



دانشگاه کردستان

دانشکده علوم

گروه شیمی

عنوان:

اندازه‌گیری الکتروکاتالیزی NADH با الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با
کمپلکس روتنیوم و نانوصفحات گرافن

پژوهشگر:

سیده نشمین حسینی

استاد راهنما:

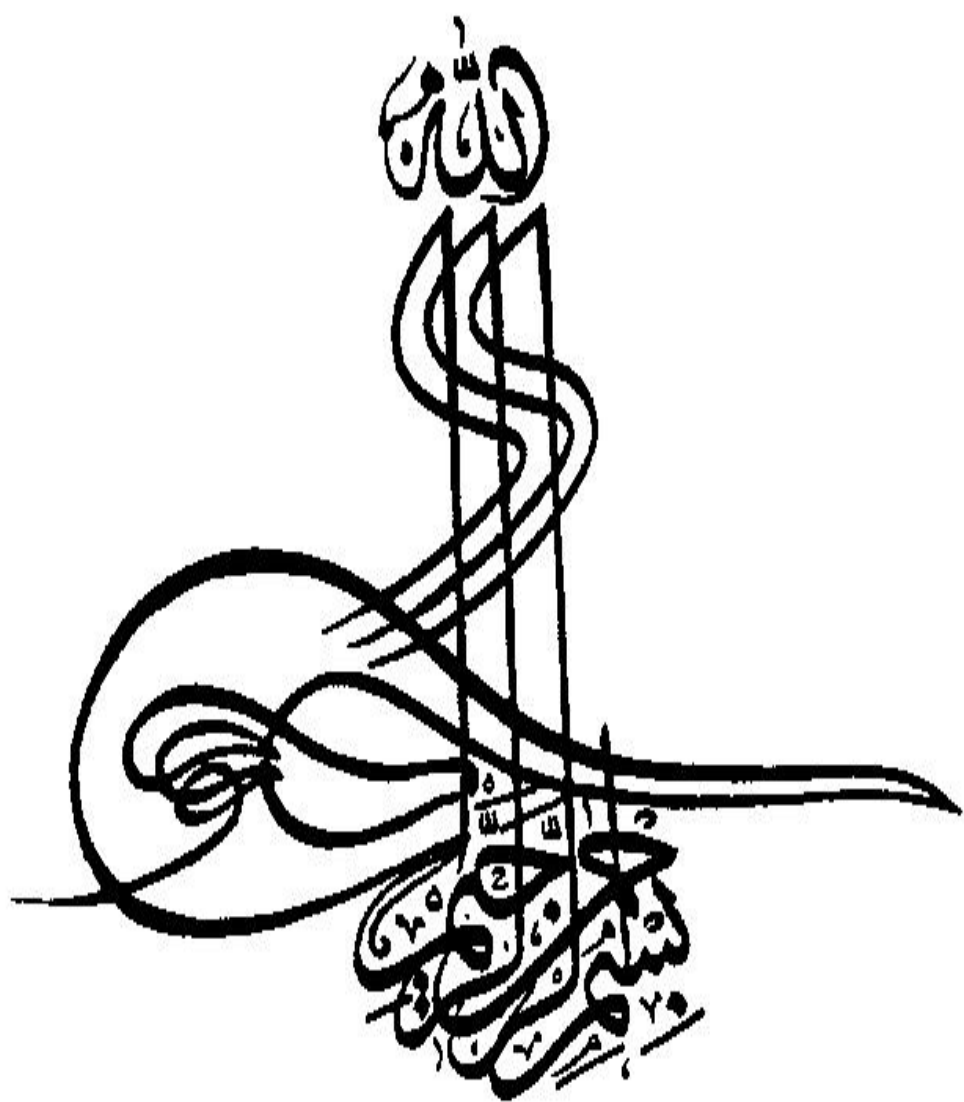
دکتر عبدالله سلیمی

استاد مشاور:

دکتر رحمان حلاج

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی گرایش تجزیه

اسفند ماه ۱۳۹۱



کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع
این پایان نامه (رساله) متعلق به دانشگاه کردستان است.

*****تعهد نامه*****

اینجانب سیده نشمین حسینی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیمی گرایش تجزیه دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه گروه شیمی تعهد می نمایم که محتوای این پایان نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

با تقدیم احترام

سیده نشمین حسینی

۱۳۹۱/۱۲/۲۳

تقدیم به دو فرشته زندگیم

پدر و مادر عزیزم

که

مخاط ناب باور بودن،

لذت و غرور دانستن،

جسارت خواستن،

عظمت رسیدن

و تمام تجربه های یکتا

و زیبای زندگیم،

مدیون حضور سبز آنهاست.

به سبک مرسوم نخارش پیمان نامه، ناچارم با واژه بابونیسیم: مشکرم، قدردانی می کنم، پاسکزارم و. ولی خوب و اتفهم که آنچه تحریر می شود کجا و کموننت دلم کجا. چه کنم جز اینکه امید بندم به این که بهمان آگاهند "ورای حد تقریر است"

سپاس خدایی را که اگر بندگان را از شناختن آیین پاسکزاری بر عطایای متواتری که به ایشان داده، محروم می ساخت از حدود انسانیت به مرز بهیبت می رفت و حمد و سپاس خدایی را که به ما عقل داد و از طریق عقل به ما علم آموخت.

