فصل ۱

مقدمه و تئوری

۱-۱- کلیات

نظر به اهمیت برخی از ترکیبات گوگرددار به عنوان ترکیبات بیولوژیکی نظیر داروها و اسیدهای آمینه، ارائه روش برای اندازه‌گیری ساده و آسان آنها از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. برخی از فنون شیمیایی و دستگاه‌ی نظیر اسپکتروسکوپی [۱]، کروماتوگرافی [۲]، عیارسنجی [۳] و غیره برای اندازه‌گیری ترکیبات گوگرددار گزارش شده است [۴] که بیشتر آنها نیاز به آماده‌سازی نمونه و مشتق سازی داشته و یا فاقد حساسیت کافی می باشند که استفاده از آنها را محدود می سازد [۵]. اما فنون الکتروشیمی تجزیه ای مزایایی نظیر سادگی و حساسیت کا فی دارند. از آنجا که اکسایش مستقیم ترکیبات گوگرددار در سطح الکترودهای جامد کند است و حداقل به پتانسیل V ۱/۰ نیاز دارد [۶,۷]. مطالعه واکنش های الکتروکاتالیتیکی این ترکیبات از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این راستا، از برخی واسطه‌گرهای انتقال الکترون نظیر کبالت فتالوسیانین[۱] [۸]، آبی پروس[۲] [۹]، روتنیم سیانید[۳] [۱۰]، هگزا سیانوفرات مس[۴] [۱۱]، مشتقات فنوتیازین[۵] [۱۲]، فروسن[۶] و مشتقات آن [۱۳] برای تشخیص ولتامتری و آمپرومتری برخی از ترکیبات گوگرددار استفاده شد. این واسطه‌گرها می‌توانند به محلول آزمایشی افزوده شد ه و یا به طریقی در سطح الکترود در قالب الکترودهای اصلاح شده شیمیایی[۷] تثبیت گردند.

دسته‌ای از کمپلکس های آلی-فلزی را که در آنها، یک یون فلزی بین دو حلق ه آروماتیک موازی با یکدیگر قرار دارد، کمپلکس های ساندویچی[۸] می‌نامند. یکی از کمپلکس های ساندویچی بسیار مهم، فروسن (FC) است که در آن، یک یون Fe^{2+} بین دو آنیون حلقه آروماتیکی سیکلوپنتادی انیل ($C_5H_5^-$) قرار گرفته و با آنها کمپلکس شده است . فروسن رفتار الکتروشیمیایی برگشت پذیر داشته و براثر اکسایش به یون فری-سرنیوم (FC^+) تبدیل می شود. فروسن و مشتقات آن به عنوان واسطه گرهای ردوکس برای الکتروکاتالیز

[1] Cobalt phthalocyanine
[2] Prussian blue
[3] Ruthenium cyanide
[4] Copper hexacyanoferrate
[5] Phenothiazine
[6] Ferrocene
[7] Chemical modified electrodes
[8] Sandwich complexes

اکسایش ترکیبات با فرایند الکترودی کند ، مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۴]. بسته به نوع استخلاف از نظر الکترون‌دهندگی یا الکترون‌کشندگی، پتانسیل نیمه موج[1] ($E_{1/2}$) مشتقات فروسن و در نتیجه توانایی آنها در الکتروکاتالیز اکسایش ترکیبات با هم متفاوت است [۱۵].

کینون‌ها از طرف دیگر، دسته‌ای از ترکیبات آلی با حلقه شش ضلعی سیر نشده هستند که دو اتم اکسیژن به صورت گروه کربنیل به آنها متصل بوده و این ترکیبات نقش مهمی در سیستم های بیولوژیکی دارند [۱۶,۱۷]. آنها به عنوان حامل های الکترون در فرایندهای فسفریل دار کردن اکسایشی که در غشای میتوکندری رخ می دهد، شرکت می کنند. جایی که در آن ، آدنوزین‌تری‌فسفات با انتقال الکترون از نیکوتینامید آدنین دی نوکلئوتید ،NADH[2] یا ۵،۱- دی هیدرو- فلاوین‌آدنین‌دی‌نوکلئوتید ،$FADH_2$[3] به اکسیژن مولکولی توسط کینون ها تشکیل می‌شود [۱۸]. از ترکیبات کینونی به عنوان رنگ، مواد نورتابنده[4] در عکاسی رنگی، الکتروفوتوگرافی، لیزرها، مواد فوتوکرومیک و کریستال های مایع نیز استفاده می شود [۱۹,۲۰]. از کینون ها هم چنین به عنوان واکنشگرهای ت جزیه‌ای [۲۱,۲۲] و کاتالیزور واکنش‌های کند [۲۳,۲۴] استفاده می‌شود. از طرف دیگر مشخص گردید ه است که وقتی کاتکول ها به طور الکتروشیمیایی اکسید شوند، ضمن تبدیل به فرم اورتوکینون وابسته، واکنش‌پذیری زیادی در مقابل هسته‌دوست‌های موجود در محلول نشان می دهند [۲۵]. بنابراین مطالعه الکتروشیمیایی کاتکول ها در حضور یک هسته دوست از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و بستر مطالعاتی برای اندازه‌گیری برخی از ترکیبات گوگرددار را فراهم می‌کند.

همچنین استفاده از نانو مواد و آنزیم ها به عنوان حدواسط در مبادله الکترون بین سطح الکترود و گونه شیمیایی الکتروفعال با رفتار سینتیکی کند به علت دارا بودن خواص بی نظیری که به طور مختصر در زیر بیان می گردند، علاقه بسیاری از الکتروشیمیدانها را به خود جلب کرده است.

