



استفاده از نانوذرات نقره پوشش داده شده با تریس - دی تیوکاربامات به عنوان حس گر رنگ سنجی گزینش پذیر برای تشخیص ملامین در شیر

فضه آریانسب^{۱*}، شهلا مظفری^۲، ژولیت اردوخانیان^۲ و سحر ربیعی^۲

۱- گروه شیمی، پژوهشکده شیمی و پتروشیمی، پژوهشگاه استاندارد، کرج
۲- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران شرق، تهران

چکیده: هدف از این پژوهش، توسعه روشی ارزان، گزینشی، حساس و کاربردی برای تشخیص ملامین در شیر است. از واکنش ۲-آمینو-۲-هیدروکسی-پروپان-۱، ۳-دی آل (باز تریس) به عنوان باز ارزان و در دسترس، با کربن دی سولفید، تریس-دی-تیوکاربامات تهیه می شود که به دلیل وجود گروه عاملی دی تیوکاربامات همراه با گروه های عاملی هیدروکسیل، تمایل زیادی به برهم کنش با ملامین، دارد. برهم کنش الکترون دهنده-الکترون پذیرنده بین ملامین و تریس-دی تیوکاربامات در سطح نانوذرات نقره، منجر به انباشتگی نانوذرات نقره شده که این پدیده باعث جابجایی طول موج جذبی نانوذرات به طول موج های بالاتر و تغییر رنگ محلول از زرد روشن به قرمز می شود. این تغییر رنگ با استفاده از طیف سنجی فرابنفش-مرئی (Vis-UV) ثبت و اندازه گیری شده است. از این روش می توان برای اندازه گیری سریع مقدار ملامین در نمونه های شیر پاستوریزه استفاده کرد. حد تشخیص روش $0.7 \mu\text{M}$ است و حس گر نسبت به ملامین کامل گزینش پذیر عمل می کند. محدوده خطی بودن اندازه گیری روش ارائه شده بین $2 \mu\text{M}$ تا $12 \mu\text{M}$ است که با بسیاری از روش های گزارش شده مشابه، قابل رقابت است.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، لیگند دی تیوکاربامات، تشخیص رنگ سنجی، حس گر گزینشی، ملامین در شیر.

*f_aryanasab@standard.ac.ir

نیترژن آنها را افزایش و هزینه های تولید خود را کاهش دهند. در سال ۱۹۵۸، ملامین به عنوان منبع نیترژن غیرپروتئینی^۳ (NPN) به خوراک گاو افزوده شد، اما به دلیل اینکه این ترکیب در بدن نشخوارکنندگان به طور کامل آبکافت نمی شود، استفاده از آن در سال ۱۹۷۸ متوقف شد. هر چند ملامین سمیت کمی دارد اما می تواند با ترکیباتی مانند سیانوریک اسید تشکیل ترکیب نامحلول "ملامین سیانورات"^۴ دهد و منجر به سنگ کلیه، نارسایی کلیوی و حتی مرگ انسان شود [۱-۳].

۱- مقدمه

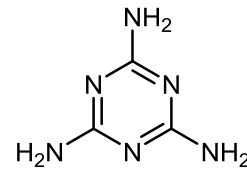
ملامین^۱ (شکل ۱) ترکیبی سنتزی است که به صورت پودر سفید رنگ موجود است و برای نخستین بار در سال ۱۸۳۴ توسط جوستاس فون لیبیک^۲، دانشمند آلمانی سنتز شد. به دلیل محتوی نیترژن بالا (۶۶٪ جرمی)، و از طرفی، به دلیل قیمت به نسبت پایین، تولیدکنندگان متقلب، ملامین را عمدتاً به غذا و فرآورده های غذایی (مانند شیر، شیر خشک، ماست منجمد، بیسکویت، آبنبات، نوشیدنی های کافئین دار و غذای حیوانات) اضافه می کنند تا سطح

^۳ - Non-Protein Nitrogen

^۴ - Melamine Cyanurate

^۱ - Melamine (1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine)

^۲ - Justus von Liebig



شکل ۱- ساختار ملامین

به طور کلی، در بسیاری از کشورها حد استاندارد برای ملامین در شیر خشک ۱ ppm و در سایر محصولات شیری بزرگسالان ۲/۵ ppm تعیین شده است [۴]. با این وجود، غلظت ملامین در محصولات شیرخشک چینی که در آن تقلب صورت گرفته بود و موجب شیوع سنگ کلیه در هزاران نوزاد در سرتاسر چین، که منجر به بستری شدن ۵۴۰۰۰ نوزاد و کودک خردسال و مرگ حداقل ۶ کودک شد، تا ۳۳۰۰ ppm گزارش شده بود [۵].

آزمون‌های استاندارد اندازه‌گیری میزان پروتئین نظیر کجدال^۵ و دیومس^۶، مقدار پروتئین مواد غذایی را با اندازه‌گیری مقدار کل نیتروژن موجود تخمین می‌زنند، بنابراین، با افزودن ترکیبات غنی از نیتروژن نظیر ملامین به مواد غذایی، این آزمون‌ها قادر نیستند نیتروژن منابع پروتئینی را از غیرپروتئینی تشخیص دهند. از این-رو، انگیزه اقتصادی برای افزودن ملامین در مواد غذایی ایجاد می‌شود. با توجه به توضیحات بالا، توسعه روش‌های سریع، در دسترس و به‌صرفه برای تشخیص ملامین در مواد متفاوت از اهمیت بسیاری برخوردار است.

تاکنون روش‌های متفاوتی برای آماده‌سازی نمونه و تعیین آلودگی ملامین در محصولاتی که روزانه مصرف می‌شوند، منتشر شده است. این روش‌ها بیشتر بر مبنای روش‌های تجزیه دستگاهی مدرن، مانند الکتروفورز موئین (CE)، روش‌های کروماتوگرافی، حس‌گرهای پلاسمای دمای پایین، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)، طیف‌سنجی ارتعاشی و آنالیز لومینسانس شیمیایی (CL) و روش‌های عیارسنجی ایمنی^۷ هستند [۶-۸]. در سال‌های اخیر، روش‌های تشخیص جدید، مانند سنسورهای بر پایه بسپارهای قالب مولکولی^۸ (MIP) و سنسورهای بر پایه نانوذرات، نیز توسعه یافته‌اند [۹ و ۱۰].

^۵ - Kjeldahl

^۶ - Dumas

^۷ - Immunoassay

^۸ - Molecule Imprinted Polymers

هر کدام از این روش‌های متفاوت، مزایا و معایب خاص خود را دارند و الزامات آماده‌سازی نمونه برای نمونه‌های پیچیده در هر کدام از این روش‌ها ممکن است متفاوت باشد. هر چند که هر کدام از این روش‌ها حساسیت بالایی دارند، با این وجود، بسیاری از روش‌های دستگاهی زمان‌بر هستند و نیاز به تجهیزات به نسبت گران دارند و به راحتی برای تعیین میدانی قابل تنظیم نیستند. بنابراین تحقیقات بسیاری برای توسعه روش‌های تجزیه-ای که هم ساده باشند و هم در بررسی‌های میدانی به راحتی به-کار روند، صورت گرفته تا حساسیت بهتری در تشخیص مقادیر جزئی ملامین حاصل آید.