استاد فریخته و فرزانه که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشد و گلشن سرای علم و دانش را با راهبانی های کارساز و سازنده بارور ساختند. باشکر و سپاس از استاد دانشمند و پر مایه ام جناب آقای دکتر عبدالله سلیمی که از محضر پر فیض تدریسشان، بهره بارده ام و همواره و در تمامی مراحل، من را یاری و راهبانی نمودند مشکرم و قدردانی نمایم. همچنین از استاد مشاورم دکتر رحمان حلاج مشکرم می کنم که به خوبی من را در خلال این پروژه راهبانی کردند و همواره مایه دلگرمی من بودند.

با تقدیر و درود فراوان خدمت پدر و مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرحه نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آنها بوده ام و همواره چراغ وجودشان رو منگن راه من در سختی ها و مشکلات بوده است. و همچنین از خانواده های عزیزم که همواره مشوق و پشتیبان من در تمام مراحل تحصیل بوده اند سپاسکزارم.

از دکتر خیاطیان و دکتر بهار که زحمت دآوری این پیمان نامه را به عهده داشتن کمال مشکرم را دارم. از کلیه ی استادی که در طول تحصیل افتخار ساگردیشان را داشتند مشکرم است، دکتر قادری، دکتر قوامی نهایت مشکرم را دارم.

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گران مایه ام خانم هانینب اززه کر، نسیم میرمحمدی راد، نسیم خضریان، الهام بیات، نسیم جستانی، فرزانه جاف، الهام معدی، اعظم کورانی، بهنوش خاموش، نسیم حقیقی، نسیم فیروزی و آقایان آسونوایی، فریدون جعفری، هژیر تیموریان، محمد نادری و عباس عرب زاده که مرا صمیمانه و مشتاقانه یاری داده اند.

و باشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مراد به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

چکیده

فرآیند ردوکس زوج NADH/NAD^+ که در بیش از ۳۰۰ آنزیم دی هیدروژناز است در سال‌های اخیر از موضوعات مهم تحقیقاتی بوده که دارای کاربردهای تجزیه‌ای و زیستی است. در این کار ما از الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوصفحات گرافن و کمپلکس روتنیوم شامل لیگاند ۱۰و۱-فنانترولین ۵و۶-دی اون به عنوان بستری مناسب برای اکسایش الکتروکاتالیتیکی NADH بکار گرفته شده است. رفتار الکتروشیمی الکتروود اصلاح شده به وسیله‌ی ولتامو متری چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ولتامتری چرخه‌ای حاکی از توانایی الکتروود GC اصلاح شده با GNSs/Ru complex برای اکسایش NADH در پتانسیل بسیار پایین ($0/0\text{V}$ نسبت به Ag/AgCl) و در نتیجه مقدار کاهش قابل توجهی در پتانسیل مازاد (حدود mV ۶۵۰) در مقایسه با الکتروود GC اصلاح نشده بود. نتایج بدست آمده حاصل از ولتامتری چرخه‌ای با الکتروود اصلاح شده نشان می‌دهد که حد تشخیص الکتروود اصلاح شده با GNSs/Ru complex برابر با 90 nM بوده و محدوده‌ی خطی، ۲ تا $22\ \mu\text{M}$ است. زیست حسگر فوق دارای گزینش‌پذیری بالا در حضور ترکیبات آسکوربیک اسید (AA)، دوپامین (DP)، اوریک اسید (UA) و استامینوفن (AP) است. با استفاده از آنزیم گلوکز دی‌هیدروژناز (GDH) بعنوان آنزیم مدل، امکان اندازه‌گیری گلوکز توسط سیستم پیشنهاد شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که پاسخ زیست‌حسگر به‌طور خطی با افزایش غلظت گلوکز در گستره غلظتی شامل ۳-۵/۰ میلی مولار افزایش پیدا می‌کند.

کلمات کلیدی: نانوصفحات گرافن، زیست حسگر گلوکز، کمپلکس روتنیوم (II)، نیکوتین آمید دی نوکلئوتید

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه‌ای بر حسگرها و زیست حسگرها

- ۱-۱- مقدمه‌ای بر حسگرها و زیست حسگرها ۱
- ۲-۱- انواع زیست حسگرها ۲
- ۳-۱- عناصر حسی ۳
- ۱-۳-۱- آنزیم‌ها ۳
- ۲-۳-۱- آنتی‌بادی‌ها ۴
- ۳-۳-۱- میکروپها ۵
- ۴-۳-۱- آپتامرها ۵
- ۴-۱- عناصر مبدل: ۶
- ۱-۴-۱- الکتروشیمیایی: ۶
- ۱-۴-۱- آمپرومتری ۷
- ۲-۴-۱- پتانسیومتری ۷
- ۳-۴-۱- بار سطحی با استفاده از ترانزیستور اثر میدان (FET) ۷
- ۴-۴-۱- هدایت‌سنجی ۸
- ۵-۴-۱- لومینسانس الکتروشیمیایی (ECL) ۹
- ۲-۴-۱- نوری ۱۰
- ۳-۴-۱- صوتی ۱۱
- ۴-۴-۱- گرمایی سنجی ۱۱
- ۵-۱- کاربردها ۱۲
- ۱-۵-۱- صنعت کشاورزی ۱۲
- ۲-۵-۱- صنعت غذا ۱۳
- ۳-۵-۱- کاربردهای بالینی ۱۳
- ۶-۱- تاریخچه‌ای از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی گلوکز ۱۴
- ۷-۱- زیست حسگرهای بر پایه NAD(P): ۱۵
- ۱-۷-۱- مکانیسم اکسیداسیون الکتروشیمیایی NADH ۱۷