[1] Half- wave potential
[2] Nicotinamide adenine dinucleotide
[3] 1,5-Dihydro-flavin adenine dinucleotide
[4] Luminophore

۱-۲- نانو مواد

خواص ساختاری و الکترونیکی بی‌نظیر نانوذرات و نانولوله‌های کربنی چشم‌انداز عالی را برای کاربرد آنها در تشخیص برخی از ترکیبات بیولوژیکی نمایان ساخته است . یکی از کاربردهای جذاب نانوذرات و نانولوله‌های کربنی، تسهیل واکنش های انتقال الکترون در مولکول‌های زیستی نظیر سیتوکروم C[1] [۲۶]، نیکوتین آمید آدنین‌دی‌نوکلئوتید [۲۷]، هیدروژن پراکسایید[2] [۲۸,۲۹]، دوپامین[3] [۳۰]، اپی‌نفرین[4] [۳۱] و اسید اسکوربیک[5] [۳۲] است. به همین دلیل به عنوان یک واسطه گر در ساخت حسگرها و زیست حسگرها استفاده می‌شود.

ذرات در مقیاس نانو در فعالیت کاتالیتیکی نقش مهمی دارند، مخصوصاً هنگامی که اندازه آنها زیر ۳-۴ nm باشد [۳۳,۳۴]. در حقیقت فعالیت نانوذرات را می‌توان با اندازه آنها کنترل کرد. در مقیاس نانو، انتشار به سطح از نوع کروی است و دانسیته جریان را در مقایسه با حالت مسطح به شدت افزایش می‌دهد. چنین دانسیته جریانی تضمین می کند که حتی در پتانسیل های مازاد کافی، محدودیت انتشار وجود ندارد. بنابراین می‌توان واکنش‌های بین سطحی سریعی را در دامنه پتانسیل وسیعی انتظار داشت [۳۵].

۱-۲-۱- نانولوله‌های کربنی

نانولوله‌های کربنی نتیجه نوآرایی کربن sp^2 در صفحه گرافیت بوده و که برای تشکیل لوله خالی یکنواخت، به صورت استوانه‌ای در آمده‌اند. لوله‌ها می‌توانند در انتها توسط نیم کره نوع فلورن بسته شوند و طول‌هایی در محدوده ده‌ها نانومتر تا چند میکرون داشته باشند . نانولوله‌ها به دو دسته تک دیواره و چند دیواره تقسیم می‌شوند. نانولوله‌های تک دیواره شامل یک لوله تک حفره با قطر ۰/۴-۲/۰ nm است درحالی که نانولوله‌های چند دیواره، لوله‌هایی متحدالمرکز با قطر ۲-۱۰۰ nm هستند [۳۶]. هدایت لوله‌ها و خواص

[1] Cytochrome C
[2] Hydrogen peroxide
[3] Dopamine
[4] Epinephrine
[5] Ascorbic acid

الکترونیکی آنها نقش مهمی در الکتروشیمی دارد . نانولوله‌های چند دیواره به عنوان هادی فلزی طبقه بندی می‌شوند که خواص جالبی برای الکترود دارند. برای نانولوله‌های تک دیواره تصویر واضح ریوده و بسته به قطر و کایرالیتی، می‌توانند نیم‌هادی یا هادی فلزی باشند [۳۸-۳۷].

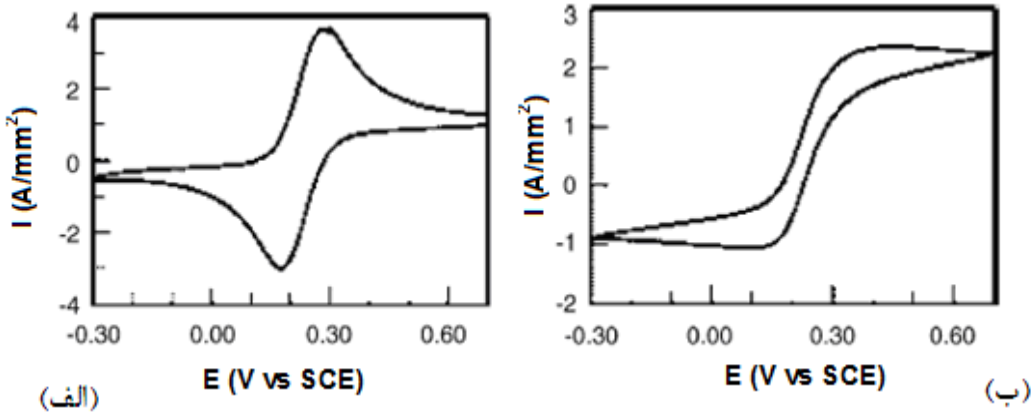
خواص الکترونیکی و هدایتی نانولوله ها می تواند توسط ذرات کاتالی‌زوری و دو پ کردن تحت تاثیر قرار گرفته و که این نوع اصلاح نانولوله‌های کربنی قبل از تثبیت آنها بر روی سطح الکترود صورت می گیرد. روش ساخت و اصلاح نانولوله‌های کربنی نقش قابل ملاحظه‌ای در اجرای واکنش های الکتروشیمیایی در سطح الکترودهای اصلاح شده دارد. در بیشتر حالت‌ها، نانولوله‌های کربنی در اسیدهای معدنی نظیر نیتریک اسید یا سولفوریک اسید خالص‌سازی می‌شوند. محیط اسیدی موجب فعال شدن کلاهک‌ها و باز شدن انتهای لوله‌ها می گردد. لوله‌ای با دهانه باز ، شامل پیوندهای آویزان[1] [۳۹] در حلال‌های آلی است که با گروه‌های عاملی اکسیژن دار ترکیباتی مثل کینون ها و کربوکسیلیک اسیدها پیوند شیمیایی می‌دهند [۴۲-۴۰]. نانولوله‌ها در محلول‌های قطبی و آبی تمایل به لخته شدن دارند که اسیدی کردن محیط، زمان پراکنده شدن را زیاد می‌کند. در نتیجه پراکنده شدن آنها معمولاً در حلال‌های غیرقطبی مثل دی‌متیل‌فرمامید [۴۳,۴۴] یا به کمک سورفکتانت ها و پلیمرها [۴۵] انجام می‌شود. مشکل پراکنده شدن در محلول‌های آبی، به عنوان مزیت در ساخت الکترودهای اصلاح شده با نانولوله های کربنی قلمداد گردیده و تاکنون هیچ گزارشی بر تخریب الکترود به علت از بین رفتن نانولوله‌های کربنی موجود در آنها وجود ندارد [۴۶].

