بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته شیمی، گرایش تجزیه

عنوان

مطالعات الکتروشیمیایی برهم‌کنش فورازولیدون با DNA در سطح الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو ذرات کربن چند دیواره

استاد راهنما

پروفسور لیدا فتوحی

استاد مشاور

پروفسور مجید ممهد هروی

توسط

فرزانه بهمنی

مهرماه۱۳۹۱

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به دانشگاه الزهرا(س) است.

ن والقلم و ما یسطرون

سوگند به قلم و آنچه می نگارد.

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

حاصل این تلاش را تقدیم می‌کنم به:

استاد بزرگوارم پروفسور لیدا فتوحی

با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کار ساز و سازنده بارور ساختند.

پدر و مادر عزیزم

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آن‌هاست.

تقدیر وتشکر:

با سپاس از سه وجود مقدس:

آنان که عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند

...ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم

...و موهایشان سپید شد تا ماروسفید شویم

استادم

پدرم

مادرم

از استاد مشاورم جناب آقای پروفسور مجید ممهد هروی به دلیل همکاری‌هایشان قدردانی می-کنم .

از جناب آقای دکتر جباری و جناب آقای دکتر مرادلو که توفیق داشتم از داوری و راهنمایی‌های ایشان بهره ببرم کمال تشکر و قدردانی دارم.

چکیده

در این کار برهم‌کنش فورازولیدون (Fu)، داروی ضد میکروب، با DNA دو رشته‌ای گاو در محلول و در سطح MWCNT-DNA-GCE با روش‌های ولتامتری چرخه‌ای و اسپکتروسکوپی UV-vis مورد بررسی قرار گرفت. در حضور DNA جریان پیک کاتدی فورازولیدون کاهش می‌یابد و پتانسیل به سمت مقادیر مثبت‌تر جابه‌جا می‌شود که بیانگر برهم‌کنش فورازولیدون با DNA می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از اسپکتروسکوپی برهم‌کنش بین لایه‌ای فورازولیدون با DNA را تأیید می‌کند. در سرعت‌های روبش $mV\ s^{-1}$ ۱۵۰-۲۰ فرایند الکترودی جذبی مشاهده شد. ضریب انتقال الکترون (α) و ثابت سرعت انتقال الکترون (k_s) طبق معادله لاویرون محاسبه شد و مقادیر تقریباً یکسانی در حضور و غیاب DNA به‌دست آمد. ثابت اتصال و ضریب استوکیومتری با استفاده از روش هیل به ترتیب $K_a = ۶/۸\times۱۰^{۴}\ M^{-1}$ و $m=۱/۳$ محاسبه شد. از این روش الکتروشیمیایی برای اندازه‌گیری DNA استفاده شد. تحت شرایط بهینه، دو منحنی کالیبراسیون خطی در گستره‌های $\mu g\ mL^{-1}$ ۰/۰۴-۰/۱۰ و $\mu g\ mL^{-1}$ ۰/۱۰-۱/۰۰ با حد تشخیص $\mu g\ mL^{-1}$ ۰/۰۲۵ برای اندازه‌گیری DNA به‌دست آمد. این روش برای تعیین DNA در سرم خون گاو بازده ۹۰٪ را نشان می‌دهد. بنابراین این روش می‌تواند برای آنالیز نمونه‌های واقعی به‌کار رود.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل۱: مقدمه

