سنتز و بررسی نانو ذرات طلا در اندازه گیری داروها براساس ویژگی تجمع آن ها با استفاده از ابزارهای کمومتریکس

مؤلف :

سکینه علیزاده

شابک	:	۹۷۸-۶۰۰-۴۶۵-۷۰۹-۹
شماره کتابشناسی ملی	:	۵۳۵۳۰۱۵
عنوان و نام پدیدآور	:	سنتز و بررسی نانو ذرات طلا در اندازه‌گیری داروها براساس ویژگی تجمع آن ها با استفاده از ابزارهای کمومتریکس/ مولف سکینه علیزاده.
مشخصات نشر	:	تهران: انتشارات راه دکتری: گروه آموزشی مدرس،۱۳۹۷.
مشخصات ظاهری	:	۱۱۴ص.
موضوع	:	داروها -- تجزیه و آزمایش
موضوع	:	Drugs -- Analysis
موضوع	:	تجزیه دستگاهی
موضوع	:	Instrumental analysis
موضوع	:	نانوذرات
موضوع	:	Nanoparticles
موضوع	:	ترکیب‌های طلا
موضوع	:	Gold compounds
رده بندی دیویی	:	۱۹۰۱/۶۱۵
رده بندی کنگره	:	۱۳۹۷۱۸۹RS ۹س۸ع/
سرشناسه	:	علیزاده، سکینه، ۱۳۶۴-
وضعیت فهرست نویسی	:	فیپا

عنوان: سنتز و بررسی نانو ذرات طلا در اندازه‌گیری داروها براساس ویژگی تجمع آن ها با استفاده از ابزارهای کمومتریکس

مولف: سکینه علیزاده.

تیراژ : ۵۰۰ نسخه

ناشر: انتشارات راه دکتری: سنجش و دانش

نوبت چاپ: اول ۱۳۹۷

صفحه آرایی: مهتاب دوستی

طراح جلد: مهتاب دوستی

قیمت: ۱۸۰.۰۰۰ ریال

کلیه حقوق مادی و معنوی برای مولف محفوظ می باشد

www.rezomephd.ir

www.sanjesh.ir

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید. سپاس او را که هر چه دارم از اوست. به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم. خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده

اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

نانو فناوری ۱

پیشینه ی نانو فناوری ۳

کاربردهای نانو فناوری ۳

خواص نوری ٦

تجمع ۷

نانو بیو تکنولوژی ۷

اهمیت مقیاس نانو برای شرکت در آزمون می بایست وارد سیستم شوید ۸

تغییر رنگ : ۹

تغییر شفافیت : ۱۰

تغییر خواص مغناطیسی: ۱۰

تغییر واکنش پذیری: ۱۱

خواص نانوذرات ۱۲

افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم ۱۲

اثرات کوانتمی ۱۳

شاخه های فناوری نانو ۱۳

انوفناوری مرطوب: ۱٤

نانوفناوری خشک: ۱٤

نانوفناوری محاسبه ای: ۱٤

روش‌های شناسایی نانوذرات ۱۵

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ۱۵

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ۱٦

پراش اشعه ایکس (XRD) ۱۷

تاریخچه‌ی نانوذرات طلا ۱۷
کاربرد نانوذرات: ۱۸
نظریه مای و SURFACE PLASMON RESONANCE(SPR)، رزونانس پلاسمون سطحی ۱۹
روش‌های سنتز نانوذره‌ی طلا ۲۰
روش ترکویچ ۲۰
روش براست ۲۱
اصلاح نانوذرات طلا ۲۲
نانو ذرات طلا به عنوان پروب‌های کالریمتری ۲۲
سینتیک شیمیایی ۲۳
تجزیه سینتیکی ۲٤
پارامترهای ترمودینامیک و ماهیت انرژی آزاد نیروهای پیوندی، آنتروپی و آنتالپی ۲۵
مفهوم آرنیوس انرژی فعال سازی ۲۵
تئوری برخورد ۲٦
تئوری حالت گذار ۲٦
محدودیتهای ایده انرژی فعال سازی آرنیوس ۲۷
کمومتریکس ۳۰
آنالیز اجزای اصلی (PCA) ۳۱
انواع داده ها ۳۲
داده های مرتبه صفر ۳۲
داده های مرتبه یک ۳۳
داده های مرتبه دو ۳۳
داده های مرتبه سه ۳٤
رگرسیون کم‌ترین مربعات نسبی (رگرسیون PLS) ۳٤
طیف‌سنجی نوری (اسپکتروفتومتری) ۳٦
مقدمه ۳۹

بهینه سازی غلظت معرف اصلاح گر ۳۹
بهینه سازی غلظت NaCl ۴۰
بهینه سازی PH ۴۱
بهینه سازی زمان انکوبه شدن ۴۲
توسعه مدل PLS ۴۳
محدوده خطی منحنی‌های کالیبراسیون ۴۴
تعیین همزمان HEM و FA ۴۷
بررسی مزاحمت ۵۱
تجزیه نمونه حقیقی ۵۳
مقدمه ۵۶
بهینه سازی غلظت عامل اصلاح کننده ۵۶
بهینه سازی غلظت NaCl ۵۷
بهینه سازی PH ۵۸
بهینه سازی زمان انکوبه کردن ۵۹
توسعه مدل PLS ۶۰
محدوده خطی منحنی‌های کالیبراسیون ۶۲
تعیین همزمان $Hg22+$ و $Cd2+$ ۶۵
بررسی مزاحمت ۶۹
تجزیه نمونه حقیقی ۷۰
مقدمه ۷۳
بهینه سازی شرایط ۷۴
بهینه سازی غلظت NaCl ۷۴
بهینه سازیPH ۷۵
بهینه سازی زمان انکوبه شدن ۷۶
بهینه سازی دما ۷۶

توسعه مدل PLS ۷۷
اعتبارسنجی روش ۷۸
بررسی تعیین همزمان مورفین و ایبو بروفن ۸۱
بررسی اثر مزاحمت ۸٦
تجزیه نمونه حقیقی ۸۷
مقدمه ۹۰
بهینه سازی شرایط آزمایش ۹۰
بهینه سازی غلظت NaCl ۹۰
بهینه سازی PH ۹۱
بهینه سازی زمان انکوبه شدن ۹۲
توسعه مدل PLS ۹۳
اعتبارسنجی روش ۹٤
تعیین همزمان BET و NEP ۹۷
بررسی اثر مزاحمت ۱۰۳
تحلیل نمونه حقیقی ۱۰٤
منابع ۱۰٦

۱- مقدمه

نانو فناوری

نانو فناوری یک مجموعه از فناوری‌هاست که ویژگی مشترک آن‌ها داشتن یک بعد در مقیاس نانومتر است. منظور از مقیاس نانو ابعادی در حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد. ترتیب قرار گرفتن اتم‌ها در کنار هم، خواص ماده حاصل را تعیین می‌کند در فناوری نانو انسان دست در ساختار ماده برده و به هر نحو دلخواه اتم‌ها را کنار هم قرار می‌دهد.

این فناوری تمام علوم اعم از شیمی، فیزیک کوانتوم، بیوشیمی ،بیولوژیکی، پزشکی و ... را در بر می‌گیرد [۳]. ذرات نانومتری به عنوان مواد پیش سازنده برای تولید ساختارها و ادوات پیچیده به شمار می‌روند و استفاده از آن‌ها سبب بهبود و تغییر پدیده‌های فیزیکی- شیمیایی یا فرایندهای بیولوژیکی می‌گردد وباعث بروز خواص جدیدی می‌شود [٤]. فناوری نانو نقطه همگرایی علوم مختلف در آینده است. به عبارتی فناوری نانو یک علم جدید نیست بلکه یک رویکرد جدید در تمام علوم می‌باشد که زندگی اجتماعی انسان و توسعه همه جانبه آن وابستگی شدیدی به آن داشته و اغلب این وابستگی‌ها نتیجه اثرات مثبت و سازنده آن می‌باشد. نمونه‌هایی از این اثرات مثبت عبارتند از: کاهش مصرف مواد اولیه و هزینه‌های تولید، کاهش آلودگی‌های محیط زیست، طراحی وسایل و ابزارهای دقیق در مهندسی پزشکی، رساندن میزان مناسب دارو به سلول‌های بیمار و ... [۳,۵].

نانوذرات (NPs) کاربردهای گسترده ای در زمینه هایی مانند بهداشت، لوازم آرایشی، غذا و تغذیه، بهداشت محیط، مکانیک، اوپتیک، مراقبت های بیومدیکال، صنایع شیمیایی ، الکترونیک، صنایع فضایی، تحویل دارو – ژن ، علوم انرژی، اوپتوالکترونیک ، کاتالیزورها، ترانزیستورهای تک الکترونی، نشر کننده های نور، دستگاه های نوری غیر خطی و کاربردهای فتوالکتروشیمیایی دارد[٦].

پیشینه ی نانو فناوری

در طول تاریخ بشر از زمان یونان باستان، مردم و به‌خصوص دانشمندان آن دوره بر این باور بودند که مواد را می‌توان آنقدر به اجزاء کوچک تقسیم کرد تا به ذراتی رسید که خرد ناشدنی هستند و این ذرات بنیان مواد را تشکیل می‌دهند، شاید بتوان دموکریتوس فیلسوف یونانی را پدر فناوری و علوم نانو دانست چرا که در حدود ٤٠٠ سال قبل از میلاد مسیح او اولین کسی بود که واژۀ اتم را که به معنی تقسیم‌نشدنی در زبان یونانی است برای توصیف ذرات سازنده موادبه کار برد [۸و۷]. نقطه شروع و توسعه اولیه فناوری نانو به طور دقیق مشخص نیست. شاید بتوان گفت که اولین متخصصان نانو فناوری شیشه‌گران قرون وسطایی بوده‌اند که از قالب‌های قدیمی[۱] برای شکل‌دادن شیشه‌هایشان استفاده کرده‌اند. البته این شیشه‌گران نمی‌دانستند که چرا با اضافه‌کردن طلا به شیشه رنگ آن تغییر می‌کند [۹].

کاربردهای نانو فناوری

زمینه‌های کاربردی بالقوه نانو فناوری عبارتند از: الکترونیک، ارتباطات، برق، کامپیوتر، صنایع شیمیایی، داروسازی، بهداشت و محیط زیست، فناوری اطلاعات، بیوتکنولوژی، پزشکی و انرژی.

کاربردهای متنوع و وسیع دیگر از جمله تولید نانو حسگرها، غبارهای هوشمند، نانوحسگرهای گازی ، نانو غشاء ها، نانو پودرها، نانو تیوپ‌های جاذب گازهای سمی و ...می-باشند [۵].

برای مثال اثر شگفت انگیز نانوذرات بر رنگ از زمان های باستان که ذرات ریز فلزی برای رنگ کردن شیشه در پنجره های کلیساها استفاده می شد شناخته شده است. ذرات نقره شیشه را

---

[۱] Medieal forges

زرد می کرد در حالی که ذرات طلا برای تولید رنگ عقیق استفاده می شد. در اجرای آزمایشات توصیف شده در این جا دانش آموزان رنگ زرد روشن نانوذرات نقره را در مقایسه با محلول بی رنگ نقره نیترات و نقره فلزی مشاهده خواهند کرد[۱۰]. تعیین یک مجموعه بهینه از شرایط برای سنتز نانوذرات نقره در بخش های بعد توضیح داده شده است. روش ساده و راحت که از محلول های رقیق آبی استفاده می کند می تواند روی میز به راحتی انجام شود و نیازمند تجهیزات ساده مانند طیف سنج Spectronic-۲۰ و صفحه همزن مغناطیسی است. واکنش شیمیایی ، احیای سدیم بوروهیدرید نقره نیترات است[۱۰,۱۱]:

(۱-۱

$$AgNO_3 + NaBH_4 \rightarrow Ag + \frac{1}{2}H_2 + \frac{1}{2}B_2H_6 + NaNO_3$$

این روش نانوذراتی به ابعاد $۱۲ \pm ۲nm$ تولید می کند. جذب پلاسمون نزدیک به ۴۰۰nm و پهنای پیک در نصف حداکثر[۱] $۵۰ - ۷۰nm(PWHM)$ است . نحوه انجام آزمایش با جزئیات در پایین توصیف شده است که شامل استفاده از میکروسکوپی عبور الکترون[۲] (TEM) برای یافتن اندازه ذراتی است که با طیف مرئی محصول انطباق دارند(بسته به دسترسی دستگاه، مواد TEM می توانند در یک آزمایش برای دروس سطح بالاتر تعمیم یابند)[۱۲].

ارتباط بین تجمع و خواص نوری به همراه روش حفاظت از ذرات با استفاده از پلی وینیل پیرولیدون تعیین شد. در طراحی یک آزمایش شامل سنتز نانوذرات فلزات نجیب برای یک کلاس شیمی عمومی چندجلسه ای ، هزینه یک مشکل اساسی بود. چون هیدروژن تتراکلرواورات (III) تری هیدرات، $HAUCl_4.3H_2O$ استفاده شده در تهیه محلول کلوئیدی طلا حدود ۲۵ برابر

---

[۱] Peak width at half maximum $(PWHM)$

[۲] Transmission Electron Microscopy (TEM)

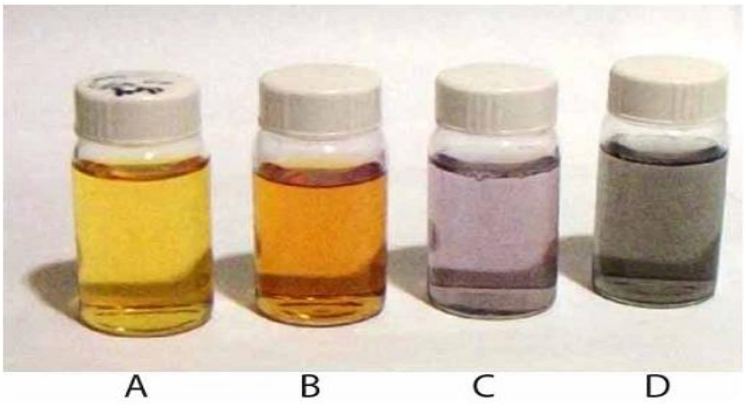
گرانتر از نقره نیترات ۲ است آزمایش انتخاب شده برای توسعه، سنتز و تحقیق نقره کلوئیدی بود. چندین روش احیای شیمیایی برای سنتز نانوذرات نقره از نمک های نقره استفاده شد[۱۳].

واکنش هایی که در این جا در نظر گرفته می شوند محدود به استفاده از نقره نیترات به عنوان ماده آغازین بودند.

انتخاب معرف احیا، مقادیر نسبی و غلظت های معرف ها، دما، مدت واکنش و قطر نانوذرات تولیدی متفاوت بود. تقریبا در تمامی آن ها محصولات نقره کلوئیدی به صورت کدر و زرد مایل به سبز یا قهوه ای بود. نقره کلوئیدی زرد با واکنش سدیم بوروهیدرید بسیار سرد گزارش شد و اساس روش استفاده شده در آزمایش بعد است. روش سنتز توسعه یافته برای این آزمایش یک کلوئید زرد نقره پایدار می سازد به شرطی که شرایط به خوبی کنترل شده باشند. نقره نیترات ($AgNO_3$ ٪۷۹۹) و سدیم بوروهیدرید ($NaBH_4$ ٪۹۹) از شرکت مواد شیمیایی آلدریچ خریداری شد. آب مقطر استفاده شد. شیشه ها با فرو بردن در KOH الکلی شسته شدند. مقدار مازاد سدیم بوروهیدرید برای احیای نقره یونی و پایدارسازی نانوذرات نقره لازم است[۱٤].

حجم ۱۰mL از نقره نیترات $1.0\ mmol\ L^{-1}$ به صورت قطره ای (۱ قطره در ثانیه) به ۳۰mL محلول سدیم بوروهیدرید $2.0\ mmol\ L^{-1}$ که در حمام یخ سرد شده بود اضافه شد. مخلوط واکنش به شدت در یک صفحه همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از افزایش ۲mL نقره نیترات ، محلول زرد کمرنگ شد و پس از افزایش کل نقره محلول زرد روشن تر شد (شکل -۱ A۱). کل افزایش تقریباً سه دقیقه طول کشید که پس از آن هم زدن متوقف شد و میله همزن برداشته شد[۱۵]. نقره کلوئیدی زرد شفاف سمت چپ شکل۱ در دمای اتاق پایدار است و در ظرف شفاف به مدت چند هفته یا چند ماه قابل نگهداری است. شرایط واکنش شامل زمان هم زدن و مقادیر نسبی معرف ها (تعداد مطلق مول های هر واکنشگر و مولاریته نسبی آن ها) باید به

خوبی کنترل شود تا نقره کلوئیدی زرد پایدار حاصل شود. اگر هم زدن ادامه یابد (پس از افزودن کل نقره) تجمع آغاز می یابد و محلول زرد ابتدا به زرد تیره (شکل ۱B-۱) و سپس بنفش (شکل ۱C-۱) و در نهایت خاکستری (شکل ۱D-۱) تبدیل می شود که پس از آن کلوئید تخریب شده ذرات رسوب می کنند. تجمع مشابه می تواند زمانی رخ دهد که واکنش قبل از افزودن کل نمک نقره مختل شود[۱۶].



شکل۱-۱. نقره کلوییدی در مراحل مختلف تجمع الف) زرد واضح ب) زرد تیره ج) بنفش د) خاکستری در جهت پیشرفت تجمع.

خواص نوری

رنگ های بارز طلا و نقره کلوئیدی به دلیل پدیده ای به نام جذب پلاسمون است. نور تابیده شده نوساناتی در الکترون های هدایت در سطح نانوذرات ایجاد کرده تابش الکترومغناطیس جذب می شود. طیف نقره کلوئیدی زرد شفاف است. برای تنظیم حداکثر جذب بین ۰.۵ و ۰.۷ ، محلول با آب مقطر رقیق شد. رزونانس پلاسمون پیکی در نزدیکی ٤۰۰nm با PWHM بین ۵۰-۷۰nm تولید می کند. طول موج حداکثر جذب پلاسمون در یک محلول می تواند برای نشان دادن اندازه ذره بکار رود. نانوذرات نقره که تولید می شوند ($\lambda_{max} = ٤۰۰nm$) با استفاده از

میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM) بررسی شدند. یک نمونه از نانوذرات نقره از محلول تازه تهیه شده زرد شفاف با خشک کردن یک قطره کوچک روی یک شبکه مس با پوشش کربنی با مش ۲۰۰ تهیه شد[۱۷].

تجمع[۱]

احتمال تجمع در زمان سنتز در بالا مطرح شد.جذب سطحی بوروهیدرید نقش کلیدی در پایدارسازی نانوذرات در حال رشد با ارائه بار سطحی دارد. باید بوروهیدرید کافی برای پایدارسازی ذرات با پیشرفت واکنش وجود داشته باشد. با این حال ، مقدار بیش از حد سدیم بوروهیدرید قدرت یونی کلی را افزایش داده تجمع را آغاز می کند. تجمع نیز می تواند با افزایش الکترولیت هایی مانند NaCl انجام گیرد. نانوذرات با نیروهای الکترواستاتیک دافعه بین ذرات به دلیل بوروهیدرید جذب سطحی شده معلق باقی می مانند. نمک از بارها محافظت کرده به ذرات اجازه می دهد تا با هم قفل شده کلوخه ها را تشکیل دهند. محلول نقره کلوئیدی به تدریج زرد تیره ، بنفش، و سپس خاکستری می شود[۱۸] (شکل ۱-۱).

نانو بیو تکنولوژی

نانوبیوتکنولوژی یک زمینه علمی با رشد سریع رد تولید دستگاه هاست. یک زمینه مهم تحقیقاتی در نانوبیوتکنولوژی سنتز NP های با ترکیب شیمیایی، اندازه و مورفولوژی متفاوت و پراکندگی کنترل شده است. نانوبیوتکنولوژی به عنوان یک بخش ابتدایی از نانوتکنولوژی مدرن و علوم مواد جدید مطرح شده است که به دلیل کاربردهای قدرتمندش توجه جهانی را به خود جلب کرده است. این یک روش چند نظامی است که از کاربرد تحقیقاتی NP ها در سیستم های

[۱] aggregation

زیستی از جمله نظام های زیست شناسی ، بیوشیمی، شیمی، مهندسی، فیزیک و پزشکی حاصل می شود[۱۹]. به علاوه نانوبیوتکنولوژی به عنوان یک تکنیک الزامی در توسعه رویه های تمیز، غیر سمی و دوستدار محیط زیست برای سنتز و تجمع NP های فلزی با قابلیت ذاتی احیای فلزات از طریق مسیرهای متابولیک ویژه عمل می کند[۲۰].

امروزه نیاز فزاینده ای به توسعه فرایندهای دوستدار محیط زیست وجود دارد که از مواد شیمیایی سمی در پروتکل های سنتز استفاده نمی کنند. سنتز سبز شامل پلی اوکسومتالاتهای با ظرفیت های مختلف، پلی ساکاریدها ، تولنز و روش های زیستی و تابشی است که مزایایی نسبت به روش های مرسوم با معرف های شیمیایی سمی برای محیط دارند. انتخاب محیط حلال و انتخاب عوامل کاهنده و پایدارکننده غیرسمی دوستدار محیط زیست مهم ترین مسائل هستند که باید در سنتز سبز NP ها در نظر گرفته شوند[۲۱].

NP های نقره به دلیل خواص منحصر به فرد مورد توجه هستند که می توانند در کاربردهای ضدمیکروبی ، مواد بیوسنسور، فیبرهای کامپوزیت،مواد ابررسانای کرایوژنی، محصولات آرایشی و قطعات الکترونیکی استفاده شوند. برخی کاربردهای مهم NP های نقره در پزشکی، داروسازی و دندانپزشکی است[۲۲].

اهمیت مقیاس نانو برای شرکت در آزمون می بایست وارد سیستم شوید

نانومتر یک واحد اندازه‌گیری است برابر با $۱۰^{-۹}$ متر و تمام اشیاء و موجوداتی که اندازه آنها در حد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است را نانومقیاس می نامند. خواص مواد به دو بخش خواص فیزیکی و خواص شیمیایی تقسیم‌بندی میشود. تجربه نشان داده ویژگی‌های یک ماده خالص، تا حد قابل قبولی ثابت است و این امر سبب میشود که ما بتوانیم مواد را از روی خواصشان شناسایی کنیم.

اما یافته‌های دانشمندان نشان می‌دهد که یک ماده در اندازه نانومتر، ویژگی‌های متفاوتی با ذرات بزرگترازخود را خواهند داشت. این در حالی است که کوچک‌کردن ذرات، یک تغییر فیزیکی است و ما انتظار داریم که با این تغییر فیزیکی، ویژگی‌های اصلی ماده تغییر نکند[۲۳].

۱-۱- تاثیر تغییر اندازه در خواص شیمیایی مواد

از جمله تغییرات شیمیایی که بر اثر کوچک شدن ذرات تا اندازه نانومتری به وجود می آید عبارت اند از:

تغییر رنگ :

ذرات حاصل از شکستن یک شیشه هر چه قدر هم که کوچک باشند، باز به بی‌رنگی و شفافیت شیشه اولیه هستند.اما این قاعده در مقیاس نانو صادق نیست. یعنی موادی وجود دارند که رنگ ذرات چند نانومتری آنها، با رنگ ذرات بزرگ‌ترشان متفاوت است . طلا و نقره، شناخته شده‌ترین نمونه‌های این مواد هستند. مثال اتم طلا در اندازه ۳۰ تا ۵۰۰ نانومتر به رنگ آبی، در اندازه ۳ تا ۳۰ نانومتر به رنگ قرمز و در اندازه ی کمتر از ۱ نانو متر به رنگ زرد است. اما از آن غیرعادی‌تر این است که نانو ذرات نقره با تغییر شکل هندسی هم تغییر رنگ می‌دهند! برای مثال : نانو ذرات کروی نقره ٤٠ نانومتری به رنگ آبی پر رنگ،نانو ذرات کروی نقره ۸۰ نانو متری آبی کم رنگ، نانو ذرات کروی نقره ۱۲۰ نانو متری زرد رنگ،نانو ذرات کروی طلا ۵۰ نانو متری سبز رنگ،نانو ذرات کروی طلا ۱۰۰ نانو متری نارنجی رنگ و نانو ذرات هرمی شکل طلا ۱۰۰ نانو متری قرمز رنگ هستند.

تغییر شفافیت :

شفافیت، یک خاصیت فیزیکی است و نشان دهنده میزان توانایی یک ماده ،در عبور دادن نور مرئی از خود است. یک پرتو نور در برخورد با سطح ماده می‌تواند از آن عبور کند یا جذب آن گردد یا بازتاب شود. اگر ماده‌ای پرتوهای نور را جذب کند و یا آنها را باز تاب کند نور را مسدود کرده است. مواد مختلف بسته به عملکردشان در برابر تابش نور، می‌تواند کاربردهای فراوانی داشته باشد. به عنوان مثال اکسید روی و اکسید تیتانیوم نور ماورای بنفش را کاملا جذب می‌کنند و نور مرئی را بازتاب می‌کنند. این مواد ،که به رنگ سفید دیده می‌شوند، گزینه‌های بسیار مناسبی برای کرم‌های ضد آفتاب هستند. البته افراد بسیاری، رنگ سفیدی را که این کرم‌ها بر روی پوست ایجاد می‌کنند، دوست ندارند. خوشبختانه این مشکل را می‌توان با کوچک کردن اندازه ذرات این مواد حل کرد.

نانوذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم، با وجود اینکه نور ماورای بنفش را کاملا جذب می‌کنند، برخلاف ذرات بزرگتر کاملا شفاف هستند. البته این امر، ناشی از عبور نور مرئی از این ذرات نیست، بلکه به سبب آن است که اندازه نانوذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم، کوچک‌تر از طول موج نور مرئی (۴۰۰-۷۰۰ نانومتر) است و از این رو این ذرات توانایی بازتابش نور مرئی را ندارند.

تغییر خواص مغناطیسی:

سیال مغناطیسی (فروفلوید) ،مایعی است متشکل از نانوذرات فرومغناطیس (مانند آهن و کبالت) که در آب یا یک حلال آلی معلق شده‌اند. این مایع در حضور یک آهنربا (میدان مغناطیسی) خاصیت مغنایسی بسیار قوی از خود نشان می‌دهد؛به نحوی که با حرکت آهن‌ربا در

اطراف این مایع می‌توان آنرا به شکل‌های سه بعدی زیبایی درآورد. البته این سیال تا زمانی از خود چنین خاصیتی نشان می‌دهد، که ذرات نانومتری آن (تحت نیروهای بین‌مولکولی) به یکدیگر نچسبند.

تغییر واکنش پذیری:

خواص شیمیایی یک ماده، خواصی هستند که به طور مستقل نمی‌توان آنها را اندازه‌گیری کرد. به این معنا که مقدار یک خاصیت شیمیایی، در طی واکنش و برهم‌کنش یک ماده با مواد دیگر مشخص می‌شود. واکنش‌پذیری یا تمایل یک ماده برای واکنش با سایر مواد، از جمله مهمترین خواص شیمیایی است. به طور مثال سدیم، لیتیم یا پتاسیم در تماس با آب به سرعت واکنش داده و شعله ور میشوند. همه اینها عناصری هستند که به شدت واکنش‌پذیرند؛ تا آنجا که نمی‌توان آنها را مانند سایر عناصر در تماس با هوا نگه داشت. اما در مقابل با انداختن یک انگشتر طلا در یک لیوان آب اتفاقی نمی‌افتد و یا پنجره‌های آلومینیومی بدون هرگونه مشکلی در مجاورت هوا استفاده می‌شوند (البته این به مدد لایه مقاوم اکسیدی است که بر روی سطح آلومینیوم تشکیل می‌شود). اما همین مواد در مقیاس نانو، رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهند. واکنش‌پذیری مواد در مقیاس نانو افزایش چشمگیری پیدا می‌کند. در این مقیاس ذرات طلا نه تنها واکنش‌پذیری بالایی دارند، بلکه برای افزایش سرعت واکنش مواد دیگر (به عنوان کاتالیزگر) نیز استفاده می‌شوند. نانوذرات آلومینیوم در هوا آتش می‌گیرند و می‌توان از آنها به عنوان سوخت موشک استفاده کرد. افزایش واکنش‌پذیری مواد در این مقیاس، امکان ساخت کاتالیزگرهای بسیار قوی‌تری را برای ما فراهم کرده است. تا آنجا که پیش‌بینی می‌شود بتوانیم با استفاده از

نانوکاتالیزگرها، واکنش‌های بازگشت‌ناپذیر بسیاری را (مانند تشکیل گازهای سمی NO و CO) در دما و فشار محیط برگشت‌پذیر کنیم [۲٤].

خواص نانوذرات

دو مورد مهم از خواص فیزیکی نانوذرات:

۱. افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم

۲. ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات کوانتومی

افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم

افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ی ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی می شود. این پدیده بر خصوصیات ذره در حالت انزوا و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می گذارد .افزایش سطح، واکنش پذیری نانوذرات را به شدت افزایش می دهد زیرا تعداد مولکولها یا اتمهای موجود در سطح در مقایسه با تعداد اتمها یا مولکولهای موجود در توده ی نمونه بسیار زیاد است، به گونه ای که این ذرات به شدت تمایل به کلوخه ای شدن دارند. به عنوان مثال در مورد نانوذرات فلزی، به محض قرار گیری در هوا، به سرعت اکسید می شوند. در بعضی مواقع برای حفظ خواص مطلوب نانوذرات، جهت پیشگیری از واکنش بیشتر، یک پایدار کننده را بایستی به آنها اضافه کرد که آنها را قادر می سازد تا در برابر سایش، فرسودگی و خوردگی مقاوم باشند [۲٤].

البته این خاصیت مزایایی هم در بر دارد. مساحت سطحی زیاد، عاملی کلیدی در کارکرد کاتالیزوها و ساختارهایی همچون الکترودها می باشد. به عنوان مثال با استفاده از این خاصیت می توان کارایی کاتالیزورهای شیمیایی را به نحو مؤثری بهبود بخشید و یا در تولید نانوکامپوزیت ها

با استفاده از این ذرات، پیوندهای شیمیایی مستحکم تری بین ماده زمینه و ذرات برقرار شده و استحکام آن به شدت افزایش می یابد. علاوه بر این، افزایش سطح ذرات، فشار سطحی را کاهش داده و منجر به تغییر فاصله بین ذرات یا فاصله بین اتم های ذرات می شود. تغییر در فاصله بین اتم های ذرات و نسبت سطح به حجم بالا در نانوذرات، تأثیر متقابلی در خواص ماده دارد. تغییر در انرژی آزاد سطح، پتانسیل شیمیایی را تغییر می دهد. این امر در خواص ترمودینامیکی ماده (مثل نقطه ذوب) تأثیر گذار است.

اثرات کوانتمی

به محض آنکه ذرات به اندازه کافی کوچک شوند، شروع به رفتار مکانیک کوانتومی می کنند. خواص نقاط کوانتومی مثالی از این دست است. نقاط کوانتومی کریستال هایی در اندازه نانو می باشد که از خود نور ساطع می کنند. انتشار نور توسط این نقاط در تشخیص پزشکی کاربرد های فراوانی دارد. این نقاط گاهی اتم های مصنوعی نامیده می شوند؛ چون الکترونهای آزاد آنها مشابه الکترونهای محبوس در اتمها، حالات گسسته و مجازی از انرژی را اشغال می کنند .علاوه بر این، کوچک تر بودن ابعاد نانوذرات از طول موج بحرانی نور، آنها را نامرئی و شفاف می نماید. این خاصیت باعث شده است تا نانوذرات برای مصارفی چون بسته بندی، مواد آرایشی و روکش ها مناسب باشند .مواد در مقیاس نانو، رفتار کاملاً متفاوت، نامنظم و کنترل نشده ای از خود بروز می‌دهند. با کوچکتر شدن ذرات خواص نیز تغییر خواهد کرد[۲٤].

شاخه های فناوری نانو

به طور کلی مطالعات نانوفناوری را می توان به سه دسته تقسیم کرد:

انوفناوری مرطوب:

این شاخه به مطالعه سامانه های زنده ای می پردازد که اساسا در محیط های آبی وجود دارند. در این شاخه ساختمان مواد ژنتیکی، غشاءها و سایر ترکیبات سلولی در مقیاس نانومتر مورد مطالعه قرار می گیرد. پژوهشگران موفق شده اند ساختارهای زیستی فراوانی تولید کنند که نحوه عملکرد آنها در مقیاس نانو کنترل می شود. این شاخه دربرگیرنده علوم پزشکی،دارویی و به طور کلی علوم و روش های مرتبط با زیست فناوری است[۲۵].