عامل‌دار کردن سطح نانولوله‌های کربنی، سازگاری آنها را نسبت به زیست مولکول‌ها بهبود می‌بخشد [۴۷]. عامل‌دار کردن نانولوله های کربنی به دو صورت غیر کووالانسی یا جذب و کووالانسی انجام می شود [۴۸]. از طرف دیگر، نانولوله‌های کربنی حجم درونی بزرگی داشته و می‌توانند با هر گونه شیمیایی یا زیست مولکول‌ها از پروتئین ها تا مولکول های کوچک، پر شوند. بنابراین توسعه روش های شیمیایی و موثر برای عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی از اهمیت اساسی و صنعتی برخوردار است [۴۹].

[1] Hanging bindings

سرعت انتقال الکترون در الکترودهای اصلاح شد ه با نانولوله های کربنی، مستقل از سطح افزایش می‌یابد. بویژه اگر گروه های عاملی خاص روی سطح الکترود باشد . در نانولوله‌های کربنی دو ناحیه مشخص (دیواره‌ها و انتها) برای انتقال الکترون وجود دارد که میزان جدایی پتانسیل دماغه های آندی و کاتدی فرایندهای الکترودی در سطح این نوع الکترودهای اصلاح شده، کاهش می‌یابد [۵۰]. هم‌چنین میزان جدایی پتانسیل دماغه های مربوط به ترکیبات الکتروفعال در سطح الکترودهای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی کوتاه، به دلیل تناسب زیاد بین انتهای اکسیژن دار و دیواره‌های کربنی sp^2 آن، کم می‌باشد [۵۱].

ولتاموگرام‌های چرخه‌ای در مطالعه رفتار الکتروشیمیایی ترکیبات الکتروفعال در سطح الکترودهای اصلاح شده با نانولوله های کربنی، دماغه ای شکل است [۵۲] که نتیجه دانسیته زیاد نانولوله های کربنی است. در اغلب موارد، دانسیته برای همپوشانی لایه های انتشار، به اندازه کافی بالا است، به طوری که موجب ایجاد لایه انتشار کلی خطی می گردد (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای محلولی از فری سیانید با غلظت ۱/۰ mM در بافر فسفات ۰/۱ M (pH=۷/۰) دارای ۱/۰ M KCl در سطح الکترودهای اصلاح شده با نانولوله های کربنی با دانسیته (الف) بالا ($۲ \times ۱۰^{۹}/cm^2$) و (ب) پایین ($۷ \times ۱۰^{۷}/cm^2$)[۵۲].

۱-۲-۲- نانوذرات فلزی

خواص الکتریکی بی‌نظیر نانو مواد فلزی مثل نانوذرات[1] (NPs)، نانولایه‌ها[2] (NSs) و نانولوله‌ها، توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است [۵۳]. این خواص بی نظیر تابعی از اندازه و ترکیب نانو مواد، محیط دی‌الکتریک و فضای هندسی است که امکان توسعه تکنولوژی زیستی را فراهم می کند [۵۵-۵۴]. نانوذرات فلزی به علت داشتن نسبت سطح به حجم بزرگ ، به عنوان کاتالیست استفاده می شوند [۵۶,۵۷]. اتم‌های سطح با کاهش اندازه ذرات فلزی به مقیاس نانو ، فعال می‌شوند، ولی مکانیسم دقیق عمل آنها به عنوان کاتالیست مشخص نیست [۵۸,۵۹]. نانوذرات کاربردهای الکتروشیمیایی زیادی دارند . آنها هدایت را افزایش داده و انتقال الکترون را تسهیل می کنند. بنابراین انتخابگری و حساسیت روش ها را بهبود می - بخشند. اندازه کوچک نانوذرات این امکان را فراهم می آورد تا برای اصلاح زیست حسگرهای متفاوت در انتقال مستقیم الکترون[3] (DET) برخی از پروتئین ها نظیر هموگلوبین [4] [۶۰]، میوگلوبین [5] [۶۱]، گلوکز اکسیداز[6] [۶۲] و پر اکسیدازها [۶۳,۶۴] استفاده گردد.

