Chemical Research & Nanomaterials(CRN)
crn.shiraz.iau.ir
پژوهش های شیمیایی و نانومواد

اندازه گیری رنگ سنجی گلوکز توسط نانوکامپوزیت مغناطیسی $Fe_3O_4/CeO_2/C$-dots

یاسمن اژدهاکش ابوالوردی، فاطمه هنرآسا*

گروه شیمی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

چکیده: در مطالعه حاضر، اندازه گیری گلوکز بر مبنای خصوصیت شبه آنزیم پراکسیداز نانوکامپوزیت $Fe_3O_4/CeO_2/C$-dots انجام شده است. برای رسیدن به این هدف یک واکنش آبشاری به کار گرفته شد. در مرحله اول گلوکز در حضور آنزیم گلوگز اکسیداز، با اکسیژن واکنش داده و تولید گلوکونیک اسید و هیدورژن پراکسید می کند. سپس در مرحله بعدی هیدروژن پراکسید تولید شده در حضور $Fe_3O_4/CeO_2/C$-dots، ترکیب ۳،۳'،۵،۵'–تترامتیل بنزیدین (TMB) را به oxTMB تبدیل می کند که باعث تغییر رنگ آبی در محلول می شود. شدت رنگ آبی به غلظت گلوکز، مقدار نانوکامپوزیت، غلظت TMB و pH محلول وابسته است. با افزایش غلظت گلوکز، رنگ آبی محلول افزایش یافت. بر این اساس، رابطه خطی بین غلظت گلوکز و شدت رنگ آبی در طول موج ۶۵۰ نانومتر دیده شد. حد تشخیص تجربی اندازه گیری گلوکز با این روش 1×10^{-5} M به دست آمد. همچنین سنجه فوق انتخابگری خوبی نیز برای اندازه گیری گلوکز در حضور مزاحمت های فروکتوز، لاکتوز و مالتوز از خود نشان داد.

واژگان کلیدی: نانوزیم ها، گلوکز، نانوذرات مغناطیسی، نانوسریا، نقاط کربنی.

Fa.Honarasa@iau.ac.ir

۱- مقدمه

دیابت یکی از بیماری های خطرناکی است که در کمین بشر است. این بیماری مزمن دارای عواقب انسانی، اجتماعی و اقتصادی گسترده ای می باشد. علت ایجاد این بیماری، عدم تولید یا ترشح انسولین کافی است که مانع توانایی سلولها در هضم گلوکز از خون می شود[۱،۲]. تولید کم انسولین در لوزالمعده منجر به دیابت نوع ۱ می شود که با افت ناگهانی سطح گلوکز مشخص می شود. از طرف دیگر، استفاده بی اثر از انسولین منجر به دیابت نوع ۲ می شود که با سطح بالایی از گلوکز مشخص می شود. هر دو بیماری درمانی ندارند، به این معنی که کنترل منظم گلوکز در افراد دیابتی تا پایان عمر لازم است[۳]. به طور کلی، روش های الکتروشیمیایی و نوری به طور گسترده ای برای اندازه گیری گلوکز مورد استفاده قرار گرفته اند. از جمله روش های نوری می توان به جذب سنجی، انعکاس سنجی، فلورسانس و تشدید پلاسمون سطحی اشاره کرد[۴]. در این راستا جذب سنجی و به دنبال آن رنگ سنجی یکی از ساده ترین ابزارهای اندازه گیری را در اختیار می گذارند. در اندازه گیری های رنگ سنجی معمولا در ابتدا گلوکز با اکسیژن در حضور گلوکز اکسیداز واکنش داده و گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تولید می شود. در ادامه آب اکسیژنه تولید شده با یک بستر رنگ زا مانند ۳،۳'،۵،۵'–تترامتیل بنزیدین(TMB) و در حضور آنزیم پراکسیداز ترب کوهی واکنش داده و محصول واکنش تولید رنگ آبی در محلول می کند. سپس شدت رنگ آبی تولید شده با استفاده از دستگاه جذب سنجی اندازه گیری می شود. به دلیل این که شدت رنگ آبی محلول با

تاریخ دریافت : ۱۴۰۱/۷/۳۰
تاریخ پذیرش : ۱۴۰۱/۸/۲۷

غلظت گلوکز رابطه مستقیم دارد می توان از این روش برای رنگ سنجی گلوکز استفاده کرد[۵]. اما مشکلاتی مانند ماندگاری کوتاه مدت، گران قیمت بودن و عدم پایداری در محیط های اسیدی باعث محدودیت هایی در استفاده از آنزیم های طبیعی در این روش شده است. در این بین، آنزیم های مصنوعی معرفی و مورد استفاده قرار گرفته اند.

