

## آپتاسگر الکتروشیمیایی بسیار حساس برای اندازه‌گیری یون جیوه (II) بر پایه

## کامپوزیت گرافن - کیتوسان

لیلا رشیدی، عبدالله نوربخش\*

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۱۳ تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۱۵

## چکیده

مقادیر اندک جیوه برای سلامت انسان و محیط زیست بسیار مضر است. حداکثر مقدار مجاز یون جیوه که توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا و سازمان بهداشت جهانی تعیین شده است به ترتیب ۱۰ و ۳۰ نانومولار می‌باشد. بنابراین به روشی فوق العاده حساس برای اندازه‌گیری آن نیاز است. روش‌های سنتی نظیر طیف سنجی و کروماتوگرافی با وجود کارآمد بودن، به دلیل هزینه‌های بالا و زمان طولانی آنالیز و نیاز به افراد متخصص مقرون به صرفه نیستند. از این رو یکی از چالش‌های مهم و اساسی در این زمینه پیدا کردن روش‌ها و حسگرهای مناسب برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار اندک یون جیوه است. از این رو، در کار حاضر، یک آپتاسگر الکتروشیمیایی حساس برای اندازه‌گیری کارآمد یون جیوه (II) طراحی شده است. در این راستا، اکسید گرافن احیاشده (rGO) به روش هامر سنتز شد و نانوکامپوزیت کیتوسان/ اکسید گرافن احیا شده (rGO-Chit) برای تثبیت مولکول‌های آپتامر در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای به کار گرفته شد. از روش‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی جهت مشخصه‌یابی مواد و بررسی رفتار آپتاسگر استفاده شده است. تحت شرایط بهینه، آپتاسگر مبتنی بر امپدانس الکتروشیمیایی بسیار حساسی با حد تشخیص ۰/۹۴ نانومولار و گستره خطی ۲۵۰-۵ نانومولار ساخته شد. بررسی‌ها نشان دادند که آپتاسگر ساخته شده در مقایسه با سایر آپتاسگرها، دارای کارایی بسیار مناسبی است و توانایی اندازه‌گیری یون جیوه در نمونه‌های حقیقی را دارا است.

**کلمات کلیدی:** زیست حسگر، یون جیوه، اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی، اکسید گرافن احیا شده، الکتروود.

## ۱- مقدمه

فلزات سنگین به علت افزایش فعالیت‌های صنعتی به محیط زیست وارد می‌شوند. از جمله این فلزات می‌توان به As, Hg, Pb و Cd اشاره کرد [۱]. مقادیر بسیار اندک فلزات سنگین در خون، برای سلامت انسان مضر است [۲, ۳]. جیوه یک فلز سنگین است که به‌طور طبیعی در محیط زیست یافت می‌شود. این فلز یک آلاینده محیط زیست است که در سه شکل دیده می‌شود: جیوه عنصری یا فلزی، ترکیبات جیوه دار غیر آلی مانند آمالگام‌های دندان، و جیوه آلی مانند متیل جیوه که خطرناک‌ترین نوع آن است و در ماهی و محصولات شیلات یافت می‌شود. جیوه با تبخیر طبیعی از سطح دریا یا زمین و آتشفشان‌ها نیز آزاد می‌شود.

هم‌چنین از طریق صنعت معدن، سوزاندن سوخت‌های فسیلی و پسماندهای صنعتی وارد محیط می‌شود. متیل جیوه اثرات بسیار مضر بر سیستم اعصاب و به‌خصوص مغز در حال رشد دارد [۴]. مهم‌ترین عضو برای جذب جیوه غیر آلی، غده هیپوفیز در مغز است که مستقیماً سبب اختلال نواحی مختلف شامل کانال‌های کلسیم، سنتز پروتئین و میتوکندری می‌شود [۵]. بنابراین منجر به بیماری‌های قلبی-عروقی، اختلالات عصبی، بی‌نظمی تیروئید، ادم ریوی، سندرم کبودی پوست، و نارسایی کلیوی- کبدی می‌شود [۶]. حداکثر مقدار مجاز  $Hg^{2+}$  که توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا<sup>۱</sup> و سازمان بهداشت جهانی<sup>۲</sup> تعیین شده به ترتیب ۱۰ و ۳۰ نانومولار در آب آشامیدنی است. بنابراین روشی حساس و اختصاصی برای شناسایی این فلز مورد نیاز است [۲]. کروماتوگرافی گازی<sup>۳</sup> و طیف‌سنجی جرمی (ICP/MS)<sup>۴</sup> و طیف‌سنجی جذب اتمی به‌طور سنتی برای تشخیص فلزات سنگین به‌کار می‌رود، اما این روش‌ها با وجودی که بسیار حساس و انتخاب‌گرند و گستره دینامیکی<sup>۵</sup> بزرگی دارند، اما برای شناسایی در محل مناسب نیستند [۷] و به ابزارهای پیچیده، آماده‌سازی زمان‌بر نمونه و افراد متخصص احتیاج دارند؛ بنابراین زمان و هزینه زیادی را صرف می‌کنند و هم‌چنین برای اندازه‌گیری‌های میدانی نامناسب می‌باشند. اخیراً برای غلبه بر این مشکلات و هم‌چنین تشخیص در محل، حسگرها توسعه یافته‌اند. حسگرهای الکتروشیمیایی در مقایسه با روش‌های طیف‌سنجی و کروماتوگرافی، مزایای منحصر به‌فردی مانند پاسخ سریع، اختصاصی بودن، قابل حمل بودن، نیاز نداشتن به معرف و داشتن شرایط تشخیص در محل را با مهندسی ابزارهای میکروسایز و نانوسایز فراهم می‌آورند [۷] و به‌علت قیمت پایین، حساسیت بالا و قابلیت کوچک‌سازی در آنالیزهای زیستی متداول‌اند.

زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی به‌علت سادگی و تشخیص انتخاب‌گر و حساسیت ذاتی‌شان در حال پیشرفت‌اند. زیست‌حسگرها برای تشخیص آنالیت از مولکول‌های زیستی استفاده می‌کنند. در آپتاسگرها از آپتامر به‌عنوان جزء زیستی استفاده می‌شود. مزایای آپتامرها نسبت به سایر مولکول‌های زیستی شامل پایداری بالا، سنتز نسبتاً ساده، قابلیت اصلاح ساختاری و تمایل بالا به یون‌های فلزی به‌صورت ویژه است. در واقع آپتامرها رشته‌های کوتاه DNA، RNA یا پپتید هستند که قابلیت اتصال انتخاب‌گر به مولکول هدف را دارند و به‌عنوان دریافت‌کننده<sup>۶</sup> در حسگر به‌کار می‌روند [۸]. مثلاً  $Hg^{2+}$  می‌تواند با دو باز تیمین برهم‌کنش اختصاصی دهد و کمپلکس پایداری ایجاد کند (T-Hg<sup>2+</sup>-T). نانومواد به‌علت مساحت سطحی بالا و طبیعت فوق‌العاده جاذبشان، منجر به کاهش حدود تشخیص<sup>۷</sup> می‌شوند و اختصاصی بودن را بهبود می‌بخشند. بنابراین ساخت

