استفاده از زیست‌حسگرهای مبتنی بر پایه نانوساختارهای پلی‌آنیلین برای تشخیص گلوکوز و کلسترول

صدیف آزادمرد دمیرچی[1*]، محمد براتی[2]، حسن خلیفه[1]

۱- تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، آزمایشگاه تجزیه مواد غذایی

۲- تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده شیمی، گروه شیمی کاربردی، آزمایشگاه چندسازه‌های بسپاری

پیام نگار: **s-azadmard@tabrizu.ac.ir**

چکیده

اندازه‌گیری کیفی و کمی اجزای مواد غذایی به دلیل هزینهٔ بالای روش‌های مرسوم، همچنین، تمایل برای تشخیص دقیق‌تر و حساس‌تر این اجزا، از اهمیت زیادی برخوردار است. از ترکیباتی که اندازه‌گیری آنها بسیار متداول است می‌توان گلوکوز و کلسترول را برشمرد. روش‌های بسیاری تا کنون به‌منظور تشخیص این دو عنصر غذایی به کار گرفته شده است. لیکن لزوم اندازه‌گیری‌های دقیق با حساسیت بالای این دو ترکیب به ویژه در امر سلامتی مواد غذایی، سبب گسترش روش‌های زیست‌شناختی مخصوصاً زیست‌حسگرها شده است. از این میان، زیست‌حسگرهای مبتنی بر نانوساختارهای بسپارهای هادی، خصوصاً پلی آنیلین، به خاطر ویژگی‌های منحصر به‌فرد آنها، اخیراً مورد توجه واقع شده‌اند. آنچه در ادامه می‌آید تلاشی به‌منظور معرفی و بررسی مطالعات انجام شده بر روی زیست‌حسگرهای مبتنی بر پلی آنیلین برای تشخیص گلوکوز و کلسترول است.

کلمات کلیدی: زیست‌حسگر، کلسترول، گلوکوز، نانوالیاف پلی‌آنیلین، نانولوله‌های پلی‌آنیلین

۱- مقدمه

امروزه در صنایع غذایی تشخیص ترکیب مواد غذایی در آزمون‌های کنترل کیفی از اهمیت بسیاری برخوردار است. هزینهٔ بالای روش‌های مرسوم و نیز نیاز به اندازه‌گیری‌های هر چه دقیق‌تر و حساس‌تر، اهمیت این موضوع را آشکارتر می‌کند. به همین دلیل یافتن و یا بهبود روش‌های اندازه‌گیری سریع‌تر، دقیق‌تر، حساس‌تر و البته ارزان‌تر همواره مورد توجه محققین و تولیدکنندکان مواد غذایی بوده است[۳-۱].

وسایل آنالیز رایج در صنایع غذایی نیاز به مهارت کاربر دارد و زمان‌بر می‌باشند. این وسایل اغلب نیازمند جداسازی‌های طولانی، تجهیزات گران قیمت و مواد شیمیایی با خلوص بالا هستند. بسیاری از این موانع و مشکلات با به‌کارگیری آنالیزهای آنزیمی از بین می‌رود. به هر حال، صنایع غذایی نوین نیازمند دستگاه‌های آنالیز کوچکی است که بتوانند در نمونه‌های غیرمحلول به آسانی مورد استفاده قرار بگیرند و قادر باشند به طور برخط یک یا چند ویژگی را طی تولید یا فراوری مواد غذایی به طور همزمان کنترل نمایند. اغلب این نیازمندی‌ها را می‌توان با استفاده از الکترودهای آنزیمی به طور قابل قبولی پاسخ داد که در نتیجه سبب افزایش بازدهی و بهینه‌سازی فرایند و کیفیت محصول تولیدی می‌گردد. هرچند خود این الکترودهای آنزیمی نیز باید ارزان، قابل اعتماد و مستحکم، و در

مقایسه با روش‌های موجود، برتری آشکاری داشته باشند[۴].

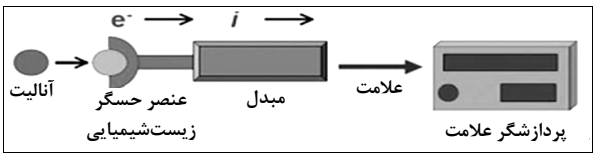
یکی از مهم‌ترین علل بروز بیماری‌های قلبی در سال‌های اخیر بالا بودن میزان کلسترول در خون است. کلسترول در محصولات لبنی و زرده تخم مرغ به وفور یافت می‌شود و مقدار آن را می‌توان به کمک روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) که از حساسیت و انتخاب‌پذیری مناسبی برخوردارند، تعیین نمود. اما به‌دلیل زمان‌بر بودن و گران بودن این روش‌ها، بهره‌گیری از روش‌های سریع و کارآمد از اهمیت بسزایی برخوردار است. در نتیجه روش‌های آنزیمی مانند استفاده از کلسترول استراز و کلسترول اکسیداز به‌دلیل سادگی، سریع بودن و مؤثر بودن می‌توانند به طور عملی جایگزین روش‌های کروماتوگرافی مرسوم شوند[۵].

