

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Κατεύθυνση Αναλυτικής Χημείας, Χημείας και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος και Τροφίμων

Νανοσυμπλέγματα χαλκού ως πλατφόρμες φθορισμού για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας οινοπνευματωδών ποτών σε μεθανόλη και οργανικών διαλυτών σε νερό καθώς και ως νανοένζυμο μιμούμενο την υπεροζειδάση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ ΔΑΚΙΔΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023

© 2023 Καλλιρρόη Δακίδη

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης

Καλλιρρόη Δακίδη

A.M.: 1372

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπαδέκα Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σακκάς Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

«Είμαστε νάνοι στους ώμους γιγάντων και γι' αυτό μπορούμε να βλέπουμε πιο μακριά απ' αυτούς.»

Ισαάκ Νεύτων

«Ει γαρ κεν και σμικρόν επί σμικρώ καταθείο και θαμά τούτ ' έρδοις, τάχα κεν μέγα και το γένοιτο.»

-Αν βάζεις ακόμα και μικρό πάνω στο μικρό, και το κάνεις αυτό τακτικά, σύντομα κι' αυτό θα γίνει μεγάλο.

Ησίοδος

Αφιερωμένο στην οικογένειά μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών (ΠΜΣ) του Τμήματος Χημείας, με κατεύθυνση: «Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Σταλίκα κατά την περίοδο 2021-2023.

Θα ήθελα να ξεκινήσω ευχαριστώντας ορισμένους από τους ανθρώπους που διαδραμάτισαν καταλυτικό ρόλο στην υλοποίηση αυτής της προσπάθειας μέσω της πολύτιμης συνεργασίας και των συνεισφορών τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Κωνσταντίνο Σταλίκα. Για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αποδεχόμενος να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα, στην εκπόνηση του θέματος της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για τη συνεχή βοήθειά του. Οι διορατικές παρατηρήσεις του έδωσαν το έναυσμα για την ανάπτυξη της διατριβής μου. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Θεόδωρο Χατζημητάκο για τη συνεχή παροχή πρακτικής βοήθειας, κατάρτισης και πληροφοριών όποτε το ζήτησα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια Μπαδέκα Αναστασία και τον αναπληρωτή καθηγητή Σακκά Βασίλειο για την ανάληψη του ρόλου της τριμελής εξεταστικής επιτροπής της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για τις σημαντικές παρατηρήσεις και διορθώσεις τους στο κείμενο της διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης, οφείλω σε όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΔΙΠ του τομέα Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαίτερα στον καθηγητή κ. Μάμαντο Προδρομίδη για την αρμονική συνύπαρξη στο εργαστηριακό περιβάλλον. Ακόμα, στην κ. Φλώρου Αγγελική και Πιπερίδη Χριστίνα για την εξαιρετική μας συνεργασία κατά την διάρκεια του επικουρικού μου έργου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές και συναδέλφους μου, Φοίβη, Θώμη, Αλκιβιάδη, Ιωάννη και Άννη που γνώρισα και συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια των σπουδών. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στις συμφοιτήτριες μου Ελευθερία και Ιωάννα για την συνεχή υποστήριξή τους τόσο σε θέματα εργασιακά όσο και ψυχολογικά. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους Δήμητρα, Μαρία, Σταμάτη, Αλέξανδρο, Μαρία και Ελένη από την ομάδα του κ. Προδρομίδη για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε στο χώρο του εργαστηρίου και για όλες τις όμορφες μέρες και εμπειρίες που μοιραστήκαμε.

Θα ήθελα να εκφράσω ξεχωριστές ευχαριστίες σε όλους τους φίλους μου εκτός και εντός πανεπιστημίου για την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν, προκειμένου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου και γενικότερα τους στόχους μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, αν και οι λέξεις είναι πολύ λίγες ώστε να εκφράσουν όλα αυτά τα χρόνια που πέρασαν και όλα αυτά που θα έρθουν.

Περιεχόμενα

KEΦAΛAIO 1 ^o - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
1.1. Μεταλλικά νανοσυμπλέγματα (Nanoclusters)	16
1.1.1. Ορισμός – Ιδιότητες	16
1.1.2. Σύνθετα υλικά με βάση τα CuNCs	
1.1.3. Μέθοδοι σύνθεσης των CuNCs	19
1.1.3.1. Τοp-Down μέθοδος σύνθεσης	20
1.1.3.2. Bottom-Up μέθοδος σύνθεσης	21
Σύνθεση μέσω προτύπου ή εκμαγείου	21
Π Ηλεκτροχημική σύνθεση	25
Π Μικρογαλάκτωμα Water-in-Oil (w/o)	
🛛 Ηχοχημική σύνθεση	27
Σύνθεση με τη βοήθεια μικροκυμάτων	
Προποποιημένη τεχνική Brust–Schiffrin	
 1.1.4. Ιδιότητες των νανοσυμπλεγμάτων Cu 	
1.1.4.1. Απορρόφηση	
1.1.4.2. Φθορισμός	
Εξάρτηση του φθορισμού από το μέγεθος των CuNCs	
Εξάρτηση του φθορισμού από τον συνδετικό υποκαταστάτη των CuNCs	
Εξάρτηση του φθορισμού των CuNCs από τον διαλύτη	
Εκπομπή που προκαλείται από συσσωμάτωση	
🛛 Φθορισμός δύο φωτονίων	
1.1.4.3. Καταλυτικές ιδιότητες των NCs	
1.1.4.4. Ηλεκτροχημειο-φωταύγεια των NCs	
1.1.4.5. Χημειοφωταύγεια	
1.2. Η Παρουσία Νερού σε Οργανικούς Διαλύτες	
1.2.1. Πλεονεκτήματα των νανοϋλικών στην ανίχνευση υγρασίας με φθορισμο	540
1.3. Η Παρουσία Μεθανόλης (MeOH) σε Αλκοολούχα Ποτά	
1.4. Ένζυμα και Ενζυμική Δράση	
1.4.1. Ενζυμική μίμηση	43
1.4.2. Υπεροξειδάση (Peroxidase)	44
1.4.3. Βρόχινο νερό	46
1.4.4. Ανάλυση δεδομένων με τη χρήση ενζύμων	46
1.4.5. Μοντέλα αρχικών ταχυτήτων σε συνθήκες περίσσειας	49

1.5. Σκοπός του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ⁰ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύτες – Υλικά	
2.2. Όργανα και Συσκευές	53
2.3. Προετοιμασία δειγμάτων	54
2.4. Πειραματικές Πορείες	54
2.4.1. Σύνθεση των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού (CuNCs) σε DMF	54
2.4.2. Σύνθεση των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού (CuNCs) σε H ₂ O	54
2.4.3. Βελτιστοποίηση προσδιορισμού των αναλυτών	55
2.4.3.1. Προσδιορισμός υγρασίας	55
2.4.3.2. Προσδιορισμός MeOH	55
2.4.3.3. Προσδιορισμός H2O2 μέσω ενζυμικής μίμησης	55
2.5. Χαρακτηρισμός των CuNCs	56
2.5.1. Φωτοηλεκτρονιακή φασματοσκοπία ακτίνων Χ	56
2.5.2. Φασματοσκοπία UV/Vis	56
2.5.3. Φασματοσκοπία FT-IR	
2.5.4. Ανάλυση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)	
2.6. Υπολογισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K _M)	57
KΕΦΑΛΑΙΟ 3O – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1. Χαρακτηρισμός των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού	
3.1.1. Χαρακτηρισμός των CuNCs-DMF με φασματοσκοπία FT-IF	₹58
3.1.2. Χαρακτηρισμός των CuNCs-H2O με φασματοσκοπία FT-IR	59
3.1.3. Χαρακτηρισμός των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού με φωτοηλ φασματοσκοπία ακτίνων Χ	εκτρονιακή 60
3.1.4. Φασματοσκοπία UV-Vis	64
3.1.5. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) και επιφανειακό φορτίο	65
3.2. Μελέτη των συνθέσεων των CuNCs για τον προσδιορισμό των	ν αναλυτών69
3.2.1. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός υγρασίας σε πολικούς ορ τη χρήση των CuNCs-DMF	γανικούς διαλύτες με 69
3.2.2. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός MeOH σε οινοπνευματώδ CuNCs-DMF	δη ποτά με τη χρήση 77
3.2.2.1. Επίδραση του pH στα παραγόμενα CuNCs-DMF σε διαλύ EtOH/H2O/MeOH	ματα 81
3.2.2.2. Αναλυτικά αποτελέσματα του φθορισμομετρικού προσδιο	ρισμού MeOH σε
οινοπνευματώδη ποτά με τη χρήση των CuNCs-DMF	

3.2.3. Φθορισμομετρικός κινητικός προσδιορισμός του H2O2 με τη χρήση CuNCs-H2O και ο-φαινυλενοδιαμίνη	3
3.2.3.1. Επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος στην κινητική του CuNCs-H ₂ O ως μιμικής υπεροξειδάσης, παρουσία H ₂ O ₂	9
 3.2.3.2. Αναλυτικά αποτελέσματα φθορισμομετρικού κινητικού προσδιορισμού του H₂O₂ σε βρόχινο νερό με τη χρήση CuNCs-H₂O και ο-φαινυλενοδιαμίνη	4
3.3. Μηχανισμοί φθορισμού και απόσβεσης των CuNCs	9
3.3.1. Σύνθεση CuNCs-DMF	9
3.3.2. Μηχανισμός φθορισμού των CuNCs-H2O10	0
KΕΦΑΛΑΙΟ 4 [°] – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	2
ПЕРІЛНΨН	3
ABSTRACT	4
KΕΦΑΛΑΙΟ 5O – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	5

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Η τοποθέτηση των νανοϋλικών στην κλίμακα του μεγέθους.	_16
Εικόνα 2: Απεικόνιση των νανοσυμπλεγμάτων, η χημική τους ποικιλότητα και οι διαφορετικ	τές
μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πεδία εφαρμογής τους	_18
Εικόνα 3: Ταξινόμηση των νανοϋλικών με βάση τη διάστασή τους	_19
Εικόνα 4: Συνθετικές στρατηγικές νανοσυμπλεγμάτων χαλκού.	_20
Εικόνα 5: Σχηματικές απεικονίσεις της σύνθεσης CuNCs χρησιμοποιώντας τετρακις 3-	22
μερκαπισπροπιονική πενιαερυορπολη ως προτοπο.	
Είκονα δ . (Α) Απεικονιοή της δυνσεοής και της εφαρμογής των CuNCs. (Β) Ζχηματική παράσταση μεθόδου αντίδρασης που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση CuNCs σε διάλυμα	
κελλουλάσης. (Γ) Διαγραμματική απεικόνιση της ανίχνευσης της ντοπαμίνης χρησιμοποιώντα BSA CuNC που συντέθηκε παρουσία H ₂ O ₂	ας _23
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης exonuclease ΙΙΙ με βάση τα φθορίζοντα Cu με πρότυπο dsDNA.	NC _25
Εικόνα 8: Σχηματική παράσταση της εξέλιζης του μεγέθους νανοσυμπλέγματος χαλκού Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής σύνθεσης σε υπερήχους των GSH-CuNC	_27 [s. _28
Εικόνα 10: Διαφορετικές ιδιότητες των CuNCs και παράγοντες που τις επηρεάζουν.	_30
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής των DHLA-CuNCs.	_31
Εικόνα 12 : (α) Φάσματα PL των PEI-CuNCs σε υδατικό διάλυμα (μια σημαντική μετατόπισ του κόκκινου), 25 °C (1.8 nm), 90 °C (2.8 nm), 150 °C (3.5 nm). (β) Φάσματα UV–Vis των προσχηματισμένων CuNPs και των προκύπτοντων PEI-CuNCs παρασκευασμένων σε διαφορετικές θεομοκομπίες (25, 50, 90 και 150 °C)	- η 33
εικόνα 13: Ελενγόμενη αναγωγή συμπλεγμένων με DNA ιόντων Cu^{2+} σε προεπιλεγμένα	_33
τμήματα του ssDNA για σχηματισμό νανοσωματιδίων. Cu-ssDNA (μπλε) αντιπροσωπεύει το ssDNA που μπορεί να χρησιμεύσει ως πρότυπο εκμαγείο για το σχηματισμό CuNCs. Το μέγει των CuNCs που σχηματίζονται εξαρτάται από το μήκος του CussDNA. Το NCu-ssDNA (πράσινο) αντιπροσωπεύει το ssDNA χωρίς τη δυνατότητα του σχηματισμού CuNCs, τα οποί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνδεση των νανοσωματιδίων μεταξύ τους για τη δυμουργία σύνθετων νανοδομών	θος ία 31
σημιουργία συνσείων νανοσομων	_34 35
Εικόνα 14: Ισιοτητές φοορισμου των Curves σε συναρτηση με τους στακοτές. Εικόνα 15: Χαρακτηριστικά παραδείγματα των τεχνολογικών εφαρμογών του ΑΙΕΕ υλικά. Εικόνα 16: Σχηματική παράσταση των στρατηγικών για τη βελτίωση της απόδοσης ECL μεταλλικών NCs.	_36 _36 _38
Εικόνα 17: Παρασκευή νανοσύνθετων κβαντικών κουκκίδων άνθρακα/CuNCs με φθορισμό	;
διπλής εκπομπής για την ανίχνευση ιχνών νερού σε οργανικό διαλύτη.	_41
Εικόνα 18: Διάγραμμα διαφόρων νανοϋλικών για την ανίχνευση του νερού και της υγρασίας	; με
φθορισμό	_42
Εικόνα 19: Χρονοδιάγραμμα για την ανάπτυζη εγγενών μιμήσεων υπεροζειδάσης με βάση	
νανοϋλικά	_45
Εικόνα 20: Γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten	_48
Εικόνα 21: Ένα παράδειγμα γραφικής παράστασης Lineweaver-Burke	_49
Εικόνα 22: Διάγραμμα συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρόνο για τα αντιδρώντα που φαίνον	ται
στην εξίσωση (9) σε συνθήκες περίσσειας υποστρώματος. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζ	,E1

τη διαρκεία της ενζομικής πειτοργίας σε ένα τοπικό πειραμά ετοι ώστε να τόχοει η εξισώση	
Michaelis-Menten	_50
Εικόνα 23: Διάγραμμα συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρόνο για τα αντιδρώντα που φαίνον	ται
στην εξίσωση (8) σε συνθήκες περίσσειας ενζύμου. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει τη	
διάρκεια της ενζυμικής λειτουργίας σε ένα τυπικό πείραμα έτσι ώστε να ισχύει η εξίσωση	
Michaelis-Menten	_51
Εικόνα 24: Φάσμα FTIR των παρασκευασμένων CuNCs-DMF	_59
Εικόνα 25: Φάσμα FTIR της GSH	_59
Εικόνα 26: Φάσμα FTIR των παρασκευασμένων CuNCs-H ₂ O	_60
Εικόνα 27: Φάσμα σάρωσης XPS σε δείγμα CuNCs-H ₂ O	_62
Εικόνα 28: Ανάλυση κορυφής Cu2p φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης, του)
δείγματος CuNCs-H2O	_62
Εικόνα 29: Ανάλυση κορυφής N1 φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης, του	
δείγματος CuNCs-H2O	_63
Εικόνα 30: Ανάλυση κορυφής S2p φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης, του	
δείγματος CuNCs-H2O	_63
Εικόνα 31: Ανάλυση κορυφής C1s φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης, του	
δείγματος CuNCs-H2O	_64
Εικόνα 32: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού	_64
Εικόνα 33: Τα CuNCs-DMF σε διάλυμα DMF και η στερεή του φάση υπό το φως της ημέρα	ς.
	_65
Εικόνα 34: Το διάλυμα CuNCs-H ₂ O στο νερό (μεσαία φωτογραφία), στη στερεή του φάση	
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φ	$\omega \zeta$
(δεζιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φ (αριστερή φωτογραφία)	ως _65
(δεζιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φ (αριστερή φωτογραφία) Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη	ως _65 _66
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία). Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη. Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8.	ως _65 _66 _66
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία). Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη. Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8. Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό.	ως _65 _66 _66 _67
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία). Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη. Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8. Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό. Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ΕtOH: H ₂ O 40:60.	ως _65 _66 _66 _67 _67
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία). Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη. Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8. Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό. Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60. Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60.	ως _65 _66 _66 _67 _67 _67
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία). Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη. Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8. Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό. Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60. Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60. Εικόνα 40: ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό. Εικόνα 40: ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό.	ως _65 _66 _66 _67 _67 _67 _68
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία). Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη. Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8. Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό. Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60. Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH : H ₂ O 40:60. Εικόνα 40: ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό. Εικόνα 41: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό.	ως _65 _66 _67 _67 _67 _68 _68
(δεξίά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία) Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8 Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60 Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH : H ₂ O 32:8:60 Εικόνα 40: ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 41: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 42: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε DMF	ως _65 _66 _67 _67 _67 _68 _68 _68
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία) Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8 Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60 Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH : MeOH : H ₂ O 32:8:60 Εικόνα 40: ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 41: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 42: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 43: Γραφική παράσταση του φθορισμού των CuNCs-DMF στους διάφορους	ως _65 _66 _67 _67 _67 _68 _68 _68 _69
(δεξίά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία) Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H_2O 92:8 Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H_2O 40:60 Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH : H_2O 32:8:60 Εικόνα 40: ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 41: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 42: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε DMF Εικόνα 43: Γραφική παράσταση του φθορισμού των CuNCs-DMF στους διάφορους οργανικούς διαλύτες για διαφορετικές περιεκτικότητες υγρασίας, (A): DMF, (B): ACN, (Γ):	ως _65 _66 _67 _67 _67 _68 _68 _68 _69
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _69
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία) Εικόνα 35 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη Εικόνα 36 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H ₂ O 92:8 Εικόνα 37 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό Εικόνα 38 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H ₂ O 40:60 Εικόνα 39 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH : MeOH : H ₂ O 32:8:60 Εικόνα 40 : ζ δυναμικό των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 41 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 42 : Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H ₂ O σε νερό Εικόνα 43 : Γραφική παράσταση του φθορισμού των CuNCs-DMF στους διάφορους οργανικούς διαλύτες για διαφορετικές περιεκτικότητες υγρασίας, (A): DMF, (B): ACN, (Γ): MeOH, (Δ): DMSO, (E): EtOH, (ΣΤ): IPA, με λex= 310 nm Εικόνα 44 : Γραφική παράσταση της εζάρτησης του φθορισμού των CuNCs-DMF στο DMF	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _68 _69 _70 σε
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _68 _69 _70 σε
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _69 _70 σε 71
(δεξίά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _69 _70 σε
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _68 _69 _70 σε _71 _72
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _69 _70 σε _71 _72
(δεξίά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _68 _69 _70 σε _71 _72 _72
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	ως _65 _66 _67 _67 _67 _67 _67 _68 _68 _69 _70 σε _71 _72 _72 _73
(δεξιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φω (αριστερή φωτογραφία)	$\omega \varsigma$ $_{-65}^{-66}$ $_{-67}^{-67}$ $_{-67}^{-67}$ $_{-67}^{-68}$ $_{-68}^{-69}$ $_{-70}^{-70}$ $\sigma \varepsilon$ $_{-71}^{-72}$ $_{-73}^{-73}$

Εικόνα 48: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε ΕtOH συναρτήσει της	
περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/610 nm	74
Εικόνα 49: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε IPA συναρτήσει της	
περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/605 nm	74
Εικόνα 50: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε MeOH συναρτήσει της	
περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/600 nm	75
Εικόνα 51: Φάσματα φθορισμού των CuNCs-DMF στους οργανικούς διαλύτες EtOH και	
MeOH, μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα σε νερό των διαλυμάτων στην περιοχή 0-100 %, μ	3!
(A) EtOH και (B) MeOH σε $\lambda ex/\lambda em = 310/660$ nm.	77
Εικόνα 52: Φάσματα φθορισμού των CuNCs-DMF σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση MeOH	
σε (A) (EtOH+MeOH):H ₂ O 20:80, (B) (EtOH+MeOH):H ₂ O 40:60 και (Γ)	
$(EtOH+MeOH):H_2O \ 60:40, \ \mu\epsilon \ \lambda ex/\lambda em = 310/660 \ nm.$	79
Εικόνα 53: Γραφική παράσταση της αύζησης του φθορισμού των CuNCs-DMF σε	
$(EtOH+MeOH):H_2O$ 40:60, $(EtOH+MeOH):H_2O$ 20:80 кал $(EtOH+MeOH):H_2O$ 60:40, ул	α
διάφορες συγκεντρώσεις MeOH με λ ex/ λ em= 310/660 nm	80
Εικόνα 54: Γραφική παράσταση του φθορισμού σε συνάρτηση με την εκατοστιαία	
περιεκτικότητα της MeOH σε συγκεντρώσεις CuNCs-DMF: 0,71 mg/mL, 1,43 mg/mL και 2,9)
mg/mL , $\mu\epsilon \lambda ex/\lambda em = 310/660 nm$	81
Εικόνα 55: Γραφική παράσταση της αύζησης του φθορισμού σε pH: 4,0, 6,0 και 8,0 για	
περιεκτικότητα σε MeOH 1-10%.	82
Εικόνα 56: Φάσμα φθορισμού της ο-φαινυλενοδιαμίνης, όπου το μέγιστο εκπομπής	~ (
εμφανίζεται στα 350 nm μετά από διέγερση στα 300 nm.	84
Εικόνα 57: Φάσμα φθορισμού του συστήματος CuNCs-H ₂ O+OPD σε διαφορετικά μήκη	0.7
κυματος διεγερσης (310-380 nm).	83
Εικόνα 58 : Μεταβολη του ερυθρου φθορισμου (λex/λem= $310/660$ nm) του συστηματος	
CuNCs-H ₂ O (2,86 mg/mL) +OPD (0,12 mg/mL), με την προσθηκη H ₂ O ₂ (0,88 μg/mL) σε	0.0
συναρτηση με το χρονο.	80
EIKOVA 59 : METABONT TOU $\mu\pi\lambda\varepsilon \varphi\theta O \rho i\sigma\mu o v (\lambda ex/\lambda em = 300/350 nm)$ tou ouotifuatos CuNCs-	
$H_2O(2,80 \text{ mg/mL}) + OPD(0,12 \text{ mg/mL}), \mu \epsilon \tau \eta \nu \pi \rho \sigma \theta \eta \kappa \eta H_2O_2(0,88 \mu g/mL) \sigma \epsilon \sigma \nu \nu \alpha \rho \tau \eta \sigma \eta$	06
$\mu \varepsilon \ \tau o \ \chi \rho o vo. ______$	80
Elikova 60 : Metapozn tou $\mu\pi\lambda\epsilon \varphi \theta o \rho i \sigma \mu o v$ (<i>nex/nem</i> = 300/350 nm) kai $\epsilon \rho v \theta o \rho i \sigma \mu o v$)
$(\lambda ex/\lambda em = 510/000 \text{ nm})$ of oldstund CulvCs-H ₂ O (2,80 mg/mL), $\mu e \tau \eta v \pi \rho o \sigma \theta \eta \kappa \eta H_2O_2(0,88 mg/mL))$, 07
$\mu g/mL$)	0/
Likova 61 : Kivhtikh μ eketh tou epudpou φ dopid μ ou γ ia kex/kem = 510/000 nm, tou	00
$COUNTER CONCS-H_2O+OPD δε διαφορες δυγκεντρωσεις H_2O_2.$	00
LIKOVA 02 : KIVITIKI μ ELECTI TOU μ TLE φ OOPIO μ OU γ IA λ EX/LETT = 500/550 nm, tou ouotif μ atog	00
$Curves-H_2O+OFD$ of ordering the second state of the second stat	00
Likova 05 . 1 pawiki napaotaon ing tagotitag ing kivitiking augnong too wooptopoo yaa $\frac{1}{2} ar/2 am = 300/350 mm sa suukasnan sau uH sa suukasastika suukausakasus HaQa$	00
$F_{\rm rec}$ $h_{\rm rec}$ h_{\rm	90
$\lambda_{ax}/\lambda_{am} = 310/660 nm as any antion ton pH as suggestives any contrast Here.$	٥n
$F_{\rm Heatrice} = 510,000 {\rm mm}$ of $00 {\rm mm}$ of $00 {\rm mm}$ in $00 {\rm mm}$ of	70
Σιπόνα σ 5. Γραφική παραστασή της ταχοτητάς της κινητικής μετώσης του φυσρισμου για $\lambda_{ax}/\lambda_{am} = 310/660$ nm σε συνάστηση της Τ σε διαφορετικές συνκευτρώσεις H ₂ O ₂	01
F_{ik} όνα 66: Γραφική παράσταση της τανήτητας της κινητικής σύ ^χ ησης του φθορισμού για	/1
$\lambda_{ax}/\lambda_{am} = 300/350 $ nm σε συνάρτηση της Τ. σε διαφορετικές συνκευτρώσεις H ₂ O ₂	92
$m_{m} = 200,220$ mm of or optimal my 1, or on working of the three of the three three the three thre	14

Εικόνα 67: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής αύξησης του φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm σε συνάρτηση με την ιοντική ισχύ, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.