نانوفناوری خشک:

این شاخه از علوم پایه شیمی و فیزیک مشتق می شود و به مطالعه تشکیل ساختارهای کربنی، سیلیکون و مواد غیر آلی و فلزی می پردازد. نکته قابل توجه این است که الکترونهای آزاد که در فناوری مرطوب موجب انتقال مواد و انجام واکنشها می گردند، در فناوری خشک خصوصیات فیزیکی ماده را پدید می آورند. در نانوفناوری خشک کاربرد مواد نانویی در الکترونیک، مغناطیس و ابزارهای نوری مورد مطالعه قرار می گیرد. برای مثال طراحی و ساختن میکروسکوپ هایی که بتوان با استفاده از آنها مواد را در ابعاد نانومتری دید.

نانوفناوری محاسبه ای:

در بسیاری از مواقع ابزار آزمایشگاهی موجود برای انجام برخی از آزمایشها در مقیاس نانومتر مناسب نیستند و یا آنکه انجام این آزمایشها بسیار گران تمام می شود. در این حالت از رایانه ها برای شبیه سازی فرآیندها و واکنش های اتم ها و مولکول ها استفاده می شود. شناختی که به وسیله محاسبه به دست می آید، باعث می شود که زمان پیشرفت نانوفناوری خشک به چند دهه کاهش یابد و البته تأثیر مهمی در نانوفناوری مرطوب نیز خواهد داشت[۲۶].

روش‌های شناسایی نانوذرات

تعیین مشخصات نانوذرات برای کنترل سنتز و کاربرد آنها ضروری است. نانوذرات در حال حاضر از طیف وسیعی از مواد ساخته می‌شوند. نانو مواد دارای مشخصات متنوعی هستند که برای تعیین هرکدام ازآن‌ها به ابزار و وسایل دقیقی نیاز است. از این رو تجهیزات و روش‌هایی شامل آنالیزمیکروسکوپی، آنالیزساختاری، روشهای تعیین اندازه وسطح ویژه ذرات، آنالیز پیوندی، آنالیزعنصری، روش‌های تعیین ضخامت فیلم و تعداد لایه، روش‌های تعیین خواص فیزیکی و روش‌های جداسازی برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتیجه آنالیزهای مذکور به صورت تصویر، طیف و یا گراف است که اطلاعاتی در مورد ابعاد، شکل، ا نواع پیوندها، عناصر و مقدار تخلخل ارائه می‌دهد[۲۷].

برخی از روش‌های کاربردی عبارتند از:

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

در پژوهش‌های مربوط به خواص مواد نانوساختاری میکروسکوپ الکترونی یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین دستگاه‌هایی است که مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اغلب مطالعات انجام‌شده روی خواص مواد نانوساختاری برای تعیین اندازه و شکل آنها از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy) که به اختصاربه آن TEM می گویند،استفاده شده است. این روش اندازه و شکل ذرات را با دقت حدود چند دهم نانومتر به دست می‌دهد که به نوع ماده و دستگاه مورد استفاده بستگی دارد. امروزه در بررسی خواص مواد نانوساختاری از میکروسکوپ الکترونی عبوری با وضوح بالا (High-Resolution) استفاده می‌شود. علاوه بر تعیین شکل و اندازه ذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری با استفاده از پراش الکترون

و سایر سازوکارهای موجود در برخورد الکترون با ماده برخی ویژگی‌های دیگر مواد نانوساختاری مانند ساختار بلوری و ترکیب شیمیایی را می توان بدست آورد.(شکل ۱-۲)

شکل۱-۲: میکروسکوپ الکترونی عبوری.

میکروسکوپ الکترونی روبشی[۱] (SEM)

اصول عملکرد SEM بر سه اصل استوار است که به صورت زنجیروار با هم در ارتباط هستند [۲۸]:

الف- برهم‌کنش پرتوی الکترونی با نمونه.

ب- امکان تولید و کنترل مشخصه‌های پرتوی الکترونی روبش‌گر در میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی.

ج- امکان آشکارسازی پرتوهای ساطع شده از سوی نمونه در اثر برهم‌کنش آن با پرتوی الکترونی ورودی.

وقتی پرتوی الکترونی روبشی با نمونه برخورد می‌کند، بین آن‌ها برهم‌کنش روی می‌دهد. نتیجه‌ی آن، ساطع شدن پرتوهایی است که با کمک آشکارسازها دریافت و شناسایی می‌شوند و

[۱] Scanning electron microscopy

مشخصات ماده را آشکار می‌سازند. نوع اطلاعاتی که از این طریق به دست می‌آید به برهم‌کنش پرتو و نمونه بستگی دارد[۲۹].

پراش اشعه ایکس(XRD[۱])

در روشXRD با استفاده از رابطه شرر[۲](معادله (۱-۲)) می‌توان اندازه کریستالی دانه‌های نانومتری را تعیین کرد. الگوی دریافتی پراش پرتو ایکس برای نانو مواد با اندازه دانه کمتر از nm ۱۰۰، گستردگی محسوسی را در خطوط پراش پرتو ایکس از خود نشان می‌دهد. پهنای قله‌ها در نصف ارتفاع خود حاوی اطلاعاتی از نمونه می‌باشد. اندازه حوزه کریستالی و میکرو کرنش (کرنش کوتاه برد که در اثر عیوب شبکه ایجاد می‌شود) عوامل مؤثر در پهنای قله‌ها می‌باشند. بدیهی است که هرچه حوزه کریستالی کوچک‌تر و عیوب شبکه کم‌تر باشد پهنای قله‌ها بیشتر است. با استفاده از روابط موجود و تجزیه و تحلیل نمونه می‌توان به اندازه حوزه کریستالی پی برد.

$$D = K\lambda / (b \cos\theta) \qquad (۲-۱)$$

در این معادله D اندازه ذرات و b پهنای پیک مبنا، در زاویه θ، در نیمه ارتفاع می‌باشد. λ(Å ۱/۵٤۱۸) طول موج پرتوX ورودی است [۲۹].

تاریخچه‌ی نانوذرات طلا

در قرون وسطی برای ساخت شیشه‌های کلیساهای قرون وسطایی از ذرات نانومتری طلا استفاده می‌شده است و با این کار شیشه‌های رنگی بسیار جذابی بدست می‌آمده است. این قبیل

[۱] Xray diffraction
[۲] Scherrer

شیشه‌ها هم‌اکنون در بین شیشه‌های بسیار قدیمی یافت می‌شوند. رنگ به‌وجودآمده در این شیشه‌ها برپایه این حقیقت استوار است که مواد با ابعاد نانو دارای همان خواص مواد با ابعاد میکرو نمی‌باشند. در واقع یافتن مثالهایی برای استفاده از نانو ذرات فلزی چندان سخت نیست.رنگدانه‌های تزیینی جام مشهور لیکرگوس در روم باستان (قرن چهارم بعد از میلاد) نمونه‌ای از آنهاست. این جام هنوز در موزه بریتانیا قرار دارد و بسته به جهت نور تابیده به آن رنگهای متفاوتی دارد. نور انعکاس یافته از آن سبز است ولی اگر نوری از درون آن بتابد، به رنگ قرمز دیده می‌شود. در سال۱۹۵۹ ریچارد فاینمن[۱] مقاله‌ای را دربارهٔ قابلیت‌های فناوری نانو در آینده منتشر ساخت. باوجود موقعیت‌هایی که توسط بسیاری تا آن زمان کسب‌شده بود، ریچارد. پی. فاینمن را به عنوان پایه گذار این علم می‌شناسند [۳۰].

کاربرد نانوذرات:

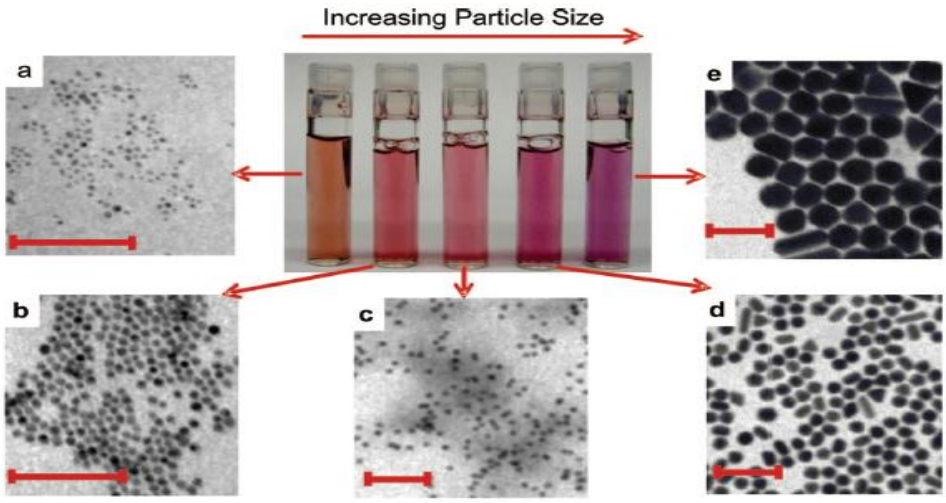
گوناگونی مواد نانوذره‌ای به اندازه تنوع کاربردهای آنها است، زمینه‌هایی که نانوذرات کاربرد دارند، عبارتند از:

مواد کامپوزیت ، کاتالیزور ، بسته‌بندی ،روکش‌ها ،افزودنی‌های سوخت و مواد منفجره ،ساینده ها ،باطری‌ها و پیل‌های سوختی ،روان کننده ها ،پزشکی و دادروسازی ،دارورسانی ،محافظت کننده ها ،آنالیز زیستی و تشخیص پزشکی ولوازم آرایشی[۳۱].

[۱] Richard Phillips Feynman

نظریه مای[۱] و Surface Plasmon Resonance(SPR)، رزونانس پلاسمون سطحی

خصوصیات نوری نانوذرات فلزی که عمدتا وابسته به اندازه‌ی نانوذرات است، بطور گسترده، در سالهای اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۱].

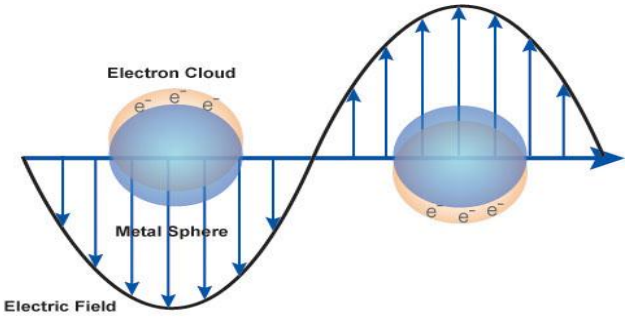


شکل ۱-۳رنگ نانوذره‌ی طلا مختلف با اندازه‌ی ذرات متفاوت.

هنگامیکه امواج الکترومغناطیسی به نانوذرات فلزی تابانده میشود، حالات الکترونی و ارتعاشی نانوذرات فلزی تهییج میشود. این پدیده باعث تحریک ممان دوقطبی میشود که در فرکانس مخصوصی نوسان میکند. در نتیجه مقداری از نور تابیده بصورت پرتوی ثانویه در تمام جهات پخش میشود و مقداری از فوتونها جذب سیستم میشود[۳۲]. نوسان کلی الکترونهای آزاد در اطراف اتمهای فلز رزونانس پلاسمون سطحی نامیده میشود[۳۳] . مکانیسم فوق توسط مای در سال ۱۹۰۸ مورد بحث و بررسی قرارگرفته است [۳٤]. قابل توجه است که فرایند جذب نور در ناحیه‌ی UV-Vis اتفاق می‌افتد. هر نوع نانو ذره بسته به جنس آن رزونانس پلاسمون سطحی

[۱] Mie theory

در ناحیه‌ی UV-Vis مخصوصی دارد که با دستگاه اسپکتروفتومتر قابل مشاهده است. رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا در ناحیه‌ی مرئی و در طول موج حدود ۵۳۰nm قابل رویت میباشد[۳۵]. شکل (۱-٤)



شکل۱-٤ نوسان الکترون در اطراف اتم فلز(رزونانس پلاسمون سطحی)۱۰۳ ,۱۰۲]

روش‌های سنتز نانوذره‌ی طلا

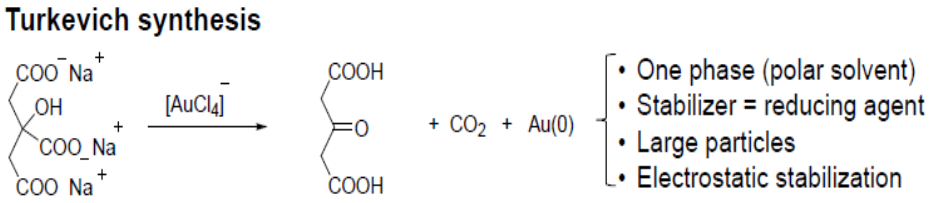
روش ترکویچ[۱]

این روش توسط ترکویچ و همکارانش در سال۱۹۵۱ میلادی کشف شد و در سال ۱۹۷۰میلادی توسط فرینز بهبود بخشیده شده است]

[۳٦. روش ترکویچ یکی از ساده‌ترین راه‌های سنتز نانوذره‌ی طلا می‌باشد. به طور کلی این روش برای سنتز نانوذرات طلای کروی با قطر متوسط ۱۰-۲۰ نانومتراستفاده می‌شود. روش ترکویچ شامل واکنش تری سدیم سیترات ۲ آبه با مقدار اندک محلول اسیدی طلا می‌باشد. در اینجا یون‌های سیترات بعنوان عامل کاهنده بوده و یون‌های طلا را احیاء کرده و نانوذره‌ی طلا سنتز می‌شود.در سالـهای اخیر تحـولی در روش ترکویچ در سنتز نانوذره‌ی طلا به وجود آمده است وآن سنتز نانولوله‌ها می‌باشد.

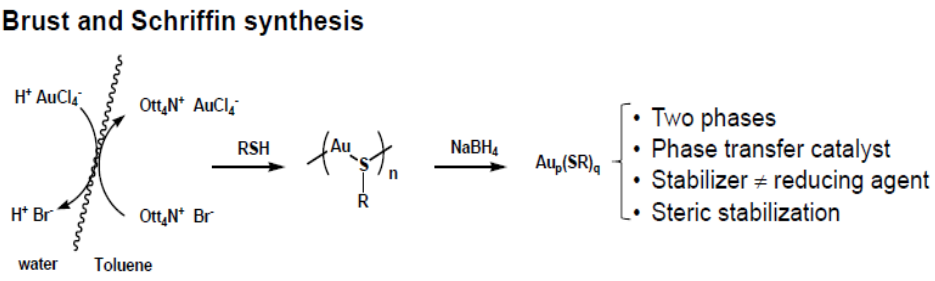
[۱] Turkevich method

برای سنتز ذرات بزرگتری از نانوذره از مقدار کمتری ازسدیم سیترات(۰/۰۵٪ به طوری که برای احیاء کامل یون‌های طلا کافی نباشد) استفاده می‌شود.کاهش در مقدار سدیم سیترات به معنی کاهش در یون‌های سیتراتی بوده که بر روی ذرات نانوذره قرار میگرند تا آنهارا پایدار کنند و این امر باعث تجمع ذرات شده ودر نتیجه ذرات درشت‌تر ایجاد می‌شود(شکل (۱-٤)).



روش براست[1]

این روش توسط براست واسچیفراین در سال ۱۹۹۰میلادی کشف شد[۳۳]. به منظور تولید نانوذره‌ی طلا در مایعات آلی غیر قابل اختلاط با آب، مانند تولوئن مورد استفاده قرار میگیرد.در این روش محلول اسیدی طلا با تتراکتیل آمونیوم بروماید در محیط تولوئن واکنش می‌دهد وسدیم بوروهیدرید بعنوان عامل کاهنده و ضد انعقاد عمل می‌کند.در این روش قطر نانوذره در حدود ۵-٦ نانومترمی باشد[۳۷] .



[1] Brust method

اصلاح نانوذرات طلا

اصلاح سطح نانوذرات طلا به منظور افزایش قدرت تشخیص آن به کار می‌رود. نانوذرات طلا به دلیل خواص منحصر به فرد فیزیکی وشیمیایی نظیر سهولت تولید و اصلاح سطح و نیز زیست سازگاری دارای کابردهای فراوانی از جمله تصویربرداری مولکولی و حمل داروها هستند.به منظور بهبود و یا تغییر پراکندگی نانوذرات و افزایش سازگاری نانوذرات با مواد دیگر، به روش‌های شیمیایی ویا فیزیکی نیازمند هستیم تا سطح نانوذرات را تغییر داده و بعبارت دیگر اصلاح کنیم[۳۳].

نانو ذرات طلا به عنوان پروب‌های کالریمتری

نانوذرات (AuNPs) پر کاربردترین نانوذرات حسگری نوری استفاده شده هستند به ویژه تغییر رنگ محلول AuNPs پلتفرم تجزیه کالریمتری را ممکن می‌کند. AuNPs مزایای زیادی با جذب رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) قوی در ناحیه مرئی، آماده سازی ساده و پایداری بالاو سازگاری زیستی دارد[۳٤] بنابراین روش کالریمتری محبوب بود و اخیراً برای آشکارسازی مواد مختلف از جمله DNA، پروتئین‌ها و یون‌های فلزی بکار رفته اند.

AuNPs نیز پروب‌های کالریمتری مفید هستند.به دلیل خواص نوری وابسته به فاصله و ضرایب خاموشی بسیار بالا در ناحیه مرئی که ارتباط نزدیکی با رزونانس پلاسمون سطحی منحصر به فرد از قرمز تا آبی دارد که متناظر است با به ترتیب حالات متناظر پخش و تجمع [۳۵].

براساس این اصل ، چندین روش کالریمتری برای آشکارسازی یون ها[۳۸]، بیوملکولها[۳۹]، ۲ و ٤ – تری نیتروتولوئن (TNT)[۱۲] ، داروها[٤۰] و ملامین[٤۱] توسعه یافته‌اند. برای مثال

گروه‌های عاملی ٦-m ارکاپتونیکوتینیک اسید و L_ سیستئین به صورت همزمان روی AuNPs برای آشکارسازی Cd^{2+} استفاده شد[٤٢].

سینتیک شیمیایی

سینتیک شیمیایی شامل بررسی نحوه تأثیر شرایط آزمایش مختلف بر سرعت یک واکنش شیمیایی شده اطلاعاتی در مورد مکانیسم‌های واکنشها و حالات گذار می‌دهد و نیز ساختار مدلهای ریاضی توصیف کننده خواص واکنش شیمیایی را نیز تعیین می‌کنند[٤٣].

در واکنش‌های متوالی، مرحله تعیین سرعت اغلب تعیین کننده سینتیک است. در واکنش‌های متوالی درجه اول یک تخمین حالت پایدار می‌تواند قانون سرعت را ساده کند. انرژی فعال سازی برای یک واکنش به صورت تجربی از طریق معادله آرینوس و معادله ایرینگ تعیین می‌شوند. به علاوه به منظور نشان دادن اهمیت تجزیه سینتیکی باید روش‌های فلوریمتری و اندازه گیری‌های آن را مطرح کنیم. آشکارسازی فلورسانس به عنوان یک ابزار قدرتمند با کاربردهای مختلف در علوم زیستی هستند. این روش امکان تحقیقات آزمایشگاهی شامل اتصال لیگاندهایی مانند یک دارو یا هورمون به یک گیرنده ، اندازه گیری غلظت‌های متابولیتها و تحقیق ساختاری ، جهت گیری، سیالیت و فاصله بین ملکولها را فراهم می‌کند[٤٤].

کاربرد اخیر NPهای لومینانت (ZnS، ZnSe، CdS ، CdTe و CdSe) تکنیک‌های تجزیه‌ای را برای تحققیات دارویی به خواص بی نظیرشان تبدیل کرد که از آثار اندازه کوانتمی، روشنایی ، پایداری بالادر برابر شویش پروب و مقاومت در برابر چشمک زدن ناشی می‌شود[٤٤]. اینها به تفصیل برای کاربردهای بالقوه مختلف از جمله دیودهای نشر نوری، سل‌های فتوولتایی، برچسب‌های بیولوژیکی فلورسانی، حسگرهای نوری و غیره بررسی شده اند[٤٥].

تجزیه سینتیکی

سینتیک شیمیایی[۱] که سینتیک واکنش نیز نامیده می شود عبارت است از بررسی سرعت های فرایندهای شیمیایی. سینتیک شیمیایی شامل بررسی نحوه تأثیر شریط مختلف آزمایش بر سرعت واکنش شیمیایی و ارائه اطلاعات در مورد مکانیسم واکنش و حالات واسطه و نیز ساختار مدلهای ریاضی که می تواند ویژگی های یک واکنش شیمیایی را توصیف کند[٤٥]. سینتیک شیمیایی به تعیین تجربی سرعت های واکنش می پردازد که از آن قانون های سرعت و ثابت های سرعت بدست می آیند. قوانین سرعت نسبتاً ساده برای واکنش های درجه صفرم[۲] (که سرعت های واکنش آنها مستقل از غلظت است)، واکنش های درجه اول[۳] ، واکنش درجه دوم[٤] وجود دارد و می تواند برای بقیه نیز بدست آید. در واکنش های متوالی مرحله تعیین سرعت مرحله تعیین سرعت اغلب سینتیک را تعیین می کند. در واکنش های متوالی[٥] درجه اول یک حالت پایدار تخمینی می تواند قانون سرعت را ساده کند. انرژی فعالسازی برای یک واکنش به صورت تجربی از طریق معادله آرنیوس[٦] و معادله ایرینگ[۷] تعیین می شود[۲۷٤]. فاکتورهای اصلی مؤثر بر سرعت واکنش عبارتند ازحالت فیزیکی واکنش گرها ، غلظت های واکنش گرها، دمای انجام واکنش و حضور یا عدم حضور کاتالیزگر در واکنش[٤٦].

---

[۱] Chemical kinetic
[۲] Zero order reaction
[۳] First order reaction
[٤] Second order reaction
[٥] consecutive reactions
[٦] Arrenius
[۷] Eyring

پارامترهای ترمودینامیک و ماهیت انرژی آزاد نیروهای پیوندی، آنتروپی و آنتالپی

در کل، تغییر انرژی آزاد (ΔG) یک واکنش تعیین می کند تغییر شیمیایی رخ می دهد یا خیر و سینتیک می گوید واکنش به چه سرعتی رخ می دهد. یک واکنش می تواند بسیار گرمازا باشد و یک تغییر انتروپی بسیار مثبت داشته باشد ولی در عمل رخ ندهد اگر واکنش خیلی کند باشد. اگر یک واکنشگر بتواند دو محصول مختلف تولید کند پایدارترین محصول از نظر ترمودینامیکی به طور کلی تولید می شود، بجز در شرایط خاص که واکنش تحت کنترل واکنش سینتیک است[٤٧].

اصل کورتین- هامت در زمان تعیین نسبت محصول برای دو واکنشگر که به سرعت بهم تبدیل می شوند که هر کدام به یک محصول متفاوت می روند اعمال می شود. انجام پیش بینی در مورد ثابت های سرعت واکنش برای یک احیا از ارتباط انرژی آزاد امکان پذیر است. سینتیک شیمیایی اطلاعاتی در مورد زمان اقامت و انتقال حرارت در یک واکنش شیمیایی فراهم می کند.

مفهوم آرنیوس انرژی فعال سازی

آرنیوس مطرح کرد که واکنش گرها برای اینکه وارد محصول شوند باید ابتدا حداقل مقدار انرژی بنام انرژی فعال سازی E_a را دریافت کنند. در دمای مطلق T جزئی از ملکول ها که انرژی سینتیک بالاتر از E_a دارند می توانند از مکانیک استاتیک محاسبه شوند. مفهوم انرژی فعال سازی ماهیت نمایی (اکسپونانسیل) رابطه را توصیف می کند و به نحوی در همه تئوری های سینتیک حضور دارد[٤٨].محاسبات برای ثابت های سرعت واکنش شامل میانگین گیری انرژی در یک

توزیع بولتزمن- ماکسول[۱] با E_a به عنوان مرز پایینی می شود و بنابراین اغلب نوعی تابع گامای ناقص دارد که متناسب است با $e^{-E_a/RT}$.[٤٨].

تئوری برخورد[۲]

یک مثال از تئوری برخورد واکنش های شیمیایی گرفته می شود که توسط مکس تراوتز و ویلیام لویس در سال های۱۸- ۱۹۱٦ توسعه یافت. در این تئوری ملکولها واکنش خواهند داد اگر با انرژی سینتیک نسبی فرارتر از E_a در امتداد خطوط مرکز برخورد کنند. این منجر به معادله ای شبیه به معادله آرینوس می شود[٤٨].

تئوری حالت گذار[۳]

یک معادله شبه آرینوس دیگر در تئوری حالت گذار واکنش های شیمیایی دیده می شود که توسط وگز، آیرینگ، پولانی و اوانس در دهه ۱۹۳۰ تهیه شد. این معادله شکل های مختلفی دارد که مرسوم ترین آنها عبارت است از :

$$K = K_B T/h(e^{-\Delta G^{\neq}/\overline{RT}}) \qquad (٤-٣)$$

که $\Delta G^{\neq}$ انرژی آزاد گیبس فعال سازی ، K_B ثابت بولتزمن و h ثابت پلانک است. در نگاه اول این به نظر مانند یک ضرب نمایی در یک فاکتور است که در دما به صورت خطی است. با این حال باید به خاطر داشت که انرژی آزاد خودش یک کمیت وابسته به دما است[۲۷۸-۲۷٦]. انرژی آزاد فعال سازی عبارت است از تفاوتی که عبارت آنتالپی و یک عبارت آنتروپی ضرب در دمای مطلق. وقتی تمام جزئیات تعیین شدند نهایتاً معادله ای حاصل می شود که باز هم شکل یک

[۱] Maxwell-Boltzmann distribution
[۲] Collision theory
[۳] Transition state theory

معادله ضرب، آرنیوس در یک تابع با تغییر کند Tاست[۲۷۷,۲۷۸]. شکل دقیق وابستگی دمایی به واکنش بستگی دارد و می تواند با استفاده از فرمول های حاصل از استاتیک شامل توابع تقسیمی[۱] واکنشگرها و کمپلکس های فعال سازی شده[۲] قابل محاسبه است[٤٨].

محدودیتهای ایده انرژی فعال سازی آرنیوس

هم انرژی فعال سازی آرنیوس و هم ثابت سرعت K به صورت تجربی تعیین می شوند نشان دهنده پارامتر خاص هر واکنش است که به انرژی های آستانه و موفقیت هر برخوردو در سطح ملکولی ارتباطی ندارد. یک برخورد خاص را در نظر بگیرید(یک واکنش اولیه) که بین ملکولهای A وB رخ می دهند. زاویه برخورد، انرژی تجزیه ای نسبی، انرژی درونی[۳] (به ویژه ارتعاشی) همگی شانس ایجاد ملکول محصول AB به واسطه برخورد را تعیین می کند[٤٩]. اندازه گیری های میکروسکوپی E و K نتیجه چندین برخورد مستقل با پارامترهای برخورد مختلف است. برای بررسی سرعت های واکنش در سطح ملکولی، آزمایشات تحت شرایط برخورد نزدیک بررسی می شوندو این موضوع اغلب دینامیک واکنش ملکولی نامیده می شود. معادله آیرینگ که توسط هنری آیرینگ در ۱۹۳۵ توسعه یافت بر تئوری حالت گذار استوار است و برای توصیف ارتباط بین سرعت واکنش و دما بکار می رود. این مشابه با معادله آرینوس است که وابستگی دمایی سرعت های واکنش را توصیف می کند. با این حال در حالی که معادله آرنیوس فقط می تواند برای سینتیک فاز گازی اعمال شود ، معادله آیرینگ در تحقیق و بررسی واکنش های فاز اختلاطی متراکم گازی مفید است که ارتباطی به مدل برخورد ندارد. معادله آیرینگ محاسبه دقیق

[۱] partition functions
[۲] activated complex
[۳] Internal vibration energy

تری از ثابت های سرعت ارائه می دهد و دیدگاهی در مورد نحوه پیش روی یک واکنش در سطح ملکولی ایجاد می کند. معادله در زیر داده شده است[۵۰]:

$$K = K_B T/he^{-\Delta H^{\neq}/RT} e^{\Delta s^{\neq}/R} \qquad (۵-۳)$$

یک واکنش بیوملکولی را در نظر بگیرید

$$A + B \rightarrow C \qquad (۶-۳)$$

$$K = [C]/[A][B] \qquad (۷-۳)$$

که k ثابت متعادل است. در مدل حالت گذار در کمپلکس فعال شده AB^* تشکیل می شود.

$$A + B \rightleftarrows AB^{\neq} \rightarrow C \qquad (۸-۳)$$

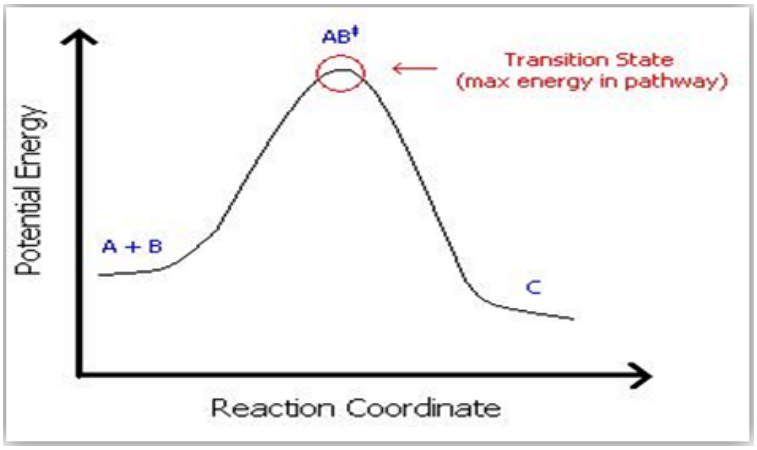
$$k^{\neq} = [AB]^{\neq}/[A][B] \qquad (۹-۳)$$

یک مانع انرژی بنام انرژی فعال سازی[۱] (شکل ۱-۵) در مسیر واکنش وجود دارد. مقدار معین انرژی برای انجام واکنش لازم است. حالت گذار $AB^{\neq}$ در حداکثر انرژی تشکیل می شود[۵۱]. این کمپلکس پر انرژی یک واسطه ناپایدار است. پس از غلبه بر مانع انرژی (سد انرژی) واکنش می تواند پیش رود و تشکیل محصول رخ دهد.

سرعت یک واکنش برابر است با تعداد کمپلکس های فعال شده که برای تولید محصولات تجزیه می شوند. به عبارت دیگر عبارت است از غلظت کمپلکس پر انرژی ضرب در فرکانس آن برای از بین بردن سد انرژی[۵۲] .

$$\text{سرعت} = V[AB^{\neq}]v[A][B]k^{\neq} \qquad (۱۰-۳)$$

[۱] Activation energy



شکل ۱-۵.جهت واکنش در مقابل پتانسیل بالقوه، سد انرژی، به نام انرژی فعال سازی، (در مسیر واکنش)؛ حالت گذار، $AB^{\ddagger}$، است که در حداکثر انرژی تشکیل؛ این مجموعه با انرژی بالا نشان دهنده یک واسطه بی ثبات است. هنگامی که سد انرژی غلبه بر است، واکنش قادر به ادامه و شکل گیری محصول رخ می دهد.

سرعت را می توان به صورت زیر بازنویسی کرد

$$\text{سرعت} = k[A][B] \quad (۱۱-۳)$$

با ترکیب معادلات (۳-۱۰) و (۳-۱۱) داریم

$$k[A][B]k = v[A][B]k^{\neq}vk^{\neq} \quad (۱۲-۳)$$

که v فرکانس ارتعاشی، k ثابت سرعت و $k^{\neq}$ ثابت تعادل ترمودینامیک است. فرکانس ارتعاشی به صورت زیر است:

$$v = k_B T/h \quad (۱۳-۳)$$

که k_B ثابت بولتزمن ($۱.۳۸۱ \times ۱۰^{-۲۳} J/K$) ، T دمای مطلق در مقیاس کلوین (K) و h ثابت پلانک ($۶.۶۲۶ \times ۱۰^{-۳٤} JS$) است.

