مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، شماره ۱، بهار۹۲، صفحات ۳۰ تا ۴۰

Original Article

توسعه زیست‌حسگر آمپرومتری بدون آنزیم برای تعیین مقدار سیستئین و استیل سیستئین

نغمه ستاراحمدی[۱و۲]، حسین هلی[۳]

[۱] استادیار بیوفیزیک، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۲] استادیار بیوفیزیک، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۳] استادیار شیمی، پژوهشکده مکانیک شیراز، سازمان فضائی ایران

چکیده

سابقه و هدف: *در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در زمینه خواص جالب نانوذرات و کاربرد آنها در طراحی زیست حسگرها انجام شده است. در این بین، توسعه زیست حسگرهایی که به سادگی ساخته شده و برای تعیین ترکیبات سولفیدریلی قابل اطمینان باشند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق، یک زیست حسگر بدون آنزیم برای تشخیص سیستئین و N-استیل-L-سیستئین طراحی شد.*

روش بررسی: *نانوذرات با هسته اکسید آهن و پوسته کبالت هگزاسیانوفرات ساخته و به عنوان مبدل سیگنال زیست حسگر آمپرومتری به کار رفت.*

یافته‌ها: *نانوذرات رفتار ردوکس برگشت پذیری ارائه کرده و فعالیت کاتالیتیکی موثری در برابر اکسایش سوبستراها از خود نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *پاسخ آمپرومتری زیست حسگر برای تعیین مقدار سیستئین و N-استیل-L-سیستئین با موفقیت ثبت شد و زیست حسگر برای تشخیص و تعیین مقدار این مواد در نمونه‌های دارویی، سرم، خون و ادرار به کار گرفته شد.*

واژگان کلیدی: *زیست حسگر، نانوذره، سیستئین، **N**-استیل-**L**-سیستئین.*

مقدمه

نانومواد خواص جدیدی ارائه می‌کنند که این خواص از نظر فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی، به دلیل اندازه کوچک، بسیار متفاوت از مواد مشابه با اندازه بزرگ‌تر است. این خواص ناشی از بیشتر بودن سطح و یا در اثر اندازه نانو است (۱)، به گونه‌ای که با کاهش اندازه، واکنش‌پذیری این مواد افزایش می‌یابد. حتی این مواد از نظر خصوصیاتی همچون هدایت الکتریکی و فعالیت کاتالیستی رفتار متفاوتی دارند (۱).

کمپلکس‌های سیانید فلزی با فرمول عمومی $A_i[B(CN)_6].\ n\ H_2O$ (A کاتیون فلز اصلی یا واسطه، B کاتیون فلز واسطه که عمدتا شامل Fe,Ru,Os می‌باشد، i ضریب استوکیومتری کاتیون A در کمپلکس، CN گروه سیانید و n تعداد مولکولهای آب تبلور کمپلکس است) توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. خصوصیات پلیمرهای ردوکس آلی، زئولیت‌ها و مواد اینترکلیت شونده (Intercalating compounds) به صورت هم‌زمان در این مواد دیده می‌شود. بررسی این خصوصیات به شکل گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است (۳،۲). در این مواد ارتباط تنگاتنگی بین ساختار و خواص دیده می‌شود و یک سری از مطالعات در این زمینه مشتمل بر تغییر خواص در اثر تغییر در ساختار برای کاربردهای

آدرس نویسنده مسئول: دکتر حسین هلی، پژوهشکده مکانیک شیراز، سازمان فضائی ایران
(**email**: hheli7@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۳/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۷/۱۰

مختلف بوده است. به دلیل آنکه کمپلکس‌های سیانیدی فلزی محیط مختلطی دارند که در آن الکترون و یون‌ها جابجا می‌شوند، این مواد می‌توانند خصلت یون گزینی داشته و برای ساخت حسگرها به کار روند. امکان کنترل واکنش پذیری این مواد باعث می‌شود تا بتوان از آنها در طراحی حسگرها و زیست حسگرها به خوبی استفاده کرد.

در سال‌های اخیر علاقه و توجه بسیاری به طراحی، توصیف و کاربرد زیست حسگرها شده است. در این راستا، استفاده از زیست حسگرهایی که با کمپلکس‌های سیانید فلزی ساخته می‌شوند نیز بسیار مورد توجه بوده است (۴). سرعت زیاد انتقال الکترون و عدم انحلال هر دو فرم اکسیدی و احیایی کمپلکس‌های سیانید فلزی باعث می‌شود تا این مواد کاندیداهای خوبی برای ساخت زیست حسگرها باشند و در این زمینه، از سیانید فلزات مختلف استفاده شده است (۴). از میان سیانیدهای فلزی مختلف، کبالت هگزاسیانوفرات با یک ساختار باز زئولیتی، در کنار آبی پروس بسیار مورد توجه است.

ترکیبات آلی گوگرددار (سولفیدریل‌ها) اهمیت ویژه‌ای در بیولوژی و پزشکی داشته و مطالعه بر روی آنها در بررسی فعالیت فیزیولوژیکی و شناخت بیماری‌ها مؤثر است (۵). سیستئین یک آمینو اسید گوگرددار است که نقش مهمی در سیستم‌های بیولوژیکی به دلیل پیوند آن به ترکیبات مختلف و مشارکت آن در تشکیل پروتئین‌ها دارد. به علاوه، این ماده نقش مهمی در ارتباط بین سلول‌های سیستم ایمنی ایفا می‌کند (۶). همچنین این ماده دهنده گوگرد در بیوسنتز خوشه‌های حاوی آهن- گوگرد و کوفاکتورهای مولیبدوپترین می‌باشد. نقصان سیستئین باعث مشکلات متعددی از جمله تصلب شرائین، سرطان خون، سرطان دهانه رحم، دیابت، مسمومیت، آب مروارید، بیماری‌های پوستی، بیماری‌های کبدی، کاهش رشد، آلزایمر، پارکینسون، سکته و ایدز می‌شود (۹-۷). این ترکیب مدلی از پروتئین‌ها در محیط‌های بیولوژیکی نیز هست (۱۰). از این رو، تعیین مقدار این ترکیب با حساسیت بالا یکی از موارد مهم در مسیر مطالعات بیولوژیکی است و توسعه روش‌های تعیین مقدار آن با استفاده از حسگرها و زیست حسگرها برای اهداف بالینی و تجاری مهم است.

N-استیل-L-سیستئین یک مشتق استیله شده سیستئین است که در سیستم‌های بیولوژیکی نقش مؤثری دارد (۱۱). این ماده فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته و در اثر متابولیزه شدن به ترکیباتی تبدیل می‌شود که سنتز گلوتاتیون را تسریع می‌کند. این ماده یک جاروبگر رادیکال آزاد است که گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن را از بین می‌برد (۱۲). N-استیل-L-سیستئین نقش محافظتی در برابر تابش داشته و یک ماده دارویی است. این ترکیب مخاط را در بیماری‌های ریوی رقیق می‌کند و از مسمومیت‌های کبدی ناشی از مصرف بیش از حد استامینوفن جلوگیری می‌کند. این ماده در درمان بیماری‌هایی مثل سندروم شوگرن، آنفولانزا، اثرات ترک سیگار، تیک عصبی و هپاتیت C به کار می‌رود (۱۳). هم‌چنین این ماده در درمان بیماری‌های مزمن ریوی، التهاب معده، گلودرد و حملات قلبی کاربرد دارد.

