



University of Tehran
College of Engineering



Faculty of Chemical
Engineering

Fabrication of glucose biosensor based on vertically aligned carbon
nanotube arrays modified with polyaniline

A thesis submitted to the Graduate Studies Office in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master of Science in Chemical Engineering

By:

Shamim Azimi

Abstract

In this study, a new method for the fabrication of vertically aligned carbon nanotube arrays (VACNTs) based electrode for selective detection of glucose was employed. VACNTs were grown by chemical vapor deposition (CVD) method on the silicon substrate deposited with alumina as a buffer layer and iron as catalyst by RF-sputtering and atomic layer deposition (ALD), respectively. In order to improve the chemical and mechanical stabilities of the electrode, polyaniline as a conductive polymer in the view of electrochemical properties and long-term environmental stability was employed by electrodeposition, leaving only the very end exposed to form inlaid arrays. The fabricated VACNT was employed as biosensor electrode for diagnosis of glucose. Glucose Oxidase was covalently bonded to the tips of VACNTs by forming the amide coupling between the amine residues and carboxylic acid groups.

Cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy methods were used to investigate the electrochemical behavior of the synthesized VACNTs. Detection limit of the fabricated biosensor was measured to be about $0.283 \mu\text{M}$ and sensitivity toward glucose detection was $0.988 \text{ mA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. The linear detection range was $(5-65) \mu\text{A}$. The fabricated biosensor performed effectively for the selective detection of glucose in the presence of other interferences, i.e. uric acid and ascorbic acid. The results demonstrate that the electrode is a suitable candidate for detection of a wide range of biomarkers.

Keywords: VACNT, Biosensor, Polyaniline, Enzyme immobilization, cyclic voltammetry,

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکتروده
زیست حسگر گلوکز

فهرست مطالب

فصل 1:	1
1-1-مقدمه	1
1-2-عنوان تحقیق:	4
1-3-مسئله و هدف تحقیق:	4
1-4-تاریخچه ای از موضوع تحقیق	5
1-5-خلاصه ی فصل ها	6
فصل 2: مروری بر منابع علمی	7
1-2-مقدمه ای بر نانولوله های کربنی	8
2-2-عامل دار کردن نانولوله های کربنی	10
1-2-2-واکنش در محیط مایع	11
2-2-2-واکنش در محیط گاز	12
1-2-2-2-انواع تخلیه ی الکتریکی	13
2-2-3-روش گاز یا بخار دما بالا	19
2-3-2-گروه های عاملی	20
1-3-2-گروه های اکسیژن دار	20
2-3-2-گروه ها آمین دار	23
2-3-3-گروه های کلره	24
2-3-4-گروه های فلوئوره	24
2-4-پلی آنیلین	25
2-5-تعریف زیست حسگر و اجزای آن	27
2-5-1-عوامل موثر بر کارایی زیست حسگرها	27

29	2-5-2- کاربرد زیست حسگرها.....
29	2-5-3- نسل های متوالی زیست حسگرها.....
32	2-6- معرفی آنزیم ها.....
34	2-6-1- راه های تثبیت آنزیم ها.....
36	2-7- زیست حسگر گلوکز.....
38	2-7-1- ساختار و واکنش های گلوکز.....
40	2-7-2- اثر مداخله گر ها در زیست حسگر گلوکز.....
40	2-8- روش های الکتروشیمیایی در زیست حسگر.....
40	2-8-1- ولتامتری.....
43	2-8-2- کروئوآمپرومتری.....
43	2-8-3- آمپرومتری.....
44	فصل ۳: روش تحقیق.....
45	3-1- مقدمه.....
45	3-2- مواد شیمیایی.....
45	3-3- ساخت آرایه های منظم نانولوله های کربنی به روش CVD.....
47	3-4- لایه نشانی پلی آنیلین.....
48	3-5- صیقل دادن.....
48	3-6- عامل دار کردن نانولوله های کربنی.....
50	3-7- بررسی عملکرد زیست حسگری.....
50	3-7-1- تهیه ی بافر فسفات.....
51	3-7-2- تهیه ی محلول آنزیم و تثبیت آن بر روی سطح الکتروود.....
53	3-7-3- تعیین مشخصات.....
53	3-7-4- بررسی تاثیر سرعت روبش بر روی رفتار اکسایش و کاهش آنزیم.....

54	3-7-5-آزمایش‌های ولتامتری و آمپرومتری جهت تعیین حساسیت نسبت به گلوکز.....
54	3-7-6-انتخاب پذیری نسبت به گلوکز.....
55	3-8-تعیین مشخصه ها.....
55	3-8-1-آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).....
55	3-8-2-آنالیز رامان (Raman).....
55	3-8-3-آنالیز ولتامتری پالس تفاضلی (DPV).....
55	3-8-4-طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS).....
56	فصل 4: نتایج و بحث.....
65	4-1-مقدمه.....
59	4-1-1-آنالیز اشعه ی فروسرخ.....
60	4-1-2-آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی.....
60	4-1-3-آنالیز طیف سنجی رامان.....
61	4-1-4-طیف سنج امپدانس الکتروشیمیایی.....
63	4-2-بررسی عملکرد زیست حسگری الکتروود.....
63	4-2-1-بررسی عملکرد با استفاده از نمودار ولتامتری.....
68	4-2-2-بررسی عملکرد با استفاده از آزمون استاندارد.....
69	4-3-تنیبت آنزیم بر روی سطح الکتروود اصلاح شده.....
71	4-4-تاثیر سرعت رویش بر فعالیت الکتروود اصلاح شده PANI/VACNTs.....
73	4-5-تاثیر pH بر فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز.....
74	4-6-تخیص گلوکز به روش آمپرومتری توسط الکتروود اصلاح شده.....
76	4-7-گزینش پذیری الکتروود PANI/VACNTs نسبت به گلوکز.....
76	4-8-پایداری الکتروود اصلاح شده با پلی آنیلین.....
76	4-9-مقایسه ی عملکرد الکتروود اصلاح شده با پلی آنیلین با سایر الکتروودها.....

فصل 5: نتایج و بحث 77

5-1- نتیجه گیری 78

فصل 6: مراجع 78

فهرست جداول

- جدول 1: مقایسه ی خواص نانولوله های کربنی با گرافیت.....9
- جدول 2: گازهای مورد استفاده برای عامل دار کردن.....13
- جدول 3: تاثیر اکسند ه های مختلف بر غلظت اکسیژن.....22
- جدول 4: انواع آنزیم ها.....33
- جدول 5: راهنمای تهیه ی لافر فسفات در pH های مختلف.....51
- جدول 6: بررسی و مقایسه س عملکرد الکتزودهای مختلف.....65
- جدول 7: بررسی و مقایسه ی عملکرد الکتزودهای مختلف.....69
- جدول 8: بررسی و مقایسه ی عملکرد الکتزود با الکتزودهای مشابه.....79

فهرست اشکال

- شکل (2-1). انواع واکنش هایی که منجر به تولید گونه های فعال در پلاسما می شوند..... 15
- شکل (2-2). شماتیک (a) حفاظت دبای و (b) توزیع پتانسیل اطراف بار نقطه های درون پلاسما..... 18
- شکل (2-3). گروه های عاملی اکسیژن دار اسیدی پیشنهاد شده برای سطح مواد کربنی..... 21
- شکل (2-4). نمایی از مسیرهای رایج عامل دار کردن نانولوله ها در محل انتها و نقص های ساختاری..... 23
- شکل (2-5). ساختار کلی پلی آنیلین..... 27
- شکل (2-6). ساختار شماتیک و قواعد عملیاتی یک زیست حسگر..... 28
- شکل (2-7). ترتیب رخدادهای سیستم زیست حسگر گلوکز با واسطه (نسل دوم)..... 31
- شکل (2-8). راه های مختلف تثبیت آنزیم (a) پیوند کووالانسی، (b) جذب سطحی، (c) تله انداختن، (d) ایجاد پیوند عرضی، (e) تثبیت درون کپسول و (f) پیوند عرضی- جذب سطحی..... 37
- شکل (2-9). حالت (a) زنجیره باز و (b) حلقهای D-گلوکز..... 38
- شکل (2-10). ساختار α -D- (a) گلوکز و β -D- (b) گلوکز..... 39
- شکل (3-1). سیستم انجام آزمایش CVD همراه بخار آب با الگوی موازی..... 48
- شکل (3-2). سل الکتروشیمیایی لایه نشانی پلی آنیلین..... 49
- شکل (3-3). شماتیک و تصویر تجهیزهای آزمایشگاهی مورد نیاز برای تولید پلاسمای DBD شامل: دستگاه تابع ساز، اسیلوسکوپ و آمپلی فایر ولتاژ و فرکانس بالا..... 50
- شکل (3-4). اتصال مولکول زیستی توسط گروه آمینی..... 53
- شکل (3-5). شمای کلی از ساخت الکترودها و تثبیت آنزیم بر روی سطح آن..... 54
- شکل (3-6). نحوه ی اعمال پتانسیل در آنالیز DPV..... 57
- شکل (4-1). تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از (الف و ب) سطح مقطع، (ج و د) روی سطح..... 60
- شکل (4-2). طیف سنجی رامان الکتروند VACNTs..... 61
- شکل (4-3). نتایج آزمایش امپدانس. (a) امپدانس واربرگ (b) امپدانس الکتروند (c) PANI/VACNTs امپدانس VACNTs..... 63

- شکل(4-4). بررسی عملکرد الکترودهای a,b,c,d جهت تشخیص آنزیم.....64
- شکل(4-5). تست استاندارد برای نمونه های b, c, and d با اندازه ی قطر متفاوت.....68
- شکل(4-6). ولتاگرام (a)الکترود کربن شیشه ای برهنه (b) الکترود GOx/PANI/VACNTs (c) PANI/VACNTs در محلول بافر فسفات اکسیژن زدایی شده با سرعت روبش 50 میلی ولت بر ثانیه.....70
- شکل(4-7). الف)ولتاگرام الکترود GOx/PANI/VACNTs در سرعت های رشد 10 تا 540 میلی ولت بر ثانیه.ب) وابستگی جریان پیک آندی و کاتدی الکترود GOx/PANI/VACNTs به سرعت روبش. پ) وابستگی جریان پیک آندی و کاتدی الکترود GOx/PANI/VACNTs به جذر سرعت روبش.....72
- شکل(4-8). اثر pH محلول بافر بر ولتامتری چرخه ای الکترود GOx/PANI/VACNTs در سرعت روبش 50 میلی ولت بر ثانیه.....73
- شکل(4-9). وابستگی پتانسیل فرمال الکترود به pH در بافر فسفات 0/1 مولار.....74
- شکل(4-10). پاسخ آمپرومتری الکترود GOx/PANI/VACNTs به افزایش متوالی محلول گلوکز به محلول بافر فسفات (0/1 مولار، pH 7/0) در پتانسیل 0/55- ولت.....75
- شکل(4-11). نمودار درجه بندی غلظت گلوکز درون محلول بافر فسفات.....76
- شکل(4-12). پاسخ آمپرومتری الکترود GOx/PANI/VACNTs به افزایش متوالی 2 میلی مولار گلوکز، 0/1 میلی مولار آسکوربیک اسید و 0/1 میلی مولار اوریک اسید درون محلول بافر در پتانسیل 0/55- ولت.....77
- شکل(4-13). پایداری جریان پیک کاتدی الکترود GOx/PANI/VACNTs78
- شکل(4-14). (a) چرخه ی ولتامتری الکترود GOx/PANI/VACNTs (b) چرخه ی ولتامتری الکترود GOx/PANI/VACNTs بعد از 160 چرخه ی متوالی.....79

با بهره‌گیری از تکنولوژی‌های جدید و با توجه به اینکه روش‌های متداول سنتی برای درمان و تشخیص بیماری‌ها تنها دقت کافی را ندارند، بلکه زمان بر هستند، می‌توان به تدریج زیست حسگرها را به عنوان ابزارهای جدید در پزشکی جایگزین آن‌ها کرد و عملکرد آن‌ها را با روش‌های مختلف بهبود بخشید. نیاز اصلی به زیست حسگرها در زمینه‌ی پزشکی و برای شناسایی مولکول مورد نظر، در دسترس بودن یک حسگر بیولوژیکی مناسب و داشتن یک سیستم شناسایی است. یکی از بیماری‌هایی که به دلیل نوع زندگی امروزه افراد زیادی با آن دست به گریبان هستند، دیابت است. در بیماران دیابتی به دلیل اینکه بدن شخص قادر به تنظیم ترشح انسولین نیست، شخص دچار اختلالاتی در میزان قند خون می‌شود که در اغلب موارد برای سلامتی خطرناک است. تشخیص میزان گلوکز در بدن بیماران دیابتی یکی از مواردی است که جایگاه مهمی در پزشکی دارد. برای تشخیص و اندازه‌گیری گلوکز راه‌های مختلفی وجود دارد. زیست حسگرهای الکتروشیمیایی به دلیل قدرت انتخاب گری، حساسیت و سرعت بالا و همچنین قابل حمل بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [1]. آنزیم مورد استفاده در این زیست حسگر آنزیم گلوکز اکسیداز است که انتخاب پذیری بالایی نسبت به گلوکز دارد.

اولین زیست حسگر بر پایه‌ی آنزیم در سال 1962 توسط کلارک ساخته شد. محدودیتی که در استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز وجود دارد پایداری پایین و سرعت پایین در انتقال الکترون است. مدفون بودن آنزیم در زیرلایه‌های پروتئینی و جهت‌گیری نامناسب و واسرشتگی، از عواملی است که باعث ایجاد

محدودیت در عملکرد این آنزیم می‌شود [2]. سه نسل متفاوت از زیست حسگرها عملکردهای مختلفی دارند. در زیست حسگرهای نسل اول و دوم از مواد واسطه جهت انتقال الکترون استفاده می‌شود. این مواد واسطه به دلیل مشکلاتی نظیر تداخل‌های پتانسیلی و همچنین نوسان‌های غلظتی دارای محدودیت‌های عملکرد هستند. در نسل بعدی زیست حسگرها برای رفع برخی از مشکلات از رویکرد حذف مواد واسطه و انتقال مستقیم الکترون استفاده می‌شود [3]. امروزه با استفاده از فناوری‌های جدید و استفاده از مواد میانجی این امکان وجود دارد که بر بسیاری از محدودیت‌های اشاره شده در زمینه‌ی زیست حسگرها غلبه کرد. این مواد باعث تسریع واکنش‌های سطحی و انتقال الکترون در زیست حسگرها می‌شوند و باعث تسهیل بسیاری از اندازه‌گیری‌ها می‌شوند. کربن نانوتیوب‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌های مطلوبی

نظیر پایداری شیمیایی و مکانیکی، مساحت سطح ویژه و ظرفیت جذب بالا و قابلیت انتقال الکترون می توانند به عنوان پایه ای برای تثبیت آنزیم به کار بروند.

یکی از انواع گونه های کربن نانوتیوب که در سال های اخیر به میزان زیاد مورد توجه قرار گرفته است، آرایه های منظم نانولوله های کربن هستند که کاربردهای وسیعی را در زمینه های مختلف از جمله حسگرها، زیست حسگرها، غشاء ها و بسیاری دیگر از کاربردها پیدا کرده اند [۴]. آرایه های نانولوله های کربن به دلیل خواص مطلوب نظیر پایداری ساختاری و مساحت سطح ویژه ی بالا می توانند محیط مناسبی را برای تثبیت آنزیم ها فراهم کرده و فرآیند تبادل الکترون آن ها با سطح الکترودها را تسهیل نمایند. این مواد همچنین می توانند مقاومت موجود در مسیر انتقال جرم را کاهش دهند و سرعت واکنش های سطح را افزایش دهند. فضای سطحی و رسانایی الکتریکی بالای حرارتی و الکتریکی بالای نانولوله های کربن باعث می شود که بتوانند مثل سیم هایی بین مراکز اکسایش و احیای یک آنزیم یا پروتئین سطح عمل کنند و انتقال الکترون مستقیم را بهبود ببخشند که باعث می شود مواد بسیار مناسبی برای ساخت زیست حسگرها باشند [۵].

عامل تعیین کننده برای بررسی آرایه ها، قطر آرایه ها و یا به عبارتی چگالی آن ها در واحد سطح می باشد. به طور کلی، کاهش اندازه ی الکترودها می تواند به طور گسترده ای سبب افزایش حساسیت و بهبود اندازه گیری های الکتروشیمیایی شود. برتری اصلی الکترودهایی با اندازه ی کوچکتر می تواند به تشکیل سریع

میدان انتشار شعاعی^۱ سه بعدی و کاهش مقاومت اهمی نسبت داده شود که همین سبب افزایش سرعت انتقال جرم، افزایش چگالی جریان و همچنین افزایش نسبت سیگنال به نویز^۲ می شود. این موارد انگیزه ی اصلی برای کاهش اندازه ی آرایه ها و حتی حرکت از الکترودهایی با اندازه ی میکرو به اندازه ی نانو می باشد.

یکی از راه های بهبود خواص مکانیکی و افزایش پایداری آرایه های کربن نانوتیوب استفاده از پلیمرهاست. پلیمرها باعث بهبود پایداری و افزایش طول عمر آرایه ها می شوند و در صورت استفاده از پلیمرهای رسانا، خواص رسانش آرایه نیز بهبود پیدا میکند.

برای بهبود برهم کنش بین آرایه های کربن نانوتیوب و آنزیم گلوکز اکسیداز و تثبیت بهتر و موثر آن ها بر سطح آرایه ها، از عامل دار کردن آن ها استفاده می کنیم. این عامل دارشدن می تواند به صورت کووالانسی

¹ Radial diffusion field

² Signal to noise ratio

یا غیر کووالانسی صورت بگیرد. در روش غیر کووالانسی گرچه ساختار کلی کربن نانوتیوب تغییر نمی کند، اما نیروی بین نانوتیوب ها و ماتریس های مهمان³ تضعیف می شود. روش های شیمیایی مثل اکسیداسیون با اسیدهای معدنی می تواند گروه های عاملی را به صورت غیر کووالانسی بر روی سطح آرایه ها ایجاد کند [6]. راه کار معمول جهت اتصال گروه های عاملی استفاده از محیط های شیمیایی مایع است که علاوه بر زمان بر بودن، آسیب های ناخواسته به آرایه ها وارد می کند. بنابراین چالش پیش روی آرایه های نانولوله های کربنی با تمام خواص مطلوبی که دارند و علیرغم پژوهش های متعددی که از زمان پیدایش بر روی آن ها صورت گرفته، اتصال گروه های عاملی بر روی سطح آن ها بدون ایجاد نقص های ناخواسته و همچنین کوتاه و بریده شدن نانولوله ها است. یک روش جایگزین استفاده از تخلیه ی الکتریکی پلاسما است. پلاسما یک راهکار موثر با زمان فرایند کوتاهتر و آلودگی کمتر است که به دلیل ملایم بودن شرایط آن، آسیب زیادی به نانولوله ها وارد نمی کند [7]. از انواع تخلیه های الکتریکی، پلاسما با مانع دی الکتریک به علت فشار

اتمسفری، دمای محیط و حجم تخلیه بالا استفاده ی بیشتری را در زمینه ی عامل دار کردن مواد پیدا کرده است. این نوع پلاسما در محیط های مختلف نظیر هوا، دی اکسید کربن و آمونیاک استفاده شده است. یک مزیت دیگر روش پلاسما کنترل پارامتری آن است که با تنظیم توان اعمالی و مدت زمان فرایند صورت می گیرد.

نوآوری این پژوهش، حذف محیط های شیمیایی مایع و بهره گیری از پلاسما برای اتصال گروه های عاملی مورد نظر بر سطح نانولوله و همچنین استفاده از پوشاندن الکتریکی پلیمر پلی آنیلین جهت بهبود خواص رسانش و همچنین افزایش مقاومت شیمیایی آرایه است.

۱-۲- عنوان تحقیق:

در این پروژه، هدف ما این است که زیست حسگر گلوکز را بر پایه ی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عامل دار شده ی کربن نانوتیوب بسازیم و پس از تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر سطح آن، پارامترهای مختلف زیست حسگرهای گلوکز از جمله حساسیت، حد تشخیص، طول عمر، گزینش پذیری و ... را برای آن بررسی کنیم.

³ Host matrix

۱-۳- مسئله و هدف تحقیق:

در کار پیش رو، از عامل دار کردن آرایه های نانولوله های کربنی به روش پلاسما استفاده می کنیم و از آرایه های اصلاح شده برای بهبود عملکرد زیست حسگر گلوکز استفاده می کنیم. به دلیل پیشرفته بودن دستگاه مورد استفاده شده و دقت به کاررفته در انجام آزمایشات و همچنین کیفیت بالای آرایه های کربن نانوتیوب، انتظار می رود که آرایه ی عامل دار شده بتواند به خوبی عملکرد زیست حسگر را بهبود ببخشد و خاصیت انتقال الکترون مستقیم را بهبود ببخشد.

۱-۴- تاریخچه ای از موضوع تحقیق

اولین حسگر آنزیمی قندخون در سال 1962 توسط کلارک^۴ و لیونز^۵ معرفی شد که در آن اکسیژن مصرفی برپایه اکسید شدن کاتالیستی گلوکز در حضور اکسیژن نمایش داده می شد [۸]. اولین حسگر آنزیمی آمپرومتری هم در سال 1973 معرفی شد که در آن به جای مقادیر جریان متغیر حاصل از کاهش اکسیژن، تولید آندی هیدروژن پراکسید بررسی می شد. پس از واضح شدن اهمیت استفاده از زیست حسگرهای گلوکز برای اندازه گیری مقدار قند خون به جای روش های متداول آزمایشگاهی، همواره تلاش محققان بر آن بوده که با استفاده از فناوری های موجود، عملکرد این نوع از زیست حسگرها را ارتقاء بخشند [۹].

در سال های اخیر، یکی از مواردی که نه تنها برای ساخت بیوسنورهای زیستی و صنعتی، بلکه در بسیاری از کاربرهای دیگر در سایر زمینه ها توجه بسیاری را به خود جلب کرده، آرایه های منظم نانولوله های کربنی است. نانولوله های کربنی به دلیل دارا بودن خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد، در ساخت حسگرهای شیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند؛ برای مثال، نسبت سطح به حجم آن ها بالاست، خواص انتقال الکترون آن ها چشم گیر است و رسانایی الکتریکی و حرارتی قابل ملاحظه ای دارند. فضای سطحی و رسانایی بالای نانولوله های کربنی باعث می شود که بتوانند مثل سیم هایی بین مراکز اکسایش و احیای یک آنزیم و یا پروتئین و سطح الکتروده عمل کنند و انتقال مستقیم الکترون را بهبود ببخشند که همین باعث می شود مواد بسیار مناسبی برای ساخت زیست حسگرها باشند [۱۰].

⁴ Clark

⁵ Lyons

با وجود خواص بسیار مطلوب نانولوله های کربنی، واکنش پذیری کم این مواد استفاده ی آن ها در بعضی کاربردهای خاص را محدود می کند. با عامل دار کردن نانولوله ها، می توان فرآیند پذیری آن ها را بهبود داده و همچنین امکان ارتقا خواص آن ها را فراهم نمود. افزودن هرگونه گروه مولکولی از قبیل گروه های اکسیژن دار، نیتروژن دار، ذره های فلزی و فلئور به سطح نانولوله را عامل دار کردن گویند. گروه عاملی در واقع آرایش مشخصی از اتم هاست که به مولکول آلی دارای آن، خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به

فردی می بخشد [۷]. روش های مختلفی برای آماده سازی آرایه های نانولوله های کربنی و استفاده از آن ها در زیست حسگرها وجود دارد.

در سال 2010، جیانگ و همکاران [۱۱] یک زیست حسگر گلوکز غیرآنزیمی بر پایه ی آرایه های نانولوله های کربنی آراسته شده با نانوذرات اکسید مس ساختند. این حسگر عملکرد چشمگیری را برای تشخیص میزان گلوکز نشان داد. برای مثال، میزان حساسیت تشخیص $2596 \text{ mAM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ و زمان پاسخ آن در حدود 1 ثانیه و کمترین حد میزان تشخیص گلوکز برای آن $0.2 \mu\text{M}$ بود. به علاوه، انتقال مستقیم الکترون از گلوکز اکسیداز به کربن نیز به خوبی صورت گرفت. در سال 2011، کیم و همکاران [۱۲] با تزئین کردن آرایه های کربن نانوتیوب با ذرات نیکل به روش پراکنده سازی^۶، توانستند زیست حسگری بسازند که با توجه به پارامترهایی نظیر میزان حساسیت $950.6 \text{ mA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ و زمان پاسخ حدود 2 ثانیه و حد تشخیص گلوکز $0.05 \mu\text{M}$ و همچنین انتقال مستقیم الکترون بین مراکز فعال آنزیم و الکترودها، عملکرد خوبی را در تشخیص میزان قندخون داشته باشد. در سال 2012، لین و همکاران با نشان دادن ذرات مس و نیکل بر روی آرایه های کربن نانوتیوب و استفاده از این آرایه ها برای بهبود عملکرد زیست حسگر گلوکز توانستند زیست حسگری با پارامترهای بالای تشخیص گلوکز از جمله میزان حساسیت $2633 \text{ AmM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ و حد تشخیص $2.5 \mu\text{M}$ و زمان پاسخ 1 ثانیه بسازند.

۱-۵- خلاصه ی فصل ها

این پژوهش مشتمل بر 5 فصل است. دیگر فصول این پایان نامه بدین صورت ارائه شده اند:

در فصل دوم به طور کلی به معرفی آرایه های نانولوله های کربنی، روش های عامل دار کردن آن ها، معرفی

^۶ sputtering

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکتروده زیست حسگر گلوکز

پلاسما، معرفی آنزیم و زیست حسگر گلوکز، بررسی خواص پلی آنیلین و در نهایت، فرآیندهای الکترودی و روش های الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار می گیرد. در فصل سوم، روش های تجربی شامل سامانه ی

آزمایشگاهی، روش های تعیین مشخصات، مراحل آماده سازی و عامل دار کردن آرایه های نانولوله های کربنی، نحوه ی ساخت الکتروده زیست حسگرها و آزمایش های زیست حسگری ارائه شده است. فصل چهارم شامل تعیین مشخصه ها آرایه ها و بررسی عملکرد آن ها به عنوان زیست حسگر گلوکز می باشد. در پایان، نتایج حاصل از آزمایش ها و بررسی عملکرد آرایه های آماده شده به عنوان زیست حسگر گلوکز می باشد و در نهایت، نتیجه گیری ها و پیشنهادهای لازم در فصل پنجم آورده شده است.

فصل 2: مروری بر منابع علمی

2-1-مقدمه ای بر نانولوله های کربنی

نانوساختارهای کربنی به دلیل ساختار نانومتری و ماهیت کربنی شان در بسیاری از حوزه های کاربردی مورد استفاده قرار میگیرند. کربن ماده ای است کم وزن، پایدار و ساده جهت انجام فرایندها که قابلیت برقراری پیوند با بسیاری از اتم ها را دارد. گونه های مختلف نانوساختارهای کربنی شامل نانوله های کربنی، گرافن، نانوالیاف های کربنی و فولرن با داشتن ویژگیهای منحصر به فرد مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته اند. از این بین ها، آرایه های نانولوله های کربنی به دلیل خواص مطلوب که در ادامه به آنها پرداخته می شود، جایگاه ویژه ای داشته و در بسیاری زمینه های علمی از قبیل زیست حسگرها کاربرد گستردهای پیدا کرده اند.