گلوکوز یکی دیگر از اجزاء مهم مواد غذایی است که اندازه‌گیری آن در کنترل کیفی فرایندهای تولید مواد غذایی بسیارمهم و متداول است. تاکنون برای تشخیص گلوکوز روش‌های متعدد طیف‌سنجی مانند کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)، بویژه در فرایند تخمیر شربت‌ها، به کار گرفته شده است. لیکن امروزه روش‌های آنزیمی بدین منظور بسیار گسترش پیدا کرده است[۶].

تمایل محققین در عرصهٔ صنایع غذایی برای اندازه‌گیری این ترکیبات، با تکرارپذیری، انتخابگری و سرعت بالا در غلظت‌های بسیار پایین در محیط زنده منجر به توسعه ابزارهایی تحت عنوان زیست‌حسگرها شده به گونه‌ای که ۸۵ درصد از زیست‌حسگرهای رایج برای اندازه‌گیری گلوکوز به کار می‌رود [۷ و ۲].

به طور کلی حسگرها وسایلی هستند که یک تغییر شیمیایی، فیزیکی و یا زیست‌شناختی را درک کرده و آن را به یک سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کنند. یک حسگر شامل یک عنصر تشخیص دهنده است که قادر به ایجاد یک پاسخ به حضور یک آنالیت خاص یا گروهی از آنالیت‌ها می‌باشد. بخش مهم دیگر یک حسگر مبدل است که پاسخ ایجاد شده را به یک علامت تبدیل می‌کند. بخش سوم یک حسگر، پردازشگر سیگنال است که سیگنال دریافتی از مبدل را جمع‌آوری کرده و پس از تقویت آن، نهایتاً به نمایش می‌گذارد.

زیست‌حسگرها زیرگروهی از حسگرهای شیمیایی هستند که عملکردی کاملاً اختصاصی در فرایندهای تشخیص زیستی دارند. در این نوع از حسگرها، عنصر تشخیص‌دهنده یک ترکیب زیستی مانند پروتئین، آنزیم، پادتن، اسید نوکلئیک، سلول، بافت و یا گیرنده می‌باشد که به‌صورت انتخابی با آنالیت هدف واکنش می‌دهد و پاسخی ایجاد می‌کند. این پاسخ در مبدل به یک علامت الکتریکی تبدیل می‌شود و پس از پردازش، مقدار این سیگنال به‌صورت ولتاژ، جریان و یا مقاومت ظاهری مشاهده می‌گردد. مقدار این علامت به غلظت آنالیت ارتباط داده می‌شود. با توجه به اینکه عملکرد عناصر تشخیص‌دهنده زیستی کاملاً اختصاصی است (به‌عنوان نمونه آنزیم گلوکوز اکسیداز فقط گلوکوز را اکسید می‌کند)، زیست‌حسگرها علاوه بر ارزیابی کیفی و آگاهی از حضور یا عدم حضور آنالیت، ارزیابی کمّی و تعیین غلظت آن را نیز ممکن می‌سازد[۸]. شکل (۱) نمای اجمالی یک زیست‌حسگر را نشان می‌دهد.



شکل ۱- تصویر اجمالی یک زیست‌حسگر [۸]

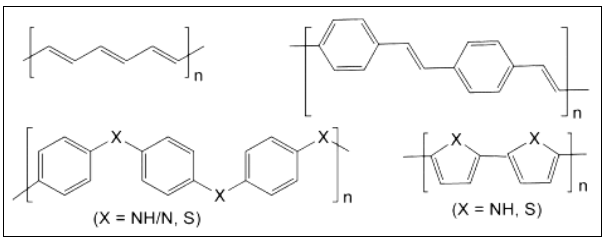
عناصر تشخیص‌دهنده زیستی مذکور در محلول‌های آبی بر روی سطوح مبدل ماندگاری کمی دارند در نتیجه برای ماندگاری بیشتر، این مواد باید به طریقی بر روی سطوح مبدل تثبیت شوند. جذب سطحی این ترکیبات بر سطح مبدل، گیرافتادن در یک ماتریس در حین پوشاندن سطح مبدل با این ماتریس و نیز تشکیل پیوند کووالانسی بین این مواد و سطح مبدل، از جمله روش‌هایی است که بدین منظور از آنها استفاده می‌شود. در بین تمامی روش‌ها، مؤثرترین و متداول‌ترین روش، روش گیرافتادن در ماتریس است. این ماتریس‌ها عمدتاً شامل غشاءها، ژل در خمیر کربن، گرافیت، سیلیس و یا فیلم‌های نازک بسپاری است. بدون شک در این میان ماتریس‌های بر پایه نانوساختارهای بسپارهای رسانا، بویژه پلی‌آنیلین و پلی‌پیرول، به دلیل سازگاری با اجزای زیستی، توانایی انتقال سریع الکترون، سطح مؤثر فوق‌العاده بالا و چسبندگی مناسب جزو کارآمدترین و مؤثرترین ماتریس‌ها به شمار می‌روند. در این مطالعه به کاربردهای نانوزیست‌حسگرهای بر پایه پلی‌آنیلین در اندازه‌گیری گلوکوز و کلسترول پرداخته می‌شود.

۲- بسپارهای رسانا

بسپارهای رسانا دسته‌ای از مواد آلی هستند که دارای خاصیت رسانش الکتریکی می‌باشند. این چنین تصور می‌شود که فلزات، دارای رسانش الکتریکی و مواد آلی عایق الکتریسیته اند در حالی که بسپارهای رسانا دارای هر دو ویژگی هستند. از دیگر مزایای بسپارهای رسانا، فرایندپذیربودن آن‌هاست بدین معنی که این مواد قابلیت انحلال و یا ذوب‌شدن را دارا می‌باشند.