با معرفی نانوساختارها و شناخت خصوصیات جالب آن ها دریچه ای شگفت انگیز به روی علاقمندان علوم مختلف باز شد. نانوزیم ها به عنوان دسته ی بزرگی از آنزیم های مصنوعی شناخته می شوند. این ترکیبات در واقع نانوساختارهایی هستند که خصوصیت شبه آنزیمی از خود نشان می دهند. نانوزیم ها نسبت به آنزیم های طبیعی دارای مزایایی هستند که از جمله آنها می توان به قیمت ارزان، پایداری در شرایط مختلف و کارایی بالا اشاره کرد[۶].

نانوکامپوزیت ها به عنوان دسته ای از نانوساختارها شناخته می شوند که خواصی فراتر از خواص مواد اولیه تشکیل دهنده خود دارا هستند. بر این اساس تاکنون نانوکامپوزیت های زیادی به عنوان نانوزیم معرفی شده اند. از جمله این مواد می توان به نانوکامپوزیت های کربنی اشاره کرد[۷،۸]. یکی از این نانوکامپوزیت هایی که به تازگی به عنوان یک شبه آنزیم معرفی و استفاده شده است نانوکامپوزیت Fe_3O_4/CeO_2/C-dots می باشد که متشکل از اکسید مغناطیسی آهن، اکسید سریم و نقاط کربنی است[۹]. نانوکامپوزیت فوق خصوصیت شبه آنزیم پراکسیداز از خود نشان داده و در این راستا برای اندازه گیری رنگ سنجی و الکتروشیمیایی آب اکسیژنه از آن استفاده شده است. در مطالعه فوق سعی بر این است که روش رنگ سنجی برمبنای نانوکامپوزیت فوق طراحی شود تا بتوان از آن برای اندازه گیری رنگ سنجی گلوکز استفاده کرد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و تجهیزات

دوده با سوزاندن شمع جمع آوری شد. نیترات آمونیوم سریک ۹۹٪ (مرک) ، $FeCl_3$ ۹۷٪(سیگما)، Na_2SO_3 ۹۸٪ (سیگما)، H_2O_2 ۳۵٪ (مرک) ،گلوکز اکسیداز(سیگما) و ۳، ۳′، ۵، ۵′-تترامتیل بنزیدین ۹۹٪ (TMB) (سیگما) با درجه تجزیه ای خریداری شده و بدون تصفیه بیشتر استفاده شدند. تمام مواد شیمیایی دیگر نیز از سیگما خریداری شده اند. همچنین در کل آزمایش ها از آب مقطر استفاده شد.

C-dots و نانوذرات Fe_3O_4 همانطور که در جاهای دیگر توضیح داده شده، سنتز شدند[۶]. همچنین نانوذرات Fe_3O_4/CeO_2 بر اساس گزارش قبلی تهیه شدند[۱۰]. سپس از نانوذرات Fe_3O_4/CeO_2 و C-dots به عنوان پیش ساز برای تهیه نانوکامپوزیت Fe_3O_4/ CeO_2/C-dots استفاده شد. به این ترتیب که محلول های Fe_3O_4/CeO_2 و C-dots با نسبت ۸:۱ در pH 2.0 با هم مخلوط شدند و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شدند. سپس محصول نهایی تحت یک میدان مغناطیسی خارجی (آهن ربای دائمی، T ۱/۴) جمع آوری شد. در نهایت محصول فوق دو بار با ۵ میلی لیتر آب خالص شستشو داده شده و در دمای اتاق خشک شد.

از طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مدل PerkinElmer FTIR Spectrum RX I برای شناسایی گروه های عاملی استفاده شد. همچنین برای ارزیابی ساختارهندسی نانوکامپوزیت از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) Zeiss، EM10C (ولتاژ شتاب دهنده ۸۰ کیلوولت) استفاده شد. طیف های جذب مرئی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Hach DR5000 جمع آوری شدند. pH محلول توسط pH متر Metrohm (مدل ۷۸۰) اندازه گیری شد.

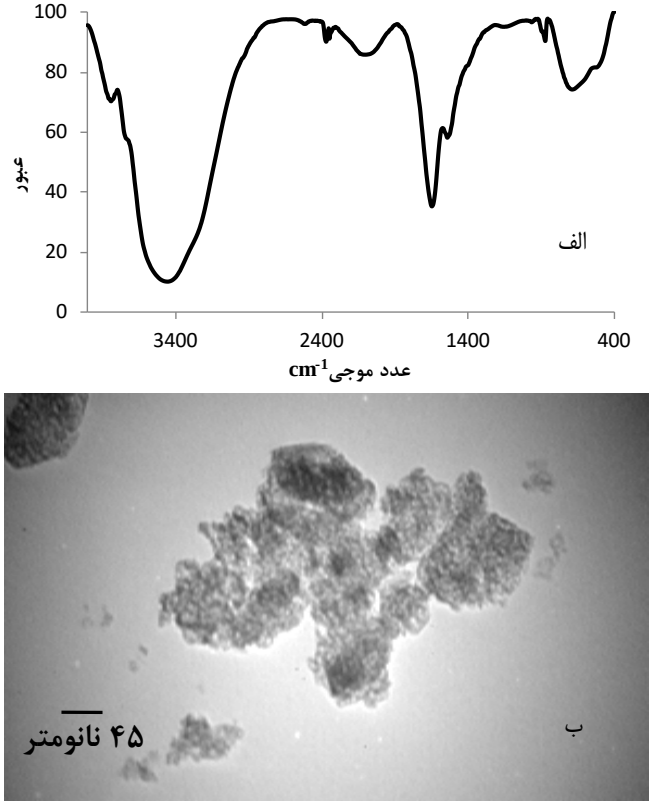
۲-۲- روش انجام آزمایش

برای تشخیص گلوکز، در ابتدا محلول هایی با غلظت های مختلف گلوکز به همراه ۵۰ میکرولیتر گلوکز اکسیداز (GOx) $100U\ mL^{-1}$ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس ۱ میلی گرم نانوکامپوزیت، ۲/۱ میلی لیتر بافر استات با pH= ۲/۴ و ۵۰۰ میکرولیتر TMB با غلظت $1/2\ mg\ mL^{-1}$ به همه ی محلول ها اضافه شد. درنهایت طیف جذبی پس از ۱۵ دقیقه جمع آوری شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی نانوکامپوزیت

