

حسگرهای آنزیمی اصلاح شده با نانوذرات برای اندازه‌گیری کولین و استیل کولین در نمونه‌های غذایی و زیستی (بخش اول: الکترودهای کربنی)

مسلم جهانی* و علیرضا جهانی

استادیار پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی مشهد، مشهد، ایران
دانشجوی کارشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد، یزد، ایران

m.jahani@rifst.ac.ir

چکیده

کولین ترکیبی شبه ویتامینی، از مواد مغذی اساسی و موثر در مسیرهای متابولیکی مهم است که برای توسعه مغز به ویژه در مرحله جنینی اهمیت داشته، در سنتز استیل کولین نقش دارد و مقادیر غیرطبیعی آن، نشانه‌ای از شرایط بیماری است. امروزه کولین و استیل کولین به غذاهای خاص اضافه می‌شوند و بنابراین اندازه‌گیری آن‌ها در صنایع غذایی و نیز آنالیزهای بالینی اهمیت دارد. معمولاً از روش‌های کروماتوگرافی استفاده می‌شود، اما مراحل آماده‌سازی سخت، زمان جداسازی طولانی، استفاده از حجم بالای نمونه و فاز متحرک و نیاز به کاربر ماهر، کاربرد این تکنیک‌ها را محدود می‌سازد. در همین زمینه، حسگرهای آنزیمی با مزایای سبز بودن، حساسیت بالا و کاربرد آسان مورد توجه قرار گرفته‌اند. در آن‌ها، پروکسید هیدروژن به عنوان محصول واکنش آنزیمی به روش الکتروشیمیایی و یا نوری اندازه‌گیری می‌شود. در این مقاله مروری، پژوهش‌های منتشر شده (از سال ۲۰۰۰ میلادی) در زمینه کاربرد نانوذرات در طراحی این حسگرها و اندازه‌گیری کولین و استیل کولین بررسی شده است. استفاده از نانومواد، تثبیت بیشتر و پایداری بالاتر آنزیم همراه با حفظ فعالیت زیستی، بهبود انتقال الکترون و کاهش مقاومت و در نتیجه بهبود ارقام شایستگی روش را به همراه دارد.

کلمات کلیدی: نانوذرات، حسگر آنزیمی، کولین، استیل کولین، روش‌های الکتروشیمیایی

مقدمه

و در سنتز فسفولیپیدها نقش دارد. همچنین متابولیت استیل کولین (AcCh) (انتقال دهنده عصبی) است که در پشتیبانی و نگهداری از سیستم عصبی، عملکردهای متابولیکی و انتقال پیام‌های عصبی در شبکه عصبی مرکزی و محیطی نقش حیاتی دارد. کاهش مقدار AcCh فرد را

کولین (Cho)، نوعی ویتامین B، ماده مغذی مهمی برای انسان است که می‌تواند متابولیسم چربی در کبد و کلیه را ارتقاء دهد. این ترکیب یک نمک آمونیوم نوع چهارم بوده

در تامین کولین خوراکی دارد و ۱۷/۹٪ از جذب Cho خوراکی در خانم‌ها را شامل می‌شود. برای بدست آوردن مقدار کولین معادل یک تخم‌مرغ باید ۳ و یک چهارم فنجان شیر بدون چربی یا ۱۰۰ گرم جوانه گندم مصرف کرد که البته هر دوی آن‌ها کالری بیشتری نسبت به یک تخم‌مرغ دارند. سبوس و جوانه گندم، چغندر، اسفناج و ماکارونی غذاهای غنی از بتائین هستند (۷-۹).

روش های اندازه‌گیری کولین

با توجه به نقش غذایی و بالینی Cho در تشخیص برخی از بیماری‌ها، توسعه روش‌های حساس و دقیق برای اندازه‌گیری آن مهم است. کولین فاقد گروه‌های عاملی مناسب (کروموفور، فلئوروفور و یا الکتروفعال) است و برای اندازه‌گیری آن نمی‌توان از روش‌های متداول آنالیز ترکیبات زیستی استفاده کرد و اغلب مشتق‌سازی اولیه و تولید ترکیباتی برای تشخیص راحت‌تر، ضروری است. متداول‌ترین روش، کروماتوگرافی مایع در تلفیق با تبدیل آنزیمی پس از ستون با استفاده از آنزیم‌های کولین اکسیداز (ChOx) و استیل کولین استراز (AcChE) است. از روش‌های نورتابی شیمیایی (Chemiluminescence) (۵)، نورتابی الکتروشیمیایی (Electrochemiluminescent) (۵، ۱۰، ۱۱)، رزونانس مغناطیسی هسته (۱۲)، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (۱۳) و کروماتوگرافی مایعی-طیف‌سنجی جرمی (۷، ۱۴، ۱۵) نیز استفاده شده است. این روش‌ها قابل اطمینان هستند، اما گران و زمان‌بر بوده و به مراحل پیش پردازش، استخراج و مشتق‌سازی نیاز دارند. روش‌های لومینوسانس و فلورسانس هم هنوز از عدم پایداری سیگنال‌های نشری رنج می‌برند (۱، ۲، ۶، ۱۶).

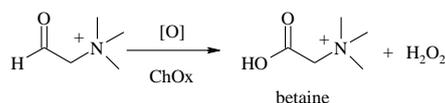
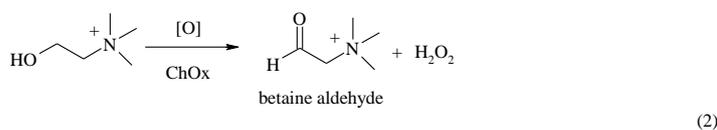
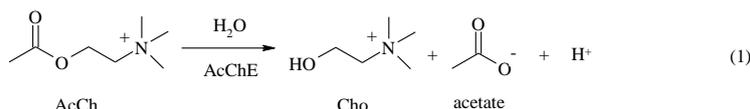
از روش‌های الکتروشیمیایی نیز استفاده شده و حسگرهای آمپرومتری آنزیمی به دلیل پاسخ سریع، حساسیت بالا،