_____93

Εικόνα 68: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής μείωσης του φθορισμού για
$\lambda ex/\lambda em = 310/660$ nm σε συνάρτηση με την ιοντική ισχύ, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 .
93
Εικόνα 69 : Απεικόνιση της αρχικής ταχύτητας-κλίσης της αντίδρασης CuNCs-H ₂ O+OPD, για διαφορετικές συγκεντρώσεις H ₂ O ₂ μέσω της παρακολούθησης του φθορισμού σε λex/λem=
310/660nm. Αφορά την κλίση στα πρώτα 5 sec της καμπύλης της ταχύτητας της αντίδρασης. Το αρνητικό πρόσημο δείχνει την μείωση του φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση του Η ₂ O ₂ . 94
Εικόνα 70 : Απεικόνιση της αρχικής ταχύτητας-κλίσης της αντίδρασης CuNCs-H ₂ O+OPD, για διαφορετικές συνκευτρώσεις H ₂ O ₂ μέσει της παρακολούθησης του φθορισμού σε $\frac{1}{2}$ ar/l am=
300/350nm. Αφορά την κλίση στα πρώτα 5 sec της καμπύλης της ταχύτητας της αντίδρασης. Το αρνητικό πρόσημο δείχνει την μείωση του φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση του Η ₂ O ₂ . 95
Εικόνα 71: Γραμμική εξίσωση Lineweaver – Burk για τον ερυθρό φθορισμό σε λex/λem=
<i>310/660nm.</i> 96
Εικόνα 72 : Γραμμική εξίσωση Lineweaver – Burk για τον μπλε φθορισμό σε λex/λem=
300/350nm96
Εικόνα 73: Κινητική μελέτη του μπλε φθορισμού με λex/λem= 300/350 nm, του συστήματος
CuNCs-H ₂ O+OPD σε τρεις συγκεντρώσεις προσθήκης H_2O_2 σε δείγμα βρόχινου νερού98
Εικόνα 74: Κινητική μελέτη του ερυθρού φθορισμού με λex/λem= 310/660 nm, του συστήματος

 $CuNCs-H_2O+OPD$ от трелс συγκεντρώσεις προσθήκης H_2O_2 от δείγμα βρόχινου νερού. 99 **Енко́va** 75: Графікή παράσταση του μηχανισμού φθορισμού disaggregation. 100 **Εικόνа** 76: Γραφική παράσταση του μηχανισμού φθορισμού Self-Aggregation. 101

<u>Κατάλογος Πινάκων</u>

Πίνακας 1: % Συγκέντρωση συστατικού των Cu, N, S και C που προέρχεται από XPS Cu2p,	
NIs, S2p και CIs κορυφές αποσυνέλιξης και % ατομική συγκέντρωση σε δείγμα CuNCs-H ₂ O.	~ 1
)]
Πίνακας 2: % Ατομική συγκέντρωση Cu, N, S, Ο και C σε δείγμα CuNCs-H ₂ O	51
Πίνακας 3: LOD, LOQ, RSD μεθόδου προσδιορισμού υγρασίας σε διάφορους οργανικούς	
διαλύτες και ανακτήσεις σε τρία επίπεδα περιεκτικότητας υγρασίας	75
Πίνακας 4 : Σύγκριση των αναφερόμενων μεθόδων για τον προσδιορισμό νερού σε οργανικού	ς
διαλύτες με την προτεινόμενη μέθοδο	76
Πίνακας 5: LOD, LOQ για τρεις διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης:νερού, RSDs για τα	
αλκοολούχα ποτά και για τρεις διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης:νερού	<i>33</i>
Πίνακας 6 : Ανακτήσεις, RSDs για τα πραγματικά δείγματα σε διάφορες αναλογίες MeOHδ	<i>33</i>
Πίνακας 7: LOD, LOQ για λex/λem= 310/660 nm και λex/λem=300/350 nm9	95
Πίνακας 8 : Σύγκριση των πειραματικών τιμών των Κ _Μ και Vmax με αντίστοιχη βιβλιογραφία	
στην αντίδραση οζείδωσης της OPD (ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε το H_2O_2)	97
Πίνακας 9: Ανακτήσεις για το πραγματικό δείγμα για λex/λem= 310/660 nm και	
λex/λem=300/350 nm, σε τρείς διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2	9 9

Συντομογραφίες

NCs	νανοσυμπλέγματα	nanoclusters
CuNCs	νανοσυμπλέγματα χαλκού	copper nanoclusters
CuNPs	νανοσωματίδια χαλκού	copper nanoparticles
PEI	πολυαιθυλενοϊμίνη	polyethylenimine
DHLA	διυδρολιποϊκό οξύ	dihydrolipoic acid
PVP	πολυβινυλοπυρρολιδόνη	polyvinylpyrrolidone
BSA	αλβουμίνη ορού βοοειδών	bovine serum albumin
MNCs	μεταλλικά νανοσωματίδια	metal nanocomposites
ECL	ηλεκτροχημειοφωταύγεια	electochemiluminescence
SPR	συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων	surface plasmon resonance
λem	μήκος κύματος εκπομπής	excitation wavelength
λex	μήκος κύματος διέγερσης	emission wavelength
THF	τετραϋδροφουράνιο	tetrahydrofuran
	εκπομπή που προκαλείται από	aggregation induced emission
AIEE	συσσωμάτωση	enhancement
CL	χημειφωταύγεια	chemiluminescence
LOD	όριο ανίχνευσης	limit of detection
DMF	Ν,Ν-διμεθυλοφορμαμίδιο	dimethylformamide
CQDs	κβαντικές κουκίδες άνθρακα	carbon quantum dots
ACN	ακετονιτρίλιο	acetonitrile
HRP	υπεροξειδάση αγριοραφανίδων	horseradish peroxidase
TMB	3,3,5,5-τετραμεθυλοβενζιδίνη	3,3,5,5-tetramethylbenzidine
OPD	ο-φαινυλενοδιαμίνη	o-phenylenediamine
MeOH	μεθανόλη	methanol
DAP	διαμινοφαιναζίνη	2,3-diaminophenazine
EtOH	αιθανόλη	ethanol
IPA	ισοπροπανόλη	isopropyl alcohol
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο	dimethylsulfoxide
DLS	ανάλυση δυναμικής σκέδασης φωτός	dynamic light scattering

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^O - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Μεταλλικά νανοσυμπλέγματα (Nanoclusters)

1.1.1. Ορισμός – Ιδιότητες

Το 1974, ο Norio Taniguchi, καθηγητής στο Πανεπιστήμιο του Τόκιο, εισήγαγε τον όρο νανοτεχνολογία στο Διεθνές Συνέδριο της Αμερικάνικης Φυσικής κοινότητας (American Physical Society) [1]. Η νανοτεχνολογία είναι το πεδίο της επιστήμης που μελετά τη δημιουργία και χρήση λειτουργικών δομών με διαστάσεις που κυμαίνονται από 1 έως 100 nm και κάθε διαδικασία που λαμβάνει χώρα στη νανοκλίμακα. Τα μεταλλικά νανοσυμπλέγματα (nanoclusters, NCs) είναι ατομικά ακριβή, κρυσταλλικά υλικά που ανήκουν στην κατηγορία της νανοτεχνολογίας με διαστάσεις μερικά μόνο νανόμετρα (<10 nm). Στην Εικόνα 1 φαίνεται η σχέση μεγέθους των νανοϋλικών συγκρινόμενη με άλλα υλικά.



Εικόνα 1: Η τοποθέτηση των νανοϋλικών στην κλίμακα του μεγέθους.

Τα νανοσυμπλέγματα ατόμων μετάλλων είναι γέφυρες μεταξύ των ογκωδών υλικών (bulk) μετάλλων και των μορίων. Ο ηλεκτρονιακός περιορισμός στα ευγενή μέταλλα (Pd, Ag, Pt, Hg και Au κλπ.) στη νανοκλίμακα, έχει οδηγήσει σε τεράστιες προόδους στην επιστήμη και την τεχνολογία. Η χημική σύνθεση τέτοιων υλικών, ο χειρισμός και η αξιοποίηση των ιδιοτήτων τους σε αυτή την κλίμακα έχουν συμβάλει σε αυτή την πρόοδο. Τέτοιες ατομικά ακριβείς ενώσεις αποτελούνται από μερικά άτομα έως δεκάδες ατόμων μετάλλων με ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη (ο οποίος είναι μια βάση Lewis (δότης ζεύγους e⁻) που συνδέεται με το μεταλλικό άτομο σ' ένα σύμπλοκο) σχηματίζοντας μόρια καθορισμένης σύνθεσης [2].

Μεταλλικά νανοσυμπλέγματα με μεγέθη συγκρίσιμα με το μήκος κύματος του ηλεκτρονίου Fermi, δηλαδή μικρότερο από 2 nm, εμφανίζουν μοριακές και εξαρτώμενες από το μέγεθος οπτικές ιδιότητες, καθώς και μαγνητισμό, ισχυρές χειρόμορφες αποκρίσεις κλπ. Ως εκ τούτου, τα μεταλλικά NCs θεωρούνται γέφυρα μεταξύ μορίων και νανοσωματιδίων και οι κβαντισμένες και διακριτές τους καταστάσεις τα προικίζουν με πλούσια φασματικά χαρακτηριστικά μοριακής απορρόφησης [3]. Εκτός από τις παραπάνω ιδιότητες, τα συμπλέγματα των ευγενών μετάλλων είναι, επίσης, πολύ σταθερά νανοϋλικά. Σε αντίθεση με τα ευγενή μέταλλα, ο χαλκός είναι αρκετά ασταθής λόγω της υψηλής ευαισθησίας του μετάλλου στην οξείδωση. Η σταθερότητα των υλικών με βάση τον χαλκό και πιο συγκεκριμένα των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού (copper nanoclusters, CuNCs) έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον. Τις τελευταίες δεκαετίες, με την εφαρμογή ήπιων συνθηκών σύνθεσης και επιλέγοντας κατάλληλους υποκαταστάτες με μοναδικές δομές, το ζήτημα της σταθερότητας έχει λυθεί σε ένα βαθμό, οδηγώντας στον (επιλεκτικό) σχηματισμό δεκάδων συναρπαστικών δομών και γεωμετριών [4, 5, 6].

Χάρη στη χαμηλή τοξικότητά τους και την υψηλή βιοσυμβατότητά τους, την τελευταία δεκαετία, τα CuNCs χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς σε βιοϊατρικά και βιολογικά πεδία για in vitro και in vivo εφαρμογές [7,8], συμπεριλαμβανομένων μοριακών διαγνωστικών και περιβαλλοντικών αναλύσεων. Επιπλέον, ο χαλκός είναι φτηνότερος από τα ευγενή μέταλλα, επηρεάζοντας θετικά την ανάπτυξη συστημάτων που βασίζονται σε NCs. Τα CuNCs εμφανίζονται ως εξαιρετικά υποκατάστατα άλλων νανοσυστημάτων, όπως για παράδειγμα των κβαντικών κουκίδων (quantum dot) και των οργανικών χρωστικών, χάρη στην υψηλή κβαντική απόδοση (QY), τη φωτοσταθερότητα [9] και τις μεγάλες μετατοπίσεις Stokes [10] που διαθέτουν.

Με την εφαρμογή νέων μεθόδων παρασκευής και σύγχρονων τεχνικών διαχωρισμού, είναι πιθανό να συντεθεί μεγάλος αριθμός μοναδικών νανοσυμπλεγμάτων στο εγγύς μέλλον. Η δημιουργία ατομικά ακριβών νανοσυμπλεγμάτων σε μοντέλα πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων άνοιξε νέους δρόμους στη χημική έρευνα [11]. Η μοναδική χημεία αυτών των συστημάτων έχει αξιοποιηθεί για να αναπτυχθούν νέοι αισθητήρες και ως προέκταση αυτού του πεδίου, δημιουργήθηκαν νέα υλικά για την απομάκρυνση ρύπων από τα επιφανειακά ύδατα [11]. Η τροποποίηση της ηλεκτρονιακής δομής και του σχήματος των νανοσυμπλεγμάτων χρησιμοποιήθηκε στην κατάλυση [11]. Η δυνατότητα δημιουργίας καλά καθορισμένων νανοσυμπλεγμάτων με διαφορετικούς υποκαταστάτες και οι αλλαγές στις χημικές ιδιότητες έχουν οδηγήσει σε πολυάριθμες εφαρμογές, στη χημεία, στη βιολογία και την επιστήμη των υλικών στις ηλεκτρονικές συσκευές. Στην Εικόνα 2 φαίνεται η ποικιλότητα των εφαρμογών των νανοσυμπλεγμάτων.



Εικόνα 2: Απεικόνιση των νανοσυμπλεγμάτων, η χημική τους ποικιλότητα και οι διαφορετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πεδία εφαρμογής τους.

1.1.2. Σύνθετα υλικά με βάση τα CuNCs

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί διάφορα σύνθετα υλικά με βάση τα CuNCs, συμπεριλαμβανομένων των κβαντικών κουκίδων CuNCs. των CuNCs-MXene (νανοσυμπλέγματα χαλκού ενθυλακωμένα σε δισδιάστατες ανόργανες ενώσεις) και των CuNCs-MOF (νανοσυμπλέγματα χαλκού ενθυλακωμένα σε MOF) [12]. Η ανάπτυξη αυτών των σύνθετων υλικών όχι μόνο βελτιώνει σημαντικά την απόδοση των νανοσυμπλεγμάτων, αλλά παρέχει επίσης, επιλεκτική ανίχνευση αναλυτών. Για την καλύτερη κατανόηση των σύνθετων υλικών CuNCs, διαμορφώνονται οι εξής κατηγορίες των υλικών αυτών με βάση τα διαφορετικά μεγέθη τους: 0D, 1D, 2D και 3D. Πιο αναλυτικά, ξεκινώντας από ένα bulk υλικό (ογκώδες) υλικό με τρεις διαστάσεις μακροσκοπικά, μέσω κατάλληλης επεξεργασίας, ο όγκος του μπορεί να μειωθεί πολύ σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος μέχρι το πάχος του να φτάσει κάτω από τα 100 nm. Σε αυτή την περίπτωση, τα τρισδιάστατα υλικά μπορούν να θεωρηθούν ως δισδιάστατα υλικά. Εάν η σμίκρυνση συνεχιστεί σε μια διάσταση, τότε μιλάμε για μονοδιάστατα υλικά 1D, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, ενώ αν και οι τρεις διαστάσεις φτάσουν επίσης στη νανοκλίμακα, το υλικό γίνεται "αδιάστατο" 0D, όπως στην περίπτωση των QDs. Στην **Εικόνα 3** φαίνονται οι τέσσερις διαστάσεις κατηγοριοποίησης των σύνθετων υλικών CuNCs.



Εικόνα 3: Ταξινόμηση των νανοϋλικών με βάση τη διάστασή τους.

1.1.3. Μέθοδοι σύνθεσης των CuNCs

Οι συνθετικές τεχνικές είναι κρίσιμες για την παραγωγή νανοϋλικών υψηλής ποιότητας. Οι μοναδικές χρήσεις των νανοϋλικών σε αρκετούς τομείς της σύγχρονης έρευνας έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον για τον τρόπο σύνθεσής τους. Ως αποτέλεσμα, έχουν επινοηθεί και εφαρμοστεί διάφορες χημικές και φυσικές προσεγγίσεις για μεγάλης κλίμακας παραγωγής μεταλλικών νανοσυμπλεγμάτων με ακριβείς ατομικές συστάσεις. Ξεκινώντας στις αρχές της δεκαετίας του 1990, η πρόοδος στην έρευνα των νανοϋλικών επέτρεψε τη σύνθεση σωματιδίων στην κλίμακα των νανομέτρων. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει επιτευχθεί τεράστια πρόοδος, κυρίως για τα ευγενή μέταλλα Au και Ag που συμμετέχουν στη σύνθεση νανοσυμπλεγμάτων [2, 13]. Η διευκρίνηση της δομής τους βοήθησε στην κατανόηση των μηχανισμών σχηματισμού τους καθώς και στην εφεύρεση καινοτόμων, αποδοτικών και αποτελεσματικών διαδικασιών για τη σύνθεση μοναδικών λειτουργικών δομικών στοιχείων.

Παρά τις σημαντικές ερευνητικές προόδους στο τομέα των νανοσυμπλεγμάτων χρυσού και αργύρου, οι έρευνες που επικεντρώνονται στην παραγωγή και τη λειτουργικότητα άλλων μετάλλων, όπως του χαλκού, ο οποίος είναι σε αφθονία στη γη, βρίσκονται ακόμα στα αρχικά τους στάδια [14]. Η δυσκολία στη δημιουργία μικρών και σταθερών νανοσωματιδίων χαλκού και νανοσυμπλεγμάτων είναι η πηγή του προβλήματος. Ο χαλκός έχει παρόμοιες χημικό-

φυσικές ιδιότητες με τον χρυσό και τον άργυρο, και μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλη εναλλακτική λύση για τα ακριβά και σπάνια μέταλλα. Ως αποτέλεσμα, οι συνθετικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία νανοσυμπλεγμάτων χρυσού και αργύρου εφαρμόστηκαν και στην παραγωγή νανοσυμπλεγμάτων χαλκού. Τροποποιήσεις και μικρές προσαρμογές στις διαδικασίες σύνθεσης βοήθησαν στην αποτελεσματική παραγωγή ατομικά ακριβών και σταθερών CuNCs [15, 16]. Στην Εικόνα 4 φαίνονται οι συνθετικές μέθοδοι νανοσυμπλεγμάτων χαλκού.



Εικόνα 4: Συνθετικές στρατηγικές νανοσυμπλεγμάτων χαλκού.

1.1.3.1. Τορ-Down μέθοδος σύνθεσης

Στη σύνθεση των νανοϋλικών από πάνω προς τα κάτω (top-down), οι μακροσκοπικές δομές (ογκώδη υλικά, συσσωματώματα, σωματίδια κ.λπ.) διασπώνται σε θραύσματα νανοκλίμακας, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται ξανά σε θερμοδυναμικά σταθερές ουσίες με διαφορετικές δομές, σύσταση και μορφή. Εκτός από τις φυσικές μεθόδους (μηχανική άλεση, αφαίρεση με λέιζερ και σύνθεση με εκκένωση τόξου) η υγρή χημική σύνθεση των CuNCs περιλαμβάνει τη χάραξη ή χώνευση (*etching*) μεγαλύτερων νανοσωματιδίων [17] ή νανοκρυστάλλων [18] παρουσία περίσσειας υποκαταστάτη, ελέγχοντας το pH, τη θερμοκρασία και την αρχική συγκέντρωση των αντιδρώντων. Όμως, μόνο τα πιο θερμοδυναμικά σταθερά νανοσυμπλέγματα θα σχηματιστούν και θα κυριαρχήσουν κατά κύριο λόγο στο μείγμα της αντίδρασης.

Ο Amitava Patra και οι συνεργάτες του αναφέρουν ένα παράδειγμα μιας θερμοδυναμικά σταθερής σύνθεσης CuNCs [19]. Ξεκινώντας με νανοσωματίδια χαλκού (copper nanoparticles, CuNPs), η χάραξη (etching) του διαλύματος σε περίσσεια γλουταθειόνης (glutathione, GSH) είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή νανοσυμπλεγμάτων Cu₃₄₋₃₂(SG)₁₆₋₁₃ (SG = glutathione) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ η χάραξη (etching) σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία (70°C) είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό νανοσυμπλεγμάτων Cu₂₅(SG)₂₀. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χημική σύνθεση προσδιορίστηκε με φασματομετρία μάζας και δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη μονοκρυσταλλική δομή για τα προαναφερθέντα νανοσυμπλέγματα. Είναι ενδιαφέρον ότι τα μεγαλύτερα νανοσυμπλέγματα εκπέμπουν ελάχιστα στην ερυθρή φασματική περιοχή, ενώ τα μικρότερα εκπέμπουν έντονα στο μπλε.

Μια άλλη τεκμηριωμένη προσέγγιση με τη μέθοδο «top-down» περιλαμβάνει τη χρήση αμμωνίας ως χαράκτη για τη μετατροπή των μη φθοριζόντων CuNCs σε μικροσκοπικά (~3,7 nm), πράσινα, φθορίζοντα CuNCs [20]. Η υποβοηθούμενη από αμμωνία χάραξη (*etching*) των CuNCs παρήγαγε σφαιρικά CuNCs μεγέθους 1,2 nm, με κβαντική απόδοση 6,6%.

1.1.3.2. Βοττοm-Up μέθοδος σύνθεσης

Σύνθεση μέσω προτύπου ή εκμαγείου

Οι προσεγγίσεις που βασίζονται σε πρότυπα εκμαγεία (template-based) έχουν αναδειχθεί ως τεχνικές αιχμής για την αποτελεσματική σύνθεση διαφόρων νανοϋλικών με σχεδιασμένες δομές, μεγέθη, μορφολογίες και ιδιότητες [21, 22]. Η κύρια ιδέα αυτής της τεχνολογίας είναι ο σχηματισμός ομοιογενών νανοϋλικών σε ότι αφορά τους πόρους, τα κανάλια ή τις κοιλότητες νανοκλίμακας. Επομένως, η μορφολογία και το μέγεθος του στόχου μπορούν να προσαρμοστούν απλώς αλλάζοντας το σχήμα του καλουπιού (δηλαδή κύλινδρο, ράβδο, σφαίρα). Γενικά, οποιοδήποτε πορώδες υλικό, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών ορυκτών και των βιολογικών μητρών, μπορεί να θεωρηθεί πρότυπο εκμαγείο. Βιομόρια, όπως δίκτυα πολυμερών, υδρογέλες, υπερμοριακά συγκροτήματα, DNA, πρωτεΐνες, ιοί και άλλοι μικροοργανισμοί μπορούν όλα να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία. Τα βιομόρια χρησιμοποιούνται ευρέως στη σύνθεση νανοδομών λόγω των φυσικών πολύπλοκων δομών τους.

Πολυμερή: Αρκετά πολυμερή με διάφορες δομές χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για τη σύνθεση των CuNCs. Η πρώτη αναφορά χρονολογείται πριν από σχεδόν δύο δεκαετίες όταν οι

Zhao et al. χρησιμοποίησαν δενδριμερή πολύ (αμιδοαμίνης) τέταρτης γενιάς (G4) με πυρήνα αιθυλενοδιαμίνης (G4-OH) ως εκμαγεία, και παρασκευάστηκε ένα μείγμα CuNCs που αποτελούνταν από 4 έως 64 άτομα στη σύστασή τους με μέση διάμετρο μικρότερη από 1,8 nm [23]. Εξαιρετικά σταθερά και φθορίζοντα (QY: 3,8% σε αιθανόλη) CuNCs συντέθηκαν από την αναγωγή του υδατικού διαλύματος θειούχου χαλκού και πολυαιθυλενοϊμίνης (polyethylenimine, PEI) με ένυδρη υδραζίνη κατά τη θέρμανση στους 95°C για 19 h [24, 25].

Το 2012 οι Hui Zhang et al. ανέφεραν τη φωτοαναγωγική σύνθεση φθοριζόντων νανοσυμπλεγμάτων μετάλλων Cu, Ag, και Au (QY: 2,2, 6,8 και 5,3%, αντίστοιχα) παρουσία πολυ-μεθακρυλικού οξέος, σε συνάρτηση με το πολυμερές τετρακις 3-μερκαπτοπροπιονική πενταερυθριτόλη (pentaerythritol tetrakis 3-mercaptopropionate) μετά από ακτινοβολία UV [26]. Διαπιστώθηκε ότι τα AuNCs ήταν σχετικά σταθερά σε σύγκριση με του Cu και του Ag. Στην **Εικόνα 5** φαίνονται οι τρείς συνθέσεις των μετάλλων με πενταερυθριτόλη τετρακις 3μερκαπτοπροπιονικό άλας.



Εικόνα 5: Σχηματικές απεικονίσεις της σύνθεσης CuNCs χρησιμοποιώντας τετρακις 3μερκαπτοπροπιονική πενταερυθριτόλη ως πρότυπο.

Πρωτεΐνες: Οι πρωτεΐνες ως δομικά βιομόρια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη σύνθεση εύκαμπτων και βιοσυμβατών CuNCs (Εικόνα 6) [27]. Μεταξύ του μεγάλου αριθμού διαθέσιμων πρωτεϊνών, η αλβουμίνη ορού βοοειδών (bovine serum albumin, BSA) έχει τραβήξει την προσοχή λόγω της διαθεσιμότητάς της, της υψηλής διαλυτότητάς της στο νερό και της ικανότητάς της να δεσμεύει διάφορες οργανικές και ανόργανες ουσίες με μη ομοιοπολικό τρόπο. Λόγω της σαφώς καθορισμένης δομής της που περιέχει φορτισμένα

αμινοξέα και 35 ομάδες θειόλης που προέρχονται από υπολείμματα κυστεΐνης (Cys), το BSA παρέχει θέσεις δέσμευσης αλβουμίνης για το σχηματισμό νανοσυμπλεγμάτων. Η σύνθεση των CuNCs περιλαμβάνει τρία βήματα για να ολοκληρωθεί [28]. Στο πρώτο στάδιο, μετά την ανάμειξη των αντιδρώντων, σε ουδέτερο pH, η καρβοξυλομάδα της πρωτεΐνης μερικώς διίστανται και σχηματίζει αμέσως σύμπλοκο με το Cu²⁺. Προς ενίσχυση της διαλυτότητας και περαιτέρω αναγωγή με BSA, στο δεύτερο στάδιο αντίδρασης, το pH θα πρέπει να ρυθμιστεί σε 12 με προσθήκη 1M NaOH υπό θέρμανση στους 55°C. Ωστόσο, το BSA είναι ασθενές αναγωγικό και για την πλήρη αναγωγή του Cu²⁺ σε μεταλλικό χαλκό, έχουν προταθεί διαφορετικοί αναγωγικοί παράγοντες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου [29] και η ένυδρη υδραζίνη [30]. Άλλες πρωτεΐνες, όπως η θρυψίνη, η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, η τρανσφερρίνη, η παπαΐνη, κελλουλάση (cellulase) και η λυσοζύμη, αναφέρθηκαν επίσης ως αποτελεσματικοί παράγοντες κάλυψης για την παρασκευή νανοσυμπλεγμάτων φθορίζοντος Cu [31].



Εικόνα 6: (Α) Απεικόνιση της σύνθεσης και της εφαρμογής των CuNCs. (Β) Σχηματική παράσταση μεθόδου αντίδρασης που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση CuNCs σε διάλυμα κελλουλάσης. (Γ) Διαγραμματική απεικόνιση της ανίχνευσης της ντοπαμίνης χρησιμοποιώντας BSA CuNC που συντέθηκε παρουσία H₂O₂.

DNA: Το DNA ως φυσική βιοδομή με μεταβλητά μήκη και αλληλουχίες έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση των CuNCs [32]. Δίκλωνο DNA (dsDNA) με ρυθμιζόμενες ακολουθίες και μήκη έχει θεωρηθεί ως ένα πρότυπο για τη σύνθεση νανοσυμπλεγμάτων φθορίζοντος χαλκού. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του προδρόμου μετάλλου Cu²⁺ δεσμεύεται πρώτα στις βασικές φωσφορικές ομάδες του DNA μέσω μη ειδικής

αλληλεπίδρασης. Ωστόσο, με την αύξηση της συγκέντρωσης, η επιμετάλλωση ευνοείται από βάσεις υψηλής συγγένειας. Κατά συνέπεια, η αναγωγή του προσχηματισμένου συμπλόκου με ασκορβικό οξύ οδηγεί στον σχηματισμό των φθοριζόντων CuNCs [33]. Η σειρά των αντιδραστηρίων ανάμειξης βρέθηκε ότι είναι κρίσιμη για τη σύνθεση. Γενικά η αντίδραση περιλαμβάνει την ανάμειξη του άλατος του χαλκού με το πρόσδεμα/πρότυπο στο πρώτο βήμα ακολουθούμενη από αναγωγή χρησιμοποιώντας το μέσο αναγωγής. Ωστόσο, στην περίπτωση του dsDNA, η απόδοση είναι πολύ μεγαλύτερη όταν το πρώτο άλας χαλκού ανάγεται με ασκορβικό οξύ και στη συνέχεια διαμορφώνεται στο εσωτερικό του DNA [33].

