وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه
گاوازنگ - زنجان

ساخت و بررسی رفتار الکتروشیمیایی الکترودهای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی آراسته شده بانانو ذرات پالادیم و کاربرد آن‌ها درالکتروشیمی تجزیه‌ای

پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد

آنا علیدوست

استاد راهنما: دکتر بهزاد حقیقی

آبان ۱۳۹۰

چکیده

نانوذرات پالادیوم برروی سطح نانولوله‌های کربنی از طریق تجزیه حرارتی پالادیم استات تزئین گردید. **سپس** سطح الکترود کربن شیشه‌ای با نانولوله‌های کربنی چند دیواره آراسته شده با نانوذرات پالادیم اصلاح شد. در انتها گلوکزاکسیداز به وسیله‌ی نفیون روی الکترود اصلاح شده تثبیت شد. الکترود ساخته شده در محلول بافر فسفات ۰/۱ M (pH = ۷) یک زوج پیک با پتانسیل فرمال ۰/٤۷- ولت از خود نشان می‌داد که نشان دهنده‌ی انتقال الکترون مستقیم گلوکز اکسیداز بود. از رسم پتانسیل فرمال نسبت به pH یک خط راست با شیب $-٥٦\ mV\ pH^{-1}$ حاصل شد که به مقدار تئوری $٥٩\ mV\ pH^{-1}$ نزدیک است و حاکی از انجام یک فرایند اکسایش- کاهش دو الکترون، دو پروتونه است. سرعت انتقال الکترون گلوکزاکسیداز $١/٨٣\ s^{-1}$ محاسبه گردید. الکترود اصلاح شده در برابر کاهش اکسیژن فعالیت الکتروکاتالیتیکی خوبی از خود نشان داد. لذا اندازه‌گیری گلوکز بر اساس کاهش اکسیژن انجام گرفت. منحنی درجه‌بندی برای اندازه‌گیری گلوکز در محدوده‌ی ۰/۵ تا ۳ میلی‌مولار با ضریب همبستگی ۰/۹۹٤ خطی بود. حساسیت و حد تشخیص به ترتیب $٩/٧٢٤\ \mu A\ mM^{-1}$ و ۱۲۷ µM به دست آمد. این حسگر انتخاب‌پذیری و پایداری خوبی در اندازه‌گیری گلوکز نشان داد.

فهرست مطالب

فهرست شکل‌ها VI

فهرست جدول‌ها VIII

فصل اول

مقدمه ۱

۱-۱- حسگرها و زیست‌حسگرها ۱

۱-۲- اجزاء یک زیست‌حسگر ۳

۱-۳- کاربرد زیست‌حسگرها ۵

۱-۳-۱-آزمایشگاه‌های بالینی ۵

۱-۳-۲-کنترل فرایندهای صنعتی ۵

۱-۳-۳- بررسی‌های زیست محیطی ٦

۱-٤- روش‌های تثبیت گونه‌های زیستی ٦

۱-۵- اصول اساسی زیست‌حسگرهای گلوکز ۷

۱-۵-۱- بیماری دیابت ۷

۱-۵-۲- نسل‌های زیست‌حسگرهای آمپرومتری گلوکز ۱۰

۱-۵-۲-۱- نسل اول زیست‌حسگرهای گلوکز ۱۰

۱-۵-۲-۲- نسل دوم زیست‌حسگرهای گلوکز ۱۰

۱-۵-۲-۳- نسل سوم زیست‌حسگرهای گلوکز ۱۲

۱-٦- انتقال الکترون مستقیم ۱۲

۱-٦-۱- انتقال الکترون مستقیم آنزیم‌ها ۱۲

۱-٦-۲- انتقال الکترون مستقیم آنزیم گلوکز اکسیداز ۱۳
۱-۷- الکترودهای اصلاح‌شده ۱۵
۱-۷-۱- نانو لوله‌های کربنی ۱٦
۱-۷-۲- نانو ذرات فلزی ۱۸
۱-۷-۳- نانو لوله‌های کربنی آراسته شده با نانو ذرات فلزی ۱۹
۱-۸- اهداف پروژه ۲۰

فصل دوم

مروری بر تحقیقات گذشته ۲۱
۲-۱- الکترودهای اصلاح شده برای اندازه‌گیری گلوکز ۲۱
۲-۲- انتقال الکترون مستقیم آنزیم گلوکزاکسیداز و زیست‌حسگرهای گلوکز ۲۳

