

اندازه‌گیری کلوگراسیلین به وسیله واکنش نورتابی شیمیایی افزایش یافته با نانوذره‌های Co_3O_4

مرتضی ایرانی فام*⁺، شیرین میکائیلی حاجی کندی

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

چکیده: در این کار پژوهشی اثر کاتالیزوری نانوذره‌های Co_3O_4 بر روی واکنش نورتابی شیمیایی لومینول-اکسیژن مولکولی انجام یافته در محیط قلیایی نشان داده شد. نانوذره‌های Co_3O_4 با روش ترسیب تند سنتز شدند و سپس با روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف سنجی تبدیل فوریه فرسرخ (FT-IR) مشخصه‌یابی شدند. نتیجه بررسی‌های اولیه نشان داد که داروی کلوگراسیلین می‌تواند شدت واکنش نورتابی شیمیایی لومینول-اکسیژن مولکولی را افزایش دهد. بر اساس این یافته‌ها، روشی نوین، ساده و بر پایه نورتابی شیمیایی برای اندازه‌گیری داروی کلوگراسیلین ارایه شد. بازه خطی، ضریب همبستگی، حد تشخیص و تکرارپذیری روش (%RSD) برای داروی کلوگراسیلین به ترتیب عبارت از 7×10^{-4} - 3×10^{-5} مولار، ۰/۹۹، $2/9 \times 10^{-5}$ مولار و ۲/۲٪ بود و اندازه‌گیری هر نمونه حدود یک دقیقه طول می‌کشید. همچنین این روش پیشنهادی با موفقیت برای اندازه‌گیری کلوگراسیلین در فرمولاسیون دارویی استفاده شد.

کلید واژگان: نانوذره‌های Co_3O_4 ؛ نورتابی شیمیایی؛ کلوگراسیلین؛ لومینول.

KEYWORDS: Co_3O_4 nanoparticles; Chemiluminescence; Cloxacillin; Luminol.

مقدمه

برای اندازه‌گیری غلظت انواع گونه‌های شیمیایی که به‌عنوان مواد واکنش دهنده و یا به‌عنوان کاتالیست و یا حتی خاموش کننده در واکنش نورتابی شیمیایی شرکت می‌کنند استفاده می‌شود. از برتری‌های روش‌های تجزیه‌ای مبتنی بر واکنش‌های نورتابی شیمیایی می‌توان به حساسیت بالا، بازه‌ی خطی گسترده و سادگی دستگاه وری اشاره کرد [۱]. به‌دلیل این برتری‌ها، واکنش‌های نورتابی شیمیایی در زمینه‌های گوناگون علمی مانند پایش آلاینده‌های محیط زیست [۲]، آنالیز نمونه‌های دارویی [۳]، کلینیکی [۴] و غذایی [۵] کاربردهای زیادی پیدا کرده‌اند.

واکنش‌های نورتابی شیمیایی به واکنش‌هایی گفته می‌شود که در آن‌ها انرژی واکنش شیمیایی به‌صورت نشر تابش الکترومغناطیسی در بازه‌ی طول موجی ماوراء بنفش، مرئی و فرسرخ آزاد می‌شود. با توجه به این که شدت نور نشر شده از واکنش نورتابی شیمیایی به غلظت گونه‌های شرکت کننده در واکنش وابسته است، به‌طور معمول می‌توان با ارتباط دادن شدت نور نشر شده به غلظت این گونه‌ها از واکنش‌های نورتابی شیمیایی به‌عنوان ابزاری تجزیه‌ای استفاده کرد. در واقع امروزه از واکنش‌های نورتابی شیمیایی به‌طور گسترده‌ای

*E-mail: mortezairanifam@yahoo.com

*عهده دار مکاتبات

بخش تجربی

مواد و معرفها

همه مواد مورد استفاده از خلوص تجزیه‌ای برخوردار بوده و بدون خالص سازی مصرف شدند. برای تهیه محلول ۰/۱ مولار کبالت (II) نیترات ۶ آبه، ۰/۷۲۷ گرم از نمک کبالت (II) نیترات در ۲۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. برای تهیه محلول ۰/۱ مولار سود، ۰/۱ گرم از سود در ۲۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. محلول $10^{-3} \times 1/7$ مولار تریتون ایکس - ۱۰۰ با حل کردن ۱/۰ میلی لیتر از تریتون ایکس - ۱۰۰ در ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و پخش کردن ۱/۰ میلی لیتر از این محلول در ۱۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر تهیه شد. محلول ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره‌های Co_3O_4 از افزودن $10^+ \times 1/0$ میلی گرم از نانوذره‌های Co_3O_4 در $10^+ \times 1/0$ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و پخش کردن نانوذره‌ها با دستگاه حمام فراصوت به مدت ۳ دقیقه تهیه شد. محلول ۱/۰ مولار سدیم هیدروکسید از حل کردن ۴/۰ گرم از سدیم هیدروکسید در $10^+ \times 1/0$ میلی لیتر آب دوبار تقطیر تهیه شد. برای تهیه محلول $10^{-2} \times 1/0$ مولار از لومینول، $0/177$ گرم از لومینول در ۱۰۰ میلی لیتر محلول سود ۰/۱۰ مول بر لیتر حل شد. برای تهیه محلول استاندارد از داروی کلوزاسیلین با غلظت $10^{-3} \times 1/0$ مولار، $4/3 \times 10^+$ میلی گرم از دارو در $10^+ \times 1/0$ میلی لیتر آب حل شد.

دستگاه‌های مورد استفاده

تصویرهای میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری با بزرگنمایی بالا و مدل JEOL JEM-3010، ساخت ژاپن گرفته شده است. الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) در دمای اتاق با استفاده از دستگاه زیمنس پراش ایکس D8-Adnace ساخت آلمان، با تابش Cu/Ka در $\lambda = 1/5148 \text{ \AA}$ گرفته شده است. جمهوری چک برای گرفتن تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. طیف FT-IR با استفاده از دستگاه Tensor 27- Bruker ساخت آلمان و قرص KBr گرفته شده است. طیف جذبی فروسرخ - فرابنفش (UV-Vis) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-1800 240V Shimadzu ساخت ژاپن گرفته شده است. شدت نشر نور با استفاده از دستگاه لومینومتر با مدل FB14 Bertold ساخت آلمان اندازه‌گیری شد. دستگاه اسپکتروفولورومتر مدل FP-6200 Jasco ساخت ژاپن با منبع نور خاموش برای ثبت طیف شدت نورتایی شیمیایی استفاده شد.