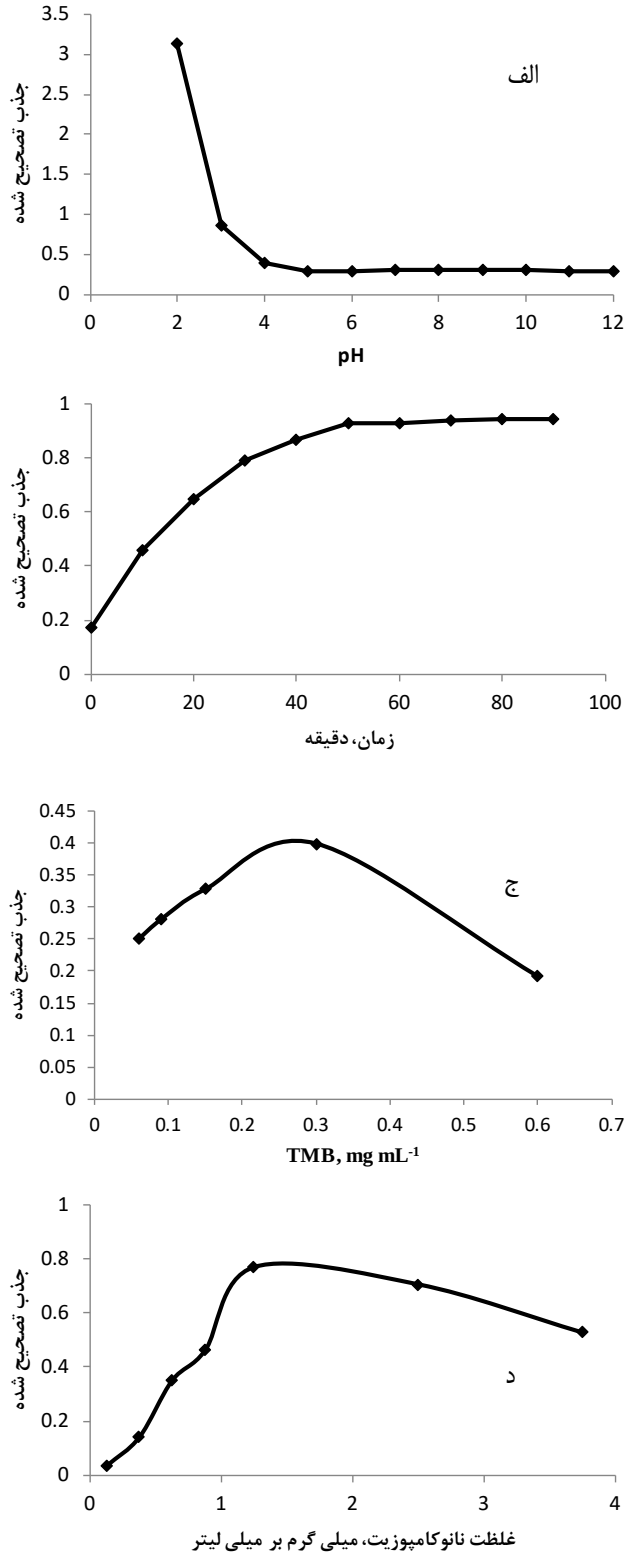
پس از سنتز نانوکامپوزیت $Fe_3O_4/CeO_2/C$-dots، از روش های مختلف تجزیه ای جهت مشخصه یابی آن استفاده شد. نتایج بدست آمده در شکل ۱ آورده شده است. در ابتدا از طیف سنجی مادون قرمز-تبدیل فوریه استفاده شد(شکل ۱-الف.) در شکل، پیک وسیع در cm^{-1} ۳۵۰۰~ به دلیل ارتعاشات کششی O-H آب در نمونه است. نوار ارتعاشی Fe-O نیز در cm^{-1} ۶۰۰~ مشاهده می شود. همچنین، نوار قابل توجهی از نانوسریا در cm^{-1} ۸۳۰~ در نانوکامپوزیت وجود دارد[۹]. در مرحله بعد، تصویر TEM نانوکامپوزیت گرفته شد (شکل ۱-ب). به طور قابل‌توجهی، تمایل به تشکیل خوشه‌بندی برای گروه‌های ذرات هم محور مشاهده می‌شود که مشابه آن چیزی است که قبلا گزارش شده است[۹]. بنابراین به نظر می رسد که نانوکامپوزیت مشابه با آنچه قبلا گزارش شده به درستی سنتز شده است.