- ۱-۱-۷-۱- اکسیداسیون الکتروشیمیایی NADH در سطح الکتروود..... ۱۷
- ۱-۱-۷-۲- اکسیداسیون الکتروشیمیایی حدواسط..... ۱۸
- ۱-۱-۷-۳- حدواسط‌های انتقال الکترون جهت اکسایش الکتروکاتالیزوری NAD(P)H..... ۱۹
- ۸-۱- مروری بر نانو ساختارهای گرافن سنتز، ویژگی‌ها و کاربردهای الکتروشیمیایی ۲۳
- ۱-۸-۱- مقدمه‌ای بر نانو ساختارهای گرافن ۲۳
- ۲-۸-۱- سنتز گرافن ۲۵
- ۳-۸-۱- خواص الکتروشیمیایی گرافن ۲۶
- ۴-۸-۱- کاربردهای گرافن..... ۲۶
- ۱-۴-۸-۱- استقرار نانوذرات روی گرافن و بکارگیری آن در ابر خازن‌ها ۲۷
- ۲-۴-۸-۱- کاربرد گرافن به عنوان کاتالیزور واکنش‌های شیمیایی ۲۷
- ۳-۴-۸-۱- کاربرد گرافن در ترانزیستور اثر میدان (FET) ۲۹
- ۴-۴-۸-۱- کاربرد گرافن در تولید الکترون در باتری‌های یون لیتیم ۲۹
- ۵-۴-۸-۱- کاربرد گرافن در ساخت حسگرها ۳۰
- ۶-۴-۸-۱- کاربرد گرافن در ساخت زیست حسگرها ۳۱

فصل دوم : بخش تجربی و ساخت الکتروودهای اصلاح شده با کمپلکس روتنیوم

- ۱-۲- مقدمه‌ای در مورد کمپلکس‌های روتنیوم..... ۳۲
- ۱-۲-۲- ترسیب الکتريکی ۳۲
- ۲-۲-۲- قرار دادن در غشاء پلیمری ۳۳
- ۳-۲-۲- قرار دادن در پیکره‌ی ژئولیت ۳۴
- ۴-۲-۲- سل - ژل ۳۴
- ۵-۲-۲- الکتروپلیمریزاسیون ۳۶
- ۶-۲-۲- نانولوله های کربن ۳۷
- ۱-۶-۲-۲- کامپوزیت‌ها ۳۷
- ۲-۶-۲-۲- ترسیب الکتريکی ۳۸
- ۳-۶-۲-۲- تغییر گروه‌های عاملی..... ۳۸
- ۴-۶-۲-۲- کوئوردیناسیون ۴۰

۴۰ جذب سطحی ۵-۶-۲-۲
۴۱ بخش تجربی ۲-۲
۴۱ مواد و معرف‌های مورد نیاز ۱-۲-۲
۴۲ دستگاه‌های مورد استفاده ۲-۲-۲
۴۲ سنتز نانو ورقه‌های گرافن ۳-۲-۲
۴۴ تهیه الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با صفحات گرافن و کمپلکس روتنیوم (GNSs/Ru complex) ۴-۲-۲
۴۴ تثبیت آنزیم بر روی الکترودهای اصلاح شده ۵-۲-۲
۴۵ بررسی رفتار الکتروشیمیایی الکترودهای اصلاح شده و اندازه‌گیری الکتروشیمیایی ۶-۲-۲

فصل سوم : ساخت حسگر و زیست‌حسگر NADH و گلوکز بر اساس الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با

نانوصفات گرافن و کمپلکس روتنیوم

۴۶ مقدمه
۴۸ روش‌های تثبیت زیست مولکول‌ها در سطح الکترودها ۱-۳
۴۸ مقدمه‌ای از نافیون ۱-۱-۳
۴۹ خواص نافیون ۲-۱-۳
۵۰ تعیین خواص و ویژگی‌های الکتروشیمیایی الکترودهای اصلاح شده (GC/GNSs/Ru complex) ۲-۳
 بررسی الکتروشیمی نانو ورقه‌های گرافن و کمپلکس روتنیوم ترسیب‌شده در سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای (GC/GNSs/Ru complex) ۱-۲-۳
۵۰complex) ۵۰
۵۲ بررسی پایداری الکترودهای اصلاح شده GC/GNSs/Ru complex ۲-۲-۳
۵۳ بررسی الکتروشیمی الکترودهای اصلاح شده GC/GNSs/Ru complex در سرعت‌های مختلف ۳-۲-۳
۵۴ محاسبه ضریب انتقال بار (α) و ثابت سرعت انتقال الکترون (k_s) برای الکترودهای اصلاح شده GC/GNSs/Ru ۴-۲-۳
۵۶ complex ۵۶
۵۷ محاسبه غلظت سطحی کمپلکس روتنیوم موجود در سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوصفات گرافن ۵-۲-۳
۵۷ گرافن ۵۷
۵۷ تاثیر pH بر پتانسیل پیک کمپلکس روتنیوم تثبیت شده روی الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو صفحات گرافن ۶-۲-۳
۵۷ صفحات گرافن ۵۷

