

تأثیر نانوذرات طلا و نانولوله‌های کربنی در بیوسنسور گلوکز اکسیداز و بهینه‌یابی شرایط به کمک روش تاگوچی

امید رضانی ازغندی، محمد جواد مغربی* و علیرضا تیمورتاش

مهندسی مکانیک، دانشگاه فردوسی، مشهد

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۴/۰۷/۱۴، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۴/۰۸/۲۰، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۴/۱۰/۰۵

چکیده

در این مقاله نانولوله‌های کربنی (MWCNTs)، نانوذرات طلا (GNP) و آنزیم گلوکز اکسیداز برای تشخیص گلوکز مورد استفاده قرار گرفت. الکتروود پلاتین خالص، توسط ماده واسط پلی‌آلی‌لامین (PAA) از نانولوله‌های کربنی غنی شد و به کمک سیستمین و نانوذرات طلا الکتروود کاری شکل گرفت. الکتروود کاری (آند) در کنار الکتروود کمکی پلاتین و الکتروود مرجع Ag/AgCl (کاتد) به کار گرفته شد. برای ارزیابی عملکرد بیوسنسور ساخته شده، درون ظرف حاوی غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۵، ۱ میلی‌مولار (mmol/l یا mM) از گلوکز محلول در آب مقطر دوبار تقطیر شده قرار گرفت. با انتقال الکترون آزاد شده در اثر واکنش گلوکز در حضور آنزیم، از الکتروود کاری به الکتروود مرجع، جریان تولید و میزان آن توسط دستگاه پتانسیوستات مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. همچنین طراحی آزمایش نیز به منظور پیدا کردن شرایط بهینه انجام پذیرفت. از نتایج حاصل از انجام آزمایشات و طراحی آنالیز تاگوچی در غلظت‌های گلوکز و pHهای متفاوت با فرسفات مشخص گردید که بیشترین جریان تولیدی در pH نزدیک خنثی و بیشترین غلظت گلوکز می‌باشد. میزان جریان تولیدی در شرایط بهینه (pH=۶ و غلظت ۰/۰۰۱ مولار) برای الکتروود پلاتین کاری غنی شده (اصلاحی یا تثبیت شده) با نانولوله‌های کربنی ۲۱/۵۷ میلی‌آمپر به دست آمد که با مقایسه با شرایط بهینه به دست آمده از نرم‌افزار تنها ۱/۸٪ انحراف محاسبه شد که نشان دهنده حساسیت بالای بیوسنسور ساخته شده است.

واژه‌های کلیدی: الکتروود پلاتین، نانولوله‌های کربنی، آنزیم گلوکز اکسیداز، نانوذرات طلا، روش تاگوچی.

۱- مقدمه

منظور به بیوسنسورها، زیست حسگر نیز می‌گویند. یک بیوسنسور در حقیقت شامل یک حسگر کوچک و ماده بیولوژیک تثبیت شده بر آن می‌باشد. از آنجا که بیوسنسورها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول‌های

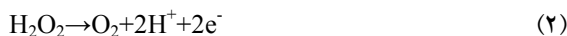
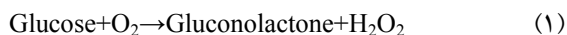
بیوسنسور از دو کلمه بیو و سنسور تشکیل شده است، بیو به معنای زیست و سنسور به معنی حسگر می‌باشد. به همین

* عهده‌دار مکاتبات: محمد جواد مغربی

نشانی: مشهد، دانشگاه فردوسی، گروه مهندسی مکانیک

تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۰۵۱، دورنگار: ۰۵۱-۳۸۷۶۳۳۰۴، پست الکترونیکی: mjmaghrebi@um.ac.ir

و ۲). H_2O_2 توسط اندازه‌گیری آمپرسنجی، شناسایی و غلظت گلوکز نمایان می‌گردد و پس از انتقال الکترون، غلظت گلوکز محلول به روش آمپرسنجی اندازه‌گیری می‌شود [۴،۵].



بیوسنسور آمپرسنجی گلوکز به دلیل سادگی و سرعت بالا یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای تشخیص گلوکز آزاد می‌باشد. این بیوسنسورها زمان و هزینه آزمایشات را کاهش داده و از طرفی اطمینان از سلامت محصول را افزایش داده‌اند. بیوسنسورها همچنین برای شناسایی یا اندازه‌گیری آنالیت‌ها در سیستم‌های مداوم نیز به کار گرفته شده‌اند. این وسایل در واقع ایجاد کننده روشی سریع، غیرمخرب برای کنترل کیفی یک محصول می‌باشند.

امروزه اغلب با اصلاح الکتروود کاری به کمک نانومواد مانند نانولوله‌های کربنی و نانو فلزات مانند طلا، نقره، پلاتین و غیره سطح الکتروود را افزایش می‌دهند (منجر به انتقال الکترون بیشتر) و در کنار الکتروود Ag/AgCl و الکتروود کمکی سعی در بهبود کارایی (افزایش حساسیت و انتخاب‌پذیری مناسب، پاسخ سریع و ...) آنها دارند [۶-۸]. به عنوان نمونه در سال ۲۰۱۳ در کشور چین بر اساس پژوهشی الکتروود کاری از دی اکسید تیتانیم، نانولوله کربنی، سیستمین و آنزیم گلوکز اکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در سال ۲۰۱۴ در این کشور روی الکتروود کربن شیشه‌ای، چیتوسان و آنزیم گلوکز اکسیداز به روش لایه به لایه تحقیقات انجام گرفت و نقش این اصلاح الکتروود بیشتر نمایان شد [۹،۱۰].

از زمان کشف نانولوله‌های کربنی به وسیله ایجیما در سال ۱۹۹۱، تلاش‌های زیادی با توجه به ساختار منحصر بفرد و پتانسیل غیرطبیعی آنها صورت گرفته است. نانولوله‌های

زیستی می‌باشند، امروزه از آنها در علوم مختلف بهره می‌گیرند. گیرنده‌های زیستی در واقع مولکول‌های زنده‌ای مانند آنزیم‌ها، میکروارگانیسم‌ها، گیرنده‌های مولکولی، سلول‌ها، نوکلئیک اسیدها یا بافت‌ها و ... می‌باشند که آنالیت مورد نظر را شناسایی می‌کنند و با ایجاد تغییرات فیزیکی و شیمیایی، پیام بیولوژیکی می‌فرستند. اتصال اختصاصی منجر به تغییر در یک یا بیش از یک خاصیت فیزیکی و شیمیایی (نظیر تغییر pH، انتقال الکترون، انتقال حرارت، جذب یا رهایش گازها) شده و ممکن است این تغییر با مبدل اندازه گرفته شود. آنزیم‌ها برای این که به سوبسترا بچسبند دارای محل خاصی به نام جایگاه فعال هستند. هر آنزیمی دارای جایگاه فعال خاصی است که برای سوبسترای خاصی تعریف شده است و اختصاصی بودن عمل آنزیم‌ها هم به همین دلیل است. عملکرد بسیاری از آنزیم‌ها شامل فرآیند اکسیداسیون و یا احیا است که با روش‌های الکتروشیمیایی قابل آشکارسازی است [۱،۲].