Τα άτομα οξυγόνου (όπως σκληρές βάσεις Lewis) φωσφοδιεστερικών ομάδων και αζώτου (σχετικά ισχυρές βάσεις Lewis) άτομα των νουκλεοβάσεων συνδέονται σε Cu²⁺ και επομένως, η σταθεροποίηση ενός μεταλλικού κατιόντος αναστέλλει την επιμετάλλωση του προτύπου. Ωστόσο, όταν το άλας αρχικά ανάγεται σε Cu^+ , ο σχηματιζόμενος Cu^0 μπορεί να συσσωρευτεί αυλακώσεις στις του dsDNA. Κατά συνέπεια. το μέγεθος των νανοσωματιδίων/νανοσυμπλέγματος μπορεί να διαφοροποιηθεί αλλάζοντας τον αριθμό των ζευγών βάσεων DNA, δηλαδή πολύ μακρύτερα πρότυπα DNA είγαν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό νανοσωματιδίων και όχι νανοσυμπλεγμάτων. Ωστόσο, μικρότερα πρότυπα DNA είχαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό CuNCs με πολύ χαμηλή ένταση φθορισμού. Αντίθετα, οι ιδιότητες φθορισμού μπορούν να βελτιωθούν με την αύξηση σε κάποιο βαθμό του μήκος των κλώνων του DNA [34]. Στην Εικόνα 7 απεικονίζεται ένα παράδειγμα φθοριζόντων CuNCs με πρότυπο dsDNA.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης exonuclease ΙΙΙ με βάση τα φθορίζοντα CuNC με πρότυπο dsDNA.

<u>Ηλεκτροχημική σύνθεση</u>

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροχημική αναγωγή του άλατος χαλκού και η εναπόθεση στην κάθοδο σε ένα τυπικό ηλεκτροχημικό στοιχείο. Το μέγεθος, η δομή και η μορφολογία των νανοσωματιδίων μπορεί να ελεγχθεί αλλάζοντας τα εφαρμοζόμενα ρεύματα και χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρότυπα μέσα σε διαλύματα ηλεκτρολυτών. Για παράδειγμα, νανοράβδοι χαλκού με μέση διάμετρο και μήκος 30 nm και 400 nm, αντίστοιχα, μπορούν να συντεθούν σε μία κυψελίδα δύο ηλεκτροδίων με μια πλάκα χαλκού ως άνοδο και μια κάθοδο πλατίνας χρησιμοποιώντας ένα σύστημα CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) /CT₄ABr (tetrabutylammonium bromide) /ακετόνη/κυκλοεξάνιο/νερό (όπου το κυκλοεξάνιο χρησιμεύει ως σταθεροποιητής) [35].

Η σύνθεση νανοσυμπλεγμάτων χαλκού με χρήση ηλεκτροχημικής μεθόδου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2010 [36]. Η σύνθεση πολύ μικρών CuNCs (Cu_n με n \leq 14) σε νιτρικό τετραβουτυλαμμώνιο, ως ηλεκτρολύτη και προστατευτικό παράγοντα κατά τη συσσωμάτωση και την οξείδωση, έγινε σε συμβατικό με τρία ηλεκτρόδια ηλεκτροχημικό στοιχείο, με χάλκινη

πλάκα ως άνοδο, ένα φύλλο πλατίνας ως κάθοδο και Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς. Τα ιόντα Cu που παρήχθησαν από τον διαλυτό χαλκό στην άνοδο μειώθηκαν και σχηματίστηκαν νανοσυμπλέγματα.

Πρόσφατα, οι Vilar-Vidal et al. ανέφεραν τον επιλεκτικό σχηματισμό των Cu₁₃ σε μία θερμοστατούμενη ηλεκτροχημική κυψελίδα τριών ηλεκτροδίων [37]. Το 2016 M. Arturo López-Quintela και οι συνεργάτες του ανέφεραν την ηλεκτροχημική σύνθεση νανοσυμπλεγμάτων Cu₅, το οποίο παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, της θέρμανσης και των διακυμάνσεων του pH [38]. Σε αντίθεση με το σύμπλεγμα Cu₅, τα μεγαλύτερα νανοσυμπλέγματα οξειδώνονται πιο εύκολα και ανάγονται σχετικά λιγότερο σε περιβάλλον οξυγόνου και αζώτου, αντίστοιχα. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι πολύ μικρά νανοσυμπλέγματα μπορούν να παρασκευαστούν χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική μέθοδο σύνθεσης.

• Μικρογαλάκτωμα Water-in-Oil (w/o)

Το 1993, οι Lisiecki et al. ανέφεραν την πρώτη σύνθεση CuNCs σε μικρογαλακτώματα με NaBH₄ ή υδραζίνη ως αναγωγικό μέσο. Ο τύπος και η περιεκτικότητα του μικρογαλακτώματος σε επιφανειοδραστικές ουσίες και η ποσότητα του αναγωγικού μέσου επηρέασαν το μέγεθος των νανοσυμπλεγμάτων [39]. Διερευνήθηκε ο αριθμός των μορίων του αναγωγικού παράγοντα που χρησιμοποιείται στην αντίδραση σε σχέση με τη στοιχειομετρική ποσότητα που απαιτείται για την αναγωγή του κατιόντος χαλκού, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 8**. Μεγαλύτερα νανοσυμπλέγματα και σωματίδια προέκυψαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις NaBH₄, μικρότερα και πιο φθορίζοντα Cu_nNCs με n \leq 13 άτομα.



Εικόνα 8: Σχηματική παράσταση της εξέλιζης του μεγέθους νανοσυμπλέγματος χαλκού με αύζηση της συγκέντρωσης του NaBH4.

• <u>Ηχοχημική σύνθεση</u>

Η ηχοχημική σύνθεση έχει αποδειχθεί αποτελεσματική μέθοδος για τον σχηματισμό NCs που αποτελούνται από ευγενή μέταλλα, μέταλλα μετάπτωσης, ημιαγωγούς, υλικά άνθρακα ή πολυμερή [40]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι υπέρηχοι υψηλής έντασης που παράγονται από τον ακουστικό αντηχείο προκαλούν μια μοναδική πορεία αντίδρασης σχηματισμού, ανάπτυξης και κατάρρευσης φυσαλίδων στο διάλυμα. Σε αυτές τις διεργασίες, η αδιαβατική συμπίεση και τα κρουστικά κύματα δημιουργούν τοπικά θερμά σημεία με παροδικά υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Τα πλεονεκτήματα της ηχοχημείας μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- 1) απλή, φιλική προς το περιβάλλον και μη επικίνδυνη,
- 2) υψηλή ταχύτητα αντίδρασης,
- 3) ελεγχόμενες συνθήκες αντίδρασης και
- 4) παραγωγή NCs με ομοιογενές σχήμα και στενή κατανομή μεγέθους.

Η ηχοχημεία έχει εφαρμοστεί στη σύνθεση των NCs Ag, Au και Cu. Oι Wang et al [41] ανέφεραν μια απλή ηχοχημική μέθοδο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τόσο αναγωγικούς όσο και σταθεροποιητικούς παράγοντες, λόγω των λειτουργικών ομάδων της GSH (καρβοξυλικές ομάδες, αμινομάδες και ελεύθερες θειόλες) για την ταχεία παραγωγή CuNCs με ισχυρό φθορισμό. Στην **Εικόνα 9** απεικονίζεται η σύνθεση των CuNCs με GSH. Τα GSH-CuNCs που παρασκευάζονται με τη μέθοδο αυτή έχουν μικρό μέγεθος (~ $2,2 \pm 0,2$ nm), QY (5,3%), ερυθρή

εκπομπή και καλή διασπορά στο νερό. Επιπλέον, η ένταση φθορισμού των παρασκευασμένων GSH-CuNCs αυξήθηκε γρήγορα όταν το pH μειώθηκε από 9 σε 4. Τα GSH-CuNCs συσσωματώνονται σε υδατικό διάλυμα υπό τη δράση ιόντων Pb²⁺ και σβήνουν τον φθορισμό. Ως εκ τούτου, τα εν λόγω GSH-CuNCs είναι εξαιρετικοί υποψήφιοι ως ανιχνευτές φθορισμού για την ανίχνευση Pb²⁺ με όριο ανίχνευσης 1,0 nM [41].



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής σύνθεσης σε υπερήχους των GSH-CuNCs.

• Σύνθεση με τη βοήθεια μικροκυμάτων

Οι μέθοδοι μικροκυμάτων χρησιμοποιούν τα μικροκύματα ως πηγή ενέργειας για τη σύνθεση νανοϋλικών χαλκού. Η παρασκευή CuNCs με μέσο μέγεθος 10 nm σε αιθυλενογλυκόλη και NaH₂PO₂·H₂O ως αναγωγικό μέσο με ακτινοβολία μικροκυμάτων αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2004 από τους Zhu et al. [42]. Φθορίζοντα CuNCs με μέσο μέγεθος 2 nm (που περιέχουν Cu₉) ελήφθησαν επιτυχώς με την προσθήκη NaOH στο μείγμα της αντίδρασης κατά τη διάρκεια θέρμανσης σε υψηλή θερμοκρασία [43]. Υπό συνθήκες ισχυρής θέρμανσης η αιθυλενογλυκόλη υφίσταται μία αντίδραση αφυδάτωσης, και σχηματίζονται αλδεΰδες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αναγωγή των ιόντων χαλκού. Η αυθόρμητη αιθοξυλίωση οδηγεί στον σχηματισμό πολυαιθυλενογλυκόλης, η οποία στη συνέχεια προσροφάται στην επιφάνεια των CuNCs. Η παθητικοποίηση της επιφάνειας περιορίζει την περαιτέρω συσσωμάτωση και οξείδωση των σχηματιζόμενων νανοσυμπλεγμάτων. Ακόμα, το ταννικό οξύ και το BSA έχουν αναφερθεί ως αναγωγικοί παράγοντες και προστατευτικοί υποκαταστάτες για την παραγωγή νανοσυμπλεγμάτων κατά την ακτινοβόληση με μικροκύματα.

• <u>Τροποποιημένη τεχνική Brust–Schiffrin</u>

Η μέθοδος Brust-Schiffrin είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παραγωγή μεταλλικών νανοσυμπλεγμάτων σε μεγάλες ποσότητες και με στενή κατανομή μεγέθους. Η

μέθοδος αυτή βασίζεται στην ταυτόχρονη σύνθεση μεταλλικών νανοσυμπλεγμάτων και στην προστασία του πυρήνα τους από μια μονοστοιβάδα θειόλης.

Οι Lee et al. έδειξαν ότι η επιλογή του αναγωγικού παράγοντα είναι πολύ σημαντική [44]. Τα είδη Cu₀ είναι πολύ ευαίσθητα στην οξείδωση σε υδατικό διάλυμα, οπότε ο ισχυρός αναγωγικός παράγοντας NaBH₄ (E₀ =-1,24 V) διίστανται γρήγορα και δεν αναστέλλει την οξείδωση του μετάλλου. Η υδραζίνη (N₂H₄), από την άλλη πλευρά, είναι ασθενέστερος αναγωγικός παράγοντας από το NaBH₄ και διίστανται πιο αργά, αλλά δεν βελτιώνει σημαντικά τη σταθερότητα των νανοσυμπλεγμάτων.

Ως εναλλακτική λύση στη μέθοδο Brust-Schiffrin, έχει προταθεί η σύνθεση CuNCs με τη χρήση υδρόφιλων υποκαταστατών εκτός από θειόλες, όπως ταννικό οξύ, παράγωγα χολικών οξέων (bile acids), ιστιδίνη, ντοπαμίνη, και προλίνη [31].

1.1.4. Ιδιότητες των νανοσυμπλεγμάτων Cu

Ο προσδιορισμός των ιδιαίτερων ιδιοτήτων των σύνθετων υλικών CuNCs είναι μεγάλης σημασίας για την κατανόηση των πιθανών εφαρμογών τους σε τομείς που σχετίζονται με τη βιοτεχνολογία. Στην **Εικόνα 10** φαίνονται κάποιες ιδιότητες των CuNCs. Τα σύνθετα CuNCs έχουν σημαντικές βελτιωμένες ιδιότητες. Σε σύγκριση με τα μεμονωμένα CuNCs, τα σύνθετα CuNCs μπορούν να έχουν καλύτερες ιδιότητες όσον αφορά τη σταθερότητα και την ένταση του φθορισμού και της ηλεκτροχημειοφωταύγειας (electrochemiluminescence, ECL). Γενικά, οι ιδιότητες των σύνθετων υλικών CuNCs εξαρτώνται κυρίως από τα CuNCs και ο συνδυασμός τους με άλλα νανοϋλικά αλλάζει τις ιδιότητές τους, όπως η μετατόπιση του μήκους κύματος διέγερσης/εκπομπής μπλε/ερυθρού.



Εικόνα 10: Διαφορετικές ιδιότητες των CuNCs και παράγοντες που τις επηρεάζουν.

1.1.4.1. Απορρόφηση

Στο φάσμα απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), υπάρχει μια ζώνη απορρόφησης γύρω στα 560-600nm που οφείλεται στον συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon resonance, SPR) των CuNCs [45]. Οι ιδιότητες απορρόφησης των μεταλλικών νανοσωματιδίων (metal nanocomposites) καθορίζονται κυρίως από το SPR των ηλεκτρονίων αγωγιμότητας. Στην περίπτωση των CuNCs, όταν το μέγεθος του NC είναι κοντά στο μήκος κύματος Fermi των ηλεκτρονίων παρουσιάζουν διαφορετικά ενεργειακά επίπεδα. Τα CuNCs αλληλεπιδρούν με το φως μέσω ηλεκτρονιακών μεταβάσεων μεταξύ ενεργειακών επιπέδων λόγω της ισχυρής μοριακής απορρόφησής τους.

Για παράδειγμα, οι Zhou et al [46] παρασκεύασαν μετρίως σταθεροποιημένα CuNCs με διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA-CuNCs) χρησιμοποιώντας το εμπορικό τετραοξυ(υδροξυμεθυλο) χλωροφωσφονικό οξύ και λιποϊκό οξύ ως αναγωγικούς και καλυπτικούς παράγοντες,

αντίστοιχα. Στην Εικόνα 11 απεικονίζεται η μέθοδος σύνθεσης. Η ευρεία ζώνη απορρόφησης ήταν περίπου στα 325 nm υπό ουδέτερες συνθήκες, και το φάσμα UV-Vis δεν έδειξε χαρακτηριστικές κορυφές. Τα CuNCs που συντέθηκαν με διαφορετικούς καλυπτικούς παράγοντες και αναγωγικά μέσα έδειξαν διαφορετικές κορυφές απορρόφησης, υποδεικνύοντας ότι ο τύπος της κάλυψης και του αναγωγικού μέσου έχουν κάποια επίδραση στη θέση της κορυφής απορρόφησης των CuNCs.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής των DHLA-CuNCs.

1.1.4.2. Φθορισμός

Καθώς το μέγεθος του μετάλλου μειώνεται στην κλίμακα των νανομέτρων και πλησιάζει το μήκος κύματος Fermi του ηλεκτρονίου, επιτρέπεται η παρατήρηση μοναδικών οπτικών ιδιοτήτων, όπως η μοριακή απορρόφηση και η έντονη εκπομπή. Ως μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των μεταλλικών NCs, οι φθορίζουσες ιδιότητες των συσσωματωμάτων Au, Ag και Cu μεγέθους κάτω του νανομέτρου έχουν μελετηθεί εκτενώς την τελευταία δεκαετία. Ο φθορισμός των μεταλλικών NCs συνήθως εξηγείται από τις διαζωνικές μεταβάσεις (HOMO-LUMO) μεταξύ του υψηλότερου και του χαμηλότερου κατειλημμένου τροχιακού. Οι Wei et al [47] ανέφεραν μπλε φθορισμό των CuNCs που παρασκευάστηκαν με μια απλή μονοφασική διαδικασία σε μη πολικούς διαλύτες όπως τολουόλιο, εξάνιο και χλωροφόρμιο.

Επιπλέον συντέθηκαν CuNCs που φθορίζουν στην περιοχή του ερυθρού. Στην περίπτωση του ερυθρού και υπέρυθρου φθορισμού, οι παρεμβολές φθορισμού in vivo συνήθως αποφεύγονται, επειδή οι περισσότερες φθορίζουσες ουσίες in vivo είναι μπλε ή πράσινες. Επιπλέον, ο ερυθρός

και υπέρυθρος φθορισμός μεταδίδονται ευκολότερα μέσα στον οργανισμό από ό,τι ο πράσινος και ο μπλε φθορισμός. Ως εκ τούτου, οι ερυθρές φθορίζουσες ιδιότητες των CuNCs τα καθιστούν ιδανικά για εφαρμογές όπως, τη βιοαπεικόνηση, τη βιοσήμανση και τη φθορισμομετρική ανάλυση [48, 49]. Παρόλο που ο μηχανισμός φθορισμού των CuNCs δεν είναι πλήρως κατανοητός, οι φθορίζουσες ιδιότητες καθορίζονται από το μέγεθος των νανοσυμπλεγμάτων και τον τύπο του διαλύτη. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι το χημικό περιβάλλον και οι συνδετικοί υποκαταστάτες που προστατεύουν την επιφάνεια παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο.

• <u>Εξάρτηση του φθορισμού από το μέγεθος των CuNCs</u>

Τα CuNCs αποτελούνται από μερικά έως μερικές εκατοντάδες άτομα Cu και το μέγεθός τους είναι ανάλογο με το μέγεθος των CuNCs στο μήκος κύματος Fermi [47]. Σε αυτή την περιοχή μεγέθους, η ηλεκτρονιακή κατάσταση των CuNCs είναι διακριτή. Έτσι, τα CuNCs παρουσιάζουν μοριακές ιδιότητες, με απορρόφηση SPR, αλλά φθορίζουν σε μπλε έως ερυθρά μήκη κύματος [50]. Σε μια μελέτη, διαπιστώθηκε ότι οι οπτικές ιδιότητες των NCs εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθός τους. Όπως οι κβαντικές τελείες, έτσι και τα NCs παρουσιάζουν εξαρτώμενη από το μέγεθος μεταλλοφωταύγεια η οποία έχει αναφερθεί στην ορατή, ερυθρή έως εγγύς υπέρυθρη περιοχή λόγω των κβαντικών φαινομένων μεγέθους [51].

Πρόσφατα, οι Wang et al [52] ανέφεραν μια πορεία σύνθεσης για φθορίζοντα CuNCs και διαπίστωσαν ότι ο φθορισμός εξαρτάται έντονα από το μέγεθος. Καθώς το μέσο μέγεθος των CuNCs αυξάνεται από 1,8 nm σε 3,5 nm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12(α), η ένταση φθορισμού των CuNCs αυξάνεται από λem = 470 nm σε λem = 600 nm με την ισχυρή ερυθρομετατόπιση (~130 nm).



Εικόνα 12: (a) Φάσματα PL των PEI-CuNCs σε υδατικό διάλυμα (μια σημαντική μετατόπιση του κόκκινου), 25 °C (1.8 nm), 90 °C (2.8 nm), 150 °C (3.5 nm). (β) Φάσματα UV–Vis των προσχηματισμένων CuNPs και των προκύπτοντων PEI-CuNCs παρασκευασμένων σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 50, 90 και 150 °C).

<u>Εξάρτηση του φθορισμού από τον συνδετικό υποκαταστάτη των CuNCs</u>

Οι παράγοντες επιφανειακής δέσμευσης όχι μόνο σταθεροποιούν τα NCs αλλά έχουν επίσης σημαντικό αντίκτυπο στις φθορίζουσες ιδιότητές τους. Οι υποκαταστάτες ελέγχουν τον φθορισμό των NCs μέσω δύο λειτουργιών:

- ελέγχουν άμεσα το μέγεθος των NCs ως σταθεροποιητές και
- αντιλαμβάνονται εξωτερικά ερεθίσματα και μεταβάλλουν την επιφανειακή λειτουργία και την εσωτερική δομή των φθοριζόντων NCs, επηρεάζοντας έτσι τον φθορισμό τους.

To φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε AuNCs. Για παράδειγμα, οι Wu et al [53] διαπίστωσαν ότι η ένταση φθορισμού ενός νανοσυμπλέγματος Au₂₅ ([Au₂₅(SR)₁₈]⁻, R: C₆H₁₃, C₁₂H₂₅, γλουταθειόνη (G)). Βρέθηκε πως η ένταση του φθορισμού του NCs, αποτελούμενο από 25 AuNCs, ήταν [Au₂₅(SC₆H₁₃)₁₈]⁻<[Au₂₅(SC₂H₄Ph)₁₈], η οποία διαπιστώνεται ότι αυξάνεται με αυτή τη σειρά. Έτσι, δεδομένου ότι η σειρά της ικανότητας απελευθέρωσης φορτίου των τριών υποκαταστατών είναι C₆H₁₃<C₁₂H₂₅<PhC₂H₄, η μεταφορά φορτίου από τους επιφανειακούς παράγοντες στον μεταλλικό πυρήνα μπορεί να ενισχύσει σημαντικά τον φθορισμό.

Ομοίως, ο φθορισμός των CuNCs επηρεάζεται από τον υποκαταστάτη. Για παράδειγμα, η ελεγχόμενη αναγωγή των συμπλεγμένων: DNA-Cu²⁺ μπορεί να σχηματίσει CuNCs, το μέγεθος

των οποίων μπορεί να ρυθμιστεί από το μήκος του DNA, επηρεάζοντας περαιτέρω τόσο την ένταση φθορισμού όσο και τη διάρκεια ζωής φθορισμού των CuNCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13.

Επιπλέον, όταν το μερκαπτοβενζοϊκό οξύ με διάφορα ισομερή χρησιμοποιείται για επιφανειακή δέσμευση, τα CuNCs μπορούν να παρουσιάσουν μια ποικιλία φυσικών και οπτικών ιδιοτήτων [54]. Η μέθοδος σύνθεσης έχει επίσης σημαντική επίδραση. Οι φθορίζουσες ιδιότητες των CuNCs με αλβουμίνη ορού βοοειδών και BSA αλλάζουν σε μπλε ή ερυθρό χρώμα, ανάλογα με τη μέθοδο σύνθεσης που χρησιμοποιείται [55].



Εικόνα 13: Ελεγχόμενη αναγωγή συμπλεγμένων με DNA ιόντων Cu²⁺ σε προεπιλεγμένα τμήματα του ssDNA για σχηματισμό νανοσωματιδίων. Cu-ssDNA (μπλε) αντιπροσωπεύει το ssDNA που μπορεί να χρησιμεύσει ως πρότυπο εκμαγείο για το σχηματισμό CuNCs. Το μέγεθος των CuNCs που σχηματίζονται εξαρτάται από το μήκος του CussDNA. Το NCu-ssDNA (πράσινο) αντιπροσωπεύει το ssDNA χωρίς τη δυνατότητα του σχηματισμού CuNCs, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνδεση των νανοσωματιδίων μεταξύ τους για τη δημιουργία σύνθετων νανοδομών.

• <u>Εξάρτηση του φθορισμού των CuNCs από τον διαλύτη</u>

Έχει παρατηρηθεί απορρόφηση και εκπομπή εξαρτώμενη από την πολικότητα του διαλύτη στην ορατή και την εγγύς υπέρυθρη περιοχή σε διάφορες μονόκλωνες αλυσίδες DNA επικαλυμμένες με AgNCs [56]. Παρομοίως, τα σύνθετα CuNCs με PEI παρουσίασαν ιδιότητες φθορισμού που προκαλούνται από διαλύτη όταν εκτίθενται σε διαφορετικούς οργανικούς

διαλύτες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 [25]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση του διαλύτη των επικαλυμμένων με PEI CuNCs διαφέρει από προηγούμενα διαλύματα που παρουσιάζουν ιδιότητες φθορισμού των επικαλυμμένων με PEI-AgNCs.

Αξιοσημείωτο είναι ότι η εξάρτηση των NCs από τον διαλύτη μπορεί να επηρεαστεί από τον δείκτη διάθλασης και τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη. Το τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF) έχει μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου από ό,τι το νερό και τα PEI-CuNCs μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου στο THF ή στο 1,4-διοξάνιο, προκαλώντας μπλε μετατόπιση στο φάσμα εκπομπής Η σύνδεση του PEI με το THF μπορεί επίσης να προκαλέσει ενίσχυση της εκπομπής λόγω συσσωμάτωσης (aggregation-induced emission enhancement, AIEE), η οποία ενισχύει άμεσα την ένταση του φθορισμού.



Εικόνα 14: Ιδιότητες φθορισμού των CuNCs σε συνάρτηση με τους διαλύτες.

Εκπομπή που προκαλείται από συσσωμάτωση

Το φαινόμενο της εκπομπής που προκαλείται από συσσωμάτωση (AIEE) αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Luo et al. το 2001 [57]. Σε αντίθεση με τα φθορισμοφόρα των οποίων η εκπομπή εξαρτάται από τη συγκέντρωση, οι φθορισμοφόροι που προκαλούνται από συσσωμάτωση δεν εκπέμπουν ή εκπέμπουν πολύ ασθενώς σε διάλυμα. Λόγου του περιορισμού της ενδομοριακής κίνησης, ο φθορισμός γίνεται ισχυρότερος όταν σχηματίζονται μοριακές διαμορφώσεις. Με βάση το φαινόμενο και τις αρχές της ΑΙΕΕ, η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων σε μόρια ΑΙΕΕ μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη χημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων για την ανίχνευση μετάλλων, κατιόντων, βιομορίων, χειρόμορφων μορίων, εκρηκτικών κλπ., όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15** [58].

Τα CuNCs με συμπεριφορά AIEE αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τους Wang et al. [59]. Συνέθεσαν φθορίζοντα CuNCs εστιάζοντας στη χάραξη (etching) και διαπίστωσαν ότι τα CuNCs εκπέμπουν ασθενή φωταύγεια όταν διασπείρονται σε υδατικό διάλυμα, και έντονο φθορισμό όταν συσσωματώνονται σημαντικά. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα φθορίζοντα CuNCs αναμένεται να ανοίξουν νέες ευκαιρίες για την παραγωγή διόδων εκπομπής φωτός, χημικών αισθητήρων και συστημάτων βιοαπεικόνισης.



Εικόνα 15: Χαρακτηριστικά παραδείγματα των τεχνολογικών εφαρμογών του ΑΙΕΕ υλικά.

• <u>Φθορισμός δύο φωτονίων</u>

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας φθορισμού δύο φωτονίων έχει δώσει τη δυνατότητα παρακολούθησης της βιολογικής δραστηριότητας των οργανιδίων βαθιά μέσα στο κύτταρο και τα φθορισμοφόρα δύο φωτονίων, λόγω του ισχυρού φθορισμού τους και της εγγενούς εξάρτησης της έντασης εκπομπής από το τετράγωνο της ισχύος, προσφέρουν υψηλότερο λόγο σήματος προς θόρυβο για ενδοκυτταρική απεικόνιση σε σύγκριση με τα συμβατικά φθορισμοφόρα ενός φωτονίου. [60]. Οι ανιχνευτές μεταλλικών νανοσυμπλεγμάτων θεωρήθηκαν κατάλληλοι για την ενδοκυτταρική απεικόνιση δύο φωτονίων λόγω των ελκυστικών χαρακτηριστικών τους, όπως το μικρό μέγεθος, ο ισχυρός φθορισμός, η
βιοσυμβατότητα, η φωτοσταθερότητα και η υψηλή απορρόφηση δύο φωτονίων. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι τα σύμπλοκα πεπτιδίου-χαλκού εκπέμπουν μπλε φθορισμό δύο φωτονίων όταν διεγείρονται με femtosecond laser [61]. Τέτοιοι ανιχνευτές έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση κυτταρικών πυρήνων με τη χρήση φθορισμού ενός και δύο φωτονίων.