در کنار برتری‌های مهم روش‌های تجزیه‌ای مبتنی بر واکنش‌های نورتایی شیمیایی، برخی از این روش‌ها معایبی همچون انتخاب‌گری ضعیف و گاهی حساسیت پایین دارند. امروزه پژوهشگران توانسته‌اند با استفاده از نانومواد این عیب‌ها را تا حدی رفع کنند. به‌عنوان نمونه نانوذره‌های کربن [۶]، طلا [۷]، نقره، آلیاژهای نقره [۸]، مس اکسید [۹]، آهن اکسید [۱۰] به‌طور گسترده‌ای برای بهبود عملکرد تجزیه‌ای واکنش‌های نورتایی شیمیایی استفاده شده‌اند. نانوذره‌های کبالت اکسید (Co_3O_4) از دیگر نانوذره‌هایی هستند که به‌عنوان افزایش‌دهنده شدت نشر واکنش‌های نورتایی شیمیایی و بهبود دهنده کارایی تجزیه‌ای این واکنش‌ها استفاده شده است. به‌عنوان نمونه از نانوذره‌های Co_3O_4 [۱۱] و نانوذره‌های مزوپروس $Co_3O_4@SiO_2$ [۱۲] برای افزایش شدت نشر واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - هیدروژن پراکسید و اندازه‌گیری گلوکز [۱۱، ۱۲] و هیدروژن پراکسید [۱۰] استفاده شده است.

کلوزاسیلین یک پنی‌سیلین نیمه سنتزی است که در سال ۱۹۶۲ میلادی ساخته شده است. این آنتی‌بیوتیک با اثر بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی برای درمان بیماری‌های عفونی در حیوانات و انسان‌ها استفاده می‌شود [۱۳]. برای این‌که فراورده‌های دارویی مانند کپسول، قرص، شربت و آمپول بیش‌ترین اثر درمانی را داشته باشند بایستی دارای مقدار مشخصی از ماده مؤثره باشند. بنابراین اندازه‌گیری ماده مؤثره دارو در فراورده‌های دارویی در مرحله کنترل کیفیت در کارخانه‌های دارویی بسیار مهم است [۹]. تاکنون روش‌های گوناگونی برای اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین ارائه شده‌اند که از آن جمله می‌توان به کروماتوگرافی با کارایی بالا [۱۷ - ۱۴]، ولتامتری [۱۸]، اسپکتروفوتومتری [۱۹]، طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FT-IR) [۲۰] و نورتایی شیمیایی [۲۱] اشاره کرد. در کنار برتری‌هایی که روش‌های ارائه شده دارا هستند این روش‌ها شامل برخی عیب‌ها مانند دستگاه‌های گران و پیچیده، وقت گیر بودن و پیچیده بودن روش، محدوده خطی باریک، حساسیت پایین، مشکل بودن آماده سازی نمونه و استفاده از معرف‌های گران و حلال‌های آلی و سمی می‌باشند. در این کار پژوهشی نانوذره‌های Co_3O_4 به‌روش ترسیب سریع سنتز شدند و از آن‌ها برای افزایش شدت واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی استفاده شد. با بهره‌گیری از اثر افزایش‌دهنده داروی کلوزاسیلین بر روی واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی افزایش یافته با نانوذره‌های Co_3O_4 ، روشی ساده برای اندازه‌گیری این دارو در فراورده‌های دارویی ارائه شد.

روش تهیه نانوذرات Co_3O_4 به روش ترسیب سریع

۰/۵۰ میلی لیتر از لومینول، ۰/۵۰ میلی لیتر از دارو و سرانجام ۰/۵۰ میلی لیتر از نانوذره‌های Co_3O_4 به سل دستگاه نورتابی شیمیایی تزریق شد و شدت نشر نور ثبت شده بیانگر بر این بود که داروی کلوزاسیلین باعث افزایش چشمگیر شدت نورتابی شیمیایی می‌شود. برای بهینه‌سازی واکنش نورتابی شیمیایی نمودارهای ΔI بر حسب غلظت‌های معرف‌های شیمیایی مورد استفاده و pH محلول رسم شد. ΔI از روی فرمول $\Delta I = I_0 - I$ به دست می‌آید که I_0 و I به ترتیب شدت نورتابی در حضور و در غیاب دارو است. برای رسم منحنی برازش ۰/۵۰ میلی لیتر از محلول داروی کلوزاسیلین در بازه‌ی غلظتی $10^{-4} \times 10^{-7} - 10^{-5} \times 10^{-3}$ مولار به سل دستگاه نورتابی شیمیایی تزریق شد. سپس به ترتیب ۰/۵۰ میلی لیتر از محلول‌های لومینول و نانوذره‌های Co_3O_4 به سل دستگاه نورتابی شیمیایی تزریق و شدت پیک‌ها ثبت شد. منحنی برازش مربوط به بیشینه شدت نشر نور بر حسب غلظت داروی کلوزاسیلین رسم گردید.

روش آماده‌سازی نمونه حقیقی

محتویات یک ویال از داروی کلوزاسیلین با نام تجاری دانا توزین شد. برای تهیه محلول مادر با غلظت $10^{-3} \times 10^{-1}$ مولار، $10^{-2} \times 10^{-4}$ گرم از دارو در $10^{-2} \times 10^{-1}$ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. برای پخش بهتر دارو از دستگاه فراصوت استفاده شد. از محلول شفاف مادر برای تهیه محلول‌های رقیق تر برای آنالیز استفاده شد.

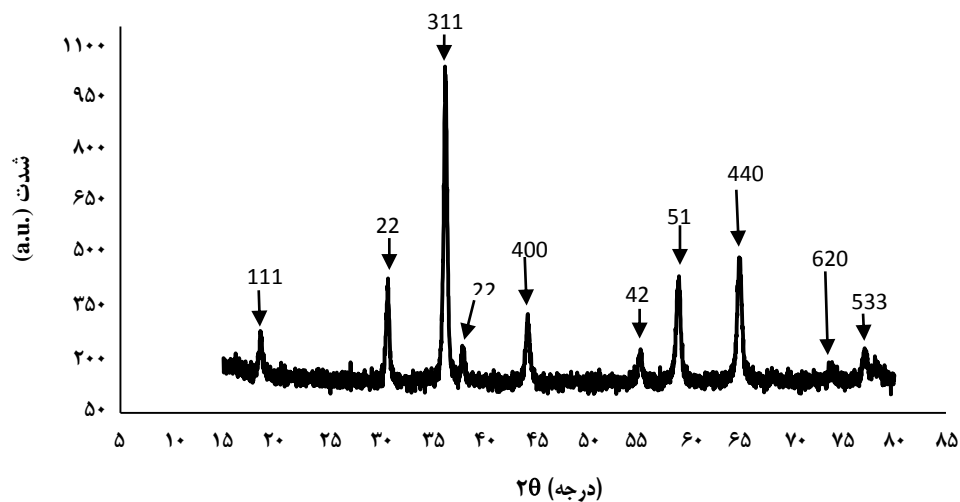
نتیجه‌ها و بحث**مشخصه یابی نانوذرات Co_3O_4** **بررسی الگوی XRD**

