

تعیین داروی سلوکسیب با استفاده از روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی جفت شده با اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی در نمونه‌های شیر، ادرار و آب

محبوبه مسرورنیا*، غفران عبود

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۱ تاریخ تصحیح: ۰۰/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۳/۱۱

چکیده

یک روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی (D μ SPE)، آسان و ارزان جفت شده با اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی برای اندازه‌گیری سلوکسیب در نمونه‌های بیولوژیکی و آب توسعه داده شد. برای این منظور، جاذب جدید نانوذرات نیکل دوپ شده در گرافن اکسید کربوکسیل دار با استفاده از یک روش شیمیایی ساده سنتز و برای استخراج سلوکسیب از آن استفاده شد. عوامل موثر در استخراج با روش طراحی آزمایش ارزیابی و بهینه‌سازی شدند. دو طرح، شامل طرح Plackett-Burman و Box-Behnken، به ترتیب برای غربالگری و بهینه‌سازی عوامل موثر مورد استفاده قرار گرفتند. این روش در محدوده غلظت ۰،۰۰۴ - ۳،۵ میکروگرم بر میلی لیتر با $R^2 = 0.9951$ برای اندازه‌گیری سلوکسیب در شرایط بهینه خطی بود. حد کمی روش ۰،۰۰۴ میکروگرم بر میلی لیتر و فاکتور غنی‌سازی ۲۱،۷ بود. انحراف استاندارد نسبی برای پنج اندازه‌گیری محلول استاندارد سلوکسیب با غلظت ۰،۳ میکروگرم بر میلی لیتر ۲،۳٪ محاسبه شد. این روش برای اندازه‌گیری سلوکسیب در نمونه‌های واقعی با بازیافت در محدوده ۹۰،۳ - ۹۶،۸٪ و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۵،۱ بسیار مناسب است. از مزایای مهم این روش می‌توان به سادگی و صرفه اقتصادی، مصرف کم حلال و جاذب و عدم نیاز به ابزار پیچیده و گران قیمت اشاره کرد.

کلمات کلیدی: سلوکسیب، میکرو استخراج فاز جامد پخشی، روش اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی، نمونه شیر، نمونه ادرار، طراحی آزمایش.

۱ - مقدمه

داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی (NSAID) دسته مهمی از داروها هستند که به طور گسترده‌ای در درمان التهاب، درد و تب در انسان استفاده می‌شود [۱]. سلوکسیب یک داروی NSAID است که با مهار تبدیل اسید آراشیدونیک به پیش سازهای پروستاگلاندین اثرات ضد التهابی ایجاد می‌کند [۲]. سلوکسیب به طور عمده توسط سیتوکروم P450 2C9 در کبد متابولیزه می‌شود و از طریق مدفوع و ادرار دفع می‌شود [۳]. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مهم‌ترین روش برای اندازه‌گیری این دارو در نمونه‌های واقعی مانند ادرار و پلاسما است [۴-۷]. اما به دلیل اثرات ماتریکس بالا و وجود گونه‌های مزاحم و غلظت کم دارو در نمونه‌های واقعی حتی در این روش نیازمند استفاده از شیوه‌های پیش تغلیظ و آماده‌سازی نمونه می‌باشیم. از طرفی به علت

هزینه بالای روش‌های کروماتوگرافی، تمایل زیادی به ارائه روش‌های جدید با هزینه کمتر و سادگی بیشتر برای اندازه‌گیری این دارو وجود دارد.

روش اسپکتروفتومتری یک روش ساده، ارزان و نسبتاً حساس برای تعیین انواع آنالیت در یک محلول نمونه است [۸-۹]. از معایب مهم این روش می‌توان به انتخاب‌پذیری کم و حد تشخیص بالا، به ویژه در محلول‌های نمونه با ماتریس‌های پیچیده اشاره کرد که استفاده از این روش را محدود می‌کند [۱۰]. بنابراین، یک روش آماده‌سازی نمونه قبل از تعیین آنالیت توسط اسپکتروفتومتری فرابنفش - مری برای کاهش اثرات ماتریس نمونه و پیش‌تغلیظ آنالیت ضروری است [۱۱-۱۲]. در میان آنها، میکرواستخراج فاز جامد پراکنده (D μ SPE) به طور گسترده‌ای به عنوان یک روش کارآمد آماده‌سازی نمونه برای استخراج و پیش‌تغلیظ آنالیت از نمونه واقعی استفاده شده است [۱۳]. در روش D μ SPE، یک جاذب مناسب در محلول نمونه حاوی آنالیت ریخته شده سپس سوسپانسیون برای مدت زمانی مناسب به یکی از روش‌های گردابی یا فراصوت هم‌زده می‌شود. جاذب حاوی آنالیت از محلول نمونه جدا شده و آنالیت با استفاده از روش واجذب حرارتی یا با حلال برای شناسایی کمی با دستگاه از سطح جاذب واجذب می‌شود [۱۴]. در این تحقیق از روش واجذب با حلال برای ارائه نمونه به دستگاه اسپکتروفتومتر برای تجزیه و تحلیل استفاده شده است. از مهمترین مزایای این روش می‌توان به سادگی، مقدار کم نمونه و مصرف کم جاذب، فاکتور تغلیظ خوب، مصرف کم حلال واجذب (در واجذب حلال) و زمان مناسب استخراج اشاره کرد [۱۵].

در روش D μ SPE، پارامتر مهم برای استخراج موفق آنالیت، نوع و ساختار شیمیایی جاذب است. به عبارت دیگر، انتخاب یا سنتز جاذب می‌تواند با ایجاد فعل و انفعالات مناسب با آنالیت (فرآیند جذب شیمیایی) یا نفوذ آنالیت به داخل منافذ جاذب با اندازه و شکل مناسب (فرآیند جذب فیزیکی) نقش اساسی در فرآیند استخراج داشته باشد [۱۶]. گرافن اکسید (GO) به عنوان یک نانوماده به دلیل خواص و ساختار منحصر به فرد در بسیاری از صنایع مورد استفاده قرار گرفته است [۱۷]. گرافن اکسید از ورق‌های کربن تشکیل شده است که در آن برخی از اتم‌های کربن دارای گروه‌های عاملی هیدروکسیل، کربوکسیل و کربونیل هستند [۱۸]. نسبت بالای سطح به حجم GO و وجود گروه‌های عاملی مناسب بر روی سطح آن باعث می‌شود GO به عنوان جاذب برای استخراج آنالیت‌های قطبی دارای خواص بسیار مناسبی باشد [۱۹-۲۰]. یک آنالیت قطبی می‌تواند از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی یا فعل و انفعالات واندروالس با گروه‌های عملکردی GO اندرکنش داشته باشد. وجود الکترون‌های π در حلقه بنزن در ورق‌های GO همچنین می‌تواند در فعل و انفعالات واندروالس با آنالیت‌ها نقش داشته باشد [۲۱]. با این حال، یک محدودیت GO میزان انتخابگری کم ماده است که باعث استخراج گونه‌های مختلف در محلول نمونه می‌شود. یک روش ساده برای غلبه بر این محدودیت، عاملدار کردن سطوح GO با گروه‌های عاملی مناسب است که می‌تواند انتخابگری آن را افزایش دهد [۲۲-۲۳]. پیشرفت دیگر در روش D μ SPE استفاده از جاذب‌های مغناطیسی است که جداسازی آن را از محلول نمونه در حضور آهنربا ساده می‌کند. برای تهیه جاذب