با توسعه فناوری نانو، فرصت‌های بیشتری برای کاربرد نانومواد در سنجش‌های شیمیایی فراهم شده است، به‌ویژه نانوذرات طلا (Au NPs) و نانوذرات نقره (Ag NPs) بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۱-۱۳]. به تازگی روش‌های تشخیص رنگ‌سنجی بر پایه نانوذرات فلزی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. در اغلب این روش‌ها از نانوذرات طلا استفاده می‌شود. نانوذرات طلا به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فردی که دارند؛ از جمله سهولت آماده‌سازی، زیست‌سازگار بودن و پایداری، بیشتر از سایر نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۴-۱۶]. از نقطه‌نظر سنجش رنگ با چشم، نانوذرات نقره نیز انتخاب خوبی برای این منظور هستند. از آنجا که نانوذرات نقره ضریب خاموشی بالاتری نسبت به نانوذرات طلا، با سایز یکسان، دارند و ارزان‌تر نیز هستند، برای سنجش-های رنگ‌سنجی از مزیت بالاتری برخوردار هستند [۱۷]. روش-های سنجش رنگ‌سنجی با استفاده از نانوذرات نقره بر مبنای این حقیقت استوار هستند که محلول حاوی نانوذرات نقره پراکنده^۹ زرد رنگ است، در حالی که محلول حاوی نانوذرات نقره انباشته^{۱۰} قرمز-قهوه‌ای (یا سبز تیره) است. با این وجود، نسبت به نانوذرات طلا، تاکنون توجه کمی به استفاده از نانوذرات نقره برای تشخیص‌های رنگ‌سنجی شده است، زیرا احتمال می‌رود که سطح این نانوذرات بیشتر متحمل اکسایش شوند. از این نظر، عامل‌دار کردن سطح نقش حیاتی در افزایش پایداری و کاربرد تجزیه‌ای نانوذرات نقره ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر، نانوذرات پایدار نقره، که با لیگندهای مناسب عامل‌دار شده‌اند، به‌عنوان حس‌گر حساس و انتخابی برای تشخیص رنگ‌سنجی DNA [

^۹ - Dispersed

^{۱۰} - Aggregated

[۱۸]، آمینو اسیدها [۱۹]، آفت‌کش‌ها [۲۰] و یون‌های فلزی متفاوت [۲۱ و ۲۲] استفاده شده‌اند، اما گزارش‌های اندکی مبنی بر استفاده از آنها برای تشخیص ملامین وجود دارد [۲۳-۲۵]. در این پژوهش، لیگند دی‌تیوکاربامات با استفاده از آمین ارزان قیمت و در دسترس تریس^{۱۱} به سهولت سنتز شده و برای پوشش‌دهی و عامل‌دار کردن نانوذرات نقره استفاده شده است. سپس، از نانوذرات نقره عامل‌دار شده با این لیگند به‌عنوان حس-گر برای تشخیص رنگ‌سنجی سریع و انتخابی مقادیر ناچیز ملامین در نمونه‌های شیر استفاده شده است. گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از لیگندهای دی‌تیوکاربامات همراه با نانوذرات نقره برای تشخیص رنگ‌سنجی فلزات سنگین و سایر آلاینده‌ها وجود دارد [۳۲-۲۶]، اما تاکنون از این نوع لیگندها برای تشخیص رنگ‌سنجی ملامین استفاده نشده است. از طرفی، در این گزارش‌ها اغلب از ترکیبات پیچیده و به نسبت گران، مانند ۵-سولفوآترانیلیک اسید، آزا-کراون اترها، بتا-آلانین و پارا-نیترو آنیلین، برای سنتز لیگندهای دی‌تیوکاربامات استفاده شده است. استفاده از آمین ارزان و در دسترس تریس برای سنتز لیگند دی-تیوکاربامات برای تشخیص رنگ‌سنجی ملامین با استفاده از نانوذرات نقره، پژوهش حاضر را از سایر پژوهش‌های گزارش شده، متمایز می‌کند.

روش ارائه شده در این پژوهش، روشی سریع و آسان برای تشخیص مقادیر بسیار کمتر از ۱ ppm در نمونه‌های شیر است. همچنین نانوذرات سنتز شده می‌توانند تا حد بسیار زیادی انتخابی عمل کنند. با این روش می‌توان به‌طور چشمی و در مدت زمان نسبتاً کوتاهی وجود ملامین در نمونه‌های شیر را تشخیص داد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و واکنشگرها

در تمام آزمایش‌ها از آب یون‌زدایی شده استفاده شد. نقره نیترات ($AgNO_3$)، کربن دی‌سولفید (CS_2) و سدیم بورهیدرید ($NaBH_4$) تولیدی شرکت Merck مورد استفاده قرار گرفتند. ملامین و تریس شرکت Sigma Aldrich مورد استفاده قرار گرفتند. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص تجزیه‌ای

¹¹ - Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)

بوده و بدون خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی اثر pH از بافر یونیورسال استفاده شد. تمامی ظروف شیشه‌ای قبل از استفاده در محلول نیتریک اسید ۱۰٪ قرار داده شده و سپس، با آب یون‌زدایی شده به خوبی شستشو داده شدند.

۲-۲- دستگاه‌ها

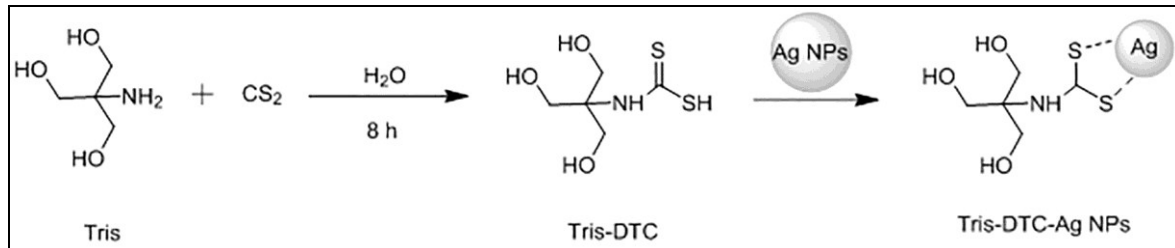
برای ثبت طیف‌های جذبی و اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در گستره ۲۵۰ نانومتر تا ۷۰۰ نانومتر از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش-مرئی (UV-Vis) دوپرتویی ساخت شرکت PerkinElmer مدل Lambda-35 استفاده شد. دستگاه اولتراسونیک با قابلیت تنظیم دما و زمان، ساخت شرکت سونیکیت، دستگاه سانتریفیوژ ساخت شرکت D.T.A.P INSTRUMENT با قدرت ۷۰۰۰ دور بر دقیقه، دستگاه pH متر، مدل MP 225، ساخت شرکت METTLER TOLEDO سوئیس مورد استفاده قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با دستگاه شرکت Zeiss آلمان، مدل EM 900 تهیه شدند. الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) با استفاده از دستگاه Philips مدل PW3710 (تابش $K\alpha$ عنصر کبالت) ثبت شد.

