

## اندازه‌گیری متانفرین توسط روش پاسخ سطح با استفاده از پیک فرابنفش - مرئی

## رزونانس جذب سطحی مربوط به نانوذرات نقره

احسان ستوده، داریوش الماسی فر\*، جعفر برومند پیروز

گروه شیمی، واحد ماهشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، ماهشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۰۹

تاریخ تصحیح: ۹۹/۰۹/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۶

## چکیده

یک روش اسپکتروفتومتری ساده و ارزان بر مبنای پیک تشدید پلاسمون نانوذرات نقره برای اندازه‌گیری داروی متانفرین (MN) پیشنهاد شد. این روش بر اساس استفاده از خاصیت احیاء‌کنندگی ترکیب متانفرین بوده و مشخص گردید که این ترکیب، یون‌های نقره را در حضور یک ماده‌ی پایدارکننده به نام پلی‌ویدون (PVP) احیاء می‌کند. در این شرایط نانوذرات نقره تشکیل شده، پیک رزونانس پلاسمون سطحی در طول موج ۴۲۳ نانومتر نشان می‌دهد. نانوذرات حاصله از طریق میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی و تخمین زده شد که اندازه نانوذرات حداکثر ۲۰۰ نانومتر می‌باشد. بعلاوه مشخص گردید که مقدار جذب محلول به غلظت متانفرین بستگی داشته و بیشینه‌ی جذب محلول در حضور نقره نیترات با غلظت  $1/53 \text{ mM}$ ؛ سدیم هیدروکسید با غلظت  $4/10 \text{ mM}$ ؛ محلول آمونیاک با غلظت  $2/51 \text{ Mm}$  و  $1/15 \text{ ml}$  پلی‌ویدون مشاهده گردید. همچنین، روش ارائه شده رابطه‌ی خطی خوبی را در گستره‌ی بین  $5\text{-}20 \mu\text{M}$  نسبت به غلظت متانفرین نشان داده و حد تشخیص روش برای متانفرین برابر  $0/6 \mu\text{M}$  می‌باشد. نهایتاً، این روش برای اندازه‌گیری متانفرین در نمونه‌های واقعی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج مطلوب و قابل قبولی حاصل شد.

کلمات کلیدی: متانفرین، نانوذرات نقره، رزونانس پلاسمون سطحی.

## ۱- مقدمه

ابداع و توسعه‌ی سنسورهای انتخابی و حساس بر پایه‌ی رنگ بسیار مورد توجه محققین بوده و دارای کاربرد زیادی در علم شیمی تجزیه می‌باشد زیرا این سنسورها دارای ویژگی‌هایی نظیر سادگی، پاسخ‌دهی سریع، دقت بالا و در دسترس بودن آن‌ها می‌باشند [۱]. طیف سنجی رزونانس پلاسمون سطحی موضعی نوعی روش غیر مستقیم اما دقیق برای تشخیص مولکولهای شیمیایی و بیولوژیکی بوده و در این روش مقدار جذب پلاسمون سطحی نانوذرات فلزی اندازه‌گیری می‌شود. در فیزیک و در فلزات، پلاسمون‌ها بصورت نوسانات جمعی بارهای الکترونیک نسبت به هسته‌های خود بار مثبت تعریف می‌شوند. به طور کلی، پلاسمون‌های سطحی به آن دسته از پلاسمون‌ها اطلاق می‌گردد که به سطح محصور شده و به شدت با پرتوهای نور ورودی به سطح فلز واکنش می‌کنند. در نتیجه‌ی این عمل نورهای با فرکانس کمتر از فرکانس پلاسمون سطحی برگشت داده می‌شود زیرا که الکترونهای موجود در سطح فلز همانند سدی جلوی میدان الکتریکی نور را می‌گیرند.

در اغلب فلزات فرکانس پلاسمون سطحی در ناحیه فرابنفش واقع است اما برای فلزاتی مانند مس، نقره و طلا انتقالات الکترونی در محدوده نور مرئی دیده شده و در نتیجه به دلیل ایجاد رنگ واضح تر در محلول، کاربرد مناسب تری را فراهم می‌سازد [۲]. مطالعات دقیق نشان می‌دهد که وجود یک عامل

شیمیایی (آنالیت) می‌تواند خواص دی‌الکتریک یک محیط و در نتیجه، شدت رزونانس پلاسمون سطحی تغییر دهد. بنابراین امروزه رزونانس پلاسمون سطحی موضعی به عنوان تکنیکی برای پیشرفت گسترده‌ی علم بکار رفته و بستر مناسبی را برای تکنولوژی امروزه فراهم نموده است.

امروزه نانوذرات فلزی نجیب به طور گسترده‌ای در زمینه‌های گوناگونی نظیر مواد نیمه‌رسانا [۳] و فوتوکاتالیزوری [۴]، کاتالیزورها [۵]، انتقال دارو [۶]، تصویربرداری بیولوژیکی [۷] و سنسورهای زیستی [۸] استفاده می‌شوند. ضمن آنکه، آن دسته از خواص این نانوذرات که باعث تشدید پلاسمون سطحی متمرکز شده و منجر به جذب و نشر نور می‌شوند، می‌توانند در توسعه‌ی روش‌های آنالیزی نظیر سنسورهای نوری، هیبریداسیون و تشخیص DNA مورد استفاده قرار گیرند. بررسی‌های دقیق نشان می‌دهد که تکنیک تشدید پلاسمون سطحی باعث ایجاد جذب انتخابی با ضریب جذب مولی بسیار بالا شده که نتیجه‌ی آن ایجاد نوسان و جنبش ابر الکترونی در سطح نانوذرات بواسطه‌ی جذب انرژی در طول موج معین از تابش الکترومغناطیس می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که در واقع رزونانس پلاسمون سطحی یک نوسان گر الکترومغناطیسی است که توسط فوتون‌ها هدایت می‌شود. علاوه بر آن در این تکنیک فوتون‌ها به ذرات کوچکتر از طول موج متصل شده و الکترون‌ها به صورت موضعی (متمرکز) در اطراف نانوذرات نوسان می‌کنند. داروی متانفرین از نظر ساختاری یکی از مشتقات متیلاسیون هورمون‌های کاتچولامین اپی‌نفرین بوده و طی یک فرآیند متابولیسم پیچیده از طریق این هورمون ایجاد می‌شود. علاوه بر آن، این ترکیب دارویی در تومورهای فئوکروموسیتوما و از طریق سلول‌های کروماتین تولید شده که عمده‌ی این ترکیب به غدد فوق کلیوی منتقل می‌شود [۹].