مستعد اختلالات عصبی مختلف (پارکینسون، آلزایمر و ام‌اس) می‌نماید و در مغز افراد مبتلا به آلزایمر، کاهش قابل توجه غلظت Cho، AcCh و پروتئین‌هایی که واسطه اثرات آن‌ها هستند (استیل کولین استراز و کولین استیل ترانسفراز) رخ می‌دهد. افزایش مقدار آن نیز سبب کاهش ضربان قلب و افزایش تولید بزاق می‌شود. به همین دلیل، استفاده از مواد غذایی غنی از Cho و AcCh برای این افراد توصیه می‌شود. در مبتلایان به سرطان سینه، سطوح غیرطبیعی و بالا از کولین ($0.4-4.9 \text{ mmol/kg}$) و ترکیبات مرتبط با آن یافت می‌شود و به همین دلیل، اندازه‌گیری مقدار Cho در سلول‌ها، می‌تواند به تشخیص آن کمک کند. کولین پیش‌ساز سنتز فسفاتیدیل کولین (چربی غشاء سلولی) و بتائین نیز می‌باشد و برای یکپارچگی غشاء سلولی و متابولیسم لیپیدها اهمیت دارد. وجود Cho در رژیم غذایی بر سیگنال‌دهی آپوپروتیک در سلول‌های عصبی و کبد، بسته شدن کانال عصبی و انتقالات کبدی لیپوپروتئین‌ها اثر می‌گذارد (۱، ۴). کولین می‌تواند در کبد و کلیه به بتائین اکسید شود که در چرخه متیونین به عنوان یک دهنده مهم گروه متیل عمل کرده و برای تولید متیونین لازم است. در سال ۱۹۹۸، انستیتوی پزشکی رسما Cho را به عنوان یک ماده مغذی اساسی معرفی نموده و در حال حاضر Cho و AcCh، به طور گسترده به مواد غذایی (شیر، غذای نوزاد و غذاهای محافظ سلامت) افزوده می‌شوند و به همین دلیل تعیین کمی این دو ترکیب در آنالیزهای بالینی (سرم، صفرا، مایع آمنیوتیک، مایع مغزی)، محصولات دارویی، صنایع غذایی، افزودنی‌های خوراکی و بسیاری از زمینه‌های دیگر اهمیت دارد (۱، ۵، ۷).

تخم‌مرغ، شیر، جگر، جوانه گندم و شیر مادر، از منابع اصلی Cho هستند. تخم‌مرغ غنی‌ترین منبع غذایی کولین است، اما با توجه به مقدار مصرف، شیر بالاترین سهم را

" مسلم جهانی و علیرضا جهانی، حسگرهای آنزیمی اصلاح شده با نانوذرات"

روش به دلیل واکنش آنزیمی، انتخاب پذیری استثنایی دارد و حساسیت بالای آن هم ناشی از تشخیص الکتروشیمیایی H_2O_2 است. پروکسید هیدروژن به راحتی در پتانسل $+0.5 V$ (نسبت به الکتروود مرجع $Ag/AgCl$) تشخیص داده می شود و جریان حاصل متناسب با غلظت Cho یا $AcCh$ است (۴، ۱۶).

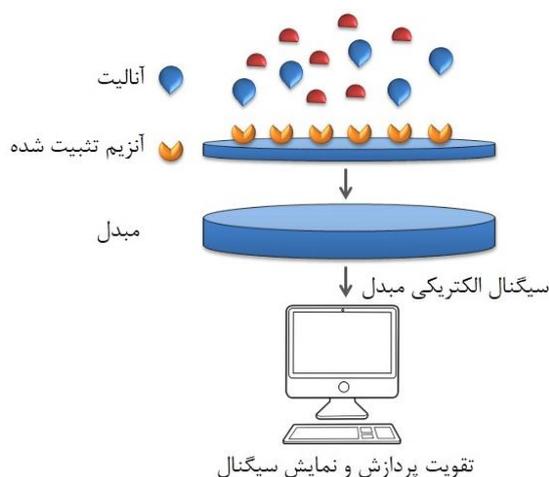


شکل ۱- مسیر واکنش های آنزیمی کولین و استیل کولین (۴)

سیگنال زیستی را به سیگنال قابل اندازه گیری تبدیل می نماید (شکل ۲). این ابزارها نسبت به گونه مورد اندازه گیری (آنالیت) حساس و گزینش پذیر هستند (۱۷، ۱۸).

اندازه گیری کولین به روش آنزیمی

هر حسگر شیمیایی از یک مبدل جفت شده با جزء شناسایی انتخاب پذیر، تشکیل شده است. یک حسگر زیستی (Biosensor) متمایز از یک حسگر شیمیایی است زیرا یک شناساگر زیستی متصل به مبدل دارد و یک



شکل ۲- اجزاء یک حسگر زیستی آنزیمی

کوچک (۱۰-۱۰۰nm)، خواص فیزیکی، شیمیایی و الکتریکی ویژه‌ای دارند که با خصوصیات مواد در حالت توده‌ای (Bulk) متفاوت است. به همین دلیل از آن‌ها می‌توان برای ساخت ابزارهای تشخیصی و نیز بهبود حساسیت حسگرهای شیمیایی و زیستی استفاده کرد. در طراحی حسگرها از انواع مختلفی از NPs (فلزی، اکسیدی، نیم رسانا و نانوذرات مرکب) استفاده شده که بر مبنای خواص منحصربرفردشان نقش‌های متفاوتی ایفا می‌کنند. به طور کلی نقش اصلی NPs در حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی به پنج دسته تقسیم می‌شود (۲۲).

۱- **تثبیت مولکول زیستی:** به دلیل مساحت سطح ویژه و نیز انرژی آزاد سطح بالا، NPs توانایی جذب محکم مولکول‌های زیستی را دارند. جذب مستقیم این مولکول‌ها روی سطح برهنه مواد توده‌ای، اغلب فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهد. در حالی که جذب بر روی NPs این تاثیر را ندارد. بسیاری از این NPs باردار هستند و می‌توانند مولکول‌های زیستی را به شکل الکترواستاتیک جذب کنند، ضمن این‌که برهمکنش‌های دیگری مانند تشکیل پیوندهای کووالانسی (نانوذرات طلا و گروه‌های آمین و نیز واحدهای سیستئین در پروتئین‌ها) نیز می‌تواند موثر باشد. نانوذرات طلا (GNPs) احتمالاً بیشترین استفاده را برای تثبیت پروتئین‌ها داشته‌اند. نانوذرات SiO_2 هم به دلیل سازگاری زیستی خوب و تهیه آسان، مواد فوق‌العاده‌ای برای این منظور هستند. از نانوذرات دیگری مثل Pt, Ag, TiO_2 , ZnO هم می‌توان استفاده کرد (۲۲).

۲- **کاتالیز کردن واکنش‌های الکتروشیمیایی:** بسیاری از NPs، به ویژه نانوذرات فلزی، خواص کاتالیزوری ویژه‌ای دارند و ورود آن‌ها به حسگرهای الکتروشیمیایی، سبب کاهش اضافه ولتاژ در خیلی از واکنش‌ها و حتی تحقق

حسگرهای زیستی مبتنی بر آنزیم ChOx، امیدوار کننده‌ترین روش برای تشخیص Cho در نمونه‌های زیستی، صنعتی و زیست محیطی می‌باشند. مکانیسم عملکرد آن‌ها مبتنی بر واکنش اکسایش آنزیمی کولین است که مرحله اول آن هیدرولیز استیل کولین و مرحله دوم اکسایش کولین است (شکل ۱). در ادامه، اکسایش H_2O_2 در سطح الکتروود کار رخ می‌دهد (معادله ۱). مقدار جریان مستقیماً متناسب با غلظت استیل کولین/کولین و فعالیت آنزیم است و همان‌گونه که مشاهده می‌شود، برای اندازه‌گیری AcCh نیاز است تا به صورت همزمان از ChOx و AcChE استفاده شود (شکل ۱) (۱۶, ۱۹, ۲۰).



