



Research Article

Optimized Synthesis of Zeolitic Imidazolate Framework-67 and its Application as a Peroxidase-Mimicking Nanozyme for Colorimetric Detection of Hydrogen Peroxide

Zohre Ebrahimpour, Zeinab Moradi-Shoeili*

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Guilan, Rasht, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 24/May/2025

Revised: 28/Jul/2025

Accepted: 11/Aug/2025

Keywords:

Zeolitic imidazolate framework,
ZIF-67,
Peroxidase-like activity,
Kinetic study,
Colorimetric sensor.

ABSTRACT

In recent years, nanostructures with enzyme-like activity, particularly peroxidase mimics, have been regarded as promising alternatives to natural enzymes in a variety of applications. In this study, a cobalt-based zeolitic imidazolate framework-67 (ZIF-67) was synthesized with high efficiency by exposing an aqueous solution of the reactants to an ammonia atmosphere at ambient temperature. The obtained ZIF-67 exhibited efficient peroxidase-like activity. Kinetic studies demonstrated that the synthesized ZIF-67 had a stronger binding affinity to o-phenylenediamine (OPD) as a substrate, as well as higher reaction rates compared to the enzyme horseradish peroxidase (HRP). A ZIF-67-based colorimetric method was further developed for H₂O₂ detection (linear response range, 10⁻⁴-9.96×10⁻⁴ M). This facile and low cost synthesis approach is expected to facilitate the large-scale production and practical application of ZIF-67 and its derivatives as artificial enzymes in the future.

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2025.37113.2353>

© 2025 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Associate Professor of Inorganic Chemistry. E-mail address: zmoradi@guilan.ac.ir

How to cite this article: Ebrahimpour, Z. & Moradi-Shoeili, Z. (2025). Optimized Synthesis of Zeolitic Imidazolate Framework-67 and its Application as a Peroxidase Mimetic for Colorimetric Detection of Hydrogen Peroxide. *Applied Chemistry Today*, 20(75), 49-64. (in Persian)

سنتز بهینه چارچوب ایمیدازولات زئولیتی-۶۷ و استفاده از آن به عنوان نانوزیم مقلد

پراکسیداز برای سنجش رنگ سنجی هیدروژن پراکسید

زهره ابراهیم پور، زینب مرادی شوئیلی*

گروه شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۳/۰۳ بازنگری مقاله: ۱۴۰۴/۰۵/۰۶ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰	در سال‌های اخیر، نانوساختارهایی با فعالیت شبه آنزیمی، به‌ویژه آنزیم‌های مقلد پراکسیداز، به عنوان جایگزین‌های امیدوارکننده‌ای برای آنزیم‌های طبیعی، در کاربردهای مختلفی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، چارچوب ایمیدازولات زئولیتی-۶۷ (ZIF-67) مبتنی بر کبالت با راندمان بالا، از طریق قراردادن محلول اتانولی واکنش‌دهنده‌ها در جو آمونیاک و در دمای محیط سنتز شد. ZIF-67 به دست آمده فعالیت شبه پراکسیدازی کارآمدی را نشان داد. مطالعات سینتیکی نشان داد که ZIF-67 سنتز شده میل اتصال قوی تری به اورتوفنیل دی آمین (OPD)، به عنوان سوبسترا و همچنین سرعت واکنش بالاتری نسبت به آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) دارد. یک روش رنگ سنجی مبتنی بر ZIF-67 برای تشخیص H_2O_2 (ناحیه پاسخ خطی $10^{-4} - 9/96 \times 10^{-4} M$) توسعه داده شد. انتظار می‌رود این رویکرد سنتزی آسان و کم هزینه، تولید در مقیاس بزرگ و کاربرد عملی ZIF-67 و مشتقات آن را به عنوان آنزیم‌های مصنوعی در آینده تسهیل نماید.
کلمات کلیدی: چارچوب ایمیدازولات زئولیتی، ZIF-67، فعالیت شبه پراکسیدازی، مطالعه سینتیکی، حسگر رنگ سنجی.	
DOI: https://doi.org/10.22075/chem.2025.37113.2353	
This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)	

۱- مقدمه

آنزیم‌های طبیعی به عنوان ماکرومولکول‌های زیستی با فعالیت کاتالیزوری بسیار کارآمد و انتخابی، در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی نقش حیاتی ایفا می‌کنند [۱]. با این حال، عواملی مانند پایداری حرارتی پایین، هزینه‌ی بالای تهیه و خالص سازی و سازگاری ضعیف با واکنش‌های غیر زنده، کاربردهای گسترده آن‌ها را در فرآیند آزمایشگاهی و صنعتی محدود کرده است [۲]. همچنین، اغلب آنزیم‌ها نیازمند استفاده از سوبسترای کمکی و کوفاکتورها هستند که این موضوع موجب افزایش هزینه تولید آنزیم می‌شود [۳]. بنابراین، نیاز اساسی به تولید و توسعه آنزیم‌های مصنوعی یا مدل‌های آنزیمی که ویژگی‌های مطلوب آنزیم‌های طبیعی را دارا باشند، وجود دارد.

در سال‌های اخیر، طیف گسترده‌ای از مواد مقلد آنزیمی برای کاتالیز واکنش‌های مهم بیولوژیکی توسعه یافته‌اند که پیچیدگی ساختاری کمتری نسبت به همتایان طبیعی خود دارند [۴ و ۵]. در این میان، شبه آنزیم‌های مبتنی بر نانو مواد (نانوزیم‌ها) به دلایل متعددی مانند هزینه پایین سنتز، پایداری بالا در شرایط سخت واکنش‌های شیمیایی، سهولت ذخیره‌سازی، بازده انرژی

مناسب و فعالیت کاتالیزوری مطلوب در شرایط ملایم مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند [۷ و ۶]. همچنین، فعالیت کاتالیزوری نانوزیم‌ها از طریق تنظیم اندازه، شکل، مورفولوژی، ترکیب شیمیایی و پوشش سطح قابل کنترل است [۸]. این ویژگی‌ها موجب شده‌اند که نانوزیم‌ها به عنوان جایگزین کارآمد برای آنزیم‌های طبیعی در کاربردهای متنوعی از جمله سنجش‌های شیمیایی و زیستی، تشخیص پزشکی و حفاظت از محیط زیست مورد استفاده قرار گیرند [۹-۱۲].

پراکسیدازها گروهی از آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز محسوب می‌شوند که انتقال الکترون را از یک مولکول سوستر، به عنوان دهنده الکترون، به مولکول دیگر مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و یا آلکیل هیدروپراکسید (ROOH)، به عنوان گیرنده الکترون، کاتالیز می‌کنند [۱۴ و ۱۳]. تقلید از پراکسیدازها به دلایل متعددی از جمله پتانسیل کاربرد آنها در تشخیص سلول‌های سرطانی و تصفیه فاضلاب‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته است [۱۶ و ۱۵]. پس از پژوهش پیشگامانه یان و همکارانش در توسعه نانوزیم‌ها با فعالیت شبه پراکسیدازی [۱۷]، پیشرفت‌های قابل توجهی در سنتز پراکسیدازهای مصنوعی مبتنی بر نانو مواد حاصل شده است. این پیشرفت‌ها شامل استفاده از فلزات نجیب [۱۹ و ۱۸]، اکسیدهای فلزی [۲۱ و ۲۰]، سولفیدهای فلزی [۲۳ و ۲۲]، و مواد بر پایه کربن [۲۵ و ۲۴] می‌باشد.