در این تحقیق یک روش جدید و ساده با حساسیت بالا برای اندازه گیری متانفرین پیشنهاد شده است. این روش براساس واکنش متانفرین با یون نقره (به عنوان اکسیدانت) و تولید نانوذرات نقره (AgNPs) در شرایط کمی بوده و حداکثر جذب مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی موضعی مربوط به نانو ذرات نقره در طول موج ۴۲۳ نانومتر مشاهده گردید. همچنین مشخص شد که با افزایش غلظت متانفرین، شدت جذب محلول افزایش یافته و رابطه‌ی خطی بین شدت جذب محلول و غلظت متانفرین وجود دارد. نهایتاً روش ارائه شده برای اندازه گیری متانفرین در نمونه‌های حقیقی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج رضایت‌بخشی بدست آمد.

## ۲- بخش تجربی

## ۲-۱- مواد شیمیایی

داروهای متانفرین، اپی نفرین و فنیل آفرین و واکنشگرهای نقره نیترات، نشاسته، پلی ویدون، بتا-سیکلودکسترین، آمونیاک و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک (آلمان) یا BDH (و با درجه تجزیه‌ای) خریداری شده و بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های مادر ترکیبات نیترات نقره، سود سوزآور، آمونیاک ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) و محلول متانفرین ( $1000 \mu\text{M}$ ) از انحلال وزن مناسب و دقیقی از این مواد در آب دوبار تقطیر، تهیه شد. محلول نشاسته، محلول پلی ویدون و محلول بتا-سیکلودکسترین (با غلظت  $0.2\% \text{ W/V}$ ) از طریق حل کردن  $0.2$  گرم از این مواد شیمیایی در  $100$  میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده تهیه و در همهی آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

## ۲-۲- دستگاهها

اسپکتروفوتومتر فرابنفش- مرئی دو پرتویی مجهز به سل ۱ سانتی متری (پرکین المر- لامبدا ۳۵، آمریکا) برای سنجش‌های اسپکتروفوتومتری استفاده گردید. یک pH سنج (سوئیس، WTW model-7110)، ترازوی سارتریوس ( $\pm 0.001$ ) و میکروسکوپ الکترونی عبوری Zeiss Inc-80 KW (آلمان) برای آنالیز نانوذرات نقره تولید شده مورد استفاده قرار گرفت.

## ۲-۳- روش کار

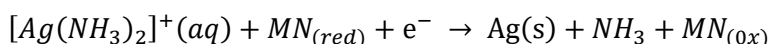
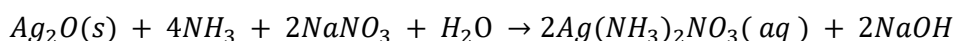
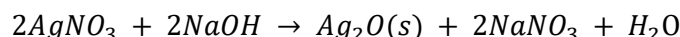
مقادیر مختلفی از محلول متانفرین،  $7/65 \text{ mL}$  میلی لیتر نقره نیترات (غلظت  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ )،  $20/5 \text{ mL}$  محلول سدیم هیدروکسید (غلظت  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ )،  $12/55 \text{ mL}$  محلول آمونیاک (غلظت  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) و  $1/15 \text{ mL}$  از محلول PVP (با غلظت  $0.2\% \text{ W/V}$ ) به ترتیب در یک بالن ژوژه‌ی  $50$  میلی لیتری اضافه و با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم رسانده شد. سپس، محلول مورد نظر بعد از  $7$  دقیقه به یک سل منتقل و جذب آن در طول موج پلاسمون نانوذرات نقره ( $423$  نانومتر) اندازه گیری و با محلول شاهد، مقایسه گردید که تغییرات رنگ محلول در حضور غلظت‌های گوناگونی از متانفرین در شکل ۱ دیده می‌شود.



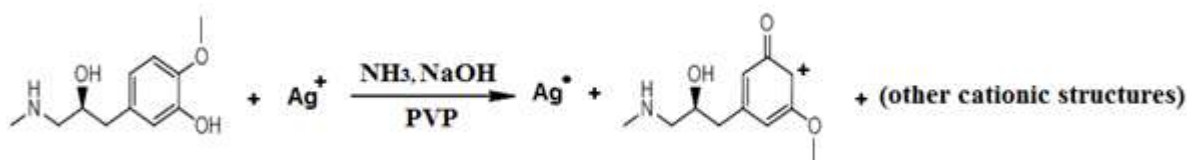
شکل (۱): تغییرات رنگی مربوط به محلول نانوذرات نقره در حضور غلظت‌های گوناگونی از متانفرین (غلظت متانفرین به ترتیب از چپ به راست  $10$ ،  $12/5$ ،  $15$ ،  $17/5$  و  $20 \mu\text{M}$  می‌باشند)

## ۴-۲- مکانیزم تشکیل نانوذرات نقره

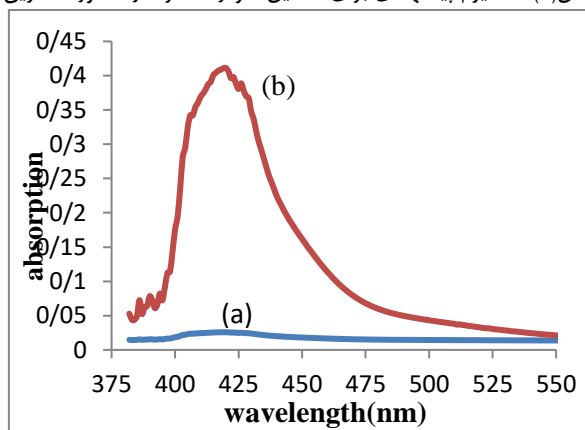
مکانیزم تشکیل نانوذرات نقره در شکل ۲ ارائه شده است. لازم به ذکر است که جذب نانوذرات نقره در حضور سایر واکنشگرها بدون وجود متانفرین در طول موج ۴۲۳ نانومتر قابل مشاهده نبوده (شکل ۳-ا) و با افزودن این ماده پیک جذب در این طول موج ظاهر گردید که بیانگر تشکیل نانوذرات نقره است (شکل ۳-ب). مکانیزم احتمالی سنتز این نانوذرات در روابط زیر مطرح و شکل ۳، طیف جذب فرابنفش- مرئی نانوذرات نقره را نشان می‌دهد که در اثر واکنش یون‌های نقره با متانفرین حاصل شده است.