شروع کار و آزمایش‌ها روی آنزیم و شناخت تاثیر آنزیم‌ها تا قبل از ۱۹۶۰ و تا اواسط ۱۹۷۰ زیاد محسوس نبود، با وجود اینکه ستلر در ۱۹۵۱ کار با آنزیم ناخالص برای انواع مسایل تحلیلی و اوسانا از اواسط ۱۸۴۵ بر روی پراکسید هیدروژن و استفاده از آنزیم را مورد بررسی قرار داده بودند ولی رشد روزافزون آنزیم در استفاده از بیوسنسورها و به خصوص سنسورهای آمپرسنجی با آنزیم خاص در علوم خاص و کاربردهای تجاری از ۱۹۷۰ به این طرف شکل گرفته است [۳]. کار با بیوسنسورهای به خصوص بیوسنسور الکتروشیمیایی گلوکز بر پایه آنزیم گلوکز اکسیداز به دلیل دارا بودن شرایطی مانند حساسیت بالا، انتخاب‌پذیری، زمان پاسخ کوتاه و ... در حال افزایش است. این آنزیم در حضور اکسیژن و اکسید کردن گلوکز، تولید گلوکونیک اسید (گلوکوروئیک اسید) می‌کند در حالی که کوآنزیم FAD به $FADH_2$ کاهش می‌یابد. در واکنش‌های طبیعی آنزیمی، اکسایش مولکول اکسیژن از $FADH_2$ به FAD اتفاق می‌افتد در حالی که O_2 به H_2O_2 کاهش می‌یابد (واکنش ۱

کربنی (که از مشتقات کربن هستند) به دلیل خواص منحصر بفردی مانند انتقال الکترون بالا، هدایت الکتریکی بالا، خواص شیمیایی- مکانیکی- کاتالیزوری بالا، توانایی رشد در آنالیت‌های متفاوت، سایز کوچک و وزن کم آن که به دلیل داشتن استوانه توخالی که قابلیت پذیرفتن مولکول مهمان در مرکز آن می‌باشد و همچنین شکل هندسی خاص و علاوه بر آن، دارا بودن مساحت سطح ویژه زیاد، پایداری شیمیایی بالا و ظرفیت حرارتی بالا [۱۱-۱۳] بیش از پیش به کمک روش‌های متفاوت تثبیت مانند تثبیت لایه به لایه یا LBL [۱۴، ۱۵] در بیوسنسورهای آمپرسنجی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از اثرات CNTs، انتقال الکترون در واکنش‌های شیمیایی به خصوص واکنش‌های اکسایش و کاهش می‌باشد. یکی از روش‌های تثبیت نانوذرات و نانو فلزات و آنزیم روی الکتروود کاری روش لایه به لایه یا LBL است که به دلیل ساختار آسان و راحت، هزینه کم و همکاری بهتر مواد و حفظ فعالیت مولکول‌های زیستی در کاربردهای مختلف الکتروشیمیایی کاتالستی، تجزیه، سنجش الکتروشیمیایی و سنسورهای بیوشیمیایی و غیره کاربرد زیادی پیدا کرده است که در این میان مطالعات بنیادی بیشتری در ارتباط با روش‌های الکتروشیمیایی که مربوط به مکانیسم انتقال بار و تثبیت احتمالی است، در حال انجام است [۱۶-۱۹]. در این مقاله ساخت بیوسنسور الکتروشیمیایی به کمک آنزیم گلوکز اکسیداز به عنوان عنصر زیستی و CNTs و نانوذرات طلا برای ساخت الکتروود کاری به کمک مواد واسط به روش لایه به لایه در مقابل الکتروود Ag/AgCl مورد بررسی قرار می‌گیرد و نیز از روش تاگوجی برای بهینه کردن نتایج استفاده شده که در طراحی آزمایشات بیشتر مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲-۲- آماده‌سازی نانولوله‌های کربنی

به کمک یک سونیکیتور به مدت ۶ ساعت محلول اسیدسولفوریک و اسید نیتریک که به نسبت ۱:۳ حجمی می‌باشند به همراه نانولوله‌های کربنی همزده می‌شود تا به این طریق عملاً نانولوله‌های کربنی اکسیده شود تا پیوند دوگانه اکسیژن به نانولوله‌های کربنی متصل گردد و گروه کربوکسیل در انتها روی نانولوله‌های کربنی قرار بگیرد. سپس نانولوله‌های کربنی، به کمک دستگاه سانتریفیوژ که دارای سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه است، از اسید جدا و به کمک آب مقطر تا زمانی شستشو داده می‌شود که pH محیط خنثی گردد. آنگاه یک مخلوطی از ماده واسط به

کربنی (که از مشتقات کربن هستند) به دلیل خواص منحصر بفردی مانند انتقال الکترون بالا، هدایت الکتریکی بالا، خواص شیمیایی- مکانیکی- کاتالیزوری بالا، توانایی رشد در آنالیت‌های متفاوت، سایز کوچک و وزن کم آن که به دلیل داشتن استوانه توخالی که قابلیت پذیرفتن مولکول مهمان در مرکز آن می‌باشد و همچنین شکل هندسی خاص و علاوه بر آن، دارا بودن مساحت سطح ویژه زیاد، پایداری شیمیایی بالا و ظرفیت حرارتی بالا [۱۱-۱۳] بیش از پیش به کمک روش‌های متفاوت تثبیت مانند تثبیت لایه به لایه یا LBL [۱۴، ۱۵] در بیوسنسورهای آمپرسنجی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از اثرات CNTs، انتقال الکترون در واکنش‌های شیمیایی به خصوص واکنش‌های اکسایش و کاهش می‌باشد. یکی از روش‌های تثبیت نانوذرات و نانو فلزات و آنزیم روی الکتروود کاری روش لایه به لایه یا LBL است که به دلیل ساختار آسان و راحت، هزینه کم و همکاری بهتر مواد و حفظ فعالیت مولکول‌های زیستی در کاربردهای مختلف الکتروشیمیایی کاتالستی، تجزیه، سنجش الکتروشیمیایی و سنسورهای بیوشیمیایی و غیره کاربرد زیادی پیدا کرده است که در این میان مطالعات بنیادی بیشتری در ارتباط با روش‌های الکتروشیمیایی که مربوط به مکانیسم انتقال بار و تثبیت احتمالی است، در حال انجام است [۱۶-۱۹]. در این مقاله ساخت بیوسنسور الکتروشیمیایی به کمک آنزیم گلوکز اکسیداز به عنوان عنصر زیستی و CNTs و نانوذرات طلا برای ساخت الکتروود کاری به کمک مواد واسط به روش لایه به لایه در مقابل الکتروود Ag/AgCl مورد بررسی قرار می‌گیرد و نیز از روش تاگوجی برای بهینه کردن نتایج استفاده شده که در طراحی آزمایشات بیشتر مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- مواد اولیه

