

سنتر و بررسی زیست‌حسگر پایه کاغذی نانوکامپوزیت

گرافن / پلی‌وینیل‌پیرولیدون / پلی‌آنیلین برای تعیین کلسترول در خون انسان

پریسا فتوحی^۱، لیدا احمدخانی^{۲*}، علی باغبان^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه پیام نور مراغه

۲- استادیار، شیمی آلی، دانشگاه پیام نور مراغه

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۴

پیام‌نگار: Lahmadkhani@yahoo.com

چکیده

نانوکامپوزیت تشکیل یافته از گرافن، پلی‌وینیل‌پیرولیدون و پلی‌آنیلین برای اصلاح زیست‌حسگرهای با پایه کاغذی به کار گرفته شده است. نانو ساختارهای شبه قطره‌ای الکترودهای اصلاح شده گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین با اندازه متوسط $160 \pm 1/20$ نانومتر فراهم شدند. حضور پلی‌وینیل‌پیرولیدون (در حدود ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در نانوکامپوزیت‌ها بهبود چشمگیری در قابلیت پخش شدن گرافن و افزایش رسانایی الکتروشیمیایی الکترودها پدید می‌آورد که به تسهیل گزینش پذیری زیست‌حسگر می‌انجامد. ولتانگاری چرخه‌ای (فرو یا فری سیانید) استاندارد بر الکترودهای اصلاح شده گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین به دست آمد. الکترودهای اصلاح شده غالباً فعالیت الکتروکاتالیتیکی بسیار مناسبی را نسبت به اکسایش هیدروژن پراکسید بروز می‌دهد. همچنین، کلسترول اکسیداز جهت تعیین کلسترول به الکترودهای اصلاح شده گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین متصل می‌شود. تحت شرایط بهینه، فعالیت الکترودها در گستره ۵۰ میکرومولار تا ۱۰ میلی‌مولار از غلظت کلسترول به صورت خطی است و محدودیت آشکارسازی کلسترول در حد ۱ میکرومولار به دست آمده است. این نانوکامپوزیت برای تعیین کلسترول در سیال زیستی مانند سرم انسانی به کار برده شد.

کلیدواژه‌ها: گرافن، پلی‌وینیل‌پیرولیدون، پلی‌آنیلین، نانوکامپوزیت، زیست‌حسگر با پایه کاغذی، کلسترول.

۱. مقدمه

زیست‌حسگرهای با پایه کاغذی، به دلایلی از جمله ارزان، فراوانی، زیست‌سازگاری و در دسترس بودنشان نسبت به مواد مرسوم مانند شیشه، سرامیک، اسپر بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند: علاوه بر آن، گزینش پذیری در زیست‌حسگرهای با پایه کاغذی به حجم کمتری از نمونه و واکنش‌گر نیاز دارد، بنابراین، بهره‌گیری از آنها را برای کاربرد در زیست‌حسگرها مناسب می‌سازد [۲].

توسعه، پیشرفت و افزایش گزینش پذیری، و نیز کاهش قیمت زیست‌حسگرها برای تشخیص هر چه سریع‌تر بیماری‌های خاص، بسیار مهم است. اخیراً از کاغذهای صافی سلولزی به منظور تهیه مواد جاذب به دلیل برخورداری از ناحیه سطحی بزرگ و قیمت پایین، در حسگرها به کار گرفته شده است [۱-۳].

* مراغه، دانشگاه پیام نور مراغه، دانشکده علوم، آزمایشگاه نانو

آلی به کار می‌رود [۱۱] ترکیب گرافن- پیرولیدون، برای اصلاح و بهبود کارکرد الکترودها در زیست‌حسگرها مناسب است [۹،۱۲] برای اصلاح الکتروده، نانو کامپوزیت‌های شامل گرافن و بسپارهای رسانا، نسبت به گرافن خالص توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند، زیرا این کامپوزیت‌ها برای ساخت و عامل‌دار کردن زیستی الکترودها مناسب‌اند [۱۶-۱۳].

بسپارهای رسانای مختلفی در ساخت زیست‌حسگرها به کار رفته است که از آن جمله می‌توان به پلی آنیلین^۲ [۹،۱۳،۱۴،۱۶]، پلی پیرول^۳ [۱۸،۱۹] و پلی (۴-آیلین دی اکسی تیوفن)^۴ [۲۰،۲۱] اشاره کرد. از میان بسپارهای رسانا، پلی آنیلین به دلیل برخورداری از خواص الکتروشیمیایی بهتر، فرایندپذیری آسان‌تر، پایداری محیطی بالاتر و سمیت کمتر، برای استفاده در زیست‌حسگرها مناسب است. براساس گزارش‌های قبلی، نحوه رسانش پلی آنیلین را می‌توان از طریق آغشته کردن پلی آنیلین با یک اسید مانند کافورسولفوریک اسید^۵ در کلروفرم به سادگی تهیه کرد [۲۲]. همچنین، تعدادی از گروه‌های آمینی (NH₂) موجود در پلی آنیلین به سهولت می‌توانند به کمک زیست‌مولکول‌ها، عامل‌دار شوند [۱۳،۱۴] که برای کاربرد زیست‌حسگرها بسیار مورد توجه‌اند.

در این مقاله، زیست‌حسگر با پایه کاغذی گرافن/ پلی‌وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین مورد مطالعه قرار گرفته است. برای ساخت نانو کامپوزیت گرافن/ پلی‌وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین^۶ بر روی زیست‌حسگر پایه کاغذی از روش افشاندن^۷ استفاده شده، چون قادر است یک نانو ساختار ریز قطره سه بعدی بر روی سطح الکتروده اصلاح شده ایجاد کند. الکترودهای اصلاح شده نانو ریز قطره G/PVP/PANI در مقایسه با الکترودهای اصلاح شده لایه نازک، نسبت سطح به حجم بیشتری را فراهم می‌آورند که به افزایش گزینش‌پذیری الکتروشیمیایی زیست‌حسگرها می‌انجامد. افزایش سطح ویژه الکتروده برای عامل‌دار کردن بیشتر الکتروده مانند بارگذاری آنزیم بسیار مفید است.

نشانه‌های زیستی عبارت‌اند از زیست‌مولکول‌هایی که قادرند فرایندهای طبیعی یا بیماری‌زا را در یک دستگاه زیستی شناسایی کنند که این فرایندها شامل میزان پرتودهی در عوامل محیطی،

از میان روش‌های آشکارسازی، آشکارسازی الکتروشیمیایی به دلیل کاربرد آسان، اندازه قابل حمل، اختصاصی بودن، گزینش‌پذیری بالا و تجزیه سریع بسیار درخور توجه است؛ علاوه بر آن، به طور همزمان می‌توان اطلاعات کیفی و کمی را تعیین کرد که این نوع زیست‌حسگرها در تشخیص‌های پزشکی [۲]، ثبت اطلاعات محیطی [۲،۴] و کنترل کیفی غذا [۵] کاربردهای گسترده‌ای دارند. زیست‌حسگرهای با پایه کاغذی را می‌توان به روش‌های گوناگونی، از جمله، فیتولیتوگرافی [۱،۲]، چاپ صفحه‌ای مومی [۲]، غوطه‌ور کردن در موم [۳] و یا چاپ مومی [۶،۷] تهیه کرد. امروزه بزرگترین محدودیت زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی با پایه کاغذی در آشکارسازی نشانگرهای زیستی با فراوانی کم، و پایین بودن گزینش‌پذیری آنهاست؛ به همین منظور، برای افزایش حساسیت این گونه زیست‌حسگرها از نانوذراتی مانند نانولوله کربنی، نانو ذرات فلزی و جز آنها که از نسبت سطح به حجم بالایی برخوردار است استفاده می‌شود.