با جایگزینی معادله (۳-۱۳) در معادله (۳-۱۲) داریم

$$K = K_B T/hK^{\neq} \quad (۱٤-۳)$$

معادلات ترمودینامیک زیر ثابت تعادل را بیشتر توصیف می کنند.

$$\Delta G^{\neq}\Delta G^{\neq} = -RTlnK^{\neq}\Delta H^{\neq} - T\Delta S^{\neq} \quad (۱۵-۳)$$

که $\Delta G^{\neq}$ انرژی فعال سازی گیبس[۱]، $H^{\neq}$ آنتالپی فعال سازی و $\Delta S^{\neq}$ آنتروپی فعال سازی[۲] است . با در نظر گرفتن معادلات (۳-۱۵) و (۳-۱٤) برای حل $lnK^{\neq}$ می دهد.

$$lnK^{\neq} = -\Delta H^{\neq}/RT + \Delta S^{\neq}/R \qquad (۱٦ - ۳)$$

معادله آیرینگ در نهایت با جایگزینی معادله (۳-۱٦) در (۳-۱٤) بدست می آید.

$$\mathrm{K} = \mathrm{K_B T/he}^{-\Delta \mathrm{H}^{\neq}/\mathrm{RT}} \mathrm{e}^{\Delta \mathrm{s}^{\neq}/\mathrm{R}} \qquad (۱۷ - ۳)$$

کمومتریکس[۳]

کمومتریکس کاربرد علوم آمار، کامپیوتر، ریاضی و گرافیک برای درک بهتر داده‌های شیمی می‌باشد.با استفاده از آنالیز داده‌های شیمیایی بدست آمده، اطلاعات مفید استخراج می‌شود که با توجه به این اطلاعات می‌توان آزمایش‌های مورد نظر با بازدهی بهتر را طراحی کرد. کاربرد روش‌های ریاضی در شیمی سابقه دیرین دارد ولی با توجه به پیشرفت علوم کامپیوتر و کاربرد آن در علوم روشهای کمومتریکس در دهه اخیر پیشرفت بسیار داشته‌است. در این دو دهه روش‌های کمومتریکس مختلفی توسط شیمیدان‌ها با کمک متخصصین علوم کامپیوتر، ریاضی و آمار ارائه شده‌است. بسیاری از شیمیدان‌ها، اسوانت وولد را به عنوان اولین کسی که این روش‌ها را معرفی کرده‌است نام می‌برند و به او لقب پدر علم کمومتریکس را داده‌اند. اسوانت وولد[۲] در دهه ٦۰ میلادی مقالات بسیاری تحت عنوان معرفی روش‌های ریاضی و کاربرد آن‌ها در شیمی ارائه کرده‌است. سابقه استفاده و مطالعه روش‌های کمومتریکس در ایران حدود ۱۰ سال می‌باشد که در دانشگاه‌های مختلف این مطالعات انجام می‌شود[۵۳].

[۱] Gibbs energy of activation

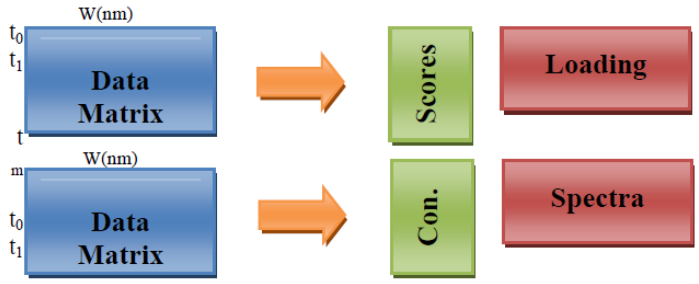
[۲] entropy of activation

[۳] Chemometrics

آنالیز اجزای اصلی (PCA)[۱]

آنالیز اجزای اصلی یک روش چندمتغیره است که برای اولین بار در سال ۱۹۲۳ توسط فیشر[۲] و مکنزی[۳] معرفی شد [٥٤]. نام آنالیز جزء اصلی توسط هتلینگ[٤] در سال ۱۹۳۳ معرفی شد [٥٥].

PCAدر صورتی که به یک ماتریس داده اعمال شود، داده های آن را به نحوی میچرخاند که روی محورهای مورد نظر بیشترین تغییرات را داشته باشند. به این ترتیب یک دسته متغیر وابسته[٥] به یک دسته متغیر مستقل[٦] تبدیل میشوند. این متغیرها بر اساس کاهش تغییرات مرتب شده‌اند. متغیرهای مستقل، ترکیب خطی از متغیرهای اولیه‌اند و آخرین متغیر همراه با کمترین کاهش مقدار داده های اولیه حذف می‌شود [٥٥]. کاربرد اصلی PCA برای کاهش ابعاد یک دسته داده میباشد در حالیکه اطلاعات تا حد امکان حفظ شود این روش یک توصیف فشرده و بهینه از دسته داده‌ها را محاسبه میکند. PCA ماتریس داده های اولیه را به دو ماتریس کوچکتر تبدیل میکند؛ امتیازات و وزنها[۷] که مفاهیم ریاضی بوده و میتوانند حاوی اطلاعاتی درباره غلظت و طیف (مفاهیم شیمیایی) باشند (شکل ۱-٦).



شکل ۱-٦

[۱]- Principal Component Analysis
[۲]- Fisher
[۳]- Mackenzi
[٤]- Hotteling
[٥]- Correlated
[٦]- Independent
[۷] - weight

متغیرها در مواردی برای اهداف دسته بندی[۱] بکار میرود. این تکنیک بطور گسترده برای استخراج و تفسیر اطلاعات از داده های چندمتغیره بکار می‌رود. متغیرهای اولیه به محورهای جدیدی (اجزاء اصلی) منتقل می‌شوند؛ طوری که امتیازات داده‌ها روی این محورها همبستگی ندارند؛ یعنی اجزاء اصلی بر هم عمود[۲] هستند و می توانند بطور منحصربفرد تعیین شوند. PCA این امکان را فراهم میکند که بیشترین مقدار تغییرات در ماتریس داده‌ها بوسیله کمترین تعداد اجزاء اصلی(PC ها)[۳] تعیین شود. بدین ترتیب استخراج متوالی هر (PC) همراه با یک کاهش مقدار از متغیر کل خواهد بود. روشهایی جهت انجام PCA روی ماتریس داده‌ها وجود دارند که از روی آنها میتوان به تجزیه مقادیر منفرد (SVD)[٤] اشاره کرد[٥٤] .

انواع داده ها

داده های مرتبه صفر[٥]

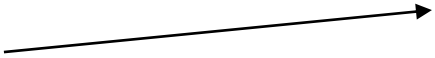
در این سری از داده ها به ازای هر نمونهٔ آزمایشی، یک داده داریم. به عنوان مثال، وقتی جذب یک محلول در یک طول موج خوانده شود، یک عدد داریم. به این نوع داده ها، داده های مرتبهٔ صفر می گویند.

۱- Classification
۲- Orthogonal
۳- Principal component
٤- Singular Value Decomposition

٥- Zero order data

داده های مرتبه یک[۱]

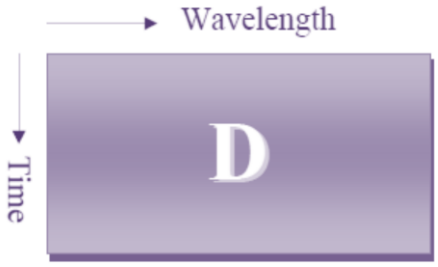
در این سری از داده ها به ازای هر نمونهٔ آزمایشی، یک بردار داریم. به عنوان مثال، اگر جذب یک محلول در چندین طول موج خوانده شود، نتیجه یک بردار خواهد بود. به این نوع داده ها داده های مرتبهٔ یک یا یک بعدی[۲] گفته میشود[٥٦].



شکل ۱-۷. داده مرتبه یک.

داده های مرتبه دو[۳]

به داده هایی گفته می شود که به ازای یک نمونهٔ آزمایشی، یک ماتریس داده داشته باشیم. به عنوان مثال دریک سیستم سینتیکی، وقتی از یک محلول در زمان های مختلف در چندین طول موج طیف گرفته می شود، در پایان یک ماتریس داده خواهیم داشت که در یک بعد طول موج و در بعد دیگر زمان تغییر می کند. به این نوع داده ها، داده های دوبعدی میگویند. شکل این نوع داده ها در شکل ۱-۸ نشان داده شده است.

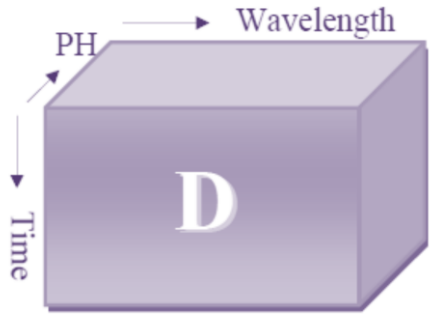


شکل ۱-۸ شکل شماتیک داده های دو بعدی.

۱- First order data
۲- One way data
۳- Second order data

داده های مرتبه سه

اگر تغییرات یک نمونه آزمایشی در سه بعد ثبت شود یک آرایهٔ سه بعدی مطابق شکل ۱-۹ خواهیم داشت.



شکل۱-۹. شکل شماتیک داده های سه بعدی.

به عنوان مثال وقتی یک سیستم سینتیکی درpH های مختلف بررسی شود، داده سه بعدی خواهیم داشت. افزایش بعد داده ها از یک بعد به سه بعد مزایای زیادی دارد[۵۷] .یکی از مزایای آن این است که اطلاعات زیادی به طور بالقوه در این داده ها موجود می باشد و اساساً روش های متفاوتی برای آنالیز یک چنین داده هایی در ابعاد متفاوت آنها قابل استفاده است [۵۸].

رگرسیون کم‌ترین مربعات نسبی (رگرسیون PLS)

رگرسیون کم‌ترین مربعات نسبی (رگرسیون PLS) یک روش آماری است که ارتباطی با اجزای اصلی رگرسیون دارد؛ به جای یافتن صفحات دارای حداقل واریانس [۱]بین پاسخ و متغیر مستقل ، یک مدل رگرسیون خطی با تصویرسازی متغیرهای پیش بینی شده و متغیرهای قابل مشاهده به یک فضای جدید بدست می‌آورد[۵۹]. چون هر دو داده Xو Y در فضاهای جدید تصویرسازی شده اند، خانواده روش‌های PLS به عنوان مدل‌های فاکتور دو خطی شناخته

[۱] Hyper pages minimum variance

شده‌اند. تحلیل جداکننده کم‌ترین مربعات نسبی (PLS-DA) یک متغیر استفاده شده وقتی Y دسته بندی شده است می‌باشد[۶۰].

PLS برای به دست آوردن ارتباط بنیادی بین دو ماتریس (X و Y) بکار می‌رود یعنی یک متغیر تأخیری برای مدل سازی ساختارهای کوواریانس در این دو فضا. یک مدل PLS سعی در یافتن جهت چندبعدی در فضای X دارد که جهت واریانس چندبعدی حداکثر را در فضای Y توضیح می‌دهد. رگرسیون PLS به ویژه زمانی مناسب است که ماتریس شاخص‌ها متغیر بیشتری از مشاهدات دارد و وقتی هم خطی چندگانه در مقادیر X وجود دارد. درمقابل، رگرسیون استاندارد در این موارد ناموفق می‌شود (مگر این که تنظیم شوند)[۶۱].

الگوریتم PLS در مدل سازی مسیر کم‌ترین مربعات نسبی بکار رفته است، روشی که یک شبکه معمول از متغیرهای تأخیری را مدل می‌کند (دلایل نمی‌توانند بدون روش‌های تجربی یا نیمه تجربی تعیین شوند ولی یک بنیان مشترک از مدل متغیرهای تأخیری با فرض‌های تئوریک قبلی دارد که متغیرهای تأخیری در شاخص‌های اندازه گیری آن‌ها نمایان است)[۴۳].

مطرح شده است که این تکنیک شکلی از مدل سازی معادله ساختاری است که متفاوت از روش‌های کلاسیک است از این نظر که بجای واریانس محوری، بر اجزا محوریت دارد. با این حال برخی دیگر می‌گویند که این گونه نیست.

کم‌ترین مربعات نسبی توسط آمارشناس سوئدی هرمان وار معرفی شد که سپس آن را با پسرش سوانت وار توسعه داد. یک عبارت جایگزین بجای PLS (دقیق تر، به نقل از سوانت وار)، تصویرسازی در ساختارهای تأخیری است ولی عبارت کم‌ترین مربعات نسبی هنوز در زمینه‌های زیادی غالب است[۶۲].

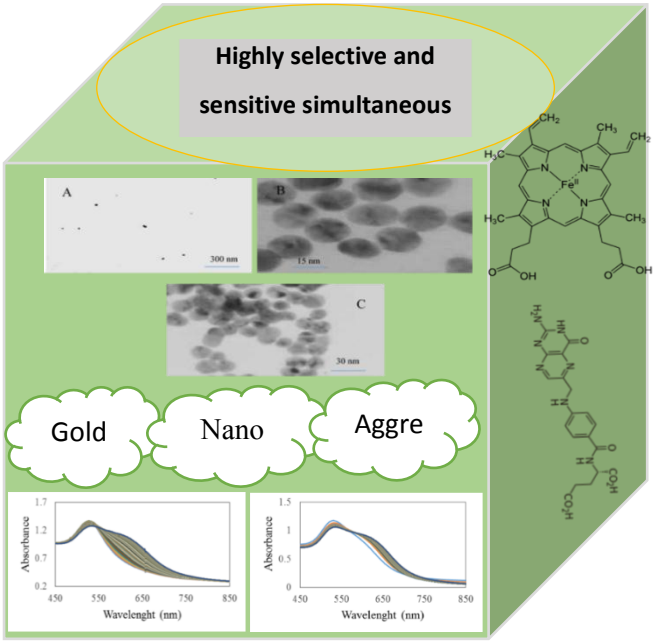
اگرچه کاربردهای اصلی در علوم اجتماعی بود، رگرسیون PLS امروز بیشتر از همه در کمومتریکس و زمینه‌های مرتبط به کار می‌روند .PLS. هم چنین در بیوانفورماتیک ، سنسومتریکس، علوم عصبی و انسان شناسی بکار می‌رود. در مقابل، مدل سازی مسیر PLS بیش‌تر از همه در علوم اجتماعی، اقتصاد، بازاریابی و مدیریت استراتژیک بکار رفته است با این حال در زمینه روان شناسی، نقدی مبنی بر این که یک ابزار تست و تخمین غیر قابل اعتماد است دریافت کرده است[۶۳].

طیف‌سنجی نوری (اسپکتروفتومتری)

طیف نمایشی از شدت تابش نشر ،جذب یا پراکنده شده توسط نمونه در برابر کمیتی در ارتباط با انرژی فوتون مثل فرکانس یا طول موج است.اسپکتروفوتومتری در شیمی، روشی است برای سنجش و مطالعه طیف الکترومغناطیسی. در این روش با استفاده از میزان اندازه جذب نور نمونه‌ها، غلظت آنها را تعیین می‌کند. این شیوه در دستگاه طیف‌سنج نوری با نام اسپکتروفوتومتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.اسپکتروفتومتر یا طیف سنج دستگاهی است که شدت نور را به صورت تابعی از طول موج اندازه گیری می کند. این دستگاه روش تجزیه دستگاهی است که در آن تابش الکترومغناطیسی در ناحیه مرئی و ماورابنفش جذب ماده می شود و از روی شدت جذب مقدار ماده تعیین می شود. منبع تابش نورسفید بر روی نمونه گازی، جامد یا مایع است و تجزیه گر منشور یا شبکه است. در این روش با استفاده از میزان جذب نور تعیین غلظت می کند. با استفاده از این وسیله امکان اندازه گیری نمونه های فوق العاده کوچک را دارد که از آن برای تجزیه و تحلیل عناصر مولکولی مانند دی ان ای و آر ان ای استفاده می شود. اسپکتروفتومتر دستگاه پیچیده ای است که شدت نور را به صورت تابعی از طول موج اندازه گیری می کند.

چهار بخش اصلی اسپکتروفتومتر شامل منبع نور، نمونه، آشکارساز و مفسر باشد[٦٤] .محدوده نور مرئی حدود ۷۰۰-٤۰۰ نانومتر است وهمچنین محدوده نور ماوراء بنفش ۲۰۰-٤۰۰ نانومتر می باشد. برای قرار دادن نمونه در دستگاه از یک سل استفاده می شود که می‌تواند جنس پلاستیک، شیشه یا کوارتز داشته باشد. پلاستیک و شیشه، UV را جذب می کنند از اینرو تنها می‌توان آن‌ها را برای اسپکتروفوتومتری نور مرئی استفاده کرد.[٦٥]

۲ تعیین همزمان بسیار دقیق و حساس هموگلوبین و فولیک اسید براساس تجمع نانوذرات طلا با استفاده از کمترین مربعات جزئی



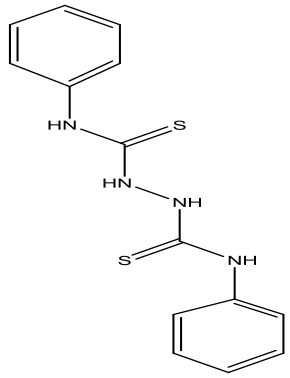
مقدمه

در این کار، روش جدید براساس تجمع نانوذرات طلا با روکش سیترات (AuNPs) برای تعیین همزمان بسیار انتخابی و حساس Hem و FA ارائه می‌شود. این روش مبتنی بر تفاوت در سینتیک تجمع نانوذرات طلا با روکش سیترات اصلاح شده با Nو N' – بی فنیل هیدرازین- ۱ و ۲- دی کربوتیوآمید (PHCA) [۱]در حضور Hem و FA است. با افزودن Hem/FA جذب در ۵۱۹nm کاهش و در ٦٦۰nm افزایش می‌یابد. تفاوت در پروفایل‌های سینتیک تجمع (افزایش جذب مشاهده شده برحسب زمان در ٦٦۰nm) برای تحلیل همزمان Hem/FA با رگرسیون کمترین مربعات جزئی (PLS) به عنوان یک روش کالیبره کردن چند متغیری کارآمد استفاده شد.

بهینه سازی غلظت معرف اصلاح گر

غلظت Nو N' – بی فنیل هیدرازین- ۱ و ۲- دی کربوتیوآمید (PHCA) (شماتیک۱-۳) نقش کلیدی در فرایند تجمع دارد و انتخابگری عامل را می‌توان به قابلیت اصلاح کننده در جمع شدن در اطراف نانوذرات با گروه‌های عاملی خاصی که می‌توانند به صورت انتخابی کمپلکس شوند یا پیوند هیدروژنی تشکیل دهند یا هر گونه برهمکنش دیگر با مواد ما داشته باشند، نسبت داده می‌شود. بنابراین می‌توانیم تعیین انتخابی همزمان انجام دهیم. هم چنین مشخص شد که با افزایش سطح عامل اصلاحی نانوذرات پوشش دار به همان دلایل که گفته شد بهترین سطح غلظت این اصلاح کننده $۱۰^{-۵} molL^{-۱}$ است که با نسبت ۱۰ به ۲۰ با ماده مورد آشکارسازی داشته با مواد ما تداخل ندارد بلکه می‌تواند قدرت انتخابگری را با برهمکنش و تجمع به دست آورد(شماتیک ۱-۳)[۳۷۲].

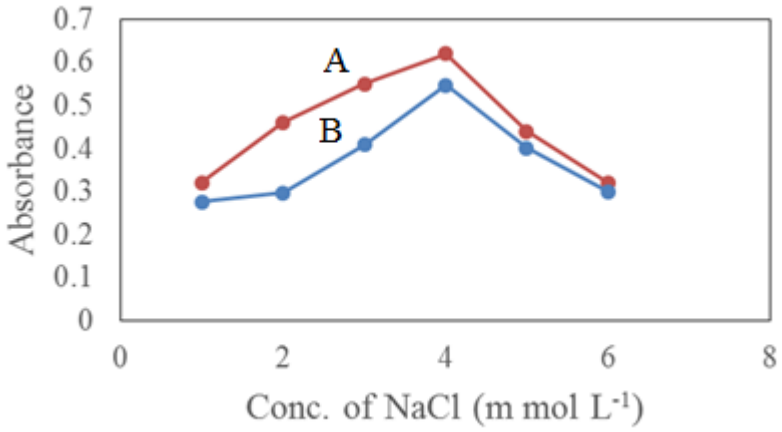
[۱] N,N' biphenyl hydrazine ۱,۲ dicarbothio amide



شماتیک ۳.۱. ساختار PHCA.

بهینه سازی غلظت NaCl

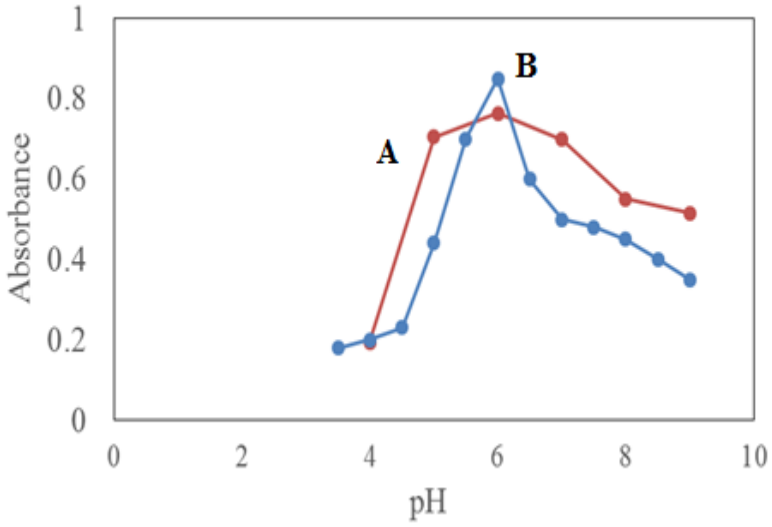
این نانوذرات معمولاً باردارند و بسیار حساس به تغییرات دی الکتریک محلول هستند. برای مثال، برای ذرات پایدار شده سیترات، افزایش NaCl بار سطحی را حفاظ می‌کند و منجر به کاهش فاصله بین ذره‌ای در نهایت تجمع ذرات می‌شود. قدرت یونی نقش مهمی در تجمع دارد که می‌تواند به قابلیت الکترولیت‌های قوی در تجمع در لایه دوگانه الکتریکی حاصل از عامل روکش دار نسبت داده شود. هم چنین مشخص شد که با افزایش قدرت یونی فراتر از یک حد معین، تجمع نانوذرات حتی در غیاب آنالیت‌ها القا می‌شود[٦٦]. مطابق شکل۲-۱، ٤ $mmol\ L^{-1}$ از NaCl به عنوان مقدار بهینه استفاده شد.



شکل ۲-۱ بهینه سازی قدرت یونی برای A) قرمز، Hem و B) آبی ، FA، غلظت NaCl از $٦ - ١\ m\ molL^{-١}$ زمان ۱۰ دقیقه ، pH٦، $PHCA١٠^{-٥}molL^{-١}$ ، تزریق $٤٠٠\mu L$ از Hem و FA($١٠^{-٤}molL^{-١}$) : AuNPs $١٠n\ molL^{-١}$.

بهینه سازی pH

به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل ، کربوکسیل و آمین در مواد، pH یک پارامتر مهم دیگر است که باید در نظر گرفته شود. برهمکنش‌های الکترواستاتیک مسئول اصلی تجمع AuNPs در حضور این مواد هستند[٦٧]. با در نظر داشتن این مسأله ، برای افزایش احتمال برهمکنش الکترواستاتیک، بهترین شرایط قابل حصول است که در آن ملکول‌های دارو در محیط نانوذرات در دسترس هستندو مطابق با شکل ۲-۲، AuNPs سنتز شده در محدوده pH٦ پایدار است و گونه‌ها نیز بهترین ساختار برای برهمکنش با AuNPs را در pH٦ داشتند. بنابراین pH٦ برای مطالعه بیشتر انتخاب شد[٦٨]. البته در بررسی pH بهینه از دیاگرام استوک مربوط به داروها نیز استفاده شده است که pH بهینه را تایید می کند.

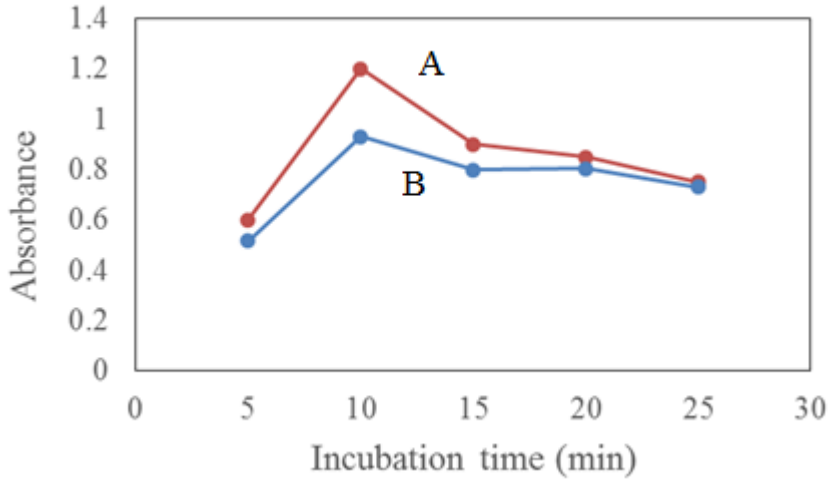


شکل ۲-۲ بهینه سازی pH برای A) قرمز، Hem و B) آبی ، FA ، pH از ۹-٤ ، زمان ۱۰ دقیقه، PH٦، $PHCA۱۰^{-٥}molL^{-۱}$، تزریق $٤۰۰\mu L$ از Hem و FA($۱۰^{-٤}molL^{-۱}$) : AuNPs $۱۰n\ molL^{-۱}$.

بهینه سازی زمان انکوبه شدن[۱]

زمان‌های انکوبه شدن مختلف برای یافتن مقدار بهینه بررسی شدند. نتایج نشان دادند که AuNPs دقیقاً پس از اختلاط با Hem و FA در شرایط بهینه شروع به تجمع کردندو سرکوب شدند و تغییر طیفی در ۱۰ دقیقه پس از آن به عنوان زمان بهینه انکوبه شدن قابل تشخیص بود. پس از این زمان به عنوان زمان پایان تحقیق شبیه سازی سینتیک استفاده شد.

[۱] Incubation time



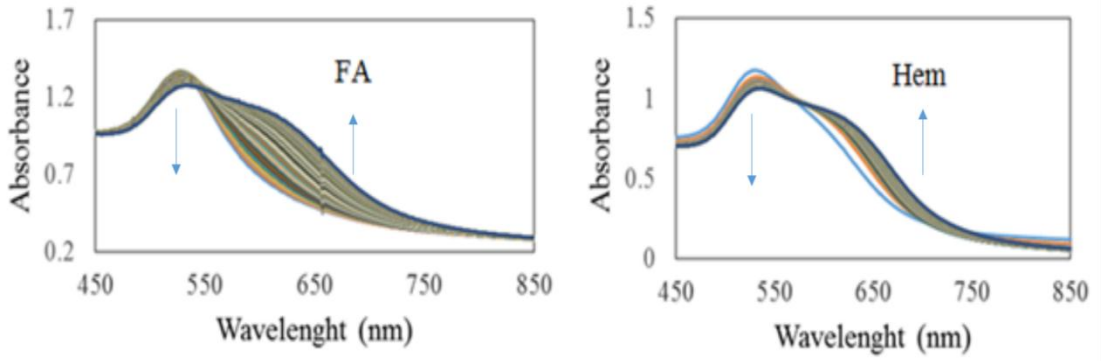
شکل ۲-۳.بهینه سازی زمان انکوبه شدن برای A) قرمز، Hem و B) آبی ، FA ، زمان از ۲۵-۵ دقیقه، pH٦، $PHCA ۱۰^{-٥} molL^{-۱}$، تزریق $٤۰۰ \mu L$ از Hem و FA($۱۰^{-٤} molL^{-۱}$) : AuNPs $.۱۰n\ molL^{-۱}$

توسعه مدل PLS

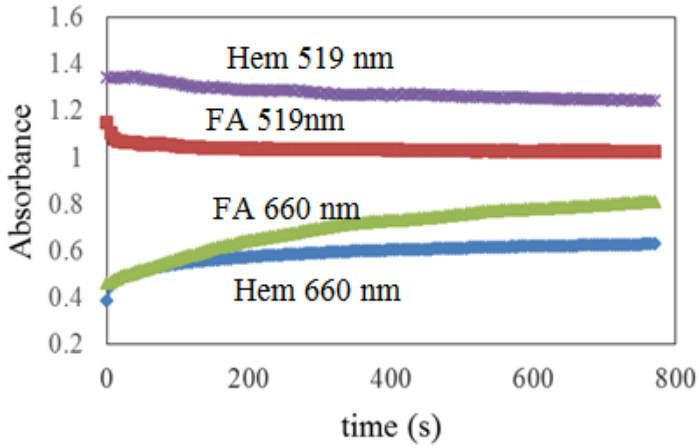
کالیبراسیون‌های رگرسیون کم‌ترین مربعات جزئی (PLSR[۱]) برای هر دو دارو با استفاده از الگوریتم NIPALS[۲] ساخته شد. یک مجموعه آزمایشی از ۱۹ نمونه استاندارد (١٤ نمونه به عنوان مجموعه کالیبراسیون و ٥ نمونه به عنوان مجموعه پیش بینی) از مخلوط‌های مختلف Hem و FA گرفته شد. ارتباط بین نمونه‌های کالیبراسیون مختلف باید اجتناب شود چرا که جزء هم خط در مجموعه آموزشی داده‌ها می‌توانند منجر به کمبود فیت (under- fitting) در مدل‌های PLS می‌شود [٦٩] .

[۱] Partial least square regression

[۲] non-linear iterative partial least squares



شکل ۲-٤ .تغییر در جذب AuNPs در ۵۱۹ و ٦٦۰nm با زمان برای تزریق BET و NEP($٤۰۰\mu L$ محلول $۱۰^{-٤} molL^{-۱}$)در هر شرایط بهینه از این گونه‌ها : قدرت یونی $٤mmolL^{-۱}$، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA۱۰^{-٥}molL^{-۱}$ ، pH٦، AuNPs $۱۰n\ molL^{-۱}$.



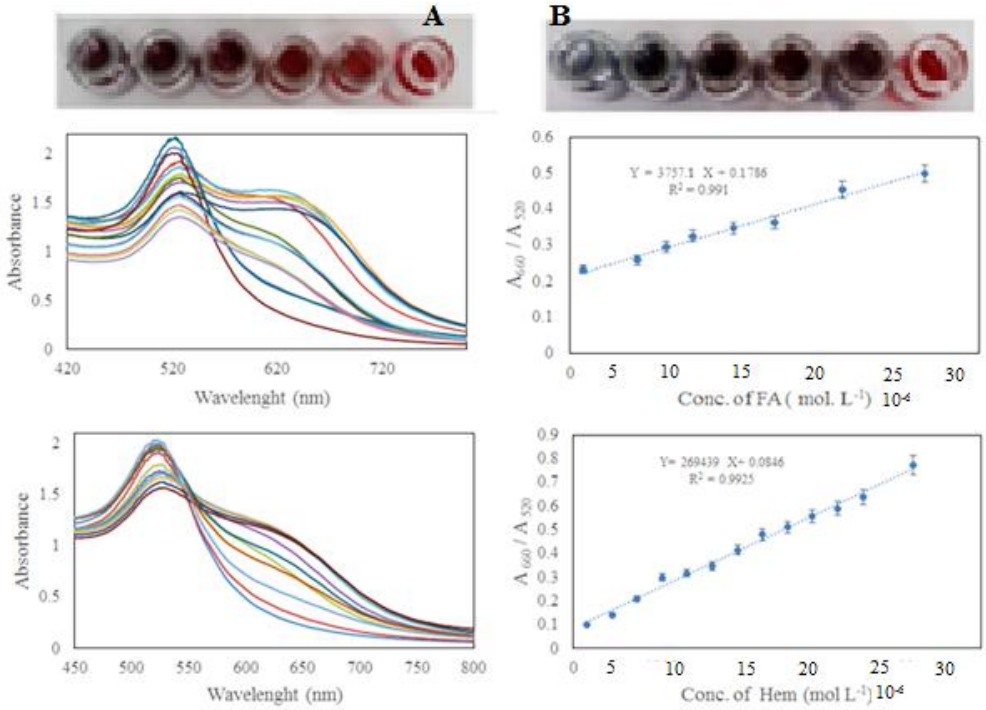
شکل ۲-۵.تغییر در جذب AuNPs در ۵۱۹ و ٦٦۰nm با زمان (نارنجی FA ۵۱۹، خاکستری FA٦٦۰، زرد Hem۵۱۹ ، آبی Hem٦٦۰) برای تزریق Hem و FA($٤۰۰\mu L$ محلول $۱۰^{-٤} mol\ L^{-۱}$) در هر شرایط بهینه از این گونه‌ها : قدرت یونی $٤mmolL^{-۱}$، ، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA۱۰^{-٥}molL^{-۱}$ ، pH٦، AuNPs $۱۰n\ mol\ L^{-۱}$.