آنزیم گلوکز اکسیداز (GOx) (شماره ART ۶۱۲۵، ۵۰ KU/mg)، پلی آلی آمین PAA (شماره ART

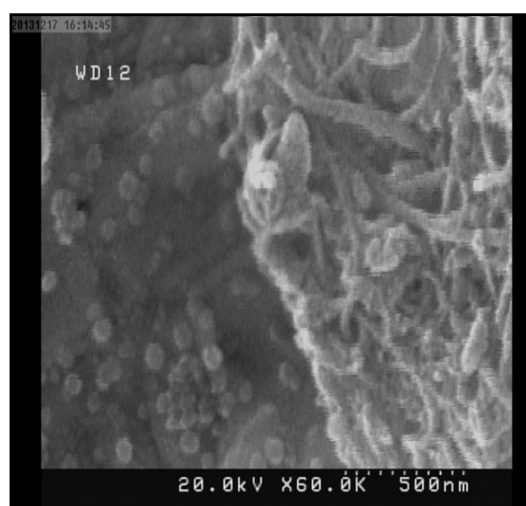
۲-۳- اصلاح الکتروُد

صفحه الکتروُد پلاتین (دارای طول ۵ cm و عرض ۳ mm و ضخامت ناچیز، عیار ۹۹/۹) به کمک پودر آلومینا کاملاً پولیش داده می‌شود تا سطح الکتروُد کاملاً صیقلی گردد. سپس یک مخلوطی از اسید سولفوریک/اسید کلرید/آب به نسبت حجمی ۱:۳:۴ تهیه می‌گردد و به مدت ۱۰ دقیقه الکتروُد در این مخلوط قرار گرفته که اگر ذره‌ای از آلومینا روی سطح الکتروُد باقی مانده، از بین برود و خللی در مرحله تثبیت ایجاد نشود. الکتروُد تمیز و براق شده، به طور کامل در محلول پلی‌آلی‌امین به مدت ۲۵ دقیقه قرار داده می‌شود، و سپس با محلول بافر فسفات شستشو داده می‌شود. در انتهای صفحه پلاتینی ماده واسط مانند یک چسب عمل کرده و تجمع می‌کند. پلی‌آلی‌امین دارای گروه آمینو با بار مثبت زیاد است. گروه آمینو با گروه کربوکسیل که دارای بار منفی می‌باشد تشکیل استر داده و این باعث اتصال قوی‌تر نانولوله‌های کربنی روی سطح الکتروُد می‌شود (شکل ۱ قسمت ب). بدون خشک کردن سطح الکتروُد، نانوذره طلا و سیستمین نیز به مدت ۲۵ دقیقه به آنها اضافه می‌گردد. تمام مراحل قبلی را می‌توان چند مرتبه ادامه داد یعنی چند لایه نانولوله‌های کربنی را روی الکتروُد تثبیت کرد و تنها مرحله متفاوت در لایه‌های بعدی، مرحله تثبیت آنزیم می‌باشد. برای این منظور با قرار دادن الکتروُد پوشش داده شده در یک غشای نیمه تراوا (شبه پوست انسان) از جنس سلفون که حاوی ۰/۰۱ گرم گلوکز اکسیداز حل شده در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفاتی با pHهای متفاوت ۴، ۶ و ۸ است و زمان دادن به آن، تثبیت آنزیم انجام می‌گیرد (به عنوان بیوکاتالیست). برای حفظ فعالیت جایگاه‌های فعال آنزیم، در بافر فسفات آنزیم را قرار داده تا محیط اسیدی تشکیل شده از گلوکورونیک اسید، کنترل pH شود. دلیل استفاده از غشا این است که زمانی که الکتروُد کاری در غشا قرار گیرد، تماس بین الکتروُد و آنالیت (گلوکز حل شده در آب مقطر) تنها از طریق بیوکاتالیست (آنزیم گلوکز اکسیداز: GOx) است. به عبارت ساده تنها راه

نسبت ۱:۱ حجمی، یعنی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از ۱-اتیل-۳-دی‌متیل کربودیماید و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آن-هیدروکسی سوکسی نایمید تهیه می‌گردد و نانولوله کربنی آماده شده به مدت ۷ دقیقه در آن خوابانده می‌شود تا بعد از اتمام سانتریفیوژ حلقه آروماتیکی روی نانولوله‌های کربنی متصل گردد. در این مرحله است که نانولوله‌های کربنی برای تثبیت آماده شده است. از طرف دیگر نیاز است الکتروُد کاری پلاتین، برای تثبیت لایه نانولوله‌های کربنی مهیا شود. عکس SEM از نانولوله‌های کربنی تنها و تثبیت شده روی الکتروُد پلاتین گرفته شده است (شکل ۱).

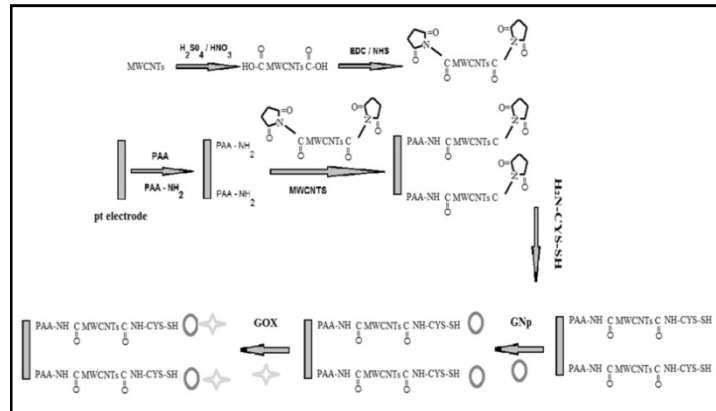


(الف)