فصل سوم

روش کار و مواد ۳۲
۳-۱- وسایل و ابزار ۳۲
۳-۲- واکنش‌گرها ۳۳
۳-۲-۱- روش تهیه‌ی محلول‌ها ۳٤
۳-۳- روش تهیه‌ی مواد به‌کار رفته در ساختار الکترود اصلاح‌شده ۳۵
۳-۳-۱- روش تهیه‌ی نانولوله‌های کربنی چنددیواره تزیین‌شده با نانوذرات پالادیم ۳۵
۳-٤- روش ساخت الکترود اصلاح‌شده ۳٦

فصل چهارم

بحث و نتایج ۳۸
٤-۱- مقدمه ۳۸
٤-۲- بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، ولتامتری چرخه‌ای و امپدانس الکتروشیمیایی nanoPd-MWCNTs ۳۹

٤-٣- بررسی رفتار الکتروشیمیایی آنزیم گلوکزاکسیداز ٤٣
٤-٤- الکتروکاتالیز کردن کاهش اکسیژن برروی GCE/ nanoPd-MWCNTs/GOD /nafion ٤٤
٤-٥- فعالیت الکتروکاتالیستی nanoPd-MWCNTs/GOD/nafion نسبت به گلوکز ٤٥
٤-٦- بررسی اثر حضور اکسیژن در پاسخ‌دهی GCE/nanoPd-MWCNTs/GOD/nafion نسبت به گلوکز ٤٧
٤-٧- بهینه کردن ساخت GCE/nanoPd-MWCNTs/GOD/nafion ٤٨
٤-٧-١- بهینه‌سازی مقدار nanoPd-MWCNTs ٤٨
٤-٧-٢- بهینه‌سازی مقدار گلوکزاکسیداز ٤٩
٤-٧-٣- بهینه‌سازی درصد نفیون ٥٠
٤-٨- بررسی اثر pH ٥١
٤-٩- بررسی اثر سرعت روبش پتانسیل ٥٣
٤-١٠- تهیه منحنی درجه‌بندی گلوکز ٥٦
٤-١١- بررسی تکرارپذیری الکترود ٥٨
٤-١١-١- بررسی تکرارپذیری پاسخ ولتامتری چرخه‌ای الکترود نسبت به گلوکز ٥٨
٤-١١-٢- بررسی تکرارپذیری ساخت الکترود ٦٠
٤-١٢- بررسی پایداری الکترود ٦٢
٤ -١٢-١- بررسی پایداری الکتروشیمیایی الکترود ٦٢
٤ -١٢-٢- بررسی پایداری نگهداری الکترود ٦٤
٤-١٣- بررسی اثر مزاحمت احتمالی گونه‌های همراه در اندازه‌گیری گلوکز ٦٦
٤-١٣-١- بررسی اثر مزاحمت اوریک اسید در اندازه‌گیری گلوکز ٦٦
٤-١٣-٢- بررسی اثر مزاحمت اسکوربیک اسید در اندازه‌گیری گلوکز ٦٨
٤-١٣-٣- بررسی اثر مزاحمت استامینوفن در اندازه‌گیری گلوکز ٧٠
٤-١٤- نتیجه‌گیری ٧٣

مراجع ٧٦

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. شمای کلی یک زیست‌حسگر ۲

شکل ۱-۲. عملکرد زیست‌حسگر نسل دوم گلوکز ۱۱

شکل ۱-۳ . شکل‌های مختلف جهت‌گیری آنزیم ۱٤

شکل ۱-٤. تصویر شماتیک انتقال الکترن مستقیم از مرکز ردوکس آنزیم به الکترود، توسط نانو ذرات ۱۵

شکل ۱-۵. ساختار نانولوله‌های کربنی ۱۷

شکل ٤-۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی پویشی nanoPd-MWCNTs ۳۹

شکل ٤-۲. بررسی ولتاموگرام‌های چرخه‌ای برای GCE ، GCE/MWCNTs و GCE/nanoPd-MWCNTs در محلول ۰/۵ M H_2SO_4 ..... ٤۰

شکل ٤-۳. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای و نمودارهای نایکوئیست GCE، GCE/ MWCNTsو GCE/nanoPd-MWCNTs ٤۲

شکل ٤-٤. ولتاموگرام مربوط به بررسی رفتار الکتروشیمیایی آنزیم گلوکزاکسیداز در محلول بافر فسفات ۰/۱M (pH = ۷) اشباع‌شده از اکسیژن ٤۳

شکل ٤-۵. ولتاموگرام مربوط الکتروکاتالیز کردن کاهش اکسیژن برروی GCE/ nanoPd-MWCNTs/GOD /nafion ٤٤

شکل ٤-٦. ولتاموگرام‌های مربوط به فعالیت الکتروکاتالیستی nanoPd-MWCNTs/GOD/nafion نسبت به گلوکز ٤٦