چارچوب‌های فلز-آلی (MOF) یکی از دسته‌های جذاب مواد متخلخل بلوری هستند که با کوئوردینه شدن یون‌های فلزی با پیوند دهنده‌های آلی ساخته می‌شوند [۲۶]. MOF‌ها به دلیل ساختار متخلخل منظم، سطح ویژه بالا و قابلیت تنظیم شیمیایی، جایگاه ویژه‌ای در طراحی کاتالیزورهای ناهمگن دارند. این مواد به عنوان بسترهای ایده‌آل برای تثبیت نانوذرات فلزی یا کلاسترهای کاتالیزوری عمل می‌کنند و با ایجاد محیطی کنترل شده، فعالیت و انتخابگری واکنش‌ها را بهبود می‌بخشند [۲۷-۲۹]. ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند پایداری حرارتی بالا و قابلیت اصلاح گروه‌های عاملی، MOF‌ها را به گزینه‌ای ممتاز در کاربردهای کاتالیزوری تبدیل کرده است. در سال‌های اخیر، تحقیقات درباره فعالیت شبه آنزیمی نانو مواد مبتنی بر MOF‌ها، توجه محققان را به خود جلب کرده است [۳۰]. چارچوب‌های ایمیدازولات زئولیتی (ZIF‌ها)، به عنوان زیر مجموعه‌ای از MOF‌ها، به دلیل ویژگی‌های ساختاری خاص مانند تخلخل بالا و پایداری حرارتی و شیمیایی مناسب در کاربردهای متنوعی از جمله ذخیره و جداسازی گازها، کاتالیزور و تصویربرداری زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۳۱]. همچنین، مزایایی مانند اصلاح پذیری ساختاری، عملکرد ساده، زمان پاسخ‌دهی کوتاه، حساسیت بالا و پایداری خوب، ZIF‌ها را به گزینه‌ای ایده‌آل برای ساخت حسگرهای شیمیایی در تشخیص آنالیت‌های مختلف تبدیل کرده است [۳۲]. افزون بر این، فعالیت کاتالیزوری ZIF‌ها به علت حضور دو گروه لیگاند‌های آلی و یون‌های فلزی با محل‌های کوئوردیناسیون خالی، که می‌توانند به عنوان مکان‌های فعال کاتالیزوری عمل کنند، قابل توجه است. ساختار متخلخل با حجم منافذ زیاد در این دسته از ترکیبات، امکان انتشار مناسب واکنش‌دهنده‌ها و محصولات را فراهم می‌سازد. این ویژگی به ویژه در واکنش‌های فاز مایع از اهمیت کلیدی برخوردار است [۳۴ و ۳۳].

با توجه به اینکه حضور پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سیستمهای زیستی با آسیب سلولی و بیماری‌هایی همچون اختلالات خود ایمنی، آلزایمر و سرطان همراه است [۳۶ و ۳۵]، اندازه‌گیری دقیق H_2O_2 در محیط‌های بیولوژیکی پیچیده برای اهداف تحقیقاتی و تشخیصی از اهمیت بالایی برخوردار است. روش‌های تحلیلی متعددی برای تشخیص کمی H_2O_2 توسعه یافته‌اند که از جمله می‌توان به روش‌های الکتروشیمیایی، کروماتوگرافی مایع، لومینسانس شیمیایی، فلورسانس و رنگ سنجی اشاره کرد [۳۷]. روش رنگ سنجی به دلیل مزایای منحصر به فردی مانند امکان قرائت سریع نتایج به صورت بصری حتی با چشم غیر مسلح و قابلیت استفاده از ابزارهای قابل حمل، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند [۳۹]. به‌ویژه، روش‌های رنگ سنجی مبتنی بر نانوزیم‌ها با فعالیت شبه پراکسیدازی به دلایل متعددی نسبت به آنزیم‌های طبیعی ارجحیت یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به انعطاف پذیری بیشتر در طراحی، هزینه تولید پایین‌تر و پایداری بالاتر در شرایط مختلف اشاره نمود. این ویژگی‌ها موجب افزایش توجه محققان به توسعه روش‌های تشخیص H_2O_2 مبتنی آنزیم‌های مصنوعی شده است [۳۹].

در این پژوهش، از چارچوب ایمیدازولات زئولیتی-۶۷ (ZIF-67) به عنوان نانوزیم مقلد پراکسیداز برای تشخیص و سنجش H_2O_2 استفاده شده است. روش‌هایی که تاکنون برای سنتز ZIF-67 گزارش شده اند مبتنی بر استفاده از افزودنی‌های آلی، سورفکتانت‌ها، نسبت‌های بالای لیگاند به فلز و یا مدت زمان طولانی واکنش بوده است که اغلب منجر به بازده پایین یا تخریب نامطلوب محصول نهایی می‌شوند. در این کار تحقیقاتی، برای نخستین بار روش سنتز ZIF-9 [۴۰] با اصلاحاتی برای تولید ZIF-67 به کار گرفته شد. این روش بهینه‌شده دارای مزایای قابل توجهی مانند سادگی روش، سرعت بالا، هزینه پایین و قابلیت انجام واکنش در دمای اتاق می‌باشد. بررسی‌های سینتیکی نشان داد که نانوساختار ZIF-67 سنتز شده دارای فعالیت شبه‌پراکسیدازی قابل توجهی است. این ویژگی‌های مطلوب در طراحی حسگر رنگ سنجی برای تشخیص H_2O_2 به کار گرفته شد که دارای حساسیت بالا، حدتشخیص پایین و عملکرد مطلوب در مقایسه با نانوساختارهای مشابه گزارش شده می‌باشد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و دستگاههای استفاده شده

تمام مواد شیمیایی استفاده شده در سنتز نانوکاتالیزور و نیز مطالعات سینتیکی از منابع تجاری مانند شرکت های شیمیایی سیگما و مرک تهیه شدند و بدون هیچگونه خالص سازی مورد استفاده قرار گرفتند. داده های XRD با دستگاه پراش اشعه‌ی X ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$, Cu-K α X-radiation) مدل Philips pw 1830 به دست آمد. طیف FT-IR نمونه ها در فرم قرص های KBr و با استفاده از طیف سنج FT-IR مدل Alpha-Bruker ثبت شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) با استفاده از دستگاه XFlash 6I30- Bruker به دست آمد. آنالیز عنصری با استفاده از طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) سری MIRA3 FEG-SEM انجام شد. طیف‌های جذب الکترونی وابسته به زمان UV-Vis با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis Analytik Jena SPEKOL1300 ثبت شد.

