

## استخراج تريگونلین از پلاسما با استفاده از کامپوزیت مغناطیسی جدید از طریق به کارگیری طراحی آزمایش

مهديه عباسی میمند<sup>۱</sup>، مریم کاظمی پور<sup>۲\*</sup>، مهدي انصاری<sup>۳</sup>، مهدي شهیدی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

۲- استاد، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

۳- استاد، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۴- دانشیار، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

\* نویسنده مسئول: m.kazemipour@iau.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۷/۵، پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۹/۱۷

### چکیده

در پژوهش حاضر ترکیب بنتونیت/نانوذرات آهن/بتاسیکلودکسترین (B/I/C) به عنوان یک جاذب موثر به منظور جداسازی و پیش تغلیظ تريگونلین سنتز و شناسایی شد. شرایط تجربی برای یافتن متغیرهای مهم به منظور جذب سطحی تريگونلین روی جاذب بنتونیت/بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن شامل زمان، مقدار جاذب و pH بود. برای عمل واجذب متغیرهایی مثل دما، غلظت سدیم کلرید، زمان و حجم محلول نمک مورد بررسی قرار گرفتند میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)، طیفسنجی مادون قرمز (FT-IR)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM)، آنالیز سطح BET و پراش پرتو ایکس (XRD) برای تعیین ساختار جاذب سنتز شده مورد استفاده قرار گرفتند. سپس طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی فاکتورهایی که فرایند استخراج را تحت تاثیر قرار می دهند به کار برده شد. تريگونلین در نمونه های پلاسما استخراج و با روش HPLC-UV اندازه گیری شد. روش MSPE (استخراج فاز جامد مغناطیسی) به طور موثر قادر به استخراج تريگونلین بود. منحنی کالیبراسیون در گستره غلظتی ۱۰-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر خطی با ضریب همبستگی  $(r^2=0/9998)$ ، به دست آمد. حد تشخیص (LOD) و حد کمی سازی (LOQ) روش به ترتیب ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر و میزان بازده استخراج ۱۱۴ درصد به دست آمد. این جاذب به طور موفقیت آمیزی برای اندازه گیری تريگونلین در پلاسما به کار برده شد.

واژه های کلیدی: تريگونلین، بتا-سیکلودکسترین، بنتونیت، استخراج فاز جامد مغناطیسی، پلاسما

### مقدمه

است که افزایش دهنده طعم، رنگ و مزه غذاست. شنبلیله شامل موادی مانند فیبرها، ساپونین ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدهایی مانند تريگونلین و کولین می باشد [۲]. هنگامی که اتم نیتروژن نیاسین متیله می شود یک یون دوقطبی (ویتامین B<sub>3</sub>) تشکیل می شود که دارای خواص دارویی مهمی نظیر ضد سرطان<sup>۴</sup>، ضد میگرن<sup>۵</sup>، پایین آورنده چربی خون<sup>۶</sup> و غیره می باشد. این ماده از تجمع پلاکتها و از فعالیت تهاجمی سلول های سرطانی جلوگیری می کند [۳-۴].

تريگونلین<sup>۱</sup> (نیکوتینیک اسید N- متیل بتائین (NAMB)<sup>۲</sup>، یک آلکالوئید با فرمول مولکولی C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> و وزن مولکولی ۱۳۷/۱۴ گرم بر مول می باشد. این ماده محلول در آب و دارای نقطه ذوب ۲۱۸ درجه سانتی گراد است. این ترکیب محصول متابولیت نیاسین است که در ادرار پستانداران یافت شده است [۱]. این ترکیب در گیاهانی مانند شنبلیله<sup>۳</sup> و قهوه به وفور یافت می شود. شنبلیله یکی از متداولترین گیاهان دارویی در طب سنتی

<sup>4</sup> Anticancer

<sup>5</sup> Anti-migraine

<sup>6</sup> Antihypoglycemic

<sup>1</sup> Trigonelline

<sup>2</sup> Nicotinic acid N- methyl betain

<sup>3</sup> Trigonella foenum graecum

حلالیت، بار الکتریکی، اندازه مولکولی، شکل و قطبیت از خواصی هستند که در این ارتباط بیشتر مدنظر می‌باشند. در اکثر موارد مشاهده شده است که آماده‌سازی نمونه مرحله‌ی محدودکننده در توسعه روش‌های آنالیز نمونه‌های حقیقی می‌باشد. لذا توسعه روش‌های آماده‌سازی نمونه همواره چالش بزرگی در شیمی تجزیه می‌باشد و از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است.

روش‌های تجربی برای استخراج و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها از مایعات بیولوژیکی، به طور عمده شامل استخراج با فاز جامد، استخراج مایع-مایع و روش‌های میکرواستخراج است. در میان این روش‌ها، استفاده از جاذب با توجه به کاربرد بسیار آسان و کارایی برتر آن بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته و به کار می‌رود. در مقایسه با جاذب‌های متداول، نانومواد به‌علت داشتن نسبت سطح به حجم زیاد و سرعت نفوذ کم، منجر به استخراج با کارایی بالا و استخراج سریع می‌شوند. نانوجاذب‌های مغناطیسی به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص، می‌توانند به‌عنوان جاذب در جداسازی و استخراج گونه‌های مختلف آلی و معدنی بویژه سموم به کار گرفته شوند. این ویژگی‌ها شامل موارد زیر می‌باشد [۱۲]:

- سهولت سنتز نانوجاذب‌ها
- مساحت سطح به حجم زیاد به دلیل داشتن ابعاد نانومتری
- خاصیت سوپرمغناطیسی که باعث می‌شود این نانوجاذب‌ها به میدان مغناطیسی خارجی پاسخ دهند و در غیاب میدان خارجی خاصیت مغناطیسی خود را از دست بدهند.
- امکان استخراج ساده و سریع گونه‌های مختلف تنها با به کارگیری یک میدان مغناطیسی خارجی
- عدم نیاز به مراحل فیلتراسیون و سانتریفیوژ کردن طی فرایند استخراج
- توانایی استخراج از حجم زیاد نمونه‌ها
- امکان اصلاح سطح نانوجاذب‌ها که باعث توانمندی در انتخاب‌گری می‌شود.
- تعیین تریگونلین در نمونه‌های بیولوژیکی به دلیل اثراتی که روی سلامتی دارد یک موضوع بسیار مهم می‌-

قهوه یکی از مطلوب‌ترین مواد آشامیدنی در جهان به خاطر طعم و معطر بودن آن می‌باشد. این ماده اثرات مفیدی بر روی سلامتی انسان دارد. ترکیبات موجود در قهوه شامل کافئین، تریگونلین، نیکوتینیک اسید و ساکاروز هستند. تریگونلین یک مشتق پیریدینی است که محصولات معطری مانند فوران، پیرازین، آلکیل پیریدین و پیرول را در طول برشته شدن قهوه تولید می‌کند. تریگونلین در طول برشته قهوه نیکوتینیک اسید را تولید می‌کند که یک ویتامین B قابل حل در آب است و به عنوان نیاسین شناخته شده است. میزان کافئین، تریگونلین، نیکوتینیک اسید و ساکاروز در قهوه تحت‌تأثیر گونه‌های قهوه، تنوع، ناحیه جغرافیایی و شرایط بو دادن است [۵].