شکل ٤-٧. بررسی اثر حضور اکسیژن در پاسخ‌دهی GCE/nanoPd-MWCNTs/GOD/nafion نسبت به گلوکز ٤٧

شکل ٤-٨. نمودار حساسیت الکترود نسبت به افزایش گلوکز بر حسب حجم سوسپانسیون nanoPd-MWCNTs ٤٩

شکل ٤-٩. نمودار حساسیت الکترود نسبت به افزایش گلوکز بر حسب واحد گلوکزاکسیداز ٥٠

شکل ٤-١٠. نمودار حساسیت الکترود نسبت به افزایش گلوکز بر حسب درصد نفیون ٥١

شکل ٤-١١. ولتاموگرام‌های مربوط به بررسی اثر pH ٥٢

شکل ٤-١٢. ولتاموگرام‌های مربوط به بررسی اثر سرعت روبش پتانسیل ٥٥

شکل ٤-١٣. ولتاموگرام‌های مربوط به تهیه منحنی درجه‌بندی گلوکز ٥٧

شکل ٤-١٤. بررسی تکرارپذیری پاسخ ولتامتری چرخه‌ای الکترود نسبت به گلوکز ٥٨

شکل ٤-١٥. بررسی تکرارپذیری ساخت الکترود ٦٠

شکل ٤-١٦. بررسی پایداری الکتروشیمیایی الکترود ٦٢

شکل ٤-١٧. بررسی پایداری نگهداری الکترود ٦٤

شکل ٤-١٨. بخشی از ولتاموگرام‌های مربوط به بررسی اثر مزاحمت اوریک اسید در اندازه‌گیری گلوکز ٦٧

شکل ٤-١٩. بخشی از ولتاموگرام‌های مربوط به بررسی اثر مزاحمت اسکوربیک اسید در اندازه‌گیری گلوکز ٦٩

شکل ٤-٢٠. بخشی از ولتاموگرام‌های مربوط به بررسی اثر مزاحمت استامینوفن در اندازه-گیری گلوکز ٧١

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱. نمونه‌هایی از بافت‌های حاوی آنزیم به‌کار رفته در زیست‌حسگرها ٤

جدول۳-۱- نام و ویژگی‌های مواد شیمیایی استفاده‌شده ۳۳

جدول ٤-۱ مقادیر m^{-1} برحسب میزان $n\Delta E_p$ حاصل از آزمایش های سرعت روبش ٥٤

جدول ٤-۲. سیگنالهای I_p به‌دست آمده برای ده چرخه پی‌درپی در حضور ۲ mM گلوکز در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH = ۷ در پتانسیل ۰/۱- ولت ٥۹

جدول ٤-۳. سیگنالهای I_p به‌دست آمده برای پنج الکترود ساخته شده به صورت جداگانه در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH = ۷ حاوی ۲ mM گلوکز در پتانسیل ۰/۱- ولت ٦۱

جدول ٤-٤. جریان دماغه کاهشی اکسیژن در ۰/۱- ولت برای چرخه‌ی اول ، چرخه‌ی ۵۰ ، چرخه‌ی۱۰۰، چرخه‌ی ۱۵۰ ، در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH = ۷ ..... ٦۳

جدول ٤-۵. جریان‌های دماغه (I_p) در پتانسیل ۰/۱- ولت برای روز اول،روز پنجم،روز دهم و روز پانزدهم نگهداری شده در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH =۷ ..... ٦٥

جدول ٤-٦. سیکنال‌های به دست آمده (I_p) برای ۲/۵ میلی‌مولار گلوکز در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH=۷ در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف اوریک اسید ٦۸

جدول ٤-۷. سیگنالهای به‌دست آمده (I_p) برای ۲/۵ میلی‌مولار گلوکز در محلول بافر فسفات ۰/۱M باpH =۷ در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف اسکوربیک اسید ۷۰

جدول ٤-۸. سیکنال‌های به دست آمده (I_p) برای ۲/۵ میلی‌مولار گلوکز در محلول بافر فسفات ۰/۱M با pH=۷ در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف استامینوفن..... ۷۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- حسگرها[۱] و زیست‌حسگرها[۲]

از گذشته تاکنون اندازه‌گیری گونه‌های مهم شیمیایی و زیستی از اهداف اساسی علوم تجزیه‌ای بوده است. در بسیاری از موارد، گونه مورد نظر در محیط‌های پیچیده‌ای وجود دارد که در آن صورت نیاز به روش‌هایی است تا علاوه بر حساسیت بالا بتوانند بدون استفاده از مراحل وقت‌گیر و هزینه‌بر جداسازی، گونه مورد نظر را به صورت انتخابی[۳] اندازه‌گیری کنند. حسگرها، ابزارهایی هستند که در چند دهه اخیر مورد توجه دانشمندان تجزیه قرار گرفته‌اند[۱].

