

طراحی یک نانوحسگر برای Cu(II) و آسکوربیک اسید بر اساس نانوذرات طلا

فاطمه قدمی، زلیخا رسولی و رئوف قوامی*

گروه شیمی، دانشکده علوم، صندوق پستی 416، کد پستی 15175-66177، آزمایشگاه کمومتری، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

(تاریخ دریافت: 1400/1/16 تاریخ پذیرش: 1401/2/3)

در این پژوهش، یک نانوحسگر برای اندازه‌گیری Cu(II) و آسکوربیک اسید (AA) بر اساس سازوکارهای ضدتجمع و تجمع طلا پیشنهاد شده است. در بخش اول، روشی انتخابی برای اندازه‌گیری Cu(II) بر اساس فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا با نئوکوپرین (NC) پیشنهاد شد. در حضور غلظت ثابتی از NC، Cu(II) با تشکیل یک کمپلکس چهارگونی دینه با NC، موجب کاهش میزان تجمع یافتگی نانوذرات طلا می‌شود. فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا در گستره 5-500 nM از Cu(II) انجام گرفت. مقدار حد تشخیص برابر با 1 nM برای Cu(II) به دست آمد. این مقدار از بیشینه مقدارهای مجاز Cu(II) در آب‌های آشامیدنی پایین‌تر است. نتایج آشکار نمود که روش پیشنهادی انتخاب‌پذیری مناسبی برای Cu(II) در مقایسه با سایر یون‌ها برای کاهش تجمع نانوذرات طلا نشان می‌دهد. روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری Cu(II) در نمونه‌های آب آشامیدنی به کار گرفته شد. در بخش دوم، از فرآیند ضدتجمعی نانوذرات طلا برای اندازه‌گیری AA استفاده شد. AA به عنوان یک لیگاند رقابتی با NC برای Cu(II) وارد فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا می‌شود و با خارج کردن Cu(II) از کمپلکس Cu(II)-NC، می‌تواند با آن وارد واکنش شود. طی این واکنش، AA اکسید و Cu(II) به Cu(I) تبدیل خواهد شد. آزاد شدن NC از کمپلکس باعث تجمع دوباره نانوذرات طلا می‌شود. فرآیند تجمع در گستره 9-75 nM از AA صورت گرفت. نتیجه این رقابت موجب اندازه‌گیری AA با انتخاب‌پذیری بالا و یک حد تشخیص 1/8 nM شد. این روش برای اندازه‌گیری AA در نمونه قرص ویتامین C به کار گرفته شد.

کلید واژه: تجمع و ضدتجمع، نانوذرات طلا، نئوکوپرین، آسکوربیک اسید، Cu(II)

مقدمه

طیف‌سنجی فلورسانس اتمی، کروماتوگرافی مایع- طیف‌سنجی جرمی، طیف‌سنجی جذب اتمی و روش‌های مبتنی بر حسگرهای الکتروشیمیایی اشاره نمود [7-10]. این روش‌ها بیشتر نیازمند مرحله‌های آماده‌سازی و پیش‌تغلیظ، ابزارهای دقیق، گرانیقیمت و پیچیده هستند. بنابراین، برای اندازه‌گیری‌های معمول مناسب نیستند. امروزه، اندازه‌گیری‌های ساده و سریع با انتخاب‌پذیری و حساسیت بالا برای اندازه‌گیری یون‌های فلزی مختلف گزارش شده‌اند. از این روش‌های رنگ‌سنجی بر پایه نانوذرات به دلیل هزینه کم، سادگی و گزینش‌پذیری بالا بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [11-14]. این حسگرها بر اساس تغییر رزونانس پلاسمون سطحی با جابجایی آبی یا قرمز مشخص در طول موج نور قابل جذب در طیف فرابنفش-مرئی و تغییر رنگ قابل مشاهده استوار هستند [15 و 16]. از این میان، نانوپروب‌های رنگ‌سنجی بر پایه سازوکارهای تجمع و ضدتجمع نانوذرات فلزی از قبیل طلا و نقره به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این نانوپروب‌ها، نانوذرات به‌وسیله واحدهای تشخیصی مختلف مانند الیگونوکلیوتیدها و آبتامرها اصلاح شده‌اند [17 و 18].

در طول دهه گذشته طیف وسیعی از لیگاندها جهت اصلاح نانوذرات برای اندازه‌گیری یون‌های فلزی به کار برده شده است. برهمکنش انتخابی میان عامل اصلاح‌کننده با یون‌های فلزی موجب ایجاد پاسخ انتخابی نانو حسگر می‌شود [19-21]. باوجود انتخاب‌پذیری مناسب این لیگاندها برای یون‌های فلزی، روش‌های آماده‌سازی آنها نسبتاً پیچیده و گرانیقیمت هستند. پیچیدگی این روش‌ها مربوط به اصلاح و پالایش نانوذرات است. به همین دلیل استفاده از نانوذرات اصلاح نشده برای تسهیل فرآیندهای تشخیص پیشنهاد شده است [22]. در این مطالعه، از نانوذرات آزاد طلا بدون اصلاح سطح آن‌ها استفاده شده است.

در بخش اول این مطالعه، ابتدا از نئوکوپرین (NC) برای تجمع نانوذرات طلا استفاده شد. NC یک ترکیب هتروسیکل آلی است که دارای گروه‌های عاملی آمینی برای تشکیل کمپلکس از طریق تشکیل

در چند دهه اخیر، شناسایی و اندازه‌گیری یون‌های فلزات سنگین به دلیل اثر سمی آن‌ها بر روی فرآیندهای زیستی و زیست محیطی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [1 و 2]. یون Cu(II) یک یون انتقالی مهم برای بسیاری از آنزیم‌های پروتئینی و یک ریز مغذی ضروری برای اجزای مختلف بدن از جمله استخوان، سلول‌های مغزی، تنفس سلولی و توسعه بافت همبند در موجودات زنده به حساب می‌آید. علاوه بر این، Cu(II) به فرآیند سوخت و ساز بدن کمک می‌کند و باعث کمک در جذب و استفاده آهن در بدن می‌شود. همچنین، به عنوان یک پاداکسنده، رادیکال‌های آزاد را نابود می‌کند و از این‌رو، با رادیکال‌های آزاد و آسیب‌های آن‌ها مانند پیری زودرس، سرطان، تخریب سلول‌های بدن و غیره مقابله می‌کند [3]. با وجود نقش‌های حیاتی Cu(II)، وجود مقدار زیاد آن در بدن موجودات زنده سمی است و موجب آسیب جدی به کلیه‌ها و کبد می‌شود. پس می‌تواند اثرهای مخربی روی سامانه عصبی مرکزی داشته باشد و موجب بیماری‌های مختلف شود [4]. بیشینه مجاز Cu(II) در آب توسط آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات متحده برابر با $1/3 \text{ mg l}^{-1}$ گزارش شده است [5]. از طرف دیگر، حلالیت بالای Cu(II) در محلول‌های آبی و همچنین استفاده روز افزون آن در صنعت کشاورزی و غذایی، ممکن است سبب وارد شدن مقدارهای بالای Cu(II) از طریق خوردن و یا نوشیدن به بدن شود. بنابراین، استفاده از روشی ساده، سریع، کم هزینه و با دقت بالا جهت شناسایی و اندازه‌گیری مقدارهای اندک Cu(II) در نمونه‌های حقیقی مختلف لازم و ضروری به نظر می‌رسد [6].