تریگونلین دومین و فراوان‌ترین آلکالوئید موجود در دانه‌های قهوه است. دانه‌های قهوه سبز دارای بیشترین سطح این ماده بوده و این آلکالوئید همچنین جزء مغذی فعال و اصلی دانه‌های قهوه است و این ماده پیش ماده ویتامین B<sub>3</sub> است و یک آلکالوئید متعلق به گروه‌های پیریدینی است که دارای گروه آمین چهارتایی است [۶]. چون تریگونلین در درمان بسیاری از بیماری‌های بشر موثر است، بسیاری از محققان علاقه‌مند به اندازه‌گیری غلظت این ماده در مایعات بیولوژیکی هستند [۷-۸]. استخراج تریگونلین از مایعات بیولوژیکی مانند ادرار و پلاسما بسیار مهم است [۹-۱۰]. تمیز کردن ماتریس نمونه برای پیش‌تغلیظ آنالیت از محلول‌های نمونه رقیق و دست‌یابی به حدهای تشخیص پایین می‌باشد.

نمونه‌های حقیقی مانند نمونه‌های زیستی حاوی تعداد زیادی گونه‌ی شیمیایی متفاوت بوده و بافتی که در آن گونه‌های مورد نظر باید اندازه‌گیری شوند، بسیار پیچیده است. این بافت پیچیده، همواره برای اندازه‌گیری‌های دقیق و صحیح مزاحمت ایجاد می‌کند. برای رفع این مشکل باید نمونه‌ها را از ناخالصی‌های موجود پاک‌سازی کرد [۱۱]. بدین‌منظور روش‌های گوناگونی جهت جداسازی و تغلیظ گونه‌های مورد نظر توسعه‌یافته‌اند. این روش‌ها بر اساس تفاوت بین خواص فیزیکی-شیمیایی اجزای گوناگون موجود در یک مخلوط می‌باشند. فراریت،

برای تهیه محلول‌های رقیق‌تر حجم خاصی از محلول استاندارد در بالن حجمی مناسب رقیق‌سازی شد.

## دستگاه‌وری

اطلاعات مربوط دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش در جدول (۱) خلاصه شده است. دستگاه HPLC برای انجام تجزیه کروماتوگرافی استفاده شد. دستگاه مجهز به گاززدای آنالین K-5020، آشکارساز UV K-2501، شیر تزریق شش‌پورت/حلقه سه کاناله و یک پمپ می‌باشد. داده‌های کروماتوگرافی با استفاده از کامپیوتر با نرم‌افزار یوروکروم<sup>۱</sup> پردازش شدند و تمام جداسازی‌ها روی ستون C<sub>18</sub> با اندازه ذرات ۵ میکرومتر و قطر داخلی ستون ۴/۶ میلی‌متر و طول ستون ۲۵۰ میلی‌متر انجام شد. برای تهیه فاز متحرک ابتدا محلول ۰/۰۵ مولار آمونیوم استات در آب دیونیزه تهیه شد. محلول شامل ۰/۱ درصد وزنی-حجمی ۱-اکتان سولفونیک اسید بود. فاز متحرک شامل متانول و آمونیوم استات ۰/۰۵ مولار در pH=3 با نسبت حجمی ۹۰:۱۰ بود. pH محلول آمونیوم استات با اسید کلریدریک یک مولار تنظیم گردید. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و دما برابر ۳۰ درجه سانتی-گراد است [۱۳].

جدول ۱- دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده در این تحقیق

کشور	شرکت سازنده	نام دستگاه
آلمان	Knauer platinum Blue V6900	HPLC
آمریکا	Perkin-Elmer Lambda25	Spectrophotometer UV-Vis
ایران	MKK- LBKFB	VSM
آلمان	Zeiss MM10	TEM
چین	KYKY3200	SEM
آلمان	BROKER	FT-IR
انگلستان	Sciquip	ور تکس
هلند	Xperfro	XRD
آلمان	Heidolph	هیتر

<sup>1</sup> Eurochrom

باشد. نمونه‌های بیولوژیکی مانند ادرار و پلاسما شامل مخلوط پیچیده‌ای از نمک‌های معدنی و بافرها هستند، بنابراین آماده‌سازی نمونه به عنوان یک مرحله بنیادی و اساسی جهت اندازه‌گیری آنالیت‌ها در نمونه‌های بیولوژیکی است. این روش نه تنها باعث دستیابی به حدهای تشخیص پایین می‌شود، بلکه پیش‌تغلیظ آنالیت از محلول‌های رقیق را موجب می‌گردد. در واقع هدف از تحقیق حاضر ارائه یک روش ساده، سریع و مقرون به صرفه جهت استخراج و اندازه‌گیری تریگونلین در نمونه‌های بیولوژیکی است. انتظار می‌رود روش استخراج مورد نظر بسیار کوتاه و با کارایی بالا باشد و با استفاده از نانوجاذب مغناطیسی جدید بتوان مقادیر ناچیز آنالیت مورد نظر را در نمونه‌ی پیچیده پلاسما پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری نمود. به دلیل در دسترس بودن دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در اغلب آزمایشگاه‌های شیمی تجزیه، امکان استفاده از این روش به عنوان یک روش استاندارد در بسیاری از آزمایشگاه‌ها وجود خواهد داشت.

## بخش تجربی

### مواد شیمیایی و محلول‌سازی

N- متیل بتائین نیکوتینیک اسید (تریگونلین) و بتاسیکلودکسترین با خلوص تجزیه‌ای از شرکت سیگما-آلد ریچ خریداری شدند. متانول با درجه‌ی HPLC، اکتان ۱- سولفونیک اسید، تری کلرواستیک اسید، اتانول مطلق، سدیم بوروهیدرید، هیدروکلریک اسید ۳۷٪، آهن (II) کلرید ۴ آبه و سدیم کلرید با خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. آب دیونیزه چهار بار تقطیر از شرکت نانوشیمی سبلان (ایران) خریداری گردید و بنتونیت از معدن بنتونیت کرمان تهیه شد.

به منظور تهیه محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از تریگونلین، دقیقاً مقدار ۰/۰۱ گرم از تریگونلین ابتدا در ده میلی‌لیتر اتانول مطلق حل و سپس در یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری با آب دیونیزه به حجم رسانده شد. محلول حاصل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

## سنتز نانوجاذب مغناطیسی

### تهیه بنتونیت/نانوذره آهن

ابتدا به منظور آماده‌سازی بنتونیت این ماده ساییده و از الک مش ۲۰۰ رد شد تا ذرات با قطر کمتر از ۷۵ میکرومتر جمع‌آوری گردد. سپس این ذرات در آون در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید.