یک حسگر، ابزار کوچکی است که می تواند برای اندازه گیری گونه مورد نظر در بافت نمونه به کار رود. حسگرها در حالت مطلوب پاسخی برگشت پذیر دارند و نباید به نمونه آسیب برسانند. از طرفی این حسگرها باید به راحتی ساخته شده و از نظر حساسیت[۴] و طول عمر نیز مطلوب باشند.

برای انتخاب یک حسگر باید به معیارهای زیر توجه داشت:

۱- محدوده‌ی خطی[۱] منحنی کالیبراسیون

---

[۱] Sensors
[۲] Biosensors
[۳] Selective
[۴] Sensitivity

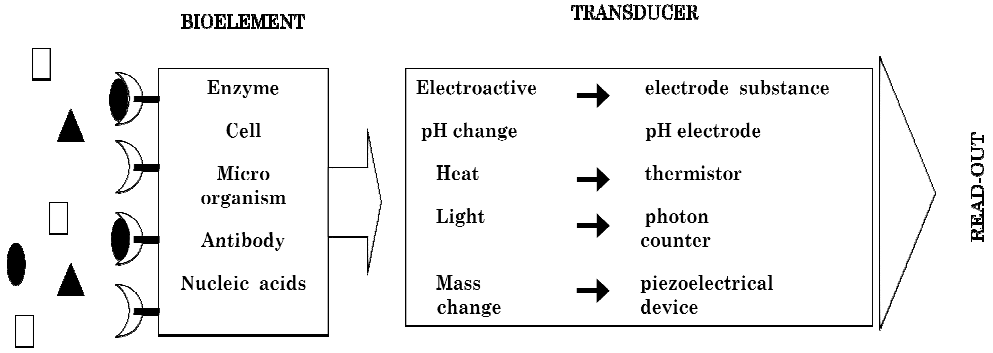
۲- تکرارپذیری[۲] و صحت[۳]

۳- انتخاب‌پذیری[٤]

٤- مدت زمان پاسخ[٥] [٤]

یک زیست‌حسگر می‌تواند به این صورت تعریف شود: دستگاهی که شامل یک جزء زیستی و یک مبدل[٦] است که می‌تواند به طور معمول غلظت یک یا دسته‌ای از گونه‌های شیمیایی را به سیگنال الکترونیکی عددی تبدیل کند. اتصال یک آنزیم به یک حسگر، زیست حسگری را ایجاد می‌کند که نسبت به یک آنالیت انتخاب‌پذیری بهتری دارد[۲].

شکل ۱- ۱. شمای کلی یک زیست‌حسگر و انتخاب‌پذیری آن را نسبت به سوبسترا نشان می-دهد.



شکل ۱- ۱. شمای کلی یک زیست‌حسگر و تشخیص سوبسترا

یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی[۷] یک دستگاه تجزیه‌ای است که در آن یک دستگاه الکتروشیمیایی به عنوان مبدل عمل می‌کند [۳].

---

[۱] Linear range
[۲] Repeatability
[۳] Accuracy
[٤] Selectivity
[٥] Response time
[٦] Transducer
[۷] Electrochemical biosensor

۱-۲- اجزاء یک زیست‌حسگر

سه بخش مهم در یک زیست‌حسگر وجود دارد:

۱- جزء زیستی یا شناساگر بیولوژیکی[۱]. در تهیه زیست‌حسگرها از مواد زیستی استفاده می‌شود که بتوانند بطور اختصاصی با یک گونه آزمایشی به سرعت واکنش داده و گونه جدیدی را که با روش‌های متداول فیزیکی یا شیمیایی قابل شناسایی است، به وجود آورند. این جزء شامل گیرنده‌ها[۲]، آنزیم‌ها[۳]، آنتی‌بادی‌ها[۴]، نوکلوئیک اسیدها[۵]، ریزجاندارها[۶] یا پروتئین‌های گیاهی[۷] است.

۲- مبدل که می‌تواند یک رویداد زیست شناختی را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل کند. مبدل-ها شامل پنج دسته: مبدل‌های الکتروشیمیایی، نوری[۸]، گرمایی[۹]، پیزوالکتریک[۱۰] و مغناطیسی[۱۱] می‌باشند.

۳- یک سیستم پردازنده‌ی سیگنال[۱۲] که آن را به شکل قابل خواندن، تبدیل می‌کند[۶-۸].

