بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم سیده مریم مصباح نمینی رشته سم شناسی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « سنتز بیوکونژوگه نانوژل- ارگانوفسفات هیدرولاز و ارزیابی ویژگی های فیزیکوشیمایی آن » در تاریخ ۹۰/۱/۲۲ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر افشین محسنی فر	(استاد راهنما)	
دکتر صادق حسن نیا	(استاد مشاور)	
دکتر ملیحه سودی	(استاد ناظر)	
دکتر محمود قاضی خوانساری	(استاد ناظر)	
دکتر بهرام دارایی	(نماینده تحصیلات تکمیلی)	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها کـه لازمـه شـکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنـوی دانشـگاه و پژوهشـگران، لازم اسـت اعضـای هیـأت علمـی، دانشـجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی کـه تحـت عنـاوین پایـان‌نامـه، رسـاله و طرحهـای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدیـد آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یـا ارائـه در مجـامع علمـی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبـات مقالـه باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتـایج حاصـل از پایـان‌نامـه/ رسـاله نیـز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فـیلم، عکـس، نقاشـی و نمایشـنامه) حاصـل از نتـایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکـز تحقیقـاتی، پژوهشـکده هـا، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامـه‌هـای مصـوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی کـه حاصـل نتـایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یـا مجـری طـرح از طریـق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تـاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیـأت رئیسـه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشـگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **سیده مریم مصباح** نمینی دانشجوی رشته **سم شناسی** ورودی سال تحصیلی **۸۷** مقطـع **کارشناسی ارشـد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایـت نمـایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسـبت بـه لغـو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبـران فـوری ضـرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضاتاریخ

۹۰/٤/۱٤

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل نگارنده در رشته سم شناسی است که در سال۸۹ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر افشین محسنی فر ، مشاوره دکتر حسن نیا از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب سیده مریم مصباح نمینی دانشجوی رشته سم شناسی مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی سیده مریم مصباح نمینی

تاریخ و امضا

۹۰/۴/۱۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته سم‌شناسی پزشکی

عنوان

سنتز بیوکونژوگه نانوژل-ارگانوفسفات هیدرولاز و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن

نگارش

سیده مریم مصباح نمینی

استاد راهنما

دکتر افشین محسنی‌فر

استاد مشاور

دکتر صادق حسن نیا

بهار ۱۳۹۰

تقدیم به:

شهدای راستین انقلاب اسلامی که با نثار خون خود فرصت علم آموزی را به ما اعطا کردند.

پدر و مادر عزیزتر از جانم که هیچ گاه توان من یارای جبران گوشه ای از زحمات آنان را نیز نخواهد داشت

و تقدیم به

همسرم که اگر صبوریها و همراهی ها و مهربانی های او نبود هیچگاه این رساله به انجام نمی رسید

تشکر و قدر دانی

خدای مهربان را سپاسگزارم که بر من منت نهاد و به من توفیق داد که بخشی از سرمایه عمر خود را صرف عبور از جاده علم کنم.

در اینجا بر خود لازم می دانم از زحمات و راهنمایی های بی دریغ استاد راهنمای محترم جناب آقای دکتر محسنی فر کمال تشکر را داشته باشم.

از همکاری های استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر حسن نیا تشکر می کنم.

از مدیر محترم گروه سم شناسی جناب آقای دکتر دارایی به جهت مساعدت های بی دریغشان بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر خرم آبادی به دلیل همه راهنماییهایشان نهایت تشکر را دارم.

و در نهایت از کمک های بی شائبه برادر عزیزم دکتر سید محمود مصباح نیز بسیار قدردانی می کنم.

چکیده

استفاده روز افزون حشره کش های ارگانوفسفره در کشاورزی و تولید عوامل عصبی، معرفی روش های پایدارسازی برای آنزیم های تجزیه کننده نظیر ارگانوفسفر هیدرولاز(OPH) را ایجاب می کند. در این مطالعه نانوژل کیتوزان- میریستیک اسید (CMA) به عنوان بستری برای آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز سنتز گردید.

