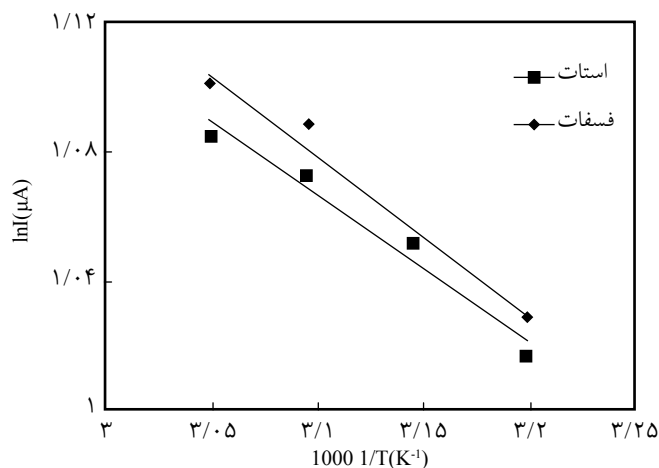


شکل ۱۱- نمودار جریان بر حسب دما برای الکتروود اصلاح شده در محلول ۳ mM گلوکوز در محلول بافری استات و فسفات.

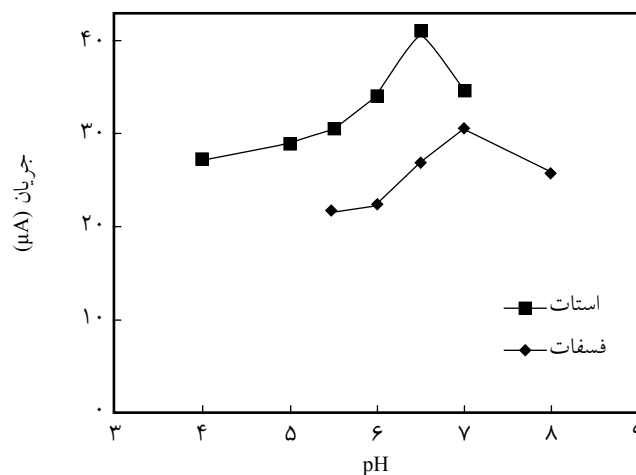
اثر دما روی الکتروود اصلاح شده

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

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

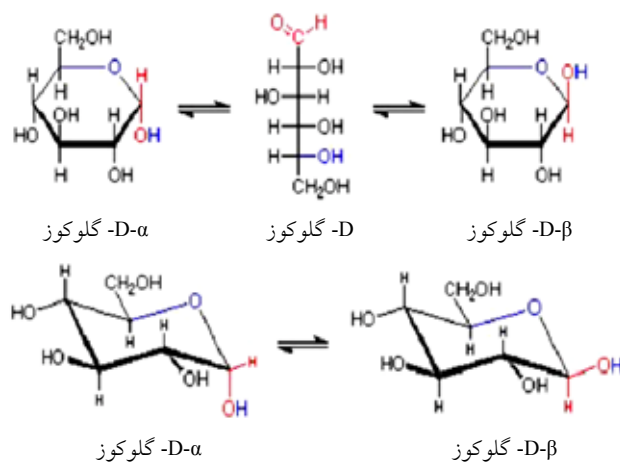


شکل ۱۲- نمودار LnI بر حسب 1/T برای الکتروود اصلاح شده در PANI/GOD در محیط بافری فسفات و استات.



شکل ۱۰- نمودار جریان بر حسب pH برای الکتروود اصلاح شده در محیط بافری استات و فسفات.

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



طرح ۳- ساختارهای مختلف گلوکوز.

نتیجه گیری

در این پژوهش به طور موفقیت آمیز الکتروود اصلاح شده PANI-GOD به روش ولت سنجی چرخه ای در الکتروولیت سولفوریک اسید تهیه شد. برای سنجش مقدار گلوکوز، گلو تار آلدهید به عنوان عامل شبکه ای کننده برای به دام انداختن آنزیم استفاده شد. بهترین فعالیت الکتروود اصلاح شده در محیط بافری فسفات در pH برابر ۷ و برای محیط بافری استات در pH برابر ۵/۶ مشاهده شد. ثابت Michaelis-Menten ارزیابی شد که مقدار آن در محیط بافری فسفات کمتر از محیط بافری استات به دست آمد. این موضوع حاکی از سرعت بیشتر تولید جریان در محیط بافری فسفات است. محدوده خطی الکتروود اصلاح شده برای سنجش مقدار گلوکوز ۱۰-۱ mM به دست آمد. بهترین فعالیت الکتروود اصلاح شده در محیط بافری استات و فسفات در دمای ۵۰°C مشاهده شد که این مسئله ناشی از افزایش فعالیت آنزیم گلوکوز اکسیداز با افزایش دما و افزایش شکل β گلوکوز در محلول بافری با افزایش دماست. انرژی فعال سازی برای الکتروود اصلاح شده پلی آنیلین، در محیط بافری فسفات و استات به ترتیب ۳۷ و ۴۱ kJ/mol به دست آمد.