- ۳-۲-۷- فعالیت الکتروکاتالیزوری الکتروود اصلاح شده برای اکسایش الکتروکاتالیزوری NADH ۵۹
- ۳-۲-۸- بررسی رفتار الکتروشیمیایی الکتروود اصلاح شده در غلظت‌های مختلف NADH ۶۰
- ۳-۲-۹- مکانیسم پیشنهادی برای واکنش الکتروکاتالیزی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو صفحات گرافن و کمپلکس روتنیوم (GC/GNSs/Ru complex) ۶۱
- ۳-۲-۱۰- تعیین گلوکز با زیست‌حسگر GC اصلاح شده با GNSs/Ru complex/GOx ۶۶
- ۳-۲-۱۱- بررسی اثر ترکیبات مزاحم بر روی پاسخ زیست‌حسگر گلوکز و آنالیز نمونه حقیقی ۶۸
- ۳-۳- نتیجه‌گیری ۷۰

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱- شمای یک زیست حسگر ۲
- شکل ۲-۱- نیروهای بین مولکولی اتصال آنتی ژن و آنتی بادی ۴
- شکل ۳-۱- واکنش ردوکس فضاویژه بین NAD^+ و $NADH$ ۱۶
- شکل ۵-۱- مکانیسم غیرفعالسازی پیشنهاد شده برای واکنش یک حدواسط جذب سطحی شده از نوع ارتوکینونی و $NADH$ ۲۱
- شکل ۶-۱- فرمول‌های ساختاری تعدادی از حدواسط‌های معمول برای اکسایش کاتالیزوری $NADH$ ، (A) ملدولا بلو (بارافنیل‌دی‌ایمین)؛ (B) N-متیل‌فنازینیم (ارتوفنیل‌دی‌ایمین)؛ (C) TCNQ (تتراسیانو کینودی‌متان)؛ و (D) TTF (تتراتیوفولوالن) ۲۲
- شکل ۷-۱- اشکال کربنی پیوند داده با هیبرید (A) sp^2 فولرن، (B) نانو لوله کربن تک لایه، (C) گرافن، (D) گرافیت ۲۴
- شکل ۸-۱- تهیه ی نانو کامپوزیت محلول در آب ۲۸
- شکل ۹-۱- واکنش کاتالیز شده توسط نانو کامپوزیت ۲۸
- شکل ۱۰-۱- ترانزیستور اثر میدان با بستر گرافنی تزئین شده با نانو ذرات طلا برای آشکار سازی پروتئین IgG ۲۹
- شکل ۱۱-۱- شماتیک ساخت و ساختار ذرات مرکب G-HM (گرافن-نانوذرات Fe_3O_4) ۳۰
- شکل ۱-۲- ولتاموگرام ترسیب الکتریکی کمپلکس روتنیم روی سطح الکتروود طلا ۳۳
- شکل ۲-۲- ولتاموگرام چرخه ای الکتروود BPG (الکتروود اصلاح شده با غشاء نافینون) تحت اتمسفر آرگون واکسیژن در بافر فسفات $0.1M$ $pH=4/4$ با سرعت روبش 0.5 ولت بر ثانیه، برای کمپلکسهای $[Ru^{III}(NH_3)_5(OH_2)]^{+3}$ ، (a)، $[Ru^{III}(NH_3)_4(OH_2)_2]^{+3}$ و (b) $cis-[Ru^{III}(NH_3)_4(OH_2)_2]^{+3}$ و (c) $trans-[Ru^{III}(NH_3)_4(OH_2)_2]^{+3}$ در غلظت‌های مختلف 10^{-2} تا 10^{-3} مولار ۳۳
- شکل ۳-۲- ولتاموگرام چرخه ای کمپلکس $Ru(NH_3)_6^{3+}$ که بطور مستقیم بر روی الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با زئولیت (B) و الکتروود خمیر کربن اصلاح نشده (A) قرار داده شده است در محلول الکتروولیت 0.05 مولار $NaCl$ با سرعت روبش 100 میلی ولت بر ثانیه. بلافاصله بعد از فرو بردن الکتروود (—)، 30 دقیقه بعد از قرار دادن الکتروود (----) در محلول الکتروولیت ۳۴