تاکنون، روش‌های مختلف کارآمد و تجدیدپذیر متنوعی برای اندازه‌گیری Cu(II) پیشنهاد شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های ولتامتری، طیف‌سنجی نشر نوری پلاسمای جفت‌شده القایی،

جهت اندازه‌گیری AA مورد استفاده قرار گیرد. نتایج آشکار نمود که اندازه‌گیری‌ها در هر دو روش پیشنهادی انتخاب‌پذیری بالا و حساسیت کافی برای هر دو گونه Cu(II) و AA دارند.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و واکنشگرها

همه مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه با خلوص تجزیه‌ای از شرکت‌های مرک و سیگما آلدریچ خریداری شدند. مواد شیمیایی شامل نمک طلای سه‌آبه (HAuCl₄.3H₂O)، تری‌سدیم سیترات (Na₃C₆H₅O₇)، AA، NC، معرف‌ها برای تنظیم pH شامل هیدروکلریک اسید، سدیم هیدروکسید، فسفریک اسید، استیک اسید و نمک‌های نیترات یا سولفات فلزات سنگین، فلزات قلبی‌خاکی و آنیون‌ها بودند. برای تهیه همه محلول‌ها از آب دوبار تقطیر بدون‌یون استفاده شد. محلول مادر AA با غلظت 1 μM با استفاده از توزین مناسب آن و حل کردن در آب تهیه شد. به دلیل حلالیت محدود NC در آب، ابتدا در چند قطره متانول خالص حل و سپس با آب مقطر به محلول مادر با غلظت M 0/001 رقیق شد. بافرهای فسفات با pHهای 2، 3، 4، 11 و 12، اسنات با pHهای 5 و 6، تریس با pHهای 7 و 8 و آمونیوم با pHهای 9 و 10 به ترتیب با استفاده از محلول‌های 0/05 M فسفریک اسید-مونوسدیم فسفات، سدیم اسنات-استیک اسید، تریس-هیدروکلریک اسید و آمونیوم کلرید-آمونیاک و تنظیم pH با HCl و NaOH غلیظ تهیه شدند.

دستگاه‌های مورد استفاده

طیف‌های جذبی با استفاده از یک طیف‌سنج آنالیتیک جانا مدل اسپکترومتر 250 مجهز به یک ترموستات ایکولاین 104 با طول مسیر سل‌های کوآرتز 1 cm اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری با استفاده از یک EM10 در ولتاژ شتاب 80 کیلوولت انجام شدند. اندازه‌گیری‌های pH با استفاده از یک pH متر مترام مدل 713 با به‌کارگیری یک الکتروود شیشه‌ای حساس به pH انجام شد. تصاویر دیجیتالی توسط یک گوشی هوشمند ایپسوس مدل زنون 3S گرفته شدند.

سنتز نانوذرات طلا

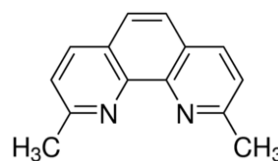
مقدار 50 ml از محلول نمک طلا با غلظت 1 mM به مدت 20 دقیقه همراه با هم‌زدن شدید بر روی یک همزن مغناطیسی جوشانده شد. سپس، 5 ml از محلول تری‌سدیم سیترات با غلظت 38/8 mM به سرعت به محلول بالا افزوده شد. محلول به مدت 10 دقیقه دیگر حرارت داده شد. رنگ محلول طی این مدت زمان از زرد کم‌رنگ به قرمز شرابی تغییر یافت. این تغییر رنگ نشان‌دهنده سنتز موفقیت‌آمیز نانوذرات طلا است. توزیع اندازه نانوذرات طلا سنتز شده برای تعداد 50 شمارش برابر با (12/92 ± 7/5) نانومتر به‌دست آمد.

تجمع نانوذرات طلا در حضور NC

جهت ایجاد نانوذرات طلای تجمع‌یافته در حضور NC، ابتدا محلولی با غلظت 1 μM از NC تهیه شد. سپس، در هر مرحله 10 μl از محلول NC به محلول حاوی 100 μl از نانوذرات طلا و 900 μl از

اتصال عرضی روی سطح نانوذرات طلا است. ساختار شیمیایی NC در شکل 1 نشان داده شده است.

اساس اندازه‌گیری Cu(II) مبتنی بر تشکیل یک کمپلکس چهار-کوردینه، [Cu(NC)₂] بین Cu(II) و NC استوار است. Cu(NC)₂ یک عامل اکسنده ضعیف است و نسبت به دیگر اکسنده‌ها انتخابی‌تر عمل می‌کند. علاوه بر این، از این معرف برای تعیین کاهنده‌های مهم زیست‌شیمیایی همچون سیستئین و ویتامین ای استفاده شده است [23].



شکل 1. ساختار مولکولی NC.

در حضور Cu(II)، NC از سطح نانوذرات طلا جدا و با Cu(II) کمپلکس (Cu(NC)₂) را تشکیل می‌دهد. در این حالت، فرآیند ضد-تجمع اتفاق می‌افتد و افزایش در شدت پیک رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا می‌تواند معیار تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری Cu(II) باشد.

در بخش دوم این مطالعه، از روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری Cu(II) برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید (AA) استفاده شد. AA (ویتامین C) یک ویتامین محلول در آب است که در بسیاری از سامانه‌های زیستی و مواد غذایی (مثل سبزیجات و میوه‌های تازه) یافت می‌شود. AA در زیست‌سنز کلآژن، جذب آهن و فعال‌سازی پاسخ ایمنی نقش مهمی دارد. این ماده همچنین به عنوان یک پاداکسنده قوی عمل می‌کند که با بیماری‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد مبارزه می‌کند. با این وجود، مقدارهای بیش از حد AA منجر به تحریک معده می‌شود و محصول متابولیکی آن (یعنی، آگزالیک اسید) می‌تواند باعث مشکلات کلیوی شود. در بعضی موارد، حتی مقدارهای بیش از حد AA ممکن است منجر به مهار فرآیندهای طبیعی رخ داده در غذا شود و بدین ترتیب، سبب زوال طعم کمک شود. AA یک ماده حساس است، زیرا براحتی توسط آنزیم‌ها و اکسیژن اتمسفر تجزیه می‌شود. اکسایش آن را می‌توان با گرمای زیاد، نور و کاتیون‌های فلزات سنگین تسریع کرد [24 و 25]. به همین دلیل است که محتوای AA مواد غذایی و نوشیدنی‌ها نشان‌دهنده یک شاخص مربوط به کیفیت است که باید با دقت و ارسای شود.

تا کنون روش‌های تجزیه‌ای متنوعی برای اندازه‌گیری AA گزارش شده است. روش‌های کلاسیک با روش‌های حجمی برای اندازه‌گیری AA بر اساس تیتر کردن با محلول یک اکسنده مانند دی‌کلروفل ایدینوفول و پتاسیم یدات یا برومات استوار هستند [26 و 27]. با وجود این، روش‌های حجمی معمولاً از فقدان اختصاصی بودن رنج می‌پرند که استفاده از آنها را تنها محدود به نمونه‌هایی که حاوی عوامل کاهنده نیستند، می‌کند. در پژوهش کنونی، بین AA و NC جهت واکنش با Cu(II) رقابت صورت می‌گیرد. AA می‌تواند Cu(II) را از کمپلکس Cu(NC)₂ خارج کند و NC آزاد شده سبب تجمع دوباره نانوذرات طلا شود. طی این واکنش، AA اکسید و Cu(II) به Cu(I) تبدیل خواهد شد [28]. بنابراین، افزایش در شدت پیک تجمع نانوذرات طلا می‌تواند به عنوان نشانک تجزیه‌ای

فرآیند اندازه‌گیری نوری آسکوربیک اسید

برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید (AA)، 100 μl از محلول AA در گستره غلظتی 9-75 nM به سامانه شیمیایی دارای نانوذرات طلا، ضد-تجمع برای اندازه‌گیری Cu(II) شامل 100 μl نانوذرات طلا، 800 μl بافر استات با pH = 5، مقدار 100 μl از محلول NC با غلظت 2/7 μM و 100 μl از Cu(II) با غلظت 300 nM افزوده شد. سرانجام، تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا و تصویرهای دیجیتالی مربوط به تغییر رنگ محلول‌ها اندازه‌گیری و ثبت شدند. نسبت مقدارهای A_{650}/A_{520} به عنوان نشانک‌های تجزیه‌ای در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی نمونه حقیقی قرص ویتامین C

برای اندازه‌گیری AA در نمونه‌های حقیقی، دو قرص ویتامین C (با برچسب 500 میلی گرم ویتامین C در هر قرص) انتخاب شدند. دو قرص کاملاً آسیاب و در 1000 ml آب مقطر حل شدند. سپس، حجم مناسبی از این محلول 100 برابر رقیق شد. سرانجام، حجم‌های مشخصی از محلول رقیق‌شده برای به‌دست آوردن دو نمونه در دو سطح غلظتی 10 و 25 nM ویتامین C، به طور جداگانه به 100 μl محلول نانوذرات طلا ضد-تجمع یافته در شرایط تجربی بهینه برای Cu(II) (یعنی 100 μl از محلول NC با غلظت 2/7 μM و 100 μl از Cu(II) با غلظت 300 nM در 800 μl بافر استات با pH = 5) افزوده و سپس، تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا برای هر کدام از نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. در پایان، هر کدام از این اندازه‌گیری‌ها به ترتیب در حضور 10 و 25 nM از AA نیز انجام گرفت.