در این واکنش‌ها،  $MN_{(red)}$  فرم احیای مولکول متانفرین (متانفرین در محیط قلیایی) بوده و  $MN_{(ox)}$  فرم اکسید شده‌ی این ترکیب پس از فرآیند ردوکس می‌باشد [۱۰].



شکل (۲): مکانیزم پیشنهادی برای تشکیل نانوذرات نقره در حضور متانفرین



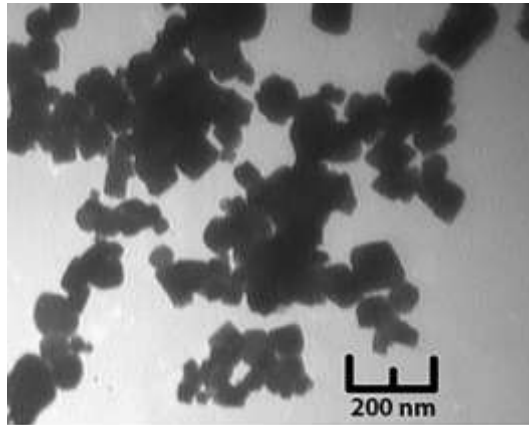
شکل (۳): طیف جذبی UV-Vis مربوط به نانوذرات نقره‌ی حاصل از احیای یون نقره (a) در غیاب متانفرین و (b) در حضور متانفرین ( $20 \mu M$ )

چنانچه گفته شد، متانفرین و کمپلکس  $[Ag(NH_3)_2]^+$  واکنشگرهای بازی بوده و محصول آن‌ها، نانوذرات نقره می‌باشد. تصاویر به‌دست آمده از نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری در شکل ۴ نشان داده است و این تصاویر نشان می‌دهند که اندازه ذرات حداکثر تا ۲۰۰ نانومتر می‌باشد.

## ۵-۲- طراحی آزمایش

روش طراحی آزمایش شامل مطالعه تاثیر عوامل مختلف در یک فرایند می‌باشد. این تکنیک از تحلیل‌های آماری برای حذف اثرات عوامل کنترل نشده استفاده نموده و پاسخ آن شامل معادله‌های چند متغیر است که در آن اثر عوامل و متغیرهای متقابل

ناخواسته حداقل می باشد. معمولاً از چند روش طراحی آزمایش نظیر طرح تک عاملی، روش پاسخ سطح و طرح فاکتوریل دو سطحی، برای مطالعه تأثیر همزمان عوامل موثر بر یک فرآیند استفاده شده که در این پژوهش روش پاسخ سطح مورد مطالعه قرار گرفته است. چنانچه گفته شد متغیرهای اصلی نظیر غلظت اولیه نیترات نقره، غلظت سود، غلظت آمونیاک و حجم اولیه



شکل (۴): تصاویر گرفته شده از نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ TEM<sup>۱</sup>

پلی و بدون پارامترهای موثر بر تولید نانوذرات نقره بوده و هدف به کارگیری تکنیک طراحی آزمایش، بهینه سازی این پارامترها برای حصول به حداکثر جذب رزونانس پلاسمون حاصل از ذرات نقره در محلول می باشد. نهایتاً با توجه به تعداد متغیرها، تکنیک طراحی آزمایش در پنج سطح مختلف از عوامل موثر بر واکنش طراحی و مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱).

جدول (۱): محدوده‌ی آزمایشی / تجربی متغیرهای مستقل مربوط به جذب نانوذرات نقره

متغیرهای مستقل	$-\alpha$	-۱	۰	۱	$\alpha$
غلظت $AgNO_3$ (mM)	۱/۴	۱/۶	۱/۸	۲/۰	۲/۲
غلظت NaOH (mM)	۳/۰	۳/۵	۴/۰	۴/۵	۵/۰
غلظت $NH_3$ (mM)	۱/۰	۱/۵	۲/۰	۲/۵	۳/۰
حجم PVP (ml)	۰/۹	۱/۰	۱/۱	۱/۲	۱/۳

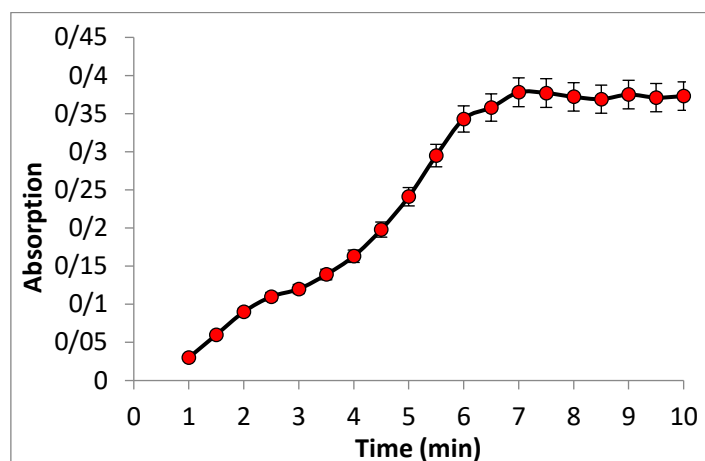
### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱ بهینه‌سازی مدت زمان انجام روش

