

کاربرد یک سنسور الکتروشیمیایی جدید بر مبنای الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده با کامپوزیت فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده برای تعیین مقادیر کم

آتورواستاتین

مجید کلاته بجدی^۱، محمد بهبهانی^{۲*}، سمیه رنجبری کلویی^۱

^۱بیرجند، دانشگاه بیرجند، دانشکده علوم، گروه شیمی

^۲گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۷

تاریخ تصحیح: ۹۹/۰۹/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۲۱

چکیده

در این پژوهش از کامپوزیت فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده به عنوان اصلاحگر جهت طراحی الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده (mCPE)، برای مطالعه رفتار الکتروشیمیایی و اندازه گیری محتوای آتورواستاتین (ATV) در نمونه های مختلف با استفاده از یک روش ساده، سریع و حساس استفاده شد. در ابتدا، اثر برخی از متغیرهای تجربی نظیر ترکیب درصد خمیر کربن، pH محلول الکترولیت، سرعت پیمایش و زمان تجمع، بر روی الکترو اکسایش دارو بطور جداگانه بررسی و پارامترهای بهینه انتخاب شدند. مکانیسم واکنش الکتروشیمیایی دارو در سطح الکتروکد اصلاح شده، بوسیله ولتاموگرام های چرخه ای بدست آمده در سرعت های روبش و pH های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه از روش ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) برای اندازه گیری کمی آتورواستاتین در شرایط بهینه استفاده شد. گستره دینامیکی از ۱/۰ تا ۵/۰ نانومولار و از ۵/۰ تا ۱۰۰/۰ نانومولار و حد تشخیص ۳۵ پیکو مولار برای آتورواستاتین بدست آمد. همچنین کاربرد موفق آمیز الکتروکد اصلاح شده در نمونه های حقیقی (قرص ها) مورد بررسی قرار گرفت و صحت مطلوبی بدست آمد.

کلمات کلیدی: الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده، آتورواستاتین، کامپوزیت فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده، اندازه گیری الکتروشیمیایی.

۱- مقدمه

آنالیز داروها در طی مراحل مختلف تولید آن ها همانند کنترل کیفیت، سم شناسی، فرمولاسیون و مطالعه پایداری آن ها در انسان و حیوانات امری بسیار مهم می باشد که تمامی این اطلاعات نیازمند یک روش تجزیه ای دقیق و قابل اتکا به منظور اندازه گیری دارو در محیطی مانند سیالات زیستی است.

سنجش دارو در نمونه های بیولوژیکی معمولاً به هدف بررسی باقی مانده دارو در بدن انجام می شود زیرا بیشتر داروها بعد از مصرف در بافت های بدن ته نشین شده و به طور کامل از بدن دفع نمی گردند که با مطالعه بر روی باقی مانده دارو در سیالات زیستی می توان به میزان دوز مناسب برای مصرف دارو پی برد. از عوامل مهم و تأثیرگذار دیگر در مبحث اندازه گیری داروها اثرات جانبی دارو است که می تواند مشکلات عدیده دیگری را مانند بروز بیماری جدید برای فرد به دنبال داشته باشد [۲۰ و ۲۱]. می توان مواد را به طور انتخاب پذیری به وسیله روش های الکتروشیمیایی شناسایی کرد و از آن به عنوان روشی مناسب برای اندازه گیری نمونه های دارویی در سیالات بیولوژیکی بهره برد [۳-۱۱].

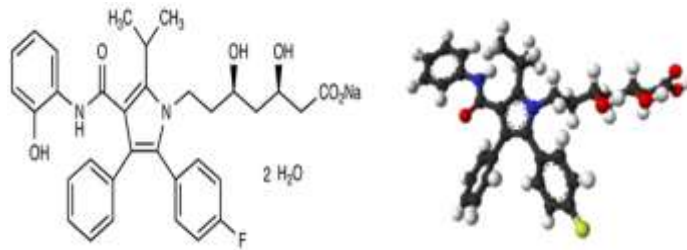
یکی از عمده ترین علل مرگ و میر سال های اخیر انسان ها در سراسر جهان بیماری های قلبی-عروقی است که علت عمده آن عوارض عروق کرونر (CAD) می باشد. پدید آمدن این عارضه با انسداد ناگهانی شریان کرونر و قطع شدن جریان خون این شریان و محدودیت اکسیژن رسانی به قلب رخ می دهد [۱۲]. بیشترین سهم ایجاد کلسترول در خون را LDL بر عهده دارد که پس از اکسیدشدن، مهم ترین نقش را در ایجاد آترواسکلروز (تصلب شریان) ایفا می کند [۱۳]. اختلال در چربی خون، از عوامل بیماری زا و بسیار خطرناک در ایجاد بیماری عروق کرونر و آترواسکلروز می باشد [۱۴]. با افزایش یک درصد LDL در خون، به میزان یک درصد به بیماری عروق کرونر اضافه می شود و افزایش یک درصدی HDL در خون باعث کاهش دو تا سه درصدی این بیماری می گردد [۱۵].

یکی دیگر از بیماری هایی که امروزه توجه بسیاری را به خود معطوف داشته، بیماری های مزمن کبدی نظیر بیماری کبد چرب غیرالکلی است که از دلایل مرگومیر مبتلایان به دیابت نوع ۲، با ایجاد نارسایی کبدی و در نهایت سرطان کبد می باشد [۲۰-۱۶].

استاتین ها و مشتقات آن جهت پیشگیری و یا کاهش خطرات بیماری های قلبی-عروقی به عنوان مهارکننده رقابتی (HMG-CoA reductase)، علیرغم افزایش ترانس آمیناز کبدی در طب بالینی، تجویز می گردند. در بعضی از بررسی های انجام شده اثرات مثبت استاتین ها را بر روی انواع سرطان مانند لنفوم و ملانوم مورد توجه قرار گرفته است [۲۱]. استاتین ها با کاهش محتوای کلسترول سلول های کبدی باعث افزایش توان گیرنده های LDL در سطح سلول می شوند که باعث جذب LDL توسط این گیرنده ها به داخل سلول می گردند [۲۲]. استاتین ها یا مهارکننده های ردوکتاز HMGCoA در برقراری پیوند با پروتئین پلاسما، جذب، حلالیت، ترشح و توانایی شان در کاهش LDL متفاوت می باشند. آن ها می توانند پنج تا ده درصد HDL را افزایش و به همان میزان از تری گلیسیرید بکاهند [۲۳]. با وجود اینکه تمامی استاتین ها باعث کاهش تری گلیسیرید و در نهایت کاهش آسیب به عروق کرونری می شوند اما تأثیرات متفاوتی بر روی پایین آوردن میزان کلسترول و کاهش پیشرفت تصلب شریان و رویدادهای قلبی-عروقی می شوند [۲۴-۲۶] که عوامل غیر لیپیدی یا اثرات غیر وابسته به

کلسترول، باعث ایجاد این تفاوت ها می شود [۲۷]. آتورواستاتین جزو مؤثرترین داروها در کاهش دادن LDL می باشد [۲۸]. اما سیمواستاتین در مقایسه با آتورواستاتین با دوز ۴۰-۸۰ میلی گرم نسبت به آتورواستاتین با دوز ۲۰-۴۰ میلی گرم تأثیر بیشتری بر افزایش HDL دارد. در صورتی که همان طور که بیان شد آتورواستاتین در کاهش دادن تری گلیسیرید مؤثرتر عمل می کند. با این وجود روزواستاتین هم می تواند HDL را به میزان ده درصد افزایش دهد [۲۹]. آتورواستاتین با داشتن اثرات قوی آنتی اکسیدانی از پراکسید شدن لیپیدها جلوگیری و همچنین باعث افزایش مهارکننده ی فعال کننده ی پلاسمینوژن یک PAI-1 می شوند [۳۰ و ۳۱].

آتورواستاتین (شمتیک ۱) در قیاس با دیگر داروهای خانواده استاتین ها اثرات منفی کمتری دارد، اما مصرف طولانی مدت یا استفاده از دوزهای نامناسب آن می تواند باعث عوارضی همچون افزایش آپوپتوز در سلول های قلبی و عدم مویرگ زایی و همچنین عوارض کبدی گردد [۳۲-۳۵].



شمتیک ۱- ساختار شیمیایی داروی آتورواستاتین

این دارو به کمک روشهای کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۳۶ و ۳۷]، طیف سنجی مشتقی [۳۸]، کروماتوگرافی مایع تلفیق شده با طیف سنج جرمی [۳۹ و ۳۷]، الکتروفورز موینه [۴۱] و روشهای الکتروشیمیایی با استفاده از الکتروود الماس [۴۲] اندازه گیری شده است. بسیاری از موارد فوق، گران قیمت، نیازمند به اپراتور با تخصص زیاد و بعضا وقت گیر هستند.

توضیحات ذکر شده مبنی بر اهمیت تعیین غلظت داروی آتورواستاتین، سختی و هزینه آنالیز زیاد روشهای اندازه گیری، ما را بر آن داشت تا روش ساده و ارزان برای اندازه گیری آتورواستاتین که از پرکاربردترین داروها می باشند را معرفی کنیم.

