Chemical Research & Nanomaterials(CRN)
crn.shiraz.iau.ir
پژوهش های شیمیایی و نانومواد

اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری هیدروژن پراکسید با استفاده از نانوزیم نقره

سعیدرضا هرمزی جنگی*، زهرا دهقانی

آزمایشگاه شیمی و بیوشیمی هرمزی، کدپستی: ۹۸۶۱۳۳۴۳۶۷، زابل، ایران

چکیده: در پژوهش حاضر، یک روش تجزیه‌ای با استفاده از نانوزیم نقره به عنوان نانوزیمی در دسترس، ارزان و با فعالیت شبه پراکسیدازی بالا برای اندازه‌گیری گزینشی هیدروژن پراکسید در نمونه‌های غذایی طراحی شد. اندازه‌گیری‌ها با بهره‌گیری از ۳,۳'،۵,۵'-تترامتیل بنزیدین به عنوان کاوشگر تجزیه‌ای و سوبسترای پراکسیدازی انجام پذیرفت. اساس اندازه‌گیری بر کاوش اسپکتروفتومتری محصول اکسیداسیون سوبسترا با هیدروژن پراکسید در حضور نانوزیم و اندازه‌گیری جذب محصول تولیده شده (آبی رنگ) در ۶۵۸ نانومتر استوار است. پارامترهای مؤثر بر حساسیت اندازه‌گیری شامل، مقدار نانوزیم، زمان، نوع و غلظت بافر، pH و غلظت سوبسترا بهینه شدند. در شرایط بهینه، محدوده‌ی اندازه‌گیری خطی بین ۸۰-۱ میکرومولار و حد تشخیص بسیار پایین ۰/۱۲ میکرومولار بدست آمد. همچنین اندازه‌گیری گزینش‌پذیری روش نشان داد که به صورت بسیار گزینش‌پذیر فقط در حضور هیدروژن پراکسید جذب در ۶۵۸ نانومتر افزایش می‌یابد و پاسخ تجزیه‌ای مشاهده می‌شود. بنابراین، روش طراحی شده برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید در شیر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش طراحی‌شده با دقت و صحت بالایی قادر به اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید موجود در شیر می‌باشد. امید است، نتایج این پژوهش بتوانند در راستی‌آزمایی سلامت مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوزیم، هیدروژن پراکسید، فعالیت شبه پراکسیدازی

saeedrezahormozi@gmail.com

۱- مقدمه

نانوزیم‌ها یا نانوذرات با فعالیت شبه آنزیمی عالی به دلیل پایداری و کارایی بالاتر در مقایسه با آنزیم‌های طبیعی، برای کاربرد در اندازه‌گیری گونه‌ها و نیز کاتالیز زیستی واکنش‌ها به جای آنزیم‌های طبیعی مورد توجه هستند و به عنوان جایگزین‌های با کارایی بالا مطرح می‌شوند [۳-۱]. اولین گزارش نانوزیم‌ها به بررسی فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 توسط گائو و همکاران در سال ۲۰۰۷ برمی‌گردد[۴]، از آن زمان تاکنون طیف گسترده ای از نانومواد به عنوان مثال، نانوذرات Co_3O_4[۵]، نانوخوشه‌های پلادیم/نقره[۶]، چارچوب‌های آلی-فلزی مختلف به طور مثال NEQC-340[۷]، نانوخوشه‌های طلا[۸]، میکروذرات $Fe_2(MoO_4)_3$ شبه گل[۹]، سیستم‌های آلی فلزی مبتنی بر مس[۱۰]، نانوذرات اکسید مس[۱۱]، نقره-طلا/کلرید نقره[۱۲]، نانوصفحات $Ce_2(MoO_4)_3$[۱۳]، نانوذرات منگنز دی اکسید و نیز نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده‌ی آهن[۱۴] به عنوان نانوزیم با فعالیت شبه پراکسیدازی بالا مورد استفاده قرار گرفته اند. از آنجایی که نانوزیم‌ها قادرند اکسیداسیون سوبستراهای پراکسیدازی را به محصولات رنگی مربوطه خود کاتالیز کنند، برای اهداف تجزیه‌ای و کاتالیزوری استفاده شده‌اند[۱۵، ۱۶]. با این حال، بیشتر تحقیقات در مورد نانوزیم‌ها بر ساخت حسگرهای حساس و انتخابی با استفاده از اکسیداسیون سوبستراهای پراکسیدازی-کاتالیز شده با نانوزیم استوارند. به طور معمول سوبستراهای ۳,۳'،۵,۵'- تترامتیل بنزیدین و ۳,۳'-دی آمینوبنزیدین برای این اهداف مورد استفاده قرار

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۲/۱۶
تاریخ پذیرش : ۱۴۰۲/۲/۲۷

گرفته‌اند. به طور مثال اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری چندین آنالیت مانند سیستئین[۱۱]، هیدروژن پراکسید[۱۴، ۱۷]، یونهای جیوه[۸]، تری استون تری پراکسید[۱۸]، گلوکز[۱۷، ۱۹] و گلوتاتیون[۱۶، ۸] و غیره با استفاده از سیستم‌های اندازه‌گیری بر پایه‌ی نانوزیم اندازه‌گیری کمی یا کیفی شده‌اند. حساسیت بالا و نیز رنگ بسیار عالی محصول اکسیداسیون ۳،۳'،۵،۵'-تترامتیل بنزیدین باعث شده است تا این ماده به عنوان سوبسترای استاندارد برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز و نیز نانوزیم‌های پراکسیدازی مورد استفاده قرار گیرد. نکته قابل توجه آن است که واکنش پذیری بالای این سوبسترا یک مزیت برای واکنش کاتالیزشده با نانوزیم می‌باشد، زیرا این عامل باعث می‌شود پاسخ تجزیه‌ای افزایش و در نتیجه حساسیت حسگرهای طراحی شده بیشتر شود [۱، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۲۰].