در این سیستم شناسایی، واکنش الکتروودی معمولاً در پتانسیل نسبتاً بالایی (حدود ۰/۷ V نسبت به الکتروود کالومل) انجام شده و به راحتی تحت تاثیر مزاحمت سایر گونه‌های الکتروفعال نمونه واقع می‌شود.

در نوع دیگری از حسگرهای آنزیمی، از ChOx به همراه پروکسیداز ترب کوهی (Horeeradish peroxidase) HRP استفاده می‌شود. در این حسگرها، اندازه‌گیری پاسخ جریان مبتنی بر احیاء HRP در حضور یک میانجی (Mediator) ردوکس است که نقش مهمی در تسریع انتقال الکترون میان HRP و سطح الکتروود دارد (۲۱). تلفیق انتخاب‌پذیری زیستی و عملکرد انتخابی آنزیم‌ها با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات (NPs) اجازه توسعه حسگرهای زیستی جدید با قابلیت‌های بهبود یافته را می‌دهد (۱۶, ۱۷).

استفاده از نانو ساختارها در طراحی حسگرهای زیستی

نانومواد مختلف، حوزه‌های کاربردی متفاوتی در بسیاری از روش‌های تجزیه‌ای یافته‌اند. آن‌ها به دلیل اندازه بسیار

مواد توده‌ای هستند. به عنوان مثال، MnO_2 در حالت توده‌ای تجزیه H_2O_2 را کاتالیز می‌نماید در حالی که نانوذرات آن می‌توانند مستقیماً با H_2O_2 واکنش دهند. با استفاده از خصوصیات فعال NPs و استفاده از آن‌ها به عنوان واکنشگرهای ویژه، می‌توان سیستم‌های الکتروتجزیه‌ای نوینی تهیه نمود. امید می‌رود تا نانوذرات دیگر با توانایی واکنش‌پذیری منحصر بفرد هم برای توسعه حسگرهای جدید مطالعه شوند. به عنوان مثال خواص PbO_2 و CeO_2 شبیه به MnO_2 است و بنابراین نانوذرات آن‌ها نیز ممکن است واکنش‌پذیری ویژه مشابهی داشته باشند (۲۲).

الکترودهای کربنی اصلاح شده با نانوذرات برای اندازه‌گیری کولین و استیل کولین

دامنه پتانسیل وسیع، جریان زمینه کم، ارزانی و بی‌اثر بودن، سبب شده الکترودهای پایه کربنی به طور گسترده در ساخت حسگرها استفاده شوند. انواع مختلفی از ترکیبات کربن مانند گرافیت، کربن شیشه‌ای، الماس، نانوذرات کربنی، گرافیت پیرولیتی، فیبرهای کربنی و نانولوله‌های کربنی (CNTs) در تهیه الکترودها به کار رفته‌اند (۲۳).

الکترودهای خمیر کربنی (Carbon paste electrode: CPE) مخلوطی از پودر گرافیت و یک مایع خمیر کننده نارسا و نامحلول در آب (نوجول، روغن پارافین، گریس سیلیکون و بروموفتالین) است. آن‌ها با سهم جریان زمینه خیلی کم، ارزانی، قابلیت ترکیب شدن با مواد مختلف (در طول تهیه خمیر)، سادگی تهیه، تجدید سطح آسان و سهولت کوچک‌سازی به طور گسترده‌ای به کار رفته‌اند (۲۴، ۲۵). خمیر کربنی، بافتی مناسب برای استقرار ترکیبات اصلاح کننده دارد و می‌توان ماده اصلاح کننده (همانند آنزیم) را بدون نیاز به اتصال دهنده جداگانه، به آن افزوده و

برگشت‌پذیری برخی از واکنش‌های ردوکس (که در الکترودهای اصلاح نشده معمولی برگشت ناپذیر هستند) می‌شود. GNPs از نانومواد پرکاربرد با ویژگی کاتالیزوری در واکنش‌های الکتروشیمیایی هستند. خواص کاتالیزوری نانوذرات Pt نیز در اکسایش پروکسید هیدروژن تایید شده است (۲۲). نانوذرات اکسید فلزی هم (SnO_2 , Fe_3O_4 , TiO_2 , ZnO , ZrO_2) خصوصیات ویژه‌ای به عنوان کاتالیزور و نیز شبیه ساز غشاءهای زیستی دارند (۶).

۳- بهبود انتقال الکترون: آنزیم اغلب اتصال الکترونی مستقیم با الکترودها ندارد. خصوصیات رسانایی NPs (معمولاً نانوذرات فلزی) سبب شده تا به عنوان میانجی‌های انتقال بار برای بهبود انتقال الکترون استفاده شوند. کاربرد نانوذرات Ag، نانوذرات غیر فلزی مثل نانوذرات اکسیدی (TiO_2 , ZrO_2 , MnO_2 , Fe_3O_4) و نیم رسانا (CdS) گزارش شده است (۲۲).

۴- نشانه‌گذاری (Labeling) مولکول زیستی: مولکول‌های زیستی نشان‌دار شده با NPs می‌توانند فعالیت خود را حفظ کرده و با همتایان خود برهمکنش داشته باشند و بر مبنای تشخیص الکتروشیمیایی NPs، می‌توان مقدار یا غلظت آنالیت‌ها را تعیین نمود. انحلال این NPs (اغلب نانوذرات فلزی و نیم رسانا)، و اندازه‌گیری یون‌های حل شده با روش ولتامتری برهنه‌سازی، یک روش الکتروتجزیه‌ای عمومی و قدرتمند برای اندازه‌گیری مقادیر ناچیز از آنالیت‌ها ارائه می‌نماید. به این منظور از نانوذرات Au, Ag و نانوذرات فلزی هسته-پوسته و اخیراً هم از نانوذرات نیم رسانا (ZnS, CdS, PbS) استفاده شده است (۲۲).

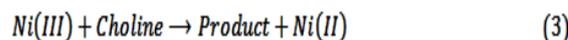
۵- کاربرد نانوذرات به عنوان واکنش‌گر: به دلیل انرژی سطح بالا، NPs معمولاً از نظر شیمیایی خیلی فعال‌تر از

حسگرهای زیستی با پاسخدهی سریع تهیه نمود (۲۵)، (۲۶).

از نقش کاتالیزوری نانوذرات اکسید نیکل برای اکسیداسیون Cho استفاده شده است. خمیر CPE شامل پودر گرافیت، عامل خمیر کننده و نانوذرات (به ترتیب ۶۰، ۲۰، ۲۰٪ w/w) تهیه و سطح الکتروود با فیلمی از نافیون پوشانده می‌شود. در ولتاموگرام الکتروود اصلاح شده، پیک مربوط به اکسیداسیون Ni(II)/Ni(III) دیده می‌شود (معادله ۲) که در محلول Cho هم از نظر پتانسیل و هم از نظر نقطه آغاز به سمت پتانسیل‌های مثبت‌تر جابجا می‌شوند. این نشان دهنده اکسایش کولین روی سطح فعال اکسید نیکل از طریق یک مکانیسم الکتروکاتالیزوری واسطه‌ای است.