تاکنون سیستئین و N-استیل-L-سیستئین به روش‌های کروماتوگرافی، اسپکتروسکپی، فلوریمتری، پتانسیومتری و آمپرومتری اندازه‌گیری شده است (۲۵-۱۴). اما هریک از روش‌های گزارش شده اشکالاتی دارند. به عنوان مثال، روش-های کروماتوگرافی و فلوریمتری نیازمند تجهیزات پیچیده و گران قیمت بوده و اندازه‌گیری با این روش‌ها مستلزم انجام فرایندهای مشتق سازی است که مشتق سازی بازده کاملی ندارد. از طرف دیگر، زیست حسگرهای الکتروشیمیایی گزارش شده تاکنون با این مشکل روبرو هستند که در تعیین مقدار با این روش‌ها، سیستئین و N-استیل-L-سیستئین در پتانسیل‌های بسیار مثبت اکسید می‌شوند. این امر زیست حسگر را با دو مشکل تداخل دیگر گونه‌ها در اندازه‌گیری و جذب سطحی شدن این دو ماده در سطح زیست حسگر (که باعث ناکارآمد شدن آن می‌شود) مواجه می‌سازد. از این رو، توسعه حسگرها و زیست حسگرهایی که کارایی لازم را در تعین مقدار این دو ماده داشته باشند، ضروری است. در این مطالعه، یک زیست حسگر بدون آنزیم برای تعیین مقدار سیستئین و N-استیل-L-سیستئین ارائه و خصوصیات آن بررسی شد.

مواد و روشها

کلیه مواد شیمیایی به کار رفته از شرکت مرک یا سیگما خریداری و بدون خالص سازی بیشتر استفاده شدند. قرص-های N-استیل-L-سیستئین از یک داروخانه تهیه شد. نمونه‌های تزریقی N-استیل-L-سیستئین به روش زیر ساخته شدند: ۲ گرم از N-استیل-L-سیستئین در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۵٪ گلوکز، ۰/۹٪ سدیم کلرید، ۰/۳٪ پتاسیم کلرید و EDTA ۱٪ حل شده و pH آن در ۷/۴ تنظیم شد.

سنتز نانوذرات اکسید آهن (III)

مخلوطی از نمک‌های آهن (II) و (III) در هوا با افزایش سود قلیایی شد تا براساس واکنش زیر نانوذرات اکسید آهن (III) تشکیل شود: (1) $Fe^{2+} + Fe^{3+} + O_2 + 2OH^- \rightarrow Fe_2O_3 + H_2O$ البته قلیایی شدن مخلوط این دو نمک در ابتدا منجر به تشکیل Fe_3O_4 می‌شود. اما این ماده در هوا بر اساس واکنش زیر به Fe_2O_3 تبدیل می‌شود: (2) $2Fe_3O_4 + ½O_2 \rightarrow 3Fe_2O_3$ این نانوذرات نقش هسته را در سنتز نهایی داشته و برای مرحله بعد در خلا نگهداری شد.

سنتز نانوذرات پوسته-هسته با هسته اکسید آهن (III) و پوسته کبالت هگزاسیانوفرات (مبدل سیگنال زیست حسگر)

نانوذرات اکسید آهن (III) را در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ M از $Na_3[Fe(CN)_6]$ شامل ۱۰mM HCl وارد کرده و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد. سپس به این مخلوط، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱M $CoCl_3$ شامل ۱۰mM HCl افزوده و برای ۳۰ دقیقه دیگر به هم زده شد. بدین ترتیب کبالت هگزاسیانوفرات به صورت یک لایه نازک بر سطح نانوذرات اکسید آهن (III) رسوب کرده و نانوذراتی با ساختار پوسته-هسته را ایجاد کرد.

تجهیزات

کلیه اندازه‌گیری‌های الکتریکی در یک سل سه الکترودی حاوی بافر فسفات ۱۰۰mM در pH ۷/۴ انجام شد. پتانسیواستات مورد استفاده یک دستگاه اتولب بود. یک الکترود مرجع Ag/AgCl, 3M KCl و یک الکترود کمکی پلاتینی مورد استفاده قرارگرفتند. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی توسط یک دستگاه مدل X-30 Philips و میکروسکوپ الکترونی عبوری توسط یک دستگاه مدل CEM 902A ZEISS با ولتاژ ۸۰kV ثبت شدند.

ساخت زیست حسگر

زیست حسگر با اختلاط پودر کربن، روغن معدنی و مبدل سیگنال به نسبت ۷۵، ۲۵ و ۵% وزنی در یک هاون به مدت ۲۰ دقیقه و قرار دادن آن در حفره نوک یک میله تفلونی تهیه شد. سطح زیست حسگر با سایش و صاف کردن روی سطح یک تکه کاغذ توزین آماده شد. جهت مقایسه، الکترود کربنی بدون مبدل سیگنال با اختلاط پودر کربن و روغن معدنی به نسبت ۸۰ به ٪۲۰ وزنی به صورت مشابه تهیه شد.

روش های عمومی

محلول‌های استاندارد سولفیدریل‌ها با انحلال آنها در بافر فسفات ۱۰۰mM در pH ۷/۴ تهیه شده و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گرادی نگهداری شد. رقیق سازی این محلول‌ها به صورت روزانه و قبل از استفاده انجام می‌گردید.

آنالیز سیستئین در نمونه‌های سرم خون و ادرار

نمونه‌های سرم از افراد سالم تهیه و تا زمان استفاده، به صورت منجمد نگهداری شد. نمونه‌های سرم با بافر فسفات به نسبت ۱:۷ رقیق شده و سپس از یک فیلتر ۳۰ کیلودالتونی عبور داده شد. مقادیر متفاوتی از محلول‌های استاندارد سیستئین در بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری که حاوی ۳/۳ میلی‌لیتر نمونه سرم بود، رقیق گشت. نمونه‌های ادرار از فرد سالم تهیه و تا حجم ده برابر توسط محلول‌های استاندارد سیستئین و بافر فسفات رقیق شد. محلول‌های حاصل با روش ارائه شده تعیین مقدار و اندازه گیری شد.