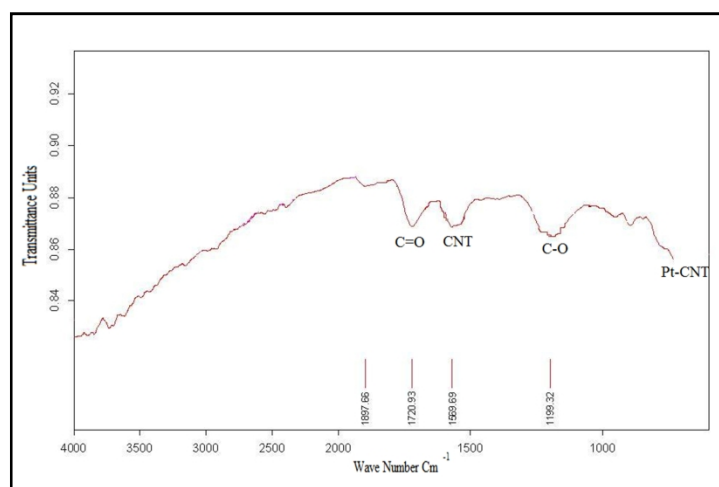


(ب)

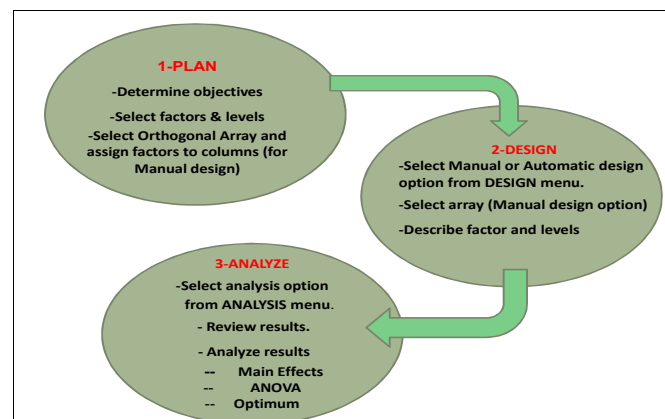
شکل ۱: الف) SEM از نانولوله‌ها و ب) SEM از نانولوله‌های کربنی تثبیت شده روی الکتروُد پلاتین.



شکل ۲: شماتیکی از تهیه نانولوله‌های کربنی (بالا) و روند مراحل تهیه فیلم روی.



شکل ۳: عکس IR از الکتروود کاری (پلاتین).



شکل ۴: فلوچارت روش تاگوچی (طراحی آزمایش).

روند شماتیک اصلاح الکتروود کاری در شکل ۲ و قرار گرفتن گروه‌های متفاوت روی سطح الکتروود در عکس IR شکل ۳ آمده است.

ارتباطی بین آنالیت و آنزیم از غشا است که باعث جدایی آنها گردیده است. زمانی که از آنزیم استفاده نمی‌شود، در بافر فسفات در ۴°C نگهداری می‌گردد.

جدول ۱: فاکتورها و سطوح انتخابی در طراحی آزمایش.

فاکتورها		سطوح		
		1	2	3
A	pH	4	6	8
B	C (mM)	0.05	0.5	1

تاگوجی ادعایی در مورد این که جواب بهینه حتما در آزمایش‌های منتخب وجود دارد را متذکر نمی‌شود بلکه به کمک محاسبات مربوط به آرایه‌ها می‌توان شرایط بهینه مورد نظر و جواب را در این شرایط بهینه تعیین نمود و در پایان با انجام تکرار آزمایش در شرایط بهینه و تایید تکرارپذیری جواب در این شرایط (آزمایش تایید کننده) صحت آن به دست می‌آید [۲۰]. طراحی آزمایش برای سه pH متفاوت ۴، ۶، ۸ و غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار انجام داده شد و این بدین معناست که دو فاکتور و سه سطح برای هر فاکتور انتخاب گردید. جدول ۱ فاکتورها و سطوح انتخابی را نشان می‌دهد (جدول ۱). بعد از انتخاب سطوح و فاکتورها، این نرم‌افزار نشان می‌دهد که کار با کدام فاکتور ساده‌تر می‌باشد و بهینه آزمایش دارای چه فاکتور و سطحی است. برای این منظور خود نرم‌افزار، آنالیز S/N را محاسبه می‌کند. آنالیز S/N (signal to noise ratio) میزان پراکندگی پاسخ‌ها را نشان می‌دهند. S یا مولفه نشانه، نشانگر مولف مطلوبیت عملکردی که می‌خواهیم در وضع بهینه خود قرار گیرند، می‌باشد و N مولفه اغتشاش، نشانگر عدم مطلوبیت تولید می‌باشد. با توجه به اینکه چه شرایط بهینه‌ای مطلوب کاربر می‌باشد، به عنوان نمونه اگر بیشترین عدد مانند بیشترین جریان مدنظر باشد، آن آزمایشی که دارای مقدار S/N بیشتر باشد، بهینه آزمایش است و یا اگر کمترین اتلاف مدنظر باشد، آزمایشی که کمترین مقدار S/N دارد، بهینه آزمایش است و در غیر این صورت حالت دیگر بهینه آزمایش است. لازم به توضیح است که از میان nominal یا bigger یا smaller the best یکی انتخاب می‌گردد و آنالیز S/N با توجه به این انتخاب انجام می‌گیرد (روابط ۴ الی ۶).

۲-۴- تهیه بیوسنسور

بعد از اصلاح الکتروود کاری پلاتین و قرار دادن آن در غشایی که نسبت به آنالیت (گلوکز در حلال آب) نیمه تراوا بوده، این مجموعه را در کنار الکتروود کمکی پلاتین و الکتروود Ag/AgCl در غلظت‌های متفاوت آنالیت (۰/۰۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) قرار می‌دهیم. گلوکز از غشای نیمه تراوا به داخل بافر نفوذ کرده و جایگاه‌های فعال آنزیم را اشغال می‌کند و محصول تولید می‌شود. الکترون به عنوان بخشی از محصول از سطح آنزیم به سطح الکتروود منتشر شده و با انتقال الکترون از الکتروود کاری به الکتروود کاتد جریان شکل می‌گیرد. با گذشت زمان غلظت اکسیژن و گلوکز از آنالیت به الکتروود کاهش یافته و این کاهش به صورت کاهش جریان بین دو الکتروود نمایان می‌گردد. جریان تولیدی توسط دستگاه پتانسیواستات (محصول شرکت AMEL، مدل ۷۰۵۰ و استفاده از سخت‌افزار M70) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

۲-۵- طراحی آزمایش

در این مقاله از نرم‌افزار Qualitek-4 که به کمک روش تاگوجی شرایط بهینه را مشخص می‌کند، استفاده گردیده است. تاگوجی با استفاده از آرایه‌های متعامد (Orthogonal Arrays) تعداد آزمایشات را به مقدار زیادی کاهش داده است. برای تمام آزمایشات نیاز به سه مرحله می‌باشد تا فرآیند طراحی آزمایش شکل بگیرد: فاز برنامه‌ریزی-فاز اجرایی-فاز تجزیه تحلیل (شکل ۴). در حقیقت این آرایه‌ها با توجه به ویژگی خاصی، از بین تعداد کل آزمایش‌ها در روش فاکتوریل انتخاب می‌شوند.