۲- بخش تجربی

۲-۱- دستگاه ها

آزمایش های الکتروشیمیایی با استفاده از یک پتانسیواستات پالم سنس مدل (EN 50۰81-2)، یک PC برای جمع آوری و پردازش داده ها و یک سل شیشه ای با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر محلول و سه الکتروود مرجع کار و کمکی برای پیش برد روند تحقیق استفاده شد. از الکتروود خمیر کربن اصلاح شده توسط فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده به عنوان الکتروود

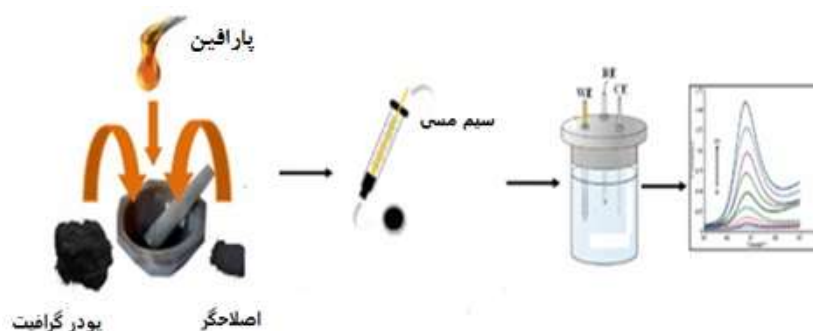
کار، یک الکتروود کالومل اشباع شده به عنوان مرجع و یک الکتروود کمکی پلاتین (ساخت شرکت آذر الکتروود، ایران) برای اندازه گیری های ولتامتری استفاده گردید. تمام پتانسیل های این تحقیق نسبت به الکتروود مرجع کالومل اشباع و در دمای آزمایشگاه گزارش شده است. تنظیم pH توسط دستگاه Metrohm 691 pH/mV انجام شد و یک همزن مغناطیسی مدل MR 3001Heidolph برای مخلوط کردن محلول ها استفاده شد. آزمایش میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با استفاده از دستگاه KYKY, EM3200SEM بدین صورت که پودر نمونه به آرامی بر روی قطعه های از جنس استیل ضدزنگ، توزیع شد، انجام پذیرفت. دستگاه سانتیفریوژ Hettich مدل EBA۲۰۰، دستگاه همزن مغناطیسی wisetter مدل D20-MSH Nicolet، دستگاه TEM (میکروسکوپ الکترونی عبوری) شرکت فیلیپس مدل CM-۱۲۰، اسپکتروفوتومتر Specord مدل ۶۷۰ Nexus، دستگاه طیفسنجی مادون قرمز تبدیل فوریه Thermo، دستگاه تخلخل سنج BET شرکت BEL ژاپن مدل II ۲۱۰، دستگاه سنجش pH شرکت IStek مدل L220-pH، دستگاه پراش پرتو ایکس XRD مدل Philips PW1730 ساخت هلند، دستگاه VSM مدل lake shore 7404، ساخت امریکا سایر تجهیزاتی بود که در این تحقیق استفاده شد.

۲-۲- تهیه محلول بافر فسفات

برای اندازه گیری و سنجش ولتامتری داروی آتورواستاتین از محلول بافر فسفات استفاده شد و تمام نتایج در محیط بافری بررسی گردید. به منظور تنظیم و تثبیت pH، نسبت های معینی از محلول سدیم دی هیدروژن فسفات و دی سدیم هیدروژن فسفات با یکدیگر مخلوط و توسط دستگاه pH متر تا رسیدن محلول به pH های مدنظر به طور تجربی مورد اندازه گیری قرار گرفت و با اضافه نمودن مقدار اندکی از اسید و باز تشکیل دهنده بافر فسفات، مقادیر pH های محلولی که با pH مدنظر متفاوت بود تنظیم گشت. غلظت کلی بافر ثابت است و غلظت اجزای تشکیل دهنده آن از رابطه $pH = pka + \log\left(\frac{[Acid]}{[Base]}\right)$ به دست می آید.

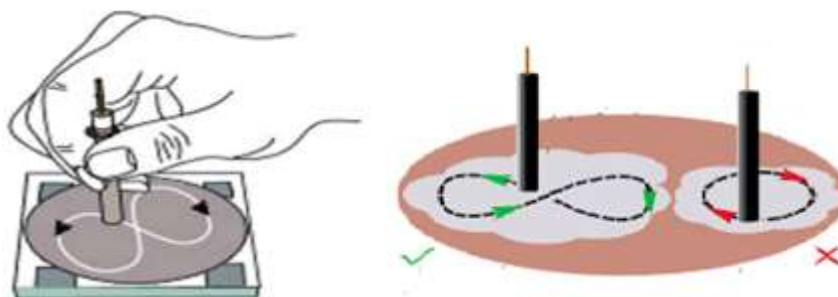
۲-۳- طریقه ساخت الکتروود خمیر کربن

به منظور تهیه الکتروود نسبت وزنی معینی (۲۵/۷۵) (w/w) از پودر گرافیت و روغن پارافین به خوبی با یکدیگر مخلوط گشت تا مخلوط خمیری همگن حاصل شود و سپس به درون یک سرنگ انسولین که درون آن یک سیم مسی (شکل ۱) به هدف برقراری اتصال الکتریکی الکتروود خمیر کربن با دستگاه قرار داده شده بود به آرامی منتقل گردید تا از وجود حباب جلوگیری شود (حباب سبب افزایش مقاومت الکتروود می شود).



شکل ۱- طریقه ساخت و پر کردن الکتروود خمیر کربنی.

برای آنکه سطح یکنواختی از خمیر کربن حاصل شود، قبل از هر بار اندازه‌گیری نوک الکتروود بر روی کاغذ روغنی به صورت شکل ۲ به خوبی صیقل داده شد تا سطح برآقی به دست آید و سپس با فشار دادن پیستون سرنگ و خارج نمودن مقداری خمیر کربن پس از هر اندازه‌گیری، سطح جدید و تمیزی از خمیر کربن حاصل شد. بدین‌صورت الکتروود خمیر کربن اصلاح‌نشده ساخته شد. به‌منظور اصلاح سطح الکتروود خمیر کربنی همانند قبل عمل کرده ولی در این مرحله به نسبت وزنی مشخصی (۲۵/۵/۷۰) (w/w) از NF@Ch به عنوان اصلاحگر به مخلوط کربنی ساخته‌شده از گرافیت و روغن پارافین به منظور اصلاح سطح اضافه شد. در هنگام ساخت خمیر کربنی باید به این نکته توجه کرد که از نسبت‌های وزنی مناسبی استفاده شود زیرا اگر به‌طور مثال مقدار پارافین از حدی زیاد شود خواص الکتریکی و سنتیکی الکتروود نامناسب می‌گردد و همچنین اگر مقدار پارافین اضافه‌شده کم باشد خمیر کربن به‌دست‌آمده خشک بوده و تجدید سطح آن دشوار می‌شود و تکرارپذیری الکتروود کاهش می‌یابد.



شکل ۲- روش صحیح صیقل دادن الکتروود

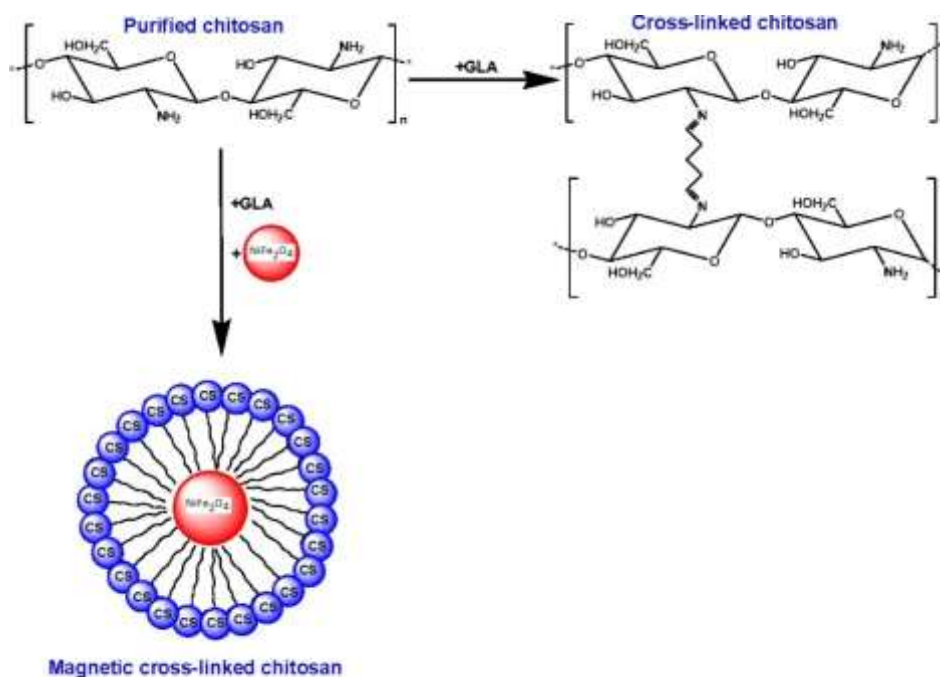
۲-۴- سنتز نانوذره NiFe_2O_4

در ابتدا مقادیر ۲۵ میلی‌لیتر از محلول‌های $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ را با غلظت‌های ۰/۲ مولار و ۰/۴ مولار به‌طور جداگانه تهیه و به‌منظور ترکیب شدن دو محلول به مدت ۳۰ دقیقه بعد از مخلوط شدن توسط همزن ترکیب هم زده شد و در ادامه برای رساندن pH محلول به ۱۰، از محلول سود ۱ مولار استفاده شد. برای تشکیل نانو ذرات فریت نیکل مخلوط به مدت

۳ ساعت در دمای ۸۰ درجه در حمام قرار داده شد و پس از آن رسوب حاصل صاف و با آب دیونیزه و اتانول شسته شد. سپس به منظور کلسینه شدن رسوب به دست آمده به مدت ۳ ساعت در آون خلأ در دمای ۷۰ درجه و بعد از آن به مدت ۴ ساعت در دمای ۷۰۰ درجه قرار داده شد.