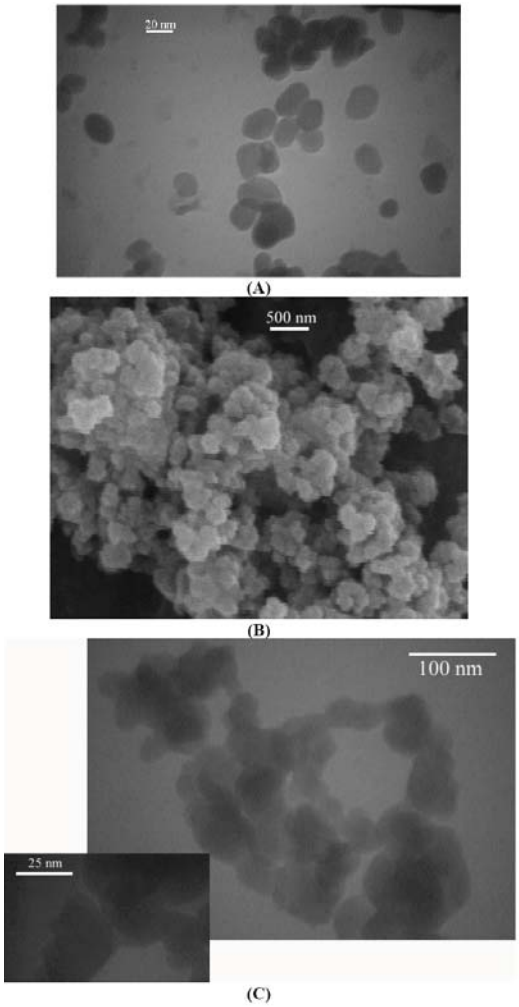
تعیین مقدار N-استیل-L-سیستئین در قرص و آمپول

قرص‌ها در یک هاون پودر شده و در حجم مشخصی از بافر حل گردید. محلول حاصل فیلتر شد و تا حجم مشخصی رقیق گشت. نمونه‌های تزریقی مستقیما به بالن ژوژه منتقل و با بافر رقیق گشت.

یافته‌ها و بحث

میکروسکوپ الکترونی

به منظور ارزیابی مورفولوژی سطح، اندازه و ساختار ذرات مبدل سیگنال زیست حسگر، عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری ثبت شدند. در شکل ۱ میکروگراف میکروسکوپ عبوری نمونه نانوذرات اکسید آهن (III) (A)، میکروگراف میکروسکوپ روبشی نانوذرات هسته اکسید آهن(III)-پوسته کبالت هگزاسیانوفرات (B) و میکروگراف میکروسکوپ عبوری ذرات پوسته-هسته (C) ارائه شده است. نانوذرات اکسید آهن (III) قطری حدود ۲۰nm دارند. از طرف دیگر، مبدل سیگنال زیست حسگر در یک چینمان پوسته-هسته‌ای قرارگرفته است، به شکلی که از ذرات حاوی هسته اکسید آهن (III) و پوسته کبالت هگزاسیانوفرات تشکیل شده است. ذرات مبدل سیگنال قطری در حدود ۴۰nm داشته و ضخامت پوسته آنها بین ۱۰ تا ۳۰nm است.



شکل ۱- میکروگراف میکروسکوپ عبوری نمونه نانوذرات اکسید آهن (III) (A)، میکروگراف میکروسکوپ روبشی نانوذرات هسته اکسید آهن(III)-پوسته کبالت هگزاسیانوفرات (B) و میکروگراف میکروسکوپ عبوری ذرات پوسته-هسته (C).

مطالعه فعالیت ردوکس زیست حسگر

شکل ۲A ولتاموگرام چرخه‌ای زیست حسگر را در بافر فسفات نشان می‌دهد. زیست حسگر دو زوج پیک با پتانسیل های فرمال ۴۲۴ و ۸۴۵ mV ارائه می‌کند. این زوج پیک‌ها به صورت I و II نامگذاری شده‌اند. بر اساس گزارش‌های موجود در مراجع، زوج I مربوط به فرایند ردوکس گونه‌های کبالت Co(II)/Co(III) (۲۶،۲۷) و زوج II مربوط به فرایندهای ردوکس گونه‌های آهن Fe(II)/Fe(III) است (۲۶،۲۷) که این واکنش‌های ردوکس را می‌توان به صورت زیر نوشت:

زوج I:

$$NaCo^{III}[Fe^{II}(CN)_6] + Na^+ + e^- \rightleftarrows Na_2Co^{II}Fe^{II}(CN)_6 \quad (3a)$$

(Red) (Yellow)

$$Na_{0.4}Co^{III}_{1.3}[Fe^{II}(CN)6] + Na^+ + e^- \rightleftarrows Na_{1.4}Co^{II}_{1.3}[Fe^{II}(CN)6] \quad (3b)$$

(Red) (Yellow)

زوج II:

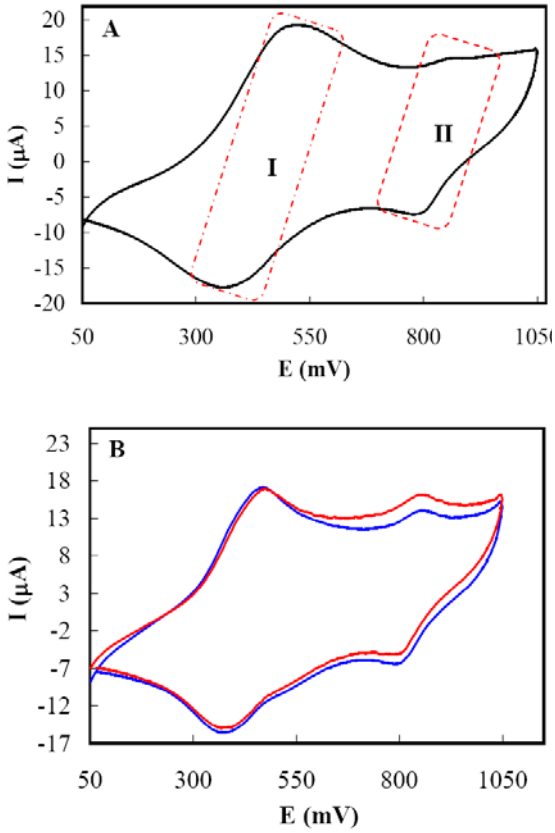
$$Co_{1.5}^{II}[Fe^{III}(CN)_6] + Na^+ + e^- \rightleftarrows NaCo^{II}_{1.5}[Fe^{II}(CN)_6] \quad (4a)$$

(Yellow-orange) (Yellow)

$$Co^{III}[Fe^{III}(CN)_6] + Na^+ + e^- \rightleftarrows NaCo^{III}[Fe^{II}(CN)_6] \quad (4b)$$

(Yellow) (Red)

بنابراین در طی فرایندهای ردوکس این ترکیب، انتقال الکترون همراه با ورود/خروج هم‌زمان کاتیون‌ها صورت می‌گیرد.



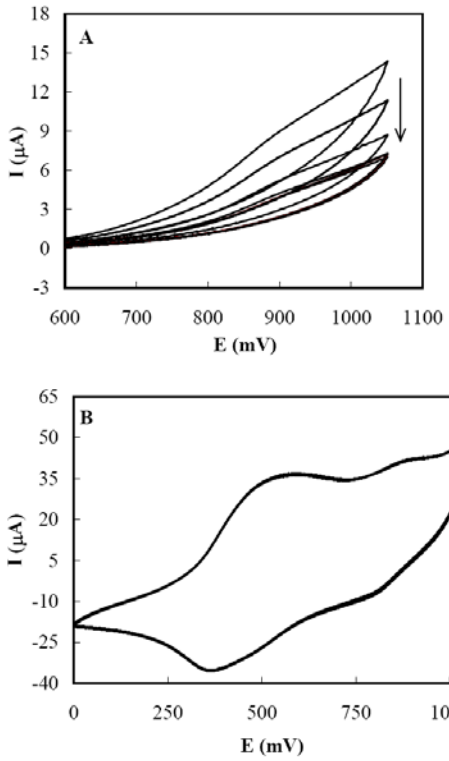
شکل ۲. A: ولتاموگرام چرخه‌ای زیست حسگر در بافر فسفات با سرعت روبش $50\ mV\ s^{-1}$؛ B: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای زیست حسگر در غیاب و حضور ۱۲۲ μM N-استیل-L-سیستئین با سرعت روبش $50\ mV\ s^{-1}$.