1.1.4.3. Καταλυτικές ιδιότητες των NCs

Τα μεταλλικά NCs με διάμετρο μικρότερη από 2 nm είναι υποσχόμενοι καταλύτες για την αντίδραση αναγωγής οξυγόνου (oxygen reduction reaction) [62]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα νανοσυμπλέγματα Au σε νανοκλίμακα παρουσιάζουν υψηλότερη καταλυτική και ηλεκτροκαταλυτική δραστικότητα. Θεωρητικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ζώνη d είναι στενότερη και μετατοπισμένη προς το επίπεδο Fermi σε μικρά νανοσυμπλέματα Au. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα μικρότερα νανοσυμπλέγματα Au είναι πιο ευνοϊκά για την προσρόφηση O₂ στην επιφάνεια των νανοσυμπλεγμάτων και ότι τα μικρότερα νανοσυμπλέγματα Au είναι πιο δραστικά [63].

Η ηλεκτροκαταλυτική δραστικότητα των CuNCs και AgNCs στην αντίδραση αναγωγής οξυγόνου διερευνήθηκε επίσης πειραματικά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα Cu_nNCs (n≤8) και Ag₇ είναι ιδιαίτερα καταλυτικά ενεργά για την ηλεκτροαναγωγή του οξυγόνου. Το δυναμικό έναρξης της αναγωγής του οξυγόνου των CuNCs (-0,07V έναντι Ag/AgCl) είναι πολύ παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται για το σύμπλοκο Au₁₁ και ορισμένους εμπορικούς καταλύτες Pt (-0,08V έναντι Ag/AgCl) [64]. Οι Wu et al [65] κατέδειξαν μια δισδιάστατη μέθοδο αυτοσυναρμολόγησης (self-assembly method) για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των καταλυτών CuNCs, ενώ οι Shen et al. [66] ανέφεραν μια εύκολη και φιλική προς το περιβάλλον in situ σύνθεση ερυθρών φωσφοριζόντων CuNCs σε υπερμοριακή υδρογέλη, χρησιμοποιώντας μια σειρά παραγώγων χολικού οξέος ως παράγοντες προ-απόθεσης. Τα σύνθετα CuNCs διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν εξαιρετική καταλυτική απόδοση στο σύστημα αναγωγής μπλε του μεθυλενίου - υδραζίνης.

1.1.4.4. Ηλεκτροχημειο-φωταύγεια των NCs

Από την πρώτη αναφορά των ιδιοτήτων ECL των φθοριζόντων AgNCs το 2009, οι εφαρμογές ECL των μεταλλικών NCs έχουν διερευνηθεί αρκετά. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν ότι τα εύκαμπτα μεταλλικά NCs προσφέρουν νέες ευκαιρίες στη φωτοφωταύγεια, την κατάλυση, την απόσβεση και σε καινοτόμα συστήματα ECL υψηλής απόδοσης.

Οι μελέτες σχετικά με την απόδοση της ECL έχουν επιτύχει βελτιώσεις, αλλά τα NCs σε μέταλλα και συμπλέγματα βρίσκονται ακόμη σε προκαταρκτικά στάδια. Η αποτελεσματικότητα είναι περιορισμένη. Η γενική μέθοδος για τη σύνθεση μεταλλικών NCs είναι η ανάμειξη κατάλληλων αντιδραστηρίων/διαλυτών με αναγωγικές ιδιότητες, όπως λιποϊκό οξύ, BSA, μεθειονίνη, GSH, Ν-ακετυλο-L-κυστεΐνη και DNA για τον σχηματισμό μεταλλικών NCs. Ωστόσο, τα μεταλλικά NCs έχουν σχετικά χαμηλή απόδοση ECL, γεγονός που περιορίζει τη μελλοντική τους χρήση. Άλλο ένα εμπόδιο στην αποτελεσματικότητα της ΕCL είναι η έλλειψη ενός σαφούς μηχανισμού. Καταβάλλονται διάφορες προσπάθειες για τη βελτίωση της απόδοσης των μεταλλικών NCs στην ECL με στόχο τη δημιουργία νέων μεταλλικών NCs. Στην Εικόνα 16 απεικονίζονται κάποιες από αυτές τις προσπάθειες [3].



Εικόνα 16: Σχηματική παράσταση των στρατηγικών για τη βελτίωση της απόδοσης ECL μεταλλικών NCs.

1.1.4.5. Χημειοφωταύγεια

Η εφαρμογή των μεταλλικών NCs στη χημειοφωταύγεια (chemiluminescence, CL) έχει επικεντρωθεί κυρίως στην κατάλυση. Ως καταλύτες χρησιμοποιούνται μεταλλικά NCs στα

ακόλουθα συστήματα: H₂O₂-νιτρώδες, H₂O₂-φθοροσκεΐνη, λουμινόλη-H₂O₂, KMnO₄ροδαμίνη B, H₂O₂-ροδαμίνη B, diperiodato-argentate-folic acid, KMnO₄-ροδαμίνη 6G, H₂O₂περοξυμονοκαρβικό, λουμινόλη-NalO₄, K₃Fe(CN)₆-ροδαμίνη 6G κ.λπ. Η ένταση της CL αποσβένει ή μειώνεται/αυξάνεται παρουσία αναλυτών. Μέχρι στιγμής, οι πιθανές μέθοδοι για τη βελτίωση της καταλυτικής δραστικότητας των μεταλλικών NCs σε συστήματα CL περιλαμβάνουν [3]:

- i. τροποποιημένα NCs,
- ii. διμεταλλικά NCs,
- iii. μονομεταλλικά NCs,
- iv. μεταλλικά NCs ενθυλακωμένα σε ομοιογενείς και διατεταγμένες νανοπορώδεις δομές.

1.2. Η Παρουσία Νερού σε Οργανικούς Διαλύτες

Η παρουσία ιχνοποσοτήτων νερού σε οργανικούς διαλύτες αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για ευαίσθητες χημικές αντιδράσεις και βιομηχανικές εφαρμογές Η παρουσία νερού στους διαλύτες αποτελεί πρόσμιξη (impurity) που επηρεάζει τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος και μεταβάλλει την ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων. Ορισμένες οργανομεταλλικές ενώσεις είναι ευαίσθητες στην παρουσία νερού και μπορούν να αντιδράσουν βίαια, προκαλώντας ατυχήματα πυρκαγιάς και έκρηξης [67]. Επομένως, τέτοιες αντιδράσεις απαιτούν αυστηρά άνυδρους διαλύτες και αντιδραστήρια. Στην πετροχημική βιομηχανία, το νερό μπορεί να βρίσκεται σε καύσιμα και λιπαντικά με βάση το πετρέλαιο, τα καύσιμα όμως αυτά μπορούν να προκαλέσουν διάβρωση του κινητήρα [68]. Η γαλακτωματοποίηση και ο διαχωρισμός φάσεων συμβαίνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες, οδηγώντας σε διάβρωση της γραμμής καυσίμου και σε ορισμένα μηχανικά προβλήματα [69].

Το νερό είναι η πιο κοινή πρόσμιξη σε πολλές βιομηχανικές και χημικές διεργασίες που περιλαμβάνουν οργανικούς διαλύτες. Ως εκ τούτου, απαιτείται ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της υγρασίας πριν από οποιαδήποτε χημική αντίδραση ή βιομηχανική διαδικασία παραγωγής. Στη βιομηχανία, ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση του νερού βασίζονται σε ηλεκτροχημικές, χρωματογραφικές και προηγμένες φασματοσκοπικές μεθόδους [70]. Η ευρεία χρήση αυτών των μεθόδων οφείλεται στην αξιοπιστία, την ακρίβεια και το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι έχουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως έλλειψη φορητότητας, υψηλό κόστος συντήρησης και την ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό για την εκτέλεση των μετρήσεων [71]. Η μέθοδος τιτλοδότησης Karl Fischer [72] είναι η βασική μέθοδος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε υγρασία συνήθως χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες. Έχει το μειονεκτήματα ότι, δεν μπορεί να γίνει η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της περιεκτικότητας σε νερό και της μεγάλης ποσότητας τοξικών και ακριβών χημικών που χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια, όπως πυριδίνη, ιμιδαζόλιο, ιώδιο, αλκυλοθειώδη και μεθανόλη.

Οι ερευνητές έχουν αναπτύξει φθορίζοντες και χρωματομετρικούς μοριακούς αισθητήρες βασισμένους σε μικρά μόρια για να ξεπεράσουν τους περιορισμούς των συμβατικών μεθόδων ανίχνευσης υγρασίας [73]. Οι χημικοί αισθητήρες έχουν τα πλεονεκτήματα της γρήγορης απόκρισης, της υψηλής ευαισθησίας, του χαμηλού κόστους, της φορητότητας, της ανίχνευσης με γυμνό μάτι και της εύκολης χρήσης πεδίου. Οι αισθητήρες μοριακού φθορισμού εμφανίζουν αλλαγές στην ένταση εκπομπής. Αυτοί μπορούν να χαρακτηριστούν είτε ως ενισχυτές (ON) είτε ως αποσβέστες (OFF), ανάλογα με την απόκρισή τους σε ίχνη υγρασίας. Οι αισθητήρες φθορισμού, ειδικά οι αισθητήρες ON, μπορούν να αποδώσουν εξαιρετικά υψηλή ανίχνευση [73] ενώ οι χρωματομετρικοί αισθητήρες έχουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα επειδή η υγρασία μπορεί να ανιχνευθεί οπτικά χωρίς πολύπλοκα αναλυτικά όργανα.

Αρκετοί αισθητήρες φθορισμού και χρωματομετρίας είναι γνωστοί για την ανίχνευση υγρασίας σε οργανικούς διαλύτες. Μελετούν κυρίως τις αρχές της μεταφοράς πρωτονίων, της επαγόμενης από το νερό αποσύνδεσης ανιοντικών χρωστικών, της επαγόμενης από το νερό συσσωμάτωσης και της επαγόμενης από το νερό πρωτονίωσης. Οι αλλαγές UV-Vis και φθορισμού που παρατηρούνται παρουσία νερού οφείλονται κυρίως στη φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων, ενδομοριακή μεταφορά φορτίου, διεγερμένη κατάσταση ενδομοριακής μεταφοράς πρωτονίων, μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster, στο διαλυτοχρωμικό φαινόμενο (solvochromic effect) και στην εκπομπή που προκαλείται από τη συσσωμάτωση.

1.2.1. Πλεονεκτήματα των νανοϋλικών στην ανίχνευση υγρασίας με φθορισμό

Φθορισμοφόροι μοριακοί ανιχνευτές για την ανίχνευση νερού και σχετικής υγρασίας έχουν παρασκευαστεί με πολύ καλή εκλεκτικότητα [74]. Ωστόσο, αυτοί οι φθορισμοφόροι μοριακοί ανιχνευτές απαιτούν πολύπλοκη οργανική σύνθεση, χρονοβόρες διαδικασίες χρωματογραφίας στήλης πηκτής πυριτίας και μεγάλες ποσότητες τοξικών οργανικών διαλυτών. Ευτυχώς, η νανοτεχνολογία παρέχει μια ποικιλία από νανοϋλικά για την ανίχνευση νερού, ειδικά

νανοϋλικά φθορισμού, επειδή οι φθορισμοφόροι νανοϊχνηλάτες έχουν καλύτερη απόδοση στην ανίχνευση νερού και υγρασίας.

Αυτά τα νανοϋλικά φθορισμού είναι εύκολο να παρασκευαστούν και δεν απαιτούν κουραστικές και περίπλοκες διαδικασίες, ακριβές πρόδρομες ενώσεις ή μεγάλες ποσότητες τοξικών οργανικών διαλυτών. Η Εικόνα 17 παρουσιάζει ένα παράδειγμα σύνθεσης ενός τέτοιου νανοϋλικού για την ανίχνευση υγρασίας με φθορισμό.



Εικόνα 17: Παρασκευή νανοσύνθετων κβαντικών κουκκίδων άνθρακα/CuNCs με φθορισμό διπλής εκπομπής για την ανίχνευση ιχνών νερού σε οργανικό διαλύτη.

Κβαντικές κουκκίδες άνθρακα (carbon quantum dots, CQDs) με διαλυτοχρωμικές ιδιότητες συντίθεται μέσω υδροθερμικής επεξεργασίας της ο-φαινυλενοδιαμίνης για 12 h [75]. Μετά τον καθαρισμό με φυγοκέντρηση και διήθηση, χρησιμοποιήθηκαν τα ληφθέντα CQDs για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του νερού σε ακετόνη, THF και ακετονιτρίλιο (acetronitrile, ACN) με LOD 0,19 v%, 0,13 v% και 0,18 v%, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι πρόδρομες ενώσεις για

την παρασκευή μοριακών ανιχνευτών φθορισμού είναι πιο ακριβές από αυτές για φθορισμοφόρους νανοαισθητήρες. Η παραπάνω σύγκριση δείχνει ότι οι νανοαισθητήρες φθορισμού παρουσιάζουν περισσότερα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους μοριακούς ανιχνευτές φθορισμού, όπως η απλότητα, το χαμηλό κόστος, η ευκολία στη λειτουργία και η φιλικότητα προς το περιβάλλον.



Εικόνα 18: Διάγραμμα διαφόρων νανοϋλικών για την ανίχνευση του νερού και της υγρασίας με φθορισμό.

1.3. Η Παρουσία Μεθανόλης (MeOH) σε Αλκοολούχα Ποτά

Το αλκοόλ είναι μια ψυχοδραστική ουσία και η μη εξουσιοδοτημένη χρήση του μπορεί να έχει πολλαπλές αρνητικές επιπτώσεις. Το αλκοόλ περιέχει επικίνδυνες χημικές συνθέσεις όπως η μεθανόλη, που θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Η αιθανόλη και η μεθανόλη έχουν συγκρίσιμα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και είναι υποπροϊόντα της απόσταξης [76]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η αλόγιστη κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί περίπου 2,5 εκατομμύρια θανάτους ετησίως, με το μεγαλύτερο ποσοστό να εμφανίζεται σε νέους [77]. Τα συμπτώματα δηλητηρίασης με μεθανόλη περιλαμβάνουν

απώλεια συνείδησης, ζάλη, αδυναμία και δυσκολία στην αναπνοή, θολή όραση και τύφλωση, απώλεια βάρους, πονοκέφαλο, στομαχόπονους, ναυτία, διάρροια και έμετο [78].

Σύμφωνα με τον ΠΟΥ (2014), συγκεντρώσεις μεθανόλης στο αίμα που υπερβαίνουν τα $500 \text{mg} \cdot \text{I}^{-1}$ συνδέονται με σοβαρή τοξικότητα και συγκεντρώσεις πάνω από $1500\text{-}2000 \text{mg} \cdot \text{I}^{-1}$ έχουν ως αποτέλεσμα τη θνησιμότητα σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν θεραπεία [78]. Μικρές ποσότητες μεθανόλης προκαλούν σημαντική μεταβολική οξέωση, οπτικές ανωμαλίες που μπορεί να οδηγήσουν σε τύφλωση και σε ακραίες περιπτώσεις πολύ-οργανική ανεπάρκεια και θάνατο [79]. Η ανίατη δηλητηρίαση από μεθανόλη συνδέεται με ποσοστό θνησιμότητας 28% και πιθανότητα τύφλωσης σε επιζώντες 30% [79]. Κατά την κατάποση, η τοξικότητά τους κυμαίνεται από μέτρια αναστρέψιμη μέθη έως θανατηφόρα για το κεντρικό νευρικό σύστημα και αναπνευστική καταστολή και εξαρτάται από τη δόση [79]. Οι ασθενείς σπάνια υποφέρουν από νευρολογικά επακόλουθα, τα οποία μπορεί να εμφανιστούν ημέρες, εβδομάδες ή και μήνες μετά την εξάντληση των άμεσων επιδράσεων της ουσίας [80].

1.4. Ένζυμα και Ενζυμική Δράση

1.4.1. Ενζυμική μίμηση

Η φύση περιέχει μεγάλο αριθμό ενζύμων που εκτελούν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως, φωτοσύνθεση, διάσπαση νερού κλπ., και η συνθετική αναπαραγωγή αυτών των θεμελιωδών διεργασιών παραμένει μια σημαντική πρόκληση [81]. Ως βιοκαταλύτες, τα ένζυμα επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις με βάση δύο βασικές αρχές:

- δεν καταναλώνονται ή δεν αλλοιώνονται μόνιμα από τις επιταχυνόμενες αντιδράσεις τους,
- ii. η χημική ισορροπία μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων δεν αλλάζει [82].

Χρησιμοποιώντας αυτές τις αρχές, τα ένζυμα φυσικής προέλευσης χρησιμοποιούνται σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας τροφίμων, της ανάπτυξης φαρμάκων και της παραγωγής ανανεώσιμης ενέργειας. Ωστόσο, το πλήρες δυναμικό των φυσικών ενζύμων παρεμποδίζεται από αρκετούς περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένου του υψηλού κόστους παραγωγής και της αστάθειας κατά τη διαδικασία παραγωγής.

Καινοτόμες τεχνικές και νέες μέθοδοι σύνθεσης τεχνητών καταλυτών έχουν εμφανιστεί για την αντιμετώπιση περιοριστικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια, η νανοτεχνολογία έχει προωθήσει την ανάπτυξη νανοενζύμων, τα οποία ορίζονται ως νανοϋλικά με ενζυμική δραστικότητα [83]. Σε σύγκριση με τα φυσικά ένζυμα, τα πλεονεκτήματα αυτών των νανοϋλικών έγκεινται κυρίως σε πιο αποδοτικές διαδικασίες παραγωγής, ευκολία τροποποίησης και υψηλότερη καταλυτική σταθερότητα [84].

1.4.2. Υπεροζειδάση (Peroxidase)

Οι υπεροξειδάσες μπορούν να καταλύσουν τις αντιδράσεις οξείδωσης μεταξύ των υπεροξειδίων και των αναγωγικών υποστρωμάτων [85]. Ένα μεγάλο ποσοστό των υπεροξειδασών είναι ουσιαστικά τα πρωτεϊνικά ένζυμα που χρησιμοποιούν την αίμη ως συμπαράγοντα, για παράδειγμα, η υπεροξειδάση αγριοραφανίδων (horseradish peroxidase, HRP), υπεροξειδάση του κυτοχρώματος c και λακτοϋπεροξειδάση. Η ενεργή θέση της υπεροξειδάσης αποτελείται συνήθως από έναν συμπαράγοντα αίμης (λίγες υπεροξειδάσες περιέχουν δύο συμπαράγοντες αίμης στην ενεργή θέση) και ορισμένα δραστικά υπολείμματα (reactive residues) γύρω από την αίμη. Λόγω του υδρόφοβου θύλακα που παρέχεται από τα υπολείμματα γύρω από την αίμη (Phe, His, Gly, Pro, κλπ.), η HRP χρησιμοποιεί πολλές αρωματικές ενώσεις ως αναγωγικά υποστρώματα [86].

Εμπνευσμένα από τις χημικές δομές ενεργών θέσεων σε φυσικές υπεροξειδάσες, έχει κατασκευαστεί μια ποικιλία τεχνητών ενζύμων που μιμούνται την υπεροξειδάση με βάση πεπτίδια. Σύμφωνα με τις διαφορετικές συνθέσεις και ενεργές θέσεις συστημάτων μίμησης υπεροξειδάσης, χρησιμοποιούμενα νανοϋλικά σε εγγενείς μιμήσεις υπεροξειδάσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν χονδρικά σε τέσσερις τύπους: νανοϋλικά με βάση ευγενή μέταλλα, νανοϋλικά με βάση μέταλλα μετάπτωσης, με βάση τον άνθρακα και άλλα ανόργανα υλικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19: Χρονοδιάγραμμα για την ανάπτυζη εγγενών μιμήσεων υπεροζειδάσης με βάση νανοϋλικά.

Η υπεροξειδάση περιλαμβάνει μια οικογένεια οξειδορεδουκτασών που μπορεί να μεσολαβήσει στην αναγωγή του H₂O₂ με ταυτόχρονη οξείδωση του οργανικού υποστρώματος όπως 3,3,5,5τετραμεθυλοβενζιδίνη (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB), ο-φαινυλενοδιαμίνη (ophenylenediamine, OPD), 2,2'-αζινο-δις(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη- 6-σουλφονικό οξύ), ντοπαμίνη, λουμινόλη κλπ.[87, 88]. Μέχρι σήμερα, οξείδια μετάλλων, κουκκίδες άνθρακα, και νανοσωλήνες άνθρακα έχουν αναφερθεί ότι μεταφράζουν ή μιμούνται τη δράση της HRP [89]. Λόγω της εύκολης μεταφοράς ηλεκτρονίων, με βάση το μέταλλο και το μεταλλικό NC, οι υπεροξειδάσες προσφέρουν καταλυτική δράση σε ένα ευρύ φάσμα του pH και της θερμοκρασίας [90]. Εκτός από το μέγεθος και το σχήμα του νανοϋλικού, η φύση της επιφανειακής κάλυψης υπαγορεύει σε μεγάλο βαθμό τη συγγένεια με τα υποστρώματα [90].

Μεταλλικά νανοσυμπλέγματα με μέγεθος στη νανοκλίμακα αντιπροσωπεύουν μία κλίμακα μεγέθους μεγαλύτερη από τα μεμονωμένα ατόμα [13]. Διαθέτουν μεγάλη ειδική επιφάνεια και λόγου των καταστάσεων οξείδωσης του μετάλλου τους, τα NCs μπορούν να χρησιμεύσουν ως αποτελεσματικό υποκατάστατο του φυσικού ενζύμου [91]. Ακόμα, η έρευνα σε μιμητικούς ενζυμικούς παράγοντες με τη χρήση NCs είναι σε αρχικό στάδιο. Την τελευταία δεκαετία υπήρξε σπουδαία πρόοδος στην έρευνα των ευγενών μεταλλικών νανοσωματιδίων (Au, Pd και Ag NCs), λόγω των δομών τους και των φυσικών τους ιδιοτήτων [92]. Ωστόσο, η υψηλή

δραστικότητα του χαλκού εμποδίζει τη σύνθεση και τις εφαρμογές των CuNCs. Έχουν επιτευχθεί CuNCs με ρυθμιζόμενη εκπομπή, με την αλλαγή του προσδέματος κάλυψης της επιφάνειας (θειόλη, αμινοξύ, πεπτίδιο, DNA, πρωτεΐνη), της θερμοκρασίας, του διαλύτη και του pH [93].

Η χρήση των βιομορίων ως προσδέματα κάλυψης επιφάνειας όχι μόνο παρέχει φθορίζοντα NCs με εκπομπή στην πράσινη περιοχή του φάσματος αλλά είναι και μη τοξικά [94]. Τα CuNCs μπορούν να επιταχύνουν την οξείδωση του TMB με παρουσία υπεροξειδίου. Η δημιουργία χρώματος ή φθορισμού στο σύστημα αντίδρασης κατά τη διάρκεια της κατάλυσης χρησιμοποιείται εκτενώς σε βιοαισθητήρες, στην κλινική ανίχνευση και στην παρακολούθηση περιβαλλοντικών ρύπων. Αρκετοί επιβλαβείς μεταβολίτες (H₂O₂, ουρικό οξύ κλπ.), αντιοξειδωτικά (ασκορβικό οξύ), GSH, ντοπαμίνη, γλυκόζη και χοληστερόλη έχουν ανιχνευθεί με βάση τις χρωματομετρικές και φθορισμομετρικές τεχνικές [95].

1.4.3. Βρόχινο νερό

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) είναι ένας από τους ισχυρότερους οξειδωτικούς παράγοντες που βρίσκονται στο φυσικό νερό. Αποτελεί επίσης βασικό μέσο σε διάφορους τομείς, όπως η παραγωγή τροφίμων, τα λευκαντικά χαρτιού και τα απολυμαντικά. Υπάρχει σε όλα τα φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα και σχηματίζεται κυρίως με φωτοχημικό σχηματισμό μέσω ενδιάμεσων ελεύθερων ριζών και διαλυμένων οργανικών χρωμοφόρων. Το H₂O₂ στο νερό της βροχής είναι ένας αποτελεσματικός οξειδωτικός παράγοντας που οξειδώνει το διοξείδιο του θείου προς σχηματισμό θειικού οξέος και η περιεκτικότητά του στο νερό της βροχής είναι συνήθως σε μικρομοριακό επίπεδο. Ο προσδιορισμός του H₂O₂ στο νερό της βροχής έχει μεγάλη σημασία σε περιβαλλοντικές εφαρμογές- έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του H₂O₂, συμπεριλαμβανομένων φασματοφωτομετρικών, φθορομετρικών και αμπερομετρικών μεθόδων.

1.4.4. Ανάλυση δεδομένων με τη χρήση ενζύμων

Οι σχετικές κινητικές παράμετροι προσδιορίζονται από μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ενζύμου (περίσσεια ενζύμου). Πειράματα πρέπει να πραγματοποιηθούν σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες, και μετρούνται οι αρχικές ταχύτητες. Στη συνέχεια, τα δεδομένα ερμηνεύονται με βάση το κινητικό πρότυπο μοντέλο του Michaelis-Menten [96 - 98]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό το σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα είναι σε ισορροπία με το μηδεσμευμένο ένζυμο και το ελεύθερο υπόστρωμα στο διάλυμα. Επίσης, το ένζυμο ή το υπόστρωμα πρέπει να είναι σε περίσσεια. Υπό αυτές τις συνθήκες αντιστοιχούν δύο ανάλογες εξισώσεις είτε υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, [S], είτε περίσσειας ενζύμου, [E], μπορεί να ληφθεί:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (4) \text{ yia περίσσεια υποστρώματος,}$$
$$V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[E]}{K_M + [E]} \quad (5) \text{ yia περίσσεια ενζύμου,}$$

όπου P είναι το προϊόν της αντίδρασης, V είναι η (αρχική) ταχύτητα, [S] είναι η συγκέντρωση υποστρώματος, Vmax είναι η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, και το $K_{\rm M}$ είναι η σταθερά Michaelis που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση υποστρώματος [S] στη οποία το ένζυμο επιδεικνύει το 50% της μέγιστης ταχύτητας. Σε μια γραφική παράσταση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης έναντι της συγκέντρωσης, οι δύο παραπάνω παράμετροι εξάγονται με μη γραμμική προσαρμογή ελαχίστων τετραγώνων: το Vmax είναι η ασυμπτωτική ταχύτητα σε υψηλές συγκεντρώσεις και το $K_{\rm M}$ είναι η συγκέντρωση στην οποία V = Vmax/2, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 20**. Τα δεδομένα προσαρμόζονται στις παραπάνω εξισώσεις για τον προσδιορισμό αυτών των παραμέτρων.