۲-۵- اصلاح بسترهای سنتز شده با چیتوسان پلیمری شده

به هدف عامل دار کردن سطح بستر در ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر محلول آبی ۰.۵٪ حجمی-حجمی استیک اسید تهیه و مقدار ۲ گرم چیتوسان در آن حل گردید. مقدار ۰/۵ گرم از نانوذره سنتز شده و ۵ میلی لیتر گلو تار آلدئید به محلول اضافه شد و ۳۰ دقیقه دیگر پخش شد و سپس ۲۰ دقیقه روی استیرر هم زده شد و در ادامه به منظور خشک شدن، در آون در دمای ۶۰ درجه حرارت داده شد. و در پایان محصول به دست آمده را با استیک اسید ۰.۲٪ حجمی-حجمی دو بار شستشو داده شد و به مدت ۱۲ ساعت مجدداً در آون با دمای ۵۰ درجه قرار داده شد (نمایی از اصلاح بسترهای سنتز شده با چیتوسان پلیمری شده در شکل ۳ نمایش داده شده است) [۴۳].

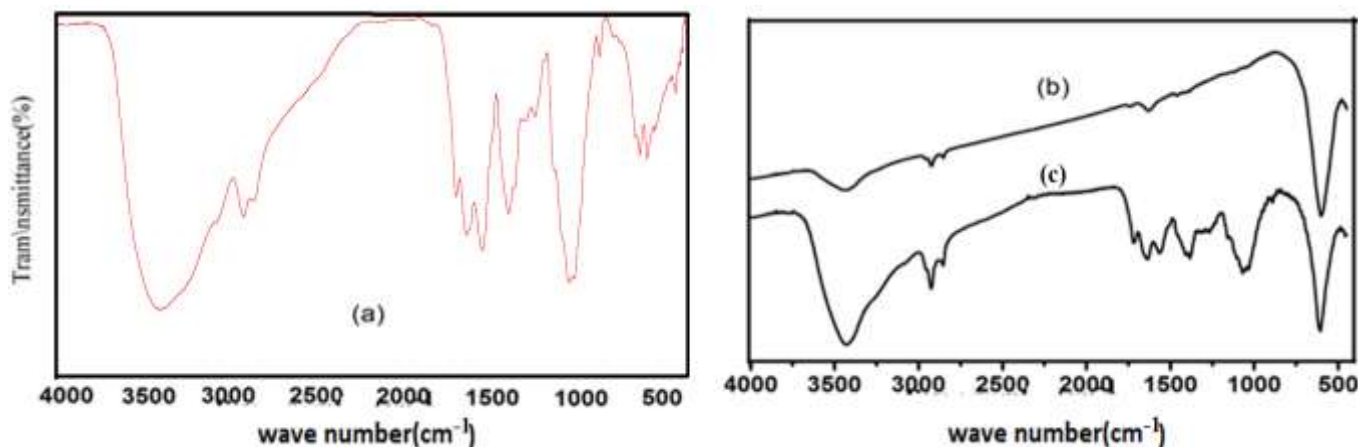


شکل ۳- فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- شناسایی بستر سنتز شده

برای بررسی طیف FT-IR به هدف شناسایی بستر سنتز شده بر پایه فریت نیکل، به کمک KBr اقدام به ساخت قرص گردید. طیف FT-IR مربوط به بستر چیتوسان، فریت نیکل و طیف مربوط به فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده در شکل ۴ نمایش داده شده است.

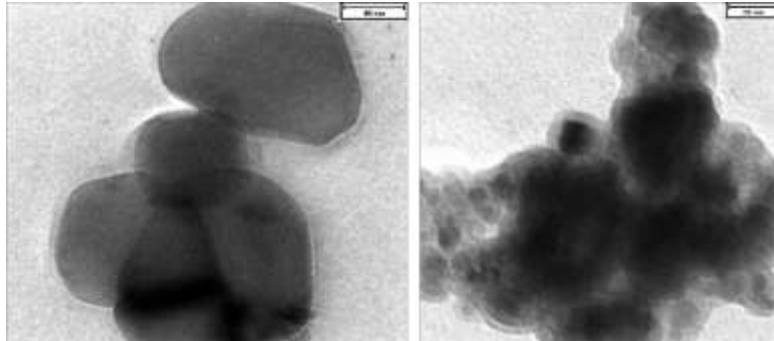


شکل ۴- طیف FT-IR مربوط به چیتوسان (a) فریت نیکل (b)، فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده (c)

همان طور که در شکل ۴ مشخص است نوار مشاهده شده در طیف مربوط به کامپوزیت مغناطیسی در 606 cm^{-1} مربوط به گروه جذب فلز - اکسیژن است که نشان می دهد بستر فریت نیکل سنتز شده است. باند پهن در 3429 cm^{-1} مربوط به پیوند O-H است که نشان از رطوبت نمونه است. نتایج طیف FT-IR بستر فریت نیکل مغناطیسی اصلاح شده با چیتوسان عامل دار شده در شکل ۴ نمودار (b) مشاهده می شود. نواری که در 606 cm^{-1} تصویر مشاهده شده، نشان از این دارد که پیوند فلز-اکسیژن در بستر اصلاح شده، حفظ شده است. و باند پهنی که در 3429 cm^{-1} مشاهده شده به پیوند O-H و N-H کششی و نیز پیوندهای هیدروژنی مربوط است، که به خاطر قرارگیری این گروه ها در چیتوسان تثبیت شده بروی بستر می باشد. پیک حاصل شده در 1068 cm^{-1} به C-N مرتبط است و نوار موجود در 1384 cm^{-1} مرتبط با N-H خمشی و نوار موجود در 1719 cm^{-1} و 1633 cm^{-1} مرتبط به گروه C=O استیلی چیتوسان و عامل آلدئیدی گلوکارآلدئید است. باندهای مشاهده شده در 2854 cm^{-1} و 2924 cm^{-1} مربوط به C-H آلکانی می باشد که نشان می دهد چیتوسان عامل دار شده روی سطح نانوذرات فریت نیکل تثبیت شده است.

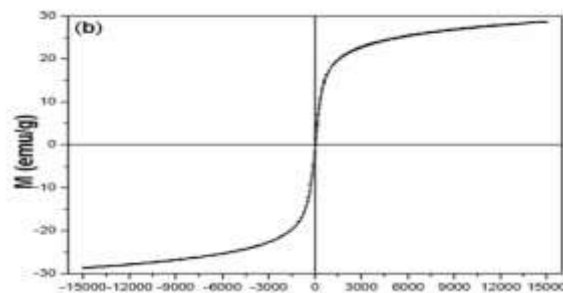
میکروسکوپ های الکترونی عبوری، ابزاری ویژه برای تعیین ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می شوند از این میکروسکوپ ها برای مطالعات ساختار کریستال ها، تقارن و جهت گیری و نقص های بلوری می توان بهره برد. بررسی ساختار بستر سنتز شده که در تصاویر شکل ۵ مشاهده می گردد توسط تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام پذیرفت.

تصاویر به دست آمده بیانگر تشکیل کامپوزیت با اندازه ذرات بین ۲۰-۷۰ نانومتر از ذرات فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری، شده است.

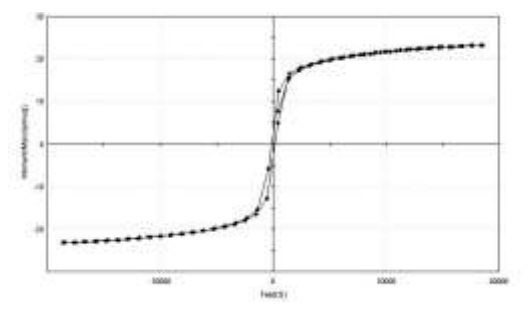


شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانو ذرات فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده

خواص مغناطیسی یک نمونه از ماده با ابعاد مختلف توسط دستگاه های مغناطیس سنج به روش های گوناگونی و در شرایط متفاوت دمایی، میدان مغناطیسی و جهت گیری نمونه، مورد اندازه گیری قرار می گیرند. اساس کار دستگاه VSM، قانون القای فارادی است که با ارتعاش نمونه و برقراری اعمال میدان مغناطیسی به آن، سبب به وجود آمدن یک جریان القایی در سیم پیچ های قرار داده شده در دستگاه می شود که متناسب با مغناطیس نمونه می باشد. با برقراری این جریان القایی به کامپیوتر متصل به دستگاه و نمایش حلقه پسماند، خاصیت مغناطیسی نمونه مورد اندازه گیری قرار می گیرد. در شکل ۶ و شکل ۷ نمودارهای به دست آمده از میزان مغناطیسی بستر فریت نیکل و فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان با استفاده از دستگاه مغناطیس سنج نمونه مرتعش (VSM) در دمای اتاق مشاهده می گردد.