<sup>1</sup> Environmental Protection Agency (EPA)

<sup>2</sup> World Health Organization (WHO)

<sup>3</sup> Gas Chromatography

<sup>4</sup> Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy

<sup>5</sup> Dynamic Range

<sup>6</sup> Receptor

<sup>7</sup> Limit Of Detection

حسگرهای الکتروشیمیایی با اصلاح الکتروود با استفاده از نانومواد رضایت‌بخش خواهد بود. به‌کارگیری حسگرهای الکتروشیمیایی همراه با نانومواد و آپتامر خواص تشخیصی بهبودیافته‌ای را ایجاد خواهد کرد. در کار حاضر با استفاده از نانوکامپوزیت (rGO-Chit)، سطح مناسبی برای تثبیت مولکول‌های آپتامری با قابلیت برهم‌کنش با یون جیوه، جهت ساخت آپتاسنگر مبتنی بر امپدانس الکتروشیمیایی برای اندازه‌گیری یون جیوه طراحی و ساخته شده است. لازم به ذکر است که طبق اطلاعات ما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر ساخت آپتاسنگر الکتروشیمیایی حساس به جیوه بر پایه این نانومواد گزارش نشده است و در این کار برای اولین بار کارایی این نانومواد برای ساخت آپتاسنگر حساس به یون جیوه ارزیابی گردیده است. ضمناً علاوه بر موارد فوق، در این تحقیق توالی آپتامری حساس به جیوه، که به‌صورت کوالانسی بر سطح این کامپوزیت تثبیت شده است؛ و بهینه‌سازی شرایط تثبیت در سطح این کامپوزیت، هم‌چنین روش به‌کار رفته که مبتنی بر امپدانس الکتروشیمیایی است، برای اولین بار برای ساخت آپتاسنگر حساس به جیوه بررسی و ارزیابی شده است.

## ۱- مواد و روش‌ها

### ۱-۲- مواد شیمیایی و واکنش‌گرها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده شامل نمک‌های پتاسیم دی‌هیدروفسفات، پتاسیم هگزا سیانو فرات، پتاسیم هگزا سیانو فریت، پتاسیم کلرید، پتاسیم پرمنگنات، پودر گرافیت، سولفوریک‌اسید، هیدروکلریک‌اسید، فسفریک‌اسید، هیدرازین مونوهیدرات، هیدروژن پراکسید، اتانول، پودر کیتوسان، گلوکارآلدئید، و نمک‌های سایر فلزات از شرکت‌های معتبر تولیدکننده مواد شیمیایی از جمله مرک، سیگما آلدریج، و دای‌جونگ تهیه شده که از درجه خلوص بالای تجزیه‌ای برخوردار بوده و بدون هیچ‌گونه خلص‌سازی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. توالی آپتامر از شرکت بیونیر چین خریداری شد. این توالی آپتامر به‌صورت '3' TCT CTT CTT CCC GTT TTT C6TTG 5' است. توالی آپتامر با استفاده از محلول بافر فسفات ۰/۰۱ مولار رقیق‌سازی شد و درون فریزر در دمای ۱۹- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### ۲-۲- دستگاه‌ها و روش‌ها

برای انجام اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی از دستگاه اتولب پتانسیواستات/ گالوانواستات<sup>۱</sup> مدل PGSTAT 302N ساخت کشور هلند مجهز به نرم‌افزار NOVA استفاده شد. از این دستگاه به‌منظور انجام اندازه‌گیری امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. در تمامی آزمایش‌ها از یک سلول الکتروشیمیایی سه الکتروودی شامل یک الکتروود Ag/AgCl ساخت شرکت Metrohm به‌عنوان الکتروود مرجع، الکتروود پلاتین به‌عنوان الکتروود کمکی و از الکتروود کربن شیشه‌ای<sup>۲</sup> به‌عنوان الکتروود کار استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در دمای اتاق صورت گرفت. محلول KCl (با غلظت برابر با ۰/۳ مولار) حاوی فرو/ فری سیانید  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  با

<sup>1</sup> Potentiostat/Galvanostat autolab

<sup>2</sup> Glassy carbon (GC)

غلظت ۵ میلی مولار برای انجام آزمایشات الکتروشیمیایی به کار گرفته شد. امپدانس الکتروشیمیایی در بازه فرکانس ۰/۱ هرتز تا ۱۰ کیلوهرتز انجام شد. به منظور برازش منحنی‌های نایکوئیست و بررسی پاسخ حسگر از مدار معادل  $R(C[RW])$  و نرم افزار Zview استفاده شد. دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه جاسکو مدل ۶۳۰۰ و هم‌چنین میکروسکوپ الکترونی روبشی تبدیل فوریه مدل سیگما برای مشخصه یابی مواد سنتز شده استفاده شد. برای تهیه نمونه‌های اکسید گرافن احیا شده و کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده و کیتوسان جهت بررسی با طیف‌سنج مادون قرمز، محلول آن‌ها تهیه شد و پس از سانتریفیوژ نمودن محلول‌ها و خشک کردن آن‌ها با استفاده از آن، نمونه‌ها به صورت پودری کاملاً خشک در آمد و سپس هر کدام از آن‌ها با پودر خشک KBr رقیق‌سازی شد و از آن‌ها نمونه‌هایی قرصی شکل تهیه گردید. سپس با استفاده از دستگاه طیف‌سنج، طیف آن‌ها تهیه شد. جهت عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، هر کدام از نمونه‌ها بر روی یک لام تمیز شیشه‌ای به ابعاد ۱ سانتی‌متر در ۱ سانتی‌متر خشک شد و با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی عکس برداری شد. آن‌ها، خلاً، سانتریفیوژ، pH متر، هم‌زن مغناطیسی، ترازوی دیجیتالی و حمام التراسونیک از دیگر دستگاه‌های مورد استفاده در مراحل مختلف پژوهش بود.

### ۲-۳- سنتز گرافن اکسید احیا شده

ابتدا با استفاده از روش تور، اکسید گرافن سنتز شد [۹]. بدین ترتیب که اسید سولفوریک و اسید فسفریک غلیظ (با نسبت ۹ به ۱) را با هم مخلوط کرده و پودر گرافیت و پرمنگنات پتاسیم به آن اضافه شد و ظرف واکنش بر روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت. پس از آن محلول زرد رنگ به دست آمده، داخل سانتریفیوژ قرار داده شد. رسوب باقی مانده که همان اکسید گرافن ورقه‌ورقه شده است به ترتیب دو مرتبه توسط آب دوبار تقطیر شده، اسید کلریدریک و اتانول شستشو و سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی آخر رسوب زرد رنگ در دستگاه آن‌ها، در دمای اتاق تحت فشار کمتر از ۸ میلی‌بار خشک شد. اکسید گرافن به اختصار GO نامگذاری شد. برای ساخت اکسید گرافن احیا شده، ابتدا سوسپانسیونی آبی از اکسید گرافن تهیه شد و روی گرم-کن تحت هم‌زدن گرم شد و پس از آن هیدرازین مونوهیدرات ۸۰٪ به آن اضافه گردید. پس از پایان واکنش و خنک شدن واکنش تا دمای محیط، محلول واکنش درون سانتریفیوژ قرار داده شد و اکسید گرافن احیا شده از دیگر مواد موجود در واکنش جدا و در ته لوله‌های فالدون رسوب کرد. پس از ۶ مرحله شستشو، اکسید گرافن احیا شده برای خشک کردن داخل آن‌ها خلاً قرار داده شد. اکسید گرافن احیا شده به اختصار rGO نامگذاری شد.