در سال‌های اخیر، گرافن از جهت برخورداری از خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و الکتریکی منحصر به فردش بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گرافن لایه‌ای از اتم‌های کربن است که به صورت یک لایه دو بعدی در پیکربندی شش ضلعی قرار گرفته است. دلیل استفاده از گرافن در وسایل الکترونیکی، افزایش رسانایی الکتریکی و کاهش گاف انرژی است. زیرا، گاف انرژی کوچک در گرافن برای رسانایی الکترون‌ها از مولکول‌های هدف در زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بسیار مطلوب است. همچنین، نسبت بالای سطح به حجم گرافن، آن را برای بارگذاری زیست‌گیرنده‌هایی چون آنزیم‌ها و پادتن‌ها بر روی سطح آن‌ها، بسیار مطلوب می‌کند.

بنابر گزارش‌های ارائه شده، حساسیت حسگرهای شیمیایی با پایه گرافنی در دماهای بالا، به دلیل کاهش درصد خطای الکترونیکی، افزایش یافته است [۸-۱۰]. گرافن را در مقایسه با آلوتروپهای کربن مانند نانولوله کربنی و فولرن می‌توان از تبدیل شیمیایی گرافیت به آسانی تهیه کرد [۸]. گرافن به دلیل ساختار SP² مسطح و حضور نیروهای گرانشی و اندروالسی گرایش زیادی به تجمع دارد؛ از این رو در طی آزمایش‌های انجام شده، آماده‌سازی محلول گرافن با پخش شدگی مناسب، بسیار دشوار و وقتگیر است. بنابر گزارش‌های اخیر، پلی‌وینیل پیرولیدون^۱ برای تثبیت غلظت بالایی از گرافن در حلال‌های

1. PVP

2. PANI
3. PPy
4. PEDOT
5. CSA
6. G/PVP/PANI
7. Electrospraying

قابلیت‌های ژنتیکی و علائم بهبود بیماری‌اند. یکی از مهمترین نشانگرهای زیستی بیماری‌های قلبی-عروقی و فشارخون بالا، وجود مقدار زیاد کلسترول در خون است. بنابراین، انواع روش‌هایی که بتواند میزان کلسترول را به طور دقیق تعیین کند، بسیار اهمیت دارد.

یکی از روش‌های متداول که در اکثر موارد برای اندازه‌گیری میزان کلسترول خون به‌کار گرفته می‌شود، استفاده از روش طیف-نورسنجی است [۲۳، ۲۴] که ساخت چنین حسگری اغلب پرهزینه است. با ظهور نانومواد، از جمله نانوذرات فلزی و نانولوله‌های کربنی، عملکرد زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی برای تشخیص میزان کلسترول خون بهبود یافته است [۲۶-۲۷]. در این راستا، نانوکامپوزیت جدیدی با ساختار گرافن/پلی‌وینیل‌پیرولیدون/پلی‌آنیلین^۱ تهیه شده و برای اصلاح الکتروکاتود کار زیست‌حسگر با پایه کاغذی از طریق افشانه کردن، استفاده شده است. ریزساختارهای قطره‌سه بعدی الکتروکاتود اصلاح شده با نانوکامپوزیت G/PVP/PANI به‌خاطر تعیین هیدروژن پراکسید و کلسترول در آمپرسنجی به‌کار می‌رود. از اینرو، عملکرد سیستم دریافت‌کننده بهینه و در نتیجه غلظت کلسترول در یک سیال زیستی، مانند سرم انسانی به آسانی تعیین می‌شود.

همه مواد به‌کار رفته در پروژه، دارای خلوص تجزیه‌ای‌اند. در این ارتباط، نانوذرات گرافن از شرکت (Sky Spring Nanomaterials) و کلسترول و کلسترول اکسیداز (418 u/mg) از شرکت (Streptomyces) تهیه شد. سدیم دو دسیل سولفات^۲، پلی‌اکسی اتیلن اکتیل فنیل اتر (تری‌تون-100، x)، کافور^{۱۰}-سولفونیک اسید^۳، پلی‌آنیلین^۴، پلی‌استیرن (MW=180,000 ps)، پلی‌وینیل‌پیرولیدون (MW=10,000 pvp)، تری‌کلرواستیک اسید^۵، دی‌متیل فرمامید^۶، کلروفورم و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات^۷، دی‌سدیم هیدروژن فسفات^۸، پتاسیم کلرید، سدیم کلرید، جوهر کربن و جوهر نقره/نقره کلرید از شرکت مرک خریداری شد. از کاغذ صافی شماره ۱ واتمن در ابعاد

محلول اولیه کلسترول با استفاده از مخلوط تری‌تون x-100 (5 % w/v) و آب مقطر تهیه و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. محلول کلسترول اکسید به صورت محلول تازه تهیه شده در بافر مورد به‌کار گرفته شد. برای تعیین کلسترول در نمونه‌های زیستی واقعی، سرم انسانی منجمد شده به‌کار رفت که از مرکز پژوهش ژنتیک خریداری شد. همه اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی شامل ولت‌سنجی چرخه‌ای و آمپرسنجی با بهره‌گیری از دستگاه آنالیزور الکتروشیمیایی (CHI 1232A) شرکت آمریکایی انجام شد. برای تعیین ساختار الکتروکاتود تهیه شده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (JSM-6400) و میکروسکوپ الکترون عبوری (JEM-2100) شرکت (Japan Electron Optics Laboratory Co) استفاده شد. سیستم سه الکترودی به‌کار گرفته شد و الکتروکاتود، الکتروگرافن/پلی‌وینیل‌پیرولیدین/پلی‌آنیلین اصلاح شده و الکتروکاتود کربن صفحه-غربالی (با قطر ۴ میلی‌متر) انتخاب شد، و برای بهبود و اصلاح الکتروکاتود از سیستم معمول الکترو افشانه‌ای استفاده شد.

۲. مواد و تجهیزات

۳. ساخت زیست‌حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با نانوکامپوزیت G/PVP/PANI به روش افشانه‌ای

زیست‌حسگر با پایه کاغذی با استفاده از روش چاپ مومی با کمترین اصلاح اولیه در [۷] ساخته شده است. زیست‌حسگر یادشده، طراحی شده با نشانگر آدوب^۱، با بهره‌گیری از چاپگر مومی، بر روی کاغذ صافی چاپ شد و سپس زیست‌حسگر با پایه کاغذی چاپ شده بر روی یک صفحه داغ در دمای ۱۷۵ درجه سلسیوس قرار گرفت تا موم ذوب شود. ناحیه موم اندود آب‌گریز بود در حالی که ناحیه بدون موم آب‌دوست می‌باشد.