یکی از مواردی که در سال های اخیر بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است، آرایه های منظم کربن نانوتیوب است. آرایه های کربن نانوتیوب به دلیل خواص ساختاری و رسانشی منحصر به فرد به همراه بی نظمی ها و نقص های ساختاری و همچنین گروه های کربوکسیل که در سطح خود دارند، ابزارهای بسیار مناسبی برای شناسایی و تشخیص مولکول های زیستی هستند. خواص ذکر شده این آرایه ها را نسبت به کربن نانوتیوب بی شکل⁷ تبدیل به ماتریس های ارزشمندی برای تثبیت مولکول های زیستی می کند و همچنین نتایجی که برای تشخیص مولکول ها با استفاده از این آرایه های منظم به دست می آید، سریع تر و موثق تر از نتایجی است که با استفاده از کربن نانوتیوب بی شکل به دست می آید. آرایه های منظم نانولوله های کربنی ساختاری مخروطی از لایه های گرافیتی است. بخش های با انتهای باز در این لایه ها شامل مقدار زیادی از گروه های اسیدی است و محل مناسبی برای واکنش های الکتروشیمیایی است. این نواقص آرایه ها را تبدیل به گزینه ی مناسبی برای الکترودهای زیست حسگر می کند. علاوه براین، هدایت بالای ساختار آرایه ها باعث تسریع انتقال بارهایی که از واکنش های اکسایش و کاهش ایجاد می شوند می شود.

⁷ bulk

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

در مقایسه با کربن نانوتیوب های بی شکل، آرایه ها مکان های فعال بیشتری را در سطح خود دارد و همین باعث حساسیت⁸ بیشتر آن می شود [13].

- خواص فیزیکی:

از مهم ترین ویژگی های آرایه های نانولوله های کربنی، خواص فیزیکی مطلوب آن هاست. جدول 1 چند مورد از خواص فیزیکی نانولوله های کربنی را با گرافیت مورد مقایسه قرار داده است [7].

- بالا بودن نسبت سطح به حجم:

این ویژگی نانولوله ها، سطح وسیعی را برای برهمکنش آن ها با دیگر مواد فراهم می کند.

جدول 1. مقایسه ی خواص فیزیکی نانولوله های کربنی با گرافیت

خاصیت	نانولوله ی تک دیواره	نانولوله ی چند دیواره	گرافیت
وزن مخصوص (g/cm^3)	0/8	کمتر از 1/8	2/26
مدول الاستیک (TPa)	1/4	0/1-3	1
هدایت حرارتی (W/m.K)	3000		3000 (در صفحه)
			6 (در جهت عمود)
پایداری حرارتی ($^{\circ}\text{C}$)	800-600 (در هوا)		650-450 (در هوا)

- قابلیت میانجی گری در انتقال الکترون

نانولوله های کربنی به دلیل رسانایی ذاتی که دارند می توانند انتقال الکترون بین گونه های الکترو فعال نظیر آب اکسیژنه و سطح الکترو د را تسهیل کنند [14].

- زیست سازگاری

⁸ selectivity

با توجه به این که کربن از مهم ترین عناصر زیستی محسوب می شود، نانولوله های کربنی نیز از قابلیت زیست سازگاری برخوردارند. اما وجود فلزهای کاتالیستی که در مرحله سنتز آن ها به کار می رود می تواند مشکل زا شود. در مرحله ی خالص سازی نانولوله ها قسمت عمده ی این فلزها از بین می روند [5].

- قابلیت عامل دار شدن

یکی از خواص نانولوله های کربنی که در برهم کنش آن ها با گروه های مولکولی اهمیت زیادی دارد، سطح نانولوله است. دیواره ی انتهایی در نانولوله ها به دلیل انحنای موجود در ساختارشان در مقایسه با صفحه های گرافیتی از واکنش پذیری بیشتری برخوردار است. هرچه قطر نانولوله ها بیشتر باشد، انحنای آن ها بیشتر است و به دنبال آن، واکنش پذیری افزایش می یابد. همچنین یکی از مواردی که قطر بر آن تاثیر دارد رسانایی نانولوله است و با افزایش قطر، رسانایی نانولوله بیشتر می شود [15]. علاوه بر موارد فوق، نقص های ساختاری نانولوله ها که بر روی دیواره ها موجودند واکنش پذیری آن ها را بیشتر می کنند. این نقص ها که در حین سنتز به وجود می آیند، حدود 1 تا 5 درصد اتم های کربن نانولوله ها را در بر می گیرند.

2-2- عامل دار کردن نانولوله های کربنی

با وجود خواص بسیار مطلوب نانولوله های کربنی، واکنش پذیری کم این مواد استفاده ی آن ها در بعضی کاربردهای خاص را محدود می کند. با عامل دار کردن نانولوله ها، می توان فرآیند پذیری آن ها را بهبود داده و همچنین امکان ارتقا خواص آن ها را فراهم نمود. افزودن هرگونه گروه مولکولی از قبیل گروه های اکسیژن دار، نیتروژن دار، ذرات فلزی و فلئور به سطح نانولوله را عامل دار کردن گویند. گروه عاملی در واقع آرایش مشخصی از اتم هاست که به مولکول آلی دارای آن، خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی می بخشد [7].

در فرایند عامل دار نمودن نانولوله ها، ابتدا محلهایی که فعالیت بیشتری دارند مورد واکنش قرار می گیرند. برای نمونه، انتهای نانولوله ها و محل نقص ها بر روی دیواره ی آن ها از فعال ترین نقاط نانولوله ها به شمار می آیند و گروه های عاملی بیشتر در این محل ها تشکیل می شوند. عامل دار کردن نانولوله های کربنی با در نظر گرفتن نوع پیوند به دو دسته ی کووالانسی و غیر کووالانسی تقسیم بندی می شوند [16].

اتصال غیر کووالانسی

در اتصال غیر کووالانسی گونه های متنوعی از پلیمرها، مواد فعال سطحی با برقراری پیوندهای فیزیکی به

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

نانولوله ها متصل می شوند. مزیت عمده عامل دار نمودن غیر کووالانسی نانولوله های تک دیواره در مقایسه با عامل دار نمودن کووالانسی دیواره ها و اتصال در محل نقص ها در این است که ساختار sp^2 نانولوله ها دست نخورده باقی می ماند و در نتیجه خواص الکترونیکی آنها حفظ می شود [17].

اتصال کووالانسی

بر مبنای مکان خاص مورد هدف برای اصلاح شیمیایی، اتصال گروه های عاملی به نانولوله ها از طریق پیوند کووالانسی به دو دسته ی واکنش مستقیم با دیواره جانبی و واکنش با انتها و نقص های ساختاری تقسیم بندی می شود.

برای انجام سازوکارهای واکنشی فوق الذکر (اعم از کووالانسی و غیر کووالانسی)، راهکارهای گوناگونی وجود دارد، بسته به فاز واکنش، این راه کارها به دو دسته ی کلی واکنش در محیط مایع و واکنش در محیط گاز دسته بندی می شوند.

2-2-1- واکنش در محیط مایع

واکنش در محیط مایع که به واکنش های شیمی تر معروفند، نانولوله ها و واکنش گرها در فاز مایع در معرض هم قرار می گیرند. گستره ی دمایی واکنش های شیمی تر وسیع بوده و از دمای اتاق تا دماهای بالا را در بر می گیرد. این واکنش ها اغلب زمان بر و چند مرحله ای هستند. پس از انجام واکنش ها، نمونه ی حاصل توسط سانتریفیوژ و یا کیف بوخنر و کاغذ صافی تفلونی از محلول جدا شده و با آب دیونیزه چندین مرتبه شستشو داده می شوند تا یون های اضافی حذف شوند. با تغییر دما و زمان فرایند و همچنین غلظت حلال، می توان کمیت عامل دار شدن را تا حدی کنترل نمود [18].

در روش شیمی تر، به علت انجام واکنش در فاز مایع در مقایسه با فاز گاز، شرایط واکنش نامالایم است و نانولوله ها آسیب زیادی می بینند. برای نمونه، در واکنش نانولوله ها با اکسندهای قوی، نانولوله ها بریده و کوتاه شده و نقص زیادی روی آنها ایجاد می شود. راهکارهای مبتنی بر عامل دار نمودن دیواره های نانولوله ها در مقایسه با واکنش انتهای آنها، چند مرحله ای و پیچیده تر بوده و آسیب کمتری به نانولوله ها وارد می کنند. طبق گزارش کیم و همکاران [19] نانولوله های عامل دار شده توسط پلاسمای اکسیژن در مقایسه با نانولوله های عامل دار شده با اسید، عمل کرد الکتروشیمیایی بهتری نشان داده اند.

2-2-2- واکنش در محیط گاز

در واکنش های در محیط گاز که یه واکنش های شیمی خشک نیز شهرت دارند، عامل دار شدن در فاز گاز انجام می گیرد و گازهای واکنش گر، معمولا همراه یک گاز حامل یا رقیق کننده استفاده می شوند. گاز حامل یک گاز بی اثر نظیر نیتروژن، هلیوم و آرگون می باشد و نقش آن ها بهبود انتقال بار و انرژی در محیط پلاسما می باشد. گاز واکنش دهنده بسته به نوع گروه عاملی مورد نظر انتخاب می شوند در این روش، انرژی لازم برای انجام واکنش از طریق حرارت دهی مستقیم و یا از طریق پلاسما تامین می شود [7]. جدول 2 تعدادی از گازهای استفاده شده در منابع علمی را نشان می دهد.

جدول 2. گازهای مورد استفاده برای عامل دار کردن

ترکیب گاز	نوع گروه عاملی
هوا؛ اکسیژن/هلیوم؛ بخار آب/ آرگون	کربوکسیل، انیدرید، لاکتون، لاکتول
دی اکسید کربن/هلیوم	انیدرید، لاکتون، لاکتول، کوئینون
آمونیاک	آمین
هیدروژن/آرگون (به همراه سولفور عنصری)	تیول
N ₂ : NO/Ar:NO/N ₂	پیروکسید، پیریدینیک، کوارتتری

با استفاده از پلاسما می توان انواع گروه های عاملی اکسیژن دار، نیتروژن دار، تیولی و کلره را ایجاد نمود

2-2-2-1 معرفی پلاسما

یک روش ملایم و موثر برای عامل دار نمودن نانولوله های کربنی استفاده از محیط های گازی یونیزه و بهره گیری از پلاسما است. پلاسما به دلیل داشتن گونه های فعال⁹ می تواند محیط واکنش مناسبی برای اتصال مولکول ها ایجاد کند. با انتخاب یک گاز مناسب و اعمال اختلاف ولتاژ بالا بر روی آن، می توان پلاسما تولید نمود. اگرچه دمای موضعی پلاسما بالا و در حدود 10000K می باشد، توده ی پلاسما در دمای اتاق قرار دارد. بنابراین راه کار پلاسما در مقایسه با روش حرارت دهی مستقیم که به دماهای بالا ($200^{\circ}\text{C} <$) نیاز

⁹ Active species

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

دارد و در مقایسه با شیمی تر که در فاز مایع انجام می گیرد، زمینه تخریب کمتر نانولوله ها را فراهم می کند. از دیگر ویژگی های مثبت روش پلاسما که قادر به ایجاد پیوند کووالانسی است، می توان به امکان کنترل پارامتری بهتر شرایط واکنش، آلودگی و سمیت کمتر آن اشاره نمود. اصلاح پلاسمایی در مقایسه با راهکارهای شیمی تر که چند مرحله ای و زمان بر هستند، کوتاه و معمولاً تک مرحله ای است. مشکل اصلاح پلاسمایی در مقایسه با شیمی تر بازده کمتر آن است [20, 21]

مقدمه ای بر پلاسما

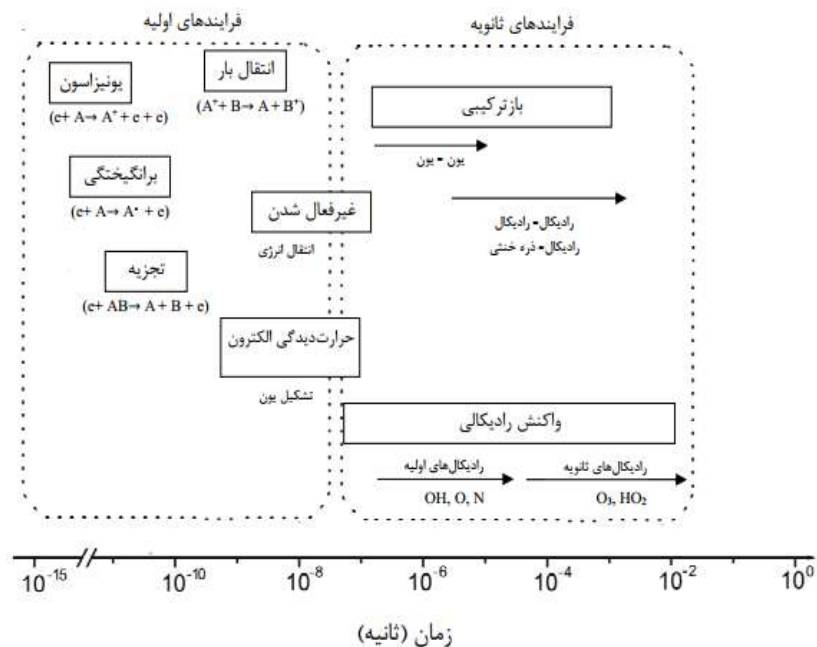
پلاسما یک محیط گازی شبه خنثی¹⁰ است که در برگرفته گونه های فعال زیادی است. از مهم ترین این گونه ها می توان به موارد زیر اشاره نمود.

- الکترون ها با انرژی در محدوده ی 1-25 الکترون ولت
- یون ها با انرژی در محدوده ی 0-026/05 الکترون ولت
- رادیکال ها و پاره مولکول ها¹¹ مانند OH , $\text{HO}_2^\cdot$
- اتم ها و مولکول های برانگیخته مانند $\text{O}^\cdot$ و N_2^*
- فوتون ها با سقف انرژی 10 الکترون-ولت

شکل (1-2) واکنش هایی که منجر به تولید گونه های فعال فوق الذکر می شود را نشان می دهد. از بین گونه های فوق، الکترون ها نقش مهمی را در تولید پلاسما ایفا می کنند. الکترون ها با داشتن انرژی کافی پیوندهای شیمیایی را شکسته و دیگر گونه های فعال را تولید یا اینکه آن ها را برای واکنش های بعدی مهیا می کنند. افت انرژی حاصل از این برخوردها دوباره از طریق میدان الکتریکی جبران می شود. مولکول های برانگیخته شده با توجه به انرژی بالایی که پیدا کرده اند، یا تجزیه شده و یا شروع کننده یک سری واکنش دیگر خواهند بود [21].

¹⁰ Quasineutral

¹¹ Molecular fragments



شکل (1-2) انواع واکنش های تولید گونه های فعال در محیط پلاسما

به جهت اهمیت الکترون ها، انواع پلاسما با در نظر گرفتن چگالی الکترون و انرژی آن دسته بندی می شوند. انرژی متوسط الکترون ها توسط دمای آن ها تعیین می شود. در بسیاری موارد، خصوصا در مواقعی که پلاسما به مقدار خیلی کم یونیزه شده باشد، واحد معمول انرژی، الکترون ولت (eV) است که برابر با 1.6×10^{-19} و تقریبا معادل با دمایی حدود 11600 K می باشد. شایان ذکر است که این دمای بالا لزوما به معنای گره های زیاد نیست. از آنجایی که چگالی الکترون ها پایین (از مرتبه 10^{12} cm^{-3}) است، بنابراین مقدار انرژی حرارتی کل آن ها کم است. همانند مقداری خاکستر سیگار که گرمای زیادی ندارد ولی قادر به سوزاندن است.

بعد از الکترون ها، یون ها از اهمیت بالایی برخوردار هستند. یون ها در زمینه های کاربردی پلاسما نقش مهمی را ایفا می کنند. یون های پر انرژی (50-1000 الکترون ولت) که توسط پلاسما تولید و شتاب دار می شوند، در زمینه هایی مانند لایه نشانی کاربرد دارند. چگالی یون ها به درجه ی یونیزه شدن پلاسما وابسته است. درجه ی یونیزه شدن به کسری از گونه های خنثی (شامل اتم ها و مولکول ها) که یونیزه می شوند اطلاق می شود و به صورت چگالی یون ها (n_i) بر چگالی گونه های خنثی (n_n) تعریف می شود و توسط معادله ی

$$\frac{n_i}{n_n} \cong 2.4 \times 10^{21} \frac{T^{3/2}}{n_i} \exp\left(\frac{U_i}{KT}\right) \quad (1-2)$$

که U_i انرژی یونیزه شدن است. تعداد مولکول های هوا (n_n) در دمای اتاق و فشار اتمسفریک در حدود $3 \times 10^{25} \text{ m}^{-3}$ است. در همین دما درجه ی یونیزه شدن هوا 10^{-122} است. به طور کلی متغیرهای تعیین کننده ی مشخصه های پلاسما عبارتند از: نوع اتم و مولکول گاز، درجه ی یونیزه شدن، چگالی و انرژی الکترون ها. برای تولید پلاسما، چگالی و انرژی الکترون ها باید در محدوده های زیر قرار گیرند:

1. تعداد الکترون ها یا یون های مثبت (n) در محدوده ی $10^6 - 10^{34} \text{ m}^{-3}$ باشد.

2. مقدار انرژی الکترون ها در محدوده ی $0/1 - 10^6$ الکترون ولت باشد.

با این حال چگالی و انرژی الکترون ها در پلاسماهای پرکاربرد به ترتیب در محدوده ی $10^9 - 10^{12} \text{ cm}^{-3}$ و $10 - 1$ الکترون ولت قرار می گیرد. درجه ی یونیزه شدن در این پلاسماها از 10^{-6} تا $0/3$ تغییر می کند. برای تشکیل پلاسما و پایدار ماندن آن، به منبع انرژی نیاز است. در حالت پایدار، شدت یونیزه شدن باید میزان از دست رفتن یون ها و الکترون ها که در اثر بازترکیبی و نفوذ و یا همرفت به مرز سیستم رخ می دهد را جبران کند. در حین تبدیل گاز به پلاسما، تغییر فاز مرز مشخصی ندارد و به صورت پیوسته انجام می گیرد. پلاسما ی مورد بحث در این پژوهش، توسط منبع انرژی میدان الکتریکی تولید می شود. این میدان الکتریکی توسط جریان مستقیم و متناوب برق به وجود می آید. ذکر این نکته حائز اهمیت است که بین واژه های پلاسما و تخلیه تفاوت اندکی وجود دارد. در واقع در برخی نواحی تخلیه (مانند لایه های کاتدی^{۱۳}) تعریف پلاسما مصداق پیدا نمی کند. ولی از آنجائیکه این تفاوت قابل اغماض است و پلاسما قسمتی از تخلیه محسوب می شود، این دو واژه می توانند به جای هم استفاده شوند [21].

حفاظت دبای^{۱۴}

همان طور که قبلا ذکر شد یکی از ویژگی های پلاسما شبه خنثی بودن آن است که در نتیجه ی آن مجموع

¹² Saha

¹³ Cathodic sheets

¹⁴ Debye shielding

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

چگالی الکترون ها و یون های منفی با چگالی بارهای مثبت برابر است. به عبارت دیگر در پلاسما ناحیه ای که تجمع بار مثبت و یا منفی داشته باشد وجود ندارد، اگر یک میدان الکتریکی به پلاسما اعمال شود (شکل 2-2)، الکترون ها که در مقایسه با یون ها سبک ترند، با حرکت خود تاثیر میدان را کاهش می دهند. در واقع بارهای منفی و مثبت پلاسما با تجمع و تشکیل ابر اطراف بارهای غیرهمنام، عدم توازن بار را از بین می برند. به این خاصیت پلاسما حفاظت دبای گویند.

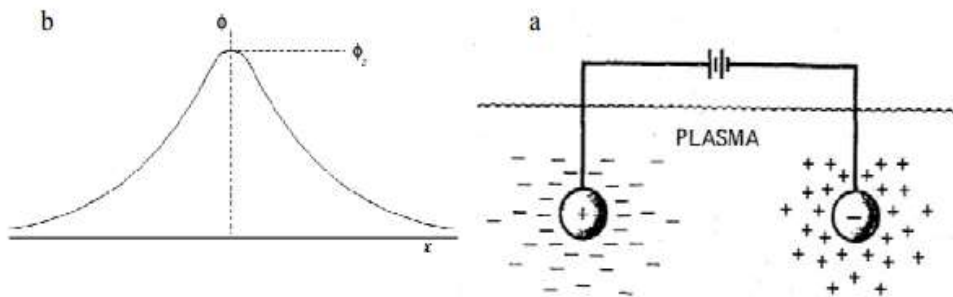
لبه ی ابرها در شعاعی تعریف می شود که انرژی پتانسیل گونه ها، kT است. T دما و k ثابت بولتزمن است. توزیع پتانسیل اطراف بار نقطه ای خارجی (ϕ) در شکل (2-2) نشان داده شده و با معادله ی زیر تعریف می شود.

$$\phi = \phi_0 \exp(-|x|/\lambda_D) \quad (2-2)$$

ϕ_0 ضریب ثابت و λ_D طول دبای است. مقدار طول دبای بر حسب متر از رابطه ی زیر به دست می آید.

$$\lambda_D = 69 \sqrt{T/n} \quad (3-2)$$

T و n دما و دانسیته ی الکترون ها هستند. برای آنکه یک گاز یونیزه شده پلاسما محسوب شود، لازم است ابعاد سیستم (مثلا فاصله ی دو الکتروده) بسیار بزرگتر از طول دبای باشد [22].



شکل (2-2) شماتیک (a) حفاظت دبای و (b) توزیع پتانسیل اطراف بار نقطه ای درون پلاسما [22]

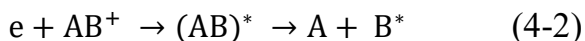
در فرایند بازترکیبی¹⁵، یون های مثبت پلاسما با واکنش با الکترون های آزاد به اتم های خنثی تبدیل می شوند. فرایند بازترکیبی الکترون-یون بستگی به دانسیته ی الکترون ها دارد و با مصرف الکترون ها مانع از انجام

¹⁵ Recombination

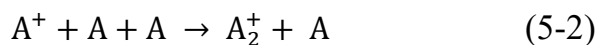
بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

واکنش های مطلوب می شود. این فرایند بسیار گرماده است و بنابراین باید کانال های مخصوصی برای انباشت انرژی آزاد شده در حین خنثی شدن یون های مثبت و الکترون ها وجود داشته باشند. سه سازوکار مختلف برای فرایندهای بازترکیبی و مصرف انرژی حاصل از آنها ارائه شده است [23].

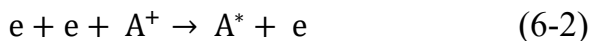
1. بازترکیبی الکترون- یون تجزیه ای¹⁶: این فرایند سریع ترین سازوکار خنثی شدن الکترون در حضور مولکول های گازی و یا مولکول های یونی است:



انرژی حاصل از این فرایند بازترکیبی برای تجزیه مولکول های یونی واسطه ای مصرف می شود. این سازوکار برای گازهای اتمی نیز کاربرد دارد:

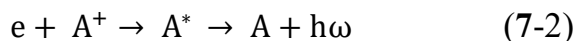


2. بازترکیبی الکترون-یون سه جسمی¹⁷: این نوع خنثی سازی الکترون-یون برای گازهای تک اتمی و در عدم حضور مولکول های یونی به کار می رود:



انرژی حاصل از این سازوکار توسط الکترون آزاد که در فرایند بازترکیبی فوق به عنوان جسم سوم شرکت می کند، جذب می شود. قابل ذکر است که گونه های سنگین (یون ها و گونه های خنثی) به علت کند بودن در جذب انرژی بازترکیبی، نمی توانند به عنوان جسم سوم ایفای نقش کنند.

3. بازترکیبی الکترون-یون تابشی¹⁸ انرژی حاصل از این بازترکیبی به تشعشع ($h\omega$) تبدیل می شود



2-2-2-2- انواع تخلیه ی الکتریکی

برای اعمال اختلاف ولتاژ و ایجاد تخلیه الکتریکی روش های متعددی وجود دارد که مهم ترین آنها به شرح

¹⁶ Dissociative electron-ion recombination

¹⁷ Three-body electron-ion recombination

¹⁸ Radiative electron-ion recombination

زیر است [24]:

- 1- تخلیه ی الکتریکی هاله^{۱۹}
- 2- تخلیه ی الکتریکی موج کوتاه^{۲۰}
- 3- تخلیه ی الکتریکی فرکانس رادیویی^{۲۱}
- 4- تخلیه ی الکتریکی با مانع دی الکتریک^{۲۲}

از این میان روش آخر به دلیل قابلیت کارکرد در فشار اتمسفری و دمای محیط و همچنین به دلیل حجم بالای برانگیختگی و پیوستگی جریان تولیدی، در مبحث عامل دار کردن کاربرد بیشتری پیدا کرده است

- تخلیه با مانع دی الکتریک (DBD)

این نوع تخلیه که به آن تخلیه ی آرام نیز گفته می شود به دلیل فشار اتمسفری و دمای پایین آن در مقایسه با انواع دیگر پلاسما از ایمنی بیشتری برخوردار بوده و کار کردن با آن آسان تر است. یکی از شاخصه های مهم پلاسمای DBD وجود یک عایق دی الکتریک بین الکترودها است. دی الکتریک در واقع چگالی متوسط جریان را در فضای گاز محدود می کند. جنس دی الکتریک معمولاً شیشه، سیلیکا و یا مواد سرامیکی است. در این نوع تخلیه، جریان برق متناوب استفاده می شود. در تخلیه ی با مانع، با انتخاب بهینه ی توان الکتریکی و زمان عملیاتی می توان چگالی یون ها و الکترون ها را تنظیم و در نتیجه ی آن، درجه ی عامل دار نمودن را کنترل نمود. متغیرهای قابل کنترل در پلاسمای DBD عبارتند از: توان (که خود وابسته به ولتاژ، فرکانس و اختلاف فاز بین این دو است)، ضخامت دی الکتریک، فاصله ی بین دو الکتروده، زمان عملیات و نوع گاز مورد استفاده [24].