$$\frac{S}{N} = -10 \log(\text{MSD}) \quad (6)$$

$$\text{MSD} = 10 \left[\frac{-(\frac{S}{N})}{10} \right] \quad (7)$$

$$\text{MSD} = \left[\frac{\left(\frac{1}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{1}{v_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{1}{v_n}\right)^2}{n} \right] \quad (8)$$

$$Y_{\text{exp}} = \sqrt{\frac{1}{\text{MSD}}} \quad (9)$$

درصد خطاهای هر یک نیز از روابط ۱۰ و ۱۱ محاسبه می‌گردد.

$$\% Y = \left[\frac{Y - Y_{\text{exp}}}{Y} \right] \times 100 \quad (10)$$

$$\% \frac{S}{N} = \left[\frac{\frac{S}{N} - \frac{S}{N_{\text{OPT}}}}{\frac{S}{N}} \right] \times 100 \quad (11)$$

۳- نتایج و بحث

بعد از تثبیت نانولوله‌های کربنی روی الکتروده پلاتین، برای بررسی عملکرد بیوسنسور، آنزیم گلوکز اکسیداز در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار در pHهای متفاوت ۴، ۶ و ۸ بافر فسفات که توسط غشایی که نسبت به آنالیت نیمه تراوا بوده قرار می‌گیرد این غشا دور الکتروده را احاطه می‌کند و این مجموعه در کنار الکتروده کمکی پلاتین و الکتروده Ag/AgCl در آنالیت، به کمک دستگاه پتانسیواستات جریان تولیدی را بررسی می‌کنند. برای این که pH محیط زیاد تغییر نکند از بافر فسفات استفاده می‌شود. زیرا بافر فسفات، باعث کم نشدن فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز می‌شود. هنگام اکسید شدن گلوکز، گلوکونیک اسید تولید شده و محیط اسیدی می‌گردد. برای اینکه pH محیط زیاد تغییر نکند از بافر فسفات استفاده می‌شود، همچنین علت استفاده از غشا این است که زمانی که الکتروده کاری در آن قرار گیرد، تماس بین الکتروده و آنالیت (گلوکز حل شده در

یک قسمت اصلی دیگر نرم‌افزار صفحه Main Effect (Average Effects of Factors and Interaction) است که با تایید صفحه آنالیز S/N باز می‌گردد (در این صفحه اهمیت هر فاکتور بر اساس مقادیر حاصل شده به دست می‌آید) که به کاربر راهنمایی می‌کند که تغییر و کار با کدام فاکتور مناسب‌تر می‌باشد و همچنین با انتخاب کلید ANOVA از پایین همین صفحه، مجموع مربعات خطا (S)، درجه آزادی (DOF)، واریانس (V)، ضریب فیشر (F) و درصد سهم هر فاکتور (P)، میزان خطای هر یک را نرم‌افزار مشخص می‌کند (جدول ۳). در این میان، ضریب فیشر و درصد سهم، دو فاکتور موثرتر می‌باشند. با انتخاب کلید Optimum از پایین همین صفحه توسط کاربر و انتخاب Stimulate، دوباره نرم‌افزار مشخص می‌کند که کدام فاکتور و کدام سطح از آن فاکتور مناسب‌تر می‌باشد. این مرحله به محاسبات آماری پیچیده نیاز می‌باشد و نتایج خروجی از آن، دقیق‌تر از مرحله مقدماتی است. با انتخاب کلید Transform از بالای این صفحه، نرم‌افزار دو عدد با عناوین Y_{exp} و S/NOPT در اختیار کاربر می‌گذارد (روابط ۶ الی ۹). Y_{exp} میزان پاسخی است که نرم‌افزار در شرایط بهینه تخمین می‌زند. هر چه اعداد Y_{exp} و S/N OPT به مقادیر S/N و Y که در مراحل قبل توسط آزمایشات به دست آمده‌اند نزدیکتر باشد (S/N Analysis)، صحت آزمایشات بیشتر می‌باشد. اگر مقدار Y_{exp} با مقدار Y تفاوت زیادی داشته باشد نشان دهنده این است که یا محاسبات اشتباه هستند و باید تکرار شوند، یا چند فاکتور اصلی حذف شده‌اند و اثرات متقابلی داشته‌اند که در نظر گرفته نشده‌اند [۲۱-۲۳].

$$n = -10 \log_{10} \left[\frac{\text{mean of sum of squares}}{\text{mesured ideal}} \right] \quad (3)$$

$$n = -10 \log_{10} \left[\frac{\text{mean of sum of squares}}{\text{reciprocal of mesured datal}} \right] \quad (4)$$

$$n = \log_{10} \left[\frac{\text{square of mean}}{\text{variance}} \right] \quad (5)$$