مغناطیسی از نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 استفاده شد [۲۴-۲۵]. محدودیت اصلی این ترکیب عدم ثبات آن و امکان تعامل غیر انتخابی با گونه‌ها در محلول نمونه به دلیل وجود اتم‌های اکسیژن در ساختار نانوذره است [۲۶].

در این مطالعه، یک میکرواستخراج فاز جامد پخشی با استفاده از جاذب مغناطیسی برای استخراج سلوکوسیپ از نمونه‌های بیولوژیکی و آب توسعه یافته است. ساختار شیمیایی سلوکوسیپ در فایل تکمیلی الکترونیکی (شکل S1) ارائه شده است. نانوذرات نیکل دوپ شده در گرافن اکسید عاملدار را به عنوان جاذب مغناطیسی برای روش $D\mu SPE$ سنتز شد. در این مطالعه از گرافن اکسید به عنوان ماده‌ای جاذب با سطح بسیار زیاد و ظرفیت جذب بالا استفاده گردید که برای افزایش انتخاب‌گری آن نسبت به داروی سلوکوسیپ با گروه کربوکسیل عامل‌دار شد. از نانوذرات نیکل ($Ni NPs$) برای ایجاد خواص مغناطیسی در جاذب استفاده شد. این نانوذره باعث رفع محدودیت انتخابی کم نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 می‌شود سطح $Ni NPs$ فاقد گروه‌های عاملی برای تعامل با آنالیت‌ها است.

عوامل مؤثر در روش استخراج با استفاده از روش طراحی آزمایش بررسی و بهینه‌سازی شدند. در این مطالعه از نرم افزار مینی تپ ۱۷ استفاده شد که یک نرم افزار آماری با کاربرد ساده برای طراحی آزمایش می‌باشد.

توانایی روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری آنالیت هدف با آزمایش سه نمونه واقعی مانند شیر، ادرار و نمونه‌های آب لوله کشی مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان می‌دهد که این روش برای اندازه‌گیری سلوکوسیپ در نمونه‌های واقعی بسیار مناسب است. همچنین، استفاده از روش $D\mu SPE$ به عنوان یک روش آماده‌سازی نمونه قبل از اندازه‌گیری نمونه‌های واقعی با روش اسپکتروفتومتری می‌تواند محدودیت‌های ذاتی روش اسپکتروفتومتری مانند انتخاب‌پذیری کم و حد تشخیص بالای آن را کاهش دهد.

۲- تجزیه

۲-۱- مواد و شناساگرها

سلوکوسیپ از شرکت مهر دارو (تهران، ایران) با درجه خلوص دارویی به دست آمد. محلول استوک سلوکوسیپ با حل کردن مقدار مناسب سلوکوسیپ با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در متانول تهیه شد. این محلول سلوکوسیپ از نور محافظت شده در یخچال و در دمای کمتر از ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گرافن اکسید از شرکت تحقیقات نانومواد تحقیقات ایالات متحده (هوستون، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. از مواد دیگر برای سنتز جاذب مانند هیدروکسید سدیم، کلرو استات سدیم، هیدروکلریک اسید، نیکل (II) کلرید استفاده شد. هگزا هیدرات، مشتات هیدرات هیدرازین از مرک آلمان خریداری شد. تمام حلال‌ها، از جمله استون، متانول، اتانول، استونیتریل، که به عنوان حلال واجذب استفاده شد، با خلوص تجزیه‌ای و از مرک آلمان تهیه شد.

۲-۲- دستگاه اندازه گیری

در تمام محلول‌های نمونه، برای اندازه‌گیری انالیت از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش - مری (واریان Cary 50 Bio، استرالیا) شامل یک آشکارساز آرایه فوتودیود و یک میکروسول کوارتز با حجم ۷۰۰ میکرولیتر استفاده شد. برای تعیین طول موج جذبی ماکزیمم، یک محلول استاندارد سلکوکسیب با غلظت ۲۵,۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر اسکن شد و طول موج ماکزیمم ۲۵۶,۰ نانومتر برای مطالعات بعدی انتخاب شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM؛ میرا ۳ تسکان؛ جمهوری چک) و طیف سنجی مادون قرمز انتقال فوریه (Thermo Nicolet AVATAR، FT-IR، ایالات متحده آمریکا) برای مشخصات جذب آماده شده استفاده شد. pH محلول‌ها توسط pH متر Metrohm 691 تنظیم شد. برای سنتز جاذب، از دستگاه ماورای صوت Hiescher (۱۰۰ وات، ۳۰ کیلوهرتز) استفاده شد.