این ویژگی سبب می‌شود که این بسپارها در اشکال مختلف و به روش‌های گوناگون تهیه شده و به کار گرفته شوند. به علاوه این بسپارها به دلیل ماهیت پلاستیکی‌شان، دارای قابلیت انعطاف‌پذیری می‌باشند. از دیگر ویژگی‌های منحصربفرد این بسپارها می‌توان به تنظیم قابلیت هدایت الکتریکی آن‌ها اشاره کرد[۹].

دلیل هدایت الکتریکی این مواد، ساختار پیوندی مزدوج آن‌هاست. بدین معنی که الکترون‌های موجود در پیوندهای π این ساختارها می‌توانند در طول زنجیره بسپاری جابجا شوند و جریان الکتریکی را انتقال دهند. شکل (۲) ساختار مزدوج برخی بسپارهای رسانا را نشان می‌دهد.



شکل ۲- برخی از انواع بسپارهای هادی. پلی فنیلن ونیلن، پلی استیلن، پلی تایوفن (x=s) و پلی پیرول (x=NH) پلی آنیلین (x=N, NH) و پلی فنیلن سولفید (x=s) [۹]

در بین بسپارهای رسانا، پلی‌آنیلین به دلیل هدایت الکتریکی بالا، ساده بودن روش تولید، پایداری محیطی خوب و ماهیت شیمیایی (اکسایش/کاهش) منحصر بفرد، بیش از دیگر بسپارهای رسانا مورد توجه محققین بوده است. پژوهش‌های انجام شده در سال‌های اخیر برای تهیه پلی‌آنیلین در مقیاس نانو موجب شده است که مهم‌ترین ویژگی قابل توجه این بسپار یعنی هدایت الکتریکی، به طور فزاینده‌ای بهبود یابد. علاوه بر این، افزایش سطح مؤثر بسپار موجب بهبود خواص فرایندپذیری آن شده است و در نتیجه کاربرد این بسپار را در علوم مختلف به خصوص صنایع غذایی افزایش داده است[۱۰]. تاکنون انواع مختلفی از نانوساختارهای پلی‌آنیلین تهیه شده است. نانوذرات، نانوالیاف‌ها، نانولوله‌ها، نانوسیم‌ها، نانومیله‌ها و نانوبلت‌ها از جملهٔ این ساختارها هستند.

ویژگی‌های یادشده از نانوساختارهای بسپارهای رسانا باعث شده است که به این مواد به‌عنوان یکی از جذاب‌ترین گزینه‌ها برای ماتریس تثبیت کنندهٔ عنصر تشخیص دهنده زیستی بر روی مبدل زیست‌حسگر، توجه شود. از بین نانوساختارهای تهیه شده از پلی‌آنیلین، نانوذرات، نانوالیاف‌ها، و نانولوله‌های این ماده تاکنون در زیست‌حسگرها به کار گرفته شده‌اند [۸].

در ادامه به نحوهٔ به‌کارگیری این مواد در ساختار زیست‌حسگرها و همچنین نحوهٔ اندازه‌گیری قندها، پروتئین‌ها و چربی‌ها با استفاده از آنها پرداخته می‌شود.

۳- زیست‌حسگرها

همان طور که اشاره شد زیست‌حسگرها دسته‌ای از حسگرها هستند که عملکرد فوق‌العاده اختصاصی در حضور عوامل مداخله‌گر دارند. تثبیت هریک از عملگرهای زیستی برروی مبدل زیست‌حسگر باعث ایجاد پاسخ کاملاً اختصاصی آن به آنالیت می‌شود. لذا از نظر انتخاب‌گری، زیست‌حسگرها، ابزارهای فوق‌العاده‌ای هستند.

به طور کلی در یک زیست‌حسگر برهم‌کنش بین آنالیت و عنصر تشخیص زیستی سبب ایجاد تغییر در یک پارامتر می‌گردد. این تغییر در مبدل به یک پیام الکتریکی تبدیل شده و پس از پردازش، به نمایش گذاشته می‌شود [۸].

۳-۱ روش‌های تثبیت عناصر زیستی

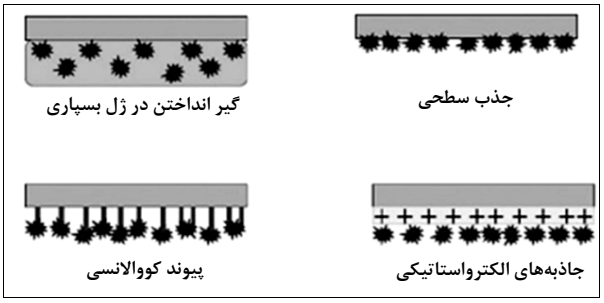
تاکنون روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی برای تثبیت عناصر زیستی ارائه شده است. لیکن تثبیت این مواد باید به گونه‌ای باشد که جایگاههای فعال آنها بلوکه نشود و تغییری در شکل هندسی آنها ایجاد نگردد. علاوه بر این باید ارتباط بین عنصر تشخیص‌دهندهٔ زیستی و سطح حساس مبدل برقرار باشد [۸].