الگوی XRD برای شناسایی و مطالعه ترکیب و عنصرهای بلوری و تعیین اندازه دانه‌های مواد نانو ساختار به کار می‌رود. الگوی XRD مربوط به نانوذرات Co_3O_4 به روش ترسیب در شکل ۱ آورده شده است. پیک‌های پراش مربوط به سطوح بازتابی (۱۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۲۲۲)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱)، (۴۴۰)، (۶۲۰) و (۵۳۳) را می‌توان در θ های ۱۸/۵۶، ۳۰/۹۴، ۳۶/۵۰، ۳۸/۱۰، ۴۴/۴۴، ۵۵/۲۰، ۵۹/۰۴، ۶۵/۰۰، ۷۳/۶۲ و ۷۷/۰۲ طبقه‌بندی کرد، که با داده‌های پراش پودر استاندارد ساختار بلوری اسپینل Co_3O_4 مطابقت دارد [۲۲، ۲۳]. همچنین هیچ گونه پیکی برای ناخالصی‌ها شناسایی نشد، بنابراین روش ترسیب سریع بکار برده شده در این پژوهش برای سنتز نانوذره‌های Co_3O_4 موفق بوده است.

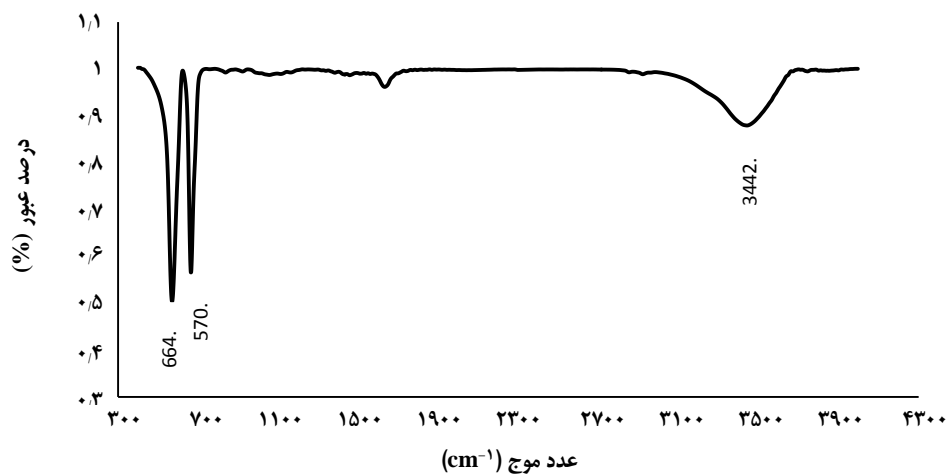
نخست ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۱۰ مولار سود به ۲۵ میلی لیتر از محلول ۰/۱۰ مولار کبالت (II) نیترات ۶ آبه افزوده شد و به مدت چند دقیقه روی یک همزن مغناطیسی هم‌زده شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از محلول $10^{-3} \times 10^{-1}$ مولار تریتون ایکس-۱۰۰ به محلول بالا افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت هم‌زدن قرار گرفت و در زمان هم‌زدن رنگ آبی محلول روشن‌تر شد. pH محلول به وسیله سدیم هیدروکسید ۰/۱۰ مولار به ۱۲ رسید که در این حالت رنگ آبی روشن محلول به آبی پر رنگ تغییر یافت و چند دقیقه روی هم‌زن هم‌زده شد. سپس محلول به دست آمده به مدت یک ساعت در حمام روغن در دمای ۹۰ درجه سلسیوس و تحت هم‌زدن مغناطیسی قرار گرفت. طی این فرایند رنگ آبی محلول به رنگ قهوه‌ای مایل به سیاه تغییر یافت. پس از سرد شدن محلول در دمای اتاق، محلول فوق صاف شد و رسوب‌های به دست آمده چندین بار با آب دوبار تقطیر شسته شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای $10^{-2} \times 10^{-1}$ درجه سلسیوس در آن قرار گرفت و بعد به یک کوره با دمای $10^{-2} \times 10^{-5}$ درجه سلسیوس به مدت ۴/۰ ساعت منتقل شد.

