

Original Article

Constructing an electrochemical sensor configuring as PGE/AgNPs/ Prednisolone for detection and determination of Caffeine in drug supplements and drinking samples

Afshin Moradi¹, Samineh Kaki², Seyed Hossein Kiaee³, Keyvan Ghodrati¹, Arash Babakhanian^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Department of pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E-mail: arash.babakhanian@gmail.com, Arash.babakhanian@iauksh.ac.ir

Received: 28 November 2018 Accepted: 9 March 2019 First Published online: 28 Oct 2020

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020;42(4):456-465

Abstract

Background: In this research work, constructing and optimizing the applicability of a new electrochemical sensor based on modifying bare graphite pencil electrode with Ag Nano particles and prednisolone drug using cyclic voltammetry (CV) technique has been presented.

Methods: The successive voltammograms at low scan rates were applied on the surface of bare pencil graphite electrode to produce durable and stable films. Scanning electron microscopy was used to characterize the modified surfaces of PGE/AgNPs and PGE/AgNPs/ Prednisolone. The new electrochemical sensor was successfully utilized to estimate caffeine contents in pretreated drug supplements and drinking samples.

Results: The results revealed that this modified electrode has a good electro catalytic activity to oxidation of caffeine with obtained parameters of $\alpha = 0.65$, $\log K_s = 3.39$ and $\Gamma = 3.4 \times 10^{-4}$. Under the optimized conditions, Caffeine was determined over the concentration of 25-600 nmolL^{-1} with limit of detection of 8.17 nmolL^{-1} .

Conclusion: This study focused on constructing and optimizing a new modified pencil graphite electrode to determine caffeine in its real samples. The simple, fast and cost effective electrodeposition technique was used to deposit AgNPs and Prednisolone. This electrochemical sensor also has some advantages such as high stability, desirable repeatability and acceptable sensitivity. So, this new sensor can be recommended for analyzing drug supplements and soft drinking samples with high accuracy and precision in analysis.

Keywords: Modified Electrodes, Pencil Graphite Electrode, Voltammetry, Ag Nano Particles, Prednisolone, Caffeine

How to cite this article: Moradi A, Kaki S, Kiaee S H, Ghodrati K, Babakhanian A. [Constructing an electrochemical sensor configuring as PGE/AgNPs/ Prednisolone for detection and determination of Caffeine in drug supplements and drinking samples]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020;42(4):456-465. Persian.

© 2020 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

ساخت یک حسگر الکتروشیمیایی با ساختار گرافیت/نانونقره/پردنیزولون جهت تشخیص و اندازه گیری کافئین در مکمل های دارویی و نوشیدنی ها

افشین مرادی^۱، ثمینه کاکای^۲، سید حسین کیایی^۳، کیوان قدرتی^۱، آرش باباخانیان^{۱*}

^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۳ دپارتمان فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول؛ ایمیل: arash.babakhanian@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۷/۹/۷ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۸/۷
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۴): ۴۵۶-۴۶۵

چکیده

زمینه: در این کار تحقیقاتی، ساخت و بهینه سازی عملکرد یک حسگر الکتروشیمیایی بر پایه اصلاح و لایه نشانی الکتروشیمیایی سطح الکتروود قلم گرافیت عریان توسط نانو ذرات نقره و پردنیزولون با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه ای نشان داده شده است.
روش کار: ولتاموگرام های متوالی چرخه ای در سرعت رویش های کم جهت تولید فیلم های پایدار و مقاوم بر سطح الکتروود عریان قلم گرافیتی اعمال شدند. میکروسکوپ الکترونی روبشی جهت ماهیت شناسی سطح های اصلاح شده ی قلم گرافیت/ نانو نقره و قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون به کار گرفته شد. حسگر الکتروشیمیایی جدید با موفقیت جهت تخمین مقدار محتوی کافئین موجود در نمونه های آماده سازی شده مکمل های دارویی و نوشیدنی ها به کار برده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که این الکتروود اصلاح شده، فعالیت الکتروکاتالیستی خوبی برای اکسیداسیون کافئین با پارامترهای الکتروشیمیایی کسب شده از قبیل ضریب انتقال الکترون برابر با ۰/۶۵، لگاریتم ثابت سرعت برابر با ۳/۳۹ (S⁻¹) و غلظت لایه اکتیو سطح برابر با ۳/۴×۱۰^{-۴} (میلی مول بر مجذور سانتیمتر مربع) را دارد. تحت شرایط آزمایشی بهینه شده، کافئین در محدوده غلظت ۲۵ تا ۶۰۰ نانو مولار با حد تشخیص ۸/۱۷ نانو مولار توسط حسگر معرفی شده اندازه گیری گردید.

نتیجه گیری: این مطالعه بر روی ساخت و بهینه سازی سک الکتروود اصلاح شده قلم گرافیتی جدید جهت اندازه گیری کافئین در نمونه های حقیقی حاوی آن تمرکز دارد. تکنیک ساده و مقرون به صرفه ی ترسیب الکتروشیمیایی جهت لایه نشانی نانو نقره و الکتروشیمیایی پردنیزولون به کار برده شد. این حسگر الکتروشیمیایی همچنین دارای مزایایی مانند پایداری بالا، تکرارپذیری رضایت بخش و حساسیت قابل قبول می باشد. بنابراین، این حسگر جدید می تواند جهت آنالیز نمونه های مکمل دارویی و نوشیدنی غیرالکلی (نوشابه) با صحت و دقت بالا در آنالیز پیشنهاد گردد.

کلید واژه ها: الکتروودهای اصلاح شده، الکتروود قلم گرافیتی، ولتامتری، نانو ذرات نقره، پردنیزولون، کافئین