از روش‌های معمول تثبیت آنزیم به‌عنوان یکی از متداول‌ترین عناصر تشخیص، می‌توان به گیر افتادن آنزیم در یک ماتریکس مثلا یک فیلم الکتروبسپارشی، اشاره کرد. روش دیگر، ایجاد پیوند کووالانسی

بین پروتئین و سطح مبدل است که در این روش پایداری عنصر تشخیص بسیار بالا خواهد بود. این اتصالات از طریق گروه‌های عاملی عنصر تشخیص مثل NH2, COOH, OH, SH که برای انجام واکنش زیست‌شناختی مورد نیاز نیستند، انجام می‌گیرد.

جذب سطحی روش دیگری است که اساس آن نیروی جاذبه بین عنصر تشخیص و سطح مبدل است و به‌منظور تثبیت عناصر تشخیص به کارگرفته می‌شود. طول عمر زیست‌حسگر حاصل از این روش بسیار محدود است. با این حال جذب سطحی، بسیار ساده است زیرا به هیچ واکنشگری نیاز ندارد و آنزیم کمتر دچار تخریب می‌شود. اتصال عناصر تشخیص زیست‌شناختی از طریق جاذبه‌های الکتروستاتیکی روش دیگری به‌منظور تثبیت این ترکیبات به شمار می‌رود. در این روش از طریق اعمال پتانسیل، بار مثبت یا منفی بر روی سطح مبدل القا می‌شود و به دنبال آن عنصر تشخیص زیست‌شناختی از طریق القای الکتریکی به سطح جذب می‌شود. شکل (۳) چهار نوع از متداول ترین روش‌های تثبیت عنصر حسگر زیست‌شناختی را نشان می‌دهد.

نانوساختارهای بسپارهای رسانا از جمله موادی هستند که به خاطر ویژگی‌هایی مانند رسانش الکتریکی، سازگاری با مواد زنده، پایداری محیطی، سطح تماس بالا، قابلیت استفاده به‌عنوان عامل تثبیت‌کنندهٔ عناصر تشخیص زیستی دارند.



شکل ۳- چند روش متداول تثبیت عناصر حسگر زیست‌شناختی [۸]

۴- ولتامتری چرخه‌ای

ولتامتری چرخه‌ای یک روش الکتروشیمیایی است که به‌منظور تشخیص حضور اجزای الکتروفعال اجرایی که توانایی تبادل الکترون در یک واکنش الکتروشیمیایی در محیط آبی را دارند- در یک محلول به کار گرفته می‌شود. از آن جایی که مبنای کار زیست‌حسگرهای مورد نظر ما بر وقوع یک واکنش الکتروشیمیایی استوار است، لذا تکنیک ولتامتری چرخه‌ای روش بسیار مناسبی برای تشخیص حضور آنالیت در محلول می‌باشد. بدین منظور مبدل زیست‌حسگر به‌عنوان الکترود کار در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش ۳ الکترود کار، کمکی و شاهد مورد استفاده قرار می‌گیرند. الکترود شاهد دارای پتانسیل ثابت در جریان‌های مختلف است. معمولاً از الکترود شاهد (نقره/ کلرید)، نقره استفاده می‌شود. الکترود کمکی معمولاً الکترود پلاتین معمولی است و الکترود کار شامل مبدل و روکش بسپاری حاوی عنصر تشخیص‌دهنده است.

پس از قراردادن این سه الکترود در محلول، به دو الکترود کار و شاهد پتانسیل، بین دو مقدار مشخص به‌صورت رفت و برگشت اعمال می‌شود و از دو الکترود کار و کمکی جریان‌های به‌دست آمده به ازای هر پتانسیل رسم می‌شود. در نتیجه، آن چه به‌دست می‌آید یک نمودار جریان بر حسب پتانسیل خواهد بود. در این نمودار هرگاه پتانسیل به مقداری برسد که یک گونهٔ الکتروفعال بتواند اکسید شود، جریان افزایش می‌یابد و یک پیک را در نمودار ولتامتری چرخه‌ای به‌دست می‌دهد.

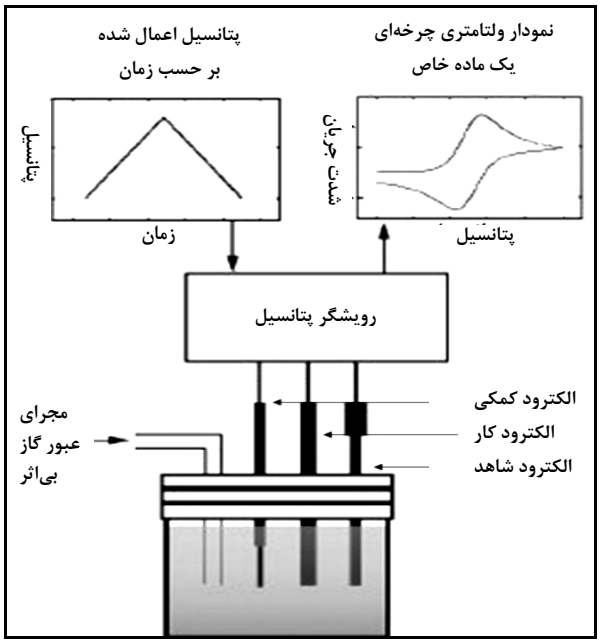
وقتی روبش پتانسیل در جهت عکس اعمال می‌شود، یعنی از میزان بالاتر به پایین‌تر، گونه‌های الکتروفعال که قابلیت احیا دارند، احیا شده و یک پیک را در جریان بوجود می‌آورند. از آن جایی که هر ماده ای پتانسیل (اکسایش-کاهش) ویژه خود را داراست، لذا تشخیص آنالیت از این طریق امکان‌پذیر است[۱۱]. در نتیجه روش ولتامتری چرخه‌ای به‌عنوان مهمترین آزمون عملکرد مبدل و ناحیه حسگر زیست‌حسگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. شکل (۴) نمایش اجمالی یک دستگاه ولتامتری چرخه ای، نحوهٔ اعمال پتانسیل و نمودار ولتامتری چرخه‌ای حاصل از آن را نشان می‌دهد.