یک آنزیم از نظر ساختمانی، ماکرومولکولی حجیم با ساختاری پیچیده و حاوی مقدار زیادی پروتئین است. هر آنزیم معمولا دارای یک گروه فعال[۱۳] می‌باشد که غالبا حاوی یک یا چند اتم فلزی است. در اکثر آنزیم‌های به‌کار رفته در زیست‌حسگرها، فعالیت آن‌ها به صورت درگیر شدن در یک فرایند اکسایش – کاهش می‌باشد که به روش‌های الکتروشیمیایی قابل تشخیص است [۵].

زیست‌حسگرهای حساس به اوره و گلوکز نمونه‌هایی از زیست‌حسگرهایی می‌باشند که به ترتیب از آنزیم اوره‌آز و آنزیم گلوکز اکسیداز در ساختمان آن‌ها استفاده می‌شود.

---

[۱] Biological recognition element
[۲] Receptors
[۳] Enzymes
[۴] Antibodies
[۵] Nucleic acids
[۶] Microorganisms
[۷] Lectins
[۸] Optical
[۹] Thermometric
[۱۰] Piezoelectric
[۱۱] Magnetic
[۱۲] Signal processing system
[۱۳] Prosthetic gruop

از بافت‌های گیاهی یا حیوانی نیز به عنوان منبع آنزیم در ساخت زیست‌حسگرها بهره می‌گیرند. با اینکه اینگونه بافت‌ها معمولا حاوی بیش از یک نوع آنزیم است ، لذا به اندازه‌ی آنزیم خالص شده انتخابی عمل نمی‌کند، ولی به دلیل قرار داشتن آنزیم در یک محیط طبیعی، به مراتب کمتر از آنزیم خالص شده در معرض تخریب تدریجی قرار دارند.

در جدول ۱-۱ تعدادی از زیست‌حسگرهایی را که با استفاده از بافت گیاهی و حیوانی تهیه و در منابع علمی ارائه شده‌اند، لیست شده است [۵].

جدول ۱-۱. نمونه‌هایی از بافت‌های حاوی آنزیم به‌کار رفته در زیست‌حسگرها

سوبسترا	جزء زیستی به کار رفته در ساخت زیست‌حسگر	گونه اندازه‌گیری شونده
گلوتامین	بافت کلیه‌ی خوک	NH_3
آدنوزین	بافت‌های مخاط روده‌ی کوچک موش	NH_3
گوآنین	بافت کبد خرگوش	NH_3
پراکسیدهیدروژن	بافت کبد گاو	O_2
گلوتامات	کدوی زرد	CO_2
پیرووات	مغز ذرت	CO_2
اوره	آرد باقالا	NH_3
فسفات/فلوئورور	جوانه‌ی سیب‌زمینی/گلوکزاکسیداز	O_2
دوپامین	موز	O_2
تیروزین	چغندر قند	O_2
سیستئین	برگ خیار	NH_3

۱-۳- کاربرد زیست‌حسگرها [۵]

تعداد گونه‌هایی که می‌توان با استفاده از زیست‌حسگرها اندازه‌گیری کرد، بسیار زیاد است. از گونه‌های معدنی ساده نظیر یون نیترات گرفته تا مولکول‌های ساده‌ای مانند منوکسید کربن، متان و مولکول‌های پیچیده‌ی زیستی نظیر DNA را می‌توان جزو گونه‌های قابل تشخیص و سنجش توسط زیست‌حسگرها نام برد. با این حال از ابداع و کاربرد یک زیست‌حسگر در آزمایشگاه تا به‌کارگیری آن به عنوان یک ابزار تشخیص و اندازه‌گیری متداول، راهی بسیار طولانی است، زیرا یک زیست-حسگر تجارتی باید تمام شرایط مربوط به کارآیی این وسیله را احراز کند تا بتواند در نقش وسیله‌ای مطمئن مورد استفاده قرار گیرد. در ادامه موارد عمده‌ای که در حال حاضر در آن‌ها از زیست‌حسگرها بهره می‌گیرند، مطرح شده است.

۱-۳-۱- آزمایشگاه‌های بالینی [۵]

استفاده از زیست‌حسگرها در آزمایشگاه‌های بالینی از دو لحاظ می‌تواند جالب توجه باشد. یکی این‌که کاربرد این وسیله می‌تواند زمان دسترسی به جواب را کوتاه کند. دیگر این‌که در بعضی موارد ممکن است از این وسیله بتوان در محیط زنده نیز استفاده کرد. به این ترتیب استفاده از چنین وسیله-ای در بالین بیمار، ضرورت انتقال نمونه‌ی خون به آزمایشگاه را از میان برمی‌دارد.