۲-۳- سنتز نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی‌تیوکاربامات

برای تهیه نانوذرات نقره از محلول سدیم بورهیدرید به‌عنوان عامل کاهنده استفاده شد. برای تامین یون نقره از نقره نیترات استفاده شد و برای پایدار کردن نانوذرات نقره تهیه شده، تری-سدیم سیترات به‌کار رفت. تریس-دی‌تیوکاربامات با روش معمول سنتز دی‌تیوکاربامات‌ها، که شامل واکنش آمین با کربن دی-سولفید است، تهیه شد (شکل ۲) [۳۳]. به‌طور خلاصه، به ۱ میلی‌لیتر از محلول تریس با غلظت ۱ mM، ۰٫۵ میلی‌لیتر محلول اتانولی CS_2 با غلظت ۱٫۵ mM افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق هم‌خورد. سپس، ۱ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات ۰٫۲ M و ۰٫۲ میلی‌لیتر محلول تری‌سدیم سیترات ۱ mM به محلول تریس-دی‌تیوکاربامات تهیه شده، افزوده شد. مخلوط با آب مقطر تا حجم ۵۰ میلی‌لیتر رقیق شد و به مدت ۵ دقیقه روی هم‌زن هم‌زده شد. ظرف واکنش به خوبی با فویل آلومینیم پوشش داده شد. هم‌زمان با بهم خوردن محتویات ظرف واکنش، مقدار ۱۲ میلی‌گرم سدیم بورهیدرید به مخلوط افزوده

تیره و در یخچال نگهداری و برای تعیین‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه طیف جذبی نانوذرات نقره خالص، این نانوذرات مطابق روش ذکر شده بالا و بدون حضور تریس و CS_2 سنتز شدند.

شد و سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق روی همزن بهم زده شد. رنگ محلول به تدریج از بی‌رنگ به زرد روشن تغییر کرد. محلول نهایی (tris-DTC-Ag NPs) با آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد. غلظت نانوذرات نقره در این محلول برابر با ۰٫۲ mM است. محلول حاوی نانوذرات نقره در ظرف شیشه‌ای



شکل ۲: شمای واکنش تریس با کربن دی‌سولفید و تشکیل تریس-دی‌تیوکاربامات و استفاده از آن به‌عنوان لیگند برای پوشش‌دهی نانوذرات نقره

۲-۴- آماده‌سازی نمونه شیر

برای خارج کردن پروتئین از نمونه شیر خام، به ۱۵ میلی‌لیتر شیر، ۲۲٫۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. به محلول حاصل ۱۰ میلی-لیتر کلروفرم حاوی ۱ گرم تری‌کلرو استیک اسید افزوده شد. محلول حاصل ۱ دقیقه بهم زده شد و سپس ۱۵ دقیقه در دستگاه فراصوت قرار داده شد. سپس، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. به منظور جداسازی یون کلسیم، به مخلوط ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم بی‌کربنات ۱ M افزوده شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. مخلوط حاصل با کاغذ صافی صاف شد و زیرصافی به‌عنوان نمونه شیر مورد استفاده قرار گرفت.

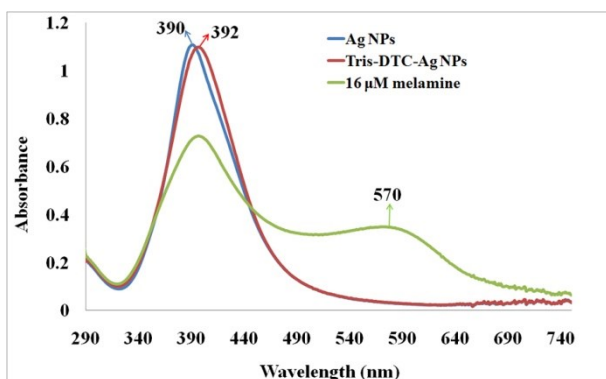
۲-۵- مطالعات طیف‌سنجی و تشخیص ملامین

به‌منظور بررسی کارایی نانوذرات نقره پوشیده شده با دی-تیوکاربامات برای تشخیص رنگ‌سنجی ملامین، ۱ میلی‌لیتر محلول ملامین با غلظت‌های متفاوت (از ۰٫۱۶ μM تا ۱۶ μM) به ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی tris-DTC Ag NPs (با غلظت نقره نیترات برابر با ۰٫۲ mM) افزوده شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط هم‌خورد و سپس، طیف جذبی محلول‌ها با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis در گستره ۲۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر ثبت شد.

۳- نتایج و بحث

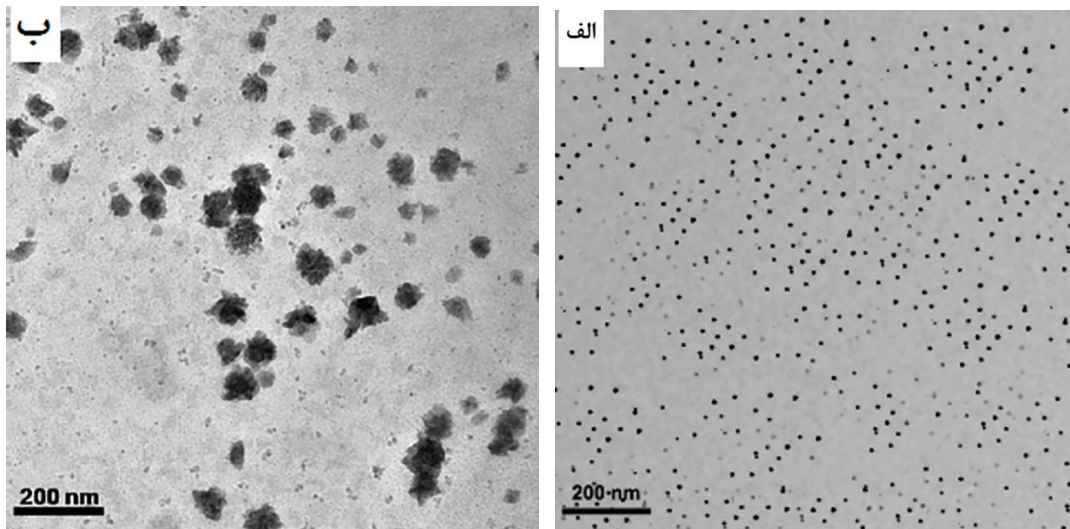
۳-۱- مشخصه‌یابی نانوذرات سنتز شده

پس از سنتز نانوذرات به روش توضیح داده شده در بند ۲-۳، از طیف‌سنجی Vis-UV، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) برای شناسایی نانوذرات سنتز شده استفاده شد. نانوذرات نقره کروی شکل جذب قابل توجهی در ۳۹۰ نانومتر دارند که از مشخصه‌های بارز این نوع نانوذرات است. جذب نانوذرات سنتز شده در حضور عامل پایدارکننده سیترات و لیگند دی‌تیوکاربامات اندکی افزایش یافته و به ۳۹۲ نانومتر می‌رسد. با افزودن ملامین به محلول حاوی نانوذرات نقره، شدت جذب در طول موج ۳۹۲ نانومتر کاهش یافته و پیک جذبی در طول موج ۵۷۰ نانومتر، که مربوط به کمپلکس نانوذرات انباشته و ملامین است، ظاهر می‌شود. این پدیده در طیف جذبی ارائه شده در شکل ۳ به وضوح مشاهده می‌شود.