۲-۲- سنتز نانوساختار ZIF-67

در ابتدا، ۰/۰۸۲ گرم (۱ mmol) از ۲-متیل ایمیدازول در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل شد. سپس ۰/۱۴۶ گرم (۵ mmol) از کبالت (II) نیترات ۶ آبه $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ به صورت پودری به محلول قبل اضافه شد. بشر حاوی محلول به همراه یک ویال حاوی ۱۰ میلی لیتر آمونیاک ۲۵٪ در یک اتوکلاو ۲۵۰ میلی لیتری قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت شرایط اتمسفر آمونیاکی و در دمای اتاق هم خورد. رسوب بنفش رنگ به دست آمده با اتانول شسته شده و سپس در دمای اتاق خشک شد. وزن رسوب حاصل ۰/۱۳۵ گرم و راندمان حدود ۵۰٪ بدست آمد.

۲-۳- مطالعات سینتیکی اکسایش کاتالیزوری OPD با استفاده از ZIF-67

در این روش ۱ میلی گرم از ZIF-67 سنتز شده، به عنوان کاتالیزور در ۱۰ میلی لیتر محلول حاوی OPD به عنوان سوبسترا (تهیه شده با بافر دی سدیم هیدروژن فسفات $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ با غلظت ۰/۲ مولار و $\text{pH} = 7$) با غلظت 10^{-2} مولار ریخته شد. سپس، ۸۰ μl از آب اکسیژنه ۳۰٪ به عنوان اکسنده به محلول بالا اضافه شد. پیشرفت واکنش به وسیله دستگاه طیف سنج UV-vis بررسی شد. نمودار جذب بر حسب زمان، به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و در محدوده ۳۵۰-۷۰۰ nm رسم شد. حداکثر مقدار جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۲۸ nm مشاهده شد. افزایش جذب در این طول موج، اکسایش OPD به دی آمینوفنازین (DAP) را در حضور نانو کاتالیزور ZIF-67 سنتز شده، تایید می کند. سرعت اولیه ی این واکنش از طریق افزایش جذب ناشی از افزایش غلظت DAP ($\epsilon = 1/67 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) تعیین شد [۴۱].

پارامترهای سینتیکی مورد نیاز با معادله میکائیلیس-منتن $v_0 = (V_{\max}[S])/(K_m + [S])$ و مدل لاین ویور-بورک^a با استفاده از معادله $\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$ محاسبه شد. در این معادله، V_0 سرعت اولیه ی واکنش، $V_{\max}$ بیشترین سرعت واکنش کاتالیز شده آنزیمی، K_m ثابت میکائیلیس-منتن و $[S]$ غلظت سوبسترا می باشد.

۳-بحث و نتیجه گیری

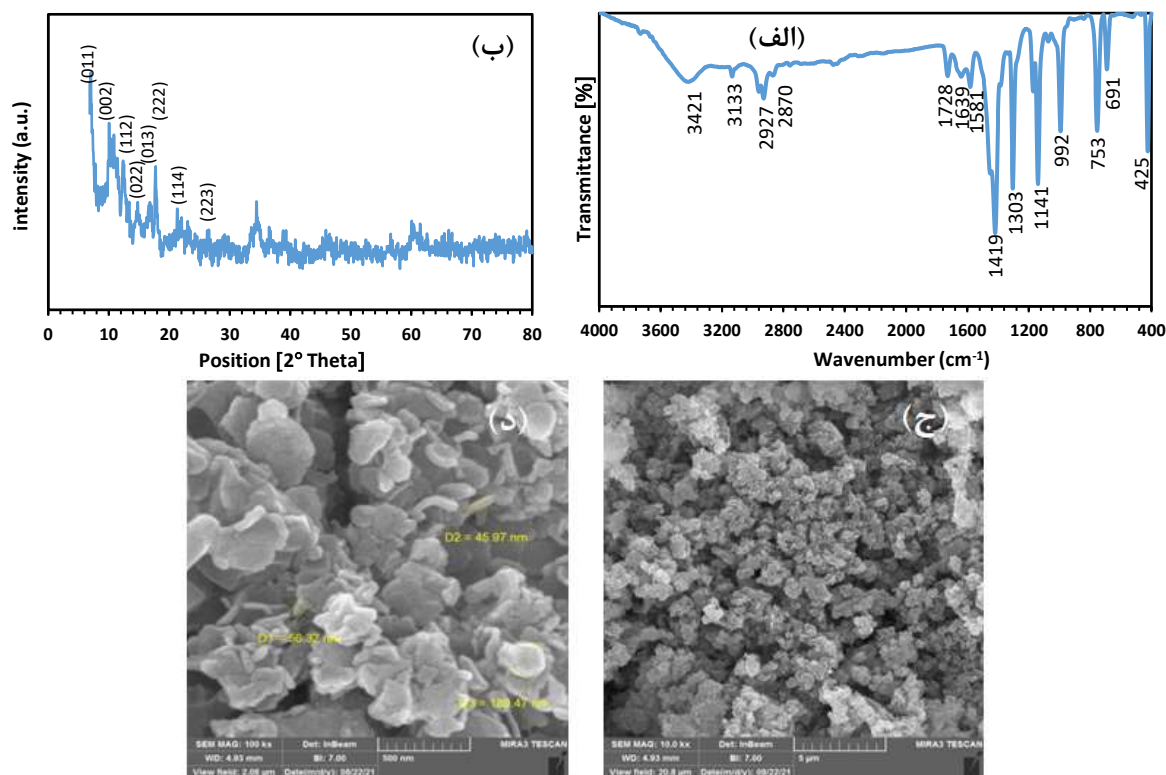
۳-۱- شناسایی ZIF-67

طیف FT-IR ZIF-67 سنتز شده در شکل ۱الف نشان داده شده است. باندهای جذبی مشاهده شده برای ساختار ZIF-67 عمدتاً به لیگاند ۲-متیل ایمیدازول نسبت داده می شود. باندهای مشاهده شده در $1500-600 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به حالت های کشش و خمش حلقه ایمیدازول است، در حالی که باند در 1581 cm^{-1} مربوط به حالت کشش پیوند $\text{C}=\text{N}$ در لیگاند ۲-متیل ایمیدازول می باشد. علاوه بر این، باندها در ناحیه 2927 cm^{-1} و 3133 cm^{-1} به ترتیب به حالت کشش $\text{C}-\text{H}$ از حلقه آروماتیک و زنجیره آلیفاتیک در ۲-متیل ایمیدازول اختصاص داده می شوند [۴۲]. نوار موجود در 425 cm^{-1} با پیوندهای $\text{Co}-\text{N}$ مطابقت