محدوده خطی منحنی‌های کالیبراسیون

بدین منظور و تحت شرایط تجربی بهینه، یک منحنی کالیبراسیون معمولی برای تعیین Hem و FA با ترسیم نسبت جذب ($A_{٦٦۰}$ / $A_{۵۱۹}$) برحسب غلظت دارو به دست آمد. منحنی

کالیبراسیون در محدوده $۱/۰ \times ۱۰^{-۷} molL^{-۱}$ و $۲/۵ \times ۱۰^{-۶} - ۱/۰ \times ۱۰^{-۵} - ۲/۵ \times$ با $۱۰^{-۶} molL^{-۱}$ و $(R^۲ = ۰/۹۹۲۵) Y = ۲۶۹۴۳۹x + ۰/۰۸۴۶$ $(R^۲ = ۰/۹۹۱) Y =$ $۳۷۵۷/۱x + ۰/۱۷۸۶$ (شکل ۲-۶) خطی بود و حد تشخیص $۴/۹ \times ۱۰^{-۸}$ و $۲ \times ۱۰^{-۷} molL^{-۱}$ (n=۵) به ترتیب برای Hem و FA است. جداول۱-۳ و ۱-۲ یک پارامتر اعتبارسنجی و مقایسه بین نتایج حاصل با روش حاضر در مقایسه با نتایج سایر روش‌های گزارش شده در تعیین این مواد را نشان می‌دهند.

مطابق با جدول ۲-۱، روش حاضر حد تشخیص خوب و محدوده خطی بالا در مقایسه با روش هموگلوبین آزیر، روش w.w.Palmer، روش WTJ s ، روش اسپکتروفتومتری UV ، تعیین اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا(HPLC) دارد[۵۶]. باید تأکید کرد که مزایای اصلی این روش عبارتند از استفاده از روش بسیار ساده برای تعیین همزمان انتخابی و حساس این داروها.



شکل ۲-٦. منحنی کالیبراسیون A : برای FA $molL^{-1}$ ۱۰$^{-٧}$ × ۱/۰ − ۱۰$^{-٦}$ × ۲/۵ و B) برای Hem $molL^{-1}$ ۱۰$^{-٦}$ × ۱/۰ − ۱۰$^{-٥}$ × ۲/۵: قدرت یونی $\varepsilon mmolL^{-1}$۰، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA$۱۰$^{-٥}molL^{-1}$ ،pH٦ ،AuNPs ،۱۰$n\ molL^{-1}$.

جدول ۲-۱پارامترهای اعتبارسنجی روش برای اندازه گیری Hem و FA.

معادله	Y= ۲٦۹٤۳۹ X+ ۰/۰۸٤٦, Y = ۳۷۵۷/۱ X + ۰/۱۷۸٦
R^2	۰/۹۹۲۵, ۰/۹۹۱
حد تشخیص	٤/۹ ×۱۰$^{-٨}$ and ۲×۱۰$^{-٧}$ mol L^{-1}
ناحیه خطی	Hem ۲/۵ × ۱۰$^{-٥}$-۱/۰ × ۱۰$^{-٧}$ mol L $^{-1}$ and FA ۲/۵ × ۱۰$^{-٦}$-۱/۰ × ۱۰$^{-٦}$ mol L^{-1}

جدول ۲-۲ داده‌های عملکردی ویژه حاصل از روش اسپکتروفتومتری و سایر تکنیک‌ها برای تعیین Hemو FA.

روش اندازه گیری	ناحیه خطی($\mu g\ mL^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu g\ mL^{-1}$)	منبع
A: Hem			
روش هموگلوبینAzide	۸/٤-۱۰/٤× ۱۰$^{-٦}$	۳/۰ ×۱۰$^{-٦}$	[۷۰]
روش W. W. پالمر	۱۲-۱۲۰× ۱۰$^{-٦}$	٤/۰ × ۱۰$^{-٦}$	[۷۱]
روشWTJ’S	۵–۳۵×۱۰$^{-٦}$	۱/۵×۱۰$^{-٦}$	[۷۲]
B: FA			
روش اسپکترومتری UV	۵/۷-۱۱× ۱۰$^{-٦}$	۰/۳× ۱۰$^{-٦}$	[۷۳]
روش اسپکترومتری	۵-۵۰× ۱۰$^{-٦}$	۱/۲× ۱۰$^{-٦}$	[۷٤]
کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	۵– ۲۰۰× ۱۰$^{-٦}$	۱/۵× ۱۰$^{-٦}$	[۷۵]
روش اسپکتروفتومتری	۱/۰ × ۱۰$^{-۷}$-۲/۵ × ۱۰$^{-٦}$و ۱/۰ × ۱۰$^{-٦}$- ۲/۵ × ۱۰$^{-۵}$ mol L^{-1}	٤/۹×۱۰$^{-۸}$و ۲/۰× ۱۰$^{-۷}$ mol L^{-1}	این روش

تعیین همزمان Hem و FA

همان طور که گفته شد به منظور انتخاب تعداد فاکتورها در الگوریتم PLS یک روش اعتبار سنجی یک به یک[۱] با هر بار یک نمونه در بیرون استفاده شد. افزایش شدت هر گونه جذب

[۱] Cross validation

در۶۶۰nm ارتباط مستقیم با سطح Hem و / یا FA در نمونه دارد (شکل ۲-۷). سرعت تجمع AuNPs سنتز شده با سیترات با ثابت‌های متفاوت به Hem و FA مرتبط شد.

مجموعه‌های کالیبراسیون و پیش گویی با نظارت بر افزایش جذب در ۶۶۰nm جمع آوری شد و برای فرایند PLS استفاده شد. برای مجموعه مذکور شامل ۱۹ نمونه پروفایل سینتیک، PLS-۱ و PLS-۲ اجرا شد و استفاده از این کالیبراسیون‌ها میزان نمونه‌های بیرون مانده در زمان فرایند کالیبراسیون محاسبه شد. تغییر در PRESS[۱] در کالیبراسیون PLS-۲ به صورت تابعی از تعداد متغیر تاخیری PLS در شکل ۲-۷ داده شد. همان طور که می‌توان دید ۳ جزء برای ساخت مدل PLS-۲ کافی است. غیرخطی بودن در ارتباط جذب – غلظت و برهمکنش بین فاکتورها می‌تواند به عنوان منابع دیگر فاکتورهای شیمیایی در نظر گرفته شود.

مقادیر پیشگوی شده از میزان Hem و FA در نمونه‌های کالیبراسیون و پیش گویی و خطاهای نسبی آن‌ها در پیش گویی در جداول ۲-۳، ۲-٤ و ۲-۵ فهرست شد. مشاهده شد که مقادیر پیش گویی شده بسیار به مقادیر حقیقی نزدیک بودند و خطاهای پیش گویی نسبی تقریباً کم‌تر از ۵٪ هستند. این موفقیت رگرسیون PLS را در پیش گویی دقیق مقادیر Hem و FA در نمونه‌ها تایید می‌کند. این که مقایسه نتایج کالیبراسیون چند متغیری $PLS_۱$ و $PLS_۲$ منجر به تولید مدل بهتر می‌شود یا خیر مفید است. به این منظور و برای تایید مدل ها، برخی پارامترهای آماری از جمله ریشه مربع خطای متوسط پیش گویی[۲] (RMSEP)، ریشه مربع خطای میانگین کراس و لیدیشن (RMSECV)[۳] و ریشه مربع خطای متوسط کالیبراسیون (RMSEC)[٤]

[۱] predicted residual error sum of squares
[۲] Root mean square error of prediction
[۳] Root mean square error of cross validation
[٤] Root mean square error of calibration

محاسبه شدند. پارامترهای آماری محاسبه شده در جداول ۵-۳ مشاهده می‌شود. در جداول ٤-۳ می‌توان دید که نتایج کالیبراسیون و پیش گویی PLS سازگارتر از کالیبراسیون تک متغیری است.

جدول ۲-۳ سطح مقدار مرجع Hem و FA در مجموعه پیش گویی با مدل سازی PLS طیف‌های UV-Vis در ٦٦٠nm

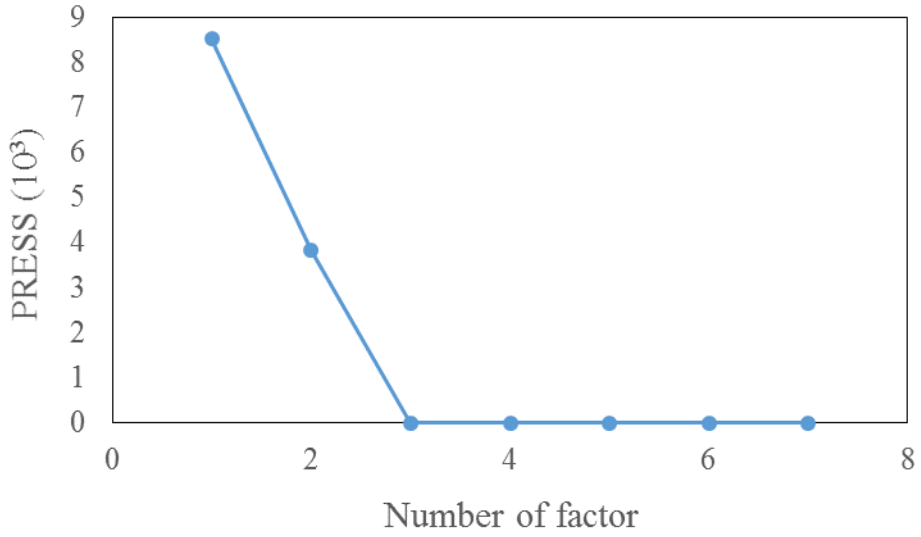
دسته پیش بینی						
شماره	مقادیر رفرنس برای هموگلوبین	مقادیر رفرنس برای فولیک اسید	مقادیر پیش بینی شده			
			PLS_1		PLS_2	
۱	۳۷۰	۳۳۰	۳٦٤/۸۷۳	۳۳۲/٥۱۳۸	۳٦٤/۹۱۰۷	۳۳۲/٥۳۲۷
۲	۷۰۰	۷۳۰	۷۰۲/٤۱۸٥	۷۳۱/٤۷٦۸	۷۰۲/۲٦٦٦	۷۳۱/۳۸۲٥
۳	۸۲۰	۸۲۰	۸۱۷/٦٤۳٥	۸۱۸/۲٦۷۹	۸۱۷/۸۳۱۹	۸۱۸/۳۹۰٦
٤	٦۷۰	٦۳۰	٦۸٥/۳۲٥٤	٦۲۹/۹۹۸	٦۸٥/۲٤٥٤	٦۲۹/۹٤٦۸
٥	۸٤۰	۷۷۰	۸۲۹/۸٦٥٥	۷٦۹/۳٤۷٤	۸۲۹/۸٥۷٤	۷٦۹/۳٤۲۷
	R.S.E. (%)		۱.۲۳	۰.۲۲	۱.۲٤	۰.۲۳
$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}j - Cj)^2}{\sum_{J=1}^{N}(Cj)^2}\right]^{1/2} \times 100$						
$R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{M}\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}ij - Cij)^2}{\sum_{J=1}^{M}\sum_{J=1}^{N}(Cij)^2}\right]^{1/2} \times 100$						۰/۹۰

جدول۲-٤. مقدار مرجع Hemو FA در مجموعه کالیبراسیون با مدل سازی PLS طیف‌های UV-Vis در ٦٦۰nm.

دسته کالیبراسیون					
شماره	مقادیر رفرنس برای هموگلوبین	مقادیر رفرنس برای فولیک اسید	مقدار پیش بینی شده		
			$PLS_۱$		$PLS_۲$
۱	۱۷۵	۱۹۰	۱۷۵/۸۰۹۵	۱۹۲/٤٦۲۲	۱۷٥/۷٦۷۱	۱۹۲/٤۸۱
۲	٦٥	۷۰	٦۷/٥۱	۷۱/۱٤۲٦	٦۷/٤۷۹۳۷	۷۱/۱٥٥۹۷
۳	۳٥٥	٤۳٥	۳٥٦/۱٥٥۹	٤۳۱/۷٥۷۹	۳٥٦/۳۰۳٦	٤۳۱/٦۹۷۱
٤	۳٦۰	٤٤۰	۳٥٦/۱٥٥۹	٤۳۱/۷٥۷٤	۳٥٦/۳۰۳٦	٤۳۱/٦۹٦٦
٥	٤۰۰	۳۷۰	٤۰۱/۱۸۸	۳۷۲/۲۳٤٦	٤۰۱/۱۰۹۹	۳۷۲/۲۷۱
٦	٤۷٥	٦۳٥	٤۷۳/۲٥۲۸	٦۳۰/٦٤۱۹	٤۷۳/۲۷٦۹	٦۳۰/٦۳۲۸
۷	۳۸۰	٤۸۰	۳۸۰/٤۲۹٥	٤۸۲/۸٥۱۹	۳۸۰/٤٤٥۲	٤۸۲/۸٤٦٥
۸	۲۰۰	۲٥٥	۱۹۸/۹۹۳۳	۲٥۹/۳۷۲۳	۱۹۸/۹۲۸۳	۲٥۹/٤۰۰۲
۹	۳٤٥	٥۰۰	۳٤۲/٤۲۰٤	٤۹٤/۷۱٦۱	۳٤۲/٤۸٤٥	٤۹٤/٦۸۹۲
۱۰	۳٥۰	٥۲٥	۳٥۱/۱٦٥٦	٥۲٤/۱۸۳۷	۳٥۱/۲٤٦۷	٥۲٤/۱٤۹٥
۱۱	۲۳۰	۲۹٥	۲۳۰/۹۳٤۷	۲۹۹/٥۱۲۲	۲۳۰/۷۹۹٤	۲۹۹/٥٦۹۹
۱۲	۲۷۰	۳۷٥	۲٦۹/۲۷۹٦	۳۷٥/۹۰۳۹	۲٦۹/۱٦۱۷	۳۷٥/۹٥٤
۱۳	۳۲٥	٥۰۰	۳۲۷/۰۳۰۹	٤۹۹/٤۰٦٤	۳۲٦/۹۹۹	٤۹۹/٤۱۹٦
۱٤	۲۸٥	٤۰۰	۲۸۷/۸٤۹۱	٤۱۳/۱٦۸	۲۸۷/٦۸٦۲	٤۱۳/۲۳٦۹
		R.S.E. (%)	۰/٥۸۳	۱/۲٤	۰/٥۹۷	۱/۲۰
		$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=۱}^{N}(C\hat{}j-Cj)۲}{\sum_{J=۱}^{N}(Cj)۲}\right] ۱/۲ \times ۱۰۰$				
		$R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=۱}^{M}\ \sum_{J=۱}^{N}(C\hat{}ij-Cij)۲}{\sum_{J=۱}^{M}\ \sum_{J=۱}^{N}(Cij)۲}\right] ۱/۲ \times ۱۰۰$				۱/۰٤

جدول ۲-۵.پارامترهای آماری مدل‌های کالیبراسیون $\boldsymbol{PLS_1}$ و $\boldsymbol{PLS_2}$ توسعه یافته برای تعیین همزمان Hemو FA با داده‌های سینتیک

پارامترهای اماری	مدل پیش بینی	
	PLS۱ (%)	PLS۲ (%)
RMSEP	۲/۱۱	۲/۱۳
RMSECV	۱/۹۲	۱/۹٤
RMSEC	۳/۹٦	۳/۹۹



شکل ۲-۷ منحنی PRESSدر برابر فاکتورها برای Hemو FA.

بررسی مزاحمت

تاثیر مواد خارجی همراه مانند ناپروکسن، اسکوربیک اسید ، ترامادول، کدئین، استامینوفن، ساکاریدها ، آمینواسیدها و یون‌ها تست شد. مطابق جدول ۲-٦ برخی از مواد همراه بررسی شده

مزاحمت جدی در آزمایش نداشتند. از این نتایج ، مزاحمت ناپروکسن، اسکوربیک اسید، Na_2NO_2 ، گلوکز، سوکروز، فروکتوز و لاکتوز، لیسین، تریپتوفان، آسپارژین، گلوتامین، والین و تیروزین بسیار ضعیف بودند. در میان مواد تست شده K^+، Na^+، NO_3^-، I^-، Cl^-، Mg^{2+}، Fe^{3+}، Ca^{2+} و کدئین می‌توانند با غلظت‌های نسبتاً بالا مجاز باشند ولی سیستئین ، سفکسیم، NH_2OH، Mn^{2+}، Cd^{2+}، So_4^{2-}، Ca^{2+}، Zr^{2+}، Co^{2+}، Zn^{2+}، Ni^{2+}، Al^{3+}، Fe^{3+}، Cu^{2+}، Pb^{2+} با غلظت‌های نسبتاً کم مجاز هستند. غلظت‌های مجاز این مواد مزاحم ولی هنوز بالاتر از Hem و FA بود که نشان دهنده این است که این روش انتخابگری خوب بین داروها و سایر گونه‌ها دارد.

جدول ۲-٦- تست‌هایی برای مواد مزاحمت در تعیین همزمان Hem و FA در شرایط بهینه : قدرت یونی $۱۰n\ molL^{-۱}$ ،AuNPs ،pH٦ ، $PHCA۱۰^{-٥}molL^{-۱}$ ، زمان ۱۰ دقیقه، $٤mmolL^{-۱}$

گونه	غلظت قابل تحمل (یون مزاحم :(Hem : FA) انالیت)
$Na۲NO۲$ساکارز اسکوربیک اسید ناپروکسن فروکتوز گلوکز لاکتوز لوسین تریپتوفان والین گلوتامین اسپارجین تایروزین	۱ : ۱: ۵۰۰
K+, Na+, NO۳-, I-, Cl-, , Mg۲+, Fe۳+, کدیین$Ca۲+$,	۱ : ۱: ۳۰۰
ترامادول سیستیین سفکسیم ,$NH۲OH, Mn۲+$, $Cd۲+, SO٤۲-, Ca۲+,Zr۲+,Co۲+, Zn۲+, Ni$ $۲+, Al\ ۳+, Fe\ ۲+, Cu۲+, Pb۲+$	۱ : ۱ : ۱۰۰

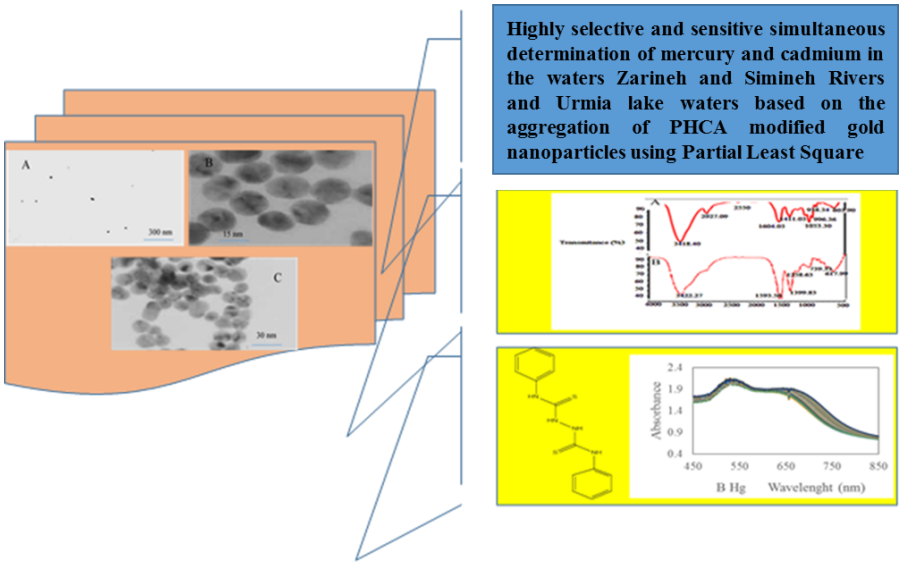
تجزیه نمونه حقیقی

برای بررسی قابلیت استفاده از روش پیشنهادی، آن را در تعیین Hem و FA در نمونه‌های سرم خون استفاده کردیم. مدل PLS حاصل در تخمین غلظت Hem و FA در این نمونه‌ها استفاده شد. نتایج حاصل نشان می‌دهند که بازیابی خوبی (٪۱۰٤/۰- ۹۱/۰) انجام شده است (جدول ۲-۷). نتایج کارایی بالقوه این روش را برای آشکارسازی همزمان Hem و FA در نمونه‌های حقیقی نشان می‌دهد.

جدول ۲-۷ تجزیه نمونه سرم خون رقیق شده برای Hem و FA : قدرت یونی $٤mmolL^{-١}$، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA١٠^{-٥}molL^{-١}$ ، pH٦، AuNPs، $.١٠n\ molL^{-١}$

نمونه	مقدار اضافه شده ($mol\ L^{-1}$)		مقدار پیدا شده ($mol\ L^{-1}$)		بازده (٪)	
	Hem	FA	Hem	FA	Hem	FA
نمونه سرم خونی	۰	۰	$٦/١٣\times ١٠^{-٧}$	$٤/٣ \times ١٠^{-٥}$	–	–
	$١/٠\times ١٠^{-٧}$	$١/٠\times ١٠^{-٥}$	$٧/١٧\times ١٠^{-٧}$	$٥/٣٣\times ١٠^{-٥}$	١٠٤/٠	١٠٣/٠
	$٢/٠\times ١٠^{-٧}$	$٢/٠\times ١٠^{-٥}$	$٨/٠٨\times ١٠^{-٧}$	$٦/١٢ \times ١٠^{-٥}$	٩٧/٥	٩١/٠
	$٣/٠\times ١٠^{-٧}$	$٣/٠\times ١٠^{-٥}$	$٩/١٩\times ١٠^{-٧}$	$٧/٤١ \times ١٠^{-٥}$	١٠٢/٠	١٠٣/٧

۳- تعیین همزمان بسیار حساس و انتخابی جیوه و کادمیم در آب‌های رودخانه‌های زرینه و سیمینه و دریاچه ارومیه براساس تجمع نانوذرات طلای اصلاح شده با PHCA با استفاده از کم‌ترین مربعات جزئی

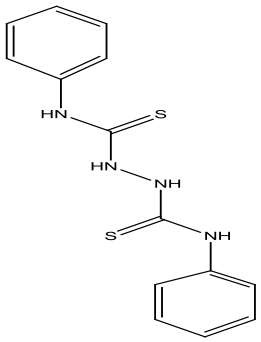


مقدمه

در این کار روش جدید براساس تجمع نانوذرات طلا (AuNPs) با پوشش سیترات برای تعیین همزمان بسیار انتخابی و حساس $Hg_{۲}^{۲+}$ و $Cd^{۲+}$ ارائه می‌شود. روش مبتنی است بر تفاوت در سینتیک تجمع نانوذرات طلا با پوشش سیترات اصلاح شده با Nو N' - بی فنیل هیدرازین- ۱و۲- دی کربوتیوآمید (PHCA) در حضور $Hg_{۲}^{۲+}$ و $Cd^{۲+}$. با افزایش $Hg_{۲}^{۲+}$ و $Cd^{۲+}$ جذب در ۵۲۰nm کاهش و در ٦٦۰nm افزایش می‌یابد. تفاوت در پروفایل‌های سینتیک تجمع (افزایش جذب مشاهده شده بر حسب زمان در ٦٦۰nm) برای شبیه سازی تجزیه $Hg_{۲}^{۲+}$ و $Cd^{۲+}$ با استفاده از رگرسیون کم‌ترین مربع جزئی (PLS) به عنوان یک روش کالیبراسیون چند متغیره مؤثر استفاده شد.

بهینه سازی غلظت عامل اصلاح کننده

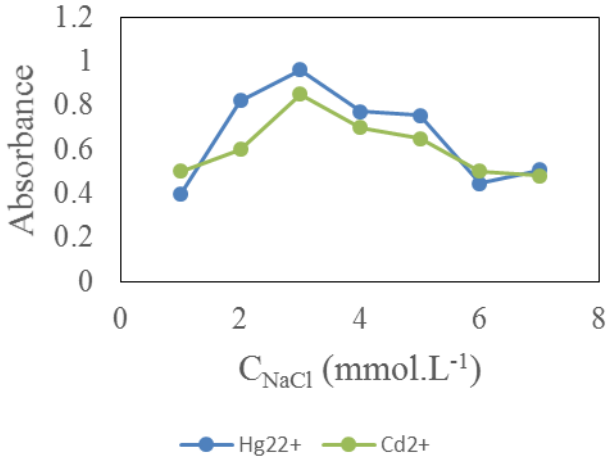
غلظت عامل اصلاحی N و N'- بی فنیل هیدرازین دی تیوکربوآمید (PHCA) (شماتیک ۲-۳) نقش کلیدی در فرایند تجمع داردکه در آن انتخابگری عامل را می‌توان به توانایی اصلاح کننده در محدود کردن محیط نانوذرات با گروه‌های عاملی خاص نسبت داد که می‌تواند به صورت انتخابی کمپلکس شوند یا پیوند هیدروژنی بدهند یا بر همکنش دیگری با مواد مورد نظر ما داشته باشند. لیگاندهای متعدد با اتم‌های دهنده مختلف به صورت یونوفورهای فلزات سنگین در حضور یون‌های مزاحم بررسی شده‌اند و PHCA نشان داد چگونه از کاتیون‌های قلیایی و قلیایی خاکی به کاتیون‌های فلزات واسطه و سنگین با جایگزینی گروه‌های متصل اکسیژنی سخت با رابط‌های گوگردی نرم جابجا می‌شود. براساس گرایش $Hg_{۲}^{۲+}$ و $Cd^{۲+}$ برای اتم‌های گوگرد نرم[۳۷۲,۳۸۳].



شکل۳-۱ ساختار PHCA.

بهینه سازی غلظت NaCl

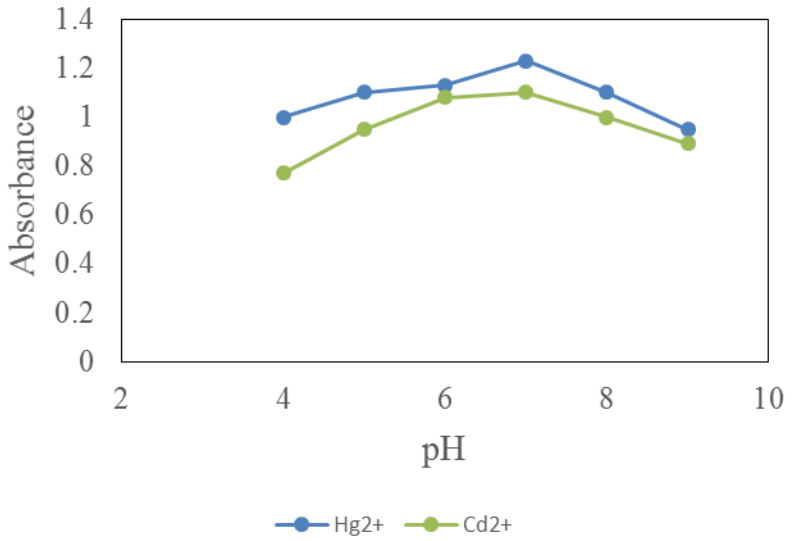
این نانوذرات معمولاً باردارند و بسیار حساس به تغییرات دی الکتریک محلول هستند. برای مثال، برای ذرات پایدار شده سیترات، افزایش NaCl بار سطحی را حفاظ می‌کند و منجر به کاهش فاصله بین ذره‌ای در نهایت تجمع ذرات می‌شود. قدرت یونی نقش کلیدی در فرایند تجمع دارد که می‌تواند به قابلیت الکترولیت‌های قوی به محدود کردن لایه دو گانه الکتریکی حاصله از عامل پوشش نسبت داده شود. هم چنین مشخص شد که با افزایش قدرت یونی به بالاتر از یک حد معین، تجمع نانوذرات حتی در غیاب آنالیت‌ها القا می‌شود[٦٦]. همان طور که می‌توان در شکل۳-۲دید، ۳mmol L^{-1} NaCl به عنوان مقدار بهینه استفاده شد.



شکل ۳-۲ بهینه سازی قدرت یونی برای $Hg_2^{2+}(A)$ و $Cd^{2+}(B)$، pH از ۷، قدرت یونی $1 - 7mmolL^{-1}$ زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA 10^{-5}molL^{-1}$، تزریق $200\mu L$ از Hg_2^{2+}و Cd^{2+} $(10^{-4}molL^{-1})$: AuNPs $10nmolL^{-1}$. λ_{max}= 660 nm

بهینه سازی pH

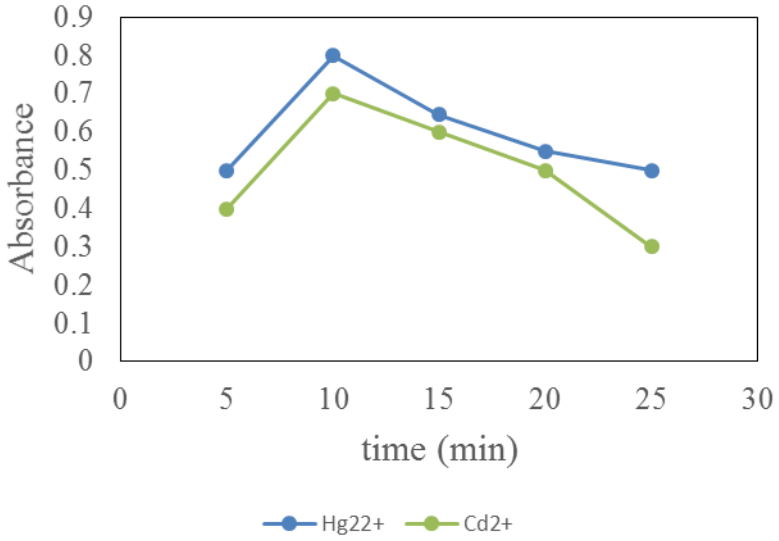
به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل ، کربوکسیل و آمین در مواد، pH یک پارامتر کلیدی است که باید در نظر گرفته شود. برهمکنش‌های الکترواستاتیک مسئول اصلی تجمع AuNPs در حضور مواد ما است. با در نظر گرفتن این مسأله ، برای افزایش برهمکنش الکترواستاتیک، بهترین شرایط قابل حصول است که در آن ملکول‌های دارو در محیط نانوذره در دسترس هستند. مطابق شکل ۳-۳ ، AuNPs سنتز شده در محدوده pH۷ پایدار است و گونه‌ها نیز بهترین ساختار را برای برهمکنش با AuNPs در pH۷ و pHهای بازی دارند، این یون‌های فلزی می‌توانند به شکل رسوب هیدروکسید تغییر یابند. بنابراین pH۷ برای تحقیقات بیش‌تر انتخاب شدند[۶۹].



شکل ۳-۳ بهینه سازی pH برای $Hg^{2+}(A)$ و $Cd^{2+}(B)$، pH از ٤ تا ۹، زمان ۱۰ دقیقه، قدرت یونی $3mmolL^{-1}$ ، $PHCA10^{-5}molL^{-1}$، تزریق $200\mu L$ از Hg^{2+} و Cd^{2+} ($10^{-4}molL^{-1}$) : AuNPs $10nmolL^{-1}$.

بهینه سازی زمان انکوبه کردن

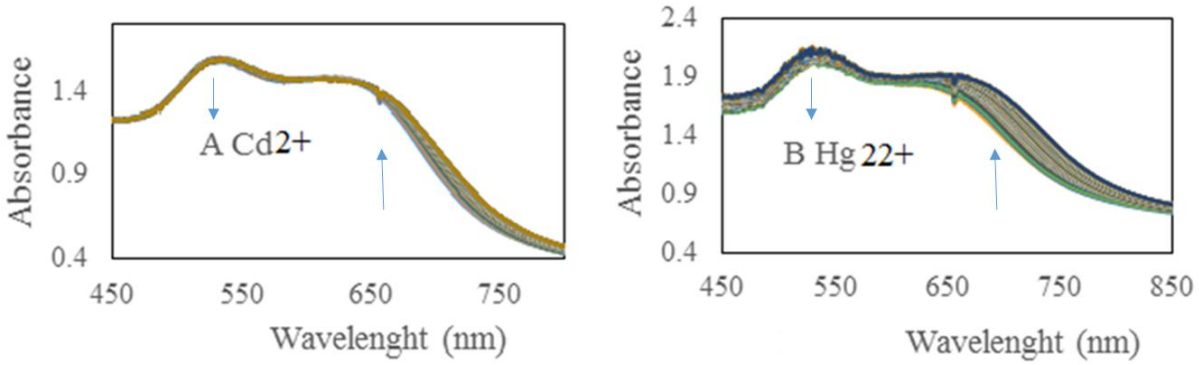
زمان‌های مختلف انکوبه کردن برای یافتن مقدار بهینه بررسی شد. نتایج نشان دادند که AuNPs دقیقاً پس از مخلوط شدن با Hg^{2+} و Cd^{2+} در شرایط بهینه شروع به تجمع کردند و تغییر طیفی در ۱۰ دقیقه قابل تشخیص است که به عنوان زمان بهینه انتخاب می‌شود. بنابراین ما از این محدوده زمانی به عنوان زمان پایان تحقیق سینتیک همزمان استفاده کردیم (شکل ۳-٤).