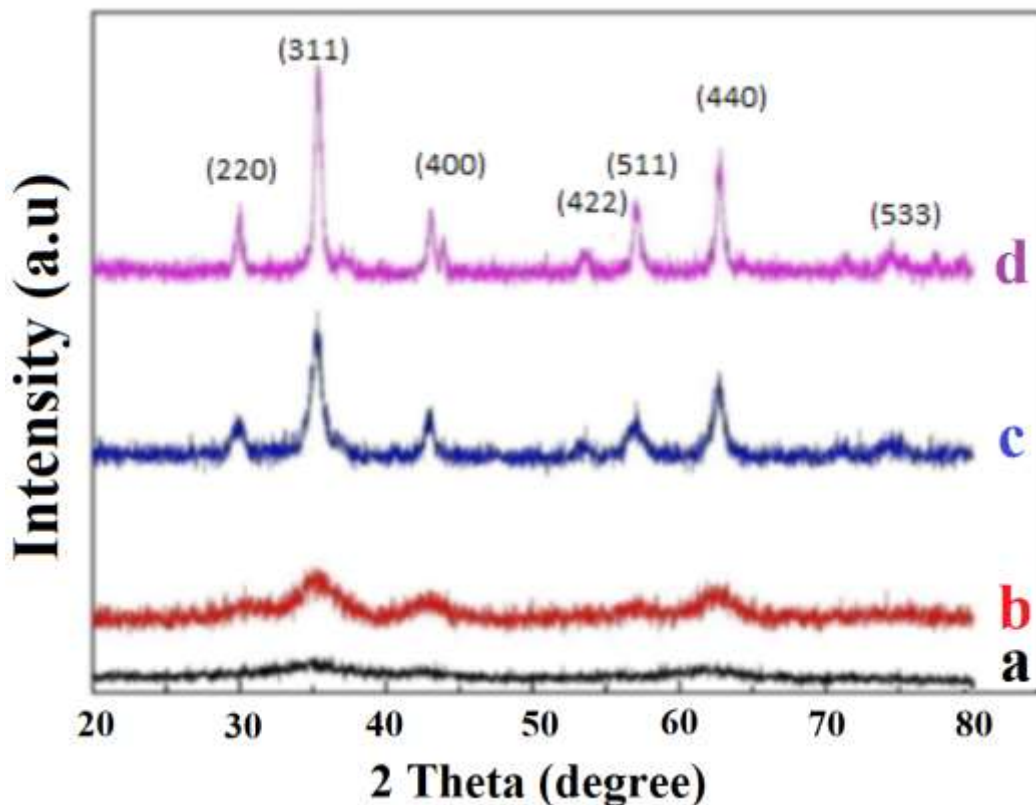
شکل ۶- بررسی ساختار مغناطیسی فریت نیکل



شکل ۷- بررسی ساختار مغناطیسی فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده

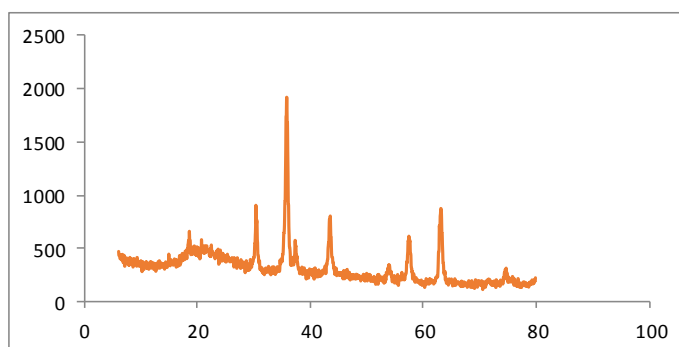
از مقایسه دو شکل، کاهش مقدار مغناطش نانو بستر فریت نیکل مغناطیسی اصلاح شده با چیتوسان عامل دار شده در قیاس با نانو ذرات فریت نیکل مغناطیسی نتیجه می شود. این کاهش نشان از تثبیت بالای چیتوسان بر روی نانو ذرات است. با وجود کاهش در مقدار مغناطیسی بستر اصلاح شده، خواص مغناطیسی بستر جوابگوی نیاز جداسازی بستر با میدان مغناطیسی خارجی می باشد.

XRD یا همان پراش اشعه ایکس (X-Ray Diffraction) از تکنیک های قدیمی و بسیار کاربردی در بررسی خصوصیات کریستال ها می باشد. در روش XRD از پراش اشعه ایکس توسط نمونه، به هدف بررسی ویژگی های مختلف نمونه استفاده می شود. این روش برای تعیین کمیات ساختار کریستالی مانند هندسه شبکه، تعیین اندازه کریستال ها، ثابت شبکه، تعیین فاز کریستال ها، جهت گیری تک کریستال، عیوب شبکه، تعیین کیفی مواد ناشناس، استرس، تنش و غیره، قابل استفاده است. به هدف بررسی آمورف یا بلوری بودن کامپوزیت سنتز شده، از پراش اشعه ایکس در دامنه روبشی 2θ (۲۰-۸۰) استفاده شد. در شکل ۸ الگوی پراش اشعه ایکس فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان عامل دار شده، نشان داده شده است.



شکل ۸- پراش اشعه X برای فریت نیکل بعد از سنتز (a)، کلسینه شده در دمای ۵۰۰ (b)، کلسینه شده در دمای ۷۰۰ (c) و کلسینه شده در دمای ۹۰۰ درجه سلسیوس (d).

شکل a بعد از سنتز، b کلسینه شده در دمای ۵۰۰، کلسینه شده، c در دمای ۷۰۰ و d کلسینه شده در دمای ۹۰۰ درجه سلسیوس. الگوی پراش اشعه ایکس فریت نیکل ساختار کریستالی در 2θ برابر با (۳۰،۶۲)، (۳۶،۰۵)، (۳۷،۷۲)، (۴۳،۷۲)، (۵۴،۱۲)، (۵۷،۲۷)، (۶۳،۳۲)، (۷۴،۳۳) درجه با اندازه های میلی (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۲۲۲)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱)، (۴۴۰)، (۵۳۳) نشان می دهد که همه پیک های مشخص شده مربوط به ساختار فریت نیکل است که با داده های استاندارد برای فریت نیکل سازگار است.

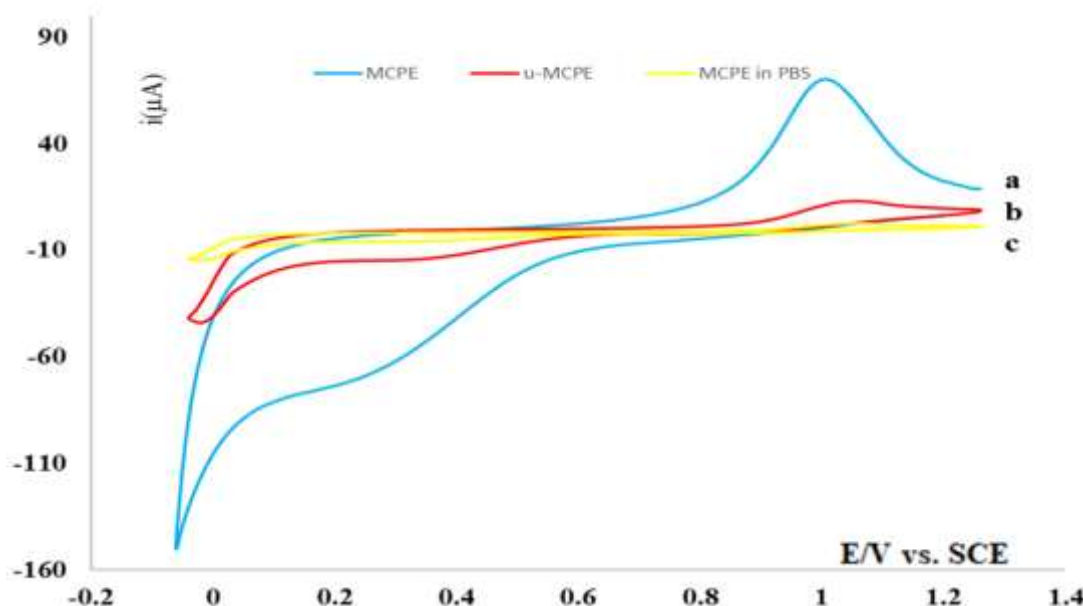


شکل ۹- پراش اشعه X برای فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان عامل دار شده

با مقایسه طیف های فریت نیکل با فریت نیکل اصلاح شده همانند شکل ۹ تطابق آن ها به خوبی قابل مشاهده است و نشان از تشکیل کامپوزیت مغناطیسی دارد و همچنین تثبیت چیتوسان بر روی NiFe_2O_4 در جهش ضعیف مشاهده شده در زاویه ۲۳ قابل رؤیت می باشد.