2-2-3- روش گاز یا بخار دما بالا

در این روش مانند روش اصلاح پلاسمایی واکنش گرهای گازی مورد استفاده قرار می گیرند و به جای اعمال اختلاف ولتاژ از حرارت دهی مستقیم در دمایی پایین تر از دمای سوختن نانولوله استفاده می شود. این روش با توجه به نیاز به دماهای بالا، در مقایسه با روش پلاسما و شیمی تر کاربرد کمتری دارد. عواملی مثل

¹⁹ Corona discharge

²⁰ Microwave discharge

²¹ Radio frequency discharge

²² Dielectric barrier discharge (DBD)

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

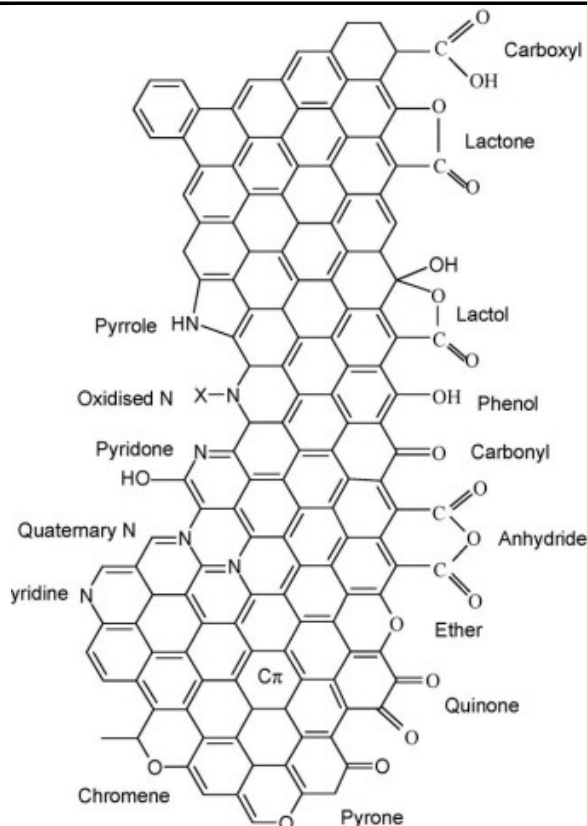
زمان، دما، جریان و غلظت گاز واکنش دهنده، بر کیفیت عامل دار کردن موثر می باشند. شایان ذکر است این فرایند برای خالص سازی نانولوله ها نیز به کار می رود. دمای سوختن کربن آمورف که یک ناخالصی محسوب می شود، از دمای سوختن نانولوله های کربنی کمتر است و با تنظیم دما می توان آن را تا حد زیادی حذف کرد [18]

2-3- گروه های عاملی

2-3-1- گروه های اکسیژن دار

از مهم ترین گروه های اکسیژن دار که در شکل (2-3) نشان داده شده اند، می توان به گروه های کربوکسیل، انیدرید، لاکتون، لاکتول و فنول اشاره کرد. این گروه ها خاصیت اسیدی داشته و آب دوست هستند و اتصال آن ها معمولا از طریق انتهای نانولوله و در محل نقص ها انجام می شود. این اکسیدهای سطحی با ایجاد بار منفی بر روی سطح نانولوله ها، علاوه بر تولید نیروی دافعه بین آن ها، امکان تبادل کاتیونی نیز فراهم می کنند. به بیان دیگر حضور این گروه ها منجر به کاهش برهمکنش های واندروالسی بین نانولوله ها گشته که این امر جداسازی دسته ها به لوله های منفرد را تسهیل می نماید [6]. اتصال گروه های اکسیژن دار به سطح نانولوله ها، هم از طریق شیمی تر که شامل واکنش با حلال های اکسیدکننده است و هم توسط پلاسما در محیط هوا، گاز اکسیژن و یا دی اکسید کربن انجام می شود.

از بین گروه های اکسیژن دار، عامل کربوکسیل اهمیت ویژه ای دارد. در این گروه عاملی که به صورت R-COOH نمایش داده می شود دو اتم اکسیژن، در مجاور هم یک حالت قطبی ایجاد نموده که باعث می شود یون H^+ آزاد شود و گروه حاصله دارای بار منفی شود. این گروه مولکولی به یکی از دو صورت یونی یا قطبی که هر دو آب دوست هستند، وجود دارد.



شکل (2-3) : گروه های عاملی اکسیژنه ی اسیدی و بازی پیشنهاد شده برای سطح مواد کربنی

با توجه به خواص آب دوستی گروه های اکسیژن دار، مهم ترین کاربرد این گروه ها افزایش خاصیت آب دوستی نانولوله ها و تهیه محلول های همگن و پایدار آن ها درون حلال های آبی می باشد [21]. حضور گروه های اکسیژن دار علاوه بر افزایش جذب آنزیم، موجب بهبود برهمکنش آن ها با نانولوله ها نیز می شود [25]. یک کاربرد مهم دیگر گروه کربوکسیل، ایفای نقش آن به عنوان پیش ران شیمیایی است. برای اتصال هرگونه گروه عاملی از طریق سرها و در محل نقص ها، وجود گروه های کربوکسیل ضروری است. پیوندهای آمیدی و استری از مهم ترین این اتصال ها می باشند.

در فرایند اتصال گروه های اکسیژن دار که نوعی واکنش اکسید کننده محسوب می شود از اسیدهای قوی مانند اسید نیتریک و سولفوریک و یا اکسندهایی نظیر پرمنگنات پتاسیم، آب اکسیژنه و یا ترکیب آن ها استفاده می شود. شکل (2-3) محصول این واکنش ها نانولوله های کربوکسیله (اکسید شده) است که می توانند در واکنش های دیگر شرکت کنند. نانولوله های کربوکسیله طی واکنش با تیونیل کلراید منجر به تشکیل اتصال آسید کلراید می شود و در ادامه به علت فعالیت بالای کلر در دو واکنش استری شدن (واکنش با زنجیره های

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

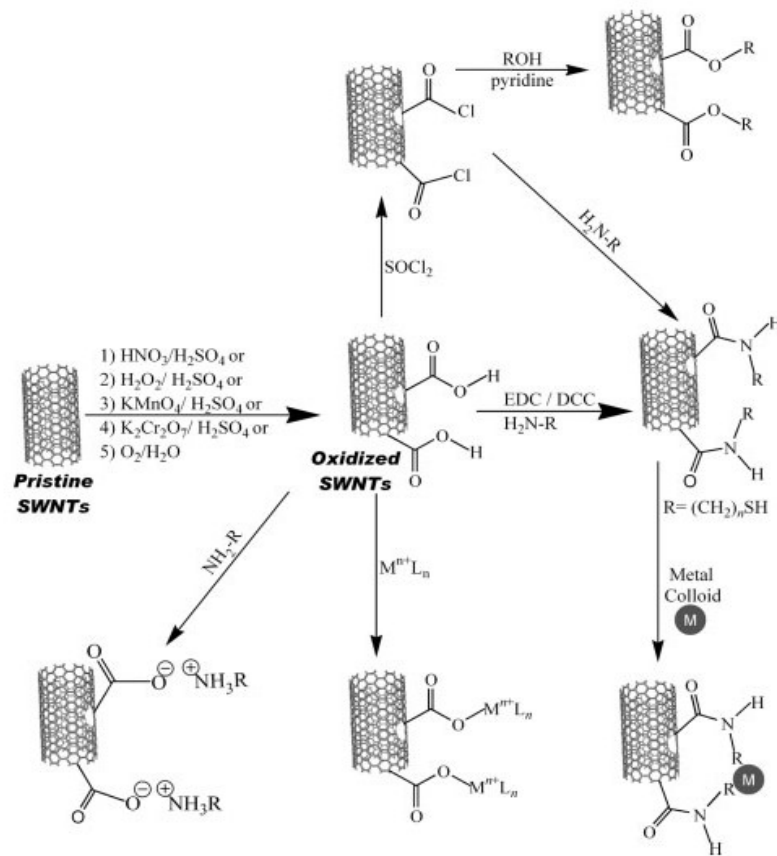
هیدروکسیل دار) و آمیدی (واکنش با زنجیره های آمین دار) شرکت می کنند. البته زنجیره های آمین دار می توانند مستقیماً با لینک هیدروکسیلی نانولوله واکنش دهند که در این صورت به مواد کمکی از قبیل EDC²³ و DCC²⁴ نیاز است [14]. شایان ذکر است این ترکیب های اکسید کننده به منظور خالص سازی و حذف کاتالیز نیز استفاده می شوند. غلظت گروه های عاملی بستگی به غلظت و نوع اکسنده، دما و زمان حرارت دهی دارد. برای نمونه جدول 3 تاثیر اکسنده های مختلف بر غلظت اکسیژن دار ایجاد شده را نشان می دهد.

جدول 3. تاثیر اکسنده های مختلف بر غلظت اکسیژن

اکسنده	کربوکسیل (mmol/g)	لاکتون (mmol/g)	فنول (mmol/g)
آب اکسیژنه	0/56	1/10	0/86
پرمنگنات پتاسیم	0/43	1/34	1/59
اسید نیتریک	0/76	1/83	1/45

²³ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

²⁴ N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide



شکل (2-4) ،نمایی از مسیرهای رایج عامل دار کردن نانولوله ها در محل انتها و نقص های ساختاری

2-3-2- گروه های آمین دار

آمین ها به طور کلی ترکیب هایی هستند که حاوی اتم های کربن، نیتروژن و هیدروژن می باشند و گروه عاملی تعیین کننده ی آنها NH_2 - است. گروه های آمینه دارای خاصیت ضعیف بازی هستند و قادر به پذیرش یک پروتون می باشند. گروه آمینه ی حاصل دارای یک بار مثبت است. اتصال آمین ها به نانولوله ها به صورت معمول از طریق واکنش جایگزینی با گروه های هیدروکسیلی یا کلره که در سرها و یا در محل نقص ها واقع هستند، انجام می شود. از مهم ترین انواع این واکنش گر ها می توان به اکتا دسیل آمین^{۲۵} و اتیلن دی آمین^{۲۶} اشاره نمود. آمین ها همچنین می توانند به صورت فیزیکی جذب دیواره نانولوله ها شوند .

گروه های آمینه همانند گروه های اکسیژن دار آب دوست هستند و حضور آنها به صورت آزاد بر روی نانولوله می تواند پراکنش آنها را درون محلول های آبی بهبود بخشد. اما به دلیل آن که عامل دار کردن

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

نانولوله ها با گروه های آمین دار نیاز به مراحل مقدماتی دارد، در مقایسه با گروه های اکسیژن دار، کاربرد کمتری برای این منظور دارند. گروه های آمین دار همچنین می توانند حلالیت نانولوله ها را درون حلال های آلی بهبود بخشند. به این منظور، زنجیره های بلند کربنی آمین دار (نظیر $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$) می توانند طی یک واکنش استری شدن، از سر آمینی خود به نانولوله های کربوکسیله متصل شوند و منجر به بهبود حلالیت در حلال های نظیر تترا هیدرو فوران و کلروفرم شوند [7, 14].

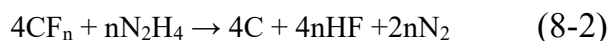
2-3-3- گروه های کلردار

گروه آسیل کلراید ($-\text{COCl}$) الکترون دوست و بسیار فعال است و مهم ترین ویژگی این گروه خاصیت جانشینی آن می باشد. دو کاربرد مهم این گروه در واکنش نانولوله های کلره با زنجیر زنجیرهای آمین دار (RNH_2) و فنول دار (ROH) است. اگرچه گروه های کربوکسیله نیز قابلیت واکنش با گروه های آمینه را دارند، ولی تبدیل گروه کربوکسیله به آسیل کلراید می تواند سرعت واکنش با آمین را افزایش دهد. برای اتصال گروه های کلره به روش شیمی تر از محلول تیونیل کلراید (SOCl_2) استفاده می شود. در این روش نانولوله ابتدا توسط اکسندها، هیدروکسیل دار می شود و سپس از محول SOCl_2 به مدت 24 ساعت در دمای 70°C استفاده می شود. در نتیجه اتصال گروه های آسیل کلراید، حلالیت نانولوله ها در حلال هایی نظیر کلروفرم، دی کلرومتان، حلال های آلی (شامل بنزن، تولوئن و کلروبنزن) و دی سولفید کربن افزایش می یابد [26].

2-3-4- گروه های فلوئوردار

گروه های فلوئوردار همانند کلردار بسیار فعالند و در واکنش های جانشینی شرکت می کنند. مهم ترین کاربرد این گروه ها آماده سازی نانولوله ها برای عامل دار کردن شیمیایی از طریق واکنش مستقیم با دیواره ها است. فلوئوردار نمودن به صورت معمول در محیط های گازی انجام می شود. استفاده از گازهایی نظیر F_2 ، CF_4 ، SF_6 به عنوان محیط پلاسما و گاز واکنش گر می تولد نانولوله را فلوئوردار کند. هلیم نیز معمولاً به همراه گاز واکنش گر استفاده می شود. فلوئوردار نمودن به صورت معمول در دماهای حدود 150°C – 600°C و زمان حدود 5 ساعت انجام می گیرد. فلوئوردار نمودن در دمای محیط به زمان های طولانی تر (چند روز) نیاز دارد. برای اتصال گروه های فلوئوره به روش شیمی تر می توان از محلولی نظیر BrF_3 استفاده کرد. گروه های فلوئوره به دلیل واکنش پذیری بالا، می توانند مجدداً از نانولوله ها جدا شوند. برای جدا کردن

گروه های فلئوره از هیدرازین استفاده می شود:



به این منظور نانولوله های عامل دار شده به مدت یک ساعت درون محلول غیر آبی هیدرازین قرار می گیرند. یک ویژگی دیگر نانولوله های فلئوره، قابلیت آن ها برای تشکیل مشتق های انحلال پذیر است. به عنوان مثال 2-پروپانول و 2-بوتانول نانولوله های فلئوردار را تا غلظت 1 گرم بر لیتر درون خود حل می کنند. سازوکار این انحلال برقراری پیوند هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل الکل و سایت فلئوری نانولوله ها می باشد. علاوه بر گروه های عاملی فوق الذکر، و با تعمیم دسته بندی گروه های عاملی، گروه های مولکولی زیستی و فلزها را نیز می توان به عنوان گروه های عاملی که در ترکیب با نانولوله ها استفاده می شوند در نظر گرفت.

2-4- پلی آنیلین

پلی آنیلین، پلیمری سنتزی و از خانواده ی پلیمرهای رسانا می باشد که به دلیل خواصی چون وزن سبک، هدایت الکتریکی بالا، انعطاف پذیری سطح بالا، زیست سازگاری، فرایند پذیری بالا و خواص قابل کنترل در زمینه های بسیاری از جمله پیل سوختی، حسگرهای گاز، جلوگیری از خوردگی و ایرخازن ها کاربرد فراوان دارد.

پلی آنیلین پلیمری نیمه رسانا با ساختار π^{27} است که در آن عمدتاً حفره های حامل بار هستند. پیوندهای π جا به جا شده مسئول خواص نیمه رسانایی پلیمر هستند. رسانایی الکتریکی این پلیمر به طور عمده به مواردی از جمله وزن مولکولی، درصد بلورینگی²⁸، جابجایی بین زنجیری²⁹، میزان اکسید شدن و نحوه ی قرار گرفتن مولکول ها³⁰ بستگی دارد. علاوه بر این، پلی آنیلین تنها پلیمر رسانای شناخته شده است که در هوا پایدار است. همزمان با پیشرفت گسترده ی تکنولوژی نانو، پلی آنیلین نانو ساختار ساخته شد. پلی

²⁷ π -type

²⁸ Crystallinity

²⁹ Inter-chain deparation

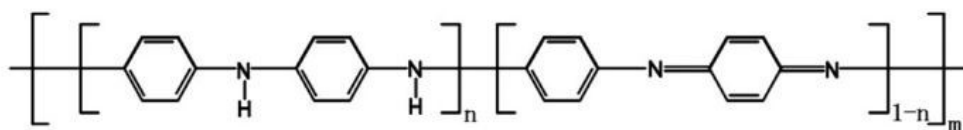
³⁰ Molecular arrangement

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

آنیلین با اندازه ی در مقیاس نانو مساحت سطح و تخلخل بیشتر و خواص الکتروشیمیایی عالی را نشان می دهد که همین موارد زمینه ی استفاده ی گسترده ی این پلیمر را در حسگرهای شیمیایی و برای نشان دادن آنزیم بر روی سطح الکترو د و توزیع یکنواخت مولکول ها فراهم می کند.

در اصلاح حسگر گلوکز، پلی آنیلین به دلیل خواص زیر کاربرد گسترده ای دارد:

1. هزینه ی پایین و تولید آسان از مونومر آنیلین در محلول آبی
 2. ساده بودن اضافه کردن ماده ی افزودنی و جدا کردن ماده ی افزودنی که باعث تغییرات اساسی در ساختار الکتریکی، خواص مغناطیسی، خواص نوری، رسانایی الکتریکی و خواص ساختاری آن می شود.
 3. مساحت سطح بالا، اکسایش و کاهش آسان و خواصی نظیر قابل نشانده شدن³¹ راحت بر روی الکترودها.
 4. زیست سازگاری، پایداری بالا در محیط و قابلیت کنترل خواص فیلم پلی آنیلین با تغییر شرایط پلیمریزاسیون.
 5. پلی آنیلین نه تنها می تواند به عنوان پایه ای برای تثبیت مولکول های زیستی به کار رود، بلکه می تواند به عنوان میانجی الکترون در اکسایش و کاهش آنزیم ها و یا در واکنش های آنزیمی به کار رود که این به دلیل خواص رسانایی و فعال بودن الکتریکی بالای آن است.
- شکل (2-5) ساختار کلی پلی آنیلین را نشان می دهد.



شکل (2-5). ساختار کلی پلی آنیلین

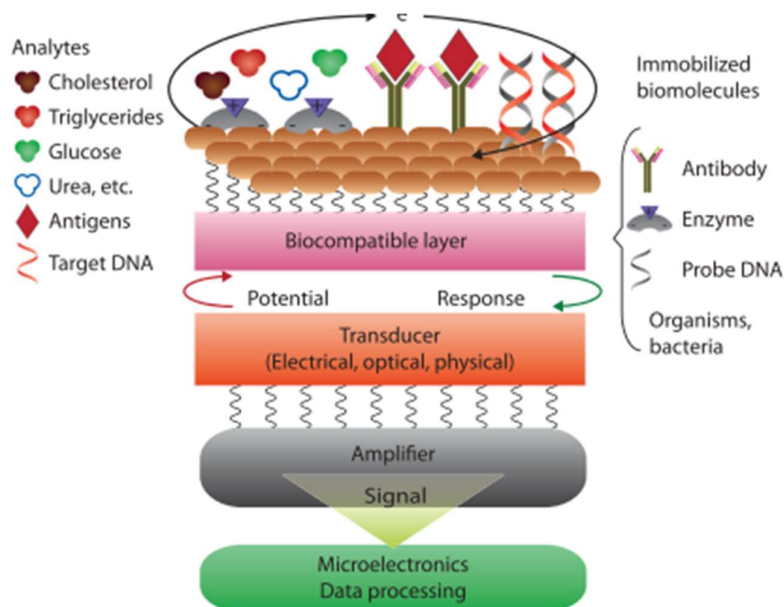
2-5-تعریف زیست حسگر و اجزای آن

زیست حسگر دستگاهی است که در آن یک جزء تشخیص دهنده ی زیستی به یک مبدل متصل شده و یا با آن ترکیب شده است و یک سیگنال زیستی را به سیگنال الکتریکی قابل اندازه گیری تبدیل می کند. امروزه

³¹ depositing

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکتروده زیست حسگر گلوکز

بیش از 60 زیست حسگر تجاری برای حدود 120 آنالیت مختلف در دسترس است [27]. اجزای اصلی در زیست حسگرها ماده‌ی فعال زیستی، مبدل و پردازنده هستند. جزء حساس زیستی یا بیوکاتالیست به طور کلی یک سیستم یا ترکیب زیستی تثبیت شده است که می‌تواند به طور اختصاصی مولکول هدف را از بین عناصر دیگر تشخیص دهد. ترکیبات زیستی که در طراحی زیست حسگرها استفاده می‌شوند شامل آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، لندامک‌ها، باکتری‌ها، سلول کامل، تکه‌های بافت و ... هستند. پردازنده، علاوه بر پردازش سیگنال‌ها، مسئولیت نمایش نتیجه‌ی فعالیت حسگر را نیز بر عهده دارد. مبدل‌ها تغییرات قابل مشاهده‌ی فیزیکی یا شیمیایی را به پیام‌های قابل اندازه‌گیری، که بزرگی آن‌ها متناسب با غلظت مواد مورد سنجش است، تبدیل می‌نمایند. اجزای مختلف یک زیست حسگر در شکل (6-2) آورده شده است.



شکل (6-2). ساختار شماتیک و قواعد عملیاتی یک زیست حسگر [28]

متداول‌ترین مبدل‌ها در زیست حسگرها، مبدل‌های الکتروشیمیایی، نوری، جرم‌سنجی و حرارتی هستند که به ترتیب تغییرات الکترون، فوتون، جرم و دمای ناشی از انجام واکنش‌ها را اندازه‌گیری می‌کنند. از این میان زیست حسگرهای مبتنی بر مبدل‌های الکتروشیمیایی به علت حساسیت بالا، زمان پاسخ کوتاه و هزینه‌ی پایین مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند [21]. مبدل‌های الکتروشیمیایی را می‌توان به سه دسته‌ی پتانسیومتری، ولتامتری (آمپرومتری) و ایمپدیمتری تقسیم نمود. در روش پتانسیومتری، پتانسیل الکتروده زمانی که جریان آن صفر است، اندازه‌گیری می‌شود. روش آمپرومتری بر پایه‌ی اندازه‌گیری جریان تحت

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

اعمال پتانسیل ثابت صورت می گیرد، اما در روش ولتامتری با اعمال پتانسیل چرخه ای در بازه ای مشخص، جریان حاصل اندازه گیری می شود. در روش ایمپدیمتری نیز تغییرات ایمپدانس الکترو لیت مورد بررسی قرار می گیرد. ماده ی فعال زیستی که مهم ترین قسمت حسگر است، می تواند یک آنزیم، سلول، بافت، اسید نوکلئیک و یا پادتن باشد [21 و 28].

2-5-1- عوامل موثر بر کارایی زیست حسگرها

1. انتخاب پذیری- بر اساس این ویژگی زیست حسگر می تواند گونه ی معینی را بدون دخالت گونه های دیگر اندازه بگیرد.
2. زمان پاسخ دهی- زمان پاسخ دهی از حدود 30 ثانیه تا چند دقیقه بسته به نوع و ساختار زیست حسگر فرق می کند. زمان بازیابی، مدت زمان لازم برای آماده شدن زیست حسگر پس از هر اندازه گیری، برای بکارگیری در اندازه گیری دیگر است که معمولاً نباید از حدود چند دقیقه تجاوز کند.
3. طول عمر کاری- طول عمر کاری یک زیست حسگر را میزان پایداری ماده زیستی به کار رفته در ساختمان آن تعیین می کند. این زمان می تواند از چند روز تا چند ماه تغییر کند
4. گستره ی حساسیت- گستره ی حساسیت مورد انتظار برای زیست حسگرها در حد کمتر از میلی مولار است. در موارد خاص، حساسیت زیست حسگرها تا حد فمتومولار کاهش می یابد.
5. دقت- دقت یا تکرار پذیری جواب های به دست آمده از زیست حسگرها معمولاً حدود $\pm 5\%$ است.
6. شرایط محلول آزمایشی- بسته به نوع زیست حسگر، شرایط محلول آزمایشی نظیر pH، دما، نیروی یونی و دیگر شرایط اختصاصی بر عمل کرد آن تاثیر گذارند.

2-5-2- کاربرد زیست حسگرها

الف) آزمایشگاه های بالینی- استفاده از زیست حسگرها در آزمایشگاه های بالینی می تواند زمان دسترسی به جواب را تا کمتر از یک دقیقه کاهش دهد. به این ترتیب ضرورت انتقال نمونه خون به آزمایشگاه را از بین می رود. از سوی دیگر این وسیله می تواند در محیط زنده استفاده شود.

ب) حسگرهای زیست محیطی- حسگرهایی برای نمایش آلودگی های محیطی برای آنالیز لحظه ای و حذف تأخیر زمانی و پتانسیل تغییر نمونه موجود است. تشخیص تعدادی از ترکیبات آلی مانند علف کش ها،

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

محلول های هالیدی آلی، هیدروکربن ها، باکتری ها، گازهای سمی، فلزات آب، خاک و هوا با به کارگیری حسگرها مورد نظر است.

ج) بررسی های زیست محیطی - ضرورت اندازه گیری آلاینده هایی نظیر حشره کش ها، کودهای شیمیایی، زباله ها و پساب های صنعتی و خانگی در هوا، آب و خاک انکار ناپذیر است. با استفاده از زیست حسگرها می توان کنترل پیوسته ی برخی از این آلاینده ها را انجام داد [29].

۲-۵-۳- نسل های متوالی زیست حسگرها

در یک دسته بندی تاریخی زیست حسگرهای گلوکز به سه نسل اول، دوم و سوم تقسیم می شوند.

• نسل اول:

آنزیم گلوکز اکسیداز (GOx)، گلوکز را اکسید کرده و در حضور اکسیژن، آب اکسیژنه تولید می کند. بنابراین، غلظت اکسیژن در سطح الکترو د کاهش می یابد. گروه اکسید و احیا در گلوکز اکسیداز، فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) است. واکنش به صورت زیر است:



FAD و FADH₂ هر دو در آب بسیار محلول هستند و به طور محکم به آنزیم متصل می شوند. کاهش غلظت اکسیژن با میزان غلظت گلوکز متناسب است (تحت شرایط آزمایشگاهی مناسب). در روشی دیگر، می توان محصول تشکیل شده (H₂O₂) را در پتانسیل مناسب اندازه گیری کرد [30]. نسل اول الکترودهای گلوکز با دو مشکل اساسی روبروست: حضور اجزای مداخله گر الکترو فعال در خون و وابستگی به اکسیژن آزاد به عنوان یک واسطه کاتالیستی [5]. دو کار اساسی برای کمینه کردن اثر مداخله گر ها انجام شده است: راهکار اول استفاده از غشای انتخابگر برای کمینه کردن مداخله گر ها در جهت الکترو د، برای مثال پوشاندن با نافیون^{۳۲} و لایه سلولز استات، راهکار دوم کاهش پتانسیل های کاری به ناحیه بهینه (0-0.2 ولت بر اساس Ag/AgCl) برای جلوگیری از فعالیت مداخله گر ها.

³² Nafion

• نسل دوم :

گلوکز اکسیداز نمی تواند الکترون ها را به طور مستقیم به الکترودهای مرسوم منتقل کند زیرا مرکز ردوکس FAD با لایه ضخیم پروتئین احاطه شده که انتقال الکترون را مسدود می کند. بنابراین از یک پذیرنده الکترون غیر فیزیولوژیک (مصنوعی) برای انتقال الکترون ها استفاده می شود. هدف اصلی این نسل از حسگرها برطرف کردن مشکل کمبود اکسیژن است [31]. واسطه های مصنوعی مطابق شکل الکترون ها را بین مرکز FAD و سطح الکتروده منتقل می کند.