۱-۳- آنزیم‌ها

آنزیم‌ها، پروتئین‌هایی هستند که واکنش های شیمیایی را با بازده و انتخابگری بالا کاتالیز می‌کنند. آنزیم‌ها انرژی فعال‌سازی واکنش‌ها را پایین می‌آورند. آنها حدواسط‌هایی تولید می‌کنند و یا مکانیسمی ایجاد می‌کنند که از واکنش غیرکاتالیزی متفاوت است [۶۵]. هر آنزیم، واکنش ویژه ای را کاتالیز می کند و انتخابگری آنزیم به محل فعال آن بستگی دارد که یک ناحیه سه بعدی است و حاوی محل های کاتالیستی و پیوندی است. آنزیم‌ها بسته به نوع واکنشی که کاتالیز می‌کنند، کدبندی شده و به دسته‌های متفاوت طبقه-بندی می‌شوند [۶۶].

---

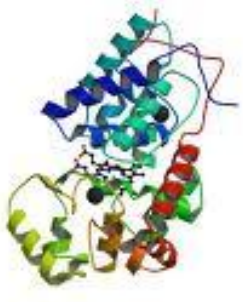
[1] Nanoparticles
[2] Nanoshelfs
[3] Direct electron transfer
[4] Hemoglobin
[5] Myoglobin
[6] Glucose oxidase

۱-۳-۱- آنزیم‌های همی

هم یک پورفیرین آهن است که آهن آن با چهار نیتروژن حلقه پورفیرین‌ی کئوردینه می شود. دو محل کئوردینه دیگر در بیشتر پورفیرین ها، با آب یا اکسیژن پر می شود [۶۷]. پروتئین های هم به طور وسیع در طبیعت یافت می شوند و پروتئین های هم غیر آنزیمی ، در تنفس به عنوان حامل اکسیژن (هموگلوبین) و در ذخیره اکسیژن (میوگلوبین) یا به عنوان پروتئین های انتقال الکترون در زنجیره تنفس و فتوسنتز شرکت می کنند [۶۸].

۱-۳-۲- پراکسیدازها و هموگلوبین

پراکسیدازها آنزیم های مهم در بیوشیمی تجزیه ای می باشند که در گیاهان، بافت های حیوانی، باکتری‌ها و قارچ‌ها یافت می شوند [۶۹]. یکی از مهمترین پر اکسیداز مورد مطالعه، پراکسیدآز ترب کوهی[1] (HRP)، (شکل ۱-۲) است که در منظم‌سازی رشد سلول، اکسایش متابولیتها و مکانیسم های دفاعی نقش مهمی دارد. همچنین HRP به طور معمول در زیست‌حسگرها و به عنوان برچسب آنزیمی در ایمنی شناسی به کار می‌رود [۷۰]. HRP با وزن مولی حدود ۴۲۰۰۰ و قطر حدود ۵ nm، آنزیمی است که دارای گروه هم، به عنوان مرکز فعال است [۷۱]. الکترودهای اصلاح شده با HRP می‌توانند برای تشخیص آمپرومتری سوبستراهای اکسید کننده (هیدروژن پراکسایید، هیدروپراکسایدهای آلی) و احیا کننده (فنل ها، آمین های آروماتیک) استفاده شوند [۷۲].



شکل ۱-۲- آنزیم پراکسیدآز ترب کوهی

[1] Horseradish peroxidase

هموگلوبین (Hb)، یک پروتئین مهم در گلبولهای قرمز می باشد که در تنفس نقش مهمی دارد و دارای وزن مولکولی حدود ۶۴۵۰۰ تا ۶۷۰۰۰ است. هموگلوبین از ۴ پلی پپتید (۲ تا α و ۲ تا β) تشکیل شده که هر کدام یک گروه هم آهن دارند [۷۳,۷۴]. اگر چه هموگلوبین نقش حامل الکترون در سیستم‌های بیولوژیکی را ندارد ، بلکه دارای فعالیت کاتالیتیکی است [۷۵]. همچنین هموگلوبین به علت در دسترس بودن و دارا بودن ساختار مشخص، مولکول مناسبی برای مطالعه انتقال مستقیم الکترون در واکنش های آنزیمی می‌باشد [۷۶,۷۷].

۱-۳-۳- تثبیت آنزیم

روش‌های متفاوتی برای تثبیت آنزیم‌ها وجود دارد که در زیر به طور مختصر بیان می گردند. تثبیت آنزیم باید طوری انجام شود تا فعالیت زیست مولکول ها حفظ شود، محل فعال در دسترس باشد و انتقال جرم واکنشگرها و محصولات در لایه تثبیت شده به راحتی صورت گیرد[۷۸].

۱-۳-۳-۱- جذب فیزیکی

جذب فیزیکی آسان ترین راه برای تثبیت آنزیم ها بر روی سطح الکترودها می باشد [۷۹,۸۰] که آنزیم‌ها در اثر نیروهای پیوندی یونی، قطبی، آب گریز، واندروالس و برهم کنش‌های $\pi-\pi$ بر روی الکترود قرار می‌گیرند. اگر محلول آنزیم رقیق باشد، به صورت تک لایه روی سطح قرار می گیرند [۸۱]. مزیت روش جذب فیزیکی این است که نیاز به هیچ معرفی ندارد . عیب روش جذب این است که ساختار آنزیم تغییر کرده و آنزیم خنثی می‌شود. در نتیجه فعالیت آن از دست می‌رود. تغییرات pH، دما و قدرت یونی می تواند منجر به واجذب آنزیم شود [۸۲].

۱-۳-۳-۲- به دام انداختن فیزیکی

آنزیم با به دام انداختن فیز یکی در شبکه پلیمری یا غشای نیم ه تواوا می‌تواند روی سطح الکترود تثبیت شود [۸۳]. مزیت فیلم‌های پلیمری این است که الکترود را از آلودگی و مزاحمت ها محافظت کرده و محدوده خطی غلظتی را گسترش می دهد. عیب به دام انداختن آنزیم در بافت پلیمری این است که سد انتشار افزایش یافته و خطر نشت آنزیم یا اصلاحگر افزایش می‌یابد.