نحوه استناد به این مقاله: مرادی، کاکای، کیایی، س ح، قدرتی، ک، باباخانیان آ. ساخت یک حسگر الکتروشیمیایی با ساختار گرافیت/نانونقره/پردنیزولون جهت تشخیص و اندازه گیری کافئین در مکمل های دارویی و نوشیدنی ها. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۴): ۴۵۶-۴۶۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کافئین، یک آلکالوئید طبیعی از مشتقات گزانتین می‌باشد. کافئین در قهوه و دیگر محصولات نظیر کولا، چای، نوشابه، کاکائو و شکلات که در زندگی روزمره انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد، وجود دارد. کافئین در دسته مواد تاثیرگذار بر روان انسان جای می‌گیرد. این ماده در گیاهان نیز موجود است و به عنوان یک حشره‌کش طبیعی برای فلج کردن و کشتن برخی از حشرات بر روی گیاه استفاده می‌گردد (۱). کافئین برای انسان از لحاظ اثرات فیزیولوژیک مانند تحریک عصب مرکزی، سیستم ادراری و ترشح اسید معده بسیار مهم می‌باشد. با این حال مقادیر زیاد کافئین می‌تواند باعث لرزش، تهوع، عصبانیت، تشنج و جهش در دی‌ان‌ای گردد (۲). دوز کشنده کافئین که در مستندات گزارش شده است بیش از ۱۰ گرم می‌باشد و مقدار بالای مصرف کافئین، یکی از عوامل ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی و نقص کلیه محسوب، و ممکن است باعث بیش فعالی گردد (۳). از طرفی دیگر، مقدار مناسب مصرف کافئین می‌تواند به عنوان مسکن در فرمولاسیون داروهای ضد درد، داروی مسکن سردرد و تسکین دردهای مربوط به بعد از زایمان و بعد از عمل‌های جراحی و همچنین کمک درمان میگرن در ترکیب داروهای دیگر مانند اسپرین، پاراستامول، اسید اسکوربیک استفاده گردد. در بسیاری از مطالعات در دو سال اخیر، تاثیر کافئین بر سلامت انسان به خوبی گزارش گردیده است (۴و۵). لذا با توجه به اهمیت اندازه‌گیری کافئین در مطالعات بالینی و در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت، ارائه روش‌های تجزیه‌ای سریع، حساس و قابل اعتماد برای تشخیص و تعیین کافئین ضروری به نظر می‌رسد. به همین دلیل پیدا کردن چنین روشی برای تعیین و اندازه‌گیری کافئین در ماتریس‌های خاص و در حضور عوامل مداخله‌گر با کمترین هزینه آزمایش لازم و ضروری به نظر می‌رسد (۶). علاوه بر این، تشخیص میزان غلظت کافئین از نظر تجزیه‌ای مهم می‌باشد، اهمیت این موضوع تنها به مواد غذایی و مواد مخدر شیمیایی مربوط نمی‌شود و دامنه استفاده آن وسیع‌تر بوده و در مطالعات بالینی هم وارد شده است. لذا پژوهش‌های متعدد و هدفمندی در جهت توسعه روش‌های تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری کافئین در ماتریس‌های مختلف مانند نوشیدنی‌ها، مواد غذایی، بالینی و زیست محیطی منتشر شده است. در طول یک دهه گذشته، تکنیک‌ها و دستگاه‌های مختلفی از قبیل جدا سازی‌های جفت شده با طیف سنجی جرمی و اغلب روش‌های بر پایه طیف سنجی در منابع علمی متعدد گزارش شده‌اند. لذا بسیاری از روش‌های جداسازی مدرن با حساسیت عالی و انتخاب‌پذیری بالا مانند کروماتوگرافی گازی جفت شده با طیف سنجی جرمی که حد تشخیص آن کمتر از 10^{-8} مولار است یا کروماتوگرافی مایع جفت شده با طیف سنجی جرمی با آشکار ساز آرایه دیودی (۷)، اغلب پیچیده بوده و در آزمایشگاه‌های تجزیه‌ای پیشرفته قابل استفاده می‌باشند.

نکات کاربردی

این حسگر طراحی شده به عنوان یک کار کاربردی معرفی شده، قابلیت اندازه‌گیری کافئین را با دقت و صحت بالای تجزیه‌ای در نمونه‌های بیولوژیکی و دارویی دارد و از آن میتوان به عنوان یک پروب الکتروشیمیایی در مطالعات بالینی، دارویی و مقاصد آزمایشگاهی استفاده نمود.

با این حال این روش‌ها با مشکلاتی از قبیل بالا بودن هزینه‌ها و طولانی بودن مراحل آزمایش مواجه هستند و نیازمند پیش آماده‌سازی پیچیده نمونه‌ها و پیش تغلیظ آنها با استفاده از انواع روش‌های مشتق‌سازی و استخراج کردن آنالیت مانند استخراج فاز جامد، میکرو استخراج با فاز جامد و استخراج مایع-مایع می‌باشند (۸). همچنین روش‌هایی بر مبنای طیف سنجی اغلب در آزمایشگاه‌های تجزیه‌ای جهت اندازه‌گیری میزان غلظت کافئین استفاده می‌شوند. اگرچه در این آزمایشگاه‌ها دلیل اصلی برای استفاده از روش‌های طیفی مانند طیف سنجی مادون قرمز با تبدیل فوری و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (۹)، دسترسی آسان به دستگاه‌ها و تجهیزات از قبیل فتومتر و اسپکتروفتومتر است، اما، اغلب این روش‌ها دارای جذب ملکولی در طیف سنجی اشعه ماوراء بنفش و منطقه قابل مشاهده هستند و با معایبی از قبیل وقت‌گیر بودن، آماده‌سازی پیچیده نمونه‌ها و همچنین حساسیت کم این روش‌ها همراه می‌باشند. در قیاسی برتر نسبت به روش‌های جداسازی و طیف سنجی؛ روش‌های الکتروشیمیایی امتیازاتی از قبیل سادگی، رضایت بخش بودن، حساسیت، طیف گسترده خطی غلظت، هزینه پایین دستگاه و امکان کوچک‌سازی (مینیا توره شدن) و زمان کم تشخیص را دارا می‌باشند (۱۰). لذا با توجه به خصوصیات برتر ذکر شده، روش‌های الکتروشیمیایی می‌توانند به روشی محبوب و جایگزین در تجزیه، ردیابی و اندازه‌گیری مواد تبدیل شوند (۱۱). از آنجا که الکتروده‌های اصلاح شده شیمیایی ویژگی‌های الکتروشیمیایی عالی را نسبت به الکتروده‌های معمولی (عریان) نشان می‌دهند؛ استفاده از الکتروده‌های اصلاح شده شیمیایی در اندازه‌گیری کافئین از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۱۲). الکتروده‌های مبتنی بر کربن به دلیل دسترسی به آنها در اشکال مختلف، و امکان کوچک‌سازی در ابعاد در میان انواع مختلف الکتروده‌های عریان مورد توجه می‌باشند (۱۳). شایان ذکر است که الکتروده قلم‌گرافیت به عنوان یک الکتروده کربنی می‌تواند یک سطح تجدید پذیر را فراهم کند که سطح آن نسبت به الکتروده‌های کربن شیشه، ساده‌تر و سریع‌تر اصلاح می‌شود و نتایج تکرارپذیری را در آزمایشات ایجاد می‌نماید (۱۴). در سال‌های اخیر، نانو ذرات بی اثر فلزی برای توسعه حسگرهای الکتروشیمیایی جدید به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نانو ذرات نقره در میان این نانو ذرات فلزی، با نسبت سطح به حجم نسبتا بالا و فعالیت الکتروکاتالیستی عالی، یکی از

محلول‌های رقیق‌تر تهیه گردیدند. محلول بافر بریتون رابینسون نیز با مخلوط کردن محلولهای ۰/۰۴ مولار اسید بوریک، ۰/۰۴ مولار اسید فسفریک و ۰/۰۴ مولار اسید استیک تهیه و pH مورد نظر توسط محلول ۰/۲ مولار سود تثبیت گردید. این بافر جهت ساختن pH های مورد نظر در محدوده ۲ تا ۱۲ به کار برده شد. همچنین برای تهیه تمام محلول‌های شیمیایی، آب مقطر دیونیزه شده در طول آزمایش‌ها استفاده گردید. مطالعات ولتامتری چرخه‌ای و ولتامتری موج مربعی با استفاده از دستگاه پتانسیواستات-گالوانواستات مدل (PEGSTAT 302 N) انجام گردید. سیستم سه الکترودی شامل یک الکترود (قلم گرافیت/نانوذرات نقره/پردنیزولون) به عنوان الکترود کار، الکترود (نقره/نقره کلرید) به عنوان الکترود مرجع و یک سیم پلاتینی به عنوان الکترود متقابل (کمکی) در طول مطالعات الکتروشیمیایی استفاده گردید. همچنین از دستگاه pH - یون متر متروهم مدل ۷۸۱ برای اندازه‌گیری مقادیر pH در طول آزمایشات استفاده گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (MMIRA3- TESCAN) گرفته شدند.