با توجه به آنکه فرآیند تولید نانوذرات نقره فرآیندی تدریجی است بنابراین در آغاز واکنش، جذب محلول به آرامی افزایش یافته و پس از مدت زمان معین به بیشترین مقدار خود رسیده و ثابت می‌شود. بنابراین برای اندازه‌گیری مدت زمان بهینه واکنش، ۱/۰ میلی‌لیتر از متانفرین (۱۰۰۰  $\mu$ M)، ۷/۶۵ mL میلی‌لیتر نقره نیترات (غلظت  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ، ۰/۰۱)، ۲۰/۵ mL محلول سدیم هیدروکسید (غلظت  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ، ۰/۰۱)، ۱۲/۵۵ mL محلول آمونیاک (غلظت  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ، ۰/۰۱) و ۱/۱۵ mL از محلول PVP (با غلظت ۰/۲ % W/V) به ترتیب در یک بالن ۵۰ میلی لیتری افزوده و با آب دوبار تقطیر رقیق گردید. سپس، در مدت زمان‌های مختلف

<sup>۱</sup> Transmission electron microscopy

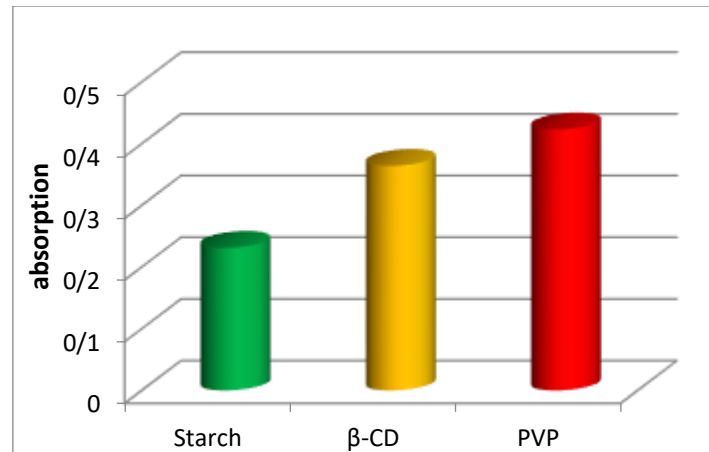
(بین ۱ الی ۱۰ دقیقه) اجازه داده شد این مواد با هم واکنش دهند و پس از طی زمان مورد نظر، جذب آن در طول موج ۴۲۳ نانومتر اندازه گیری شد. شکل ۵، تغییر جذب محلول را در زمانهای مختلف نشان می دهد و بر اساس شکل، بیشینه جذب محلول پس از ۷ دقیقه به دست آمده و این مدت زمان به عنوان زمان بهینه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.



شکل (۵): نمودار تأثیر مدت زمان واکنش روی جذب محلول (شرایط: متانفرین  $20 \mu\text{M}$ ، نقره نیترات  $1/53 \text{ mM}$ ؛ سدیم هیدروکسید  $4/10 \text{ mM}$ ؛ محلول آمونیاک  $2/51 \text{ mM}$ ؛  $1/15$  میلی لیتر  $0/2 \text{ \% W/V}$  PVP)

## ۲-۳ انتخاب مواد پایدار کننده

زمانی که نانوذرات تشکیل می شوند آن‌ها به تدریج در حلال رشد کرده و گسترش می یابند، از این رو لازم است با استفاده از واکنشگرها و مواد پایدار کننده از تجمع نانوذرات نقره جلوگیری شود بنابراین در این آزمایشات سه ترکیب نشاسته، پلی ویدون (PVP) و بتا سیکلودکسترین ( $\beta\text{-CD}$ ) به عنوان مواد پایدارکننده غیرسمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نتیجه، برای بررسی تأثیر این مواد پایدارساز، مقدار ۱ میلی لیتر از داروی متانفرین ( $1000 \mu\text{M}$ )،  $7/65 \text{ mL}$  میلی لیتر محلول نقره نیترات (با غلظت  $1 \text{ mol L}^{-1}$ )،  $20/5 \text{ mL}$  محلول سدیم هیدروکسید (غلظت  $1 \text{ mol L}^{-1}$ )،  $12/55 \text{ mL}$  آمونیاک (غلظت  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) و  $1/15 \text{ mL}$  از محلول های نشاسته، پلی ویدون و بتا سیکلودکسترین (با غلظت  $0/2 \text{ \% W/V}$ ) به ترتیب به یک بالن ژوژه ی  $50$  میلی لیتری منتقل شده و محلول حاصل شده با آب دو بار تقطیر رقیق گردید و نهایتاً، جذب نانوذرات نقره پس از ۷ دقیقه اندازه گیری شد. شکل ۶ اثر این سه ماده پایدارکننده را نشان داده و همانطور که مشاهده می گردد، محلول حاوی پلی ویدون جذب بیشتری را نشان داده و در نتیجه این ترکیب به عنوان ماده پایدارکننده در آزمایش های بعدی استفاده گردید.



شکل (۶): نمودار تأثیر مواد پایدار کننده روی جذب محلول (شرایط: متانفرین  $20 \mu\text{M}$ ، نقره نیترات  $1/53 \text{ mM}$ ؛ سدیم هیدروکسید  $4/10 \text{ mM}$ ؛ محلول آمونیاک  $2/51 \text{ mM}$ ؛  $1/15$  میلی لیتر پایدار کننده ( $0/2 \% \text{ W/V}$ )؛ مدت زمان: ۷ دقیقه)

### ۳-۳ بهینه‌سازی واکنش‌های شیمیایی موثر بر فرآیند

با توجه به فرآیند مورد مطالعه، عوامل موثر بر میزان جذب، غلظت اولیه نیترات نقره، سدیم هیدروکسید، آمونیاک و حجم اولیه پلی‌ویدون (با غلظت  $0/2 \% \text{ W/V}$ ) می‌باشند. از این رو، پارامترهای فوق به عنوان متغیرهای مستقل انتخاب و مقدار جذب نانو ذرات نقره حاصل از برهم‌کنش این واکنشگرها با محلول  $20$  میکرومولار داروی متانفرین (پس از زمان ۷ دقیقه) به عنوان متغیر وابسته ارزیابی (جدول ۲) و نهایتاً مقادیر جذب به عنوان تابع پاسخ و به روش طراحی آزمایش گردید (شکل ۷).