به طور کلی نیاز به اندازه‌گیری برخی ترکیبات زیستی نظیر گلوکز و کلسترول، فرآورده‌های دارویی مانند آسپرین و پاراستامول و برخی یون‌ها و گازها در حداقل زمان ممکن و حتی در بالین بیمار، با هدف کمک به نجات جان بیماران، کاربرد زیست‌حسگرها را بیش از پیش ضروری می‌سازد.

۱-۳-۲-کنترل فرایندهای صنعتی [۵]

کاربرد عمده‌ی زیست‌حسگرها در صنایع تخمیری و صنایع غذایی است. به کمک زیست‌حسگرها می‌توان مقدار مواد گوناگون نظیر قندها، مخمرها، الکل‌ها و شاید برخی محصولات فرعی ناخواسته را در مواد اولیه و فرآورده‌های صنعتی تعیین مقدار و کنترل کرد. این کار به بهبود کیفیت تولید، افزایش بازده و ارتقا بهره‌وری کمک می‌کند. علاوه بر این با استفاده از زیست‌حسگرها می‌توان بسیاری از اندازه‌گیری‌های ضروری را که باید توسط آزمایشگر و با صرف وقت و هزینه‌ی زیاد انجام گیرد، به طور خودکار به مرحله‌ی اجرا در آورد.

۱-۳-۳- بررسی‌های زیست محیطی [۵]

مواد قابل سنجش متعددی در هوا، آب، خاک و دیگر تشکیل دهنده‌های محیط‌زیست وجود دارد و هر روز بر تعداد این گونه مواد افزوده می‌شود. ضرورت اندازه‌گیری آلاینده‌هایی نظیر انواع حشره-کش‌ها، کودهای شیمیایی، زباله‌ها و پساب‌های صنعتی و خانگی بر کسی پوشیده نیست. با استفاده از زیست حسگرها، می‌توان کنترل پیوسته‌ی برخی از این آلاینده‌ها را به راحتی امکان‌پذیر ساخت و اندازه‌گیری تصادفی برخی دیگر را در کمترین مدت ممکن به انجام رسانید.

۱-٤- روش‌های تثبیت گونه‌های زیستی [۵]

در ساخت زیست‌حسگرها، تثبیت گونه‌های زیستی بر سطح مبدل از اهمیت خاصی برخوردار است و با توجه به نوع جزء زیستی به یکی از پنج روش زیر انجام می‌شود:

الف) جذب سطحی[۱]

ساده‌ترین روش تثبیت است، ولی به دلیل سست بودن پیوند جزء زیستی با سطح انتقال دهنده، از آن در آزمایش‌های اولیه استفاده می‌شود.

ب) تثبیت درون کپسول

جزء زیستی را درون کپسول یا غشای نازکی که با مبدل در تماس است، قرار می‌دهند. در این روش گونه زیستی پایداری خود را حفظ می‌کند و از عواملی نظیر دما، pH، نیروی یونی و ترکیب شیمیایی محیط متاثر نمی‌شود. غشاء به کار رفته به طور معمول برای گونه‌ای که جزء زیستی به آن حساس می‌باشد، تراوا است.

ج) تله انداختن

در این روش با مخلوط از گونه‌ی زیستی و یک منومر بی‌اثر شبکه‌ی پلیمری ژل مانند تهیه می-شود که گونه‌ی زیستی درون آن شبکه محبوس می‌شود. این روش گاهی مانع از ارتباط آسان گونه-های آزمایشی با جزء زیستی و در نهایت سبب کند شدن واکنش می‌شود.

---

[۱] Adsorption

د) پیوند زنی

در این روش ماده زیستی از طریق یک پیوند شیمیایی به یک تکیه‌گاه متصل می‌شود. در این روش نیز انتشار گونه‌های آزمایشی به سوی جزء زیستی با کمی محدودیت همراه است.

ه) پیوند کووالان

در این روش بین جزء زیستی و گروه عاملی ویژه‌ای که روی تکیه‌گاه مستقر در سطح مبدل قرار دارند، پیوندی کوالانسی ایجاد می‌شود. گروه‌های هسته خواه موجود در آمینواسیدهایی از ماده زیستی، که فاقد فعالیت کاتالیزی هستند، برای ایجاد پیوند مناسب می‌باشند.