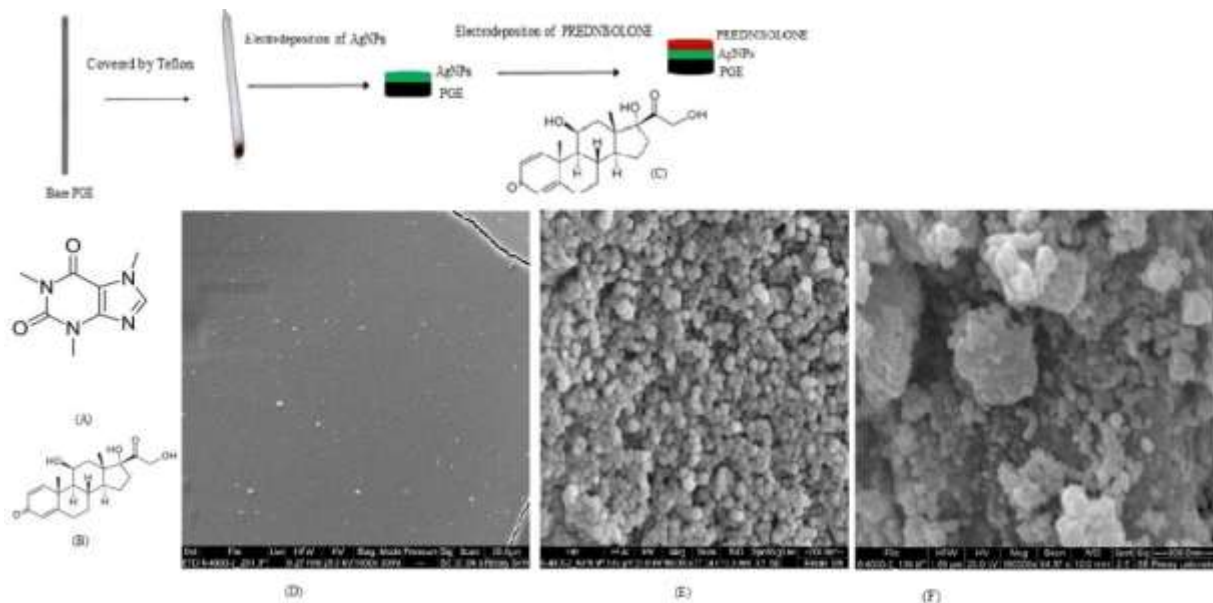
یافته‌ها

شمای اصلاح الکترود قلم گرافیت عریان (PGE) در تصویر (C-۱) نشان داده شده است. ابتدا سطح الکترود قلم گرافیت عریان روی یک کاغذ معمولی صیقل داده شد و چندین بار توسط آب مقطر دیونیزه و اتانول شستشو داد شد. سپس سطح پاک شده الکترود قلم گرافیت عریان با یک جریان نیتروژن با خلوص بالا خشک گردید. در ادامه، الکترود قلم گرافیت عریان تمیز شده در ۲۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد حاوی ۳۰ میلی مولار نترات نقره غوطه‌ور گردید و با اعمال تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در محدوده ولتاژ ۱/۱- تا ۰/۴+ ولت تحت ۱۶ چرخه (دور) متوالی با سرعت ۳۰ میلی‌ولت بر ثانیه بر سطح الکترود قلم گرافیت عریان، فیلم اصلاح شده (گرافیت/نانوذرات نقره) تشکیل گردید. در ادامه، الکترود اصلاح شده (قلم گرافیت/نانوذرات نقره) به داخل محلول آبی حاوی ۵۰ میلی‌مولار از پردنیزولون وارد گردید و با اعمال تکنیک روبش ولتامتری چرخه‌ای در محدوده پتانسیل ۱/۲- تا ۱/۲ ولت با تعداد ۱۴ چرخه متوالی با سرعت ۳۰ میلی‌ولت بر ثانیه، الکترود اصلاح شده نهایی به صورت (قلم گرافیت/نانو ذرات نقره/پردنیزولون) ساخته شد. ماهیت و مرفولوژی سطح الکترودهای اصلاح شده نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی شناسایی گردید. همانطور که در تصویرهای (D-۱ تا F-۱) نشان داده شده است، الکترود قلم گرافیت عریان (تصویر D-۱) دارای سطحی صاف و اصلاح نشده است و لایه نشانی سطح گرافیت عریان توسط نانو ذرات نقره (تصویر E-۱) و پردنیزولون (تصویر F-۱)، الکترودهای اصلاح شده با سطوح نانو ساختار حاوی نانو ذرات و نانو توده‌ها را تولید می‌نماید.

نانوذرات بی اثر فلزی می‌باشند که به طور گسترده در ساخت الکترودهای اصلاح شده مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵). علاوه بر این، نقره بهترین هدایت را در میان نانو ذرات فلزی بی اثر دارا می‌باشد و انتقال الکترون را بهتر از سایر نانو ذرات فلزی بی اثر دیگر تسهیل می‌نماید (۱۶). با توجه به امکان اکسیداسیون الکتروشیمیایی آسان پردنیزولون بر سطح الکترود کربن شیشه‌ای و تعیین مقدار آن با ولتامتری موج مربعی، می‌توان از آن به عنوان یک اصلاح‌کننده الکتروشیمیایی فعال در اصلاح سطح الکترودها استفاده نمود (۱۷). لذا، ما در این کار تحقیقاتی تصمیم گرفتیم یک حسگر الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر فیلم حساس شامل نانو ذرات نقره و پردنیزولون راسب شده به روش ولتامتری چرخه‌ای بر سطح الکترود عریان گرافیتی تولید نماییم و آنرا برای تعیین و اندازه‌گیری الکتروشیمیایی کافئین در نمونه‌های حقیقی حاوی آن به کار ببریم. این الکترود اصلاح شده جدید به دلیل استفاده از روش ترسیب الکتروشیمیایی برای لایه نشانی فیلم حساس تولید شده، از پایداری بالایی برخوردار است و می‌تواند به عنوان یک پلتفرم تجزیه‌ای حساس در تشخیص دقیق و صحیح کافئین در نمونه‌های واقعی از قبیل مکمل‌های دارویی و نوشیدنی‌ها، بدون مزاحمت‌های جدی جانبی با موفقیت و رضایتمندی به کار رود. اگرچه در سال‌های گذشته، روش‌های حسگری از قبیل تعیین کافئین با استفاده از ولتامتری موج مربعی در حضور حسگر بر پایه (۱) پلی (۴-آمینو-۳-هیدروکسی نفتالین سولفونیک اسید) با الکترود اصلاح شده شیشه کربن (۱۸)، (۲) الکترود اصلاح شده توسط نانولوله کربنی و اندازه‌گیری کافئین توسط روش ولتامتری پالس تفاضلی (۱۹)، (۳) تعیین کافئین توسط الکترود اصلاح شده کربن مزوپورس/نافیون (۲۰)، (۴) تعیین ولتامتری کافئین با استفاده از الکترود اصلاح‌شده شیشه کربن توسط پلی نیل بلو (۲۱)؛ در مستندات علمی گزارش شده است، اما حسگر معرفی شده جدید توسط ما نسبت به کارهای گزارش شده قبلی دارای صحت و دقت بالا در آنالیز، حساسیت پایین‌تر، حد تشخیص کمتر، سادگی بیشتر و مقرون به صرفه‌تر بودن در روش ساخت حسگر می‌باشد که می‌تواند به عنوان یک حسگر الکتروشیمیایی کارآمد با دقت و صحت بالای تجزیه‌ای جهت اندازه‌گیری کافئین در نمونه‌های حقیقی حاوی آن پیشنهاد گردد.