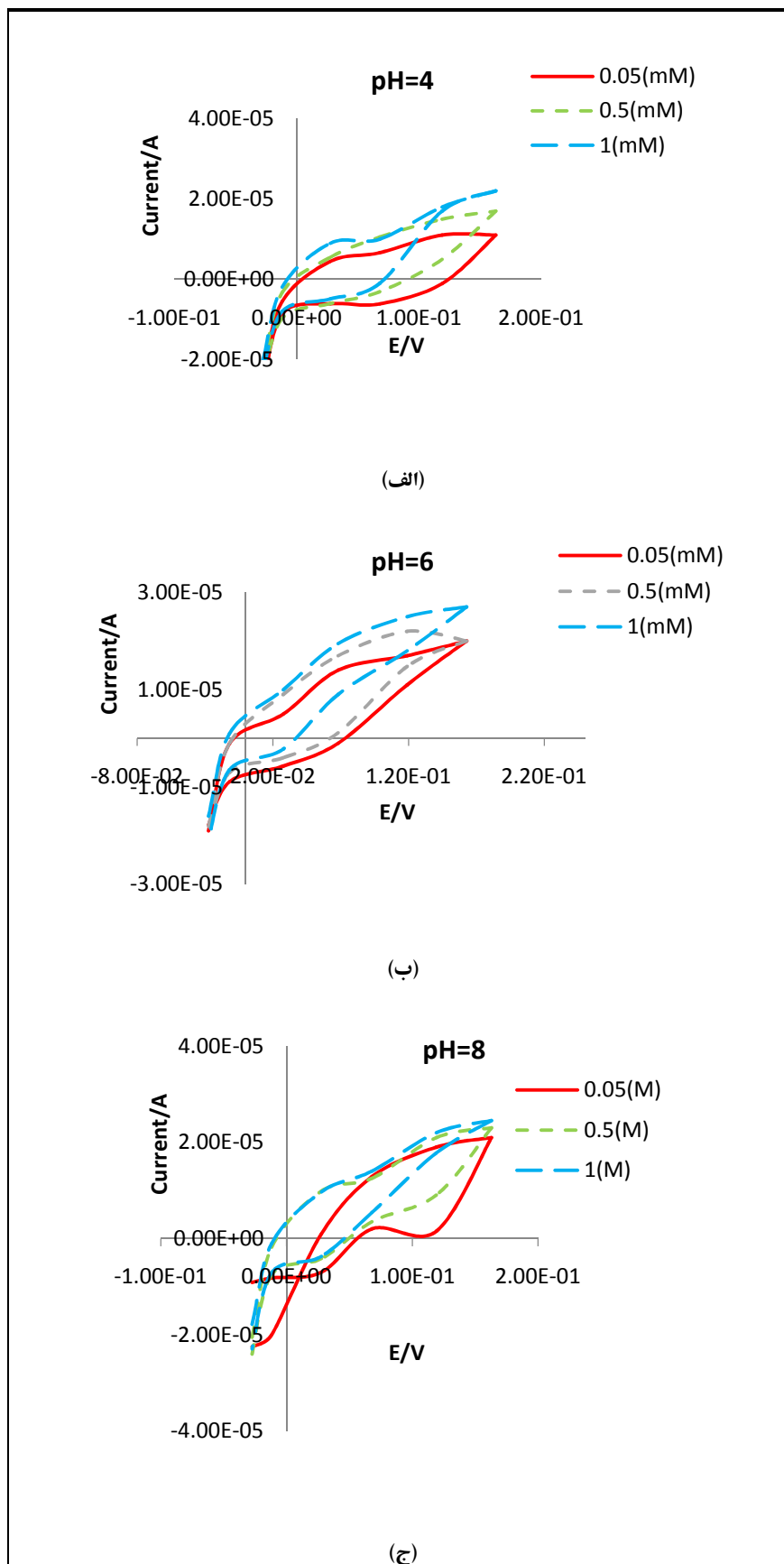
همان‌طور که از شکل ۵ (الف تا ج) مشخص است میزان سوپسترا (گلوکز) یا به عبارت دیگر میزان غلظت آنالیت، روی فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تاثیر گذار می‌باشد و همچنین مشخص گردید که در ولتاژ ۰/۷ اغلب پیک‌های جریان مشاهده می‌گردد. علاوه بر آن در هر pH مشخص با افزایش غلظت از ۰/۰۵ مولار به ۱ مولار، جریان تولیدی افزایش می‌یابد. علت این است که در غلظت‌های پایین، به دلیل کم بودن سوپسترا، جایگاه‌های فعال آنزیم هنوز کاملاً پر نشده است و فعالیت آنزیم کم خواهد بود. با افزایش تدریجی غلظت سوپسترا، فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد تا جایی که تمام جایگاه‌های فعال آنزیم پر شده و آنزیم در ماکزیمم فعالیت خود می‌باشد و از آن به بعد افزایش غلظت، تاثیری بر فعالیت بیشتر آنزیم ندارد، یا به عبارت دیگر رابطه غلظت دیگر خطی نمی‌باشد. آن زمان است که اصطلاحاً گویند گلوکز اضافی به صورت آزادانه در محیط باقی مانده است.

همان‌طور که از شکل ۶ نیز مشاهده می‌گردد در یک غلظت مشخص مانند ۱ میلی‌مولار، برای pH خنثی و نزدیک به آن، بیشترین جریان تولیدی اتفاق افتاده است. علاوه بر آن مشخص گردید در pH های بسیار کم مانند $pH=4$ ، نسبت به pH های بالاتر مانند $pH=8$ میزان جریان تولیدی، کمتر به دست آمد. دلیل این مطلب این است که گلوکز به همراه اکسیژن در مجاورت آنزیم تولید گلوکورونیک اسید می‌کند. وقتی درون غشا، آنزیم با بافر فسفات با pH خنثی قرار می‌گیرد این تغییرات حاصل شده را، بافر در حد خنثی نگه می‌دارد و اجازه نمی‌دهد محیط اسیدی گردد. اما هنگامی که pH بافر فسفات کم باشد این اتفاق نمی‌افتد و یا زمانی که pH بافر زیادتر باشد این اتفاق کمتر می‌افتد. شرایط بهینه علاوه بر نتایج آزمایشات، توسط نرم‌افزار نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای دو فاکتور انتخابی غلظت و pH و سه سطح آنها، جدول L_9 شکل گرفت (جدول ۲). مطابق جدول ۲، آزمایش ۶ (دارای $pH=6$ و غلظت ۱ میلی‌مولار) بهینه آنالیز انتخاب گردید که دارای $Y=19/95$ و میزان $S/N=26$ است (شکل ۸).

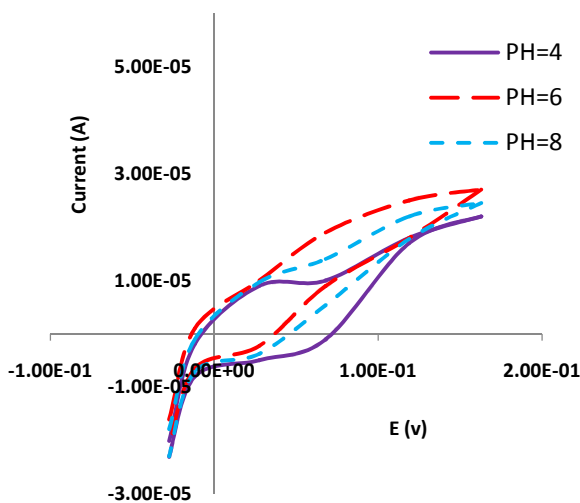
آب مقطر) تنها از طریق بیوکاتالیست (آنزیم گلوکز اکسیداز) است. به عبارت ساده‌تر تنها راه ارتباطی بین آنالیت و آنزیم این امر با دو مرتبه تکرار برای پیک جریان در هر pH مختلف بافر فسفات و غلظت‌های مختلف آنالیت انجام پذیرفت که نتایج در شکل ۵ برای pH و غلظت‌های مورد بررسی، آورده شده است. همچنین میزان جریان به دست آمده از دستگاه پتانسیوستات، برای غلظت ۱ میلی‌مولار و pH متفاوت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶) که همان بیان‌کننده نقش pH در یک غلظت مشخص است و علاوه بر آن، میزان جریان خروجی در یک ولتاژ مشخص ۰/۷ ولت و برای غلظت‌های متفاوت بررسی شد (شکل ۷).