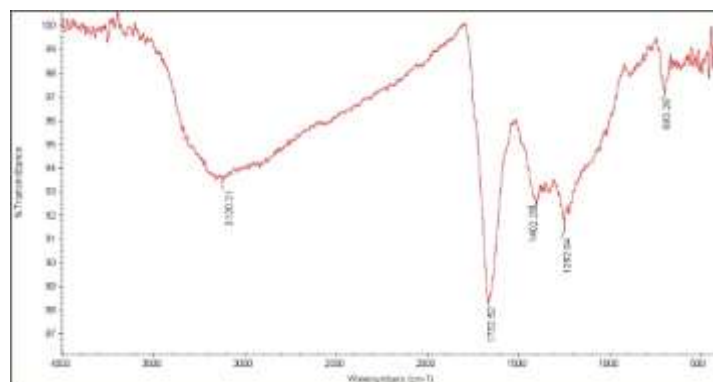
۲-۳- مراحل سنتز جاذب

جهت سنتز جاذب ابتدا گرافن اکسید (۵,۰ گرم) در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه پراکنده شد. هیدروکسید سدیم (۵/۰ گرم) و کلرواستات سدیم (۵/۰ گرم) درون سوسپانسیون ریخته و مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با امواج فراصوت همزده شد. سپس سوسپانسیون با محلول آبی هیدروکلریک اسید (۰,۱ مول در لیتر) خنثی شد. رسوب حاصل (گرافن اکسید کربوکسیل، GO-COOH) با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد و سه بار با آب مقطر (۵,۰ میلی لیتر) شسته شد. GO-COOH سرانجام در آون خلا با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شد. در مرحله بعدی، (۱,۰ گرم GO-COOH) و (۱,۰ گرم NiCl_2) در ۱۰۰,۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با امواج فراصوت همزده شد. ۱۰,۰ میلی لیتر هیدرات هیدرازین (۸۰٪ در آب) به صورت قطره‌ای به مدت ۲۰ دقیقه به سوسپانسیون اضافه شد و سپس pH سوسپانسیون با افزودن محلول هیدروکسید سدیم (۲,۰ مول بر لیتر) به حدود ۱۳ افزایش یافت. سوسپانسیون حاصل در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت حدود ۴۰ دقیقه گرم شد تا اینکه گاز نیتروژن آزاد شد. سوسپانسیون برای تکمیل واکنش در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ دقیقه تحت رفلکس قرار گرفت. رسوب حاصل (Ni @ GO-COOH) توسط آهنربا نتودیمیم جدا شد و چندین بار با آب مقطر شستشو شد. جاذب (Ni @ GO-COOH) سرانجام در آون خلا با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. شماتیک واکنش‌های انجام شده برای تهیه جاذب (شکل S2) نشان داده شده است.

۲-۴- مشخصه‌یابی جاذب سنتز شده

خصوصیات Ni @ GO-COOH طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه برای مطالعه گروه‌های عاملی در جاذب استفاده شد. تصویر FTIR از جاذب در شکل ۱ ارائه شده است. یک پیک قوی و پهن در حدود 3120 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های

عاملی هیدروکسیل در GO-COOH است. این قله بسیار پهن به دلیل تشکیل پیوند هیدروژن است. پیک ارتعاش دیگر در ۱۷۳۲ cm^{-1} مربوط به $\text{C}=\text{O}$ در گروه عاملی کربوکسیل در جاذب است. این پیک بسیار قوی است و تأیید می‌کند که تعداد گروه‌های عاملی کربونیل در گرافن اکسید بسیار زیاد می‌باشد. پیک‌های 1402cm^{-1} و 1252 به ترتیب به ارتعاش H-O و C-O در گروه عاملی کربوکسیل در جاذب نسبت داده می‌شوند. سرانجام، یک پیک ارتعاش در 693cm^{-1} مربوط به حضور نانوذرات نیکل (Ni doped GO-COOH) در ساختار جاذب است که باعث خاصیت مغناطیسی جاذب می‌شود.

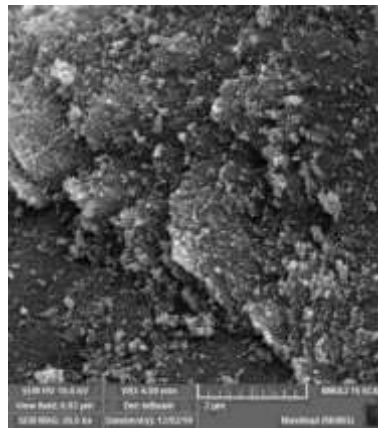


شکل ۱- تصویر FTIR از Ni @ GO-COOH

برای ارزیابی مورفولوژی سطح جاذب از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. تصویر SEM به دست آمده در جاذب در شکل ۲ ارائه شده است. این تصویر نشان داد که نانوذرات Ni در سطح جاذب پراکنده شده‌اند. با این حال، این پراکندگی نانو ذرات Ni کاملاً یکنواخت نیست و تراکم این نانوذرات در بعضی از قسمت‌های سطح جاذب بیشتر است. این ممکن است به دلیل روش سنتز مورد استفاده برای تهیه جاذب باشد. علاوه بر این، سطح جاذب برای استخراج آنالیز با منافذ زیادی پوشانده شده است. این منافذ می‌توان به نفوذ آنالیت به درون آنها (فرآیند فیزیکی جذب) و استخراج سلوکوسیپ کمک کند. اندازه متوسط Ni NPs در سطح جاذب کمتر از ۱۰۰ نانومتر برآورد شد.

۲-۵- روش میکرواستخراج

برای انجام میکرواستخراج فاز جامد پراکنده، ۱۰ میلی گرم جاذب نانوکامپوزیت‌های (Ni @ GO-COOH) در آب مقطر (۱,۰ میلی‌لیتر) ریخته و به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق فراصوت شد. سوسپانسیون بدست آمده کاملاً به داخل سرنگ (۵ میلی‌لیتر) کشیده شد. محلول نمونه حاوی سلوکوسیپ (۱۰,۰ میلی‌لیتر) در یک ویال پروپیلن مناسب ریخته و pH آن با استفاده از محلول آبی هیدروکلریک اسید (۰,۱ مول در لیتر) یا هیدروکسید سدیم (۰,۱ مول در لیتر) به ۷,۰ تنظیم شد.



شکل ۲- تصویر SEM جاذب (Ni @ GO-COOH)

سوسپانسیون موجود در سرنگ به محلول نمونه تزریق و به مدت ۵ دقیقه و ۵۰ ثانیه در دمای اتاق فراصوت شد. سپس جاذب توسط یک آهنربا نئودیمیم از محلول نمونه جدا شده و محلول مایع رویی تخلیه شد. برای واجذب آنالیت از سطح جاذب، ۰/۷ میلی‌لیتر از محلول حاوی استونیتریل و متانول با نسبت (V/V) ۵۰:۵۰ به جاذب اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ ثانیه فراصوت شد. حلال واجب با استفاده از آهنربا نئودیمیم جدا شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis با طول موج ۲۵۶,۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۳- نتایج و بحث

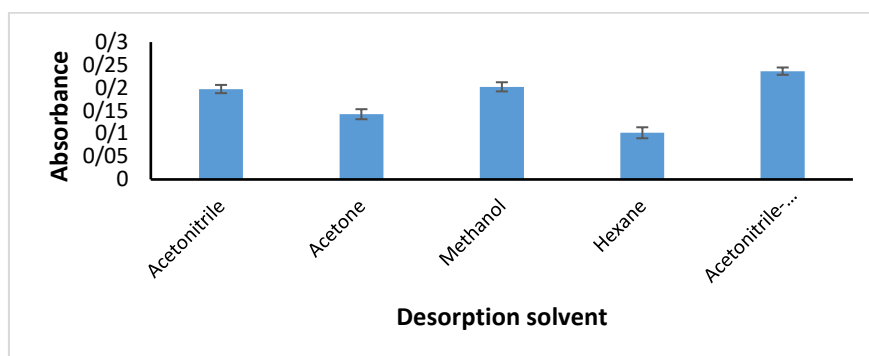
۳-۱- بهینه‌سازی روش استخراج فاز جامد میکروپخشی

