

ساخت حسگر زیستی مبتنی بر نانوساختار پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره جهت تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز به منظور سنجش گلوکز خون در بیماران دیابتی

مهسا مهدوی نیا^۱، غلامرضا کیانی*^۱، ایوب کریم‌زاد قویدل^۲

^۱ ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده شیمی، گروه شیمی آلی و بیوشیمی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، گروه مهندسی مکانیک

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۰

چکیده

در تحقیق حاضر، یک حسگر زیستی با استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز، جهت اندازه‌گیری میزان گلوکز موجود در خون بیماران دیابتی ساخته شد. حسگر زیستی تولید شده از نوع آمپرومتریک بوده و در آن به ترتیب از پلی‌آنیلین و نانوذرات نقره به عنوان تثبیت‌کننده آنزیم و افزایش‌دهنده حساسیت حسگر زیستی بهره گرفته شد. مشخصات نمونه تهیه شده، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز EDS مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات ساختارشناسی نشان داد که لایه نانوکامپوزیتی پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره، به طور یکنواختی سطح آنزیم را پوشانده است. در شرایط ارزیابی آزمایشگاهی، در محدوده غلظت ۶۰-۱۶۰ mg/dl، خطیت قابل‌قبولی با حساسیت nA.dl/mg ۱/۳۸ و پاسخ زمانی ۸ ثانیه حاصل شد. همچنین خروجی حسگر زیستی برای نمونه واقعی خون در دمای C ۳۵-۲۰ و محدوده غلظت گلوکز ۷۰-۱۶۰ mg/dl، کاملاً خطی همراه با حساسیت nA.dl/mg ۱/۶ بود که نسبت به نمونه‌های پیشین بهبود ۱۴ درصدی داشت. براساس آنالیزهای آماری، خروجی جریان الکتریکی برای این حسگر زیستی مستقل از فاکتورهای دما و نیز pH خون بوده که نشان می‌دهد حسگر زیستی طراحی شده با موفقیت می‌تواند در موارد کلینیکی نیز به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: حسگر زیستی، دیابت، تثبیت آنزیم، پلی‌آنیلین، نانوذرات نقره

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: gr.kiani@tabrizu.ac.ir

مقدمه

امروزه اندازه‌گیری و تشخیص نشانگرهای زیستی در بدن انسان از اهمیت بسیاری برخوردار هستند (۱۰ و ۱). بمنظور اندازه‌گیری پارامترهای حیاتی بدن انسان، از حسگرهای زیستی استفاده می‌شود (۱۰). حسگرهای زیستی ابزارهای تحلیلی هستند که از یک عنصر زیستی متصل به یک مبدل تشکیل شده‌اند و از طریق واکنش‌های بیوشیمیایی بواسطه آنزیم‌ها، نشانگر زیستی مدنظر را آشکار می‌کنند (۱۰، ۱۹ و ۲۰).

دیابت یک بیماری مزمن و تهدیدکننده زندگی بشر شناخته می‌شود (۱۹). برای نظارت منظم بر میزان گلوکز خون و در نتیجه کاهش عوارض ناشی این بیماری، بکارگیری حسگرهای زیستی گلوکز مبتنی بر آنزیم، یکی از مناسب‌ترین راه‌های پایش گلوکز بعنوان یک نشانگر زیستی است (۱۷). حسگر زیستی گلوکز بدلیل مزایایی همچون سرعت بالا، دقت و عملکرد ساده نظارت بر سطح آنالیت در خون، اهمیت زیادی در تشخیص و کنترل دیابت دارند (۳ و ۱۷). در این حسگرهای زیستی، تعیین غلظت گلوکز باتوجه به واکنش اکسایش/کاهش انجام شده روی سطح الکتروود انجام می‌شود (۲۶).

در بین انواع مختلف حسگرهای زیستی موجود، مبدل‌های الکتروشیمیایی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند و به لحاظ تجاری توسعه یافته‌اند (۴). از روش‌های متداول در مبدل‌های الکتروشیمیایی می‌توان به روش آمپرومتریک، پتانسیومتری و هدایت-سنجی اشاره نمود (۱۰ و ۲۰). در حال حاضر، تحقیقات گسترده‌ای بر روی شناسایی آمپرومتریک گلوکز متمرکز شده‌اند (۵، ۹ و ۲۸). در حسگرهای زیستی آمپرومتریک، جریان تولید شده در نتیجه انتقال الکترون‌ها حین فرایند اکسایش/کاهش عنصر زیستی در پتانسیل ثابت بین الکتروود مرجع و الکتروود کار اندازه‌گیری می‌شود و رابطه‌ی بین جریان اندازه‌گیری شده و غلظت گلوکز (عنصر زیستی) یک رابطه‌ی خطی می‌باشد (۳۲).

پیشرفت‌های اساسی در نانوفناوری افتح‌های جدیدی را برای کاربرد نانومواد در حوزه‌های مختلف گشوده است (۲۳ و ۳۲). در حسگرهای زیستی، استفاده از نانومواد، بعنوان یک بستر برای اصلاح سطح الکتروود و ایجاد یک منطقه زیست‌سازگار برای تثبیت آنزیم عمل می‌کنند (۱۵)، زیرا نانومواد از مساحت سطح وسیعی برای انجام واکنش، فعالیت کاتالیزوری مطلوب و توانایی جذب قوی برخوردار هستند (۱۵).

در زمینه حسگرهای الکتروشیمیایی، پلیمرهای رسانا نیز می‌توانند بعنوان یک بستر تثبیت‌کننده و رسانای انتقال الکترون برای مواد حیاتی مورد استفاده قرار گیرند (۱۴). تهیه حسگر زیستی مقاوم در برابر تجزیه زیستی و زیست‌سازگاری بالا تنها در سایه استفاده از پلیمرهای رسانا امکان‌پذیر است (۱۱ و ۱۳)، زیرا انتقال الکترون‌ها بین میکروارگانیزم‌ها و الکتروود در کل ساختار پلیمر رسانا بواسطه رزونانس دائمی الکترون‌های مزدوج در طول زنجیره پلیمری صورت می‌گیرد (۱۴).

با وجود مزایای ذکر شده برای پلیمرهای رسانا، از جمله عوامل مهمی که باید در هنگام توسعه حسگرهای زیستی برپایه پلیمرهای رسانا مورد توجه قرار گیرد، اتصال ضعیف پلیمر به سطح الکتروودکار است که بطور قابل‌توجهی منجر به کاهش بازده انتقال الکترون و نهایتاً راندمان حسگر زیستی می‌گردد (۱۳). این امر بدلیل محدودیت در انتقال الکترون‌های سطحی به الکتروود رخ می‌دهد (۲۳). از این رو به‌کارگیری نانومواد می‌تواند سبب افزایش مساحت سطح پلیمر رسانا شده و از سویی دیگر اتصال آن به الکتروود را افزایش دهد (۲۳). پلی‌آنیلین از جمله پلیمرهای رسانایی است که بدلیل خواصی همچون مقاومت در برابر تأثیرات محیطی، رسانایی الکتریکی قابل تنظیم، نسبت سطح به حجم بزرگ و خواص اکسایش/کاهش مناسب، بطور گسترده در طراحی حسگرهای زیستی برای تعیین میزان گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۱۰ و ۱۱).