شکل ۱: (الف) طیف □□□□ و (ب) تصویر □□□ از نانوکامپوزیت

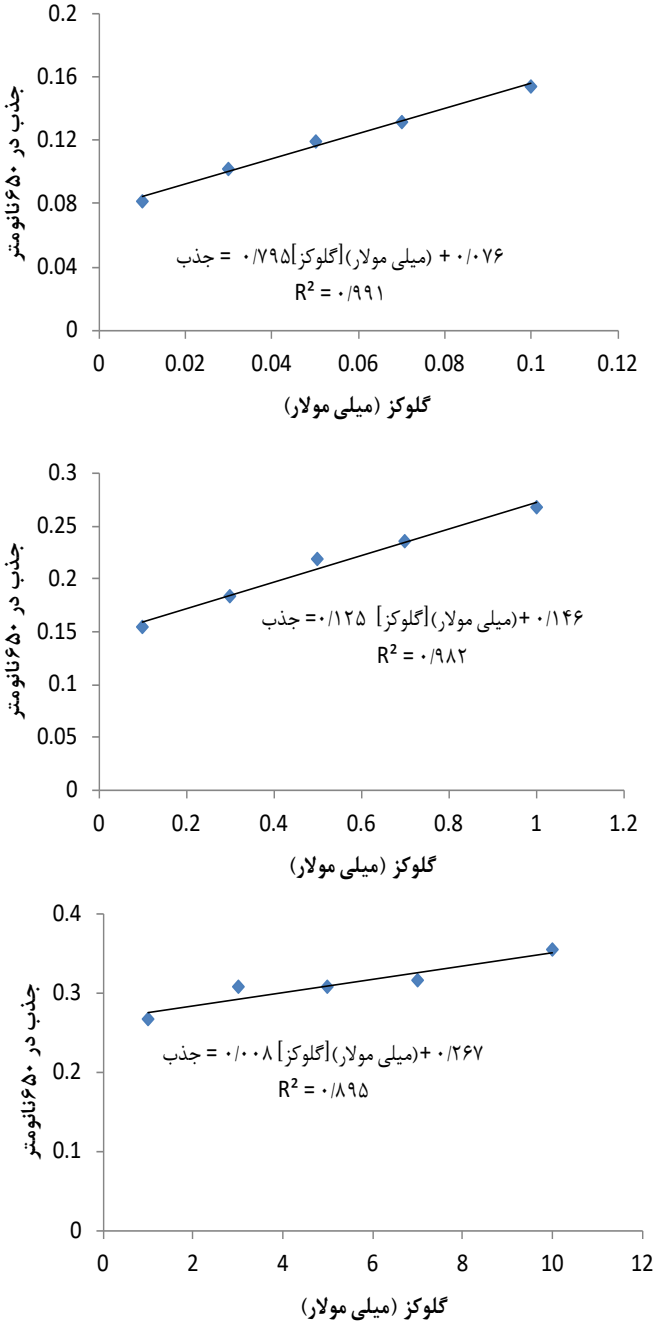
۳-۲- اندازه گیری گلوکز توسط نانوکامپوزیت

قبلا خصوصیت شبه آنزیم پراکسیدازی نانوکامپوزیت $Fe_3O_4/CeO_2/C$-dot به اثبات رسیده است[۹]. علت خصوصیت شبه آنزیمی خوب نانوکامپوزیت فوق حضور همزمان سه نانوزیم مجزا در این ترکیب است. بر این اساس از نانوکامپوزیت فوق در اندازه گیری شیمیایی و همچنین الکتروشیمیایی هیدروژن پراکسید استفاده شده است[۹]. در کار حاضر توانایی نانوکامپوزیت فوق در اندازه گیری گلوکز بررسی می شود. در روش متداول اندازه گیری رنگ سنجی گلوکلز، ابتدا گلوکز در حضور آنزیم گلوکز اکسیداز با اکسیژن محلول واکنش داده و هیدروژن پراکسید تولید می کند. سپس در مرحله بعد هیدروژن پراکسید تولید شده در حضور آنزیم گلوکز اکسیداز با تترا متیل بنزیدین(TMB) واکنش داده و رنگ محلول به آبی تغییر پیدا می کند. هرچه غلظت گلوکز بیشتر باشد شدت رنگ آبی در طول موج ۶۵۰ نانومتر افزایش می یابد. بنابراین با دنبال کردن جذب مرئی در این طول موج می توان غلظت گلوکز موجود در محلول را مشخص کرد. هدف از انجام کار حاضر جایگزین کردن نانوکامپوزیت$Fe_3O_4/CeO_2/C$-dots به جای پراکسیداز ترب کوهی در سنجه فوق است. برای انجام این کار ابتدا پارامترهای تاثیرگذار بر اندازه گیری گلوکز بررسی شد(شکل ۲). اولین متغیری که بررسی شد pH محلول گلوکز بود. همانگونه که در شکل ۲-الف دیده می شود بیشترین جذب مربوط به pH= ۲/۰ است. بنابراین این pH به عنوان pH بهینه در اندازه گیری گلوکز استفاده شد. اثر زمان نیز در شکل ۲-ب آورده شده است. همان گونه که مشخص است، در ابتدا با افزایش زمان جذب مرئی افزایش می یابد تا اینکه در زمان ۵۰ دقیقه به مقدار ثابتی می رسد. بنابراین در ادامه کار زمان ۵۰ دقیقه به عنوان بهینه انتخاب شد. در مرحله بعد تاثیر مقدار TMB بررسی شد. همانگونه که در شکل ۲-ج مشخص است، با افزایش مقدار TMB یک روند افزایشی در جذب دیده می شود و سپس روند بصورت کاهشی دیده می شود. بنابراین بیشینه نمودار یعنی مقدار ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان مقدار بهینه TMB انتخاب شد. از طرف دیگر، طبق گزارش های قبلی مقدار نانوزیم/آنزیم یکی دیگر از عوامل تاثیرگذار در اندازه گیری گلوکز است.