بهینه‌سازی روش استخراج فاز جامد میکرو پخشی (D μ SPE) به عنوان یک روش آماده‌سازی نمونه برای استخراج سلکوکسیب توسط پارامترهای مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بنابراین، این پارامترها باید ارزیابی و بهینه شوند تا بهترین درصد بازیابی نسبی حاصل شود. در این مطالعه، چندین عامل از جمله pH، حجم محلول نمونه، مقدار جاذب، زمان استخراج، زمان واجذب، زمان پراکندگی، نوع و حجم حلال واجذب و مقدار نمک افزودنی بررسی و بهینه‌سازی شد. نوع حلال واجذب با یک فاکتور در یک زمان بهینه سازی شد زیرا این فاکتور یک فاکتور کیفی در طراحی روش آزمایش است و تعداد آزمایشات ارائه شده در طرح را به طرز چشمگیری افزایش می‌دهد. سایر عوامل با استفاده از روش طراحی آزمایش بهینه‌سازی شدند. در مرحله اول، از یک طرح غربالگری بر اساس طرح پلاکت - بورمن (Plackett-Burman) برای تعیین عوامل با تأثیر قابل توجه در روش میکرو استخراج استفاده شد. در مرحله دوم، فاکتورهای مهم با استفاده از طرح (Box-Behnken) باکس - بهنکن بهینه‌سازی شدند.

۳-۱-۱- نوع حلال واجذب

حلال واجذب در روش D μ SPE، برای واجذب آنالیت استخراج شده روی جاذب باید بکار گرفته شود تا غلظت آنالیت با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شود. بنابراین، نوع حلال واجذب از طریق انجام تعامل مناسب با آنالیت، تأثیر زیادی بر فرایند واجذب دارد.

چندین حلال، از جمله متانول، استونیتریل، استون، هگزان و یک مخلوط دوتایی حاوی متانول و استونیتریل (۵۰V/V) به عنوان حلال واجذب مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳- اثر نوع حلال واجذب بر تعیین سلوکسیب

این نتایج نشان داد که بازده استخراج سلوکسیب با مخلوط دو حلال (متانول-استونیتریل) بالاترین است. گروه هیدروکسیل متانول در حلال دوتایی می‌تواند از طریق تشکیل یک پیوند هیدروژن به خوبی با گروه آمین موجود در سلوکسیب تعامل می‌کند. از طرف دیگر، استونیتریل با قطبیت مناسب می‌تواند با ایجاد یک فعل و انفعالات قطبی - π با الکترون‌های π (الکترون‌های غیر مستقر) موجود در حلقه بنزن در آنالیت تعامل داشته باشد. بنابراین، هر دو برهم کنش متانول و استونیتریل در حلال دوتایی با آنالیت منجر به بالاترین بازده استخراج سلوکسیب می‌شود. هگزان به دلیل کمترین قطبیت و اثر متقابل با آنالیت، کمترین بازده استخراج را دارد. بنابراین، حلال دوتایی (متانول-استونیتریل) به عنوان حلال واجذب برای مطالعه بعدی انتخاب شد.

۳-۱-۲- طرح Plackett-Burman

برای اینکه تعداد آزمایش‌ها در غربالگری فاکتورهای با اهمیت در استخراج سلوکسیب کاهش یابد، از طرح-Plackett-Burman برای ارزیابی هشت عامل استفاده شد. این طرح شامل دوازده اجرا در یک بلوک بدون هیچ نقطه مرکزی بود. این طرح به طور تصادفی برای از بین بردن اثر پارامترهای ناشناخته و غیرقابل کنترل ایجاد شده است. فاکتورهای انتخاب شده و سطح آنها در جدول ۱ ارائه شده است.

همچنین، طرح و نمودارها در جدول ۲ نشان داده شده است. هر اجرا سه بار با شرایط یکسان انجام شد و میانگین سه بار اجرا به عنوان پاسخ ذکر شد. نتایج با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) در حد اطمینان ۹۵٪ بررسی شد. در این مطالعه، مقدار p می‌تواند برای تعیین یک عامل با اهمیت در استخراج سلوکسیب استفاده شود. هنگامی یک عامل تأثیر قابل ملاحظه در روش میکرو استخراج دارد که مقدار p عامل در جدول ANOVA در حد اطمینان ۹۵٪ از ۰/۰۵ کمتر (سطح α) است (جدول S1). یک نمایش گرافیکی ساده برای این مطالعه نمودار پارتو است که در آن اثرات هر عامل به صورت یک میله نشان داده شده است.

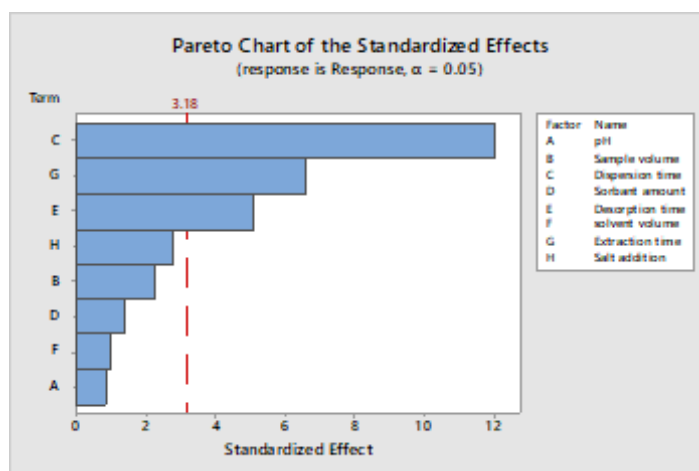
جدول ۱- فاکتورهای انتخاب شده و سطح آنها

Factor	Level		
	Low	Center	High
pH of sample solution	5	7	9
Sample solution volume (mL)	10	20	30
Dispersion time (min)	3	5	7
Extraction time (min)	2	4	6
Desorption time (min)	3	5	7
Desorption solvent volume (μ L)	500	600	700
Sorbent amount (mg)	10	15	20
Salt amount (%)	0	2.5	5

جدول ۲- پاسخ طرح و نمودارها

Run Order	pH	Sample volume	Dispersion time	Sorbent amount	Desorption time	solvent volume	Extraction time	Salt addition	Response
1	5	10	3	10	7	0.7	6	5	0.23435
2	5	10	3	10	3	0.5	2	0	0.18022
3	9	10	7	20	3	0.5	2	5	0.21918
4	9	10	7	10	3	0.7	6	0	0.27451
5	9	10	3	20	7	0.7	2	0	0.19063
6	5	30	3	20	3	0.7	2	5	0.14662
7	9	30	3	10	3	0.5	6	5	0.17368
8	5	30	7	10	7	0.5	2	0	0.25249
9	5	10	7	20	7	0.5	6	5	0.27509
10	9	30	7	10	7	0.7	2	5	0.24446
11	5	30	7	20	3	0.7	6	0	0.26261
12	9	30	3	20	7	0.5	6	0	0.22156

اثر عامل در پاسخ با افزایش طول میله آن افزایش می‌یابد. در این نمودار یک خط مرجع نیز وجود دارد که مقدار به تعداد عوامل انتخاب شده و سطح اطمینان بستگی دارد. بر اساس خط مرجع، هر عاملی هنگامی که طول میله آن از مقدار خط مرجع بیشتر باشد و میله از خط مرجع عبور کند، تأثیر مهمی در پاسخ دارد. نمودار پارتو در حد اطمینان ۹۵٪ برای استخراج سلوکوسیپ در شکل ۴ ارائه شده است.