شکل (7-2)، ترتیب رخدادهای سیستم زیست حسگر گلوکز با واسطه (نسل دوم) [31]

که Mediator(ox) و Mediator(red) صورت های اکسید و احیاء شده ی واسطه است. چنین چرخه ی واسطه ای یک جریان وابسته به غلظت گلوکز تولید می کند. واسطه های الکترون نفوذی مانند مشتقات فروسن، فری سیانید، نمک های آلی هادی، ترکیبات فوتوایزین و فنوکسازین یا ترکیبات کوئینون به طور گسترده برای برای تماس الکتریکی با گلوکز اکسیداز به کار می رود. در نتیجه ی استفاده از این واسطه ها، اندازه گیری ها بسیار مستقل از فشار جزئی اکسیژن خواهد بود و می تواند در پتانسیل های پایین تری انجام شود که واکنش های مداخله گر از اجزای الکتروفعال موجود تحریک نشود. برای داشتن عملکرد موثر، واسطه باید به سرعت با آنزیم احیاء شده واکنش دهد (جهت کمینه کردن رقبیت با اکسیژن)، خواص الکتروشیمیایی خوبی داشته باشد (مانند پتانسیل ردوکس پایین)، حلالیت کمی در محیط های آبی داشته باشد و غیر سمی و از نظر شیمیایی پایدار باشد (در هر دو شکل اکسید و احیاء شده). دستگاه های تست قند خون شخصی معمولاً بر اساس واسطه های فری سیانید یا فروسن است. گرچه به علت سمی بودن مواد واسطه، زیست حسگرهای قابل کاشت در بدن از نسل سوم (بدون مواد واسطه) هستند [32].

• نسل سوم :

نسل سوم شامل انتقال مستقیم الکترون بین آنزیم و الکترودها است بدون نیاز به واسطه های طبیعی یا سنتزی. این یک نوع جاه طلبانه ی حسگر گلوکز آنزیمی است. این نسل در سال های اخیر به طور افزایشی در حال تحقق است. دستیابی به انتقال الکترون بدون واسطه بین الکترودها و آنزیم ردوکس از موارد بنیادی مورد علاقه است. اگر از پیچیدگی واسطه های مناسب صرف نظر شود، سیستم بهتری خواهیم داشت و انتخابگری و حساسیت بسیار زیاد و غیر تأخیری خواهد بود. بزرگ ترین مشکل در دستیابی به انتقال الکترون مستقیم بین الکترودها و آنزیم، پروتئین ضخیمی است که مرکز فعال ردوکس در آن قرار دارد. واسطه ها و گلوکز توسط نفوذ و تراوایی شبکه ی مولکولی سه بعدی به آن دسترسی می یابند که این هنوز در یک الکترودها کامل صفحه ای امکان پذیر نیست. اگرچه در سال های اخیر، بهبود سریع در توسعه ی مواد نانو و متخلخل به طرز چشمگیری مساحت سطح الکترودها و دینامیک را افزایش داده است. مواد الکترودها متخلخل، سطح الکترودها که آنزیم را دربرمی گیرد، پیشنهاد می کنند. در نتیجه، انتقال الکترون مستقیم از آنزیم به الکترودها می تواند محقق شود و ممکن است جریانی مطابق اکسیداسیون آنزیم بدون پیچیدگی های واسطه ها، دخالت مداخله گرهای الکتروفعال یا بستگی به اکسیژن حل شده، مشاهده شود. این الزامات اثرات مداخله گر رقابت اکسیژن حل شده را با الکترودها برای تولید مجدد آنزیم حل نمی کند اما اثرش می تواند به طور قابل ملاحظه ای کاهش یابد [9].

2-6- معرفی آنزیم ها

آنزیم ها، کاتالیزگرهای زیستی هستند که دارای جایگاه فعال بوده و اتصال سوبسترا³³ به این نواحی، منجر به تغییر آن و تولید محصول می شود. کاتالیزورها معمولاً در واکنش ها بدون تغییر می مانند، ولی آنزیم ها تحت شرایط مختلف پایدار نمی مانند. این مواد در اثر حرارت بالا و شرایط اسیدی و قلیایی تغییر می کنند. آنزیم ها با کاهش انرژی فعال سازی سرعت واکنش شیمیایی را افزایش می دهند. آنزیم ها این کار را از طریق پایدار نمودن حالت گذار (نظیر مراحل شکست و تشکیل پیوند) انجام می دهند. به طور کلی کاهش خطی انرژی فعال سازی منجر به افزایش نمایی سرعت واکنش ها می شود. برای نمونه با کاهش انرژی فعال سازی به میزان 5 کیلوکالری بر مول، سرعت واکنش به میزان 5000 واحد در ثانیه افزایش می یابد. انجام سریع یک واکنش در موقعیت آزمایشگاهی بدون حضور کاتالیزور به دما و فشار بالا نیاز دارد، ولی در سلول³⁴ که شرایط محیطی آن کاملاً ثابت است، انجام واکنش های شیمیایی بسیار کند است. بنابراین حضور آنزیم در این محیط

³³ Substrate

³⁴ Cellule

برای انجام واکنش با سرعت مناسب ضروری است. آنزیم ها دارای ویژگی های زیر می باشند [33]:

1. سرعت واکنش های آنزیمی 10^6-10^{12} برابر بیشتر از سرعت متوسط واکنش های بدون کاتالیست و چندین برابر بیشتر از واکنش های مشابهی است که در حضور کاتالیست شیمیایی انجام می شوند.
 2. شرایط واکنش های آنزیمی ملایم است. این واکنش ها در دمای پایین، فشار محیط و pH نزدیک به 7 انجام می شوند، در حالی که کاتالیست های شیمیایی به دما و فشار بالا و pH های اسیدی و بازی نیاز دارند.
 3. آنزیم ها نسبت به واکنش هایی که کاتالیز می کنند، انتخاب پذیری بالایی دارند و به ندرت فرآورده های جانبی ناخواسته تولید می کنند.
 4. فعالیت کاتالیستی بسیاری از آنزیم ها نسبت به تغییر غلظت موادی به جز سوبسترا حساس است.
- هر آنزیم با یک نام سیستماتیک که مشخص کننده ی واکنشی است که آنزیم کاتالیز می کند مشخص می شود. این نام با افزودن پسوند آز³⁵ به سوبسترا یا نام واکنشی که آنزیم بر آن اثر می کند، به دست می آید. آنزیم ها بر حسب نوع واکنشی که کاتالیز می کنند به شش گروه اصلی طبقه بندی شده اند (جدول 4)

جدول 4 انواع آنزیم ها

طبقه بندی	نوع واکنش
اکسیدوردوکتازها	اکسایش - کاهش
ترانسفرازها	انتقال گروه های عاملی
هیدرولازها	هیدرولیز کننده
لیازها	حذف گروه ها با ایجاد پیوند دوگانه
ایزومرازها	ایزومریزاسیون

لیگازها	سنتز یا الحاق دو مولکول
---------	-------------------------

آنزیم ها همانند تمامی پروتئین ها، از بیست اسید آمینه ی طبیعی تشکیل شده اند و برای آن ها چهار سطح ساختمانی در نظر گرفته می شود که به ساختار اول تا چهارم موسوم هستند. ماهیت نیروهای غیرکووالانسی که به کمک آن ها سوبسترا و سایر مولکول ها به آنزیم متصل می شوند، مشابه نیروهایی است که ساختار سه بعدی پروتئین ها را شکل می دهند. این نیروها شامل برهم کنش های واندروالسی، الکترواستاتیکی، پیوندهای هیدروژنی و نیروهای آب گریز هستند. به طور کلی محل اتصال سوبسترا به صورت حفره یا شیار در سطح مولکول آنزیم تعبیه شده و مکمل شکل هندسی سوبسترا است.

برای برهم کنش بین آنزیم و سوبسترا بایستی حداقل سه نقطه متفاوت وجود داشته باشد. این برهم کنش ها می توانند نقش اتصال یا کاتالیتی ایفا نمایند. جایگاه های اتصال در آنزیم به گروه های ویژه ای در سوبسترا متصل شده و قرار گرفتن مولکول های سوبسترا و آنزیم را در یک جهت گیری ثابت نسبت به هم تضمین می نماید. ناحیه ای که شامل جایگاه های اتصال^{۳۶} و کاتالیتیک^{۳۷} است، اصطلاحاً جایگاه فعال یا مرکز فعال آنزیم خوانده می شود. این ناحیه به دلیل آن که باید در دسترس سوبسترا باشد، معمولاً در قسمت های سطحی آنزیم قرار دارد و فقط بخش کوچکی از کل ساختار آنزیم را شامل می شود. این جایگاه فعال شامل ناحیه ای به صورت شکافی معین در ساختمان آنزیم است. پیوند بین سوبسترا و جایگاه فعال معمولاً از نوع پیوندهای ضعیف غیر کووالانسی است. جایگاه فعال یک آنزیم اغلب شامل هر دو نوع اسیدهای آمینه قطبی و غیر قطبی است که موجب پدید آمدن آرایشی ویژه از نواحی آب گریز و آب دوست می شوند.

کوفاکتورها و کوآنزیم ها

بسیاری از آنزیم ها برای کاتالیز واکنش های مختلف، نیاز به یک بخش غیر پروتئینی موسوم به کوفاکتور دارند. کوفاکتورها ممکن است شامل یون های فلزی مانند Cu^{+2} ، Fe^{+3} و یا Zn^{+2} باشند. ضرورت وجود

³⁶ Binding site

³⁷ Active site

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکتروده زیست حسگر گلوکز

چنین عناصری به عنوان عامل کمکی می تواند علت نیاز موجودهای زنده به مواد غذایی حاوی این عناصر و همچنین اثر سمی برخی از عناصر سنگین مانند Cd^{+2} و Hg^{+2} را توجیه نماید. این عناصر می توانند جایگزین Zn^{+2} موجود در جایگاه فعال برخی آنزیم ها شوند و آن ها را غیرفعال نمایند. کوفاکتورها همچنین ممکن است شامل مولکول های آلی موسوم به کوآنزیم باشند. NAD^{+} ، FAD^{+} و ATP مثال هایی از این نوع کوفاکتورها هستند. برخی از کوفاکتورها به صورت گذرا به آنزیم متصل می شوند، بنابراین به عنوان کوسوبسترا عمل می کنند. کوفاکتورهایی نیز وجود دارند که اتصال محکم کووالانسی با پروتئین مربوطه برقرار می نمایند. این نوع کوفاکتورها به گروه های پروستتیک موسومند. مجموعه ی فعال آنزیم-کوفاکتور را هولوآنزیم می نامند. بخش پروتئینی آنزیم که فاقد کوفاکتور است و فعالیت آنزیماتیک ندارد را آپوآنزیم می گویند.

2-6-1- راه های تثبیت آنزیم ها

در ساخت زیست حسگرها، تثبیت گونه های زیستی نظیر آنزیم ها بر سطح الکتروده اهمیت زیادی دارد. در این فرایند یک جزء محلول (معمولا یک زیست مولکول) با اتصال به یک فاز جامد به صورت نامحلول درمی آید [27].

آنزیم تثبیت شده به دلیل قابل بازیافت بودن و پایدارتر بودن نسبت به آنزیم آزاد کاتالیست مؤثرتر است. زمانی که یک مولکول فعال زیستی به یک پایه متصل می شود، نحوه اتصال نباید چنان باشد که با جایگاه فعال مولکول واکنش بدهد و یا آن را تخریب کند زیرا موجب از بین رفتن فعالیت آنزیم می شود. همچنین مهم است که از بارگذاری اضافی ماتریکس با آنزیم خودداری شود زیرا منجر به تجمع و کاهش فعالیت آنزیم می شود. روش های تثبیت زیادی برای مولکول های زیستی وجود دارد که هر یک برای نوعی از مولکول ها یا اهداف مختلفی قابل استفاده است [27]. این روش ها که در نشان داده شده، به شرح زیر است :

1. جذب سطحی: ساده ترین روش تثبیت است و به دلیل سست بودن گونه زیستی بر سطح الکتروده، از آن در آزمایش های اولیه استفاده می شود. جذب سطحی آنزیم شامل اتصالات نمکی³⁸ و پیوندهای هیدروژنی است.

2. تله انداختن: مخلوطی از گونه ی زیستی و یک مونومر بی اثر تهیه می شود و گونه ی زیستی درون شبکه پلیمری ژل مانند محبوس می شود. این روش گاهی مانع از ارتباط آسان گونه های آزمایشی با ماده ی

³⁸ Salt linkages

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلازما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

زیستی و نهایتاً موجب کند شدن واکنش می شود. ژل های به کار رفته شامل پلی اکریلامید، چسب نشاسته، نایلون، نافون و پلی پیرول است.

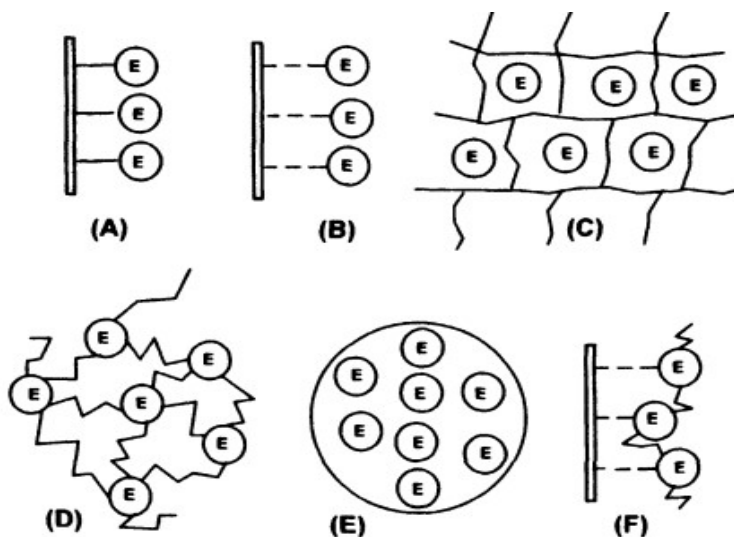
3. ایجاد پیوند عرضی³⁹: گونه ی زیستی از طریق پیوند شیمیایی به یک تکیه گاه متصل می شود. برای این منظور از معرف های دو عاملی نظیر گلو تار آلدهید و آمید استفاده می شود. در این روش نیز نفوذ گونه های آزمایشی به سوی گونه ی زیستی با محدودیت همراه است

4. تثبیت درون کپسول: گونه زیستی درون کپسول یا غشا تراوا که با انتقال دهنده در تماس است قرار می گیرد. در این روش گونه ی زیستی پایداری خود را حفظ کرده و از عواملی نظیر دما، pH، نیروی یونی و ترکیب شیمیایی محیط متاثر نمی شود

5. پیوند عرضی - جذب سطحی: گونه های زیستی علاوه بر ایجاد پیوندهای عرضی، از طریق جذب سطحی به الکتروده متصل می شوند.

شایان ذکر است پیوندهای بسیار محکم بین آنزیم و تکیه گاه می تواند از فعالیت کاتالیتیکی آن بکاهد [34].

6. تثبیت درون کپسول: گونه زیستی درون کپسول یا غشا تراوا که با انتقال دهنده در تماس است قرار می گیرد. در این روش گونه ی زیستی پایداری خود را حفظ کرده و از عواملی نظیر دما، pH، نیروی یونی و ترکیب شیمیایی محیط متاثر نمی شود.



شکل (2-8) راه های مختلف تثبیت آنزیم: (a) پیوند کووالانسی، (b) جذب سطحی، (c) تله انداختن، (d) ایجاد پیوند عرضی، (e) تثبیت درون کپسول و (f) پیوند عرضی - جذب سطحی [35].

³⁹ Cross linking

2-7- زیست حسگر گلوکز

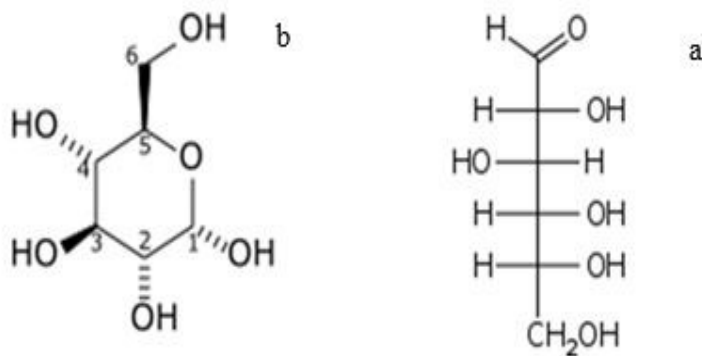
زیست حسگرهای آمپرومتری بر پایه ی آنزیم گلوکز اکسیداز بیشترین کاربرد را در تشخیص گلوکز دارند. تشخیص گلوکز در زمینه های مختلف کاربرد دارد. یکی از مهم ترین این کاربردها کنترل بیماری دیابت است. این بیماری یکی از مسایل بزرگ سلامت جهانی است و پیش بینی می شود که تعداد بیماران دیابتی در بیست سال آینده دو برابر شود. بنابراین، توسعه سریع، دقیق و پایدار فناوری های شناسایی سطح گلوکز در بیرون آزمایشگاه و درون بدن نه تنها در خون بلکه در سایر منابع مانند غذاها و داروها اهمیت فراوانی دارد. این اختلال متابولیک از ناکارآمدی انسولین ناشی می شود و ازدیاد قند خون منجر به بیشتر شدن غلظت گلوکز از گستره ی نرمال $7/8-3/9$ میلی مولار می گردد [36]. برای سنجش میزان گلوکز در بدن انسان علاوه بر خون از منابع دیگر مانند اشک، ادرار، بزاق دهان و بازدم نیز می توان استفاده نمود. برای نمونه میزان استون موجود در بازدم افراد دیابتی با میزان قند خون آنها در ارتباط است. در حال حاضر تلاش برای ساخت زیست حسگرهای بسیار ظریف گلوکز خون در جریان است که بتواند آن را برای مدت طولانی در زیر پوست بیماران دیابتی قرار داد. چنین حسگری با یک پمپ انسولین در ارتباط است تا متناسب با نوسان های قند خون بیمار، انسولین لازم به بدن وی تزریق شود. [21].

2-7-1- ساختار و واکنش های گلوکز

گلوکز یک مونوساکارید آلدئیدی با خاصیت احیاکنندگی است که در متون علمی به صورت $\beta(\alpha) -D(L)$ - گلوکز نشان داده می شود. گلوکز به دو صورت زنجیره ی باز و حلقه ای وجود دارد شکل (9-2). برای تبدیل زنجیره ی باز به حالت حلقه ای، عامل آلدئیدی واقع در کربن C_1 طی یک واکنش هسته دوستی با یک گروه هیدروکسیل واقع در C_5 ترکیب شده و یک نیمه استال⁴⁰ تولید می کند. این حالت حلقه ای گلوکز، گلوکوپیرانوز⁴¹ نام دارد و بیش از 99٪ گلوکز درون محلول های آبی به این صورت است.

⁴⁰ Hemiacetal (-C(OH)H-O-)

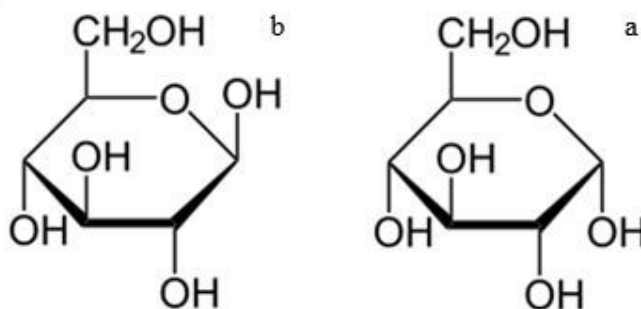
⁴¹ Glucopyranose



شکل (9-2) . حالت (a) زنجیره باز و (b) حلقه ای D-گلوکز

برای نشان دادن شکل های فضایی قندها بنابر پیشنهاد فیشر⁴² از حروف D و L بهره گرفته می شود. در مورد این قند 6 کربنی به دلیل آنکه عامل هیدروکسیل آخرین کربن ناقرینه آن ها به طرف راست است از نوع D محسوب می شوند. گلوکز نوع D و L تصویر آینه ای یکدیگر هستند. گلوکز نوع L به ندرت در طبیعت یافت می شود. D-گلوکز نور پلاریزه را با قدرت چرخش 52/7° به طرف راست منحرف می کند و بنابراین آن را با علامت + مشخص می نمایند.

پیشوندهای α و β بسته به نحوه ی قرارگیری گروه هیدروکسیل متصل به C₁ و گروه -CH₂OH متصل به C₅ استفاده می شوند. اگر این دو گروه مولکولی در دو سمت مخالف قرار گیرند (شکل 2a-10)، پیشوند α و اگر در دو سمت موافق قرار گیرند (شکل 2b-10)، پیشوند β به کار می رود. حدود 6/63٪ درصد -D-گلوکز از نوع β و بقیه از نوع α می باشند.



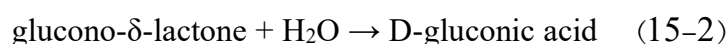
شکل (10-2) ساختار (a) D- α گلوکز و (b) D- β گلوکز

⁴² Fischer

گلوکز با توجه به خاصیت احیا کنندگی آن می تواند با اکسیژن ترکیب شود [58]:



این واکنش در حضور آنزیم گلوکز اکسیداز به صورت زیر انجام می شود:



واکنش کلی به شرح زیر است:



گلوکز اکسیداز (EC 1.1.3.4) یک آنزیم اکسیدوردو کتاز دوپار⁴³ با وزن مولکولی 150-180 kDa است که دارای دو کوفاکتور فلاوین⁴⁴ با اتصال محکم می باشد. این مرکز فعال در زیر لایه های پروتئینی محبوس است. گلوکز اکسیداز عمدتاً برای کاتالیز واکنش گلوکزهای آزاد موجود در بدن مورد استفاده واقع می شود. نحوه عمل کرد گلوکز اکسیداز به این صورت است که گروه فلاوین آن با گلوکز برهمکنش می کند تا حالت کاهش یافته ی آن (FADH₂) تولید شود. فلاوین کاهش یافته توسط یک گونه ی واسطه به حالت اولیه برگردانده می شود. تولید مجدد آنزیم یک فرایند حیاتی است که در صورت انجام نشدن آن، آنزیم از چرخه ی واکنش حذف می گردد.

نقطه صفر بار این آنزیم 3/8 است. بنابراین در pH=7 سطح آن بار منفی دارد. تثبیت گلوکز اکسیداز روی سطح موادی که در این pH بار مثبت دارند (موادی که نقطه صفر آن ها بالاتر از 7 است) توسط نیروهای الکترواستاتیکی تقویت می شود. شایان ذکر است نیروهای الکترواستاتیکی می توانند باعث کاهش فعالیت کاتالیستی آنزیم شوند

2-7-2- اثر مداخله گر ها در زیست حسگر گلوکز

⁴³ Dimeric

⁴⁴ Flavin adenine dinucleotide (FAD)

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

مداخله گرهای الکتروشیمیایی موجود در خون می توانند باعث خطای بالا در خواندن گلوکز، از طریق اهدای الکترون غیر حاصل از گلوکز شوند. مولکول مداخله گر یک گونه الکترو فعال در پتانسیل کار حسگر الکتروشیمیایی است. مداخله گرهای استاندارد ارائه شده توسط FDA⁴⁵ شامل: استامینوفن، سالیسیلیک اسید، تراسیسلین، دوپامین، افدرین، ایوپروفن، L-DOPA، متیل-DOPA، تولازامید، آسکوربیک اسید، بیلروبین، کلسترول، کریتینین، تری گلیسیرید و اسید اوریک است. اسید آسکوربیک و اسید اوریک دو گونه الکترو فعال هستند که به طور طبیعی در خون موجود هستند و باعث بیشترین مداخله گری الکتروشیمیایی در طول حسگری گلوکز می شوند [29 و 37].

2-8- روش های الکتروشیمیایی در زیست حسگر

2-8-1- ولتامتری

ولتامتری چرخه ای روشی است برای مطالعه ی الکتروشیمیایی مکانیسم واکنش هایی که سبب تغییر در سیگنال جریان می شوند. این روش تغییرات جریان را در مقابل تغییرات خطی پتانسیل میان دو محدوده E₁-E₂ با سرعت معین به دست می دهد. در این روش به محض رسیدن به پتانسیل E₂، روبش پتانسیل به جای تمام شدن (معمولا با همان سرعت روبش) در جهت عکس انجام می گیرد. تغییرات جریان پیل در ولتامتری چرخه ای در قالب نمودار جریان بر حسب پتانسیل ثبت می گردد. نمودار مرسوم می که از روش ولتامتری چرخه ای به دست می آید، ولتاموگرام نام دارد. انتقال مؤثر الکترون در این روش به صورت پیک در نمودار ظاهر می شود که در صورت بازگشت پذیری انتقال الکترون در طول فرایند اکسیداسیون-احیا، به صورت جفت پیک در می آید. سرعت های روبش مورد استفاده در آزمایش های متداول از چند میلی ولت در ثانیه تا چند صد میلی ولت در ثانیه است. ولتامتری چرخه ای همچنین مرسوم ترین روش بررسی های سینتیکی و ترمودینامیکی انتقال الکترون و رفتار آنزیم های تثبیت شده در سطح الکترو د است که اولین بار توسط آرمسترانگ⁴⁶ مطرح شد [28 و 38].

مزیت های روش ولتامتری به طور کلی عبارتند از:

- قابل شناسایی بودن انتقال الکترون آنزیم ریداکس در غیاب سوپسترا [39].
- کاهش مشکلات نفوذ ماده.

⁴⁵Food and Drug Administration

⁴⁶ Armstrong

- پتانسیل اعمال شده با سرعت و دقت قابل کنترل.

✓ اطلاعاتی که از ولتاگرام به دست می آید به شرح زیر است:

- پتانسیل فرمال یک زوج اکسایش-کاهش که از میانگین پتانسیل پیک های آنودی (E_{pa}) و کاتدی (E_{pc}) به دست می آید:

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (17-2)$$

مقدار E^0 که همانند طول موج جذبی مواد در آنالیز اسپکتروسکوپی یک وجه مشخصه ی گونه های اکسایش-کاهش محسوب می شود، میزان تمایل زوج اکسایش-کاهش برای اکسید و یا احیا شدن را نشان می دهد.

- پتانسیل جدایی پیک ها (ΔE_p) که سهولت و برگشت پذیری فرآیند انتقال الکترون را نشان می دهد:

$$\Delta E = 0.059/n \quad (18-2)$$

تعداد الکترون های انتقالی است. این عدد برای فرایندهای سریع انتقال الکترون ثابت است. وابستگی این عدد به سرعت روبش بیان گر وجود برگشت ناپذیری الکتروشیمیایی است. شایان ذکر است در شرایط آزمایشگاهی عدد $59/n$ میلی ولت به ندرت مشاهده می شود [21].

- نسبت جریان پیک های آنودی و کاتدی (I_{pa}/I_{pc}) که هر چه به عدد یک نزدیک تر باشد فرایند برگشت پذیرتر است.

- تعیین پدیده ی کنترل کننده سرعت فرایند الکترو دی:

از ارتباط میان جریان های پیک آنودی کاتدی با سرعت روبش می توان اطلاعاتی در مورد نحوه ی جذب آنزیم به دست آورد. چنانچه پروتئین ها روی سطح الکترو د جذب شده باشند، جریان پیک ها به طور خطی متناسب با سرعت روبش خواهد بود. اما در صورتی که آنزیم به داخل محلول نفوذ کند، فرآیند انتقال الکترون تحت کنترل نفوذ خواهد بود که در این حالت جریان پیک ها متناسب با ریشه دوم سرعت روبش است [40].