۱-۵- اصول اساسی زیست‌حسگرهای گلوکز

۱-۵-۱- بیماری دیابت[۱]

بیماری دیابت یک معضل عمومی سلامتی ست که وسعت جهانی دارد. این اختلال متابولیکی[۲] ناشی از کمبود انسولین[۳] و یا ازدیاد قند خون است و بازتاب آن ازدیاد غلظت گلوکز به بیشتر از مقدار معمول آن در بدن یعنی به بیش از ۱۲۰-۸۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و یا ٦/٦-٤/٤ میلی مولار می‌باشد[۹]. بیماری دیابت یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در دنیاست [۱۰-۱۲] و طبق آمار سازمان سلامت جهانی[٤](WHO) حدود ۲/۸٪ جمعیت جهان در سال ۲۰۰۰ از این بیماری رنج برده و این درصد به سرعت رشد کرده و تا سال ۲۰۳۰ حدود دو برابر افزایش یافته و به ٤/٤٪ خواهد رسید [۱۱]. در سال ۲۰۰۹ حدود ۲۰۰ میلیون نفر درگیر این بیماری بوده و این رقم تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۳۰۰ میلیون نفر خواهد رسید [۱۲].

دیابت عوارض بیشماری چون بیماری‌های قلبی، نارسایی‌های کلیوی، کم بینایی و نابینایی به همراه دارد [۸]. برای درمان و کنترل بیماری دیابت و کاهش عوارض ناشی از آن باید مقدار گلوکز خون تعیین گردد. به این منظور زیست حسگرهای گلوکز به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند

[۱] Diabetes mellitus
[۲] Metabolic disorder
[۳] Insulin
[٤] World Health Organization

و برروی انواع زیست‌حسگرهایی که بر اساس آنزیم کار می‌کنند، تحقیق‌ها و بررسی‌های گسترده‌ای انجام گرفته است[۱۲].

مهمترین زیست‌حسگرهای متداول گلوکز نوع الکتروشیمیایی آن‌هاست، که حساسیت بهتر، قابلیت ساخت مجدد بیشتر، سهولت در نگهداری و قیمت پایین‌تری دارند. حسگرهای الکترشیمیایی می‌توانند به شکل‌های پتانسیومتری[۱]، آمپرومتری[۲] و یا هدایت سنجی[۳] وجود داشته باشند[۱۳-۱۵].

زیست‌حسگرهای آنزیمی و آمپرومتری گلوکز دستگاه‌هایی هستند که قابل دسترس‌ترند و به طور گسترده‌ای در دهه‌ی اخیر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. حسگرهای آمپرومتری جریان تولید شده‌ی ناشی از انتقال مستقیم یا غیر مستقیم الکترون بین الکترود و جزء بیولوژیکی را نشان می‌دهند [۱٦].

به طور معمول گلوکز بر اساس بر همکنش با یکی از سه آنزیم هگزوکیناز[٤]، گلوکز اکسیداز[٥] (GOD) و یا گلوکز-۱-دهیدروژناز[٦] (GDH) اندازه‌گیری می‌شود [۱۷]. سنجش بر اساس هگزوکیناز روش مرجعی برای اندازه‌گیری گلوکز به وسیله‌ی اسپکترومتری ست که در بسیاری از آزمایشگاه‌های کلینیکی استفاده می‌شود [۱۸].

معمولا در زیست‌حسگرهای گلوکز از دو آنزیم گلوکزاکسیداز و گلوکز-۱-دهیدروژناز استفاده می‌شود. این آنزیم‌ها در پتانسیل اکسایش-کاهش، کوفاکتورها[۷]، سرعت تبدیل و گزینش‌گری نسبت به گلوکز متفاوت هستند [۱۸]. گلوکز اکسیداز یک آنزیم استاندارد برای زیست‌حسگرها ست و نسبت به گلوکز حساسیت نسبتا بالایی دارد. گلوکز اکسیداز آسان به دست آمده و ارزان است، در برابر pH، قدرت یونی و دما از دیگر آنزیم‌ها مقاوم‌تر است[۱۹و۲۰].

عملکرد عمومی حسگرهای گلوکز بر اساس کاتالیز اکسایش β-D-glucose به وسیله‌ی مولکول-های اکسیژن به گلوکونیک اسید و هیدروژن پراکسید توسط گلوکز اکسیداز تثبیت شده، می‌باشد[۱۸].

---

[۱] Potentiometry
[۲] Amperometry
[۳] Conductometry
[٤] Hexokinase
[٥] Glucose oxidase
[٦] Glucose-1-dehydrogenase
[۷] Cofactors

گلوکز اکسیداز هسته‌ی فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید[۱] (FAD) دارد که به عنوان یک گیرنده‌ی اولیه‌ی الکترون عمل می‌کند و به $FADH_2$ کاهیده می‌شود. (واکنش ۱-۱)

$$Glucose + GOD\text{-}FAD \rightarrow Glucolactone + GOD\text{-}FADH_2$$ واکنش ۱-۱