برای تهیه بنتونیت/نانوذرات آهن از روش شهوان<sup>۱</sup> و همکاریانش استفاده گردید. نانوذرات آهن/بنتونیت با احیای یون‌های  $Fe^{+2}$  به Fe به وسیله سدیم بوروهیدرید به دست آمد. نسبت جرمی آهن به بنتونیت ۱:۵ بود. یک محلول آهن با حل کردن ۱/۰۷ گرم  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  معادل با ۰/۳ گرم آهن در مخلوط اتانول/آب با نسبت حجمی (۴:۱) تهیه شد. به آن مخلوط ۱/۵ گرم بنتونیت اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه خوب به هم زده شد. در مرحله‌ی بعد ۰/۶۱ گرم از سدیم بوروهیدرید که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده بود، قطره قطره به محلول بالا اضافه شد. محلول داخل بشر روی آهن‌ربا قرار داده شد تا رسوب به دست آمده ته‌نشین شود. سپس اتانول مطلق طی سه مرحله به رسوب بالا اضافه و رسوب شست و شو داده شد و در طول شب در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۱۴].

### تهیه نانوکامپوزیت بنتونیت/نانوذره آهن/بتاسیکلودکسترین

برای اتصال نانوذرات آهن/بنتونیت با بتاسیکلودکسترین از روش آقای حسین عبدالله‌زاده و همکاریانش با انجام اصلاحاتی استفاده گردید. در آن روش استخراج فاز جامد مغناطیسی بر پایه بتاسیکلودکسترین/اکسید گرافن/مگنتیت پایه‌گذاری شده بود. برای اتصال نانوذرات آهن/بنتونیت با بتاسیکلودکسترین، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره آهن/بنتونیت با

۱۰ میلی‌لیتر محلول ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بتاسیکلودکسترین مخلوط شدند. بعد از هم زدن شدید ظرف در حمام آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳/۵ ساعت قرار گرفت و در نهایت ماده جامد به دست آمده با آهن‌ربا جدا شد [۱۵].

### بهینه‌سازی عوامل موثر بر فرایند جذب

از روش طراحی آزمایش<sup>۲</sup> به منظور یافتن مقادیر متغیرهای مهم به منظور جذب سطحی تریگونلین استفاده شد. در مرحله غربال‌گری متغیرهای تجربی شامل زمان، pH و مقدار جاذب به عنوان پارامترهای اصلی انتخاب شدند که به نظر می‌رسد فرایند جذب سطحی را تحت‌تاثیر قرار دهند. در این مطالعه استفاده از روش طراحی عاملی دو سطحی با سه نقطه مرکزی و ۲۷ اجرا استفاده شد.

به منظور بهینه‌سازی متغیرهای شناسایی شده در فاز غربال‌گری ۱۱ آزمایش اجرا شد که به وسیله نرم‌افزار با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) طراحی شد.

### بهینه‌سازی عوامل موثر بر فرایند واجذب

به منظور یافتن متغیرهای مهم در واجذب تریگونلین از سطح جاذب، استفاده از روش طراحی آزمایش برپایه متغیرهایی مانند دما، زمان، غلظت نمک و حجم حلال واجذب در مراحل غربال‌گری و بهینه‌سازی انجام شد. این مراحل به کمک نرم‌افزار به ترتیب شامل ۱۸ و ۱۱ اجرا است.

### فرآیند استخراج

به ۵۰ میلی‌گرم نانوجاذب ۱۰ میلی‌لیتر محلول استاندارد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تریگونلین اضافه شد. بشر روی یک شیکر به منظور توزیع یکنواخت جاذب در محلول قرار گرفت. جذب سطحی تریگونلین روی جاذب در دمای اتاق تحت هم‌زدن مکانیکی برای ۱۰

<sup>2</sup> Experimental design

<sup>1</sup> Shahwan

## بحث و نتیجه گیری

### شناسایی نانوجاذب

به منظور تایید سنتز جاذب از روش‌های طیف‌بینی زیر قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپی الکترونی عبوری (SEM)، آنالیز سطح BET و مغناطیس‌سنجی ارتعاشی نمونه (VSM) استفاده گردید.

ابتدا ساختار نانوهیبرید بنتونیت/بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن به وسیله اسپکتروسکوپی FT-IR بررسی شد. شکل (۱) طیف‌های FT-IR (a-f) بتاسیکلودکسترین، نانوذرات آهن، بنتونیت/بتاسیکلودکسترین، بنتونیت/بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن، بنتونیت/نانوذرات آهن را نشان می‌دهد. طیف‌های بنتونیت خام باندهایی را در اطراف  $3623 \text{ cm}^{-1}$  و  $3621 \text{ cm}^{-1}$  نشان می‌دهد. پیک تیز در  $3621 \text{ cm}^{-1}$  نشانگر ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل در ساختار است. باندها در حدود  $1640 \text{ cm}^{-1}$  و  $3440 \text{ cm}^{-1}$  به دلیل ارتعاش خمشی O-H و ارتعاش کششی H-O-H در مولکول کئوردینه‌شده آب است.

باند کششی (Si, Al)-O-H در محدوده  $3622 \text{ cm}^{-1}$  و کششی Si-O-Si برابر  $1035 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد. بنتونیت/نانوذرات آهن باندهایی در حدود  $2926 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1390 \text{ cm}^{-1}$  و  $595 \text{ cm}^{-1}$  را نشان می‌دهد. مشاهده شده است که باند کششی C-O-C در حدود  $1010-1060 \text{ cm}^{-1}$  برای اتصال  $\alpha(1-4)$  گلیکوزیدی است.

باند  $1038 \text{ cm}^{-1}$  به دلیل ارتعاشات کششی گروه‌های Si-O است در حالی که  $518 \text{ cm}^{-1}$  و  $466 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به باندهای اتصال یافته با Al-O-Si و ارتعاش خمشی Si-O-Si می‌باشند. در عدد موجی برابر  $630 \text{ cm}^{-1}$  باند به ارتعاش خارج از صفحه کوپل شده با Al-O و Si-O اختصاص می‌یابد.

در ادامه پراش پرتو ایکس به عنوان یک ابزار مفید برای بررسی ساختار فازی نانوذرات آهن و نانوماده سنتز شده بکار برده شد. شکل (۲) الگوی XRD از a-

دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه انجام و سپس جاذب به وسیله آهنربا جدا شد.

جاذب با ۱ میلی‌لیتر سدیم کلرید یک مولار برای واجذب آنالیت شسته شد. مقدار واجذب آنالیت با هم‌زدن روی همزن<sup>۱</sup> به مدت ۲۰ دقیقه افزایش یافت. با کمک مگنت مرحله بالا کامل شده و محلول شفاف حاوی تریگونلین به دستگاه HPLC تزریق گردید. جاذب محلول‌ها در طول موج ۲۳۲ نانومتر خوانده شد.