Εικόνα 20: Γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten.

Η αναδιαταγμένη εξίσωση Michaelis-Menten δίνει την ακόλουθη εξίσωση Lineweaver - Burk,

η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των
$$K_M$$
 και $Vmax$ (Εικόνα 21)

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (6)$$

Όσο μικρότερη είναι η τιμή της *K*_M τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια του ενζύμου ως προς τον υπόστρωμα και τόσο πιο ταχεία η αντίδραση.



Εικόνα 21: Ένα παράδειγμα γραφικής παράστασης Lineweaver-Burke. 1.4.5. Μοντέλα αρχικών ταχυτήτων σε συνθήκες περίσσειας Ένα απλό μοντέλο για την ενζυμική αντίδραση δίνεται από:

$$E+S \stackrel{k_1}{\longrightarrow} ES \stackrel{k_2}{\longrightarrow} E+P$$

όπου το E είναι ένζυμο, το S είναι υπόστρωμα, το ES είναι σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και το P είναι προϊόν. Η σταθερά k_2 καθορίζει την ταχύτητα με την οποία το σύμπλοκο ES μετατρέπεται σε προϊόν. Η χρήση της εξίσωσης Michaelis-Menten απαιτεί είτε το ένζυμο είτε το υπόστρωμα είναι σε περίσσεια και ότι υπάρχει ψευδοσταθερή κατάσταση στο σύμπλεγμα ES έτσι ώστε η συγκέντρωσή του να είναι ουσιαστικά σταθερή με τον χρόνο, δηλαδή, σε συνθήκες σταθερής κατάστασης ο σχηματισμός και η διάσπαση του ES βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία. Η ίδια η εξίσωση Michaelis-Menten δεν περιγράφει τα προφίλ συγκέντρωσης του ενζύμου (ανάλογα με το ποιο είναι σε περίσσεια). Για την περίπτωση περίσσειας υποστρώματος όπου το σύμπλεγμα ES βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση (και με μια σταθερή τιμή), ο σχηματισμός του P και η κατανάλωση του S ακολουθούν κινητικές μηδενικής τάξης:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_2[ES] \Rightarrow [P] = [P]_0 + K_2[ES] \cdot t \quad (8)$$
$$\frac{d[S]}{dt} = K_2[ES] \Rightarrow [S] = [S]_0 - K_2[ES] \cdot t \quad (9)$$

Η εξίσωση (9) υποδηλώνει/υποθέτει ότι η μείωση του [S] περιορίζεται από τη μετατροπή του συμπλόκου [ES] σε προϊόν [P] όταν η αρχική δέσμευση του ενζύμου γίνεται γρήγορα.

Μια αντιπροσωπευτική λύση στις εξισώσεις αυτές, φαίνεται στην Εικόνα 22 για την περίπτωση περίσσειας υποστρώματος.



Εικόνα 22: Διάγραμμα συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρόνο για τα αντιδρώντα που φαίνονται στην εξίσωση (9) σε συνθήκες περίσσειας υποστρώματος. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει τη διάρκεια της ενζυμικής λειτουργίας σε ένα τυπικό πείραμα έτσι ώστε να ισχύει η εζίσωση Michaelis-Menten.

Αξιοσημείωτη είναι η γραμμική μείωση και αύξηση των [S] και [P], αντίστοιχα, σύμφωνα με τις εξισώσεις (8) και (9), κατά τη χρονική περίοδο όπου το [ES] είναι σταθερό. Αυτές οι συνθήκες επιτρέπουν να εξάγονται σωστά οι κινητικές παράμετροι από ένα μοντέλο Michaelis-Menten για την αρχική ταχύτητα αντίδρασης.

Ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα για την περίπτωση της περίσσειας ενζύμου φαίνεται στην Εικόνα 23. Σε αυτή την περίπτωση, βλέπουμε ότι το υπόστρωμα δεσμεύεται γρήγορα από το ένζυμο για να σχηματίσει το σύμπλεγμα ES. Σε οποιαδήποτε από τις συνθήκες, περίσσειας υποστρώματος ή ενζύμου, το επαρκές υπόστρωμα παραμένει ανέπαφο και δεν αντιδρά κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού έτσι ώστε να ισχύουν οι υποθέσεις της εξίσωσης Michaelis-Menten.



Εικόνα 23: Διάγραμμα συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρόνο για τα αντιδρώντα που φαίνονται στην εξίσωση (8) σε συνθήκες περίσσειας ενζύμου. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει τη διάρκεια της ενζυμικής λειτουργίας σε ένα τυπικό πείραμα έτσι ώστε να ισχύει η εξίσωση Michaelis-Menten.

1.5. Σκοπός του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Στόχος του παρόντος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης είναι η μελέτη νανοσυμπλεγμάτων χαλκού (CuNCs) ως φθορίζοντες ανιχνευτές για τον προσδιορισμό της υγρασίας σε πολικούς οργανικούς διαλύτες, της μεθανόλης σε αλκοολούχα ποτά και του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της ενζυμικής μίμησης. Οι πειραματικές συνθήκες που επηρεάζουν τον προσδιορισμό τους θα μελετηθούν και θα εξαχθούν συμπεράσματα ως προς την εφαρμοσιμότητα και την προοπτική τους σε πραγματικά δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2⁰ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύτες - Υλικά

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε διπλά αποσταγμένο νερό (DDW). Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Τέλος, τα δείγματα των αλκοολούχων ποτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ελήφθησαν από τοπικό κατάστημα. Ο κατάλογος όλων παρατίθενται παρακάτω.

- Τριένυδρος νιτρικός χαλκός [Cu(NO₃)₂·3H₂O]
- Φωσφορικό οξύ (H₃PO₄) από τη Sigma-Aldrich
- Γλουταθειόνη (GSH) από την Alfa Aesar
- N, N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) από την Carlo Erbra
- Μεθανόλη (methanol, MeOH) από τη Fisher Chemical
- Αιθανόλη (ethanol, EtOH) από τη Fisher Chemical
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (isopropyl alcohol, IPA) από τη Fisher Chemical
- Ακετονιτρίλιο (ACN) από τη Fisher Chemical
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) από τη Merck KGaA
- Bορικό οξύ από την Panreac Química S.A.
- Οξικό οξύ από τη Fluka
- ο-φαινυλενοδιαμίνη από τη Fluka
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου από την Carlo Erbra
- Υδροχλωρικό οξύ από Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany
- Υδροξείδιο του νατρίου από Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany
- Χλωριούχο νάτριο από Merck-Darmstadt, Germany
- Δις-απεσταγμένο νερό (DDW)

- Ρυθμιστικό διάλυμα Britton-Robinson, στην περιοχή pH 2-12, συγκέντρωσης 0,04 M: Παρασκευάστηκαν διαλύματα CH₃COOH, H₃PO₄ και H₃BO₄ με αραίωση 0,915 mL, 0,930 mL και ζύγιση 0,99 g σε 100 mL H₂O αντίστοιχα, και ανάμειξη ίσων όγκων (83,3 mL) των διαλυμάτων αυτών, ώστε ο τελικός όγκος ήταν 250 mL. Με την προσθήκη διαλύματος NaOH 0,2 M παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα με το αντίστοιχο pH.
- Vodka Serkova 40% vol και
- Τσίπουρο 40% vol.

2.2. Όργανα και Συσκευές

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου (Shimadzu, Japan)
- Συσκευή διπλής απόσταξης ύδατος (Aquatron, A4D, BIBBY Scientific Ltd, UK)
- Πεχάμετρο PHM83 Autocal pH METER (Radiometer, Denmark)
- > Εργαστηριακός φούρνος (ή πυριαντήριο)
- Συσκευή περιδύνισης (Vortex)
- Λουτρό υπερήχων Emmi-D30 (Emag, Germany)
- Γεννήτρια αζώτου Micro nitrogen generator (Claind S.r.l., Lenno, Italy)
- Λουτρό υπερήχων Elmasonic S40 (Elma, Germany)
- Φυγόκεντρος PrO-Research centrifuge (Centurion, Sci. West Sussex, UK)
- Nano Zetasizer (Nano ZS, Malvern, Herrenberg) με τεχνολογία δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρους και τη μέτρηση του ζ-δυναμικού
- Φασματοφθορισμόμετρο FS5 Spectrofluorometer (Edinburgh Instruments) εφοδιασμένο με σύστημα μαγνητικής ανάδευσης
- Φασματόμετρο υπερύθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR-FTIR), (FT-IR, Perkin Elmer Inc., MA, USA)
- Κυψελίδα από χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1 cm

- Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους-Ορατού UV-1800 (Shimadzu, Japan)
- Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτινών X (X-Ray Phoetoelectron Spectroscopy, XPS)

2.3. Προετοιμασία δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό υγρασίας σε δείγματα οργανικών διαλυτών (DMF, DMSO, MeOH, ACN, IPA, EtOH), γνωστή ποσότητα νερού προστέθηκε σε άνυδρους οργανικούς διαλύτες και με κατάλληλες αραιώσεις τα διαλύματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Για τη μελέτη της παρουσίας MeOH σε αλκοολούχα ποτά, παρασκευάστηκαν διαλύματα αιθανόλης/νερού εμβολιασμένα με γνωστή ποσότητα μεθανόλης, σε διάφορες αναλογίες αιθανόλης/μεθανόλης/νερού. Τέλος, για τον προσδιορισμό του H₂O₂ μέσω ενζυμικής μίμησης, δείγμα βρόχινου νερού συλλέχθηκε κατευθείαν σε ποτήρι ζέσεως, και αναλύθηκε χωρίς να υποστεί κάποια περαιτέρω επεξεργασία.

2.4. Πειραματικές Πορείες

2.4.1. Σύνθεση των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού (CuNCs) σε DMF

Η παρασκευή του CuNCs@GSH-DMF έγινε σύμφωνα με την εργασία των Han et al.[99] με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 40 mg γλουταθειόνης και 60 mg Cu(NO₃)₂ διαλύθηκαν σε 15 mL DMF, ενώ το διάλυμα ήταν υπό ανάδευση. Μετά από έντονη ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου, το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το δείγμα ξηράθηκε σε ρεύμα αζώτου, προκύπτοντας το τελικό ίζημα (λευκού χρώματος) το οποίο αποθηκεύτηκε για περαιτέρω χρήση σε ξηραντήρα κενού.

2.4.2. Σύνθεση των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού (CuNCs) σε H₂O

Τα σταθεροποιημένα με γλουταθειόνη CuNCs παρασκευάστηκαν στο νερό με μία ηχοχημική διαδικασία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία με κάποιες τροποποιήσεις [100]. Συγκεκριμένα, 144 mg GSH και 22,4 mg Cu(NO₃)₂ προστέθηκαν σε 5 mL DDW και το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Έπειτα, διάλυμα NaOH (1 M) προστέθηκε στάγδην με έντονη ανάδευση μέχρι pH = 5,0 και στη συνέχεια το μίγμα τοποθετήθηκε σε υπερήχους για 15 min. Το προϊόν (κίτρινου χρώματος) συλλέχθηκε με καθίζηση μετά από προσθήκη ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στα 3000 rpm. Η παραπάνω διαδικασία λήψης του προϊόντος επαναλήφθηκε τρεις φορές, ακολουθούμενη από τη συλλογή του ιζήματος. Το προκύπτον ίζημα ξηράθηκε υπό ρεύμα αζώτου και αποθηκεύτηκε για περαιτέρω χρήση, στους 4°C.

2.4.3. Βελτιστοποίηση προσδιορισμού των αναλυτών

Για τον προσδιορισμό των αναλυτών, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάλυσης, η οποία περιλάμβανε τη διερεύνηση των ακόλουθων παραμέτρων: συγκέντρωση CuNCs, pH, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, θερμοκρασία, ιοντική ισχύς και χρόνος επώασης πριν από τη μέτρηση.

2.4.3.1. Προσδιορισμός υγρασίας

Όγκος 200 μL διαλύματος CuNCs-DMF συγκέντρωσης 20 mg/mL, αραιώθηκε περαιτέρω σε τελικό όγκο 1,4 mL οργανικού διαλύτη (DMF, DMSO, MeOH, ACN, IPA, EtOH). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και καταγράφηκε η βασική τιμή φθορισμού, για λex/λem = 310 nm/660 nm. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα με περιεκτικότητα σε νερό 1-10%, σε οργανικό διαλύτη (DMF, DMSO, MeOH, ACN, IPA, EtOH), με τελικό όγκο 1,2 mL. Ακολούθως, προστέθηκαν 200 μL από διάλυμα CuNCs-DMF συγκέντρωσης 20 mg/mL, σε τελικό όγκο 1,4 mL. Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και καταγράφηκαν οι τιμές φθορισμού (αύξηση), για λex= 310 nm και λem= 660 nm.

2.4.3.2. Προσδιορισμός ΜeOH

Όγκος 200 μL διαλύματος CuNCs -DMF συγκέντρωσης 20 mg/mL αραιώθηκε σε τελικό όγκο 2,8 mL διαλύματος EtOH: H₂O 40:60 (v:v). Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και καταγράφηκε η βασική τιμή φθορισμού για λex/λem = 310 nm/660 nm. Παρασκευάστηκαν τρεις σειρές πρότυπων υδατικών διαλυμάτων MeOH περιεκτικότητας 1-10%, σε διαφορετικές αναλογίες (EtOH+MeOH): H₂O 40:60 (v:v), (EtOH+MeOH): H₂O 20:80 (v:v), και (EtOH+MeOH): H₂O 60:40 (v:v) και τελικό όγκο διαλύματος 2,6 mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε αυτά 200 μL από διάλυμα CuNCs-DMF συγκέντρωσης 20 mg/mL, και ο τελικός όγκος ήταν 2,8 mL. Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και καταγράφηκαν οι τιμές φθορισμού (αύξηση) για λex= 310 nm και λem= 660 nm.

2.4.3.3. Προσδιορισμός Η₂O₂ μέσω ενζυμικής μίμησης

Στη κυψελίδα προστέθηκαν 600 μL από διάλυμα OPD (0,54 mg/mL) και 400 μL από CuNCs-H₂O (20 mg/mL) με συνεχόμενη καταγραφή του σήματος των κινητικών του φθορισμού. Από διάλυμα H₂O₂ συγκέντρωσης 0,16 mg/mL, όγκοι 5-30 μL μεταφέρθηκαν στην κυψελίδα, όπου αραιώθηκαν με DDW μέχρι τελικού όγκου 1,8 mL. Καταγράφηκε η μείωση του φθορισμού των CuNCs-H₂O + OPD σε λem= 660 nm και η αύξησή του σε λem= 350 nm μετά από διέγερση σε λex= 310 και 300 nm αντίστοιχα.

2.5.Χαρακτηρισμός των CuNCs

2.5.1. Φωτοηλεκτρονιακή φασματοσκοπία ακτίνων Χ

Τα πειράματα φωτοεκπομπής πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα υπερυψηλού κενού (ultra high vacuum system, UHV) που ήταν εξοπλισμένο με 'πιστόλι' ακτίνων X για μετρήσεις XPS. Χρησιμοποιήθηκε μη μονοχρωματική γραμμή MgKa στα 1253,6 eV και δύο ενέργειες διέλευσης αναλυτή 15 eV (που δίνουν πλήρες πλάτος στο μισό μέγιστο (full width at half maximum, FWHM) 0,85 eV για την κορυφή Ag3d_{5/2}) και 40 eV. Τα φάσματα επιπέδου πυρήνα XPS αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας μια ρουτίνα προσαρμογής, η οποία μπορεί να αποσυνθέσει κάθε φάσμα σε μεμονωμένες μικτές κορυφές Gaussian-Lorentzian μετά από αφαίρεση υποβάθρου Shirley. Τα σφάλματα στα ποσοτικά δεδομένα εντοπίζονται στο εύρος ~10%, ενώ η ακρίβεια για τις εκχωρήσεις BE είναι ~0,1 eV. Τα δείγματα ήταν σε μορφή σκόνης και συμπιέστηκαν σε μορφή φύλλου και η περιοχή που αναλύθηκε ήταν ένα ορθογώνιο 7,0×15 mm².

2.5.2. Φασματοσκοπία UV/Vis

Για την λήψη φασμάτων, παρασκευάστηκαν διαλύματα CuNCs στο νερό με κατάλληλες αραιώσεις. Για τη λήψη των φασμάτων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm χωρητικότητας 1 mL. Τα φάσματα ελήφθησαν στην περιοχή UV - Vis, σε θερμοκρασία δωματίου.

2.5.3. Φασματοσκοπία FT-IR

Ελήφθησαν τα φάσματα FTIR των στερεών δειγμάτων CuNCs. στην περιοχή κυματαριθμών 4000 έως 400 cm⁻¹.

2.5.4. Ανάλυση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

Το υδροδυναμικό μέγεθος των σωματιδίων μετρήθηκε με την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), η οποία επιτρέπει τη γρήγορη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων σε διασπορές και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Στο ίδιο όργανο μετρήθηκε το ζ- δυναμικό των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού.

2.6. Υπολογισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_M)

Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την ενζυμική καταλυτική αντίδραση που φαίνεται στην εξίσωση (10):

$$E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$$
 (10)

όπου τα *E*, *S*, *ES* και *P* αντιπροσωπεύουν το μιμητικό παράγοντα ενζύμου (CuNCs-H₂O), το υπόστρωμα (OPD/H₂O₂), το σχηματιζόμενο προϊόν προσθήκης ενζύμου-υποστρώματος και το προκύπτον προϊόν, αντίστοιχα. Η εξίσωση Michaelis–Menten για αυτό το καταλυτικό σύστημα εκφράζεται ως εξής:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \qquad (11)$$

όπου V είναι η ταχύτητα μετατροπής του υποστρώματος, Vmax είναι η μέγιστη ταχύτητα μετατροπής, [S] είναι η συγκέντρωση υποστρώματος και K_M είναι η σταθερά Michaelis– Menten.

Οι κινητικές παράμετροι που σχετίζονται με την ενζυμική αντίδραση υπολογίστηκαν από τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιώντας φθορισμομετρία. Εάν χαραχθεί μια ευθεία εφαπτομένη στην καμπύλη κινητικής της αντίδρασης (φθορισμός έναντι χρόνου) ξεκινώντας από τη χρονική στιγμή μηδέν, υπολογίζεται η κλίση, που είναι η ταχύτητα της αντίδρασης. Για να εκφραστεί το Vmax ως προς τον σχηματισμό προϊόντος, θα πρέπει να μετατραπεί η ένταση φθορισμού σε συγκέντρωση προϊόντος. Έτσι, χαράσσεται το διάγραμμα της ταχύτητας έναντι της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αν το σύστημα υπακούει στην εξίσωση Michaelis-Menten τότε η καμπύλη θα είναι υπερβολική. Χρησιμοποιώντας γραμμικό μετασχηματισμό (διάγραμμα Lineweaver – Burk), προσδιορίζεται το Vmax (καθώς 1/ Vmax = β) και K_M (K_M / $Vmax = \alpha$).

KΕΦΑΛΑΙΟ 3^O - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα φθορίζοντα CuNCs παρήχθησαν με δύο διαφορετικούς τρόπους σύνθεσης: σε διαλύτη DMF με τη μέθοδο χάραξης (etching), σε θερμοκρασία δωματίου (με το ακρωνύμιο **CuNCs-DMF**) και σε H₂O με την ηχοχημική μέθοδο σε λουτρό υπερήχων, σε παγόλουτρο (με το ακρωνύμιο **CuNCs-H₂O**). Η σταθεροποίηση των CuNCs και στις δύο συνθέσεις έγινε με γλουταθειόνη (GSH) και ως πρόδρομη ένωση χρησιμοποιήθηκε Cu(NO₃)₂.

3.1. Χαρακτηρισμός των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού

3.1.1. Χαρακτηρισμός των CuNCs-DMF με φασματοσκοπία FT-IR

OI επιφανειακές ομάδες των συντεθειμένων CuNCs χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR. Οπως φαίνεται στην **Εικόνα 24**, οι κορυφές στα 1709 cm⁻¹ αποδίδονται στη χαρακτηριστική απορρόφηση του δεσμού δόνησης C=O. Ομοίως, οι κορυφές στα 1595 cm⁻¹ αντιστοιχίστηκαν σε δονήσεις δεσμού και κάμψης C–H, αντίστοιχα, ενώ οι κορυφή στα 3015 και 3242 cm⁻¹ αντιστοιχίστηκαν στη δόνηση κάμψης N–H. Συμπεραίνεται ότι τα CuNCs που συντέθηκαν διαθέτουν χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες, όπως COOH (1393 cm⁻¹), -C=N (1073 cm⁻¹) και $-NH_2$ (1277 cm⁻¹), οι οποίες προέρχονται από προστατευτικούς υποκαταστάτες της GSH. Σε σύγκριση με τα φάσματα FTIR της GSH (**Εικόνα 25**), δεν υπάρχει η διακριτή αφαίρεση/ διεύρυνση της δόνησης του δεσμού κάμψης -SH στα 2522 cm⁻¹ στα φάσματα FTIR του CuNCs-DMF (**Εικόνα 24**), η οποία αποκαλύπτει ότι τα άτομα χαλκού των CuNCs δεν καλύπτονται από την GSH μέσω δεσμού Cu–S. Μέσω αυτού του δεσμού παράγεται ένα προϊόν που οφείλεται ο φθορισμός. Τα αποτελέσματα αυτά, ερμηνεύουν το γεγονός ότι τα νανοσυμπλέγματα χαλκού δεν έχουν εγγενή φθορισμό.



Εικόνα 24: Φάσμα FTIR των παρασκευασμένων CuNCs-DMF.



Εικόνα 25: Φάσμα FTIR της GSH.

3.1.2. Χαρακτηρισμός των CuNCs-H₂O με φασματοσκοπία FT-IR

Oι επιφανειακές ομάδες των συντιθέμενων CuNCs-H₂O χαρακτηρίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FTIR. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 26**, οι κορυφές στα 3259 cm⁻¹ μπορεί να αποδοθούν στο χαρακτηριστική απορρόφηση δόνησης κάμψης του δεσμού O–H, ενώ για τον δεσμό C=O οι κορυφές δόνησης ήταν στα 1593 cm⁻¹. Τα παραπάνω δεδομένα αποκάλυψαν ότι η επιφάνεια των συντιθέμενων CuNCs-H₂O περιέχει καρβοξυλικές ομάδες. Ομοίως, η κορυφή στα 1520 cm⁻¹ αποδίδεται σε δονήσεις δεσμού κάμψης C–H, αντίστοιχα, ενώ οι κορυφές στα 3057 και 2926 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης N–H. Τα αποτελέσματα FTIR, δείχνουν ότι τα CuNCs-H₂O που συντίθενται έχουν χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες, όπως COOH (1393 cm⁻¹), −C≡N (1033 cm⁻¹) και −NH₂ (1248 cm⁻¹), οι οποίες προέρχονταν από προστατευτικούς υποκαταστάτες της GSH. Συγκρίνοντας τα φάσματα FTIR της GSH (**Εικόνα**

25) και του CuNCs-H₂O (Εικόνα 26), η κορυφή δόνησης της κάμψης του δεσμού –SH στα 2522 cm⁻¹ που είναι ορατή στο φάσμα της γλουταθειόνης, έχει διευρυνθεί/αφαιρεθεί, γεγονός που δείχνει ότι τα άτομα χαλκού των CuNCs-H₂O καλύπτονται από GSH μέσω δεσμών Cu–S. Αυτό αποδεικνύει και τον έντονο φθορισμό που επιδεικνύουν τα CuNCs-H₂O σε λex/λem= 310/660 nm.



Εικόνα 26: Φάσμα FTIR των παρασκευασμένων CuNCs-H₂O.

3.1.3. Χαρακτηρισμός των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού με φωτοηλεκτρονιακή φασματοσκοπία ακτίνων Χ

Για τη διερεύνηση της χημικής σωματιδιακής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ. Η **Εικόνα 27** δείχνει τη σάρωση του δείγματος CuNCs-H₂O, όπου ανιχνεύθηκαν κορυφές Cu, O, S, N και C. Η **Εικόνα 28** δείχνει το λεπτομερές φάσμα Cu2p XPS το οποίο αναλύεται σε δύο συστατικά Cu²⁺ σε ενέργειες δέσμευσης Cu2p_{3/2} στα 932,5eV και 934,1eV που αποδίδονται στο Cu⁺¹ σε Cu2O ή Cu⁰ και στο Cu⁺². Η **Εικόνα 29** δείχνει την αποσυνελιγμένη κορυφή N1s. Η κορυφή αποτελείται από δύο συστατικά σε ενέργειες δέσμευσης 398,8 eV που αποδίδονται στη βιβλιογραφία στο άζωτο πυριδίνης και στα 400,5 eV που αποδίδεται σε αμίνη/αμίδιο. Η **Εικόνα 30** δείχνει την αποσυνελιγμένη κορυφή S2p, με ενέργειες δέσμευσης S2p3/2 στα 162,2 eV που αποδίδονται στο σουλφίδιο μετάλλου και σε 167,3 eV που αποδίδονται σε σουλφοναμίδια (–SO₂). Η **Εικόνα 31** δείχνει την αποσυνελιγμένη κορυφή C1s χωρισμένη σε τέσσερα συστατικά:

- 1) δεσμούς C-C με διαμόρφωση sp2
- διαμόρφωση C-C sp3 και C-N σε ενέργειες δέσμευσης 284,4 eV και 285,2 eV αντίστοιχα,

- 3) δεσμούς C-O και C-S σε ενέργεια δέσμευσης 286,1 eV
- 4) C=O που βρίσκεται στα 287,6 eV.

Η % περιεκτικότητα συστατικών των Cu2p, N1s, S2p και C1s παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Από της περιοχές κορυφής των Cu2p, O1s, C1s, N1s και S2p διαιρεμένες με τους συντελεστές σχετικής ευαισθησίας και τα χαρακτηριστικά μετάδοσης του αναλυτή ενέργειας, προκύπτει η σχετική ατομική συγκέντρωση και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Κορυφές	Αποδίδεται σε	% περιεκτικότητα
Cu2p	CuO	64,0
	Cu or Cu ₂ O	36,0
N1s	Πυριδινικός δακτύλιος	77,9
	-C-NH-	22,1
S2p	Θειούχος χαλκός, Cu-S	64,9
	σουλφοναμίδιο, SO2	35,1
C1s	C-C sp ²	20,0
	C-C sp ³ , C-N	45,0
	C-O/C-S	7,7
	C=O	27,3

Πίνακας 1: % Συγκέντρωση συστατικού των Cu, N, S και C που προέρχεται από XPS Cu2p, N1s, S2p και C1s κορυφές αποσυνέλιζης και % ατομική συγκέντρωση σε δείγμα CuNCs-H₂O.

Πίνακας 2: % Ατομική συγκέντρωση Cu, N, S, O και C σε δείγμα CuNCs-H₂O.