OPH از منشا باکتریایی به دست آمد و روی نانوژل کیتوزان- میریستیک اسید از طریق پیوند های کوالانسی رابط گلوتارآلدهید تثبیت شد. ویژگی های فیزیکوشیمیایی نانوبیوکونژوگه حاصله سپس از طریق اندازه گیری فعالیت آن در شرایط دمایی و pH مختلف و همچنین پایداری و خصوصیات کینتیکی ارزیابی شد(مقادیر k_m و k_{cat}).

نانوژل حاصله ذرات کروی شکل با قطر کمتر از ۵۰ نانومتر به دست آمد. طیف FTIR شکل گیری صحیح نانوبیوکونژوگه را تایید کرد. درصد کاهش فعالیت آنزیم بر گذشت روز برای آنزیم تثبیت شده و آزاد به ترتیت ۱/۱۴ و ۲/۲۸ به دست آمد. با نشان دادن بیشترین فعالیت در pH، ۸ فعلیت آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب ۹۳ و ۵۸ درصد کاهش را در نتیجه تغییرات pH از ۸ تا ۲ نشان دادند. همچنین مشاهدات مشابهی برای گستره بازی و تغییرات دمایی صورت گرفت. به عبارت دیگر بهینه فعالیت در ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده شد. علاوه بر آن پارامتر های کینتیکی نانوبیوکونژوگه بهبود یافت.

پایداری بیشتر و کاهش مقدار k_m برای آنزیم تثبیت شده به شکل طبیعی آنزیم و جایگاه فعال آن در شکل نانوبیوکونژوگه با کمک تثبیت کوالانسی نسبت داده می شود. علاوه بر آن احتمالا ویژگی های چپرونی نانوژل در ایجاد خصوصیات ذکر شده در بالا موثر است.

واژه های کلیدی:

ترکیبات ارگانوفسفره، ارگانوفسفر هیدرولاز، تثبیت آنزیمی، نانوژل

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ومروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱. ترکیبات ارگانوفسفره ۲
۱-۲. تاریخچه حشره کش ها و عوامل جنگی شیمیایی ارگانوفسفره ۴
۱-۳. ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره ۵
۱-۴. نحوه عمل ترکیبات OP ۷
۱-۵. مکانیسم سم زایی OP ۸
۱-۶. نشانه ها وعلائم مسمومیت با حشرکش های آنتی کولین استراز ۹
۱-۷. آنزیم های هیدرولیز کننده ترکیبات ارگانو فسفره ۱۱
۱-۸. آنزیم OPH ۱۵
۱-۹. فرایند تثبیت ۱۷
۱-۹-۱. مزایا و محدودیتهای تثبیت ۱۸
۱-۹-۲. روش های تثبیت ۱۸
۱-۹-۳. اثرات تثبیت بر آنزیم ۲۰
۱-۹-۴. بسترهای مورد استفاده در تثبیت آنزیم ها ۲۲
۱-۱۰. نانو ذرات هیدروژلی ۲۴
۱-۱۰-۱. خود تجمعی ۲۴
۱-۱۰-۲. نانوژل ۲۵
۱-۱۱. تاثیر نانوذرات روی تاخوردگی پروتئین ها ۲۹
۱-۱۲. فعالیت چپرونی نانوذرات نانوژلی ۳۰
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۲
۲-۱. جداسازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۳۳
۲-۱-۱. طرز تهیه محیط کشت نمکی براث حاوی سم ۳۴
۲-۱-۲. طرز تهیه محیط کشت BHI ۳۵
۲-۱-۳. طرز تهیه محیط کشت نوترینت آگار (N.A) ۳۵
۲-۱-۴. طرز تهیه محیط کشت نمکی آگار حاوی سم ۳۶
۲-۲. نگهداری طولانی مدت باکتری و طرز تهیه ذخیره ۳۶
۲-۲-۱. طرز تهیه محیط کشت لوریا برتانی (LB) ۳۷