از میان نانوزیم‌های مختلف، نانوزیم‌های نقره تاکنون به دلیل آسانی سنتز، ارزان بودن و نیز خواص شبه‌آنزیمی بی‌نظیری که دارند برای اندازه‌گیری نانوزیمی گونه‌های مختلف نظیر گلوکز[۲۰]، تری استون تری پراکسید[۲۱] و آسکوربیک اسید[۲۲] استفاده شده‌اند. از نانوزیم‌های نقره هیبرید شده با Ti_3C_2 نیز برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید استفاده شده است[۲۳]. همچنین در سال ۲۰۲۳ برای اندازه‌گیری مجموع انتی اکسیدان‌ها از نانوزیم‌های نقره‌ی کلاستری به همراه نانوذرات گرافن اکسید استفاده شده است[۲۴]. پژوهش‌های متنشر شده در رابطه با کاربرد نانوزیم‌های نقره نشان می‌دهد که این نانوزیم‌ها می‌توانند افق‌های جدیدی را برای طراحی سیستم‌های شبه‌آنزیمی حساس با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی فراهم کنند. با این حال گستره زیادی از این گزارش ها مربوط به سیستمهای عامل دار شده‌ی نانوزیم نقره و یا نانوذرات محافظت شده با بیوپلیمرها می‌باشند که صرفه اقتصادی استفاده از این نانوزیم‌ها را برای کاربردهای عملی محدود می‌کند. متاسفانه تاکنون گزارش های کمی در رابطه با استفاده از نانوذرات نقره به شکل برهنه و بدون عامل دار شدن به عنوان سیستمهای نانوکاتالیزوری منتشر شده است[۲۵].

در پژوهش حاضر، یک روش تجزیه‌ای با استفاده از نانوزیم نقره به عنوان نانوزیمی در دسترس، ارزان و با فعالیت شبه پراکسیدازی بالا برای اندازه‌گیری گزینشی و حساس هیدروژن پراکسید در نمونه‌های غذایی طراحی شد. اندازه‌گیری‌ها با بهره‌گیری از ترامتیل بنزیدین به عنوان کاوشگر تجزیه‌ای و سوبسترای پراکسیدازی انجام پذیرفت. اساس اندازه‌گیری بر کاوش اسپکتروفتومتری محصول اکسیداسیون سوبسترا با هیدروژن پراکسید در حضور نانوزیم و اندازه‌گیری جذب محصول تولیده شده (آبی رنگ) در ۶۵۸ نانومتر استوار است. پارامترهای مؤثر بر حساسیت اندازه‌گیری شامل، مقدار نانوزیم، زمان، نوع و غلظت بافر، pH و غلظت سوبسترا بهینه شدند. ارقام شایستگی روش طراحی شده شامل محدوده پاسخ خطی و حد تشخیص مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس گزینش‌پذیری روش در مقابل گونه‌های دیگر مانند نمک‌ها، یون‌های فلزی، آمینواسیدها و غیره مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت روش طراحی شده برای اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری هیدروژن پراکسید در شیر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش طراحی‌شده با دقت و صحت بالایی قادر به اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید موجود در شیر می‌باشد. امید است، نتایج این پژوهش بتوانند در راستی‌آزمایی سلامت مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. نقطه عطف روش طراحی شده در پژوهش حاضر استفاده از نانوذرات نقره به صورت برهنه و بدون انجام مراحل اضافی عامل‌دار سازی، پایدارسازی با محافظت‌کننده‌هایی مانند پلیمرها و نیز بدون هیبریداسیون با سایر نانوذرات در اندازه‌گیری شبه پراکسیدازی هیدروژن پراکسید می‌باشد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد

تمامی مواد مورد استفاده از شرکت مرک خریداری شدند. همچنین آب بدون یون از شرکت زلال طب شیمی تهیه شد. لازم به ذکر است که تمامی مواد تهیه شده در درجه‌ی آنالیز خریداری شده‌اند.

۲-۲- دستگاهوری

بررسی رفتار جذبی نانوزیم نقره و نیز اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری هیدروژن پراکسید با استفاده از یک اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش مدل Ultrospec 4000 تولید شده توسط Pharmacia Biotech انجام پذیرفت. pH تمامی محلول‌ها با استفاده از یک pH-متر مدل متراهم ۸۲۷ تنظیم شد. تصویر TEM از نانوزیم ها

توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss، مدل EL10C) که با ولتاژ شتاب دهنده ۸۰ کیلو ولت کار می کند، ثبت شد.

۲-۳- سنتز نانوزیم نقره

به طور خلاصه، ۱۰/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌مولار نیترات نقره با ۱۰/۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰/۰ میلی‌مولار سدیم سیترات مخلوط شد. پس‌ازآن، ۱۸۰/۰ میلی‌لیتر آب بدون یون به مخلوط واکنش اضافه شد. سپس، محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط به حال خود رها شد. فرآیند سنتز با افزودن سریع ۱۷/۶ میلی‌گرم سدیم بورهیدرات و هم زدن محلول برای ۲ ساعت در دمای محیط دنبال شد. در نهایت، نانوذرات زرد رنگ نقره برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگه‌داری شدند.