نتایج و بحث

سازوکار نانوحسگر طراحی‌شده برای اندازه‌گیری Cu(II) و AA در طرح‌واره 1 نشان داده شده است. اساس اندازه‌گیری Cu(II) مبتنی بر تشکیل کمپلکس بین Cu(II) و NC (یعنی $\text{Cu}(\text{NC})_2$) استوار است. واکنش بین Cu(II) و NC به حدی قوی است که می‌تواند NC را از سطح نانوذرات طلا جدا کند و بدین‌وسیله، باعث پراکندگی نانوذرات تجمع‌یافته شود. به عبارت دیگر، اینجا، از فرآیند ضد-تجمع نانوذرات طلا برای اندازه‌گیری Cu(II) استفاده می‌شود که گزینش‌پذیری بیشتری دارد و در آن نشانک‌های مثبت کاذب کمتری دیده می‌شود. ابتدا نانوذرات طلا

بافر استات با pH = 5 افزوده شد. NC در گستره غلظتی 9/9 تا 90/9 nM موجب تجمع نانوذرات طلا می‌شود. تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا و تصویرهای دیجیتالی مربوط به تغییر رنگ محلول‌ها اندازه‌گیری و ثبت شدند.

فرآیند اندازه‌گیری نوری Cu(II)

برای اندازه‌گیری Cu(II)، 100 μl از محلول Cu(II) در گستره غلظتی 5-500 nM و 100 μl از محلول NC با غلظت 2/72 μM داخل سل ترکیب شدند. سپس، 10 دقیقه زمان داده شد تا کمپلکس $\text{Cu}(\text{NC})_2$ تشکیل شود. پس از آن، مقدار 100 μl از مخلوط حاصل به محلولی حاوی 100 μl از نانوذرات طلا و 800 μl بافر استات با pH = 5 افزوده شد. پس از 5 دقیقه (برای تکمیل فرآیند تجمع نانوذرات طلا)، تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا و تصویرهای دیجیتالی مربوط به تغییر رنگ محلول‌ها اندازه‌گیری و ثبت شدند. نسبت مقدارهای A_{520}/A_{650} به عنوان نشانک‌های تجزیه‌ای در نظر گرفته شد.

بررسی تشکیل کمپلکس Cu(II) با NC

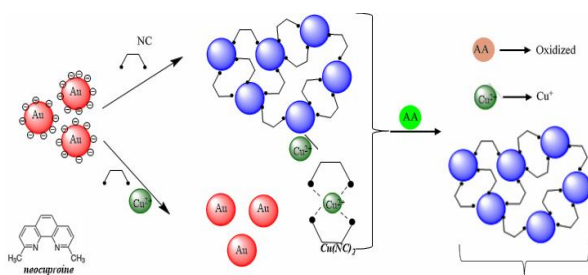
برای تعیین استوکیومتری کمپلکس بین Cu(II) و NC، از روش نسبت مولی استفاده شد. بدین منظور، 100 μl از محلول NC با غلظت 0/001 M به 1 ml بافر استات با pH = 5 افزوده شد. سپس، محلول‌هایی از Cu(II) در گستره غلظتی صفر تا 55 μM به سل افزوده شدند. در پایان، تغییرات طیف جذبی NC اندازه‌گیری شدند.

بررسی گزینش‌پذیری در اندازه‌گیری Cu(II)

برای بررسی گزینش‌پذیری در اندازه‌گیری Cu(II)، ابتدا محلول‌هایی از نمک‌های فلزات Zn^{2+} ، Co^{2+} ، Pb^{2+} ، Mg^{2+} ، Al^{3+} ، Ni^{2+} ، Fe^{2+} ، K^+ ، Ce^{3+} و Cd^{2+} با غلظت 500 nM تهیه شدند. سپس، 100 μl از هر کدام از محلول این کاتیون‌ها با 100 μl از NC با غلظت 2/7 μM ترکیب شدند. برای تکمیل برهمکنش کاتیون‌ها با NC، 10 دقیقه زمان تیمار طور جداگانه به هر محلول داده شد. به دنبال آن، به 100 μl از هر کدام از این محلول‌ها، به ترتیب 100 μl از نانوذرات طلا و 800 μl بافر استات با pH = 5 افزوده شد. در پایان، به هر کدام از ترکیب‌ها، 5 دقیقه زمان برای تکمیل فرآیند تجمع داده شد و سپس، تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا اندازه‌گیری شدند.

آماده‌سازی نمونه حقیقی آب آشامیدنی

در تهیه نمونه‌های حقیقی از روش اسپایک‌کردن یعنی افزایش مقدارهای معلومی از Cu(II) به نمونه‌های آب آشامیدنی استفاده شد. بدین منظور، به سه نمونه آب آشامیدنی مقدارهای مشخصی از Cu(II) با غلظت‌های 15، 20 و 25 μM افزوده شد. سپس، 100 μM از محلول هر کدام از این نمونه‌ها با 100 μL از محلول NC با غلظت 30 μM به طور جداگانه مخلوط و 10 دقیقه تیمار شد. آنگاه، 100 μl از نانوذرات طلا و 800 μl بافر استات با pH = 5 به محلول هر کدام از نمونه‌ها افزوده شدند. در پایان، 5 دقیقه زمان جهت تکمیل فرآیند تجمع داده شد و تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا برای هر کدام از نمونه‌ها ثبت شدند.

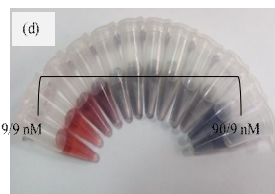
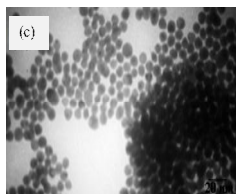
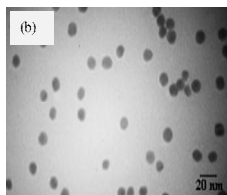
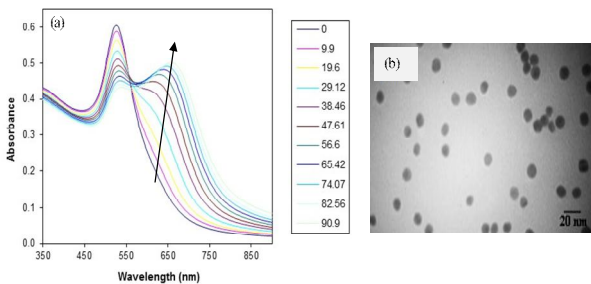


طرح‌واره 1. طراحی و سازوکار نانوحسگر پیشنهادی برای اندازه‌گیری Cu(II) و AA.

برای تعیین Cu(II) در این روش است. اینجا، بافرهای فسفات با pH های 2، 3، 4، 5 و 6، 7 و 8 و آمونیوم با pH های 9 و 10 مورد بررسی قرار گرفتند. مقدارهای نشانک تجزیه‌ای A₅₂₀/A₆₅₀ در فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا در گستره 2 pH تا 12 در شکل 3b نشان شده است. نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات طلا در بافرهای استات با pH های 5 و 6 بیشترین پایداری را از خود نشان می‌دهند. سرانجام، بافر استات با pH = 5 به عنوان pH بهینه انتخاب شد.