در زمینه تهیه حسگرهای زیستی مبتنی بر گلوکز بر پایه پلیمرهای رسانا تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفته است (۱۲، ۱۸ و ۲۱). در تداوم تلاش پژوهشگران، یک تیم تحقیقاتی توانستند حسگرهای زیستی مبتنی بر نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانوذرات طلا جهت سنجش گلوکز طراحی کنند (۱۰). براساس نتایج ارائه شده مشخص گردید که حساسیت این حسگر $1 \mu\text{A mM}^{-1}$ در $65/4 \text{ cm}^{-2}$ در محدوده خطی گسترده تا کمترین حد تشخیص $16/5 \text{ mmol L}^{-1}$ است. در بررسی دیگر از حسگرهای زیستی مبتنی بر نانوکامپوزیت متخلخل با آرایه سه‌بعدی از پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره از الگوی اکسید آلومینیوم آندی استفاده شد که

یافته‌های این پژوهش نشان داد حسگر زیستی طراحی شده پاسخ زمانی و خطیت مطلوبی دارا است (۲۸). در تحقیقی دیگر، یک حسگر زیستی آمپرومتریک گلوکز مبتنی بر ساختار لایه‌به‌لایه با استفاده از نانولوله‌های کربنی چندجداره، پلی‌آنیلین و نانوذرات طلا بمنظور اصلاح سطح الکتروود و تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز تهیه شد (۳۰). نتایج این تحقیق نشان داد که حسگر زیستی در طی ۱۰ ثانیه با حداکثر جریان ۹۵٪ به پایداری می‌رسد. علاوه بر این، محدوده خطی برای غلظت گلوکز از ۰/۰۶۲۵ تا ۱/۱۹ میلی مولار با حساسیت $29/17 \mu A \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ و قابلیت حد تشخیص $0/19 \mu M$ بود و توانست غلظت گلوکز را در سرم خون انسان اندازه‌گیری کند (۳۰).

یک تیم تحقیقاتی از اکسیدگرافن احیاشده در ترکیب با پلی‌آنیلین، نفیون و گلوکز اکسیداز برای ایجاد حسگر زیستی گلوکز آمپرومتریک بهره‌گرفتند (۲۴). حسگر زیستی گلوکز تهیه شده با محدوده خطی گسترده (از ۰/۵ تا ۵۰ mM) از گزینش‌پذیری، تکرارپذیری و پایداری مطلوبی برخوردار بود (۲۴).

در بررسی دیگر، آرایه نانوسیم‌های پلی‌آنیلین از طریق یک رویکرد الکتروشیمیایی بدون قالب، بر روی الکترودهای گرافیت اصلاح شده با اکسید گرافن کاهش یافته جهت کاربرد در حسگر زیستی گلوکز تهیه شد (۲۹). حسگر زیستی گلوکز ساخته شده زمان پاسخ بسیار سریع (کمتر از ۳ ثانیه)، پاسخ خطی در محدوده غلظت ۰/۱ تا ۸/۵ mM و حساسیت $1 \mu A \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ را نشان داد (۲۹). علیرغم پیشرفت‌های کنونی صورت گرفته در این حوزه، تشخیص دقیق و سریع گلوکز در حجم‌های کوچک آنالیت‌های حیاتی، بعنوان یک چالش حیاتی برای سال‌های متمادی باقی مانده است (۲۸).

لذا براساس بررسی‌های صورت گرفته از منابع علمی و با تمرکز بر چالش‌های موجود در توسعه حسگرهای زیستی، پژوهش حاضر در نظر دارد به بررسی قابلیت سنجش گلوکز موجود در خون بیماران دیابتی از طریق نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره پردازد. نوآوری این تحقیق، استفاده از پلی‌آنیلین جهت تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز و استفاده از نانوذرات نقره، بمنظور افزایش حساسیت حسگر زیستی می‌باشد. در این راستا تلاش شده است تا حسگر زیستی ارزان‌قیمت با پاسخ زمانی مطلوب و در اندازه‌ای کوچک از طریق روش آمپرومتریک تهیه شود که از حساسیت کافی و پایداری مناسب نسبت به سایر حسگر-های زیستی موجود برخوردار باشد.

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات مورد استفاده

در این تحقیق از آنیلین، اسید کلریدریک، آمونیوم پرسولفات و استون (ساخت شرکت مرک آلمان) بمنظور تهیه پلی‌آنیلین بهره گرفته شد. همچنین از اتانول (ساخت شرکت ایرانی آرمان سینا)، نانوذرات نقره (ساخت شرکت ایرانی دیده‌ور)، آنزیم گلوکز اکسیداز (ساخت شرکت سیگما آلدریج) و گلوکز (محصول شرکت ایرانی پویندگان سلامت) بهره گرفته شد. ارزیابی ریزساختاری و آنالیز عناصر شیمیایی موجود در آن به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مدل Tescan-MIRA3 انجام شد. از دستگاه اتو آنالیزور مدل RA1000 (ساخت شرکت Pomeca سوئد)، مدار تقویت‌کننده بر مبنای op-amp-07 و اهم‌متر آنالوگ مدل XR0 (ساخت شرکت Hiochi ژاپن) در روند ارزیابی حسگر زیستی استفاده گردید.

روش تهیه پلی‌آنیلین

پلی‌آنیلین به روش اکسیداسیون شیمیایی در حضور اسید کلریدریک تهیه گردید (۲۲). بدین منظور نخست، دو مول از مونومر آنیلین به‌مراه اسید کلریدریک یک مولار، در ظرفی به گنجایش ۳۰۰ mL افزوده شد. ظرف مذکور به‌جهت حفظ محدوده دمایی $0-2^{\circ}\text{C}$ ، درون محفظه یخ قرار گرفت. فرایند پلیمریزاسیون توسط افزودن قطره به قطره ۰/۰۵ مول از آمونیوم پرسولفات بعنوان اکسیدکننده، به‌مراه ۲۰۰ mL اسید کلریدریک در طی ۸ ساعت صورت پذیرفت. پس از سپری شدن این مدت زمان، رسوب پلیمری از محلول جدا گردید و در ۷۰۰ mL سود یک مولار حل گردید. در انتها، رسوب حاصل توسط کاغذ صافی فیلتر گشت و توسط استون شستشو داده شد و سپس در آن بمدت ۴۸ ساعت خشک گردید (۲۲).

تهیه نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره

جهت تهیه نانوکامپوزیت، پلی‌آنیلین تهیه شده از مرحله قبل، بایستی بر روی الکترودها پوشش داده شود. برای ساخت حسگر زیستی از یک مدار بعنوان سطحی که قرار است پلی‌آنیلین روی آن پوشش داده شود، استفاده شد. این مدار شامل سه الکتروده مسی با اتصال‌های مشخص می‌باشد.

بدین منظور نخست ۰/۱ mg پلی‌آنیلین با ۱ mL اتانول در دمای محیط ترکیب شد و بمدت ۱۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۷). پس از آن بمدت ۲۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت. ترکیب بدست آمده بمنظور قرارگیری مابین الکترودها، توسط دستگاه پوشش‌دهی چرخشی در طی دو مرحله تحت لایه‌نشانی قرار گرفت. در هر مرحله بستر مدنظر (شامل الکترودها و پلی‌آنیلین) حدود ۳۰ دقیقه در آن در دمای 50°C قرار گرفتند. سپس بستر حاصل بمنظور عمل دوپینگ، در معرض بخارات اسیدکلریدریک بمدت ۲ دقیقه قرار گرفت (۷). لازم به ذکر است براساس بررسی‌های تجربی صورت گرفته در مرحله آماده‌سازی، در این حالت خروجی حسگر زیستی برای مقادیر حدود ۲۰۰ mg/dl قابل اندازه‌گیری بود، اما محدوده نرمال برای سنجش گلوکز خون در بدن معادل ۷۰ mg/dl الی ۱۱۰ می‌باشد. باتوجه به این مسئله و بمنظور افزایش هدایت الکترون‌ها، به ترکیب پلی‌آنیلین و اتانول مقداری نانوذرات کروی نقره در اندازه ۱۱۰ nm با خلوص ۹۹/۵٪ اضافه گردید. آزمایشات اکتشافی نشان داد که نانوکامپوزیت مدنظر در ۲/۵٪ وزنی از نانوذرات، بهترین پاسخ از نظر خطی و عدم اشباع سریع در پاسخ خروجی حسگر زیستی، حاصل می‌گردد. در نهایت نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره بر روی الکترودها پوشش‌دهی شدند.

تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز

گلوکز اکسیداز اغلب در حسگرهای زیستی گلوکز، بعنوان کاتالیزور واکنش اکسایش/کاهش گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶). آنزیم گلوکز اکسیداز موجود در بازار، بصورت محلولی به‌مراه یک سری از مواد دیگر یافت می‌شود که طی واکنش آنزیم با گلوکز، این مواد منجر به رنگی شدن محلول می‌گردند. این امر برای اندازه‌گیری میزان گلوکز خون توسط روش‌های

طیف‌سنجی مناسب می‌باشد (۲۵). از این رو، آنزیم خالص گلوکز اکسیداز برای ساخت حسگر زیستی مدنظر در این تحقیق که بتوان با استفاده از روش‌های آمپرومتریکی میزان گلوکز خون را سنجید، خریداری گردید. ابتدا محلول گلوکز اکسیداز چهار واحدی تهیه شد. بدین ترتیب که 0.1 mg آنزیم گلوکز اکسیداز در 0.8 mL آب مقطر حل شد. محلول بمدت ۳۰ دقیقه تحت سانتریفوژ قرار گرفت. سپس محلول روی بستر بدست آمده از مرحله قبل، بصورت قطره قطره در ۳ مرحله افزوده شد. در هر مرحله فاصله زمانی ۶۰ دقیقه‌ای طی شد. در مرحله آخر، توسط یک غشای نیمه‌تراوا، کل بستر که شامل دو الکتروود پلی‌آنیلین و آنزیم تثبیت‌شده روی آن است پوشش داده شد. بمنظور اطمینان از قرارگیری کامل و صحیح آنزیم گلوکز اکسیداز، بستر مدنظر بمدت ۱۰ ثانیه درون 100 mg/dl از محلول گلوکز قرار گرفت. پس از خارج کردن بستر، بمنظور بررسی انجام واکنش و باتوجه به اینکه در حضور گلوکز اکسیداز باید محصول واکنش پراکسید هیدروژن باشد، لذا به محلول، به میزان 1 mL معرف پراکسید هیدروژن اضافه شد و رنگ محلول در قرمز تثبیت گردید که نشان‌دهنده برهمکنش بین گلوکز اکسیداز و گلوکز و نیز آنزیم گلوکز اکسیداز روی الکتروودها توسط پلی‌آنیلین می‌باشد (۲۵).

تهیه محلول‌های استاندارد گلوکز برای بررسی عملکرد حسگر زیستی

بمنظور ارزیابی عملکرد حسگر زیستی باید محلول‌های استاندارد از گلوکز تهیه گردد تا عملکرد حسگر زیستی و خروجی جریان در غلظت‌های متفاوتی از گلوکز اندازه‌گیری گردد. از آنجایی که واحد اندازه‌گیری گلوکز در حوزه‌های پزشکی برابر میلی‌مول یا میلی‌گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد، لذا در این تحقیق، از واحد میلی‌گرم بر دسی‌لیتر (mg/dl) استفاده گردید (۱۰). غلظت‌هایی که برای تحلیل عملکرد حسگر زیستی تهیه شده است در محدوده $400-60 \text{ mg/dl}$ می‌باشد. برای تهیه این غلظت‌ها، وزن مشخصی از گلوکز با آب مقطر ترکیب می‌گردد. به جهت اطمینان از صحت میزان گلوکز، محلول‌های تهیه شده توسط دستگاه اتو آنالیزور مدل RA1000 تست شد. این دستگاه پارامترهای مختلفی در بدن از جمله گلوکز را اندازه‌گیری می‌کند که اساس کار این دستگاه مبتنی بر روش‌های طیف‌سنجی می‌باشد.

طراحی مدار چاپی شامل الکتروودها

برای طراحی مدار چاپی شامل الکتروودها، ابتدا در نرم‌افزار پروتل (Protel 99 SE) شکل الکتروودها طراحی شد. سپس فیبر مدار چاپی در ابعاد $0.7 \times 0.5 \text{ cm}$ ساخته شد. باتوجه به اینکه در این تحقیق از روش آمپرومتریکی برای اندازه‌گیری گلوکز بهره گرفته شده است، بدین منظور سه کنتاکتور در هر فیبر مدار چاپی برای حسگر زیستی تعبیه شده است که یکی از آن‌ها مربوط به الکتروود مرجع و دو عدد دیگر برای الکتروودهای کار و شمارنده الکتروود می‌باشد. باتوجه به اینکه خروجی جریان در حسگر زیستی در حد نانوآمپر می‌باشد، لذا از یک مدار تقویت‌کننده بر مبنای op-amp-op07 با ضریب تقویت حدوداً ۳۵ جهت افزایش جریان استفاده شد. خروجی جریان نیز توسط یک اهم‌متر آنالوگ مدل XRO اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری گلوکز

جهت اندازه‌گیری گلوکز، ابتدا ولتاژ ۰/۵ ولت به الکتروود مرجع و الکتروود کار اعمال شد. سپس یک قطره از محلول حاوی گلوکز بر روی حسگر زیستی قرار گرفت. خروجی جریان تقویت‌کننده توسط اهم‌متر اندازه‌گیری شد. شماتیک کلی از روند تهیه حسگر زیستی در شکل ۱ آورده شده است.



(ب)



(الف)



(د)



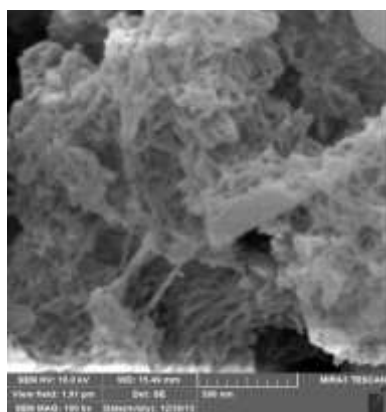
(ج)

شکل ۱- شمای کلی از روند ساخت و بررسی عملکرد حسگر زیستی گلوکز: (الف) بستر مورد استفاده در ساخت حسگر زیستی (ب) پلی-آنیلین تهیه شده (ج) نانوکامپوزیت حاصل برای قرارگیری روی الکتروود (د) دستگاه اتوآنالیزور جهت اندازه‌گیری گلوکز

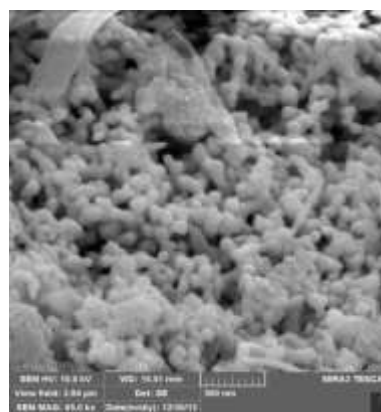
نتایج و بحث

آنالیزهای میکروسکوپی و طیف‌نگاری

شکل ۲، میکروگراف‌های حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) را برای نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره نشان می‌دهد. باتوجه به تصاویر، وجود نانوساختارها در حسگر زیستی مشهود می‌باشد. در شکل ۲ الف، نانوذرات نقره با اندازه متوسط ۱۰۸ nm قابل مشاهده است و در شکل ۲ ب، ساختار نانوکامپوزیت بصورت طولی مشاهده می‌شود. بررسی ریخت‌شناسی سطح الکتروود نشان داد که لایه نانوکامپوزیتی پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره، بطور مناسب و یکنواختی سطح آنزیم را پوشانده است. آنالیز حاصل از طیف‌نگاری پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) نانوکامپوزیت حاصل، در شکل ۳ و مقادیر وزنی هر عنصر در جدول ۱ آورده شده است. حضور کربن و نیتروژن در طیف مذکور، تشکیل پلی‌آنیلین را تأیید می‌نماید (۲۹). همچنین حضور عناصر فوق به‌مراه نقره، نشان‌دهنده آماده‌سازی مطلوب نانوکامپوزیت حاوی پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره است. وجود ۲/۰۲ درصد وزنی از نقره در نانوکامپوزیت حاصل مشهود است که در سنتز معادل ۰/۰۰۲ میلی‌گرم، در نظر گرفته شده بود.