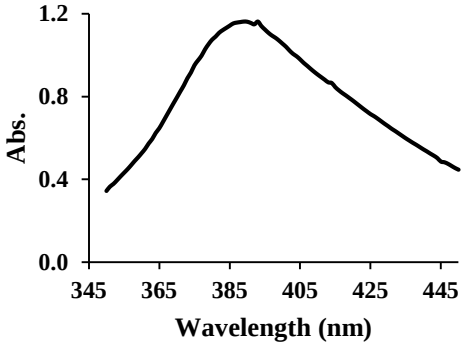
۲-٤- روش اندازه‌گیری نانوزیمی هیدروژن پراکسید

به منظور اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری H_2O_2 با استفاده از سیستم نانوزیمی نانوذرات نقره-تترامتیل بنزیدین، ابتدا به یک میلی‌لیتر بافر استات (۰/۳ مولار با pH برابر ۴/۰)، ۲۰/۰ میکرولیتر محلول هیدروژن پراکسید با غلظت‌های مختلف و ۵۰ میکرولیتر از محلول تترامتیل بنزیدین(غلظت نهایی در محلول واکنش، ۰/۴ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس ۸۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره به عنوان نانوزیم به آن افزوده شد تا فرآیند اکسیداسیون و تولید رنگ آبی آغاز شود. برای تکمیل فرآیند اکسیداسیون سوبسترا، محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط به حال خود رها شد. پس‌از آن، جذب محصول واکنش اکسیداسیون در ۶۵۸ نانومتر ثبت شد و به عنوان پاسخ تجزیه‌ای برای تعیین هیدروژن پراکسید مورد استفاده قرار گرفت.

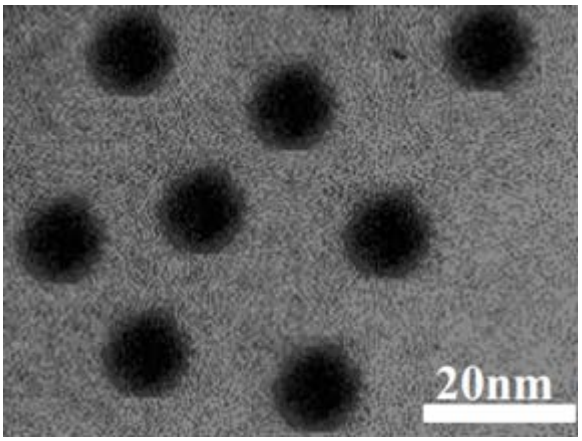
۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی نانوزیم نقره

به جهت شناسایی نانوزیم‌های نقره‌ی سنتزشده، اندازه و مورفولوژی و نیز خواص نوری(رفتار جذبی) نانوذرات نقره سنتز شده مورد ارزیابی قرار گرفت. خواص نوری نانوزیم سنتزشده با استفاده از اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش در محدوده‌ی ۴۵۰-۳۵۰ نانومتر بررسی شد. طیف جذبی نانوذرات سنتز شده در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشخص است نانوذرات سنتز شده یک طیف نسبتاً متقارن با بیشینه‌ی جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر از خود نشان می‌دهند. سپس اندازه و خواص مورفولوژیکی نانوزیم سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. مطابق این شکل، نانوذرات سنتزشده دارای مورفولوژی کروی با اندازه نسبتاً یکنواخت می‌باشند. لازم به ذکر است که اندازه متوسط این نانوذرات در حدود ۱۲ نانومتر تخمین زده شد.



شکل ۱. طیف اسپکتروفوتومتری نانوزیم نقره‌ی سنتز شده.

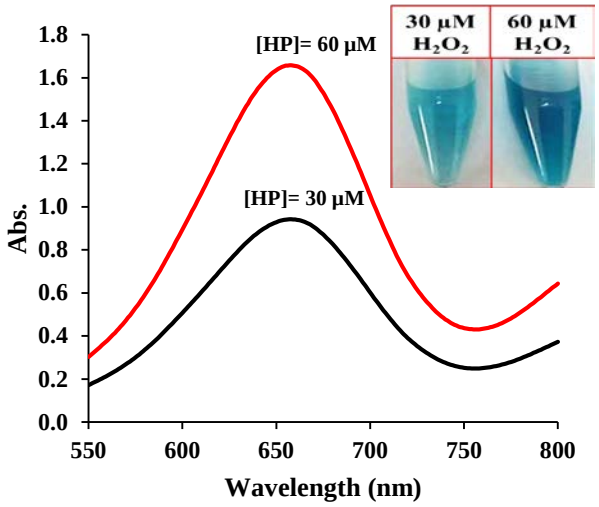


شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوزیم نقره‌ی سنتز شده.

۳-۲- ارزیابی فعالیت شبه پراکسیدازی نانوزیم سنتزشده و اصول روش طراحی شده

فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات سنتزشده با استفاده از ۳,۳،'۵,۵'-تترامتیل بنزیدین به عنوان سوبسترای پراکسیدازی بررسی گردید. نتایج این بررسی در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. همانطور که نشان داده شده است، نانوزیم سنتزشده فرآیند اکسیداسیون تترامتیل بنزیدین را با هیدروژن پراکسید به عنوان