۵- تشخیص گلوکوز

در زیست‌حسگرهای تشخیص گلوکوز واکنش‌های انجام شده بر روی زیست‌الکترود (الکترو کار) به شرح زیر است:

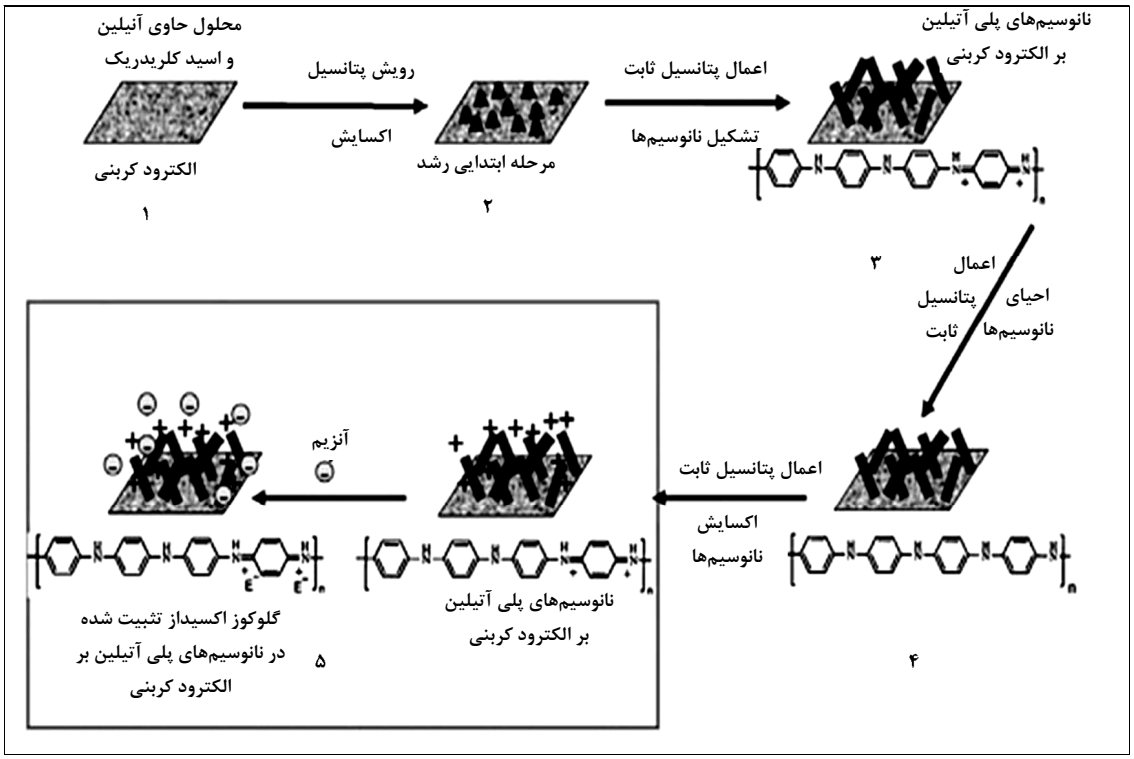
$$\text{گلوکوز} \xrightarrow{GOX} C_6H_{10}O_6 + H_2O_2 \qquad (۱)$$

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2^+ + O_2 + 2e^- \qquad (۲)$$



شکل ۴- طرح اجمالی یک دستگاه ولتامتری چرخه‌ای، نمودار پتانسیل زمان اعمال شده و نمودار ولتامتری چرخه‌ای اخذ شده [۱۱]

هورنگ و همکاران [۱۲]، در پژوهشی به بررسی زیست‌حسگر تشخیص دهندهٔ گلوکوز بر مبنای تثبیت گلوکوز اکسیداز در نانوسیم‌های پلی‌آنیلین پرداختند. در این روش ابتدا مونومرهای آنیلین در یک محصول حاوی اکسیدکنندهٔ آمونیم پروکسی دی‌سولفات بسپارش شده و به‌صورت فیلم بر روی یک الکترود کربن رسوب می‌کند. در مرحله‌ای که ذرات پلی‌آنیلین در حال رشد بودند بسپارش آنیلین با استفاده از اعمال پتانسیل ادامه پیدا می‌کند. سپس با اعمال جریان ثابت به الکترود کربنی، نانوسیم‌های پلی‌آنیلین بوجود می‌آیند. پس از آن این الکترود در یک محلول بافر فسفات (pH=۷/۲) قرار داده می‌شود و با اعمال پتانسیل ثابت، نانوسیم‌های پلی‌آنیلین احیاء می‌گردد. این عمل باعث پاک شدن آنیون ها از سطح پلی‌آنیلین شده و شرایط را برای جذب سطحی گلوکوز اکسیداز آماده می‌کند. سپس الکترود در یک محلول بافر فسفات حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر گلوکوز اکسیداز قرار داده می‌شود و با اعمال پتانسیل ۰/۲۵ ولت، بار مثبت بر روی نانوسیم‌های پلی‌آنیلین القا می‌گردد. این بار مثبت باعث جذب الکتروستاتیکی گلوکوز اکسیداز که حاصل بارهای سطحی منفی است، می‌گردد شکل (۵) طرح اجمالی فعالیت انجام شده را نشان می‌دهد.