۱-۱ مقدمه..... ۲

فصل۲: بررسی منابع

۲-۱ بررسی منابع..... ۶

فصل۳: تئوری

۳-۱ الکترود کار..... ۲۰

۳-۱-۱ الکترود اصلاح شده..... ۲۲

۳-۱-۲ روش‌های اصلاح الکترود..... ۲۳

۳-۲ نانولوله‌های کربنی..... ۲۵

۳-۲-۱ مزایای نانولوله‌های کربنی..... ۲۷

۳-۳ برهم‌کنش دارو- DNA ۲۸

۳-۳-۱ بررسی الکتروشیمیایی برهم‌کنش دارو- DNA..... ۳۱

۳-۴ بیوسنسور DNA..... ۳۴

۳-۴-۱ روش‌های تثبیت DNA..... ۳۴

۳-۵ روابط در ولتامتری ۳۵

۳-۵-۱ محاسبه ضریب انتقال الکترون، ثابت سرعت استاندارد و پتانسیل فرمال.....۳۵

۳-۵-۲ نحوه‌ی محاسبه ضریب استوکیومتری (m) و ثابت اتصال DNA -Fu (K_a) ۳۵

فصل۴: مطالعات تجربی و بررسی نتایج

۴-۱ شرایط تجربی.....۳۹

۴-۱-۱ مواد شیمیایی.....۳۹

۴-۱-۲ دستگاهوری ۳۹

۴-۱-۳ مراحل انجام کار.....۴۱

۴-۲ بررسی برهم‌کنش فورازولیدون با DNA.....۴۳

۴-۲-۱ مطالعات ولتامتری چرخه‌ای فورازولیدون در سطح الکترودهای اصلاح شده MWCNT-GCE (در غیاب و حضور DNA) و MWCNT-DNA-GCE ۴۳

۴-۲-۲ تأثیر pH.....۴۶

۴-۲-۳ مطالعات اثرسرعت روبش.....۴۹

۴-۲-۳-۱ محاسبه ثابت سرعت استاندارد واکنش و ضریب انتقال الکترون.....۵۲

۴-۲-۳-۲ بررسی جذبی یا نفوذی بودن فرآیند.....۵۶

۴-۲-۴ محاسبه ضریب استوکیومتری (m) و ثابت اتصال DNA -Fu (K_a) ۶۰

۴-۲-۵ مطالعات طیف سنجی جذبی UV-vis.....۶۳

۴-۲-۶ اندازه‌گیری کمی DNA در سطح MWCNT-GCE.....۶۵

۴-۲-۶-۱ بررسی تأثیر حجم نانو لوله‌های کربن چند دیواره‌ای.....۶۵

۴-۲-۶-۲ بررسی تأثیر مقدار نانو لوله‌های کربن چند دیواره‌ای..... ۶۷

۴-۲-۶-۳ رسم منحنی کالیبراسیون..... ۶۹

۴-۲-۶-۴ حداقل مقدار قابل تشخیص (LOD) ۷۲

۴-۲-۶-۵ تکرارپذیری (RSD%)..... ۷۳

۴-۲-۶-۶ بررسی اثر مزاحمت..... ۷۵

۴-۲-۶-۷ تعیین مقدار DNA در نمونه واقعی..... ۷۷

فصل۵: نتیجه‌گیری

۵-۱ نتیجه‌گیری..... ۷۹

فهرست منابع..... ۸۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۴-۱ نتایج حاصل از ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در سرعت‌های روبش مختلف در سطح MWCNT-GCE..... ۵۱

جدول۴-۲ نتایج حاصل از ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در سرعت‌های روبش مختلف در سطح MWCNT-DNA-GCE..... ۵۱

جدول۴-۳ نتایج مربوط به محاسبه پارامترهای الکتروشیمیایی فورازولیدون (k_s، α، Γ) در سطح الکترودهای MWCNT-GCE و MWCNT-DNA-GCE..... ۵۹

جدول۴-۴ نتایج حاصل از ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در حضور غلظت‌های مختلف DNA..... ۷۰

جدول۴-۵ نتایج مربوط به محاسبه حداقل مقدار قابل تشخیص DNA..... ۷۲

جدول ۴-۶ نتایج حاصل از تکرار اندازه‌گیری فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون در حضور محلول DNA در سطح MWCNT-GCE ۷۴

جدول۴-۷ نتایج حاصل از بررسی گونه‌های مزاحم بر روی جریان پیک فورازولیدون در حضور DNA..... ۷۶

جدول۴-۸ نتایج مربوط به تعیین DNA در نمونه واقعی..... ۷۷

جدول۵-۱ ارقام شایستگی روش پیشنهادی..... ۸۱

جدل۵-۲ مقایسه حدود تشخیص روش پیشنهادی با روش‌های دیگر برای تعیین DNA..... ۸۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱ ساختار مولکولی فورازولیدون..... ۲

شکل۳-۱ انواع مختلف نانولوله‌های کربنی..... ۲۶

شکل۳-۲ انواع اتصالات دارو - a DNA) اتصال کووالانسی، b) اتصال از طریق شیار، c) جایگیری بین لایه‌ای..... ۳۱