عامل اکسنده کاتالیز می‌کند و طیف جذبی با بیشینه‌ی جذب در ۶۵۸ نانومتر مشاهده می‌گردد. بررسی‌ها نشان داد که با تغییر مقدار هیدروژن پراکسید، جذب در ۶۵۸ نانومتر نیز تغییر می‌کند. بنابراین نانوزیم سنتزشده برای طراحی یک نانوحسگر با حساست بالا برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید مورد استفاده قرار گرفت. در واقع، نانوزیم‌های نقره با اثر بر هیدروژن پراکسید، رادیکال فعال هیدروکسیل را تولید می‌کنند[۱، ۱۴، ۱۷]. رادیکال‌های تولید شده با اثر بر تترامتیل بنزیدین باعث پیشرفت فرآیند اکسیداسیون آن و در نتیجه تولید یک کاتیون رادیکال آبی رنگ می‌شوند که بیشینه‌ی جذب آن در ۶۵۸ نانومتر برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید(عامل اکسنده) مورد استفاده قرار گرفته است. نکته قابل ذکر این است که اگرچه نانوزیم‌های نقره فعالیت پراکسیدازی بالایی نشان می‌دهند، اما در محلول پایداری نانوذرات نقره هنوز به عنوان یک چالش اساسی مطرح است. همانطور که در گزارشات پیشین مطرح شده است برای استفاده از نانوذرات نقره به عنوان کاوشگرهای تجزیه‌ای در راستای اندازه‌گیری گونه‌های مختلف این نانوذرات به طرق مختلف نظیر پوشش با بیوپلیمرها از اثرات ناپایدار کننده محافظت شده‌اند[۲۰]. اما نکته حائز اهمیت این است که تجمع ذرات نانونقره در محلول اگرچه بر طیف جذبی نانونقره اثرات مخربی دارد اما هنوز این پرسش باقی است که آیا این فرآیند می‌تواند فعالیت شبه‌آنزیمی نانوزیم نقره را نیز به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهد یا خیر. از طرفی استفاده از نانوذرات نقره بدون هیچ‌گونه پیش عملیات محافظتی برای فرآیندهای کاتالیزوری[۲۵] و نیز اندازه‌گیری گلوکز و اسکوربیک اسید[۲۲] قبلا گزارش شده است. بنابراین می‌توان در نظر داشت که روند ناپایداری نانوذرات نقره در محلول به قدری سریع رخ نمی‌دهد که نتوان از آن به تنهایی و بدون پوشش محافظت کننده در فرآیندهای کاتالیزوری استفاده نمود. با این حال برای اطمینان از اینکه تأثیر عواملی که رفتار جذبی نانوذرات نقره را به شدت نامساعد می‌کنند، بر فعالیت کاتالیزوری این نانوذرات قابل اغماض است، فعالیت نانوزیمی نانوذرات نقره در مدت زمان ۵ روز بررسی گردید و RSD٪ مربوط به نتایج حاصله به عنوان شاخص پایداری فعالیت نانوزیمی محاسبه گردید. نتایج نشان داد که در صورت نگه‌داری نانوزیم نقره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با پوشش فویل آلومینیمی (برقراری شرایط تاریکی)، RSD٪ در حدود ۲/۳ درصد برای اندازه‌گیری فعالیت شبه‌آنزیمی نانوزیم نقره بدست آمد که نشان از تاثیر قابل چشم‌پوشی عوامل ناپایدار کننده بر فعالیت نانوزیمی این نانوذرات دارد. بنابراین نانوذرات نقره به صورت برهنه برای فرآیند اکسیداسیون TMB استفاده شدند.



شکل ۳. بررسی فعالیت شبه پراکسیدازی نانوزیم سنتز شده با دو غلظت متفاوت از هیدروژن پراکسید.

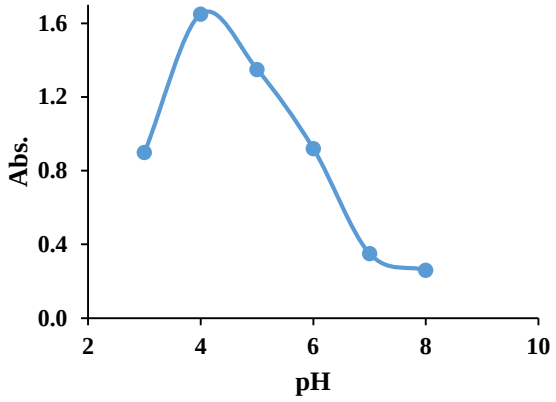
۳-۳- بهینه‌سازی شرایط اندازه‌گیری

پارامترهای مؤثر بر حساسیت روش شامل، مقدار نانوزیم، زمان، نوع و غلظت بافر، pH و غلظت سوبسترا بهینه شدند. در تمامی مراحل بهینه‌سازی غلظت هیدروژن پراکسید برابر ۶۰/۰ میکرومولار می‌باشد.

۳-۳-۱- اثر pH

اثر pH به عنوان یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر حساسیت اندازه‌گیری روش‌های مبتنی بر نانوزیم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور فرایند اندازه‌گیری در بافر استات ۰/۳ مولار با pH مختلف در محدوده‌ی ۸-۳ انجام پذیرفت. نتایج این بررسی در شکل ۴ نشان داده شده اند. همانطور که مشخص است با افزایش pH پاسخ تجزیه‌ای افزایش می‌یابد و سپس در pH برابر ۴/۰ به بیشینه‌ی خود می‌رسد. با افزایش pH به مقادیر بالاتر از ۴/۰ رفته رفته میزان اکسیداسیون تترامتیل بنزیدین کاهش یافته و پاسخ تجزیه‌ای (جذب در ۶۵۸ نانومتر) نیز رو به کاهش می‌گذارد. با افزایش pH از مقادیر شدیدا اسیدی، میزان اکسیداسیون TMB

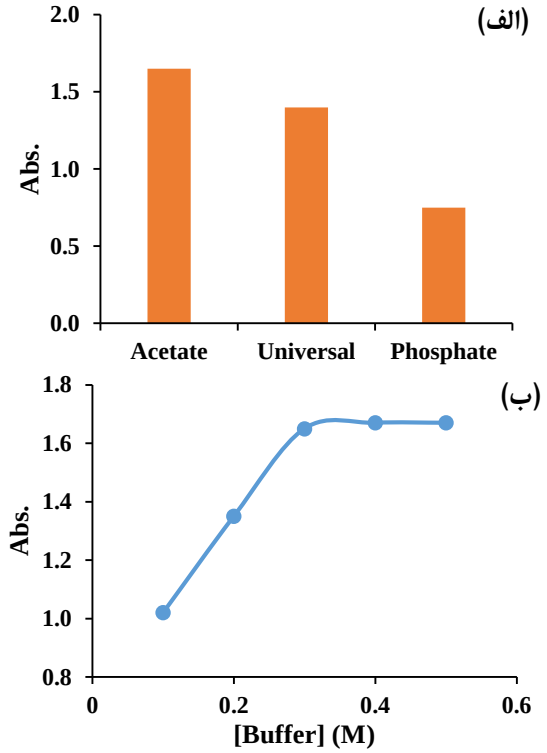
افزایش می‌یابد و درنتیجه جذب مشاهده شده در pH بالاتر از ۳ بیشتر می‌شود. در واقع همانطور که قبلاً گزارش شده است pH اپتیمم برای اکسیداسیون آنزیمی/نانوزیمی TMB در حدود pH برابر ۳/۵ الی ۴/۵ بسته به نوع نانوزیم متغیر است[۱]. در pH بالاتر از این مقادیر به دلیل ناپایداری هیدروژن پراکسید[۷] میزان اکسیداسیون TMB کاهش یافته و در نتیجه جذب مشاهده شده در ۶۵۸ نانومتر و به تبع آن پاسخ تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. بنابراین و با در نظر گرفتن تمام عوامل مربوطه، pH برابر ۴/۰ به عنوان pH بهینه برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید انتخاب گردید.