در سیستم سه الکترودی زیست‌حسگر با پایه کاغذی، الکتروکاتود^{۱۱} و الکتروکاتود مخالف^{۱۲} که به‌کمک چاپگر معمولی با استفاده از

9. PBS
10. Adobe
11. WE
12. CE

1. G/PVP/PANI
2. SDS
3. CSA
4. PANI
5. TCA
6. DMF
7. KH₂PO₄
8. Na₂HPO₄

گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین قادرند به طور یکنواخت بر سطح الکتروود اصلاح شده تولید شوند، بنابراین، اندازه متوسط هر قطره چکنده، مطابق شکل (۲) - الف، در حدود $160 \pm 1/20$ نانومتر است. همچنین، در شکل (۲) - ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری^۴ از نانوکامپوزیت گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین، پراکندگی مناسب و بدون تجمع از نانوغرافن را در داخل نانو کامپوزیت حاصل مشاهده می‌کنید. همانطور که مشاهده می‌شود، الگوی پراش گرافن در شکل (۲) - ب) با گزارش‌های قبلی بخوبی منطبق است [۲۱]. برای الکتروافشانش، تأثیر ولتاژ، زمان تزریق و نسبت گرافن به پلی‌آنیلین بر رسانایی الکتروشیمیایی الکتروودهای اصلاح شده، تحقیق و بهینه‌سازی شد. در این مقاله، نسبت گرافن به پلی‌آنیلین به صورت ۱:۱ انتخاب شد. برای تهیه نانو کامپوزیت گرافن- بسپار، جز بسپار رسانای پلی‌آنیلین، از پلی‌وینیل‌پیرولیدون و پلی‌استایرن نیز به عنوان تثبیت‌کننده گرافن و بسپار حامل برای الکتروافشانشی، استفاده شد.

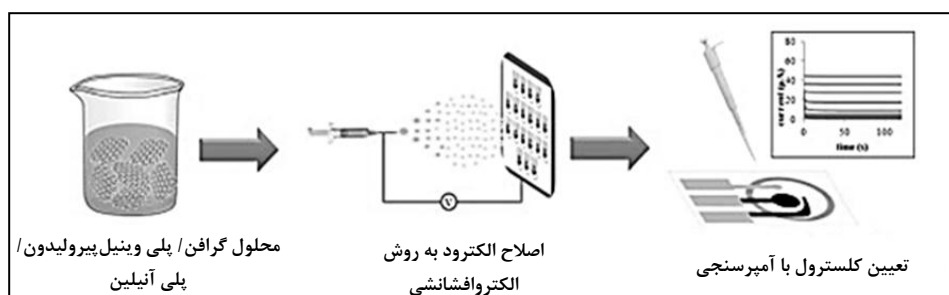
به منظور بررسی فرایند انتقال الکترون، ولت‌سنجی چرخه‌ای بر الکتروودهای مختلف مانند: گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین، گرافن/ پلی‌آنیلین، هموپلی‌آنیلین و الکتروودهای کربن اصلاح نشده انجام شده و از (فرو یا فری‌سیانید) به عنوان ردیاب‌های ردوکس سودجسته شد. بیشینه جریان‌های آندی و کاتدی (فرو یا فری‌سیانید) از جمله بیشینه‌های شاخص برای الکتروودها به‌شمار می‌آیند. بالاترین بیشینه‌های جریان‌های آندی و کاتدی (فرو یا فری‌سیانید) بر الکتروود اصلاح شده گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین مشاهده شده است (خط سبز) که نشانگر حساسیت زیاد سیستم است.

جوهر کربن ساخته شده بود، به کار رفت و از الکتروود (نقره/ نقره کلرید) به عنوان الکتروود مرجع و لایه رسانا استفاده شد.

در ابتدا، از پلی‌آنیلین و کافورسولفوریک اسید برای تهیه نوع رسانای پلی‌آنیلین و محلول در کلروفرم بهره گرفته شد. سپس، محلول پلی‌وینیل‌پیرولیدون اولیه با انحلال مقدار اندکی از پلی‌وینیل‌پیرولیدون در حلال دی‌متیل فرمامید^۱ و هم‌زدن در دمای اتاق تهیه شد. پخش‌شدگی گرافن در محلول پلی‌وینیل‌پیرولیدون و پلی‌آنیلین توسط دستگاه فراصوت در دمای اتاق انجام شد. سیستم افشانش از تلمبه تزریق، تأمین‌کننده پرولتاژ، جاروب‌کننده زمینه، سرنگ و سوزنی از جنس استیل تشکیل شده است. به‌خاطر محافظت الکتروود اصلاح شده در خلال افشاندن، الکتروود مخالف و الکتروود مرجع^۲ با بهره‌گیری از پوشش محافظت شدند. محلول نانوکامپوزیت گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین در داخل سرنگ با هم درآمیختند و ولتاژ بالا در محلول برقرار شد. محلول نانوکامپوزیت در یک استوانه دوار بر روی الکتروود کار زیست‌حسگر با پایه کاغذی، با سرعت و ولتاژ کنترل شده افشانه شد، در حالی که فاصله بین نوک سوزن و جاروب‌کننده زمینه در فاصله ۵ سانتی‌متری ثابت شد.

۴. شناسایی زیست‌حسگر با پایه‌ی کاغذی اصلاح‌شده نانوکامپوزیت G/PVP/PANI

به منظور اصلاح سطح الکتروود و افزایش ناحیه سطحی الکتروود کار، روش الکتروافشانشی گرافن به کار گرفته شد. ساختار الکتروود اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین با سودجستن از میکروسکوپ الکترون روبشی^۳ بررسی شد (شکل (۱)). با توجه به این‌که، ساختارهای سه بعدی ریز قطره



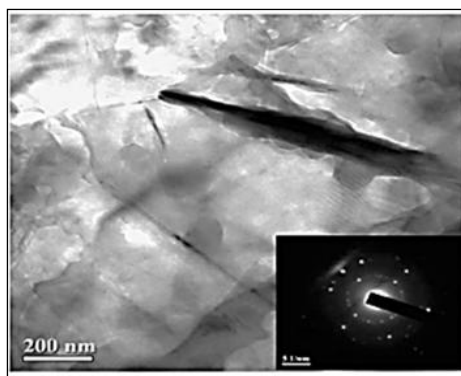
شکل ۱. طرح کل ساخت زیست‌حسگر پایه کاغذی اصلاح شده نانوکامپوزیت G/PVP/PANI.