احیاء مجدد Ni با اکسایش کولین همراه است:



احتمالا اکسایش گروه‌های عاملی کولین طی یک یا چند مرحله رخ می‌دهد. کولین به عنوان یک الکل، می‌تواند به بتائین آلدهید و متعاقب آن به بتائین اکسید شود (۲).

الکترودهای کربن شیشه‌ای (Glassy carbon electrode: GCE)، سرعت اکسایش پایین، خلل و فرج کم، تکرارپذیری نسبتا خوب، گستره پتانسیل وسیع، نفوذپذیری کم در مقابل گازها و مایعات و مقاومت شیمیایی خوبی در برابر حلال دارند. همین موارد سبب می‌شود آن‌ها الکترودهای واقعا بی‌اثر باشند (۲۷).

نانوذرات MnO₂ با مساحت سطح ویژه بزرگ، آبدوستی و نیز سازگاری زیستی، کاربرد زیادی در طراحی حسگرهای زیستی دارند. در یک مطالعه، نانوذرات

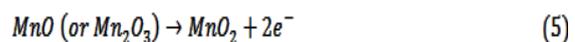
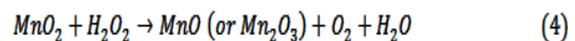
MnO₂ با سه ساختار کریستالی متفاوت به روش الکتروشیمیایی و با استفاده از چیتوسان روی GCE ترسیب شدند. دو عدد GCE وارد محلولی شامل چیتوسان، نانوذرات و ChOx شده و با اعمال پتانسیل (-۳۷V)، در کاتد احیا و به صورت H₂ خارج می‌شود که نتیجه آن تغییر موضعی شدید pH در مجاورت سطح کاتد است. با افزایش pH از ۶/۳، چیتوسان نامحلول شده و هیدروژل چیتوسان، نانوذرات و آنزیم را به هم ملحق و در سطح کاتد ترسیب می‌نماید. طبق بررسی‌ها، نانوذرات MnO₂ آمورف فعالیت کاتالیزوری بالاتری دارند، اما زمان پاسخ الکتروود تهیه شده با آن زیاد است (۵ دقیقه در مقابل ۲۵ و ۸ ثانیه به ترتیب برای نانوذرات آلفا و بتا). این نشان می‌دهد که ساختارهای کریستاله سریع‌تر توسط H₂O₂ احیا می‌شوند. درون محلول بافر، الکتروود اصلاح شده با α-MnO₂ نسبت به نانوذرات آمورف پیک‌های اکسایش منگنز (معادلات ۴ و ۵) را واضح‌تر نشان می‌دهد. به طور کلی الکترودهای تهیه شده با نانوذرات آلفا و بتا پاسخ سریع‌تری دارند و β-MnO₂ برای ساخت حسگر زیستی مناسب‌تر است (۲۸).

در بررسی دیگری، سنتز و تثبیت نانوذرات MnO₂ در سطح GCE به صورت یک مرحله‌ای (به روش الکتروشیمیایی و درون محلولی از پرمنگنات پتاسیم) انجام شده است. محلول ChOx به روش پوشش‌دهی قطره‌ای (drop coating) بر روی سطح الکتروود قرار گرفته و سپس با نافیون پوشانده می‌شود، تا فیلم نانوذرات/ آنزیم را در سطح نگه دارد. بررسی‌های ولتامتری چرخه‌ای GCE خام و GCE/ChOx/nafion در حضور و در غیاب کولین هیچ ردوکسی نشان نمی‌دهد. اما GCE/MnO₂/ChOx/nafion در غیاب کولین، یک جفت

به دلیل هدایت الکتریکی و خاصیت الکتروکاتالیزوری بالا، توانایی جذب سطحی قوی، سرعت‌های انتقال الکترون سریع و سازگاری زیستی فوق العاده، از CNTs به عنوان واسطه میان الکتروود و جزء تشخیص زیستی (آنزیم) استفاده می‌شود. ساختار توخالی و مساحت سطح بالا، امکان بارگیری مقادیر زیاد آنزیم در یک لایه نازک را فراهم می‌آورد که خود گستره خطی وسیع‌تری را ممکن می‌سازد. گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار در سطح CNTs، در محیط آبی بار منفی دارند و می‌توانند با پلی الکترولیت‌های با بار مثبت و یا مولکول‌های زیستی برهمکنش نمایند و به تثبیت آن‌ها در سطح CNTs کمک نمایند. برای تثبیت CNTs در حسگرهای زیستی از روش‌های متفاوتی مانند پراکندگی و تثبیت توسط اسیدهای اکسنده، عامل‌دار کردن سطح و الحاق درون یک کامپوزیت استفاده شده است. برای تثبیت آنزیم در الکتروود اصلاح شده با CNTs هم دو روش اصلی جذب فیزیکی و اتصال عرضی شیمیایی وجود دارد (۱۷، ۲۹).

در پژوهشی، GCE توسط کامپوزیتی شامل نانولوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) و نانوذرات ZrO_2 (غیر سمی و با سازگاری زیستی بالا) اصلاح شده و ChOx و AcChE به طور همزمان در سطح آن تثبیت شده‌اند. با قرار گرفتن GCE داخل سوسپانسیون CNTs/NPs اعمال پتانسیل ثابت (V -1/1)، فیلم نانوذرات در سطح الکتروود تشکیل می‌شود. در ادامه مخلوطی از AcChE (۲mg/mL) و ChOx (۱۰ mg/mL) به روش پوشش‌دهی قطره‌ای روی سطح الکتروود قرار می‌گیرد. با تثبیت CNTs/NPs، مقاومت انتقال بار الکتروود به شدت کاهش یافته، اما پس از تثبیت آنزیم مجدداً افزایش می‌یابد که اثباتی بر تثبیت موفق آنزیم است. الکتروود اصلاح نشده درون محلول آنالیت، هیچ پیکی نشان نمی‌دهد، اما در

پیک ردوکس (واکنش ردوکس MnO_2) نشان می‌دهد. حضور کولین جریان پیک اکسایش افزایش قابل توجهی دارد که آن‌را به واکنش کاتالیزوری همزمان ربط می‌دهند. کولین توسط H_2O_2 اکسید می‌شود که می‌تواند MnO_2 را احیاء نماید (معادله ۴)، اکسایش مجدد MnO_2 نیز می‌تواند در سطح الکتروود رخ دهد (معادله ۵).



با تثبیت NPs، مقاومت انتقال بار الکتروود خام افزایش یافته (۲۰۰ به ۱۲۰۰ اهم) که ناشی از محدودیت ایجاد شده در برابر انتقال الکترون است. این افزایش با اضافه شدن لایه‌های آنزیم و نافینون نیز مشاهده می‌شود (۴۴۰۰ اهم). اما لایه آنزیمی، اتصال خوبی بین NPs و نافینون ایجاد می‌کند که به ماهیت آبریز و نیز وجود گروه‌های آمینو اسیدی آن برمی‌گردد (۶).