### آماده‌سازی و آنالیز نمونه حقیقی

روش پیشنهادی به منظور آنالیز نمونه‌های پلاسما شامل ۱۰-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نیکوتینیک اسید N - متیل بتائین می‌باشد. در مرحله نخست برای ترسیب پروتئین، ۹۵۰ میکرولیتر از پلاسما با ۵۰ میکرولیتر محلول استاندارد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر NAMB یا تریگونلین مخلوط شده و با ۲۰۰ میکرولیتر تری-کلرواستیک اسید ۱۰ درصد رقیق گردید. سپس مخلوط حاصله با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده تا پروتئین رسوب شده جدا گردد [۱۶] و سپس محلول صاف رویی جدا شد. در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری به ۰/۹ میلی‌لیتر پلاسما دپروتئینه شده، ۱۰ میلی‌گرم از نانوجاذب اضافه شد. میکروتیوب در داخل حمام التراسونیک برای یک دقیقه قرار گرفت. به منظور توزیع نانو جاذب در داخل محلول، جاذب سطحی تریگونلین روی جاذب با تکان دادن به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط با سرعت جریان ثابت ۸۰۰-۵۰۰ دور دقیقه از نمونه انجام شد. در واقع جاذب با استفاده از آهنربا جمع‌آوری شده و برای واجذب آنالیت، جاذب جدا شده در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد با ۱ میلی‌لیتر NaCl ۰/۸ مولار داغ شسته شد. فرایند واجذب با قرار دادن مخلوط روی شیکر سرعت گرفت. مایع شفاف و صاف شده به سیستم HPLC برای تعیین تریگونلین تزریق شد.

<sup>۱</sup> Mixer

بر اساس شکل ایجاد شده ناشی از انعکاس نور لیزر در نقاط مختلف، اطلاعات مورد نظر از قبیل مورفولوژی و پایداری مکانیکی سطح با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی در شکل (۵) مورد بررسی قرار گرفته است. در مد تماسی با حرکت در سطح و جابه جا شدن باعث ایجاد پستی و بلندی‌هایی بر روی سطح می‌شود. با نیروی واکنش دریافتی می‌توان به خوبی دامنه نوسانات را مشخص کرد و با اندازه‌گیری دامنه نوسانات به ویژگی سطح نمونه پی برد. همان طور که در قسمت ب شکل (۵) مشخص است پروفیل ارتفاع بالاست و این خود نشان-دهنده جذب مشخص ماده بر روی جاذب است یعنی کامپوزیت نانوذرات آهن/ بنتونیت/بتاسیکلودکسترین مناسب‌ترین جاذب می‌باشد.

در ادامه تکنیک VSM به منظور بررسی خاصیت مغناطیسی نانوجاذب‌های سنتز شده با به‌کارگیری میدان مغناطیسی در دمای اتاق استفاده شد. آنالیز میزان خاصیت ماده مغناطیسی ماده فرومغناطیس (حلقه پسماند مغناطیسی)، پراکندگی و تراکم نانوذرات آهن و نانوذرات آهن/ بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین در شکل (۶) نشان داده شده است. در هر دو منحنی هیچ پسماند مشخصی وجود ندارد که نشان‌دهنده سوپرپارامغناطیس بودن مواد سنتزی می‌باشد. مشخص شده است که پروفیل دو منحنی خیلی شبیه هم است اگر چه مقدار مغناطیس‌پذیری اشیاعی بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن (۱۵ emu/g) پایین‌تر از نانوذرات آهن (۵۶ emu/g) است که نشان‌دهنده این است که نانوذرات آهن به وسیله بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین پوشانده شده‌اند.

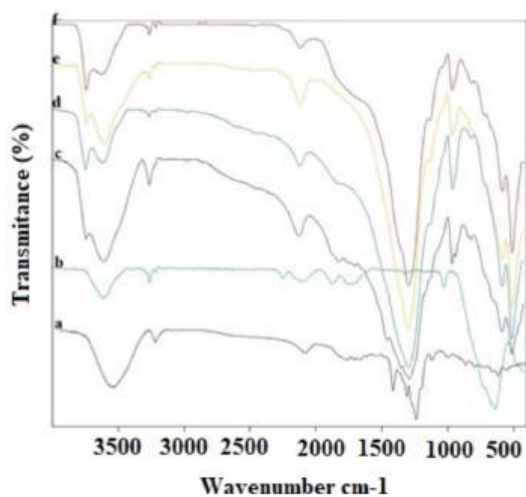
روش BET به منظور مطالعه و بررسی سطح مواد سنتز شده بکار گرفته شد. شناخت پارامتر سطح ویژه و بررسی خواص مواد جامد به خصوص مواد جاذب سطحی ضروری است. با اندازه‌گیری گاز جذب شده روی سطح می‌توان سطح ماده را اندازه گرفت. نمودارهای جذب-واجذب نیتروژن به‌دست آمده از این بررسی در شکل (۷) نشان داده شده است. نتایج مربوط به خواص سطح نیز در جدول (۲) خلاصه شده است. براساس نتایج خلاصه‌شده در جدول (۲) بیشترین مساحت سطح مربوط به نانوذرات

بتاسیکلودکسترین، b- بنتونیت/ نانوذرات آهن، c- بنتونیت/نانوذرات آهن/ بتاسیکلودکسترین، d- بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین و e- نانوذرات آهن/ بنتونیت/ سدیم بور هیدرید را نشان می‌دهد. شدت پیک‌های بنتونیت در زوایای ۰/۷۸، ۲۶/۲۷، ۲۰/۹ =  $2\theta$  زمانی که نانوذرات آهن با رگیری می‌شوند، پایین می‌آیند. پیک‌های کوچک موجود در الگوی پراش پرتو ایکس بنتونیت/ نانوذرات آهن مربوط به ساختار بنتونیت می‌باشند. پیک‌های مشخصی در ۰/۷۴، ۳/۲، ۴/۶۳، ۵۷/۴، ۵۳/۵۷، ۴۳/۴ =  $2\theta$  با نمونه ذرات آهن استاندارد مطابقت دارند [۱۷]. موقعیت پیک انعکاسی نانوذرات آهن و بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین با الگوهای XRD انطباق دارد [۱۸] و این مطلب نشانگر این است که ساختار بلوری نانوذرات مغناطیسی بعد از فرایند اتصال سیکلودکسترین حفظ می‌شود.