## ۲-۴- آماده سازی کامپوزیت rGO-Chit

ابتدا محلول کیتوسان با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، با حل کردن کیتوسان در استیک اسید (۲٪) ساخته شد. در ادامه برای ساخت کامپوزیت rGO-Chit، به محلول فوق rGO با نسبت وزنی برابر با کیتوسان اضافه شد و محلول برای مدت زمان ۲ ساعت با استفاده از حمام مافوق صوت همگن گردید.

## ۲-۵- نحوه اصلاح سطح الکترودها

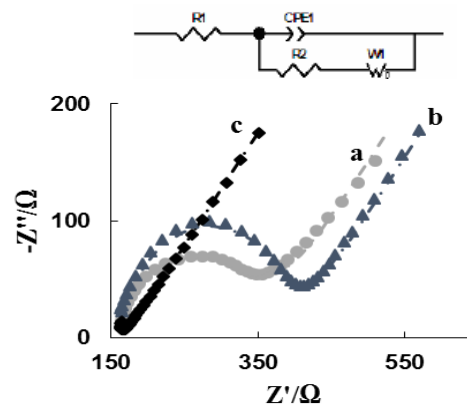
الکترودها کربن شیشه‌ای با استفاده از پودر آلومینا به مدت چند دقیقه به دقت پولیش داده شد. پس از آبکشی در معرض امواج مافوق صوت به مدت چند دقیقه قرار داده شد تا آلومینای چسبیده به سطح الکترودها شسته شود، در ادامه الکترودها چند مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. برای اصلاح سطح الکترودها با کامپوزیت rGO-Chit، مقدار ۱۰ میکرولیتر از کامپوزیت ساخته شده (با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) روی سطح الکترودها کربن شیشه‌ای ریخته شد و در دمای محیط خشک گردید. این الکترودها تحت عنوان الکترودها GC/rGO-Chit نامگذاری شد. اصلاح سطح الکترودها کربن شیشه‌ای با GO و rGO نیز مشابه روش قبل با قراردادن ۱۰ میکرو لیتر از محلول حاوی GO و یا rGO در سطح الکترودها و خشک شدن در دمای اتاق صورت گرفت. این الکترودها نیز به ترتیب به صورت الکترودهای GC/GO و GC/rGO نامگذاری شدند.

## ۳- بحث و نتیجه گیری

### ۳-۱- بررسی و مشخص یابی rGO سنتز شده

در این قسمت برای بررسی rGO سنتزی از روش اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده گردید. در شکل ۱ منحنی-های نایکوئیست مربوط به الکترودهای GC، GC/GO و GC/rGO در محلول ۵ میلی مولار فری/فروسیانید حاوی ۰/۳ مولار پتاسیم کلرید در پتانسیل ۰/۲۲ ولت در بازه‌ی فرکانسی ۱۰ کیلوهرتز تا ۱۰۰ میلی‌هرتز نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، شعاع نیم‌دایره منحنی نایکوئیست مربوط به الکترودها اصلاح شده با اکسید گرافن بیشتر از الکترودها کربن شیشه‌ای اصلاح نشده است که این نشان‌دهنده‌ی بیشتر بودن مقاومت انتقال بار در الکترودها GC/GO نسبت به الکترودها GC است. دلیل بیشتر بودن مقاومت انتقال بار در الکترودها GC/GO ماهیت نیمه‌رسانا بودن اکسید گرافن و همچنین وجود گروه-های اکسیژن‌دار با بار منفی در سطح گرافن اکسید است که باعث می‌شود یون‌های فری/فروسیانید با بار منفی دفع شوند و انتقال الکترون به سطح الکترودها کند شود. این نتایج تایید کننده سنتز GO از ماده اولیه گرافیت و اکسید شدن گرافیت طی مراحل سنتزی هستند. از سوی دیگر زمانی که الکترودها با اکسید گرافن احیا شده اصلاح شد، مقاومت انتقال بار به شدت کاهش یافت که نشان‌دهنده‌ی سینتیک بسیار سریع انتقال الکترون در سطح الکترودها GC/rGO است. در واقع در منابع مختلف نیز به

روشنی بیان شده است که مقاومت انتقال بار گرافن اکسید احیا شده به مراتب کمتر از گرافن اکسید است. بنابراین نتایج فوق به خوبی نشان دهنده احیا شدن اکسید گرافن و تبدیل آن به گرافن اکسید احیا شده است.



شکل ۱- منحنی‌های نایکوئیست (a) الکتروود کربن شیشه‌ای؛ (b) الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با اکسید گرافن و (c) الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با اکسید گرافن احیا شده در حضور محلول ۵ میلی‌مولار فری / فروسیانید حاوی ۰/۳ مولار پتاسیم کلرید در پتانسیل ثابت ۰/۲۲ ولت در بازه فرکانسی ۱۰ کیلوهرتز تا ۱۰۰ میلی‌هرتز. نمودارهای برازش شده با استفاده از مدار معادل  $R(C[RW])$  به صورت خط چین روی هر نمودار نشان داده شده است.

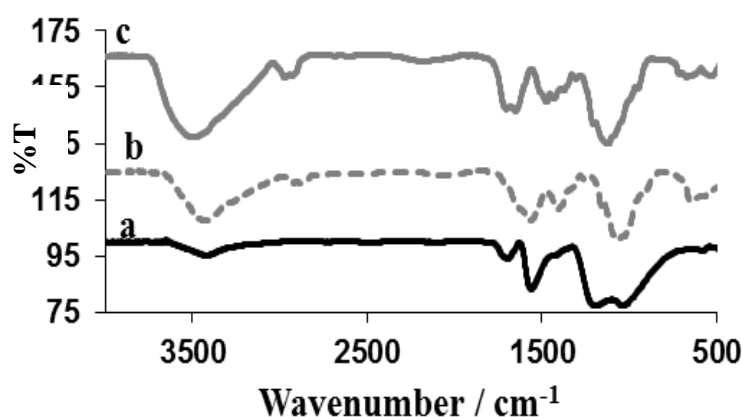
در جدول ۱ نیز مقادیر مقاومت انتقال بار و مقاومت محلول مربوط به منحنی‌های برازش شده هر الکتروود با استفاده از مدار معادل  $R(C[RW])$  ذکر شده است. با احیا شدن اکسید گرافن، سنتیک انتقال الکترون در سطح الکتروود افزایش و بارهای منفی سطحی آن کاهش می‌یابد؛ لذا انتقال الکترون در سطح الکتروود تسهیل شده و مقاومت انتقال بار به صورت قابل توجهی کاهش می‌یابد. همانطور که اشاره شد، این نتایج تاییدی بر سنتز موفقیت آمیز اکسید گرافن و اکسید گرافن احیا شده است. اکسید گرافن احیا شده با سطح مؤثر بالا و مقاومت انتقال بار پایین می‌تواند به عنوان بستر مناسبی برای ساخت الکتروودهای اصلاح شده به کار گرفته شود.