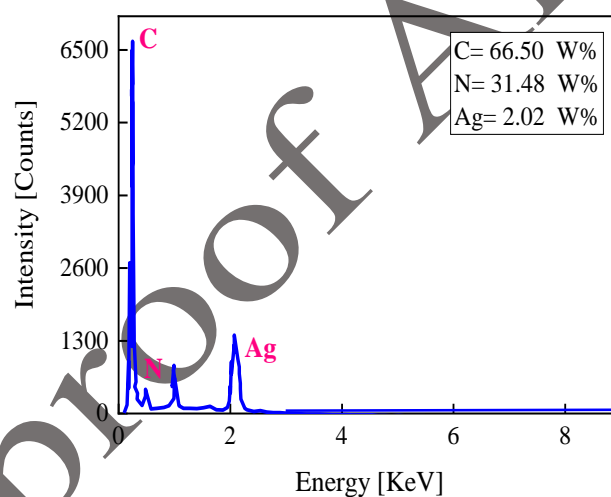


(ب)



(الف)

شکل ۲- میکروگراف‌های حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نانوکامپوزیت (الف) نانوذرات نقره (ب) نانوکامپوزیت پلی-آنیلین/نانوذرات نقره



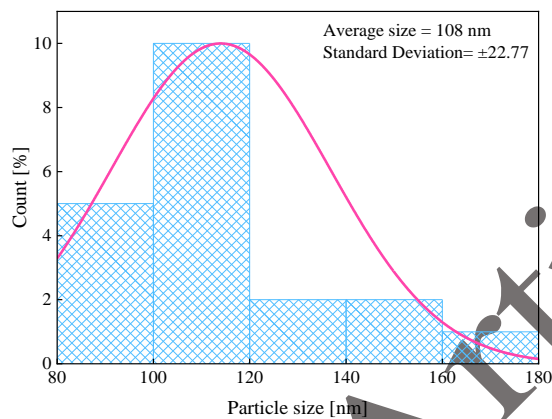
شکل ۳- میکروگراف حاصل از پراش انرژی پرتو ایکس مربوط به نانوکامپوزیت پلی-آنیلین/نانوذرات نقره

جدول ۱- آنالیز پراش انرژی پرتو ایکس نانوکامپوزیت پلی-آنیلین/نانوذرات نقره

Elt	line	Int	Error	K	Kr	W%	A%	ZAF	Ox%	Pk/Bg
C	Ka	۲۰۸۶/۳	۳۱/۶۳	۰/۸۹	۰/۶۰	۶۶/۵۰	۷۰/۹۶	۰/۹۱	۰	۱۶۱/۵۱
N	Ka	۱۴۹/۶	۳۱/۶۳	۰/۰۹	۰/۰۶	۳۱/۴۸	۲۸/۸۰	۰/۱۹	۰	۱۵/۷۹
Ag	La	۲۶/۹	۸/۰۹	۰/۰۱	۰/۰۱	۲/۰۲	۰/۲۴	۰/۶۵	۰	۲/۷
Total				۱/۰۰۰۰	۰/۶۸	۱۰۰	۱۰۰		۰	

بررسی توزیع اندازه ذرات حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی

نمودار توزیع اندازه ذرات میکروسکوپی نانوذرات نقره در شکل ۴ نشان داده شده است. نمودار حاصل از آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، به کمک نرم‌افزار ImageJ 1.52v استخراج گردیده است. همانگونه که در شکل مشهود است، گستره توزیع اندازه ذرات برابر ۸۰ تا ۱۸۰ nm می‌باشد. همچنین، میانگین اندازه ذرات برابر با ۱۰۸ nm بدست آمده است. انحراف معیار نیز برابر با $22.77 \pm$ بوده که نشان‌دهنده توزیع مناسب اندازه نانوذرات می‌باشد.



شکل ۴- نمودار توزیع اندازه نانوذرات نقره (گستره توزیع اندازه ذرات توسط نرم‌افزار ImageJ 1.52v بدست آمده است).

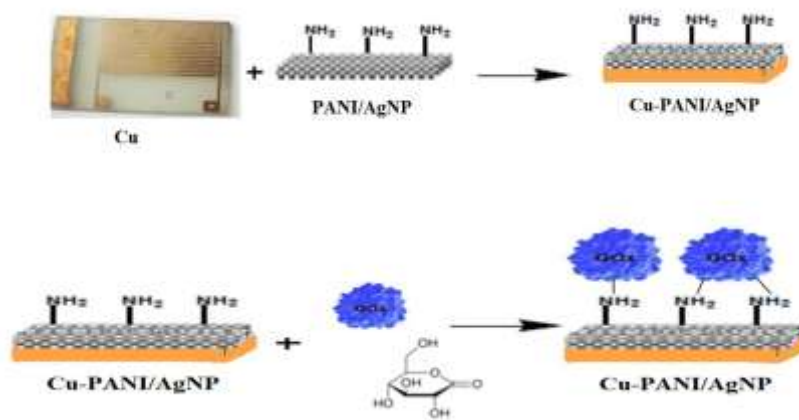
بررسی عملکرد حسگر زیستی گلوکز مبتنی بر پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره

در حسگرهای زیستی، گیرنده‌های زیستی نظیر سلول‌ها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها به مبدلی برای شناسایی مولکول‌های زیستی متصل می‌شوند (۱۸). در بین پلیمرهای رسانا، پلی‌آنیلین بدلیل ویژگی‌های قابل توجهی که دارد توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۲۳). از آنجایی که پلی‌آنیلین دارای دو زوج اکسایش/کاهش است، نیازی به هیچ واسطه دیگری در حسگر زیستی وجود ندارد و پلی‌آنیلین قادر است همانند یک واسطه مستقل عمل نماید (۲۳). زیست‌سازگاری مواد مبتنی بر پلی‌آنیلین را می‌توان برای شناسایی مولکول‌های زیستی با پاسخ سریع و حساسیت فوق‌العاده استفاده کرد (۳۲). از طرفی پلی‌آنیلین در مقیاس نانو دارای فاصله نفوذ کوتاه‌تری برای آنالیت است و سطح بزرگ‌تری را فراهم می‌کند، از این رو، حساسیت بالاتر و پاسخ سریع‌تری نسبت به حجم خود دارد (۱۳). نانوکامپوزیت‌های مبتنی بر پلی‌آنیلین نیز می‌توانند به کاتالیزورها و گیرنده‌های زیستی از جمله آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌های آنتی‌ژن، سلول‌ها و اسیدهای نوکلئیک کمک کنند تا روی سطح بی‌حرکت و تثبیت شوند تا آنالیت‌ها را شناسایی کنند (۱۳). از مزایای استفاده از پلی‌آنیلین در توسعه حسگرهای زیستی گلوکز، می‌توان به سنتز کم‌هزینه و آسان آن در محلول‌های آبی، زیست‌سازگاری، پایداری محیطی عالی، مساحت سطح بالا، رسوب مستقیم و آسان بر روی الکتروود و خواص الکتریکی مطلوب آن اشاره نمود (۲۳).

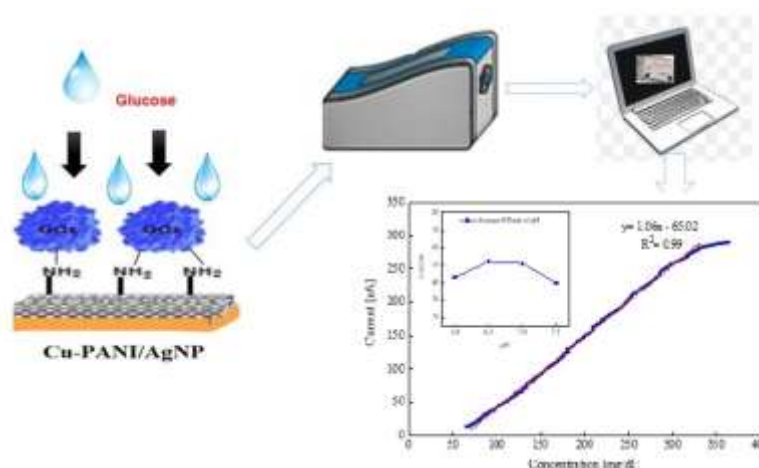
دلیل بکارگیری نانوذرات نقره در حسگر زیستی بدین ترتیب می‌باشد که این نانوذرات ناپایدار بوده و مستعد تجمع در محیط‌های آبی هستند و یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل، ترکیب آن‌ها در ماتریس‌های پلیمری رسانا است (۱۸). علاوه بر این، نانوذرات نقره در محیط آبی دارای سمیت بالایی برای سلول‌های انسانی هستند (۱۸)، بنابراین کپسوله‌کردن آن‌ها در بسترهای

پلیمری اثرات نامطلوب آن‌ها را کاهش می‌دهد. وجود پلی‌آنیلین سبب آرایش فضایی و رشد آن‌ها در طول فرایند ساخت شده و نانوذرات را قادر می‌سازد که بعنوان الگویی برای جذب مواد مختلف عمل کنند (۱۸). نقره دارای موقعیت‌های زیادی برای دوپینگ می‌باشد و تمایل دارد به گروه‌های نیتروژنی پلی‌آنیلین متصل گشته و پیوند زنجیره‌ای مابین بسیاری از زنجیره‌های پلیمری مجاور شود (۱۸). اتصال نانوذرات نقره به پلی‌آنیلین توسط آمین‌های نوع دوم و آمین‌ها در ساختار زنجیره پلی‌آنیلین تسهیل می‌شود (۷). همچنین نانوذرات بعنوان اتصالات رسانا بین زنجیره‌های پلی‌آنیلین عمل می‌کنند. این نانوذرات قادر هستند حساسیت و پایداری حسگرهای زیستی را با کاتالیز کردن اکسیداسیون هیدروژن پراکسید و تسهیل انتقال الکترون پذیرفته شده به سمت الکتروود بهبود بخشند (۱۸).