^a -Michaeli-Menten

^b -Lineweaver-Burk

دارند [۴۳]. باند گسترده‌ای که در 3420 cm^{-1} متمرکز شده است، به گروه‌های هیدروکسیل مولکول‌های آب جذب شده نسبت داده می‌شود. الگوی پراش اشعه‌ی ایکس (XRD) نانوساختار ZIF-67 در شکل ۱.ب نشان داده شده است. پیک‌های قوی نانوبلورهای ZIF-67 مربوط به صفحات بلوری (۰۱۱)، (۰۰۲)، (۱۱۲)، (۰۲۲)، (۰۱۳)، (۲۲۲)، (۱۱۴) و (۲۲۳) به ترتیب در 2θ های 6.9° ، 10.05° ، 12.5° ، 14.8° ، 16.6° ، 17.7° ، 22.1° و 26.5° می‌باشد که با نتایجی که پیش از این برای ZIF-67 گزارش شده است مطابقت دارند [۴۴]. شدت نسبی پیک‌ها و موقعیت زاویه‌ای آنها تشکیل فاز بلوری مورد نظر را تأیید می‌کند. تصاویر SEM مربوط به نانوساختار ZIF-67 سنتز شده در شکل ۱.ج و ۱.د نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل‌ها مشاهده می‌شود، ZIF-67 سنتز شده ساختاری شبه گلبگی با میانگین اندازه‌ای در حدود ۲۰۰ نانومتر و ضخامت حدود ۵۰ نانومتر می‌باشند. این ساختارهای نانومتری با سطح ویژه بالا می‌توانند دسترسی بهتر مواد واکنش‌دهنده به مراکز فعال کاتالیزوری را فراهم نمایند. بررسی دقیق‌تر تصاویر SEM نشان می‌دهد که نانوذرات تولید شده دارای توزیع اندازه نسبتاً یکنواخت و همگنی مناسبی هستند. اگرچه مقداری تجمع سطحی در نمونه مشاهده می‌شود، اما این امر تأثیر محسوسی بر عملکرد کاتالیزوری نخواهد داشت چرا که ساختار متخلخل ZIF-67 دسترسی به مراکز فعال را حتی در حالت تجمع یافته نیز ممکن می‌سازد.



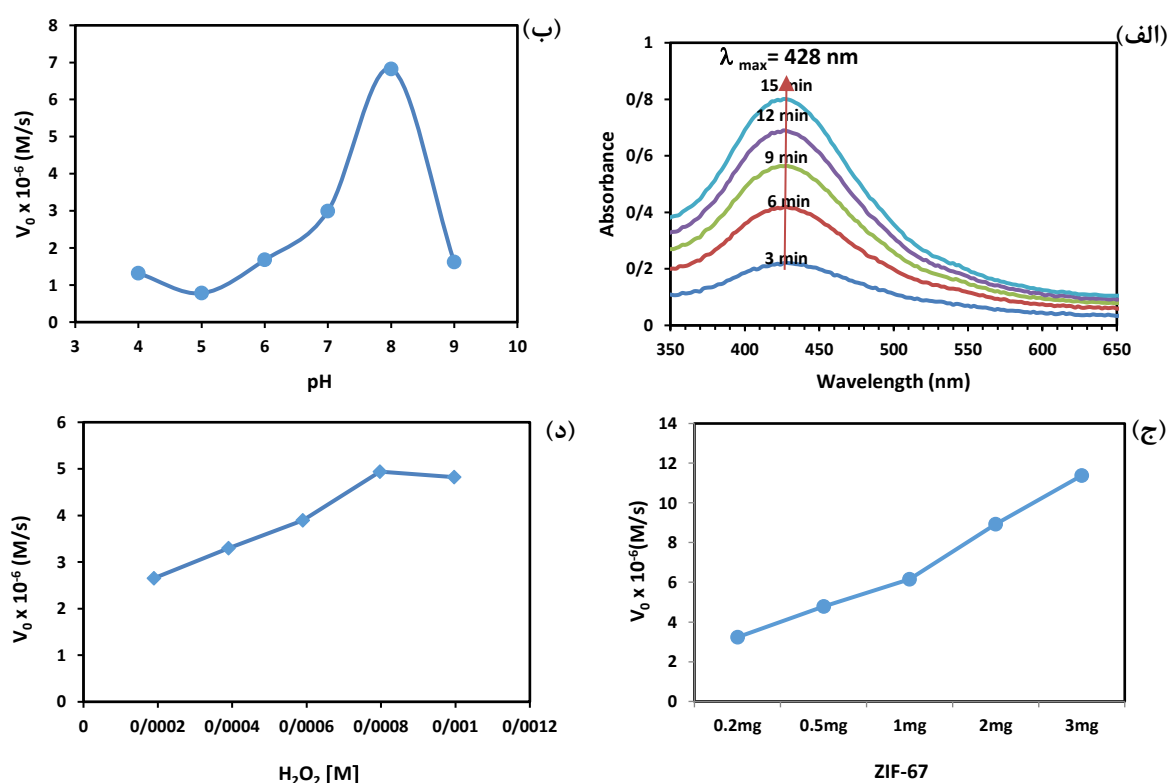
شکل ۱. الف) طیف‌های FT-IR مربوط به ۲-متیل ایمیدازول و نانوزیم ZIF-67، ب) الگوی پراش اشعه‌ی ایکس نانو بلورهای ZIF-67، ج) و د) تصاویر SEM مربوط به نانوساختار ZIF-67 در دو بزرگنمایی مختلف

۳-۲- بررسی فعالیت شبه پراکسیدازی نانوزیم ZIF-67

در ابتدا برای بررسی فعالیت شبه پراکسیدازی ZIF-67 سنتز شده برای اکسایش OPD در حضور آب اکسیژنه استفاده شد و جذب مخلوط واکنش در زمان‌های مختلف در فاصله زمانی یکسان طی ۱۵ دقیقه با استفاده از طیف سنج UV-vis در ناحیه ۳۵۰-۷۰۰ nm اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۲الف نشان داده شده است، در طی زمان پیک جدیدی در طول موج بیشینه ۴۲۸ nm ظاهر شد که نشان دهنده واکنش اکسایش OPD و تشکیل DAP به عنوان محصول واکنش می باشد. لازم به ذکر است که در عدم حضور ZIF-67 و H_2O_2 تغییر محسوسی در طیف جذبی مشاهده نشد. این مشاهدات به وضوح تأیید می کند که فعالیت کاتالیزوری مشاهده شده ماهیت پراکسیدازی دارد و نه اکسیدازی، زیرا نانوساختار ZIF-67 به تنهایی و حتی در حضور اکسیژن، فاقد توانایی اکسید کردن سوبسترا است و فعالیت کاتالیزوری تنها در حضور همزمان نانوزیم و H_2O_2 رخ می دهد. این رفتار مشابه با عملکرد پراکسیدازهای طبیعی است که در آن H_2O_2 به عنوان پذیرنده الکترون عمل می کند.