شکل ۴- نمودار پارتو به دست آمده برای طرح Plackett-Burman

مقدار خط مرجع در حد اطمینان ۹۵٪ ($\alpha = 0/05$) برای هشت عامل ۳,۱۸ است. مطابق شکل ۴، سه عامل شامل: زمان پخش، زمان استخراج و زمان واجذب، تأثیر قابل توجهی در استخراج سلوکسیب دارند. این نتایج نشان می‌دهد که استخراج سلوکسیب بیشتر تحت تأثیر زمان است. به عبارت دیگر، استخراج آنالیت بیشتر تحت تأثیر سینتیک فرآیند استخراج است. علاوه بر این، زمان پخش مهمترین عاملی است که در پاسخ اثر دارد زیرا دارای بیشترین طول میله نمودار پارتو است. اندازه ذرات جاذب پخش شده در محلول نمونه با افزایش زمان پخش کاهش می‌یابد، که منجر به افزایش تعداد ذرات جاذب در محلول نمونه می‌شود. بنابراین، بازده استخراج سلوکسیب به دلیل افزایش تعداد ذرات جاذب در محلول نمونه و افزایش سطح بین جاذب و آنالیت افزایش می‌یابد [۲۷]. بنابراین، سه عامل، زمان استخراج، زمان واجذب و زمان پخش، برای مرحله بهینه‌سازی انتخاب شدند. عوامل دیگر تأثیر معنی داری بر پاسخ نداشتند و بنابراین در مقادیر خاصی ثابت شدند. فاکتورها، از جمله pH، حجم محلول نمونه، حجم حلال واجذب، مقدار جاذب و مقدار نمک به ترتیب برای مرحله بهینه‌سازی در ۷,۰، ۱۰ میلی لیتر، ۷۰۰ میکرولیتر، ۱۰ میلی گرم و ۰,۰٪ ثابت شدند. به نظر می‌رسد که حضور گروه‌های آمینی در سلوکسیب می‌تواند در محلول خنثی به خوبی با گروه کربوکسیل در سطح جاذب از طریق پیوند هیدروژنی اندرکنش ایجاد نماید. حضور این اندرکنش‌های و جذب فیزیکی سلوکسیب در حفرات و سطح گرافن اکسید می‌تواند به عنوان عامل اصلی استخراج این دارو مطرح گردد.

۳-۱-۳- طراحی باکس - بهنکن

طرح Box-Behnken طرحی راحت و پرکاربرد برای بهینه‌سازی عوامل است [۲۸-۳۰]. تعداد آزمایشات در این طرح کمتر از سایر طرح‌های مورد استفاده برای بهینه‌سازی مانند طراحی مرکب مرکزی است [۳۱-۳۳]. همچنین، نتایج بدست آمده در دو طرح معمولاً با هم تفاوت معنی داری ندارند [۳۲]. بنابراین، یک طرح Box-Behnken برای بهینه‌سازی سه عامل انتخاب شده از مرحله غربالگری ایجاد شد. این طرح شامل پانزده آزمایش (۱۲ اجرا و ۳ نقطه مرکزی) بود که به طور تصادفی برای حذف اثر پارامترهای غیرقابل کنترل و ناشناخته طراحی شده بودند. عوامل انتخاب شده، سطح آنها و طرح ایجاد شده در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- عوامل انتخاب شده، سطح آنها و طرح ایجاد شده

Factors (min)	Level		
	Low	Center	High
Extraction time	5	6	7
Dispersion time	6	7	8
Desorption time	6	7	8

Standard Order	Run Order	Dispersion time	Extraction time	Desorption time	Response
6	1	8	6	6	0.25436
4	2	8	7	7	0.22484
10	3	7	7	6	0.22335
12	4	7	7	8	0.24512
14	5	7	6	7	0.28209
2	6	8	5	7	0.22335
3	7	6	7	7	0.19174
9	8	7	5	6	0.26659
1	9	6	5	7	0.23706
8	10	8	6	8	0.24124
7	11	6	6	8	0.23617
15	12	7	6	7	0.28418
5	13	6	6	6	0.24631
13	14	7	6	7	0.28865
11	15	7	5	8	0.24362

برای ارزیابی عوامل و اندرکنش آنها در حد اطمینان ۹۵٪ از تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. نتایج بدست آمده برای ANOVA در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴- تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	0.009608	0.001068	60.14	0.000
Linear	3	0.001122	0.000374	21.07	0.003
Dispersion time	1	0.000132	0.000132	7.44	0.041
Extraction time	1	0.000915	0.000915	51.56	0.001
Desorption time	1	0.000075	0.000075	4.21	0.095
Square	3	0.007435	0.002478	139.63	0.000
Dispersion time*Dispersion time	1	0.004006	0.004006	225.68	0.000
Extraction time*Extraction time	1	0.003969	0.003969	223.62	0.000
Desorption time*Desorption time	1	0.000209	0.000209	11.75	0.019
2-Way Interaction	3	0.001050	0.000350	19.73	0.003
Dispersion time*Extraction time	1	0.000548	0.000548	30.86	0.003
Dispersion time*Desorption time	1	0.000002	0.000002	0.13	0.738
Extraction time*Desorption time	1	0.000500	0.000500	28.19	0.003
Error	5	0.000089	0.000018		
Lack-of-Fit	3	0.000066	0.000022	1.97	0.354
Pure Error	2	0.000022	0.000011		
Total	14	0.009697			