بررسی اثر غلظت NC. غلظت NC اصلی‌ترین عامل در تجمع نانوذرات طلا است. بنابراین، بهینه‌سازی آن در گزینش‌پذیری Cu(II) برای فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا مؤثر است. شکل 3c اثر غلظت NC در گستره غلظتی 0/3-9/6 μM در حضور 250 nM از Cu(II) را نشان می‌دهد. روشن است که 2/7 μM از NC سبب ایجاد بیشترین میزان نشانک تجزیه‌ای A₅₂₀/A₆₅₀ در فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا شده است. بنابراین، 2/7 μM از NC به عنوان مقدار بهینه برای اندازه‌گیری Cu(II) انتخاب شد.

بررسی اثر زمان تیمار ضدتجمع بر روی اندازه‌گیری Cu(II). علاوه بر بررسی اثر زمان بر روی تجمع نانوذرات طلا به‌وسیله NC، زمان تیمار ضدتجمع بر روی اندازه‌گیری Cu(II) نیز باید بهینه شود. در شکل 3(d) نمودار مقدارهای A₅₂₀/A₆₅₀ در مقابل زمان تیمار در گستره 0-10 دقیقه برای اندازه‌گیری 250 nM از Cu(II) با فرآیند ضدتجمع نانوذرات طلا نشان داده شده است. نتایج نشان داد که نشانک تجزیه‌ای تا زمان 8 دقیقه افزایش می‌یابد و پس از آن ثابت باقی می‌ماند. بنابراین، زمان 10 دقیقه به عنوان زمان تیمار بهینه انتخاب شد.



شکل 2. (a) طیف‌های جذبی 100 μl از محلول NC با غلظت 2/7 μM و 100 μl از Cu(II) با غلظت 300 nM نانوذرات طلا در حضور NC در گستره غلظتی 9/9-90/9 nM بعد از مدت زمان 5 دقیقه در 900 μl بافر استات با pH = 5، (b) تصویر TEM نانوذرات طلا در غیاب NC و (c) تصویر TEM نانوذرات طلا در حضور 90 nM از NC، (d) تصویر دیجیتالی 100 μl نانوذرات طلا در حضور NC در گستره غلظتی 9/9-90/9 nM بعد از مدت زمان 5 دقیقه در 900 μl بافر استات با pH = 5

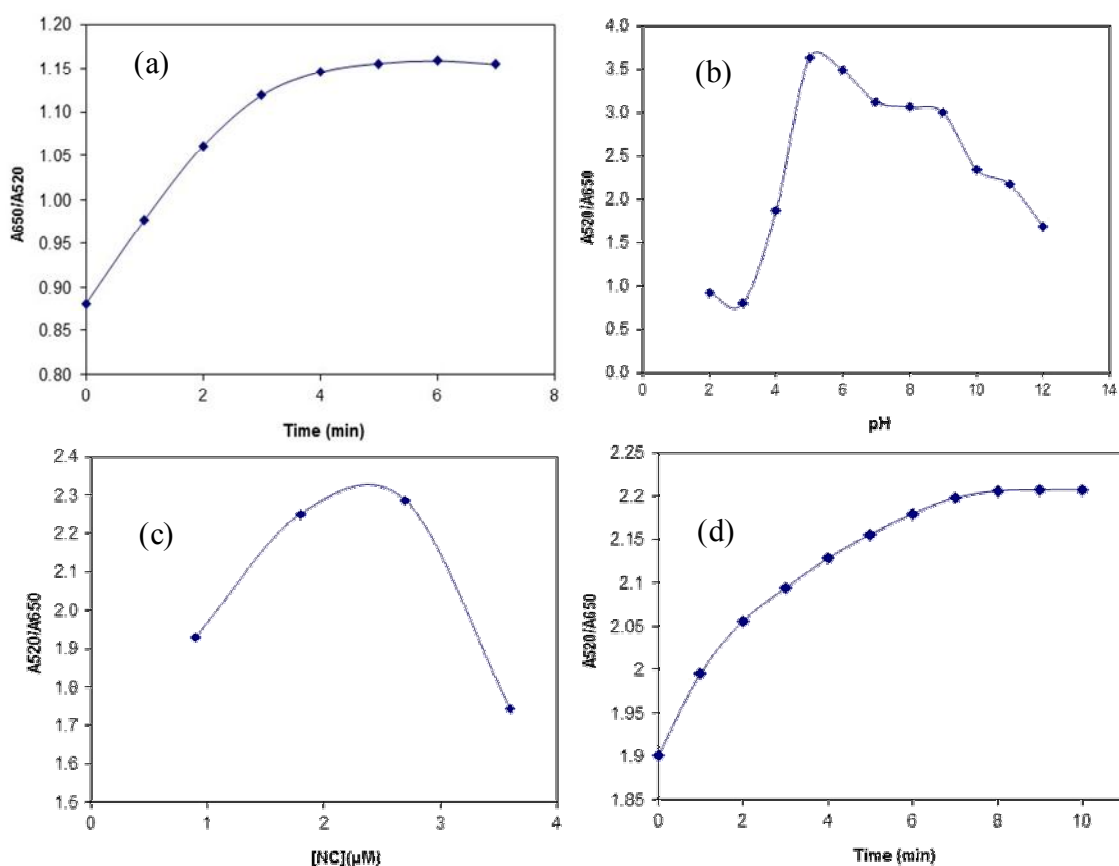
NC از طریق گروه‌های عاملی آمینی تجمع می‌یابند. در حضور یون‌های Cu(II)، NC با Cu(II) واکنش می‌شود و تجمع‌یافتگی نانوذرات طلا کاهش می‌یابد. بنابراین، افزایش در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلای پراکنده‌شده متناسب با غلظت Cu(II) خواهد بود. با وجود این، در حضور AA، بین AA و NC، برای برهمکنش با Cu(II) رقابت صورت می‌گیرد. به‌طوری‌که، AA می‌تواند Cu(II) را از کمپلکس Cu₂(NC)₂ خارج و به Cu(I) تبدیل کند و خودش نیز اکسید شود. بنابراین، NC از آنجا که موجب تجمع نانوذرات طلا شود. این صورت، افزایش در نشانک جذبی نانوذرات طلای تجمع‌یافته متناسب با غلظت AA خواهد بود.

بهینه‌سازی شرایط تجربی برای اندازه‌گیری Cu(II)

تجمع نانوذرات طلا به‌وسیله NC. روش‌های رنگسنجی بر اساس تجمع اتصال‌عرضی، نیاز به عوامل کی‌لیت‌ساز برای اتصال به سطح نانوذرات دارند. لیگاندها می‌توانند از طریق تشکیل کمپلکس‌های چنددندانه موجب تجمع نانوذرات شوند. گروه‌های آمینی NC با اتصال به سطح نانوذرات طلا ایجاد کمپلکس کرده و بدین طریق، حضور NC موجب تجمع نانوذرات طلا می‌شود. در شکل 2a، تغییرات در طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا با افزایش غلظت NC در گستره غلظتی 9/90-9/9 nM نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، طیف جذبی رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا پراکنده در طول موج 520 nm به وضوح قابل مشاهده است که با افزایش غلظت NC یک جابجایی قرمز در طیف و انتقال طیف‌های جذبی به طول موج 650 nm اتفاق می‌افتد. تغییرات در اندازه نانوذرات طلا قبل و بعد از افزایش NC (یعنی حالت‌های پراکنده و تجمع به ترتیب) در تصاویر TEM در شکل b و 2c نشان داده شده است. علاوه بر این، تصویر دیجیتالی مربوط به تغییر رنگ محلول‌های نانوذرات طلا از قرمز به آبی با افزایش غلظت NC در شکل 2d نیز قابل مشاهده است. این تغییر رنگ نیز دوباره تجمع نانوذرات طلا را نشان می‌دهد.

بررسی اثر زمان تیمار بر روی تجمع نانوذرات طلا به‌وسیله NC. تجمع نانوذرات طلا از طریق گروه‌های عاملی آمینی NC صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه گروه‌های عاملی آمینی برهمکنش‌کنندگی نسبت به گروه‌های تیولی با طلا دارند که ناشی از قاعده نرمی و سختی است، بهینه‌سازی اثر زمان در فرآیند تجمع نانوذرات طلا لازم و ضروری است. بدین منظور، تغییرات نشانک تجزیه‌ای در حضور NC با غلظت 47 nM در گستره زمانی 0-7 دقیقه بررسی شد. از یافته‌های شکل 3a روشن است که تجمع نانوذرات طلا تا زمان 5 دقیقه افزایش و پس از آن ثابت باقی می‌ماند. بنابراین، زمان 5 دقیقه به عنوان زمان بهینه برای تجمع نانوذرات طلا انتخاب شد.