شکل ۲: وابستگی شدت رنگ آبی در سنجش گلوکز به (الف) pH، (ب) زمان، (ج) غلظت □□□، و (د) مقدار نانوکامپوزیت

بنابراین اثر مقدار نانوکامپوزیت نیز بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده در شکل ۲-د ، مقدار ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر که



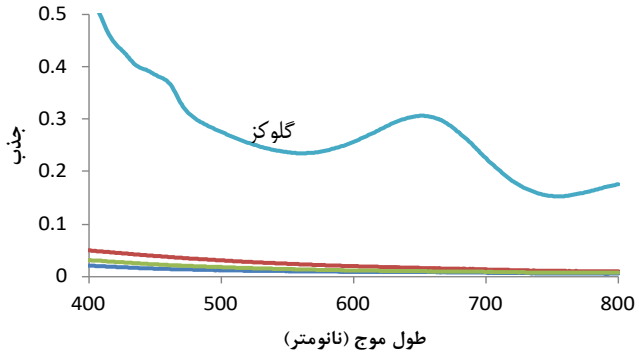
شکل ۳. محدوده های خطی به دست آمده برای اندازه گیری گلوکز توسط روش پیشنهادی

بیشترین مقدار جذب را نشان می دهد به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

با توجه به نتایج به دست آمده از نانوکامپوزیت Fe_3O_4/CeO_2/C-dots برای اندازه گیری گلوکز استفاده شد. نتایج به دست آمده دارای سه محدوده خطی است(شکل ۳). محدوده های خطی مشاهده شده شامل 1×10^{-5} M – 1×10^{-4}، 1×10^{-4} M – 1×10^{-3} و همچنین 1×10^{-3} M – 1×10^{-2} می

باشند. همچنین حد تشخیص تجربی 1×10^{-5} M برای اندازه گیری گلوکز توسط این روش به دست آمد. طبق گزارش های قبلی، حد تشخیص اندازه گیری گلوکز توسط نانوذرات Fe_3O_4 [۱۱] و $Fe_3O_4@CeO_2$ [۱۲] به ترتیب برابر با 3×10^{-5} M و $2/1\times10^{-5}$ M است. همان گونه که مشخص است حد تشخیص اندازه گیری گلوکز نسبت به روش های قبلی گزارش شده ی مشابه کمی بهبود یافته است.

برای بررسی انتخابگری روش، پاسخ قندهای مشابه با گلوکز یعنی فروکتوز، مالتوز و لاکتوز بررسی شد. برای انجام این کار محلول هریک از قندها در مجاورت گلوکز اکسیداز قرار گرفته و پس از افزایش TMB و نانوکامپوزیت فوق از هریک از آنها طیف مرئی گرفته شد. نتایج حاصل در شکل ۴ آورده شده اند. همان گونه که مشخص است روش فوق از انتخابگری خوبی برخوردار است.