روش کلی اجرای واکنش نورتابی شیمیایی

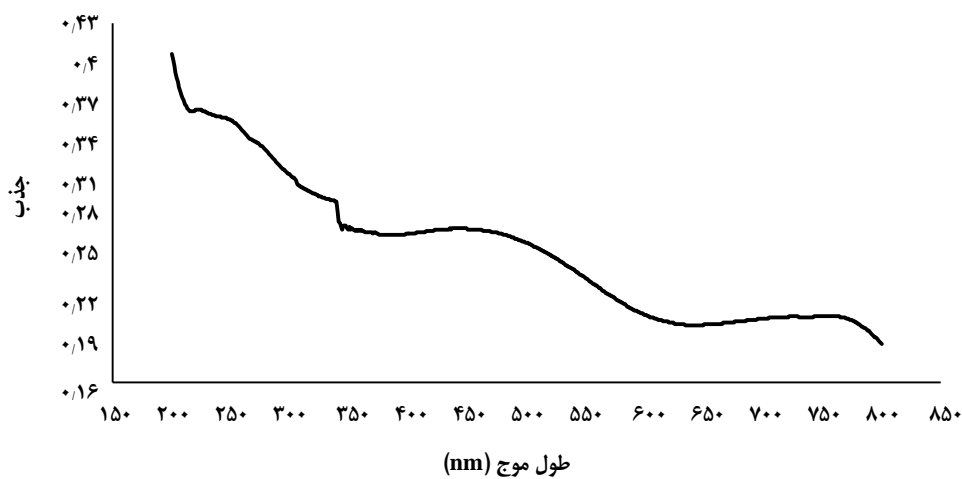
در آزمایش‌های انجام شده تأثیر نانوذره‌های Co_3O_4 و تأثیر داروی کلوزاسیلین بر روی واکنش‌های نورتابی شیمیایی سامانه لومینول-اکسیژن مولکولی به‌صورت batch مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر کاتالیستی نانوذره‌های Co_3O_4 ۰/۵۰ میلی لیتر لومینول با غلظت $10^{-3} \times 10^{-1}$ مولار بدون سل دستگاه نورتابی شیمیایی که یک لوله آزمایش ۳/۰ میلی لیتری بود و دارای ۰/۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر تزریق شد و شدت نور ضعیف نشر شده در کامپیوتر متصل به دستگاه ثبت شد. در مرحله بعدی ۰/۵۰ میلی لیتر محلول لومینول با غلظت $10^{-3} \times 10^{-1}$ مولار بدون سل دستگاه نورتابی شیمیایی دارای ۰/۵۰ میلی لیتر از محلول $10^{-2} \times 10^{-1}$ میلی گرم بر لیتر نانوذره‌های Co_3O_4 به تزریق شد و شدت نور نشر شده ثبت شد و از این داده‌ها معلوم شد که شدت نشر سامانه نورتابی شیمیایی آرایه شده در این پژوهش، در حضور نانوذره‌های Co_3O_4 افزایش می‌یابد، یعنی نانوذره‌های Co_3O_4 واکنش لومینول-اکسیژن مولکولی را کاتالیز می‌کند. به همین روش شدت نورتابی شیمیایی مخلوط محلول لومینول-آب مقطر و لومینول-دارو مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های نشان داد که دارو می‌تواند شدت نشر نور محلول لومینول را افزایش دهد. در مرحله بعدی برای سنجش نورتابی شیمیایی داروی کلوزاسیلین به ترتیب



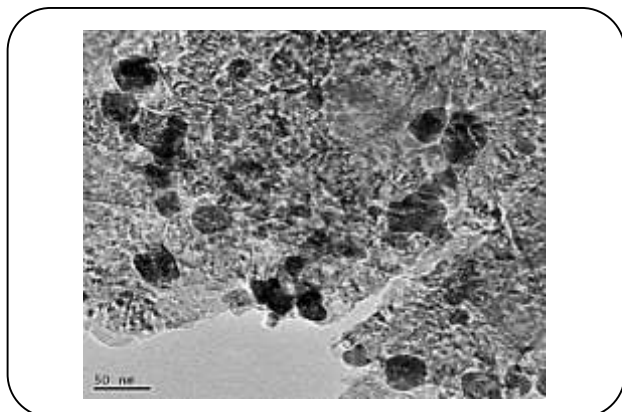
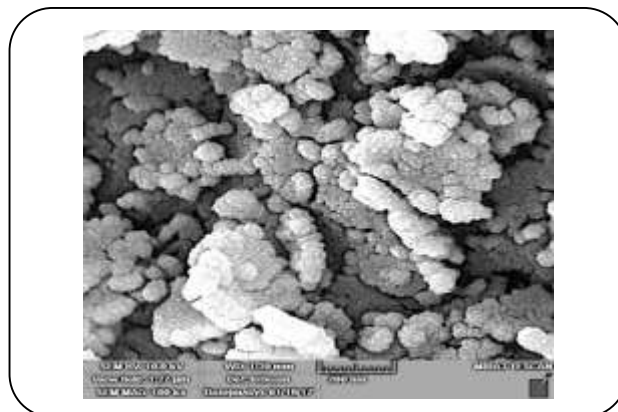
شکل ۱- الگوی XRD نانوذره‌های Co_3O_4 سنتز شده به روش ترسیب سریع.



شکل ۲- طیف FT-IR نانوذره‌های Co_3O_4 .



شکل ۳- طیف UV-Vis نانوذره‌های Co_3O_4 .

شکل ۵ - تصویر TEM نانوذره‌های Co_3O_4 .شکل ۴ - تصویر SEM نانوذره‌های Co_3O_4 .

اصول کلی نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی افزایش یافته

با نانوذره‌های Co_3O_4

به منظور بررسی امکان استفاده از نانوذره‌های Co_3O_4 به‌عنوان کاتالیست در واکنش‌های نورتابی شیمیایی، اثر این نانو ذره‌ها بر واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی در محیط قلیایی مورد آزمایش قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که نانوذره‌های Co_3O_4 می‌توانند که شدت نشر نور واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی را به‌طور چشمگیری افزایش دهند. افزون بر این آزمایش‌ها کنترلی با استفاده از کبالت (II) نیترات ۶ آبه با غلظتی برابر با آنچه که در سنتز نانوذره‌های Co_3O_4 استفاده شده بود اجرا شد. نتیجه‌های این آزمایش‌ها نشان داد که محلول کبالت (II) نیترات ۰/۱ مولار تأثیر چندانی بر شدت واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی ندارد. این امر ممکن است به دلیل تشکیل کمپلکس‌های هیدروکسیدی یون‌های کبالت (II) باشد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سیگنال افزایش یافته نورتابی شیمیایی دیده شده تنها ناشی از فعالیت کاتالیستی نانوذره‌های Co_3O_4 است. طیف نورتابی شیمیایی سامانه لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 در شکل ۶ آورده شده است.

همان‌گونه که در این شکل مشخص است پیک طیف نورتابی شیمیایی در ۴۲۵ نانومتر (مربوط به ۳-آمینوفتالات تحریک شده) قرار گرفته است. شایان توضیح است که در واکنش‌های نورتابی شیمیایی لومینول، اکسیداسیون لومینول منجر به تولید ۳-آمینوفتالات تحریک شده که بازگشت آن به حالت پایه منجر به نشر در بیشینه طول موج ۴۲۵ نانومتر می‌شود [۲۵]. این مشاهده‌ها تأییدی است بر این واقعیت که نانوذره‌های Co_3O_4 تنها نقش کاتالیست را در واکنش نورتابی شیمیایی بازی می‌کنند و نور جدیدی در هنگام حضور نانوذره‌های Co_3O_4 در محلول نشر نمی‌شود.