۲-۲-۲. طرز تهیه محیط کشت لوریا برتانی XYT2 ..... ۳۷
۲-۳. تخلیص آنزیم OPH یا ارگانوفسفرهیدرولاز از باکتری منتخب ۳۸
۲-۳-۱. تکثیر باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۳۸
۲-۳-۲. از بین بردن دیواره سلولی باکتری ۳۹
۲-۳-۳. افزایش حلالیت غشا سلولی باکتری ۴۰
۲-۳-۴. رسوب گذاری ۴۱
۲-۳-۵. جدا کردن نمکهای سولفات آمونیوم از پروتئین ۴۱
۲-۳-۶. کروماتوگرافی تعویض یونی توسطDEAE-Sepharose CL-6B ۴۲
۲-۴. سنجش فعالیت آنزیم ۴۵
۲-۵. آزمایش برادفورد ۴۶
۲-۶. الکتروفورز SDS- PAGE ۴۷
۲-۶-۱. رنگ آمیزی با کوماسی آبی R-250 ..... ۵۰
۲-۷. مراحل سنتز نانوژل کیتوزان ـ میریستیک اسید (CMA) ۵۱
۲-۷-۱. بررسی مورفولوژی و تعیین اندازه نانوژل های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ۵۲
۲-۷-۲. بررسی مورفولوژی و تعیین اندازه نانوژل های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۵۳
۲-۷-۳. طیف بینی (FT/IR) از کیتوزان ـ میریستیک اسید (CMA) ۵۳
۲-۸. فرایند تثبیت ۵۳
۲-۸-۱. اتصال گلوتارآلدهید به نانوژل ۵۳
۲-۸-۲. اتصال گلوتارآلدهید- نانوژل به آنزیم ۵۴
۲-۹. ارزیابی ویژگی های فیزیکوشیمیایی آنزیم آزاد و نانوبیو کونژوگه ۵۵
۲-۹-۱. فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه در pHهای ۲ تا ۱۲ جهت تعیین بهترین pH ۵۵
۲-۹-۲. ارزیابی فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه درطیفی از دماهای مختلف جهت تعیین بهترین دما در بهترین pH ۵۶
۲-۹-۳. ارزیابی پارامترهای کینیتیکی آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه ۵۶
۲-۹-۴. ارزیابی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه ۵۷
فصل سوم: نتایج و یافته ها ۵۸
۳-۱. جداسازی باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۵۹

۳-۲. مراحل تخلیص آنزیم ۶۱
۳-۲-۱. تکثیر باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۶۱
۳-۲-۲. از بین بردن دیواره سلولی باکتری ۶۲
۳-۲-۳. استفاده از تریتون X100 برای افزایش حلالیت غشا ۶۲
۳-۲-۴. رسوب دهی با سولفات آمونیم اشباع ۶۲
۳-۲-۵. کروماتوگرافی تعویض یونی..... ۶۳
۳-۳. نتایج کمی حاصله از تخلیص آنزیم ۶۴
۳-۴. رسم منحنی استاندارد ۶۵
۳-۵. نتایج مربوط به سنتز نانوژل ۶۶
۳-۵-۱. سایز و مورفولوژی نانوژل ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ۶۶
۳-۵-۲. موروفولوژی سه بعدی نانوژل ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۶۶
۳-۶. تثبیت آنزیم ۶۹
۳-۶-۱. تأیید اتصال رابط گلوتارآلدهید به نانوژل با استفاده از طیف جذبی FTIR ۶۹
۳-۶-۲. بررسی تثبیت آنزیم روی نانوژل حاوی گلوتارآلدهید ۷۰
۳-۷. بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی آنزیم آزاد و نانوبیوکونژوگه ۷۱
۳-۷-۱. تعیین pH بهینه آنزیم آزاد و نانوبیوکونژوگه ۷۱
۳-۷-۲. - تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه ۷۲
۳-۷-۳. نتایج مربوط به پارامترهای سینتیکی (KmVmax) ۷۳
۳-۷-۴. ارزیابی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه ۷۴
فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها ۷۵
۴-۱. نگاه کلی..... ۷۶
۴-۲. جدا سازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۷۷
۴-۳. تخلیص آنزیم OPH از باکتری جدا شده ۷۹
۴-۳-۱. سونیکیت باکتری ۷۹
۴-۳-۲. اضافه کردن Triton X100 ..... ۷۹
۴-۳-۳. رسوب دهی با نمک سولفات آمونیوم ۸۰
۴-۳-۴. کروماتوگرافی تعویض یون ۸۰
۴-۴. بررسی نتایج کمی حاصله از تخلیص آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز و بررسی فرایند تخلیص آنزیم با استفاده از الکتروفورز SDS- PAGE ۸۱
۴-۵. سنتز نانوژل ۸۱