$GOD\text{-}FADH_2$ با اکسیژن واکنش داده و به حالت GOD-FAD اولیه برمی‌گردد و تولید هیدروژن‌پراکسید می‌کند.(واکنش ۱-۲)

$$GOD\text{-}FADH_2 + O_2 \rightarrow GOD\text{-}FAD + H_2O_2$$ واکنش ۱-۲

بر اساس واکنش ۱-۳ هیدروژن‌پراکسید در الکترود پلاتین (به عنوان آند) اکسید می‌شود. الکترود به سادگی تعداد انتقال‌های الکترون را شناخته و این جریان الکترون‌ها متناسب با تعداد مولکول‌های گلوکز موجود در نمونه می‌باشد [۱۸].

$$H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$$ واکنش ۱-۳

سه استراتژی برای استفاده از زیست‌حسگرها وجود دارد: ۱) اندازه‌گیری اکسیژن مصرف شده توسط واکنش آنزیمی، ۲) اندازه‌گیری هیدروژن‌پراکسید تولید شده توسط واکنش آنزیمی و ۳) با استفاده از حدواسط‌های[۲] قابل انتشار یا تثبیت شده برای انتقال الکترون از گلوکز اکسیداز به الکترود [۲۱ و ۲۲].

تاریخچه‌ی الکترودهای آنزیمی گلوکز از سال ۱۹۶۲ با ساختن اولین زیست‌حسگر گلوکز توسط کلارک[۳] و لیون[۴] در بیمارستان کودکان سین‌سیناتی[۵] آغاز شد. آنها برای ساخت اولین الکترود آنزیمی

---

[۱] Flavin adenine dinucleotide
[۲] Mediators
[۳] Clark
[۴] Lyons
[۵] Cincinnati

گلوکز یک لایه‌ی نازک از گلوکزاکسیداز را به وسیله‌ی یک غشای نیمه تراوا روی الکترود حساس به اکسیژن تثبیت کردند و اندازه‌گیری گلوکز بر اساس اندازه‌گیری اکسیژن مصرف شده از طریق واکنش کاتالیز شده به وسیله‌ی آنزیم انجام گرفت. در واقع گلوکز در مجاورت گلوکز اکسیداز به وسیله‌ی اکسیژن به گلوکونیک اسید اکسید شده و میزان اکسیژن مصرفی و غلظت گلوکز با هم رابطه-ی مستقیمی دارند [۹ و۲۳].

۱-۵-۲- نسل‌های زیست‌حسگرهای آمپرومتری گلوکز [۹]

سه نسل از زیست‌حسگرهای آمپرومتری گلوکز وجود دارد:

۱-۵-۲-۱- نسل اول زیست‌حسگرهای گلوکز[۱] [۹]

نسل اول زیست‌حسگرهای گلوکز تکیه بر استفاده از اکسیژن طبیعی و تولید و تعیین هیدروژن-پراکسید دارند. واکنش بیوکاتالیتیکی سبب کاهش گروه فلاوین (FAD) شده و ایجاد ($FADH_2$) میکند (طبق واکنش ۱-۱). در پی آن فلاوین به وسیله‌ی مولکول‌های اکسیژن دوباره اکسید می‌شود و فرم اکسیدی گلوکز اکسیداز GOD-FAD و هیدروژن‌پراکسید تولید میشود(طبق واکنش ۱-۲).

اندازه‌گیری هیدروژن‌پراکسید تولید شده توسط واکنش آنزیمی، مزیت‌هایی چون سادگی به همراه دارد،به ویژه زمانی که کوچک کردن دستگاه مد نظر باشد. اندازه‌گیری‌ها معمولا توسط الکترود پلاتین در پتانسیل آندی مناسب حدودا ۰/٦ V (vs Ag | AgCl) انجام می‌شوند.

این سیستم‌ها که بر اساس اکسایش هستند از اکسیژن به عنوان پذیرنده‌ی فیزیولوژیکی الکترون استفاده می‌کنند. در نتیجه پاسخ آن‌ها در اثر تنش در مقدار اکسیژن می‌تواند دارای نوسان باشد. این خطا سبب تغییر در پاسخ حسگر و کاهش حد بالای محدوده‌ی خطی است. به این محدودیت "کسر عمل اکسیژن"[۲] گفته می‌شود.

۱-۵-۲-۲- نسل دوم زیست‌حسگرهای گلوکز[۳] [۹]

در نسل دوم زیست‌حسگرهای آمپرومتری گلوکز یک پذیرنده‌ی الکترون غیر فیزیولوژیکی که توانایی انتقال الکترون از مرکز ردوکس آنزیم به سطح الکترود را داشته باشد، جای‌گزین اکسیژن شده

---

[۱] First-Generation Glucose Biosensors

[۲] Oxygen deficit

[۳] Second-Generation Glucose Biosensors