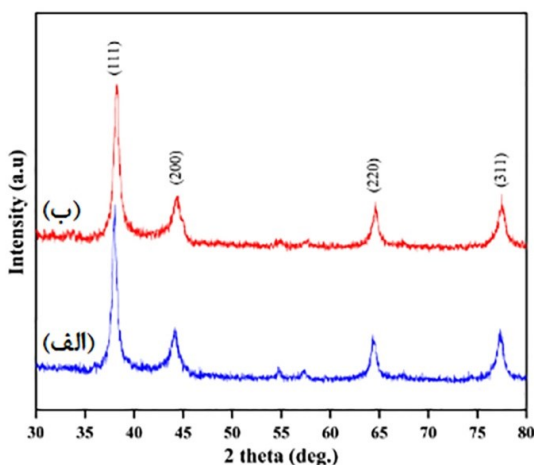
شکل ۳: طیف UV-Vis مربوط به محلول نانوذرات نقره، NPs Ag-DTC-risT (با غلظت نقره برابر با ۰٫۲ mM) در غیاب و در حضور ملامین (با غلظت ۱۶ μM)

از افزودن ملامین، به دلیل برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی بین ملامین و لیگند دی‌تیوکاربامات، نانوذرات به صورت انباشته در آمده‌اند. همچنین، اندازه متوسط نانوذرات سنتز شده حدود ۱۰ نانومتر بودند.



شکل ۴: تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده: (الف) قبل از افزودن ملامین و (ب) بعد از افزودن ملامین

هیچ تغییری نشان نداد. همچنین، نانوذرات تهیه شده در محدوده pH از ۳ تا ۱۱ کامل پایدار بودند.



شکل ۵: الگوی XRD: (الف) نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی‌تیوکاربامات و (ب) نانوذرات نقره کمپلکس شده با ملامین

۳-۲- بررسی سازوکار حس گر در تشخیص ملامین به روش رنگ‌سنجی

با بررسی‌های به عمل آمده مشخص شد که tris-DTC-Ag NPs نسبت به وجود ملامین در محلول بسیار حساس هستند. هنگامی که ملامین به محلول حاوی tris-DTC-Ag NPs

تصویر TEM مربوط به نانوذرات نقره پوشش داده شده با دی-تیوکاربامات پیش و پس از افزودن ملامین در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، نانوذرات نقره پیش از افزودن ملامین کاملاً پراکنده بوده‌اند، در صورتی که پس

الگوهای پراش پرتو ایکس نانوذرات نقره عامل‌دار شده با دی-تیوکاربامات و کمپلکس آنها با ملامین در شکل ۵ نشان داده شده است. الگوی XRD نانوذرات tris-DTC-Ag NPs دارای چهار پیک شاخص است که در زوایای 2θ برابر با 38.1° ، 44.5° ، 64.5° و 77.5° درجه نمایان شده‌اند و به ترتیب مربوط به صفحات انعکاسی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است (کارت JCPDC شماره ۳۷۲۲-۸۹) [۳۴]. الگوهای XRD به دست آمده به طور واضح نشان می‌دهند که نانوذرات نقره سنتز شده از بلورینگی عالی برخوردار هستند و صفحات انعکاسی نشان‌دهنده ساختار FCC این نانوذرات هستند [۳۵]. اندازه بلوری متوسط نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی-تیوکاربامات، که با استفاده از پهنای پیک در نصف ارتفاع پیک (۱۱۱) محاسبه شده است، ۱۰ nm است. همچنین، الگوی XRD نانوذرات tris-DTC-Ag NPs کمپلکس شده با ملامین (شکل ۵-ب) پیک‌های مشابهی دارد با این تفاوت که شدت پیک‌ها مقداری کاهش یافته، که نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های نانوذرات نقره با ملامین است.

نانوذرات نقره پوشش داده شده با دی‌تیوکاربامات بعد از یک ماه نگهداری در یخچال پایدار بودند و طیف جذبی UV-Vis آنها

افزوده شد، رنگ سوسپانسیون حاصل بعد از گذشت حدود ده دقیقه از زرد روشن به قرمز تغییر کرد، که این تغییر رنگ نشان-دهنده انباشتگی نانوذرات نقره است. تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات در حضور ملامین با طیف‌سنجی UV-Vis پایش شد. طیف جذبی نانوذرات نقره پس از افزودن محلول ملامین (با غلظت $10 \mu\text{M}$) تغییر قابل توجهی داشت. یک پیک جذبی قوی در طول موج 570 nm نانومتر ظاهر شد که مربوط به نانوذرات نقره انباشته است. این تغییر در طیف جذبی و تغییر رنگ محلول به این دلیل است که ملامین باعث انباشته شدن نانوذرات نقره پوشش داده شده با دی‌تیوکاربامات می‌شود که سازوکار آن از طریق برهم‌کنش‌های دهنده-گیرنده بین ملامین و تریس-دی-تیوکاربامات است که در آن ملامین به‌عنوان دهنده الکترون و تریس-دی-تیوکاربامات به‌عنوان پذیرنده الکترون عمل می‌کنند (شکل ۶).

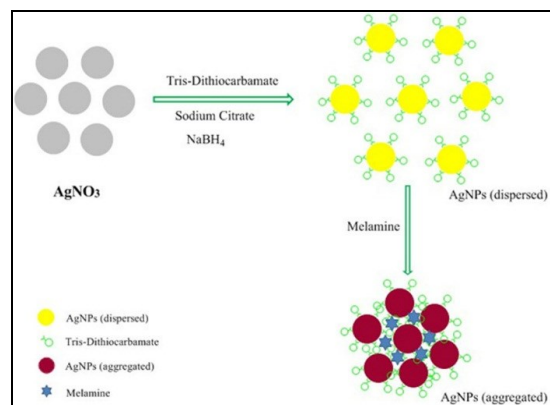
برحسب pH محیط رسم شد. حداقل نسبت جذب (A_{570}/A_{392}) در محیط اسیدی ($\text{pH}=4$) و محیط قلیایی ($\text{pH}=12$) رخ می‌دهد. در pH های پایین (کمتر از ۷)، امکان هیدرولیز ملامین و اکسیدشدن نانوذرات نقره وجود دارد، که ممکن است منجر به جدا شدن تریس-دی‌تیوکاربامات از نانوذرات نقره و ناپایداری کمپلکس tris-DTC-Ag NPs شود. در pH های بالا (بالتر از ۱۰)، گروه‌های NH_2 ملامین با گروه‌های OH جایگزین می‌شوند و در نتیجه ملامین به آمین^{۱۲}، آمید^{۱۳} و/یا سیانوریک اسید تبدیل می‌شود که منجر به محدود شدن برهم‌کنش‌های بین ملامین و نانوذرات می‌شود. مشاهدات انجام شده نیز تایید کننده بودند و در عمل هیچ تغییر رنگی در محیط‌های اسیدی یا قلیایی قوی مشاهده نشد. به دنبال آن، بالاترین نسبت جذب (A_{570}/A_{392}) در محیط با $\text{pH}=10$ مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده این است که در این محیط برهم‌کنش‌های میان ملامین و نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی‌تیوکاربامات حداکثر مقدار ممکن است. در نتیجه، حس گر tris-DTC-Ag NPs، در محیط با $\text{pH}=10$ بیشترین حساسیت را نسبت به ملامین دارد.

زمان‌های متفاوت برای برهم‌کنش tris-DTC-Ag NPs با ملامین مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین زمان برای انجام کامل برهم‌کنش، ۱۰ دقیقه است.