شکل ۴. اثر pH بر اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید با استفاده از نانوحسگر طراحی شده.

۳-۳-۲- اثر نوع و غلظت بافر

اثر نوع بافر بر پاسخ تجزیه‌ای با استفاده از بافرهای استات، فسفات و یونیورسال مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار pH برای تمام اندازه‌گیری‌ها برابر ۴/۰ تنظیم شد. نتایج در شکل ۵-الف نشان داده شده‌اند. همانطور که از این شکل قابل استنتاج است اکسیداسیون تترامتیل بنزیدین در حضور نانوزیم نقره و در نتیجه پاسخ تجزیه‌ای (جذب در ۶۵۸ نانومتر) در بافر استات بیشینه است. بنابراین بافر استات به عنوان محیط اکسیداسیون انتخاب گردید. سپس اثر غلظت بافر با استفاده از بافر استات با pH مساوی ۴/۰ در محدوده‌ی غلظتی ۰/۵-۰/۱ مولار مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵-ب). نتایج نشان داد که بیشینه‌ی پاسخ تجزیه‌ای در بافر استات (pH=۴/۰) ۰/۳ مولار حاصل می‌شود. قدرت یونی و غلظت بافر می‌تواند بر سرعت واکنش کاتالیزوری و در نتیجه بر بازده محصول فرآیند کاتالیزوری (در اینجا محصول آبی رنگ) از طریق تغییر دانسیته بار اطراف یونها و یا گونه‌های خنثی درگیر در واکنش مؤثر واقع شود. با نظر گرفتن اثر این امر بر فرآیندهای اکسایش-کاهش، بررسی‌های قبلی ثابت کرده است که با افزایش غلظت بافر میزان اکسیداسیون افزایش می‌یابد و سپس به طور کامل به یک حد ثابت می‌رسد. گزارش ها نشان می‌دهد که در این موارد در فرآیند کاتالیزوری دو گونه‌ی یونی و یا حداقل یک گونه‌ی یونی و یک گونه‌ی خنثی درگیر هستند[۱۸].

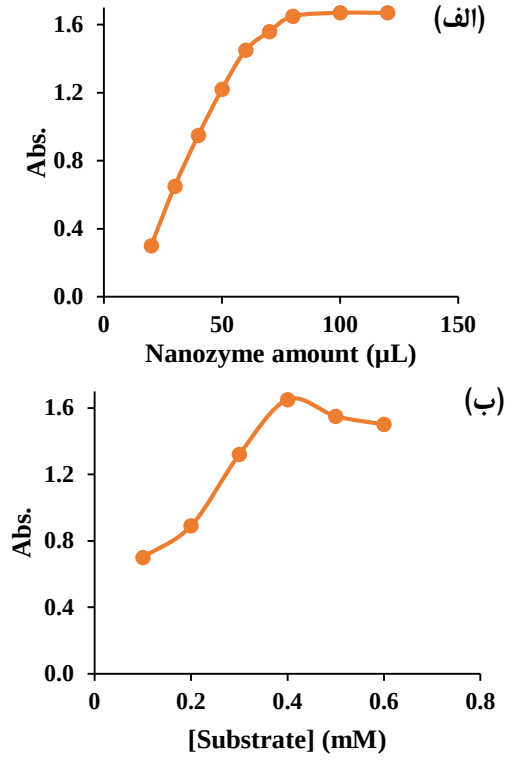


شکل ۵. اثر نوع بافر (الف) و غلظت بافر (ب) بر اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید.

۳-۳-۳- اثر مقدار نانوزیم

اثر مقدار نانوزیم بر میزان اکسیداسیون سوبسترا و در نتیجه اندازه‌ی پاسخ تجزیه‌ای و میزان حساسیت اندازه‌گیری با استفاده از مقادیر مختلف نانوزیم سنتزشده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان جذب در ۶۵۸ نانومتر با افزایش مقدار نانوزیم افزایش می‌یابد و در نهایت به یک مقدار ثابت می‌رسد که با پروفایل واکنش کاتالیزشده با آنزیم‌های طبیعی تطابق خوبی دارد[۲۶]. در واقع همانطور که گزارش شده است سرعت واکنش‌های کاتالیزوری با افزایش مقدار کاتالیزور افزایش پیدا می‌کند و در نهایت به یک حد ثابت می‌رسد پس از آن افزایش مقدار کاتالیزور تأثیری بر سرعت

واکنش ندارد که این موضوع در عدم افزایش بازده فرآیند کاتالیزوری در پی افزایش مقدار کاتالیزور پس از یک مقدار معین نمود می‌یابد[۱۸]. مطابق نتایج حاصله، مقدار بهینه‌ی نانوزیم برابر ۸۰ میکرولیتر برآورد گردید (شکل ۶-الف).