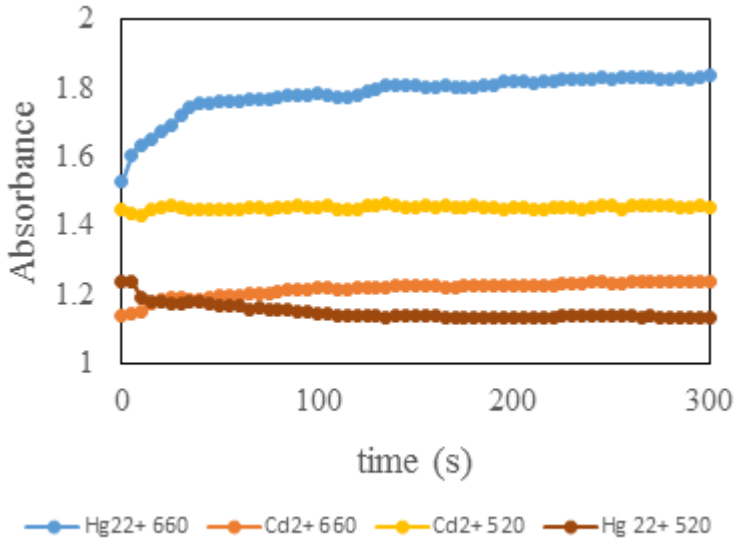
شکل۳-٤ بهینه سازی زمان انکوباسیون برای $Hg_2^{2+}(A)$، و $Cd^{2+}(B)$،مقدار pH برابر ۷ ، زمان ۲۵-۵ دقیقه، قدرت یونی $3mmolL^{-1}$ ، $PHCA10^{-5}molL^{-1}$، تزریق $200\mu L$ از Hg_2^{2+} و Cd^{2+} $10nmolL^{-1}$ AuNPs : $(10^{-4}molL^{-1})$

توسعه مدل PLS

کالیبراسیون‌های رگرسیون کم‌ترین مربع جزئی (PLSR) برای هر دو دارو با استفاده از الگوریتم NIPALS تهیه شد. یک مجموعه آموزشی از ۱۹ نمونه استاندارد(١٤ نمونه کالیبراسیون و ۵ نمونه پیش بینی) از مخلوط‌های مختلف Hg_2^{2+}و Cd^{2+} تهیه شد. ارتباط بین نمونه‌های کالیبراسیون مختلف باید اجتناب شود چون جزء هم خط در داده‌های مجموعه آموزشی باعث عدم فیت شدن در مدل‌های PLS می‌شود[٦٧](شکل ۳-۵ و۳-٦).



شکل ۳-۵ تغییر در جذب AuNPs در ۵۲۰ و ٦٦٠nm با زمان ، تزریق ۲۰۰µL از Hg_2^{2+}و Cd^{2+} ($10^{-4}molL^{-1}$) در هر شرایط بهینه از این گونه ها، قدرت یونی $3mmolL^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، pH۷ $PHCA10^{-5}molL^{-1}$ AuNPs $10nmolL^{-1}$.



شکل ۳-٦تغییر در جذب AuNPs در ۵۲۰ و ٦٦٠nm با زمان، تزریق ۲۰۰µL از Hg_2^{2+} و Cd^{2+} ($10^{-4}molL^{-1}$) در هر شرایط بهینه از این گونه ها، قدرت یونی $3mmolL^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، pH۷ $PHCA10^{-5}molL^{-1}$ AuNPs $10nmolL^{-1}$

محدوده خطی منحنی‌های کالیبراسیون

بدین منظور تحت شرایط تجربی بهینه، یک منحنی کالیبراسیون عادی برای تعیین Hg_2^{2+} و Cd^{2+} با ترسیم نسبت جذب ($A_{۶۶۰}/A_{۵۲۰}$) بر حسب غلظت دارو به دست آمد. منحنی کالیبراسیون در محدوده $۳/۳۳ \times ۱۰^{-۵}$ تا $۳/۳۳ \times ۱۰^{-۶} molL^{-۱}$ و $۲/۰ \times ۱۰^{-۵} - ۱/۰ \times ۱۰^{-۶} molL^{-۱}$ با معادله های(Y=۲۷۳۳٤X+۰/۰۷۸٤ $R^2 = ۰/۹۹۵$) و (Y=۳٦۷۳۷X+۰/۲٦٦۲ $R^2 = ۰/۹۹۰۱$) (شکل ۳-۷) بدست آمد که حد تشخیص $۱/۲۱ \times ۱۰^{-۷}$و $۰/۵ \times ۱۰^{-۷} molL^{-۱}$ (n=۵) به ترتیب برای Hg_2^{2+}و Cd^{2+} بود. جدول ۳-۱ یک پارامتر تأیید و مقایسه بین نتایج حاصل با روش حاضر با روش‌های دیگر را برای تعیین این مواد نشان می‌دهند.

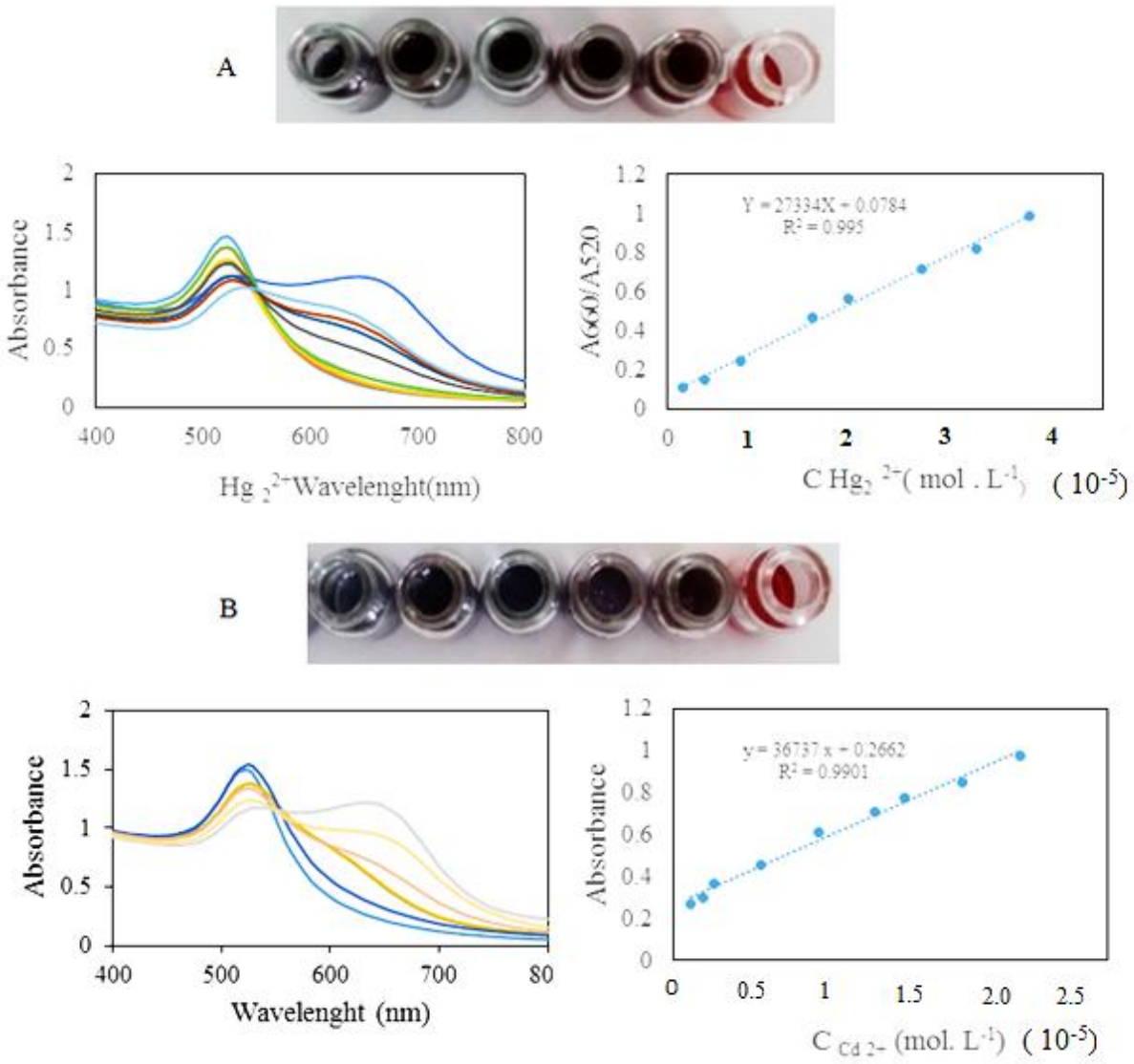
این روش حد تشخیص خوب و محدوده خطی بهتر از طیف سنجی جذب اتمی الکتروشیمیایی[۱] (ETAAS)، طیف سنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی[۲] (ICP-MS) ، طیف سنجی جرمی پلاسمی جفت شده القایی تبخیر الکتروترمال[۳] (EVICP-MS) و طیف سنجی جذب اتمی (AAS)[٤] دارد[۷٦].

[۱] Electrochemical atomic absorption spectrometry

[۲] inductively coupled plasma mass spectrometry

[۳] electro - thermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry

[٤] atomic absorption spectrometry



شکل ۳-۷-منحنی کالیبراسیون Hg_2^{2+}و Cd^{2+} در شرایط بهینه، قدرت یونی $3mmolL^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA10^{-5}molL^{-1}$ pH۷، $10nmolL^{-1}$ AuNPs.

جدول ۳-۱ .داده‌های عملکردی اختصاصی حاصل از روش اسپکتروفتومتری و سایر تکنیک‌ها برای تعیین Cd^{2+} و Hg_2^{2+}.

روش اشکار سازی	ناحیه خطی ($\mu g\ mL^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu g\ mL^{-1}$)	منبع
A) Cd^{2+}			
طیف سنجی جذب اتمی الکتروشیمیایی	۱-۱۰۰× ۱۰$^{-6}$	۰/۳۶ ×۱۰$^{-6}$	[۷۶]
ICP-MS [b]	۵–۳۵×۱۰$^{-6}$	۱/۵×۱۰$^{-6}$	[۷۷]
EVICP-MS [c]	۰/۱–۱۵۰ ×۱۰$^{-6}$	۰/ ۰۸ ×۱۰$^{-6}$	[۷۸]
B: Hg_2^{2+}			
طیف سنجی جذب اتمی الکتروشیمیایی	۲–۷۰ × ۱۰$^{-6}$	۰/۴۸× ۱۰$^{-6}$	[۷۶]
AAS [d]	۱–۱۵× ۱۰$^{-6}$	۰/۵	[۷۷]
EVICP-MS [c]	۰/۵–۱۲۰×۱۰$^{-6}$	۰/۰۲۰×۱۰$^{-6}$	[۷۸]
روش اسپکترو متری	۳/۳۳ × ۱۰$^{-5}$ – ۳/۳۳ × ۱۰$^{-}$ ^{6} and ۲/۰ × ۱۰$^{-5}$ – ۱/۰ × ۱۰$^{-}$ ^{6} mol L^{-1} for Hg_2^{2+} and Cd^{2+}	۱/۲۱×۱۰$^{-7}$ and ۰/۵ ×۱۰$^{-7}$ mol L^{-1} For Hg_2^{2+} and Cd^{2+}	This work

تعیین همزمان Hg_2^{2+} و Cd^{2+}

همان طور که گفته شد برای انتخاب تعداد فاکتورها در الگوریتم PLS یک روش تأیید عرضی یکی در بیرون در هر زمان استفاده شد. افزایش شدت جذب در ٦٦٠nm ارتباط مستقیم با سطح Hg_2^{2+}و Cd^{2+} در نمونه دارد (شکل ۳–۸). سرعت تجمع AuNPs سنتز شده با سیترات با مقدار Hg_2^{2+}و Cd^{2+} با ثابت‌های مختلف ارتباط داشت. نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی با رصد کردن افزایش جذب در ٦٦٠nm جمع آوری شده در فرایند PLS استفاده شد. بررسی مجموعه مذکور شامل ۱۹ نمونه پروفایل‌های سینتیک و الگوریتم‌های PLS_1 و PLS_2 اجرا شد و با استفاده از این کالیبراسیون‌ها مقدار نمونه‌های بیرون مانده در فرایند کالیبراسیون محاسبه شد.تغییر در PRESS در کالیبراسیون PLS_2 به صورت تابعی از تعداد متغیرهای تأخیری PLS در شکل ۳–۸ داده شده است . همان طور که می‌توان دید ۳ جزء برای ساخت مدل PLS_2 کافی است. غیر خطی بودن در ارتباط جذب – غلظت و برهمکنش بین فاکتورها می‌تواند به عنوان منبع دیگری از فاکتورهای شیمیایی در نظر گرفته شود.

جدول ۳-۲ مقدار مرجع $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ در مجموعه پیش بینی با مدل سازی PLS طیف UV-Vis در ۶۶۰nm.

	دسته پیش بینی					
			مقادیر پیش بینی شده			
شماره	مقدار رفرنس $Hg_{۲}^{۲+}$	مقدار رفرنس $Cd^{۲+}$	$PLS_{۱}$		$PLS_{۲}$	
۱	۱۹۰	۲۲۰	۲۲۱/۳۰	۱۹۶/۷۶	۱۹۵/۹۰	۲۲۱/۹۰
۲	۸۰	۷۰	۶۷/۶۱	۷۷/۲۳	۷۷/۱۰	۶۷/۵۹
۳	۲۶۰	۳۰۰	۲۹۷/۸۵	۲۵۴/۳۲	۲۵۵/۱۱	۲۹۷/۲۱
۴	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۲/۱۳	۱۳۸/۹۳	۱۳۹/۰۸	۱۴۱/۹۷
۵	۱۶۰	۱۸۰	۱۸۰/۸۹	۱۶۲/۸۳	۱۶۲/۶۳	۱۸۱/۲۵
	R.S.E. (%)		۰/۹۴۳	۲/۱۹۷	۲/۴۷۱	۱/۰۷۵
	$R.S.E.(\%) = \frac{\left[\frac{\sum_{J=۱}^{N}(c^{j}-cj)^{۲}}{\sum_{J=۱}^{N}(cj)^{۲}}\right]^{۱}}{۲} \times ۱۰۰$					
	$R.S.E.t(\%) = \frac{\left[\frac{\sum_{J=۱}^{M}\ \sum_{J=۱}^{N}(C^{ij}-Cij)^{۲}}{\sum_{J=۱}^{M}\ \sum_{J=۱}^{N}(Cij)^{۲}}\right]^{۱}}{۲} \times ۱۰۰$					۱/۵۷۱

مقادیر پیش بینی شده برای $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ در نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی و خطاهای نسبی متناظر آنها در جدول‌های ۳-۲، ۳-۳ و ۳-۴ آمده است. مشاهده شد که مقادیر پیش گویی بسیار نزدیک به مقادیر واقعی هستند و خطاهای پیش بینی نسبی تقریباً کم‌تر از ۶.۰٪ است. این تأیید کننده موفقیت رگرسیون PLS برای پیش بینی دقیق مقدار $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ در نمونه ها.

مقایسه نتایج کالیبراسیون چند متغیری PLS_1 و PLS_2 برای بررسی این که مدل دقیق تری ایجاد شده یا خیر مفید است. برای این مقایسه و تأیید مدل‌ها برخی پارامترهای آماری از جمله خطای مربع میانگین ریشه پیش بینی (RMSEP) ، خطای میانگین ریشه تأیید متقاطع (RMSECV) و مربع میانگین ریشه کالیبراسیون (RMSEC) محاسبه شد. پارامترهای آماری محاسبه شده در جدول ۳-٤ آمده‌اند. از جدول ۳-۳ می‌توان دید که کالیبراسیون و پیش بینی PLS بهتر از کالیبراسیون تک متغیری است.

جدول ۳-۳ مقدار مرجع Hg_2^{2+}و Cd^{2+} در مجموعه کالیبراسیون با مدل سازی PLS طیف UV-Vis در ٦٦٠nm.

دسته کالیبراسیون						
مقادیر پیش بینی شده				مقادیر رفرنس	مقادیر رفرنس	شماره
PLS_2		PLS_1		Cd^{2+}	Hg_2^{2+}	
٢٤٥/٩٧	٢٦٢/١٨	٢٤٥/٩٧	٢٦٢/١٨	٢٥٠	٢٦٠	١
٢٦١/١٤	٢٧٨/٣٦	٢٦١/١٤	٢٧٨/٣٦	٢٦٠	٢٨٠	٢
٣٠٨/٢١	٣٢٨/٥٢	٣٠٨/٢١	٣٢٨/٥٢	٣١٠	٣٣٠	٣
٢٦٣/٥٥	٢٨٠/٩٢	٢٦٣/٥٥	٢٨٠/٩٢	٢٦٠	٢٨٠	٤
٢١٢/٥٠	٢٢٦/٥١	٢١٢/٥٠	٢٢٦/٥١	٢١٠	٢٣٠	٥
٢٤٠/٦٢	٢٥٦/٤٨	٢٤٠/٦٢	٢٥٦/٤٨	٢٤٠	٢٦٠	٦
١٩٨/٠٥	٢١١/١٠	١٩٨/٠٥	٢١١/١٠	٢٠٠	٢١٠	٧
٢٦٥/٥٦	٢٨٣/٠٦	٢٦٥/٥٦	٢٨٣/٠٦	٢٧٠	٢٨٠	٨
٢٣١/٨٨	٢٤٧/١٦	٢٣١/٨٨	٢٤٧/١٦	٢٣٠	٢٥٠	٩
١٥٠/٩٤	١٦٠/٨٩	١٥٠/٩٤	١٦٠/٨٩	١٥٠	١٦٠	١٠
١٣٤/٥٩	١٤٣/٤٧	١٣٤/٥٩	١٤٣/٤٦	١٣٠	١٤٠	١١
٢٨٠/٣٧	٢٩٨/٨	٢٨٠/٣٧	٢٩٨/٨٥	٢٨٠	٣٠٠	١٢
٣٧٨/٥٤	٤٠٣/٤٩	٣٧٨/٥٤	٤٠٣/٤٩	٣٨٠	٤٠٠	١٣
٢٦١/٦٤	٢٧٨/٨٩	٢٦١/٦٤	٢٧٨/٨٩	٢٦٠	٢٨٠	١٤
١/٠٢٧	٠/٨٩٦	١/٠٢٧	٠/٨٩٦	R.S.E. (%)		

$$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}j - Cj)^2}{\sum_{J=1}^{N}(Cj)^2}\right] 1/2 \times 100$$

$$R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(C\hat{}ij - Cij)^2}{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(Cij)^2}\right] 1/2 \times 100$$

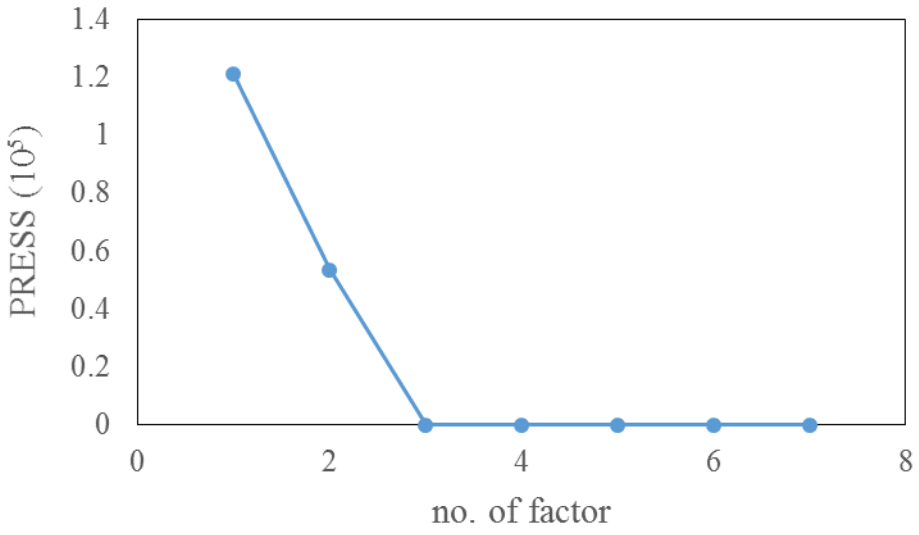
٠/٩٧٩

جدول ۳-٤ پارامترهای آماری $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ در مدل‌های کالیبراسیون $PLS_{۱}$ و $PLS_{۲}$ توسعه یافته برای تعیین همزمان $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ با داده‌های سینتیک.

مدل پیشگویی		
$PLS_{۲}$ (%)	$PLS_{۱}$ (%)	پارامترهای اماری
۳/۸۹	۳/۹۹	RMSEP
۲/٦۱	۲/۵۸	RMSECV
۵/۱٦	۵/۱۲	RMSEC

جدول ۳-٤ پارامترهای آماری $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ در مدل‌های کالیبراسیون $PLS_{۱}$ و $PLS_{۲}$ توسعه یافته برای تعیین همزمان $Hg_{۲}^{۲+}$و $Cd^{۲+}$ با داده‌های سینتیک.

مدل پیشگویی		
$PLS_{۲}$ (%)	$PLS_{۱}$ (%)	پارامترهای اماری
۳/۸۹	۳/۹۹	RMSEP
۲/٦۱	۲/۵۸	RMSECV
۵/۱٦	۵/۱۲	RMSEC



شکل ۳-۸ منحنی PRESS برحسب تعداد فاکتورهای Hg_2^{2+}و Cd^{2+}.

بررسی مزاحمت

تأثیر مواد خارجی همراه مانند ناپروکسن ، اسکوربیک اسید، ترامادول، کدئین، استامینوفن، ساکاریدها، آمینواسیدها و یون‌ها بررسی شد. مطابق جدول ۳-۵، برخی از مواد همراه موجود مزاحمت شدیدی در آزمایش نداشتند. از این نتایج ، مزاحمت ناپروکسن، اسکوربیک اسید، Na_2NO_2، گلوکز، سوکروز، فروکتوز و لاکتوز، لیسین و تریپتوفان، آسپارژین، گلوتامین، والین و تیروزین بسیار ضعیف بود. در میان مواد تست شده K^+، Na^+، NO_3^-، I^-، Cl^-، Mg^{2+}، Fe^{3+}، Ca^{2+} و کدئین می‌توانند با مقادیر نسبتاً بالا مجاز باشند ولی سیستئین ، سفکسیم، NH_2OH، Mn^{2+}، So_4^{2-}، Ca^{2+}، Zr^{2+}، Co^{2+}، Zn^{2+}، Ni^{2+}، Al^{3+}، Fe^{2+}، Cu^{2+} فقط با غلظت‌های نسبتاً پایین مجاز هستند. غلظت مجاز این مواد مزاحم ولی هنوز بالاتر از Hg_2^{2+}و Cd^{2+} است که نشان داد که این روش گزینش خوبی بین داروها و گونه‌های دیگر دارد.

جدول ۳-۵ تست‌های مواد مزاحم در تعیین همزمان Hg^{2+}_2و Cd^{2+} در شرایط بهینه : قدرت یونی $3mmolL^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA10^{-5}molL^{-1}$:pH۷ $10nmolL^{-1}$ AuNPs.

گونه	غلظت قابل تحمل (analyte (Hg_2^{2+} : Cd^{2+}) :interfering ion))
گلوکز ساکارز فروکتوز لاکتوز, Na_2NO_2, اسکوربیک اسید ناپروکسن تریپتوفان لایسین تایروزین والین گلوتامین اسپارجین	۱ : ۱: ۵۰۰
K^+, Na^+, NO^{3-}, I^-, Cl^-, , Mg^{2+}, Fe^{3+}, Ca^{2+}, کدیین	۱ : ۱: ۳۰۰
سیستیین ,سفکسیم,ترامادول , NH_2OH, Mn^{2+}, , SO_4^{2-}, Ca^{2+},Zr^{2+},Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, Fe^{2+}, $Cu^{2+,}$	۱ : ۱ : ۱۰۰

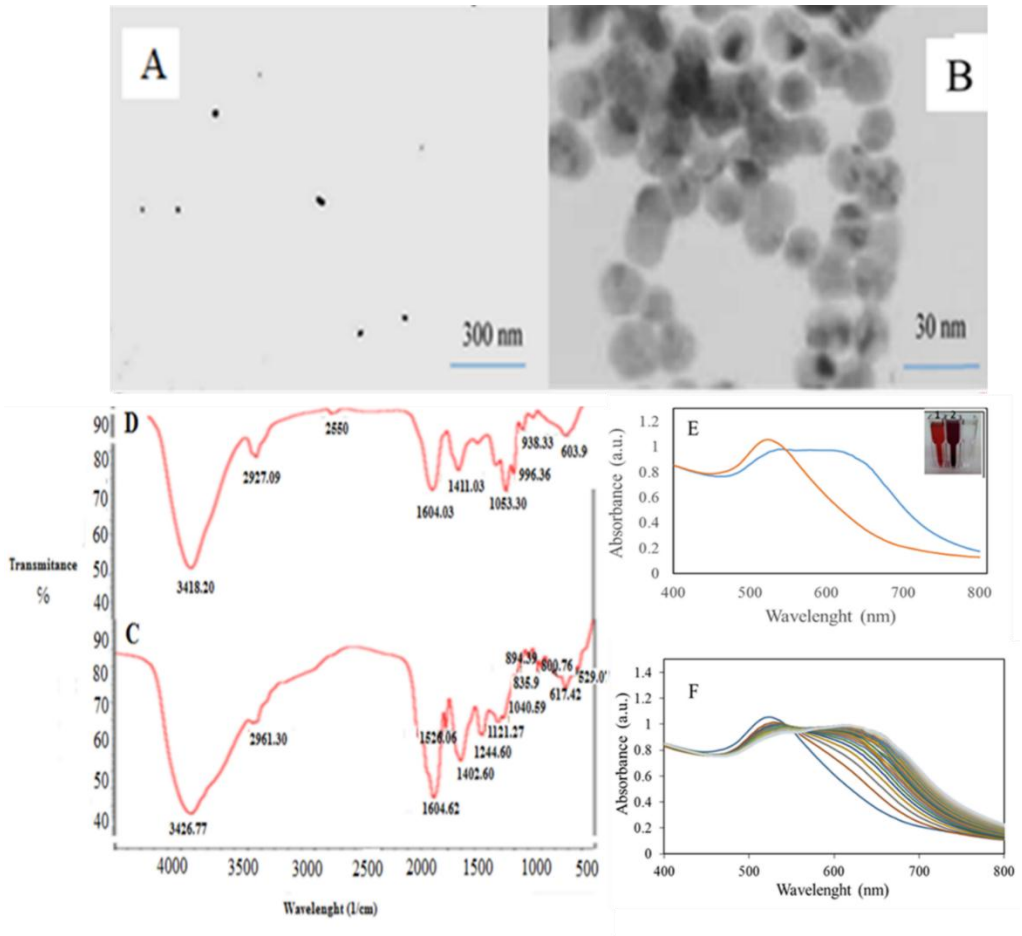
تجزیه نمونه حقیقی

برای تست قابلیت استفاده از روش پیشنهادی آن را در تعیین Hg^{2+}_2و Cd^{2+} در نمونه‌های آب آلوده تست کردیم. مدل PLS تهیه شده در تخمین غلظت Hg^{2+}_2و Cd^{2+} در این نمونه‌های آلوده استفاده شد . نتایجی که به دست آمد بازیابی‌های خوبی نشان می‌دهند (۹۰/۰-۱۰۷/٤٪) (جدول ۳-٦). نتایج نشان دادند که قابلیت استفاده بالقوه این روش‌ها برای تعیین همزمان Hg^{2+}_2و Cd^{2+} در نمونه‌های حقیقی وجود دارد.

جدول ۳-٦ تجزیه نمونه‌های آب رودخانه‌های زرینه و سیمینه و دریاچه اورمیه برای Hg_2^{2+}و Cd^{2+}قدرت یونی $3mmolL^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، $PHCA10^{-5}molL^{-1}$ pH۷: $10nmolL^{-1}$ AuNPs.

نمونه	اضافه شده ($mol.L^{-1}$)		پیداشده ($mol.L^{-1}$)		بازده (٪)	
	Hg_2^{2+}	Cd^{2+}	Hg_2^{2+}	Cd^{2+}	Hg_2^{2+}	Cd^{2+}
اب دریاچه ارومیه	۰	۰	$۰/۱۳\times ۱۰^{-٦}$	$۰/٤\times ۱۰^{-٦}$	–	–
	$٤/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۳/۱۹\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۰۳\times ۱۰^{-٦}$	۹۰/۰	۹۰/۷۵
	$۵/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۳۲\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۹۲\times ۱۰^{-٦}$	۱۰۰/۲	۹۰/٤
	$٦/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۳\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۸\times ۱۰^{-٦}$	۹۹/۸۳	۱۰٦/۷
اب زرینه رود	۰	۰	$۰/۲\times ۱۰^{-٦}$	$۰/۰۱۸\times ۱۰^{-٦}$	–	–
	$٤/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۳/۸٦\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۰۳\times ۱۰^{-٦}$	۹۱.۵	۱۰۰/۳
	$۵/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۷۸\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۰٦\times ۱۰^{-٦}$	۹۱/٦	۱۰۰/۸٤
	$٦/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۸٤\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۳۲\times ۱۰^{-٦}$	۹٤/۰	۱۰۰/۰۳
اب سیمینه رود	۰	۰	$۰/۰۲\times ۱۰^{-٦}$	$۰/۰٤\times ۱۰^{-٦}$	–	–
	$٤/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٤/۰۵\times ۱۰^{-٦}$	$۳/۹\times ۱۰^{-٦}$	۱۰۰/۷۵	۹٦/۵
	$۵/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۱۹\times ۱۰^{-۷}$	$۵/٤۱\times ۱۰^{-٦}$	۱۰۳/٤	۱۰۷/٤
	$٦/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۰\times ۱۰^{-٦}$	$٦/۲۰\times ۱۰^{-٦}$	$۵/۹۷\times ۱۰^{-٦}$	۱۰۳/۰	۹۷/۸۳

٤- تعیین همزمان مورفین و ایبوبروفن با تجمع نانوذرات طلا با استفاده از حداقل مربع جزئی به عنوان ابزار کمومتریکس



مقدمه

در این کار یک حسگر جدید براساس تجمع AuNPs با پوشش سیترات[۱] ارائه می‌شود. حضور MOR و IBU در شرایط بهینه AuNPs را القا می‌کند که منجر به یک تغییر رنگ از قرمز به آبی می‌شود، که منجر به تشکیل ذرات بزرگتر و بیان تغییر رنگ آشکار از قرمز به آبی با افزایش غلظت MOR و IBU می‌شود. شرایط تجربی برای حصول بالاترین راندمان در تشکیل نانوذرات بهینه سازی شد. رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) به عنوان یک روش کالیبراسیون طیفی چند متغیری مؤثر برای ایجاد ارتباط بین طیف‌های SPR برای AuNPs تهیه شده و غلظت داروها استفاده شد. تعداد متغیرهای نهفته PLS با اعتبارسنجی متقابل یکی در بیرون باجمع مربع خطای باقیمانده پیش بینی شده (PRESS) بهینه سازی شد. مدل پیشنهادی توانایی بالایی برای پیشگویی غلظت MOR و IBU در نمونه‌ها نشان داد به ویژه یک تشخیص انتخابی خوب MOR وIBU در داده‌های سینتیک با بررسی تجمع در برابر داروهای دیگر نشان داده شد . نتایج این کار یک روش سریع برای ارزیابی همزمان تحلیل کمی MOR و IBU در پلاسمای انسان و ادرار در غلظت‌های معنی دار فیزیولوژیکی در pH برابر ٦ ارائه کرد.

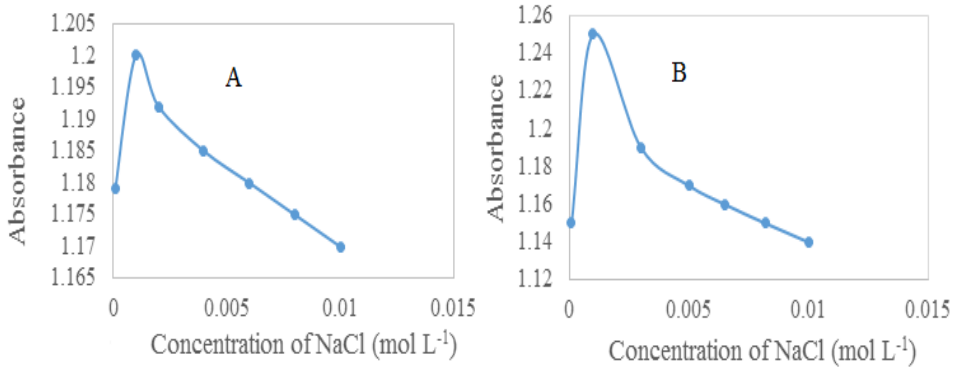
[۱] Citrate capped

بهینه سازی شرایط

بهینه سازی غلظت NaCl

این نانوذرات معمولاً باردارند و بسیار حساس به تغییر در دی الکتریک محلول هستند. برای مثال برای ذرات پایدار شده سیترات ، افزایش NaCl بار سطحی را حفاظت می‌کندو منجر به یک کاهش فاصله بین ذره‌ای و تجمع ذرات نهایی می‌شود.