بمنظور حفظ فعالیت آنزیم و جلوگیری از نشت آن در حسگر زیستی، باید به طریقی آن را در جایگاهش تثبیت نمود. تثبیت عنصر حسگر زیستی، نقش اساسی در ویژگی‌های عملکردی حسگر ایفا می‌کند (۱۸)، زیرا مولکول‌های زیستی باید مستقیماً به سطح حسگر زیستی متصل شوند تا حساسیت خوب و طول عمر طولانی داشته باشند (۱۱). از متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای تثبیت مولکول‌های زیستی به پلیمرها، جذب فیزیکی، پیوند کووالانسی و به دام افتادن است (۱۱). انتخاب راهکار تثبیت، عمدتاً به نوع عنصر زیستی بستگی دارد. در روش تثبیت کووالانسی از گروه‌های عاملی مولکول‌های زیستی (مانند COOH ، NH_2 یا -SH) برای اتصال با یک پلیمر رسانا استفاده می‌شود (۶). از مزایای روش تثبیت می‌توان به صرفه اقتصادی، پایداری بیشتر آنزیم، عدم آلودگی نمونه با آنزیم، ایجاد پیوند قوی بین مولکول زیستی و پلیمر و در نتیجه کاهش از دست‌دادن مولکول‌های زیستی اشاره نمود (۲۰). در شکل ۵، شماتیک نحوه عملکرد حسگر زیستی آورده شده است.



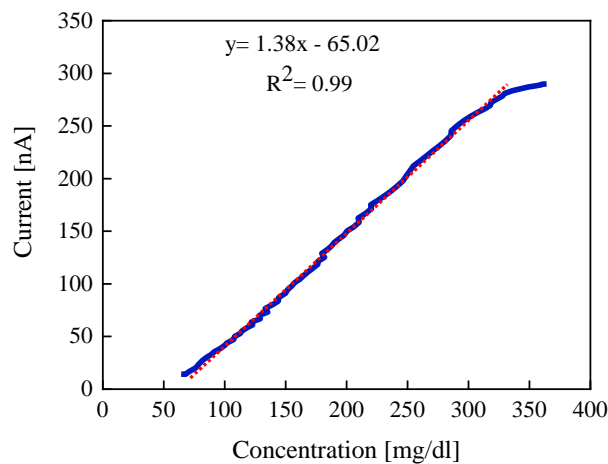
Pr



شکل ۵- شماتیک مکانیسم اندازه‌گیری گلوکز توسط حسگر زیستی تهیه شده با نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانوذرات نقره

بررسی عملکرد حسگر زیستی در غلظت‌های مختلف

بمنظور بررسی عملکرد حسگر زیستی از محلول‌های شامل گلوکز و آب مقطر با درصد وزنی مشخص استفاده شد. میزان گلوکز موجود در محلول‌ها بصورت دقیق با دستگاه اتو آنالیزور مشخص شد. باتوجه به این نکته که محدوده نرمال گلوکز خون انسان بین ۷۰-۱۲۰ mg/dl است (۱۷)، لذا در صورت استفاده از پلی‌آنیلین به‌تنهایی در حسگر زیستی، برای غلظت‌های کمتر از ۱۵۰ mg/dl، خروجی جریان به سمت صفر میل می‌کند. از این‌رو، برای بهبود عملکرد حسگر زیستی نانوذرات نقره به پلی‌آنیلین حاصل افزوده شد (۱۸). همانطوریکه در بخش مواد و روش‌ها تشریح گردید، بر اساس آزمایشات اکتشافی تجربی بهترین پاسخ خروجی حسگر زیستی در ۲/۵ درصد وزنی از نانوذرات نقره بدست آمد. در درصدهای وزنی بالاتر از نانوذرات نقره، پاسخ خروجی حسگر زیستی سریعاً به سمت اشباع سوق می‌یابد. برای ارزیابی دقیق عملکرد حسگر زیستی، ۳۱ نمونه محلول گلوکز در بازه غلظت بین ۶۰-۳۳۰ mg/dl تهیه شد و پاسخ حسگر زیستی برای هر سطح غلظت مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در شکل ۶ آورده شده است. برای مقادیر کمتر از ۶۰ mg/dl، خروجی جریان تقویت‌کننده که توسط مولتی‌متر اندازه‌گیری می‌شود، در حسگر زیستی برابر صفر بود. از غلظت حدود ۳۳۰ mg/dl به بعد نیز خروجی حسگر زیستی تقریباً ثابت بوده و تغییر چندانی مشاهده نگردید. باتوجه به بحث فوق، بازه غلظت قابل اعتماد برای این حسگر زیستی ۶۰-۳۳۰ mg/dl می‌باشد.

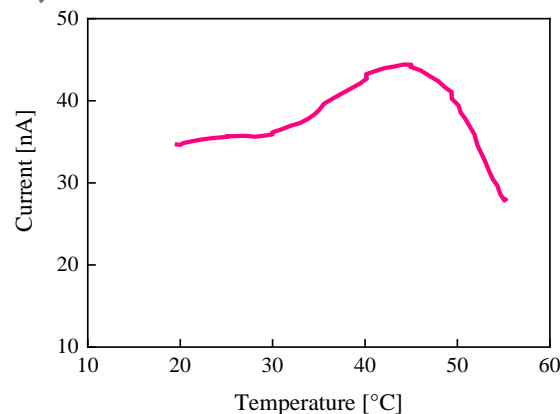


شکل ۶- نمودار پاسخ جریان آمپرومتری برحسب میزان تغییرات غلظت گلوکز

بررسی عملکرد حسگر زیستی در دماهای مختلف

در شکل ۷، نمودار تغییرات جریان برحسب دما نشان داده شده است. باتوجه به اهمیت دقت اندازه‌گیری در یک حسگر زیستی در شرایط مختلف، بررسی عملکرد حسگر زیستی حاصل در بازه دمایی $20-60^{\circ}\text{C}$ و در غلظت مشخص 80 mg/dl صورت پذیرفت. در نمودار شکل ۷، مشاهده می‌شود که با افزایش دما ابتدا جریان افزایش پیدا می‌کند. اما با ادامه روند صعودی دما، به‌علت کاهش عملکرد آنزیم، میزان جریان کاهش می‌یابد (۱۹).

بسته به شرایط خاص در روش آمپرومتریک، مانند پتانسیل اعمال شده، pH، دما و غلظت سوبسترا، فعالیت گلوکز اکسیداز ممکن است در طول زمان تحت تاثیر قرار گیرد. اگر دما خارج از محدوده بهینه برای آنزیم باشد، می‌تواند منجر به افت فعالیت آن شود. علاوه بر این، اگر غلظت سوبسترا خیلی کم یا خیلی زیاد باشد، می‌تواند بر حساسیت و انتخاب‌پذیری سنجش تأثیر بگذارد. لذا دمای بهینه از بازه $20-30^{\circ}\text{C}$ باتوجه به روند ثبوت جریان و حفظ فعالیت آنزیم بعنوان بازه دمایی مناسب برای عملکرد حسگر زیستی انتخاب گردید.