در این بررسی‌ها به وضوح مشخص گردید که هر چه میزان غلظت بیشتر باشد میزان جریان خروجی بیشتر می‌باشد، همچنین در غلظت ۱ میلی‌مولار (بیشترین غلظت) و pH نزدیک به شرایط خنثی میزان جریان خروجی به مراتب از سایر شرایط بیشتر است، به عبارت ساده‌تر بیشترین جریان در pH نزدیک به شرایط خنثی و ماکزیمم غلظت به دست می‌آید. البته باید توجه داشت که این غلظت ماکزیمم نیز تا زمانی است که جایگاه‌های فعال آنزیم هنوز پر نشده است و بعد از آن، افزایش غلظت دیگر نقشی ایفا نمی‌کند.

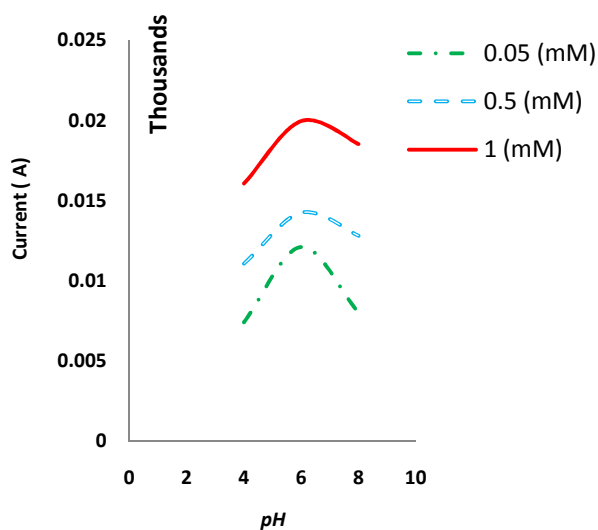
شکل ۵-الف جریان‌سنجی بیوسنسور، برای بافر فسفات با $pH=4$ و سه غلظت ۰/۰۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار رسم گردید. همان‌طور که دیده می‌شود، با افزایش جریان از غلظت ۰/۰۵ به ۱ میلی‌مولار، میزان جریان تولیدی افزایش می‌یابد به طوری که برای غلظت ۱ مولار نسبت به سایر غلظت‌ها، افزایش جریان تولیدی نسبت به دو حالت قبل دیده می‌شود. حالت (ب) این شکل جریان‌سنجی بیوسنسور، برای بافر فسفات با $pH=6$ و همان سه غلظت رسم گردیده است. با بررسی این نمودار، همان نتیجه قبلی حاصل می‌گردد که بیشترین جریان تولیدی برای حالتی است که بیشترین غلظت را داراست. حالت (ج) رسم شده برای بافر فسفات با $pH=8$ ، تصدیق‌کننده افزایش جریان تولیدی در قبال افزایش غلظت گلوکز است.



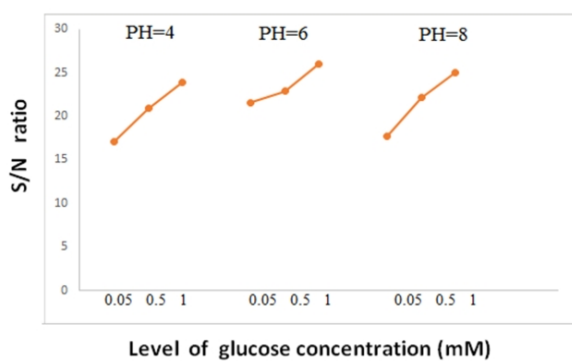
شکل ۵: جریان اندازه‌گیری شده از بیوسنسور الف (pH=4، ب) pH=6 و ج) pH=8 و غلظت‌های متفاوت گلوکز (میلی‌مولار).



شکل ۶: میزان جریان در غلظت ۱ میلی مولار و pH های متفاوت.



شکل ۷: نمودار pH بر حسب جریان برای ولتاژ ۰/۷ ولت و در غلظت های متفاوت (میلی مولار).



شکل ۸: نمودار S/N بر حسب غلظت های متفاوت گلوکز و برای pH های متفاوت.

جدول ۲: آرایه‌های متعامد L9.

Current(mA) A	parameters and their levels		experiment number	
	A	B	A	
1	1	1	6.14	8.70
2	1	2	11.23	10.93
3	1	3	17.05	14.63
4	2	1	11.30	12.91
5	2	2	13.06	14.92
6	2	3	20.07	19.84
7	3	1	6.71	9.33
8	3	2	12.07	13.56
9	3	3	18.08	18.97

جدول ۳: نتایج جدول ANOVA.

Parameters		DOF	sum of squares (S)	Variance (V)	F-Ratio (F)	Percent P (%)
A	pH	2	12.55	6.27	10.55	13.62
B	C (mM)	2	60.92	30.55	58.93	76.07
Other/error		4	3.98	0.11		10.29
Total		8	77.46			100 %

جدول ۴: نتایج به دست آمده از پیش‌بینی نرم‌افزار و آزمایشات.

Parameters		Value current(mA)		
		value	Level	Contribution
A	pH	6	2	1.521
B	C (mM)	1	3	3.192
total contribution		4.713		
Observed value of current (mA)		19.95		
predicted value of current (mA)		21.57		

واریانس، نسبت F یا ضریب فیشر و درصد P یا همان اشتراک پذیری که به ترتیب دارای مقادیر ۶۰/۹۲، ۳۰/۵۵، ۵۸/۹۳ و ۷۶/۰۷ می‌باشند نیز می‌توان نشان داد که با توجه به بیشتر بودن اعداد جدول، اثر غلظت بیشتر از اثر pH می‌باشد و در نتیجه این نشان می‌دهد که راحت‌تر است که برای رسیدن به نتایج بهتر، تغییرات را روی غلظت قرار دهیم. همچنین از جدول بالا مشخص گردید که میزان خطا ۱۰/۲۹٪ بوده که کمتر از ۱۵٪ می‌باشد و نشان می‌دهد که نتایج قابل قبول بوده است و صحتی بر درستی آزمایشات

اعداد ۲ و ۳ برای آزمایش ۶ نشان دهنده سطح ۲ از فاکتور pH و سطح ۳ از فاکتور غلظت می‌باشد. همچنین اثر و سهم هر فاکتور در جدول ANOVA (جدول ۳) آورده شده است که نشان می‌دهد که آن فاکتور که سهم بیشتری دارد، در شرایط بهینه نقش بیشتری دارد و برای رسیدن به شرایط بهینه تغییرات روی آن فاکتور بهتر و موثرتر است. به عبارت ساده‌تر از این جدول مشاهده می‌شود که تغییر غلظت گلوکز اثر بیشتری نسبت به میزان pH در جریان خروجی دارد. به طریقی مشابه، از روی میزان مجموع مربعات خطا،