بررسی اثر pH. بررسی اثر pH بر روی پایداری نانوذرات طلا با استفاده از روش کاهش سیترات بسیار حائز اهمیت است. آنیون‌های سیترات سطح نانوذرات طلا را پوشانده و باعث پراکندگی الکتروستاتیک میان نانوذرات طلا می‌شوند. در pH های اسیدی آنیون‌های سیترات پروتون‌دار می‌شوند و بدین ترتیب، پایداری حالت پراکنده محلول‌های نانوذرات طلا کاهش می‌یابد و تجمع پیدا می‌کنند. از سوی دیگر، یون‌های Cu(II) در pH های بالاتر از 8 پایدار نیستند و به فرم هیدروکسیدی خود تبدیل می‌شوند [29]. به همین دلیل، بهینه‌سازی pH سنج به‌سیار مهمی



شکل 3. (a) بررسی اثر زمان تیمار بر تجمع 100 µl نانوذرات طلا در حضور NC با غلظت 47 nM در گستره زمانی 0-7 دقیقه در 900 µl بافر استات با pH = 5، (b) بررسی اثر بافرهای شامل فسفات با pHهای 2، 3، 4، 11 و 12، استات با pHهای 5 و 6، تریس با pHهای 7 و 8 و آمونیوم با pHهای 9 و 10 بر روی پایداری 100 µl نانوذرات طلا در حضور Cu(II) با غلظت 250 nM و NC با غلظت 2/7 µM، (c) مقدارهای A₅₂₀/A₆₅₀ نانوذرات طلا در گستره غلظتی 3/0-6/9 µM از NC و Cu(II) با غلظت 250 nM، (d) بررسی زمان تیمار بر روی فرآیند ضدتجمع 100 µl نانوذرات طلا در حضور 2/7 µM از NC و 250 nM از Cu(II) در 900 µl بافر استات با pH = 5.

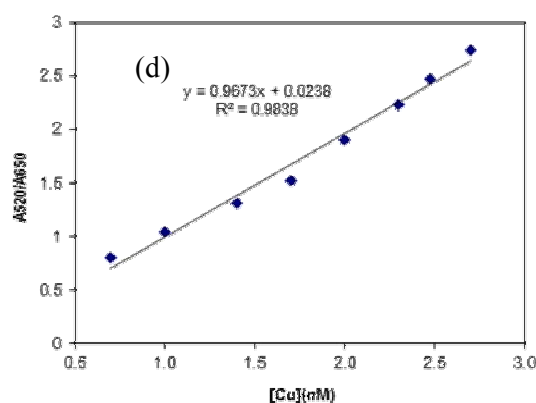
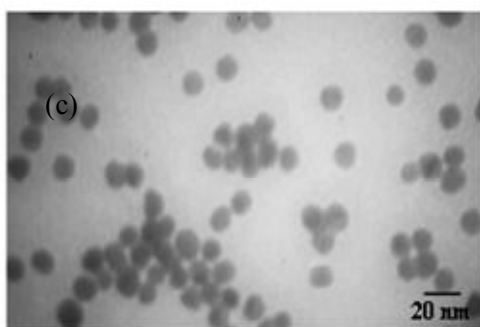
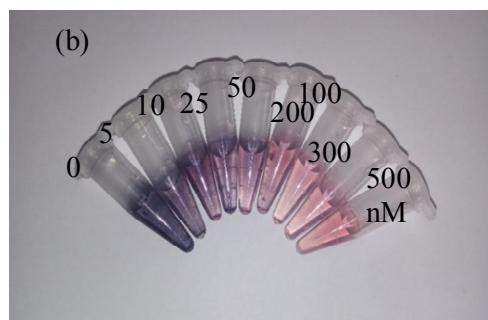
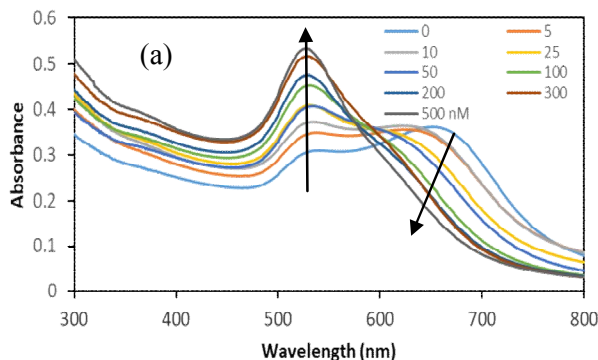
مقدار بسیار پایین‌تر از حد مجاز از آب‌های آشامیدنی است.

بررسی تشکیل کمپلکس Cu(II) با NC

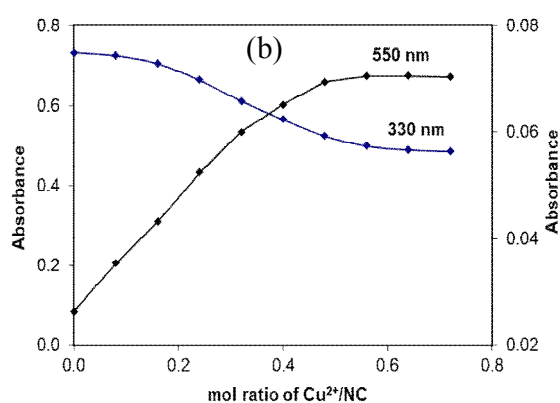
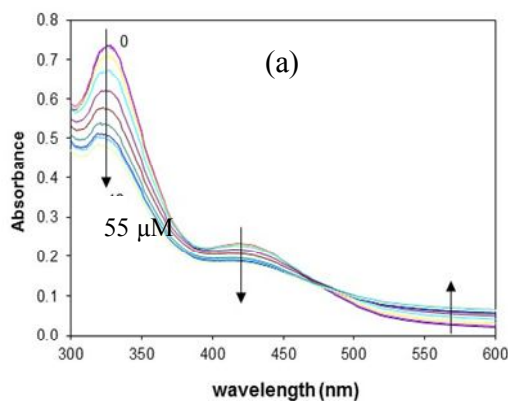
در این بخش، هدف تعیین استوکیومتری بین Cu(II) و NC در کمپلکس با استفاده از روش نسبت مولی است. اینجا، از طیف جذبی NC به عنوان نقطه شروع استفاده شد. نتایج در شکل 5a نشان می‌دهد که با افزایش غلظت Cu(II) به محلول NC با یک غلظت مشخص، طیف جذبی NC کاهش و یک پیک جدید در گستره 600-500 nm تشکیل می‌شود که در حال افزایش است. این کاهش و افزایش در طیف جذبی نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس بین Cu(II) و NC است. وجود یک نقطه ثابت در طیف‌ها (نقطه همجذب) می‌تواند حضور یک تعادل در سامانه محلول را نشان دهد. شکل 5b مقدارهای تغییرات جذبی در 330 و 550 nm را در مقابل نسبت مولی Cu(II)/NC نشان می‌دهد. با افزایش نسبت مولی، تغییرات جذبی در 330 nm به‌صورت کاهشی و برای 550 nm به صورت افزایشی است. با توجه به این نتایج، می‌توان نسبت مولی بین

عملکرد تجزیه‌ای نانوحسگر برای اندازه‌گیری Cu(II)