مطالعه اکسیداسیون N-استیل-L-سیستئین با روش ولتامتری

در شکل ۲B ولتاموگرام‌های چرخه‌ای زیست حسگر در غیاب و حضور ۱۲۲ μM N-استیل-L-سیستئین ارائه شده است. با افزایش N-استیل-L-سیستئین به محلول، جریان آندی پیک II افزایش و جریان کاتدی آن کاهش می‌یابد؛ در حالی که جریان‌های زوج I بدون تغییر می‌مانند. در حضور N-استیل-L-سیستئین، بار آندی II ۸۰/۹۷٪ بیشتر از بار کاتدی است، در حالی که این تفاوت در غیاب N-استیل-L-سیستئین ۵۲/۲۲٪ است. بنابراین N-استیل-L-سیستئین از طریق یک فرایند ردوکس چرخه‌ای جفت شده با یک واکنش شیمیایی، در پتانسیلی که گونه Fe (III) تولید می‌شود، اکسید می‌شود. گونه Co(III) که در پتانسیل های کمتر-مثبت تولید می‌شود، نمی‌تواند N-استیل-L-سیستئین را اکسید کند.

N-استیل-L-سیستئین در سطح الکترودهای کربنی نیز اکسید می‌شود. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای پی در پی الکترود کربنی در حضور ۱۲۲μM از N-استیل-L-سیستئین در شکل ۳A ارائه شده است. در ولتاموگرام‌ها، یک پیک آندی پهن با پتانسیل پیک نامشخص ظاهر شده است. این پیک آندی که احتمالا ناشی از برهمکنش کربن و اتم گوگرد مولکول N-استیل-L-سیستئین است، ناشی از اکسایش مستقیم N-استیل-L-سیستئین در سطح الکترود کربنی است. به علاوه، محصولات اکسایش N-استیل-L-سیستئین در سطح الکترود جذب می‌شوند. این مطلب باعث کاهش متوالی جریان آندی حاصل از اکسایش N-استیل-L-سیستئین در طی چرخه‌های پی در پی می‌شود. بنابراین در طی اکسایش N-استیل-L-سیستئین در سطح الکترود کربنی، سطح الکترود آلوده می‌شود و برای اندازه‌گیری این ماده مناسب نیست. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای پی در پی ثبت شده با زیست حسگر در حضور N-استیل-L-سیستئین در شکل ۳B ارائه شده است. این ولتاموگرام‌ها رفتار پایداری ارائه کرده و اثر آلودگی در سطح زیست حسگر دیده نمی‌شود. بنابراین زیست حسگر پایداری و تکرارپذیری لازم را در اکسایش متوالی N-استیل-L-سیستئین خواهد داشت.

کارایی زیاد نانوذرات پوسته-هسته (مبدل سیگنال زیست حسگر) را در اکسایش N-استیل-L-سیستئین می‌توان به هردو عامل ساختار ویژه و اندازه ربط داد. نانوذرات در سطح زیست حسگر تثبیت شده‌اند و هر کدام به عنوان یک مرکز واکنش عمل می‌کنند. این نانوذرات سطح مؤثر زیادی دارند. از طرف دیگر، ساختار پوسته-هسته که از مواد مختلف تشکیل شده است، به دلیل اثرات متقابل پوسته و هسته، باعث اصلاح یا تغییر خواص شیمیایی مواد سازنده می‌شود. بنابراین خواص این مواد متاثر از هر دو ماده سازنده آن است و از این رو، خواص آنها با موادی که ترکیب یکنواخت دارند، متفاوت است (۲۸). دیگر آن که، هسته سازنده چنین موادی خواص پوسته را تحت تاثیر قرار می‌دهد.



شکل ۳. A: ولتاموگرام‌های چرخه ای پی در پی الکترود کربنی در حضور ۱۲۲μM از N-استیل-L-سیستئین با سرعت روبش mV $۵۰\ s^{-1}$؛ B: ولتاموگرام‌های چرخه ای پی در پی ثبت شده با زیست حسگر در حضور ۱۲۲μM از N-استیل-L-سیستئین با سرعت روبش $۵۰\ mV\ s^{-1}$.

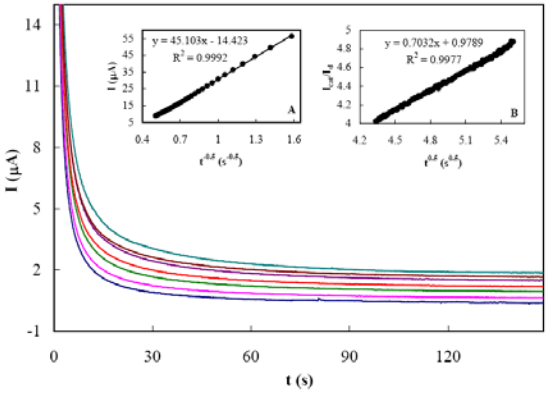
مطالعه اکسیداسیون N -استیل-L-سیستئین به روش کرنوآمپرومتری

روش کرنوآمپرومتری نیز جهت مطالعه بیشتر بر روی واکنش و استخراج برخی پارامترهای سینتیکی آن به کار گرفته شد. شکل ۴ کرنوآمپروگرام‌هایی که در غلظت‌های مختلف N-استیل-L-سیستئین با استفاده از زیست حسگر ثبت شده‌اند را نشان می‌دهد. پتانسیل اعمالی برابر ۸۶۰mV و محدوده غلظتی N-استیل-L-سیستئین ۶۱ تا ۳۶۶ μM بود. جریان ثبت شده در کرنوآمپروگرام‌ها با عکس جذر زمان رابطه خطی دارد (شکل ۴A). این ارتباط خطی مؤید حاکم بودن فرایند انتشار بر پاسخ زیست حسگر به N-استیل-L-سیستئین است. بنابراین، مبدل سیگنال زیست حسگر به خوبی عمل کرده و سیستئین را به سرعت اکسید می‌کند، به گونه‌ای که هیچ

محدودیت انتقال الکترون در تبدیل سیگنال وجود ندارد. با استفاده از خط ارائه شده در شکل ۴A و استفاده از معادله $I=nFAD^{1/2}C\pi^{-1/2}t^{-1/2}$ (5) [۲۹]، مقدار ضریب انتشار N-استیل-L-سیستئین برابر $(۲/۱۰\pm۰/۰۴)\times۱۰^{-۵}$ cm^2/s به دست می آید.