به‌منظور بررسی تاثیر غلظت، محلولی حاوی نانوذرات نقره با غلظت 0.1 mM مطابق با بند ۲-۳ آماده شد. با افزودن محلول ملامین (با غلظت $10 \mu\text{M}$) به این محلول در بهترین pH ، تغییر رنگ قابل توجهی در مدت زمان ۱۰ دقیقه مشاهده نشد.

۳-۴- بررسی عملکرد حس گر برای شناسایی رنگ‌سنجی ملامین در بهترین شرایط

پس از بررسی بهترین شرایط برای عملکرد مطلوب حس گر، غلظت‌های متفاوتی از ملامین (از $0.16 \mu\text{M}$ تا $16 \mu\text{M}$) تهیه شد و حساسیت حس گر نسبت به آنها بررسی شد. همان‌طور که



شکل ۶: سازوکار برهم‌کنش نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی‌تیوکاربامات با ملامین

۳-۳- تعیین بهترین شرایط برای عملکرد مطلوب حس گر

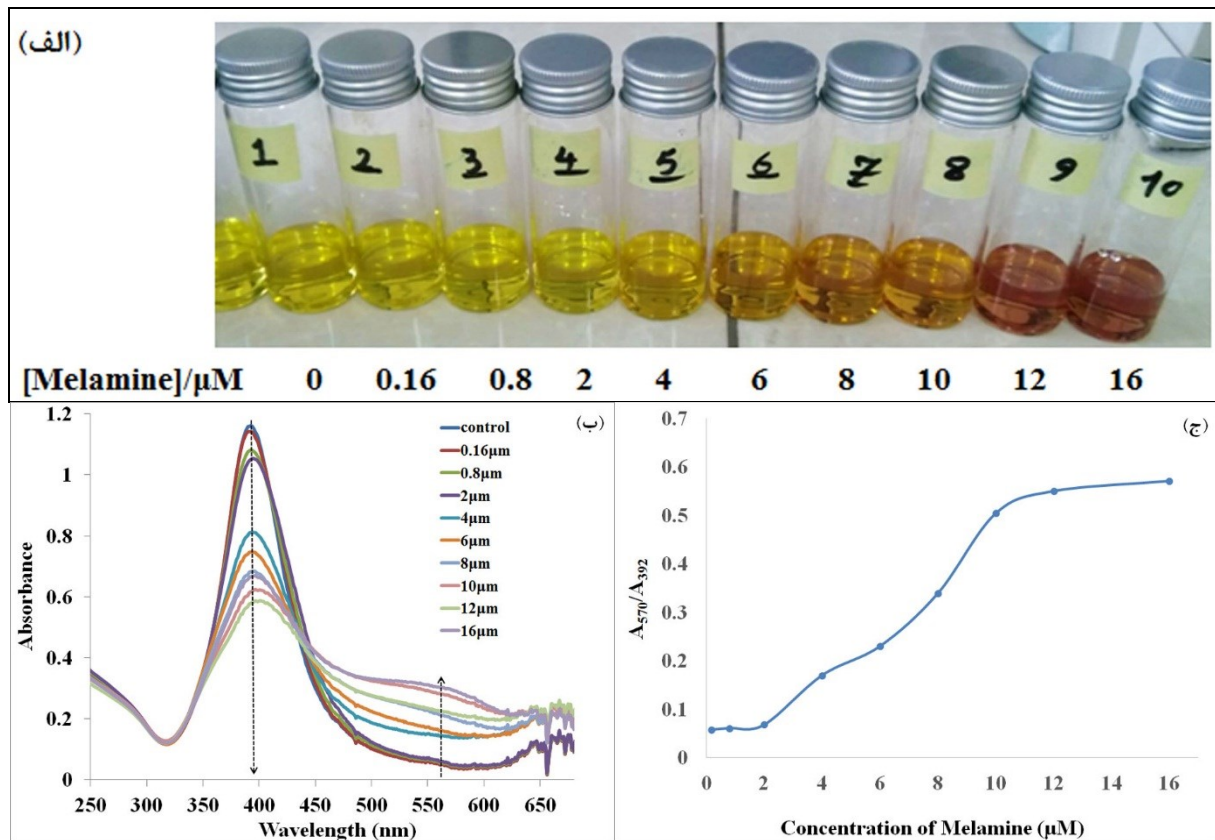
تاثیر عوامل متفاوت تاثیرگذار بر برهم‌کنش ملامین با نانوذرات نقره، از جمله pH محلول، غلظت نانوذرات نقره در محلول و مدت زمان لازم برای برهم‌کنش، مورد بررسی قرار گرفت.

pH محیط می‌تواند بر برهم‌کنش نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی‌تیوکاربامات با ملامین تاثیر داشته باشد. از این‌رو، تاثیر pH بر رفتار تشخیص حس گر tris-DTC-Ag NPs در گستره pH از ۴ تا ۱۲ بررسی شد. به‌منظور کمی کردن تغییرات جذب در طول موج 570 nm نانومتر و 392 nm نانومتر، نمودار نسبت جذب

¹² - Ammeline
¹³ - Ammelide

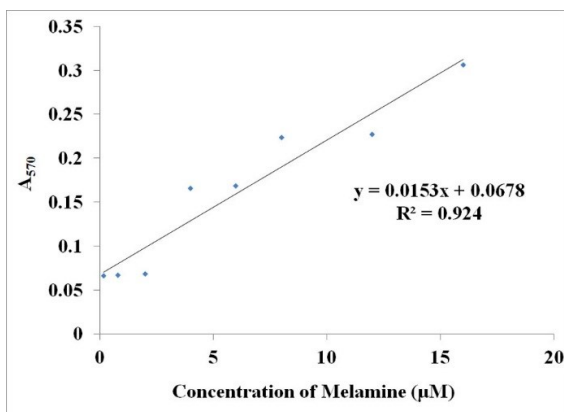
کرده است. حتی با افزودن مقدار $4 \mu\text{M}$ از ملامین، تغییر رنگ

در شکل ۷-الف مشاهده می‌شود. با افزایش غلظت ملامین در محلول، رنگ محلول به تدریج از زرد کم‌رنگ تا قرمز تیره تغییر



شکل ۷: (الف): تغییرات رنگ مشاهده شده با افزایش غلظت ملامین، (ب) منحنی جذب بر حسب طول موج محلول Ag-DTC-trisT NPs و در حضور غلظت‌های متفاوت ملامین، (ج) منحنی نسبت جذب (A_{570}/A_{392}) بر حسب غلظت ملامین

در گستره مورد بررسی، این تغییرات نسبتاً خطی ($R=0.924$) و حد تشخیص (LOD) این روش برابر با $0.7 \mu\text{M}$ است.