### ۳-۴ ارزیابی عوامل مؤثر بر حذف به روش طراحی آزمایش

همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود بیشینه‌ی شدت جذب رزونانس پلاسمون نانو ذرات نقره حاصل از واکنش داروی متانفرین با واکنشگرهای موثر بر فرآیند در غلظت  $\text{AgNO}_3$  برابر با  $1/53 \text{ Mm}$ ، غلظت سدیم هیدروکسید برابر با  $4/10 \text{ Mm}$ ، غلظت آمونیاک برابر با  $2/51 \text{ Mm}$  و حجم پلی‌ویدون معادل  $1/15 \text{ mL}$  حاصل شده و این مقادیر برای مطالعه‌ی داروی متانفرین مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین نمودارهای تغییرات شدت جذب محلول نسبت به پارامترهای موثر بر فرآیند بصورت منحنی رسم شده که در شکل‌های ۸-الف الی ۸-ج نشان داده شده‌اند. این شکل‌ها تأثیر متقابل نسبی فاکتورهای اصلی نظیر غلظت نیترات نقره، سدیم هیدروکسید، آمونیاک و حجم پلی‌ویدون را نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل‌ها دیده می‌شود، سطوح پاسخ برهم‌کنش‌های متقابل بین همه‌ی پارامترها، سهمی شکل بوده و این مطلب بیانگر این واقعیت است که شدت جذب محلول متأثر از اثرات چندین پارامتر همزمان می‌باشد. نهایتاً، با بررسی نمودارها می‌توان به نتایج زیر رسید:

(۱) بررسی‌ها نشان می‌دهد که در محلول‌های قلیایی، یون‌های نقره می‌توانند طی واکنشی به نام واکنش آینه‌ای<sup>۲</sup>، رسوب کرده و وجود سدیم هیدروکسید می‌تواند به روند ترسیب یونهای نقره کمک کند. برای رفع این مشکل معمولاً همراه با سدیم

<sup>2</sup> mirror reaction

هیدروکسید از آمونیاک استفاده می شود زیرا این ترکیب یون نقره را به فرم کمپلکس درآورده و بنابراین مانع ترسیب یونهای نقره می گردد. از سوی دیگر، بالا رفتن مقدار آمونیاک محلول می تواند منجر به کاهش شدت جذب گردد زیرا در حضور مقدار اضافی از آمونیاک (به عنوان لیگاند) احیای ترکیب نقره سخت تر شده و داروی متانفرین نمی تواند به سادگی یونهای نقره احیاء نماید. شکل ۸-الف تغییرات شدت جذب محلول را بر حسب تغییرات غلظت آمونیاک نشان می دهد و همانگونه که در شکل دیده می شود، شدت جذب محلول ابتدا افزایش و سپس به مقدار حداکثر می رسد.

(۲) همانطور که ذکر شد تشکیل نانوذرات نقره فرآیندی تدریجی بوده و از ترکیب پلی ویدون برای رفع تجمع و انباشته شدن نانوذرات نقره استفاده شده است. بنابراین، حجم این ترکیب مهم به عنوان ماده پایدار کننده مورد بررسی قرار گرفت و همانطور که در شکل ۸-ب می بینیم گستره ی غلظتی وسیعی از پلی ویدون را می توان برای جلوگیری از انباشته شدن نانوذرات نقره استفاده نمود.

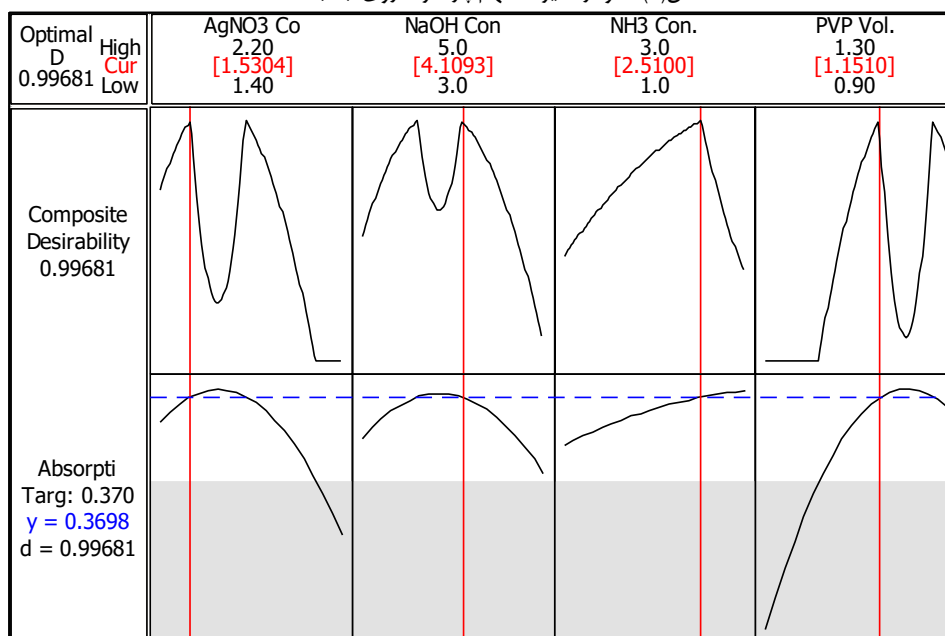
جدول (۲): ماتریس طرح کامپوزیت مرکزی فاکتوریل کامل مربوط به جذب MN