با استفاده از روش کرنوآمپرومتری ثابت سرعت واکنش کاتالیتیکی را نیز می‌توان به دست آورد. بر اساس معادله $I_{cat}/I_d=\pi^{1/2}(k_{cat}C)^{1/2}$ (6) [۲۹]:

که I_{cat} و I_d به ترتیب، جریان در حضور و غیاب N-استیل-L-سیستئین است و k_{cat} ثابت سرعت کاتالیستی است، و رسم تغییرات I_{cat}/I_L بر حسب $t^{1/2}$ (شکل ۴B)، مقدار ثابت سرعت واکنش اکسایش الکتروکاتالیتیکی N-استیل-L-سیستئین در سطح زیست حسگر برابر $(۴/۳۰\pm۰/۰۳)\times۱۰^{۵}$ $mol^{-1}\ s^{-1}\ cm^3$ به دست آمد.



شکل ۴- کرنوآمپروگرام‌های ثبت شده با زیست حسگر در غلظت‌های مختلف N-استیل-L-سیستئین. پتانسیل اعمالی برابر ۸۶۰mV و محدوده غلظتی N-استیل-L-سیستئین ۶۱ تا ۳۶۶μM. A: تغییرات I با $t^{-1/2}$. B: تغییرات I_{cat}/I_L با $t^{1/2}$

تعیین مقدار N-استیل-L-سیستئین

پاسخ آمپرومتری حاصل از زیست حسگر به غلظت‌های متفاوت N-استیل-L-سیستئین در شکل ۵ ارائه شده است که برای ثبت آن از پتانسیل ۸۹۰mV استفاده شد. پاسخ زیست حسگر به N-استیل-L-سیستئین بسیار سریع بوده و متناسب با غلظت آن است (شکل درونی ۵). پارامترهای تجزیه‌ای مربوط به این روش در جدول ۱ ارائه شده است. مقایسه بین پارامترهای تجزیه‌ای زیست حسگر حاضر با دیگر انواع مشابه (۲۱-۱۸، ۲۳، ۳۰، ۳۱) نشان می‌دهد که مختصات تجزیه‌ای زیست حسگر حاضر از انواع مشابه بهتر بوده و بر این اساس، حد تشخیص ارائه شده در این کار، کمترین مقدار تا زمان ارائه می‌باشد. به منظور ارزیابی تکرار و تکثیرپذیری روش آمپرومتری، سه اندازه‌گیری مختلف در یک غلظت N-استیل-L-سیستئین در یک روز و به صورت جداگانه در سه روز انجام شد که انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۲/۱٪ به دست آمد. از طرف دیگر، تکرارپذیری برای اندازه گیری با یک الکترود، انحراف استاندارد نسبی برابر ۰/۵۹٪ داشته و این مقدار برای سه الکترود برابر ۳/۷۶٪ بود.

مکانیسم واکنش و سینتیک آن

براساس نتایج به دست آمده، اکسایش الکتروکاتالیتیکی N-استیل-L-سیستئین بر اساس واکنش‌های زیر است. واکنش ردوکس انجام شده عبارت است از:

$$Fe(II) \underset{k_{-1}(E)}{\overset{k_1(E)}{\rightleftarrows}} Fe(III) + e \quad (7)$$

این واکنش با اکسایش گروه تیولی موجود در N-استیل-L-سیستئین همراه می‌شود (۲۰)

$$Fe(III) + NAC \xrightarrow{k_{cat}} NAC^{\bullet} + H^{+} + Fe(II) \quad (8)$$

که در آن $NAC^{\bullet}$ رادیکال N-استیل-L-سیستئین به سرعت بر اساس واکنش زیر به محصول نهایی (دی استیل سیستئین) دیمر می‌شود:

$$2\ NAC^{\bullet} \xrightarrow{k_2} NAC\text{-}NAC \quad (9)$$

نکته قابل توجه این است که اکسایش N-استیل-L-سیستئین همراه با ایجاد پیک آندی در روبش برگشت نیست. از طرفی، ولتاموگرام‌های چرخه ای پی در پی پاسخ ثابتی را به N-استیل-L-سیستئین نشان می‌دهند که در طی چرخه‌های پی در پی کاهش نمی‌یابد (شکل ۳B). بنابراین، رادیکال N-استیل-L-سیستئین و دی استیل سیستئین در سطح زیست حسگر جذب نمی‌شوند. لذا زیست حسگر پاسخ‌های تکرارپذیری به N-استیل-L-سیستئین ارائه خواهد کرد.

در واکنش‌های ارائه شده در بالا، K_1 و K_{-1} بر اساس معادلات زیر به پتانسیل مدار خارجی وابسته‌اند:

$$k_1(E)=k^0 \exp[(1-a)nF(E-E^{0'})/RT] \quad (10)$$

$$k_{-1}(E)=k^0 \exp[-anF(E-E^{0'})/RT] \quad (11)$$

که k° ثابت سرعت استاندارد و α ضریب انتقال الکترون است.

قانون سرعت برای واکنش های ۷ تا ۱۰ چنین است:

$$n_{19}=k_1\Gamma\theta_{II} - k_{-1}\Gamma\theta_{III} \quad (12)$$

$$n_{20}=k_{cat1}\Gamma\theta_{III}C_{NAC} \quad (13)$$

$$n_{21}=k_2C_{NAC^{\bullet}}^2 \quad (14)$$

و پاسخ ایجاد شده توسط زیست حسگر عبارت است از:

$$i_f=FAk_1\Gamma\theta_{II} - Fk_{-1}\Gamma\theta_{II} \quad (15)$$

جدول ۱- متغیرهای مربوط به کارایی زیست حسگر برای تعیین مقدار N-استیل-L-سیستئین و سیستئین

متغیر	N-استیل-L-سیستئین	سیستئین
محدوده خطی (μM)	۲۰-۴۳۲	۳-۳۷
حساسیت ($\times 10^2$ A M^{-1} cm^{-2})	۱/۶۷	۱۰/۸۴
حد تشخیص (nM)	۲۰/۹۲	۴۰/۰
حد کمی سازی (nM)	۶۹/۷۳	۲۳۰/۰
انحراف استاندارد نسبی (٪)	۰/۵۹	۱/۲۷
خطای مطلق (٪)	۰/۸۷	۱/۲۹

که θ_s نسبت پوشش سطح با گونه‌های ردوکس آهن، Γ بیشینه غلظت سطحی گونه ردوکس آهن و C_{NAC} غلظت N-استیل-L-سیستئین است. با توجه به این که:

$$\theta_{II}+\theta_{III}=1 \quad (16)$$

سرعت تغییر پوشش سطح:

$$d\theta_{II}/dt = -d\theta_{III}/dt=-k_1\theta_{II}+k_{-1}\theta_{III}+k_{cat}\theta_{III}C_{NAC} \quad (17)$$