۳-۲- بررسی عملکرد الکتروود خمیر کربنی اصلاح شده

کاربرد بالقوه سنسور جدید برای اکسیداسیون الکتروشیمیایی و اندازه گیری آتورواستاتین (ATV) مطابق شکل ۱۰ مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا به منظور مطالعه رفتار ولتامتری ATV در سطح سنسور جدید، از تکنیک ولتامتری چرخه ای استفاده شد. همان طور که در شکل ۱۰ نشان داده شده است ولتاموگرام های چرخه ای برای یک محلول ۵۰ نانو مولار ATV بر سطح (a) NF@Ch-mCPE و (b) u-CPE در ۰/۱ مولار بافر فسفات (PBS)، $\text{pH} = ۰/۲$ با سرعت پیمایش ۱۰۰ mVs^{-1} انجام شده است. جریان اکسیدی وقتی از MCPE به عنوان الکتروود استفاده می شود، افزایش می یابد که نشان دهنده کارایی بالای الکتروود اصلاح شده می باشد.



شکل ۱۰- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای برای یک محلول ۵۰ نانومولار ATV بر سطح NF@Ch-MCPE (a) (خط آبی) و u-MCPE (b) (خط قرمز) در ۰/۱ مولار بافر فسفات (PBS)، NF@Ch-MCPE (c) در بافر فسفات و در عدم حضور ATV، pH برابر ۲ با سرعت پیمایش 100 mVs^{-1} در برابر الکتروود کالومل اشباع.

۳-۳- بهینه‌سازی پارامترهای آزمایش

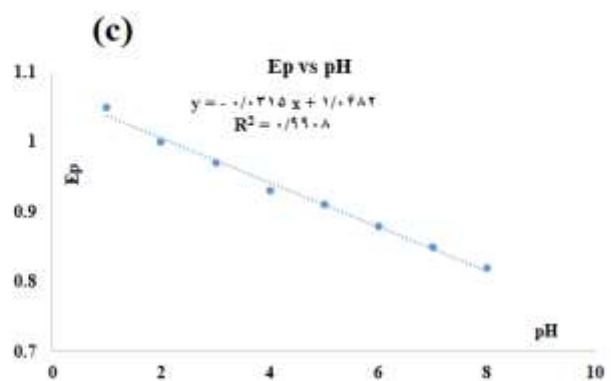
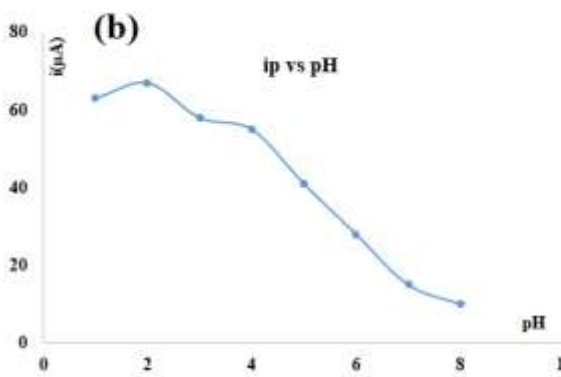
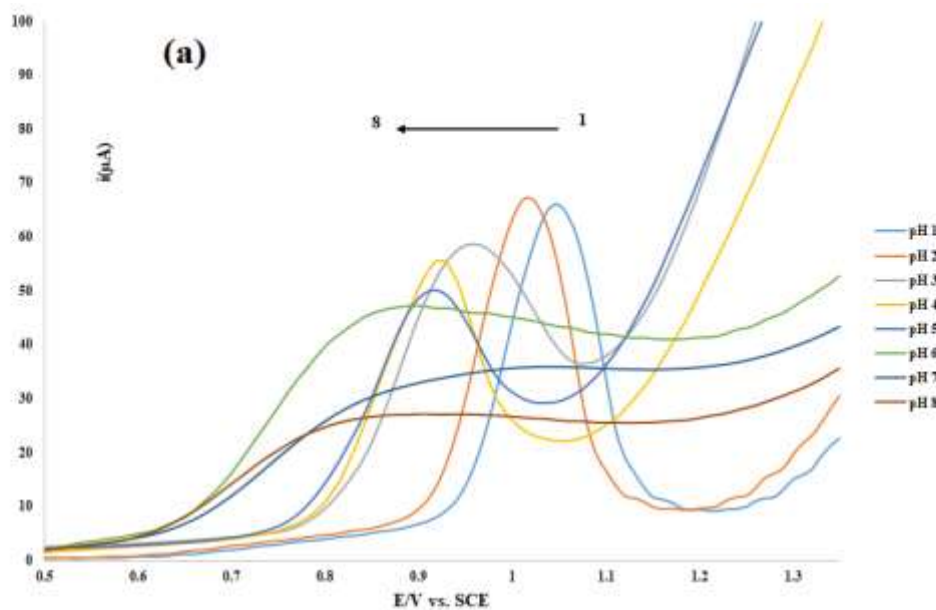
از مهم‌ترین بخش‌های تحقیقات تجربی بررسی و بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر نتایج در جهت افزایش بازدهی روش مورد استفاده است. فرآیند بهینه‌سازی بر روی بخش‌های مختلفی از عوامل تجربی مانند بهینه‌سازی عملکردی، بهینه‌سازی دستگاهی و بهینه‌سازی محیطی انجام می‌گیرد. از معمول‌ترین روش‌های بهینه‌سازی تجربی می‌توان به بهینه‌سازی تک متغیره اشاره کرد که با تغییر مقادیر یکی از عوامل و ثابت نگه‌داشتن سایر عوامل مؤثر، اثر آن مورد بررسی قرار می‌گیرد. متغیرهای مؤثری شامل اثر زمان تجمع، مقدار درصد خمیر کربن الکتروود، اثر سرعت پیمایش و اثر pH در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۴- بررسی اثر pH و بهینه‌سازی آن

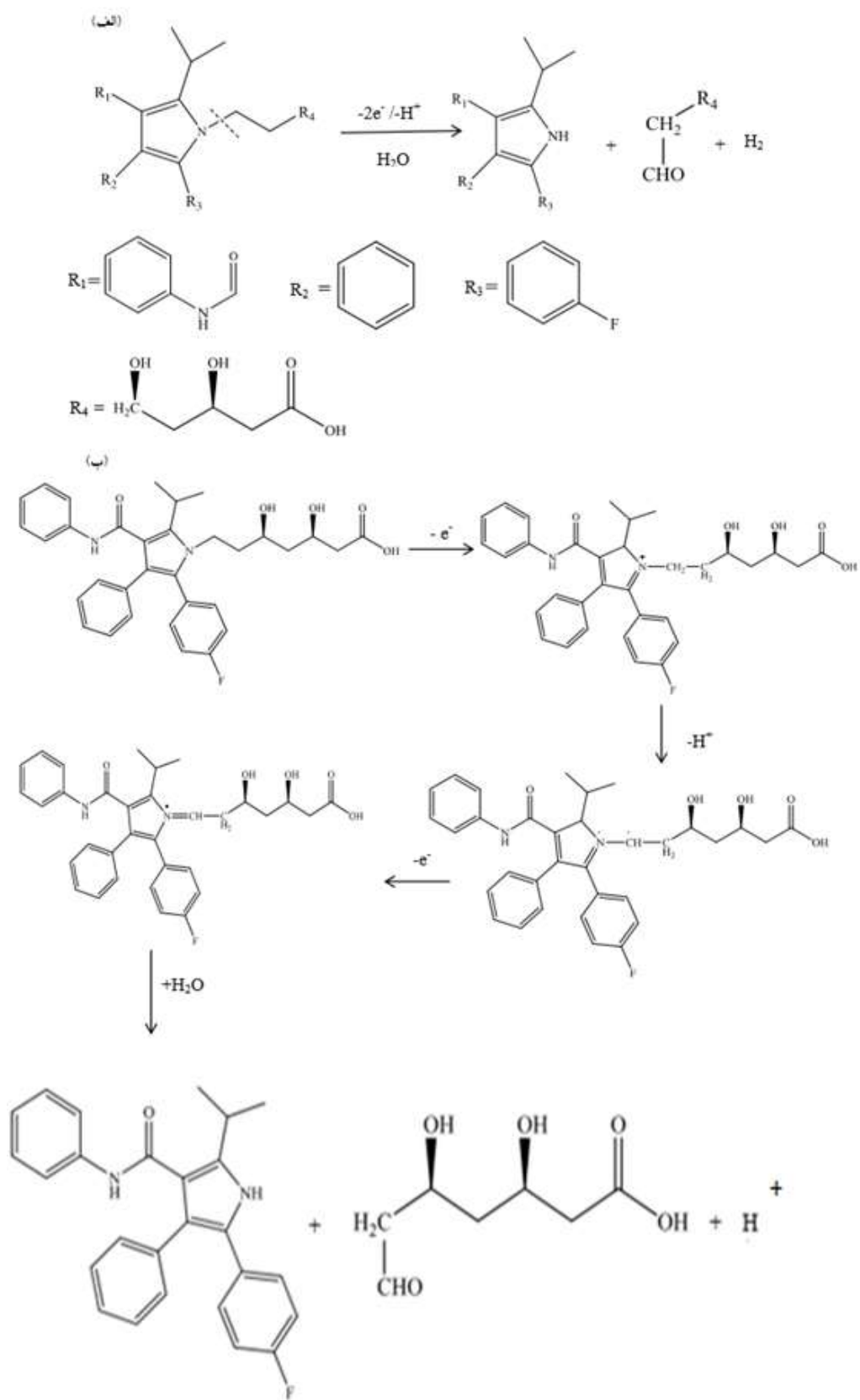
واکنش الکتروشیمیایی بسیاری از ترکیبات به میزان pH محلول وابسته است. تأثیر pH محلول بافر بر رفتار الکتروشیمیایی ATV با استفاده از ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) بررسی شد. شکل ۱۱ وابستگی پاسخ ولتامتری ATV، بر سطح NF@Ch-mCPE در مقادیر مختلف pH را نشان می‌دهد. واضح است که بیشترین جریان پیک آندی ATV برای سنسور پیشنهادی در pH=۲ حاصل می‌شود. از این رو pH=۲ به عنوان pH بهینه برای ادامه آزمایشات در نظر گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۱۱ قابل مشاهده است، پتانسیل پیک آندی به pH محلول وابسته است. بستگی پتانسیل پیک آندی برای ATV با pH با معادله زیر شرح داده می‌شود