شماره آزمایش	غلظت $AgNO_3$ (mM)	غلظت NaOH (mM)	غلظت NH <sub>3</sub> (mM)	حجم PVP (ml)	جذب
۱	۱/۶	۴/۵	۲/۵	۱/۰	۰/۲۶۷
۲	۱/۸	۳/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۵۴
۳	۱/۶	۳/۵	۲/۵	۱/۰	۰/۳۳۵
۴	۲/۰	۳/۵	۱/۵	۱/۰	۰/۲۷۶
۵	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۵۱
۶	۱/۶	۳/۵	۱/۵	۱/۲	۰/۳۷۵
۷	۱/۶	۴/۵	۲/۵	۱/۲	۰/۳۶۴
۸	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۵۶
۹	۲/۰	۴/۵	۲/۵	۱/۰	۰/۱۷۳
۱۰	۲/۰	۴/۵	۱/۵	۱/۲	۰/۲۹۳
۱۱	۲/۰	۴/۵	۲/۵	۱/۲	۰/۳۱۰
۱۲	۱/۶	۴/۵	۱/۵	۱/۲	۰/۳۵۵
۱۳	۲/۰	۴/۵	۱/۵	۱/۰	۰/۱۴۲
۱۴	۲/۰	۳/۵	۲/۵	۱/۲	۰/۳۲۸
۱۵	۲/۲	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۲۷۳
۱۶	۱/۸	۴/۰	۳/۰	۱/۱	۰/۳۶۰
۱۷	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۳۱
۱۸	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۶۸
۱۹	۱/۶	۴/۵	۱/۵	۱/۰	۰/۱۹۸
۲۰	۱/۸	۵/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۲۴۱
۲۱	۱/۸	۴/۰	۱/۰	۱/۱	۰/۳۲۰
۲۲	۲/۰	۳/۵	۱/۵	۱/۲	۰/۳۲۷
۲۳	۱/۶	۳/۵	۲/۵	۱/۲	۰/۳۷۷
۲۴	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۰/۹	۰/۱۵۴
۲۵	۱/۶	۳/۵	۱/۵	۱/۰	۰/۳۱۸
۲۶	۲/۰	۳/۵	۲/۵	۱/۰	۰/۲۸۸
۲۷	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۴۵
۲۸	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۵۰

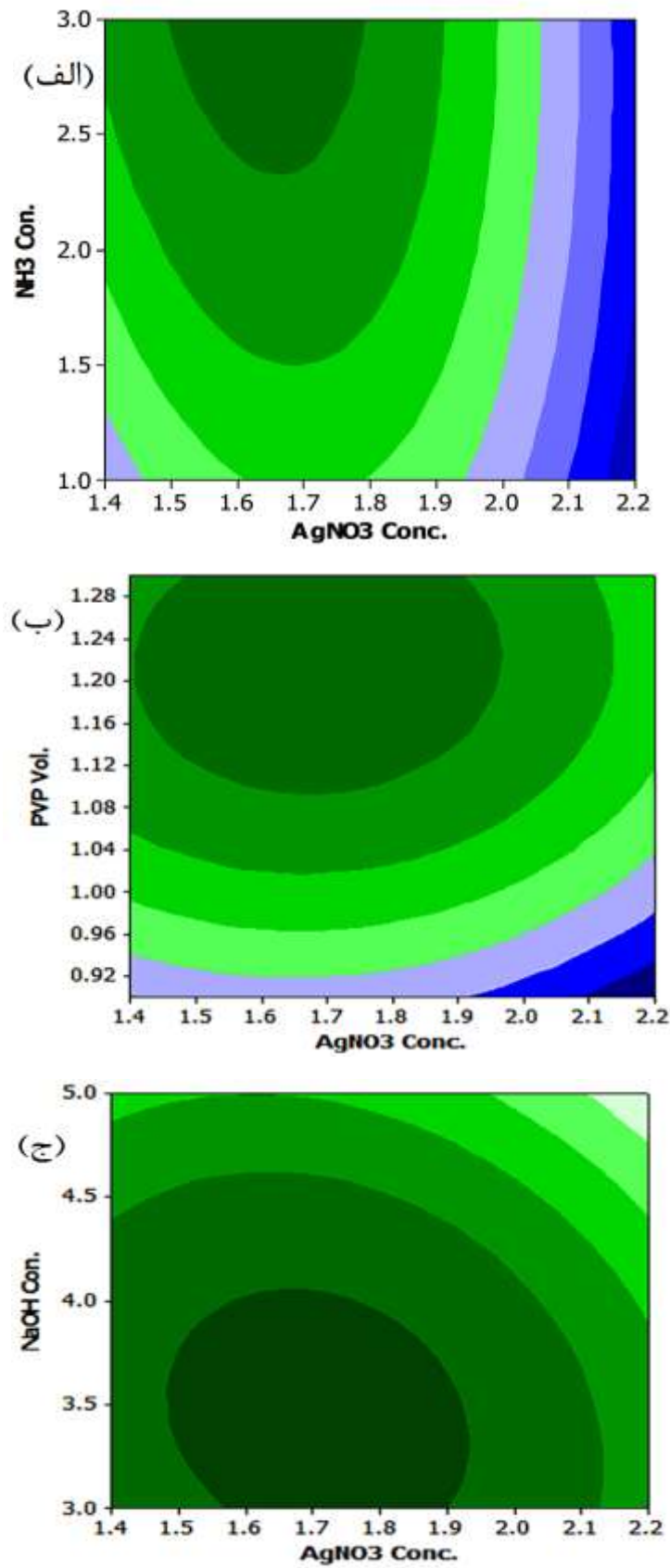


۲۹	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۳۳۶
۳۰	۱/۸	۴/۰	۲/۰	۱/۳	۰/۳۷۸
۳۱	۱/۴	۴/۰	۲/۰	۱/۱	۰/۲۹۴

شکل (۷): نمودار تأثیرات مهم پارامترها روی جذب MN



۳) با توجه به آنکه واکنش بین داروی متانفرین و  $AgNO_3$  یک واکنش اکسایش-کاهش بوده و در محیط بازی انجام می‌شود، بنابراین می‌توان گفت که ابتدا گروه‌های فنولی متانفرین در این شرایط یونیزه شده و به یک آنیون فنولی که عاملی اکسند است تبدیل می‌گردد. بنابراین، مقدار pH محلول بر چگونگی انجام این فرآیند مهم می‌باشد. شکل‌های ۸-ج اثر غلظت سدیم هیدروکسید را بر پیک شدت پیک پلاسمون مربوط به نانوذرات نقره نشان می‌دهد و همانطور که در این شکلها دیده می‌شود، جذب محلول ابتدا تا غلظت مشخصی از سدیم هیدروکسید افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد که این امر احتمالاً به دلیل رسوب کردن یونهای نقره بصورت  $Ag_2O$  می‌باشد.