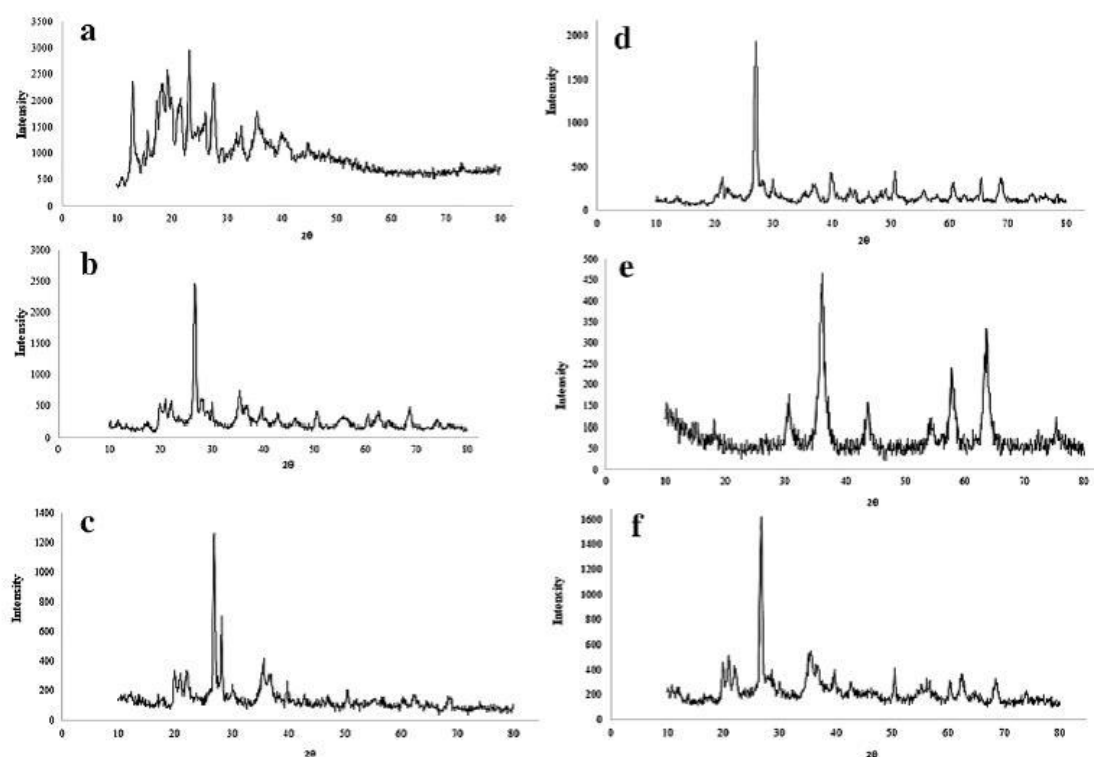
در ادامه تکنیک‌های SEM، TEM و AFM به منظور بررسی مورفولوژی مواد سنتز شده و تعیین اندازه نانوذرات بکار گرفته شدند. شکل ۳ (a-c) تصاویر SEM از بنتونیت/ نانوذرات آهن، بنتونیت و بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین را به ترتیب نشان می‌دهد. از میکروگراف می‌توان تشخیص داد که بنتونیت/ نانوذرات آهن فرورفتگی‌های بیشتر و مورفولوژی سطح متخلخل را دارد. در نتیجه تعدادی از نانوذرات آهن روی سطح با اندازه‌های ۵۷/۱، ۵۷، ۴۹/۶ و ۵۹/۴ در شکل نشان داده شده‌اند. سپس در طول واکنش نانوذرات مغناطیسی به طور مشخص روی سطح بنتونیت قرار می‌گیرند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات آهن و نانوذرات آهن/ بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین در شکل (۴) نشان داده شده است. این شکل تمام اشکال و همچنین ساختار پوسته/ هسته نانوذرات آهن را به تصویر می‌کشد. قطر ذرات در محدوده ۶۰-۱۰ نانومتر و ضخامت پوشش ۳-۴ نانومتر است. عدم ساختار بلوری پیرامون نشان‌دهنده این است که پوشش بی‌شکل (آمورف) است. در نانوذرات پراکنده ضخامت پوسته و مورفولوژی زنجیر مانند شناسایی می‌شود. تصاویر TEM از نمونه‌های بنتونیت/ نانوذرات آهن نشان می‌دهد که نانوذرات آهن تمایل زیادی به پراکندگی روی ذرات بنتونیت دارند.

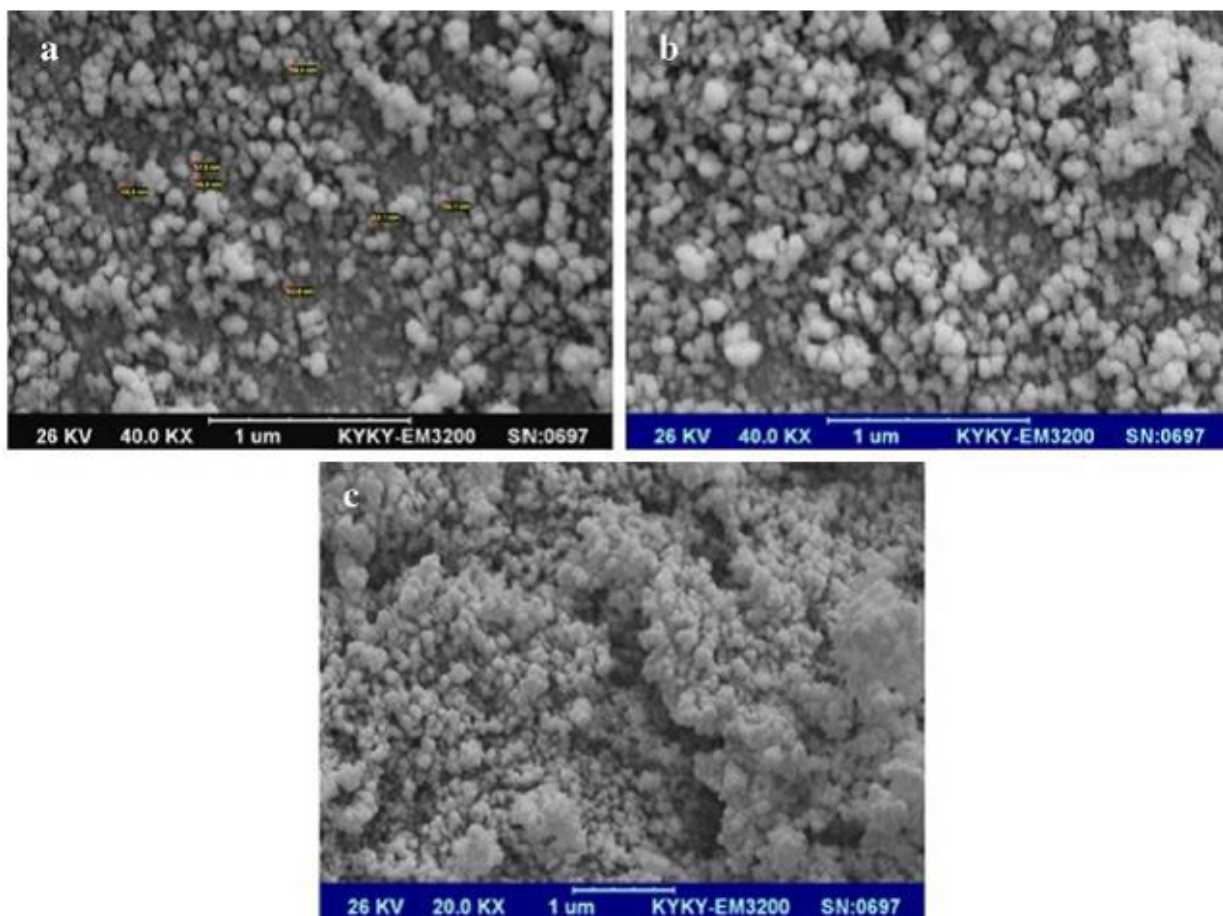
آن است و کامپوزیت سه‌تایی بنتونیت/بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن دارای سطح ویژه ۳۵ متر مربع بر گرم است که در مقایسه با بنتونیت و بتاسیکلودکسترین بالاتر است.