شکل ۵- طرح اجمالی مطالعه هورنگ و همکاران[۱۲]

به‌منظور بررسی عملکرد الکترود تهیه شده، از روش ولتامتری چرخه‌ای استفاده شده است. الکترود تهیه شده در محلول‌های با و بدون گلوکوز مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ولتامتری حاصله نشان داد که در حالت تثبیت گلوکوز اکسیداز پیک‌های اکسیدی مربوطه ظاهر شده است، در حالی که درحالت بدون آنزیم پیک‌های اکسیدی ظاهر نشده اند (شکل (۶)). این مشاهده به‌منظور عملکرد درست زیست‌حسگر تهیه شده است.

شکل ۶- ولتامتری چرخه‌ای حاصل از مطالعه هورنگ و همکاران [۱۲]

در بررسی دیگری که توسط وانگ و همکاران [۱۳]، انجام شد از نانولوله‌های پلی‌آنیلین به‌منظور تثبیت گلوکوز اکسیداز استفاده شد. در این مطالعه غشاء آلومینیم اکسید آندی (AAO) با قطر بیرونی حفرات ۲۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر و قطر درونی حفرات ۱۰۰ نانومتر به‌منظور سنتز نانولوله‌های پلی‌آنیلین به کار گرفته شد.

ابتدا یک طرف آلومینیم اکسید آندی با پلاتین از طریق تبخیر در خلأ به ضخامت ۱۰ نانومتر پوشش داده شد. سپس به پلاتین یک سیم مسی به‌منظور انتقال جریان الکتریکی متصل شد. پس از عایق‌سازی سیم مسی و قسمت پشتی پلاتین به‌منظور جلوگیری از برخورد آن‌ها با محلول حاوی نمونه، الکترود تهیه‌شده در محلول ۰/۵ مولار اسید سولفوریک و ۰/۲ مولار مونومر آنیلین قرار داده شد. با اعمال پتانسیل روبشی، بسپارش آنیلین و ترسیب پلی‌آنیلین در حفرات آلومینیم اکسید آندی انجام شد و نانولوله‌های پلی‌آنیلین تهیه گردید.

به‌منظور تثبیت گلوکوز اکسیداز از ابتدا نانولوله‌های پلی‌آنیلین در محلول بافر فسفات با اعمال ولتاژ ۲۵۰ میلی ولت احیاء شد تا آنیون‌های اطراف نانولوله‌های پلی‌آنیلین حذف گردد. سپس به‌منظور جذب الکتروستاتیکی گلوکوزاکسیداز، نانولوله‌های پلی‌آنیلین این بار در محلول بافر فسفات حاوی ۷ میلی‌گرم بر لیتر گلوکوزاکسیداز، تحت پتانسیل ۷۵۰ میلی ولت اکسید شد. در طول اکسایش گلوکوزاکسیداز که حاوی بار منفی است در جدارهٔ داخلی نانولوله‌های پلی‌آنیلین جذب می‌شود و گیر می‌افتد. سپس به‌منظور حذف آنزیم‌هایی که به خوبی جذب جداره داخلی نانولوله‌ها نشده‌اند، الکترود به وسیلهٔ آب مقطر شستشو داده شد.

به‌منظور بررسی عملکرد الکترود تهیه شده از ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد.