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} v \quad (19-2)$$

- تاثیر pH

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

معمولاً با افزایش pH ، پیک های آن دی و کاتدی زوج ریداکس با یک رابطه ی خطی به سمت پتانسیل های منفی تر جابه جا می گردند. اگر شیب این نمودار به مقدار 59/02 میلی ولت به ازاء هر واحد PH نزدیک باشد، بدان معنی است که تعداد الکترون و پروتون تبادل شده برابر هستند.

- پایداری ماده ی اصلاح گر

پایداری مکانیکی ماده ی اصلاح گر که با میزان چسبندگی آن به سطح الکترو د در ارتباط است با اندازه گیری میزان کاهش جریان خازنی اندازه گیری می شود. پایداری فعالیتی آنزیم نیز با اندازه گیری کاهش جریان فارادیک آن تعیین می شود. پایداری اصلاح گر می تواند با هر چند روز یکبار با گذشت زمان و یا پس از انجام تعداد زیادی چرخه بررسی شود. بر اساس آنچه در مورد متغیرهای قابل دستیابی از روش ولتامتری گفته شد، فرایندهای الکتروشیمیایی را می توان به 3 دسته تقسیم بندی نمود:

1- برگشت پذیر:

- $\Delta E = 59/n$ (mV)
- نسبت $|I_{pc}|$ به $|I_{pa}|$ یک است.
- E_p مستقل از سرعت روبش است.

2- برگشت ناپذیر:

- پیک برگشت مشاهده نمی شود

3- شبه برگشت پذیر:

- $|I_p|$ با افزایش سرعت روبش افزایش می یابد، ولی با آن متناسب نیست.
- ΔE از 59/n میلی ولت بزرگ تر است و با افزایش سرعت روبش افزایش می یابد.
- E_{pc} با افزایش سرعت روبش در جهت منفی جابجا می شود.

2-8-2- کرونوآمپرومتری

کرونوآمپرومتری⁴⁷ زیر شاخه ای از روش ولتامتری است که در آن یک پتانسیل ثابت و مشخص به الکترو د کار اعمال و تغییرات جریان در طول زمان اندازه گیری می شود. پتانسیل اعمالی معادل پتانسیل فرمال واکنش ردوکس آنزیم، انتخاب می گردد. به نمودار شدت جریان نسبت به زمان که در آزمایش کرونوآمپرومتری (و

⁴⁷ Chronoamperometry

آمپرومتری) ثبت می گردد، آمپروگرام گفته می شود.

میزان جریان عبوری نسبت به زمان به دو عامل نفوذ و سرعت انجام واکنش سطحی (انتقال بار در سطح الکتروده) بستگی دارد. فرض بر این است که انتقال جرم تنها از طریق نفوذ صورت می گیرد. هرگاه پتانسیل اعمال شده قادر به انجام واکنش باشد، مقدار جریان ناگهان افزایش یافته و از صفر به حداکثر مقدار خود می رسد. این جریان با گذشت زمان و با مصرف گونه فعال در سطح الکتروده، کاهش می یابد. در این روش از پدیده ی همرفت برای سرعت بخشیدن به انتقال ماده و رسیدن به حالت نفوذ ایستا کمک گرفته می شود.

2-8-3-آمپرومتری

این روش همانند روش کروئوآمپرومتری است و طی اعمال پتانسیل ثابت، گونه ی مورد سنجش به طور متوالی به محلول افزوده می شود. به منظور کاهش اثر نفوذ، الکتروده با دستگاه چرخاننده الکتروده می چرخد و یا این که به کمک سیستم مغناطیسی هم زده می شود.

بررسی ها نشان می دهد در یک پتانسیل و زمان مشخص، بین شدت جریان و غلظت گونه در توده ی محلول، رابطه ی خطی وجود دارد. از این ویژگی برای رسم نمودار درجه بندی⁴⁸ جریان نسبت به غلظت گونه مورد سنجش استفاده می شود.

در این روش در صورت بی حرکت بودن الکتروده و محلول، شار ترکیب الکترولیز شونده، در اثر گسترش ضخامت لایه ی نفوذ، با گذشت زمان کاهش می یابد که به صورت کاهش جریان ظاهر می شود. در صورتی که شدت جریان اندازه گیری شده ماهیت نفوذ داشته باشد، تغییرات آن در طول زمان از معادله ی کنترل⁴⁹ پیروی می کند.

$$I = mt^{-1/2}, m = \frac{nFA C^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (20-2)$$

این معادله از یک سو وابستگی شدت جریان را در هر لحظه به غلظت ترکیب آزمایشی در محلول نشان می دهد و از سوی دیگر نمایان گر کاهش جریان بر حسب عکس جذر زمان می باشد. با رسم نمودار تغییرات جریان نسبت به عکس جذر زمان که به صورت خط راستی با شیب $nFA C \pi^{-1/2} D^{1/2}$ ظاهر می شود، می توان ضریب نفوذ (D) آنزیم درون بافر و مساحت سطح الکتروده اصلاح شده (A) را بدست آورد. برای

⁴⁸ Calibration

⁴⁹ Cottrell

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د
زیست حسگر گلوکز

اندازه گیری گونه های الکترو فعال، پس از هر افزایش گونه ی آزمایشی، نمونه اندازه جریان برای مدت زمان
معین تعیین می شود

فصل ۳: روش تحقیق

3-1-مقدمه

به طور کلی این کار تجربی شامل دو بخش است. بخش اول، ساخت آرایه های نانولوله های کربنی و بخش دوم، اصلاح این آرایه های کربنی به کمک لایه نشانی الکتريکی پلی آنیلین و عامل دار کردن آن و سپس تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز و بررسی عملکرد شیمیایی و الکتريکی آن است.

3-2-مواد شیمیایی

آنزیم گلوکز اکسیداز (G7141- 50KU)، اوریک اسید، آسکوربیک اسید و ماده ی NHS از شرکت Sigma-Aldrich و بقیه مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک⁵⁰ آلمان خریداری شد.

3-3-ساخت آرایه های منظم نانولوله های کربنی به روش لایه نشانی بخار(CVD)

در این پژوهش از ویفر سیلیکون پوشیده با لایه سیلیکا به ضخامت ۵۰۰-۲۰۰ nm استفاده می شود و لایه نشانی آلومینا به ضخامت ۳۰-۲۰ nm به روش RF-Sputtering و همچنین لایه نشانی کاتالیست آهن به روش ALD انجام می گیرد.

رشد نانولوله های کربنی بر روی پایه های ویفر سیلیکون Si/SiO₂/Al₂O₃/Fe توسط سیستم ترسیب شیمیایی بخار صورت میگیرد. به این منظور ابتدا نمونه های ویفر سیلیکا بعد از لایه نشانی Al₂O₃ و Fe به صورت افقی داخل راکتور CVD قرار داده شد و پس از بستن اتصالات و کنترل نشتی، حرارت دهی در حضور جریان آرگون (در مواردی آرگون همراه هیدروژن) تا رسیدن به دمای ۷۵۰°C ادامه یافت. پس از رسیدن به دما، جریان های اتیلن و هیدروژن نیز اضافه شد و واکنش CVD انجام گرفت. استفاده از آب در سنتز نانولوله های کربنی با روش های CVD به نام سنتز به کمک آب (water assisted synthesis) خوانده میشود. در این حالت ، در زمان انجام CVD قسمتی از جریان آرگون از درون رطوبت زن عبور داده شد تا

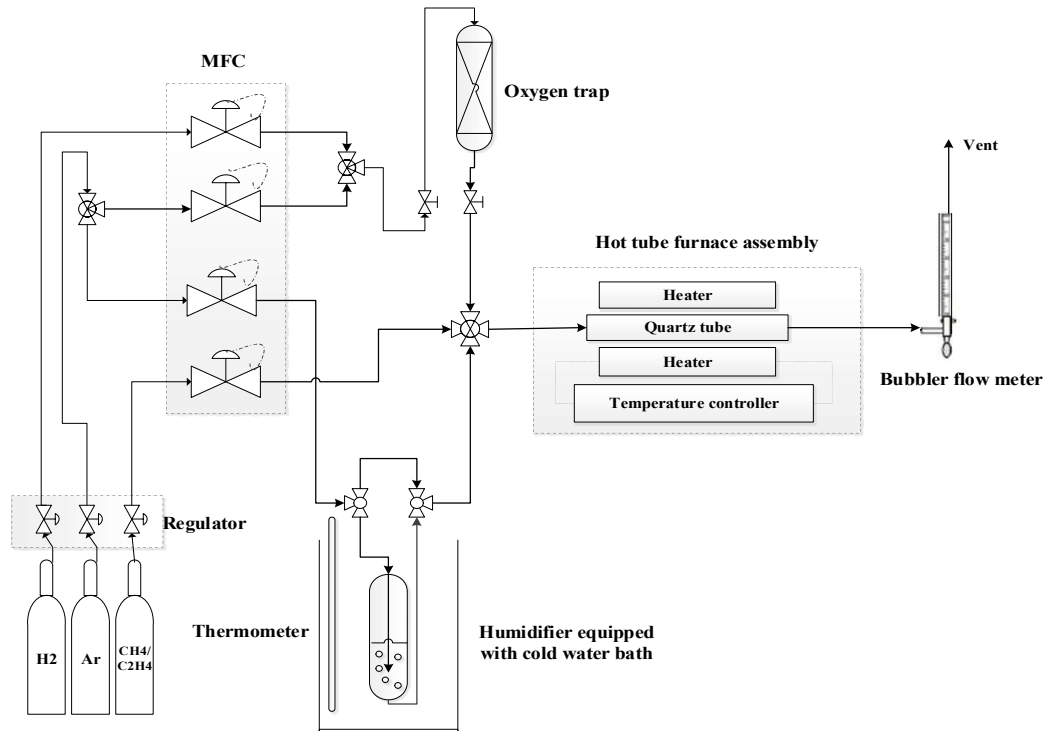
⁵⁰ Merck

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

خوراک به میزان مورد نظر مرطوب شود. پس از انجام CVD جریان های خوراک هیدروکربنی و هیدروژن و جریان آرگون حاوی رطوبت قطع شد و جریان آرگون خشک تا خنک شدن کامل نمونه تا دمای محیط از درون راکتور عبور نمود.

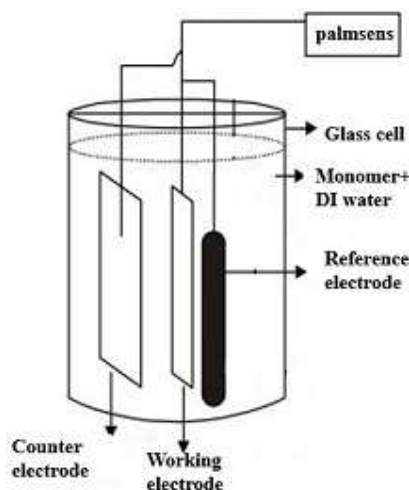
در انجام آزمایش ها از نرخ حرارت $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ برای افزایش و نرخ $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ برای کاهش دمای نمونه ها استفاده شد. فرایند CVD در زمان های ۴۵ دقیقه تا ۶۰ دقیقه انجام گرفت. در این کار، از آب در حدود ppm ۵۰۰-۱۰۰۰ به عنوان پایدار کننده کاتالیست استفاده می شود. برای تامین رطوبت در محیط CVD از یک کپسول آرگون با رطوبت 5000 ppm استفاده میشود که با جریان دیگری از آرگون خشک برای دست یافتن به غلظت مطلوب رقیق می شود.

طبق منابع در انجام فرایند CVD نرخ کل دبی عبوری از راکتور با توجه به ابعاد راکتور به گونه ای است که نسبت دبی کل (بر حسب سانتی متر مکعب بر دقیقه) به قطر داخلی راکتور (سانتی متر) در حدود ۱۰۰ می باشد. بنابراین در انجام آزمایش ها نرخ کل دبی عبوری با توجه به ابعاد راکتور کوارتز ۲۵۰ میلی لیتر بر دقیقه برای آزمایش ها با کوره افقی انتخاب شده است.



شکل (3-1) سیستم انجام آزمایش CVD همراه بخار آب با الگوی موازی

3-4- لایه نشانی پلی آنیلین



شکل (2-3). سل الکتروشیمیایی لایه نشانی پلی آنیلین

3-5- صیقل دادن⁵¹

برای صیقل دادن انتهای آرایه های نانوکربنی مدفون شده در پلی آنیلین از $0.2\mu\text{M}$ پودر آلومینای حل شده در محلول 1MKOH استفاده شد.

3-6- عامل دار کردن نانولوله های کربنی

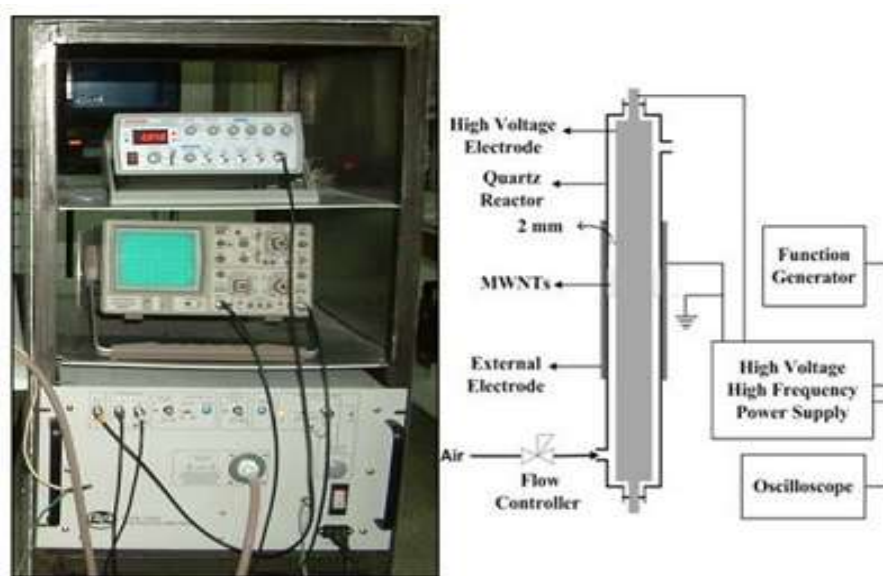
جهت عامل دار کردن آرایه های نانولوله های کربنی با پلاسمای DBD، از تخلیه الکتریکی با مانع دی الکتریک در محیط بخار آب/هوا در دمای 70°C استفاده شد. بیشترین مقدار گروه های عاملی اکسیژن دار در مدت زمان 4 دقیقه ایجاد شدند. گروه های عاملی ایجاد شده باعث افزایش خواص آب دوستی نانولوله ها، موجب بهبود برهمکنش آن ها با آنزیم ها شدند. برای اشباع هوا از بخار آب، یک ستون شیشه ای به ارتفاع 35 سانتی متر از آب مقطر پر شده و درون حمام روغن

⁵¹ Polishing

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

سیلیکون در دمای 70°C قرار گرفت و هوای خالص با دبی 40sccm درون این ستون عبور داده شد. فشار بخار آب در این دما 0/31 اتمسفر است. برای جلوگیری از میعان بخار آب، تمامی طول مسیر از خروجی اشباع کننده تا خروجی راکتور پلاسما توسط کنترل کننده دما در دمایی بالاتر از دمای 70°C نگه داشته شد [21].

شکل (2-3) شماتیک و تصویر سامانه آزمایشگاهی مورد استفاده برای عامل دار نمودن نانولوله ها به وسیله ی پلاسمای DBD را نشان می دهد. در این پژوهش برای تولید پلاسما از تخلیه الکتریکی با مانع دی الکتریک استفاده شد.



شکل (3-3) شماتیک و تصویر تجهیزهای آزمایشگاهی مورد نیاز برای تولید پلاسمای DBD شامل: دستگاه

تابع ساز، اسیلوسکوپ و آمپلی فایر ولتاژ و فرکانس بالا [21]

برای تولید جریان الکتریکی یک دستگاه تابع ساز⁵² مدل PINTEK FG-32 مورد استفاده قرار گرفت. خروجی این دستگاه توسط یک دستگاه منبع تغذیه ولتاژ و فرکانس بالا (Trek 10/20 A-AC) هزار برابر می شود. برای تعیین مقدار جریان و اختلاف فاز بین ولتاژ و جریان، از یک دستگاه اسیلوسکوپ مدل HAMEG HM 203 استفاده گردید. جریان عبوری گاز برای هر 50 میلی گرم نمونه، توسط کنترل کننده سرعت جریان جرمی بر روی 40 sccm تنظیم شده است.

⁵² Function generator

۳-۷- بررسی عملکرد زیست حسگری

در این کار از یک سل الکتروشیمیایی سه الکترو دی شامل الکترو د کربن شیشه ای به عنوان الکترو د کار جهت مقایسه، آرایه های کربن نانوتیوب به عنوان الکترو د کار اصلی، الکترو د مرجع نقره/کلرید نقره و الکترو د کمکی پلاتین (با مساحت سطح $1/85$ سانتی متر مربع) با اتصال به دستگاه پتانسیوستات/گالوانوستات (PalmSense) استفاده شد. الکترو د کار با مساحت سطح $1/5$ سانتی متر مربع به کار گرفته شد. الکترو د مرجع در مواقع عدم استفاده در محلول کلرید پتاسیم 3 مولار نگهداری می شد. در تمام آزمایش های این پژوهش، از آب دو بار یون زدایی شده استفاده شد و در هنگام انجام تست های ولتامتری، گاز نیتروژن جهت اکسیژن زدایی به درون محلول بافر فسفات دمیده می شد.

۳-۷-۱- تهیه ی بافر فسفات

به منظور تهیه بافر فسفات با غلظت $0/1$ مولار در pH برابر 7، ابتدا $5/486$ گرم از K_2HPO_4 ($174/2$ گرم بر مول) و $6/804$ گرم از KH_2PO_4 ($136/1$ گرم بر مول) توزین شده و سپس با 100 میلی لیتر آب دوبار یون زدایی شده ترکیب شد. برای ساخت بافر با pH برابر 5 تا 11، جرم مشخص از نمک های K_2HPO_4 و KH_2PO_4 مطابق جدول 5 با 100 میلی لیتر آب ترکیب شد.

جدول 5. راهنمای تهیه ی بافر فسفات در pH های مختلف

pH	KH_2PO_4 (گرم)	K_2HPO_4 (گرم)
5	13/609	0/1097
6	13/609	1/097
7	6/8045	5/4866
8	0/408	8/281
9	0/054	11/042
10	0/0068	13/8
11	0/0008	16/5

مقادیر فوق با استفاده از معادله هندرسون-هزلباخ محاسبه شده که در آن pK_a ، ثابت تفکیک فسفریک اسید

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

و $[A^-]$ و $[HA]$ به ترتیب غلظت K_2HPO_4 و KH_2PO_4 است.

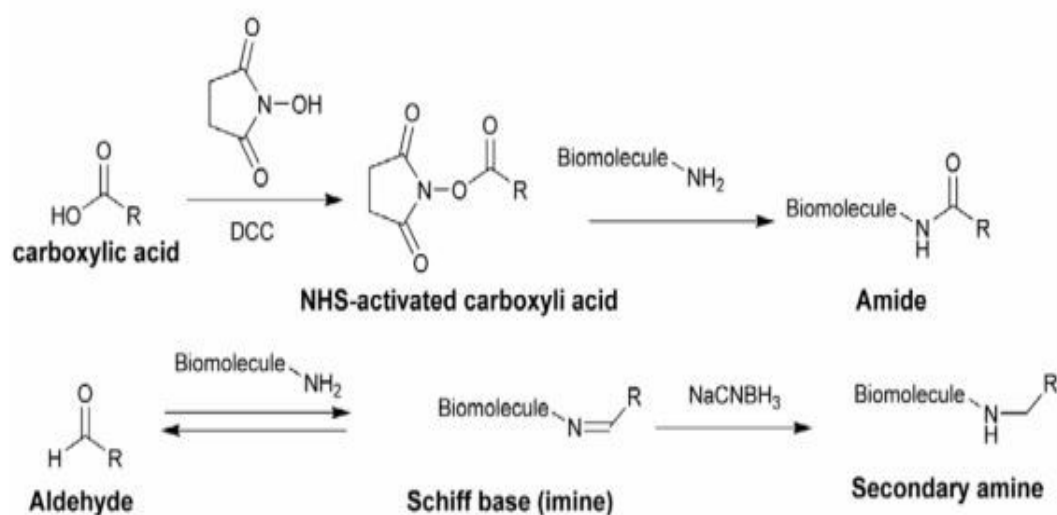
$$pH = pK' + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

که pK' ثابت تفکیک اسید فسفریک بوده و $[A^-]$ و $[HA]$ به ترتیب غلظت K_2HPO_4 و KH_2PO_4 می باشند.

برای جلوگیری از آلوده شده الکترو د، محلول فسفات تنها یک بار برای هر آزمایش استفاده شد و برای انجام آزمایش جدید از بافر فسفات تازه استفاده می شد.

۳-۷-۲-تهیه ی محلول آنزیم و تثبیت آن بر روی سطح الکترو د

برای تثبیت آنزیم بر روی سطح الکترو د از روش های مختلفی از جمله اتصالات متقاطع، اتصال عرضی و اتصال کووالانسی استفاده می شود. در اینجا برای تثبیت آنزیم از روش کووالانسی استفاده می کنیم. مزیت این روش نسبت به سایر روش ها جلوگیری از نشت آنزیم به درون محلول و مختل شدن عملکرد حسگر است. در این روش، بین ماده زیستی و گروه عاملی ویژه-ای که روی تکیه گاه مستقر در سطح الکترو د قرار دارد، پیوندی ایجاد می شود. گروه های هسته خواه موجود در آمینو اسیدها برای ایجاد پیوند مناسب است. مواد حد واسط نیز در ایجاد پیوند بین گونه زیستی و تکیه گاه استفاده می شود. پس از عامل دار کردن آرایه ها با گروه عامل کربوکسیل و با توجه به عامل دار بودن ذاتی نانولوله ، آنزیم های دارای گروه عاملی می توانند در حضور EDC و NHS به آن ها متصل شوند. شکل زیر اتصال گروه های زیستی توسط پیوند آمینی را توضیح می دهد.

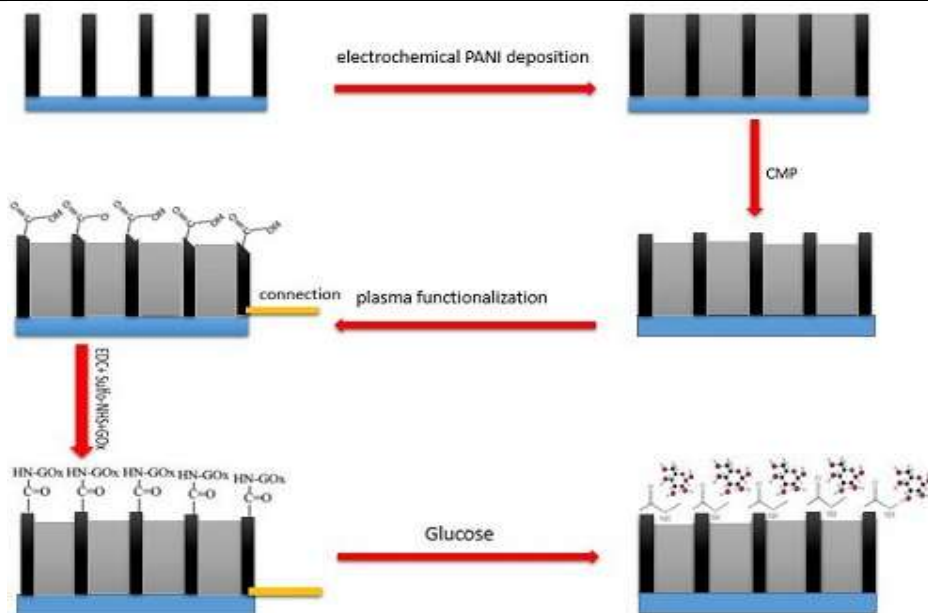


شکل (3-4) اتصال مولکول زیستی توسط گروه آمینی [42]

برای تهیه و تثبیت آنزیم، پس از عامل دار کردن الکتروده، آن را در 1 میلی لیتر محلول PBS شامل mg/mL برای 10 EDC و 30 mg/mL که به طور مداوم حدود 150 دقیقه با سرنگ تمیز در حال هم زدن بود استفاده شد. بعد از این مدت و پس از شستن الکتروده با محلول بافر pH=7، 0/5 میلی لیتر از محلول آنزیم (5 mg/mL) که در محلول بافر فسفات با pH=7 تهیه شده بود بر روی سطح الکتروده قرار گرفت و واکنش به مدت دوساعت در دمای اتاق انجام شد. پس از آن، الکتروده با محلول PBS با pH=7 شسته شد و در موارد عدم استفاده، در محلول بافر فسفات با pH=7 در دمای 4 درجه ی سانتی گراد نگهداری شد.

شکل (3-4) شمای کلی از مرحله ی ساخت آرایه تا تثبیت آنزیم بر روی آرایه های عامل دار شده را نشان می دهد.

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکتروود زیست حسگر گلوکز



شکل (3-5) شمای کلی از ساخت الکترودها و تثبیت آنزیم بر روی سطح آن

۳-۷-۳- تعیین مشخصات

برای انجام آزمایشات جهت تعیین مشخصات الکتروود و بررسی عملکرد، ابتدا بر روی سه نمونه ی مختلف از آرایه ها با طول های مختلف و قطر یکسان به روش الکتریکی پلی آنیلین را می نشانیم. با توجه به طول آرایه های مختلف، زمان نشانیدن پلی آنیلین متفاوت بود. برای این الکترودها تست استاندارد انجام شد. در مرحله ی بعد، برای آرایه هایی با طول های یکسان و قطرهای مختلف لایه نشانی انجام شد. برای این نمونه ها نیز تست استاندارد جهت بررسی اولیه ی عملکرد الکتروود انجام شد. در نهایت، با مقایسه ی نتایج به دست آمده از آزمایشات، بهترین نمونه که نمونه ای با کمترین قطر ممکن و بیشترین چگالی در واحد سطح بود به عنوان الکتروود اصلی انتخاب شد و تمام آزمایشات بعدی بر روی آن انجام شد.

۳-۷-۴- بررسی تاثیر سرعت روبش بر روی رفتار اکسایش و کاهش آنزیم

به منظور بررسی اثر سرعت روبش بر رفتار ردوکسی هیبریدهای سنتز شده، از ولتاژهای چرخه ای در سرعت های روبش 200-230-250-280-300-350-380-400-450-480-500-520-540

10-20-30-40-50-80-100-130-150 میلی ولت بر ثانیه بهره گرفته شد. با افزایش سرعت روبش در روش ولتامتری چرخه ای، جریان پیک ها و به دنبال آن حساسیت روش افزایش می یابد، با این وجود جریان خازنی نیز متناسب با این افزایش سرعت روبش، زیاد و موجب محدودیت حساسیت روش می شود که این مطلوب نیست. از این رو سرعت روبش اغلب در محدوده ی 20-50 میلی ولت بر ثانیه به کار گرفته شد. در این پژوهش، از سرعت روبش 50 میلی ولت بر ثانیه استفاده شده است.