شکل۳-۳ انواع برهم‌کنش دارو- A DNA) برهم‌کنش در سطح الکترود a) الکترود اصلاح شده با DNA، b) الکترود اصلاح شده با دارو B) بر هم‌کنش در محلول..... ۳۳

شکل۴-۱ نمای دستگاه Metrohm Model 746 VA trace Analyzer..... ۴۰

شکل۴-۲ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴M و ۷ =pH a) در غیاب DNA در سطح MWCNT-GCE، b) در حضور DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۴ در سطح MWCNT-GCE، c) در سطح MWCNT-DNA-GCE (سرعت روبش $mV\ s^{-1}$ ۵۰) ۴۵

شکل۴-۳ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M در سطح MWCNT-DNA-GCE در pH های a)۴/۵، b)۵/۰، c)۶/۰، d)۶/۵، e)۷/۰، f)۸/۰، g)۹/۰، h)۱۰/۰ ، i)۱۱/۰ (سرعت روبش $mV\ s^{-1}$ ۵۰)..... ۴۷

شکل۴-۴ نمودار شدت جریان پیک کاتدی فورازولیدون ۰/۵ mM برحسب pH در سطح MWCNT-DNA-GCE..... ۴۷

شکل۴-۵ نمودار پتانسیل پیک کاتدی فورازولیدون ۰/۵ mM برحسب pH در سطح MWCNT-DNA-GC ۴۸

شکل۴-۶ مکانیسم کاهش فورازولیدون ۴۸

شکل۴-۷ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و ۷ =pH در سطح MWCNT-GCE در سرعت‌های روبش a)۲۰، b)۳۰، c)۵۰، d)۷۰، e)۹۰، f)۱۱۰، g)۱۵۰ $mV\ s^{-1}$ ۴۹

شکل۴-۸ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mMدر بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در سطح MWCNT-DNA-GCE در سرعت‌های روبش a)۲۰، b)۳۰، c)۵۰، d) ۷۰، e)۹۰، f)۱۱۰، g)۱۵۰ $mV\ s^{-1}$ ۵۰

شکل۴-۹ نمودار پتانسیل برحسب لگاریتم سرعت روبش درشرایط ذکرشده در شکل ۴-۷ ..... ۵۳

شکل۴-۱۰ نمودار پتانسیل برحسب لگاریتم سرعت روبش درشرایط ذکرشده در شکل ۴-۸ ..... ۵۴

شکل۴-۱۱ نمودار پتانسیل برحسب سرعت روبش در شرایط ذکرشده در شکل ۴-۷ ..... ۵۵

شکل۴-۱۲ نمودار پتانسیل برحسب سرعت روبش در شرایط ذکرشده در شکل ۴-۸ ..... ۵۵

شکل۴-۱۳ نمودار جریان بر حسب سرعت‌های روبش بر اساس شرایط ذکرشده در شکل ۴-۷ ..... ۵۸

شکل۴-۱۴ نمودار جریان بر حسب سرعت‌های روبش بر اساس شرایط ذکرشده در شکل ۴-۸ ..... ۵۸

شکل۴-۱۵ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در سطح MWCNT-GCE در غلظت‌های a)۰/۱، b)۰/۲، c)۰/۳، d) ۰/۵، e)۰/۶، f)۰/۷، g)۰/۸، h)۰/۹ mM ۶۰

شکل۴-۱۶ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در حضور DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۴ در سطح MWCNT-GCE در غلظت‌های a) ۰/۱، b) ۰/۲، c) ۰/۳، d) ۰/۵، e) ۰/۶، f) ۰/۷، g) ۰/۸، h) ۰/۹ mM ۶۱

شکل۴-۱۷ نمودارهای a) جریان غلظت‌های مختلف فورازولیدون در سطح MWCNT-GCE، b) جریان غلظت‌های مختلف فورازولیدون در حضور DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۴ در سطح MWCNT-GCE، c) اختلاف جریان برحسب غلظت‌های مختلف فورازولیدون در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴M و pH=۷ ..... ۶۱

شکل۴-۱۸ نمودار $\log[\Delta I / (\Delta I_{max}-\Delta I)]$ برحسب $\log ([Fu] / M)$ بر اساس شرایط ذکرشده در شکل ۴-۱۷ ..... ۶۲