شکل (۸): نمودار دوبعدی پاسخ سطح مربوط به اثر برهم کنش دو فاکتوری الف) غلظت اولیه ی آمونیاک و نیترات نقره، ب) حجم پلی ویدون و غلظت نیترات نقره و ج) غلظت اولیه سود و نیترات نقره بر جذب پلاسمون نانوذرات نقره حاصل از احیای داروی MN (غلظت  $20 \mu\text{M}$ )

## ۳-۵ تأثیر یون و داروهای مزاحم

تأثیر یون‌هایی رایج نظیر  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{ClO}_3^- \text{Na}^+$  و تعدادی از داروهای مختلف در شرایط بهینه‌ی اندازه‌گیری متانفرین مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۳). این نتایج نشان می‌دهند که وجود یونهای متداول در محلولهای آبی اثر تداخل ناچیزی بر اندازه‌گیری این دارو داشته، در حالیکه برخی داروهای نظیر اپی‌نفرین، فنیل‌آفرین، آتنولول، پروپرانولول، پیروکسیکام، استامینوفن، ویتامین ب ۶ و ویتامین ث اثر مزاحمت بالایی را نشان می‌دهد، بنابراین می‌توان گفت که این داروها در شناسایی و تعیین مقدار متانفرین دخالت داشته و نسبت به متانفرین مزاحم محسوب می‌شوند.

جدول (۳): تأثیر یون‌های مداخله‌گر در شناسایی متانفرین و تعیین مقدار آن (شرایط: متانفرین  $20 \mu\text{M}$ ، نقره نیترات  $1/53 \text{ mM}$ ؛ سدیم هیدروکسید  $4/10 \text{ mM}$ ؛ محلول آمونیاک  $2/51 \text{ mM}$ ؛  $1/15$  میلی لیتر  $\text{PVP (W/V \% 0/2)}$ ؛ مدت زمان: ۷ دقیقه)

Ions or drugs	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Relative error (%)	Ions or drugs	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Relative error (%)
$\text{Na}^+$	۱۵۰	٪ +۲/۲۷	متفورمین	۳۰	٪ -۴/۱۱
$\text{K}^+$	۸۰	٪ +۲/۸۷	گایافنزین	۲۵	٪ -۳/۹۲
$\text{Mg}^{+2}$	۵۰	٪ +۲/۵۱	آتنولول	۱۵	٪ +۲۵/۷۳
$\text{Ca}^{+2}$	۴۰	٪ +۳/۰۹	پروپرانولول	۱۵	٪ +۱۸/۰۱
$\text{Cl}^-$	۲۰۰	٪ -۱/۰۹	پیروکسیکام	۱۰	٪ +۲۱/۴۳
$\text{NO}_3^-$	۲۰۰	٪ -۲/۴۵	استامینوفن	۱۰	٪ +۴۰/۵۵
$\text{ClO}_4^-$	۶۰	٪ -۲/۱۱	آملودیپین	۳۰	٪ -۳/۸۰
اپی‌نفرین	۵	٪ +۳۰/۱	اگزازپام	۲۰	٪ +۶/۸۹
فنیل‌آفرین	۵	٪ +۳۱/۶	کاپتوبریل	۴۰	٪ -۲/۱۶
ویتامین ب ۶	۱۰	٪ +۱۸/۹	ویتامین ث	۵	٪ +۴۱/۹

## ۳-۶ ارقام شایستگی

روش پیشنهادی، محدوده‌ی کالیبراسیون خطی بسیار خوبی را در بازه‌ی  $2/20-50 \mu\text{M}$  نسبت به داروی متانفرین با ضریب هم‌بستگی ( $R^2$ ) برابر با  $0/9955$  نشان داده و حد تشخیص روش برابر  $0/6 \mu\text{M}$ ، بر اساس رابطه‌ی  $3S_b/m$  (انحراف معیار سیگنال‌های شاهد و  $n =$  شیب نمودار کالیبراسیون) می‌باشد. ضمناً، انحراف معیار نسبی (RSD) مربوط به اندازه‌گیری داروی متانفرین با غلظت  $10$  میکرومولار و  $15$  میکرومولار برای ۶ آزمایش متوالی اندازه‌گیری و مقادیر به ترتیب  $1/76$ ٪ و  $1/97$ ٪ ( $n=6$ ) بدست آمد که این نتایج به طور خلاصه در جدول ۴ ارائه شده‌است.

جدول (۴): اعداد و ارقام نشان دهنده‌ی شایستگی روش پیشنهادی در این مطالعه برای شناسایی و تعیین مقدار MN.

ارقام شایستگی	مقادیر
انحراف استاندارد نسبی ( $n=6$ )	$10 \mu\text{M}$ ٪ $1/76$ $15 \mu\text{M}$ ٪ $1/97$
گستره‌ی خطی	$2/50 - 20 \mu\text{M}$
حد تشخیص	$0/6 \mu\text{M}$
معادله کالیبراسیون	$Y=0/0188X-0/0095$
$R^2$	$0/9955$

## ۳-۷ کاربرد روش در نمونه‌های واقعی

روش ارائه شده برای اندازه‌گیری داروی متانفرین در نمونه‌های پلاسما و ادرار مورد استفاده قرار گرفت. برای نمونه‌های پلاسما، ابتدا این نمونه‌ها از مرکز انتقال خون تهیه و قبل از استفاده، در یخچال نگهداری شدند. برای آماده‌سازی اولیه، ۲ میلی‌لیتر متانول به ۱/۵ میلی‌لیتر پلاسما اضافه شد تا به حذف پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها کمک کند. سپس، نمونه در همزن مکانیکی با دور ۱۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا بواسطه‌ی آن، پروتئین موجود در نمونه ته‌نشین گردد. در مرحله بعد محلول بالایی را جدا نموده، توسط آب دو بار تقطیر تا دو برابر رقیق گردید. برای آماده‌سازی نمونه‌های ادرار، ابتدا نمونه را با استفاده از آب دو بار تقطیر، تا حجم دو برابر رقیق و بلافاصله سانتریفیوژ شد.