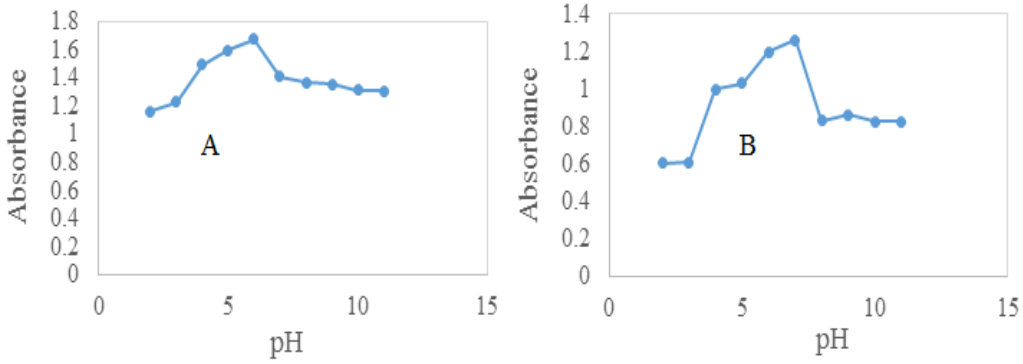
قدرت یونی نقش مهمی در فرایند تجمع دارد که می‌تواند به قابلیت الکترولیت‌های قوی برای محدودسازی لایه دوگانه الکتریکی حاصله از عامل پوششی نسبت داده شود. اگرچه مشخص شده است که با افزایش قدرت یون بالاتر از یک حد معین، تجمع نانوذرات حتی در غیاب آنالیت القا می‌شود. بنابراین ، برخی آزمایشات کنترل شده انجام شدند که غلظت $1 mmol\ L^{-1}$ را برای NaCl به صورت بهینه سازی شده نشان دادند (شکل ٤-١) که در آن تجمع نه در غیاب بلکه در حضور آنالیت‌های ما رخ می‌دهد



شکل ٤-١ .بهینه سازی قدرت یونی برای A) IBU و B) غلظت MOR، NaCl ۰/۱-۰/۰۰۵ $mol\ L^{-1}$ ، ۲۵°C دما، زمان ۱۰ دقیقه، pH برابر ٦،ایبو بروفن و مورفین 10^{-4} $mol\ L^{-1}$ AuNPs . ۱۰ n $mol\ L^{-1}$.

بهینه سازی pH

به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل ، کربوکسیل و آمین در داروها،pH یک پارامتر کلیدی دیگر است که باید در نظر گرفته شود.برهمکنش الکترواستاتیک عمدتاً مسئول تجمع AuNPs در حضور داروها است. با در نظر داشتن این مسأله برای افزایش احتمال برهمکنش الکترواستاتیک، بهترین شرایط قابل حصول است که در آن ملکولهای دارو در محیط نانوذرات حاضرند. این هم چنین می‌تواند براساس دیاگرام استوک[۱] داروها تأیید شود. مطابق شکل ٤-٢، AuNPs سنتز شده در محدوده pH٦ پایدار هستند. بنابراین داروهای ما بهترین ساختار را برای برهمکنش باAuNP در pH٦ و ۷ دارند. بنابراین بهترین pH برای این کار ٦ است.

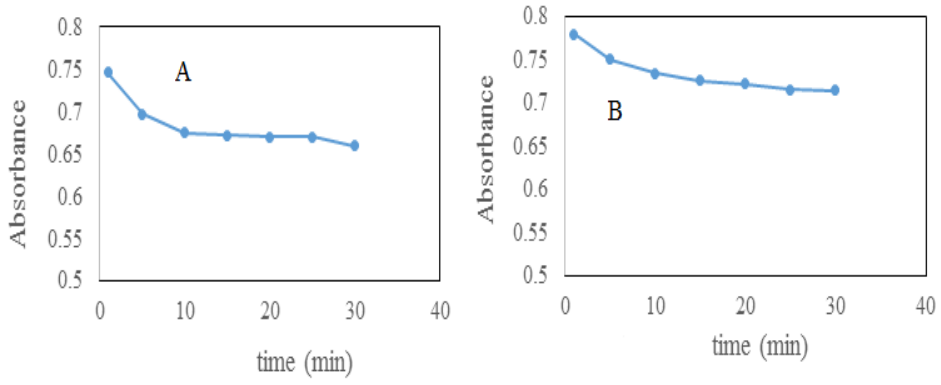


شکل ٤-٢ .بهینه سازیpH الف) برای ایبو بروفن ب) برای مورفین، pH محلول ٢-١١، ^{o}C٢٥ دما، قدرت یونی ۱ $m\ mol\ L^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، تزریق ۲۰۰ µL ازایبو بروفن و مورفین $۱۰^{-٤}$ $mol\ L^{-1}$. AuNPs ۱۰ [۱] $n\ mol\ L^{-}$.

[۱] Stock diagram

بهینه سازی زمان انکوبه شدن

زمان‌های انکوبه شدن مختلف برای بهینه سازی آن بررسی شدند. نتایج نشان دادند که AuNPs پس از اختلاط با MORو IBU (عامل تجمع) در شرایط بهینه، AuNPs بهینه شدند. از سوی دیگر تجمع AuNPs متوقف شد و تغییر طیفی در ۱۰ دقیقه به عنوان زمان انکوبه شدن بهینه قابل تشخیص بود. بنابراین از این زمان به عنوان زمان پایان برای داده‌های سینتیکی استفاده کردیم که برای اندازه گیری همزمان انتخاب شد(شکل ٤-۳).

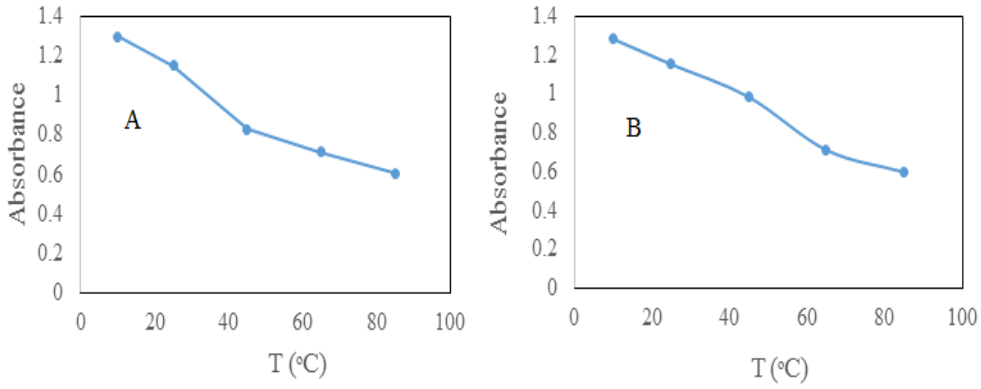


شکل ٤-۳ .بهینه سازی زمان انکوباسیون برای الف) مورفین ب) برای ایبو بروفن، زمان ۵-۳۰ دقیقه، ۲۵°C دما، قدرت یونی ۱ m mol L-۱، تزریق ۲۰۰ µL ازایبو بروفن و مورفین٤- ۱۱۰ mol L-۱ . ۱۰ n AuNPs mol L-۱.

بهینه سازی دما

دما اغلب تأثیر مهمی بر سرعت واکنش‌های شیمیایی دارد. ملکولها در دماهای بالاتر انرژی حرارتی بیشتری دارند. اگرچه فرکانس برخورد در دماهای بالا بیشتر است. یک فاکتور مهم در سینتیک واکنش دما برای داده‌های سینتیک ایزوترم است. این دما باید سرعت واکنش خوب و نه خیلی پایین ایجاد کند تا بهترین شدت جذب برای نانوذرات برای انتخابگری و حساسیت بیشتر

بدست آید. بهترین شرایط دمایی برای هدف ما ۲۵°C است که در شکل زیر نشان داده شده است(شکل ٤-٤).



شکل ٤-٤ .بهینه سازی دما برای الف) مورفین ب) برای ایبو بروفن درجه حرارت°C ۱۰-۸۵ ، زمان ۱۰ دقیقه، °C۲۵ دما، قدرت یونی ۱ m mol L-۱، تزریق ۲۰۰ میکرولیتر ازایبو بروفن و مورفین٤- ۱۰ mol L-۱۰ n mol L-۱ AuNPs .۱ .۱۰

توسعه مدل PLS

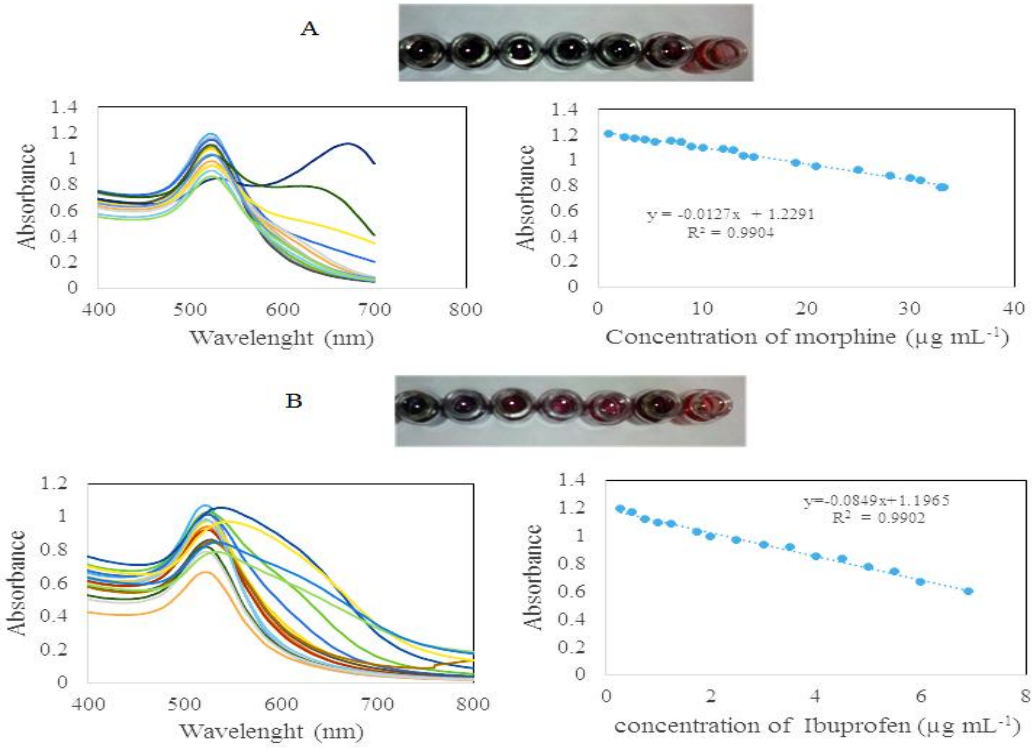
رگرسیون NIPALS به صورت PLS اجرا شد به طوریکه در میان اجزای نمونه مختلف ، مدل PLS برای میزانMORو IBU توسعه یافت. طیف‌های جذبی دیجیتالی شده در محدوده ۱۰ دقیقه (بازه‌های ۱nm) تغییر یافت و نمونه‌ها به عنوان متغیرهای شاخص (متغیرهای X) و پیش بینی شده (متغیر Y) عبارت بودند از مقدار MOR و IBU. رگرسیون PLS نیازمند یک سری نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی از ۲۷ مخلوط مختلف بودند که از ترکیب MOR و IBU در محلول AuNPs به دست آمد که از آن میان ۲۰ نمونه به عنوان مجموعه کالیبراسیون و بقیه به عنوان مجموعه پیش بینی استفاده شد. باید توجه شود که مجموعه پیش بینی شامل ۷ نوع مخلوط بود که در نمونه‌های کالیبراسیون وجود نداشت. مدل PLS با استفاده از نمونه‌های

کالیبراسیون ساخته شد[۱۷۸]. تعداد بهینه متغیرهای نهفتهPLS با اعتبارسنجی متقابل یکی در بیرون با استفاده از مجموع خطای باقیمانده پیش بینی مربع (PRESS) به عنوان یک معیار آماری بدست آمد. تحلیل PLS از طریق الگوریتم NIPALS (حداقل مربعات جزیئ تکراری غیرخطی) بدست آمد. همه محاسبات در محیط MATLAB انجام شد.

اعتبارسنجی روش

به این منظور تحت شرایط بهینه یک منحنی کالیبراسیون معمولی برای تعیین MORو IBU با ترسیم جذب (A) در برابر غلظت‌های دارو به دست آمد. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۱/۳۳-۳۳/۲۹ و μgmL^{-1} ۰/۲۸ − ٦/۹ با معادله‌های $Y = -۰/۰۱۲۷ \times +۱/۲۲۹۱$، $R^{۲} = ۰/۹۹۰٤$ و $Y = -۰/۰۸٤۹ \times +۱/۱۹٦٥$ ، $R^{۲} = ۰/۹۹۰۲$ (شکل ٤-٥) خطی بود و حد تشخیص برابر بود با μgmL^{-1} ۰/۱٥(n=٥) برای MOR و μgmL^{-1} ۰/۰۳ برای IBU.جدول ٤-۱ یک مقایسه بین نتایج حاصل از روش فعلی با موارد حاصل از برخی روش‌های دیگر گزارش شده در تعیین این داروها را نشان می‌دهد. مطابق مقایسه جدول ٤-۱ روش فعلی حد تشخیص خوب و محدوده خطی قابل قبول در مقایسه با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای فاز معکوس[۱] (RP -HPLC)، روش الکتروشیمیایی، کروماتوگرافی مایع- اسپکتروسکوپی جرمی (LC-MS-MS[۲]) ، کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS[۳]) ، روش‌های مشتق سازی آبی مستقیم[٤] و HPLC/UV[٥] دارد[۷۹]. باید توجه شود که مزایای اصلی این روش عبارتند از استفاده از روش بسیار ساده برای تعیین این دارو.

[۱] Reverse phase high performance liquid chromatography
[۲] Liquid chromatography – mass mass spectroscopy
[۳] Gas chromatography mass spectroscopy
[٤] Direct aqueous derivative method
[٥] High performance liquid chromatography / ultra violet



شکل ٤-٥ .شکل منحنی ۲. کالیبراسیون الف) برای مورفین۳۳/۲۹-۱/۳۳ و ب) برای ایبو بروفن۶/۹-۰/۲۸ $\mu g\ mL^{-1}$ ۱، به ترتیب: ^{o}C۲۵ دما، قدرت یونی ۱ $mmol\ L^{-1}$، زمان ۱۰ دقیقه، pH از ٦: AuNPs، ۱۰ n $mol\ L^{-1}$.

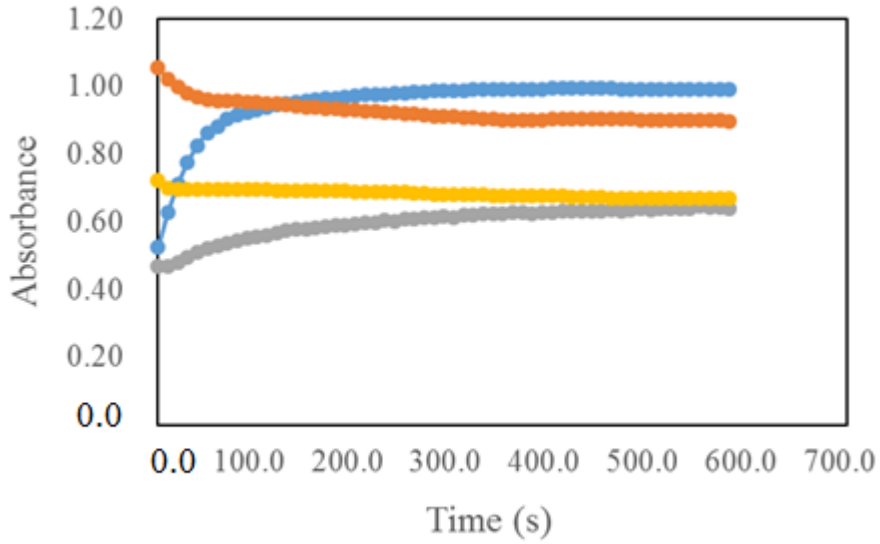
جدول ٤-١ ..داده‌های عملکرد مشخصه به دست آمده توسط اسپکتروفتومتری روش‌ها و تکنیک‌های دیگر برای اندازه گیری مورفین و ایبو بروفن.

روش اندازه گیری	ناحیه خطی ($\mu g\ mL^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu g\ mL^{-1}$)	منبع
برای مورفین(a			
کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا فاز معکوس	۰/۱۵-۲	۰/۰۵	[۳۸۷]
کروماتوگرافی مایع- اسپکتروسکوپی جرمی-جرمی	۰/۰۰۲-۲	۰/۰۰۱	[۳۸۸]
روش الکتروشیمیایی	۰/۰۰۸-۵/۰	۰/۰۰۲	[۳۸۹]
مشتق سازی مستقیم در محیط ابی	۰/۰۲-۲۰	۰/۰۰۳	[۳۹۰]
کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکوپی جرمی	۰/۰۲۵-۲	۰/۰۰۲	[۳۹۱]
برای ایبو بروفن(b			
مشتق سازی ونسبت گیری از طیف‌ها	۲–۳۲	۰/۵۳	[۳۹۲]
کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	٦/۱–۲۰۰	۱/۷	[٤۹۳]
روش اسپکترو متری	۰/۲۸-٦/۹ ایبو بروفن ۱/۳۳-۳۳/۲۹,مورفین	۰/۰۳ایبوبروفن- ۰/۱۵مورفین	این کار

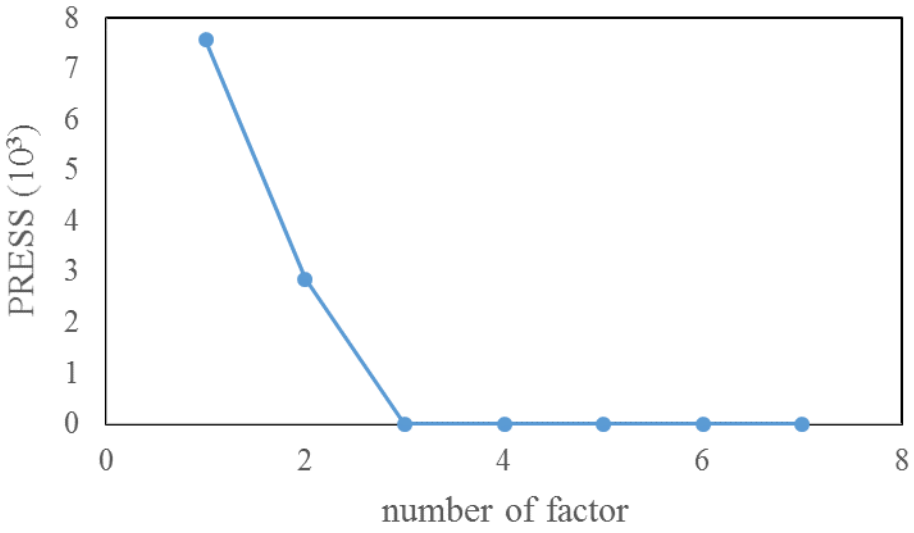
بررسی تعیین همزمان مورفین و ایبو بروفن

بررسی‌های اولیه نشان داد که کاهش شدت طیف‌های UV-Vis در ۵۲۰nm و افزایش در ۶۲۰nm ارتباط مستقیم با میزان مورفین و ایبو بروفن در نمونه دارد (شکل ٤-٦). این ویژگی برای پیشنهاد یک روش تجربی برای تعیین این داروها در نمونه‌ها ما استفاده شد. تجمع AuNPs سنتز شده به وسیله سیترات به مقادیر مورفین و ایبو بروفن نسبت داده شد. در طیف جذبی نمونه‌های کالیبراسیون و جذبی ابتدا کالیبراسیون یک متغیره استفاده شد به طوری که شدت در ۵۲۰nm به غلظت دارو نسبت داده شد. داده‌های دو انتهای منحنی به ویژه در غلظت‌های پایین انحراف شدیدی از خط راست نشان می‌دهد. به علاوه داده‌های پیش بینی انحرافات مهمی از داده‌های کالیبراسیون دارند و در نتیجه مدل کالیبراسیون حاصله برای پیش بینی داده‌های خارجی قابل استفاده نیست. این بی نظمی را می‌توان به اثر مزاحم اجزای دیگر نسبت داد که می‌توانند Au^{3+} را تجمع دهند و AuNPs بزرگتری ایجاد کنند. بنابراین رگرسیون PLS استفاده شده به عنوان یک روش کالیبراسیون چند متغیره قدرتمند و پرکاربرد برای مدل سازی نقش گونه‌های مزاحم در علامت‌های کل SPR استفاده شدند. مدل PLS با استفاده از مجموعه کالیبراسیون توسعه یافت. تغییرات درPRESS و به صورت تابعی از تعداد متغیرهای نهفته PLS در شکل ٤-٦ آمده‌اند. همان طورکه نشان داده شده است، RMSE به یک حداقل در تعداد متغیرهای نهفته به۷ می‌رسد. به علاوه صفحه اول Au در PRESS در یک تعداد متغیر نهفته برابر ۷ مشاهده شده است. متعاقباً ۷ اجزای اصلی برای محاسبه ضرایب رگرسیون PLSو پشی بینی مقدار مورفین و ایبو بروفن نمونه‌های پیشگویی انتخاب شدند. ریشه مربع خطای میانگین اعتبارسنجی متقابل (RMSECV) تخمین زده شده با این تعداد متغیر برابر ٪ ٤/٢ است. در میان فاکتورهای آشکارسازی شده یکی را می‌توان به مورفین و دیگری را به ایبو بروفن ارتباط داد. به

علاوه، غیرخطی بودن ارتباط جذب- غلظت و برهمکنش بین فاکتورها می‌تواند به عنوان یک منبع دیگر فاکتورهای شیمیایی درنظر گرفته شود. مقادیر پیش بینی شده مقادیر مورفین و ایبو بروفن در نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی و خطاهای نسبی متناظر آنها در پیش بینی در جدول‌های ٤-٢، ٤-٣و ٤-٤ فهرست شده‌اند. مشاهده شده است که مقادیر پیش بینی شده بسیار نزدیک به مقدار واقعی است و خطاهای پیش بینی نسبی تقریباً کمتر از ٥٪ است. این موفقیت رگرسیون PLS برای پیش بینی دقیق مقدار مورفین و ایبو بروفن در نمونه‌ها را نشان می‌دهد. حال مقایسه نتایج PLS_1 و PLS_2 کالیبراسیون چند متغیری منجر به مدل مناسب‌تر می‌شود. برای این مقایسه و اعتبارسنجی مدل‌ها برخی پارامترهای آماری از جمله ریشه مربع خطای میانگین پیش بینی (RMSEP) ، ریشه مربع خطای میانگین اعتبارسنجی متقابل (RMSECV) و ریشه مربع خطای میانگین کالیبراسیون (RMSEC) محاسبه شدند. پارامترهای آماری محاسبه شده در جدول ٤-٢ آمده‌اند. می‌توان از جدول ٤-٣ دید که نتایج کالیبراسیون و پیش بینی PLS سازگارتر از کالیبراسیون یک متغیره است. یک مقایسه بین پارامترهای آماری PLS و مدل‌های یک متغیره نشان می‌دهد که RMSEP حاصل از PLS بسیار کمتر است. به علاوه مدل PLS دارای همه الزامات در نظر گرفته شدن به عنوان یک مدل پیش گویانه است در حالیکه مدل یک متغیره این گونه نیست.



شکل ٤-٦ .تغییر در جذب AuNPs درجذب ٥٢٠ و ٦٢٠ نانومتر، برای تزریق ٧٠٠(µL) از محلول ١٠-٤ (mol L-١)در هر شرایط بهینه از این داروها: برای مورفین و ایبو بروفن درجه حرارت ٢٥ °C ، زمان ١٠ دقیقه، ٢٥°C دما، قدرت یونی ١ m mol L-١، AuNPs ١٠ n mol L-١ .



شکل ٤-٧ .نمودار PRESS در برابر تعداد فاکتورها برای مورفین و ایبو بروفن.

جدول ٤-٢ .سطح مقدار مرجع و اصلی مورفین و بروفن دردسته پیش بینی تعیین شده توسط مدل PLS از طیفSPR.

دسته پیش بینی					
شماره	مقادیر مرجع ایبو بروفن	مقادیر مرجع مورفین	مقادیر پیش بینی شده		
			PLS_1		PLS_2
١	٤٦٠	٢٣٠	٤١٨/٩	٢٢١/٥	٤١٨/٩٨	٢٢١/١٤
٢	٥٣٠	٢٨٠	٥٥٥/٠٦	٢٨٥/٥	٥٥٥/٠٧	٢٨٥/٤٩
٣	٣٠٠	١٦٠	٢٨٩/٤٣	١٥٦/٩	٢٨٩/٤٦	١٥٦/٨
٤	٦٦٠	٣٦٠	٦٥٢/٤	٣٥٩	٦٥٢/٤	٣٥٩/٠١
٥	٦٦٠	٣٧٠	٦٦٣/٢٦	٣٦٧/٧	٦٦٣/٢٥	٣٦٧/٨٣
٦	٥٨٠	٣٣٠	٥٩٤/٩٩	٣٣٢/٤	٥٩٤/٩٦	٣٣٢/٥٧
٧	٦٠٠	٣٣٠	٦٠٠/٣	٣٣٣/٤	٦٠٠/٣٥	٣٣٣/٥٤
	R.S.E. (%)		٣/٥٥	١/٤٥	٣/٥٦	١/٤٩
	$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}j-Cj)^2}{\sum_{J=1}^{N}(Cj)^2}\right] 1/2 \times 100$					
٣/١٩	$R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(C\hat{}ij - Cij)^2}{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(Cij)^2}\right] 1/2 \times 100$					

جدول ٤-٣. سطح مقدار مرجع و اصلی مورفین و بروفن دردسته کالیبراسیون تعیین شده توسط مدل PLS از طیفSPR.

دسته کالیبراسیون					
شماره	مقادیر مرجع ایبو بروفن	مقادیر مرجع مورفین	مقادیر پیش بینی شده		
			PLS_1		PLS_2
۱	۷۰۰	٤۰۰	۷۰٤/۵۹	۳٦۵/۱٦	۷۰٤/٦۲	۳٦۵
۲	۵۲۰	۲٦۰	۵۲٤/۹٦	۲٦۲/۵۵	۵۲٤/۹٦	۲٦۲/۵٤
۳	۳۷۰	۱۹۰	۳٦٤/۸۳	۱۹۰/٦۸	۳٦٤/۸۳	۱۹۰/۷
٤	۲۹۰	۱٦۰	۲۹۳/۷۷	۱٦۵/۰۳	۲۹۳/۷۷	۱٦۵/۰٦
۵	۳۲۰	۱۷۰	۳۲۰/۱٦	۱۷۱/۷۵	۳۲۰/۱۵	۱۷۱/۷۷
٦	۳۲۰	۱۷۰	۳۱۵/۲	۱۷۳/٤٤	۳۱۵/۲	۱۷۳/٤۷
۷	۳۵۰	۲۰۰	۳٤٦/٦	۱۹۳/۸	۳٤٦	۱۹۳/۸۲
۸	٤٦۰	۲۳۰	٤٦٤/۱٤	۲۳۲/۲۹	٤٦٤/۱٤	۲۳۲/۲۸
۹	٤۵۰	۲۷۰	٤۵۳/۸۷	۲۷٤/۳۷	٤۵۳/۸۷	۲۷٤/۳۸
۱۰	۷٤۰	۲۹۰	۷۳۷/۱٦	۲۹۹/٦۲	۷۳۷/۱٦	۲۹۹/۵۲
۱۱	۱۸۰	۸۰	۱۵۲/۷	۷۹/٤	۱۵۲/٦٤	۷۹/۹٤
۱۲	۱۷۰	۱۰۰	۱۵۲/٤٦	۱۰۳/۰٤	۱۵۲/٤۹	۱۰۲/۸۹
۱۳	۱۷۰	۱۰۰	۱۷۲/۵۸	۱۰۰/٦۵	۱۷۲/۵۷	۱۰۰/٦۷
۱٤	۳۳۰	۲۲۰	۳۳۱/۵	۲۱۸	۳۳۱/۵۲	۲۱۷/۹۵
۱۵	۳۵۰	۲۰۰	۳٤٦/٤٤	۱۹۹/۹۷	۳٤٦/٤٤	۲۰۰
۱٦	۱٦۰	۹۰	۱٦۲/۱۷	۹۱/٤۳	۱٦۲/۱۷	۹۱/٤۵
۱۷	۲٤۰	۱۳۰	۲٤۱/٦	۱۳۳/۵۵	۲٤۱/٦	۱۳۳/۵٦
۱۸	٦۵۰	۳۷۰	٦۵۵/٤۹	۳۷٦/۱۸	٦۵۵/٤۹	۳۷٦/۲۲
۱۹	٦٤۰	۳٦۰	٦۳۹/۷۵	۳٦۷/٦۳	٦۳۹/۷٤	۳٦۷/٦۹
۲۰	۲۰۰	۱۰۰	۱۹٤/۳٤	۱۱۰/۲۹	۱۹٤/۳٤	۱۱۰/۳٤
R.S.E. (%)			۱/۹۱	٤/۰۳	۱/۹۲	٤/۰٤
$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}j - Cj)^2}{\sum_{J=1}^{N}(Cj)^2}\right] 1/2 \times 100$ $R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{M}\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}ij - Cij)^2}{\sum_{J=1}^{M}\sum_{J=1}^{N}(Cij)^2}\right] 1/2 \times 100$						۲/۵۵

جدول ٤-٤ .پارامترهای آماری از مدل‌های پیش بینی PLS۱ و PLS۲ در اندازه گیری همزمان ایبو بروفن و مورفین با استفاده از داده‌های سینتیکی.

مدل پیش بینی		
پارامترهای آماری	$PLS_۱$ (%)	$PLS_۲$ (%)
RMSEP	٤/٧	٤/٦٩
RMSECV	٤/١	٤/٢
RMSEC	٥/١	٥/٢

بررسی اثر مزاحمت

تأثیر مواد همزیست خارجی مانند ناپروکسن، اسکوربیک اسید، ترامادول، کدئین، استامینوفن، ساکاریدها، آمینواسیدها و یونها تست شدند. مطابق جدول ٤-٥ بیشتر مواد همزیست بررسی شده مزاحمت زیادی در تحقیق ایجاد نکردند. از نتایج، مزاحمت ناپروکسن، اسکوربیک اسید، $Na_۲NO_۲$، تریپتوفان، تیروزین، گلوکز، سوکروز، فروکتوز و لاکتوز بسیار ضعیف بودند. در میان مواد تست شده K^+، Na^+ ، $No_۳^-$ ، I^-، Cl^-، $Mg^{۲+}$ ، $Fe^{۳+}$ ، $Ca^{۲+}$، کدئین و سیستئین می‌توانند با غلظت‌های نسبتاً مجاز باشند ولی سفکسیم، سفتریاکسون $NH_۲OH$، $Mn^{۲+}$ ، $Cd^{۲+}$، $So_٤^{۲-}$، $Ca^{۲+}$ ، $Zr^{۲+}$، $Co^{۲+}$ ، $Zn^{۲+}$، $Ni^{۲+}$، $Al^{۳+}$، $Fe^{۲+}$، $Cu^{۲+}$ با غلظت‌های نسبتاً پایین مجاز هستند. غلظت‌های مجاز این مواد مزاحم ولی هنوز بالاتر از MOR و IBU هستند که نشان داد که این روش انتخابگری خوبی بین داروها و سایر گونه‌ها به دلیل تفاوت در طیف‌های کاهش یابنده با زمان داشتند .

جدول ٤-٥ بررسی اثر مزاحمت در تعیین همزمان مورفین و ایبو بروفن مخلوط ۲۰۰ µL از مورفین و ایبو بروفن مخلوط به ترتیب مقدار گونه مزاحم ذکر شده در جداول زیر در شرایط مطلوب: ۲۵ ^{o}Cدما، قدرت یونی ۱ $mmolL^{-1}$ ، زمان ۱۰ دقیقه، pH٦، ۱۰ n mol L^{-1} AuNPs .