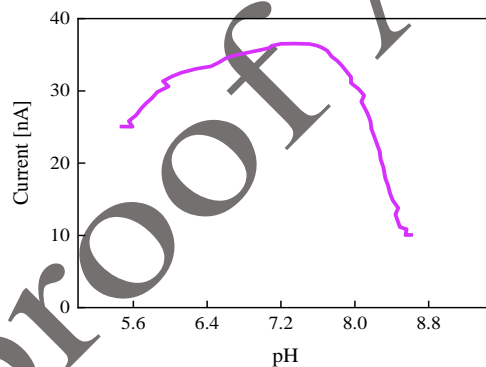
شکل ۷- نمودار تغییرات دما برحسب جریان آمپرومتری

بررسی عملکرد حسگر زیستی در pH های مختلف

در شکل ۸، نمودار تغییرات جریان بر حسب pH نشان داده شده است. اندازه‌گیری‌های قبلی در pH برابر هفت (شرایط خنثی) انجام گرفت اما با توجه به اینکه محیط‌های زیستی دارای pH متغیر می‌باشند (۱۷)، بررسی عملکرد حسگر زیستی در محدوده pH (۵/۵ - ۸/۵) ارزیابی شد. حداکثر پاسخ جریان آمپرومتری در pH برابر ۷/۵ مشاهده شد.

با افزایش pH به مقادیر بیشتر از ۷/۵، جریان خروجی حسگر زیستی بشدت افت پیدا نمود. علت این رخداد وابستگی شدید رسانایی پلی‌انیلین به pH محلول است (۱۷). در محلول‌های اسیدی دارای رسانایی بالاتر و در محلول‌های خنثی، از رسانایی کمتری برخوردار است (۱۷). از این رو با افزایش pH از میزان رسانایی و پاسخ جریان خروجی کاسته می‌شود.

لازم به ذکر است که گلوکز اکسیداز آنزیمی پایدار است که می‌تواند در شرایط نگهداری مناسب فعالیت خود را حفظ کند. برای اطمینان از اینکه آنزیم گلوکز اکسیداز فعالیت خود را حفظ میکند، ذخیره آنزیم در شرایط مناسب امری مهم است (۱). اگر pH یا دما خارج از محدوده بهینه برای آنزیم باشد، می‌تواند منجر به کاهش فعالیت آن شود (۲).

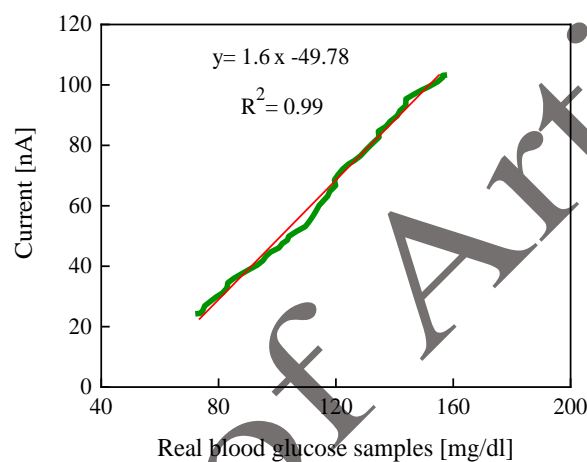


شکل ۸- نمودار تغییرات pH بر حسب جریان آمپرومتری

بررسی عملکرد حسگر زیستی با نمونه‌های واقعی خون

پس از ارزیابی‌های آزمایشگاهی حسگر زیستی تهیه شده، جهت بررسی عملکرد حسگر زیستی با نمونه‌های واقعی خون، حدود ۱۰ نمونه‌ی خونی با غلظت گلوکز در بازه ۷۰-۱۷۰ mg/dl تهیه گردید. در ابتدا توسط دستگاه اتونالیزور میزان گلوکز آن‌ها تعیین و سپس خروجی جریان حسگر زیستی با هر کدام از نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. نتایج عملکرد حسگر زیستی، برای نمونه‌های واقعی خون با سطح غلظت متفاوت گلوکز در شکل ۹ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، مقدار جریان نسبت به حالتی که گلوکز خالص در آب مقطر حل شده بود، کاهش یافته است. این امر بدلیل دخالت سایر آنالیت‌های موجود در خون می‌باشد که سبب گردیده است عملکرد آنزیم گلوکز اکسیداز مختل شود. اما مشاهده می‌شود علی‌رغم کاهش جریان خروجی حسگر زیستی، عملکرد آن برای نمونه‌های واقعی خون کاملاً خطی است.

همچنین در شکل ۹، مقدار حساسیت در محدوده غلظت گلوکز ۷۰-۱۷۰ mg/dl در قالب نمودار تابع کار (حساسیت و خطیت) آورده شده است. حساسیت یک حسگر زیستی، شیب نمودار خطی تقسیم‌بر هندسه/ناحیه فعال حسگر زیستی است (۲۷). لذا مطابق شکل، حساسیت حسگر زیستی یک افزایش تقریباً خطی با غلظت گلوکز اعمال شده دارد. برازش خطی برای داده‌ها این نمودار ($R^2=0.99$) نشان می‌دهد. مقدار شیب در محدوده غلظت مورد مطالعه ۱/۶ nA.dl/mg می‌باشد. حساسیت بالا در مقادیر جزئی یا تغییرات غلظت آنالیت‌های دارای اهمیت بالینی، نظیر گلوکز برای حصول اطمینان از تشخیص دقیق بیماری و پایش سلامت امری مهم تلقی می‌گردد (۱۷). از این‌رو، باتوجه به نتایج بدست آمده در ارزیابی توسط نمونه‌های واقعی خون، حسگر زیستی تهیه شده قادر است با موفقیت در موارد بالینی نیز دارای عملکرد مطلوب باشد.



شکل ۹- خروجی جریان آمپرومتری برای نمونه‌های واقعی خون و میزان خطیت پاسخ

تحلیل عملکرد حسگر زیستی با استفاده از روش تاگوچی

در این قسمت عملکرد حسگر زیستی با استفاده از روش طراحی آزمایشات تاگوچی و در نظر گرفتن سه پارامتر متغیر ورودی غلظت، دما و pH مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مطمئن‌ترین روش‌های آماری برای بهبود کیفیت یافته‌های علمی، استفاده از روش‌های طراحی آزمایش است (۱۲). از اهداف کلی طراحی آزمایش می‌توان به موضوعاتی همچون کاهش تعداد آزمایش‌ها و در نتیجه کاهش زمان و هزینه‌ها، تعیین متغیرهایی که بیشترین تأثیر را در پاسخ دارند و حذف فاکتورهای غیر ضروری، محاسبه درصد اهمیت هر متغیر، تعیین میزان خطا و تعیین شرایط بهینه اشاره نمود (۱۲).

تحلیل عملکرد حسگر زیستی

برای بررسی عملکرد حسگر زیستی طبق جدول ۲، سه فاکتور مستقل ورودی دما، pH و غلظت، هر کدام در چهار سطح در نظر گرفته شد. بازه دما و pH به گونه‌ای در نظر گرفته شدند که در محدوده واقعی نمونه‌های خون و آزمایشگاهی طبیعی و نرمالی باشند، زیرا احتمال اینکه حسگر زیستی در خارج از این محدوده استفاده شود، بسیار کم است. در شرایط طراحی

آزمایش‌ها با روش فاکتوریل کامل لازم است تعداد ۶۴ مرحله آزمایش انجام شود که مستلزم هزینه و صرف زمان زیادی است. ولی بر مبنای روش تاگوچی ۱۶ مرحله آزمایش پیشنهاد شد. شرح نتایج این ۱۶ آزمایش در پیوست قرار گرفته است.