جدول ۱- مقادیر پارامترها در بررسی اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی

الکتروود	مقاومت انتقال بار ( $R_{ct}$ )	مقاومت محلول ( $R_{st}$ )
GC	۲۰۴	۱۵۸
GC/GO	۲۴۰	۲۵۸
GC/rGO	-۱۶	۳۰۴/۱۴

### ۳-۲- مشخصه‌یابی کامپوزیت Chit-rGO

شکل ۲، طیف مادون قرمز مربوط به اکسید گرافن احیا شده، کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده/کیتوسان و کیتوسان تنها را نشان می‌دهد.

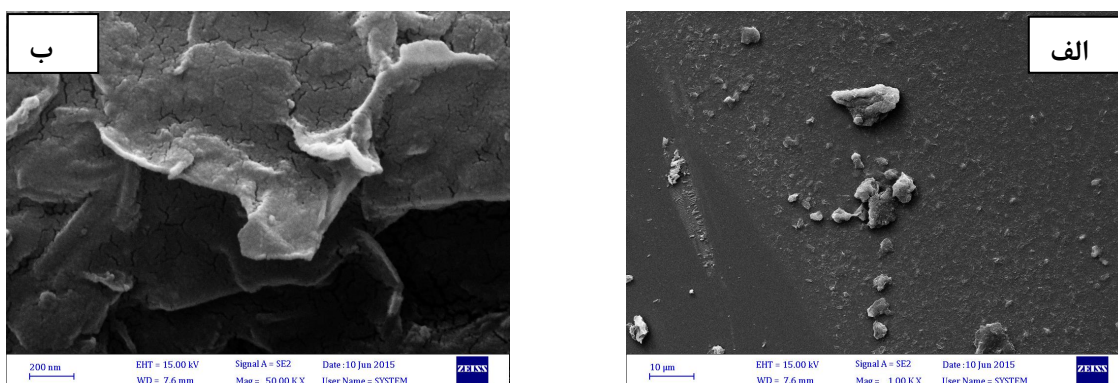


شکل ۲- طیف FTIR مربوط به (a) اکسید گرافن احیا شده (b) کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده و کیتوسان و (c) کیتوسان

در طیف اکسید گرافن احیا شده (شکل ۲- نمودار a)، دو نوار جذبی مربوط به ارتعاشات کششی در  $1034 \text{ cm}^{-1}$  و  $1198 \text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود که متعلق به پیوند C-O گروه‌های کربوکسیل و اپوکسی [۱۰] است و نوار جذب ارتعاشات کششی پیوند C=C مربوط به کربن‌های اکسید نشده یا فنولی در ناحیه  $1562 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود. همچنین نوار جذب ارتعاشات کششی پیوند C=O در ناحیه  $1692 \text{ cm}^{-1}$  و نوار جذبی مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) در  $3430 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌گردد [۱۰-۱۲]. در طیف IR مربوط به کامپوزیت کیتوسان و اکسید گرافن احیا شده (شکل ۲- نمودار b) پیک‌های C-H کششی در  $2877 \text{ cm}^{-1}$  الی  $2980 \text{ cm}^{-1}$ ، کششی C-O-C در  $1064 \text{ cm}^{-1}$ ، نوار جذبی مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) در  $3430 \text{ cm}^{-1}$  و کششی C=O در -NHCO- در  $1700 \text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود. همچنین در  $1563 \text{ cm}^{-1}$  و  $1406 \text{ cm}^{-1}$  پیک‌های مربوط به پیوند N-H مشاهده می‌شود که حضور پیوندهای آمیدی تازه تشکیل شده بین نانوصفحات گرافن و کیتوسان و در واقع برهم‌کنش الکتروستاتیک بین بار مثبت کیتوسان و بار منفی شبکه اکسید گرافن احیا شده را نشان می‌دهد. پاسخ مربوط به  $1634 \text{ cm}^{-1}$  نیز می‌تواند متعلق به ارتعاشات کششی C=O باشد [۱۳-۱۵]. از اصلی‌ترین باندهای موجود در طیف کیتوسان خالص (شکل ۲- نمودار c) می‌توان به باند ارتعاشات کششی مربوط به گروه O-H در گستره  $3000 \text{ cm}^{-1}$  تا  $3750 \text{ cm}^{-1}$  و باند مربوط به ارتعاشات کششی C-H در  $2874 \text{ cm}^{-1}$  و  $2921 \text{ cm}^{-1}$  اشاره کرد. لازم به ذکر است که باند مربوط به ارتعاشات کششی گروه N-H با باند متعلق به گروه O-H هم‌پوشانی کرده است [۱۶]. ارتعاشات خمشی مربوط به گروه‌های متیلن و متیل به ترتیب در  $1385 \text{ cm}^{-1}$  و  $1423 \text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده هستند. جذب‌های مربوط به ارتعاشات پیوندهای کربونیل (C=O) در نواحی  $1480 \text{ cm}^{-1}$  تا  $1680 \text{ cm}^{-1}$  وجود دارند. پیک‌های حاضر در بازه  $1000 \text{ cm}^{-1}$  تا  $1160 \text{ cm}^{-1}$  اشاره به ارتعاشات گروه‌های C-O دارند. به‌طور دقیق‌تر می‌توان گفت که باندهای نزدیک به محدوده  $1025 \text{ cm}^{-1}$  تا  $1080 \text{ cm}^{-1}$  متعلق به ارتعاشات خمشی گروه‌هایی چون COH، COC و CH<sub>2</sub>OH هستند. پیک نسبتاً کوچک نزدیک به  $1080 \text{ cm}^{-1}$

۸۹۰ مربوط به ساختار ساکاریدی کیتوسان است. بنابراین در منحنی b، حضور باندهای C-H ( $2920\text{ cm}^{-1}$  و  $2854\text{ cm}^{-1}$ )، C=O ( $1566\text{ cm}^{-1}$ )، C-O-C ( $1060\text{ cm}^{-1}$  و  $1160\text{ cm}^{-1}$ ) نشان‌دهنده حضور کیتوسان در نمونه و ساخته شدن نانو کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده - کیتوسان می‌باشد.

به‌منظور بررسی مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. مطابق شکل ۳ کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده و کیتوسان ساختار همگنی دارد و ورقه‌های گرافنی در همه جای ترکیب به‌طور یکنواخت پراکنده شده‌اند.