$$E_{pa} (V) = -0.0315 \text{ pH} + 1.0682 \quad (R^2 = 0.9908) \quad (\text{معادله ۱-۳})$$

بر اساس نتایج، پتانسیل اکسید شدن ATV با افزایش pH محلول، به سمت پتانسیل های کمتر مثبت میل می کند که نشان دهندهی دپروتونه شدن، در حین اکسیداسیون است که در pH های بالاتر تسهیل می شود. نتایج نشان می دهد که یک رابطه خطی بین پتانسیل و pH مشاهده می شود که شیبی برابر با $31/5 \text{ mV/pH}$ به دست آمده است که نشان از انتقال تعداد دو الکترون و یک پروتون در طی اکسیداسیون ATV است، که در توافق با گزارش های قبلی می باشد [44-46]. شکل ۱۲ نشان دهندهی مکانسیم الکترو اکسایش اتورواستاتین بر سطح الکتروکدکس اصلاح شده در $\text{pH} = 2$ است [47]. به نظر می رسد جریان های پیک تحت تأثیر pH و با افزایش pH به طور خطی کاهش یافته و از این رو pH محلول بافر در ۲ تنظیم شده است.



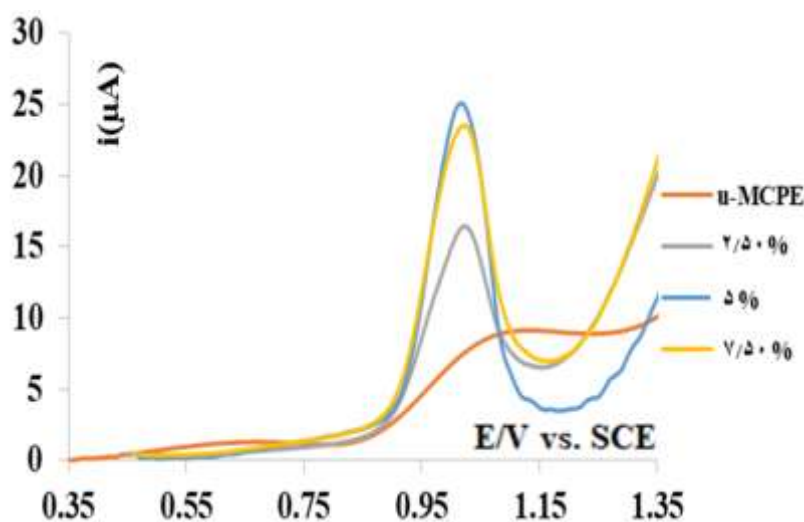
شکل ۱۱- (a) ولتاموگرام پالس تفاضلی (DPV) در یک محلول ۵۰ نانومولار ATV بر سطح NF@Ch-mCPE در pH های (۲ تا ۸) (۸ تا ۰/۱ مولار (PBS) با سرعت پیمایش 100 mVs^{-1} در دمای $25 \pm 1^\circ \text{C}$ (b) بررسی اثر pH بر شدت جریان، (c) اثر pH بر پتانسیل پیک آندی در برابر الکتروکدکس کالومل اشباع.



شکل ۱۲- مکانیزم اکسایش آنورواستاتین

۳-۵- بهینه‌سازی مقدار درصد اصلاحگر در الکتروکدومر

سیگنال‌های ولتامتری پالس تفاضلی نشان می‌دهد که ابتدا با افزایش میزان اصلاحگر استفاده‌شده درون خمیر کربن پرکننده الکتروکدومر، پاسخ الکتروشیمیایی به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد و این زیادشدن جریان تا افزایش به میزان ۵٪ وزنی/وزنی اصلاحگر ادامه می‌یابد و سپس ثابت می‌شود و بعد از آن با افزایش بیشتر درصد اصلاحگر، جریان رو به نزول می‌رود (شکل ۱۳). که نشان از آن دارد که با افزایش میزان درصد اصلاحگر، سایت‌های فعال برای جذب ATV افزایش می‌یابد و بعد با افزایش بیشتر میزان اصلاحگر (به دلیل ماهیت نارسا بودن اصلاحگر) باعث افزایش مقاومت الکتروکدومر می‌شود، لذا جریان مشاهده‌شده کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمایشات، در ادامه کار از الکتروکدومر NF@Ch C-mPE با درصد اصلاحگر ۵٪ به عنوان الکتروکدومر کار استفاده شد.



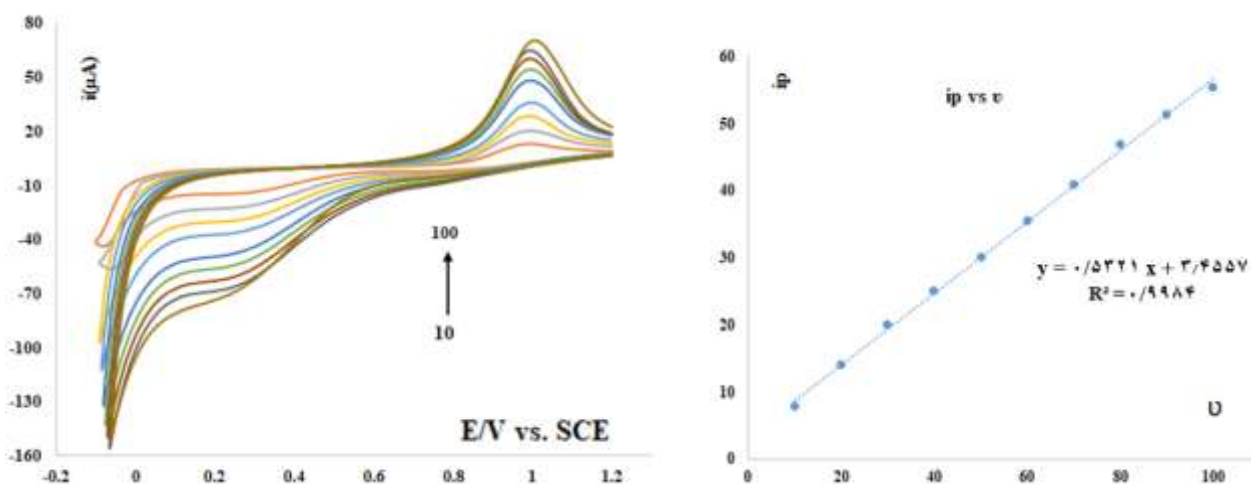
شکل ۱۳- اثر درصد اصلاحگر بر پاسخ الکتروشیمیایی، بر روی سطح الکتروکدومرهای اصلاح‌شده با درصدهای اصلاحگر متفاوت بر محلول ۵۰ نانومولار از ATV در pH=۲ در برابر الکتروکدومر کالومل اشباع.

۳-۶- اثر زمان تجمع

با قرار دادن الکتروکدومر اصلاح‌شده درون محلول حاوی ۵۰ nM از ATV و هم زدن محلول به کمک هم زن مغناطیسی، برای مدت زمان‌های متفاوت، اثر زمان تجمع برای دارو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد جریان پیک تا مدت‌زمان غوطه‌وری ۳۰ ثانیه افزایش می‌یابد و با افزایش بیشتر این زمان، تغییر قابل‌توجهی در شدت جریان پیک مشاهده نمی‌گردد که دلیل آن این است که ابتدا ATV به محل‌های فعال روی سطح الکتروکدومر نزدیک شده و با جذب بر روی آن، سبب پیش‌تغلیظ و افزایش جریان می‌شود. بعد از آن محل‌های فعال موجود بر روی الکتروکدومر اشباع‌شده و تغلیظ از حدی، بیشتر نمی‌گردد، لذا جریان ثابت باقی می‌ماند. با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده زمان تجمع ۳۰ ثانیه به عنوان زمان تجمع بهینه برای سایر آزمایشات در نظر گرفته شد.