برهمکنش اختصاصی بین NC و Cu(II) برای تشکیل کمپلکس Cu₂(NC)₄ موجب جدا شدن NC از سطح نانوذرات طلا می‌شود. شکل 4a به روشنی نشان می‌دهد که با افزایش غلظت Cu(II) در گستره غلظتی 5-500 nM، شدت پیک نانوذرات طلا در 520 nm به‌تدریج افزایش می‌یابد و از شدت پیک تجمع در 650 nm به‌تدریج کاسته می‌شود. افزایش نشانگر تجزیه‌ای نشان‌دهنده کاهش میزان تجمع یافتگی نانوذرات طلا با افزایش غلظت Cu(II) است. علاوه بر این، تغییر رنگ محلول‌ها از آبی به قرمز در شکل 4b نیز دیده می‌شود. روشن است که در غلظت 50 nM از Cu(II)، رنگ محلول‌ها تغییر می‌کند. شکل 4c تصویر TEM پراکندگی نانوذرات طلا در حضور Cu(II) با غلظت 300 nM را نشان می‌دهد. شکل 4d وابستگی خطی بین مقدارهای A₅₂₀/A₆₅₀ در مقابل لگاریتم غلظت Cu(II) را نشان می‌دهد. مقدار LOD با محاسبه از طریق رابطه 3Sb/m (که در آن انحراف استاندارد شاهد و m شیب منحنی واسنجی هستند) برابر با 1 nM تخمین زده شد. گفتنی است که این



شکل 4. (a) طیف‌های جذب 100 μl نانوذرات طلا در حضور NC با غلظت $2/7 \mu\text{M}$ و Cu(II) در گستره غلظتی 0-500 nM از Cu(II) در 900 μl بافر استات با $\text{pH} = 5$ ، (b) تصویر دیجیتالی از تغییر رنگ محلول‌های متناظر با (a)، (c) تصویر TEM نانوذرات طلا در حضور NC با غلظت $2/7 \mu\text{M}$ و Cu(II) از 300 nM و (d) نمودار مقدارهای A_{520}/A_{650} 100 μl نانوذرات طلا در مقابل لگاریتم غلظت Cu(II) در گستره غلظتی 5-500 nM در 900 μl بافر استات با $\text{pH} = 5$.



شکل 5. (a) طیف‌های جذب 100 μM از NC در حضور Cu(II) در گستره غلظتی 0-55 μM در 900 μl بافر استات با $\text{pH} = 5$ ، (b) مقدارهای جذب متناظر با (a) در 330 nm و 550 nm در مقابل نسبت مولی Cu(II)/NC.

بررسی گزینش‌پذیری برای اندازه‌گیری Cu(II)

جهت بررسی اندازه‌گیری انتخابی Cu(II)، اثر سایر یون‌های فلزی که معمولاً در نمونه‌های حقیقی آب آشامیدنی در کنار Cu(II) حضور دارند، بررسی شد. یون‌های فلزی شامل Mg^{2+} ، Pb^{2+} ، Zn^{2+} ، Ni^{2+} ، Fe^{2+} ، Ce^{2+} و Al^{3+} به ترتیب در غیاب و در حضور Cu(II)

Cu(II) و NC را با شکست داده‌ها در نقطه 0/5 (1 به 2) نشان داد. علاوه بر نسبت مولی، با توجه به تغییرات جذب مشاهده شده می‌توان گفت که وجود یک شکست در روند تغییرات جذب و عدم جابجایی طیف‌های جذب نشان‌دهنده این است که تشکیل کمپلکس $\text{Cu}(\text{NC})_2$ در یک مرحله صورت گرفته است.

تجربی بهینه برای Cu(II) در حضور AA در گستره غلظتی 9-75 nM را نشان می‌دهد. همان‌گونه که پیداست با افزایش غلظت AA، شدت‌های

جدول 1. نتایج آماری نانوحسگر پیشنهادی برای اندازه‌گیری Cu(II) در نمونه‌های آب آشامیدنی

نمونه	اضافه شده (nM)	اندازه‌گیری شده (nM)	درصد بازیابی	RSD (%)
1	50	51/22	102/44	2/33
		48/89	99/78	
2	100	101/84	101/84	3/30
		106/40	106/40	
3	200	198/00	198/00	1/57
		204/32	204/32	
		201/16	100/58	

جدول 2. مقایسه عملکرد نانوحسگر پیشنهادی با تعدادی از روش‌های رنگسنجی برای تعیین Cu(II)

روش	گستره خطی (nM)	حد تشخیص (nM)	مرجع
رنگسنجی	1000-3	3	30
رنگسنجی	300-10	10	31
رنگسنجی	1000-125	8/6	32
رنگسنجی	110-2	0/76	33
رنگسنجی	500-5	1	مطالعه کنونی

مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل 6a مشاهده می‌شود، برخلاف Cu(II)، دیگر یون‌های فلزی موجب افزایش نسبت مقدارهای A_{520}/A_{650} نمی‌شوند. این نتایج نشان می‌دهد که دیگر یون‌های فلزی قادر به جدا کردن NC از سطح نانوذرات طلا نیستند. شکل 6b اثر دیگر یون‌های فلزی در حضور Cu(II) را نشان می‌دهد. روشن است که در حضور Cu(II) مقدار نشانک تجزیه‌ای A_{520}/A_{650} افزایش می‌یابد. افزایش نشانک تجزیه‌ای نشان‌دهنده گزینش‌پذیری بالای نانوحسگر برای Cu(II) نسبت به دیگر کاتیون‌های موجود است. این نتایج تایید می‌کنند که نانوحسگر طراحی شده برای اندازه‌گیری Cu(II) در مقایسه با دیگر کاتیون‌های فلزی حساسیت بیشتری نشان می‌دهد.

اندازه‌گیری مقدار Cu(II) در نمونه‌های حقیقی آب آشامیدنی

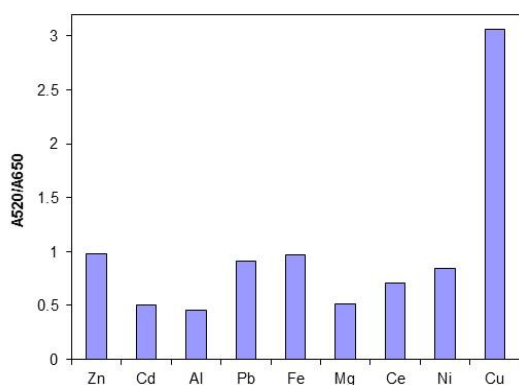
برای بررسی کاربرد عملی نانوحسگر پیشنهادی برای اندازه‌گیری Cu(II)، مقدارهای مشخصی از Cu(II) به سه نمونه آب آشامیدنی اسپایک شد. سپس، اندازه‌گیری مقدارهای Cu(II) با استفاده از روش پیشنهادی در بخش تجربی انجام شد. نتایج در جدول 1 نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بازیابی‌های خوب و انحراف استانداردهای پایین برای نمونه‌های آب بعدست آمده‌اند که نشان‌دهنده عملکرد تجزیه‌ای صحیح نانوحسگر پیشنهادی برای Cu(II) است.

مقایسه عملکرد تجزیه‌ای نانوحسگر پیشنهادی برای Cu(II) در مقایسه با دیگر روش‌ها

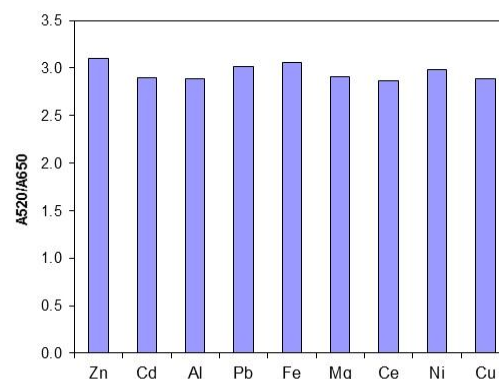
جدول 2 مقایسه نتایج نانوحسگر پیشنهادی با تعدادی از گزارش‌های قبلی رنگسنجی برای اندازه‌گیری Cu(II) را نشان می‌دهد. با توجه به این نتایج، می‌توان نتیجه گرفت که NC می‌تواند یک نامزد آرمانی برای اندازه‌گیری Cu(II) باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، حد تشخیص و حساسیت روش پیشنهادی قابل مقایسه و در برخی از موارد بهتر از دیگر روشهای رنگسنجی بر اساس نانوذرات برای Cu(II) می‌باشد.