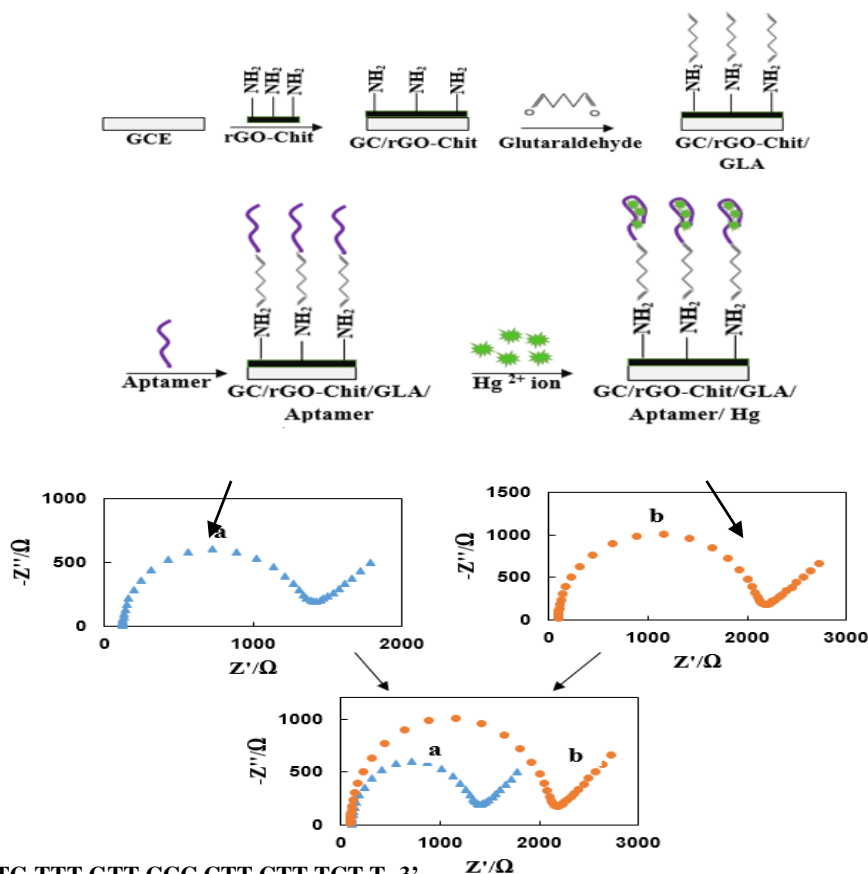
شکل ۳- تصویر FESEM از نانوکامپوزیت کیتوسان / اکسید گرافن احیا شده با بزرگنمایی‌های الف) ۱۰۰۰ برابر و ب) ۵۰۰۰ برابر

عدم تجمع ورقه‌های گرافنی و پراکنده شدن نشان می‌دهد که اکسید گرافن احیا شده توانسته است با کیتوسان به خوبی پیوند برقرار کند [۱۵]. در واقع کیتوسان باعث پراکندگی ورقه‌های گرافنی شده است و برهمکنش موثری بین کیتوسان و اکسید گرافن احیا شده اتفاق افتاده است [۱۳، ۱۴]. در این تصاویر ساختار چروکیده ورقه‌های گرافن در زمینه فیلم کیتوسان به خوبی نمایان است [۱۲]. تصاویر به‌دست آمده در توافق بسیار خوبی با نتایج حاصل از طیف مادون قرمز کامپوزیت کیتوسان / اکسید گرافن احیا شده هستند.

### ۳-۳- طراحی آپتاسگر برای اندازه‌گیری یون جیوه (II)

در شکل ۴، شمای کلی طرح آپتاسگر به‌کار رفته برای اندازه‌گیری یون جیوه نشان داده شده است. در مرحله اول پس از اطمینان از تمیز بودن سطح الکتروود کربن شیشه‌ای، نانوکامپوزیت کیتوسان / اکسید گرافن احیا شده روی سطح الکتروود قرار داده شد. سپس محلول گلو تار آلدهید در معرض تماس با سطح الکتروود اصلاح شده قرار داد شد تا پیوندهای آمیدی مورد نظر بین گلو تار آلدهید و کیتوسان تشکیل گردند.





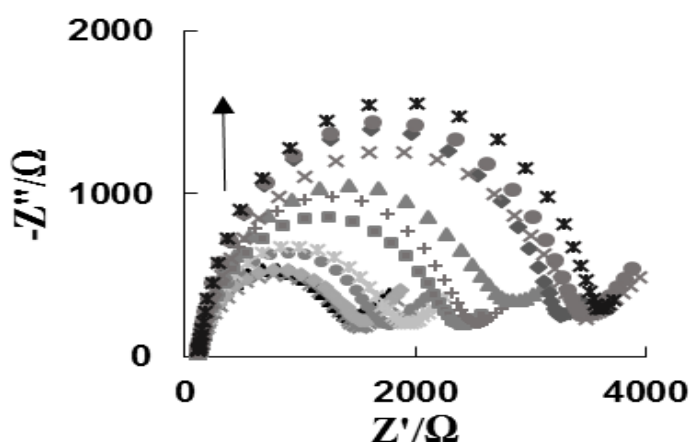
شکل ۴- شمایی از آپتاسنجر طراحی شده برای تشخیص یون جیوه (II)

پس از مدت زمان لازم برای واکنش گلووتارآلدهید و سطح، الکتروود توسط بافر فسفات با pH برابر با ۷/۴ و به دنبال آن توسط آب مقطر آبکشی گردید. در مرحله بعدی بلافاصله، محلول حاوی توالی آپتامری با غلظت‌های مشخص در معرض تماس با سطح الکتروود قرار داده شد. در نهایت الکتروود به ترتیب با بافر فسفات با pH برابر با ۷/۴ و با آب مقطر شستشو داده شد تا هرگونه توالی نوکلئوتیدی که به صورت غیراختصاصی جذب سطح الکتروود شده است یا پیوند آن‌ها محکم نیست، شسته شود. این الکتروود اصلاح شده تحت عنوان الکتروود GC/rGO-Chit/GLA/APT نام‌گذاری شد. در این مرحله طیف امپدانس الکتروشیمیایی الکتروود در حضور ردیاب الکتروشیمیایی  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ثبت گردید (منحنی a). با تثبیت آپتامر بر روی سطح، مقاومت انتقال بار به طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد. این افزایش در مقاومت انتقال بار به دلیل دافعه میان بار منفی ردیاب و بار منفی موجود در اسکلت فسفاتی رشته‌ی آپتامری است که این دافعه، رسیدن ردیاب به سطح الکتروود و امکان انجام فرآیند انتقال الکترون را با مشکل مواجه می‌کند. پس از آن، دوباره الکتروود با آب مقطر شستشو داده شد و در معرض تماس با محلول حاوی جیوه قرار گرفته شد تا برهمکنش بین باز تیمین آپتامر و جیوه به طور کامل صورت گیرد. سپس مجدداً طیف امپدانس الکتروود در همان شرایط قبل ثبت گردید. با توجه به ساختار انتخاب شده برای توالی آپتامر، برهم‌کنش بین جیوه و باز

تیمین، سبب خم شدن آپتامر شده و بنابراین سطح بیشتری از الکتروود با آپتامر پوشیده شد. نتیجه این امر، افزایش بیشتر در مقاومت سطح الکتروود بود (منحنی b). تغییر در افزایش میزان مقاومت انتقال بار به‌عنوان پاسخ آپتاحسگر تلقی و ارزیابی شد.