شکل ۸: نمودار تغییرات جذب در 570 nm بر حسب غلظت ملامین

۳-۵- تعیین مقدار ملامین افزوده شده به شیر خام

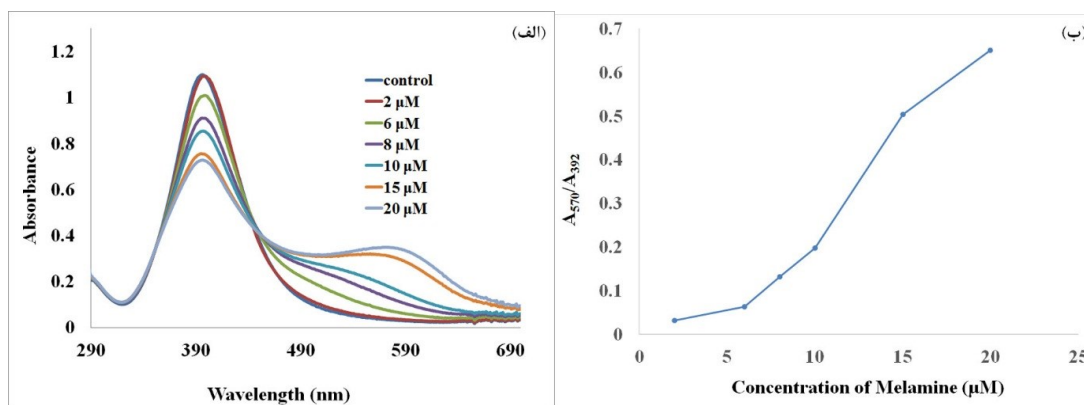
کامل با چشم غیرمسلح قابل مشاهده است. افزون بر این، همان-طور که در شکل ۷-ب دیده می‌شود، با افزایش غلظت ملامین، جذب شاخص نانوذرات نقره در 392 nm به تدریج کاهش یافته، در حالی که باند جذبی جدیدی در 570 nm افزایش غلظت نانوذرات نقره انباشته شده است. همچنین، منحنی نسبت جذب (A_{570}/A_{392}) بر حسب غلظت ملامین در شکل ۷-ج نشان داده شده است.

منحنی تغییرات جذب در 570 nm بر حسب غلظت ملامین در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که از این منحنی مشخص است، مطابق قانون بیر-لامبرت^{۱۴}، همبستگی خطی بین غلظت ملامین و جذب نانوذرات نقره در 570 nm وجود دارد.

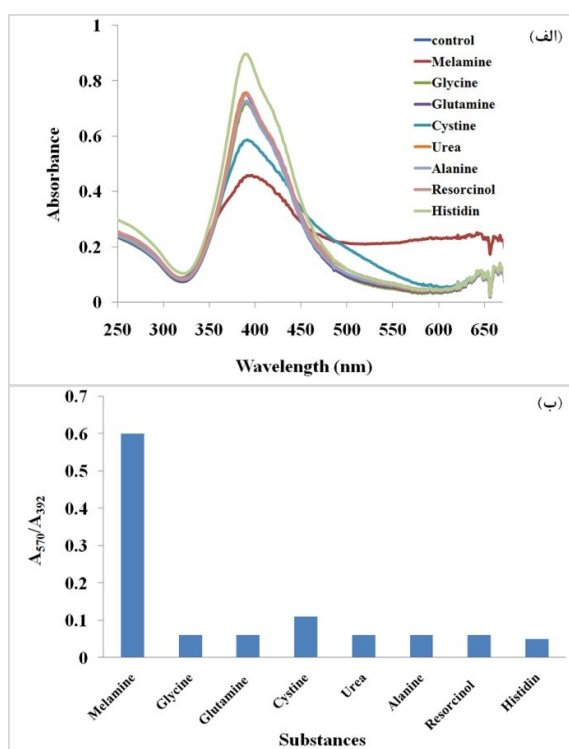
¹⁴ - Beer-Lambert Law

طیف جذبی UV-Vis این نمونه‌ها در شکل ۹-الف نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۹-ب مشخص است، با افزایش غلظت ملامین، نسبت جذب A_{570}/A_{392} افزایش می‌یابد.

به‌منظور بررسی قابلیت کاربردی بودن عملی حس‌گر، تشخیص ملامین در شیر پاستوریزه آزمون شد. غلظت‌های مشخصی از ملامین به نمونه‌های شیر پاستوریزه آماده‌سازی شده افزوده شد.



شکل ۹: (الف): طیف جذبی Vis-UV مربوط به افزودن مقادیر متفاوت ملامین به نمونه شیر آماده‌سازی شده، (ب): منحنی نسبت جذب (A_{570}/A_{392}) بر حسب غلظت ملامین در این نمونه‌ها



شکل ۱۰: گزینش‌پذیری حس‌گر Tris-Ag-DTC-NPs نسبت به ملامین، (الف): طیف جذبی ملامین و ترکیبات با ساختار مشابه با غلظت $12 \mu\text{M}$ ، (ب): منحنی نسبت جذب (A_{570}/A_{392}) بر حسب نوع ترکیب.

۳-۷- مقایسه عملکرد حس‌گر با حس‌گرهای مشابه

همان‌طور که گفته شد، به‌دلیل ویژگی منحصر به فرد نانوذرات نقره و همچنین، قیمت ارزان‌تر آنها نسبت به نانوذرات طلا،

۳-۶- بررسی گزینش‌پذیری حس‌گر نسبت به ملامین

به‌منظور بررسی گزینش‌پذیری حس‌گر Tris-DTC-Ag NPs نسبت به ملامین، آزمایش‌های کنترل با استفاده از ملامین و ترکیباتی که ساختار مشابه ملامین دارند، انجام شده است. به این منظور، محلول‌هایی با غلظت $12 \mu\text{M}$ از ملامین، گلايسين، گلوتامین، سیستئین، اوره، آلانین، رزورسینول و هیستیدین تهیه شدند و پس از افزودن حس‌گر (با غلظت نقره 0.2 mM) به هر یک از آنها در بهترین شرایط، منحنی جذب هر یک از آنها بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود، حس‌گر نسبت به ملامین کامل گزینش‌پذیری عمل کرده است و ترکیبات مشابه تغییر رنگ قابل مشاهده‌ای نشان نداده‌اند. همچنین پیک جذبی جدید در 570 nm تنها در حضور ملامین ظاهر شده است که نشان‌دهنده گزینش‌پذیری بالای حس‌گر نسبت به ملامین است. ساختار مولکولی ملامین و برهمکنش‌های ویژه آن با نانوذرات نقره پوشش‌داده شده با دی‌تیوکاربامات باعث فراهم آمدن حس‌گر رنگ‌سنجی با گزینش‌پذیری عالی برای ملامین شده است.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، نانوذرات نقره پوشش داده شده با تریس-دی-تیوکاربامات سنتز و ساختار آنها مورد بررسی قرار گرفت. از این نانوذرات به عنوان حسگر رنگ سنجی برای شناسایی مقادیر جزئی ملامین در شیر استفاده شد. عملکرد حسگر بر مبنای برهمکنش های الکترون دهنده-الکترون گیرنده بین گروه های عاملی موجود در سطح نانوذرات پوشش داده شده و ملامین است که منجر به انباشتگی نانوذرات می شود. نانوذرات نقره در حالت پراکنده به رنگ زرد روشن و در حالت انباشته به رنگ قرمز هستند که این تغییر رنگ با چشم غیرمسلح و در مدت زمان نسبتاً کوتاهی به آسانی قابل مشاهده است. از دستگاه طیف-سنجی UV-Vis برای بررسی تغییرات جذب استفاده شد. حد تشخیص روش $0.7 \mu\text{M}$ است و حسگر نسبت به ملامین کامل گزینش پذیر عمل می کند. روش ارائه شده از نظر گستره خطی بودن اندازه گیری و حد تشخیص، با روش های ارائه شده در مقالات قابل رقابت است. از این روش می توان برای تشخیص میدانی تقلبات در شیر و فراورده های مشابه استفاده کرد.