۳-۷- اثر سرعت پیمایش

با توجه به اهمیت نتایج مطالعات سرعت پیمایش که سبب دست‌یابی به اطلاعات مفیدی، از جمله اطلاعات کلی مکانیسم الکتروشیمیایی از آزمایش سرعت پیمایش پتانسیل می‌شود، تأثیر سرعت پویش پتانسیل در اکسیداسیون الکتروشیمیایی ATV در سطح NF@Ch-mCPE توسط ولتامتری چرخه‌ای با سرعت‌های پیمایش مختلف، از 10 تا 100 mVs^{-1} بررسی شد و با توجه به شکل ۱۴ و نتایج به‌دست‌آمده از نمودار جریان پیک ($I_{pa}/\mu A$) بر حسب سرعت پیمایش (mVs^{-1}) برای ATV نتیجه‌گیری شد که آنالیت بروی سطح الکتروود اصلاح‌شده جذب‌شده است.



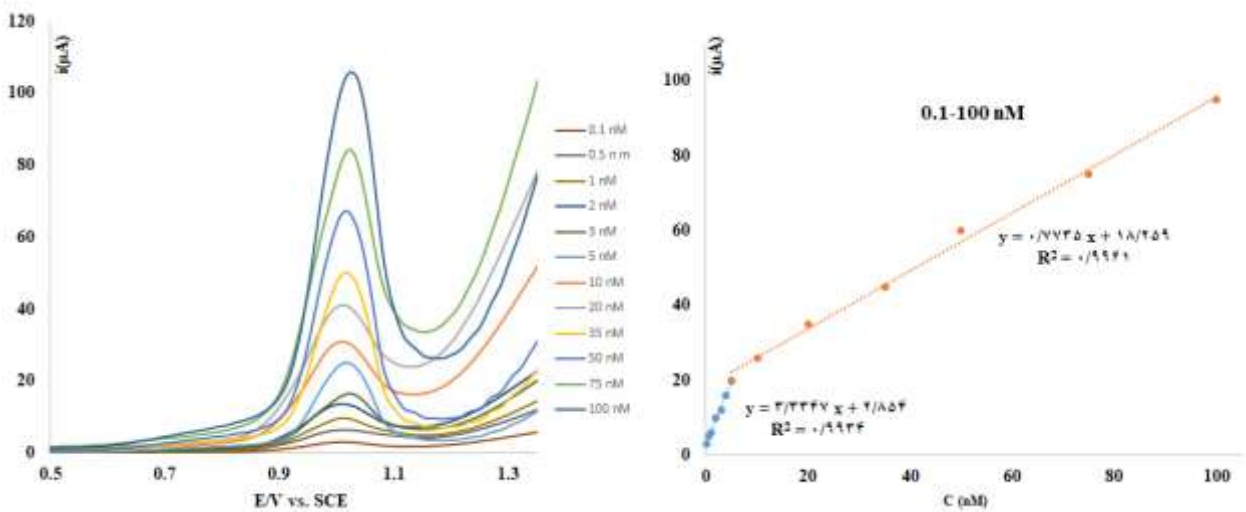
شکل ۱۴- اکسیداسیون الکتروشیمیایی ATV بر روی سطح NF@Ch-mCPE در مقادیر مختلف اسکن از 10 تا 100 mVs^{-1} در PBS 0.1 مولار ($pH = 2$) در برابر الکتروود کالومل اشباع.

۳-۸- گستره خطی و حد تشخیص

با توجه به حساسیت بالاتر ولتامتری پالس تفاضلی نسبت به ولتامتری چرخه‌ای، برای تعیین گستره خطی داروی ATV، از این تکنیک برای به دست آوردن منحنی درجه بندی استفاده شد شکل ۱۵ ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی ATV را در گستره 0.1 تا 100 نانومولار در $pH = 2$ را نشان می‌دهد. منحنی جریان پیک آندی نسبت به غلظت ATV دو محدوده خطی را نشان می‌دهد که معادله خط مربوط به هرکدام در زیر آمده است:

$$I_{\mu A} = 3.334 C_{ATV} (nM) + 2.854 \quad R^2 = 0.9934 \quad \text{بین گستره } 0.1 \text{ تا } 5/0 \text{ نانومولار} \quad (2-3)$$

$$I_{\mu A} = 0.7735 C_{ATV} (nM) + 18.259 \quad R^2 = 0.9961 \quad \text{بین گستره } 5/0 \text{ تا } 100/0 \text{ نانومولار} \quad (3-3)$$



شکل ۱۵- نمودارهای کالیبراسیون خطی NF @ Ch-mCPE به دست آمده در غلظت های مختلف ATV در شرایط بهینه شده

۳-۹- ارقام شایستگی برای سنسور الکتروشیمیایی تهیه شده

خصوصیات mCPE ها در آنالیز ATV در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان می دهد که mCPE های موجود در مطالعه حاضر از یک حد تشخیص مناسب برخوردار بوده و دامنه خطی وسیعی را ارائه می دهد (جدول ۱). محاسبه عملکرد تجزیه ای mCPE ها در ماتریکس های ادرار و پلاسما به روش مشابه با نمونه های آب انجام شد و این نتایج نیز در جدول ۱ گنجانده شده است. حد تشخیص با استفاده از رابطه $k.s.b.m^{-1}$ ، مولار به دست آمد، که در آن $k = 3$ و sb انحراف استاندارد مربوط به جریان های پیک محلول شاهد و m شیب منحنی درجه بندی برای ATV است. انحراف استاندارد محلول شاهد، از جریان به دست آمده در محدوده پتانسیلی که پیک دارو مشاهده می شود به دست آمد.

جدول ۱. ارقام شایستگی m CPE ها در آنالیز نمونه های آب، ادرار و پلاسما

نمونه	مدل رگرسیونی	R ²	LDR ^a (nM)	LOD ^b (nM)	RSD ^c (%)	
					Intra-day ^d	Inter-day ^d
آب	$ip = 3/3347C (nM) + 2/854$	0.993	0.1-5.0		3/5	4/6
	$ip = 0.77735 C (nM) + 18/259$	0.996	5-100	0.035		
پلاسما	$ip = 3/2884 C (nM) + 2/854$	0.980	0.1-5.0		4/5	5/9
	$ip = 0.7021 C (nM) + 18/259$	0.980	5-100	0.088		
ادرار	$ip = 3/3143 C (nM) + 2/854$	0.985	0.1-5.0		4/0	5/2
	$ip = 0.7512 C (nM) + 18/259$	0.985	5-100	0.079		

۳-۱۰- تکرارپذیری

برای به دست آوردن تکرارپذیری الکتروود اصلاح شده (NF@Ch-mCPEs)، ولتاموگرام پالس تفاضلی ۵۰ نانو مولار از محلول ATV از طریق ۹ آزمایش متوالی ثبت شد و در نهایت انحراف استاندارد ۴/۳٪ برای جریان‌های پیک به دست آمد.

۳-۱۱- تکثیرپذیری

تکثیرپذیری الکتروود اصلاح شده نیز با محاسبه انحراف استاندارد نسبی برای جریان پیک‌های اکسایشی ۵ الکتروود مختلف با یک دستور ساخت مشابه در محلول بافر فسفات با pH=۲/۰ شامل 50 nM از ATV به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی در این حالت برابر با ۶/۱٪ به دست آمد.

۳-۱۲- پایداری

به منظور آگاهی از مقدار پایداری الکتروود، طی ۱۰ روز از الکتروود ساخته شده در شرایط کاملاً مشابه DPV گرفته شد و مشاهده گردید که جریان حاصله پس از ۱۰ روز به ۸۹/۸٪ مقدار اولیه آن رسید.

۳-۱۳- کاربرد تجزیه‌ای: ارزیابی صحت روش با اندازه‌گیری ATV در نمونه دارویی

برای بررسی کارایی الکتروود اصلاح شده برای تعیین ATV، نمونه‌های مختلف قرص های ATV آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد NF@Ch-mCPE پیشنهادی به عنوان یک حسگر الکتروشیمیایی مطلوب برای آنالیز ATV عمل می‌کند. نتایج حاصله از اندازه‌گیری‌ها برای نمونه‌های مختلف به صورت خلاصه در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج، صحت مطلوبی را نشان می‌دهند که کاربرد موفقیت‌آمیز این روش را برای آنالیز نمونه حقیقی تأیید می‌کند. محلول‌های نمونه با انحلال قرص‌های روکش‌دار در آب تهیه و بعد از آن به صورت متوالی با بافر (pH ۲) رقیق شد تا رقت به حدی برسد که غلظت محلول در بازه ی خطی بودن روش قرار گیرد. تحت شرایط بهینه آزمایش ولتامتری پالس تفاضلی انجام شد و نتایج با در نظر گرفتن میزان رقیق‌سازی، همخوانی خوبی با مقدار اسمی نمونه‌های قرص داشت. نتایج حاصله در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. اندازه گیری نمونه های حقیقی (قرص) با استفاده از سنسور الکتروشیمیایی پیشنهاد شده

شرکت تولیدکننده	درصد اندازه‌گیری شده	اندازه‌گیری شده	دوز اسمی دارو (میلی‌گرم)
داروپخش	۱۰۱/۰۰	۴۰/۴۱	۴۰
لقمان	۱۰۰/۲۵	۲۰/۰۵	۲۰
سبحان	۹۸/۵۰	۱۹/۷	۲۰
رازک	۱۰۱/۰۰	۱۰/۱	۱۰

۴- نتیجه گیری

یک سنسور الکتروشیمیایی اصلاح شده برای تعیین اثر آتورواستاتین با استفاده از کامپوزیت فریت نیکل اصلاح شده با چیتوسان پلیمری شده به عنوان ماده الکتروشیمیایی جدید برای الکتروودهای کربنی اصلاح شده مورد استفاده قرار گرفت. رفتار الکتروشیمیایی ATV اثبات می کند که سنسور اصلاح شده پیشنهادی حساسیت زیادی را نشان می دهد. بازه خطی بودن در غلظت-های مختلف، برای الکتروود پیشنهادی، گستره ی وسیعی را در برمی گیرد و حد تشخیص کمی مناسبی نسبت به مطالعات گذشته (جدول شماره ۳)، از خود نشان داد [۳۶-۴۲ و ۴۸]. این سنسور، نمونه ای از کاربرد مزوپروس کربن ها در سنسورهای الکتروشیمیایی دارویی را نشان داد.