۳-۳- تعیین شرایط بهینه برای بررسی شبه پراکسیدازی

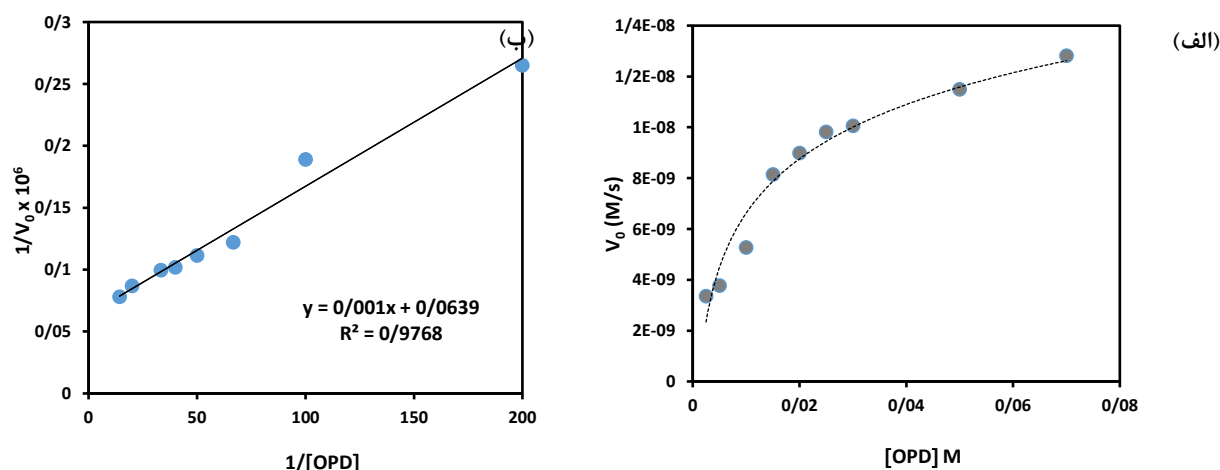
در مرحله اول، pH محلول تهیه شده OPD در بافر فسفات از ۴ تا ۹، با ثابت نگه داشتن سایر پارامترها (۱ میلی گرم کاتالیزور و ۸۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪) تغییر داده شد و تغییرات جذب به مدت ۱۵ دقیقه با طیف سنج UV-vis ثبت گردید. همانطور که در شکل ۲ب نشان داده شده است، سرعت اولیه واکنش در pH های مختلف محاسبه شده و بیشترین سرعت اولیه واکنش در pH ۸ به دست آمده است که این مقدار به عنوان pH بهینه در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، در pH بهینه و با ثابت در نظر گرفتن سایر پارامترها، مقدار کاتالیزور استفاده شده در واکنش شبه پراکسیدازی تغییر داده شد و نتایج به دست آمده از نمودار رسم شده در شکل ۲ج نشان می دهد که تغییرات جذب محلول، تابع مقدار کاتالیزور ZIF-67 می باشد و با افزایش مقدار کاتالیزور مقادیر جذب محلول و به تبع آن سرعت اولیه واکنش افزایش یافته است. با توجه به اینکه مقدار سرعت واکنش و در نتیجه جذب محلول برای مقادیر بالای کاتالیزور به ویژه در غلظت‌های بالای OPD زیاد می شود، مقدار ۱ mg به عنوان مقدار بهینه در نظر گرفته شد و در ادامه تمامی مطالعات مربوط به فعالیت پراکسیدازی با مقدار ۱ میلی گرم از کاتالیزور انجام شده است. به منظور تعیین مقدار بهینه آب اکسیژنه، سینتیک فعالیت پراکسیدازی نانوزیم ZIF-67 در غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه و در شرایط بهینه با ثابت نگه داشتن سایر پارامترهای آزمایش بررسی شده و به وسیله طیف سنج UV-vis ثبت گردید. به این ترتیب جذب محلول در هر دقیقه ثبت شده و مقادیر سرعت اولیه واکنش در غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه محاسبه شد. مطابق شکل ۲د مقدار بهینه آب اکسیژنه ۸۰ میکرولیتر (۰/۷۹ mM) بدست آمد.



شکل ۲. الف) طیف UV-vis مخلوط واکنش شبه پراکسیدازی نانوزیم ZIF-67 در طی زمان، ب) تعیین مقدار بهینه‌ی pH برای واکنش شبه پراکسیدازی، ج) تغییرات سرعت واکنش برحسب مقدار کاتالیزور ZIF-67، د) نمودار تعیین مقدار بهینه‌ی آب اکسیژنه برای واکنش شبه پراکسیدازی

۳-۴- محاسبه‌ی پارامترهای سینتیکی فعالیت شبه پراکسیدازی ZIF-67 در واکنش اکسایش سوپسترای OPD

برای مطالعه‌ی سینتیکی فعالیت کاتالیزوری ZIF-67 از شرایط بهینه‌ی به دست آمده در بخش قبل استفاده شد. به این ترتیب، ۱ میلی گرم از کاتالیزور به ۱۰ میلی لیتر محلول بافر دی سدیم هیدروژن فسفات (pH = ۸) حاوی سوپسترای OPD با غلظت ۲ mM و مقدار ۸۰ μL آب اکسیژنه (۳۰٪) اضافه شد. سپس برای محاسبه‌ی سرعت اولیه‌ی واکنش، تغییرات جذب محلول به مدت ۱۵ دقیقه از شروع واکنش با فاصله زمانی یک دقیقه در بیشینه طول موج ۴۲۸ nm و با استفاده از طیف سنج UV-vis ثبت شد. در شکل ۳ الف نمودار تغییرات سرعت اولیه در غلظت‌های مختلف سوپسترای OPD رسم شده است که نشان می‌دهد تغییرات سرعت اولیه‌ی واکنش (V_0) بر حسب غلظت OPD از معادله‌ی میکائیلیس-منتن تبعیت می‌نماید. در این معادله، K_m وابستگی بین سوپسترا و کاتالیزور را نشان می‌دهد؛ در حالی که V_m نشان‌دهنده‌ی بیشینه‌ی سرعت واکنش در فعالیت کاتالیزوری است. پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} مربوط به فعالیت شبه پراکسیدازی ZIF-67 با توجه به معادله‌ی خط درجه اول به دست آمده از نمودار لاین ویور-بورک در شکل ۳ ب محاسبه شدند و به ترتیب ۱۶/۱۸ mM و ۱۶/۱۸ (M/s) و $15/62 \times 10^{-6}$ به دست آمد.