۳-۷-۵-آزمایش های ولتامتری و آمپرومتری جهت تعیین حساسیت نسبت به گلوکز

10 میلی لیتر بافر فسفات را در سل الکتروشیمی می ریزیم. در آزمایش ولتامتری، پتانسیل در محدوده 1- تا 0 ولت اعمال شده و برای هر مرتبه تزریق مقدار معین گلوکز نمودار ولتاموگرام آن ثبت گردید. در آزمایش آمپرومتری با اعمال پتانسیل ثابت مشخص، نمودار جریان بر حسب زمان (آمپروگرام) قبل و پس از تزریق گلوکز متوالی گلوکز با فاصله های زمانی ثابت رسم شد.

۳-۷-۶-انتخاب پذیری نسبت به گلوکز

انتخاب پذیری الکترودهای اصلاح شده نسبت به گلوکز در محلول بافر فسفات و در حضور اسید آسکوربیک و اسید اوریک انجام شد. برای انجام این سری آزمایش ها، پاسخ آمپرومتری و ولتامتری الکترودهای اصلاح شده نسبت به تزریق مقادیر مساوی از محلول های گلوکز (0/2 میلی مولار) اسید آسکوربیک (0/1 میلی مولار) و اسید اوریک (0/1 میلی مولار) به محلول بافر فسفات مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه محلول اسید اوریک به دلیل نامحلول بودن آن در محیط آبی، از محلول 0/5 NaOH مولار استفاده شد. پتانسیل بهینه برای انجام این آزمایش 0/55- بود.

۳-۸-تعیین مشخصه ها

برای تعیین مشخصه های مربوط به آرایه های نانولوله های کربنی از روش های مختلفی استفاده می شود که در ادامه به آن ها پرداخته می شود.

3-8-1-آنالیز ATR-FTIR

برای تعیین ساختار و شناسایی ترکیبات آلی، پیوندهای شیمیایی و شناسایی گروه های عاملی و ساختار مولکولی بکار می رود.

3-8-2-آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)⁵³

به منظور بررسی ریخت شناسی آرایه های نانولوله های کربنی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد.

3-8-3-آنالیز رامان (Raman)

طیف سنجی رامان یک تکنیک طیف سنجی بر اساس پراکندگی نور تکفام است که معمولاً از یک لیزر ناشی می شود. در این تکنیک، نور دچار پراکندگی غیرالاستیک می شود. پراکندگی غیر-الاستیک یعنی فرکانس فوتون ها در نور تکفام طی برهم کنش با یک نمونه تغییر می کند. فوتون های نور لیزر توسط نمونه جذب و باز نشر می شود. فرکانس فوتون های باز نشر شده نسبت به فرکانس اصلی تکفام به بالا یا پایین انتقال می یابد که اثر رامان نامیده شده است. این انتقال اطلاعاتی در مورد انتقال فرکانس ارتعاشی، چرخشی و سایر انتقال های فرکانس کم در مولکول ها به دست می دهد. طیف سنجی رامان می تواند برای مطالعه نمونه های جامد، مایع و گازی استفاده شود [43].

3-8-4-آنالیز ولتامتری پالس تفاضلی (DPV)⁵⁴

آنالیز ولتامتری پالس تفاضلی یک روش ولتامتری است که در آن جریان به عنوان تابعی از زمان و تابعی از پتانسیل بین شاخص⁵⁵ و الکتروده مرجع اندازه گیری می شود که به علت حساسیت

⁵³ Scanning electron microscopy

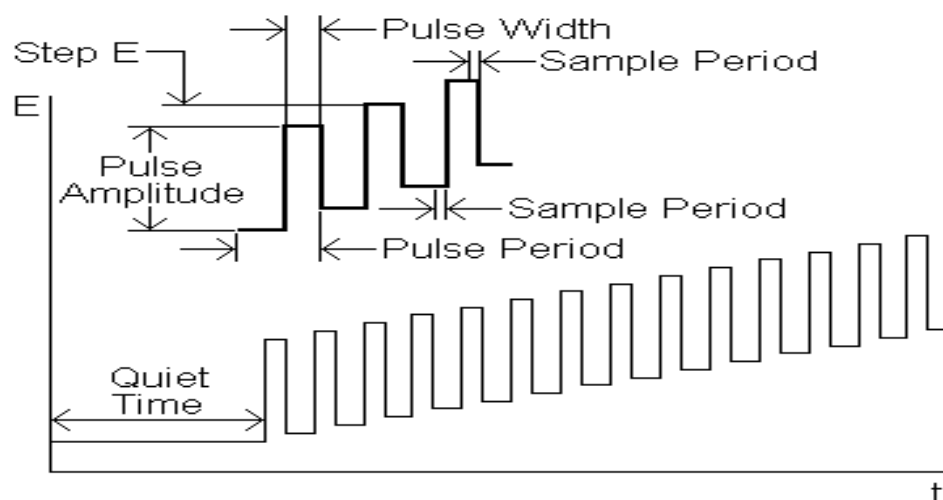
⁵⁴ Differential pulse voltammetry

⁵⁵ Indicator

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

بیشتر نسبت به سایر روش های پتانسیو استاتیک معمولاً در اندازه گیری های کمی استفاده می-گیرد. از آنجایی که در روش های ولتامتری غلظت گونه الکترو فعال ارتباط مستقیم با شار جریان فارادی دارد در نتیجه بهتر است از روش هایی استفاده گردد که در آنها جریان فارادی در بیشینه مقدار خود باشد. پتانسیل با تغییر پالس های دامنه تغییر می کند و جریان قبل و بعد از هر پالس ولتاژ اندازه گیری می شود. این اندازه گیری بر پایه ی الکتروشیمیایی است که بخاطر ساده بودن، ارزان بودن و زمان آنالیز کوتاه بسیار کارآمد است. کاربرد عمده ی آن در روش های تشخیص پزشکی⁵⁶ است و برای تشخیص مولکول های زیستی از آن استفاده می شود. در اینجا از این روش برای تشخیص و اندازه گیری سطح گلوکز استفاده می شود.

برای نیل به این هدف بهتر است شکل پتانسیل اعمالی مطابق شکل (4-4) به صورت پله ای تفاضلی اعمال شود. یعنی در ابتدا پتانسیل به صورت ناگهانی افزایش یابد تا سد انرژی پتانسیل برای انجام واکنش فارادی طی گردد و جریان فارادی به بیشینه مقدار خود برسد.



شکل (3-6) نحوه ی اعمال پتانسیل در آنالیز DPV

۳-۸-۵-طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS)⁵⁷

یکی از روش های بررسی سرعت خوردگی است. اساس کار این روش اندازه گیری امپدانس

⁵⁶ Bioanalytical

⁵⁷ Electrochemical impedance spectroscopy

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

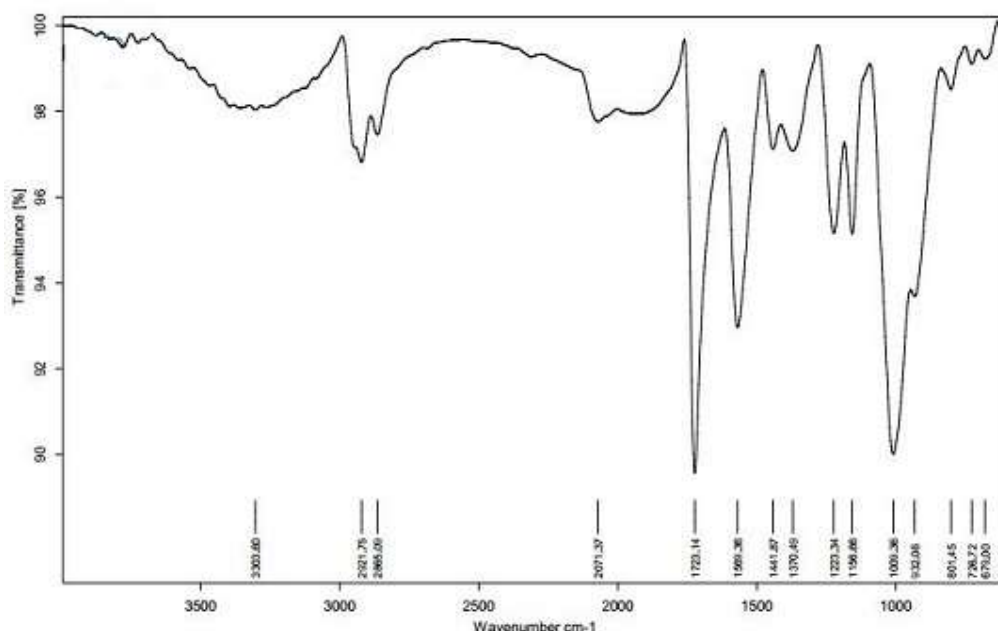
جریان متناوب در دامنه ای از فرکانس است. طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی ابزاری قدرتمندی است که در چند دهه اخیر به تکنیکی رایج جهت مشخصه یابی فرایند خوردگی، پارامترهای محافظت در برابر خوردگی و پوشش ها تبدیل شده است. این تکنیک الکتروشیمیایی غیر مخرب بوده و می تواند برای ارزیابی سینتیک خوردگی در یک محیط خورنده تسریع شده به ویژه برای پوشش ها به کار گرفته شود. در این روش پتانسیل کوچکی به صورت متغیر با زمان به نمونه اعمال شده و جریان اندازه گیری شده و امپدانس سیستم و زاویه ی امپدانس اندازه گیری می شود. این کمیت ها در ارتباط یا فرایند های الکتروشیمیایی، شیمیایی و فیزیکی پیل تفسیر میشوند.

فصل 4: نتایج و بحث

4-1-مقدمه

در این فصل نتایج تعیین مشخصه ها و آزمایش های الکتروشیمیایی ارائه می شود.

4-1-1-آنالیز اشعه ی فروسرخ

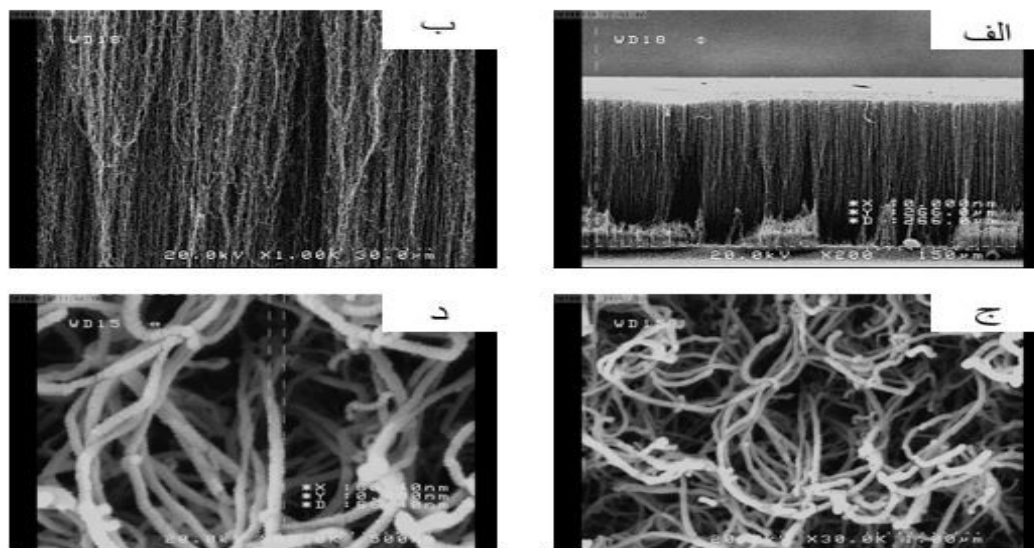


شکل (4-1) طیف ATR-FTIR الکترودهای PANI/VACNTs عامل دار شده با گروه های کربوکسیل

برای مشاهده ی گروه های عاملی CNT-OH از اشعه ی فروسرخ استفاده گردید. طیف FTIR نانولوله ها حاوی یک پیک در محل 1569cm^{-1} است که به پیوند دوگانه ی کربن-کربن نسبت داده می شود. حضور همزمان پیک پهن واقع در 3303cm^{-1} که معرف گروه هیدروکسیل است و پیک واقع در 1723cm^{-1} که به گروه کربونیل نسبت داده می شود نشان دهنده ی وجود کربوکسیل بر روی سطح نانولوله ها می باشد. پیک واقع در 1270cm^{-1} به پیوند یگانه ی کربن-اکسیژن مربوط است. آنالیز فروسرخ همچنین تا حد زیادی قادر به تشخیص گروه های پلی آنیلین نیز بوده است. پیک 2921cm^{-1} مربوط به گروه C-H، پیک 1569cm^{-1} مربوط به گروه C=C و پیک 1223cm^{-1} مربوط به گروه C-N

۴-۱-۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل (2-4) تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی را نشان می دهد. قطر متوسط آرایه ها بین 50 تا 100 نانومتر و طول آن ها نیز حدودا 80 تا 100 میکرومتر است. اندازه ی قطر آرایه هلدبا اندازه ی آنزیم قابل مقایسه است، در نتیجه برای اتصال کووالانسی آنزیم به سر آرایه ها مناسب هستند.



شکل (2-4) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از (الف و ب) سطح مقطع ، (ج و د) روی سطح VACNTs

۴-۱-۳- آنالیز طیف سنجی رامان

نتایج طیف سنجی رامان نانولوله های کربنی عامل دار شده در شکل (2-4) نشان داده شده است. آنالیز رامان انجام گرفته از نمونه هایی که برای ساخت الکترودها مورد استفاده قرار گرفتند به منظور مطالعه ی ساختار و خلوص آنها در شکل زیر آورده شده اند. بطور کلی پیک های VACNTs در محدوده $100-3000\text{ cm}^{-1}$ گزارش شده است. که در این روش سستز شدت بالاتر و پیک قوی تر در 1576 cm^{-1} ، مربوط به باند G

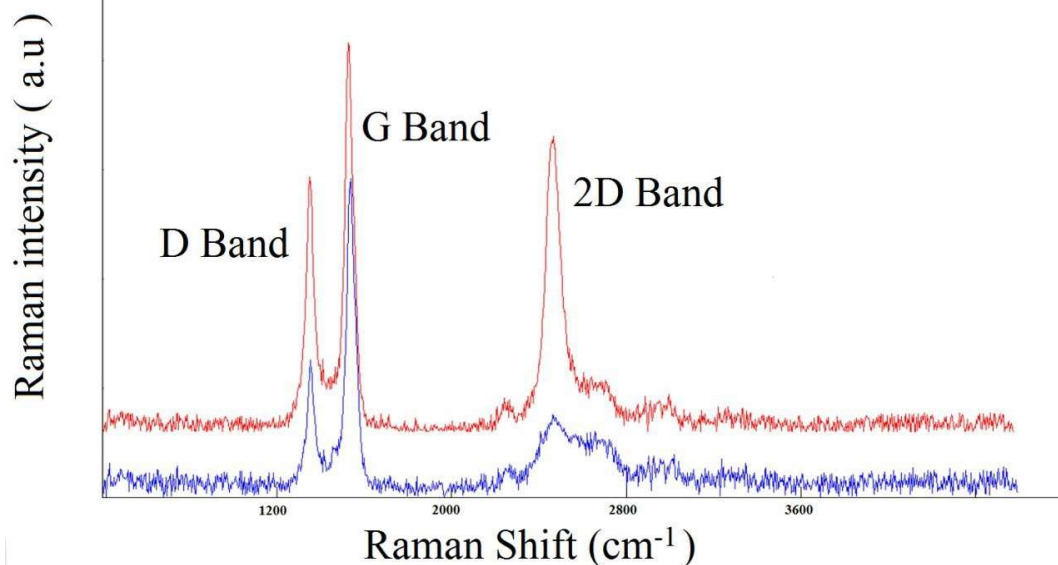
بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلازما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

گرافیت، نسبت به پیک در 1339 cm^{-1} ، مربوط به باند D ناشی از کربن آمورف، نشانگر آن است که آرایه سنتز شده دارای درصد بالاتری از نانولوله های نیمه هادی کریستاله با خلوص بالا می باشد.

برای مشتقات پایه کربنی همانند نانولوله های کربنی و گرافن یکی از مناسب ترین روش ها برای شناسایی ترکیب در کنار سایر روش های شناسایی اسپکتروسکوپی رامان می باشد. برای نانولوله های کربنی ظهور هر یک از قله های D، G و 2D نشان از حضور و یا عدم حضور گونه های کربنی و راندمان حضور آنها دارد. ظهور این قله ها در نواحی فرکانسی خاص که ناشی از تاثیر گونه های کناری بر فرکانس ارتعاش می باشد میتواند در شناسایی کیفی گونه بسیار موثر باشد.

همچنین فاکتور موثر دیگری که برای شناسایی در تکنیک رامان موثر است شدت قله های یاد شده است. قله D معمولا شکستگی ساختار و یا کامل نبودن فرآیند تشکیل نانولوله های کربنی را نشان میدهد و نسبت شدت $G/2D$ نشان دهنده میزان تشکیل نانولوله ها به صورت مجزا است. افزایش مقدار G نشان میدهد که با اینکه نانولوله ها به خوبی تشکیل شده اند تجمع پیدا کرده اند اما افزایش شدت 2D نشان از تشکیل نانولوله های مجزا با سطح تماس بالا دارد.

طیف رامان درج شده در تحقیق فوق نشان میدهد همراه با ماده سنتزی مورد نظر مقداری ناخالصی هم وجود دارد اما شدت بیشتر قله G نشان از راندمان تشکیل نانولوله ها در مقابل ساختارهای ناقص و شکست ها دارد (D/G 65/100) همچنین افزایش شدت قله 2D نسبت به حالت اول نشان از تشکیل نانولوله ها به صورت مجزا با افزایش زمان دارد.



شکل (3-4) طیف سنجی رامان الکترودهای VACNTs

۴-۱-۴-طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی

طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی رفتار انتقال الکترون و مقاومت الکتروده قبل و بعد از اصلاح با پلی آنیلین انجام شد. شکل زیر امپدانس الکتروده PANI/VACNT و الکتروده VACNT را در در میدان های نوسان^{۵۸} مختلف نشان می دهد. با توجه به آنچه در شکل می بینیم، در فرکانس های پایین، با اعمال پتانسیل گونه های موجود در محلول به سمت الکتروده با بار مخالف حرکت می کنند (گونه های مثبت به سمت الکتروده با بار منفی و گونه های منفی به سمت الکتروده با بار مثبت) تا زمانی که پتانسیل به حدی برسد که واکنش انجام شود و جریان ما به جریان از جنس فارادی تبدیل شود. در فرکانس های پایین، گونه ها فرصت کافی را دارند تا به سطح الکتروده با بار مخالف برسند و واکنش انجام شود. در اینجا، امپدانس واربرگ^{۵۹} خود را نشان می دهد و رابطه به صورت تقریباً خطی می شود (بعد موهومی و بعد حقیقی مقاومت در یک رابطه ی خطی نسبت به هم قرار می گیرند). در اینجا واکنش فارادی در حال انجام گرفتن است. با بالا بردن فرکانس، گونه ها زمان لازم برای انجام واکنش در سطح الکتروده به صورت کامل

⁵⁸ Amplitude

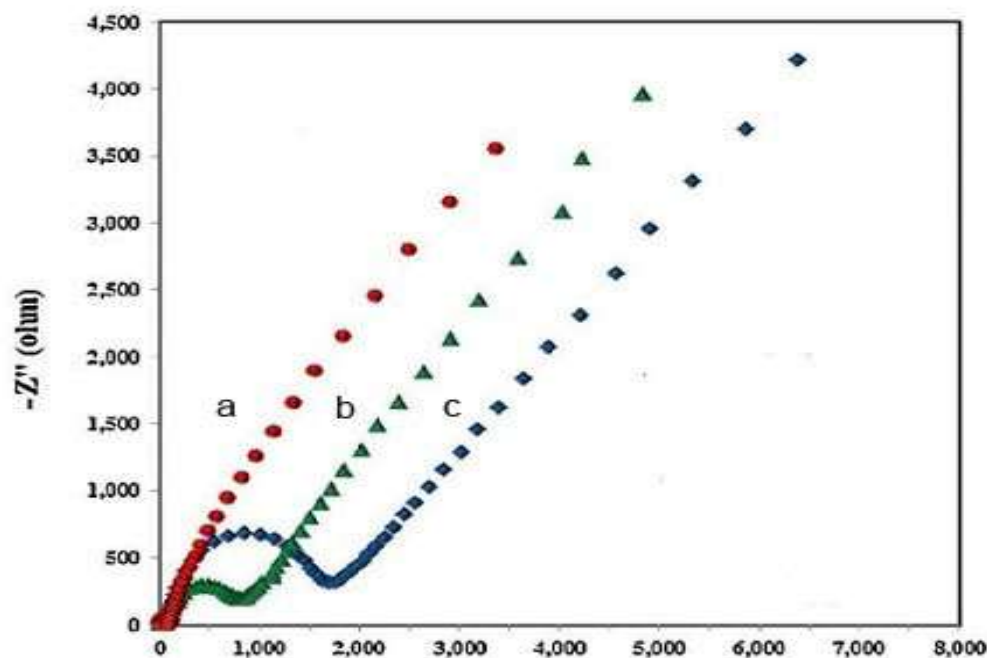
⁵⁹ Warburg

را ندارند. هرچه این فرکانس بالاتر برود، واکنش کمتر انجام می شود تا جایی که به مرحله ای می رسیم که به دلیل فرکانس بسیار بالا، گونه ها فرصت انجام واکنش در سطح را پیدا نمی کنند، واکنش فارادی انجام نمی شود و رابطه ی خطی بین بعد حقیقی و موهومی دیگر صدق نمی کند. در اینجا به نیم دایره ی نمودار می رسیم. در اینجا خازن تشکیل می شود و قبل از اینکه پتانسیل به حدی برسد که واکنش انجام شود، جهت حرکت گونه ها عوض می شود، در نتیجه هیچ واکنش و جریان فارادی نخواهیم داشت. این نرسیدن به مرحله ی واکنش مقاومت خازنی بین مرز مشترک⁶⁰ الکترو د و محلول را مشخص می کند. هرچه این دایره کوچکتر باشد، یعنی مقاومت بین مرز مشترک الکترو د و محلول کمتر است. در این شرایط، سیستم در فرکانس های بالا هم می تواند واکنش فارادی انجام دهد. با توجه به آنچه در شکل می بینیم، پس از اصلاح الکترو د با پلی آنیلین، میزان مقاوت خازنی در برابر انتقال بار کمتر است که این نشان دهنده ی بهبود انتقال الکترون است. همچنین، قله ی نمودار نشان دهنده ی مقاوت در برابر انتقال الکترون⁶¹ است. پس از اصلاح الکترو د، مقاوت در برابر انتقال الکترون نیز به میزان قابل توجهی کاهش یافته است.

⁶⁰ Interface

⁶¹ Charge transfer resistant

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلازما به عنوان الکترودهای زیست حسگر گلوکز

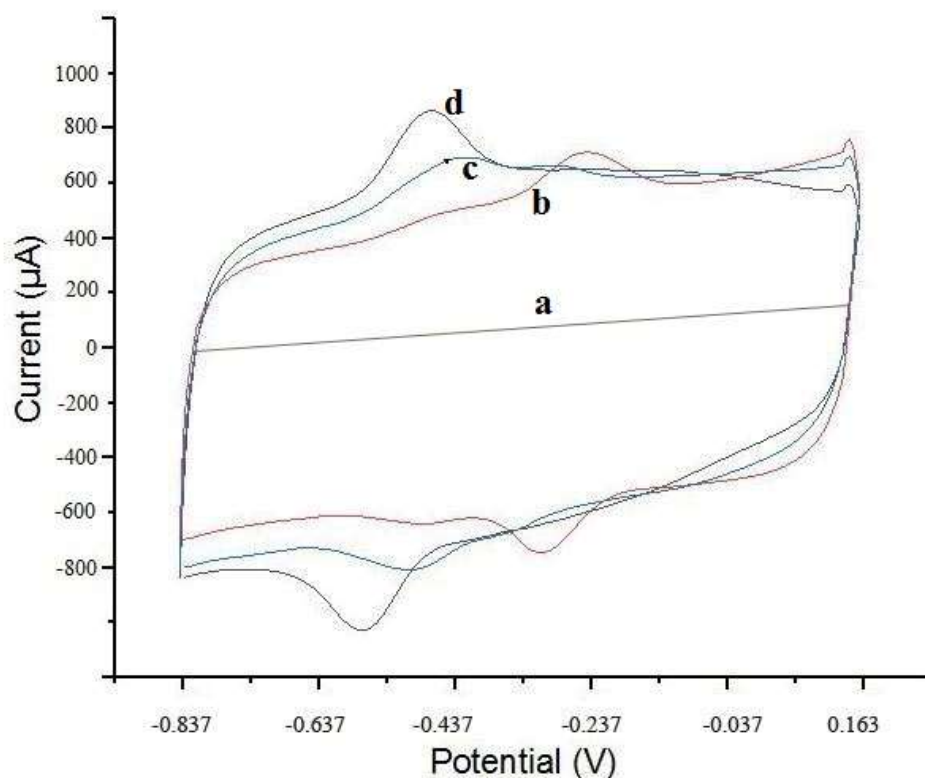


شکل (4-4) نتایج آزمایش امپدانس. (a) امپدانس واربرگ $^{1/2}$ (b) امپدانس الکترودهای PANI/VACNTs (c) امپدانس الکترودهای VACNTs

۲-۴- بررسی عملکرد زیست حسگری الکترودهای

۲-۴-۱- بررسی عملکرد با استفاده از نمودار ولتامتری

جهت بررسی نمونه های مختلف آماده شده و انتخاب بهترین نمونه، عملکرد آن ها جهت تشخیص گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شکل، نمونه ی b نسبت به نمونه های دیگر پتانسیل فرمال بیشتری را برای تشخیص گلوکز دارد، که این سبب کاهش انتخاب پذیری الکترودهای می شود. مقادیر بالای پتانسیل فرمال سبب کاهش انتخاب پذیری الکترودهای نسبت به گلوکز می شود، زیرا در این پتانسیل ها گونه های مداخله گر نظیر اسکوربیک اسید و اوریک اسید توانایی اکسید شدن پیدا می کنند و همین موضوع سبب ایجاد پیک اضافی در نمودار ولتامتری و اختلال در تشخیص گلوکز می شود.