جدول ۳. مقایسه ی داده های تجربی به دست آمده با روش پیشنهادی و روش های ارائه شده روش های ارائه شده ی پیشین

Classical Method	Linear concentration range	Detection limit	Refs
HPLC	0.50–86.0 µg/mL	0.0084 µg/mL	۳۶
HPLC-UV	0.001–0.5 µg/mL	0.0004 µg/mL	۳۷
Derivative Spectrophotometry	10–35 µg/mL	1.75 µg/mL	۳۸
LC-MS/MS	0.0005–0.15 µg/mL	۳۹
LC-MS	0.0002–0.03 µg/mL	0.00006 µg/mL	۴۰
Capillary electrophoresis	1.0–100 µg/mL	60 µg/mL	۴۱
Electrochemical method			
Boron doped diamond electrode	1.16–46.6 µg/mL	0.2745 µg/mL	۴۲
PVC-ISEa (ATR-(TPB)2)	0.09–5586 µg/mL	0.0560 µg/mL	۴۸
Modified carbon paste electrode (NF@Ch-mCPE)	0.1-100.0 nM or 0.00005-0.05 µg/mL	0.035 nM or 0.00002 µg/mL	This work

۵- مراجع

- [1] N. Abo El-Maali, *Bioelectrochemistry* **64** (2004) 99.
- [2] J. C. Abbar and S. T. Nandibewoor, *Colloid Surface B* **106** (2013) 158.
- [3] B. Uslu and S. A. Ozkan, *Anal. Lett.* **44** (2011) 2644.
- [4] M. Kalate Bojdi, M. Behbahani, M. H. Mashhadizadeh, A. Bagheri, S. S. Hosseiny Davarani, and A. Farahani, *Mater. Sci. Eng. C* **48** (2015) 213.
- [5] M. K. Bojdi, M. Behbahani, G. Hesam, and M. H. Mashhadizadeh, *RSC Adv.* **6** (2016) 32374.
- [6] M. Behbahani, M. Barati, M. K. Bojdi, A. R. Pournali, A. Bagheri, and N. A. G. Tapeh, *Microchim. Acta* **180** (2013) 1117.
- [7] M. K. Bojdi, M. Behbahani, A. Sahragard, B. G. Amin, A. Fakhari, and A. Bagheri, *Electrochim. Acta* **149** (2014) 108.

- [8] M. K. Bojdi, M. H. Mashhadizadeh, M. Behbahani, A. Farahani, S. S. H. Davarani, and A. Bagheri, *Electrochim. Acta* **136** (2014) 59.
- [9] K. Asadpour-Zeynali, K. Bigdeloo, *Applied chem.* **1399** (2020) 68.
- [10] A. Mohammadian, M. Ebrahimi, *Applied chem.* **15** (2020) 289.
- [11] M. Abbasghorbani, *Applied chem.* **14** (2019) 77.
- [12] M.A. Garza, E.A. Wason, J.Q. Zhang, *World J Cardiol.* **7**(2) (2015) 52.
- [13] H. C. McGill, C. A. McMahan, E. E. Herderick, G. T. Malcom, R. E. Tracy, and J. P. Strong, *Am. J. Clin. Nutr.* **72** (2018) 1307s.
- [14] R. Bonow, D. Zipes, and P. Libby, Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine., (2015) vol. 9th Edition.
- [15] E. Dayakar, C. S. Sree, and E. Sanjay, *Int. J. Adv. Med.* **6** (2019) 786.
- [16] P. D. Thompson, P. Clarkson, and R. H. Karas, *J. Am. Med. Assoc.* **289** (2003) 1681.
- [17] S. O. El-Ganainy, A. El-Mallah, D. Abdallah, M. M. Khattab, A. S. El-Khatib, and M. M. Mohy El-Din, *Toxicol. Lett.* **305** (2019) 58.
- [18] A. Bielska and P. Glusko, *Polish Arch. Intern. Med.* **117** (2018) 420.
- [19] K. Egashira, Y. Hirooka, H. Kai, M. Sugimachi, S. Suzuki, T. Inou, A. Takeshita, *Circulation* **89** (1994) 2519.
- [20] C.B. Treasure, J.L. Klein, W.S. Weintraub, J.D. Talley, M.E. Stillabower, A.S. Kosinski, J. Zhang, S.J. Boccuzzi, J.C. Cedarholm, R.W. Alexander, N. Engl. J. Med. **332** (1995) 481.
- [21] T. J. Anderson, I. T. Meredith, A. C. Yeung, B. Frei, A. P. Selwyn, and P. Ganz, *N. Engl. J. Med.* **332** (1995) 488.
- [22] I. Pinal-Fernandez, M. Casal-Dominguez, and A. L. Mammen, *Med. Clin. (Barc).* **150** (2018) 398.
- [23] Goodman and Gilman's, "The Pharmacological Basis of Therapeutics." (2011) 893.
- [24] P. Kolly and J.F. Dufour, *Diagnostics* **6** (2016) 22.
- [25] Y. Sumida, Y. Seko, and M. Yoneda, *Hepato Res.* **47** (2017) 266.
- [26] C.C. Giallourakis, P.M. Rosenberg, L.S. Friedman, *Clin Liver Dis.* **6** (2002) 947.
- [27] A. Forner, M. Reig, and J. Bruix, *Lancet* **391** (2018) 1301.
- [28] S. O. El-Ganainy, A. El-Mallah, D. Abdallah, M. M. Khattab, A. S. El-Khatib, and M. M. Mohy El-Din, *Toxicol. Lett.* **305** (2019) 58.
- [29] H. B. El-Serag, H. Hampel, F. Javadi, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4** (2006) 369.
- [30] C. J. Vaughan, A. M. Gotto, and C. T. Basson, *J. Am. Coll. Cardiol.* **35** (2000) 1.
- [31] G.M. Kostner, D. Gavish, B. Leopold, K. Bolzano, M.S. Weintraub, J.L. Breslow, *Circulation* **80** (1989) 1313.
- [32] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, *Lancet* **344** (1994) 1383.

- [33] B. Pitt, G. B. J. Mancini, S. G. Ellis, H. S. Rosman, J. S. Park, and M. E. Mcgovern, *J. Am. Coll. Cardiol.* **26** (1995) 1133.
- [34] P. S. Woscops, *Circulation* **97** (1998) 1440.
- [35] B. Zamani, B. Babapour, H. Doustkami, and M. Mousavi, *Int. J. Res. Med. Sci.* **4** (2016) 3895.
- [36] T. G. Altuntas, N. Erk, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **27**(2004) 83.
- [37] H. Farahani, P. Norouzi, A. Beheshti, H. Sobhi, R. Dinarvand, M.R. Ganjali, *Talanta* **80** (2009) 1001.
- [38] Y. Z. Baghdady, M.A. Al-Ghobashy, A.A.E. Abdel-Aleem, S.A. Weshahy, *J. Adv. Res.* **4** (2013) 51.
- [39] S.R. Polagani, N.R. Pilli, R. Gajula, V. Gandu, *J. Pharm. Anal.* **3** (2013) 9.
- [40] M. Hermann, H. Christensen, J. L.E. Reubsæet, *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005) 1242.
- [41] M.M. AlShehri, *Saudi Pharm J.* **20** (2012) 143.
- [42] B. Dogan-Topal, B. Uslu, S.A. Ozkan, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **10** (2007) 571.
- [43] A. Homayonfard; M. Miralinaghi; R. Haji Seyed Mohammad Shirazi; E. Moniri, *Water Sci Technol* **78** (11) (2018) 2297.
- [44] U. S. Devarushi, N. P. Shetti, M. B. Reddy, and S. M. Tuwar, *AIP Conf. Proc.* **1989** (2018) 1.
- [45] D. Plausinaitis, A. Pulmanas, V. Kubilius, R. Raudonis, and V. Daujotis, *Electrochim. Acta* **121** (2014) 278.
- [46] S. F. Rassi, *Anal. Chem. Res.* **12** (2017) 65.
- [47] O. Fazlolahzadeh, A. Rouhollahi, M. Hadi, *Anal. Bioanal. Electrochem.* **8** (2016) 566.
- [48] A.L. Saber, *Electroanalysis* **25** (2013) 2707.