- شکل ۲-۴- ولتاموگرام الکتروود اصلاح شده کربن سرامیکی با کمپلکس روتنیم در حضور ۱/۶ میلی مولار تیوسولفات (d) و در غیاب تیوسولفات (c) در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار pH=۷ و با سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه (a) مانند (c) و (b) مانند (d) برای الکتروود اصلاح نشده در همان شرایط قبلی ۳۵
- شکل ۲-۵- تصویر SEM از سطح الکتروود اصلاح شده با نانولوله های کربن و آلیاژ Pt- Ru (A) ولتاموگرام الکتروود اصلاح شده با نانولوله های کربن و آلیاژ Pt-Ru (B) ۳۸
- شکل ۲-۶- تصویر TEM سطح نانولوله کربن که فلز پالادیم به روش تغییر گروه عاملی روی آن قرار گرفته است. ۳۹
- شکل ۲-۷- ولتاموگرام چرخه ای الکترودهای GC (A)، GC/CNT (B)، GC/Pd-CNT (C) در محلول H₂SO₄ (۱ مولار) اشباع شده با نیتروژن (a) و اکسیژن (b) با سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه ۳۹
- شکل ۲-۸- عامل دار کردن سطح نانولوله های کربن با کمپلکس Ir-(CO) Br(PPh₃) ۴۰
- شکل ۲-۹- ساختار کمپلکس [Ru(phen-dione)₂(4,4'-bpy)Cl]PF₆ ۴۲
- شکل ۲-۱۰- تصویر SEM الکتروود شیشه ای اصلاح شده با نانوصفحات گرافن ۴۳
- شکل ۲-۱۱- شمای کلی الکتروود اصلاح شده ی GC/GNSs/Ru complex (a) قرار دادن و تثبیت نانو ورقه های گرافن در الکتروود GC، (b) ترسیب کمپلکس Ru بر روی الکتروود GC/GNSs ۴۴
- شکل ۳-۱- ساختار پلیمری نافینون ۴۹
- شکل ۳-۲- ولتاموگرام های چرخه ای مربوط به (a) الکتروود کربن شیشه ای اصلاح نشده (b) الکتروود کربن شیشه ای و نانوصفحات گرافن (c) الکتروود کربن شیشه ای اصلاح شده با گرافن و کمپلکس روتنیوم در سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه ۵۱
- شکل ۳-۳- ولتاموگرام های چرخه ای متوالی الکتروود اصلاح شده با گرافن در محلول Ru complex در DMF با سرعت روبش ۵۰ میلی ولت بر ثانیه ۵۲
- شکل ۳-۴- ولتاموگرام های چرخه ای الکتروود کربن شیشه ای اصلاح شده با نانوصفحات گرافن و کمپلکس روتنیوم در pH=۷/۴ و سرعت روبش پتانسیل برابر با ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه. (a) چرخه ی اول، (b) بعد از ۱۰۰ چرخه .. ۵۳
- شکل ۳-۵- پاسخ های ولتامتری چرخه ای الکتروود GC اصلاح شده با GNSs/Ru complex در ۰/۱ M بافر فسفات با pH=۷/۴ در سرعت های روبش (از داخل به خارج) ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ mV s⁻¹. (حاشیه A): نمودار جریان پیک بر حسب سرعت روبش. (حاشیه B): نمودار جریان پیک بر حسب جذر سرعت روبش (حاشیه C): تغییرات جدایی پتانسیل پیک بر حسب لگاریتم سرعت روبش ۵۳

شکل ۳-۶. A. ولتاموگرام‌های الکتروود GC/GNSs/Ru complex در محلول ۰/۱ مولار بافر استات در سرعت روبش ۲۰ میلی

ولت بر ثانیه در pH های ۲ تا ۹. B. نمودار تغییرات پتانسیل فرمال نسبت به تغییرات pH..... ۵۸

شکل ۳-۷- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکتروودهای GC اصلاح شده با GNSs (b,a) در pH=۷/۴ با

سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه در غیاب (a, C) و در حضور (b, d) و ۰/۰۲ mM از NADH..... ۵۹

شکل ۳-۸: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکتروود GC/GNSs/ Ru complex در محلول ۰/۱ مولار بافر استات در pH=۷/۴ در سرعت

رویش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه در غلظت‌های (به ترتیب از داخل به خارج) ۲،۰، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۲۰،

۲۲ میکرو مولار NADH. نمودار حاشیه نمودار تغییرات جریان کاتالیزوری بر حسب غلظت NADH..... ۶۰

شکل ۳-۹- دیفرانسیل پالس الکتروود اصلاح شده در بافر فسفات ۰/۱ مولار در غلظت‌های مختلف NADH (A) در pH=۴

(B) در pH=۷..... ۶۴

شکل ۳-۱۰- LSV الکتروود اصلاح شده در بافر فسفات ۰/۱ مولار در غلظت‌های مختلف NADH (A) در pH=۴ (B) در

pH=۷..... ۶۵

شکل ۳-۱۱- A. طیف visible-UV محلول کمپلکس روتنیوم در بافر pH=۷ (a) قبل از الکتروولیز (b) بعد از الکتروولیز B. طیف

visible-UV محلول کمپلکس روتنیوم در بافر pH=۴ (a) قبل از الکتروولیز (b) بعد از الکتروولیز..... ۶۶

شکل ۳-۱۲- نمای شماتیک واکنش‌های الکتروکاتالیزوری در گیر در زیست‌حسگر گلوکز با استفاده از الکتروود GC اصلاح

شده با کمپلکس روتنیوم و نانوصفحات گرافن..... ۶۷

شکل ۳-۱۳- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکتروود GC اصلاح شده با GNSs/Ru complex/GDH در بافر فسفات ۰/۱ مولار

با pH=۷/۴ شامل ۱mM از ترکیب NAD⁺ و غلظت‌های مختلف گلوکز در سرعت روبش ۲۰mV s⁻¹ (از داخل به

خارج) ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳mM. شکل حاشیه: تغییرات جریان کاتالیزوری بر حسب غلظت‌های گلوکز

..... ۶۸

شکل ۳-۱۴ پاسخ ولتامتری چرخه‌ای الکتروود GC اصلاح شده با GNss/Ru complex در بافر استات با pH=7.4 در حضور