مدل ارائه شده با طرح معنی دار است زیرا مقدار p مدل کمتر از ۰/۰۵ (سطح α) و مقدار p عدم تناسب از ۰/۰۵ بیشتر است و این پارامتر تأثیر معنی داری ندارد. علاوه بر این، دو عامل از جمله زمان پراکندگی و زمان استخراج اثرات قابل توجهی بر استخراج سلوکوسیب دارند و زمان واجذب به دلیل مقادیر p آنها متغیرهای قابل توجهی نیستند. متغیرهای تعامل دو طرفه نیز در استخراج سلوکوسیب با مقدار p ۰,۰۰۳ (کمتر از ۰,۰۵ در حد اطمینان ۹۵٪) قابل توجه است. بر اساس مقدار p تعاملات، دو برهم کنش بین زمان استخراج با زمان واجذب و زمان پراکندگی تأثیر معنی داری بر استخراج سلوکوسیب دارند، در حالی که زمان برهم کنش پخش و زمان واجذب تأثیر قابل توجهی بر استخراج آنالیت ندارد (جدول ۴). یک معادله درجه دوم می‌تواند توسط مدل ارائه شود تا رابطه بین پاسخها با عوامل و تعاملات آنها را بیان کند. معادله بدست آمده در واحدهای بدون کد برای استخراج

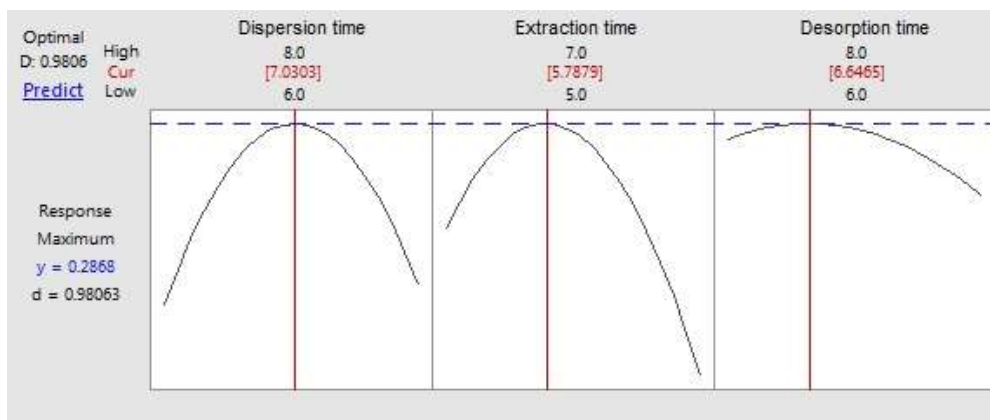
سلوکوسیپ به شرح معادله (۱) است.

$$\text{Response} = -1.896 + 0.4002 A + 0.2225 B + 0.0403 C - 0.03294 A*A - 0.03279 B*B - 0.00752 C*C + 0.01170 A*B - 0.00074 A*C + 0.01118 B*C \quad (1)$$

مقادیر R2 و R2 تنظیم شده برای مطابقت ارزیابی معادله با پاسخها استفاده شد. مقدار R2 و R2 تنظیم شده به ترتیب ۹۹,۰۸ و ۹۷,۴۴٪ است. این مقادیر نشان می‌دهد که معادله به خوبی با پاسخها مطابقت دارد و می‌تواند رابطه بین پاسخها با عوامل و تعامل آنها را بیان کند. علاوه بر این، مقدار R2 بالا پیش بینی شده (۰,۸۸,۵۴) در معادله نشان داد که معادله می‌تواند پاسخ مطالعات بعدی را پیش بینی کند. طبق معادله، زمان پخش مهم‌ترین متغیر با تأثیر مثبت به دلیل بالاترین ضریب در معادله است. علاوه بر این، همه عوامل تأثیرات مثبتی بر استخراج سلوکوسیپ دارند. در مقایسه با تعاملات دو طرفه، تعاملات بحرانی برای استخراج آنالیت با تأثیر مثبت بر پاسخ، برهم کنش بین زمان پراکندگی و زمان استخراج است (A * B).

به عبارت دیگر، با افزایش زمان پخش و زمان استخراج، تعداد ذرات جاذب بکار رفته برای استخراج آنالیت افزایش می‌یابد در نتیجه بازده استخراج آنالیت افزایش می‌یابد. با این حال، افزایش زمان استخراج به انتقال آنالیت از محلول نمونه به سطح جاذب کمک می‌کند تا فرآیند استخراج سلوکوسیپ انجام شود. بنابراین، افزایش همزمان زمان استخراج و زمان پخش منجر به افزایش بازده استخراج سلوکوسیپ می‌شود. همچنین، برهم کنش بین زمان استخراج و زمان واجذب (B * C) همان تأثیر برهم کنش A * B را دارد. تعامل دو طرفه دیگر بین زمان پخش و زمان واجذب دارای کمترین تأثیر منفی بر استخراج سلوکوسیپ است که علت آن کمترین و منفی بودن معادله است. طرح بهینه‌سازی برای تعیین مقادیر بهینه عوامل ترسیم شد. اثرات هر عامل بر روی واکنش در یک منحنی جداگانه در شکل ۵ نشان داده شده است.

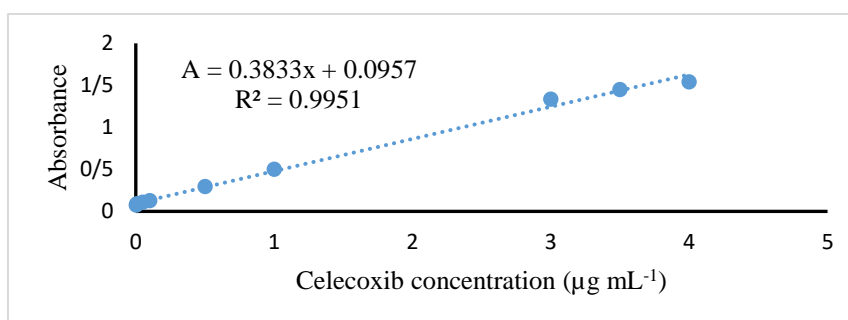
مطابق شکل ۵، مقادیر بهینه سه عامل شامل زمان پخش، زمان استخراج و زمان واجذب، به ترتیب تقریباً ۷، ۶ و ۶,۵ دقیقه مقادیر بهینه تمام فاکتورهای مورد استفاده برای استخراج سلوکوسیپ با روش DμSPE ارائه شده است.



شکل ۵- نمودار بهینه سازی به دست آمده برای استخراج سلوکوسیپ

۲-۳- معیارهای شایستگی روش

روش پیشنهادی بر اساس تعیین پارامترهای مختلف از جمله دامنه خطی، حد تشخیص، انحراف استاندارد نسبی و عامل غنی- سازی اعتبارسنجی شدند. منحنی کالیبراسیون برای تعیین میزان جذب محلول استاندارد سلوکسیب بعد از روش استخراج در مقابل غلظت سلوکسیب رسم شد. معادله خط و R^2 آن در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶- منحنی کالیبراسیون بدست آمده برای تعیین سلوکسیب.