بررسی طیف FT-IR

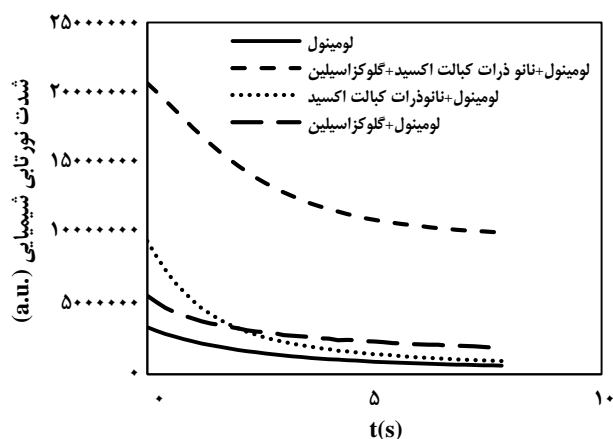
طیف FT-IR نانوذره‌های Co_3O_4 در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به شکل، دو پیک شدید در $570/03 \text{ cm}^{-1}$ و $664/41 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های Co-O می‌باشد. پیک موجود در $570/03 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی یون فلزی Co^{2+} در حفره‌های تتراهدرال و پیک موجود در $664/41 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به یون فلزی Co^{2+} در حفره‌های اکتاهدرال می‌باشد [۲۴]. همچنین پیک پهن موجود در $3442/03 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی گروه عاملی H-O سطحی و نیز آب جذب شده می‌باشد.

بررسی طیف UV-Vis

شکل ۳ طیف UV-Vis نانوذره‌های Co_3O_4 را نشان می‌دهد. بررسی منابع نشان داد که جذب در بازه‌ی ۲۰۰-۳۶۰ نانومتر مربوط به انتقال‌های بار O^{2-} با Co^{2+} می‌باشد و بازه جذبی ۳۸۰-۶۰۰ نانومتر مربوط به فرایند انتقال بار بین O^{2-} با Co^{2+} می‌باشد [۲۲].

بررسی تصویرهای SEM و TEM

تصویر SEM به منظور مشخص شدن اندازه و ریخت شناسی نانوذره‌ها Co_3O_4 در شکل ۴ آورده شده است. این تصویر نشان‌دهنده ساختار نانوذره‌های Co_3O_4 می‌باشد. همان‌گونه که در شکل مشخص است، قطر تقریبی نانوذره‌های Co_3O_4 سنتز شده حدود ۲۰-۳۰ نانومتر می‌باشد. برای بررسی مواد در مقیاس اتمی از TEM استفاده می‌شود. شکل ۵ تصویر TEM نانوذره‌های Co_3O_4 را نشان می‌دهد. همان‌گونه که از شکل مشخص است، قطر نانوذره‌ها Co_3O_4 حدود ۲۰-۳۰ نانومتر می‌باشد که با تصویر به دست آمده از SEM مطابقت دارد.



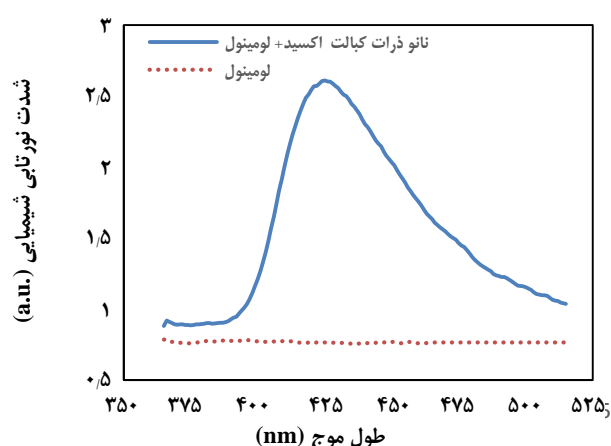
شکل ۷ - منحنی سنتتیکی واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 . شرایط واکنش: لومینول $10^{-3} \times 10^{-3}$ مولار، سدیم هیدروکسید 10^{-1} مولار، نانوذره‌های Co_3O_4 10^{-3} میلی گرم بر لیتر و کلوزاسیلین $10^{-3} \times 10^{-3}$ مولار.

و برای بررسی امکان استفاده از واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 در اندازه‌گیری داروها، اثر برخی از داروها بر این واکنش نورتایی شیمیایی بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که داروی کلوزاسیلین اثر افزایشی بر روی واکنش نورتایی داشته و می‌تواند شدت نشر نور را به‌طور چشمگیری افزایش دهد (شکل ۷). بنابراین در ادامه امکان استفاده از واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 برای ارزیابی روشی نوین و حساس برای اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین مورد بررسی بیشتر قرار گرفت.

بهینه سازی شرایط واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی افزایش یافته با نانوذره‌های Co_3O_4

برای پیدا کردن شرایطی از واکنش که در آن دارو بیشترین اثر افزایشی (ΔI) را دارد اثر پارامترهای شیمیایی شامل غلظت لومینول، غلظت سدیم هیدروکسید و غلظت نانوذره‌های Co_3O_4 مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل این که واکنش نورتایی شیمیایی لومینول در شرایط قلیایی انجام می‌گیرد از سدیم هیدروکسید برای محلول سازی لومینول استفاده شده است. بدین منظور غلظت‌های متفاوتی از سدیم هیدروکسید در بازه 10^{-2} تا 10^{-1} مولار ساخته و اثر آن بر روی ΔI مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۸ غلظت 10^{-1} مولار به عنوان غلظت بهینه با بیشینه ΔI انتخاب شد.

در ادامه فرایند اثر غلظت لومینول در بازه‌ی غلظتی



شکل ۸ - طیف نورتایی شیمیایی برای واکنش لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 .

در ادامه اثر خورنده‌های گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) روی واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که شدت نشر نور در حضور $0/1$ مولار آسکوربیک اسید (خورنده رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل) [۲۶] و یا تیواوره (خورنده رادیکال‌های هیدروکسیل) و یا سدیم آزید (خورنده اکسیژن سینگلت) [۲۶، ۲۷] به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. این نتیجه‌ها نشان دهنده تشکیل ROS در طی واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 می‌باشد. شایان ذکر است که در واکنش نورتایی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Fe_3O_4 نیز تولید ROS در اثر تخریب اکسیژن مولکولی واکنش آن با لومینول دلیل نشر نور عنوان شده است [۲۸]. بر اساس این مشاهددها می‌توان احتمال داد که در این واکنش نورتایی شیمیایی، اکسیژن مولکولی در محیط قلیایی و در حضور نانوذره‌های Co_3O_4 به ROS تبدیل می‌شوند. ROS تولید شده با لومینول واکنش داده و تولید ۳-آمینوفتالات تحریک شده می‌کند که بازگشت آن به حالت پایه منجر به نشر در بیشینه طول موج ۴۲۵ نانومتر می‌شود. همچنین نقش دیگری را که می‌توان برای نانوذره‌های Co_3O_4 محتمل دانست این است که هم‌زمان با مورد اول، لومینول بر روی نانوذره‌های Co_3O_4 جذب شده و فرایند اکسایش آن به‌خاطر تغییر در دانسیته بار اتم‌های متصل به نانوذره‌ها آسان‌تر شود. با این حال تعیین دقیق مکانیسم این واکنش نورتایی شیمیایی نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد که خارج از هدف‌های این پروژه است. در ادامه این کار پژوهشی