کاربرد نانوحسگر پیشنهادی برای Cu(II) برای اندازه‌گیری AA

شکل 7a طیف‌های جذبی نانوذرات طلای ضدتجمع یافته در شرایط



(b)



(a)

شکل 6. (a) نمودار مقدارهای A_{520}/A_{650} برای 100 μl نانوذرات طلا در بررسی گزینش‌پذیری تعدادی از یون‌ها با غلظت 500 nM در غیاب Cu(II) در 900 μl بافر استات با pH = 5، (b) نمودار مقدارهای A_{520}/A_{650} برای 100 μl نانوذرات طلا در بررسی گزینش‌پذیری تعدادی از یون‌ها با غلظت 500 nM در حضور Cu(II) با غلظت 300 nM در 900 μl بافر استات با pH = 5.

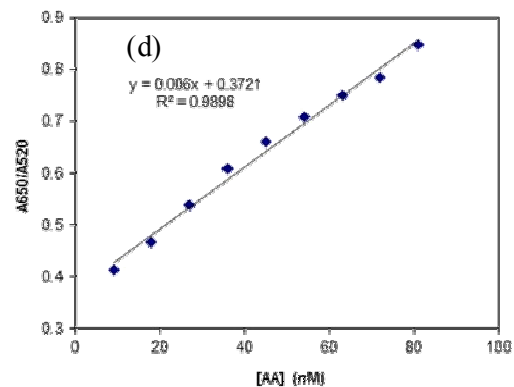
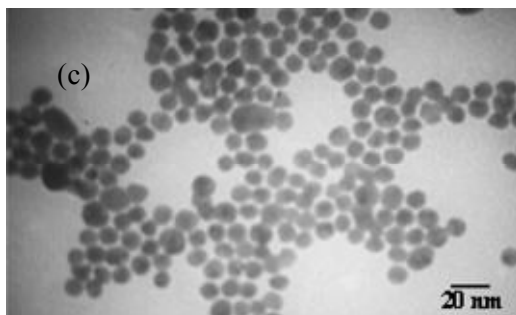
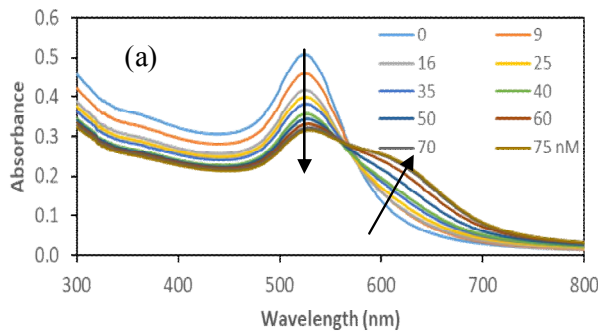
رابطه $3Sb/m$ برابر با $1/8 \text{ nM}$ به وسیله نانوحسگر پیشنهادی برای AA تخمین زده شد.

بررسی انتخاب پذیری برای اندازه گیری AA

برای مطالعه گزینش پذیری روش پیشنهادی برای AA، اثر برخی از ترکیب‌ها مانند سدیم کلرید، کافئیک اسید (CA)، گلوکز (Glu)، منیزیم نیترات، اوره و اگزالیک اسید (OXA) به ترتیب در غیاب و در حضور AA (شکل 8) مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به شکل 8a، برخلاف AA، نسبت مقدار A_{650}/A_{520} افزایش نمی‌یابد. این نشان می‌دهد که روش پیشنهادی برای اندازه گیری AA مناسب است و از گزینش پذیری بالایی برخوردار است. علاوه بر این 8b نشان می‌دهد که نشانک تجزیه‌ای در حضور ترکیب‌های مزاحم افزایش یافته و سامانه رنگسنجی نسبت به AA انتخاب پذیری مناسبی را نشان داده است.

پیک نانوذرات طلا در 520 و 650 nm به ترتیب به طور تدریجی با افزایش غلظت AA کاهش و افزایش می‌یابند. این مشاهده نشان می‌دهد که AA سبب خارج شدن Cu(II) از کمپلکس $Cu(NC)_2$ می‌شود و آزاد شده سبب تجمع نانوذرات طلا می‌شود.

شکل 7b، تصویر دیجیتالی از تغییر رنگ محلول‌ها در حضور AA در گستره غلظتی 9-75 nM را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، رنگ محلول‌ها از قرمز به آبی روشن (شکل 7c) تغییر رنگ می‌یابند. گفتنی است که از آنجا که واکنش بین AA و Cu(II) به صورت کامل انجام نمی‌شود، تجمع نانوذرات طلا نیز به صورت کامل صورت نمی‌گیرد. شکل 7c، تصویر TEM نانوذرات طلا در حضور 50 nM از AA را نشان می‌دهد که در آن تجمع نانوذرات طلا به روشنی دیده می‌شود. نمودار وابستگی خطی بین مقدارهای نسبت A_{650}/A_{520} و غلظت AA در شکل 7d نشان داده شده است. مقدار LOD با محاسبه از طریق

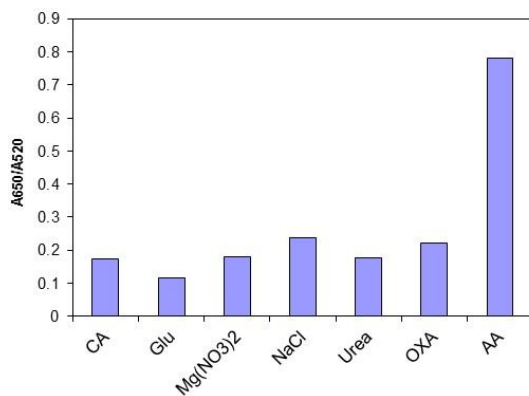


شکل 7. (a) طیفهای جذب 100 μl نانوذرات طلای ضدتجمع یافته در شرایط تجربی بهینه برای Cu(II) از 100 μl محلول NC با غلظت $2/7 \mu\text{M}$ و 100 μl از Cu(II) با غلظت 300 nM در حضور AA در گستره غلظتی 0-75 nM در 800 μl بافر استات با $\text{pH} = 5$ ، (b) تغییر رنگ محلول‌های نانوذرات طلا متناظر با شرایط تجربی (a) در حضور AA در گستره غلظتی 9-75 nM، (c) تصویر TEM نانوذرات طلا در حضور 50 nM از AA تحت شرایط تجربی بهینه برای Cu(II) و (d) نمودار مقدارهای A_{650}/A_{520} نانوذرات طلا در مقابل غلظت AA در گستره 9-75 nM متناظر با شرایط تجربی (a).

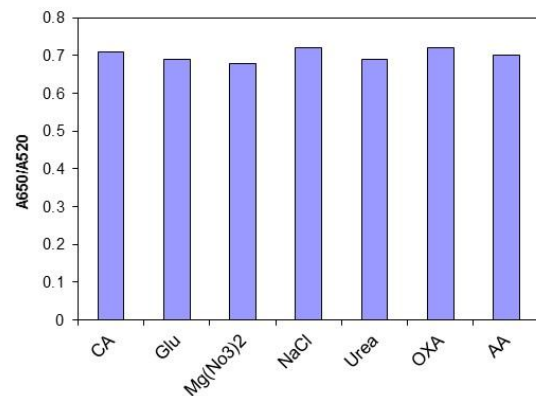
انجام گرفت. نتایج در جدول 2 نشان داده شده است. همان‌طور که می‌توان مشاهده نمود، درصد‌های بازیابی‌های خوب و انحراف استانداردهای پایین بدست آمده‌اند که نشان‌دهنده عملکرد تجزیه‌ای صحیح نانوحسگر پیشنهادی برای اندازه گیری AA است.

اندازه‌گیری مقدار AA در نمونه حقیقی ویتامین C

جهت بررسی کاربرد تجزیه‌ای نانوحسگر پیشنهادی برای AA، اندازه‌گیری AA در نمونه حقیقی قرص ویتامین C انجام گرفت. بدین منظور، اندازه‌گیری‌های AA در قرص ویتامین به ترتیب C در غیاب و در حضور مقدارهای مشخصی از AA



(a)



(b)

شکل 8. (a) نمودار مقدارهای A_{520}/A_{650} برای 100 μl نانوذرات طلا جهت بررسی گزینش پذیری تعدادی از ترکیبها با غلظت 75 nM در غیاب AA در 800 μl بافر استات با pH = 5، (b) نمودار مقدارهای A_{520}/A_{650} برای 100 نانوذرات طلا جهت بررسی انتخاب پذیری تعدادی از ترکیبات هر کدام با غلظت 75 nM در حضور AA با غلظت 50 nM در 800 μl بافر استات با pH = 5.