روش کار

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از قبیل ویتامین‌ها، قندها، اسیدهای آمینه، کافئین (تصویر A)، پردنیزولون (تصویر B) و نمک‌های نیتراته از یونهای فلزی مختلف با خلوص تجاری بالا از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری و بدون نیاز به خلص‌سازی مجدد استفاده گردیدند. محلول‌های استاندارد از کافئین و پردنیزولون نیز با غلظت ۵۰ میلی مولار به صورت جداگانه در بالن‌های حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری جهت ساختن



تصویر ۱- (A) ساختار مولکولی کافئین (B) ساختار مولکولی پردنیزولون (C) طرح شمایی الکترود اصلاح شده با ساختار (قلم گرافیت/نانوذرات نقره/پردنیزولون). تصاویر میکروسکوپ الکترونی پویشی از سطح الکترودهای (D) قلم گرافیت عریان (E) قلم گرافیت/نانو نقره (F) قلم گرافیت/نانو نقره/پردنیزولون.

استاندارد و تکنیک ولتامتری موج مربعی مقدار کافئین موجود اندازه‌گیری گردید.

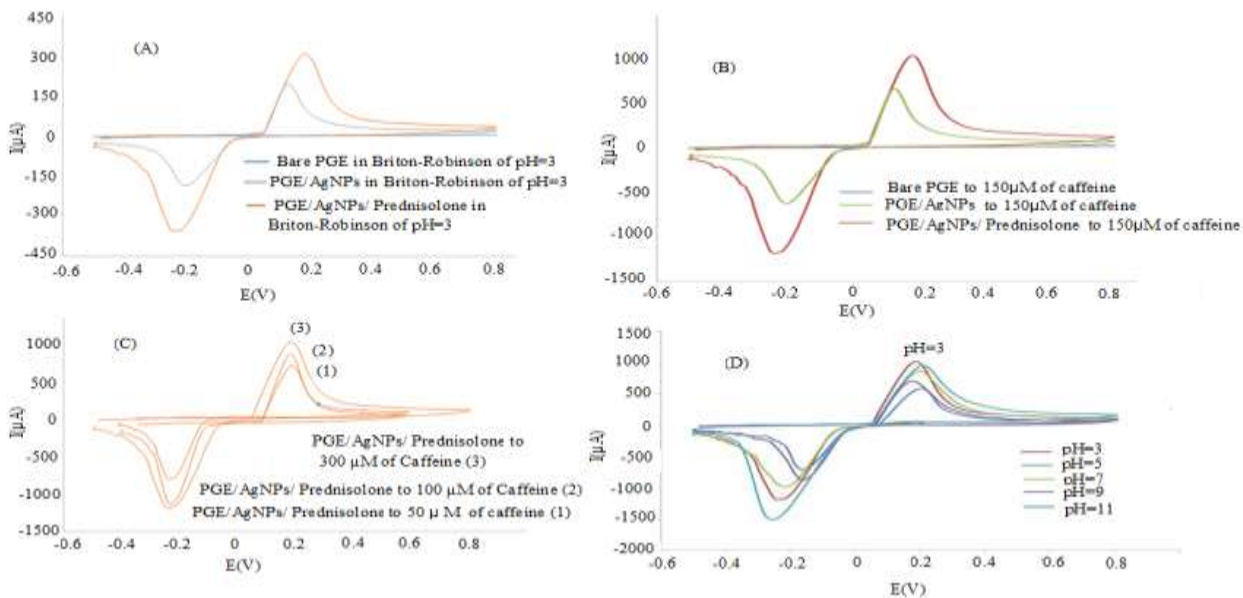
بحث

جهت بررسی رفتار الکتروشیمیایی کافئین بر روی سطح الکترود اصلاح شده، از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. در ادامه، پاسخ ولتامتری چرخه‌ای الکترودهای مختلف قلم گرافیت عریان، الکترود (قلم گرافیت/نانوذرات نقره) و الکترود (قلم گرافیت/نانو ذرات نقره/پردنیزولون) در محلول بافر بریتون-راینسون با pH برابر با ۳ و بدون حضور کافئین (تصویر ۲- A) و در حضور ۱۵۰ میکرومولار از کافئین (تصویر ۲- B) بررسی گردیدند. همانطور که از تصویر (۲- A) مشخص است الکترودهای قلم گرافیت عریان در محیط بافری و بدون حضور آنالیت، سیگنال واضح و مشخصی ندارد اما اصلاح سطح الکترود با نانو ذرات نقره و پردنیزولون به ارتقاء خواص الکتروشیمیایی سطوح اصلاح شده کمک می‌نماید. در خصوص ارزیابی رفتار الکتروشیمیایی الکترود قلم گرافیت عریان و الکترودهای اصلاح شده با نانو ذرات نقره و پردنیزولون (تصویر ۲- B)؛ پاسخ جریان اکسایش و کاهش این حسگرها به مراتب نسبت به الکترود عریان به ترتیب در ولتاژهای حوالی ۰/۱۸ ولت و ۰/۲۲- ولت نسبت به الکترود مرجع نقره - نقره کلرید در مقابل ۱۵۰ میکرومولار از کافئین افزایش یافته است؛ این نشان‌دهنده آن است که سطح الکترودهای اصلاح شده مذکور دارای فعالیت الکتروشیمیایی مناسب برای مطالعات الکتروشیمیایی کافئین می‌باشد. با توجه به بیشینه حساسیت الکترود اصلاح شده (قلم گرافیت/نانو ذرات