۱-۳-۳-۳- اتصال کووالانسی

پیوند کووالانسی اتصال قویتری نسبت به جذب ایجاد می کند [۸۴]. گروه‌های آمینی، گوگردی، کربوکسیل و هیدروکسید موجود بر روی بستر الکترود می توانند با معرف مناسب تحت واکنش کربودی-ایمیدی[1] قرار گیرند [۸۵]. این گروه‌های عاملی فعالیت آنزیم را تحت تاثیر قرار نمی‌دهند [۸۶].

۱-۳-۳-۴- اتصالات عرضی

اتصالات عرضی بین مولکولی می تواند با استفاده از معرف های دارای دو گروه عاملی (نظیر: دی آلدئیدها، دی ایزوتیوسیاناتها و ...) تشکیل شود [۸۷]. اتصالات عرضی اغلب به همراه روش جذب، به دام انداختن فیزیکی یا اتصال کووالانسی برای تثبیت آنزیم در زیست حسگرها به کارگرفته می‌شود.

۱-۳-۳-۵- تک لایه‌های خودانباشته[2] (SAMs)

یک راه برای تثبیت جهت‌دار مولکول‌های ردوکس به عنوان اصلاحگر در سطح الکترودها، تک لایه-های خودانباشته است. SAM می‌تواند فاصله بین سطح الکترود و محل تثبیت آنزیم را کنترل کند . SAMs

[1] Carbodiimide
[2] Self-assembled monolayers

می‌توانند همزمان گروه های عاملی مناسبی را برای اتصال کووالانسی پروتئین های ردوکس یا اصلاحگرها با استفاده از واکنش کربودی ایمیدی ایجاد کنند [۸۸].

۱-۴- ترکیبات بیولوژیکی گوگرددار و هیدروژن پراکسایید

پنی‌سیلامین (۲-آمینو-۳-مرکاپتو-۳-متیل بوتانوئیک اسید) یک آمینو اسید گوگرددار غیر فیزیولوژیکی است و به دو شکل انانتیومری L و D وجود دارد. همچنین D- پنی‌سیلامین (ایزومر S) از متابولیت‌های پنی‌سیلین بوده که به عنوان دارو برای درمان بیماری های مختلف نظیر: روماتیسم، نارسائیهای کبدی و پوستی، مسمومیت در اثر فلزات سنگین و بیماری ویلسون به کار می‌رود [۸۹,۹۰].

برای اندازه گیری پنی سیلامین از روش های مختلفی نظیر کروماتوگرافی [۹۱]، نورتابی شیمیایی [1] [۹۲]، فلوریمتری [۹۳,۹۴]، الکتروفورز [۹۵,۹۶] و طیف بینی تشدید مغناطیسی هسته ای NMR [2] [۹۷] استفاده شده است. علاوه بر روش‌های ذکر شده می‌توان به روش‌های الکتروشیمیایی [۹۸] نیز اشاره کرد که برای اندازه‌گیری پنی‌سیلامین ها مناسب می‌باشند، زیرا روشهای ارزان قیمت، ساده، سریع و حساس هستند.

همچنین L- سیستئین (۲،۱-آمینو-۳- مرکاپتو پروپیونیک اسید) و گلوتاتیون (γ- گلوتامیل سیستیئیل گلایسین) از ترکیبات بیولوژیکی بسیار مهم دیگر آمینواسیدهای گوگرددار هستند [۹۹,۱۰۰] که به طور گسترده ایی در صنایع غذایی به عنوان آنتی‌اکسیدان و در صنایع دارویی به کار می‌روند [۱۰۱]. گروه سولفیدریلی (-SH) این آمینواسیدها، نقش کلیدی در فعالیت بیولوژیکی پروتئین ها و آنزیم ها ایفا کرده و [۱۰۲,۱۰۳] در غذاهایی با مقدار پروتئین بالا نظیر ماست، گوشت خوک ، سیر، پنیر، سوسیس و کالباس یافت می‌شوند. این آمینواسیدها، از مغز و کلیه در برابر خطرت ناشی از مصرف الکل محافظت کرده و برای معالجه پوست هم استفاده می‌شوند [۱۰۶-۱۰۴] و خطرات ناشی از سرطان را کاهش می‌دهند [۱۰۷].

سیستامین (β- مرکاپتو-اتیل آمین) یک آمینوتیول احیا کننده است که به صورت دارو استفاده می‌شود [۱۰۸]. اگر چه مکانیسم دقیق عمل سیستام ین روشن و مشخص نیست، ولی در یادگیری، تقویت

[1] Chemiluminescence
[2] Nuclear magnetic resonance

حافظه و منظم‌سازی ژن‌ها نقش مهمی دارد [۱۰۹]. روش های تجزیه‌ای متفاوتی نظیر کروماتوگرافی تعویض یون [۱۱۰]، الکتروفورز [۱۱۱] و کروماتوگرافی گازی [۱۱۲] برای تعیین سیستامین وجود دارد.

N- استیل -*L*- سیستئین، مشتق استیله شده آمینواسید *L*- سیستئین است که معمولاً به عنوان دارو استفاده می‌شود. این دارو در درمان سیندروم، آنفولانزا، هپاتیت و صرع نقش مهمی دارد. این آمینواسید به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی قوی در درمان سرطان [۱۱۳]، بیماری‌های قلبی و تنفسی [۱۱۴]، عفونت ویروسی [۱۱۵]، بی‌نظمی‌های عصبی [۱۱۶] و بیماری‌های دیگر استفاده می‌شود.