مقادیر ۰/۱ میلی مولار از (UA, DP, AP, Glucose, AA) و ۰/۰۱ میلی ولار از NADH. a تا h به ترتیب به

صورت (a) الکتروود اصلاح شده (b NADH (c Glucose (d UA (e AA (f DP (h) NADH..... ۶۹

فهرست جداول

جدول ۱-۱- عناصر زیستی و مبدل‌هایی که در ساخت زیست‌حسگرها متداول هستند ۶

جدول ۱-۳- مقایسه‌ی حسگر ساخته شده با برخی حسگرهای گزارش شده ۶۱

فصل اول

مقدمه‌ای بر حسگرها و زیست حسگرها

۱-۱- مقدمه‌ای بر حسگرها^۱ و زیست حسگرها^۲

حسگرها، ابزارهایی هستند که از یک عنصر حسگر، یک جزء مبدل و یک سیستم نمایش تشکیل شده اند، که عنصر حسگر توانایی تشخیص و یا اتصال به گونه‌ی موردنظر را دارد و جزء مبدل این اتصال را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند و در نهایت سیستم نمایش سیگنال الکتریکی یا نوری را به فرمت دیجیتال جهت استفاده کاربران آماده می‌سازد [۱]. حسگرها بر اساس عنصر حسگر به دو گروه عمده‌ی حسگرهای شیمیایی و زیست حسگرها دسته بندی می‌شوند. زیست حسگرها، ابزارهای تشخیصی بر پایه‌ی بکارگیری اجزای زیستی (آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها، DNA و غیره) می‌باشند و قادرند یک آنالیت خاص را با حساسیت و قدرت گزینش‌پذیری بالا تشخیص دهند [۲-۴]. در این حسگرها، عنصر حسگر در سطح الکتروود به عنوان کاتالیزور، یک واکنش شیمیایی یا بیوشیمی را جهت بدست آوردن یک سیگنال خروجی تسهیل می‌بخشد. از طرف دیگر، حسگرها را می‌توان بر اساس سیگنال خروجی به حسگرهای گرمایی، نوری، الکتروشیمیایی و غیره دسته‌بندی کرد. در این میان، حسگرهای الکتروشیمیایی بیشترین مزیت را نسبت به سایر حسگرها دارند زیرا در این حسگرها، الکتروود می‌تواند مواد را بدون آن که آسیبی به آن‌ها برساند شناسایی کند [۵].

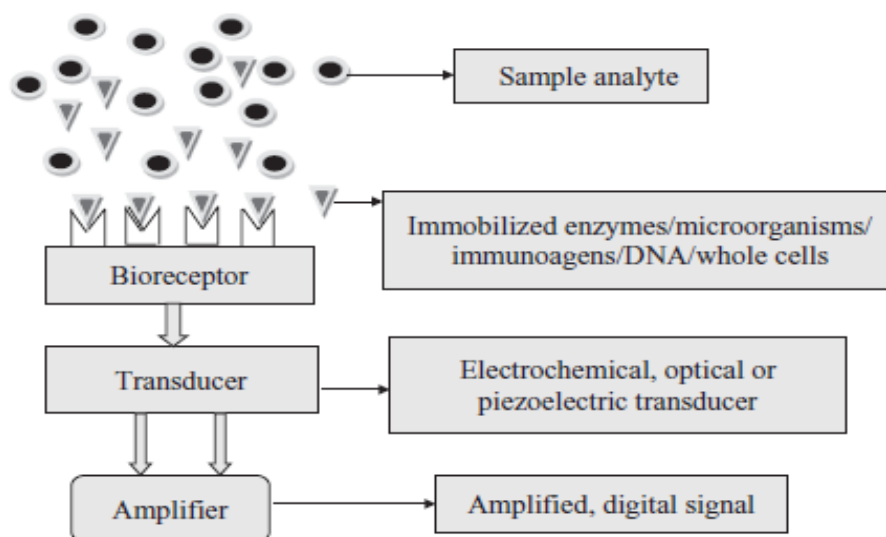
یک زیست حسگر ایده‌آل باید دارای پایداری خوب، گستره‌ی خطی وسیع، حساسیت بالا و زمان پاسخ‌گویی کوتاه باشد، علاوه بر این باید ارزان، کوچک و قابل حمل، قابل استفاده برای یک کاربر نیمه حرفه‌ای و همچنین دارای سازگاری زیستی باشد.

¹ Sensor

² Biosensor

۲-۱- انواع زیست حسگرها

زیست حسگرها را بر حسب عنصر زیستی آن‌ها می‌توان دسته‌بندی کرد. عناصر زیستی شامل آنزیم‌ها،^۱ آنتی‌بادی‌ها،^۲ میکروارگانیسم‌ها^۳، بافت‌های زیستی و اجزای سلولی می‌باشند. اگر آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن‌ها و یا اجزای آنها، به عنوان عامل تشخیص زیستی بکار گرفته شوند، این ابزار ایمن حسگر^۴ نامیده می‌شود [۶]. زیست حسگرهایی بر پایه‌ی آپتامرها (توالی‌های مصنوعی RNA یا DNA تک رشته‌ای) را آپتاسنسر می‌نامند [۷]. ابزارهایی که در آن‌ها از آنزیم به عنوان عامل تشخیص زیستی استفاده می‌شود زیست حسگرهای آنزیمی نامیده می‌شوند [۸]. نمایی از زیست حسگر در شکل (۱-۱) نشان داده شده است.