این مشاهدات، ترسیم موفق الکتروشیمیایی نانو ذرات نقره و پردنیزولون بر روی سطح الکترودهای گرافیت را تأیید می‌نمایند. در واقع با اصلاح سطح الکترود عریان توسط نانو ذرات نقره و پردنیزولون، میزان سطح موثر افزایش یافته و این افزایش سطح موثر باعث افزایش خاصیت لکتروکاتالیستی، بهبود خواص الکتروشیمیایی و افزایش حساسیت حسگر می‌گردد. جهت آماده‌سازی نوشیدنی غیرالکلی (نوشابه) و نمونه دارویی، سه بطری نوشیدنی غیرالکلی (نوشابه) که هر بطری حاوی ۳۳۰ میلی‌لیتر می‌باشد در یک بالن حجمی ۱۵۰۰ میلی‌لیتری بخوبی با همدیگر مخلوط گردید. سپس، حجمی برابر با ۳۳۰ میلی‌لیتری (معادل یک بطری) از محلول مخلوط شده برداشته شد و به داخل یک بالن ۱۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. در ادامه، مخلوط حاصل به حجم نهایی ۱۵۰۰ میلی‌لیتر توسط آب مقطر دیونیزه افزایش حجم داده شد. سپس، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده برای تعیین مقدار کافئین در شرایط بهینه شده شیمیایی و دستگاهی تحت pH برابر با ۳، با استفاده از روش افزایش استاندارد و تکنیک ولتامتری موج مربعی اندازه‌گیری گردید. برای آنالیز مقدار کافئین موجود در نمونه‌های دارویی نیز محتوی پنج کیسول ویتامین- مواد معدنی به خوبی با هم مخلوط و وزن معادل یک کیسول از پودر امتزاج شده برداشته شد و به یک بالن ۲۵۰ میلی‌لیتر منتقل گردید. سپس پودر حاصله به طور کامل در آب مقطر دیونیزه حل و حجم آن به حجم نهایی ۲۵۰ میلی‌لیتر رسید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه آماده به همراه مقادیر مختلف تزریق شده کافئین به سلول الکتروشیمیایی انتقال داده شدند. در نهایت، تحت شرایط بهینه شیمیایی و دستگاهی در pH بهینه برابر با ۳ به روش افزایش

سرعت انتقال الکترون بالای نانو ذرات نقره و همچنین نقش واسطه الکترونی پردنیزولون در ساختار فیلم حسگری و در نهایت خاصیت الکتروکاتالیستی این الکتروود نسبت به رفتار الکتروشیمیایی کافئین نسبت داد. همچنین، اثر مقدار pH بر روی پاسخ الکتروشیمیایی ۱۵۰ میکرومولار از کافئین با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای در محدوده pH برابر با ۳ تا ۱۱ بررسی گردید. همانطور که در (تصویر ۲-۲) نشان داده شده است، جریان پیک اکسایش با افزایش مقدار pH کاهش می‌یابد. کاهش جریان در مقادیر بالاتر pH ممکن است به حمله یون‌های هیدروکسید به سطح الکتروود اصلاح شده و کاهش جذب سطحی کافئین به سطح الکتروود مربوط گردد. بنابراین، حداکثر شدت و حساسیت در pH برابر با ۳ در محلول بافر بریتون-رابینسون مشاهده شده است. لذا، در مطالعات بعدی از محلول بافر بریتون-رابینسون با pH برابر با ۳ استفاده گردید.

نقره/ پردنیزولون) نسبت به کافئین، این الکتروود اصلاح شده به عنوان حسگر تشخیص کافئین در این مطالعه برگزیده شد تا ضمن بهینه‌سازی پارامترهای موثر شیمیایی و دستگامی، از آن جهت تشخیص و اندازه‌گیری کافئین استفاده گردد. علاوه بر این، جهت بررسی رفتار گزینش پذیر و کاتالیستی حسگر معرفی شده نسبت به کافئین، پاسخ ولتامتری چرخه‌ای هر یک از الکتروودهای مذکور نسبت به غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار از کافئین بررسی گردید. نتایج در (تصویر ۲-۲) نشان داده است، همانطور که مشخص است با افزایش غلظت کافئین، جریان پیک اکسایش با نظم افزایش‌پذیری افزایش می‌یابد. لذا با اطمینان از رفتار الکتروکاتالیستی الکتروود (قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون)؛ می‌توان نتیجه گرفت که این الکتروود اصلاح شده می‌تواند در مطالعات و اندازه‌گیری های الکتروشیمیایی کافئین با موفقیت استفاده گردد. این مشاهدات موفق الکتروشیمیایی را می‌توان به هدایت خوب و



تصویر ۲-۲) پاسخ الکتروشیمیایی الکتروود عریان و اصلاح شده مختلف در محلول بافر بریتون-رابینسون با pH برابر با ۳. (B) پاسخ الکتروشیمیایی الکتروود عریان و اصلاح شده مختلف در محلول بافر بریتون-رابینسون با pH برابر با ۳ حاوی ۱۵۰ میکرو مولار کافئین. (C) پاسخ الکتروشیمیایی الکتروود عریان و اصلاح شده مختلف در محلول بافر بریتون-رابینسون با pH برابر با ۳ حاوی مقادیر مختلف کافئین. (D) پاسخ ولتامتری چرخه‌ای ۱۵۰ میکرو مولار از کافئین بر سطح الکتروود قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون در مقادیر مختلف pH از ۳ تا ۱۱.

$$\left[\log K_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nF\theta} - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2.3RT} \right] \quad \text{(معادله ۱)}$$

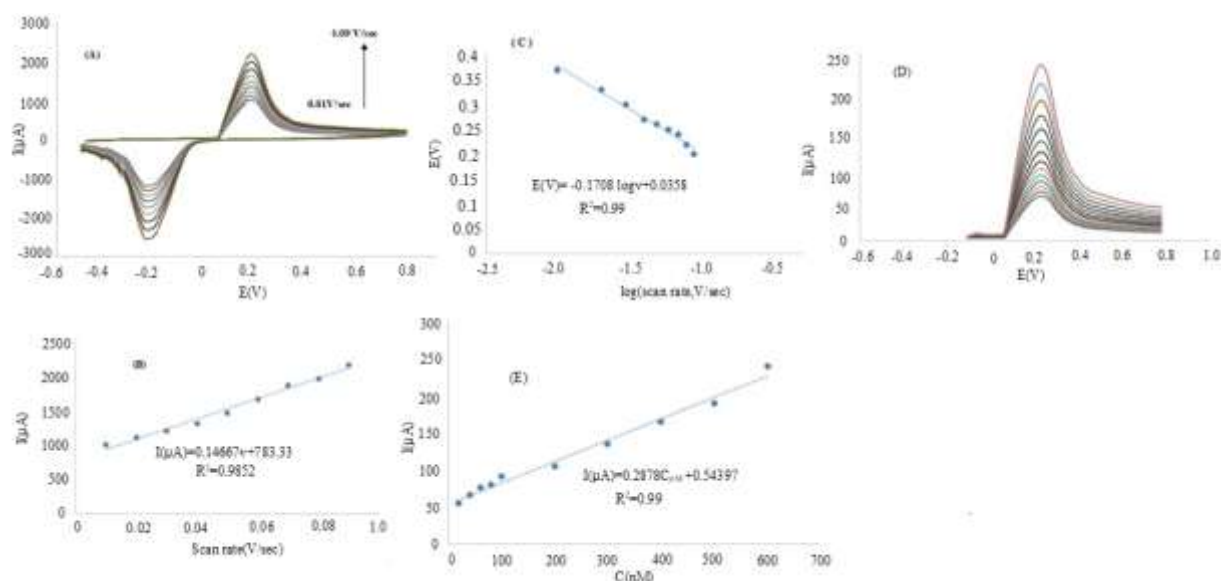
$$I_p = \frac{n^2 F^2 \theta \Delta E_p \Gamma_c}{4RT} \quad \text{(معادله ۲)}$$