با فرض این که تقریب حالت پایا حاکم باشد:

$$d\theta_{II}/dt = -d\theta_{III}/dt = 0 \quad (18)$$

مقادیر حالت پایای پوشش سطحی عبارت است از:

$$\theta_{II}^{*}=(k_{-1} + k_{cat}C_{NAC})/(k_1 + k_{-1} + k_{cat}C_{NAC}) \quad (19)$$

$$\theta_{III}^{*}=k_1/(k_1 + k_{-1} + k_{cat}C_{NAC}) \quad (20)$$

که علامت ستاره نشان دهنده مقادیر حالت پایا است. سپس:

$$n_8^{*}=k_1\Gamma k_{cat}C_{NAC}/(k_1 + k_{-1} + k_{cat}C_{NAC}) \quad (21)$$

و بر اساس معادلات سرعت، مقدار جریان فاراده در حالت پایا چنین خواهد بود:

$$i_f^{*}=FAk_1\Gamma k_{cat}C_{NAC}/(k_1 + k_{-1} + k_{cat}C_{NAC}) \quad (22)$$

بر مبنای مکانیسم ارائه شده و سینتیک نوشته شده، جریان فارادی حاصل از اکسایش N-استیل-L-سیستئین به ثابت‌های سرعت و غلظت سطحی گونه‌های آهن بستگی دارد. در یک پتانسیل خاص، ثوابت سرعت ثابت باقی می‌مانند و جریان فارادی تنها به غلظت سطحی گونه‌های آهن بستگی خواهد داشت. غلظت‌های سطحی نیز توسط سرعت واکنش کاتالیتیکی (واکنش۸) کنترل می‌شوند و آن نیز به غلظت توده N-استیل-L-سیستئین بستگی دارد. با توجه به این که استوکیومتری واکنش نسبت به واکنشگرها واحد است، بنابراین جریان فارادی به صورت خطی به غلظت توده N-استیل-L-سیستئین بستگی خواهد داشت. از طرفی، معادله ۲۲ یک پیچیدگی در وابستگی جریان فارادی به غلظت N-استیل-L-سیستئین را نشان می‌دهد. اما بر اساس مقادیر به دست آمده برای ثابت سرعت کاتالیتیکی، مقادیر گزارش شده برای ثابت سرعت زوج II [۳۲] و مقدار نوعی برای α_{NAC} (۰/۵) و حداکثر غلظت N-استیل-L-سیستئین در این مطالعه، می‌توان چنین استنتاج کرد که در پتانسیل ۸۹۰mV، بخش $k_{cat}C_{NAC}$ بسیار کوچکتر از بخش (k_1+k_{-1}) در معادله ۲۲ است. بنابراین می‌توان از بخش اول صرف نظر کرد. این باعث می‌شود که در معادله ۲۲ بین جریان فارادی و غلظت ارتباط خطی ایجاد شود. بنابراین در پتانسیل ۸۹۰mV، جریان فارادی به غلظت توده محلول وابسته خواهد بود (شکل درونی ۵).

تعیین مقدار N-استیل-L-سیستئین در نمونه حقیقی

کاربرد زیست حسگر برای آنالیز N-استیل-L-سیستئین توسط اندازه‌گیری آن در نمونه‌های تزریقی و قرص آن ارزیابی شد. مقادیر به دست آمده برای مقدار N-استیل-L-سیستئین در فرم های دارویی تطابق خوبی با مقادیر گزارش شده داشت. به منظور ارزیابی انتخابگری روش، اثر تداخل گلوکز، EDTA، ساکاروز، لاکتوز، فروکتوز، نشاسته، منیزیم استئارات، سدیم ساخارین، سدیم بنزوات، منتول، آمونیوم کلرید، بنزالکونیم کلرید وسدیم سیترات بررسی شد. کلیه این گونه‌ها در سطح زیست حسگر در پتانسیل مورد مطالعه اکسید نمی‌شوند و تداخلی در اندازه‌گیری ندارند.

مطالعه اکسیداسیون سیستئین با روش ولتامتری

ولتاموگرام‌های چرخه‌ای زیست حسگر در غیاب و حضور ۲۰μM سیستئین ثبت و منحنی‌هایی شبیه آنچه در شکل ۲B نشان داده شد، حاصل گردید. افزایش سیستئین به محلول باعث شد که جریان پیک آندی II افزایش و جریان پیک کاتدی کاهش یابد؛ اما پیک های زوج I بدون تغییر بمانند. در حضور سیستئین، بار آندی زوج II به میزان ۷۹/۹٪ بیشتر از بار کاتدی آن بود. این مقدار در غیاب سیستئین برابر ۴۰/۳٪ بود. این نتایج نشان می‌دهد که سیستئین با گونه فعال Fe(III) از طریق یک مکانیسم ردوکس چرخه ای واکنش می‌دهد و اکسید می‌شود. از طرفی، گونه فعال Co(III) که در پتانسیل های کمتر-مثبت ایجاد می شود، این توانائی را ندارد. بنابراین مکانیسم واکنش را می‌توان این طور نوشت:

$$Fe(III) + e \rightleftarrows Fe(II) \quad (23)$$

$$Fe(III) + CySH \xrightarrow{k_{cat}} Product + Fe(II) \quad (24)$$

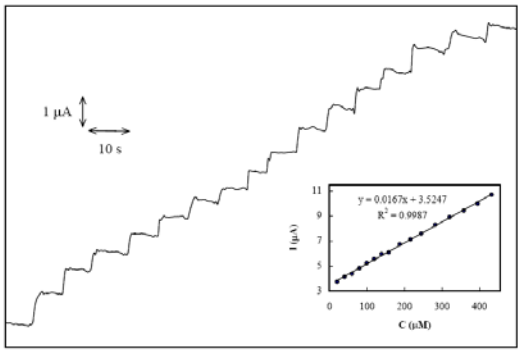
جدول ۲- متغیرهای مربوط به کارایی زیست حسگر برای تعیین مقدار سیستئین در سرم خون و ادرار

متغیر	ادرار	سرم
محدوده خطی (μM)	۷/۵-۳۷	۷/۵-۳۷
حساسیت ($\times10^2$ A M^{-1} cm^{-2})	۷/۴۲	۸/۳۱
حد تشخیص (μM)	۱/۷۸	۰/۷۶
حد کمی سازی (μM)	۵/۹۳	۲/۵۳
انحراف استاندارد نسبی (٪)	۲/۷۲	۲/۶۹
خطای مطلق (٪)	-۰/۶۹	۱/۰۵

جریان آندی حاصله و اکسایش سیستئین را می‌توان به اکسید شدن گروه تیولی آن بر اساس واکنش زیر مربوط دانست (۳۳):

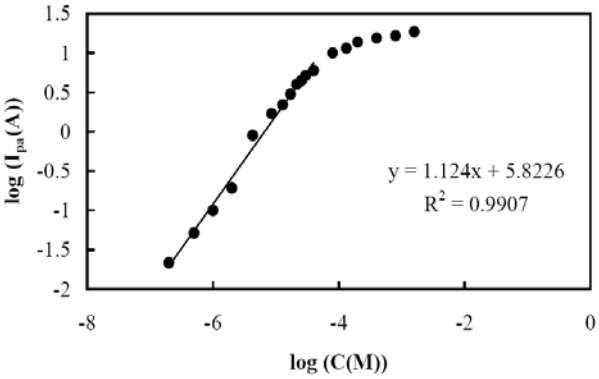
$$2CySH \rightarrow CyS\text{-}SyC + 2H^+ + 2e^- \quad (25)$$

سیستئین روی الکترود کربنی نیز اکسید می‌شود. اما، محصولات اکسایش مستقیم سیستئین بر سطح کربن جذب می‌شوند. بنابراین سطح الکترود کربنی در طی اکسایش سیستئین آلوده می‌شود و الکترودهای کربنی مناسب اندازه گیری سیستئین نیستند. از طرفی ولتاموگرام‌های چرخه‌ای پی در پی ثبت شده با زیست حسگر در محلول سیستئین پاسخ ثابتی را نشان داد. بنابراین سطح زیست حسگر در طی اندازه گیری آلوده نشده و برای اندازه‌گیری‌های پی در پی مناسب است.