هیدروژن پراکسایید یکی از ترکیبات اکسیژن دار می باشد که نقش مهمی در فرایندهای اتمسفری و بیوشیمی دارد و به عنوان موثرترین اکسیدان برای تبدیل سولفور دی اکسید به سولفوریک اسید در نظر گرفته می شود [۱۱۷]. بنابراین، تعیین هیدروژن پراکسایید به منظور محافظت از محیط و مطالعه واکنش های بیوشیمیایی و فتوشیمیایی مهم است [۱۱۸]. روش های متعددی برای تعیین هیدروژن پراکسایید نظیر طیف بینی [۱۱۹]، فلوریمتری [۱۲۰]، آمپرومتری [۱۲۱] و نورتابی شیمیایی [۱۲۲] گزارش شده است. روش سیستم های جاری با استفاده از واکنشگرهای آنزیمی [۱۲۳]، عموما به علت سادگی، برای اندازه گیری هیدروژن پراکسایید به کار گرفته می شود.

۱-۵- مروری بر پژوهش‌های انجام شده توسط محققین

از آنجایی که در این پروژه ، به اندازه‌گیری برخی از ترکیبات بیولوژیکی از جمله ترکیبات گوگرددار در سطح الکترودهای اصلاح شده پرداخته می شود، در ابتدا بطور مختصر به کارهای تحقیقاتی انجام شده توسط سایر محققین در این زمینه اشاره می‌شود.

اکسایش الکتروشیمیایی ارتو یا پارا دی هیدروکسی بنزن ها منجر به ایجاد ترکیبات ا رتو یا پاراکینون‌های مربوطه بسیار فعال می شود که می توانند به راحتی در واکنش های شیمیایی موخر نظیر هیدروکسیله شدن، دیمر شدن و یا پلیمر شدن شرکت کنند [۱۲۴-۱۲۶]. در فرآیند اکسایش الکتروشیمیایی این ترکیبات در محیط‌های آبی با pH پایین دو الکترون و دو پروتون شرکت می‌کنند [۱۲۹-

۱۲۷]. کینون‌های ایجاد شده به طور الکتروشیمیایی ، واکنش‌پذیری قابل توجهی دارند. از این رو در صورت وجود هسته‌دوست در محلول ، تحت واکنش افزایشی ۴،۱ یا مایکل قرار گرفته و منجر به سن تز برخی از مشتقات جدید کینونی می شوند [۱۳۰].

شاهرخیان و همکاران، از ترکیبات ۳- مرکاپتو-۴،۲،۱- تری آزول [۱۳۱] و ۲- تیو اوراسیل [۱۳۲] به عنوان هسته دوست برای حمله به اورتوکی‌نون حاصل از اکسایش کاتکول استفاده نمودند . آنها همچنین براساس واکنش ترکیبات گوگرددار نظیر پنی‌سیلامین و سیستئین با اورتوکینون مربوطه، روشی برای اندازه-گیری این ترکیبات پیشنهاد نمودند [۱۳۳].

توریرو[1] و همکاران، اکسایش الکتروشیمیایی ۴- ترشیو بوتیل کاتکول را در حضور هسته‌دوست‌هایی نظیر پنی سیلامین و کافئیک اسید در سطح الکترودهای کربن شیشه ای واجد آنزیم تیروزیناز[2]، با تبیین مکانیسم الکترودی مطالعه نمودند و از شدت جریان الکترواکسایش ی ایجاد شده به عنوان علامت تجزیه ای برای اندازه‌گیری آمپرومتری پنی‌سیلامین استفاده کردند [۱۳۴].

کامپتون[3] و همکاران ، رفتار الکتروشیمیایی کاتکول را در حضور سیستئین، گلوتاتیون و هموسیستئین مطالعه و بررسی کرده‌اند و نشان دادند که کاتکول‌ها در واکنش افزایش مایکل با این ترکیبات شرکت کرده و منجر به افزایش جریان شدند. از افزایش جریان برای اندازه گیری این ترکیبات استفاده شد [۱۳۵].

رئوف و همکاران، اکسایش الکتروشیمیایی ترکیبات بیولوژیکی گوگرددار نظیر سیستئین، گلوتاتیون و پنی‌سیلامین را در سطح الکترودهای خمیر کربن اصلاح شده با فروسن و بعضی از مشتقات آن مطالعه نمودند [۱۳۶,۱۳۷]. آنها موفق شدند با بکارگیری برخی از نانومواد برروی بستر الکترودی، اندازه گیری م-م زمان چند نمونه بیولوژیکی را مورد بررسی و مطالعه قرار دهند [۱۳۸].