نیترا ت به عنوان الکتروولیت پشتیبان با غلظت یک میلی مولار، مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین این مقدار قدرت یونی برای مطالعات الکتروشیمیایی رفتار حسگر معرفی شده نسبت به کافین در مطالعات بعدی انتخاب گردید. ولتاژتری موج مربعی اغلب برای اندازه‌گیری های الکتروشیمیایی به علت حساسیت بالا و کاهش جریان زمینه آن استفاده می‌شود. آزمایش‌های مقدماتی برای انتخاب بهترین پارامترها، مانند دامنه پالس، پله پتانسیل و فرکانس انجام شد. این پارامترها برای کسب حداکثر نسبت سیگنال به نویز بهینه گردیدند. مقادیر بهینه شده برای پارامترهای مورد مطالعه به ترتیب ۶۵ میلی‌ولت، ۵۰ میلی‌ولت و ۵۵ هرتز انتخاب گردیدند. لذا در شرایط بهینه، تکنیک ولتاژتری موج مربعی برای بررسی منحنی کالیبراسیون پاسخ الکتروشیمیایی حسگر پیشنهادی به کافین استفاده گردید. بدین منظور، ولتاموگرام‌های موج مربعی پاسخ الکتروشیمیایی حسگر پیشنهاد شده، در حالی که غلظت کافین در محلول های مورد آزمایش متفاوت بود ثبت گردیدند. نتایج در تصویر ۳-D نشان داده شده است. همچنین تغییرات خطی جریان‌های پیک موج مربعی در برابر غلظت‌های مختلف کافین در تصویر ۳-E آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، حسگر پیشنهادی دارای پاسخ الکتروشیمیایی خطی نسبت به کافین در محدوده غلظتی ۲۵ تا ۶۰۰ نانومولار با حد تشخیص ۸/۱۷ نانومولار می‌باشد. تکرارپذیری این اصلاح شده نیز در اندازه‌گیری ۱۵۰ نانومولار از کافین با انجام پنج تکرار از محلول استاندارد کافین مورد بررسی قرار گرفت. انحراف استاندارد نسبی برای پاسخ این الکتروود اصلاح شده نسبت به ۱۵۰ نانومولار از محلول کافین، ۵/۱۵ درصد بدست آمد. برای بررسی قابلیت تکثیر پاسخ الکتروود پیشنهادی، پنج الکتروود مشابه تهیه شد و پاسخ آنها به ۱۵۰ نانومولار از محلول کافین مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد انحراف استاندارد نسبی برای پاسخ بین الکتروودها ۴/۴۵ درصد محاسبه گردید. نتایج نشان داد که تکرارپذیری حسگر پیشنهاد شده برای تعیین غلظت کافین از لحاظ تجزیه‌ای قابل قبول و مناسب است. علاوه بر این، ثبات و دوام حسگر طراحی شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این حسگر برای حداقل چهار ماه، دارای پاسخ تجزیه‌ای مورد قبولی نسبت به غلظت‌های مختلف کافین بر روی منحنی کالیبراسیون ایجاد شده می‌باشد و فقط حداکثر حدود ۷ درصد کاهش در سیگنال پس از گذشت ۹۰ روز قابل رویت است. اثر تداخل ویتامین‌ها، قندها، افزودنی‌ها و برخی از آنیون‌ها و کاتیون‌ها بر پاسخ حسگر پیشنهاد شده به ۱۵۰ میکرومولار از کافین در pH برابر با ۳ با استفاده از تکنیک ولتاژتری موج مربعی و در حضور حسگر اصلاح شده جدید بررسی گردید؛ در حالی که غلظت کافین ثابت و غلظت گونه‌های مزاحم متغیر بود. خطای نسبی پنج درصد در جریانهای سیگنال ولتاژتری موج مربعی، با توجه به سیگنال محلول بافر که

برای به دست آوردن پارامترهای سینتیکی و الکتروشیمیایی اکسایش-کاهش کافین بر سطح الکتروود اصلاح شده (قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون)، اثر سرعت روبش توسط ولتاژتری چرخه‌ای در محدوده ۰/۰۱ تا ۰/۰۹ ولت بر ثابته مورد بررسی قرار گرفت (تصویر ۳-A). همانطور که در تصویر ۳-A و ۳-B نشان داده شده است، شدت جریان پیک‌های اکسایش با افزایش سرعت روبش رابطه خطی دارد که یک مکانیسم کنترل سطح را برای رفتار الکتروشیمیایی کافین بر روی سطح الکتروود اصلاح شده پیشنهاد می‌نماید. بر اساس تئوری لاورن (۲۲)، ثابت نرخ انتقال الکترون (ks) و ضریب انتقال بار (α) را نیز می‌توان با اندازه‌گیری تغییر پتانسیل پیک با سرعت روبش محاسبه کرد. مقادیر پتانسیل پیک متناسب با لگاریتم سرعت اسکن برای سرعت پویش ۰/۰۱ تا ۰/۰۷ ولت بر ثانیه می‌باشد (همانطور که در تصویر ۳-C، نشان داده شده است). مقدار ضریب انتقال الکترون (α)، از روی شیب نمودار پتانسیل در مقابل لگاریتم سرعت و با استفاده از معادله $(E_{pa} = E_{pc} - 2.3030 (RT / (1 - \alpha) nF) \log (v))$ برای اکسیداسیون کافین بر روی سطح الکتروود اصلاح شده (قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون) به دست می‌آید. بر سطح این الکتروود اصلاح شده؛ ضریب انتقال بار به میزان α برابر ۰/۶۵ بدست آمد. همچنین لگاریتم ثابت سرعت انتقال الکترون برابر با $3/39 (s^{-1})$ از روی (معادله ۱) محاسبه گردید. مقدار به دست آمده بالای لگاریتم ثابت سرعت؛ توانایی الکترو کاتالیزوری بالا و مناسب الکتروود اصلاح شده (قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون) به منظور اکسیداسیون کافین را توجیه می‌نماید. غلظت سطح الکتروود فعال Γ ، را نیز می‌توان از روی شیب نمودار جریان در برابر سرعت روبش بر اساس (معادله ۱) محاسبه کرد. مقدار محاسبه شده Γ یا غلظت لایه اکتیو سطح نیز برابر با $3/4 \times 10^{-4}$ (میلی مول بر مجذور سانتیمتر مربع) برای این الکتروود اصلاح شده پیشنهادی به دست آمد؛ جایی که (V) سرعت و یا نرخ شیب، (A) مساحت سطح و دیگر علامت‌ها معنای معمول خود را دارند. بنابراین، نتایج به دست آمده حاکی از یک سطح قابل دسترسی مناسب با توانایی انتقال بار خوب برای اکسیداسیون کافین در سطح الکتروودهای اصلاح شده می‌باشد. الکتروولیت پشتیبان و تنظیم قدرت یونی نیز ممکن است حساسیت، شدت و پاسخ الکتروشیمیایی آنالیت اندازه‌گیری شونده (کافین) را بر سطح الکتروودهای اصلاح شده تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین، اثر غلظت‌های مختلف نمک بر ولتاموگرام موج مربعی ۱۵۰ میکرومولار از کافین با استفاده از الکتروولیت‌های پشتیبان شده نظیر پتاسیم نیترا ت، سدیم نیترا ت، پتاسیم پرکلرا ت و سدیم پرکلرا ت مورد بررسی قرار گرفت. غلظت هر الکتروولیت پشتیبان در محلول آزمون، بین صفر تا ۲ میلی‌مولار از این نمک‌ها به طور مجزا تغییر یافت. نتایج نشان داد که حداکثر حساسیت و شدت جریان پیک هنگامی است که سدیم