شکل ۱-۱- شمای یک زیست حسگر

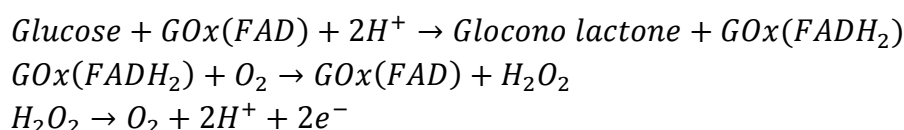
عناصر زیستی بخش اصلی زیست حسگرها را تشکیل می‌دهند. به همین دلیل در بخش بعدی به طور مختصر به عناصر زیستی پرداخته می‌شود.

¹ Enzymes
² Antibodies
³ Micro-organisms
⁴ Immunosensor

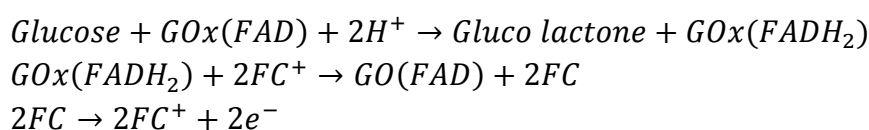
۱-۳- عناصر حسی

۱-۳-۱- آنزیم‌ها

آنزیم‌ها، پروتئین‌هایی با فعالیت کاتالیزوری و گزینش‌پذیری بالا برای اجزای مورد نظر هستند. از آن‌ها در دهه‌ی اخیر برای سنجش غلظت آنالیت‌های مختلف استفاده شده است [۹]. دسترسی تجاری آن‌ها در خلوص بالا باعث تولید انبوه آن‌ها در ساخت حسگرهای آنزیمی شده است. مهمترین عوامل محدودکننده آن‌ها pH، قدرت یونی، مهارکننده‌ی شیمیایی و دما می‌باشند که بر فعالیت آن‌ها تاثیر می‌گذارند. آنزیم‌ها زمانی که در معرض دمای بالای ۶۰°C قرار گیرند تجزیه می‌شوند. یک دسته از آنزیم‌هایی که به طور گسترده در ساخت زیست حسگرها به کار می‌روند اکسیدازها هستند که بر اساس مصرف اکسیژن محلول و تولید هیدروژن پراکسید عمل می‌کنند. آنزیم‌ها به صورت جذب سطحی، پیوند کووالانسی، گیرافتادن در ژل یا پلیمر و قرارگرفتن در محلول دارای غشای گزینش‌پذیر تثبیت می‌شوند. آنزیم‌ها معمولاً با مبدل‌های الکتروشیمیایی کوپل می‌شوند [۱۰]. زیست حسگرها آنزیمی به طور کلی به سه دسته‌ی نوع اول و نوع دوم تقسیم می‌شوند. در زیست حسگرهای نوع اول از هیچ‌گونه حدواسطی استفاده نمی‌شود. همان‌گونه که در زیر نشان داده شده است گلوکز در حضور FAD به FADH₂ تبدیل می‌شود که این ترکیب در حضور اکسیژن مجدداً به FAD و H₂O₂ تبدیل می‌شود و H₂O₂ در سطح الکتروکد اکسید شده و به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد بررسی قرار می‌گیرد.

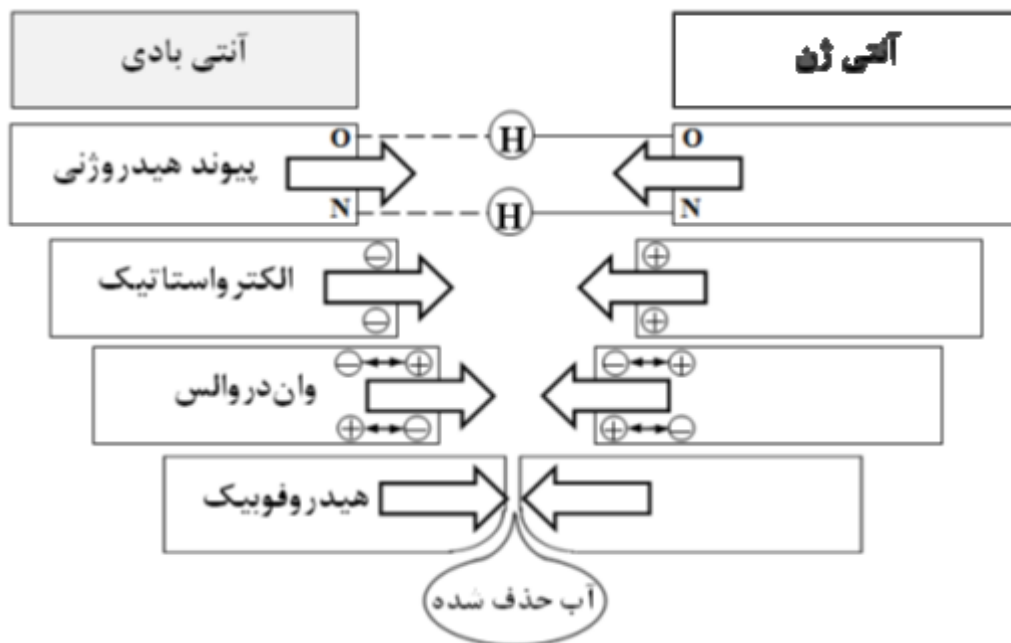


در زیست حسگرهای نوع دوم از یک حدواسط برای ایجاد سیگنال استفاده می‌شود. همان‌گونه که در زیر نشان داده شده است، گلوکز در حضور FAD تولید FADH₂ می‌کند، ترکیب مذکور در حضور فروسن (FC⁺) ایجاد FAD و فرم اکسیدی فروسن می‌کند، پیک اکسایشی فروسن به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد بررسی قرار می‌گیرد. در اینجا فروسن نقش حدواسط را دارد [۱۱].