شکل۴-۱۹ طیف جذبی DNA $M\ ۱/۶۴\times۱۰^{-۵}$ در pH=۷ ..... ۶۳

شکل ۴-۲۰ طیف جذبی فورازولیدون و کمپلکس Fu-DNA در بافر برایتون- رابینسون (۰/۰۴ M و pH=۷) منحنی a) $۱۰^{-۴}$ M فورازولیدون، b) DNA + a $M\ ۲/۶۰\times۱۰^{-۵}$، c) DNA + a $M\ ۶/۱۰\times۱۰^{-۵}$، d) DNA + a $M\ ۹/۱۰\times۱۰^{-۵}$، e) DNA + a $M\ ۱/۱۸\times۱۰^{-۴}$، f) DNA + a $M\ ۱/۴۲\times۱۰^{-۴}$، g) DNA + a $M\ ۱/۶۴\times۱۰^{-۴}$، h) DNA + a $M\ ۱/۸۳\times۱۰^{-۴}$، i) DNA + a $M\ ۲/۰۱\times۱۰^{-۴}$ ۶۴

شکل۴-۲۱ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در حضور DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۴ در سطح MWCNT-GCE همراه با حجم‌های مختلف MWCNT ($mg\ mL^{-1}$ ۴) تثبیت شده در سطح الکترود a) ۱، b) ۲، c) ۳، d) ۴، e) ۵ µL ۶۶

شکل۴-۲۲ نمودار جریان بر حسب حجم MWCNT ۶۶

شکل۴-۲۳ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در حضور DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۴ در سطح MWCNT-GCE همراه با غلظت‌های

مختلفMWCNT تثبیت شده در سطح الکترود a)۲، b)۳، c)۴، d)۵، e)۶ $mg\ mL^{-1}$ ۶۸

شکل۴-۲۴ نمودار جریان بر حسب غلظت MWCNT۶۸

شکل۴-۲۵ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ درغلظت‌های مختلف a) ۰ DNA، b)۰/۰۴، c)۰/۰۶، d)۰/۰۸، e)۰/۱۰، f)۰/۲۰، g) ۰/۳۲، h)۰/۶۰، i)۰/۰۸، j)۱/۰۰ ، k)۱/۵۰، l)۲/۰۰ $\mu g\ mL^{-1}$ با اعمال شرایط بهینه۶۹

شکل۴-۲۶ منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظتی DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۰/۰۴-۰/۱۰۷۱

شکل۴-۲۷ منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظتی DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۰/۱۰-۱/۰۰۷۱

شکل۴-۲۸ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در سطح MWCNT-GCE با ۸ بار تکرار۷۲

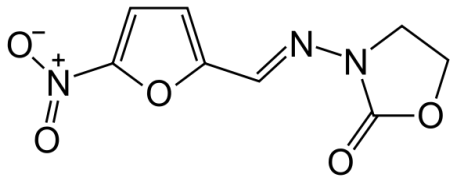
شکل۴-۲۹ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای فورازولیدون ۰/۵ mM در بافر برایتون- رابینسون ۰/۰۴ M و pH=۷ در سطح MWCNT-GCE در حضور DNA $\mu g\ mL^{-1}$ ۴ با ۸ بار تکرار۷۴

فصل اول

مقدمه

فصل ۱-۱ مقدمه

فورازولیدون دارای فرمول شیمیایی $C_8H_7N_3O_5$ با جرم مولکولی ۲۲۵/۱۶ گرم بر مول می-باشد (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱ ساختار مولکولی فورازولیدون

نیتروفوران‌ها اولین ترکیبات نیترو هتروسیکلی بودند که برای شیمی درمانی مورد استفاده قرار گرفتند. فورازولیدن از مشتقات نیتروفوران می‌باشد که گروه نیترو در محل پنجم حلقه فوران قرار دارد. فعالیت بیولوژیکی این دسته از داروها به دلیل کاهش گروه نیترو می‌باشد. فورازولیدون و دیگر مشتقات نیتروفوران برای بیشتر از سی سال در پزشکی به تنهایی و یا در ترکیب با داروهای دیگر جهت درمان بیماری‌های روده‌ای در حیوانات و انسان‌ها استفاده می‌شوند[۲-۱]. البته مهم‌ترین ویژگی دارویی ترکیبات نیترو آروماتیک خصلت ضد سرطانی و ضد باکتریایی آن‌ها می‌باشد[۳].