تکرار اندازه‌گیری در حضور حسگر معرفی شده می‌باشند. بر اساس نتایج بدست آمده از پاسخ این حسگر، انحراف‌های استاندارد نسبی به دست آمده، همگی از لحاظ تجزیه‌ای قابل قبول بوده و خطاهای رضایت‌بخشی را جهت سنجش مقدار کافئین موجود در نمونه‌های نوشیدنی و دارو نشان می‌دهند. لذا این روش پیشنهادی در آنالیز نمونه‌های حقیقی حاوی کافئین، دارای پتانسیل بالایی بوده که می‌تواند یک جایگزین مناسب برای سنجش کافئین در اندازه‌گیری‌های روتین آزمایشگاهی محسوب گردد.

حاوی تنها کافئین بود؛ پایه اندازه‌گیری نسبت تحمل بود. همانطور که در جدول A نشان داده شده است، حسگر پیشنهاد شده دارای گزینش پذیری عالی نسبت به کافئین است که می‌تواند آنرا به عنوان یک کاندیدای مناسب برای اندازه‌گیری و تشخیص کافئین در نمونه‌های نوشیدنی و مکمل‌های دارویی معرفی نمود. همچنین جهت اعتبار سنجی روش پیشنهاد شده؛ الکتروود اصلاح شده (قلم گرافیت/ نانونقره/ پروپیلولون) برای تعیین مقدار کافئین در نمونه‌های نوشیدنی (نوشابه) و دارویی (مکمل‌های دارویی) مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های موجود در جدول B، میانگین پنج



تصویر ۳- (A) اثر سرعت رویش در محدوده ۰/۰۱ تا ۰/۰۹ ولت بر ثانیه بر روی پاسخ ولتامتری چرخه‌ای الکتروود اصلاح شده (قلم گرافیت/ نانو نقره/ پروپیلولون) نسبت به ۱۵۰ میکرومولار از پاسخ کافئین در pH بهینه برابر با سه. (B) تغییرات خطی جریان بر حسب سرعت. (C) تغییرات خطی پتانسیل بر حسب لگاریتم سرعت. (D) ولتاموگرام‌های موج مربعی و پاسخ الکتروشیمیایی الکتروود اصلاح شده (قلم گرافیت/ نانونقره/ پروپیلولون) به غلظت‌های مختلف کافئین در شرایط شیمیایی و دستگاهی بهینه شده. (E) منحنی کالیبراسیون خطی استخراج شده به صورت جریان (میکروآمپر) بر حسب غلظت (نانومولار)

جدول A: آستانه تحمل به دست آمده برای پاسخ الکتروشیمیایی حسگر پیشنهادی نسبت به ۱۵۰ میکرومولار از کافئین در حضور برخی از مواد خارجی.

تداخل‌کننده	نسبت غلظت مزاحم به کافئین	تداخل‌کننده	نسبت غلظت مزاحم به کافئین
Cu ²⁺	۳۹۰	Co ²⁺	۳۴۰
Cd ²⁺	۷۱۰	Fe ³⁺	۳۶۰
Zn ²⁺	۶۹۰	Fe ²⁺	۳۸۰
K ⁺	۱۴۰۰	Glucose	۱۱۰۰
Mn ²⁺	۸۲۰	Vitamin A, vitamin E	۱۲۵۰
CTAB, Thiourea, urea	≥ ۱۳۳۰	Ammonia	۸۶۰
acid benzoic	۷۸۰	Vitamin C	۹۱۰
NO ₃ ⁻	۱۵۲۰	L-cysteine	۱۳۲۰

جدول B: کاربرد تجزیه‌ای حسگر پیشنهاد شده برای تعیین محتوای کافئین در نمونه‌های نوشابه و کپسول‌های ویتامین - مواد معدنی حاوی کافئین (پنج تکرار).

نمونه	مقدار تزریق شده کافئین (نانو مولار)	مقدار تعیین شده توسط حسگر کافئین (نانومولار)
نوشیدنی (کوکا کولا)	۵۵	۵۸/۷۵ ± ۳/۹۹ (انحراف استاندارد نسبی ۶/۷۹ درصد)
نوشیدنی (کوکا کولا)	۸۵	۸۹/۳۶ ± ۴/۷۵ (انحراف استاندارد نسبی ۵/۳۱ درصد)
نوشیدنی (کوکا کولا)	۱۱۵	۱۱۰/۳۳ ± ۴/۵۲ (انحراف استاندارد نسبی ۴/۱۰ درصد)
کپسول مولتی ویتامین - مواد معدنی	۵۵	۵۷/۹۵ ± ۳/۱۲ (انحراف استاندارد نسبی ۵/۳۸ درصد)
کپسول مولتی ویتامین - مواد معدنی	۸۵	۸۸/۹۸ ± ۴/۱۲ (انحراف استاندارد نسبی ۴/۶۳ درصد)