شکل ۵- پاسخ آمپرومتری حاصل از زیست حسگر به غلظت‌های متفاوت N-استیل-L-سیستئین. شکل درونی: منحنی کالیبراسیون مربوط به پاسخ زیست حسگر

وابستگی جریان پیک به غلظت سیستئین در ولتاموگرام‌های چرخه‌ای بررسی شد. ولتاموگرام‌های شبه پایا برای غلظت‌های مختلف سیستئین، با سرعت روبش ۱۰mV/s ثبت شد. جریان پیک آندی زوج II تا حد ۱۰۰μM به غلظت سیستئین وابسته بود و در حد غلظت های بیشتر به حالت پایدار رسید (شکل ۶). این رفتار نشان دهنده این است که فرایند اکسایش سیستئین در سطح زیست حسگر از مکانیسم مایکل- منتن (Michaelis-Menten) پیروی می‌کند (۳۴). مرتبه واکنش نیز از شیب وابستگی خطی لگاریتم جریان آندی به لگاریتم غلظت توده محلول سیستئین برابر واحد به دست آمد.



شکل ۶. وابستگی جریان ایجاد شده در زیست حسگر به غلظت سیستئین

مطالعه اکسیداسیون سیستئین با روش کرنوآمپرومتری

کرنوآمپروگرام های زیست حسگر در غلظت‌های مختلف سیستئین با پله پتانسیل ۹۰۰mV ثبت شد که بر اساس آنها، جریان تنها توسط انتشار محدود می‌شود و بر اساس معادله ۵، مقدار ضریب انتشار سیستئین برابر $s^{-1}cm^2$ $^{-5}$ ۱۰×(۳/۴۷±۰/۰۵) به دست آمد. همچنین با استفاده از معادله ۶، مقدار ثابت سرعت الکتروکاتالیتیکی اکسایش سیستئین برابر mol^{-1} $s^{-1}cm^3$ ^{6}۱۰× (۵/۱۷±۰/۰۳) به دست آمد. این مقدار حدود ده برابر بزرگتر از مقدار مشابه به دست آمده برای N-استیل-L-سیستئین است.

تعیین مقدار سیستئین

پاسخ آمپرومتری زیست حسگر در غلظت‌های مختلف سیستئین با اعمال پتانسیل ۹۰۰mV ثبت شد. پارامتر های مربوطه این روش در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، پارامترهای تجزیه‌ای مربوط به زیست حسگر

حاضر برای تعیین مقدار سیستئین از دیگر حسگرهای مشابه بهتر می‌باشد (۲۳، ۳۸-۳۵).

اثر تداخل دیگر مواد بر تعیین مقدار سیستئین

اثر موادی که امکان تداخل در اندازه گیری دارند نیز بررسی شد. به این منظور، اثر تداخلی گلوکز، ساکارز، لاکتوز، فروکتوز، اگزالیک اسید، آلبومین سرم خون، سدیم بنزوات، منتول، بنزالکونیوم کلرید و سدیم سیترات بررسی شد. این ترکیبات در این محدوده پتانسیل روی زیست حسگر اکسید نمی‌شوند و تاثیری در پاسخ ایجاد شده برای سیستئین ندارند.

تعیین مقدار سیستئین در سیالات بیولوژیک

پاسخ آمپرومتری زیست حسگر به سیستئین در سرم خون و ادرار در پتانسیل ۹۰۰mV ثبت شد. بر این اساس، منحنی کالیبراسیون رسم و پارامترهای مرتبط به دست آمد که در جدول ۲ ارائه شده است. به منظور ارزیابی صحت روش و بررسی اثر بافت سیالات بیولوژیک، سیستئین به روش افزایش استاندارد تعیین شد. مقدار بازیابی سیستئین در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که در پاسخ زیست حسگر تداخلی از ترکیبات موجود در این سیالات دیده نمی‌شود.

نتیجه گیری

۱- نانوذرات هسته اکسید آهن(III)-پوسته کبالت هگزاسیانوفرات به روش شیمیائی ساخته شدند. روش سنتز شامل ترکیب یون های هگزاسیانوفرات و یون های کبالت در حضور هسته‌های نانوذره اکسید آهن بود. جهت تشکیل ذرات پوسته-هسته کنترل شرایط ترسیب شامل pH و دما اهمیت ویژه‌ای دارد.

۲- قطر ذرات حدود ۴۰nm و ضخامت پوسته ۲۰nm بود.

۳- نانو ذرات پوسته-هسته فعالیت ردوکس قابل توجهی داشته و با آنها می‌توان زیست حسگرهایی طراحی کرد.

۴- زیست حسگر ساخته شده با این نانوذرات (به عنوان مبدل سیگنال) به خوبی می‌تواند موادی مثل N-استیل-L-سیستئین و سیستئین را اکسید کرده و این مواد را با حساسیت و دقت زیاد اندازه‌گیری کند.

۵- زیست حسگر ساخته شده قادر به تشخیص مقتدیر بسیار کم مواد سولفیدریلی همانند سیستئین و N-استیل-L-سیستئین می‌باشد که این مواد نقش مهمی در متابولیسم و هموستازی سلولی دارند. مقادیر غیرنرمال این مواد می‌تواند با بیماری‌های خاصی در ارتباط باشد. برای مثال، کمبود سیستئین در سندرم رشد آهسته کودکان و آسیب کبدی نقش دارد. بنابراین تشخیص سریع و گزینشی این مواد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

۶- زیست حسگر حاضر با هزینه کم، حساسیت زیاد و پاسخ سریع در ابعاد کوچک از مزایای بسیاری نسبت به دیگر روش-های ارائه شده تاکنون برای اندازه‌گیری سیستئین و N-استیل-L-سیستئین برخوردار است.

۷- روش ساخت به خوبی می‌تواند برای سنتز دیگر هگزاسیانوفرات های فلزی به کار گرفته شود و یا اثر استفاده هسته‌های مختلف مطالعه شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (۳۱۰۹) به انجام رسید که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Nalwa HS, Editor. Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology. 1st ed. USA: American Scientific Publishers; 2004.

2. Heli H, Majdi S, Sattarahmady N. Fe_2O_3 core-$NaCo[Fe(CN)_6]$ shell nanoparticles-Synthesis and characterization. Mater Res Bull 2010; 45: 850-58.