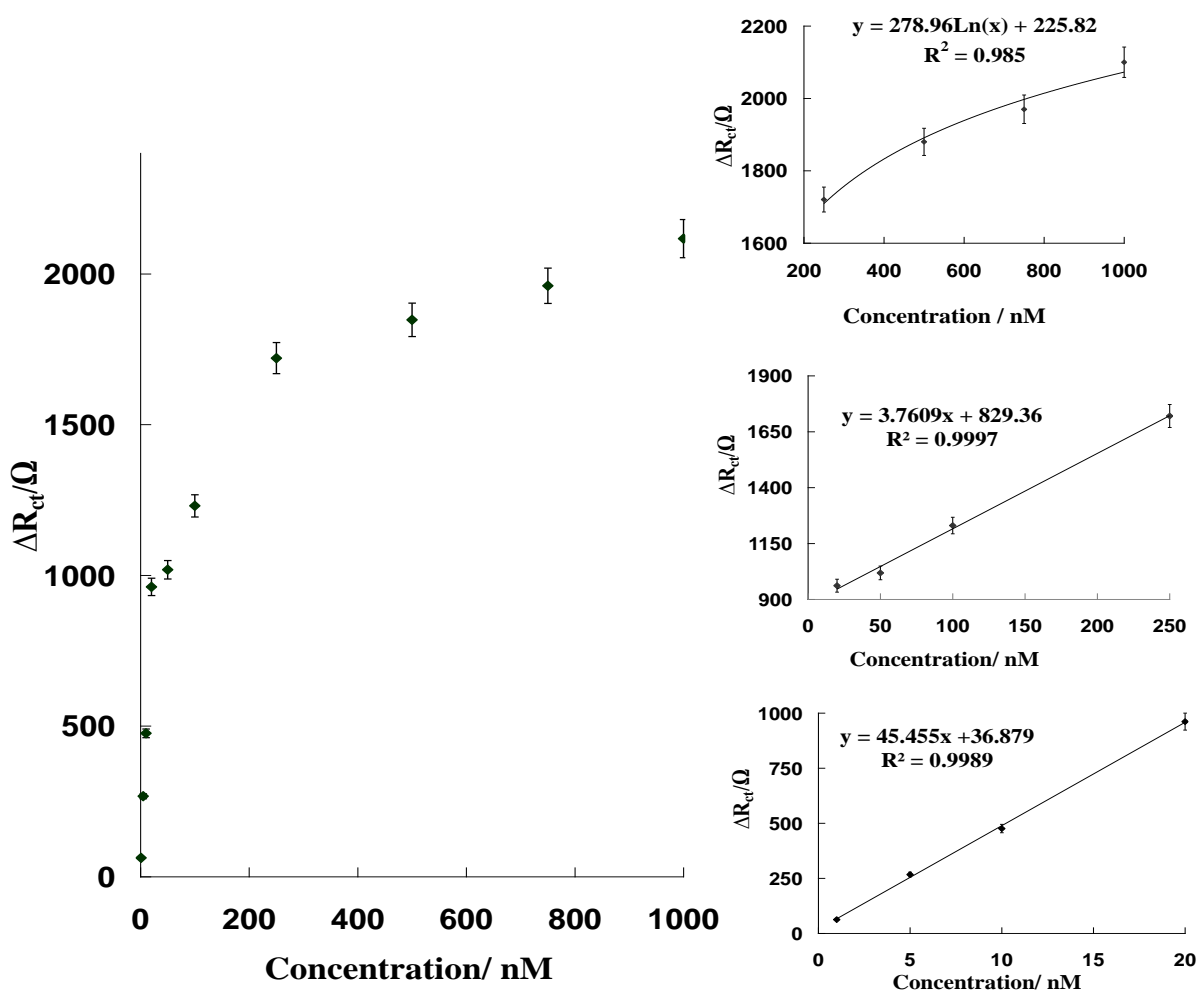
### ۳-۴- بررسی رفتار الکتروشیمیایی آپتاحسگر در حضور غلظت‌های مختلف یون جیوه (II)

به‌منظور بررسی قابلیت آپتاحسگر برای پاسخ به مقادیر متفاوت یون جیوه، پاسخ آپتاحسگر به غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ نانومولار از یون جیوه ثبت و بررسی گردید. شکل ۵ منحنی‌های نایکوئیست مربوط به پاسخ آپتاحسگر به غلظت‌های مختلف یون جیوه را نشان می‌دهد.



شکل ۵- منحنی‌های نایکوئیست مربوط به پاسخ آپتاحسگر به غلظت‌های مختلف جیوه

در شکل ۶ نیز منحنی کالبراسیون استخراج شده از نمودارهای نایکوئیست نشان داده شده است.



شکل ۶- نمودار پاسخ حسگر برحسب غلظت‌های مختلف یون جیوه (II) در گستره‌ی غلظتی ۰/۵ تا ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر.

مطابق با شکل ۶، منحنی کالیبراسیون دارای گستره خطی در محدوده ۰/۵-۲۵۰ نانومولار می‌باشد؛ که این گستره خطی خود از دو بخش ۰/۵-۲۰ نانومولار (معادله ۱) و ۲۰-۲۵۰ نانومولار (معادله ۲) تشکیل شده است.

$$R_{ct}(\Omega) = 45.455[Hg(II)](nM) + 36.879(\Omega) \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$R_{ct}(\Omega) = 3.7609[Hg(II)](nM) + 829.36(\Omega) \quad \text{رابطه (۲)}$$

روش‌های مختلفی برای تعیین حد تشخیص وجود دارد. در یکی از این تعاریف، حد تشخیص عبارتست از سه برابر انحراف معیار پاسخ تقسیم بر شیب منحنی کالیبراسیون. در این جا برای به دست آوردن حد تشخیص، از شیب خط در رابطه ۱، مربوط به گستره خطی ۰/۵-۲۰ نانومولار استفاده شد. حد تشخیص حسگر ۰/۹۴ نانومولار به دست آمد. حساسیت، شیب منحنی کالیبراسیون در این گستره، یعنی  $45/45 \Omega \text{ nmol}^{-1}$  می‌باشد. حد تشخیص به دست آمده برای حسگر، مقداری بسیار کم‌تری

از میزان مجاز جیوه تعیین شده توسط سازمان‌های بین‌المللی می‌باشد و این نشان می‌دهد که حسگر مورد نظر ابزاری مناسب و کاربردی برای اندازه‌گیری میزان یون جیوه است.