روش در محدوده غلظت $0.004 - 3.5$ میکروگرم بر میلی لیتر با $R^2 = 0.9951$ خطی بود. حد تشخیص بر اساس اندازه گیری انحراف استاندارد محلول شاهد ($n = 5$) مطابق با معادله (۲) محاسبه شد:

$$LOD = 3Sb / m$$

(۲)

جایی که Sb و m به ترتیب انحراف معیار نمونه شاهد و شیب منحنی کالیبراسیون (حساسیت) به دست آمده برای اندازه گیری سلوکسیب هستند. حد تشخیص 0.012 میکروگرم در میلی لیتر و حد کمی برای تعیین سلوکسیب 0.004 میکروگرم در میلی لیتر بود. انحراف استاندارد نسبی برای ارزیابی تکرارپذیری و دقت روش پیشنهادی تعیین شد. انحراف استاندارد نسبی برای پنج بار اندازه گیری محلول استاندارد سلوکسیب با غلظت 0.3 میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد و 3.2% بود. ضریب غنی سازی با استفاده از معادله (۳) بدست آمده است:

$$F = Co / Caq$$

(۳)

جایی که Co و Caq به ترتیب غلظت سلوکسیب در محلول واجذب و غلظت سلوکسیب در محلول اولیه آبی نمونه هستند. ضریب غنی سازی برای سه بار اندازه گیری محلول سلوکسیب با غلظت 0.3 میکروگرم در میلی لیتر $21/7$ تعیین شد.

۳-۳- تجزیه نمونه حقیقی

کارایی روش میکرو استخراج برای اندازه گیری سلوکسیب در نمونه های واقعی مانند شیر گاو، ادرار و آب شیر ارزیابی شد (جدول ۵).

جدول ۵- روش میکرو استخراج برای اندازه گیری سلکوکسیب در نمونه‌های واقعی

Sample	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Milk	0.0	ND ¹	---	---
	0.03	0.027±0.001	90.3	5.1
	0.3	0.28±0.01	92.9	4.8
Urine	0.0	ND	---	---
	0.03	0.028±0.002	93.3	4.2
	0.3	0.29±0.01	95.4	4.1
Tap water	0.0	ND	---	---
	0.03	1.029±0.0	95.3	3.8
	0.3	0.29±0.01	96.8	3.5

نمونه‌های شیر از یک لبنیات فروشی در سطح شهر مشهد خریداری شده است. نمونه شیر را (۵۰ میلی لیتر) در یک ویال مناسب ریخته و ۱۰ میلی لیتر هیدروکلریک اسید ۶ مولار اضافه شد. سوسپانسیون سپس به مدت ۵ دقیقه و در دور ۲۰۰ دور تکان داده شد. رسوب حاصل با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و با یک کاغذ فیلترواتمن ۰,۴۵ میکرومتر فیلتر شد. سپس محلول در ویال شیشه ای در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای تجزیه ذخیره شد.

نمونه ادرار از یک مرد سالم ۳۲ ساله به دست آمد. وی طی دو هفته قبل از نمونه‌گیری هیچ دارویی مانند سلکوکسیب یا هم‌رده‌های آن را مصرف نکرده بود. نمونه ادرار به مدت ۸ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس نمونه از طریق کاغذ فیلتر واتمن ۰,۴۵ میکرومتر عبور داده شد. نمونه در یخچال و در دمای کمتر از ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌های آب شیر از مشهد، ایران به دست آمد. نمونه‌های آب شیر بدون هیچ‌گونه آماده‌سازی استفاده شد.

۳-۴- مقایسه روش با روشهای دیگر

ما روش پیشنهادی را با چندین روش کروماتوگرافی از جمله HPLC با آشکارسازهای مختلف مقایسه کردیم. برای این منظور، پارامترهای مختلفی از جمله نوع نمونه حقیقی، دامنه خطی، RSD، بازبایی انتخاب و مقایسه شدند. نتایج در جدول ۶ نشان داده شده است و نشان می‌دهد که محدوده خطی روش پیشنهادی تفاوت معناداری با روش کروماتوگرافی ندارد. بنابراین می‌توان از این روش برای اندازه‌گیری سلکوکسیب در نمونه‌های واقعی استفاده کرد. علاوه بر این، روش ارائه شده RSD و بازبایی مناسب در مقایسه با روش‌های کروماتوگرافی دارد. این نتایج تأیید کرد که استفاده از روش میکرو استخراج به عنوان یک روش آماده‌سازی نمونه قبل از تعیین آنالیت با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی می‌تواند انتخاب‌پذیری کم و حد تشخیص بالا را اصلاح کند، به ویژه در محلول‌های نمونه با ماتریس‌های پیچیده علاوه بر این، استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری به جای روش‌های کروماتوگرافی می‌تواند باعث کاهش مصرف حلال‌های آلی گران قیمت و هزینه‌های تجزیه شود.

جدول ۶- بازیابی انتخاب و مقایسه روش پیشنهادی با چندین روش کروماتوگرافی

Date	Method	Sample	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD%	Recovery%	Ref.
2011	HPLC-UV	Skin samples	5.0-50.0	≤ 8.0	≥ 95.0	[34]
2012	HPLC-MS/MS	Plasma	0.007-18	≤ 4	---	[35]
2016	SPE-HPLC	Urine- Serum	0.00176-60	≤ 10.7	96	[36]
2016	MISPE-HPLC ¹	Plasma	0.0002-2	≤ 10	96	[37]
2017	MISPE-HPLC	Urine	0.05-100	1.12	96	[38]
2019	LLE- HPLC	plasma	0.01-2	≤ 4.06	98.6-111	[4]
This work	D μ SPE- Spc ³	Milk, urine, and water	0.004-3.5	3.2	90.3-96.8	---

¹Molecular imprinted nanoparticles- Solid Phase Extraction; ²Molecularly imprinted polymer-Solid Phase Extraction,

³Dispersive micro Solid Phase Extraction-Spectrophotometric method

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، یک روش میکرو استخراج فاز جامد پراکنده ساده و حساس همراه با اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی برای استخراج و تعیین سلوکوسیب در نمونه‌های بیولوژیکی شیر و آب ارائه شد. میکرو استخراج فاز جامد پراکنده به عنوان یک روش آماده‌سازی نمونه برای کاهش اثر ماتریس و حد تشخیص اندازه‌گیری آنالیت استفاده شد. برای این منظور، نانوذرات نیکل گرافن اکسید کربوکسیل گرافن را به عنوان جاذب تهیه کرده و برای استخراج سلوکوسیب استفاده می‌شود. اثرات مختلف بر استخراج آنالیت با استفاده از روش طراحی آزمایش بررسی و بهینه سازی شد. در شرایط مطلوب، این روش دارای دامنه خطی گسترده، حد تشخیص و انحراف استاندارد نسبی مناسب با ضریب غنی‌سازی بالا است. توانایی این روش برای تجزیه نمونه‌های حقیقی مانند شیر، ادرار و نمونه‌های آب لوله‌کشی مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داد که این روش می‌تواند برای تعیین سلوکوسیب از نمونه‌های مورد آزمون با بازیابی نسبی خوب و یک انحراف استاندارد نسبی مناسب استفاده شود. از مزایای مهم این روش می‌توان به سادگی و ارزانی روش، مصرف کم حلال و جاذب بدون نیاز به ابزار پیچیده و گران قیمت اشاره کرد.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، برای حمایت از این تحقیق تقدیر می‌کنند.