$3 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-5}$ مولار بر روی ΔI مورد ارزیابی قرار گرفت و غلظت 5×10^{-4} مولار به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

شکل ۱۰ اثر نانوذره‌های Co_3O_4 بر روی سامانه نورتابی شیمیایی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشخص است غلظت ۷۰ میلی گرم بر لیتر برای نانوذره‌های Co_3O_4 در محدوده غلظتی ۵۰-۱۰۰ میلی گرم بر لیتر منجر به بیش‌ترین ΔI می‌شود، بنابراین به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

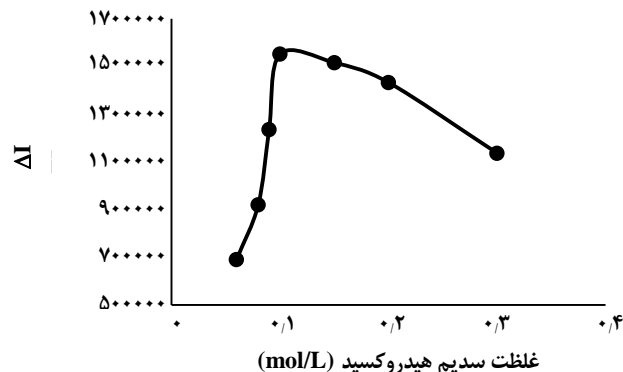
مشخصه‌های تجزیه‌ای روش نورتابی شیمیایی

همان‌طور که گفته شد، داروی کلوگزاسیلین باعث افزایش شدت نورتابی شیمیایی می‌شود و این افزایش با غلظت دارو متناسب می‌باشد. در شرایط بهینه منحنی کالیبراسیون برای این دارو رسم شد و حد تشخیص نیز محاسبه شد. در جدول ۱ پارامترهای تجزیه‌ای روش نورتابی شیمیایی ارائه شده برای اندازه‌گیری داروی کلوگزاسیلین خلاصه شده است.

در جدول ۲ ویژگی‌های تجزیه‌ای روش نورتابی شیمیایی ارائه شده در این کار پژوهشی با دیگر روش‌های تجزیه‌ای مقایسه شد. همان‌گونه که از جدول ۲ می‌توان دریافت حد تشخیص روش ارائه شده در این کار پژوهشی بیش‌تر از روش‌های دیگر است ولی با این‌حال در این روش از هیچ اکسید کننده‌ای استفاده نشده است و مشخصه‌های تجزیه‌ای آن برای اندازه‌گیری داروی کلوگزاسیلین در فرمولاسیون‌های دارویی مناسب است.

بررسی مزاحمت‌ها

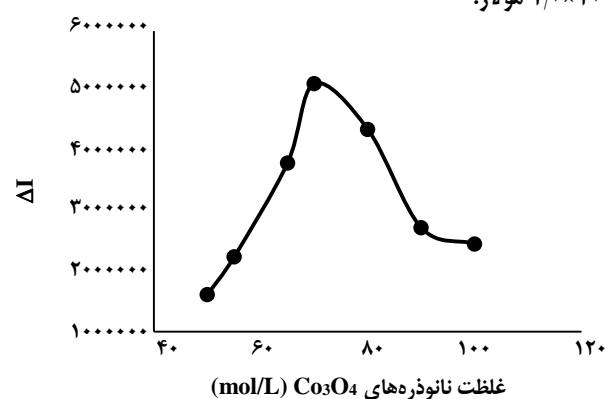
به منظور بررسی میزان انتخاب پذیری روش، تأثیر برخی گونه‌های یونی، در اندازه‌گیری داروی کلوگزاسیلین توسط واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 بررسی شد (جدول ۳). هرگاه حضور گونه مزاحم منجر به تغییر شدت نورتابی شیمیایی به میزان بیش از ۵ درصد نسبت به محلول دارای آنالیت تنها شود، نسبت غلظتی مربوط به عنوان آستانه مزاحمت گونه مزاحم در نظر گرفته می‌شود. در این آزمایش غلظت داروی کلوگزاسیلین ثابت و برابر با 1×10^{-4} مولار بود. اگر چه کاتیون‌های Al^{3+} ، Cu^{2+} ، Ca^{2+} ، Fe^{2+} ، Mg^{2+} و Pb^{2+} در واکنش نورتابی شیمیایی مزاحمت داشتند ولی این کاتیون‌ها در نمونه حقیقی مورد آزمایش که ویال دارویی بود حضور نداشتند و امکان اندازه‌گیری داروی کلوگزاسیلین در فرمولاسیون دارویی وجود داشت.



شکل ۸ - تأثیر غلظت سدیم هیدروکسید در واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 . شرایط واکنش لومینول 1×10^{-3} مولار، نانوذره‌های Co_3O_4 ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و کلوگزاسیلین 1×10^{-4} مولار.



شکل ۹ - تأثیر غلظت لومینول در واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 . شرایط واکنش: سدیم هیدروکسید 0.1×10^{-4} مولار، نانوذره‌های Co_3O_4 ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و کلوگزاسیلین 1×10^{-4} مولار.



شکل ۱۰ - تأثیر غلظت نانوذرات Co_3O_4 در واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی. شرایط واکنش: لومینول 5×10^{-4} مولار، سدیم هیدروکسید 0.1×10^{-4} مولار و کلوگزاسیلین 1×10^{-4} مولار.

جدول ۱- پارامترهای تجزیه‌ای روش نورتابی شیمیایی.

بازه خطی (mol/L)	معادله خط ^a	ضریب همبستگی (R ²)	تکرار پذیری (%RSD)	حد تشخیص (mol/L)
$3.0 \times 10^{-5} - 7.0 \times 10^{-4}$	$y = 0.5277x + 9.0413$	۰/۹۹	۲/۲ (n=۵)	2.9×10^{-5}

^a $y = \log$ (غلظت دارو)، $x = \log$ (شدت نشر نور)

جدول ۲- ویژگی‌های تجزیه‌ای روش‌های نورتابی شیمیایی ارایه شده برای اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین.