۴-۵-۱. چگونگی شکل گیری نانوژل ها ۸۱
۴-۵-۲. تاثیر اندازه نانوذرات روی عملکرد آنها ۸۳
۴-۶. تثبیت آنزیم ۸۳
۴-۶-۱. چرا آنزیم ها روی مواد بر پایه کیتین و کیتوزان تثبیت می شوند؟ ۸۱
۴-۶-۲. اتصال گلوتار آلدهید به نانوژل ۸۵
۴-۶-۳. اتصال آنزیم به نانوژل حاوی گلوتارآلدهید ۸۶
۴-۷. بررسی ویژگی های فیزیکو شیمیایی ۸۸
۴-۷-۱. اثر pH بر سرعت واکنش های آنزیمی ۸۸
۴-۷-۲. مطالعه اثرpH های اسیدی و قلیایی بر فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه ۸۹
۴-۷-۳. اثر دما بر واکنش های آنزیمی ۹۰
۴-۷-۴. تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده بر روی نانوژل ۹۱
۴-۷-۵. ارزیابی پارامترهای کینیتیکی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (Km Vmax) ۹۲
۴-۷-۶. مطالعه پارامترهای کینیتیکی(Km , Vmax) آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده برروی نانوژل ۹۳
۴-۷-۷. بررسی پایداری ذخیره ای آنزیم OPH آزاد و تثبیت شده ۹۳
۴-۸. پیشنهاد ها ۹۴
فهرست منابع ۹۶
ضمائم ۱۰۵
چکیده انگلیسی ۱۰۸

فهرست جداول

جدول ۱-۱. آفت کش ها و محل اثر آن ها ۳

جدول ۱-۲:علائم مسمومیت با حشره کش های ارگانوفسفره ۱۰

جدول ۱-۳. سمیت زایی برای رت ها و انسان ها برای OP های مختلف. ۱۱

جدول ۱-۴. میکروارگانیسم های جدا شده تجزیه کننده ترکیبات OP ۱۲

جدول ۱-۵. برخی از مهمترین کاربرد های صنعتی سیستم های تثبیت آنزیمی ۱۹

جدول ۱-۶پتانسیل های پزشکی انتخابی مورد استفاده آنزیم های تثبیت شده ۲۰

جدول ۲-۱. مواد لازم برای تهیه محیط کشت نمکی براث حاوی سم ۳۴

جدول ۲-۲. مواد لازم برای تهیه محیط کشت نمکی آگار حاوی سم ۳۶

جدول ۲-۳. مواد لازم برای تهیه محیط کشت لوریا برتانی ۳۷

جدول ۲-۴. مواد لازم برای تهیه محیط کشت لوریا برتانی2XYT ۳۸

جدول ۲-۵. مواد لازم برای ساخت استوک ۴۰ میلی مولار پاروکسون ۴۶

جدول ۲-۶. مواد لازم برای تهیه ژل پایین ۴۹

جدول ۲-۷. مواد لازم جهت تهیه ژل بالا ۴۹

جدول ۲-۸. مواد لازم برای تهیه نانوژل کیتوزان ـ میریستیک اسید ۵۱

جدول ۳-۱. فعالیت آنزیمی در غلظت های مختلف NaCl ۶۳

جدول ۳-۲ داده های کمی بدست آمده از تخلیص آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز: ۶۴

جدول ۳-۳. نتایج حاصله از رسم منحنی استاندارد با استفاده از روش برادفورد ۶۵

جدول ۳-۴ مقادیر Km و Vmax ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکونژوگه ۷۳