۱-۳-۲- آنتی بادی‌ها

آنتی بادی‌ها، پروتئین‌هایی با گزینش‌پذیری بالایی هستند. آن‌ها به وسیله‌ی لنفوسیت B در پاسخ به آنتی‌ژن^۱ که یک ماده‌ی خارجی در اندام‌هاست تولید می‌شوند. پیوند آنتی بادی با آنتی‌ژن، در مقایسه با پیوند آنزیم با سوبسترای مربوط، بسیار قوی‌تر و اختصاصی‌تر است. در حقیقت، آن‌ها نسبت به گونه‌های مختلف از یک ماده بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. این مواد اغلب به صورت نشاندار مورد استفاده قرار می‌گیرند. بسیاری از آنتی بادی‌ها در سطح تجاری در دسترس‌اند و معمولاً برای سنجش ایمنی از آن‌ها استفاده می‌کنند. اتصال آنتی‌ژن به آنتی بادی پیوندی برگشت‌پذیر است، در این اتصال نیروهای نظیر پیوند هیدروژنی، الکتروستاتیک، واندروالسی و هیدروفوب موثر هستند (شکل ۱-۲). آنتی بادی‌ها معمولاً از طریق پیوند کووالانسی به وسیله‌ی گروه‌های آمین، کربوکسیل، آلدهید و تیول بر روی سطح تثبیت می‌شوند. سطح باید قبلاً توسط گروه‌های عاملی مثل کربوکسیل، آمین، هیدروکسیل و سایر گروه‌ها عامل‌دار شده باشد [۱۲].



شکل ۱-۲- نیروهای بین مولکولی اتصال آنتی‌ژن و آنتی بادی [۴]

¹ Antigen

به علاوه، پیوندها ممکن است برگشت پذیر نباشد و جهت تکرارپذیری سطح نیاز به تغییرات شدید مثل pH پایین، قدرت یونی بالا، شوینده‌ها و غیره باشد. مهم‌ترین مزیت ایمن حسگرها علاوه بر سنجش ایمنی آن‌ها، می‌توانند در زمینه‌ی اندازه‌گیری سریع عمل کنند. ایمن حسگرها معمولاً با مبدل‌های نوری و صوتی کوپل می‌شوند.

۱-۳-۳- میکروب‌ها

استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان عناصر زیستی در ساخت زیست‌حسگرها، بر مبنای اندازه‌گیری متابولیسم آن‌ها است، در این زیست‌حسگرها، برهم‌کنش بین میکروارگانیسم‌ها و آنالیت همراه با تغییر شیمیایی در غلظت یکی از اجزای موردنظر بوده که در بسیاری از موارد همراه با مصرف اکسیژن است. متداول‌ترین روش برای این اندازه‌گیری روش الکتروشیمیایی است [۱۳]. سلول‌های میکروبی ارزان‌تر از آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها هستند، پایداری بهتری دارند و می‌توانند به همراه چندین واکنش پیچیده شامل آنزیم‌ها و کوفاکتورها انجام گیرند. برعکس، گزینش‌پذیری آن‌ها نسبت به آنزیم‌ها کم‌تر است، زمان پاسخگویی و بازیافت آن‌ها طولانی‌تر است و ممکن است به کالیبراسیون‌های مکرر نیاز داشته باشند. میکروارگانیسم‌ها بر روی شبکه‌های نایلونی^۱، غشاهای نیترات سلولز^۲ یا استیل سلولز^۳ تثبیت می‌شوند [۱۶-۱۴].

۱-۳-۴- آپتامرها

آپتامرها توالی الیگونوکلئوتیدی RNA یا DNA تک رشته‌ای سنتز شده‌ای هستند که در اشکال سه بعدی تا خورده‌اند و به صورت اختصاصی و با قابلیت بالا با مولکول‌های هدف برهم‌کنش می‌دهند [۱۷]. در سال‌های اخیر آپتامرها به علت قابلیت بالا و عملکرد اختصاصی و پایداری‌شان به عنوان معرف‌های تشخیصی ایده‌آل در توسعه‌ی نانو حسگرها به کار می‌روند [۱۸]. آپتامرها می‌توانند در محدوده‌ی وسیع و با گزینش‌پذیری بالا به مولکول‌های هدف مثل داروها، پروتئین‌ها و یا مولکول‌های آلی و معدنی متصل می‌شوند. ساختار شیمیایی آپتامرها امکان اصلاح آن‌ها را با گروه‌های عاملی مختلف به منظور اهداف گوناگون ممکن می‌سازد. در نهایت، پایداری بیشتر آپتامرها نسبت به

¹ Nylon nets

² Cellulose nitrate membranes

³ Acetyl cellulose