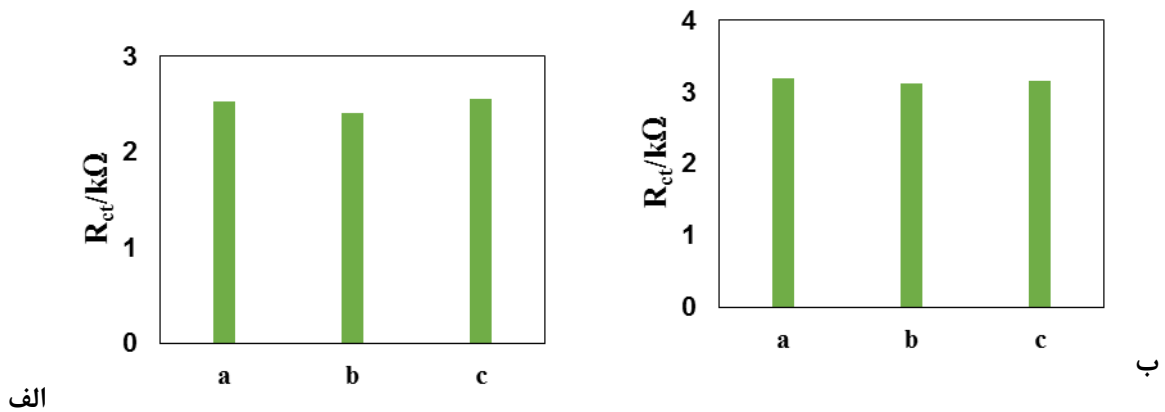
در جدول ۲ مشخصات آپتاسنرهای ساخته شده برای اندازه‌گیری یون جیوه گردآوری شده است. مشاهده می‌شود که کارایی آنالیزی حسگر فوق در مقایسه با سایر کارها بسیار مناسب و مطلوب است. ضمناً باید به این نکته توجه داشت که کار حاضر نسبت به سایر کارها دارای زمان آنالیزی کمتر و سادگی بیشتری است. عمده‌ترین تفاوت کار حاضر با سایر حسگرهای گزارش شده بستر استفاده شده برای ساخت آپتاسنر جیوه است، تفاوت توالی آپتامری انتخاب شده و تثبیت کوآلانسسی آپتامر حساس به جیوه بر روی سطح آن با استفاده از گلوآر آلدهید است. در اکثر آپتاسنرهای گزارش شده برای اندازه‌گیری یون جیوه، زمان لازم برای تثبیت آپتامر از ۱۰ ساعت تا ۲۴ ساعت متغیر است؛ درحالی‌که در حسگر طراحی شده در کار حاضر، پیوند کوآلانسسی بین آپتامر و گلوآر آلدهید در حدود یک ساعت شکل می‌گیرد و بنابراین، زمان آماده‌سازی و پاسخگویی بسیار کوتاه‌تر از سایر کارهای گزارش شده است.

جدول ۲-مقایسه کارایی آنالیزی آپتاسنرهای ساخته شده برای اندازه‌گیری جیوه

الکتروود	روش الکتروشیمیایی	حد تشخیص	گستره پاسخ خطی	مرجع
Au E	DPV	۰/۵nM	۱ nM-۲ μM	[۱۷]
MCH/Au E	EIS	۰/۱nM	۰/۱ nM-۱۰ μM	[۱۸]
MCH/PTO/Au E	DPV	۱nM	۱-۳۰۰ nM	[۱۹]
CuO@NCs/Au E	EIS	۰/۱۵nM	۱-۱۰۰ nM	[۲۰]
Cs-rGO/GCE	EIS	۰/۹۴ nM	۰/۵-۲۵۰ nM	کار حاضر

DPV: differential pulse voltammetry; MCH: 6-mercaptohexanol; Cs: chitosan.

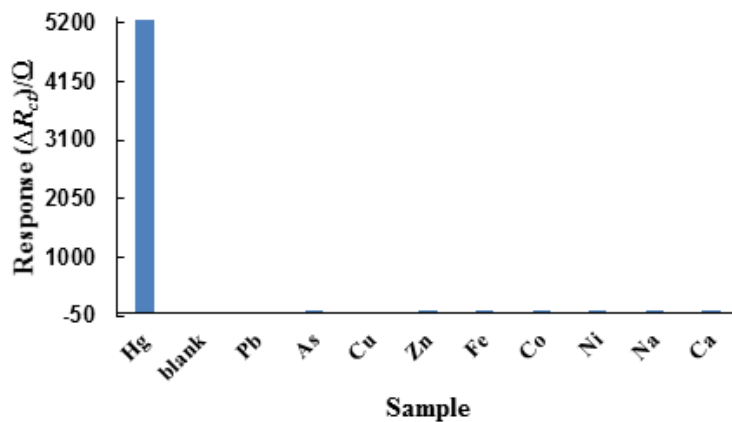
یکی از عوامل مهم در بررسی کارایی یک حسگر، تکرار پذیری پاسخ آن است. در شکل ۷، تکرار پذیری پاسخ آپتاسنر برای دو غلظت ۱۰۰ نانومولار و ۵۰۰ نانومولار بررسی شده است. میزان RSD% محاسبه شده برای سه بار تکرار اندازه‌گیری این دو غلظت به ترتیب ۳٪ و ۱/۲۴٪ است و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حسگر طراحی شده تکرار پذیری بسیار خوبی در پاسخ دارد.



شکل ۷- بررسی تکرارپذیری پاسخ آبتاحسگر برای دو غلظت الف) ۱۰۰ نانومولار و ب) ۵۰۰ نانومولار

### ۳-۵- بررسی انتخابگری و عملکرد حسگر در نمونه‌های حقیقی

انتخابگری آبتاحسگر، هم‌چون حساسیت و حد تشخیص، یک پارامتر مهم و اساسی در عملکرد حسگر است. به‌منظور بررسی انتخابگری حسگر، پاسخ آبتاحسگر به ۱۰۰ میکرومولار از یون‌های مختلف شامل سرب، آرسنیک، مس، روی، آهن، کبالت، نیکل، سدیم و کلسیم ثبت و بررسی گردید (شکل ۸).



شکل ۸- نمودار پاسخ آبتاحسگر به ۱۰۰ نانومولار از یون‌های مختلف شامل جیوه، سرب، آرسنیک، مس، روی، آهن، کبالت، نیکل، سدیم و کلسیم.

همانگونه که دیده می‌شود آبتاحسگر مورد نظر تنها به جیوه پاسخ نشان داده و به سایر یون‌ها پاسخی نشان نمی‌دهد. این نتایج نشان می‌دهند که توالی آبتامر مورد استفاده فقط نسبت به یون‌های جیوه حساس است و به‌صورت اختصاصی با آن برهم‌کنش می‌کند و واکنشی نسبت به سایر فلزات سنگین ندارد.