1. DMF

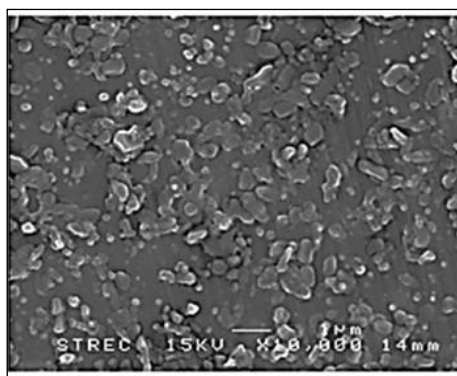
2. RE

3. SEM

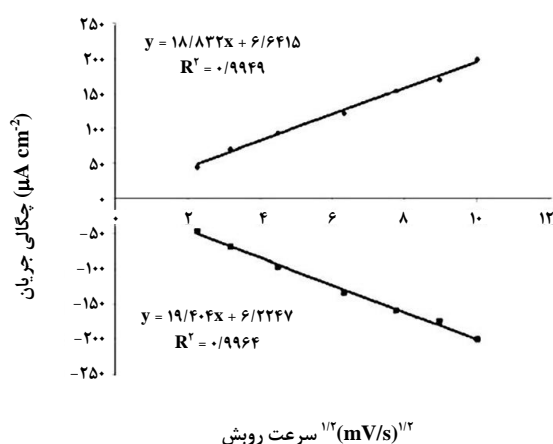
4. TEM



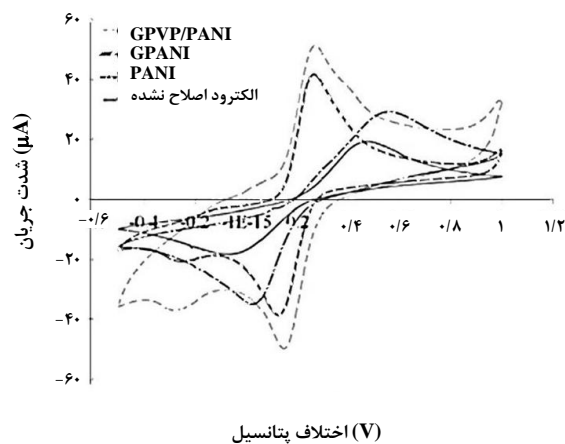
(ب)



(الف)



(ت)



(پ)

شکل ۲. بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی الکترودهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین؛ (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) الکترودهای اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین؛ (ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین با الگوی پراش الکترون گرافن (داخل شکل ۱-ب)؛ (پ) ولتاژنگارهای چرخه‌ای (فرو یا فری‌سیانید) در پتانسیل ۰/۱ مولار، اندازه‌گیری شده بر الکترودهای کار زیست‌حسگر با پایه کاغذی با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه؛ (ت) نسبت بین جذر سرعت روبش و بیشینه جریان اندازه‌گیری شده در محدوده ۵ و ۱۰ میلی‌ولت بر ثانیه.

$\Delta E_p = 0.155$ در مقایسه با ΔE_p حاصل از الکترودهای اصلاح شده با پلی‌آنیلین (خط بنفش $\Delta E_p = 0.508$)، کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد که بیانگر نقش گرافن در افزایش سینتیک انتقال الکترون در نانو کامپوزیت‌هاست.

ملاحظه می‌شود که بهره‌گیری از پلی‌وینیل‌پیرولیدون به عنوان تثبیت‌کننده برای پخش‌شدگی گرافن می‌تواند به افزایش در بیشینه‌های جریان آندی و کاتدی در سیستم دریافت‌کننده منجر شود که در شکل (۱-پ) (خط سبز و خط قرمز) مشاهده می‌شود.

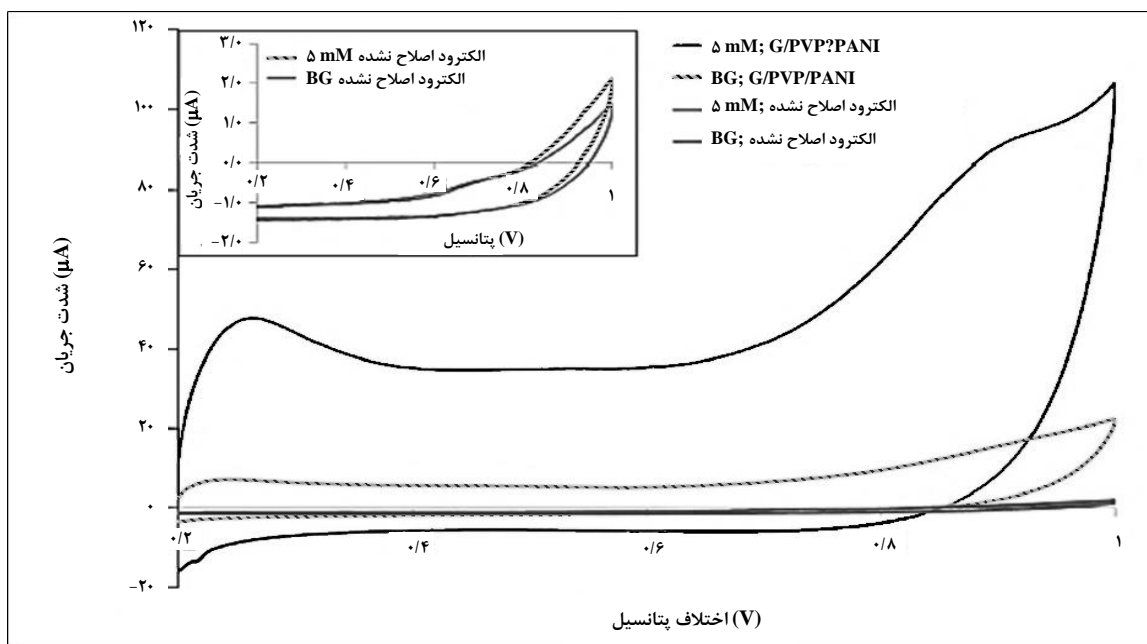
بیشینه جریان، به ترتیب، برای الکترودهای اصلاح شده با گرافن/ پلی‌آنیلین و هموپلی‌آنیلین و الکترودهای کربن اصلاح نشده، به تدریج کاهش می‌یابد. بنابراین، با مقایسه الکترودهای اصلاح شده پلی‌آنیلین (خط بنفش) می‌توان نتیجه گرفت که افزودن گرافن داخل نانو کامپوزیت‌ها قادر است هر دو بیشینه جریان‌های آندی و کاتدی (فرو یا فری‌سیانید) را افزایش دهد (خط قرمز). اختلاف پتانسیل بیشینه‌های ΔE_p (فرو یا فری‌سیانید) اندازه‌گیری شده بر روی الکترودهای اصلاح شده با گرافن/ پلی‌آنیلین (خط قرمز

کاتدی (فرو یا فری سیانید) در جذر سرعت پویش در محدوده ۲ تا ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه خطی است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مرحله ردوکس از طریق مرحله نفوذ کنترل شده است.