نانوذرات ZnO، خصوصیتی مانند غیر سمی بودن، سازگاری زیستی، خواص کاتالیزوری و نسبت سطح به حجم بالا دارند. علاوه بر این، نقطه ایزوالکتریک ZnO حدود ۹/۵ است که به تثبیت آنزیم‌های با نقطه ایزوالکتریک پایین (مثل ChOx با نقطه ایزوالکتریک ۴/۱) کمک می‌کند. در پژوهشی این NPs به روش هیدروترمال سنتز و سطح GCE توسط محلولی شامل نانوذرات، چیتوسان و ChOx پوشانده شده است. اضافه شدن لایه NPs به سطح، افزایش شار جریان اکسایش را به همراه دارد و اصلاح همزمان با NPs و آنزیم بیشترین افزایش جریان پیک اکسایش را نشان می‌دهد که ناشی از توانایی NPs در بهبود انتقال الکترون است. در ضمن ارتقاء پوشش سطح برای الکتروود GCE/ZnO/ChOx می‌تواند یک عامل کلیدی برای افزایش جریان پیک باشد (۳).

آنزیم باشد. حلقه ایمیدازولیوم در مایع یونی از طریق برهمکنش‌های π - π ، الکترواستاتیک و آبگریز با CNTs برهمکنش دارد و به همین دلایل مایع یونی نقش مهمی در تثبیت موثر آنزیم و حفظ ساختار آن دارد (۳۰).

اخیرا در توسعه حسگرهای زیستی، پلیمرهای هادی (CPS) هم مورد توجه قرار گرفته‌اند. آن‌ها برای تثبیت مولکول زیستی و نیز انتقال الکترون سریع، فوق‌العاده هستند. اسکلتی از الکترون‌های π مسئول خواص غیرعادی آن‌ها (هدایت الکتریکی بالا، انتقالات نوری کم انرژی، پتانسیل ردوکس پایین و میل ترکیبی بالا برای الکترون) است. روش سنتز الکتروشیمیایی آن‌ها بیشتر مورد استفاده بوده، زیرا ساده‌تر و تکرارپذیرتر است، در دمای محیط انجام می‌شود و با کنترل جریان، پتانسیل و یا زمان به راحتی می‌توان ضخامت لایه پلیمری را کنترل کرد (۳۱).

در پژوهشی ابتدا سطح GCE با سوسپانسیون MWCNTs اصلاح شده است. افزایش غلظت CNTs حساسیت را کمی بهتر می‌کند، اما پایداری مکانیکی فیلم CNTs خوب نیست. با قرار گرفتن الکتروود درون محلول آنیلین و اسکن پتانسیل (از -0.2 تا $+1$ V، سرعت روبش پتانسیل 20 mV/s)، لایه‌ای از پلی‌آنیلین (PA) سطح الکتروود را پوشش می‌دهد. تثبیت ChOx از طریق اتصال عرضی آنزیم با آلبومین سرم گاوی توسط گلوترآلدهید انجام شده است. عملکرد عمده لایه PA شامل: توانایی عالی برای مقابله در برابر تداخل‌ها، پایداری CNTs تثبیت شده و توانایی هدایت بالا است. در سرعت پلیمریزاسیون خیلی کم، یک فیلم فشرده و صاف تشکیل می‌شود اما ضخامت‌های بالا از PA حساسیت را کم و زمان پاسخ را افزایش می‌دهد. فیلم ضخیم‌تر، جلوی مزاحمت‌ها را

ولتاموگرام الکتروود اصلاح شده با CNTs و NPs پیک اکسایشی دیده می‌شود که جریان آن در الکتروود اصلاح شده با آنزیم خیلی بیشتر است. با استفاده از این حسگر، سطح کولین در سرم خون افراد سالم و مبتلایان به آلزایمر به ترتیب $9.0-12.8$ و $0.4-0.8$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ اندازه‌گیری شده است (۱۹).

حسگرهای نسل سوم (مبتنی بر الکتروشیمی مستقیم میان مراکز ردوکس آنزیم و سطح الکتروود) اغلب انتخاب‌پذیری بهتری دارند و چون در گستره پتانسیلی نزدیک به پتانسیل ردوکس خود آنزیم عمل می‌کنند، در معرض واکنش‌های مداخله‌کننده کمتری قرار می‌گیرند (۳۰). به این منظور به یک ماتریکس میزبان نیاز است تا علاوه بر سازگاری زیستی، بتواند انتقال الکترون را بهبود بخشد و محیطی فراهم آورد که فعالیت آنزیم در آن حفظ شود. مایعات یونی (ILs) الکتروولیت‌هایی ویژه با سازگاری زیستی خوب هستند و تلفیق آن‌ها با CNTs می‌تواند قابلیت‌های هر دو آن‌ها را در کنار هم قرار دهد. سجادی و همکارانش برای اصلاح GCE از کامپوزیت CNTs-ILs استفاده کردند. نانولوله‌های کربنی آمین‌دار به روش پوشش‌دهی قطره‌ای در سطح الکتروود قرار گرفته‌اند. این الکتروود ابتدا درون محلول مایع یونی (۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترافلئوربورات) و سپس محلول ChOx قرار داده می‌شود. بر اساس نتایج، الکتروود آنزیمی در غیاب IL بسیار ناپایدار است، اما وجود مایع یونی با ایفای نقش محافظی، افزایش پایداری را به همراه دارد که می‌تواند به علت ظرفیت آن برای تشکیل پیوند هیدروژنی و حفظ ساختار آنزیم به دام افتاده در شبکه‌ای از پیوندهای هیدروژنی باشد. پایداری بالاتر ChOx می‌تواند به دلیل برهمکنش‌های مایع یونی با CNTs‌های آمین‌دار و

NPs (با بار مثبت) محیط مناسبی برای جذب ChOx و AcChE با بار منفی فراهم می‌نمایند. سوسپانسیون CNTs در اتیل سلولز و آلفا-تریپینول به روش صفحه چاپی روی الکتروگرافیت پیرولیتی (pyrolytic graphite: PG) چاپ می‌شود. نانوذرات نیز از طریق لایه نشانی از فاز بخار تشکیل شده‌اند. اصلاح الکتروود با CNTs/NPs، بهبود سینتیک انتقال بار میان محلول و سطح الکتروود و کاهش مقاومت انتقال بار را به همراه دارد. سطح الکتروود با محلول آنزیم (ChOx و AcChE در بافر فسفات) نیز اصلاح شده و برای بهبود یکنواختی آنزیم، عمل لایه نشانی به صورت مرحله‌ای تکرار می‌شود. در انتها سطح با پلی‌دی‌متیل‌دی‌آلیل آمونیوم کلراید (PDDA) به عنوان یک پلی‌الکتروولیت پوشانده می‌شود تا مانع از رهاش آنزیم شود (۳۴). از PDDA به عنوان یک پلیمر یونی با بار مثبت که چسبندگی خوب و توانایی تشکیل فیلم دارد، استفاده می‌شود. این ترکیب کاندیدای مناسبی برای تثبیت آنزیم‌ها است و اغلب از آن برای اصلاح سطح سوبستراها و کلوئیدها به کمک جاذبه‌های الکترواستاتیک استفاده شده، ضمن این‌که می‌تواند به عنوان یک عامل پراکنده کننده CNTs یا تثبیت کننده کلوئیدها هم بکار رود (۳۵).