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، یک حسگر الکتروشیمیایی بر اساس ترسیب الکتروشیمیایی نانو ذرات نقره و پردنیزولون بر روی سطح الکتروود قلم گرافیت با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای ساخته شده است. حسگر پیشنهادی (قلم گرافیت/ نانو نقره/ پردنیزولون)، فعالیت الکتروکاتالیستی عالی نسبت به اکسیداسیون کافئین از خود نشان داد. نانو ذرات نقره و پردنیزولون توانستند به خوبی، حساسیت الکتروود را نسبت به کافئین افزایش دهند. همچنین حسگر الکتروشیمیایی پیشنهاد شده دارای دامنه پاسخ خطی وسیع، قابلیت تکثیر خوب، حساسیت بالا، پایداری طولانی مدت (حداقل چهار ماه استفاده مکرر) و حد تشخیص پایین می‌باشد. این روش پیشنهادی نیز برای تشخیص کافئین در نمونه‌های نوشیدنی (نوشابه) و مکمل‌های دارویی با نتایج مطلوب استفاده گردید. نتایج نشان داد که این الکتروود اصلاح شده، کاندیدای مناسبی برای تعیین الکتروشیمیایی کافئین در نمونه‌های واقعی حاوی آن در محیط‌های بیولوژیک و غیر بیولوژیک می‌باشد. علاوه بر این، استفاده از مواد نانوساختار مانند نانو لوله‌ها، نانو ذرات فلزی و نانو فیبرها در سطح الکتروودهای عریان مانند طلا، پلاتین، گلاسی کربن و غیره، به شرط بالا بردن رسانایی مواد مذکور، می‌توانند ماهیت جدیدی را به سطح این الکتروودها بدهند. جهت افزایش گزینش پذیری سطح اصلاح شده این الکتروودها، از انواع مختلف شناساگرهای الکترو فعال، آبتامرها و کورشل‌های مغناطیسی می‌توان استفاده نمود. استفاده از پلیمرهای هادی مانند پلی‌آنیلین، پلی‌تیوفن، پلی‌هیستدین

و پلی پیرول گزینه‌های مناسبی برای زیر لایه‌های الکتروودی و لایه‌های میانی حسگرهای حساس به کافئین می‌باشند.

قدردانی

مؤلفین مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری‌ها و همراهی دانشگاه آزاد اسلامی کرمانشاه جهت در اختیار گذاشتن امکانات پژوهشی تقدیر نمایند. ضمناً در این مقاله حق مالکیت مؤلفین و دانشگاه رعایت شده است.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی ندارد.

منافع مالی

منافع مالی ندارد.

منافع متقابل

منافع متقابلی ندارد.

مشارکت مولفان

کلیه مولفان در تمام مراحل تالیف و انتشار این اثر مشارکت داشته‌اند.

References

- Martinez BMJ, Ucles S, Hernando MD, Davoli E, Fernandez-Alba AR. Research article Abstract only Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Water Res* 2011;45:2331-41. doi: 10.1016/j.watres.2011.01.011.
- Barres R, Yan J, Egan B, Trebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 2012;15:405-11. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.001.
- Wardle MC, Treadway MT, de Wit H. Caffeine increases psychomotor performance on the effort expenditure for rewards task, *Pharmacology. Biochem Behave* 2012;102:526-31. doi: 10.1016/j.pbb.2012.06.016.
- Peck JD, Leviton A, Cowan LD. A review of the epidemiologic evidence concerning the reproductive health effects of caffeine consumption, *Food Chem. Toxicology* 2010;48:2549-76. doi: 10.1016/j.fct.2010.06.019.
- Murthy PS, Naidu MM. Resource. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition. *Conserve Recy* 2012;66:45-58. doi: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005.
- Daghbouche Y, Garrigues S, Vidal M. Flow Injection Fourier Transform Infrared Determination of Caffeine in Soft Drinks. *Anal Chem* 1997;69:1086-91. doi:10.1021/ac960693v.
- Al-Othman ZA, Aqel A, Alharbi MKE, Badjah-Hadj-Ahmed YA, Al-Warthan AA. Fast chromatographic determination of caffeine in food using a capillary hexyl methacrylate monolithic column. *Food Chem* 2012;132:2217-32. doi: 10.1021/ie010558v
- Glade MJ. Caffeine-Not just a stimulant. *Nutrition* 2010;26:932-8. doi: 10.1016/j.nut.2010.08.004
- Campo G del, Berregi I, Caracena R, Zuriarrain J. Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonal line and 5-(hydroxyethyl) furfural in soluble coffees by 1H NMR spectrometry. *Talanta* 2010;81:367-71. doi: 10.1016/j.talanta.2009.12.010.
- Svorc L, Sochr J, Tomcik P, Rievaj M, Bustin D. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. *Electrochim Acta* 2012;68:227-34. doi: 10.1016/j.electacta.2012.02.071.
- Desimoni E, Brunetti B, Bacchell R. Cathodic, Stripping Volta metric Determination of Platinum in Some Foods and

- Beverages at ng/g Level under Statistical Control. *Electro analysis* 2002;14:459-61. doi: 10.1002/1521-4109(200203)14.
12. Sinija VR, Mishra HN. FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules. *LWT Food Sci Technol* 2009;42:998-1002. doi: 10.1016/j.lwt.2008.12.013.
 13. del Campo G, Berregi I, Caracena R, Zuriarrain J. Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by ¹H NMR spectrometry. *Talanta* 2010;81:367-71. doi: 10.1016/j.talanta.2009.12.010.
 14. Jafari MT, Rezaei B, M Javaheri. A new method based on electrospray ionization ion mobility spectrometry (ESI-IMS) for simultaneous determination of caffeine and theophylline. *Food Chem* 2011;126:1964-70. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.054.
 15. Fei S, Chen J, Yao SZ, Deng G, He D, Kuang Y. Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum. *Anal Biochem* 2005;339:29-35. doi: 10.1016/j.ab.2004.11.026
 16. Kumar N, Goyal R. Silver nanoparticles decorated graphene nanoribbon modified pyrolytic graphite sensor for determination of Histamine. *Sens Actuators B Chem* 2018;268:383-91. doi: 10.1016/j.snb.2018.04.136.
 17. Wang J, Kawde A, Sahlin E. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. *Analyst* 2000;125:5-7. doi: 10.1039/A907364G.
 18. Molla T, Alemnew G, Merid T, Shimelis A. Simultaneous determination of caffeine and paracetamol by square wave voltammetry at poly(4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *Food Chem* 2016;210:156-62. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.106.
 19. Habibi B, Abazari M, Pournaghi-Azar MH. A Carbon Nanotube Modified Electrode for Determination of Caffeine by Differential Pulse Voltammetry. *Chinese Journal of Catalysis* 2012;33(11-12):1783-90. doi: 10.1016/S1872-2067(11)60438-5.
 20. Gao Y, Wang H, Guo L. Simultaneous determination of theophylline and caffeine by large mesoporous carbon/Nafion modified electrode. *J Electroanal Chem* 2013;706:7-12.
 21. Chitravathi S, Munichandraiah N. Voltammetric determination of paracetamol, tramadol and caffeine using poly (Nile blue) modified glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem* 2016;764:93-103. doi: 10.1016/j.jelechem.2016.01.021.
 22. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusion less electrochemical systems. *J Electroanal. Chem. Inter. Electrochemical* 1979;101:19-28. doi: 10.1016/S0022-0728(79)80075-3.