فهرست شکل ها

شکل۱-۱ .ساختار عمومی ترکیبات ارگانوفسفره..... ۲
شکل ۱-۲. فرمول عمومی ترکیبات ارگانوفسفره ومسیر اصلی سم زدایی آنها..... ۶
شکل ۱-۳. نمای انتقال پیام عصبی توسط آنزیم استیل کولین استراز در پایانه های عصبی..... ۷
شکل ۱--۴. مکانیسم سم زایی OP..... ۹
شکل ۱-۵. ساختار کریستالی آنزیم OPH و جایگاه فعال آنزیم :OPH..... ۱۶
شکل ۱-۶. مکانیسم تجزیه ترکیبات OP توسط . : OPH..... ۱۷
شکل ۱-۷ساختار کیتین، کیتوزان و سلولز..... ۲۷
شکل ۱-۸. ساختار میریستیک اسید..... ۲۹
شکل ۳-۱ نمونه های خاک کشت داده شده در محیط کشت نمکی مایع حاوی سم دیازینون..... ۶۰
شکل ۳-۲نتایج محیط کشت غربالی و محیط نوتریت آگار..... ۶۰
شکل ۳-۳محیط کشت نمکی آگار حاوی سم..... ۶۱
شکل ۳-۴. نمایی از دستگاه کروماتوگرافی تعویض یونی .DEAE-Sepharose CL-6B..... ۶۳
شکل ۳-۵: الکتروفورز مراحل تخلیص وتعیین وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده..... ۶۴
شکل ۳-۶. منحنی استاندارد غلظتهای مختلف پروتئین BSA..... ۶۵
شکل ۳-۷:تصویر نانوژل توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره..... ۶۶
شکل ۳-۸. تصویر نانوژل توسط میکروسکوپ الکترونی..... ۶۷
شکل ۳-۹:طیف FTIR مربوط به کیتوزان..... ۶۷
شکل ۳-۱۰: طیف FTIR مربوط به میریستیک اسید..... ۶۸
شکل ۳-۱۱: طیف FTIRمربوط به نانوژل..... ۶۸
شکل ۳-۱۲ طیف FTIR گرفته شده از نانوژل - گلوتارآلدهید ۶۹
شکل ۳-۱۳. طیف FTIR گرفته شده از آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز تخلیص شده..... ۷۰
شکل ۳-۱۳ طیف FTIR گرفته شده از نانوژل –گلوتارآلدهید- آنزیم..... ۷۱
شکل ۳-۱۴. تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم OPH آزاد و تثبیت شده روی نانوژل..... ۷۲
شکل ۳-۱۵: تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه..... ۷۳
شکل ۳-۱۶. معادله لینویر-برک جهت محاسبه Km ،Vmax آنزیم آزاد و تثبیت شده..... ۷۴
شکل ۳-۱۷. نمودار پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه..... ۷۴
شکل ۴-۱: مربوط به اتصال گروه آمین کیتوزان به کربوکسیل میریستیک اسید..... ۸۱

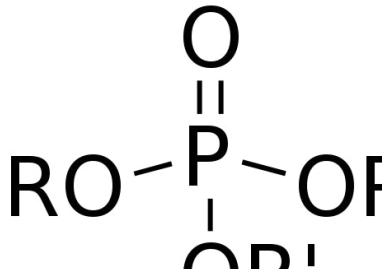
شکل ۴-۲ تأثیر اندازه نانوذرات بر روی تاخوردگی پروتئین ها..... ۸۳
شکل ۴-۳ساختار رابط گلوتارآلدهید..... ۸۵
شکل ۴-۴. پیوند شیف باز..... ۸۶
شکل ۴-۵. مکانیسم عمل NaBH4..... ۸۶

فصل اول

مقدمه ومروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. ترکیبات ارگانوفسفره

ترکیبات ارگانوفسفر (OP)[1]، استر، آمید یا مشتقات تیولی فسفریک اسید هستند که در برگیرنده یک خانواده بزرگ (بیش از ۵۰۰۰۰ ترکیب) از حشره کش‌ها و عوامل جنگی شیمیایی[2] وترکیبات نرم کننده پلاستیک و مواد تشکیل دهنده سوختگیری هوایی می‌باشند [۱و۲].