نانوذرات طلا، سازگاری زیستی خوبی دارند و آنزیم تثبیت شده روی آن‌ها فعالیت خود را حفظ می‌نماید. با توجه به هدایت الکتریک فوق العاده طلا، تماس الکترونی مستقیم میان مکان‌های فعال و سطح الکتروود نیز قابل دستیابی است. چهار روش پایه شامل جذب فیزیکی، جذب شیمیایی، تک لایه‌های خود تجمع یافته (Self-assembling monolayers) و اصلاح همزمان با ماتریکس الکتروود برای تثبیت آنزیم‌ها روی GNPs وجود دارد (۱۷).

خواهد گرفت، اما به طور همزمان می‌تواند جلوی آنالیت‌ها را هم گرفته و زمان‌های پاسخ را طولانی نماید. به همین دلیل از سرعت‌های اسکن کم و محلول‌های رقیق آنیلین استفاده شده است. تعداد سیکل‌های پلیمریزاسیون نیز از پارامترهای مهم دیگر است و بهترین حساسیت تا ۶ سیکل و در الکتروود اصلاح شده با ۵ لایه CNT/PA دیده شده است (۳۲).

در مطالعه دیگری، رفتار GCEs اصلاح شده با ChOx و ChOx-HRP مقایسه شده است. برای الکتروود دوم ابتدا HRP و بعد ChOx تثبیت می‌شوند. به این منظور ابتدا لایه‌ای از پلیمر هادی (ترشیوفن کربوکسیلیک اسید) به روش الکتروپلیمریزاسیون در سطح GCE ایجاد و آنزیم‌ها با تشکیل اتصالات کووالانسی روی سطح تثبیت شده‌اند. این پلیمر در سطح خود گروه‌های کربوکسیلیک اسید آزاد دارد که توسط یک دی‌ایمید فعال می‌شوند و با قرار گرفتن درون محلول ChOx و تشکیل اتصالات کووالانسی میان گروه‌های کربوکسیلیک پلیمر و گروه‌های آمین آنزیم، آنزیم به سطح متصل می‌شود. در مقایسه با روش‌های گیراندازی فیزیکی و یا ترسیب الکتروشیمیایی آنزیم روی CP، این روش دسترسی بهتر سوبسترا به آنزیم را فراهم و برهمکنش‌های مولکولی را تسهیل می‌نماید. در الکتروود GCE/CP/ChOx اندازه‌گیری کولین بر مبنای فرآیند اکسایش H_2O_2 در $0.1V$ و در الکتروود GCE/CP/ChOx-HRP بر مبنای احیاء آن در پتانسیل V -0.2 صورت گرفته و الکتروود دوم پایداری بهتر، حد تشخیص بالاتر و گستره خطی وسیع‌تری نشان داده است (۳۳).

در مطالعه دیگری، برای اصلاح سطح الکتروود گرافیتی از MWCNTs و نانوذرات ZnO استفاده شده است. این

که برای تثبیت آنزیم به خوبی در دسترس است. ضمن این که GNPs سطح کربنی آزاد را پوشش داده و اجازه تشخیص چند آنالیت را نمی دهند. برای اطمینان از جذب حداقل مقدار آنزیم، الکتروود درون محلول رقیق آنزیم با نسبت (10):ChOx (1):AcChE قرار می گیرد. وجود یک تک لایه از آنزیم سبب می شود تا قابلیت دستیابی به مکان های فعال آنزیم فراهم شود، سرعت نفوذ محصول آنزیمی به سطح الکتروود زیاد شده و شانس ممانعت های فضایی برای فعالیت آنزیم کم شود. الکتروود CFE خام در محلول H_2O_2 پاسخی نشان نداده اما در الکتروود اصلاح شده با GNPs یک جریان احیاء دیده می شود که ثابت می کند در این پتانسیل، H_2O_2 توسط NPs و نه سطح کربنی تشخیص داده می شود (۳۶).

میکروالکتروودهای آنزیمی برای تشخیص آنالیت های الکتروفعال در محل بافت زنده (in-vivo)، توسعه یافته اند. برای بهبود انتخاب پذیری، آرایه های میکروالکتروودی معرفی شده اند که متشکل از الکتروودهای مجزا با ویژگی های سطحی متفاوت برای تشخیص گونه های مزاحم هستند. اندازه کوچک الکتروودهای فیبر کربنی (CFEs) یا سیم های پلاتینی، (قطر $30-50 \mu m$)، اجازه تفکیک مکانی در مقیاس میکرومتری می دهد و چون تشخیص مستقیماً در سطح الکتروود انجام می شود، غلظت میان سلولی آنالیت ها را می توان در کسری از ثانیه تعیین نمود. در پژوهشی، GNPs از طریق ترسیب الکتروشیمیایی (احیاء Au^{3+} به Au^0 با اعمال پتانسیل ثابت $-0.6 V$) بر روی CFE تثبیت شده اند. با این کار سطحی فراهم می شود

جدول ۱- مقایسه ویژگی های الکتروودهای کربنی اصلاح شده با نانوذرات

| الکتروود | ماتریس اصلاح سطح | گستره غلظتی (μM) | حد تشخیص (μM) | پتانسیل (V) | زمان پاسخ (s) | پایداری (روز) | %RSD | نمونه مرجع |
|----------|---|-------------------------|----------------------|-------------|---------------|---------------|------|-----------------|
| GCE | MnO ₂ /ChOx/ nafion | 8-1000 | 5 | 0.7 | 40 | 30 | 2.7 | شیر (۶) |
| GCE | ZrO ₂ /CNTs/ChOx+AcChE | 0.05-200 | 0.01 | 0.15 | 4 | 60 | 1.35 | سرم انسانی (۱۹) |
| GCE | ZnO/Chitosan/ChOx | 300-5100 | 82.5 | -0.6 | 4 | 11 | 4.4 | سلول (۳) |
| GCE | α -MnO ₂ /Chitosan/ChOx | 2-580 | 1 | 0.6 | 25 | 42 | 4.3 | - (۲۸) |
| GCE | β -MnO ₂ /Chitosan/ChOx | 1-790 | 3 | 0.6 | 8 | 42 | 3.5 | - (۲۸) |
| GCE | CNTs/ILs/ChOx | 6.9-670 | 2.7 | -0.35 | 6 | 60 | 2.4 | - (۳۰) |
| CPE | NiO/Nafion | 26-6980 | 25.4 | 0.48 | - | 28 | 3.19 | - (۲) |
| PG | ZnO/CNTs/ChOx/PDDA | 1-800 | 0.3 | 0.6 | 13 | 90 | 2.36 | خون (۳۴) |
| PG | ZnO/CNTs/AcChE/PDDA | 1-1000 | 0.3 | 0.6 | 13 | 90 | 2.36 | خون (۳۴) |
| CFE | GNPs/AcChE, ChOx | 10-4000 | 10 | -0.3 | 40 ms | 10 | 7 | سلول (۳۶) |
| GCE | CNTs/PA/ChOx | 1-2000 | 0.3 | 0.4 | 3 | 30 | 3.6 | - (۳۲) |
| GCE | CP/ChOx | 1-50 | 0.4 | 0.6 | 5 | 40 | 3.4 | - (۳۳) |
| GCE | CP/ChOx-HRP | 1-80 | 0.1 | -0.2 | 5 | 90 | 3.1 | - (۳۳) |