Cu	Ν	S	0	С
3,7	11,9	6,6	34,0	43,8



Εικόνα 27: Φάσμα σάρωσης XPS σε δείγμα CuNCs-H₂O



Εικόνα 28: Ανάλυση κορυφής Cu2p φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεζης, του δείγματος CuNCs-H₂O



Εικόνα 29: Ανάλυση κορυφής N1 φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης, του δείγματος CuNCs-H₂O



Εικόνα 30: Ανάλυση κορυφής S2p φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης, του δείγματος CuNCs-H₂O



Εικόνα 31: Ανάλυση κορυφής C1s φάσματος XPS μετά από διαδικασία αποσύμπλεζης, του δείγματος CuNCs-H₂O

3.1.4. Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα μοριακής απορρόφησης UV-Vis που ελήφθησαν για τις δύο συνθέσεις, είχαν την ίδια μορφή. Τα νανοσυμπλέγματα χαλκού εμφάνισαν μια τυπική κορυφή περίπου στα 250 nm, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 32**, η οποία συμφωνεί με τα δεδομένα από διεθνή βιβλιογραφία [101, 100]. Όπως απεικονίζεται, υπάρχει κορυφή στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας, αλλά δεν ανιχνεύεται εμφανής απορρόφηση στην ορατή περιοχή, λόγω της έλλειψης μεγαλύτερων νανοσωματιδίων Cu.



Εικόνα 32: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού.

Τα CuNCs-DMF σε DMF εμφάνισαν πράσινο χρώμα (Εικόνα 33), ενώ το στερεό προϊόν, λευκού χρώματος, δεν εμφάνισε οποιονδήποτε φθορισμό όταν εκτέθηκε σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας.



Εικόνα 33: Τα CuNCs-DMF σε διάλυμα DMF και η στερεή του φάση υπό το φως της ημέρας.

Τα CuNCs-H₂O σε νερό έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα υπό το φως της ημέρας και η στερεά ουσία είναι επίσης κίτρινη. Τόσο η στερεή ένωση όσο και το διάλυμα εμφάνισαν έντονο ερυθρό φθορισμό όταν εκτέθηκαν σε υπεριώδες φως, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34**.



Εικόνα 34: Το διάλυμα CuNCs-H₂O στο νερό (μεσαία φωτογραφία), στη στερεή του φάση (δεζιά φωτογραφία) υπό το φως της ημέρας, και κατά την ακτινοβόλησή του σε υπεριώδες φως (αριστερή φωτογραφία).

3.1.5. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) και επιφανειακό φορτίο

Στην περίπτωση της οργανικής σύνθεσης (CuNCs-DMF), η ανάλυση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) έδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Όταν τα CuNCs-DMF διαλύθηκαν σε οργανικό διαλύτη (ισοπροπανόλη), το μέγεθος των νανοσυμπλεγμάτων ήταν αρχικά 490 nm (**Εικόνα 35**). Με την προσθήκη υγρασίας (8%), παρατηρήθηκε ότι τα CuNCs-DMF συσσωματώθηκαν και το μέγεθός τους αυξήθηκε σε 550 nm (**Εικόνα 36**). Ακόμα παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού. Το μέγεθος των CuNCs-DMF στην περίπτωση που τα νανοσυμπλέγματα διαλύθηκαν στο νερό ήταν 160 nm, με το ζ δυναμικό στην τιμή –14,3 mV

(Εικόνα 37). Αντίστοιχα, το μέγεθος των σωματιδίων στην περίπτωση EtOH : H₂O 40:60 ήταν 490 nm (Εικόνα 38), και στην περίπτωση (EtOH+MeOH): H₂O (32+8):60 ήταν 220 nm (Εικόνα 39). Παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού, όπως περιγράφεται παρακάτω στην Ενότητα 3.3.1.



Εικόνα 35: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη.



Εικόνα 36: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε ισοπροπανόλη : H₂O 92:8.



Εικόνα 37: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε νερό.



Εικόνα 38: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH: H₂O 40:60.



Εικόνα 39: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-DMF σε EtOH : MeOH : H₂O 32:8:60.

Στην περίπτωση της υδατικής σύνθεσης (CuNCs-H₂O), η ανάλυση δυναμικής σκέδασης φωτός έδειξε ότι, το μέγεθος των σωματιδίων στην περίπτωση που τα νανοσυμπλέγματα διαλύθηκαν

στο νερό ήταν 150 nm (**Εικόνα 41**), με το ζ δυναμικό –18 mV (**Εικόνα 40**). Το μέγεθος των σωματιδίων όταν αυτά διαλύθηκαν στο DMF ήταν 460 nm (**Εικόνα 42**).

Η αρνητική τιμή του επιφανειακού φορτίου και στις δύο περιπτώσεις (CuNCs-DMF και CuNCs-H₂O) στο νερό, αποδίδεται στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των νανοσυμπλεγμάτων χαλκού λόγω των υδροξυλο- και καρβοξυλομάδων.



Εικόνα 40: ζδυναμικό των CuNCs-H₂O σε νερό.



Εικόνα 41: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H₂O σε νερό.



Εικόνα 42: Μέγεθος σωματιδίων των CuNCs-H₂O σε DMF.

3.2.Μελέτη των συνθέσεων των CuNCs για τον προσδιορισμό των αναλυτών

3.2.1. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός υγρασίας σε πολικούς οργανικούς διαλύτες με τη χρήση των CuNCs-DMF

Τα CuNCs-DMF που συντέθηκαν ήταν αδιάλυτα σε οργανικούς πολικούς διαλύτες, όπως EtOH, IPA, ACN, DMF, DMSO και MeOH. Στους διαλύτες ACN, DMF και DMSO δεν παρατηρήθηκε φθορισμός, ενώ στους EtOH, IPA και MeOH παρατηρήθηκε ασθενής φθορισμός. Με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων νερού, όμως, παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση του φθορισμού στην ερυθρή περιοχή του φάσματος με λem= 610-660 nm. Ο φθορισμός των CuNCs-DMF στο μέγιστο του φάσματος εκπομπής εμφάνισε γραμμική εξάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης του νερού. Με βάση αυτά, διερευνήθηκε η εφαρμογή των CuNCs-DMF στην ανίχνευση νερού σε οργανικούς διαλύτες. Η **Εικόνα 43** δείχνει ακριβώς αυτή την εξάρτηση της αύξησης του ερυθρού φθορισμού σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες παρουσία νερού.



Εικόνα 43: Γραφική παράσταση του φθορισμού των CuNCs-DMF στους διάφορους οργανικούς διαλύτες για διαφορετικές περιεκτικότητες υγρασίας, (A): DMF, (B): ACN, (Γ): MeOH, (Δ): DMSO, (E): EtOH, (ΣΤ): IPA, με λex= 310 nm.

Μια παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η συγκέντρωση των CuNCs-DMF σε διαλύματα οργανικών διαλυτών. Δοκιμάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις (0,1, 0,21 και 0,41 mg/mL) των CuNCs-DMF σε διαλύτη DMF και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε ικανοποιητική γραμμικότητα ως συνάρτηση της έντασης του φθορισμού μόνο σε συγκέντρωση 0,41 mg/mL, όπως φαίνεται στην Εικόνα 44. Δεν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των CuNCs-DMF καθώς δεν δημιουργούταν σταθερό αιώρημα. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν μόνο σε διαλύτη DMF.



Εικόνα 44: Γραφική παράσταση της εξάρτησης του φθορισμού των CuNCs-DMF στο DMF σε συγκεντρώσεις: 0,1 mg/mL, 0,21 mg/mL και 0,41 mg/mL, σε συνάρτηση του $H_2O(\%)$ με $\lambda ex/\lambda em = 310/615$ nm.

Οι Εικόνες 45-50, παρουσιάζουν οι αυξήσεις του φθορισμού (μέσω του λόγου $\frac{F-F_0}{F_0}$, όπου F₀ και F είναι οι εντάσεις του φθορισμού απουσία και παρουσία του ενισχυτή, αντίστοιχα), σε συνάρτηση με την εκατοστιαία αύξηση της υγρασίας, στην περιοχή από 0-10%. Με αυτόν τον τρόπο κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης και υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (limits of detection, LODs) τα όρια ποσοτικοποίησης (limits of quantitation, LOQs) από το λόγου σήματος προς θόρυβο = 3 και 10, αντίστοιχα. Ακόμα, υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις σε όλους τους οργανικούς διαλύτες και η πιστότητα (precision, RSD), σε τρεις διαφορετικές εκατοστιαίες περιεκτικότητες σε υγρασία, την ίδια ημέρα. Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών μετρήσεων φαίνονται παρακάτω, στον Πίνακα 3.



Εικόνα 45: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε ACN συναρτήσει της περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/640 nm.


Εικόνα 46: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε DMF συναρτήσει της περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/615 nm.



Εικόνα 47: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε DMSO συναρτήσει της περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/650 nm.



Εικόνα 48: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε EtOH συναρτήσει της περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/610 nm.



Εικόνα 49: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε IPA συναρτήσει της περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/605 nm.



Εικόνα 50: Γραφική παράσταση του φθορισμού του CuNCs-DMF σε MeOH συναρτήσει της περιεκτικότητας νερού, με λex/λem= 310/600 nm.

Πίνακας 3: LOD, LOQ, RSD μεθόδου προσδιορισμού τ	υγρασίας σε διάφορους οργανικοί	ός
διαλύτες και ανακτήσεις σε τρία επίπεδα περιεκτικότητα	ας υγρασίας.	

0 /		$H_2O\left(\%w/v\right)$		$H_2O\left(\%w/v\right)$			(%w/v)	
Οργανικοι Διαλύτες	3	5	8	3	5	8	LOD	LOQ
	A	νάκτηση (%	6)		RSD (%)		-	
Ακετονιτρίλιο	106,3	97,5	100,7	8,4	2,2	8,8	0,9	2,8
DMSO	101,4	92,9	101,7	4,8	1,7	8,5	0,5	1,5
DMF	103,2	95,2	100,4	7,4	4,1	6,4	0,6	1,8
МеОН	94,3	100,8	103,9	5,1	3,1	6,2	0,4	1,3
EtOH	101,1	101,9	96,9	6,6	7,7	3,1	0,4	1,3
IPA	87,9	98,7	100,4	4,9	4,7	1,4	0,4	1,3

Ο Πίνακας 4 συνοψίζει μια σύγκριση μεταξύ της παρούσας μεθόδου και ορισμένων αναφερόμενων στη βιβλιογραφία μεθόδων ανίχνευσης νερού. Φαίνεται ότι η μέθοδός μας θα μπορούσε να εφαρμοστεί ευρέως σε διάφορους οργανικούς διαλύτες με χαμηλά όρια και μεγάλα εύρη ανίχνευσης. Ταυτόχρονα, η μέθοδός μας θα μπορούσε να αποτελέσει όχι μόνο ποιοτική ανίχνευση αλλά και ποσοτική ανάλυση.

Μέθοδοι/Νανοϋλικά	Οργανικός διαλύτης	Εύρος προσδιορισμού (%)	Ref.
Τιτλοδότηση Karl Fischer	-	_	[102]
Χρωματομετρικά / block copolymers	_	20-95	[103]
Φθορισμός / CDs/CuNCs	DMF	0,02-2,50	[104]
	THF	1,00-5,00	
	ACN	0,30-5,00	
Φθορισμός / Ru@MIL-NH2	EtOH	0-10,0	[105]
Φθορισμός / Eu-MOF/N, S-CDs	EtOH	0,05–4	[106]
Φθορισμός / μοριακός ανιχνευτής	Ακετόνη	0,0–8,0	[107]
χαλκόνης (chalcone)	Ακετονιτρίλιο	0,0–4,0	
	EtOH	0,0–6,0	
	Ισοπροπανόλη	0,0–4,0	
Φθορισμός / coumarin probe	DMF	0–1,0	[108]
Φθορισμός / CDs-CuNCs	DMSO	0-10,0	[109]
	DMF	0-7,5	
	ACN	0-10	
	EtOH	0-2,5,	
	Μεθανόλη	15-50 0-5, 20-45	
	η-Ποοπανόλη	0-10 10-25	
		0 10, 10 25	[100]
Smartphone / CDs-CuNCs	DMSO	0,5-10	[109]
	EtOH	2,5–45	
Φθορισμός / CuNCs-DMF	DMF		
	DMSO		
	EtOH	0-10,0	Παρούσα
	МеОН		Εργασία
	IPA		
	Ακετόνη		

Πίνακας 4: Σύγκριση των αναφερόμενων μεθόδων για τον προσδιορισμό νερού σε οργανικούς διαλύτες με την προτεινόμενη μέθοδο.

3.2.2. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός MeOH σε οινοπνευματώδη ποτά με τη χρήση CuNCs-DMF

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ποσοστιαίας αύξησης του φθορισμού των νανοσυμπλεγμάτων CuNCs-DMF στους οργανικούς διαλύτες EtOH και MeOH, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σε νερό στην περιοχή 0-100 %. Η **Εικόνα 51** δείχνει τα φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων αυτών για λex/λem=310/660 nm. Στους δύο οργανικούς διαλύτες παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση της κορυφής εκπομπής (~25 nm) προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Ομοίως, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα του νερού στα δείγματα. Απουσία νερού από τα διαλύματα MeOH ή EtOH δεν παρατηρείται φθορισμός. Τα CuNCs-DMF σε αυτούς τους δύο οργανικούς διαλύτες δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές ως προς την ένταση του φθορισμού.



Εικόνα 51: Φάσματα φθορισμού των CuNCs-DMF στους οργανικούς διαλύτες EtOH και MeOH, μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα σε νερό των διαλυμάτων στην περιοχή 0-100 %, με (A) EtOH και (B) MeOH σε λex/λem= 310/660 nm.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τεχνικώς παρασκευασμένα ποτά σε μίγματα (EtOH+MeOH):H₂O 40:60, (EtOH+MeOH):H₂O 20:80 και (EtOH+MeOH):H₂O 60:40 με περιεκτικότητα σε MeOH στο εύρος 1-10%. Οι αναλογίες αυτές παρομοιάζουν, ως ένα βαθμό, αλκοολούχα ποτά του εμπορίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην **Εικόνα 52**, όπου παρουσιάζεται ο φθορισμός των CuNCs-DMF σε σχέση με την περιεκτικότητα σε MeOH. Παρατηρείται ότι υπάρχει μεγάλη αύξηση στην ένταση φθορισμού σε συνάρτηση με την αύξηση της περιεκτικότητας της MeOH, στην περίπτωση του μίγματος (EtOH+MeOH):H₂O 60:40 για σταθερή συγκέντρωση σε νανοσυμπλέγματα. Επίσης, κατασκευάστηκε διάγραμμα της ποσοστιαίας αύξησης του φθορισμού σε συνάρτησα με την περιεκτικότητας της MeOH. Και στις τρεις αναλογίες αιθανόλης/νερού, υπάρχει παρόμοια περιοχή γραμμικότητας με την κλίση της ευθείας στο μίγμα (EtOH+MeOH):H₂O 40:60 να είναι μεγαλύτερη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 53**.



Εικόνα 52: Φάσματα φθορισμού των CuNCs-DMF σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση MeOH σε (A) (EtOH+MeOH):H₂O 20:80, (B) (EtOH+MeOH):H₂O 40:60 και (Γ) (EtOH+MeOH):H₂O 60:40, με λex/λem= 310/660 nm.



Εικόνα 53: Γραφική παράσταση της αύζησης του φθορισμού των CuNCs-DMF σε (EtOH+MeOH):H₂O 40:60, (EtOH+MeOH):H₂O 20:80 και (EtOH+MeOH):H₂O 60:40, για διάφορες συγκεντρώσεις MeOH με λex/λem= 310/660 nm.

Η συγκέντρωση των CuNCs-DMF μελετήθηκε για μίγματα (EtOH+MeOH):H₂O 40:60 σε σχέση με τη συγκέντρωση της MeOH. Μελετήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις (0,71, 1,43 και 2,9 mg/mL) και τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση των CuNC-DMF προέκυπτε και μεγαλύτερη κλίση (μεγαλύτερη ευαισθησία) σε συνάρτηση με την αύξηση της MeOH (%). Στην Εικόνα 54, παρατηρείται αυτή η συμπεριφορά. Δεν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των CuNCs-DMF καθώς δεν προέκυπτε σταθερό αιώρημα.



Εικόνα 54: Γραφική παράσταση του φθορισμού σε συνάρτηση με την εκατοστιαία περιεκτικότητα της MeOH σε συγκεντρώσεις CuNCs-DMF: 0,71 mg/mL, 1,43 mg/mL και 2,9 mg/mL, με λex/λem= 310/660 nm.

3.2.2.1. Επίδραση του pH στα παραγόμενα CuNCs-DMF σε διαλύματα EtOH/H₂O/MeOH

Διερευνήθηκε η επίδραση του pH σε μίγματα EtOH/H₂O με CuNCs-DMF, για την επίδρασή του στον φθορισμό, παρουσία MeOH. Το μίγμα στο οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ήταν (EtOH+MeOH):H₂O 40:60 και οι τιμές pH που μελετήθηκαν ήταν 4,0, 6,0 και 8,0, σε ρυθμιστικά διαλύματα Britton-Robinson. Επίσης, το κάθε pH μελετήθηκε σε εύρος περιεκτικότητας MeOH 1–10 %, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 55**. Παρατηρείται ότι σε pH=4,0, η ένταση του φθορισμού των CuNCs-DMF είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το 6,0 και 8,0. Ως αποτέλεσμα, τα CuNCs-DMF μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ανίχνευσης με μεγάλο εύρος pH, με μεγαλύτερη ευαισθησία να παρουσιάζουν σε όξινα pH.



Εικόνα 55: Γραφική παράσταση της αύξησης του φθορισμού σε pH: 4,0, 6,0 και 8,0 για περιεκτικότητα σε MeOH 1-10%.

3.2.2.2. Αναλυτικά αποτελέσματα του φθορισμομετρικού προσδιορισμού MeOH σε οινοπνευματώδη ποτά με τη χρήση των CuNCs-DMF

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω καμπύλες βαθμονόμησης, υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LODs) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs). Ακόμα, υπολογίστηκε η πιστότητα (σχετική τυπική απόκλιση, %RSD) σε αναλογίες σε τρεις διαφορετικές εκατοστιαίες περιεκτικότητες μεθανόλης, (EtOH+MeOH):H₂O (37+3):60, (35+5):60 και (32+8):60, την ίδια ημέρα. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 5. Επιπλέον, για τα πραγματικά δείγματα (vodka 40%vol. και τσίπουρο 40%vol.), υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις (%) σε τρεις διαφορετικές εκατοστιαίες παρτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Στα πραγματικά δείγματα δεν ανιχνεύθηκε κάποιο ποσοστό MeOH, οπότε πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός (spiking).

		MeOH (%w	(%w/v)		
Αλκοολούχα Ποτά	3	5	8		
		<i>RSD(%)</i>	<u>, </u>	LOD	LOQ
<i>EtOH:H</i> ₂ <i>O</i> 20:80	4,7	1,9	7,5	0,1	0.3
EtOH:H ₂ O 40:60	3,2	4,1	4,6	0,2	0.6
<i>EtOH:H</i> ₂ <i>O</i> 60:40	2,9	5,7	3,4	0,8	2,4

Πίνακας 5: LOD, LOQ για τρεις διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης: νερού, RSDs για τα αλκοολούχα ποτά και για τρεις διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης: νερού.

Πίνακας 6: Ανακτήσεις, RSDs για τα πραγματικά δείγματα σε διάφορες αναλογίες MeOH.

	MeOH (%w/v)					
Πραγματικά	3	5	8	3	5	8
δείγματα	Ανάκτηση				<i>RSD(%)</i>	
Vodka	108,7	116,8	111,3	7,9	8,1	8,0
Τσίπουρο	94,1	96,7	103,3	7,8	8,5	6,6

3.2.3. Φθορισμομετρικός κινητικός προσδιορισμός του H₂O₂ με τη χρήση CuNCs-H₂O και ο-φαινυλενοδιαμίνη

Το υλικό CuNCs-H₂O διαπιστώθηκε από προκαταρκτικά πειράματα ότι μπορεί να δράσει ως μιμητικός παράγοντας υπεροξειδάσης. Σε σύγκριση με την υπεροξειδάση αγριοραφανίδων (horseradish peroxidase, HRP), τα παρασκευασμένα CuNCs-H₂O συντίθενται εύκολα, με χαμηλό κόστος και δεν αντιμετωπίζουν πρόβλημα μετουσίωσης, όπως τα ένζυμα. Ως μιμητικός παράγοντας υπεροξειδάσης, τα CuNCs-H₂O μπορούν να καταλύσουν την οξείδωση του υποστρώματος ο-φαινυλενοδιαμίνη (o-phenylenediamine, OPD) από H₂O₂ προς ένα προϊόν πρασινοκίτρινου χρώματος, τη 2,3-διαμινοφαιναζίνη (2,3-diaminophenazine, DAP), σε υδατικό διάλυμα.

Για τον προσδιορισμό του H₂O₂, χρησιμοποιήθηκαν τα νανοσυμπλέγματα CuNCs-H₂O, τα οποία παρουσιάζουν φθορισμό σε λex/λem= 310/660 nm τόσο στη στερεή κατάστασή τους όσο και σε υδατικά διαλύματα. Ως οργανικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η οφαινυλενοδιαμίνη, η οποία από μόνη της παρουσιάζει φθορισμό με εκπομπή στα 350 nm μετά από διέγερση στα 300 nm, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 56**. Κατά την οξείδωσή της από το H₂O₂ (παρουσία υπεροξειδάσης ή μιμητικό παράγοντα υπεροξειδάσης) μετατρέπεται στην DAP σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (**Αντίδραση 1**), η οποία παρουσιάζει φθορισμό με εκπομπή στα 553 nm μετά από διέγερση στα 346 nm [110].



Αντίδραση 1: Οζείδωση της ο-φαινυλενοδιαμίνη με H₂O₂ (παρουσία ενζύμου ή CuNCs-H₂O).



Εικόνα 56: Φάσμα φθορισμού της ο-φαινυλενοδιαμίνης, όπου το μέγιστο εκπομπής εμφανίζεται στα 350 nm μετά από διέγερση στα 300 nm.

Σε διάλυμα της OPD παρουσία CuNCs-H₂O παρουσιάζεται ασθενής φθορισμός με μέγιστο εκπομπής σε λex/λem= 350/450 nm. Έτσι, στο σύστημα που διαμορφώνεται, διαπιστώνεται ότι υπάρχουν τρεις φθορισμοί, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 57**. Ο φθορισμός με εκπομπή λem κοντά στα 450 nm, παρατηρήθηκε ότι παράγεται από την ανάμιξη των CuNCs-H₂O και OPD. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν έντονος ο φθορισμός του συστήματος, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω.



Εικόνα 57: Φάσμα φθορισμού του συστήματος CuNCs-H₂O+OPD σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης (310-380 nm).

Με την προσθήκη H₂O₂ στο σύστημα, παρατηρείται ότι ο ερυθρός φθορισμός, λex/λem= 310/660 nm των CuNCs-H₂O, αρχίζει να μειώνεται δραστικά, ενώ ο μπλε φθορισμός, λex/λem= 300/350 nm, αρχίζει να αυξάνεται. Στις Εικόνες 58 και 59 παρουσιάζονται οι κινητικές αυτών των συστημάτων. Η σταδιακή αύξηση στον φθορισμό λex/λem= 300/350 nm, αποδείχθηκε ότι οφείλεται στα CuNCs-H₂O. Κατά την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂), τα CuNCs-H₂O χάνουν τον ερυθρό φθορισμό τους (λex/λem= 310/660 nm) και αναπτύσσουν το μπλε (λex/λem= 300/350 nm), όπως φαίνεται στην Εικόνα 60.



Εικόνα 58: Μεταβολή του ερυθρού φθορισμού (λex/λem= 310/660 nm) του συστήματος CuNCs-H₂O (2,86 mg/mL) +OPD (0,12 mg/mL), με την προσθήκη H₂O₂ (0,88 μg/mL) σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 59: Μεταβολή του μπλε φθορισμού (λex/λem= 300/350 nm) του συστήματος CuNCs-H₂O (2,86 mg/mL) +OPD (0,12 mg/mL), με την προσθήκη H₂O₂(0,88 μg/mL) σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 60: Μεταβολή του μπλε φθορισμού (λex/λem= 300/350 nm) και ερυθρού φθορισμού (λex/λem= 310/660 nm) σε διάλυμα CuNCs-H₂O (2,86 mg/mL), με την προσθήκη H₂O₂ (0,88 μg/mL).

Μία από τις παραμέτρους του συστήματος αυτού που εξετάστηκε ήταν η επίδραση της συγκέντρωσης του H₂O₂, στην κινητική μελέτη της αντίδρασης. Στις **Εικόνες 61** και **62**, παρατηρείται ότι καθώς η συγκέντρωση αυξάνεται από 0,29 σε 1,75 μg/mL, αυξάνεται η κλίση σε ότι αφορά τις απόλυτες τιμές της για τα δύο μήκη κύματος εκπομπής, δηλ. ο φθορισμός σε λex/λem= 310/660 nm μειώνεται, ενώ ο φθορισμός με λex/λem= 300/350 nm αυξάνεται.



Εικόνα 61: Κινητική μελέτη του ερυθρού φθορισμού για λex/λem= 310/660 nm, του συστήματος CuNCs-H₂O+OPD σε διάφορες συγκεντρώσεις H₂O₂.



Εικόνα 62: Κινητική μελέτη του μπλε φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm, του συστήματος CuNCs-H₂O+OPD σε διάφορες συγκεντρώσεις H₂O₂.

3.2.3.1. Επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος στην κινητική του CuNCs-H₂O ως μιμικής υπεροζειδάσης, παρουσία H₂O₂

Το υλικό CuNCs-H₂O βρέθηκε από προκαταρκτικά πειράματα ότι μπορεί να αποτελέσει ένα χημικό σύστημα για τον προσδιορισμό H₂O₂ με CuNCs-H₂O/ο-φαινυλενοδιαμίνη (ophenylenediamine, OPD), και μελετήθηκε κινητικά σε δύο μήκη κύματος μέσω των παρακάτω παραμέτρων.