مراجع

- [1] European Food Safety Authority, Question NEFSA-Q-2007-093. "EFSA provisional statement on a request from the European Commission related to melamine and structurally related to compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for food and feed", <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1047.htm> [4 July 2007]
- [2] S. Ehling, S. Tefera, I.P. "Ho, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid", Food Addit. Contam., 24, 1319-1325, 2007.
- [3] C.A. Brown, K.S. Jeong, R. H. Poppenga, B. Miller, A.E. Ellis, K.I. Kang, S. Sum, A.M. Cistola, S.A. Brown, "Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007", J. Vet. Diagn. Invest. 19, 525-531, 2007.

پژوهش های بسیاری برای استفاده از این نانوذرات در رنگ سنجی انجام شده است. محققان بسیاری از نانوذرات نقره پوشیده شده با لیگندهای متفاوت به عنوان حسگر برای تشخیص رنگ سنجی ملامین در شیر استفاده کرده اند. در جدول ۱، نتایج برخی از این پژوهش ها با پژوهش حاضر مقایسه شده است. همان طور که مشاهده می شود، گستره خطی بودن پژوهش حاضر از بسیاری از پژوهش های مشابه گسترده تر است، همچنین، حد تشخیص روش ارائه شده با پژوهش های مشابه قابل رقابت است.

جدول ۱: استفاده از نانوذرات نقره در تشخیص رنگ سنجی ملامین

ردیف	روش	گستره خطی (μM)	حد تشخیص (μM)	مرجع
۱	نانوذرات نقره پوشیده شده با بتا-سیکلودکستین	۰.۰۵-۰.۰۰۱	۴.۹۸	[۲۳]
۲	نانوذرات نقره اصلاح شده با دوپامین	۱۰-۰.۷۹	۰.۷۹	[۲۴]
۳	نانوذرات نقره پوشیده شده با کروموتروپیک اسید (CTA)	۱-۰.۱	۰.۳۶	[۲۹]
۴	نانوذرات پوشیده شده با سولفانیلک اسید (SAA)	۳.۱-۰.۱	۰.۱۱	[۳۷]
۵	نانوذرات نقره پوشیده شده با سیترات	۱۷۰-۴	۲.۳	[۳۸]
۶	نانوذرات نقره اصلاح شده با پارا-نیتروآنیلین	۱۰۰-۰.۵	۰.۷۹	[۳۲]
۷	نانوذرات نقره تهیه شده با عصاره برگ جاتروفاجوسپینولیا ^{۱۵}	۱۰-۰.۵	۰.۲۵۲	[۳۹]
۸	نانوذرات نقره تهیه شده با معرف تولنس	۰.۸۸-۰.۰۴	۰.۰۱	[۴۰]
۹	نانوذرات نقره تهیه شده با تانیک اسید	۱.۴-۰.۵	۰.۰۱	[۴۱]
۱۰	نانوذرات نقره تهیه شده با بیو-پلی-فنول ها	۱۶		[۴۲]
	الف- نانوذرات نقره-روتین	۳.۱۶-۰.۳۹	۰.۷۹	
	ب- نانوذرات نقره-کور کومین	۶۶-۳.۱	۱.۹	
		۷۹۱		
۱۱	نانوذرات نقره پوشیده شده با تریس-دی تیوکاربامات	۱۲-۲	۰.۷	تحقیق حاضر

¹⁵ - Jatropha gossypifolia

¹⁶ - Rutin

- [14] J.S. Lee, P.A. Ulmann, M.S. Han, C.A. Mirkin, "A DNA-gold nanoparticle-based colorimetric competition assay for the detection of cysteine", *Nano Lett.*, 8, 529–533, 2008.
- [15] M.H. Jazayeri, T. Aghaie, A. Avan, M. R. S. Ghaffari, "Colorimetric detection based on gold nano particles (GNPs): An easy, fast, inexpensive, low-cost and short time method in detection of analytes (protein, DNA, and ion)", *Sens. Bio-Sens. Res.*, 20, 1-8, 2018.
- [16] M.S. Han, A.K.R. Lytton-Jean, B.K. Oh, J. Heo, C.A. Mirkin, "Colorimetric screening of DNA-binding molecules with gold nanoparticle probes", *Angew. Chem., Int. Ed.*, 45, 1807–1810, 2006.
- [17] J.S. Lee, A.K.R. Lytton-Jean, S.J. Hurst, C.A. Mirkin, "Silver nanoparticle-oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties". *Nano Lett.*, 7, 2112–2115, 2007.
- [18] Y. Chen, J. Aveyard, R. Wilson, "Gold and silver nanoparticles functionalized with known numbers of oligonucleotides per particle for DNA detection". *Chem. Commun.*, 2804–2805, 2004.
- [19] H. Li, Y. Bian, "Selective colorimetric sensing of histidine in aqueous solutions using cysteine modified silver nanoparticles in the presence of Hg^{2+} ". *Nanotechnology*, 20, 145502–145507. (2009).
- [20] V.T. Hoang, N.X. Dinh, N. L. Trang, N. TienKhi, N. V. Quy, P. A. Tuan, D. Q. Tri, L. H. Thang, T. Q. Huy, A.T. Le, "Functionalized silver nanoparticles-based efficient colorimetric platform: Effects of surface capping agents on the sensing response of thiram pesticide in environmental water samples", *Mater. Res. Bull.*, 139, 111278, 2021.
- [21] D. Xiong, H. Li, "Colorimetric detection of pesticides based on calixarene modified silver nanoparticles in water". *Nanotechnology*, 19, 465502–465507, 2008.
- [22] C. Han, L. Zhang, H. Li, "Highly selective and sensitive colorimetric probes for Yb^{3+} ions
- [4] N. Vasimalai, S.A. John, "Picomolar melamine enhanced the fluorescence of gold nanoparticles: Spectrofluorimetric determination of melamine in milk and infant formulas using functionalized triazole capped goldnanoparticles", *Biosens. Bioelectron.* 42, 267–272, 2013.
- [5] K. Sharma, M. Paradakar, "The melamine adulteration scandal", *Food Sec.*, 2, 97-107, 2010.
- [6] Y. Liu, E.E.D. Todd, Q. Zhang, J. Shi, X. Liu, "Recent developments in the detection of melamine", *Biomed. Biotechnol.*, 13, 525-532, 2012.
- [7] F. Sun, W. Ma, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, C. Peng, L. Wang, H. Kuang, C. Xu, "Analytical methods and recent developments in the detection of melamine", *Trends Analyt. Chem.*, 29, 1239–1249, 2010.
- [8] M. Ritota, P. Manzi, "Melamine detection in milk and dairy products: traditional analytical methods and recent developments", *Food Anal. Methods*, 11, 128–147, 2018.
- [9] Y. Ting, J. Deng, X. Lin, L. Ding, Y. Li, H. Li, X. Ting, "Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk". *Electrochim. Acta* 56, 4595–4602, 2011.
- [10] K. Rovina, S. Siddiquee, "A review of recent advances in melamine detection techniques", *J. Food Compost Anal.*, 34, 25-38, 2015.
- [11] D.B. Liu, Z. Wang, X.Y. Jiang, "Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules". *Nanoscale.*, 3, 1421–1433, 2011.
- [12] D. Vilela, M. C. González, A. Escarpa, "Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review", *Anal. Chim. Acta*, 751, 24– 43, 2012.
- [13] A.P. V.S, P. Joseph, K.D. S.C.G, S. Lakshmanan, T. Kinoshita, S. Muthusamy, "Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes", *Mater. Sci. Eng. C*, 78, 1231-1245, 2017.