می‌باشد. در انتها نرم‌افزار S/N_{OPT} و Y_{EXP} را محاسبه کرده و در اختیار ما می‌گذارد که به شرح زیر است:

$$S/N_{OPT} = 26.67 \text{ mA}$$

$$Y_{EXP} = 21.57$$

همان‌طور که بیان شد نرم‌افزار نیز شرایط بهینه را $pH=6$ و غلظت ۱ میلی‌مولار معرفی کرد که این همان نتایجی است که از شکل‌های ۵ و ۶ حاصل از آزمایشات استخراج شده بود. برای شرایط بهینه معرفی شده تست مجدد و تاییدیه انجام گرفت (جدول ۴). بر این اساس، درصد خطای بین آزمایشات و نتایج نرم‌افزار در حدود ۸/۱۲٪ و درصد خطای محاسبه شده بین آزمایشات و آزمایش تاییدیه (بهینه‌یابی توسط نرم‌افزار و آزمایش مجدد در شرایط بهینه) در حدود ۷/۴۷٪ به دست آمد که هر دوی آنها نیز کمتر از ۱۵٪ می‌باشد. همچنین میزان جریان خروجی از دستگاه پتانسیواستات برای شرایط بهینه (غلظت ۱ میلی‌مولار و $pH=6$) برای الکتروود غنی نشده (بدون اصلاح) ۰/۰۰۴۳۷ آمپر به دست آمده بود در حالی که با اصلاح الکتروود به ۲۱/۵۷ میلی‌آمپر افزایش یافت که نشان دهنده این است نانوذررات چقدر بر میزان جریان اثر مثبت داشته‌اند و علت آن نیز به خاطر افزایش سطح تماسی است که بعد از اصلاح الکتروود کاری ایجاد شده است. می‌توان این ایده را هم مطرح کرد که به کمک یک سری الکتروود اصلاحی ساخته شده بتوان جریان آمپر خروجی زیادی تولید کرد که بتواند جایگزین روش‌های قدیمی تولید برق گردد و روش نوینی برای بحث تبدیل انرژی گردد و افق تازه‌ای برای محیط زیست نیز ایجاد شود.

۴ - نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصله از بررسی عملکرد این بیوسنسور مشخص گردید که شرایط بهینه، $pH=6$ و غلظت ماکزیمم است. علاوه بر آن مشخص گردید در pH های بسیار کم مانند $pH=4$ ، نسبت به pH های بالاتر مانند $pH=8$ میزان

جریان کمتری تولید می‌کند. همچنین جریان خروجی از دستگاه پتانسیواستات بعد از تثبیت و اصلاح الکتروود کاری تقریباً ۵/۱ برابر الکتروود تثبیت نشده است که بیان کننده اثر نانوذررات روی جریان خروجی بوده است. همچنین به کمک نرم‌افزار نیز مشخص گردید که شرایط بهینه همان شرایطی است که با آزمایشات به دست آمده است و علاوه بر این نتایج، اثر غلظت بیشتر از اثر pH بوده است یا به عبارت ساده‌تر برای رسیدن به شرایط بهینه تغییر در غلظت بهتر از تغییر در میزان pH آنزیم می‌باشد. همچنین میزان خطای محاسبه شده بین شرایط آزمایشگاه و اعداد پیش‌بینی نرم‌افزار و به طور مشابه بین اعداد جریان خروجی از آزمایشات و آزمایش مجدد (تاییدیه) میزان کمی است که این بیان کننده میزان حساس بودن بیوسنسور اصلاحی و صحت آزمایشات می‌باشد.

سپاسگزاری

این پروژه با پشتیبانی پژوهشگاه صنعت نفت ایران (RIPI)، آزمایشگاه‌های دانشگاه فردوسی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان و پژوهشکده پرتاووس انجام پذیرفت. همچنین بر خود واجب می‌دانیم که از تمام کسانی که در این کار ما را کمک کردند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

مراجع

- [1] N.Q. Dung, D. Patil, T.T. Duong, *Sensors and Actuators B*, **166**, 2012, 103.
- [2] M.B. Gholivand, M. Khodadadian, *Biosensors and Bioelectronics*, **53**, 2014, 472.
- [3] M. Tasviri, H.A. Rafiee-Pour, H. Ghourchian, M.R. Gholami, *Appl. Nanosci.*, **1**, 2011, 89.
- [4] X. Pang, D. He, Sh. Luo, *Sensors and Actuators B*, **137**, 2009, 134.
- [5] F. Valentini, L. Galache, E. Tamburri, *Biosensors and Bioelectronics*, **43**, 2013, 75.
- [6] U. Anik, M. Cubukcu, *Turk J. Chem.*, **32**, 2008, 711.
- [7] D. Zheng, S. Vashist, M. Dykas, *Materials*, **6**, 2013, 1011.
- [8] E.H. Yoo, S.Y. Lee, *Sensors*, **10**, 2010, 4558.
- [9] H.F. Cuia, K. Zhanga, Y.F. Zhanga, *Biosensors and Bioelectronics*, **51**, 2013, 1.
- [10] Y. Gao, T. Yang, X. Yang, *Biosensors and Bioelectronics*, **60**, 2014, 30.
- [11] R. Antiochia, L. Gorton, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 2007, 2611.
- [12] D. Odaci, A. Telefoncu, S. Timur, *Sensors and Actuators B*, **132**, 2008, 159.

- [18] M. Olek, J. Ostrander, S. Jurga, *Nano Lett.*, **4**, 2004, 1889.
- [19] O. Ramezani, A. Farahbakhsh, *International Journal of Nano Dimension*, **6**, 2015, 23.
- [20] R.A. Upadhye, *Int. J. Eng. Res and Tech.*, **7**, 2012, 11.
- [21] S.S. Madaeni, S. Koocheki, *Chemical Engineering Journal*, **119**, 2006, 37.
- [22] A. Farahbakhsh, M. Taghizadeh, B. Yakhchali, *Chemical Engineering Technology*, **34**, 2011, 1807.
- [23] R. Mehravar, M. Jahanshahi, G.D. Najafpour, *Iranica Journal of Energy and Environment*, **2**, 2011, 87.
- [13] Y. Fan, K.Y. Ryu, H.K. Shin, *Current Applied Physics*, **7**, 2007, 490.
- [14] S.H. Xi, T. Shi, D. Liu, *Sensors and Actuators A*, **198**, 2013, 15.
- [15] R.M. Iost, F.N. Crespilho, *Biosensors and Bioelectronics*, **31**, 2012, 1.
- [16] S. Timur, Y. Yigzaw, L. Gorton, *Sensors and Actuators B*, **113**, 2006, 684.
- [17] P.K. Deshmukh, K.P. Ramani, S.S. Singh, *Journal of Controlled Release*, **166**, 2013, 294.