Το pH ήταν μία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν για την επίδρασή τους στην αρχική ταχύτητα της κινητικής των παραγόμενων CuNCs-H₂O στο νερό, για τον προσδιορισμό H₂O₂. Τα pH που μελετήθηκαν (4,0, 5,0, 6,0 και 7,0) πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Britton-Robinson και μελετήθηκαν αντίστοιχα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 δηλ. 0,30, 0,88 και 1,75 μg/mL. Δεν μελετήθηκαν σε μεγαλύτερα pH, λόγου της αστάθειας του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αυτά. Στην κινητική του φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm, παρατηρείται ότι η αρχική ταχύτητα (δηλαδή η κλίση σε μονάδες $\Delta F/\Delta t$) είναι πιο μεγάλη σε pH=5,0 (Εικόνα 63). Ακόμα, παρατηρείται ότι οι αρχικές ταχύτητες των κινητικών και για τις τρεις συγκεντρώσεις H₂O₂ είναι μεγαλύτερες σε όξινα pH σε σχέση με το ουδέτερο. Στην περίπτωση της κινητικής με φθορισμό για λex/λem= 310/660 nm τα αποτελέσματα των μετρήσεων, όπως αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 64, έδειξαν ότι η αρχική ταχύτητα της κινητικής είναι μεγαλύτερη (σε απόλυτες τιμές) σε pH=6,0. Αντίθετα με ότι παρατηρείται στην περίπτωση της κινητικής με φθορισμό για λex/λem= 300/350 nm, εδώ οι αργικές ταχύτητες είναι μεγαλύτερες σε pH 6 και 7. Έπειτα, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) των κλίσεων των κινητικών της αντίδρασης. Παρασκευάστηκαν διαλύματα H₂O₂ συγκέντρωσης 0,88 μg/mL για την πραγματοποίηση των μετρήσεων αυτών. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στην περίπτωση του pH για τις κινητικές με φθορισμό για $\lambda ex/\lambda em = 310/660 \text{ nm kai } \lambda ex/\lambda em = 300/350 \text{ nm}, \kappa u \mu a ivovtai } a \pi o 0.5 \ \epsilon \omega c 8.9\%.$



Εικόνα 63: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής αύξησης του φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm σε συνάρτηση του pH, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.



Εικόνα 64: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής μείωσης του φθορισμού για λex/λem= 310/660 nm σε συνάρτηση του pH, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην αρχική ταχύτητα της κινητικής των παραγόμενων CuNCs-H₂O στο νερό για τον προσδιορισμό H₂O₂. Μελετήθηκαν θερμοκρασίες 20-40°C και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με βήματα των 5°C σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ (0,30, 0,88 και 1,75 μg/mL). Κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα των αρχικών ταχυτήτων των κινητικών του κάθε φθορισμού σε συνάρτηση της θερμοκρασίας. Οι **Εικόνες 65, 66** παρουσιάζουν τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων. Στην

περίπτωση της κινητικής για λex/λem= 310/660 nm (**Εικόνα 65**), μετά τους 20°C οι κλίσεις είναι περίπου αμετάβλητες στο εύρος θερμοκρασιών που λήφθηκαν οι καμπύλες. Αντίθετα, για την κινητική με φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm (**Εικόνα 66**), οι μεγαλύτερες κλίσεις παρατηρήθηκαν στους 35°C. Ακόμα, υπολογίστηκε η RSD των αρχικών κλίσεων των κινητικών της αντίδρασης. Παρασκευάστηκαν διαλύματα H₂O₂ συγκέντρωσης 0,88 μg/mL για την πραγματοποίηση των μετρήσεων αυτών. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στην περίπτωση της θερμοκρασίας υπολογίστηκαν να κυμαίνονται από 0,2 έως 9,6%.



Εικόνα 65: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής μείωσης του φθορισμού για λex/λem= 310/660 nm σε συνάρτηση της Τ, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.



■ 0,30 (µg/mL) ■ 0,88 (µg/mL) ■ 1,75 (µg/mL)

Εικόνα 66: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής αύζησης του φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm σε συνάρτηση της Τ, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύς σε διαλύματα NaCl συγκέντρωσης 0,01, 0,03, 0,05, 0,07 και 0,1Μ. Κατασκευάστηκαν διαγράμματα των αρχικών ταχυτήτων των κινητικών φθορισμού σε συνάρτηση με την ιοντική ισχύ, οι οποίες μελετήθηκαν σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ (0,30 και 0,88 μg/mL). Στις **Εικόνες 67, 68** παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων. Και στα δύο διαγράμματα δεν εμφανίζονται σημαντικές αλλαγές στις αρχικές ταχύτητες των κινητικών φθορισμού για λεχ/λem= 300/350 nm (**Εικόνα 67**) και λεχ/λem= 310/660 nm (**Εικόνα 68**). Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις για τις αρχικές ταχύτητες των κινητικών παρουσία H₂O₂ συγκέντρωσης 0,88 μg/mL, για λεχ/λem= 310/660 nm και λεχ/λem= 300/350 nm, ήταν 0,7-9,8%.



Εικόνα 67: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής αύξησης του φθορισμού για λex/λem= 300/350 nm σε συνάρτηση με την ιοντική ισχύς, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.



Εικόνα 68: Γραφική παράσταση της ταχύτητας της κινητικής μείωσης του φθορισμού για λex/λem= 310/660 nm σε συνάρτηση με την ιοντική ισχύς, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂.

3.2.3.2. Αναλυτικά αποτελέσματα φθορισμομετρικού κινητικού προσδιορισμού του H₂O₂ σε βρόχινο νερό με τη χρήση CuNCs-H₂O και ο-φαινυλενοδιαμίνη

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης των κλίσεων των αρχικών ευθύγραμμων τμημάτων των καμπυλών της ταχύτητας της αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του H₂O₂ (**Εικόνες 69, 70**).



Εικόνα 69: Απεικόνιση της αρχικής ταχύτητας-κλίσης της αντίδρασης CuNCs-H₂O+OPD, για διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ μέσω της παρακολούθησης του φθορισμού σε λex/λem= 310/660nm. Αφορά την κλίση στα πρώτα 5 sec της καμπύλης της ταχύτητας της αντίδρασης. Το αρνητικό πρόσημο δείχνει την μείωση του φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση του H₂O₂.



Εικόνα 70: Απεικόνιση της αρχικής ταχύτητας-κλίσης της αντίδρασης CuNCs-H₂O+OPD, για διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ μέσω της παρακολούθησης του φθορισμού σε λex/λem= 300/350nm. Αφορά την κλίση στα πρώτα 5 sec της καμπύλης της ταχύτητας της αντίδρασης. Το αρνητικό πρόσημο δείχνει την μείωση του φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση του H₂O₂.

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω καμπύλες βαθμονόμησης υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LODs) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Πίνακα 7. Κατασκευάζοντας γραμμικό διάγραμμα Lineweaver – Burk, προσδιορίστηκαν τα Vmax (1/ $Vmax = \beta$) και K_M (K_M / $Vmax = \alpha$) για τις δύο κινητικές (Εικόνες 71, 72).

Пі́vакаς 7: LOD, LOQ για λex/λem= 310/660 nm каι λex/λem=300/350 nm.

(µM)	Ερυθρού Φθορισμού (λex/λem= 310/660 nm)	Μπλε Φθορισμού (λex/λem= 300/350 nm)
LOD	0,04	0,07
LOQ	0,10	0,24



Εικόνα 71: Γραμμική εξίσωση Lineweaver – Burk για τον ερυθρό φθορισμό σε λex/λem= 310/660nm.



Εικόνα 72: Γραμμική εξίσωση Lineweaver – Burk για τον μπλε φθορισμό σε λex/λem= 300/350nm.

Από τα δύο παραπάνω Lineweaver – Burk διαγράμματα (Εικόνες 71, 72) και σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

υπολογίζονται τα K_M και τα Vmax, τα οποία συγκρίνονται με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 8**, όπου επιβεβαιώνεται η ικανότητα των νανοσυμπλεγμάτων CuNCs να συμπεριφέρονται ως μιμητικός παράγοντας υπεροξειδάσης. Η K_M είναι δείκτης της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμά του και συνεπώς, όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της τόσο ισχυρότερη η συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Για την Vmax, όσο υψηλότερη είναι το ένζυμο. Παρατηρείται ότι, τα CuNCs-H₂O έχουν καλύτερο βαθμό συγγένειας με το υπόστρωμα και είναι πιο αποδοτικά σε σχέση με την πλειοψηφία των άλλων συστημάτων.

Πίνακας 8: Σύγκριση των πειραματικών τιμών των K_M και Vmax με αντίστοιχη βιβλιογραφία στην αντίδραση οξείδωσης της OPD (ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε το H_2O_2).

Ένζυμο	К _М , тМ	Vmax	Βιβλιογραφία
af-GQDs	0,00018	3,1 (μM min ⁻¹)	[111]
HRP	3,70	8,71 (10 ⁻⁸ M s ⁻¹)	
3D_RGOFe ₃ O ₄ -Pd	0,02	5,58 (10^{-8} M s ⁻¹)	[112]
CoAl-ELDH	22,13	0,598 (10 ⁻⁸ M s ⁻¹)	[113]
NiFe-LDHNS	2,4		[114]
ZnFe ₂ O ₄ MNPs	1,66	7,74 (10 ⁻⁸ M s ⁻¹)	[115]
CdCo ₂ O ₄ νανοφύλλα	0,325	$3,75 (10^{-8} \text{ M s}^{-1})$	[116]
CuNCs-H ₂ O	0,0058	5,01 (10^{-5} M s ⁻¹)	Παρούσα εργασία
CuNCs-H ₂ O	0,0064	$4,50(10^{-4} \text{ M s}^{-1})$	Παρούσα εργασία

Λόγω της αστάθειας του H2O2 σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τα δείγματα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν άμεσα με την προτεινόμενη μέθοδο, που περιγράφηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων που προέκυψαν για τον προσδιορισμού H2O2 φαίνονται στις Εικόνες 73, 74. Στις εικόνες αυτές φαίνονται τα εμβολιασμένα δείγματα, στα οποία δεν βρέθηκαν ανιγνεύσιμες συγκεντρώσεις Η2O2. Ο εμβολιασμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ανακτήσεων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0,30, 0,88 και 1,75 μg/mL), τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 9. Οι πιστότητες των κλίσεων των κινητικών φθορισμού (RSD, στην ίδια μέρα) για τα δείγματα, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 δηλ. 0,30, 0,88 και 1,75 μg/mL, βρέθηκαν να κυμαίνονται για τον μπλε φθορισμό (λex/λem= 300/350 nm) στην περιοχή 8,7-9,6 και για τον ερυθρό φθορισμό (λex/λem= 310/660 nm) στην περιοχή 6,0-11,7.



Εικόνα 73: Κινητική μελέτη του μπλε φθορισμού με λex/λem= 300/350 nm, του συστήματος CuNCs-H₂O+OPD σε τρεις συγκεντρώσεις προσθήκης H₂O₂ σε δείγμα βρόχινου νερού.



Εικόνα 74: Κινητική μελέτη του ερυθρού φθορισμού με λex/λem= 310/660 nm, του συστήματος CuNCs-H₂O+OPD σε τρεις συγκεντρώσεις προσθήκης H₂O₂ σε δείγμα βρόχινου νερού.

Πίνακας 9: Ανακτήσεις για το πραγματικό δείγμα για $\lambda ex/\lambda em = 310/660$ nm και $\lambda ex/\lambda em = 300/350$ nm, σε τρείς διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 .

	Ανακτήσεις (%)			
Сн202 (µМ)	Ερυθρού Φθορισμού (λex/λem= 310/660 nm)	Μπλε Φθορισμού (λex/λem= 300/350 nm)		
0,30	146,7	93,3		
0,88	109,1	105,7		
1,75	108,6	95,4		

3.3. Μηχανισμοί φθορισμού και απόσβεσης των CuNCs

3.3.1. Σύνθεση CuNCs-DMF

Παρόλο που στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης (AIEE) ο φθορισμός γίνεται ισχυρότερος όταν σχηματίζονται μοριακές διαμορφώσεις, είναι συχνά μία δύσκολη μέθοδος στη σύνθεση νανοσωματιδίων μεγάλης κλίμακας. Συγκριτικά, η αποσυσσωμάτωση των νανοσωματιδίων (disaggregation) για την ανάπτυξη αισθητήρων φθορισμού έχει προσελκύσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, η διαδικασία μετατροπής βασίζεται στην αυτοσυσσωμάτωση η οποία διαμορφώνεται από δεσμούς υδρογόνου και στην αποσύνθεση που προκαλείται από τον αναλύτη [117].

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) αποτελούν μία ένδειξη για τον μηχανισμό φθορισμού των CuNCs-DMF, για τις δύο αναλυτικές μεθόδους που αναπτύχθηκαν. Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 3.1.5, το μέγεθος των σωματιδίων στην περίπτωση EtOH : H₂O 40:60 ήταν 490 nm (**Εικόνα 38**), και 220 nm στην περίπτωση EtOH : MeOH : H₂O 32:8:60 (**Εικόνα 39**). Αποδεικνύεται με αυτόν τον τρόπο ότι, ενώ τα CuNCs-DMF δεν επιδεικνύουν κάποιον φθορισμό, με την προσθήκη του αναλύτη (MeOH) το μέγεθος τωνς μειώνεται και παρατηρείται ερυθρός φθορισμός (λεχ/λεm= 310/660 nm), ο οποίος οφείλεται στην αποσυσσωμάτωση (**Εικόνα 75**). Όταν τα CuNCs-DMF διασπαρθήκαν σε οργανικό διαλύτη (ισοπροπανόλη), το μέγεθος των νανοσυμπλεγμάτων ήταν αρχικά 490 nm (**Εικόνα 35**). Με την προσθήκη υγρασίας (8 %), παρατηρήθηκε ότι τα CuNCs-DMF συσσωματώθηκαν καθώς το μέγεθος τως αυξήθηκε σε 550 nm (**Εικόνα 36**) και παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού.

Τα αποτελέσματα από τα φάσματα FTIR, όπως εξηγείται αναλυτικά στην Ενότητα 3.1.1, αποτελούν μία περαιτέρω ένδειξη για τους παραπάνω μηχανισμούς. Όπως αναλύθηκε και παραπάνω, τα CuNCs-DMF δεν έχουν εγγενή φθορισμό καθώς δεν υπάρχει η διακριτή κορυφή δόνησης κάμψης του δεσμού -SH, το οποίο υποδηλώνει ότι τα άτομα χαλκού των CuNCs δεν καλύπτονται από GSH μέσω δεσμού Cu-S (Εικόνα 24).



Εικόνα 75: Γραφική παράσταση του μηχανισμού φθορισμού disaggregation.

3.3.2. Μηχανισμός φθορισμού των CuNCs-H₂O

Από την ανακάλυψη του φαινομένου ΑΙΕΕ από τους Tang et al. [118], πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τον σχεδιασμό, τη σύνθεση και την εφαρμογή υψηλής φωταύγειας υλικών ΑΙΕΕ. Τα νανοσυμπλέγματα χαλκού που σταθεροποιούνται από ισχυρά συνδεδεμένους υποκαταστάτες (όπως είναι η GSH) μπορούν επίσης να εμφανίσουν το φαινόμενο ΑΙΕΕ. Τα

παρασκευασμένα CuNCs-H₂O ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και εκπέμπουν έντονο ερυθρό φθορισμό (**Εικόνα 76**). Ο φθορισμός αυτός μπορεί να επιβεβαιωθεί από το φάσμα FTIR, όπως εξηγείται αναλυτικά στην Ενότητα 3.1.2, τα CuNCs έχουν εγγενή ερυθρό φθορισμό (λex/λem= 310/660 nm) καθώς υπάρχει η διακριτή κορυφή δόνησης κάμψης του δεσμού -SH, η οποία υποδηλώνει ότι τα άτομα χαλκού των CuNCs καλύπτονται από GSH μέσω δεσμού Cu-S (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 76: Γραφική παράσταση του μηχανισμού φθορισμού Self-Aggregation.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ $4^{O} - \Sigma YMΠΕΡΑΣΜΑΤΑ$

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή συντέθηκαν δύο υλικά φθοριζόντων νανοσυμπλεγμάτων χαλκού, δηλ. CuNCs-H2O και CuNCs-DMF σε δύο διαφορετικούς διαλύτες. Μετά τη φθορισμομετρική τους μελέτη, αποδείχθηκε ότι μπορούν να δράσουν ως φθορίζοντες ανιχνευτές. Η υγρασία είναι ένας παράγοντας ανεπιθύμητος στους οργανικούς διαλύτες και όπως αποδείχθηκε, τα νανοσυμπλέγματα χαλκού σε DMF (CuNCs-DMF) μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστο εργαλείο για την ανίχνευσή της. Η μεθανόλη αποτελεί επικίνδυνη πρόσμιξη πολλών αλκοολούχων ποτών και όπως αποδείχτηκε, τα νανοσυμπλέγματα χαλκού (CuNCs-DMF) μπορούν να αποτελέσουν μία γρήγορη μέθοδο ανίγνευσης μεθανόλης στα ποτά. Ακόμα, λόγο της μιμητικής τους ικανότητας ως υπεροξειδάση, τα νανοσυμπλέγματα χαλκού σε νερό (CuNCs- H2O) έχουν εφαρμογή στον προσδιορισμό του H2O2. Έτσι, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις οξειδασών (δηλ. ενζύμων που παράγουν Η2O2) για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων (πχ. της γλυκόζης). Συμπερασματικά, το γαμηλό κόστος σε συνδυασμό με την εύκολη και σύντομη διαδικασία σύνθεσής τους και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά, καθιστούν και τα δύο είδη νανοσυμπλεγμάτων χαλκού πολλά υποσχόμενα ως νανοανιχνευτές στη χημική ανάλυση με αρκετές προοπτικές για επιπλέον εφαρμογές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή συντέθηκαν δύο συστήματα φθοριζόντων νανοσυμπλεγμάτων χαλκού. Τα φθορίζοντα CuNCs παρήχθησαν με δύο διαφορετικούς τρόπους σύνθεσης: σε διαλύτη DMF με τη μέθοδο χάραξης (etching) σε θερμοκρασία δωματίου και σε H₂O με την ηχοχημική μέθοδο σε λουτρό υπερήχων. Η σταθεροποίηση των CuNCs και στις δυο συνθέσεις έγινε με GSH και ως πρόδρομη ένωση χρησιμοποιήθηκε Cu(NO₃)₂.

Τα συστήματα αυτά μελετήθηκαν για πρώτη φορά και βρέθηκαν από προκαταρκτικά πειράματα ότι μπορούν να αποτελέσουν έναν χημικό αισθητήρα για τον προσδιορισμό MeOH σε σύστημα EtOH:H₂O, τον προσδιορισμό υγρασίας σε διάφορους οργανικούς διαλύτες, και τον προσδιορισμό H₂O₂ μέσω ενζυμικής μίμησης. Κατά τον προσδιορισμό των δύο πρώτων αναλυτών παρατηρήθηκε η αύξηση του ερυθρού φθορισμού (λex/λem= 310/660 nm) των CuNCs-DMF. Ενώ, για τον προσδιορισμό H₂O₂ σε σύστημα CuNCs-H₂O/OPD το οποίο δρα ως μιμητικός παράγοντας υπεροξειδάσης και μελετήθηκε κινητικά σε δύο μήκη κύματος, παρατηρήθηκε η αύξηση του μπλε φθορισμού (λex/λem= 300/350 nm) και η μείωση του ερυθρού φθορισμού (λex/λem= 310/660 nm). Έτσι, αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν είναι ικανοποιητικά.

Με βάση τα παραπάνω, η ανίχνευση της MeOH και υγρασίας σε οργανικά δείγματα μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα νανοσυμπλέγματα CuNCs-DMF ως νανοανιχνευτές. Η ιδιότητα του φθορισμού και κατ' επέκταση το φαινόμενο της αποσυσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων (disaggregation), παρουσία των αναλυτών μπορεί να αξιοποιηθεί με τη χρήση των πρότυπων καμπύλων και την εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα. Τα νανοσυμπλέγματα CuNCs-H₂O παρουσία OPD μπορούν να μιμούνται την υπεροξειδάση για τον εκλεκτικό προσδιορισμό του H₂O₂. Με βάση το φαινόμενο της συσσώρευσης (AIEE), στο σύστημα αυτό μπορούν να αξιοποιηθούν οι δύο φθορισμοί με διαφορετικά μήκη κύματος για την ανάπτυξη πρότυπων καμπύλων και την εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτή η προτεινόμενη μέθοδος έχει μεγάλες δυνατότητες στη χημική/βιολογική ανίχνευση του H₂O₂ (όπως ο προσδιορισμός της γλυκόζης).

ABSTRACT

In this MSc thesis, two systems of fluorescent copper nanoclusters were synthesized. Fluorescent CuNCs were produced by two different synthesis methods: in DMF solvent by the etching method at room temperature and in H_2O by the sonochemical method in an ultrasonic bath. The stabilization of CuNCs in both compositions was done with GSH and Cu(NO₃)₂ was used as a precursor compound.

These systems were studied for the first time and found by preliminary experiments that they can be a chemical sensor for the determination of MeOH in EtOH:H₂O system, the determination of moisture in various organic solvents, and the determination of H₂O₂ by enzyme mimicking. During the determination of the first two analytes, the increase of the red fluorescence ($\lambda ex/\lambda em = 310/660$ nm) of CuNCs-DMF was observed. While, for the determination of H₂O₂ in a CuNCs-H₂O/OPD system which acts as a peroxidase mimicking agent and was kinetically studied at two wavelengths, an increase in blue fluorescence ($\lambda ex/\lambda em = 310/660$ nm) and a decrease in red fluorescence were observed ($\lambda ex/\lambda em = 310/660$ nm). Thus, analytical methods were developed which were optimized and the characteristics of analytical results were satisfactory.

Based on the above, the selective detection of MeOH and moisture in organic samples can be realized using the CuNCs-DMF nanocomplexes as nanoprobes. The property of fluorescence and by extension the phenomenon of disaggregation of the nanoparticles, in the presence of the analytes, can be exploited by using the standard curves and applying them to real samples. The CuNCs-H₂O nanoclusters in the presence of OPD can mimic peroxidase for the selective determination of H₂O₂. Based on the effect AIEE, in this system the two fluorescence peaks with different wavelengths can be exploited to develop standard curves and apply to real samples. The results showed that this proposed method has great potential in the chemical/biological detection of H₂O₂ (such as glucose determination).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5⁰ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] F. Pacheco-Torgal and S. Jalali, "Nanotechnology: Advantages and drawbacks in the field of construction and building materials," *Constr Build Mater*, vol. 25, no. 2, pp. 582–590, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.07.009.
- [2] I. Chakraborty and T. Pradeep, "Atomically Precise Clusters of Noble Metals: Emerging Link between Atoms and Nanoparticles," *Chem Rev*, vol. 117, no. 12, pp. 8208–8271, Jun. 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00769.
- [3] "Metal Nanoclusters Subjects: Electrochemistry | Analytical Chemistry."
- O. Fuhr, S. Dehnen, and D. Fenske, "Chalcogenide clusters of copper and silver from silylated chalcogenide sources," *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 4, pp. 1871–1906, 2013, doi: 10.1039/C2CS35252D.
- [5] C. Coughlan, M. Ibáñez, O. Dobrozhan, A. Singh, A. Cabot, and K. M. Ryan, "Compound Copper Chalcogenide Nanocrystals," *Chem Rev*, vol. 117, no. 9, pp. 5865–6109, May 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00376.
- [6] S. Dehnen, A. Eichhöfer, and D. Fenske, "Chalcogen-Bridged Copper Clusters," *Eur J Inorg Chem*, vol. 2002, no. 2, pp. 279–317, Feb. 2002, doi: https://doi.org/10.1002/1099-0682(20022)2002:2<279::AID-EJIC279>3.0.CO;2-H.
- P. Vaid, P. Raizada, A. K. Saini, and R. V Saini, "Biogenic silver, gold and copper nanoparticles -A sustainable green chemistry approach for cancer therapy," *Sustain Chem Pharm*, vol. 16, p. 100247, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100247.
- [8] W.-F. Lai, W.-T. Wong, and A. L. Rogach, "Development of Copper Nanoclusters for In Vitro and In Vivo Theranostic Applications," *Advanced Materials*, vol. 32, no. 9, p. 1906872, Mar. 2020, doi: https://doi.org/10.1002/adma.201906872.
- J. Benavides, I. Quijada-Garrido, and O. García, "The synthesis of switch-off fluorescent water-stable copper nanocluster Hg2+ sensors via a simple one-pot approach by an in situ metal reduction strategy in the presence of a thiolated polymer ligand template," *Nanoscale*, vol. 12, no. 2, pp. 944–955, 2020, doi: 10.1039/C9NR08439H.
- K. T. Prakash, N. Singh, and V. Venkatesh, "Synthesis of novel luminescent copper nanoclusters with substituent driven self-assembly and aggregation induced emission (AIE)," *Chemical Communications*, vol. 55, no. 3, pp. 322–325, 2019, doi: 10.1039/C8CC09109A.
- [11] P. L. Xavier, K. Chaudhari, A. Baksi, and T. Pradeep, "Protein-protected luminescent noble metal quantum clusters: an emerging trend in atomic cluster nanoscience," *Nano Rev*, vol. 3, no. 1, 2012, doi: 10.3402/nano.v3i0.14767.
- J. Mu, Y. Peng, Z. Shi, D. Zhang, and Q. Jia, "Copper nanocluster composites for analytical (bio)-sensing and imaging: a review," *Microchimica Acta*, vol. 188, no. 11, p. 384, 2021, doi: 10.1007/s00604-021-05011-9.

- [13] R. Jin, C. Zeng, M. Zhou, and Y. Chen, "Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities," *Chem Rev*, vol. 116, no. 18, pp. 10346– 10413, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00703.
- S. Shahsavari *et al.*, "Ligand functionalized copper nanoclusters for versatile applications in catalysis, sensing, bioimaging, and optoelectronics," *Mater Chem Front*, vol. 3, no. 11, pp. 2326–2356, 2019, doi: 10.1039/C9QM00492K.
- [15] Y. Lu, W. Wei, and W. Chen, "Copper nanoclusters: Synthesis, characterization and properties," *Chinese Science Bulletin*, vol. 57, no. 1, pp. 41–47, 2012, doi: 10.1007/s11434-011-4896-y.
- [16] N. K. Das and S. Mukherjee, "Size-controlled atomically precise copper nanoclusters: Synthetic protocols, spectroscopic properties and applications," vol. 3, no. 11, 2018, doi: doi:10.1515/psr-2017-0081.
- [17] S. Maity *et al.*, "Ultrafast Relaxation Dynamics of Luminescent Copper Nanoclusters (Cu7L3) and Efficient Electron Transfer to Functionalized Reduced Graphene Oxide," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 122, no. 25, pp. 13354–13362, Jun. 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b09959.
- [18] X. Jia, J. Li, and E. Wang, "Cu Nanoclusters with Aggregation Induced Emission Enhancement," Small, vol. 9, no. 22, pp. 3873–3879, Nov. 2013, doi: https://doi.org/10.1002/smLl.201300896.
- [19] S. Maity, D. Bain, and A. Patra, "Engineering Atomically Precise Copper Nanoclusters with Aggregation Induced Emission," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 123, no. 4, pp. 2506– 2515, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b09467.
- [20] H.-H. Deng *et al.*, "An ammonia-based etchant for attaining copper nanoclusters with green fluorescence emission," *Nanoscale*, vol. 10, no. 14, pp. 6467–6473, 2018, doi: 10.1039/C7NR09449C.
- [21] A. Huczko, "Template-based synthesis of nanomaterials," *Applied Physics A*, vol. 70, no. 4, pp. 365–376, 2000, doi: 10.1007/s003390051050.
- [22] M. Cui, Y. Zhao, and Q. Song, "Synthesis, optical properties and applications of ultra-small luminescent gold nanoclusters," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 57, pp. 73–82, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.005.
- [23] M. Zhao, L. Sun, and R. M. Crooks, "Preparation of Cu Nanoclusters within Dendrimer Templates," J Am Chem Soc, vol. 120, no. 19, pp. 4877–4878, May 1998, doi: 10.1021/ja980438n.
- [24] Y. Ling *et al.*, "Fluorescent detection of hydrogen peroxide and glucose with polyethyleneimine-templated Cu nanoclusters," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 118, pp. 315–320, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.097.
- [25] Y. Ling, J. J. Wu, Z. F. Gao, N. B. Li, and H. Q. Luo, "Enhanced Emission of Polyethyleneimine-Coated Copper Nanoclusters and Their Solvent Effect," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 119, no. 48, pp. 27173–27177, Dec. 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09488.