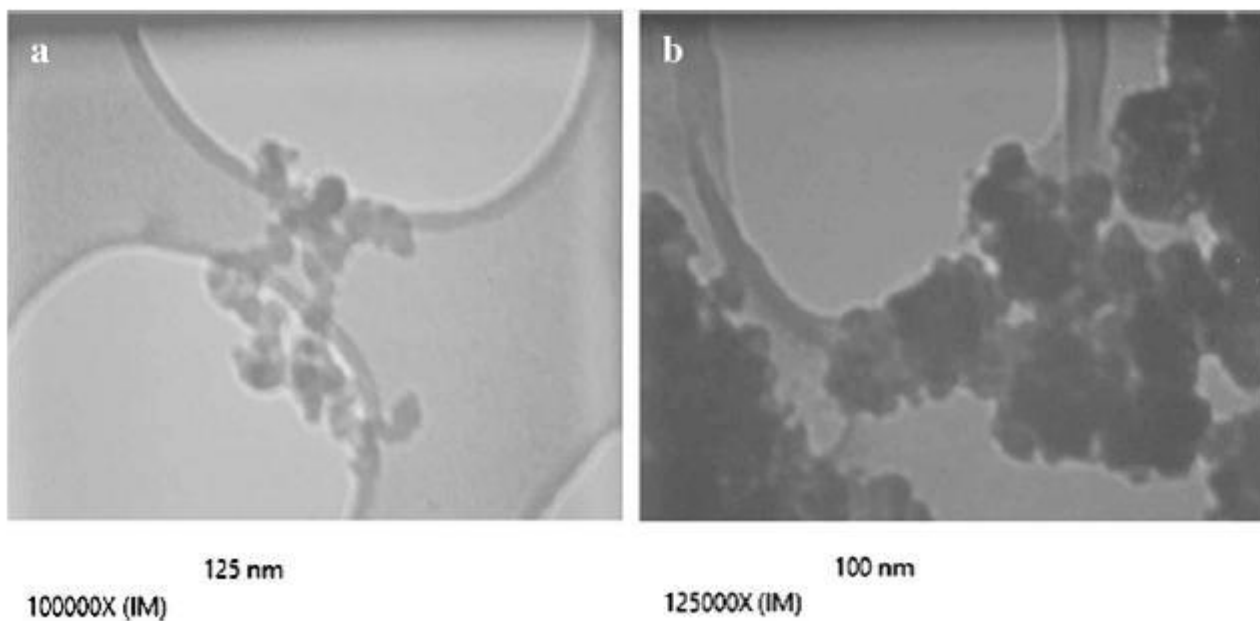
شکل ۱- طیف‌های FT-IR، a- بتاسیکلودکسترین، b- نانوذرات آهن، c- بنتونیت/بتاسیکلودکسترین، d- بنتونیت، e- بنتونیت/بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن، f- بنتونیت/نانوذرات آهن



شکل ۲- الگوی XRD از a- بتاسیکلودکسترین b- بنتونیت/نانوذرات آهن c- بنتونیت/نانوذرات آهن/بتاسیکلودکسترین d- بنتونیت/بتاسیکلودکسترین e- نانوذرات آهن f- بنتونیت/نانوذرات آهن/سدیم بورهیدرید

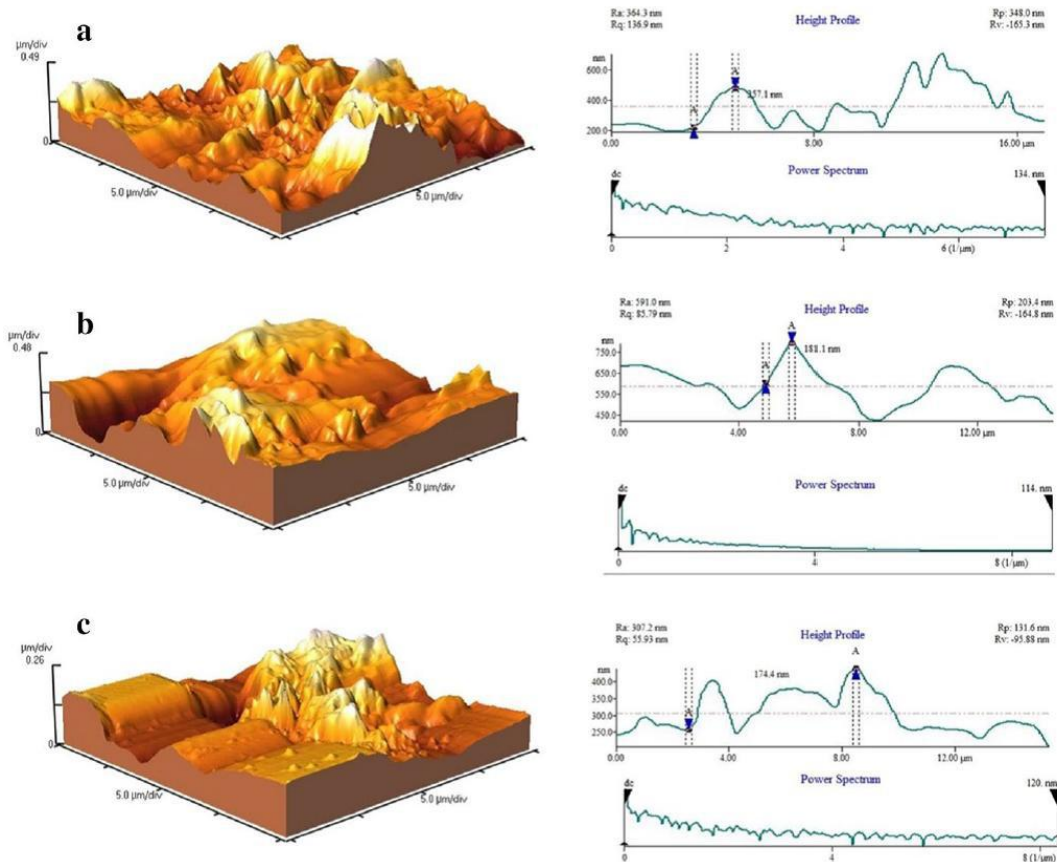


شکل ۳- تصاویر SEM از a- بنتونیت/ نانوذرات آهن b- بنتونیت c- بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین

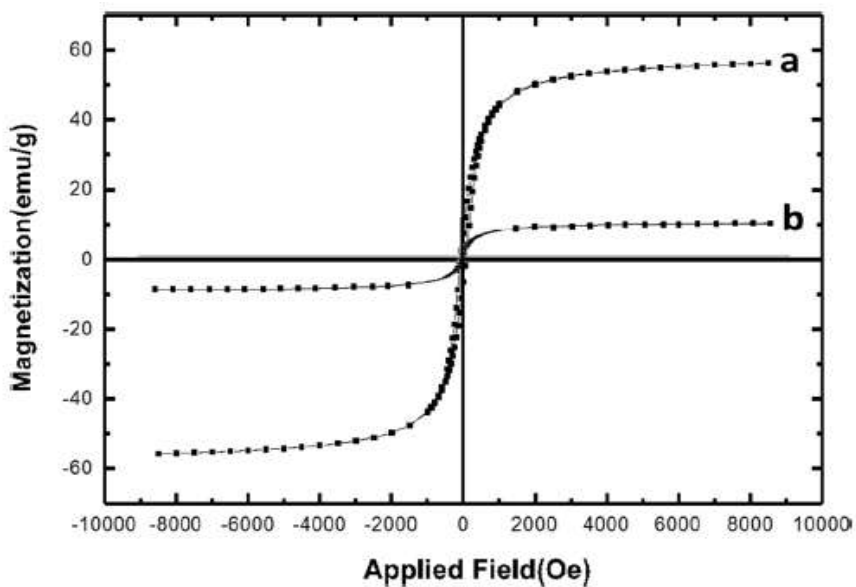


شکل ۴- تصاویر TEM از a- نانوذرات آهن، b- نانوذرات آهن/ بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین

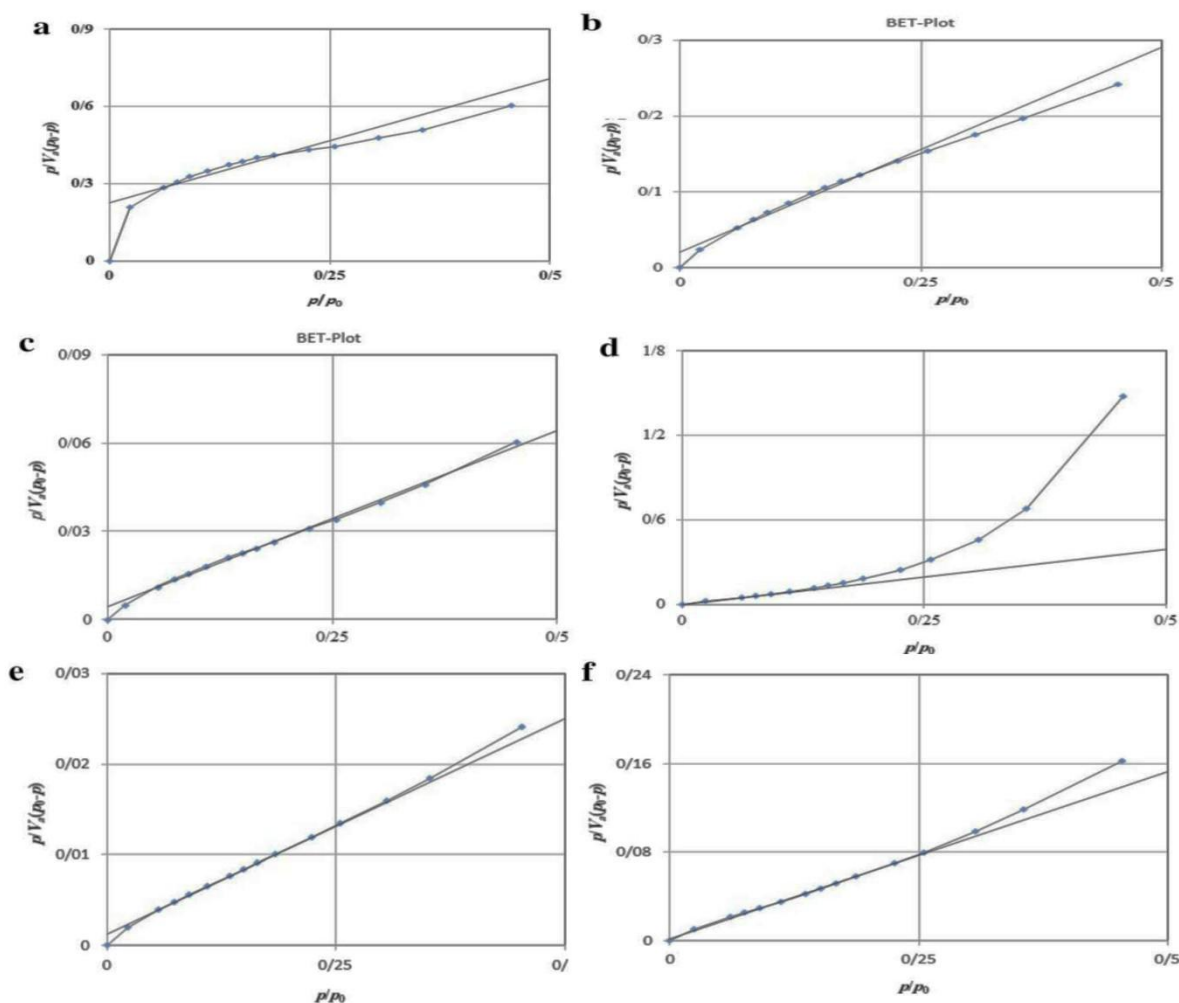




شکل ۵- میکروسکوپ نیروی اتمی a- بنتونیت / نانوذرات آهن b- بنتونیت / نانوذرات آهن / بتاسیکلودکسترین c- بنتونیت / بتاسیکلودکسترین



شکل ۶- نمودار مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM) a- نانوذرات آهن، b- بنتونیت / بتاسیکلودکسترین / نانوذرات آهن



شکل ۷- بررسی مساحت سطحی با آنالیز BET از a- بتاسیکلودکسترین، b- بنتونیت/ نانوذرات آهن، c- بنتونیت/ نانوذرات آهن/ بتاسیکلودکسترین، d- بنتونیت/ بتاسیکلودکسترین، e- نانوذرات آهن، f- بنتونیت/ نانوذرات آهن/ سدیم بورهیدرید

جدول ۲- نتایج آنالیز BET از نانوکامپوزیت‌های تهیه‌شده

نمونه	مساحت سطحی (BET) مترمربع/ گرم	حجم روزنه کلی ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) (سانتی‌متر مکعب بر گرم)	قطر روزنه (nm)
بتاسیکلودکسترین	۳/۶۶	۰/۰۰۹۸	۱۹/۵۱
بنتونیت/نانوذرات آهن	۷/۷۷	۰/۰۴۸۸	۲۵/۱۵
بنتونیت/نانوذرات آهن/ بتاسیکلودکسترین	۳۵/۰۴	۰/۱۲۱۸	۱۳/۹۰
بنتونیت/بتاسیکلودکسترین	۵۷/۰۰	۰/۰۲۰۹	۱۵/۰۶
نانوذرات آهن	۸۹/۱۵	۰/۳۴۲۵	۱۱/۳۷
بنتونیت/نانوذرات آهن/سدیم بورهیدرید	۱۴/۳۴	۰/۰۸۹۱	۲۴/۸۸

## بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر استخراج

در روش طراحی آزمایش برای عمل جذب سطحی سه پارامتر زمان، مقدار جاذب و pH و برای عمل واجذب متغیرهایی مانند دما، زمان، غلظت نمک و حجم مورد بررسی قرار گرفتند. این مراحل به کمک نرم‌افزار به ترتیب شامل ۱۸ و ۱۱ اجرا است که به ترتیب در جدول-های (۳) و (۴) خلاصه شده است. نتایج این بررسی در شکل‌های ۸ تا ۱۲ ارائه شده است.

نتایج تحلیل واریانس‌ها نشان داد که مقدار Predicted R<sup>2</sup> برابر ۰/۹۹۴۶ با Adjusted R<sup>2</sup> که دارای مقدار ۰/۹۹۵۸ است توافق دارد یعنی تفاوت کمتر از ۰/۲ است. همچنین Adeq-precision نسبت سیگنال به نویز را نشان می‌دهد و این نسبت اگر بزرگتر از ۴ باشد معقول است. این نسبت در این تحقیق برای مرحله‌ی جذب مقدار ۹۲/۱۳ است که نشانگر یک سیگنال مناسب می‌باشد. بنابراین این مدل برای بررسی فضای طراحی مناسب می‌باشد.