شکل ۱-۱. ساختار عمومی ترکیبات ارگانوفسفره

امروزه بیش از ۲۰۰ حشره کش از استرهای ارگانوفسفره و حدود ۲۵ حشره کش از استرهای کاربامات در بازارهای فروش موجود است. ترکیبات ارگانوفسفره تقریبا ۳۸٪ کل حشره کش های جهان را تشکیل می دهند. بنا به گزارشات EPA[3] در سال۲۰۰۴ ، سالانه در آمریکا بیش از ۴۰ میلیون کیلو از ارگانوفسفاتها مورد استفاده قرار می گیرند. طبق این گزارشات گلیفوسات و کلرپیریفوس پر استفاده ترین

[1] Organophosphorus (OP) compounds
[2] Chemical warfare agents (CWA)
[3] Environmental Protection Agency

ترکیبات ارگانوفسفره مورد استفاده در این کشور می باشند که به ترتیب ۲۰٪ و ۱۱٪ کل آفت کش های مورد استفاده در این کشور را تشکیل می دهد[۱].

جدول ۱-۱. آفت کش ها و محل اثر آن ها

TARGET	INSECTICIDE	EFFECT
Acetylcholinesterase	Organophosphates	Inhibition
	Carbamates	Inhibition
Sodium channels	Pyrethroids (Type I and II)	Activation
	DDT	Activation
	Dihydropyrazoles	Inhibition
Nicotinic acetylcholine receptors	Nicotine	Activation
	Neonicotinoids	Activation
GABA receptors-gated chloride channels	Cyclodienes	Inhibition
	Phenylpyrazoles	Inhibition
	Pyrethroids (Type II)	Inhibition
Glutamate-gated chloride channels[1]	Avermectins	Activation
Octopamine receptors[2]	Formamidines	Activation
Mitochondrial complex I	Rotenoids	Inhibition

از مهمترین ترکیبات ارگانوفسفره می توان به پاراتیون، متیل پاراتیون، پاروکسون، دیازینون، متامیدوفوس، ایزوکربوفوس، کلرپیریفوس، سومان، سارین و تابون و . . . اشاره کرد[۳].

عوامل جنگی شیمیایی ارگانوفسفره به ۲ دسته تقسیم می شوند:

G agents : عوامل G ترکیبات فلوزین ارگانوفسفات هستند. (بغیر از تابون که ترکیب ریانیدی ارگانوفسفات می باشد). این عوامل شامل تابون (GA)، سارین (GB)، سومان (GD)، سیکلوسارین (GF)[۱] یا سیکلوهگزیل متیل فسفونوفلوریدات[۲] می باشند.

V agent : یا VX که ترکیبات ارگانوفسفر حاوی سولفور هستند.

عوامل G و V در عموم گازهای عصبی نیز نامیده می شوند [۴، ۵ و ۶].

[1] Cyclosarin
[2] Cyclohexyl methylphosphonofluoridate

ترکیبات ارگانوفسفره باعث غیر فعال شدن آنزیم استیل کولین استراز شده و به همین علت به عنوان سموم عصبی شناخته می شوند. مکانیسم سمیت آنها براساس آگاهی از مکانیسم عمل فیزوستیگمن می باشد که خیلی سریع کشف شد. این آلکالوئید در سال ۱۸۶۴ از باقلای کالابار[1]، دانه های فیزوستیگما ونوزوم[2]، که یک گیاه چاودار در آفریقای غربی استوایی است، جداسازی شد. در سال ۱۹۲۶ مکانیسم عمل مشخصه آن یعنی فعالیت مهاری کولین استرازی کشف شد [۴].

۱-۲. تاریخچه حشره کش ها و عوامل جنگی شیمیایی ارگانوفسفره

در حدود ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح هامر استفاده از گوگرد برای قارچ های خانگی را ثبت نمود و نزدیک ۹۰۰ سال قبل از میلاد، چینی ها از آرسنیک برای کنترل آفات باغ استفاده می کردند. استفاده از آفت کش ها در کشاورزی بعد از جنگ جهانی دوم به علت دسترسی بیشتر به آفت کش ها و تمرکز تلاشها بر افزایش فراورده های غذایی جهان، فزونی یافت [۷] .