۴-۱ آشکارسازی هیدروژن پراکسید و کلسترول

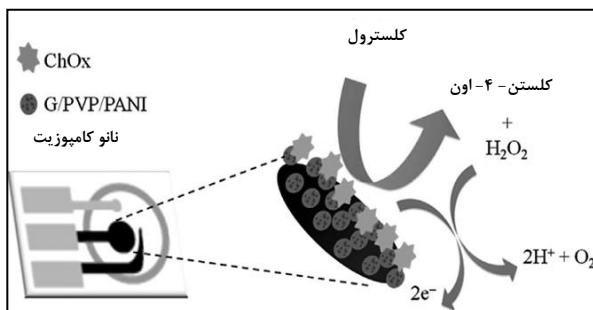
در زیست حسگرهای الکتروشیمیایی، می‌توان مستقیماً از تعیین مقدار هیدروژن پراکسید تولید شده از اکسایش کلسترول برای اندازه‌گیری مقدار کلسترول مورد نظر بهره گرفت [۲۷، ۲۸]. در این تحقیق، زیست حسگر با پایه کاغذی جدیدی مبنی بر الکترو اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل پیرولیدون/ پلی‌آنیلین به منظور افزایش حساسیت تعیین پراکسید هیدروژن و کلسترول به‌کار رفته در ولت‌سنجی چرخه‌ای و آمپرسنجی، مورد استفاده قرار گرفته است. ولتاژنگارهای چرخه‌ای هیدروژن پراکسید را که برای الکترو اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل پیرولیدون/ پلی‌آنیلین و الکترو اصلاح نشده انجام و اندازه‌گیری شده در شکل (۳) مشاهده می‌کنید.

مزیت دیگر سودجستن از پلی‌وینیل پیرولیدون، کاهش زمان لازم برای پخش‌شدگی گرافن از ۲۴ ساعت به ۶ ساعت است [۱۱]. در صورتی که از پلی‌وینیل پیرولیدون استفاده نشود، زمان پخش‌شدگی گرافن به منظور جلوگیری از تجمع گرافن به ۲۴ ساعت افزایش می‌یابد؛ بنابراین، مقدار (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از پلی‌وینیل پیرولیدون در دی‌متیل فرامید به عنوان تثبیت‌کننده برای پخش‌شدگی گرافن استفاده شد. اخیراً در آزمایش هیدروژن پراکسید و کلسترول، رفتار الکتروشیمیایی زیست حسگر پایه‌ی کاغذی اصلاح شده با نانو کامپوزیت گرافن/ پلی‌وینیل پیرولیدون/ پلی‌آنیلین با بهره‌گیری از (فرو یا فری سیانید) استاندارد به عنوان ردیاب ردوکس بررسی شده است. همچنین، با بهره‌گیری از محلول (فرو یا فری سیانید) در پتاسیم کلرید که به صورت قطره‌ای بر سطح الکترو اصلاح شده قرار گرفته بود، اندازه‌گیری‌های ولت‌سنجی چرخه‌ای در سرعت‌های مختلف انجام و رابطه بین جذر سرعت پویش ($U^{\frac{1}{2}}$) و چگالی جریان در شکل (۱۱-ت) نشان داده شده است. بیشینه جریان‌های آندی و



شکل ۳. ولتاژنگار چرخه‌ای ۵ میلی مولار هیدروژن پراکسید در ۰/۱ مولار بافر PBS با $\text{pH}=7$ اندازه‌گیری شده بر روی الکترو اصلاح شده گرافن/ پلی‌وینیل پیرولیدون/ پلی‌آنیلین و الکترو اصلاح نشده با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه.

حد آشکارسازی^۲ برای کلسترول ۱ میکرومولار حاصل شد. حد آشکارسازی عبارت است از غلظتی که در آن سیگنال تأمین شده ۳ برابر انحراف استاندارد زمینه ($n=5$) باشد [۳۰]. بنابر گزارشهای برنامه تحقیقات ملی کلسترول^۳، سطح متعارف کلسترول خون در انسان کمتر از ۵/۱۸ میلی مولار (۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر) است [۳۱]. این اطلاعات حاکی است که سیستم مورد نظر ما می تواند برای تعیین میزان کلسترول در نمونه های زیستی حقیقی به کار رود.



شکل ۴. واکنش آنزیمی بین کلسترول و کلسترول اکسید بر زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین.

مقایسه عملکرد الکتروشیمیایی الکتروود اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین با دیگر الکتروودهای اصلاح شده به کار رفته برای آشکارسازی کلسترول را در جدول (۱) درج کرده ایم. با توجه به داده های جدول ارائه شده، الکتروود حاضر در یک محدوده خطی وسیع دارای حساسیت الکتروشیمیایی نسبتاً بالایی است. بنابراین، زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین به دلیل در دسترس بودن، روش ساخت آسان و ارزانی آن پیشنهاد می شود که محتمل ترین وسیله برای آشکارسازی کلسترول به حساب می آید.

بنابر گزارشهای قبلی، گلوکز و اسید آسکوربیک متداول ترین مولکول های تولید شده در طی فرایند آشکارسازی کلسترول در سیال های زیستی مانند سرم انسانی اند. بنابراین، آشکارسازی انتخابی کلسترول در حضور گلوکز و اسید آسکوربیک با بهره گیری از بیشترین غلظت های پیش بینی شده از گلوکز (۵/۳ میلی مولار)

در مقایسه با الکتروود کربن اصلاح نشده (خط قرمز) افزایش چشم گیر ۴۰ برابر شدن سیگنال جریان آنودی هیدروژن پراکسید مشاهده شد که حاکی است، الکتروود اصلاح شده می تواند به عنوان وسیله ای مناسب برای آشکارسازی کلسترول پیشنهاد شود. به دلیل حساسیت زیاد و کاربرد گسترده برای آشکارسازی هیدروژن پراکسید و کلسترول از زمان - آمپرسنجی استفاده می شود. در زیست حسگر کلسترول، هیدروژن پراکسید از واکنش آنزیمی بین کلسترول و کلسترول اکسید^۱ تولید می شود که تصویر نموداری آن را در شکل (۳) مشاهده می کنیم [۲۳ و ۱]. بنابراین، بهینه سازی مقدار کلسترول اکسید بر روی زیست حسگر با پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین مهم است. در این مطالعه، حجم های متفاوتی از کلسترول اکسید به صورت قطره ای، مستقیماً بر الکتروود اصلاح شده چکانده و سپس در دمای اتاق خشک شد. با توجه به نمودارهای شکل (۲)، الکتروود اصلاح شده گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین نسبت به H_2O_2 در ولتاژ ۰/۶ ولت حساسیت زیادی بروز می دهد. بنابراین، ولتاژ ۰/۶ ولت به عنوان اختلاف پتانسیل آشکارسازی آمپرسنجی برای آزمایش انتخاب شد. بعد از بررسی اثر حجم آنزیم بر سیگنال جریان آنودی (ولتاژ ۰/۶ ولت) کلسترول ۱ میلی مولار، در محدوده ۰/۱ تا ۱ میکرولیتر، حجم بهینه شده آنزیم ۰/۴ میکرولیتر تعیین شد.

۲-۴ بررسی عملکرد زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با نانوکامپوزیت گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین

زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین برای اندازه گیری کلسترول در غلظت های متفاوت استفاده شد و پاسخ های جریان آمپرسنجی آن در یک حالت جریان ۱۰۰ ثانیه ای برای ترسیم منحنی درجه بندی برای غلظت کلسترول ثبت شد (شکل (۴)). نمودار درجه بندی بین غلظت های بالای کلسترول در محدوده ۵۰ میکرومولار تا ۱۰ میلی مولار با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹۳ رابطه خطی برقرار است. حساسیت آشکارسازی زیست حسگر اصلاح شده با نانوکامپوزیت گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون/ پلی آنیلین از تقسیم شیب نمودار به مساحت سطح، معادل $34/77 \text{ cm}^{-2} \text{ mM}^{-1} \mu\text{m}^2$ به دست آمد [۲۹].