۶- مراجع

- [1] S. Wongrakpanich, A. Wongrakpanich, K. Melhado, *Aging Dis.* **9** (2018) 143.
- [2] A. Aghazadeh-Habashi, W. Asghar, F. Jamali., *Journal of pharmaceutical sciences, J. Pharm. Sci.* **107** (2018) 756.
- [3] L. Gong, C.F. Thorn, M.M. Bertagnolli, T. Grosser, R.B. Altman, T.E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics*, **22** (2012) 310.
- [4] D.-G. Han, J. Kwak, S.-W. Seo, J.-M. Kim, J.-W. Yoo, Y. Jung, Y.-H. Lee, M.-S. Kim, Y.-S. Jung, H. Yun, *Pharmaceutics*, **11** (2019) 382.
- [5] S. Ansari, *Anal. Methods*, **9** (2017) 3200.
- [6] M. Attimarad, K.N. Venugopala, N. SreeHarsha, B.E. Aldhubiab, A.B. Nair, *Microchem. J.* **152** (2020) 104365.
- [7] M.A. Abdel Hamid, M.M. Mabrouk, M.A. Michael, *J. Sep. Sci.* **43** (2020) 3197.
- [8] K. Attia, M. Nassar, A. El-Olemy, S. Ramzy, *J. Adv. Pharm. Res.* **2** (2018) 133.
- [9] A. Ashour, M.A. Hegazy, M. Abdel-Kawy, M.B. ElZeiny, *J. Saudi Chem. Soc.* **19** (2015) 186-.
- [10] N.S. Abdullah, M.A. Hassan, R.O. Hassan, *Arab. J. Chem.* **10** (2017) S3426.
- [11] N. Khoddami, F. Shemirani, *Talanta*, **146** (2016) 244.
- [12] A. Asfaram, M. Ghaedi, K. Dashtian, *Ultrason. Sonochem.* **34** (2017) 640.
- [13] S. Hamidi, A. Azami, E.M. Aghdam, *Clinica Chimica Acta*, **488** (2019) 179.
- [14] S. Chen, J. Yan, J. Li, D. Lu, *Microchem. J.* **147** (2019) 232.
- [15] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, *TrAC Trends Anal. Chem.* **112** (2019) 226.
- [16] M. Ghorbani, M. Aghamohammadhassan, H. Ghorbani, A. Zabihi, *Microchem. J.* **158** (2020) 105250.
- [17] H. Ahmad, M. Fan, D. Hui, *Compos. B: Eng.* **145** (2018) 270.
- [18] W. Yu, L. Sisi, Y. Haiyan, L. Jie, *RSC Adv.* **10** (2020) 15328.
- [19] M. Bahmaie, L. Abbasi, M. Faraji, *J. of Applied Chemistry*, **26** (1392) 29, In Persion. doi.org/10.22075/chem.2017.633
- [20] M. Ghorbani, O. Seyedin, M. Aghamohammadhassan., *J. Environ. Manage.* **254** (2020) 109814.
- [21] R. Mirzajani, S. Karami, *J. of Applied Chemistry*, **58** (1400) 47, In Persion.
- [22] A. Azzouz, S.K. Kailasa, S.S. Lee, A.J. Rascón, E. Ballesteros, M. Zhang, K.-H. Kim, *TrAC Trends Anal. Chem.* **108** (2018) 347.
- [23] J.Y. Lim, N. Mubarak, E. Abdullah, S. Nizamuddin, M. Khalid, *J. Ind. Eng. Chem.* **66** (2018) 29.
- [24] W.-T. Li, W. Shi, Z.-J. Hu, T. Yang, M.-L. Chen, B. Zhao, J.-H. Wang, *Appl. Surf. Sci.* (2020) 147254.
- [25] M. Hemmati, M. Rajabi, A. Asghari., *Microchim. Acta.* **185** (2018) 160.
- [26] A. Ismailzadeh, M. Masrournia, Z. Es'haghi, M.R. Bozorgmehr, *Chem. Papers.* **74** (2020) 2929.

- [27] N. Nazari, M. Masrournia, Z. Es' hagh, M. Bozorgmehr, *J. Sep. Sci.* **39** (2016) 3046.
- [28] A.-T. Mohammad, A.S. Abdulhameed, A.H. Jawad. B, *Int. J. Biol. Macromol.* **129** (2019) 98.
- [29] H. Barabadi, S. Honary, P. Ebrahimi, A. Alizadeh, F. Naghibi, M. Saravanan, *Inorg. Nano-Met. Chem.* **49** (2019) 33.
- [30] S.V. Gomes, L.A. Portugal, J.P. dos Anjos, O.N. de Jesus, E.J. de Oliveira, J.P. David, J.M. David, *Microchem. J.* **132** (2017) 28.
- [31] V. Singh, A. Soni, R. Singh, *J. Environ. Biol.*, **38** (2017) 849.
- [32] A. Czyski, H. Jarzębski, *Processes*, **8** (2020) 473.
- [33] O.S. Stamenković, M.D. Kostić, D.B. Radosavljević, V.B. Veljković, *Period. Polytech. Chem. Eng.* **62** (2018) 359.
- [34] F.S.G. Praça, M.V.L.B. Bentley, M.G. Lara, M.B.R., *Biomed. Chromatogr.* **25** (2011) 1237.
- [35] P. Ptáček, J. Klíma, J. Macek, *J. Chromatogr. B*, **899** (2012) 163.
- [36] A. Morovati, H. Ahmad Panahi, F. Yazdani., *Int. J. Pharm.* **513** (2016) 62.
- [37] M. Arabi, M. Ghaedi, A. Ostovan, J. Tashkhourian, H. Asadallahzadeh, *Ultrason. Sonochem.* **33** (2016) 67.
- [38] S. Ansari, A. Ghorbani., *J. Chem. Health Risks*, **7** (2017).