شکل ۳. الف) نمودار سرعت اولیه واکنش برحسب غلظت OPD، ب) نمودار لاین ویور- بورک

جدول ۱ پارامترهای سینتیکی تعدادی از ترکیباتی که پیش از این به عنوان نانوزیم پراکسیدازی در اکسایش سوبسترای OPD معرفی شده اند را نشان می دهد. به طور کلی هر چه K_m کوچکتر باشد، برهم کنش بین سوبسترا و کاتالیزور بیشتر و قوی تر است [۴۵]. همانطور که مشاهده می شود نانوزیم ZIF-67 نسبت به نانوفریت های جایگزین شده $MnFe_2O_4$ ، $CoFe_2O_4$ و $ZnFe_2O_4$ [۴۶] مقدار K_m کوچکتر و در نتیجه وابستگی بیشتری به سوبسترای OPD را نشان می دهد، از طرفی نسبت به نانوساختارهای گزارش شده در جدول ۱ و نیز آنزیم طبیعی پراکسیداز ترب کوهی (HRP) دارای سرعت بالاتری برای فعالیت پراکسیدازی است.

جدول ۱. مقایسه ی پارامترهای سینتیکی کاتالیزورهای مختلف در اکسایش سوبسترای OPD

کاتالیزور	سوبسترا	K_m (mM)	V_{max} (M/s)	منابع
$CoFe_2O_4$	OPD	$32/7$	$7/8 \times 10^{-10}$	[۴۶]
$ZnFe_2O_4$	OPD	$22/6$	0.82×10^{-10}	[۴۶]
$MnFe_2O_4$	OPD	$27/5$	1.04×10^{-10}	[۴۶]
Co_3O_4	OPD	0.61	0.332×10^{-10}	[۴۷]
HRP	OPD	0.25	0.31×10^{-10}	[۴۱]
ZIF-67	OPD	$16/18$	$15/62 \times 10^{-10}$	این مطالعه

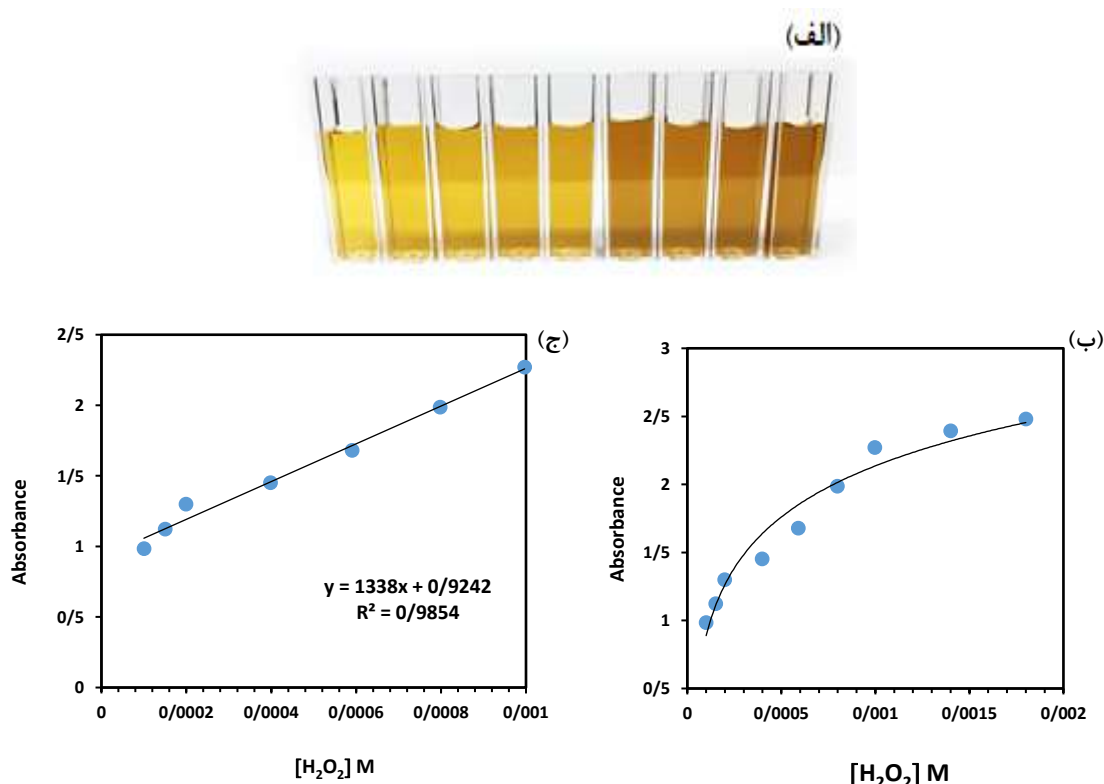
* به صورت $1.86 \mu M/min$ گزارش شده است.

بررسی فعالیت شبه پراکسیدازی کاتالیزور سنتز شده در حضور آسکوربیک اسید نشان داد که نانو ساختار ZIF-67 می تواند OPD را به وسیله آب اکسیژنه، علی رغم استفاده از آسکوربیک اسید به عنوان یک مهار کننده رادیکال، اکسید کند. این مشاهده نشان می دهد که مکانیسم فعالیت شبه پراکسیدازی این ترکیب احتمالاً با واکنش های شبه فنتونی که مربوط به تشکیل رادیکال های آزاد از H_2O_2 است، متفاوت است. به نظر می رسد نانوکاتالیزور ZIF-67 به عنوان یک واسطه عمل می کنند و

فرآیند انتقال الکترون را از OPD جذب شده بر روی سطح به H_2O_2 تسهیل می نمایند. پیش از این مکانیسم مشابهی برای فعالیت شبه آنزیمی نانوکاتالیزورهای مبتنی بر کبالت مانند Co_3O_4 و $NiCo_2O_4$ پیشنهاد شده بود [۴۹ و ۴۸].

۳-۵- شناسایی آب اکسیژنه با استفاده از فعالیت شبه پراکسیدازی ZIF-67

با توجه به وابستگی فعالیت کاتالیزور ZIF-67 به غلظت H_2O_2 ، می توان از فعالیت شبه پراکسیدازی این نانوزیم برای طراحی یک حسگر رنگ سنجی برای تشخیص آب اکسیژنه استفاده نمود. بدین منظور، با تغییر دادن غلظت H_2O_2 و ثابت نگه داشتن سایر پارامترهای واکنش، تغییرات جذب به مدت ۳۰ دقیقه از شروع واکنش در بیشینه طول موج ۴۲۸ نانومتر با استفاده از طیف سنج UV-vis ثبت شد. همانطور که در شکل ۴الف نشان داده شده است از آنجایی که اکسایش سوبسترای OPD با تغییر رنگ محلول از بی رنگ به زرد همراه است، با افزایش غلظت آب اکسیژنه، سرعت فعالیت شبه پراکسیدازی افزایش یافته و محلول تغییر رنگ بیشتری نشان می دهد که با چشم غیر مسلح قابل شناسایی است. با توجه به نمودارهای رسم شده در شکل ۴ب و ۴ج ناحیه ی خطی تشخیص بین 10^{-4} M تا $10^{-4} \times 9/96$ می باشد. لازم به ذکر است که ارزیابی عملکرد روش در نمونه های حقیقی با ماتریس پیچیده (مانند پساب های صنعتی یا نمونه های بیولوژیکی) نیازمند مطالعات تکمیلی است که می تواند در تحقیقات آینده انجام پذیرد.