فعالیت آنها شروع به کاهش می کند، چرا که آنزیم ها پروتئین هستند و در دماهای بیش از ۵۰°C شروع به تخریب می کنند [۳۰]. با استفاده از معادله آرنیوس می توان انرژی فعال سازی آنزیم های به دام افتاده را در الکتروود اصلاح شده محاسبه کرد [۳۱]:

$$I(T) = I_0 \exp(-E_a/RT) \quad (2)$$

$$\ln I(T) = \ln I_0 - E_a/RT \quad (3)$$

در این معادله I_0 ، I ، E_a ، R و T به ترتیب جریان ابتدایی، جریان، انرژی فعال سازی، ثابت سرعت و دما برحسب کلوین است. با رسم $\ln I$ برحسب $1/T$ ، معادله ای به شکل $Y = A - BX$ به دست می آید و انرژی فعال سازی از معادله $E_a = B \times R$ محاسبه می شود. انرژی فعال سازی برای الکتروود اصلاح شده پلی آنیلین، در محیط بافری فسفات و استات به ترتیب ۳۷ و ۴۱ kJ/mol به دست آمد. هر اندازه مقدار انرژی فعال سازی کمتر باشد، بدین معنی است که آنزیم های به دام افتاده در بستر پلیمری مدنظر، فعالیت بیشتری دارند. بنابراین، به انرژی کمتری برای گذر از سد انرژی نیاز است (شکل های ۱۱ و ۱۲).

مراجع

- Shirale D.J., Gade V.K., Gaikwad P.D., Kharat H.J., Kakde K.P., Savale P.A., Hussaini S.S., Dhumane N.R., and Shirsat M.D., Synthesis of P(NMP) Film for Glucose Oxidase Electrode, *Transaction Saest*, **40**, 128-133, 2005.
- Trojanowicz M., Geschke O., Krawczynski K.T., and Cammann K., Biosensors Based on Oxidases Immobilized in Various Conducting Polymers, *Sensor. Actuator. B*, **28**, 191-199, 1995.
- Bartlett P.N. and Birkin P.R., A Microelectrochemical Enzyme Transistor Responsive to Glucose, *Anal. Chem.*, **66**, 1552-1559, 1994.
- Lvovich V. and Scheeline A., Amperometric Sensors for Simultaneous Superoxide and Hydrogen Peroxide Detection, *Anal. Chem.*, **69**, 454-462, 1997.
- Cosnier S., Biomolecule Immobilization on Electrode Surfaces by Entrapment or Attachment to Electrochemically Polymerized Films, A Review, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 443-456, 1999.
- Schuhmann W., Conducting Polymers and their Application in Amperometric Biosensors, *Mikrochim. Acta*, **121**, 1-29, 1995.
- Liu Y. and Yu T., Polymers and Enzyme Biosensors, *J. Macromol. Sci.*, **37**, 459-500, 1997.
- Foulds N.C. and Lowe C.R., Immobilization Glucose Oxidase in Ferrocene-Modified Pyrrole Polymers, *Anal. Chem.*, **60**, 2473-2478, 1988.
- Savale P.A. and Shirsat M.D., Synthesis Poly(*o*-anisidine)/H₂SO₄ Film for the Development Glucose Biosensor, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **159**, 299-309, 2009.
- Shaolin M., Huaiguo X., and Bidong Q., Bioelectrochemical Responses of the Polyaniline Glucose Oxidase Electrode, *J. Electroanal. Chem.*, **304**, 7-16, 1991.
- Tiwari A. and Gong S., Electrochemical Detection a Breast Cancer Susceptible Gene Using cDNA Immobilized Chitosan-co-Polyaniline Electrode, *Talanta*, **77**, 1217-1222, 2009.
- Gospodinova N., Terlemezyan L., Mokreva P., and Kossev K., On the Mechanism Oxidative Polymerization Aniline, *Polymer*, **34**, 2434-2439, 1993.
- Gospodinova N., Mokreva P., and Terlemezyan L., Chemical