- [26] H. Zhang *et al.*, "Photoreductive synthesis of water-soluble fluorescent metal nanoclusters," *Chemical Communications*, vol. 48, no. 4, pp. 567–569, 2012, doi: 10.1039/C1CC16088E.
- [27] F. Gao *et al.*, "Ultrasmall [64Cu]Cu nanoclusters for targeting orthotopic lung tumors using accurate positron emission tomography imaging," *ACS Nano*, vol. 9, no. 5, 2015, doi: 10.1021/nn507130k.
- [28] L. Xiaoqing, L. Ruiyi, L. Zaijun, S. Xiulan, W. Zhouping, and L. Junkang, "Fast synthesis of copper nanoclusters through the use of hydrogen peroxide additive and their application for the fluorescence detection of Hg2+ in water samples," *New Journal of Chemistry*, vol. 39, no. 7, pp. 5240–5248, 2015, doi: 10.1039/C5NJ00831J.
- [29] R. Guan *et al.*, "Selective determination of Ag+ in the presence of Cd2+, Hg2+ and Cu2+ based on their different interactions with gold nanoclusters," *RSC Adv*, vol. 10, no. 55, pp. 33299–33306, 2020, doi: 10.1039/D0RA05787H.
- [30] B. Wang, R. Gui, H. Jin, W. He, and Z. Wang, "Red-emitting BSA-stabilized copper nanoclusters acted as a sensitive probe for fluorescence sensing and visual imaging detection of rutin," *Talanta*, vol. 178, pp. 1006–1010, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.102.
- [31] A. Baghdasaryan and T. Bürgi, "Copper nanoclusters: designed synthesis, structural diversity, and multiplatform applications," *Nanoscale*, vol. 13, no. 13, pp. 6283–6340, 2021, doi: 10.1039/D0NR08489A.
- [32] H. Zhang, Z. Lin, and X. Su, "Label-free detection of exonuclease III by using dsDNA-templated copper nanoparticles as fluorescent probe," *Talanta*, vol. 131, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.065.
- X. Jia, J. Li, L. Han, J. Ren, X. Yang, and E. Wang, "DNA-Hosted Copper Nanoclusters for Fluorescent Identification of Single Nucleotide Polymorphisms," ACS Nano, vol. 6, no. 4, pp. 3311–3317, Apr. 2012, doi: 10.1021/nn3002455.
- [34] X.-P. Wang, B.-C. Yin, and B.-C. Ye, "A novel fluorescence probe of dsDNA-templated copper nanoclusters for quantitative detection of microRNAs," *RSC Adv*, vol. 3, no. 23, pp. 8633– 8636, 2013, doi: 10.1039/C3RA23296D.
- [35] X. Yang, C. SHENHAO, Z. SHIYONG, D. Li, and H. Ma, "Synthesis of copper nanorods using electrochemical methods," *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 68, Nov. 2003, doi: 10.2298/JSC0311843Y.
- [36] N. Vilar-Vidal, M. C. Blanco, M. A. López-Quintela, J. Rivas, and C. Serra, "Electrochemical Synthesis of Very Stable Photoluminescent Copper Clusters," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 38, pp. 15924–15930, Sep. 2010, doi: 10.1021/jp911380s.
- [37] N. Vilar-Vidal, J. Rivas, and M. A. López-Quintela, "Copper clusters as novel fluorescent probes for the detection and photocatalytic elimination of lead ions," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 16, no. 48, pp. 26427–26430, 2014, doi: 10.1039/C4CP02148G.
- [38] S. Huseyinova *et al.*, "Synthesis of Highly Stable Surfactant-free Cu5 Clusters in Water," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 120, no. 29, pp. 15902–15908, Jul. 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b12227.

- [39] I. Lisiecki and M. P. Pileni, "Synthesis of copper metallic clusters using reverse micelles as microreactors," *J Am Chem Soc*, vol. 115, no. 10, pp. 3887–3896, May 1993, doi: 10.1021/ja00063a006.
- [40] K. Okitsu, M. Ashokkumar, and F. Grieser, "Sonochemical Synthesis of Gold Nanoparticles: Effects of Ultrasound Frequency," *J Phys Chem B*, vol. 109, no. 44, pp. 20673– 20675, Nov. 2005, doi: 10.1021/jp0549374.
- [41] C. Wang, H. Cheng, Y. Huang, Z. Xu, H. Lin, and C. Zhang, "Facile sonochemical synthesis of pHresponsive copper nanoclusters for selective and sensitive detection of Pb2+ in living cells," *Analyst*, vol. 140, no. 16, pp. 5634–5639, 2015, doi: 10.1039/C5AN00741K.
- [42] H. Zhu, C. Zhang, and Y. Yin, "Rapid synthesis of copper nanoparticles by sodium hypophosphite reduction in ethylene glycol under microwave irradiation," *J Cryst Growth*, vol. 270, no. 3, pp. 722–728, 2004, doi: https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2004.07.008.
- [43] H. Kawasaki, Y. Kosaka, Y. Myoujin, T. Narushima, T. Yonezawa, and R. Arakawa, "Microwave-assisted polyol synthesis of copper nanocrystals without using additional protective agents," *Chemical Communications*, vol. 47, no. 27, pp. 7740–7742, 2011, doi: 10.1039/C1CC12346G.
- [44] D. Li, Z. Chen, Z. Wan, T. Yang, H. Wang, and X. Mei, "One-pot development of water soluble copper nanoclusters with red emission and aggregation induced fluorescence enhancement," *RSC Adv*, vol. 6, no. 41, pp. 34090–34095, 2016, doi: 10.1039/C6RA01499B.
- [45] D. Mott, J. Galkowski, L. Wang, J. Luo, and C.-J. Zhong, "Synthesis of Size-Controlled and Shaped Copper Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 23, no. 10, pp. 5740–5745, May 2007, doi: 10.1021/la0635092.
- [46] T. Zhou, Q. Yao, T. Zhao, and X. Chen, "One-pot synthesis of fluorescent DHLA-stabilized Cu nanoclusters for the determination of H2O2," *Talanta*, vol. 141, pp. 80–85, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.056.
- [47] W. Wei, Y. Lu, W. Chen, and S. Chen, "One-Pot Synthesis, Photoluminescence, and Electrocatalytic Properties of Subnanometer-Sized Copper Clusters," J Am Chem Soc, vol. 133, no. 7, pp. 2060–2063, Feb. 2011, doi: 10.1021/ja109303z.
- [48] C. Wang, C. Wang, L. Xu, H. Cheng, Q. Lin, and C. Zhang, "Protein-directed synthesis of pHresponsive red fluorescent copper nanoclusters and their applications in cellular imaging and catalysis," *Nanoscale*, vol. 6, no. 3, pp. 1775–1781, 2014, doi: 10.1039/C3NR04835G.
- [49] C. Wang, H. Cheng, Y. Sun, Q. Lin, and C. Zhang, "Rapid Sonochemical Synthesis of Luminescent and Paramagnetic Copper Nanoclusters for Bimodal Bioimaging," *ChemNanoMat*, vol. 1, no. 1, pp. 27–31, May 2015, doi: https://doi.org/10.1002/cnma.201500004.
- [50] Z. Qing *et al.*, "Visual and Portable Strategy for Copper(II) Detection Based on a Striplike Poly(Thymine)-Caged and Microwell-Printed Hydrogel," *Anal Chem*, vol. 86, no. 22, pp. 11263–11268, Nov. 2014, doi: 10.1021/ac502843t.
- [51] C. Wang *et al.*, "Near infrared Ag/Au alloy nanoclusters: Tunable photoluminescence and cellular imaging," *J Colloid Interface Sci*, vol. 416, pp. 274–279, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.011.
- [52] C. Wang, Y. Yao, and Q. Song, "Interfacial synthesis of polyethyleneimine-protected copper nanoclusters: Size-dependent tunable photoluminescence, pH sensor and bioimaging," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 140, pp. 373–381, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.001.
- [53] Z. Wu and R. Jin, "On the Ligand's Role in the Fluorescence of Gold Nanoclusters," *Nano Lett*, vol. 10, no. 7, pp. 2568–2573, Jul. 2010, doi: 10.1021/nl101225f.
- [54] Y.-J. Lin, P.-C. Chen, Z. Yuan, J.-Y. Ma, and H.-T. Chang, "The isomeric effect of mercaptobenzoic acids on the preparation and fluorescence properties of copper nanoclusters," *Chemical Communications*, vol. 51, no. 60, pp. 11983–11986, 2015, doi: 10.1039/C5CC02342D.
- [55] N. Goswami, A. Giri, M. S. Bootharaju, P. L. Xavier, T. Pradeep, and S. K. Pal, "Copper Quantum Clusters in Protein Matrix: Potential Sensor of Pb2+ Ion," *Anal Chem*, vol. 83, no. 24, pp. 9676–9680, Dec. 2011, doi: 10.1021/ac202610e.
- [56] S. A. Patel *et al.*, "Electron Transfer-Induced Blinking in Ag Nanodot Fluorescence," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 47, pp. 20264–20270, Nov. 2009, doi: 10.1021/jp9079537.
- [57] J. Luo *et al.*, "Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole," *Chemical Communications*, vol. 18, 2001, doi: 10.1039/b105159h.
- [58] P. Gopikrishna, N. Meher, and P. K. Iyer, "Functional 1,8-Naphthalimide AIE/AIEEgens: Recent Advances and Prospects," ACS Appl Mater Interfaces, vol. 10, no. 15, pp. 12081–12111, Apr. 2018, doi: 10.1021/acsami.7b14473.
- [59] X. Jia, J. Li, and E. Wang, "Cu Nanoclusters with Aggregation Induced Emission Enhancement," Small, vol. 9, no. 22, pp. 3873–3879, Nov. 2013, doi: https://doi.org/10.1002/smLl.201300896.
- [60] L. Polavarapu, M. Manna, and Q.-H. Xu, "Biocompatible glutathione capped gold clusters as one- and two-photon excitation fluorescence contrast agents for live cells imaging," *Nanoscale*, vol. 3, no. 2, pp. 429–434, 2011, doi: 10.1039/C0NR00458H.
- [61] Y. Wang *et al.*, "Blue two-photon fluorescence metal cluster probe precisely marking cell nuclei of two cell lines," *Chemical Communications*, vol. 49, no. 91, pp. 10724–10726, 2013, doi: 10.1039/C3CC46690F.
- [62] W. Chen and S. Chen, "Oxygen electroreduction catalyzed by gold nanoclusters: Strong core size effects," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 24, pp. 4386–4389, Jun. 2009, doi: 10.1002/anie.200901185.
- [63] J. A. van Bokhoven and J. T. Miller, "d Electron Density and Reactivity of the d Band as a Function of Particle Size in Supported Gold Catalysts," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, no. 26, pp. 9245–9249, Jul. 2007, doi: 10.1021/jp070755t.

- [64] Z. Zhao and Y. Li, "Developing fluorescent copper nanoclusters: Synthesis, properties, and applications," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 195, p. 111244, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111244.
- [65] Z. Wu, Y. Li, J. Liu, Z. Lu, H. Zhang, and B. Yang, "Colloidal Self-Assembly of Catalytic Copper Nanoclusters into Ultrathin Ribbons," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, no. 45, pp. 12196–12200, Nov. 2014, doi: https://doi.org/10.1002/anie.201407390.
- [66] J.-S. Shen *et al.*, "In situ synthesis of red emissive copper nanoclusters in supramolecular hydrogels," *J Mater Chem C Mater*, vol. 1, no. 11, pp. 2092–2096, 2013, doi: 10.1039/C3TC00941F.
- [67] D. Wang, H. Zhao, H. Li, S. Sun, and Y. Xu, "A fluorescent 'glue' of water triggered by hydrogen-bonding cross-linking," *J Mater Chem C Mater*, vol. 4, no. 47, pp. 11050–11054, 2016, doi: 10.1039/C6TC04238D.
- [68] H. Yu, H. Li, C. Chen, S. Zhou, and P. Wang, "Water-sensitive phase-transition of a carbon dotcalcium carbonate composite for moisture detection in organic solvents," *Analytical Methods*, vol. 11, no. 20, pp. 2634–2638, 2019, doi: 10.1039/C9AY00541B.
- [69] S. A. Yoon, J. H. Oh, S. K. Kim, and M. H. Lee, "Water-sensitive ratiometric fluorescent probes and application to test strip for rapid and reversible detection of water," *Dyes and Pigments*, vol. 165, pp. 421–428, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.02.052.
- [70] D. Yang, X.-T. Wu, X.-J. Cao, and B.-X. Zhao, "A reversible ratiometric fluorescence probe for fast detection of trace water in different organic solvents," *Dyes and Pigments*, vol. 170, p. 107558, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107558.
- [71] D. Huang *et al.*, "An optical-fiber sensor based on time-gated fluorescence for detecting water content in organic solvents," *Analytical Methods*, vol. 7, no. 11, pp. 4621–4628, 2015, doi: 10.1039/C5AY00110B.
- [72] K. Schöffski and D. Strohm, "Karl Fischer Moisture Determination," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006. doi: https://doi.org/10.1002/9780470027318.a8102.
- [73] P. Kumar, A. Ghosh, and D. A. Jose, "Chemical Sensors for Water Detection in Organic Solvents and their Applications," *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 4, pp. 820–842, Jan. 2021, doi: https://doi.org/10.1002/slct.202003920.
- [74] H. S. Jung, P. Verwilst, W. Y. Kim, and J. S. Kim, "Fluorescent and colorimetric sensors for the detection of humidity or water content," *Chem Soc Rev*, vol. 45, no. 5, pp. 1242–1256, 2016, doi: 10.1039/C5CS00494B.
- [75] D. Chao *et al.*, "Solvent-dependent carbon dots and their applications in the detection of water in organic solvents," *J Mater Chem C Mater*, vol. 6, no. 28, pp. 7527–7532, 2018, doi: 10.1039/C8TC02184H.
- [76] J. REHM, F. KANTERES, and D. W. LACHENMEIER, "Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences," *Drug Alcohol Rev*, vol. 29, no. 4, pp. 426–436, Jul. 2010, doi: https://doi.org/10.1111/j.1465-3362.2009.00140.x.

- S. K. Tulashie, A. P. Appiah, G. D. Torku, A. Y. Darko, and A. Wiredu, "Determination of methanol and ethanol concentrations in local and foreign alcoholic drinks and food products (Banku, Ga kenkey, Fante kenkey and Hausa koko) in Ghana," *Int J Food Contam*, vol. 4, no. 1, p. 14, 2017, doi: 10.1186/s40550-017-0059-5.
- [78] E. I. Ohimain, "Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, p. 1607, 2016, doi: 10.1186/s40064-016-3303-1.
- [79] J. Brent, "Fomepizole for Ethylene Glycol and Methanol Poisoning," *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 21, pp. 2216–2223, May 2009, doi: 10.1056/NEJMct0806112.
- [80] N. J. Reddy, M. Sudini, and L. D. Lewis, "Delayed neurological sequelae from ethylene glycol, diethylene glycol and methanol poisonings," *Clin Toxicol*, vol. 48, no. 10, pp. 967–973, Dec. 2010, doi: 10.3109/15563650.2010.532803.
- [81] M. Schnölzer, P. Alewood, A. Jones, D. Alewood, and S. B. H. Kent, "In situ neutralization in boc-chemistry solid phase peptide synthesis: Rapid, high yield assembly of difficult sequences," *Int J Pept Res Ther*, vol. 13, no. 1–2, 2007, doi: 10.1007/s10989-006-9059-7.
- [82] K. F. Chou and A. M. Dennis, "Förster resonance energy transfer between quantum dot donors and quantum dot acceptors," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 6, 2015, doi: 10.3390/s150613288.
- [83] J. R. Lakowicz, Ed., "Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Boston, MA: Springer US, 2006, pp. 27–61. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4_2.
- [84] P. J. E. Gaffney Tracey A, "The International and 'NIH' Units for Thrombin How Do They Compare?," *Thromb Haemost*, vol. 74, no. 09, pp. 900–903, 1995, doi: 10.1055/s-0038-1649844.
- [85] L. Banci, "Structural properties of peroxidases," J Biotechnol, vol. 53, no. 2–3, 1997, doi: 10.1016/S0168-1656(97)01677-5.
- [86] Q. Liu, A. Kuzuya, and Z.-G. Wang, "Supramolecular enzyme-mimicking catalysts selfassembled from peptides," *iScience*, vol. 26, no. 1, p. 105831, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105831.
- [87] M. Vázquez-González et al., "Mimicking Horseradish Peroxidase Functions Using Cu2+-Modified Carbon Nitride Nanoparticles or Cu2+-Modified Carbon Dots as Heterogeneous Catalysts," ACS Nano, vol. 11, no. 3, pp. 3247–3253, Mar. 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b00352.
- [88] Y. Lin, J. Ren, and X. Qu, "Catalytically Active Nanomaterials: A Promising Candidate for Artificial Enzymes," Acc Chem Res, vol. 47, no. 4, pp. 1097–1105, Apr. 2014, doi: 10.1021/ar400250z.
- [89] L. He *et al.*, "Self-Cascade System Based on Cupric Oxide Nanoparticles as Dual-Functional Enzyme Mimics for Ultrasensitive Detection of Silver Ions," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 6, no.
 9, pp. 12132–12139, Sep. 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b02476.

- [90] W. Chen, S. Li, J. Wang, K. Sun, and Y. Si, "Metal and metal-oxide nanozymes: bioenzymatic characteristics, catalytic mechanism, and eco-environmental applications," *Nanoscale*, vol. 11, no. 34, pp. 15783–15793, 2019, doi: 10.1039/C9NR04771A.
- [91] L. Jin *et al.*, "Ultrasmall Pt Nanoclusters as Robust Peroxidase Mimics for Colorimetric Detection of Glucose in Human Serum," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 11, pp. 10027– 10033, Mar. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b01616.
- [92] Z. Zhuang, Q. Yang, and W. Chen, "One-Step Rapid and Facile Synthesis of Subnanometer-Sized Pd6(C12H25S)11 Clusters with Ultra-High Catalytic Activity for 4-Nitrophenol Reduction," ACS Sustain Chem Eng, vol. 7, no. 3, pp. 2916–2923, Feb. 2019, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b06637.
- [93] S. Shahsavari *et al.*, "Ligand functionalized copper nanoclusters for versatile applications in catalysis, sensing, bioimaging, and optoelectronics," *Mater Chem Front*, vol. 3, no. 11, pp. 2326–2356, 2019, doi: 10.1039/C9QM00492K.
- [94] M. Shamsipur et al., "Photoluminescence Mechanisms of Dual-Emission Fluorescent Silver Nanoclusters Fabricated by Human Hemoglobin Template: From Oxidation- and Aggregation-Induced Emission Enhancement to Targeted Drug Delivery and Cell Imaging," ACS Sustain Chem Eng, vol. 6, no. 8, pp. 11123–11137, Aug. 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b02674.
- [95] D. Jiang, D. Ni, Z. T. Rosenkrans, P. Huang, X. Yan, and W. Cai, "Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications," *Chem Soc Rev*, vol. 48, no. 14, pp. 3683–3704, 2019, doi: 10.1039/C8CS00718G.
- [96] M. DIXON, "The determination of enzyme inhibitor constants.," *Biochem J*, vol. 55, no. 1, 1953, doi: 10.1042/bj0550170.
- [97] P. B. Blakemore, "Spectrophotometry and spectrofluorimetry a practical approach Edited by D A Harris and C L Bashford. pp 176. IRL Press, Oxford. 1987. £25 or £15.50 (pbk) ISBN 0-947946-69-1 or-46-2 (pbk)," *Biochem Educ*, vol. 15, no. 3, p. 159, Jul. 1987, doi: https://doi.org/10.1016/0307-4412(87)90059-8.
- [98] P. J. Butterworth, "Fundamentals of enzyme kinetics (3rd edn) A. Cornish-Bowden. Portland Press Ltd, London, 422 + xvi pp., ISBN 1 85578 158 1 (2000)," *Cell Biochem Funct*, vol. 23, no. 4, p. 292, Jul. 2005, doi: https://doi.org/10.1002/cbf.1194.
- [99] B. Han, X. Hu, M. Yu, T. Peng, Y. Li, and G. He, "One-pot synthesis of enhanced fluorescent copper nanoclusters encapsulated in metal–organic frameworks," *RSC Adv*, vol. 8, no. 40, pp. 22748–22754, 2018, doi: 10.1039/C8RA03632B.
- [100] C. Wang, H. Cheng, Y. Huang, Z. Xu, H. Lin, and C. Zhang, "Facile sonochemical synthesis of pHresponsive copper nanoclusters for selective and sensitive detection of Pb2+ in living cells," *Analyst*, vol. 140, no. 16, pp. 5634–5639, 2015, doi: 10.1039/C5AN00741K.
- [101] C. Liu *et al.*, "Facile Preparation of Homogeneous Copper Nanoclusters Exhibiting Excellent Tetraenzyme Mimetic Activities for Colorimetric Glutathione Sensing and Fluorimetric Ascorbic Acid Sensing," ACS Appl Mater Interfaces, vol. 12, no. 38, pp. 42521–42530, Sep. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c11983.

- [102] K. Schöffski, "Die Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Titration," *Chemie in unserer Zeit*, vol. 34, no. 3, pp. 170–175, Jun. 2000, doi: https://doi.org/10.1002/1521-3781(200006)34:3<170::AID-CIUZ170>3.0.CO;2-2.
- [103] E. Kim, S. Y. Kim, G. Jo, S. Kim, and M. J. Park, "Colorimetric and resistive polymer electrolyte thin films for real-time humidity sensors," ACS Appl Mater Interfaces, vol. 4, no. 10, 2012, doi: 10.1021/am3011115.
- [104] S. Song *et al.*, "Ratiometric fluorescence detection of trace water in organic solvents based on aggregation-induced emission enhanced Cu nanoclusters," *Analyst*, vol. 143, no. 13, 2018, doi: 10.1039/c8an00450a.
- [105] H. Q. Yin, J. C. Yang, and X. B. Yin, "Ratiometric Fluorescence Sensing and Real-Time Detection of Water in Organic Solvents with One-Pot Synthesis of Ru@MIL-101(AI)-NH2," Anal Chem, vol. 89, no. 24, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03723.
- [106] Y. Dong, J. Cai, Q. Fang, X. You, and Y. Chi, "Dual-Emission of Lanthanide Metal-Organic Frameworks Encapsulating Carbon-Based Dots for Ratiometric Detection of Water in Organic Solvents," Anal Chem, vol. 88, no. 3, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03974.
- [107] J. Tan et al., "Chalcone based ion-pair recognition towards nitrates and the application for the colorimetric and fluorescence turn-on determination of water content in organic solvents," Sens Actuators B Chem, vol. 260, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.12.186.
- [108] W. Y. Kim *et al.*, "Coumarin-decorated Schiff base hydrolysis as an efficient driving force for the fluorescence detection of water in organic solvents," *Chemical Communications*, vol. 52, no. 56, 2016, doi: 10.1039/c6cc04285f.
- [109] J. Yang, Z. Li, and Q. Jia, "Design of dual-emission fluorescence sensor based on Cu nanoclusters with solvent-dependent effects: Visual detection of water via a smartphone," *Sens Actuators B Chem*, vol. 297, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.126807.
- [110] S. Huang, L. Wang, C. Huang, W. Su, and Q. Xiao, "Amino-functionalized graphene quantum dots based ratiometric fluorescent nanosensor for ultrasensitive and highly selective recognition of horseradish peroxidase," *Sens Actuators B Chem*, vol. 234, pp. 255–263, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.001.
- [111] S. Huang, L. Wang, C. Huang, W. Su, and Q. Xiao, "Amino-functionalized graphene quantum dots based ratiometric fluorescent nanosensor for ultrasensitive and highly selective recognition of horseradish peroxidase," *Sens Actuators B Chem*, vol. 234, pp. 255–263, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.001.
- [112] X. Zheng *et al.*, "In situ synthesis of self-assembled three-dimensional graphene-magnetic palladium nanohybrids with dual-enzyme activity through one-pot strategy and its application in glucose probe," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 7, no. 6, 2015, doi: 10.1021/am508540x.
- [113] L. Chen, B. Sun, X. Wang, F. Qiao, and S. Ai, "2D ultrathin nanosheets of Co–Al layered double hydroxides prepared in l-asparagine solution: enhanced peroxidase-like activity and colorimetric detection of glucose," J Mater Chem B, vol. 1, no. 17, pp. 2268–2274, 2013, doi: 10.1039/C3TB00044C.

- [114] T. Zhan, J. Kang, X. Li, L. Pan, G. Li, and W. Hou, "NiFe layered double hydroxide nanosheets as an efficiently mimic enzyme for colorimetric determination of glucose and H2O2," *Sens Actuators B Chem*, vol. 255, pp. 2635–2642, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.074.
- [115] L. Su, J. Feng, X. Zhou, C. Ren, H. Li, and X. Chen, "Colorimetric Detection of Urine Glucose Based ZnFe2O4 Magnetic Nanoparticles," *Anal Chem*, vol. 84, no. 13, pp. 5753–5758, Jul. 2012, doi: 10.1021/ac300939z.
- [116] X. Wei, J. Chen, M. C. Ali, J. C. Munyemana, and H. Qiu, "Cadmium cobaltite nanosheets synthesized in basic deep eutectic solvents with oxidase-like, peroxidase-like, and catalaselike activities and application in the colorimetric assay of glucose," *Microchimica Acta*, vol. 187, no. 6, p. 314, 2020, doi: 10.1007/s00604-020-04298-4.
- [117] J. Liu *et al.*, "A switchable fluorescent quantum dot probe based on aggregation/disaggregation mechanism," *Chemical Communications*, vol. 47, no. 3, pp. 935– 937, 2011, doi: 10.1039/C0CC03993D.
- [118] J. Luo *et al.*, "Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole," *Chemical Communications*, no. 18, pp. 1740–1741, 2001, doi: 10.1039/B105159H.