برای اندازه‌گیری متانفرین، از روش افزایش استاندارد در نمونه‌های ادرار و پلاسما دو داوطلب، استفاده شد. تست‌های اولیه نشان داد که نمونه‌ها ادرار و پلاسما این دو داوطلب (نمونه‌های ۱ و ۲) فاقد متانفرین بوده و سپس، مقادیر مختلفی از محلول‌های استاندارد متانفرین به این نمونه‌ها اضافه گردید. نهایتاً، پس از افزایش مقادیر بهینه از واکنشگرهای نقره نیترات، سدیم هیدروکسید، آمونیاک و پلی‌ویدون و مدت زمان ۷ دقیقه، جذب محلول اندازه‌گیری شد. ارائه شده در جداول ۵ و ۶، نتیجه میانگین سه بار آزمایش بوده و مقادیر حاصله مؤید کارایی بالای روش اتخاذ شده می‌باشد.

## ۴- نتیجه گیری

روش ارائه شده، روشی ساده، سریع و کم‌هزینه با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتر بوده که در شرایط بهینه قادر است مقادیر ناچیز داروی متانفرین را اندازه‌گیری نماید. همچنین، این روش حد تشخیص پایینی داشته، نیاز به روش‌هایی نظیر پیش تغلیظ ندارد. ضمن آنکه روش مورد مطالعه تکرارپذیر بوده، حد تشخیص مناسب و محدوده‌ی دینامیکی خطی بسیار خوبی را در مقایسه با سایر روش‌های ارائه شده در اندازه‌گیری داروی متانفرین نشان می‌دهد.

جدول ۵- شناسایی مقادیر مختلفی از MN در نمونه‌های ادرار؛ روش افزایش استاندارد (شرایط: نقره نیترات ۱/۵۳ mM؛ سدیم هیدروکسید ۴/۱۰ mM؛ محلول آمونیاک ۲/۵۱ mM؛ ۱/۱۵ میلی‌لیتر PVP (۰/۲ % W/V)؛ مدت زمان: ۷ دقیقه)

نمونه	اضافه شده	اندازه‌گیری شده	% بازیافت
نمونه (۱)	۸ μM	۷/۸۳ μM (±۰/۱۴)	۹۷/۹%
	۱۲ μM	۱۱/۴۴ μM (±۰/۱۵)	۹۵/۳%
	۱۶ μM	۱۵/۴۷ μM (±۰/۱۳)	۹۶/۷%
	۲۰ μM	۱۸/۸۹ μM (±۰/۱۸)	۹۴/۵%
نمونه (۲)	۸ μM	۷/۶۵ μM (±۰/۱۳)	۹۵/۶%
	۱۲ μM	۱۱/۱۶ μM (±۰/۱۴)	۹۳/۰%
	۱۶ μM	۱۵/۶۱ μM (±۰/۱۱)	۹۷/۶%
	۲۰ μM	۱۸/۵۳ μM (±۰/۱۲)	۹۲/۹%

جدول ۶- شناسایی مقادیر مختلفی از MN در نمونه‌های سرم؛ روش افزایش استاندارد (شرایط: نقره نیترات  $1/53 \text{ mM}$ ؛ سدیم هیدروکسید  $4/10 \text{ mM}$ ؛ محلول آمونیاک  $2/51 \text{ mM}$ ؛  $1/15$  میلی لیتر PVP (W/V % ۰/۲)؛ مدت زمان: ۷ دقیقه)

نمونه	اضافه شده	اندازه‌گیری شده	٪ بازیافت
نمونه (۱)	$8 \mu\text{M}$	$7/78 \mu\text{M} (\pm 0/21)$	۹۷/۴٪
	$12 \mu\text{M}$	$11/45 \mu\text{M} (\pm 0/17)$	۹۵/۴٪
	$16 \mu\text{M}$	$15/28 \mu\text{M} (\pm 0/20)$	۹۵/۵٪
	$20 \mu\text{M}$	$18/94 \mu\text{M} (\pm 0/21)$	۹۴/۷٪
نمونه (۲)	$8 \mu\text{M}$	$7/60 \mu\text{M} (\pm 0/22)$	۹۵/۰٪
	$12 \mu\text{M}$	$11/30 \mu\text{M} (\pm 0/21)$	۹۴/۲٪
	$16 \mu\text{M}$	$15/51 \mu\text{M} (\pm 0/17)$	۹۶/۹٪
	$20 \mu\text{M}$	$18/73 \mu\text{M} (\pm 0/20)$	۹۳/۶٪

### ۵- تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان مقاله از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماهشهر صمیمانه تشکر می‌نمایند.

### ۶- منابع

- [1] M. Bahram, F. Hoseinzadeh, K. Farhadi, M. Saadat, P. Najafi-Moghaddam, A. Afkhami, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **441** (2014) 517.
- [2] J. Abolhasani, A. Samadi, E. Ghorbani-Kalhor, N. Serrpoush Hamid, *J. Of Applied Chemistry*, **29** (1392) 25, in Persian.
- [3] G. Garcia, R. Buonsanti, E.L. Runnerstrom, R.J. Mendelsberg, A. Llordes, A. Anders, T.J. Richardson, D.J. Milliron, *Nano letters* **11** (2011) 4415.
- [4] M. Irani, Z. Abdollahi, E. Sadaf Fateni, S. Mohebbi, *J. Of Applied Chemistry*, **56** (1399) 23, in Persian.
- [5] X. Yang, Q. Wang, K. Wang, W. Tan, H. Li, *Biosensors and Bioelectronics* **22** (2007) 1106.
- [6] E. Einafshar, A. Haghghi Asl, M. Ramezani, A. Hashemnia, A. Malekzade, *J. Of Applied Chemistry*, **51** (1398) 35, in Persian.
- [7] V. Gaudin, J. Fontaine, P. Maris, *Analytica Chimica Acta* **436** (2001) 191.
- [8] A. Olaru, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, H.Y. Aboul-Enein, *Critical reviews in analytical chemistry* **45** (2015) 97.
- [9] G. Liu, J. He, S. Dou, S. Gupta, J.-L. Vanderheyden, M. Rusckowski, D.J. Hnatowich, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **31** (2004) 417.
- [10] B. Zargar, A. Hatamie, *Analyst* **137** (2012) 5334.