جدول ۲- مقادیر خروجی جریان حسگر زیستی بر اساس سه فاکتور pH، دما و غلظت در روش تاگوچی

فاکتورها				
خروجی جریان	غلظت	دما	pH	سطح
۱۷	۷۰	۲۵	۶	۱
۳۴	۸۵	۳۰	۶	۲
۴۳	۱۰۰	۳۵	۶	۳
۸۰	۱۱۵	۴۰	۶	۴
۳۵	۸۵	۲۵	۶/۵	۵
۲۱	۷۰	۳۰	۶/۵	۶
۷۹	۱۱۵	۳۵	۶/۵	۷
۵۲	۱۰۰	۴۰	۶/۵	۸
۴۹	۱۰۰	۲۵	۷	۹
۸۱	۱۱۵	۳۰	۷	۱۰
۲۹	۷۰	۳۵	۷	۱۱
۵۱	۸۵	۴۰	۷/۵	۱۲
۸۷	۱۱۵	۲۵	۷/۵	۱۳
۵۵	۱۰۰	۳۰	۷/۵	۱۴
۵۴	۸۵	۳۵	۷/۵	۱۵
۴۰	۷۰	۴۰	۷/۵	۱۶

پس از اینکه مقادیر خروجی جریان برای شرایط مختلف، توسط نرم‌افزار آماری مینی‌تب تحلیل شد، نتایج مندرج در جدول ۲ بدست آمدند. برای تحلیل یافته‌ها، آنالیز واریانس بر روی داده‌ها انجام شد که نتایج در جدول ۳ مشاهده می‌گردد. همچنانکه در این جدول مشهود است، مقدار آماره P-value تنها برای تغییرات غلظت کوچکتر از ۰/۰۵ بدست آمده است و برای دو متغیر pH و دما بزرگتر از این مقدار بدست آمده است. بر این اساس با طرح ضریب اطمینان ۰/۹۰، غلظت گلوکز خون تنها فاکتور مؤثر بر خروجی حسگر زیستی (جریان) می‌باشد. این تحلیل اثبات می‌کند که تاثیر متغیرهای جانبی بر عملکرد حسگر

زیستی بسیار ناچیز بوده و قابل اغماض می‌باشند. برای صحت‌سنجی آنالیز انجام شده نیز فاکتور ضریب تبیین اصلاح شده (R^2_{adj}) برابر با ۹۴/۷۱٪ محاسبه شده است که مقبولیت بالای مدل تحلیلی را اثبات می‌نماید.

جدول ۳- نتایج حاصل از روش تاگوچی و آنالیز واریانس

Source	درجه آزادی	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	۳	۴۵۹۷۴/۹	۱۵۳۲۵/۰	۹۶/۵۷	۰/۰۰۰
pH	۱	۲۸۹/۰	۲۸۹/۰	۱/۸۲	۰/۲۰۰
T دما	۱	۱۳/۳	۱۳/۳	۰/۰۸	۰/۷۷۷
C غلظت	۱	۴۴۰۶/۸	۴۴۰۶/۸	۲۷/۷۷	۰/۰۰۰
خطا	۱۳	۲۰۶۳/۱	۱۵۸/۷		
کل	۱۶	۴۸۰۳۸/۰			
$R^2=۰/۹۵/۷۱$		$R^2_{adj}=۰/۹۴/۷۱$		$R^2_{Pred}=۰/۹۳/۲۸$	
$I = - ۴/۲۳ pH - ۰/۱۴۹ T + ۰/۹۱۵ C$					

همچنین نتایج سایر پژوهش‌های مرتبط نیز در جدول ۴ خلاصه شده است. با مقایسه بین نتایج تحقیق حاضر با سایر کارهای پژوهشی می‌توان نتیجه گرفت که بالاترین حساسیت حسگر زیستی در محدوده غلظت گلوکز در نمونه‌های واقعی خون، برابر با ۱/۶ nA.dl/mg است که نسبت به سایر مراجع بهبود ۱۴ درصدی داشته است.

جدول ۴- مقایسه پارامترهای مؤثر در حسگر زیستی آمپرومتریک گلوکز تهیه شده با مراجع پیشین

منابع	پاسخ زمانی (s)	حساسیت nA.dl/mg	خطیت (R^2)	pH	غلظت (mg/dl)	دما (°C)	نوع حسگر زیستی
(۳۰)	۹	۱/۴	۰/۹۸	-	۱/۳۱-۲۱/۴۲	-	پلی آنیلین/نانولوله کربنی/نانوذرات طلا
(۸)	-	۱/۲۴	۰/۹۷	-	۱۸-۹۹	-	پلی آنیلین/نانوذرات طلا
(۲۴)	۱۰	۱/۰۸	۰/۹۸	-	۱۸-۳۶۰	-	پلی آنیلین/اکسید گرافن احیاشده
(۳۳)	۹	۱/۳۳	۰/۹۸	-	۵۴-۱۵۰	-	پلی آنیلین/نانولوله کربنی
(۱۶)	-	۰/۱۷	۰/۹۸	-	۴۵۰-۱۸	-	پلی آنیلین/نانودیاموند
پژوهش حاضر	۸	۱/۶	۰/۹۹	۶-۷/۵	۱۷۰-۷۰	۴۰-۲۰	پلی آنیلین/نانوذرات نقره (نمونه‌های واقعی خون)

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، برای حل مشکل تثبیت آنزیم در جزء زیستی حسگر زیستی، از نانوساختارهای پلیمر رسانا برای تثبیت آنزیم استفاده شد و برای بهبود عملکرد حسگر زیستی نیز از نانوذرات نقره بهره گرفته شد. در این راستا تلاش شد تا حسگر زیستی تهیه شده به روش آمپرومتریکی، به صورت موفقیت‌آمیزی جهت اندازه‌گیری میزان گلوکز خون مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی نتایج حاصل از حسگر زیستی ساخته شده را می‌توان به شکل زیر خلاصه نمود:

حسگر زیستی تهیه شده در محدوده غلظت $330-60$ mg/dl دارای پاسخ خطی قابل قبولی با حساسیت $1/38$ nA.dl/mg می‌باشد. پاسخ زمانی این حسگر زیستی در بازه غلظت مذکور حداکثر ۸ ثانیه اندازه‌گیری شد.

حسگر زیستی با نمونه‌های واقعی خون در محدوده غلظت $170-70$ mg/dl نیز جریان خروجی کاملاً خطی و با حساسیت قابل توجه $1/6$ nA.dl/mg را ارائه نمود.

این حسگر زیستی در محدوده دمای $20-35$ °C مشخصات خود را حفظ نموده و خروجی جریان آن تغییر چندانی نمی‌کند و در این محدوده دمایی قابل استفاده می‌باشد.

تغییرات خروجی حسگر زیستی تهیه شده در محدوده pH خون بدن انسان بین $6/25$ تا $7/1$ بسیار ناچیز و قابل اغماض بوده، لذا تغییر در مقادیر pH خون خللی در کارایی حسگر زیستی ساخته شده ایجاد نخواهد کرد.

مطالعات و آنالیزهای آماری انجام شده اثبات نمود خروجی حسگر زیستی، بیشتر وابسته به تغییرات غلظت گلوکز خون بوده و اثر دما و pH در مقایسه با اثر غلظت قابل اغماض است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از مساعدت آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تبریز جهت پیشبرد این تحقیق، قدردانی می‌نمایند.

منابع

- ۱- رضایی زارچی، س.، و نگهداری، م. (۱۳۹۲). طراحی حسگر زیستی اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از الکتروود اصلاح شده با نانوذرات اکسید کادمیوم و آنزیم گلوکز اکسیداز. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷(۳)، ۳۵۴-۳۶۶.
- ۲- قدیمی، ع. (۱۳۹۲). تغییرات فعالیت بیولوژیکی آنزیم‌های بزاقی در سیگاری‌ها. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷(۱)، ۱۳۵-۱۲۵.

- 3- Abdullah, H., Azmy, N. A. N., Hamid, A. A., & Naim, N. M. (2014). PANI-Ag-Cu nanocomposite thin films based impedimetric microbial sensor for detection of E. coli bacteria. Journal of Nanomaterials, 2014, 197-197.
- 4- Adhav, P., Bora, M., Chabukswar, V., Chourasia, A., Diwate, B., Jagtap, S., & Pawar, D. (2023). Room temperature operable ultra-sensitive ammonia sensor based on polyaniline-silver (PANI-Ag) nanocomposites synthesized by ultra-sonication. Synthetic Metals, 293, 117237.