گونه	غلظت($\mu g\ mL^{-1}$)	تغییر در شدت جذب (%)
آسکوربیک اسید ،Na_2NO_2 ، ,تریپتوفان ناپروکسن , لاکتوز،ساکارز، فروکتوز،گلوکز، تایروزین,	۲۰۰/۰	٤
کدیین ، $K^+, Na^+, NO^{3-}, I^-, Cl^-, , Mg^{2+}, Fe^{3+},$ Ca^{2+}	۲۰۰/۰	۱۵
سیستیین,سفکسیم ,$NH_2OH, Mn^{2+}, Cd^{2+}, SO_4^{2-},$ $Ca^{2+},Zr^{2+},Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, Fe^{2+}, Cu^{2+},$ Pb^{2+}	۲۰۰/۰	۳۰

تجزیه نمونه حقیقی

به منظور تست قابلیت استفاده از روش پیشنهادی، آن را در تعیین *IBU* و*MOR* در سرم و ادرار استفاده کردیم. جدول ٤-٦ نشان می‌دهد که*IBU* و *MOR* در سرم اصلی حدود (١٤/٩٤و٣/٢) در سرم و (١٣/٩٢ و٤/٤٣) در ادرار (به ترتیب) هستند. حجم دقیقی از دارو بیشتر با *DDW*[1] رقیق سازی شد به طوری که غلظت *IB* در محلول نهایی قرص می‌تواند با محدوده خطی منحنی کار انطباق داشته باشد. نتایج فوق قابلیت استفاده بالقوه از این روشها را برای

[1] Double distilled water

تشخیص همزمان *IBU* و *MOR* در نمونه‌های حقیقی نشان دادند. نتایج این بررسی در جدول ٤-٦ آمده است. این عملکرد خوب روش پیشنهادی را برای تعیین همزمان *IBU* و *MOR* در نمونه‌های سرم و ادرار نشان می‌دهد.

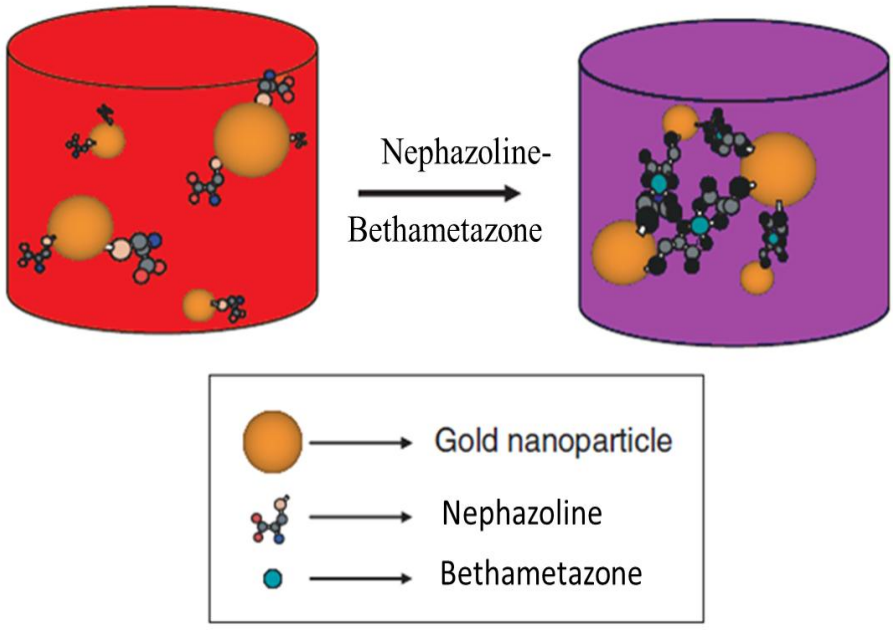
جدول ٤-٦ .بررسی نمونه رقیق سرم خون و ادرار برای مورفین و ایبو بروفن دما^{o}C۲۵ ، قدرت یونی ۱$^{-1}$mmolL، زمان ۱۰ دقیقه، pH از ٦ AuNPs، $^{-1}$L n mol ۱۰.

نمونه		اضافه شده ($\mu g\ mL^{-1}$)		پیدا شده ($\mu g\ mL^{-1}$)		بازده (٪)	
		مورفین	ایبو بروفن	مورفین	ایبو بروفن	مورفین	ایبوبروفن
سرم		۰	۰	ND*	ND	-	-
		۱۵	۳	۱٤/۹٤	۳/۲	۹۹/٦	۱۰٦/٦
	ادرار	۰	۰	ND	ND	-	-
		۱٤	٤	۱۳/۹۲	٤/٤۳	۹۹/٤	۱۱۰/۷

*[1]ND: دیده نشد

[1] Not detected

۵- تعیین رنگ سنجی همزمان سریع و ساده بتامتازون و نفازولین براساس حداقل مربعات جزیی با استفاده از پروب نانوذرات طلا



مقدمه

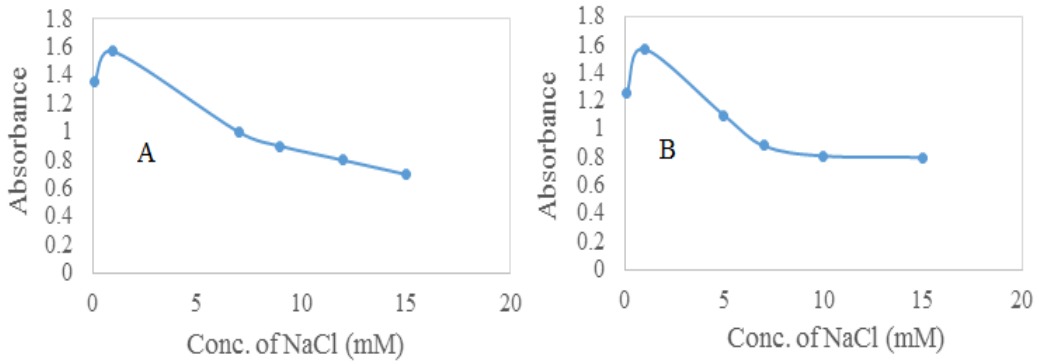
در این کار یک حسگر عادی برای دارو براساس تجمع AuNPs با پوشش سیترات ارائه شد. حضور BET و NEP در شرایط بهینه تجمع AuNPs را القا کرده منجر به تغییر رنگ از قرمز به آبی می‌شودکه منجر به اندازه بزرگتر نانوذرات، بیان تغییر رنگ آشکار از قرمز به آبی با افزایش غلظت BET و NEP می‌شود. شرایط تجربی برای حصول بالاترین راندمان در تشکیل نانوذرات بهینه سازی شد. رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) به عنوان یک روش کالیبراسیون طیفی چند متغیری کارآمد برای ایجاد ارتباط بین طیف‌های SPR در AuNPs حاصله و غلظت داروها استفاده شد. تعداد متغیرهای نهفته PLS با اعتبارسنجی متقابل یکی در بیرون با پیش بینی مجموع مربعات خطای باقیمانده (PRESS) بهینه سازی شد. مدل پیشنهادی قابلیت بالایی در پیش بینی غلظت BETو NEP در نمونه‌ها به ویژه تشخیص انتخابی خوب BET و NEP در داده‌های سینتیکی با بررسی تجمعی در برابر داروها نشان داد. نتایج این کار یک روش سریع برای ارزیابی همزمان تحلیل کیفی BETو NEP در پلاسمای انسان و قطره‌های چشم در غلظت‌های معنی دار فیزیولوژیکی ارائه کرد.

بهینه سازی شرایط آزمایش

بهینه سازی غلظت NaCl

این نانوذرات معمولاً باردارند و بسیار حساس به تغییرات دی الکتریک محلول هستند. برای مثال، برای ذرات پایدار شده سیترات، افزایش NaCl بار سطحی را حفاظ می‌کند و منجر به کاهش فاصله بین ذره‌ای در نهایت تجمع ذرات می‌شود.

قدرت یونی نقش کلیدی در فرایند تجمع دارد که می‌تواند به قابلیت الکترولیت‌های قوی در محدودسازی لایه دوگانه الکتریکی ناشی از عامل پوشش دهنده نسبت داده شود. همچنین مشخص شده است[۳۷۳] که با افزایش قدرت یونی در بالاتر ازیک حد معین، تجمع نانوذرات حتی در غیاب آنالیتها القا می‌شود. بنابراین برخی آزمایشات کنترل شده انجام شدند که ۲ mmol L^{-1} NaCl را به عنوان بهینه (شکل ۵-۱) معرفی کرد که در آن یک تجمع نه در غیاب بلکه در حضور آنالیتهای ما وجود دارد.

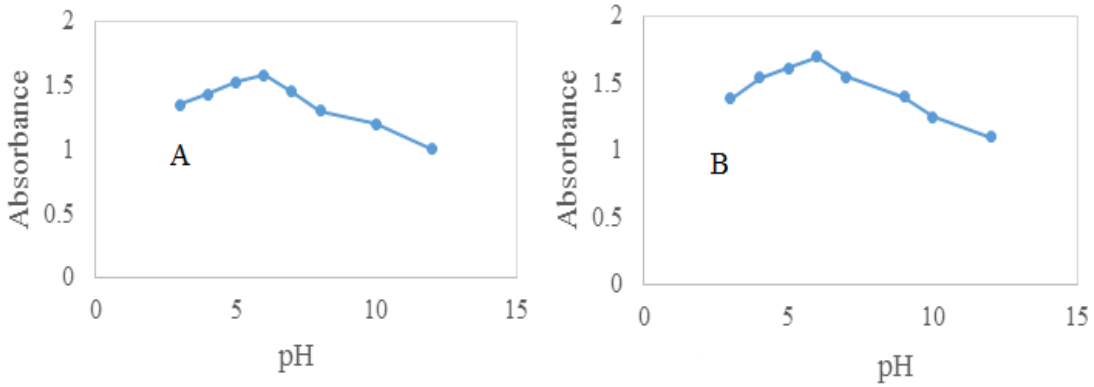


شکل ۵-۱ .بهینه سازی قدرت یونی برای الف) بتامتازون ب) نفازولین قدرت یونی از ۰/۰۵- ۱۲ m mol L^{-1} برای بتامتازون و ۰/۰۵-۱۵ m mol L^{-1} برای نفازولین زمان ۱۰ دقیقه pH ٦تزریق ۲۰۰ µL از محلول 10^{-4} mol L^{-1} بتامتازون و نفازولین غلظت ۱۰ n mol AuNPs L^{-1}.

بهینه سازی pH

به دلیل حضور هیدروکسیل ، آمین و سایر گروه‌های عاملی،pH یک پارامتر کلیدی دیگر است که باید در نظرگرفته شودو برهمکنش‌های الکترواستاتیک مسئول اصلی تجمع AuNPs در حضور داروها هستند[۸۰]. با در نظر داشتن این مسأله ، برای افزایش احتمال برهمکنش

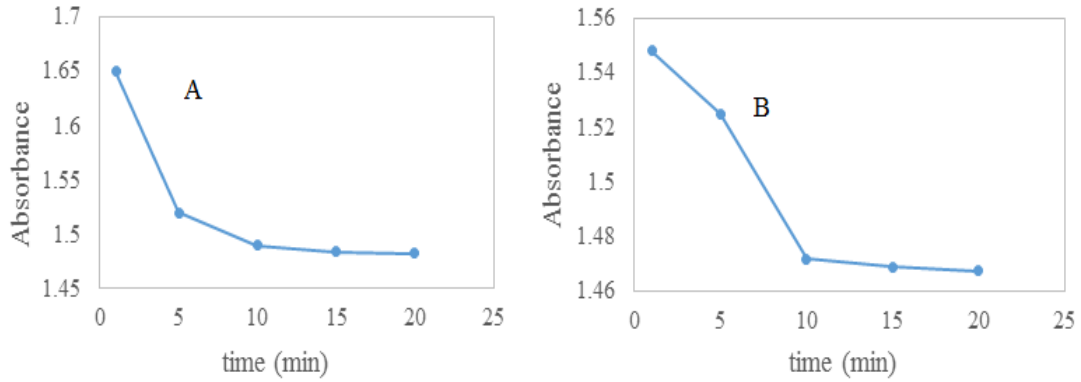
الکترواستاتیک، بهترین شرایط قابل حصول است که در آن ملکولهای دارو در محیط نانوذرات در دسترس هستند. این همچنین می‌تواند براساس دیاگرام استوک داروهای ما تأیید شود. مطابق شکل ۵-۲ ، AuNPs سنتز شده در محدوده pH اپتیمم پایدار هستند. بنابراین داروهای ما بهترین ساختار را برای برهمکنش با AuNPs در pH ٦ و ۷ دارد. در pH بالاتر قلیایی، AuNPs شکل هیدروکسی را تشکیل می‌دهند و بنابراین بهترین pH برای کار با ٦ است[۸۱] (شکل ۵-۲).



شکل ۵-۲ .بهینه سازی pH برای الف) بتامتازون ب) نفازولین قدرت یونی از ۲ m molL-۱ زمان ۱۰ دقیقه pH ۱۲-۳ تزریق ۲۰۰ µL از محلول ۱-mol L ٤-۱۰ بتامتازون و نفازولین غلظت AuNPs n ۱۰ mol L-۱.

بهینه سازی زمان انکوبه شدن

زمان‌های انکوبه شدن مختلف برای بهینه سازی آن استفاده شدند. نتایج نشان دادند که AuNPs پس از اختلاط با BET و NEP (عامل تجمع) تجمع یافتند. از سوی دیگر تجمع AuNPs سرکوب شدند و تغییر طیفی در ۱۰min به عنوان زمان انکوبه شدن بهینه قابل تشخیص است. بنابراین ما از این زمان به عنوان زمان پایان برای داده‌های سینتیکی استفاده کردیم که برای تعیین همزمان جمع آوری شدند (شکل ۵-۳).



شکل ۵-۳ بهینه سازی زمان انکوباسیون برای الف) بتامتازون ب) نفازولین قدرت یونی از ۱۲-m mol L زمان ۱۰ دقیقه pH ٦تزریق ۲۰۰ µL از محلول ۱-mol L ٤-۱۰ بتامتازون و نفازولین غلظت AuNPs n ۱۰ ۱-mol L.

توسعه مدل PLS

رگرسیون PLS به صورت یک تکنیک رگرسیون اجرا شد به طوری که در میان اجزای نمونه مختلف ، مدل PLS برای محتوای BET و NEP توسعه یافت. تغییر طیف‌های جذب دیجیتالی شده در محدوده min ۱۰ (در بازه‌های ۱nm) نمونه به عنوان متغیرهای شاخص (متغیرهایX) و میزان پیش بینی شده (یا متغیر Y) BET و NEP استفاده شدند. رگرسیون PLS نیازمند یک سری نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی از ۲٦ مخلوط مختلف است که به عنوان مجموعه کالیبراسیون استفاده شد و بقیه به عنوان دسته پیش بینی استفاده شد. باید توجه شود که دسته پیش بینی ۷ نوع مخلوط در نمونه‌های کالیبراسیون قرار نگرفت. مدل PLS با استفاده از نمونه‌های کالیبراسیون ساخته شد. تعداد بهینه متغیرهای نهفته PLS با اعتبارسنجی متقابل یکی در بیرون با مجموع مربعات خطاهای باقیمانده پیش بینی (PRESS) به عنوان یک معیار آماری تعیین شد. تجزیه PLS از طریق الگوریتم NIPALS (حداقل مربعات جزئی تکراری غیر خطی) بدست آمد. همه محاسبات در محیط MATLAB انجام شد.

اعتبارسنجی روش

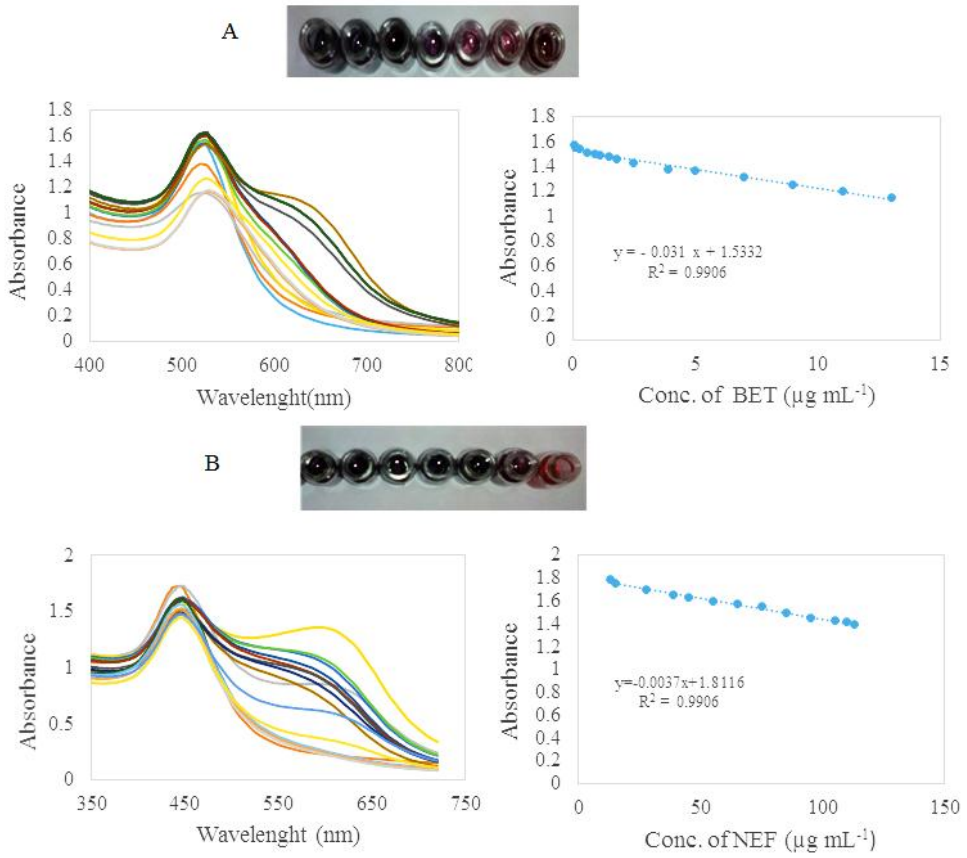
تحت شرایط تجربی بهینه یک منحنی کالیبراسیون عادی برای تعیین BET و NEP با ترسیم جذب (A) برحسب غلظت داروها بدست آمد. منحنی کالیبراسیون در محدوده $-۰/۰۵$ $۱۳\mu gmL^{-۱}$ و $۱۳-۱۳۳/۳\mu gmL^{-۱}$ با معادله‌های $Y=-۰/۰۳۱\times+۱/۵۳۳۲$ ، $R^{۲}=۰/۹۹۰۷$ و $Y=-۰/۰۰۳۷\times+۱/۸۱۱٦$ ، $R^{۲}=۰/۹۹۰٦$ (شکل ٤-۵) و حد تشخیص $۰/۱۵\mu gmL^{-۱}$ (n=۵) برای BET و $۰/۰۳\mu gmL^{-۱}$ برای NEP (جدول ۵-۱) است. جدول ۵-۲ یک مقایسه بین نتایج حاصل از روش موجود با نتایج حاصل از برخی روش‌های دیگر برای تعیین داروها را گزارش می‌دهد. در مقایسه با جدول ۵-۲، روش حاضر حد تشخیص و محدوده خطی خوبی در مقایسه با روش اسپکتروفتومتری مشتقی سریع[۱]، اسپکتروفتومتری اعتبارسنجی شده[۲] و روش‌های کمومتریکس، کروماتوگافی الکتروسینتیک مایسلی[۳]، اسپکتروفتومتری ابزارهای تجزیه‌ای یکپارچه[٤]، کمومتریکس و تعیین کروماتوگرافیک ، LC-[۵]MS/Ms، روش کروماتوگرافی مایع اعتبارسنجی شده[٦]،HPLC[۷] و RP-HPLC[۸] دار[۸۲]. باید توجه شود که مزایای اصلی این روش عبارت از استفاده از روش بسیار ساده برای تعیین همزمان این داروها می باشد.

---

[۱] Rapid Derivative Spectrophotometric Method
[۲] Validated spectrophotometric method
[۳] micellar electro kinetic chromatography
[٤] Integrated Analytical Tools Spectrophotometric
[۵] Liquid chromatography mass-mass spectroscopy
[٦] Validated liquid chromatographic method
[۷] High performance liquid chromatography
[۸] Reverse phase high performance liquid chromatography

جدول ۵-۱ پارامترهای ارزیابی روش به ترتیب برای بتامتازون و نفازولین.

معادله	y = - ۰/۰۳۱ x + ۱/۵۳۳۲, y= - ۰/۰۰۳۷ x + ۱/۸۱۱۶
R^2	۰/۹۹۰۷, ۰/۹۹۰۶
حد تشخیص	۰/۰۰۶ and ۰/۱٤ μ g mL^{-1}
ناحیه خطی	۰/۰۵-۱۳ μg mL^{-1} and ۱۳-۱۳۳/۳ μg mL^{-1}



شکل ٤-۵ نمودار کالیبراسیون الف) برای بتامتازون ۰/۰۵-۱۳ μg mL^{-1} و ب) نفازولین ۱۳-۱۳۳ μg mL^{-1} قدرت یونی ۱ mmol L^{-1} زمان انکوباسیون ۱۰ دقیقه pH ٦ و غلظت AuNPs ۱۰ n mol L^{-1}.

جدول ۵-۲ مقایسه پارامترهای برتری روش مورد بحث با تکنیک‌های دیگر برای اندازه گیری بتامتازون و نفازولین.

روش اندازه گیری	ناحیه خطی ($\mu g\ mL^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu g\ mL^{-1}$)	منبع
a) برای نفازولین			
اسپکترومتری	۱-۰/۲	۰/۰۳	[۸۲]
اسپکترومتری و کمومتریکس	۲-۰/۲	۰/۰۱	[۸۳]
کروماتوگرافی الکتروسینتیک مایسلی	۱۰-۰/۰۸	۰/۰۰٤	[۸٤]
روش‌های انتگرال گیری تجزیه ای	۳۵-۵	۰/۰٦	[۸۵]
اسپکترو متری و کمومتریکس و کروماتوگرافی	۱۰۰-۰/۵	۰/۰٦	[۸٦]
b) برای بتامتازون			
کروماتوگرافی مایع-اسپکتروسکوپی جرمی-جرمی	۳۲-۲	۰/۵۳	[۸۷]
کروماتوگرافی مایع هم عیار شده	۱۵۰-۱۵	٦/۱	[۸۸]
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا	۲۰۰-۵	۱/۵	[۸۹]
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس	۱۰۰-۰/۱	۰/۰۲۵	[۹۰]
روش اسپکترومتری ساده	(بتامتازون)۱۳-۰/۰۵ (نفازولین) ۱۳-۱۳۳/۳	(بتامتازون)۰/۰۰٦ (نفازولین)۰/۱٤	این روش

تعیین همزمان BET و NEP

بررسی مقدماتی نشان داد که کاهش شدت طیف هایUV-Vis در ۵۲۰ nm و افزایش در ٦٤٠nm ارتباط مستقیم با سطح BETو NEP در نمونه دارد(شکل‌های ۵-۵، ۵-٦ و ۵-۷). این ویژگی برای پیشنهاد یک روش تجزیه‌ای برای تعیین این داروها در نمونه‌های ما استفاده شد. تجمع AuNPs سنتز شده با سیترات به میزان BET و NEP مرتبط بودند[٤٠٧]. در طیف جذبی نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی در ابتدا کالیبراسیون تک متغیری استفاده شد به طوری که شدت در ۵۲۰nm به سادگی به غلظت دارو مرتبط شد. داده‌های دو انتهای منحنی، به ویژه غلظت‌های پایین، انحراف چشمگیری از خط راست دارد. به علاوه داده‌های پیش بینی انحرافات چشمگیری از داده‌های کالیبراسیون نشان می‌دهد و در نتیجه مدل کالیبراسیون حاصله برای پیش بینی داده‌های خارجی قابل استفاده نیست. این بی نظمی را می‌توان به تأثیر مزاحمت سایر اجزا نسبت داد که می‌تواند Au^{3+} را تجمع داده AuNPs با اندازه بزرگتر ایجاد کند. بنابراین ما رگرسیون PLS را به عنوان یک روش کالیبراسیون چند متغیری قوی و پرکاربرد برای مدل سازی نقش گونه‌های مزاحم در کل علامت‌های SPR استفاده کردیم. مدل PLS با استفاده از مجموعه کالیبراسیون توسعه یافت. تغییرات در PRESS و به صورت تابعی از تعداد متغیرهای نهفته PLS در شکل ۵-۷ آمده‌اند. همان طور که نشان داده شده است RMSE به یک حداقل در تعداد متغیرهای نهفته ۷ می‌رسد. به علاوه اولین صفحه Auدر PRESS در تعداد متغیرهای نهفته ۷ مشاهده شد. بنابراین، ۷ جزء اصلی برای محاسبه ضرایب رگرسیون PLS پیش بینی BET و NEP نمونه‌های پیش بینی انتخاب شدند. خطای مربع متوسط ریشه اعتبارسنجی متقابل (RMSECV) تخمین شده با این تعداد متغیر نهفته ٪۲/۹۲ بود. در میان فاکتورهای آشکارسازی شده می‌توان یکی را به BETو دیگری را به NEP نسبت داد. به علاوه ، غیرخطی بودن در

ارتباط جذب- غلظت و برهمکنش بین فاکتورها می‌توانند به عنوان منابع دیگر فاکتورهای شیمیایی درنظرگرفته شود. مقادیر پیش بینی شده برای مقادیر NEPو BET در نمونه‌های کالیبراسیون و پیش بینی و خطاهای نسبی متناظرپیش بینی در جداول ۵-۲، ۵-۳ و ۵-٤ آمده‌اند. مشاهده شده است که مقادیر پیش بینی شده بسیار نزدیک به مقادیر حقیقی هستند و خطاهای پیش بینی نسبی تقریباً کمتر از ۰/۵٪ هستند. این تأیید می‌کند که موفقیت رگرسیون PLS در پیش بینی دقیق مقدار BET و NEP در نمونه‌ها به وجود آمده است. حال مقایسه نتایج کالیبراسیون چند متغیری PLS_1 و PLS_2 در یک مدل مناسب مفید است. برای این مقایسه و اعتبارسنجی مدل‌ها ، برخی پارامترهای آماری شامل ریشه مربع خطای میانگین پیش بینی(RMSEP)، ریشه مربع خطای میانگین اعتبارسنجی متقابل (RMSECV) و ریشه مربع خطای میانگین کالیبراسیون (RMSEC) محاسبه شدند. پارامترهای آماری محاسبه شده در جدول ۵-۳ آمده‌اند. از جدول ۵-٤و ۵-۵و ۵-٦ می‌توان دید که نتایج کالیبراسیون و پیش بینی PLS سازگارتر از کالیبراسیون یک متغیری است. یک مقایسه بین پارامترهای آماری PLSو مدل‌های تک متغیری نشان می‌دهد که RMSEP حاصل شده با PLS بسیار پایین‌تر است. به علاوه مدل PLS همه الزامات را دارد که باید به عنوان یک مدل پیش گویی در نظر گرفته شود در حالی که مدل تک متغیره این گونه نیست.

جدول ۵-۳ .مقادیر و سطوح مرجع برای نفازولین و بتامتازون در دسته پیش بینی سازی در مدل سازیPLS برای طیف‌های مریی فرابنفش در طول موج ٦٤٠ nm.

دسته پیش بینی					
عدد	مقادیر مرجع برای نفازولین	مقادیر مرجع برای بتامتازون	مقادیر پیش بینی شده		
			PLS_1		PLS_2
۱	٦٥٠	٥٥٠	٦٥١/٨٨٤٤	٥٥٧/٧٢٢	٦٥١/٨٨٦٩	٥٥٧/٧١٢٧
۲	٥١٠	٤٠٠	٥٠٨/٣٧١٥	٤٠١/٩٢٧٢	٥٠٨/٣٥٨	٤٠١/٩٨٨٢
۳	٣٣٠	٢٠٠	٣٢٧/٩٥٢٥	١٨٤/٥٤١٧	٣٢٧/٩٧٢٧	١٨٤/٤٥٧٧
٤	٣٠٠	٦٥٠	٢٩٧/٤٥٧٣	٦٤٨/٩٦١١	٢٩٧/٤٦١٨	٦٤٨/٩٤٧٥
٥	٥٦٠	٧٥٠	٥٦٢/٥٣٢	٧٤٥/١٠٨٨	٥٦٢/٥٣٩٩	٧٤٥/٠٥٨٧
٦	٢٣٠	١٥٠	٢٢٨/١٧٢٩	١٥٠/٥٨٨٥	٢٢٨/١٩٢١	١٥٠/٥٠١٥
۷	٤٥٠	٤٥٠	٤٥٠/٠٤٤٣	٤٥٤/٤٠٣٤	٤٥٠/٠١٨٧	٤٥٤/٥١١٩
	R.S.E. (%)		٠/٤٢	١/٤٢	٠/٤٣	١/٤٣
	$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}j - Cj)^2}{\sum_{J=1}^{N}(Cj)^2}\right] ١/٢ \times ١٠٠$					
١/٠٨	$R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(C\hat{}ij - Cij)^2}{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(Cij)^2}\right] ١/٢ \times ١٠٠$					

جدول ٥-٤ .مقادیر و سطوح مرجع برای نفازولین و بتامتازون در مدل سازیPLS برای طیف‌های مریی فرابنفش در طول موج ٦٤٠ nm در دسته کالیبراسیون.

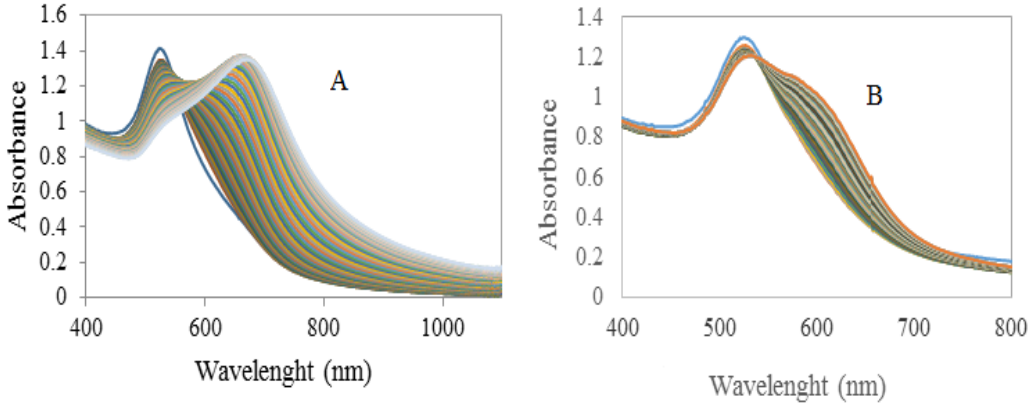
دسته کالیبراسیون					
عدد	مقادیر مرجع نفازولین	مقادیر مرجع بتامتازون	مقادیر پیش بینی شده		
			PLS_1		PLS_2
١	٣٢٠	٢٦٠	٣١٧/٦٦٥٨	٢٥٧/٨٠٨١	٣١٧/٦٤٣١	٢٥٧/٨٠٦٥
٢	٢٧٠	١٤٥	٢٧٣/٩٣٠٧	١٤٩/٩٦٠٢	٢٧٣/٧٩٣١	١٥٠/٠١٠٢
٣	٦٣٠	٨١٠	٦٥٤/٥٠٧٢	٨٤١/٩٤٠٧	٦٥٣/٩٦٨٢	٨٤٢/٢٠٢٣
٤	٥٨٠	٧٣٥	٥٧٨/٨٥٨٦	٧٣٩/٥٦٧٣	٥٧٨/٧٩٧٣	٧٣٩/٥٩٦٤
٥	٢١٠	٢٧٠	٢٠٧/١١٢٧	٢٦٢/٧١٥٨	٢٠٧/٢٢٤٩	٢٦٢/٦٦٠٩
٦	٢٨٠	٣٤٠	٢٧٨/٦٥٨	٣٥٩/٥٠٤٦	٢٧٨/٧٩١٥	٣٥٩/٤٣٩٧
٧	٢٤٠	٣٠٠	٢٣٤/٢٨٥٦	٢٩٩/٥٦٤١	٢٣٤/٣٩٨	٢٩٩/٥٠٩٢
٨	٢٦٠	٣٤٠	٢٥٥/٢٦٩٥	٣٢٩/٦٠٢٣	٢٥٥/٣٨٧٦	٣٢٩/٥٤٤٩
٩	٣٩٠	٤٦٠	٣٧٩/٨٢٢٨	٤٤٨/٥٧٩٩	٣٨٠/٠٦٥٨	٤٤٨/٤٥٨٣
١٠	٣٧٠	٤٧٠	٣٥٩/٢٠٣٨	٤٥٦/٨٩٦٣	٣٥٩/٣٨٥٢	٤٥٦/٨٠٧٦
١١	٣٠٠	٣٨٠	٢٩٦/٨٢٩٢	٣٧٧/٣٠٣٦	٢٩٦/٨٤٠٤	٣٧٧/٢٩٧٧
١٢	٥٧٠	٧٣٠	٥٨٤/١٥٢٦	٧٣٦/٥٩٢٣	٥٨٤/٠٠٧٤	٧٣٦/٦٦١٣
١٣	٣٧٠	٤٧٠	٣٦٠/٥٩٧	٤٥٤/٩٩١٧	٣٦٠/٨٠٢٨	٤٥٤/٨٩٠٨
١٤	٢٣٠	٢٩٠	٢٢١/٢٦٩٦	٢٧٧/٤٤١٦	٢٢١/٣٩٠٣	٢٧٧/٣٨٢٣
١٥	٢٢٠	٢٩٠	٢١٦/٢٢٤٩	٢٧٦/٥٩٢٧	٢١٦/٣٣٧٣	٢٧٦/٥٣٧٩
١٦	٤١٠	٥٣٠	٤٠٦/٧٥٩٥	٥٢٣/٠٢٩٢	٤٠٦/٩٤٦٤	٥٢٢/٩٣٨١
١٧	٢٥٠	٣٢٠	٢٤٠/٠٦٥٧	٣٠٩/١٢٩٦	٢٤٠/١٨٢٤	٣٠٩/٠٧٢٨
١٨	٢١٠	٢٨٠	٢٠٩/٥١١٢	٢٧٣/٩٢٨٨	٢٠٩/٦٠٥٦	٢٧٣/٨٨٣٢
١٩	٢٦٠	٣٣٠	٢٥٢/٦٨١٢	٣٢٣/٦٢٣٩	٢٥٢/٧٩١٨	٣٢٣/٥٦٩٩
		R.S.E. (%)	٢/٤٤	٢/٧١	٢/٣٩	٢/٧٣

$$R.S.E.(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{N}(C\hat{}j - Cj)^2}{\sum_{J=1}^{N}(Cj)^2}\right]^{1/2} \times 100$$

$$R.S.E.t(\%) = \left[\frac{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(C\hat{}ij - Cij)^2}{\sum_{J=1}^{M}\ \sum_{J=1}^{N}(Cij)^2}\right]^{1/2} \times 100$$ ٢/٦١

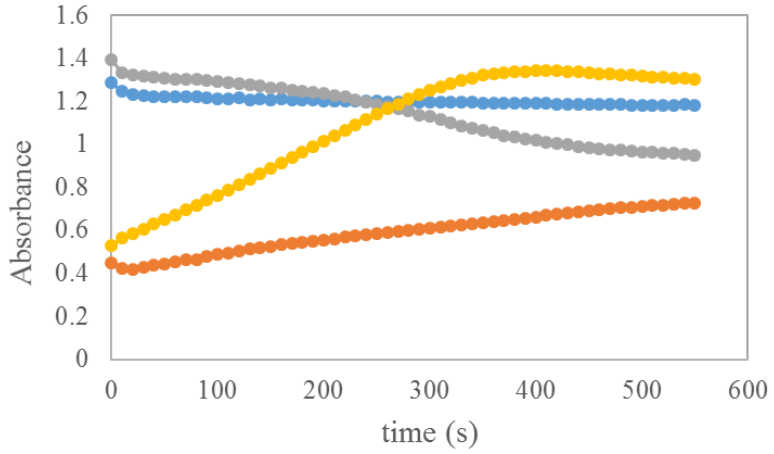
جدول ۵-۵ .پارامترهای اماری برای مدل کالیبراسیون در اندازه گیری همزمانی نفازولین و بتامتازون با استفاده از داده‌های سینتیکی.