۶- تشخیص کلسترول

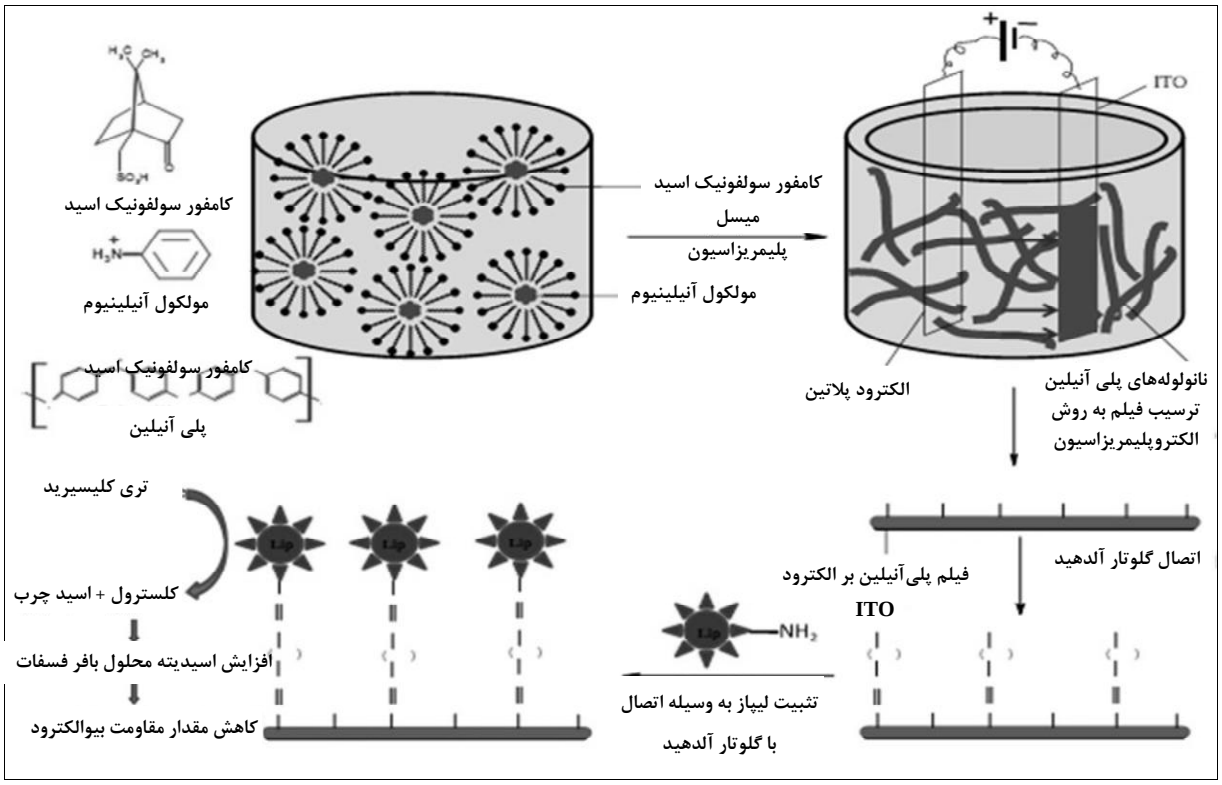
در زیست‌حسگرهای تشخیص کلسترول، واکنش‌هایی که بر روی زیست‌الکترود اتفاق می‌افتد به شرح زیر است:

$$\text{کلسترول} + O_2 \longrightarrow \text{Cholesterol-ten-30ne} + H_2O_2 \quad (۳)$$

$$H_2O_2 \longrightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^- \quad (۴)$$

دهند و همکاران[۱۴]، از نانولوله‌های پلی‌آنیلین به‌منظور تثبیت آنزیم لیپاز در زیست‌حسگر تشخیص کلسترول استفاده کردند. در این روش همان طور که در شکل (۷) می‌بینید ابتدا نانولوله‌های پلی‌آنیلین (PANI-NT) از طریق واکنش بسپارش شیمیایی تهیه شد. سپس این نانولوله‌ها به روش الکتروفورتیک به سطح الکترود (ایندیوم- قلع) اکسید به‌صورت فیلم ترسیب داده شد. پس از آن، الکترود تهیه شده در محلول حاوی گلوتار آلدهید (GLU) قرار داده شد. دلیل استفاده از گلوتار آلدهید این است که این ترکیب در دو سر انتهایی خود حاوی گروه کربونیل است. از یک انتهای خود می‌تواند با نیتروژن‌های فیلم پلی‌آنیلین روی سطح (ایندیوم- قلع اکسید)، پیوند تشکیل دهد و از انتهای دیگر به گروه‌های نیتروژن لیپاز متصل گردد. در نتیجه باعث تثبیت کووالانسی لیپاز بر سطح فیلم پلی‌آنیلین می‌شود. پس ازاتصال گلوتار آلدهید به سطح فیلم، الکترود، خشک شده وارد محلول لیپاز می‌گردد و پس از مدتی الکترود خشک می‌شود.

در این بررسی نیز معیار سنجش عملکرد الکترود تهیه شده ولتامتری چرخه‌ای بوده است. در این مطالعه، سه نوع الکترود، ((PANI-NT)/ITO) (الکترود پوشش داده شده با نانولوله‌های کربنی



شکل ۷- طرح اجمالی مطالعه دهند و همکاران [۱۴]

بدون گلوتار آلدهید و یا لیپاز)، (PANI/GLU/ITO) و ((LIP/GLU/PANI)-(NI/ITO)) در محیط‌های با و بدون کلسترول با یکدیگر مقایسه شدند. مشاهدهٔ پیک‌های مربوط به واکنش لیپاز و کلسترول موجود در ظرف نمونه برای الکترود و عدم مشاهدهٔ آنها در دو حالت دیگر دلیلی بر صحت عملکرد الکترود است.

در مطالعه‌ای مشابه، خان و همکارانش[۱۵]، اقدام به تهیه زیست‌حسگر تشخیص کلسترول بر پایهٔ فیلم پلی‌آنیلین پوشش داده شده بر روی الکترود (ایندیوم- قلع اکسید) به روش الکتروشیمیایی نموده‌اند.

در این مطالعه ابتدا پلی‌آنیلین به روش بسپارش الکتروشیمیایی بر روی الکترود (ایندیوم- قلع اکسید) پوشش داده شد و سپس تمام مراحل مطالعه دهند و همکاران تکرار شد.