فورازولیدون در درمان اسهال ناشی از عوامل باکتریال و پروتوزوا، اسهال ناشی از ژیاردیا، اسهال مسافرتی، سالمونلا و بیماری وبا به‌کار می‌رود. از این دارو نیز در دامپزشکی در درمان کوکسیدیوز در طیور یا درمان ماهیان یا به عنوان افزودنی در غذای حیوانات مانند گاو، خوک، مرغ، ماهی و میگو برای درمان بیماری‌های مرتبط به باکتری‌ها و پروتوزواها استفاده می‌شود[۴].

اشکال دارویی آن به صورت سوسپانیون ۵۰ mg / ۱۵ ml و یا قرص ۱۰۰ mg می‌باشد. عوارض جانبی این دارو شامل تهوع، استفراغ، دل درد، خارش و ضایعات پوستی می‌باشد. چندین مورد منع مصرف فورازولیدون گزارش شده است ازجمله: مصرف همزمان آن با غذاهای حاوی تیرآمین (باقلا،

پنیر غیر پاستوریزه، آبجو، جگر مرغ و محصولات تخمیر شده)، داروهای کاهنده اشتها، قرص سرماخوردگی و داروهای ضد سرفه زیرا ممکن است برای مدت قابل توجهی در بافت بدن باقی بماند. در طول مصرف این دارو از مصرف فرآورده‌های حاوی الکل باید خودداری کرد. هم‌چنین مصرف این دارو در نوزادان زیر یک ماه از آن نظر که سیستم آنزیمی آن‌ها نارس است، توصیه نمی‌شود[۵].

برای شناسایی و تشخیص فورازولیدن به صورت خالص و یا به صورت محلول در آب از روش-های کروماتوگرافی مایع[۶،۷]، کروماتوگرافی لایه نازک[۸]، اسپکتروسکوپی[۹]، کدرسنجی[۱۰] و پلاروگرافی[۱۴-۱۱] استفاده شده است.

مطالعه برهم‌کنش بین مولکول‌های کوچک و DNA حائز اهمیت می باشد. چون این برهم-کنش‌ها اساس خواص درمانی سرطان زایی بسیاری از گونه‌های سرطان زا و داروهای ضد تومور و آنتی ویروسی می‌باشد[۱۸-۱۵].

از انواع مختلف بر هم‌کنش DNA با دارو [۲۱-۱۹] می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- جایگیری بین لایه‌ای

۲- اتصال غیر کووالانس از طریق شیارها

۳- شکستن DNA

۴- پیوند کووالانسی / اتصال عرضی

تشکیل کمپلکس دارو–DNA باعث تغییر در ثبات ترمودینامیکی و خواص اصلی DNA می-شود[۲۲]. برهم‌کنش بین دارو و DNA در تشخیص مولکولی هیبرید DNA، جهش ژن‌ها و مکانیسم عمل برخی از داروها حائز اهمیت است.

اخیراً مطالعه کاربرد سنسورهای DNA در تشخیص‌های بالینی، قانونی و کاربردهای پزشکی توجه محققان را به خود جلب کرده است[۲۳]. البته بیشترین کاربرد بیوسنسورهای DNA، تشخیص گونه‌های شیمیای مانند عوامل سرطان زا، داروها، آلاینده‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد. آنالیت‌های الکترواکتیو به‌طور مستقیم با روش ولتامتری تعیین می‌شوند[۲۴]. درحالی‌که ترکیبات غیر الکترواکتیو می‌توانند از طریق تغییر در سیگنال الکتروشیمیایی واکنش‌های اکسایش و کاهش DNA تعیین شوند[۲۵،۲۶].

به‌طور کلی DNA به دلیل ویژگی‌های شیمیایی و بیولوژیکی‌اش منجر به کشف کدهای ژنی و توالی ژنوم بشر شده است و یکی از نتایج بسیار مهم شناسایی توالی ژنوم بشر، تشخیص جهش‌های نقطه‌ای و ارتباط شان با پاتولوژی نظیر سرطان می‌باشد[۲۷].

مهم‌ترین مزایای بیوسنسورهای الکتروشیمیایی DNA قیمت پایین، پاسخ سریع، ابعاد کوچک، قابل حمل بودن، حساسیت بالا و غیر وابسته به کدورت نمونه می‌باشد[۲۸،۲۹].

فصل دوم

بررسی منابع