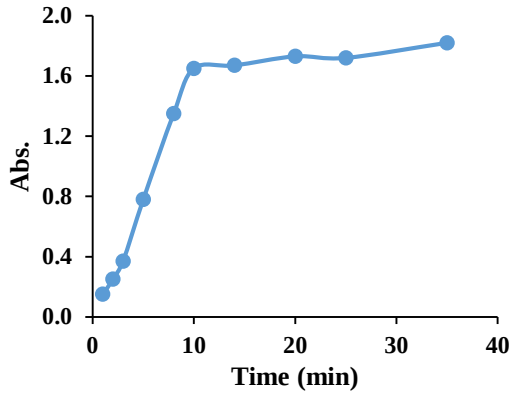
شکل ۶. اثر مقدار نانوزیم (الف) و غلظت سوبسترا (ب) بر اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید.

۳-۳-٤- اثر مقدار سوبسترا (تترامتیل بنزیدین)

اثر مقدار سوبسترای آنزیمی بر پاسخ تجزیه‌ای و میزان حساسیت اندازه‌گیری با استفاده از غلظت‌های مختلف تترامتیل بنزیدین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان جذب در ۶۵۸ نانومتر با افزایش مقدار سوبسترا افزایش می‌یابد و در نهایت به یک مقدار ثابت می‌رسد که با پروفایل واکنش کاتالیزشده با آنزیم‌های طبیعی مطابقت خوبی دارد [۲۶]. همانطور که قبلاً گزارش شده است با افزایش غلظت سوبسترا در فرآیند کاتالیز شده با آنزیم (نانوزیم)، میزان محصول تولید شده افزایش می‌یابد، اما بعد از مدتی با افزایش غلظت سوبسترا دیگر فرآیند کاتالیزوری دستخوش تغییر نمی‌شود و به اصطلاح فرآیند به یک حالت پایا می‌رسد. دلیل این امر آن است که آنزیم (نانوزیم) پس از یک مقدار مشخص از سوبسترا اشباع شده و با افزایش غلظت سوبسترا دیگر جایگاه فعال آنزیم برای سوبسترای مازاد در دسترس نمی‌باشد، بنابراین سوبسترای اضافی در واکنش شرکت داده نمی‌شود و در نتیجه پروفایل واکنش کاتالیز شده در نهایت به یک حد ثابت می‌رسد[۲۶]. مطابق نتایج حاصله، مقدار بهینه‌ی سوبسترا برابر ۰/۴ میلی‌مولار برآورد گردید (شکل ۶-ب).

۳-۳-۵- اثر زمان

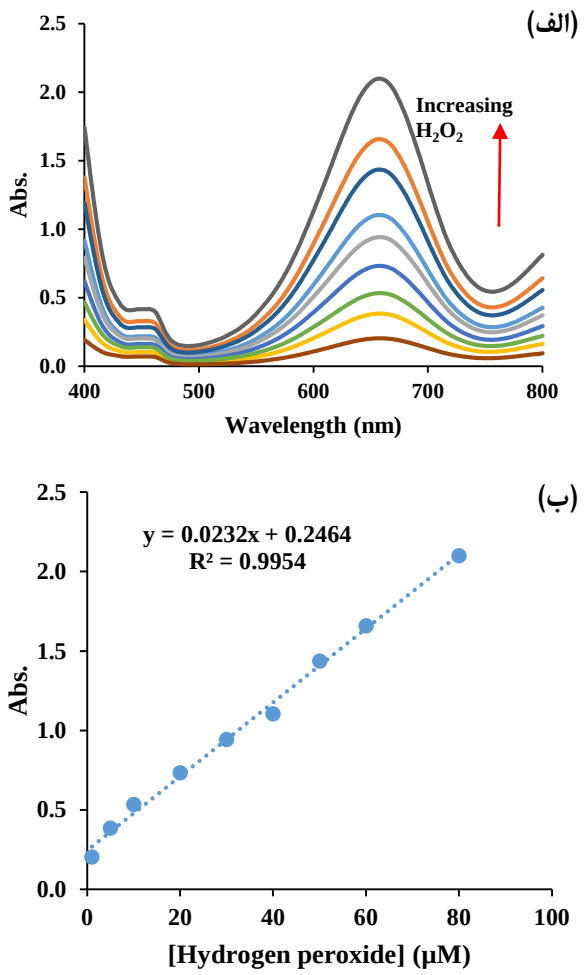
اثر زمان واکنش نانوزیمی بر پاسخ تجزیه‌ای بررسی گردید. نتایج در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. همانطور که از این شکل استنتاج می‌شود پاسخ تجزیه‌ای پس از گذشت ۱۰ دقیقه به بیشینه‌ی خود می‌رسد و پس از آن تغییرات جذب در ۶۵۸ نانومتر ناچیز است. بنابراین زمان ۱۰ دقیقه به عنوان مقدار بهینه برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید انتخاب شد.



شکل ۷. اثر زمان واکنش بر اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید.

۳-٤- منحنی کالیبراسیون و برآورد حد تشخیص

برای تشکیل منحنی کالیبراسیون و برآورد محدوده‌ی پاسخ خطی نانوحسگر طراحی‌شده طیف‌های جذبی محصول اکسیداسیون سوبسترا در حضور غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید ثبت گردید (شکل ۸-الف). همانطور که نشان داده شده است با افزایش غلظت هیدروژن پراکسید میزان جذب در ۶۵۸ نانومتر افزایش می‌یابد. به منظور برآورد محدوده‌ی پاسخ خطی منحنی کالیبراسیون با رسم جذب در ۶۵۸ نانومتر به عنوان تابعی از غلظت هیدروژن پراکسید تشکیل شد(شکل ۸-ب). در شرایط بهینه، محدوده‌ی اندازه‌گیری خطی بین ۸۰-۱ میکرومولار برآورد گردید.