واکنش نورتابی شیمیایی	بازه‌ی خطی (mol/L)	حد تشخیص (mol/L)	%RSD	مرجع
نانوذره‌های مس اکسید - هیدرژن پراکسید - لومینول	$1.0 \times 10^{-7} - 6.3 \times 10^{-5}$	6.3×10^{-8}	۲/۲	[۱۱]
لومینول - نقره (III)	$1.0 \times 10^{-7} - 6.3 \times 10^{-5}$	1.3×10^{-7}	۱/۰ - ۱/۴	[۲۹]
پتاسیم پرمنگنات - کارمینک اسید - کادمیم سولفید کوانتوم دات	$1.7 \times 10^{-8} - 4.6 \times 10^{-5}$	1.21×10^{-8}	۲/۱	[۳۰]
نانوذره‌های Co_3O_4 - لومینول - اکسیژن مولکولی	$3.0 \times 10^{-7} - 7.0 \times 10^{-4}$	2.9×10^{-5}	۲/۲۵	کار حاضر

از روش افزایش استاندارد استفاده شد (جدول ۴). برای بررسی درستی نتیجه‌های به دست آمده از روش محاسبه درصد بازیابی استفاده شده است. درصد بازیابی در محدوده ۹۷/۵-۱۰۳/۰ بوده و تأیید کننده این امر است که درستی روش قابل می‌باشد.

نتیجه‌گیری

امروزه روش‌های تجزیه‌ای حساس شده با نانو ذره‌ها از روش‌های جالب و مهم توسعه یافته در آنالیز نوع‌های ترکیب‌ها هستند [۳۲، ۳۳]. در این کار پژوهشی نانوذره‌های Co_3O_4 به روش ترسیب سریع سنتز و با فناوری‌های XRD، FT-IR، TEM و SEM مشخصه یابی شدند. نانوذره‌های Co_3O_4 سنتز شده برای افزایش شدت نشر نور واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی در محیط قلیایی استفاده شدند. براساس اثر افزایش دهنده‌گی داروی کلوزاسیلین بر روی واکنش نورتابی شیمیایی لومینول - اکسیژن مولکولی - نانوذره‌های Co_3O_4 روشی جدید، ساده و حساس برای اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین در فرمولاسیون‌های دارویی ارایه شد.

قدردانی

مولفین این مقاله از حمایت‌های دانشگاه مراغه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

جدول ۳- نسبت غلظتی قابل تحمل گونه مزاحم در اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین.

نام گونه	غلظت کلوزاسیلین/غلظت گونه
Cl ⁻ , Na ⁺ , NO ₃ ⁻ , K ⁺ , sodium saccharin	۱۰۰۰
Sucrose, Glucose	۳۰۰
Zn ²⁺	۵۰
EDTA	۵
Cu ²⁺ , Al ³⁺	۱
Pb ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , Ca ²⁺	<۱

جدول ۴- نتیجه‌های به دست آمده از اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین در نمونه ویال.

درصد بازیابی	غلظت یافته شده (مولار)	غلظت افزوده شده (مولار)
-	3.0×10^{-5}	-
۹۷.۵%	3.9×10^{-5}	1.0×10^{-5}
۹۶.۲%	7.7×10^{-5}	5.0×10^{-5}
۱۰۳.۳%	9.3×10^{-5}	6.0×10^{-5}

کاربرد تجزیه‌ای

از روش پیشنهادی در پروژه حاضر برای اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین در فرمولاسیون دارویی این دارو که بصورت ویال است، استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری داروی کلوزاسیلین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۳۱

مراجع

- [1] Sorouraddin M.H., Iranifam M., A New Chemiluminescence Method for Determination of EDTA in Ophthalmic Drugs. *Chem Anal (Warsaw, Pol)*, **52**(3): 481-490 (2007).
- [2] Lara F.J., Airado-Rodriguez D., Moreno-Gonzalez D., Huertas-Perez J.F., Garcia-Campana A.M., Applications of Capillary Electrophoresis with Chemiluminescence Detection In Clinical, Environmental And Food Analysis. A Review. *Anal Chim Acta.* , **913**: 22-40 (2016).
- [3] Iranifam M., Revisiting Flow-Chemiluminescence Techniques: Pharmaceutical Analysis, *Luminescence*, **28**(6): 798–820 (2013).
- [4] Iranifam M., Analytical Applications of Chemiluminescence Methods for Cancer Detection and Therapy, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **59**(0): 156-183 (2014).
- [5] Al Haddabi B., Al Lawati H.A.J., Suliman F.O., An Enhanced Cerium(IV)-Rhodamine 6G Chemiluminescence System Using Guest-Host Interactions in a Lab-on-a-Chip Platform for Estimating the Total Phenolic Content in Food Samples, *Talanta*, **150**: 399-406 (2016).
- [6] Iranifam M., Analytical Applications of Chemiluminescence Systems Assisted by Carbon Nanostructures, *TrAC, Trends Anal. Chem.* , **80**: 387–415 (2016).
- [7] Liu Z.Z., Zhao F.R., Gao S.D., Shao J.J., Chang H.Y. , The Applications of Gold Nanoparticle-Initiated Chemiluminescence in Biomedical Detection, *Nanoscale Res. Lett.*, **11**: 1-8 (2016).
- [8] Iranifam, M., Chemiluminescence Reactions Enhanced by Silver Nanoparticles and Silver Alloy Nanoparticles: Applications in Analytical Chemistry *Trac, Trends Anal. Chem.*, **82**: 126–142 (2016).
- [9] Iranifam M., Hendekhale N.R., CuO Nanoparticles-Catalyzed Hydrogen Peroxide-Sodium Hydrogen Carbonate Chemiluminescence System Used for Quenchometric Determination of Atorvastatin, Rivastigmine and Topiramate, *Sens Actuators, B.* , **243**: 532-541 (2017).
- [10] Iranifam M., Analytical Applications of Chemiluminescence-Detection Systems Assisted by Magnetic Microparticles and Nanoparticles. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **51**: 51-70 (2013).
- [11] Xie J., Huang Y., Co₃O₄ Nanoparticles-Enhanced Luminol Chemiluminescence and its Application in H₂O₂ and Glucose Detection, *Anal Methods*, **3**(5): 1149-1155 (2011).
- [12] Li X.H., Bai Y.F., Feng F., Zhang Z.J., The Development of a Novel Chemiluminescent Glucose Sensor Using Hydrophilic Co₃O₄@SiO₂ Mesoporous Nanoparticles, *Anal Methods*, **8**(14): 2923-2928 (2016).
- [13] Khataee A., Iranifam M., Fathinia M., Nikravesh M., Flow-Injection Chemiluminescence Determination of Cloxacillin in Water Samples and Pharmaceutical Preparation by Using CuO Nanosheets-Enhanced Luminol-Hydrogen Peroxide System, *Spectrochim Acta, Part A.* , **134**(0): 210-217 (2015).