در مطالعه‌ای دیگر سینگ و همکاران [۱۶]، به‌منظور تهیه زیست‌حسگر کلسترول از تثبیت همزمان کلسترول اکسیداز و کلسترول استراز بر روی فیلم پلی‌آنیلین بهره بردند. در این روش ابتدا پلی‌آنیلین از طریق بسپارش الکتروشیمیایی بر روی الکترود (ایندیوم- قلع اکسید) پوشش داده شد. سپس گلوتار آلدهید ۱٪ بر روی سطح فیلم پلی‌آنیلین پخش گردید و اجازه داده شد تا سطح الکترود خشک شود. سپس بر روی سطح خشک شدهٔ الکترود، کلسترول استراز پخش گردید و پس از خشک شدن، کلسترول اکسیداز پخش و خشک شد. سپس این مجموعه (آنزیمی- بسپاری) به‌منظور حذف اولیگومرها و آنزیم‌های تثبیت نشده، با آب مقطر شستشو داده شد. نتایج ولتامتری چرخه‌ای، حضور کلسترول و کلسترول اولئات را تأیید کرد.

۷- نتیجه‌گیری

تشخیص گلوکوز و کلسترول در آزمون‌های کنترل کیفی فرایندهای تولید مواد غذایی از اهمیت بسیاری برخوردار است. در حالی که روش‌های مورد استفاده برای آنالیز این ترکیبات باید سریع، دقیق، حساس و البته ارزان باشند، اما روش‌های رایج نیاز به مهارت کاربر دارد و زمان‌بر است. برای حل این مشکل می‌توان از دسته‌ای از حسگرهای شیمیایی به نام زیست‌حسگرها که عملکردی کاملاً اختصاصی در فرایندهای تشخیص زیستی دارند، استفاده کرد. زیست‌حسگرهای مبتنی بر بسپارهای رسانا مخصوصاً بسپارهای

آنیلینی به دلیل ویژگی‌های منحصربفرد مانند هدایت الکتریکی بالا، سطح تماس بالا و ساده بودن روش تهیه، به شدت مورد توجه محققین قرار گرفته است. عملکرد مناسب مشاهده شده از طرف این زیست‌حسگرها، آنها را به‌عنوان مهم‌ترین ابزارهای اندازه‌گیری به بازار معرفی کرده است.

مراجع

[1] Pal, P., Nandy, D., Misra, T. N., "Immobilization of alcohol dehydrogenase enzyme in a Langmuir-Blodgett film of stearic acid: its application as an ethanol sensor" Thin Solid Films, 239, 138-143 (1994).

[2] Stephens, S. K., Cullen, D. C., Warner, P. J., "Biosensors for novel rapid assay methods in the food industry" New Food, 1, 47-51 (1998).

[3] Stredansky, M., Pizzariello, A., Stredanska, A., Miertus, S., "Determination of D-fructose in foodstuffs by an improved amperometric biosensor based on a solid binding matrix" Anal. Commun, 36, 57-61 (1999).

[4] Maines, A., Shworth, D. A., Vadgaman, P., "Enzyme Electrodes for Food Analysis" Food. Technol. Biotechnol, 34, 31- 36 (1996).

[5] Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychoudhuri, U., Chakraborty, R., "Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples" Bioelectrochemistry, 70, 375-379 (2007).

[6] Shi, R., Stein, K., Schwedt, G., "Spectrophotometric determination of glucose in foods by flow injection analysis with an immobilized glucose oxidase reactor" Z Lebensm Unters Forish A, 204, 99-102 (1997).

[7] Nenkova, R., Ivanova, D., Valdimirova, j., Gadjevargova, T., "New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/ polyacrylonitrile nanocomposite film" Sensors and Actuators, 148, 59-65 (2010).

[8] Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., Heineman, W. R., "Electrochemical Biosensors" Chemical Society Reviews, 39, 1747–1763 (2010).

[9] Gerard, M., Chanbey, A., Malhotra, B. D., "Application of conducting polymers to biosensors" Biosensors and Bioelectrods, 17, 345-359 (2002).

[10] kumar, G., Sivashanmugam, A., Muniyandi, N., Dhawan, S., Trivedi, D., "Polyaniline as an electrode material for magnesium reserve battery" synthetic metals, 80, 279-282 (1996).

[11] Allen, B., Faulkner, L. R., Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications (2 ed), Wiley, ISBN 0471043729 (2000).

[12] Horng, Y. Y., Hsu, Y. K., Ganguly, A., C. C. Chen, L. C. Chen, K. H. Chen, "Direct-growth of polyaniline nanowires for enzyme-immobilization and glucose detection" Electrochemistry Communications, 11, 850-853 (2009).

[13] Wang, Z., Liu, S., Wu, P. R., Cai, C., "Detection of glucose based on direct electron transfer reaction of glucose oxidase immobilized on highly ordered polyaniline nanotubes" Analytical Chemistry, 81, 1638-1645 (2009).

[14] Dhand, C., Solanki, P. R., Sood, Datta, K. N., M., Malhorta, B. D., "Polyaniline nanotubes for impedimetric triglyceride detection" Electrochemistry Communications, 11, 1482-1486 (2009).

[15] Khan, R., Solanki, P. R., Kanshik, A., "Cholesterol biosensor based on electrochemically prepared polyaniline conducting polymer film in presence of a nonionic surfactant" J. Polymer Res, 16, 363-373 (2009).

[16] Singh, S., Solanki, P. R., Pandey, M. K., Malhorta, B. D., "Potentiometric studies in oxidation-reduction reactions: Reduction with ferrous ethylenediamine sulphate ceric sulphate method" Analytica Chemica Acta, 568, 126-132 (2006).