[1] Torriero
[2] Tyrosinase
[3] Campton

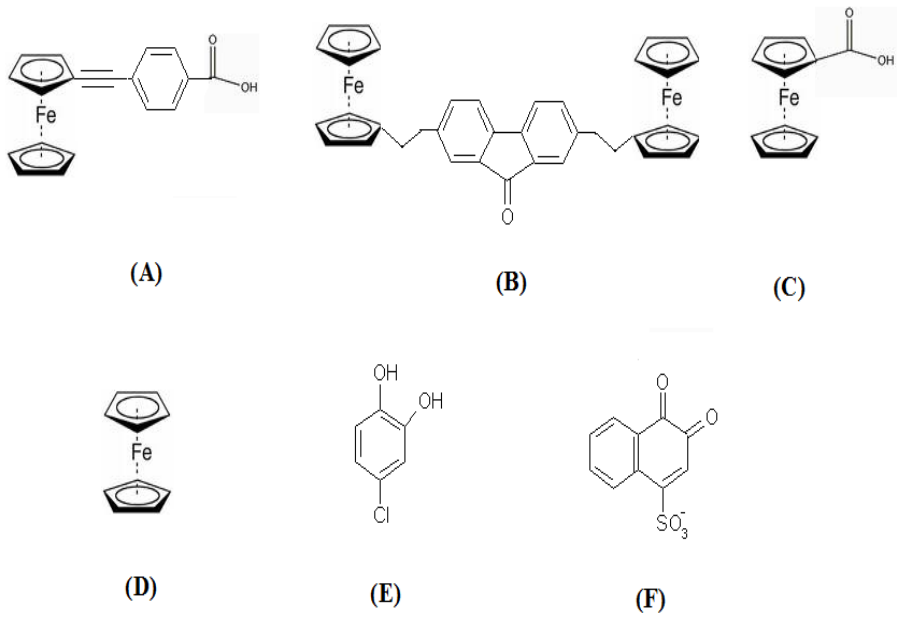
از اینرو در این پژوهه تحقیقاتی، با توجه به اهمیت ترکیبات بیولوژیکی گوگرددار مورد نظر و هیدروژن پراکساید، رفتار الکتروشیمیایی فروسن و مشتقات آن ، ۴-کلروکاتکول، ۱و۲-نفتوکینون ۴-سولفونیک اسید، پراکسیدآز ترب کوهی و هموگلوبین در حضور هسته دوست های گوگردی نظیر : *D*- پنی-سیلامین، *L* - سیستئین، گلوتاتیون، سیستامین و *N*- استیل -*L*- سیستئین و هیدروژن پراکساید در سطح الکترودهای خمیر کربن، کربن شیشه ای، طلا و چاپی کربن مطالعه و به تبیین مکانیسم فرایند الکترودی پرداخته می شود. برای انجام مطالعات از روش های ولتامتری چرخه ای ، ولتامتری پالس تفاضلی و کرونوآمپرومتری با پله پتانسیل دوگانه استفاده می گردد. در خاتمه اندازه گیری ترکیبات گوگردی و هیدروژن پراکساید به روش های ولتامتری چرخه ای، ولتامتری پالس تفاضلی و آمپرومتری مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

فصل ۲

بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی

اصلاحگره‌ای مورد استفاده در تهیه الکترودهای اصلاح شده عبارتند از : ۱-[۴- (فروسنیل اتینیل) فنیل]- ۱-اتانون (A)، ۲و۷-بیس (فروسنیل اتیل)-فلورن-۹-ان (B)، فروسن کربوکسیلیک اسید (C)، فروسن (D)، ۴-کلروکاتکول (E) و ۱و۲-نفتوکینون ۴-سولفونیک اسید (F) هستند که ساختمان آنها در شکل ۲-۱، ارائه گردیده است. لازم به ذکر است که ترکیبات (A) و (B) توسط دکتر حسین زاده در آزمایشگاه آلی تهیه شده‌اند [۱۳۹]. نام، درصد خلوص و شرکت سازنده سایر مواد شیمیایی استفاده شده در این کار تحقیقاتی در جدول ۲-۱، ارائه شده است:



شکل ۲-۱- فرمول ساختمانی اصلاحگرهای مورد استفاده

جدول ۲-۱- مشخصات مواد شیمیایی استفاده شده در این کار تحقیقاتی

ردیف	ترکیب شیمیایی	درصد خلوص	شرکت سازنده
۱	فروسن کربوکسیلیک اسید	≥ ۹۷	فلوکا
۲	فروسن	> ۹۷	فلوکا
۳	کاتکول	> ۹۷	فلوکا
۴	۴-کلروکلتکول	> ۹۷	فلوکا
۵	۲،۱-نفتوکینون-۴-سولفونیک اسید	> ۹۷	فلوکا
۶	*L*-سیستئین	> ۹۹	فلوکا
۷	گلوتاتیون	> ۹۹	مرک
۸	*D*- پنی‌سیلامین	> ۹۹	فلوکا
۹	سیستامین	> ۹۸	فلوکا
۱۰	*N*-استیل-*L*- سیستئین	> ۹۹	فلوکا
۱۱	هیدروژن پراکسایید	۳۰	مرک
۱۲	پروکسیدآز ترب کوهی	> ۹۹	بهرینگ مانهیم
۱۳	پیروگالول	> ۹۹	مرک
۱۴	دوپامین هیدروکلراید	> ۹۹	مرک
۱۵	اکتوپامین	> ۹۹	مرک
۱۶	۴،۳-دی هیدروکسی-*L*-فنیل امین	> ۹۹	مرک
۱۷	نانولوله‌های کربنی	> ۸۰	پژوهشگاه شرکت نفت ایران

۱۸	پیریدین ۲، ۶-دی کربوکسیلیک اسید	> ۹۹	فلوکا
۱۹	پودر آلومینا	۸۰	مرک
۲۰	فسفریک اسید	۸۵	فلوکا
۲۱	سدیم دی هیدروژن فسفات دی هیدرات	۹۹	فلوکا
۲۲	دی سدیم هیدروژن فسفات دی هیدرات	۹۷	مرک
۲۳	سدیم فسفات	۹۷/۵	مرک
۲۴	پتاسیم فروسیانید	> ۹۹	مرک
۲۵	پتاسیم فری سیانید	> ۹۹	مرک
۲۶	پتاسیم کلرید	> ۹۹	فلوکا

۲-۲- وسایل و تجهیزات

جهت انجام واکنش‌های الکتروشیمیایی و ثبت داده‌های مربوط به آنها از تجهیزات زیر استفاده شد:

الف) از دستگاه پتانسیواستا- گالوانواستای Autolab ساخت شرکت متروهم از کشور هلند، مجهز به نرم‌افزار GPES و Fra جهت ثبت ولتاموگرام های چرخه‌ای، پالس تفاضلی، کرونوآمپرومتر ی و طیف بینی امپدانس الکترونی استفاده گردید.