- [31] S. Bothra, J.N. Solanki, S.K. Sahoo, J.F. Callan, "Anion-driven selective colorimetric detection Hg^{2+} and Fe^{3+} using functionalized silver nanoparticles", RSC Adv., 4, 1341-1346, 2014.
- [32] C. Han, H. Li, "Visual detection of melamine in infant formula at 0.1 ppm level based on silver nanoparticles" Analyst, 135, 583-588, 2010.
- [33] N. Azizi, F. Aryanasab, M.R. Saidi, "Straightforward and highly efficient catalyst-free one-pot synthesis of dithiocarbamates under solvent-free conditions", Org. Lett. 8, 5275-5277, 2006.
- [34] G.L. Carballo, L. Higuera, R. Gavara and P.H. Munoz, "Silver ions release from antibacterial chitosan films containing in situ generated silver nanoparticles", J. Agric. Food Chem., 61, 260-267, 2013.
- [35] X. Wang, Y. Zou, J. Zhu and Y. Wang, "Silver cholesteric liquid crystalline: shape-dependent assembly and plasmonic chiroptical response", J. Phys. Chem. C, 117, 14197-14205, 2013.
- [36] J. Song, F. Wu, Y. Wan, L.H. Ma, "Visual test for melamine using silver nanoparticles modified with chromotropic acid", Microchim Acta, 181, 1267-1274, 2014.
- [37] J. Song, F. Wu, Y. Wan, L.H. Ma, "Colorimetric detection of melamine in pretreated milk using silver nanoparticles functionalized with sulfanilic acid", Food Control, 50, 356-361, 2015.
- [38] H. Ping, M. Zhang, H. Li, S. Li, Q. Chen, C. Sun, T. Zhang, "Visual detection of melamine in raw milk by label-free silver nanoparticles", Food Control, 23, 191-197, 2012.
- [39] H.P. Borase, C.D. Patil, R.B. Salunkhe, R.K. Suryawanshi, B.K. Salunke, S.V. Patil, "Bio functionalized silver nanoparticles as a novel colorimetric probe for melamine detection in raw milk", Biotechnol. Appl. Biochem, 62, 652-662, 2015.
- based on supramolecular aggregates assembled from β -cyclodextrin-4,4'-dipyridine inclusion complex modified silver nanoparticles". Chem. Commun., 3545-3547, 2009.
- [23] S.S.J. Xavier, C. Karthikeyan, G.G. kumar, A.R. Kim, D.J. Yoo, "Colorimetric detection of melamine using β -cyclodextrin-functionalized silver nanoparticles", Anal. Methods, 6, 8165-8172, 2014.
- [24] Y. Ma, H. Niu, X. Zhang, Y. Cai, "One-step synthesis of silver/dopamine nanoparticles and visual detection of melamine in raw milk", Analyst, 136, 4192-4196, 2011.
- [25] W.F. Wang, Y. Qiang, X-H. Meng, J-L. Yang, Y-P. Shi, "Ultrasensitive colorimetric assay melamine based on in situ reduction to formation of CQDs-silver nanocomposite", Sens. Actuators B: Chem. , 260, 808-815, 2018.
- [26] J.V. Rohit, S.K. Kailasa, "5-Sulfo anthranilic acid dithiocarbamate functionalized silver nanoparticles as a colorimetric probe for the simple and selective detection of tricyclazole fungicide in rice samples", Anal. Methods, 6, 5934-5941, 2014.
- [27] V.N. Mehta, J.V. Rohit, S.K. Kailasa, "Functionalization of silver nanoparticles with 5-sulfoanthranilic acid dithiocarbamate for selective colorimetric detection of Mn^{2+} and Cd^{2+} ions", New J. Chem., 40, 4566-4574, 2016.
- [28] V.N. Mehta, A.K. Mungara, S.K. Kailasa, "Dopamine dithiocarbamate functionalized silver nanoparticles as colorimetric sensors for the detection of cobalt ion", Anal. Methods, 5, 1818-1822, 2013.
- [29] H. Li, L. Zhang, Y. Yao, C. Han, S. Jin, "Synthesis of aza-crown ether-modified silver nanoparticles as colorimetric sensors for Ba^{2+} ", Supramol. Chem. 22, 544-547, 2010.
- [30] J.V. Rohit, S.K. Kailasa, "Cyclen dithiocarbamate-functionalized silver nanoparticles as a probe for colorimetric sensing of thiram and paraquat pesticides via host-guest chemistry", J. Nanopart. Res., 16, 2585-2601, 2014.

[40] H. Wang, D. Chen, L. Yu, M. Chang, L. Ci, "One-step, room temperature, colorimetric melamine sensing using an in-situ formation of silver nanoparticles through modified Tollens process", *Spectrochim. Acta. A*, 137, 281-285, 2015.

[41] M.F. Alam, A.A. Laskar, S. Ahmed, M.A. Shaida, H. Younus , "Colorimetric method for the detection of melamine using in-situ formed silver nanoparticles via tannic acid", *Spectrochim. Acta A*, 183, 17-22, 2017.

[42] J. Kaur Rajput, J. Kaur Rajput, "Bio-polyphenols promoted green synthesis of silver nanoparticles for facile and ultra-sensitive colorimetric detection of melamine in milk", *Biosens. Bioelectron.* 120, 153-159, 2018.



Tris-dithiocarbamate Functionalized Silver Nanoparticles as a Selective Colorimetric Sensor for Detection of Melamine in Milk

F. Aryanasab^{1*}, Sh. Mozaffari², J. Ordokhanian², S. Rabiei²

1- Chemistry Research Group, Chemistry and Petrochemical Research Center, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Iran.

2- Faculty of Payame Noor University, Department of Chemistry, Tehran, Iran.

Abstract: The aim of this study was to develop a cheap, selective, sensitive and practical method for detecting melamine in raw milk samples. Tris-dithiocarbamate was prepared by the reaction of 2-amino-2-hydroxy-propane-1,3-diol (tris base), as a cheap and available base, with carbon disulfide. Due to the presence of the dithiocarbamate together with the hydroxyl functional groups, there is a strong tendency to interact with melamine. Electron donor-electron acceptor interaction between melamine and tris-dithiocarbamate on the surface of silver nanoparticles leads to the aggregation of silver nanoparticles, which causes the absorption wavelength of nanoparticles to shift to higher wavelengths and the color of the solution changes from bright yellow to red. This color change has been recorded and measured using ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy. This method can be used to quickly measure the small amount of melamine in pasteurized milk samples. The detection limit of the method is 0.7 μM , and the sensor is completely selective towards melamine. The linear range of the method is 2 μM -12 μM , which is competitive with many similar methods reported.

Keywords: Silver nanoparticles, Dithiocarbamate Ligand, Colorimetric Detection, Selective Sensor, Melamine in Milk.