2. LOD
3. NCEP

1. Shox

جدول ۱. مقایسه زیست‌حسگرهای کلسترول بر پایه الکترودهای اصلاح شده با نانو مواد- بسیار.

منابع	گزینه پذیرد ($\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^2$)	محدوده غلظتی (mM)	LOD (μM)	روش تثبیت آنزیم	جز گیرنده	روش آشکارسازی	الکتروده اصلاح شده
۱۷	۱۶/۵۴	۰/۱۳-۱۲/۹۵	۰/۰۳۱۳	جذب فیزیکی	ChOx	DPV	NiFe ₂ O ₄ /CuO/Feo-Ch/ChOx
۳۱	۲۹/۳۳	۰/۹۷-۷/۸	۱۲/۹۵	به دام اندازی	ChOx/ChEt	CV	Ti/NPAu/ChOx-HRP-ChE
۳۴	۴۵/۹۶	۰/۰۴-۰/۲۲	۳۴/۶	پیوند کووالانسی	ChOx	CV	AuE/dithiol/AuNPs/MUA/ ChOx
۲۷	-	۰/۰۵-۰/۳۵	۵	پیوند کووالانسی	ChOx	آمپرسنجی	ChOx-FG/G
۳۵	۹۰/۷	۰/۰۵-۶/۲ ۶/۲-۱۱۲	۱۰	رابطه متقاطع	ChOx	آمپرسنجی	AuPt-Ch-IL/GCE
۲۸	۳۱۴	۰-۱۳۵	--	جذب فیزیکی	ChOx	آمپرسنجی	AuNPs/f-Gmodified GCE
۳۳	۱/۰۲	۰/۰۰۱-۰/۰۴۵	۰/۵	جذب فیزیکی	ChOx	آمپرسنجی	CSNF-AuNPs/ChOx
۲۶	۱۸/۶	۰/۰۱-۱/۰۵	۲/۲	جذب فیزیکی	ChOx	آمپرسنجی	ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/ MWCNTs/GCE
-	۳۴/۷۷	۰/۰۵-۱۰	۱	جذب فیزیکی	ChOx	آمپرسنجی	نانو کامپوزیت G/PVP/PANI

اختصارات: (nPt) نانو ذرات پلاتین، (GCE) الکتروده کربن شیشه‌ای، (AuNPs) نانو ذرات طلا، (f-G) نانو سطوح گرافن عامل دار، (IL) مایع یونی، (Ch) چیتوسان، (HRP) پراکسیداز، (ChEt) کلسترول استراز، (CSNF) نانوفیبرهای چیتوسان، (AuE) الکتروده طلا، (MUA) ۱۱- مرکاپتان دکانوتیک اسید، (PDDA) پلی- دی آلایل دی متیل آمونیوم کلرید، (MWCNTs) نانو تیوبهای کربن چند لایه

پوشیده شده با ماده فعال سطحی آنیونی برای محدوده نسبتاً وسیعی دارای نسبت خطی است که این نتایج مشابه نتایج حاصل از الکتروده بدون ماده فعال سطحی آنیونی است.

۳-۴ تکرارپذیری و پایداری الکتروده اصلاح شده با گرافن / پلی وینیل پیرولیدون / پلی آنیلین

تکرارپذیری و پایداری الکتروده اصلاح شده با نانوکامپوزیت گرافن / پلی وینیل پیرولیدون / پلی آنیلین باید با بهره‌گیری از آشکارسازی آمپرسنجی کلسترول ۱ میلی مولار آزمایش شود. انحراف استاندارد نسبی^۲ تمام غلظت‌های کلسترول در محدوده خطی ۱/۰۵٪ و ۹/۳۷٪ (n=۵)، تکرارپذیری قابل قبولی را برای این زیست‌حسگر نشان می‌دهد. پایداری زیست‌حسگر با بهره‌گیری از اندازه‌گیری پاسخ‌های جریان (۱ میلی مولار) به‌کار رفته در تهیه زیست‌حسگر با پایه کاغذی مطالعه شد؛ تراکم ۸۹/۱٪ پاسخ اولیه بعد از یک دوره نگهداری دو هفته‌ای نشان داد که زیست‌حسگر با پایه کاغذی از ثبات و پایداری مطلوبی برخوردار است.

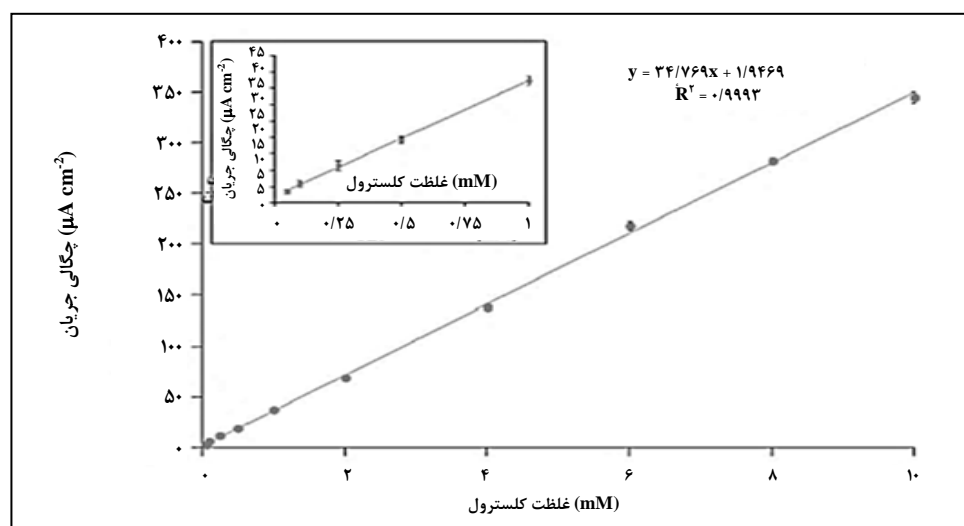
و اسیدآسکوربیک (۸۰ میکرومولار) در سرم انسانی مورد تحقیق و پژوهش شده است [۳۲-۳۰]. بنابر نتایج تحقیقات انجام شده، تأثیر گلوکز بر روی پاسخ جریان آمپرسنجی مخلوط کلسترول و گلوکز چشم‌پوشیدنی است، در حالی که اسیدآسکوربیک بر پاسخ جریان، تداخل برقرار می‌کند. برای حل‌وفصل مشکل تداخل اسیدآسکوربیک، از ماده فعال سطحی آنیونی^۱ برای پوشاندن الکتروده اصلاح شده گرافن / پلی وینیل پیرولیدون / پلی آنیلین استفاده شد. براساس تحقیقات انتشاریافته، رانش الکتروستاتیکی بین ماده فعال سطحی آنیونی و اسیدآسکوربیک در pH=۷/۴ و pK_a=۴/۱ می‌تواند مانع تأثیر تداخلی اسیدآسکوربیک در آشکارسازی کلسترول شود [۳۲].