شکل ۴. الف) تغییر رنگ محلول با افزایش غلظت H_2O_2 از چپ به راست، ب) منحنی جذب در غلظت های مختلف آب اکسیژنه، ج) منحنی واسنجی شناسایی آب اکسیژنه در حضور نانوزیم ZIF-67 (در این بررسی، مقدار کاتالیزور (۱ mg) و غلظت سوبسترا (۲ mM) ثابت بوده و حجم های مشخصی از آب اکسیژنه ۳۰٪ به محلول واکنش اضافه شد.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، چارچوب ایمیدازولات زئولیتی ZIF-67 با موفقیت با استفاده از طریق یک روش سنتز کارآمد، سریع و کم هزینه در دمای اتاق تهیه شد که بازده محصول مناسبی را ارائه می داد. مشخصه یابی این نانوماده با بهره گیری از تکنیک های مختلف طیف سنجی انجام پذیرفت. ارزیابی سینتیک واکنش اکسایش سوبسترای OPD در شرایط بهینه نشان داد که فعالیت شبه پراکسیدازی ZIF-67 از سینتیک میکائیلیس-منتن تبعیت می کند. بر مبنای این ویژگی های کاتالیزوری، یک حسگر رنگ سنجی ساده، سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص H_2O_2 در دمای اتاق طراحی و توسعه یافت. این سیستم حسگری دارای محدوده خطی بین 10^{-4} M تا 9.96×10^{-4} M برای شناسایی H_2O_2 است. با توجه به فعالیت شبه پراکسیدازی این نانوساختار به عنوان یک مدل آنزیمی در اکسایش سوبسترای OPD، امکان استفاده از آن ها به عنوان حسگر رنگ سنجی برای شناسایی طیف وسیعی از آنالیت ها از جمله اسیدهای آمینه، فلزات سنگین و سایر موارد نیز وجود دارد.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه گیلان برای حمایت از این پروژه پژوهشی ابراز می دارند.

۶- فهرست منابع و مآخذ

- [1] Kaushal, J., Singh, G. & Arya, S.K. (2022). *Emerging trends and future prospective in enzyme technology*. In Kuddus, M., Aguilar, C. N. (Eds.), *Value-addition in food products and processing through enzyme technology* (491–503). Academic Press.
- [2] Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S. & Kaur, B., (2021). Enzyme engineering: current trends and future perspectives. *Food Reviews International*, 37(2), 121-154.
- [3] He, J., Zhang, Y., Zhang, X., & Huang, Y. (2018). Highly efficient Fenton and enzyme-mimetic activities of NH₂-MIL-88B (Fe) metal organic framework for methylene blue degradation. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.
- [4] Kuah, E., Toh, S., Yee, J., Ma, Q., & Gao, Z. (2016). Enzyme mimics: advances and applications. *Chemistry—A European Journal*, 22(25), 8404-8430.
- [5] Hoarau, M., Hureau, C., Gras, E., & Faller, P. (2016). Coordination complexes and biomolecules: A wise wedding for catalysis upgrade. *Coordination Chemistry Reviews*, 308, 445-459.
- [6] Shin, H. Y., Park, T. J., & Kim, M. I. (2015). Recent research trends and future prospects in nanozymes. *Journal of Nanomaterials*, 2015(1), 756278-756288.
- [7] Gawande, M. B., Goswami, A., Felpin, F. X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R., ... & Varma, R. S. (2016). Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. *Chemical reviews*, 116(6), 3722-3811.
- [8] Wei, H & Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(14), 6060-6093.

- [9] Wu, J., Li, S., & Wei, H. (2018). Integrated nanozymes: facile preparation and biomedical applications. *Chemical Communications*, 54(50), 6520-6530.
- [10] Xie, J., Zhang, X., Wang, H., Zheng, H., & Huang, Y. (2012). Analytical and environmental applications of nanoparticles as enzyme mimetics. *Trends in Analytical Chemistry*, 39, 114-129.
- [11] Gawande, M. B., Goswami, A., Felpin, F. X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R., ... & Varma, R. S. (2016). Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. *Chemical reviews*, 116(6), 3722-3811.
- [12] Kim, M. Y., & Kim, J. (2017). Chitosan microgels embedded with catalase nanozyme-loaded mesocellular silica foam for glucose-responsive drug delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(4), 572-578.
- [13] Champe, P. C., Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2005). *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- [14] Sellami, K., Couvert, A., Nasrallah, N., Maachi, R., Abouseoud, M. & Amrane, A., (2022). Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. *Science of the Total Environment*, 806, 150500.
- [15] Peng, Y., Wang, Z., Liu, W., Zhang, H., Zuo, W., Tang, H., ... & Wang, B. (2015). Size-and shape-dependent peroxidase-like catalytic activity of MnFe_2O_4 nanoparticles and their applications in highly efficient colorimetric detection of target cancer cells. *Dalton Transactions*, 44(28), 12871-12877.
- [16] Zhong, C., He, M., Lou, K., & Gao, F. (2017). *The application, neurotoxicity, and related mechanism of silica nanoparticles*. In *Neurotoxicity of Nanomaterials and Nanomedicine*. Academic Press.
- [17] Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., Wang, T., Feng, J., Yang, D., Perrett, S. & Yan, X., (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 2(9), 577-583.
- [18] Singh, S., Tripathi, P., Kumar, N., & Nara, S. (2017). Colorimetric sensing of malathion using palladium-gold bimetallic nanozyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 280-286.
- [19] Manea, F., Houillon, F. B., Pasquato, L., & Scrimin, P. (2004). Nanozymes: Gold-nanoparticle-based transphosphorylation catalysts. *Angewandte Chemie*, 116(45), 6291-6295.
- [20] Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., ... & Yan, X. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 2(9), 577-583.
- [21] Luo, W., Li, Y. S., Yuan, J., Zhu, L., Liu, Z., Tang, H., & Liu, S. (2010). Ultrasensitive fluorometric determination of hydrogen peroxide and glucose by using multiferroic BiFeO_3 nanoparticles as a catalyst. *Talanta*, 81(3), 901-907.
- [22] Lin, T., Zhong, L., Guo, L., Fu, F., & Chen, G. (2014). Seeing diabetes: visual detection of glucose based on the intrinsic peroxidase-like activity of MoS_2 nanosheets. *Nanoscale*, 6(20), 11856-11862.