3. de Tacconi NR, Rajeshwar K. Metal hexacyanoferrates: electrosynthesis, in situ characterization, and applications. Chem Mater 2003; 15:3046-62.

4. Koncki R. Chemical sensors and biosensors based on prussian blues. Crit Rev Anal Chem 2002;32:79-96.

5. Jahandideh S, Hoseini S, Jahandideh M, Hoseini A, Yazdi AS. Analysis of factors that induce cysteine bonding state. Comput Biol Med 2009; 39:332-39.

6. Droge W, Eck HP, Gmunder H, Mihm S. Modulation of lymphocyte functions and immune-responses by cysteine and cysteine derivatives. Am J Med 1991; 91:S140-44.

7. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Selhub J. Case-control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B-12, and cysteine as markers of cervical dysplasia. Cancer 2000; 89:376-82.

8. Lang CA, Mills B, Mastropaolo W, Liu MC. Blood glutathione decreases in chronic diseases. J Lab Clin Med 2000; 135:402-405.

9. Droge W, Eck HP, Mihm S. HIV-induced cysteine deficiency and t-cell dysfunction-A rationale for treatment with N-acetyl cysteine. Immunol Today 1992; 13:211-14.

10. Spataru N, Sarada BV, Popa E, Tryk DA, Fujishima A. Voltammetric determination of L-cysteine at conductive diamond electrodes. Anal Chem 2001; 73:514-19.

11. Voet D, Voet JG, Editors. Biochemistry. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1995. p.1263.

12. Feroci G, Fini A. Voltammetric investigation of the interactions between superoxide ion and some sulfur amino acids. Inorg Chim Acta 2007; 360:1023-31.

13. Czap K. N-acetylcysteine. Altern Med Rev 2000; 5:467-71.

14. Concha-Herrera V, Torres-Lapasio JR, Garcia-Alvarez-Coque MC. Chromatographic determination of thiols after pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and isoleucine. J Liq Chromatogr Relat Technol 2004; 27:1593-609.

15. Suarez WT, Vieira HJ, Fatibello-Filho O. Generation and destruction of unstable reagent in flow injection system: determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using bromine as reagent. J Pharm Biomed Anal 2005; 37:771-75.

16. Al-Ghannam S, El-Brashy A, Al-Farhan B. Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms. Farmaco 2002; 57:625-29.

17. Kolar M, Dobcnik D. Chemically prepared silver electrode for determination of N-acetyl-l-cysteine by flow-injection potentiometry. Pharmazie 2003; 58:25-28.

18. Suarez WT, Marcolino LH, Fatibello-Filho O, Voltammetric determination of N-acetylcysteine using a carbon paste electrode modified with copper(II) hexacyanoferrate(III). Microchem. J. 2006;82:163-67.

19. Moore RR, Banks CE, Compton RG, Electrocatalytic detection of thiols using an edge plane pyrolytic graphite electrode. Analyst 2004;129:755-58.

20. Gao ZN, Zhang J, Liu WY, Electrocatalytic: oxidation of N-acetyl-L-cysteine by acetylferrocene at glassy carbon electrode. J Electroanal Chem 2005;580:9-16.

21. Pournaghi-Azar MH, Ahour F. Palladized aluminum electrode covered by Prussian blue film as an effective transducer for electrocatalytic oxidation and hydrodynamic amperometry of N-acetyl-cysteine and glutathione. J Electroanal Chem 2008; 622:22-28.

22. Inoue T, Kirchhoff JR. Electrochemical detection of thiols with a coenzyme pyrroloquinoline quinone modified electrode Anal Chem 2000;72:5755-60.

23. Shi G, Lu J, Xu F, Sun W, Jin L, Yamamoto K, et al. Determination of glutathione in vivo by microdialysis using liquid chromatography with a cobalt hexacyanoferrate chemically modified electrode. Anal Chim Acta 1999;391:307-13.

24. Herzog G, Arrigan DWM. Electrochemical strategies for the label-free detection of amino acids, peptides, and proteins. Analyst 2007; 132:615-32.

25. Molnar-Perl I. Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately. J Chromatogram 2003; 987:291-309.

26. de Tacconi NR, Rajeshwar K, Lezna RO. Electrochemical impedance spectroscopy and UV-vis reflectance spectroelectrochemistry of cobalt hexacyanoferrate films. J Electroanal Chem 2006; 587:42-55.

27. Prabakar SJR, Narayanan SS. Surface modification of amine-functionalised graphite for preparation of cobalt hexacyanoferrate (CoHCF)-modified electrode: an amperometric sensor for determination of butylated hydroxyanisole (BHA). Anal Bioanal Chem 2006; 386:2107-15.

28. Kalele S, Gosavi SW, Urban J, Kulkarni SK, Nanoshell particles: synthesis, properties and applications. Curr Sci 2006; 91:1038-52.

29. Bard AJ, Faulkner LR, Editors. Electrochemical methods. New York: Wiley & Sons, Inc; 2001.

30. Barus C, Gros P, Comtat M, Daunes-Marion S, Tarroux R. Electrochemical behaviour of N-acetyl-l-cysteine on gold electrode-A tentative reaction mechanism. Electrochim Acta 2007; 52:7978-85.

31. Carmo DR, da Silva RM, Stradiotto NR. Electrocatalytic and voltammetric determination of sulfhydryl compounds through iron nitroprusside modified graphite paste electrode. J Braz Chem Soc 2003; 14:616-620.

32. Arduini F, Cassisi A, Amine A, Ricci F, Moscone D, Palleschi G. Electrocatalytic oxidation of thiocholine at chemically modified cobalt hexacyanoferrate screen-printed electrodes. J Electroanal Chem 2009; 626:66-74.

33. Ralph TR, Hitchman ML, Millington JP, Walsh FC. The electrochemistry of L-cystine and L-cysteine. 1. Thermodynamic and kinetic studies. J Electroanal Chem 1994; 375:1-15.

34. Lyons MEG, Fitzgerald CA, Smyth MR. Glucose-oxidation at ruthenium dioxide-based electrodes. Analyst 1994; 119:855-61.

35. Liu M, Li P, Cheng Y, Xian Y, Zhang C, Jin L. Determination of thiol compounds in rat striatum microdialysate by HPLC with a nanosized CoHCF modified electrode. Anal Bioanal Chem 2004; 380:742-50.

36. Kalimuthu P, John SA. Nanostructured electropolymerized film of 5-amino-2- mercapto-1, 3, 4-thiadiazole on glassy carbon electrode for the selective determination of L-cysteine. Electrochem Commun 2009; 11:367-70.

37. Chen X, Yang Y, Ding M. Electrocatalytic oxidation and sensitive detection of cysteine at layer-by-layer assembled carbon nanotube-modified electrode. Anal Chim Acta 2006;557;52-56.

38. Chen Z, Zheng H, Lu C, Zu Y. Oxidation of L-cysteine at a fluorosurfactantmodified gold electrode: lower overpotential and higher selectivity. Langmuir 2007; 23:10816-22.