شکل ۸. طیف‌های جذبی محصول اکسیداسیون تترامتیل بنزیدین کاتالیزشده با نانوزیم نقره در حضور غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید (الف) و منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید (ب)

به علاوه حد تشخیص نانوحسگر با استفاده قانون 3s [۱۶] معادل ۰/۱۲ میکرومولار بدست آمد که مقدار بسیار پایینی می‌باشد. لازم به ذکر است که ارقام شایستگی روش طراحی‌شده با روشهای گزارش شده برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید مقایسه گردید. نتایج این مقایسه در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشخص است روش طراحی شده محدوده‌ی اندازه‌گیری خطی گسترده و حد تشخیص پایین‌تری نسبت به روش‌های پیشین نشان می‌دهد.

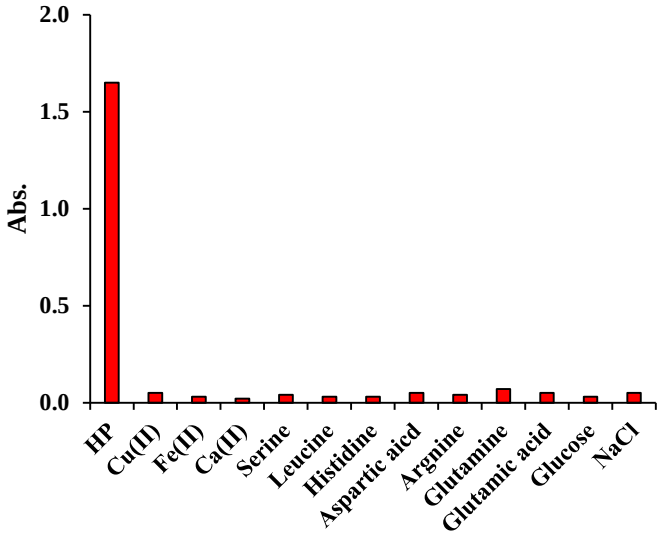
۳-۵- گزینش‌پذیری نانوحسگر

گزینش‌پذیری حسگر در مقابل گونه‌های همزیست مانند نمک‌ها، یون‌های فلزی، آمینواسیدها و غیره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی در شکل ۹ نشان داده شده‌اند. همانطور که مشخص

جدول ۱. مقایسه ارقام شایستگی روش طراحی‌شده با روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری نانوزیمی هیدروژن پراکسید

نانوزیم	LDR (میکرو مولار)	LOD (میکرو مولار)	مرجع
نانوزیم منگنز دی اکسید /نانوزیم آهن	۱۰۰-۱	۰/۲۶	[۱۴]
نانوزیم هیبریدی نقره-Ti_3C_2	۳۵۰۰۰-۵۰	۱/۵۳	[۲۳]
نانوزیم اکسید کروم	۵۸-۴	--	[۲۷]
نانوزیم نقره	۸۰-۱	۰/۱۲	**این کار**

است گونه‌های همزیست نمی‌توانند تأثیر قابل توجهی بر اکسیداسیون سوبسترا و درنتیجه افزایش جذب در ۶۵۸ نانومتر شوند و حتی در غلظت هایی به اندازه ۱۰۰ برابر بیشتر از غلظت هیدروژن پراکسید جذب در ۶۵۸ نانومتر را زیاد نمی‌کنند. گفتنی است که غلظت هیدروژن پراکسید برابر ۶۰/۰ میکرومولار در نظر گرفته شده است. همانطور که در شکل مشخص است پاسخ تجزیه‌ای فقط در حضور هیدروژن پراکسید قابل مشاهده است که نشان از عملکرد گزینشی نانوحسگر طراحی شده دارد.



شکل ۹. گزینش‌پذیری نانوحسگر طراحی شده برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید

۳-۶- کاربرد عملی: اندازه‌گیری در نمونه حقیقی

روش طراحی شده در نهایت برای اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری هیدروژن پراکسید در نمونه شیر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. بررسی‌ها نشان داد که روش طراحی‌شده با دقت و صحت بالایی قادر به اندازه‌گیری هیدروژن

پراکسید موجود در شیر می‌باشد. امید است، نتایج این پژوهش بتوانند در راستی‌آزمایی سلامت مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۲. نتایج اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید در نمونه حقیقی (شیر) با استفاده از نانوحسگر طراحی شده

هیدروژن پراکسید تزریق شده (میکرومولار)	هیدروژن پراکسید اندازه‌گیری شده (میکرومولار)	درصد بازیابی(٪)	RSD (%)
۰/۰	۳/۰	–	۲/۳
۵/۰	۸/۲	۱۰۲/۵	۲/۸
۲۰/۰	۲۲/۶	۹۸/۲	۳/۲
۵۰/۰	۵۵/۰	۱۰۳/۷	۳/۴

٤- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، یک روش تجزیه‌ای با استفاده از نانوزیم نقره به عنوان نانوزیمی در دسترس، ارزان و با فعالیت شبه پراکسیدازی بالا برای اندازه‌گیری گزینشی و حساس هیدروژن پراکسید در نمونه‌های غذایی طراحی شد. اندازه‌گیری‌ها با بهره‌گیری از ۳,۳'،۵,۵'-تترامتیل بنزیدین به عنوان کاوشگر تجزیه‌ای و سوبسترای پراکسیدازی انجام پذیرفت. اساس اندازه‌گیری بر کاوش اسپکتروفتومتری محصول اکسیداسیون سوبسترا با هیدروژن پراکسید در حضور نانوزیم و اندازه‌گیری جذب محصول تولیده شده (آبی رنگ) در ۶۵۸ نانومتر استوار است. پارامترهای مؤثر بر حساسیت اندازه‌گیری شامل، مقدار نانوزیم، زمان، نوع و غلظت بافر، pH و غلظت سوبسترا بهینه شدند. در شرایط بهینه، محدوده‌ی اندازه‌گیری خطی بین ۸۰-۱ میکرومولار و حد تشخیص بسیار پایین ۰/۱۲ میکرومولار بدست آمد. همچنین اندازه‌گیری گزینش‌پذیری روش نشان داد که به صورت بسیار گزینش‌پذیر فقط در حضور هیدروژن پراکسید جذب در ۶۵۸ نانومتر افزایش می‌یابد و پاسخ تجزیه‌ای مشاهده می‌شود. بنابراین، روش طراحی شده برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید در شیر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش طراحی‌شده با دقت و صحت بالایی قادر به اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید موجود در شیر می‌باشد. امید است، نتایج این پژوهش بتوانند در راستی‌آزمایی سلامت مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