- 5- Basniwal, R. K., Chauhan, R. P. S., Jain, V. K., & Parvez, S. (2013). Development of a cholesterol biosensor by chronoamperometric deposition of polyaniline-Ag nanocomposites. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(9), 493-498.
- 6- Brice, I., Atvars, A., Alnis, J., Grundsteins, K., Ramanavicius, A., & Viter, R. (2020). Whispering gallery mode resonator and glucose oxidase based glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 318, 128004.
- 7-Choudhury, A. (2009). Polyaniline/silver nanocomposites: Dielectric properties and ethanol vapour sensitivity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138(1), 318-325.
- 8-Chowdhury, A. D., De, A., & Gangopadhyay, R. (2014). Highly sensitive electrochemical biosensor for glucose, DNA and protein using gold-polyaniline nanocomposites as a common matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190, 348-356.
- 9- Deshmukh, M. A., Ha, T. J., & Kang, B. C. (2020). Non-enzymatic electrochemical glucose sensors based on polyaniline/reduced-graphene-oxide nanocomposites functionalized with silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(15), 5112-5123.
- 10- German, N., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2021). Dispersed conducting polymer nanocomposites with glucose oxidase and gold nanoparticles for the design of enzymatic glucose biosensors. *Polymers*, 13(13), 2173.
- 11- Kang, B. C., Ha, T. J., & Park, B. S. (2019). Highly sensitive wearable glucose sensor systems based on functionalized single-wall carbon nanotubes with glucose oxidase-nafion composites. *Applied Surface Science*, 470, 13-18.
- 12-Karna, S. K., & Sahai, R. (2012). An overview on Taguchi method. *International journal of engineering and mathematical sciences*, 1(1), 1-7.
- 13- Kazemi, F., Naghib, S. M., Zare, Y., & Rhee, K. Y. (2021). Biosensing applications of polyaniline (PANI)-based nanocomposites: a review. *Polymer Reviews*, 61(3), 553-597.
- 14- Karyakin, A. A. (2021). Glucose biosensors for clinical and personal use. *Electrochemistry Communications*, 125, 106973.
- 15- Khor, S. M., Choi, J., Ko, S. H., & Won, P. (2022). Challenges and strategies in developing an enzymatic wearable sweat glucose biosensor as a practical point-of-care monitoring tool for type II diabetes. *Nanomaterials*, 12(2), 221.
- 16-Komathi, S., Gopalan, A. I., Lee, K. P., & Muthuchamy, N., (2017). Polyaniline nanoflowers grafted onto nanodiamonds via a soft template-guided secondary nucleation process for high-performance glucose sensing. *RSC advances*, 7(25), 15342-15351.
- 17- Kuznetsova, L. S., Arlyapov, V. A., Kamanina, O. A., Lantsova, E. A., Tarasov, S. E., & Reshetilov, A. N. (2022). Development of Nanocomposite Materials Based on Conductive Polymers for Using in Glucose Biosensor. *Polymers*, 14(8), 1543.
- 18- Kyomuhimbo, H. D., & Feleni, U. (2023). Electroconductive Green Metal-polyaniline Nanocomposites: Synthesis and Application in Sensors. *Electroanalysis*, 35(2), e202100636.
- 19- Lai, J., Liu, J., Shen, J., Wu, K., Yi, Y., Zhang, L., & Zhu, P. (2016). Polyaniline-based glucose biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, 138-153.
- 20- Lakard, B. (2020). Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences*, 10(18), 6614.
- 21- Liu, J., Agarwal, M., & Varahramyan, K. (2008). Glucose sensor based on organic thin film transistor using glucose oxidase and conducting polymer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(1), 195-199.
- 22-Li, J., Li, H., Tang, X., Yan, Y., & Zhang, Q. (2010). Synthesis and thermoelectric properties of hydrochloric acid-doped polyaniline. *Synthetic Metals*, 160(11-12), 1153-1158.
- 23- Mohamad Nor, N., Abdul Razak, K., & Ridhuan, N. S. (2022). Progress of Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Biosensor Based on Nanomaterial-Modified Electrode. *Biosensors*, 12(12), 1136.

- 24-Popov, A., Aukstakojyte, R., Barkauskas, J., Gaidukevic, J., Kausaite-Minkstimiene, A., Lisyte, V., & Ramanaviciene, A. (2021). Reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers nanocomposite for the development of an amperometric glucose biosensor. *Sensors*, 21(3), 948.
- 25- Rassas, I., Braiek, M., Bessueille, F., Bonhomme, A., Jaffrezic-Renault, N., Majdoub, H., & Raffin, G. (2019). Highly sensitive voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulated in a chitosan/kappa-carrageenan/gold nanoparticle bionanocomposite. *Sensors*, 19(1), 154.
- 26- Shukla, V. K., Mishra, P., Pandey, A. C., Yadav, P., & Yadav, R. S. (2012). A new class of PANI-Ag core-shell nanorods with sensing dimensions. *Nanoscale*, 4(13), 3886-3893.
- 27-Turner, A. P. (2000). Biosensors--sense and sensitivity. *Science*, 290(5495), 1315-1317.
- 28- Vasileva, A. A., Kolesnikov, I. E., Manshina, A. A., Mamonova, D. V., Mikhailovskii, V., Petrov, Y. V., & Toropova, Y. G. (2023). 3D Nanocomposite with High Aspect Ratio Based on Polyaniline Decorated with Silver NPs: Synthesis and Application as Electrochemical Glucose Sensor. *Nanomaterials*, 13(6), 1002.
- 29- Xia, L., Xia, J., & Wang, Z. (2015). Direct electrochemical deposition of polyaniline nanowire array on reduced graphene oxide modified graphite electrode for direct electron transfer biocatalysis. *Rsc Advances*, 5(113), 93209-93214.
- 30-Zeng, X., Du, X., Li, Y., Tang, W., & Zhang, Y. (2018). A highly sensitive glucose sensor based on a gold nanoparticles/polyaniline/multi-walled carbon nanotubes composite modified glassy carbon electrode. *New Journal of Chemistry*, 42(14), 11944-11953.
- 31-Zheng, H., Chen, J., Liu, M., & Yan, Z. (2020). Highly selective and stable glucose biosensor based on incorporation of platinum nanoparticles into polyaniline-montmorillonite hybrid composites. *Microchemical Journal*, 152, 104266.
- 32- Zheng, W., Hu, L., Lee, L. Y. S., & Wong, K. Y. (2016). Copper nanoparticles/polyaniline/graphene composite as a highly sensitive electrochemical glucose sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 781, 155-160.
- 33-Zhong, H., Chai, Y., Li, Yuan, R., W., Zhang, Y., & Zhong, X. (2011). In situ chemo-synthesized multi-wall carbon nanotube-conductive polyaniline nanocomposites: Characterization and application for a glucose amperometric biosensor. *Talanta*, 85(1), 104-111.

Preproof

Fabrication of Biosensor based on Polyaniline Nanostructure/Silver Nanoparticles for Stabilizing Glucose Oxidase Enzyme and Measuring Blood Glucose in Diabetic Patients

Mahdavinia M.¹, Kiani G.R.^{1*}, Karimzadgavidel A.²

¹ Department of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Tabriz, Faculty of Chemistry, Tabriz, Iran

² Department of Mechanical Engineering, Technical and Vocational University, Tehran, Iran

Abstract

In the current research, a bio-sensor was fabricated to measure the blood glucose levels of diabetic patient using glucose oxidase enzyme. The produced bio-sensor is of the amperometric type, wherein polyaniline and silver nanoparticle were utilized as the enzyme stabilizer and sensitivity enhancer, respectively. The properties of the produced sample were investigated using electron scanning microscope and energy-dispersive X-ray spectroscopy. The morphological studies revealed that the nanocomposite layer of polyaniline/silver nanoparticles consistently covered the enzyme surface. During laboratory evaluations, an acceptable linearity was achieved within the concentration range of 60-160 mg/dl, with a sensitivity of 1.38 nA.dl/mg and a response time of 8 second. The bio-sensor output for real blood samples, within a temperature of 20-35 °C and glucose levels of 70-160 mg/dl, exhibited a significantly linear relationship with a sensitivity of 1.6 nA.dl/mg, representing a 14% improvement compared to previous samples. Statistical analysis indicated that the electrical current output of this sensor was independent of temperature and blood pH factors, thereby demonstrating that the designed biosensor can be successfully applied in clinical cases.

Keywords: Biosensor, Diabetes, Enzyme Immobilization, Polyaniline, Silver nanoparticles