اولین ماده ی شیمیایی سنتزی که به عنوان آفت کش استفاده شد، ماده ی شیمیایی به نام DDT[3] بود . موفقیت های ابتدایی در رابطه با د.د.ت افزایش استفاده ازحشره کش ها را منجر گردید. سموم دفع آفات مانند د.د.ت و سایر آفت کش های هیدروکربنی کلردار در ایران از اواسط دهه چهل به طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفتند [۸].

در اواخر دهه ۱۹۳۰ میلادی اسچاردر[4] پدر حشره کش های ارگانوفسفره، به عنوان یک شیمیدان در Bayer AG آلمان هزاران ترکیب گوناگون را تولید کرد که در این اثناء موفق به سنتز ترکیب جدیدی تحت عنوان کد E ۶۰۵ شد که نهایتا با نام تجاری حشره کش سمی پاراتیون که به عنوان جد[5] عوامل جنگی شیمیایی سری G (سومان وسارین وتابون) به حساب می آید، وارد بازار کشاورزی شد که به عنوان یکی از

[1] Calabar beans
[2] Physostigma venenosum
[3] Dicloro Diphenyl Tricloro Ethan
[4] Gerhard Schrader
[5] Predecessor

کارآمدترین ومورد استفاده ترین ترکیبات این کلاس محسوب می شود. او موفق به کشف ساختار شیمیایی عمومی ترکیبات ارگانوفسفره آنتی کولین استرازی شد.

در انتهای جنگ جهانی دوم دانشمندان آمریکایی وبریتانیایی شروع به سنتز ترکیبات جدید ارگانوفسفره مثل دی ایزوپروپیل فلوروفسفونات کردند. و در اوایل دهه ۱۹۵۰ میلادی ترکیب VX که به عنوان یکی از سمی ترین ترکیبات OP به شمار می آید، توسط دانشمندان بریتانیایی سنتز شد. به دنبال تولید سلاح های شیمیایی دانشمندان آمریکایی در سال ۱۹۵۸ ترکیبات سری V را سنتز کردند.

در اواسط دهه ۱۹۹۰ دانشمندان اتحادیه جماهیر شوروی ترکیبات ارگانوفسفره نسل سوم [1] را تولید کردند. در بین کلاس های مختلف ترکیبات ارگانوفسفره سمیت عصبی عوامل سری V، ۱۰۰مرتبه بیشتر از عوامل سریG می باشد. ترکیبات سریG بسیار فرار می باشند و به سهولت در محیط زیست پراکنده می شوند. درحالیکه خصوصیات فیزیکی عوامل سری V به گونه ای است که به آنها این امکان را می دهد که به صورت یک لایه روغنی، فعالانه در سطح محیط زیست پایدار باقی بمانند[۹].

۱-۳. ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره

بیشتر ترکیبات ارگانوفسفره مشتقات تیوله یا استری فسفریک ، فسفنیک[2] یا فسفرآمیدیک[3] اسید می باشند. ترکیبات ارگانوفسفره دارای یک اتم فسفر پنج ظرفیتی مرکزی هستند که به اتم اکسیژن یا گوگرد(در این حالت فسفروتیوات[4] نامیده می شود) با پیوند دوگانه متصل شده است .

گروه X معروف به گروه ترک کننده[5] است، زمانیکه ترکیبات ارگانوفسفره آنزیم استیل کولین استراز[6] را فسفریله می کنند، مکانش را ترک می کند همچنین این گروه نسبت به هیدرولیز شدن بسیار حساس می باشد. این گروه می تواند یک آنیون آلی، اسیدهای معدنی نظیر فلوئور، سیانید یا تیو سیانید ویا

[1] Novichock agents
[2] Phosphonic acid
[3] Phosphoramidic acid
[4] Phosphorothioate
[5] Leaving group
[6] Acethyl Cholin Esterase ؛ AChE