مراجع

1. A.R. Hormozi Jangi, M.R. Hormozi Jangi, S.R. Hormozi Jangi, Chin. J. Chem. Eng. 28, 1492 (2020).

2. B. Wang, P. Ju, D. Zhang, X. Han, L. Zheng, X. Yin, C. Sun, Microchim. Acta 183, 3025 (2016).

3. X. Liu, Q. Wang, Y. Zhang, L. Zhang, Y. Sub, Y. Lv, New J. Chem 37, 2174 (2013).

4. L.Z. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J.B. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T.H. Wang, J. Feng, D. L. Yang, S. Perrett, X. Yan, Nat. Nanotechnol. 2, 577 (2007).

5. J. Mu, L. Zhang, M. Zhao, Y. Wang, J. Mol. Catal. A Chem. 378, 30 (2013).

6. L.L. Wu, L.Y. Wang, Z.J. Xie, N. Pan, C.F. Peng, Sens. Actuators B Chem. 235, 110 (2016).

7. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Microchem. J. 158, 105328 (2020).

8. M. Akhond, S.R. Hormozi Jangi, S. Barzegar, G. Absalan, Chem. Pap., 74, 1321 (2020).

9. B. Wang, P. Ju, D. Zhang, X. Han, L. Zheng, X. Yin, C. Sun, Microch. Acta 183, 3025 (2016).

10. M.X. Guo, Y.F. Li, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. 207, 236 (2019).

11. Y. Zhu, Z. Zhang, X. Song, Y. Bu. J. Mater. Chem. B, 9, 3533 (2021).

12. P.C. Kuo, C.W. Lien, J.Y. Mao, B. Unnikrishnan, H.T. Chang, H.J. Lin, C.C. Huang, Anal. Chim. Acta 1009, 89 (2018).

13. M. Rahimi-Nasrabadi, M. Hosseini, A.H. Keihan, M.R. Ganjali, Curr. Pharm. Anal. 15, 224 (2019).

14. S.R. Hormozi Jangi, H. Khoshalhan Davoudli, Y. Delshad, M.R. Hormozi Jangi, A.R. Hormozi Jangi, Surf. Interfaces 21, 100771 (2020).

15. B. Ahmadi-Leilakouhi, S.R. Hormozi Jangi, A. Khorshidi, Chem. Pap. 77, 1033 (2023).

16. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, G. Absalan, Anal. Chim Acta 1127, 1 (2020).

17. X. Zhang, X. Bi, W. Di, W. Qin, Sens. Actuators B 231, 714 (2016).

18. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, G. Absalan, Microchim. Acta 187, 431 (2020).

19. Y. Ezhdehakosh Abolverdi, F. Honarasa, Chem. Res. Nano., 1, 30 (2022).

20. H. Jiang, Z. Chen, H. Cao, Y. Huang, Analyst 137, 5560 (2012).

21. A. Üzer, S. Durmazel, E. Erçağ, R. Apak, Sens. Actuators B: Chem., 247, 98 (2017).

22. V. Doan, V. Nguyen, A. Nguyen, T. Nguyen, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol., 268, 120709 (2022).

23. B. Zhu, D. An, Z. Bi, W. Liu, W. Shan, Y. Li, G. Ni, Chem. Electro. Chem. 9, e202200050 (2022).

24. X. Geng, R. Xue, F. Liang, Y. Liu, Y. Wang, J. Li, Z. Huang, Talanta, 259, 124565 (2023).

25. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, J. Chem. Sci., 132, 110 (2020).

26. S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Process Biochem. 105, 79 (2021).

27. S. Uzunboy, A.N. Avan, S. Demirci-Çekiç, R. Apak. Microchem. J. 178, 107335 (2022).

Chemical Research & Nanomaterials(CRN)
crn.shiraz.iau.ir
پژوهش های شیمیایی و نانومواد

Spectrophotometric quantification of hydrogen peroxide utilizing silver nanozyme

S. R. Hormozi Jangi*, Z. Dehghani

Hormozi Laboratory of Chemistry and Biochemistry, postal code: 9861334367, Zabol, Iran

Abstract: In this contribution, an analytical method was developed utilizing silver nanozymes as inexpensive and high throughput nanomaterials with high peroxidase-like activity for the selective quantification of hydrogen peroxide in food samples. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was utilized as peroxidase substrate to produce the blue-colored analytical probe. The method was constructed based on the spectrophotometric probing the oxidation product of TMB by hydrogen peroxide in the presence of silver nanozyme as catalyst and the absorbance of the blue-colored oxidation product at 658 nm was used as analytical signal. The effective parameters on the method sensitivity including nanozyme amount, incubation time, buffer type and concentration, pH, and substrate concentration were optimized. In optimal experimental conditions, a linear dynamic range of 1-80 μM and detection limit as low as 0.12 μM were obtained. Besides, the selectivity studies revealed that the absorbance at 658 nm was increased in the presence of hydrogen peroxide while other co-existing species cannot proceed the oxidation process. Finally, the designed method was applied to quantify hydrogen peroxide of milk samples, revealing highly accurate results. The results of this research can be potentially utilized for food safety verification in food industries.

Keywords: Nanozyme, Hydrogen peroxide, Peroxidase-like activity

*Corresponding Author Email: *saeedrezahormozi@gmail.com*