ب) دستگاه pH متر Ion Analyzer 250 Corning، ساخت کشور انگلستان جهت اندازه گیری pH محلول‌های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت.

ج) جهت تمیز کردن سطح الکترود کار پس از انجام پولیش الکترود با پودر آلوم ینای با قطر ذرات ۰/۰۵ μm از حمام فراصوت Dawe ساخت کشور انگلستان استفاده گردید.

د) از پتانسیواستا مدل Zeta ساخت کشور سوئد ، برای ثبت جریان آمپرومتری در سیستم های جاری[1] استفاده گردید.

ه) از سیستم های جاری حاوی پمپ مدل Gilson mini pulse 3، ساخت کشور فرانسه و دریچه تزریق ۵۰ µL مدل Rheodyne، ساخت امریکا جهت اندازه‌گیری‌های آمپرومتری استفاده گردید.

۲-۳- تهیه محلول‌ها

۲-۳-۱- بافرهای مورد استفاده برای تثبیت pH

از محلول‌های بافر فسفات با غلظت کل ۰/۱ M که دارای پتاسیم کلرید ۰/۱ M به عنوان الکترولیت حامل بودند، برای تثبیت pH محلول‌های آزمایشی در محدوده pH: ۲/۰۰ تا ۱۲/۰۰ استفاده شد. برای محدوده‌های pH مختلف از محلول‌های زیر استفاده گردید:

- برای محدوده ۴/۰۰ ≤ pH ≤ ۲/۰۰: از محلول دارای ارتوفسفریک اسید و سدیم دی هیدروژن فسفات
- برای محدوده ۹/۰۰ ≤ pH ≤ ۵/۰۰: از محلول دارای سدیم دی هیدروژن فسفات و دی سدیم هیدروژن فسفات
- برای محدوده ۱۲ ≤ pH ≤ ۱۰: از محلول دارای دی سدیم هیدروژن فسفات و سدیم فسفات

pH محلول بافر تهیه شده توسط دستگاه pH متر به طور تجربی اندازه‌گیری شد. در صورتی که pH اندازه‌گیری شده محلول بافر اندکی با pH مورد نظر تفاوت داشت با اضافه کردن محلول غلیظ سدیم هیدروکسید یا فسفریک اسید به محلول بافر، pH آن در مقدار مورد نظر تنظیم شد.

[1] Flow systems

۲-۳-۲- تهیه محلول اصلی نمونه‌های بیولوژیکی

به منظور تهیه ۱۰ mL محلول ترکیبات بیولوژیکی ۰/۰۱ M (*D*- پنی سیلامین، *L*- سیستئین، گلوتاتیون، سیستامین، *N*- استیل-*L*- سیستئین، هیدروژن پراکسلید، دوپامین، پیروگالول، اکتوپامین، ۴،۳- دی هیدروکسی-*L*- فنیل آمین)، مقدار لازم از این ترکیبات را در آب مقطر حل کرده و سپس در یک بالن حجمی ۱۰ mL به حجم رسانده می شد. این ترکیبات به نور حساس بوده و به وسیله اکسیژن اکسید می شوند، از اینرو، محلول آنها هر بار به طور تازه تهیه شده و بالن حجمی حاوی محلول آنها با ورق آلومینیمی پوشانده شد.

۲-۴- الکترودها

برای انجام آزمایشات ولتامتری از یک سیستم سه الکترودی استفاده گردید . بدین منظور از الکترود نقره- کلرید نقره شناور در محلول ۳ M کلرید پتاسیم به عنوان الکترود مرجع ، از سیم پلاتین به عنوان الکترود کمکی و از الکترودهای خمیر کربن، خمیر کربن اصلاح شده با کمپلکس های آلی فلزی، کربن شیشه‌ای، کربن شیشه ای اصلاح شده با نانولوله های کربنی، طلا، طلای اصلاح شده با نفتوکینون و کربن شیشه‌ای اصلاح شده با چند سازه[1] پلیمر و نانو طلا به عنوان الکترودهای کار استفاده گردید.

برای انجام آزمایشات آمپرومتری در سیستم جاری، از الکترودهای کربن چاپی[2] (SPCE)، کربن چاپی اصلاح شده با نانولوله های تک‌دیواره[3] (SWCNT- SPCE) و کربن چاپی اصلاح شده با نانولوله های چند دیواره[4] (MWCNT-SPCE) به عنوان الکترود کار و سل الکتروشیمیایی ساخت شرکت دراپ سن[5] اسپانیا مورد استفاده قرار گرفت که در شکل ۲-۲ نشان داده شد. به طوری که مشاهده می شود هر سه

[1] Composite
[1] Screen printed carbon electrode
[3] Single-wall carbon nanotube-Screen printed carbon electrode
[4] Malti-wall carbon nanotube-Screen printed carbon electrode
[5] Dropsens