شکل (4-5) بررسی عملکرد الکترودهای a,b,c,d جهت تشخیص آنزیم

جدول 6 پتانسیل فرمال و مقدار جدایی پیک ها (ΔE_p) پیک های اکسید-احیای آنزیم تثبیت شده روی نمونه ها را با استناد به بالا نشان می دهد. با توجه به جدول نمونه ی d نسبت به سایر نمونه ها ΔE_p کمتر و در نتیجه فرایند اکسید-احیای آنزیم برگشت پذیرتری دارد. پیک های آندی و کاتدی نمونه ی d نسبت به سایر نمونه ها در پتانسیل منفی تری ظاهر شده است. علاوه بر این، میزان افزایش جریان فارادی برای تشخیص گلوکز اکسیداز برای نمونه ی d از سایر نمونه ها بیشتر است جریان فارادی بیانگر تشخیص آنالیت توسط الکتروود است، هر چقدر میزان جریان فارادی بیشتر باشد، قابلیت الکتروود برای تشخیص آنالیت بیشتر است. همچنین، با در نظر گرفتن نسبت جریان پیک آندی به جریان پیک کاتدی این الکتروود که حدود یک است، می توان نتیجه گرفت فعالیت ریداکسی گلوکز اکسیداز تثبیت شده روی این الکتروود شبه برگشت پذیر است. در نتیجه، نمونه ی d به عنوان نمونه ی نهایی برای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز و

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

انجام ادامه ی آزمایشات انتخاب شد. جدول 6 پتانسیل فرمال و مقدار جدایی پیک ها (ΔE_p) پیک های اکسید-احیای آنزیم تثبیت شده روی نمونه ها را با استناد به شکل (4-5) نشان می دهد

جدول 6. بررسی و مقایسه ی عملکرد الکترودهای مختلف

نمونه	پتانسیل فرمال (ولت)	جدایی پیک ها (میلی ولت)
B	-0/2833	0/0609
C	-0/4691	0/078
D	-0/525	0/059

تفاوت در عملکرد انواع مختلف آرایه ها را می توان به قطر آرایه ها در واحد سطح نسبت داد. با توجه به اینکه در همه ی موارد تنها طول ثابتی از آرایه ها پس از ساییده شدن در معرض عامل دار شدن و تثبیت آنزیم قرار می گیرد، پس تغییر در ارتفاع نمی تواند عامل تعیین کننده برای عملکرد الکترو د باشد. آرایه های با قطر یکسان و طول های متفاوت عملکرد یکسانی را در مقابل تثبیت آنزیم نشان دادند. تغییر زمان لایه نشانی بخار شیمیایی عامل تغییر دهنده ی طول آرایه هاست. هر چقدر زمان این لایه نشانی بخار بیشتر باشد، طول آرایه های حاصل نیز بیشتر می شود.

از آنجا که روش لایه نشانی برای تمام الکترودها یکسان است و تنها زمان لایه نشانی برای آرایه ها با توجه به طول و چگالی آن ها متفاوت است، این عامل نیز به طور مستقیم با طول و چگالی آرایه ها متناسب است و در نتیجه نمی تواند عامل تعیین کننده باشد.

عامل تعیین کننده برای بررسی آرایه ها، قطر آرایه ها و یا به عبارتی چگالی آن ها در واحد سطح می باشد. به طور کلی، کاهش اندازه ی قطر الکترو د می تواند به طور گسترده ای سبب افزایش حساسیت و بهبود اندازه گیری های الکتروشیمیایی شود. برتری اصلی الکترودهایی با اندازه ی کوچکتر می تواند به تشکیل سریع میدان انتشار شعاعی⁶³ سه بعدی و کاهش مقاومت اهمی نسبت داده شود که همین سبب افزایش

⁶³ Radial diffusion field

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

سرعت انتقال جرم، افزایش چگالی جریان و همچنین افزایش نسبت سیگنال به نویز⁶⁴ می شود. این موارد انگیزه ی اصلی برای کاهش اندازه ی آرایه ها و حتی حرکت از الکترودهایی با اندازه ی میکرو به اندازه ی نانو می باشد.

چالش اصلی در رشد VACNTs کنترل اندازه ذرات کاتالیست می باشد که قطر و تعداد دیواره CNTs را تعیین می کند. تاکنون تکنیک های زیادی برای کنترل اندازه ذرات کاتالیست استفاده شده است. علاوه بر این پیش مراقبت کاتالیست تاثیر بسزایی بر روی رشد CNTs دارد.

عوامل موثر در رشد نانو لوله های کربنی بر اساس روش CVD عبارتند از: پایه، کاتالیست (نوع، ترکیب، ضخامت و اندازه ذرات)، منبع کربن شامل نوع و ترکیب گازها، نرخ و غلظت پیش ماده، دما و فشار. قابل کنترل ترین روش برای سنتز و رشد CNT با تعداد دیواره های معین و مشخص، تنظیم مشخصات کاتالیست شامل اندازه ذرات، ترکیب، ضخامت فیلم و همچنین بهینه کردن شرایط سنتز شامل دمای رشد و سرعت جریان گازهای فرآیند می باشد

حضور لایه بافر آلومینا از نفوذ به داخل زیر لایه جلوگیری کرده و زبری مناسب و محیطی برای سایت های هسته زایی کاتالیست ایجاد میکند. دانسیته سایت های هسته زایی تعیین کننده دانسیته آرایه رشد یافته است بطوری که می تواند به تولید آرایه با دانسیته بالا کمک کند. بطور کلی لایه پیوسته Fe به سایت های فعال شکسته شده و به طور همزمان SiO₂ موجود روی Si به جلوگیری از واکنش شیمیایی Si با کاتالیست کمک می کند زیرا Si خالص می تواند با کاتالیست های مختلف واکنش دهد و احتمالاً منجر به تشکیل اتم C در کاتالیست سیلیکات و C-silicate شود. بنابراین یک لایه خنثی و بی اثر از لحاظ شیمیایی مانند SiO₂ به رشد آرایه MWCNTs بلندتر با خلوص بیشتر کمک می کند.

اثر آلومینا به عنوان یک زیر لایه بررسی شده است. گزارش شده است که برهمکنش قوی بین Al₂O₃ و کاتالیست (عموما Fe) منجر به رشد CNT هایی با ارتفاع زیاد، حدود میلی متر، و قطر کمتر می شود. بطوریکه آلومینا به عنوان یک لایه واسطه موثر بین کاتالیست و زیرلایه برای رشد نانو لوله های طویل (super long CNTs) عمل می کند [11]

از دیگر پارامترهای بررسی شده برای کاهش قطر نانو لوله های رشد یافته می توان تغییر ضخامت لایه آلومینا اشاره کرد. گزارش شده است که برهمکنش قوی بین Al₂O₃ و کاتالیست (عموما Fe) منجر به رشد CNT

⁶⁴ Signal to noise ratio

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکتروده زیست حسگر گلوکز

هایی با ارتفاع زیاد، حدود میلی متر، و قطر کمتر می شود. بطوریکه آلومینا به عنوان یک لایه ی واسطه موثر بین کاتالیست و زیرلایه برای رشد super long CNTs عمل می کند [4]. رشد بسیار بیشتر نانو لوله های کربنی بر روی $\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Fe}$ نسبت به حالتی که پایه تنها شامل SiO_2/Si می باشد، گزارش شده است.

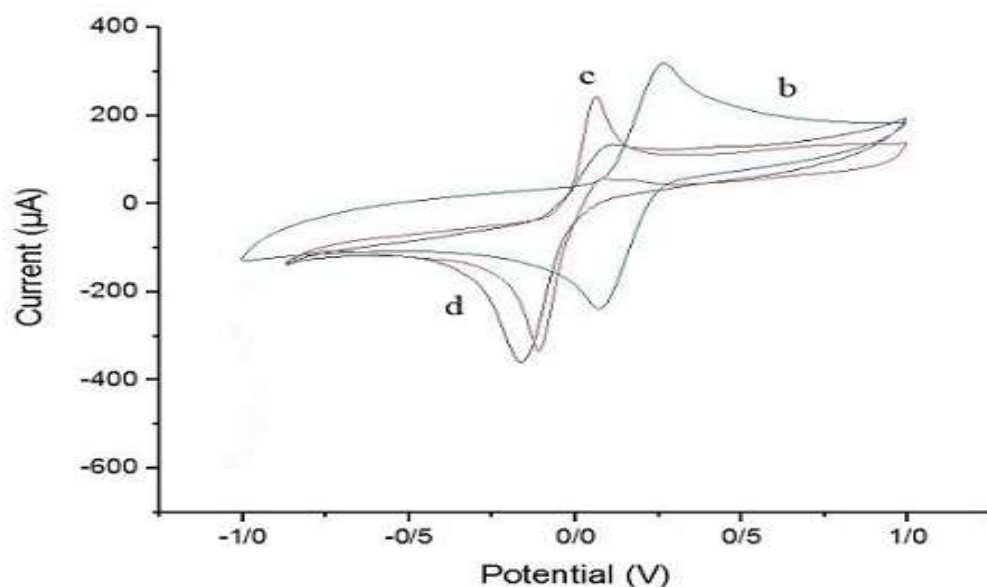
از دیگر تاثیرات حضور آلومینا به عنوان زیر لایه، تاثیر آن بر سرعت رشد نانو لوله ها و طول بدست آمده ی آنها می باشد. بطوریکه در این بررسی مشاهده شده است که در طی 5 دقیقه واکنش، آرایه ی سنتز شده بر روی کاتالیست حاوی آلومینا حدود $490\text{ }\mu\text{m}$ طول دارد که بسیار بالاتر از کاتالیست بدون آلومینا بوده که نشانگر سرعت بالاتر رشد در حضور آلومینا می باشد. همچنین حضور آلومینا منجر به تشکیل آرایه با دانسیته بالاتر و منظم تر می شود.

مقدار بار الکتریکی جابجا شده در فرایند اکسایشی گلوکز اکسیداز را می توان با انتگرال گیری از سطح پیک آندی آن به دست آورد. مساحت سطح پیک آندی الکتروده d نسبت به الکتروده a و c بیشتر است. این تفاوت رفتاری نشان دهنده ی آن است که قطر کمتر از یک سو باعث افزایش میزان جذب آنزیم و از سوی دیگر موجب تسریع و تسهیل شدن انتقال الکترون بین مرکز فعال آنزیم و سطح الکتروده شده است. بنابراین کاهش قطر آرایه ها از یک سو سبب کاهش پتانسیل فرمال و ΔE_p فرایند ریداکسی گلوکز اکسیداز و از سوی دیگر سبب بهبود انتقال الکترون از مرکز فعال آنزیم می شود.

۴-۲-۲- بررسی عملکرد الکتروده برای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز با استفاده از

آزمایش استاندارد

برای بررسی بیشتر و اطمینان از انتخاب نمونه ی بهتر، از بررسی با محلول استاندارد استفاده شد. محلول استاندارد استفاده شده، محلول 5 میلی مولار $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ در محلول 0/1 مولار KCl بود. دلیل انتخاب این ماده برای انجام تست استاندارد سینتیک بسیار راحت ماده برای انتقال الکترون است. در نتیجه، هر بی نظمی در انتقال الکترون، در صورت بهینه بودن شرایط آزمایش و سلول، می تواند به الکتروده نسبت داده شود. شکل (4-6) نتایج به دست آمده از آزمایش استاندارد برای سه نمونه الکتروده موجود با مساحت یکسان را نشان می دهد.



شکل (6-4) تست استاندارد برای نمونه های **b**, **c**, and **d** با اندازه ی قطر متفاوت

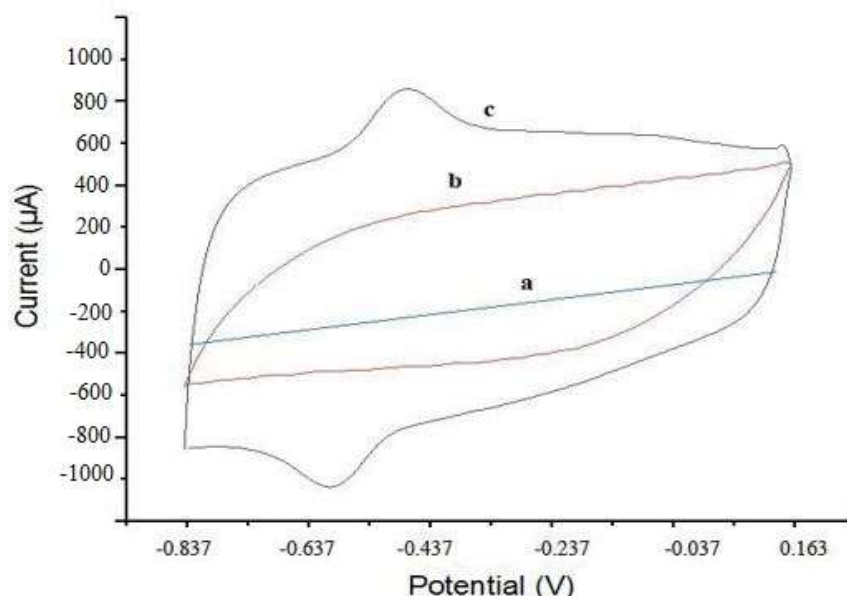
نمودارهای به دست آمده را می توان اینگونه تفسیر کرد. در نمونه ی **b**، پتانسیل فرمال به دست آمده مقدار بیشتری نسبت به دیگر نمونه ها دارد، در نتیجه در صورت حضور مداخله گر ها در محیط، انتخاب پذیری پایینی نسبت به سایر الکترودها دارد. در نتیجه این نمونه برای تشخیص گلوکز عملکرد ضعیف تری را دارد. در بین نمونه های **d** و **c**، پیک های آنودی و کاتدی برای نمونه ی **d** نسبت به نمونه ی **c** در مقادیر منفی تری ظاهر شده است و همچنین میزان ΔE_p به دست آمده برای نمونه ی **d** مقدار کمتری نسبت به کمیت مشابه در **c** دارد. در نتیجه، نمونه ی **d** برگشت پذیری بیشتری نسبت به نمونه ی **c** دارد. نتایج به دست آمده گواهی بر درستی اطلاعات به دست آمده از آزمایش ولتامتری و تاکید بر برتری نمونه ی **d** جهت انتخاب شدن به عنوان الکتروود برای انجام ادامه ی آزمایشات است.

جدول 7 بررسی و مقایسه ی عملکرد الکترودهای مختلف

نمونه	پتانسیل فرمال (ولت)	ΔE_p (میلی ولت)
B	0/1675	0/185
C	-0/025	0/27

۴-۳- تثبیت آنزیم بر روی سطح الکترودهای اصلاح شده

پارامترهای شیمیایی و انتقال الکترون آنزیم گلوکز اکسیداز برای الکترودهای PANI/VACNTs در محلول 0/1 مولار بافر فسفات با $\text{pH}=7$ بررسی می شود. برای این کار، ولتاگرام الکترودهای کربن شیشه ای، الکترودهای اصلاح شده ی آنزیمی و غیر آنزیمی با هم مقایسه می شوند. الکترودهای کربن شیشه ای با ظاهر براق و مقاومت مکانیکی بالا از لحاظ شیمیایی پایدار است. این الکترودها به سبب رفتار الکتروشیمیایی تکرارپذیر و جریان زمینه پایین در گستره وسیعی از پتانسیل ها به عنوان بستر تثبیت در مطالعات الکتروشیمیایی و ساخت الکترودهای زیست حسگرها به کار می رود. نمودار زیر عملکرد الکترودهای کربن شیشه ای، الکترودهای PANI/VACNTs غیر آنزیمی و الکترودهای GOx/PANI/VACNTs را در سرعت روبش 50 میلی ولت بر ثانیه نشان می دهد. الکترودهای کربن شیشه ای و PANI/VACNTs هیچگونه فعالیت اکسید و احیایی را در محلول بافر ندارد. نداشتن فعالیت الکتروشیمیایی نشان دهنده ی این است که هر پیک که پس از اضافه شده آنالیت ایجاد شود، صرفاً در اثر حضور آنالیت است و هیچگونه ماده ی شیمیایی دیگری در تشکیل آن دخالت ندارد. نمودار c که مربوط به الکترودهای اصلاح شده با پلی آنیلین است، یک جفت پیک اکسید و احیای برگشت پذیر را در پتانسیل -0/525 نشان می دهد که به مقدار ذکر شده در مرجع [44] که برابر 0/46- نزدیک است.



شکل (7-4) ولتاگرام (a) الکترودهای کربن شیشه ای برهنه (b) الکترودهای PANI/VACNTs/GOx (c) PANI/VACNTs در محلول بافر فسفات اکسیژن زدایی شده با سرعت روبش 50 میلی ولت بر ثانیه

جریان الکترودهای اصلاح شده ی PANI/VACNTs در مقایسه با الکترودهای کربن به میزان قابل ملاحظه ای افزایش یافته است که این بیانگر حضور نانولوله ها بر روی الکترودهای برهنه و افزایش چشمگیر جریان در سطح مشترک الکترودها و محلول است که به دلیل رسانایی بالای نانولوله ها و همچنین افزایش سطح می باشد. مقدار ΔE_p به دست آمده برابر 0/059 است. با توجه به مقدار ΔE_p برای این دو الکترودها و نسبت جریان پیک آنودی به کاتدی که حدود یک است، می توان فعالیت اکسایش-کاهش آنزیم تثبیت شده روی این الکترودها را شبه برگشت پذیر دانست.

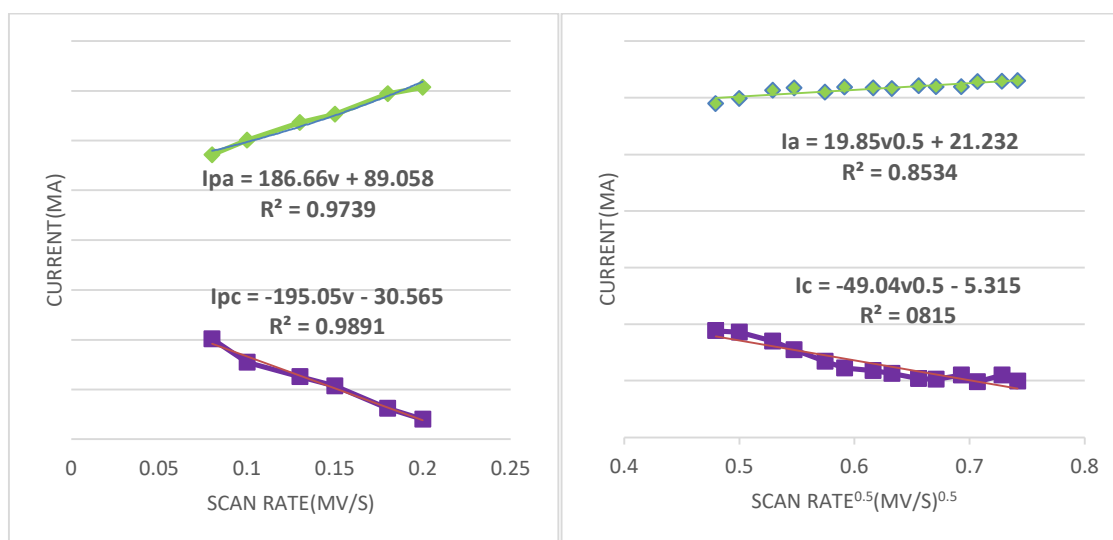
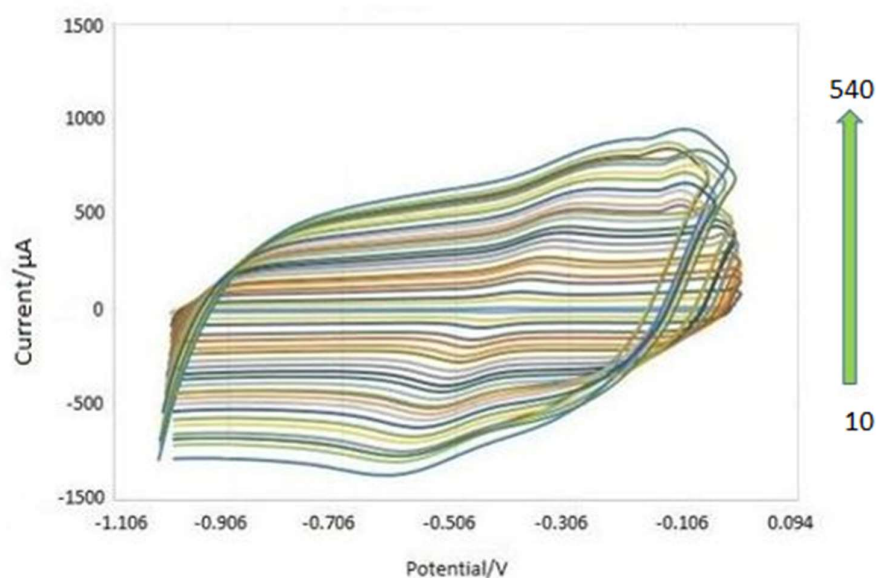
توانایی انتقال الکترون سریع GOx در سطح الکترودهای اصلاح شده با PANI/VACNTs به زیست سازگاری خوب، جهت گیری مناسب GOx، هدایت الکتریکی بالا و اثر هم افزایی PANI/VACNTs نسبت داده می شود.

۴-۴- تأثیر سرعت روبش بر فعالیت الکتروده اصلاح شده

برای بررسی تثبیت مؤثر آنزیم GOx روی سطح PANI/VACNTs ولتامتری چرخه ای الکتروده اصلاح شده با GOx/PANI/VACNTs در سرعت های روبش 350-380-400-450-480-500-520-540-300-280-250-230-200-170-150-130-100-80-50-40-30-20-10 را نشان می دهد همان طور که مشاهده می شود جریان الکتروده (مجموع جریان خازنی و جریان پیک) به سرعت روبش وابسته است و با افزایش آن افزایش می یابد. دلیل این وابستگی تغییر ضخامت لایه ی نفوذ است. در سرعت روبش بالا، لایه ی نفوذ زمان کمتری برای رشد و گسترش داشته و ضخامت آن در مقایسه با سرعت روبش پایین کمتر خواهد بود. با کاهش ضخامت لایه ی نفوذ، شار بار الکتریکی به سمت الکتروده افزایش یافته (و با توجه به تعریف جریان که عبارتست از مقدار بار انتقال یافته در واحد زمان) جریان افزایش می یابد. نتایج به دست آمده از نمودارهای زیر نشان می دهد که در محدوده 0/08 تا 0/2 در شدت جریان پیک اکسایشی و پیک کاهش با سرعت روبش پتانسیل (و نه با ریشه ی دوم آن) رابطه ی خطی دارند (شکل 7-4 ب). این رابطه ی خطی دلیل بر آن است که گونه ی الکتروفعال در سطح الکتروده به طور موثری تثبیت شده و توسط واکنش های سطحی⁶⁵ کنترل می شود [38]. از سرعت های بعد از 0/2 ولت بر ثانیه جریان پیک ها با جذر سرعت روبش رابطه خطی دارد که نشان می دهد پلیده نفوذ کنترل کننده واکنش انتقال الکترون است (شکل 8-4).

⁶⁵ Surface control

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلازما به عنوان الکتروود زیست حسگر گلوکز



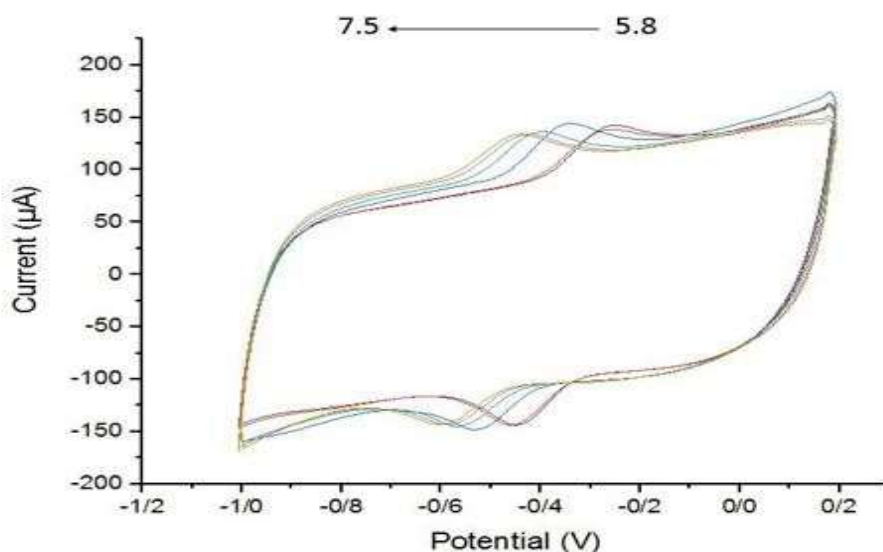
شکل (4-8) الف) ولتاگرام الکتروود GOx/PANI/VACNTs در سرعت های رشد 10 تا 540 میلی ولت بر ثانیه. ب) وابستگی جریان پیک آنودی و کاتدی الکتروود GOx/PANI/VACNTs به سرعت روبش. پ) وابستگی جریان پیک آنودی و کاتدی الکتروود GOx/PANI/VACNTs به جذر سرعت روبش.

۴-۵- تاثیر pH بر فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز

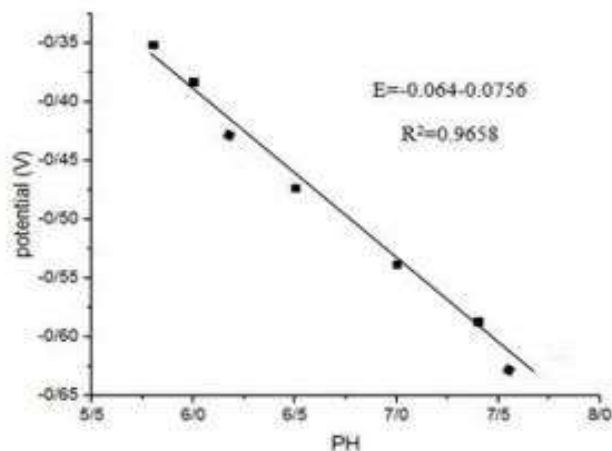
به منظور بررسی تعداد پروتون تبادل شده به ازای هر انتقال الکترون اثر pH محلول بر ولتاگرام الکتروود GOx/PANI/VACNTs مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در محدوده pH 5/8-7/8 در بافر فسفات

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

با $\text{pH}=7$ و غلظت 0/1 مولار انجام شد. با توجه به این شکل، در محدوده pH بررسی شده، پیک های اکسید-احیای GOx دیده می شود. با افزایش pH ، پتانسیل فرمال به سمت پتانسیل های منفی جابجا می شود. مطابق 0 پتانسیل فرمال با pH رابطه خطی دارد. شیب این نمودار، $-64 \text{ mV}/\text{pH}$ است که به مقدار تئوری ذکر شده در مرجع [45] $-58/6 \text{ mV}/\text{pH}$ در 25 درجه سانتی گراد برای فرآیند اکسید-احیای برگشت پذیر FAD/FADH_2 با تعداد پروتون (H^+) و الکترون (e^-) انتقالی مساوی، بسیار نزدیک است. با افزایش pH ، ΔE_p هم کاهش می یابد که بهبود سرعت انتقال الکترون و حرکت به سمت فرآیند برگشت پذیر را نشان می دهد.