9-75 nM می‌تواند NC را از کمپلکس خارج کند. حد تشخیص AA با استفاده از این روش، 1/8 nM محاسبه شد. روش پیشنهادی دو منظوره در حضور مزاحمت‌های مختلف برای هر دو Cu(II) و AA بررسی شد. نتایج گزینش پذیری بالای روش پیشنهادی برای هر دو Cu(II) و AA را آشکار نمود. برتری‌های اصلی روش پیشنهادی عبارتند از: پاسخ سریع، هزینه پایین و توانایی عملی بالقوه برای سنجش Cu(II) و AA در حضور مزاحمت‌ها.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه کردستان در انجام این پژوهش صمیمانه قدر دانی می‌کنند.

مراجع

- 1) G. Aragay, J. Pons, A. Merkoçi, Chem. Rev. 111 (2011) 3433.
- 2) J.A. Buledi, S. Amin, S.L. Haider, M.I. Bhangar, A.R. Solangi, Environ. Sci. Pollut. Res. 24 (2020) 1.
- 3) A.A. Ghoniem, N.El-A. El-Naggar, W.I.A. Saber, M.S. El-Hersh, A.Y. El-khateeb, Sci. Rep. 10 (2020) 9491.
- 4) F. Wang, X. Lua, X-Y. Li, J. Hazard. Mater. 308 (2016) 75.
- 5) D.J. Fitzgerald, Am. J. Clin. Nutr. 67 (1998) 1098S.
- 6) G. Grass, C. Rensing, M. Solioz, Appl. Environ. Microbiol. 5 (2011) 1541.
- 7) M.A. Deshmukh, H.K. Patil, G.A. Bodkhe, M. Yasuzaw, P. Koinkar, A. Ramanaviciene, M.D. Shirsat, A. Ramanavicius, Sens. Actuators B: Chem.

جدول 3. نتایج آماری نانوحسگر پیشنهادی برای اندازه‌گیری AA در نمونه‌های قرص ویتامین C

نمونه	اضافه شده (nM)	اندازمگیری شده (nM)	درصد بازایی	RSD (%، n = 3)
1	10	9/50	95/00	3/10
2	20	20/10	100/50	2/55
3	25	26/00	104/00	1/75
4	50	50/76	101/52	2/23

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، اینجا یک نانوحسگر دو منظوره حساس و گزینش-پذیر برای اندازه‌گیری Cu(II) و AA به ترتیب بر اساس فرآیندهای ضد-تجمع و تجمع نانوذرات طلا پیشنهاد شده است. به طور کلی، فرآیند ضد-تجمع نانوذرات طلا دارای عملکرد انتخابی بیشتری است، چون در این فرآیند نشانک‌های مثبت کاذب کمتری نسبت به فرآیند تجمع نانوذرات طلا دیده می‌شود. تقویت نشانک‌ها در نانوذرات طلا موجب افزایش حساسیت تشخیص نسبت به محلول آبی شده است. در این مطالعه، ابتدا از واکنشگر NC با اتصالات عرضی آمینی برای تجمع نانوذرات طلا استفاده شد. واکنشگر NC موجب اندازه‌گیری Cu(II) در گستره غلظتی 5-500 nM با گزینش‌پذیری بالا از طریق تشکیل کمپلکس $\text{Cu}(\text{NC})_2$ می‌شود. اثر pH در اندازه‌گیری Cu(II) سنجه‌ای مهم و اساسی است که علاوه بر پایداری Cu(II)، بر روی پایداری نانوذرات طلا هم تأثیرگذار است. پایین‌ترین غلظت قابل تشخیص Cu(II) به وسیله روش پیشنهادی برابر 1 nM تخمین زده شد. این مقدار بسیار پایین‌تر از حد مجاز مقدار Cu(II) در آب‌های آشامیدنی است. در ادامه کار، از سامانه طراحی شده برای Cu(II)، برای اندازه‌گیری AA نیز استفاده شد. اینجا بین AA و NC برای واکنش با Cu(II) رقابت صورت می‌گیرد. AA در گستره غلظتی

- 19) E. Priyadarshini, N. Pradhan, *Sens. Actuators B: Chem.* 238 (2017) 888.
- 20) M. Li, H. Gou, I. Al-Ogaidi, N. Wu, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2013) 713.
- 21) H. Wei, S.M.H. Abtahi, P.J. Vikesland, *Environ. Sci.: Nano* 2 (2015) 120.
- 22) L. Li, B.D. Li, *Food Chem.* 122 (2010) 895.
- 23) G. Grass, C. Rensing, M. Solioz, *Appl. Environ. Microbiol.* 5 (2011) 1541.
- 24) M.P. Bradshaw, C. Barril, A.C. Clark, P.D. Prenzler, G.R. Scollary, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 (2011) 479.
- 25) D. Njusa, P.M. Kelleya, Y-J. Tu, Y-J., H.B. Schlegel, *Free Radica. Bio. Med.* [7https://www.sciencedirect.com/science/journal/08915849/159/supp/C](https://www.sciencedirect.com/science/journal/08915849/159/supp/C) (2020) 37.
- 26) A.M. Pisoschi, A.F. Danet, S. Kalinowski, *J. Autom. Methods Manag. Chem.* 1463-9246 (2008) 937651.
- 27) N.V. Bhagavan, *Medical Biochemistry* (4th edn.) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2001.
- 28) E.M. Mystkowski, *Biochem. J.* 36 (1942) 494.
- 29) X. Wang, L. Chen, L. Chen, *Microchim. Acta* 181 (2014) 105.
- 30) M.R. Hormozi-nezhad, S. Abbasi-moayed, *Talanta* 129 (2014) 227.
- 31) L. Zhang, Y. Xing, C. Liu, X. Zhou, H. Shi, *Sens. Actuator B: Chem.* 215 (2015) 561.
- 32) Q. Gao, L. Ji, Q. Wang, K. Yin, J. Li, L. Chen, *Anal. Methods* 9 (2017) 5094.
- 33) Z. Rasouli, R. Ghavami, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 191 (2018) 336.
- 1 (2018) 331.
- 8) Z. Guo, D-D. Li, X.k. Luo, Y-H. Li, Q-n. Zhao, M-M. Li, Y-T. Zhao, T-S. Sun, M. J. *Colloid Interface Sci.* 490 (2017) 11.
- 9) S.C. Wilschefski, M.R. Baxter, *Clin. Biochem. Rev.* 40 (2019) 115.
- 10) M. Ghisi, E.S. Chaves, D.P.C. Quadros, E.M. Marques, A.J. Curtius, A.L.B. Marques, *Microchem. J.* 98 (2011) 62.
- 11) D. Vilela, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 751 (2012) 24.
- 12) G.M. Fernandes, D.N. Barreto, R.S. Lamarca, P.C.F. Lima Gomes, S. João Flávio da Petrucci, A.D. Batista, *Anal. Chim. Acta* 1135 (2020) 187.
- 13) Duraisamy Udhayakumari, Sanay Naha, Sivan Velmathi, Colorimetric and fluorescent chemosensors for Cu²⁺. A comprehensive review from the years 2013-15, *Anal. Methods* 9 (2017) 552.
- 14) V.S.A. Piriya, P. Joseph, S.G.G.K. Daniel, S. Lakshmananc, T. Kinoshita, S. Muthusamy, *Mater. Sci. Eng. C* 78 (2017) 1231.
- 15) M. Lv, X. Zhang, Y. Zhang, *RSC Adv.* 124 (2015) 102311.
- 16) D.V. María, C. González, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 751 (2012) 24.
- 17) P.C. Huang, N.J-F. Li, F-Y. Wu, *Sens. Actuators B: Chem.* 255 (2018) 2779.
- 18) M. Iarossi, C. Schiattarella, I. Rea, L.D. Stefano, R. Fittipaldi, A. Vecchione, R. Velotta, B.D. Ventura, *ACS Omega* 30 (2018) 3805.