نتیجه گیری

کولین توسط موسسات پزشکی به عنوان یک ماده مغذی ضروری به رسمیت شناخته شده و نقش پیچیده‌ای در بدن دارد. علاوه بر این اندازه‌گیری و نظارت بر نشانگرهای زیستی ویژه بیماری‌ها وظایفی مهم برای پیش‌بینی، توسعه ابزارهای تشخیصی، راهبردهای درمانی و ارزیابی پتانسیل‌های درمانی داروهای جدید هستند. شروع اختلالات غیرطبیعی، اغلب خیلی ظریف و نامحسوس و تغییر در غلظت نشانگرهای زیستی خیلی اندک است و روش‌های تجزیه‌ای جدید و حساس با انتخاب‌پذیری بالا، برای تشخیص وجود مشکلات بالینی ضروری هستند. در میان شیوه‌های مختلف برای اندازه‌گیری Cho و AcCh، روش‌های زیستی سهولت، حساسیت، سرعت و انتخاب‌پذیری بهتری دارند و حسگرهای زیستی آمپرومتری مبتنی بر آنزیم، توجه زیادی را برای اندازه‌گیری‌های کمی به خود جلب کرده‌اند. استفاده از الکترودها به عنوان مبدل سیگنال در حسگرهای زیستی به دلیل حساسیت بالا و سادگی عملکرد روشی محبوب است. همچنین تشخیص الکتروشیمیایی انتخاب‌پذیری مضاعفی فراهم می‌نماید، زیرا گونه‌های الکتروفعال متفاوت در پتانسیل‌های متفاوت نیز اکسید یا احیا می‌شوند. روش‌های شناسایی الکتروشیمیایی همچنین سازگار با تکنیک‌های نوین مینیاتوری سازی هستند که به حداقل انرژی نیاز داشته و مستقل از رنگ و کدورت نمونه می‌باشند. بیشتر حسگرهای آنزیمی، نیازی به دستگاه‌های خیلی گران

قیمت ندارند و به نسبت ارزان هستند. استفاده از نانومواد برای طراحی حسگرهای زیستی، روشی جدید و هیجان‌انگیز برای بهبود قابلیت سیستم‌های تشخیصی است. چشم انداز بسیار امیدوار کننده استفاده از نانومواد، ناشی از خصوصیات منحصر بفرد آنها است. در حالی که جذب مستقیم آنزیم‌ها روی سطوح توده‌ای فلزات معمولاً سبب دناتوره شدن و کاهش فعالیت آنها می‌شود. تثبیت روی نانوذرات می‌تواند پایداری را افزایش و فعالیت زیستی آنها را حفظ نماید. مساحت سطح بالای نانوذرات، امکان تثبیت مقدار بیشتر آنزیم را نیز می‌دهد. نانوذرات فلزی، هدایت الکتریکی و خصوصیات کاتالیزوری فوق‌العاده‌ای دارند و برای بهبود انتقال الکترون میان مراکز ردوکس در پروتئین‌ها و سطوح الکترودی و نیز به عنوان کاتالیزور برای افزایش واکنش‌های الکتروشیمیایی مناسب هستند. از نانوذرات اکسیدی معمولاً به دلیل سازگاری زیستی خوب آنها استفاده می‌شود. در حالی که نانوذرات نیم‌رسانا اغلب به عنوان ردیاب در آنالیزهای الکتروشیمیایی استفاده می‌شوند. نانولوله‌های کربنی هم می‌توانند واکنش‌پذیری الکتریکی مولکول‌های زیستی و واکنش‌های انتقال الکترون در پروتئین‌ها را بهبود بخشند. استفاده از نانوذرات کربنی در غالب موارد پتانسیل عملکرد حسگر را کاهش می‌دهد که به مزاحمت کمتر در اندازه‌گیری منجر می‌شود. ویژگی حسگرهای اشاره شده در این مقاله در جدول (۱) مقایسه شده است.

References

1. **Chen, Z., Ren, X., Meng, X., Chen, D., Yan, C., Ren, J., Yuan, Y. and Tang, F., 2011.** Optical detection of choline and acetylcholine based on H₂O₂-sensitive quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1), pp.50-55.
2. **Sattarahmady, N., Heli, H. and Vais, R.D., 2014.** A flower-like nickel oxide nanostructure: Synthesis and application for choline sensing. *Talanta*, 119, pp.207-213.
3. **Thiagarajan, V., Madhurantakam, S., Sethuraman, S., Rayappan, J. B. B., & Krishnan, U. M. (2016).** Nano interfaced biosensor for detection of choline in triple negative breast cancer cells. *Journal of colloid and interface science*, 462, 334-340.
4. **Barkhimer, T. V., Kirchoff, J. R., Hudson, R. A., Messer Jr, W. S., & Tillekeratne, L. V. (2008).** Electrochemical detection of acetylcholine and choline: application to the quantitative nonradiochemical evaluation of choline transport. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(4), 651.
5. **Pal, S., Sharma, M. K., Danielsson, B., Willander, M., Chatterjee, R., & Bhand, S. (2014).** A miniaturized nanobiosensor for choline analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 558-564.
6. **Yu, G., Zhao, Q., Wu, W., Wei, X. and Lu, Q., 2016.** A facile and practical biosensor for choline based on manganese dioxide nanoparticles synthesized in-situ at the surface of electrode by one-step electrodeposition. *Talanta*, 146, pp.707-713.
7. **Richard, C., Lewis, E.D., Zhao, Y.Y., Asoaming, J., Jacobs, R.L., Field, C.J. and Curtis, J.M., 2016.** Measurement of the total choline content in 48 commercial dairy products or dairy alternatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, pp.1-8.
8. **Zeisel, S. H., & Da Costa, K. A. (2009).** Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition reviews*, 67(11), 615-623.
9. **Zeisel, S.H., Mar, M.H., Howe, J.C. and Holden, J.M., 2003.** Erratum: Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods (*Journal of Nutrition* (2003) 133 (1302-1307)). *Journal of Nutrition*, 133(9), pp.2918-2919.
10. **Dai, H., Chi, Y., Wu, X., Wang, Y., Wei, M. and Chen, G., 2010.** Biocompatible electrochemiluminescent biosensor for choline based on enzyme/titanate nanotubes/chitosan composite modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6), pp.1414-1419.
11. **Dai, H., Wu, X., Xu, H., Wei, M., Wang, Y. and Chen, G., 2009.** Fabrication of a new ECL biosensor for choline by encapsulating choline oxidase into titanate nanotubes and Nafion composite film. *Electrochemistry Communications*, 11(8), pp.1599-1602.
12. **Mazzetti, S., Bracco, C., Regge, D., Caivano, R., Russo, F., & Stasi, M. (2013).** Choline-containing compounds quantification by ¹H NMR spectroscopy using external reference and noise measurements. *Physica Medica*, 29(6), 677-683.
13. **Zeisel, S. H., & DaCosta, K. A. (1990).** Choline: determination using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1(1), 55-59.
14. **Xiong, Y., Zhao, Y.Y., Goruk, S., Oilund, K., Field, C.J., Jacobs, R.L. and Curtis, J.M., 2012.** Validation of an LC-MS/MS method for the quantification of choline-related compounds and phospholipids in foods and tissues. *Journal of Chromatography B*, 911, pp.170-179.
15. **Kirsch, S.H., Herrmann, W., Rabagny, Y. and Obeid, R., 2010.** Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 878(32), pp.3338-3344.
16. **Khan, A., Khan, A.A.P., Asiri, A.M., Rub, M.A., Azum, N., Rahman, M.M., Khan, S.B. and Ab Ghani, S., 2013.** A new trend on biosensor for neurotransmitter choline/acetylcholine—an overview. *Applied*