- [14] Legrand T., Vodovar D., Tournier N., Khoudour N., Hulin A. [Simultaneous Determination of Eight Beta-Lactam Antibiotics, Amoxicillin, Cefazolin, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Cloxacillin, Oxacillin, and Piperacillin, in Human Plasma by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection](#), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**(8): 4734-4742(2016).
- [15] Kumar V., Bhutani H., Singh S., [ICH Guidance in Practice: Validated Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Ampicillin and Cloxacillin in Combination Drug Products](#), *J Pharm. Biomed. Anal.*, **43**(2): 769-773 (2007).
- [16] Espinosa-Mansilla A., de la Pena A.M., Gomez D.G., Canada-Canada F., [HPLC Determination of Ciprofloxacin, Cloxacillin, and Ibuprofen Drugs in Human Urine Samples](#), *J Sep Sci.*, **29**(13): 1969-1976 (2006).
- [17] Marchetti M., Schwaiger I., Schmid E.R., [Determination of Benzylpenicillin, Oxacillin, Cloxacillin, and Dicloxacillin in Cows' Milk by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography After Precolumn Derivatization](#), *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**(1): 64-67 (2001).
- [18] Qureshi S.Z., Qayoom T., Helaleh M.I.H., [Simultaneous Spectrophotometric and Volumetric Determinations of Amoxycillin, Ampicillin and Cloxacillin in Drug Formulations: Reaction Mechanism in the Base Catalysed Hydrolysis Followed by Oxidation with Iodate in Dilute Acid Solution](#), *J Pharm Biomed Anal*, **21**(3): 473-482 (1999).
- [19] Helaleh M.I.H., [Indirect Spectrophotometric Determination of Benzylpenicillin and Cloxacillin in Pharmaceutical Preparations](#), *Mikrochim. Acta*, **129**(1-2): 29-32 (1998).
- [20] Drackova M., Navratilova P., Hadra L., Vorlova L., Hudcova L., [Determination Residues of Penicillin G and Cloxacillin in Raw Cow Milk Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy](#). *Acta Vet Brno.*, **78**(4): 685-690 (2009).
- [21] Khataee A., Iranifam M., Fathinia M., Nikravesht M., [Flow-Injection Chemiluminescence Determination of Cloxacillin in Water Samples and Pharmaceutical Preparation By Using CuO Nanosheets-Enhanced Luminol-Hydrogen Peroxide System](#), *Spectrochim. Acta, Part A.*, **134**: 210-217 (2015).
- [22] Srivastava A.K., Madhavi S., Ramanujan R., [A novel Method to Synthesize Cobalt Oxide \(Co₃O₄\) Nanowires from Cobalt \(Co\) Nanobowls](#), *Phys. Status Solidi A*, **207**(4): 963-966 (2010).
- [23] Farhadi S., Sepahdar A., Jahanara K., [Spinel-Type Cobalt Oxide \(Co₃O₄\) Nanoparticles from the mer-Co \(NH₃\)₃ \(NO₂\)₃ Complex: Preparation, Characterization, and Study of Optical and Magnetic Properties](#), *J Nanostruct.*, **3**(2): 199-207 (2013).
- [24] Jha A., Rode C.V., [Highly Selective Liquid-Phase Aerobic Oxidation of Vanillyl Alcohol to Vanillin on Cobalt Oxide \(Co₃O₄\) Nanoparticles](#), *New. J. Chem.*, **37**(9): 2669-2674 (2013).

- [25] Barni F., Lewis S.W., Berti A., Miskelly G.M., Lago G. , [Forensic Application of the Luminol Reaction as a Presumptive Test for Latent Blood Detection](#), *Talanta*, **72**(3): 896-913 (2007).
- [26] Fan Y., Shi W., Zhang X., Huang Y., [Mesoporous Material-Based Manipulation of the Enzyme-Like Activity of CoFe₂O₄ Nanoparticles](#), *J. Mater. Chem. A.*, **2**(8): 2482-2486 (2014).
- [27] Liang S.X., Zhao L.X., Zhang B.T., Lin J.M., [Experimental Studies on the Chemiluminescence Reaction Mechanism of Carbonate/Bicarbonate and Hydrogen Peroxide in the Presence of Cobalt\(II\)](#), *J. Phys. Chem. A.*, **112**(4): 618-623 (2008).
- [28] Guan G., Yang L., Mei Q., Zhang K., Zhang Z., Han M-Y., [Chemiluminescence Switching on Peroxidase-Like Fe₃O₄ Nanoparticles for Selective Detection and Simultaneous Determination of Various Pesticides](#), *Anal Chem.*, **84**: 9492-9497 (2012).
- [29] Ma L., Kang W., Xu X., Niu L., Shi H, Li S., [Flow-Injection Chemiluminescence Determination of Penicillin Antibiotics in Drugs and Human Urine Using Luminol-Ag \(III\) Complex System](#), *J. Anal. Chem.*, **67**(3): 219-225 (2012).
- [30] Khataee A., Hasanzadeh A., Lotfi R., Joo S.W., [Enhanced Chemiluminescence of Carminic Acid-Permanganate by Cds Quantum Dots and its Application for Sensitive Quenchometric Flow Injection Assays of Cloxacillin](#), *Talanta*, **152**: 171-178 (2016).

[۳۱] ارشادی، ستار؛ دیده بان، خدیجه؛ رستمی پایین افراکتی، معصومه، نانومخروط بور نیتربیدی BNNC جایگزین شده با جایگاه فعال شبه کلروفیل: حسگری گزینش پذیر برای گاز اکسیژن، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۱) ۳۲: ۱۵۷ تا ۱۴۳ (۱۳۹۶).

[۳۲] قلیزاده، اعظم؛ شاهرخیان، سعید؛ ایرجی زاد، اعظم؛ مهاجرزاده، شمس الدین؛ وثوقی، منوچهر، اندازه‌گیری گلوتامات با استفاده از حسگر زیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی عمودی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴) ۳۲: ۳۳ تا ۳۶ (۱۳۹۲).