پارامترهای آماری	مدل پیش بینی	
	PLS_1 (%)	PLS_2 (%)
RMSEP	۳/۰۱	۳/۰۵
RMSECV	۲/۹۱	۲/۹۲
RMSEC	٤/۹٦	٤/۹۹

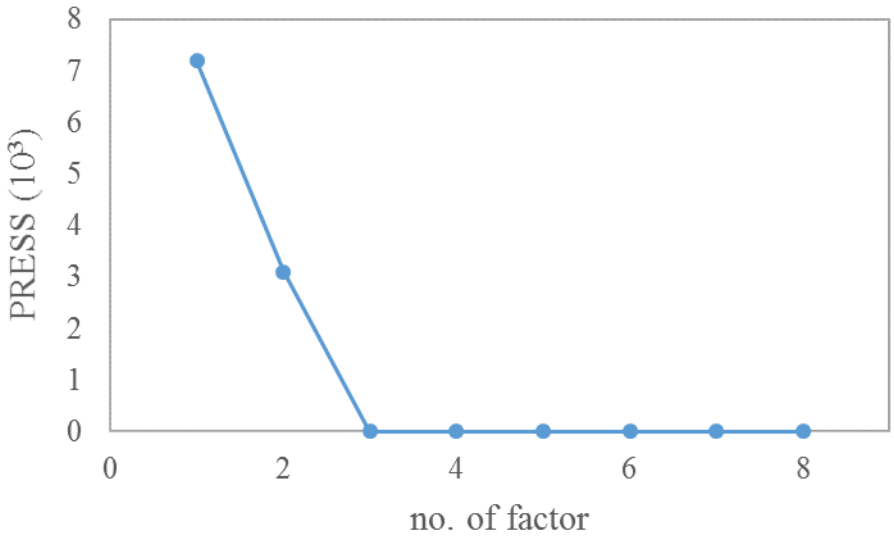


شکل ۵-۵ .تغییر در جذب نانو ذرات طلا در طول موج‌های ۵۲۰ و ٦٤٠ nm نسبت به زمان برای تزریق ۷۰۰ µL از محلول‌های ۱-mol L ۱۰-٤ بتامتازون و نفازولین در شرایط بهینه: قدرت یونی ۱-mmolL ۱ زمان ۱۰ دقیقه :٦ pH و غلظت $AuNPs$ $n\ mol\ L^{-1}$ ۱۰.

Blue ٥٢٠ BET, Orange ٦٤٠ BET
Black ٥٢٠ NEP, Yellow ٦٤٠ NEP



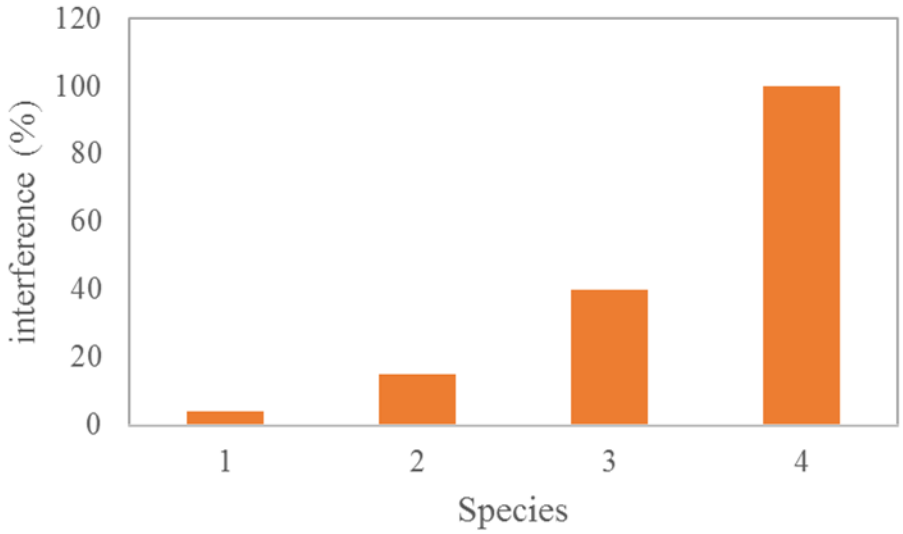
شکل ۵-۶ تغییر در جذب نانو ذرات طلا در طول موج‌های ۵۲۰ و ۶۴۰ nm نسبت به زمان برای تزریق ۷۰۰ µL از محلول‌های 10^{-4} mol L^{-1} بتامتازون و نفازولین در شرایط بهینه: قدرت یونی ۱ mmol L^{-1} زمان ۱۰ دقیقه :pH ۶ و غلظت AuNPs ۱۰ n mol L^{-1}.



شکل ۵-۷ .نمودار PRESS در مقابل تعداد فاکتورها در اندازه گیری همزمانی بتامتازون و نفازولین.

بررسی اثر مزاحمت

آثار مواد همزیست خارجی مانند ناپروکسن ، اسکوربیک اسید، ترامادول، کدئین ، استامینوفن ، ساکاریدها، آمینواسیدها و یونها تست شدند. مطابق شکل ۵-۸، بیشتر مواد همزیست بررسی شده تداخل و مزاحمت برجسته‌ای در آزمایش نداشت. از نتایج ، تداخل ناپروکسن، اسکوربیک اسید، $Na_۲No_۲$، تریپتوفان، تیروزین، گلوکز، ساکارز، فروکتوز و لاکتوز بسیار ضعیف بودند. در میان مواد تست شده $Ca^{۲+}, Fe^{۲+}, Mg^{۲+}, Cl^{-}, I^{-}, No_۳^{-}, Na^{+}, K^{+}$ ، کدئین و سیستئین (شکل ۵-۸ گونه‌های شماره ۲) می‌توانند با غلظت‌های بالاتر مجاز شدند ولی سفالکسین،سفتریاکسان، آنتازولین، $NH_۲OH$، $Mn^{۲+}$ ، $Cd^{۲+}$، $So_٤^{۲-}$، $Ca^{۲+}$ ، $Zr^{۲+}$، $Co^{۲+}$ ، $Zn^{۲+}$، $Ni^{۲+}$، $Al^{۳+}$، $Fe^{۲+}$، $Cu^{۲+}$ فقط می‌توانند با غلظت‌های متوسط نسبی مجاز شدند(گونه‌های شماره ۳ در شکل ۵-۸). غلظت‌های مجاز این مواد مزاحم بالاتر از BETو NEP بود که نشان می‌داد این روش انتخابگری خوبی بین داروها و سایر گونه‌ها داشت به دلیل تفاوت در کاهش و افزایش طیف‌ها با زمان.



.شکل ۵–۸ بررسی مزاحمت گونه‌های مزاحم در اندازه گیری همزمانی بتامتازون و نفازولین مخلوط µL ۲۰۰ از هر کدام از داروها در شرایط بهینه : قدرت یونی $mmol\ L^{-1}$ ۱ زمان ۱۰ دقیقه :pH ٦ و غلظت $n\ molL^{-1}$ AuNPs ۱۰. اعداد ۱و۲و۳ شماره گونه‌های دسته بندی شده در متن است و ٤ رفتار بتامتازون و نفازولین در مخلوط را نشان میدهد.

تحلیل نمونه حقیقی

به منظور تست قابلیت استفاده روش پیشنهادی، از آن برای تعیین BET و NEP در سرم وقطره چشم استفاده شد. جدول ٤۰–۳ نشان می‌دهد که BET و NEP در نمونه اصلی آشکارسازی شده عبارتنداز(٤/۹۸، ۱۵/۰۳) برای سرم و (٦/۸۸و ۱٤/۲۳) μgmL^{-1} برای قطره چشم. یک حجم دقیق از سرم و قطره‌های چشمی با DDW رقیق‌تر شد تا غلظت BET و NEP درمحلول نهایی قطره‌های چشم در محدوده خطی منحنی کالیبراسیون قرار گیرد . نتایج فوق قابلیت استفاده بالقوه این روش را در آشکارسازی همزمان BETو NEP در نمونه‌های

حقیقی نشان می‌دهد. نتایج این بررسی در جدول ٤٠-٣ آمده‌اند. این عملکرد خوب روش پیشنهادی برای تعیین همزمان BET و NEP در سرم و قطره چشم را نشان می‌دهد.

جدول ٥-٦ .بررسی نمونه حقیقی سرم رقیق شده خونی و قطره‌های چشمی برای بتامتازون و نفازولین در شرایط بهینه : قدرت یونی $^{-1}$ mmol L ۱ زمان ۱۰ دقیقه :٦ pH و غلظت AuNPs $^{-1}$n molL ۱۰.

نمونه	اضافه شده (µg mL^{-1})		پیدا شده (µg mL^{-1})		بازده (٪)	
	بتامتازون	نفازولین	بتامتازون	نفازولین	بتامتازون	نفازولین
سرم	۰	۰	ND*	ND	–	–
	٥/۰	۱٥/۰	٤/۹۸	۱٥/۰۳	۹۹/٦	۱۰۰/۲
قطره‌های چشمی	۰	۰	ND	ND	–	–
	۷/۰	۱٤/۰	٦/۸۸	۱٤/۲۳	۹۸/۳	۱۰۱/٦

*ND: دیده نشد

منابع

١. Daniel M.C., Astruc D., ٢٠٠٣, “Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology”, Chem. Rev., Vol. ١٠٤, pp. ٢٩٣-٣٤٦.

٢. Abad A., Concepción P., Corma A., García H., ٢٠٠٥, “A collaborative effect between gold and a support induces the selective oxidation of alcohols”, Angew. Chem. Int. Ed., vol. ٤٤, pp. ٤٠٦٦-٤٠٦٩.

٣. Sharma A.K., Gupta B.D., ٢٠٠٥, “On the sensitivity and signal to noise ratio of a step index fiber optic surface plasmon resonance with nanoparticle films”, Photonics. Nanostr., vol. ٣, pp. ٣٠-٣٧.

٤. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Cortie M.B., ٢٠٠٦, “Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles”, Trends. Biotech, Vol. ٢٤, pp. ٦٢-٦٧.

٥. Chang T.L., Lee Y.W., Chen C.C, Ko F.H., ٢٠٠٧, “Effect of different gold nanoparticle sizes to build an electrical detection DNA between nano gap electrodes”, Microelectron. Eng. Vol. ٨٤, pp. ١٦٩٨–١٧٠١.

٦. Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J., ١٩٩٦, “A DNA based method for assembling nanoparticles”, Nature, Vol. ٣٨٢, pp. ٦٠٧–٦٠٩.

٧. Schmid G., ١٩٩٤, “Cluster and colloids: From theory to applications” John Wiley & Sons: New York.

٨. Henglein A., ١٩٩٣, “Physicochemical properties of small metal particles in solution: microelectrode reactions, chemisorption, composite metal particles”, and the atom-to-metal transition. J. Phys. Chem. Vol. ٩٧, pp. ٥٤٥٧-٥٤٧١.

٩. El-Sayed M.A., ٢٠٠١, “Some interesting properties of metals confined in time and. nanometer space of different shapes”, Acc. Chem. Res., Vol. ٣٤, pp. ٢٥٧–٢٦٤.

١٠. Afzali A., Dimitrakopoulos C.D., Breen T.L., ٢٠٠٢, “High-performance, solution-processed organic thin film transistors from a novel pentacene precursor”, J. Am. Chem. Soc. Vol. ١٢٤, pp. ٨٨١٢-٨٨١٣.

١١. Franke M.E., Koplin T.J., Simon U., ٢٠٠٦, “Metal and metal oxide nanoparticles in chemiresistors: Does the nanoscale matter?” , Small., Vol. ٢, pp. ٣٦-٥٠.

١٢. Nair A. S., Pradeep T. Y., ٢٠٠٣, “Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles”, Curr. Sci., Vol. ٨٤, pp. ١٥٦٠-١٥٧٠.

١٣. Van Hyning D. R., Zukowski C. F., ١٩٩٨, “Synthesis of Noble Metal Nanoparticles”, Langmuir Vol.١٤, pp. ٧٠٤٦-٧٠٣٤.

١٤. Yugang S., Gates B., Mayers B., Xia Y., ٢٠٠٢, “Crystalline Silver Nanowires by Soft Solution Processing”, Nano Lett., Vol. ٢, pp. ١٦٥-١٦٨.

١٥. Jung J., Oh H., Noh H., Ji J., Kim S., ٢٠٠٦, “Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area”, J. Aerosol Sci., Vol. ٣٧, pp. ١٦٦٢–١٦٧٠.

١٦. Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., Sawabe H., ٢٠٠٠, “Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation”, J. Phys. Chem. B., Vol. ١٠٤, pp. ٨٣٣٣–٨٣٣٧.

١٧. Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., Sawabe H., ٢٠٠١, “Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant”, J. Phys. Chem. B, Vol. ١٠٥, pp. ٥١١٤–٥١٢٠.

١٨. Kabashin A.V., ٢٠٠٣, “Meunier M., Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water”, J. Appl. Phys., Vol. ٩٤, pp. ٧٩٤١–٧٩٤٣.

١٩. Cozzoli P., Comparelli R., Fanizza E., Curri M., Agostiano A., Laub D., ٢٠٠٤, “Photocatalytic synthesis of silver nanoparticles stabilized by TiO_2 nanorods: A semiconductor/metal nanocomposite in homogeneous nonpolar solution”, J. Am. Chem. Soc. Vol. ١٢٦, pp. ٣٨٦٨–٣٨٧٩.

٢٠. Zhou Y., Yu S.H., Wang C.Y., Li X.G., Zhu Y.R., Chen Z.Y., ١٩٩٩, “A Novel ultraviolet irradiation photoreduction technique for the preparation of single- crystal Ag nanorods and Ag dendrites”, Adv. Mat., Vol. ١١, pp. ٨٥٠–٨٥٢.

٢١. Socol Y., Abramson O., Gedanken A., Meshorer Y., Berenstein L., Zaban A., ٢٠٠٢,“Suspensive electrode for-mation in pulsed sonoelectrochemical synthesis of silver nanoparticles”, Langmuir, Vol. ١٨, pp. ٤٧٣٦–٤٧٤٠.

٢٢. Hornyak G.L., Patrissi C.J., Oberhauser E.B., Martin C.R., Valmalette J.C., Lemaire L., Dutta J., Hofmann H., ١٩٩٧, “Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology”, NanoStruct. Mater. Vol. ٩, ٥٧١-٥٧٤.

٢٣. NASA Study edited by Freita.

٢٤. https://www.nanoclub.ir.

٢٥. Hainfield J., Powell R., ٢٠٠٠, “investigation clinical application thechnology”, Master Proj., Vol. ٤٨, pp. ٤٧١-٤٧٩.

٢٦. Wang L.S., Hong R.Y., ٢٠١١, "Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Nanoparticles", Adv. in Nanocomp. – Syn. Charac.and Indus.l Appl., Dr. Boreddy Reddy (Ed.), Vol. ٧, pp. ٩٧٨-٩٥٣.

٢٧. Shao N., Jin J.Y., Cheung S.M., Yang R .H., Chan W.H., Mo T., ٢٠٠٦, "A Ferromagnetically Coupled Mn١٩ Aggregate with a Record S=٨٣/٢ Ground Spin State", Angew. Chem. Int. Edn., Vol. ٤٥, pp. ٤٩٤٤–٨.

٢٨. Slocik J. M., Zabinski J.S., Phillips D. M., Naik R. R., ٢٠٠٨, "Evaluation of peptide-capped gold nanoparticle networks for vapour sensing", Adv. in Nanocomp. – Syn. Charac.and Indus. Appl., Vol. ٤, pp. ٥٤٨–٥١

٢٩. Yu C.J., Tseng W. L., ٢٠٠٨, "Colorimetric Detection of Mercury (II) in a High-Salinity Solution Using Gold Nanoparticles Capped with ٣-Mercaptopropionate Acid and Adenosine Monophosphate", Langmuir. Vol. ٢٤, pp. ١٢٧١٧–١٢٧٢٢.

٣٠. Ghosh S.K., Pal T., ٢٠٠٧, "Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications", Chem. Rev., Vol. ١٠٧, pp. ٤٧٩٧–٤٨٦٢.

٣١. Lee I.H., Kwon H.K., Yu M.K., Lee J., Lee T.S., Im S.H., Jon S., ٢٠١٢, "Reversible covalent inhibition of a protein target", Angew. Chem. Int. Ed., Vol. ١٢٤, pp. ٨٩٣٠–٨٩٣٥.

٣٢. Liu D., Wang Z., Jiang X., ٢٠١١, "Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules", Nanoscale. Vol. ٣, pp. ١٤٢١-١٤٢٥.

٣٣. Liu B., Tan H., Chen Y., ٢٠١٣, "Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Test Strip for Rapid Detection of Sulfonamides in Eggs and Chicken Muscles", Microchim. Acta. Vol. ١٨٠, pp. ٣٣١-٣٣٥.

٣٤. Villa D., Gonzalez M.C., Escarp A., ٢٠١٢, "sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: chemical creativity behind the assay", Anal. Chim. Acta. Vol. ٧٥١, pp. ٢٤-٢٩.

٣٥. Dang Y.Q., Li H.W., Wang B., Li L., Wu Y., ٢٠٠٩, "Selective detection of trace $Cr^{٣+}$ in aqueous solution by using ٥,٥'-dithiobis (٢-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticle", ACS. Appl. Mater. Interfaces. Vol. ١, pp. ١٥٣٣-١٥٣٥.

٣٦. Jiang Y., Zhao H., Lin Y., Zhu N., Ma Y., Mao L., ٢٠١٠, "A simple assay for direct colorimetric visualization of trinitrotoluene at picomolar levels using gold nanoparticles", Angew. Chem. Int. Ed., Vol. ٤٩, pp. ٤٨٠٠-٤٨٢٠.

٣٧. Jiang Y., Zhao H., Zhu N., Lin Y., Yu P., Mao L., ٢٠٠٨, "Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins", Angew. Chem. Int. Ed., Vol. ٤٧, pp. ٨٦٠١-٨٦٠٥.

٣٨. Zheng Y., Wang Y., Yang X., ٢٠١١, "recent developments in carbon nanomaterial sensors", Sen. Act. B., Vol. ١٥٦, pp. ٩٥-٩٦.

٣٩. http://www.infometrix.com/chemometrics/chemometrics.html.

٤٠. Kincl M., Turk S., Vrecer F., ٢٠٠٥, "Application of experimental design methodology in development and optimization of drug release method", Int. J. of Pharm., Vol. ٢٩١, pp. ٣٩-٤٩.

٤١. Brereton R. G., ٢٠٠٢, "Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant", Wiley, England.

٤٢. Wold S., Sjöström M., Eriksson L., ٢٠٠١,"PLS-regression: a basic tool of chemometrics", Chemo. Intell. Lab. Systems, Vol. ٥٨, pp. ١٠٩–١٣٠.

٤٣. Jonsson T., Christensen C.B., Jordening H., ١٩٨٨,"The bioavailability of rectally administered morphine", Pharmacol. Toxicol. , Vol. ٦٢, pp. ٢٠٣–٢٠٥.

٤٤. Whimster F., ١٩٩٧, "Cambridge textbook of accident and emergency medicine" Cambridge: Cambridge University .

٤٥. Güneş Y. M., Bakirdere S., ٢٠٠٣, “Contamination of aluminium from cooking utensils and yogurt containers,” Bull. Environ. Contamin. Toxic, Vol. ٧٠, pp. ٤٣٧–٤٤٢.

٤٦. Lide D. R., ٢٠٠٥, "Magnetic susceptibility of the elements and inorganic compounds, CRC Handbook of Chemistry and Physics", ٨٦th ed., Boca Raton (FL), CRC Press.

٤٧. . Morrow H., ٢٠١٠, "Cadmium and Cadmium Alloys, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology", John Wiley & Sons.

٤٨. Macintyre P.E., Schug S.A., Scott D.A., ٢٠١٠, "Working Group of the Australian and New Zealand College of Anaesthetists and Faculty of Pain Medicine", Acute Pain Management: Scientific Evidence , ٣rd ed., Melbourne, National Health and Medical Research Council, Australia.

٤٩. Schug S.A., ٢٠١٣, "Codapane Forte Paracetamol and codeine phosphate product information", TGA eBusiness Services, Alphapharm Pty Limited, London.

٥٠. Granberg R.A., Rasmuson A.C., ١٩٩٩, "Solubility of paracetamol in pure solvents", Journal of Chemical & Engineering Data, Vol. ٤٤, pp. ١٣٩١–١٣٩٥.

٥١. Karthikeyan M., Glen R. C., Bender A., ٢٠٠٥, "General Melting Point Prediction Based on a Diverse Compound Data Set and Artificial Neural Networks", J. of Chem. Inform. Model., Vol. ٤٥, pp. ٥٨١–٥٩٠.

٥٢. Bartlett J., ٢٠١٣, "Clinical Ocular Pharmacology", ٢nd ed., Elsevier.

٥٣. Moulds R., Jeyasingham M., ٢٠١٠, "Gentamicin: a great way to start", Austr. Presc, Vol. ٣٣, pp. ١٣٤–١٣٥.

٥٤. Yebra M.C., Cespon R.M., Cid A.M., ٢٠٠١, "Automatic determination of ascorbic acid by flame atomic absorption spectrometry", Anal. Chim. Acta., Vol. ٤٤٨, pp. ١٥٧-١٦٤

٥٥. Agater I.B., Jewsbury R.A., ١٩٩٧, "Direct chemiluminescence determination of ascorbic acid using flow injection analysis", Anal. Chim. Acta., Vol. ٣٥٦, pp. ٢٨٩-٢٩٤.

٥٦. Wang S., Schram I.M., Sund R.B., ١٩٩٥, "Determination of plasma ascorbic acid by HPLC: Method and stability studies", Eur. J. of Pharm. Sci., Vol. ٣, pp. ٢٣١-٢٣٩.

٥٧. Esteban MR., Ho CN., ١٩٩٧, "Enzymic spectrophotometric determination of ascorbic

٥٨. Nishino S.F., Spain J.C., ٢٠٠٤, "Catabolism of nitro aromatic compounds", third ed., Pseudomonas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

٥٩. Nishino S. F., Spain J.C., He Z., ٢٠٠٠, "Strategies for aerobic degradation of nitro aromatic compounds by bacteria: process discovery to field application", CRC, Boca Raton, FL.

٦٠. Jin Y., Jang J.W., Han C.H., Lee M.H., ٢٠٠٥, "Development of ELISA and Immunochromatographic Assay for the Detection of Gentamicin", J of Agri. and Food Chem. Vol. ٥٣, pp. ٧٦٣٩-٧٦٤٣.

٦١. Jurjen ter M., Remco R., Colin J. I., Carel A. G. M., ٢٠١١, "Organic Modification and Subsequent Biofunctionalization of Porous Anodic Alumina Using Terminal Alkynes", Langmuir, Vol. ٢٧, pp ١٣٦٠٦–١٣٦١٧.

٦٢. Tseng K.H., Hsieh C.L., Huang J.C., ٢٠١٥, " The Effect of NaCl/pH on Colloidal Nanogold Produced by Pulsed Spark Discharge", Journal of Nanomaterials, Vol ٢٠١٥, pp. ٧-١٥.

٦٣. Kazanga I., Tameni S., Piccinotti A., ٢٠١٢, "Psychoactive substances in seriously injured drivers in Denmark", Forensic. Sci. Int. Vol. ٢١٥, pp. ٤٦-٤٩.

٦٤. Storhoff J.J., Lazarides A.A., Mucic R.C., ٢٠٠٠, "What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?", J. Am. Chem. Soc. Vol. ١٢٢, pp. ٤٦٤٠-٤٦٤٥.

٦٥. Conde J., Dias J. T., Grazú V., ٢٠١٤, "Revisiting ٣٠ years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine", Front. Chem. Vol. ٢, pp. ٤٨-٥٠.

٦٦. Madrakian T., Afkhami A., Borazjani M., Bahram M., ٢٠٠٥, "Partial least-squares regression for the simultaneous determination of aluminum and beryllium in geochemical samples using xylenol orange", Spectrochimica Acta. Part A. Vol. ٦١, pp. ٢٩٨٨-٢٩٩٠.

٦٧. Luger T.J., Häussler R., ١٩٩٠, "Determination of hemoglobin concentration using the hemoglobin azide method in traumatic emergencies", Article in German. Vol. ٣٩, pp.١٢٥-١٢٩.

٦٨. Baker W., ١٩٣١, "the determination of hemoglobin in minute amounts of blood by WTJ'S method", From the Department of Biochemistry, School of Medicine, Western Reserve University, Cleveland.

٦٩. Palmer W., ١٩١٧, "the colorimetric determination of hemoglobin", From the Hospital of the Rockefeller Institute for Medical Research, Cleveland.

٧٠. Matias R., Ribeiro P. R. S., Sarraguça M. C., ٢٠١٤, "A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests", Anal. Methods, Vol. ٦, pp. ٣٠٦٥-٣٠٧١

٧١. Nagaraja P., Vasantha R.A., Yathirajan H.S., ٢٠٠٢, " Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or ٣-aminophenol or sodium molybdate-pyrocatechol", Anal. Biochem. Vol. ٣٠٧, pp. ٣١٦-٣٢١.

٧٢. Lebiedzińska A., Dąbrowska M., Szefer P., Marszałł M., ٢٠٠٨, "High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Folic Acid in Fortified Food Products", Toxic. Mech. and Meth. Vol. ١٨, pp. ٤٦٣-٤٦٧.

٧٣. Yordanov A. T., Wolf N. J., M.Georgiev E., Koch H. F., Falana O. M., ١٩٩٩, "Advances in Endophytic Research", Comments Inorg. Chem., Vol. ٢٠, pp. ١٦٣-١٦٥.

٧٤. Zhang X., Chen Gaozhong Cao M., Hu G., ٢٠١٣, "Determination of Morphine and Codeine in Human Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry", J. Anal. Methods. Chem. Vol. ١٥, pp. ٦-١٠.

٧٥. Bashir M., Mohammadi M.A., Alkazemi B., ٢٠١٣, "analgesic effect of intraarticular morphine, after arthroscopic knee surgery", Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. Vol. ٥, pp. ٩٢-٩٥.

٧٦.

http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=٦٦٦٥d٠e٣-e٣٥b-٤٥e٤-b٠fe ٢٤c٢٥e٢٦f٥ad&type=display, ٢٠١٥.

٧٧. Chunfang L., Dongxiang L., Gangqiang W., Jie X., Wanguo H., ٢٠١١, "Ambient Air and Hole Transport Layer Free Synthesis: Towards Low Cost CH٣NH٣PbI٣ Solar Cells", Nanoscale Res. Lett. Vol. ٦, pp. ٤٤٠-٤٥٠.

٧٨. Souri E., Amanlou M., ٢٠١٣, "medicinal chemistry", Tehran University of Medical Sciences, Iran. Chemical and pharmacy. Bullet. Vol. ٣, pp. ١٢-١٥.

٧٩. NW A., Hegazy M.A., Abdelkawy M., Abdelfatah R.M., ٢٠١٣, "Simultaneous determination of naphazoline hydrochloride, chlorpheniramine maleate", Pak. J. Pharm. Sci., Vol. ٢٦, pp. ٦٤١-٦٤٨.

٨٠. Maria J., Gallego L., Perez Arroyo J., ٢٠١٣, "Dosimetric comparison of ٣-dimensional conformal and field-in-field radiotherapy techniques for the adjuvant treatment of early stage endometrial cancer", J. Sep. Sci. Vol. ٢٦, pp. ٦٥٠-٦٥٥.

٨١. Eman Frag Y.Z., Gehad Mohamed G., Nour El-Dien F.A., ٢٠١١, "Simple Spectrophotometric Methods for Determination of Tenofovir Fumarate and Emtricitabine in Bulk Powder and in Tablets", Pharma. Anal. Acta. Vol. ٢٢, pp. ٢٠٠-٣٠٠.

٨٢. Sayed N., Hegazy M., Abdelkawy M., Abdelfatah R., ٢٠١٣, "Botanical and genetic characteristics of Farsetia aegyptia Turra growing in Egypt", Bull. Fac. Pharm., Vol. ٥١, pp. ٥٧–٦٨.

٨٣. Salem I. I., Alkhatib M., Najib N., ٢٠١١, "Recent advances in the application of transmission Raman spectroscopy to pharmaceutical analysis", Jord. J. Pharm. Biomed. Anal. Vol. ٥٦, pp. ٩٨٣-٩٩١.

٨٤. Belal F., Sharaf M.K., Din E., Enany N., Saad S., ٢٠١٣, "Direct fluorescence polarization aptamer-based assay for the determination of adenosine", Anal. Meth. Vol. ٢٣, pp. ٩٣٠-٩٣١.

٨٥. Burda C., Chen X., Narayana R., El-Sayed M. A., ٢٠٠٥, "Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes", Chemical Reviews. Vol. ١٠٥, pp. ١٠٢٥-١١٠٢.

٨٦. Saha K., Agasti S.S., Kim C., Li X., Rotello M. V., ٢٠١٢, "Gold nanoparticles in chemical and biological sensing", Chemical Reviews. Vol. ١١٢, pp. ٢٧٣٩-٢٧٧٩.

٨٧. Vilela D., Gonzalez M. C., Escarpa A., ٢٠١٢, "Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical

creativity behind the assay a review", Analytica Chimica Acta. Vol. ٧٥١, pp. ٤٠-٤٣

٨٨. HaoHan J., Xu Zh., Li J., Meng X., ٢٠١١, "Surface-enhanced Raman scattering analysis of perchlorate using silver nanofilms deposited on copper foils", Research Letters. Vol. ٦, pp. ٢٦٣-٢٧٣.

٨٩. Yadong Y., Zhi-Yuan L., Ziyi Z.H., Byron G., Sagar V.W., ٢٠٠٢, "Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process", Journal of Materials Chemistry. Vol. ١٢, pp. ٥٢٢-٥٢٧.

٩٠. Saito Y., Wang J., Batchelder D.N., Smith D.A., ٢٠٠٣, "Simple Chemical Method for Forming Silver Surfaces with Controlled Grain Sizes for Surface Plasmon Experiments", Langmuir. Vol. ١٩, pp. ٦٨٥٧- ٦٨٦١.