biochemistry and biotechnology, 169(6), pp.1927-1939.

17. **Putzbach, W. and Ronkainen, N., 2013.** Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors*, 13(4), pp.4811-4840.
18. **Wilson, G.S. and Gifford, R., 2005.** Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), pp.2388-2403.
19. **Pundir, S., Chauhan, N., Narang, J. and Pundir, C.S., 2012.** Amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes/zirconium oxide nanoparticles electrodeposited on glassy carbon electrode. *Analytical biochemistry*, 427(1), pp.26-32.
20. **Shimomura, T., Itoh, T., Sumiya, T., Mizukami, F. and Ono, M., 2009.** Amperometric determination of choline with enzyme immobilized in a hybrid mesoporous membrane. *Talanta*, 78(1), pp.217-220.
21. **Ding, S., Shan, D. and Sun, Y., 2009.** Bioelectrochemical response of a choline biosensor fabricated by using polyaniline. *Science in China Series B: Chemistry*, 52(12), p.2275.
22. **Luo X, Morrin A, Killard AJ, Smyth MR. 2006.** Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*;18(4):319-26.
23. **Chen, P. and McCreery, R.L., 1996.** Control of electron transfer kinetics at glassy carbon electrodes by specific surface modification. *Analytical Chemistry*, 68(22), pp.3958-3965.
24. **Nossol, E., & Zarbin, A. J. (2008).** Carbon paste electrodes made from novel carbonaceous materials: Preparation and electrochemical characterization. *Electrochimica Acta*, 54(2), 582-589.
25. **Sassolas, A., Blum, L.J. and Leca-Bouvier, B.D., 2012.** Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, 30(3), pp.489-511.
26. **Kalcher, K. (1990).** Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis*, 2(6), 419-433.
27. **Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Nikolić, B.Ž. and Jovanović, V.M., 2001.** Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. *Carbon*, 39(8), pp.1195-1205.
28. **Bai, Y.H., Zhang, H., Xu, J.J. and Chen, H.Y., 2008.** Relationship between nanostructure and electrochemical/biosensing properties of MnO₂ nanomaterials for H₂O₂/choline. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(48), pp.18984-18990.
29. **Qin, X., Wang, H., Wang, X., Li, S., Miao, Z., Huang, N. and Chen, Q., 2009.** Amperometric choline biosensors based on multi-wall carbon nanotubes and layer-by-layer assembly of multilayer films composed of Poly (diallyldimethylammonium chloride) and choline oxidase. *Materials Science and Engineering: C*, 29(4), pp.1453-1457.
30. **Sajjadi, S., Ghourchian, H., Rafiee-Pour, H.A. and Rahimi, P., 2012.** Accelerating the electron transfer of choline oxidase using ionic-liquid/NH₂-MWCNTs nano-composite. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 9(2), pp.111-119.
31. **Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B.D., 2002.** Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17(5), pp.345-359.
32. **Qu, F., Yang, M., Jiang, J., Shen, G. and Yu, R., 2005.** Amperometric biosensor for choline based on layer-by-layer assembled functionalized carbon nanotube and polyaniline multilayer film. *Analytical biochemistry*, 344(1), pp.108-114.
33. **Rahman, M.A., Park, D.S. and Shim, Y.B., 2004.** A performance comparison of choline biosensors: anodic or cathodic detections of H₂O₂ generated by enzyme immobilized on a conducting polymer. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(12), pp.1565-1571.
34. **Zhang, L., Chen, J., Wang, Y., Yu, L., Wang, J., Peng, H. and Zhu, J., 2014.** Improved enzyme immobilization for enhanced bioelectrocatalytic activity of choline sensor and acetylcholine sensor. *Sensors*

and Actuators B: Chemical, 193, pp.904-910.

35. Qin, X., Wang, H., Wang, X., Miao, Z., Chen, L., Zhao, W., Shan, M. and Chen, Q., 2010. Amperometric biosensors based on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes-poly (diallyldimethylammonium chloride) biocomposite for the determination of choline. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147(2), pp.593-598.
36. Keighron, J.D., Wigström, J., Kurczyk, M.E., Bergman, J., Wang, Y. and Cans, A.S., 2015. Amperometric detection of single vesicle acetylcholine release events from an artificial cell. *ACS chemical neuroscience*, 6(1), pp.181-188.

Enzymatically modified nanoparticle sensors for measuring choline and acetylcholine in food and biota (Part I: Carbon electrodes)

Moslem jahani*, alireza jahani

Assistant Professor, Science and Technology Research Center of Mashhad, Mashhad, Iran
Graduate Student, Islamic Azad University, Yazd, Yazd, Iran

m.jahani@rifst.ac.ir

Abstract

Choline, a vitamin-like compound, is an essential nutrient and plays vital roles in important metabolic pathways. It is important for brain development especially in cellular growth that occurs during fetal development. It also participates in acetylcholine synthesis and its abnormal amount is a sign of disease conditions. Nowadays choline and acetylcholine are added to certain foods and therefore their quantitative determination is very important in food industries and clinical analysis. Chromatographic methods are usually used but tedious sample preparation, long separation time, use of high sample and mobile phase volumes and an experienced operator, limited their applications. In this regard, application of bio-sensors as a green method with the benefits of high sensitivity and convenient application have been noted. The hydrogen peroxide as the product of enzymatic reaction is measured with optical or electrochemical methods. In this review, published researches (from 2000 to present) in the field of application of nano-particles in the design of this biosensors and determination of choline and acetylcholine has been reviewed. Application of nano-materials cause more enzyme immobilization with better stability and bioactivity, improve the electron transfer and decrease the resistance, and as a result enhancement in the figure of merits of the method.

Keywords: nanoparticles; enzyme sensor, choline, acetylcholine, electrochemical methods