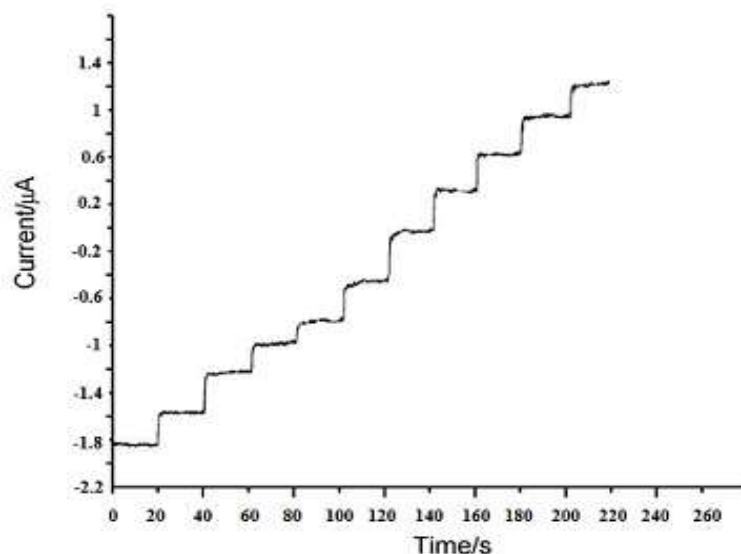
15 شکل (4-9) اثر pH محلول بافر بر ولتامتری چرخه ای الکترو د $\text{GOx}/\text{PANI}/\text{VACNTs}$ در سرعت روبش 50 میلی ولت بر ثانیه.



شکل (10-4) وابستگی پتانسیل فرمال الکترودها به pH در بافر فسفات 0/1 مولار

۶-۴- تشخیص گلوکز به روش آمپرومتری توسط الکترودهای اصلاح شده

در شکل (۱۱-۴)، پاسخ کروم آمپرومتری الکترودهای اصلاح شده ی PANI/VACNTs به افزایش متوالی محلول گلوکز به محلول بافر فسفات با pH=7 در پتانسیل بهینه ی -0/55 ولت می بینیم. جریان الکتروکاتالیستی حاصل از اکسایش گلوکز با افزودن متوالی آن به صورت پله ای افزایش می یابد. در این آنالیز، در واقع آب اکسیژنه ای که در اثر اکسایش گلوکز تولید می شود، تشخیص داده می شود. با توجه با پاسخ آمپرومتری، زمان لازم برای رسیدن به حالت تعادل پس از هر مرحله اضافه کردن گلوکز حدود 16 ثانیه است که نشان دهنده ی پاسخ نسبتاً سریع و پایدار الکترودهای اصلاح شده می باشد.

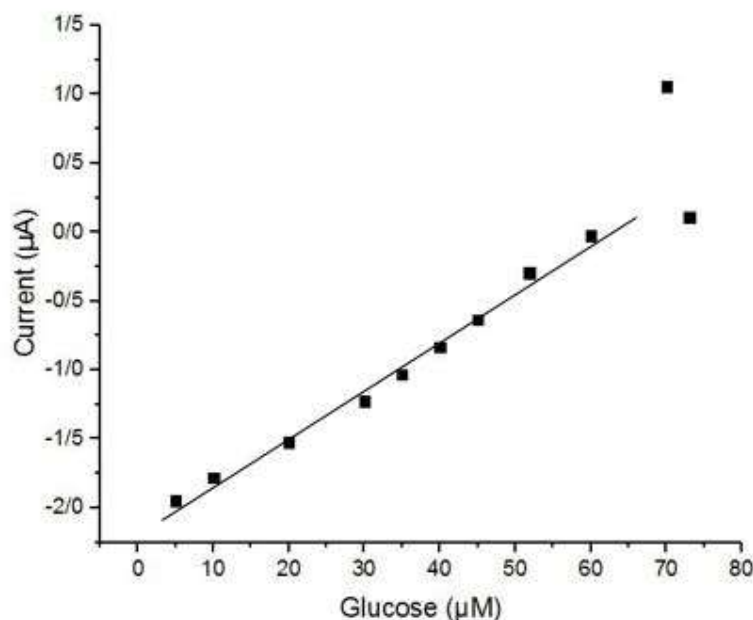


شکل (11-4) پاسخ آمپرومتری الکترو د GOx/PANI/VACNTs به افزایش متوالی محلول گلوکز به محلول بافر فسفات (0/1 مولار، pH= 7/0) در پتانسیل -0/55 ولت. غلظت گلوکز درون محلول بافر عبارتست از : 10 و 20 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 60 و 65 و 70 میکرومولار

در شکل (12-4) نمودار درجه بندی غلظت گلوکز نشان داده شده است. جریان اکسایش با غلظت گلوکز در محدوده غلظت 5 تا 65 میکرومولار رابطه خطی دارد. از تقسیم شیب این نمودار بر مساحت سطح الکترو د، حساسیت الکترو د PANI/VACNTs برابر $988 \mu\text{A}/\text{mM}.\text{cm}^2$ به دست آمده است که عملکرد عالی الکترو د برای تشخیص گلوکز را نشان می دهد.

برای به دست آوردن حد تشخیص الکترو د اصلاح شده از رابطه ی $DL = 3 \frac{\sigma}{m}$ استفاده می شود که در آن σ انحراف استاندارد پاسخ آمپرومتری پیش از اضافه کردن گلوکز، m شیب منحنی درجه بندی غلظت گلوکز و DL حد تشخیص الکترو د است. با قرار دادن انحراف استاندارد محاسبه شده برابر در راب طه، حد تشخیص 0/283 میکرومولار بدست می آید که مقدار بسیار پایینی است.

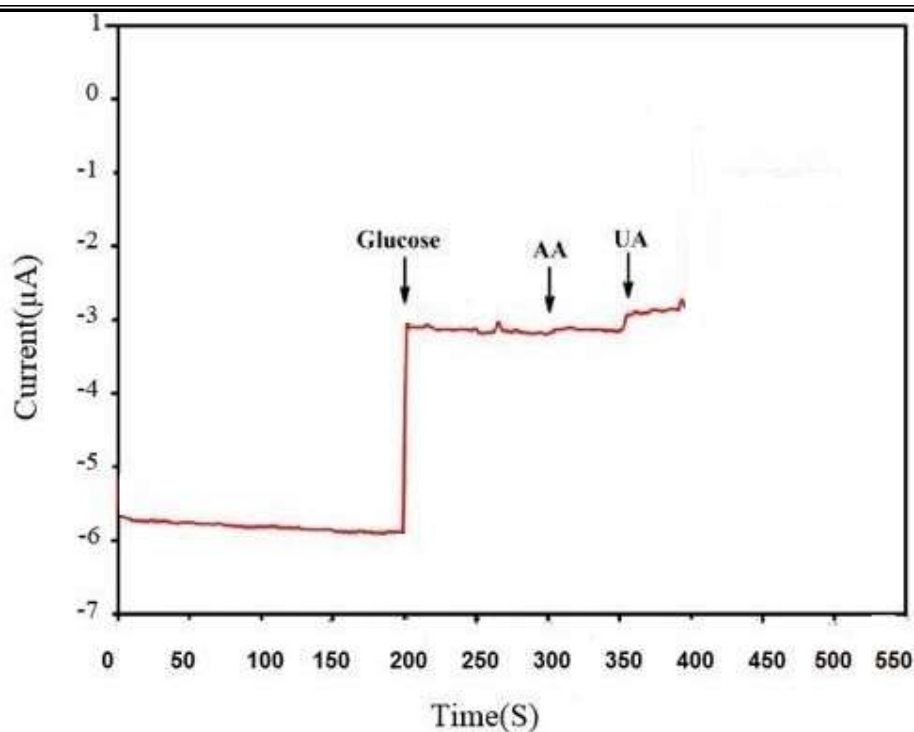
$$I (\mu\text{A}) = 0.0395(\mu\text{M}) - 2.1848$$



شکل (12-4) نمودار درجه بندی غلظت گلوکز درون محلول بافر فسفات و معادله ی خط آن

۷-۴- گزینش پذیری الکترودهای PANI/VACNTs نسبت به گلوکز

در خون انسان علاوه بر گلوکز، گونه های اکسنده ی دیگری نظیر اسید اوریک و اسید آسکوربیک وجود دارند. یک ویژگی مهم زیست حسگر گلوکز، قابلیت تشخیص گلوکز در بین این گونه ها است [46]. شکل (13-4) پاسخ الکترودهای GOx/PANI/VACNTs به افزایش متوالی 2/0 میلی مولار گلوکز و 0/1 میلی مولار اسید اوریک و اسید آسکوربیک نشان می دهد. در اثر اکسایش گلوکز یک جریان قابل توجه مشاهده می شود در حالی که افزایش اسید اوریک و اسید آسکوربیک تاثیری بر افزایش جریان نداشته اند. این رخداد بیانگر گزینش پذیری خوب الکترودهای نسبت به گلوکز در برابر اجزای مداخله گر است. پتانسیل بهینه برای انجام این آزمایش 0/55- ولت است.



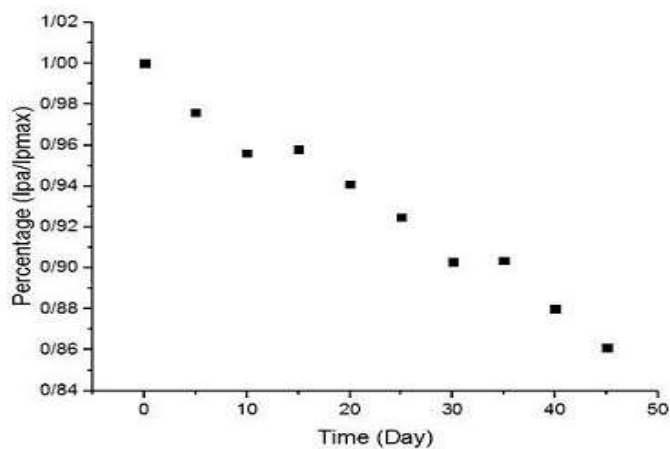
شکل (13-4) پاسخ آمپرومتری الکترو د GOx/PANI/VACNTs به افزایش متوالی 2 میلی مولار گلوکز، 0/1 میلی مولار آسکوربیک اسید و 0/1 میلی مولار اوریک اسید درون محلول بافر در پتانسیل 0/55- ولت

۴-۸- پایداری الکترو د اصلاح شده با پلی آنیلین

شکل (14-4) پایداری بلند مدت الکترو د GOx/PANI/VACNTS را نشان می دهد که با اندازه گیری پیک کاتدی آن حدود هر 5 روز اندازه گیری شده است. جریان کاتدی پس از گذشت 45 روز به 0/86 درصد اولیه ی خود رسیده است. این بدان معناست که آنزیم گلوکز اکسیداز فعالیت اکسایش - کاهش خود را به خوبی حفظ کرده است. آرایه های نانولوله های کربن به دلیل داشتن مساحت سطح بالا، قابلیت انتقال الکترون و برقراری برهمکنش مناسب با آنزیم، نقش مهمی در حفظ فعالیت آنزیم ایفا می کنند. پایداری الکترو د توسط ولتامتری چرخه ای نیز بررسی شد. به این منظور 120 ولتامتری چرخه ای با سرعت 50 میلی ولت بر ثانیه در محدوده ی 1- تا 0 به صورت پیاپی اعمال و میزان کاهش جریان پیک کاتدی اندازه

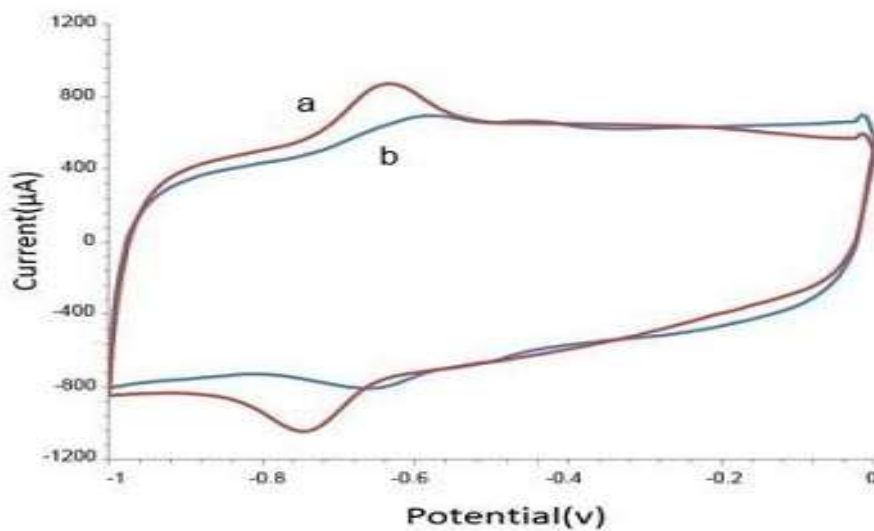
بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

گیری شد. همانطور که از شکل (4-15) قابل مشاهده است، پس از این تعداد چرخه، جریان پیک کاندی حدود 20 درصد کاهش داشت.



شکل (4-14) پایداری جریان پیک کاندی الکترو د GOx/PANI/VACNTs بعد از

گذشت 45 روز نسبت به جریان اولیه



شکل (4-15) (a) ولتامتری الکترو د PANI/VACNTs. (b) ولتامتری PANI/VACNTs بعد از 160 چرخه ی متوالی

4-9- مقایسه عملکردی الکترودهای اصلاح شده با پلی آنیلین

پارامترهای زیست حسگری الکترودهای GOx/PANI/VACNTs و الکترودهای مشابه آن، در جدول 8 آورده شده است. با توجه به جدول مشاهده می شود که GOx/PANI/MWCNTs حساسیت بالا، محدودیت شناسایی پایین، پایداری و گزینش پذیری خوبی نسبت به گلوکز دارد.

جدول 8. مقایسه عملکرد الکترودهای با سایر الکترودهای مشابه

مرجع	ماده الکتروده	حساسیت ($\frac{\mu A}{mM.cm^2}$)	محدوده خطی (میلی مولار)	حد تشخیص (میکرو- مولار)
[47]	Gox/Au and polyaniline nanocomposite	4/18	0/001-0/08	50
[48]	Gox/PANI/Patinium	50/2	0/16-1	0/25
[49]	GOx/Au-NPs/PANI	5/36	0/6-01/5	4/5
[50]	GOx/PANI/Fe ₃ O ₄ /Graphene	47	0/0067- 1/29	2/22
این پژوهش	GOx/PANI/VACNT	988	0/005 -0/065	0/283

فصل 5: نتایج و بحث

1-5- نتیجه گیری

در این پژوهش آرایه های نانولوله های کربنی به روش CVD سنتز شده و به روش الکتروشیمیایی با پلی آنیلین پوشانده شده و جهت سنجش میزان گلوکز استفاده شدند. پس از زدودن سر آرایه ها از پلیمر و عامل دار کردن آن ها به روش پلاسما، گروه های عاملی کربوکسیلیک اسید در سر آرایه ها ایجاد شدند که همین باعث اتصال کووالانسی بهتر آنزیم بر سر آرایه ها و افزایش پایداری الکترودهای نانولوله های کربنی توسط پلاسمای با مانع دی الکتریک (DBD) در محیط بخار آب/ هوا در دمای 70°C عامل دار شدند. بیشترین گروه های عاملی در مدت زمان 4 دقیقه ایجاد شدند. نمونه های مختلف با اندازه ی مختلف قطر آرایه ها برای تثبیت آنزیم به کار برده شدند و در نهایت، پس از انجام آزمایش های الکتروشیمیایی، نمونه ی با چگالی پایین تر به عنوان نمونه ی نهایی و برای انجام اندازه گیری های بعدی انتخاب شد. با انجام آزمایش های ولتامتری چرخه ای، افزایش جریان و بهبود فرایند انتقال الکترون برای الکترودهای اصلاح شده با پلی آنیلین نسبت به الکترودهای اصلاح نشده نشان داده شد. حضور پلی آنیلین سبب کاهش پتانسیل فرمال، افزایش میزان برگشت پذیری و میزان انتقال الکترون در واکنش اکسایش-کاهش آنزیم شده اند. افزایش pH موجب انتقال پیک های ردوکسی آنزیم به پتانسیل های منفی تر شد. به عبارت دیگر، علاوه بر الکترون ها پروتون ها نیز در واکنش آنزیم شرکت داشته اند. نتایج آزمایش های ولتامتری چرخه ای در سرعت های روبش مختلف، واکنش شبه برگشت پذیر اکسید-احیای آنزیم را نشان داده است. همچنین این نتایج نشان می دهد که در تمام سرعت های روبش، واکنش های سطحی فرایند انتقال الکترون را کنترل می کند. در نتیجه، پدیده نفوذ مواد از سطح الکترودها به درون الکترولیت و بالعکس، به سرعت انجام می شود. بررسی اثر pH روی ولتامتری چرخه ای نمونه، نشان می دهد که پیک های آندی و کاتدی آنزیم در محلول های اسیدی فروکش می کند. این پدیده، بیانگر غیرفعال شدن GOx در pH های اسیدی است. با افزایش pH، خاصیت انتقال الکترون و برگشت پذیری واکنش اکسید-احیای آنزیم بهبود می یابد. الکترودهای پایداری قبل توجهی را پس از تعداد چرخه های بالا نشان داد و همچنین پایداری بلند مدت آن پس از گذشت مدت زمان های مشخص اندازه گیری شد.

بررسی الکترودهای اصلاح شده با آرایه های عمودی نانولوله های کربنی عامل دار شده به وسیله ی پلاسما به عنوان الکترو د زیست حسگر گلوکز

آزمایش های کرو نو آمپرومتری بیانگر حساسیت بالای الکترو د اصلاح شده و حد تشخیص پایین نسبت به گلوکز است. عدم تغییر محسوس جریان در برابر مداخله گر های اسید آسکوربیک و اسید اوریک در آمپروگرام ها، گزینش پذیری خوب این الکترو د را نسبت به گلوکز نشان می دهد.

نتایج آزمایش امپدانس بیانگر کاهش چشمگیر مقاومت الکترو د در برابر انتقال الکترون پس از اصلاح الکترو د با پلی آنیلین است. نتایج آزمایش همچنین نشان می دهد که رفتار خطی حتی در نوسان های بالا نیز مشاهده می شود که این بیانگر این است که الکترو د حاصل شده گزینه ی خوبی برای اندازه گیری امپدانس در نوسان های بالاست و در محدوده ی خطی انتقال الکترون از مکانیزم پراکندگی تبعیت می کند.

بنابراین به طور کلی می توان نتیجه گرفت پلیمر رسانا علاوه بر بهبود تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز و پایداری آن، فرایند انتقال مستقیم الکترون را نیز تسریع و تسهیل نموده اند. در واقع این پلیمرها با فراهم آوردن ریز محیط مناسب برای تثبیت گلوکز اکسیداز، موجب حفظ فعالیت ریداکسی آن در بلند مدت شده اند.

2-5-پیشنها دها

به منظور ادامه ی این پژوهش، می توان پیشنهاد های زیر را مورد توجه قرار داد:

1. به منظور بهبود خصوصیات الکترو د، از پلیمر های رسانای دیگری نظیر پلی پیرو ل استفاده شود.
2. به جای استفاده از تنها یک پلیمر رسانا، در صورت امکان از ترکیبی از پلیمر های رسانا استفاده شود و نتایج مقایسه شوند.
3. تلاش برای بیشتر کردن چگالی آرایه ها در واحد سطح قبل از اصلاح و بررسی نتایج

References

- [1] T. Vo-Dinh, B. Cullum, J. Fresenius, Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *J Anal Chem* 366 (2000) 540-551
- [2] F. A. Armstrong, Recent development in dynamic electrochemical studies of adsorbed enzymes and their active sites, *Curr Opin Biotechnol* 9 (2005) 110-117.
- [3] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, *Anal Chim Acta* 400 (1999) 91-108
- [4] Lawal, Abdulazeez T. "Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors." *Materials Research Bulletin* 73 (2016): 308-350.
- [5] Zhang, Wei-De, et al. "A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on NiO-modified multi-walled carbon nanotubes." *Microchimica acta* 168.3-4 (2010): 259-265.
- [6] Naseh, Masoud Vesali, et al. "Fast and clean functionalization of carbon nanotubes by dielectric barrier discharge plasma in air compared to acid treatment." *Carbon* 48.5 (2010): 1369-1379.
- [7] M. Vesali-Naseh, Plasma functionalization of carbon nanotubes, M.S. thesis, Chem Eng Dept, Tehran Univ, Tehran, Iran, 2009.
- [8] L. C. Clark and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 102, pp. 29-45, 1962
- [9] K. E. Toghill and R. G. Compton, "Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 5, no. 9, pp. 1246-1301, 2010
- [10] Lin, Yuehe, et al. "Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles." *Nano letters* 4.2 (2004): 191-195.
- [11] Jiang, Liao-Chuan, and Wei-De Zhang. "A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on CuO nanoparticles-modified carbon nanotube electrode." *Biosensors and Bioelectronics* 25.6 (2010): 1402-1407.

-
- [12] Kim, Wan-Sun, et al. "A flexible, nonenzymatic glucose biosensor based on Ni-coordinated, vertically aligned carbon nanotube arrays." *RSC Advances* 4.89 (2014): 48310-48316.
- [13] Al Mamun, Khandaker A., et al. "Vertically aligned carbon nanofiber based biosensor platform for glucose sensor." *International Journal of High Speed Electronics and Systems* 23.01n02 (2014): 1450006.
- [14] K. Balasubramanian, M. Burghard, Biosensors based on carbon nanotubes, *Anal Bioanal Chem* 385 (2006) 452-468
- [15] S. Banerjee, T. Hemraj-Benny, S. S. Wong, Covalent surface chemistry of single-walled carbon nanotubes, *Adv Mater* 17 (2005) 17-29
- [16] O. alizadeh Sahraei, Functionalized carbon nanotubes for chemical gas sensor, M.S. thesis, Chem Eng Dept, Tehran Univ, Tehran, Iran, 2009.
- [17] A. Hirsch, Functionalization of single-walled carbon nanotubes, *Angew Chem Int Ed* 41 (2002) 1853-1859
- [18] F. Pourfayaz, Functionalized carbon nanotubes for polymer nanocomposites, Ph.D thesis, Chem Eng Dept, Tehran Univ, Tehran, Iran, 2011
- [19] J. H. Kim, M. J. Song, C. J. Lee, J. H. Lee, A comparative study of electrochemical and biointerfacial properties of acid- and plasma-treated singlewalled carbon-nanotube-film electrode systems for use in biosensors, *Carbon* 52 (2013) 398-407.
- [20] Azimi, S., Farahani, A., & Sereshti, H. (2020). Plasma-functionalized Highly Aligned CNT-based Biosensor for Point of Care Determination of Glucose in Human Blood Plasma. *Electroanalysis*, 32(2), 394-403.
- [21] F. F. Chen, Introduction to plasma physics, 1st ed., Plenum Press, New York, 1974
- [22] A. Fridman, Plasma chemistry, Cambridge university press, 2008
- [23] M. S. Haji-Tarverdi, Plasma Catalytic Conversion of Methane, Ph.D. thesis, Chem Eng Dept, Tehran Univ, Tehran, Iran, 2006.
- [24] Y. S. Chen, J. H. Huang, C. C. Chuang, Glucose biosensor based on multiwalled carbon nanotubes grown directly on Si, *Carbon* 47 (2009) 3106-3112.

- [25] A. M. Showkat, K. P. Lee, A. I. Gopalan, S. H. Choi, Y. C. Nho, Dispersion of gold nanoparticles into thiol-functionalized carbon nanotubes by γ -radiation, *Diam Relat Mater*, 16 (2007)1688-1692.
- [26] Solanki, P.R., Kaushik, A., Agrawal, V.V. and Malhotra, B.D., 2011. Nanostructured metal oxide-based biosensors. *NPG Asia Materials*, 3(1), p.17.
- [27] S. M. Golabi, An introduction to electroanalytical chemistry, 6th ed, Tabriz, Sotudeh, 2011
- [28] K. E. Toghill and R. G. Compton, "Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation," *Int. J. Electrochem. Sci*, vol. 5, no. 9, pp. 1246–1301, 2010
- [29] Z. Zhu, L. Garcia-Gancedo, A. J. Flewitt, H. Xie, F. Moussy, and W. I. Milne, "A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: Carbon nanotubes and graphene," *Sensors*, vol. 12, no. 5, pp. 5996–6022, 2012
- [30] X. Zhang, H. Ju, and J. Wang, *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, 1th ed. Elsevier, 2008
- [31] F. Azari, M. Habibi-Rezaei, S. Hosseinkhani, K. Khaje, A. Golestani, M. Miroliaei, M. Nemat-Gorgani, *Applied Enzymology*, 1st ed, Tehran Univ Press, 2008.
- [32] S. Sakka, *Handbook of sol-gel science and technology*. 1. Sol-gel processing, Kluwer academic publisher, USA, 2005.
- [33] B. D. Malhotra, *Advances in Biosensors*, 1st ed, USA, JAI Press INC, 2003.
- [34] A. Naseri, Glucose biosensors, *Nano Tech Mag*, 10 (2013) 34-39.
- [35] S. Sajjadi, Direct electron transfer of choline oxidase using carbon nanotubes, Ph.D thesis, I B B, Tehran Univ, Tehran, Iran, 2011
- [36] H. N. Zhang, Z. Y. Guo, P. P. Gai, Research progress in protein film voltametry, *Chin J Anal Chem* 37(2009) 461-465
- [37] A. J. Bard, *Electroanalytical chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1982
- [38] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J Electroanal Chem* 101 (1979) 19-28.

- [39] W. Yang, P. Thordarson, J. J. Gooding, S. P Ringer, F. Braet, Carbon nanotubes for biological and biomedical applications, *Nanotechnol* 18 (2007) 412001-412012.
- [40] Princeton Instruments, “Raman Spectroscopy Basics - Application Note,” *Internet*: <http://content.piacton.com/Uploads/Princeton/>, pp. 1–5, 2012.
- [41] F. Hu, S. Chen, C. Wang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Xiang, and C. Wang, “ZnO nanoparticle and multiwalled carbon nanotubes for glucose oxidase direct electron transfer and electrocatalytic activity investigation,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 72, no. 3–4, pp. 298–304, 2011
- [42] Farahani, A., Sereshti, H., Tashakori, C., & Azimi, S. 7th Iranian Biennial Chemometrics Seminar, 30-31 October 2019.
- [43] Y. L. Yao, K. K. Shiu, Direct electrochemistry of glucose oxidase at carbon nanotube-gold colloid modified electrode with poly(diallyldimethylammonium chloride) coating, *Electroanalysis* 20 (2008) 1542-1548
- [44] Xian Y, Hu Y, Liu F, Xian Y, Wang H, Jin L. Glucose biosensor based on Au nanoparticles–conductive polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006 Apr 15;21(10):1996-2000.
- [45] Hoa, D.T., Kumar, T.S., Punekar, N.S., Srinivasa, R.S., Lal, R. and Contractor, A.Q., 1992. A biosensor based on conducting polymers. *Analytical chemistry*, 64(21), pp.2645-2646.
- [46] Mazeiko, V., Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanaviciene, A., Balevicius, Z. and Ramanavicius, A., 2013. Gold nanoparticle and conducting polymer-polyaniline-based nanocomposites for glucose biosensor design. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 189, pp.187-193.
- [47] Nguyen, H.B., Ngo, T.T.T., Nguyen, N.T., Dang, T.T.H., Do, P.Q., Nguyen, X.N., Nguyen, X.P., Phan, H.K. and Phan, N.M., 2012. Graphene patterned polyaniline-based biosensor for glucose detection. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(2), p.025011.