- Oxidative Polymerization of Aniline in Aqueous Medium without Added Acids, *Polymer*, **34**, 2438-2439, 1993.
14. Fortier G. and Belanger D., Characterization the Biochemical Behavior Glucose Oxidase Entrapped in a Polypyrrole Film, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 854-858, 1991.
 15. Uang Y.M. and Chou T.C., Fabrication Glucose Oxidase/Polypyrrole Biosensor by Galvanostatic Method in Various pH Aqueous Solutions, *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 141-147, 2003.
 16. Iroh J.O., Zhu Y., Shah K., Levine K., Rajagopalan R., and Uyar T., Electrochemical Synthesis: A Novel Technique for Processing Multi-Functional Coatings, *Prog. Org. Coat.* **47**, 365-375, 2003.
 17. Gaikwad P.D., Shirale D.J., Gade V.K., Savale P.A., Kharat H.J., Kakde K.P., and Shirsat M.D., Immobilization GOD on Electrochemically Synthesized PANI Film by Cross-linking via Glutaraldehyde for Determination Glucose, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **1**, 425-434, 2006.
 18. Vastarella W., Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors, *Facolta A Discienze Matematiche Fisiche Naturail Dipartimentio Di Chimica*, Tesi di Dottorato di Ricerca in Chimica dei Materiali Innovativi, XIV Ciclo- A.A., March 2001.
 19. Tiwari A. and Shukla S.K., Chitosan-g-Polyaniline: A Creatine Amidinohydrolase Immobilization Matrix For Creatine Biosensor, *Express Polym. Lett.*, **9**, 553-559, 2009.
 20. Ansari R. and Keivani M.B., Polyaniline Conducting Electroactive Polymers: Thermal and Environmental Stability Studies, *E-J. Chem.*, **3**, 202-217, 2006.
 21. Geng Y., Li J., Sun Z., Jing X., and Wang F., Polymerization of Aniline in an Aqueous System Containing Organic Solvents, *Synth. Met.*, **96**, 1-6, 1998.
 22. Ruckenstein E. and Yin W., Polyaniline Co-Doped with Camphor Sulfonic and Hydrochloric Acids by Chemical Oxidation in Aqueous Solution, *J. Appl. Polym. Sci.*, **79**, 80-85, 2001.
 23. Athawale A.A., Kulkarni M.V., and Chabukswar V.V., Studies on Chemically Synthesized Soluble Acrylic Acid Doped Polyaniline, *Mat. Chem. Phys.*, **73**, 106-111, 2002.
 24. Rao P.S., Anand J., Palaniappan S., and Sathyanarayan D.N., Effect Sulphuric Acid on the Properties Polyaniline-HCl Salt and Its Base, *Eur. Polym. J.*, **36**, 915-921, 2000.
 25. Kim Y.H., Foster C., Chiang J., and Heeger A., Localized Charged Excitations in Polyaniline: Infrared Photoexcitation and Protonation Studies, *Synth. Met.*, **29**, 285-291, 1989.
 26. Salimi A., Zand Karimi R., Noorbakhash A., and Soltanian S., Glucose Biosensor Based on Silicon Nitride Nanoparticles, *Electroanalysis*, **20**, 2434-2442, 2010.
 27. Akundy G.S., Rajagopalan R., and Iroh J.O., Electrochemical Deposition Polyaniline-Polypyrrole Composite Coatings on Aluminum, *J. Appl. Polym. Sci.*, **83**, 1970-1976, 2002.
 28. Shobha Jeykumari D.R. and Sriman Narayanan S., Fabrication Bienzyme Nanobiocomposite Electrode Using Functionalized Carbon Nanotubes for Biosensing Applications, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1686-1693, 2008.
 29. Lee Sh.H., Fang H.Y., and Chen W.C., Amperometric Glucose Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrodes Mediated with Hexacyanerrate-Chitosan Oligomers Mixture, *Sensor. Actuator. B*, **117**, 236-243, 2006.
 30. Bayramoglu. G., Karakısla M., Altıntas B., Metin U.A., Sacak M., and Arica M.Y., Polyaniline Grafted Polyacrylonitrile Conductive Composite Fibers for Reversible Immobilization Enzymes: Stability and Catalytic Properties Invertase, *Proc. Biochem.*, **44**, 880-885, 2009.
 31. Turkarslan Ö., *Amperometric Cholesterol and Alcohol Biosensors Based on Conducting Polymers*, PhD Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University, April 2010.