شکل ۴. مقایسه ی پاسخ فروکتوز، مالتوز، لاکتوز و گلوکز در سنجه ی پیشنهادی

٤- نتیجه گیری

نکات عملکرد نانوکامپوزیت Fe_3O_4/CeO_2/C-dot به عنوان یک شبه آنزیم پراکسیداز در در یک سنجه رنگ سنجی برای اندازه گیری گلوکز بررسی شد. در این راستا، پاسخ مشاهده شده وابسته به مقدار TMB، pH، زمان و غلظت نانوکامپوزیت است. منحنی کالیبراسیون به دست آمده بسیار وسیع و حاوی سه محدوده ی خطی است. نتایج به دست آمده حاکی از حد تشخیص بهتر نانوکامپوزیت فوق نسبت به Fe_3O_4 و $Fe_3O_4@CeO_2$ است. همچنین استفاده از نانوکامپوزیت فوق در سنجه ی اندازه گیری گلوکز انتخابگری خوبی نشان می دهد.

مراجع

1. K. Soganci, H. Bingol, and E. Zor, J. Electroanal. Chem. 114801 (2020).

2. A. Abellán-Llobregat, I. Jeerapan, A. Bandodkar, L. Vidal, A. Canals, J. Wang, and E. Morallón, Biosens. Bioelectron. **91**, 885 (2017).

3. W. Villena Gonzales, A. Mobashsher, and A. Abbosh, Sensors **19**, 800 (2019).

4. C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, and S. Yao, RSC Adv. **3**, 4473 (2013).

5. S. Sadravi and F. Honarasa, J. Chem. Sci. **131**, 58 (2019).

6. S. Yousefinejad, H. Rasti, M. Hajebi, M. Kowsari, S. Sadravi, and F. Honarasa, Sensors Actuators B Chem. **247**, 691 (2017).

7. F. Honarasa, F. H. Kamshoori, S. Fathi, and Z. Motamedifar, Microchim. Acta **186**, 234 (2019).

8. F. Honarasa, F. Peyravi, and H. Amirian, J. Iran. Chem. Soc. **17**, 507 (2020).

9. F. Honarasa, S. Keshtkar, N. Eskandari, and M. Eghbal, Chem. Pap. (2021).

10. M. B. Gawande, V. D. B. Bonifácio, R. S. Varma, I. D. Nogueira, N. Bundaleski, C. A. A. Ghumman, O. M. N. D. Teodoro, and P. S. Branco, Green Chem. **15**, 1226 (2013).

11. H. Wei and E. Wang, Anal. Chem. **80**, 2250 (2008).

12. F. Huang, J. Wang, W. Chen, Y. Wan, X. Wang, N. Cai, J. Liu, and F. Yu, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. **83**, 40 (2018).

Chemical Research & Nanomaterials(CRN)
crn.shiraz.iau.ir
پژوهش های شیمیایی و نانومواد

Colorimetric determination of glucose using Fe_3O_4/CeO_2/C-dots magnetic nanocomposite

Y. Ezhdehakosh Abolverdi, F. Honarasa*

Department of Chemistry, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Abstract: In the present study, determination of glucose was performed based on peroxidase-like activity of Fe_3O_4/CeO_2/C-dot nanocomposite. In this way, a cascade reaction was used. At first, glucose in the presence of glucose oxidase enzyme reacts with oxygen to produce gluconic acid and H_2O_2. Then, in the second step, H_2O_2 in the presence of Fe_3O_4/CeO_2/C-dot converts TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine) to oxTMB which causes the solution to turn blue. Intensity of blue color depends on glucose concentration, nanocomposite amount, TMB concentration and solution pH. Absorbance of solution at 650 nm was increased by increasing the glucose concentration. So, linear range between glucose concentration and intensity of absorbance at 650 nm was observed. Experimental detection limit for glucose detection was obtained as 1×10^{-5} M. Also, the sensing system shows high selectivity towards the detection of glucose in the presence of fructose, lactose and maltose as interferences.

Keywords: Nanozymes, Glucose, Magnetic nanoparticles, Nanoceria, Carbon dots.

*Correspondent Author Email: *Fa.Honarasa@iau.ac.ir*