در این مطالعه، مقدار کمی از ماده فعال سطحی آنیونی بر سطح الکتروده چکانده و در دمای اتاق خشک شد. غلظت بهینه ماده فعال سطحی آنیونی که می‌تواند مانع تأثیر تداخلی اسیدآسکوربیک با غلظت بالایی در حدود ۱۲۰ میکرولیتر برای آشکارسازی ۱ میلی‌مولار کلسترول شود، در حدود ۲ میلی مولار تعیین شد. پاسخ الکتروده اصلاح شده گرافن / پلی وینیل پیرولیدون / پلی آنیلین

۴-۴ تحلیل نمونه

زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون / پلی آنیلین به صورت شناور در داخل محلول نگه داشته شد. نتایج حاکی از آنند که پاسخ‌های جریان، وابسته به غلظت کلسترول اند و رابطه خطی قابل قبولی با ضریب هم‌بستگی^۱ معادل با ۰/۹۹۹۸ به ازای (N=۳) برقرار است. درصدهای بازیابی به دست آمده در محدوده ۱۰۰٪ تا ۱۰۲٪ در جدول (۲) درج شده است و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۵٪ حاصل شد که حاکی از صحت و دقت بالای کارکرد سیستم است.

برای آزمون قابلیت کاربردی سیستم، زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی وینیل پیرولیدون / پلی آنیلین برای آشکارسازی کلسترول در سرم انسانی به کار گرفته شد. بهره‌گیری از نمونه سرم انسانی شاهد، روشی متداول برای تعیین صحت و اعتبار سیستم تشخیصی جدید است. با توجه به شکل (۵)، غلظت‌های متفاوتی از کلسترول داخل سرم انسانی وارد و پروتئین‌های داخل سرم نیز رسوب داده شدند. بعد از قرار گرفتن در دستگاه مرکزگریز (سانتریفیوز) برای انجام آمپرسنجی با استفاده از



شکل ۵. نمودار درجه‌بندی برای تعیین کلسترول در محدوده غلظتی ۵۰ میکرومولار تا ۱۰ میلی مولار و نمودار کالیبراسیون (درونی) بین ۵۰ میکرومولار و ۱ میلی مولار در حضور بافر ۰/۱ مولار و pH=۷.

جدول ۲. تعیین کلسترول در نمونه‌های سرم انسانی (n=۳).

غلظت کلسترول (mM)	بازیابی (%)	انحراف استاندارد (%)
۰/۰۵	۱۰۰/۰	۰/۸
۰/۱۰	۱۰۰/۰	۰/۸
۰/۲۵	۱۰۰/۰	۱/۲
۱/۰۰	۱۰۲/۰	۱/۰
۵/۰۰	۱۰۰/۲	۰/۶
خطای نسبی = ۲۸٪		خطای مطلق = ۰/۲۸ mM

1. R²

۵. نتیجه‌گیری کلی

برای تعیین کلسترول در سرم انسانی به طور موفقیت آمیزی عمل کرده و علاوه بر آن، ممکن است به دلیل ارزانی، در دسترس بودن و قابل حمل بودن آن و استفاده آسان از آن به عنوان وسیله‌ای متداول برای غربالگری‌های تشخیصی پزشکی و آزمایشگاه‌های بالینی به کار گرفته شود.

مراجع

- [1] Apilux, A., Dungchai, W., Siangproh, W., Praphairaksit, N., Henry, C. S., Chailapakul, O., "Lab-on-Paper with Dual Electrochemical/ Colorimetric Detection for Simultaneous Determination of Gold and Iron" *Anal. Chem.*, 82 (5), 1727–1732, (2010).
- [2] Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing" *Analyst*, 136, 77-82, (2011).
- [3] Songjaroen, T., Dungchai, W., Chailapakul, O., Laiwattanapaisal, W., "Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping" *Talanta*, 85(5), 2587–2593, (2011).
- [4] Nie, Z. H., Nijhuis, C. A., Gong, J. L., Chen, X., Kumachev, A., Martinez, A. W., Narov Iyansky, M., White sides, G. M., "Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices", *LabonaChip*, 10(4), 477–483, (2010).
- [5] Hossain, S. M. Z., Luckham, R. E., McFadden, M. J., Brennan, J. D., "Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/ polyvinylpyrrolidone/ polyaniline nanocomposite", *Analytical Chemistry*, 81(21), 9055–9064, (2009).
- [6] Lu, Y., Shi, W. W., Qin, J. H., Lin, B. C., "Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane By Wax Printing", *Analytical Chemistry*, 82(1), 329–335, (2010).
- [7] Mentele, M. M., Cunningham, J., Koehler, K., Volckens, J., Henry, C. S., "Microfluidic Paper-Based Analytical Device for Particulate Metals", *Analytical Chemistry*, 84(10), 4474–4480, (2012).
- [8] Geim, A. K., Novoselov, K. S., "The rise of graphene" *Nature Materials*, 6(3), 183–191, (2007).
- [9] Liu, S., Xing, X. R., Yu, J. H., Lian, W. J., Li, J., Cui, M., Huang, J. D., "Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/ polyvinylpyrrolidone/ polyaniline nanocomposite", *Biosensors and Bioelectronics*, 36(1), 186–191, (2012).
- [10] Potts, J. R., Dreyer, D. R., Bielawski, C. W., Ruoff, R. S., "Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/ polyvinylpyrrolidone/ polyaniline nanocomposite" *Polymer*, 52(1), 5–25, (2011).

زیست حسگر با پایه کاغذی با بهره‌گیری از روش چاپ مومی ساخته شده است. در دستگاه سه الکترودی زیست حسگر با پایه کاغذی، الکتروود کار و الکتروود مخالف که به کمک چاپگر معمولی با بهره‌گیری از جوهر کربن ساخته شده بود، به کار گرفته و از الکتروود (نقره/ نقره کلرید) به عنوان الکتروود مرجع و لایه رسانا استفاده شد. به منظور اصلاح سطح الکتروود و افزایش ناحیه سطحی الکتروود کار، روش الکتروافشانش گرافن به کار رفت و ساختار الکتروود اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین با بهره‌گیری از میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری بررسی شد. نتایج حاصل از تصویربرداری‌های میکروسکوپ الکترونی، پراکندگی مناسب و بدون تجمع نانوغرافن را در داخل نانو کامپوزیت حاصل نشان داد. زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین برای اندازه‌گیری کلسترول در غلظت‌های متفاوت استفاده شد. ترسیم نمودار درجه‌بندی در محدوده غلظتی ۵۰ میکرومولار تا ۱۰ میلی‌مولار کلسترول با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹۳ دارای رابطه خطی است و حد آشکارسازی برای کلسترول ۱ میکرومولار حاصل شد. مطالعه پایداری زیست حسگر بعد از دو هفته نشان داد که پاسخ‌ها ۸۹/۱٪ مقدار اولیه است که حاکی از ثبات و پایداری زیست حسگر پایه کاغذی اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین است. همچنین، درصد بازبایی زیست حسگر فوق در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۲ درصد حاصل شد و انحراف استاندارد نسبی آن کمتر از ۵ درصد به دست آمد که نشانی از صحت و دقت بالای سامانه مورد نظر است. با توجه به نتایج حاصل، نانو کامپوزیت‌های مبتنی بر پایه گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین برای اصلاح زیست حسگر کلسترول با پایه کاغذی بسیار مناسب‌اند. رسانایی بالا و ناحیه سطحی بزرگ نانو ساختارهای الکتروود اصلاح شده با گرافن/ پلی‌وینیل‌پیرولیدون/ پلی‌آنیلین به طور چشمگیری حساسیت الکتروشیمیایی سیستم را به منظور آشکارسازی هیدروژن پراکسید بهبود بخشید و در شرایط مطلوب به دلیل وجود محدوده خطی گسترده، از حساسیت زیادی برخوردار است و از این رو مقدار کمی از میزان کلسترول برای آشکارسازی ضروری است. مزاحمت و وجود خطا در آشکارسازی کلسترول با استفاده از ماده فعال سطحی آبیونی به آسانی رفع شد. از این رو، این سیستم گیرنده