به منظور بررسی کاربردی بودن آبتاحسگر ساخته شده، به بررسی عملکرد حسگر در نمونه‌های حقیقی پرداخته شد. برای این منظور، از نمونه‌های حقیقی مختلف شامل آب آشامیدنی شهر اصفهان، پساب فاضلاب صنعتی ذوب آهن اصفهان، آب

رودخانه زاینده رود (روستای سودجان در استان چهارمحال و بختیاری) و نمونه آب چاه دانشگاه اصفهان استفاده شد. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا نمونه مورد نظر سانتریفیوژ شد تا املاح آن جدا شود. غلظت‌های مختلف از یون جیوه به نمونه‌های حقیقی اضافه شد. سپس اندازه‌گیری یون جیوه موجود در این نمونه‌ها با آپتاحتسگر ساخته شده انجام و درصد بازیافت بررسی گردید. نتایج این بررسی‌ها در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- مقادیر غلظت جیوه اندازه‌گیری شده در نمونه‌های حقیقی با استفاده از حسگر جیوه

نمونه	میزان Hg اضافه شده (nM)	پاسخ حسگر (nM)	درصد بازیافت توسط روش حاضر	مقدار اندازه‌گیری شده با روش AAS	در صد بازیابی AAS
آب آشامیدنی	۰	بدون تشخیص	-	-	-
	۵	۴/۹	۹۸٪	-	-
	۷۰	۶۸	۹۷/۱٪	-	-
پساب صنعتی	۰	۴/۳۳	-	-	-
	۵	۱۰/۲	۱۱۸/۴٪	-	-
	۷۰	۷۶	۱۰۲/۳٪	-	-
آب زاینده رود (روستای سودجان)	۰	بدون تشخیص	-	بدون تشخیص	-
	۵	۴/۸	۹۶٪	۴/۹	۹۸٪
	۵۰	۵۲	۱۰۴٪	۵۲/۵	۱۰۵٪
نمونه آب چاه	۰	بدون تشخیص	-	بدون تشخیص	-
	۵	۵/۱	۱۰۲٪	۵/۴	۱۰۸٪
	۵۰	۴۸/۷	۹۷/۴٪	۵۱/۹	۱۰۳/۸٪

با توجه به اطلاعات جدول، درصد بازیافت حسگر برای نمونه‌های حقیقی از ۹۶٪ تا ۱۱۸٪ را شامل می‌شود بنابراین می‌توان نتایج قابل قبولی را در استفاده از حسگر در نمونه‌های حقیقی به دست آورد و با اطمینان کامل می‌توان از آپتاحتسگر در اندازه‌گیری نمونه‌های حقیقی استفاده نمود. همچنین برای سنجش صحت داده‌ها و مقایسه روش حاضر با سایر روش‌های استاندارد، میزان جیوه موجود در نمونه‌های آب رودخانه اصفهان و آب چاه نیز علاوه بر آپتاحتسگر حاضر با روش اسپکتروسکوپی جذب اتمی (AAS) نیز اندازه‌گیری شده که نتایج آن در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. در ادامه نیز از تست  $f$  و تست  $t$  برای بررسی داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نتایج نشان دادند اختلاف معنی‌داری بین داده‌های به دست آمده از محلول‌های استاندارد و نمونه حقیقی در شرایط آزمایشی یکسان وجود ندارد. درصد بازیابی مناسب حسگر در انواع نمونه‌های حقیقی و تطابق زیاد پاسخ این آپتاحتسگر در مقایسه با روش استاندارد AAS، نشان دهنده انتخاب‌گری بالا و صحت بسیار مناسب پاسخ حسگر است.

## ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش یک آبتاحسگر حساس برای اندازه‌گیری یون جیوه(II) با استفاده از کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده و کیتوسان ساخته شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بستر فوق، پایداری بالایی داشته و بستر مناسبی جهت تثبیت مولکول‌های آبتامر فراهم می‌کند. بررسی‌های به‌عمل آمده نشان دادند که آبتاحسگر ساخته شده کارایی بسیار خوبی برای تشخیص جیوه داشته و دارای مزایایی از جمله حساسیت بالا، توانایی اندازه‌گیری جیوه در مقادیر بسیار کم با حد تشخیص برابر با ۰/۹۴ نانومولار و محدوده‌های پاسخ خطی برابر با ۵- تا ۲۰ و ۲۰ تا ۲۵۰ نانومولار است. به‌علاوه، زمان آنالیز کوتاه، سادگی و ارزان قیمت بودن نسبی، کارکرد در دمای محیط و صحت بالای اندازه‌گیری از جمله سایر مزایای این آبتاحسگر هستند. هم‌چنین این حسگر کارایی بسیار مناسبی برای استفاده در نمونه‌های حقیقی را دارا است و با توجه به حساسیت بالا، حد تشخیص بسیار کم، انتخابگری مناسب و صحت بالای پاسخ، به‌عنوان حسگر کارآمد، قابلیت استفاده برای ارزیابی سلامت منابع آبی و پساب کارخانه جات را دارا است.

## ۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اصفهان صمیمانه تشکر می‌نمایند.

## ۶- مراجع

- [1] M. Li, H. Gou, I. Al-Ogaidi, N. Wu, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **1** (2013) 713.
- [2] C.H. Chung, J.H. Kim, J. Jung, B.H. Chung, *Biosensors and Bioelectronics*, **41** (2013) 827.
- [3] Z. Zhao, X. Zhou, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **171** (2012) 860.
- [4] J.K. Virtanen, T.H. Rissanen, S. Voutilainen, T.-P. Tuomainen, *The Journal of nutritional biochemistry*, **18** (2007) 75.
- [5] D.R. Laks, *Medical hypotheses*, **74** (2010) 698/
- [6] Y.-S. Lin, G. Ginsberg, J.L. Caffrey, J. Xue, S.V. Vulimiri, R.G. Nath, B. Sonawane, *Environment international*, **70** (2014) 88.
- [7] X. Lou, T. Zhao, R. Liu, J. Ma, Y. Xiao, *Analytical chemistry*, **85** (2013) 7574.
- [8] M. Lönne, G. Zhu, F. Stahl, J.-G. Walter, *Springer*, 2013, pp. 121.
- [9] D.C. Marcano, D.V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, *ACS nano*, **4** (2010) 4806.
- [10] V. Loryuenyong, K. Totepvimarn, P. Eimburanaprat, W. Boonchompoo, A. Buasri, *Advances in Materials Science and Engineering*, **2013** (2013).
- [11] E.-Y. Choi, T.H. Han, J. Hong, J.E. Kim, S.H. Lee, H.W. Kim, S.O. Kim, *Journal of Materials Chemistry*, **20** (2010) 1907.

- [12] H. Wang, Y. Wang, S. Liu, J. Yu, W. Xu, Y. Guo, J. Huang, *RSC Advances*, **4** (2014) 60987.
- [13] Y. Pan, H. Bao, L. Li, *ACS applied materials & interfaces*, **3** (2011) 4819.
- [14] X. Feng, X. Wang, W. Xing, B. Yu, L. Song, Y. Hu, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **52** (2013) 12906.
- [15] Z. Zhang, X. Fu, K. Li, R. Liu, D. Peng, L. He, M. Wang, H. Zhang, L. Zhou, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **225** (2016) 453.
- [16] S.M. Silva, C.R. Braga, M.V. Fook, C.M. Raposo, L.H. Carvalho, E.L. Canedo, *engineering and technology*. Croatia: InTech, (2012) 43.
- [17] S.-J. Liu, H.-G. Nie, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Analytical chemistry*, **81** (2009) 5724.
- [18] Z. Lin, X. Li, H.-B. Kraatz, *Analytical chemistry*, **83** (2011) 6896.
- [19] H. Park, S.-J. Hwang, K. Kim, *Electrochemistry Communications*, **24** (2012) 100.
- [20] S. Liu, M. Kang, F. Yan, D. Peng, Y. Yang, L. He, M. Wang, S. Fang, Z. Zhang, *Electrochimica Acta*, **160** (2015) 64.