- [23] Dai, Z., Liu, S., Bao, J., & Ju, H. (2009). Nanostructured FeS as a mimic peroxidase for biocatalysis and biosensing. *Chemistry–A European Journal*, 15(17), 4321-4326.
- [24] Song, Y., Qu, K., Zhao, C., Ren, J., & Qu, X. (2010). Graphene oxide: intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection. *Advanced Materials*, 22(19), 2206-2210.
- [25] Zhao, R., Zhao, X., & Gao, X. (2015). Molecular-level insights into intrinsic peroxidase-like activity of nanocarbon oxides. *Chemistry: A European Journal*, 21, 960-964.
- [26] Freund, R., Zaremba, O., Arnauts, G., Ameloot, R., Skorupskii, G., Dincă, M., Bavykina, A., Gascon, J., Ejsmont, A., Goscińska, J. & Kalmutzki, M., (2021). The current status of MOF and COF applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(45), 23975-24001.
- [27] Nikseresht, A., Shokri, N., Mohammadi, M., Afzalnia, A., Nosratollahi, S. & Rostamizadeh, S., (2024). TMU-16-NH₂: A metal–organic framework as an efficient, green, and heterogeneous catalyst for the Michael addition annulations for the synthesis of a new series of 2, 4-Diphenylpyrido [4, 3-d] pyrimidines. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 44(6), 3771-3786.41.
- [28] Nikseresht, A., Ghoochi, F. & Mohammadi, M., (2024). Postsynthetic modification of amine-functionalized MIL-101 (cr) metal–organic frameworks with an EDTA–Zn (II) complex as an effective heterogeneous catalyst for Hantzsch synthesis of polyhydroquinolines. *ACS omega*, 9(26), 28114-28128.
- [29] Nikseresht, A., Mehravar, R. & Mohammadi, M., (2024). RSM optimization of Friedel–Crafts C-acylation of para-fluorophenol over the catalysis of phosphomolybdic acid encapsulated in MIL-53 (Fe) metal organic frameworks. *Nanoscale Advances*, 6(12), 3158-3168.
- [30] Piroozi, S., Tanhaei, B., Ayati, A., Niknam Shahrak, ., & Saei Moghadam, M. (2022). Investigation of photo catalytic properties of ZIF-8 emitted based on titanium dioxide nano tubes in removal of aqueous pollutants, *Applied Chemistry Today*, 17(62), 99-114. (in persion)
- [31] Jacobs, P. A., Flanigen, E. M., Jansen, J. C., & van Bekkum, H. (2001). *Introduction to zeolite science and practice*. Elsevier.
- [32] Azadi, S., Zare-Dorabei, R., Hamidi, F., & Safarifard, V. (2020). Synthesis of GQD@ZIF-8 nano hybrids and its application as a lead optical sensor, *Applied Chemistry Today*, 15(55), 327-342. (in persion)
- [33] Furukawa, H., Y. (2009). Storage of hydrogen, methane and carbon dioxide in highly porous covalent organic frameworks for clean energy applications. *Journal of the American Chemical Society*, 131(25), 8875-8883.
- [34] Dhakshinamoorthy, A., Alvaro, M., Hwang, Y. K., Seo, Y. K., Corma, A., & Garcia, H. (2011). Intracrystalline diffusion in Metal Organic Framework during heterogeneous catalysis: Influence of particle size on the activity of MIL-100 (Fe) for oxidation reactions. *Dalton Transactions*, 40(40), 10719-10724.

- [35] Maruyama, W., Dostert, P., Matsubara, K., & Naoi, M. (1995). N-methyl (R) salsolinol produces hydroxyl radicals: involvement to neurotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(1), 67-75.
- [36] Hu, A. L., Liu, Y. H., Deng, H. H., Hong, G. L., Liu, A. L., Lin, X. H., ... & Chen, W. (2014). Fluorescent hydrogen peroxide sensor based on cupric oxide nanoparticles and its application for glucose and l-lactate detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 374-378.
- [37] Niu, X., Lan, M., Zhao, H., & Chen, C. (2013). Highly sensitive and selective nonenzymatic detection of glucose using three-dimensional porous nickel nanostructures. *Analytical chemistry*, 85(7), 3561-3569.
- [38] Deng, X., Fang, Y., Lin, S., Cheng, Q., Liu, Q., & Zhang, X. (2017). Porphyrin-based porous organic frameworks as a biomimetic catalyst for highly efficient colorimetric immunoassay. *ACS applied materials & interfaces*, 9(4), 3514-3523.
- [39] Lu, J., Zhang, H., Li, S., Guo, S., Shen, L., Zhou, T., ... & Zhang, Y. (2020). Oxygen-vacancy-enhanced peroxidase-like activity of reduced Co₃O₄ nanocomposites for the colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Inorganic chemistry*, 59(5), 3152-3159.
- [40] Ebrahimi, A., & Mansournia, M. (2017). Cost-effective fabrication of thermal-and chemical-stable ZIF-9 nanocrystals at ammonia atmosphere. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 111, 12-17.
- [41] Aumiller Jr, W.M., Davis, B.W., Hatzakis, E. & Keating, C.D. (2014). Interactions of macromolecular crowding agents and cosolutes with small-molecule substrates: effect on horseradish peroxidase activity with two different substrates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(36), 10624-10632.
- [42] Qin, J., Wang, S. & Wang, X., 2017. Visible-light reduction CO₂ with dodecahedral zeolitic imidazolate framework ZIF-67 as an efficient co-catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 209, 476-482.
- [43] Farid, S., Qiu, W., Zhao, J., Song, X., Mao, Q., Ren, S. & Hao, C., 2020. Improved OER performance of Co₃O₄/N-CNTs derived from newly designed ZIF-67/PPy NTs composite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 858, 113768-113778.
- [44] Zhou, K., Mousavi, B., Luo, Z., Phatanasri, S., Chaemchuen, S. & Verpoort, F., 2017. Characterization and properties of Zn/Co zeolitic imidazolate frameworks vs. ZIF-8 and ZIF-67. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(3), 952-957.
- [45] Samoshina, N.M. & Samoshin, V.V., 2005. The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidases. *Enzyme and microbial technology*, 36(2-3), 239-251.
- [46] Vetr, F., Moradi-Shoeili, Z., & Özkar, S. (2018). Oxidation of o-phenylenediamine to 2, 3-diaminophenazine in the presence of cubic ferrites MFe₂O₄ (M= Mn, Co, Ni, Zn) and the application in colorimetric detection of H₂O₂. *Applied Organometallic Chemistry*, 32(9), 4465-4474.

- [47] Jia, H., Yang, D., Han, X., Cai, J., Liu, H., & He, W. (2016). Peroxidase-like activity of the Co_3O_4 nanoparticles used for biodetection and evaluation of antioxidant behavior. *Nanoscale*, 8(11), 5938-5945.
- [48] Dong, J., Song, L., Yin, J. J., He, W., Wu, Y., Gu, N., & Zhang, Y. (2014). Co_3O_4 nanoparticles with multi-enzyme activities and their application in immunohistochemical assay. *ACS applied materials & interfaces*, 6(3), 1959-1970.
- [46] Huang, W., Lin, T., Cao, Y., Lai, X., Peng, J., & Tu, J. (2017). Hierarchical NiCo_2O_4 hollow sphere as a peroxidase mimetic for colorimetric detection of H_2O_2 and glucose. *Sensors*, 17(1), 217.