- [11] Wajid, A. S., Das, S., Ahmed, H. S. T., Shelburne, J. L., Parviz, D., Fullerton, R. J., Jankowski, A. F., Hedden, R. C., Green, M. J., "Polymer-stabilized graphene dispersions at high concentrations in organic solvents for composite production" *Carbon*, 50(2), 526–534, (2012).
- [12] Mano, N., Heller, A., "Detection of Glucose at 2 fM Concentration" *Analytical Chemistry*, 77(2), 729–732, (2005).
- [13] Arya, S. K., Dey, A., Bhansali, S., "Polyaniline protected gold nanoparticles based mediator and label free electrochemical cortisol biosensor" *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1), 166–173, (2011).
- [14] Qiu, J. D., Shi, L., Liang, R. P., Wang, G. C., Xia, X. H., "Controllable Deposition of a Platinum Nanoparticle Ensemble on a Polyaniline/Graphene Hybrid as a Novel Electrode Material for Electrochemical Sensing" *Chemistry-a European Journal*, 18(25), 7950–7959, (2012).
- [15] Liu, Q., Zhu, X., Huo, Z. H., He, X. L., Liang, Y., Xu, M. T., "Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using PVP/graphene modified electrodes" *Talanta*, 97, 557–562, (2012).
- [16] Huang, J. D., Lin, Q., Zhang, X. M., He, X. R., Xing, X. R., Lian, W. J., Zuo, M. M., Zhang, Q. Q., "Electrochemical immune sensor based on polyaniline/poly (acrylic acid) and Au-hybrid graphene nanocomposite for sensitivity enhanced detection of salbutamol" *Food Research International*, 44(1), 92–97, (2011).
- [17] Singh, J., Srivastava, M., Kalita, P., Malhotra, B. D., "A novel ternary NiFe₂O₄/ CuO/ FeO-chitosan nanocomposite as a cholesterol biosensor", *Process Biochemistry*, 47(12), 2189–2198, (2012).
- [18] Li, C. L., Su, Y., Lv, X. Y., Xia, H. L., Shi, H. J., Yang, X. G., Zhang, J. Q., Wang, Y. J., "Controllable anchoring of gold nanoparticles to polypyrrole nanofibers by hydrogen bonding and their application in nonenzymatic glucose sensors", *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1), 402–406, (2012).
- [19] Lu, L. C., Wang, W. Q., Cai, W. J., "Preparation of Polypyrrole-Au Composite on Electrospun Poly(4-vinylpyridine) Fibers", *Journal of Polymer Materials*, 29(2), 181–187, (2012).
- [20] Jiang, F., Yue, R., Du, Y., Xu, J., Yang, P., "A one-pot 'green' synthesis of Pd-decorated PEDOT nanospheres for nonenzymatic hydrogen peroxide sensing", *Biosensors and Bioelectronics*, 44(0), 127–131, (2013).
- [21] Karuwan, C., Sriprachuabwong, C., Wisitsoraat, A., Phokharatkul, D., Sritongkham, P., Tuantranont, A., "Inkjet-printed graphene-poly(3,4-ethylene dioxithiophene): poly(styrene-sulfonate) modified on screen printed carbon electrode for electrochemical sensing of salbutamol", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161(1), 549–555, (2012).
- [22] Shin, Y. J., Kameoka, J., "Amperometric cholesterol biosensor using layer-by-layer adsorption technique on to electrospun polyaniline nanofibers" *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(1), 193–197, (2012).
- [23] Arya, S. K., Prusty, A. K., Singh, S. P., Solanki, P. R., Pandey, M. K., Datta, M., Malhotra, B. D., "Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxy silane self-assembled monolayer". *Analytical Biochemistry*, 363(2), 210–218, (2007).
- [24] Dhand, C., Singh, S. P., Arya, S. K., Datta, B., Malhotra, B. D., "Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nano-structured polyaniline colloidal suspension", *Analytical Chimica Acta*, 602(2), 244–251, (2007).
- [25] Dey, R. S., Raj, C. R., "Development of an Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Graphene-Pt Nanoparticle Hybrid Material", *Journal of Physical Chemistry C*, 114(49), 21427–21433, (2010).
- [26] Eguilaz, M., Villalonga, R., Agui, L., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J. M., "Gold nanoparticles: Poly(diallyl dimethyl ammonium chloride)-carbon nanotubes composites as platforms for the preparation of electrochemical enzyme biosensors: Application to the determination of cholesterol" *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661(1), 171–178, (2011).
- [27] Manjunatha, R., Shivappa Suresh, G., Savio Melo, J., D'Souza, S. F., Venkatarangaiah, V., enkatesha, T., "An amperometric bienzymatic cholesterol biosensor based on functionalized graphene modified electrode and its electrocatalytic activity towards total cholesterol determination", *Talanta*, 99(0), 302–309, (2012).
- [28] Aravind, S. S. J., Baby, T. T., Arockiadoss, T., Rakhi, R. B., Ramaprabhu, S., "A cholesterol biosensor based on gold nanoparticles decorated functionalized graphene nanoplatelets", *Thin Solid Films*, 519(16), 5667–5672, (2011).
- [29] Parlak, O., Tiwari, A., Turner, A. P. F., Tiwari, A., "Template-directed hierarchical self-assembly of graphene based hybrid structure for electrochemical biosensing", *Biosensors and Bioelectronics*, 49(0), 53–62, (2013).
- [30] Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., "Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics", *Analytical Chemistry*, 81(14), 5821–5826, (2009).
- [31] Ahmadalinezhad, A., Chen, A., "High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol", *Biosensors and Bioelectronics*, 26(11), 4508–4513, (2011).
- [32] Rattanarat, P., Dungchai, W., Siangproh, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., "Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples", *Analytical Chimica Acta*, 744, 1–7, (2012).

- [33] Gomathi, P., Ragupathy, D., Choi, J. H., Yeum, J. H., Lee, S. C., Kim, J. C., Lee, S. H., Ghim, H. D., "Fabrication of novel chitosan nanofiber/gold nanoparticles composite towards improved performance for a cholesterol sensor", *Sensors and Actuators B:Chemical*, 153(1), 44–49, (2011).
- [34] Saxena, U., Chakraborty, M., Goswami, P., "Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples", *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3037–3043, (2011).
- [35] Safavi, A., Farjami, A., "Electrodeposition of gold–platinum alloy nanoparticles on ionic liquid–chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2547–2552, (2011).