در جدول تحلیل واریانس‌ها برای عمل جذب سطحی تریگونلین F-value برابر ۲۰۰/۵۸ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل است و یک شانس ۰/۰۱ درصدی وجود دارد که این F-value بزرگ به دلیل نویز اتفاق افتاده باشد. همچنین میزان p-value کمتر از ۰/۰۵ نشانگر معنی‌دار بودن مدل است. در این مورد B, C و BC اصطلاحات معنی‌دار هستند و مقادیر بزرگتر از ۰/۱ نشان می‌دهد که پارامتر مورد بررسی معنی‌دار نیست (شکل ۸).

عدم برازش F-value برابر ۱/۳۰ نشان‌دهنده‌ی غیر معنی‌دار بودن نسبی به خاطر وجود خطا است و یک شانس ۳۰/۸۵ درصدی وجود دارد این عدم برازش به خاطر نویز می‌باشد.

آزمایش‌های انجام شده در مرحله واجذب برای تست-های غربال‌گری و بهینه‌سازی به ترتیب شامل ۱۸ و ۱۱

اجرا است که به ترتیب در جدول‌های (۵) و (۶) خلاصه شده است. نتایج این بررسی در شکل‌های ۱۳ تا ۱۷ ارائه شده است.

برای عمل واجذب Predicted R<sup>2</sup> برابر ۰/۹۹۴۱ با Adjusted R<sup>2</sup> که دارای مقدار ۰/۹۹۶۰ است توافق دارد، یعنی تفاوت کمتر از ۰/۲ است. همچنین Adeq-precision برابر با ۶۴/۶۵ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی سیگنال مناسب است.

در جدول تحلیل واریانس‌ها برای عمل واجذب تریگونلین F-value برابر ۱۳۱۴/۶۹ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل است. یک شانس ۰/۰۱ درصدی وجود دارد که این F-value به دلیل نویز اتفاق افتاده باشد. همچنین مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ نشانگر معنی‌دار بودن مدل است. در این مورد C, D و CD اصطلاحات معنی‌دار هستند و مقادیر بزرگتر از ۰/۱ نشان می‌دهد که مدل معنی‌دار نیست (شکل ۹). لازم به ذکر است که اگر تعداد اصطلاح مدل غیر معنی‌دار وجود داشته باشد، احیا مدل ممکن است مدل را بهبود دهد.

عدم برازش F-value برابر ۲۵/۵۸ به دست آمد که نشان‌دهنده غیر معنی‌دار بودن نسبی به خاطر وجود خطا است و یک شانس ۱۵/۳۴ درصدی وجود دارد این عدم برازش به خاطر نویز باشد.

در نمودارها به طور مثال در نمودار نیم نرمال خط خطی خطای قرمز به گونه‌ای قرار می‌گیرد که به عنوان راهنما برای کمک به انتخاب اثرات است و به طور دستی جابه جا می‌شود تا کوچک‌ترین نمایش به بهترین شکل نشان داده شود. هدف این است که اثرات را به اثرات بزرگ، تکرارپذیر و اثرات نویز کوچک تفکیک کنیم. اگر هیچ اثری از خط خطی قرمز جدا نشد این امکان وجود دارد که اثر قابل توجه نباشد.

جدول ۳- سطوح هر متغیر در هر آزمایش در مرحله غربالگری مربوط به جذب تریگونلین بر اساس اجزای پیشنهادی

نرم افزار Design Expert® 12

Run	Std	A: time (min)	B: Adsorbent (g)	C: pH	(Percent Adsorbed)
۱	۱۷	۱۰/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۳۵/۷۴
۲	۲۰	۱/۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۷۱/۸۷
۳	۱۱	۱/۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۷۵/۲۹
۴	۲	۱/۰	۰/۰۱۰	۱/۰	۰/۱۳
۵	۱۵	۱/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۳۸/۹۱
۶	۱۸	۱۰/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۴۰/۷۴
۷	۱۱	۱۰/۰	۰/۱۰۰	۱/۰	۰/۶۱
۸	۲۱	۱/۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۸۲/۲۴
۹	۲۷	۵/۵	۰/۰۵	۴/۵	۹۰/۲۳
۱۰	۱۱	۱/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۴۲/۰۵
۱۱	۷	۱/۰	۰/۱۰۰	۱/۰	۰/۵۹
۱۲	۲۲	۱۰/۰	۰/۱۰۰	۱/۰	۷۰/۰۷
۱۳	۱۶	۱۰/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۲۸/۳۳
۱۴	۱۳	۱/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۰/۸۵
۱۵	۲۵	۵/۵	۰/۰۵	۸/۰	۸۷/۴۳
۱۶	۲۴	۱۰/۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۷۳/۸۳
۱۷	۵	۱۰/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۰/۲۶
۱۸	۹	۱/۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۰/۶۹
۱۹	۲۳	۱۰/۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۷۴/۷۳
۲۰	۱۰	۱۰/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۰/۵۷
۲۱	۲۰	۱۰/۰۰	۰/۱۰۰	۸/۰	۰/۵۸
۲۲	۳	۱/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۰/۱۲
۲۳	۶	۱۰/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۰/۲۸
۲۴	۱۳	۱/۰	۰/۰۱۰	۸/۰	۴۳/۸۵
۲۵	۸	۱/۰	۰/۱۰۰	۴/۵	۰/۵۷
۲۶	۲۶	۵/۵	۰/۰۵۵	۴/۵	۹۴/۳۳
۲۷	۴	۱۰	۰/۰۱۰	۴/۵	۰/۲۶

جدول ۴- نتایج سطوح هر متغیر در هر آزمایش در مرحله بهینه‌سازی سه‌سطحی مربوط به جذب تریگونلین بر اساس

اجراهای پیشنهادی نرم‌افزار Design Expert® 12

Std	RUN	A; time(min)	B:Adsorbent(g)	Factor3 C:pH	Percent Adsorbent
۵	۱	۱/۰	۰/۰۱	۸/۰	۴۱/۶
۳	۲	۱/۰	۰/۱۰	۱/۰	۲/۴
۱۱	۳	۵/۵	۰/۰۵	۴/۵	۹۰/۲
۶	۴	۱۰/۰	۰/۰۱	۸/۰	۳۶/۵
۱	۵	۱/۰	۰/۰۱	۱/۰	۱/۶
۴	۶	۱۰/۰	۰/۱۰	۱/۰	۲/۳
۱۰	۷	۵/۵	۰/۰۵	۴/۵	۹۴/۳
۸	۸	۱۰/۰	۰/۱۰	۸/۰	۷۲/۸
۷	۹	۱/۰	۰/۱۰	۸/۰	۷۶/۴
۹	۱۰	۵/۵	۰/۰۵	۴/۵	۸۷/۴
۲	۱۱	۱۰/۰	۰/۰۱	۱/۰	۱/۲

جدول ۵- سطوح هر متغیر در هر آزمایش در مرحله غربالگری مربوط به واجذب تریگونلین بر اساس اجراهای پیشنهادی

نرم‌افزار Design Expert® 12

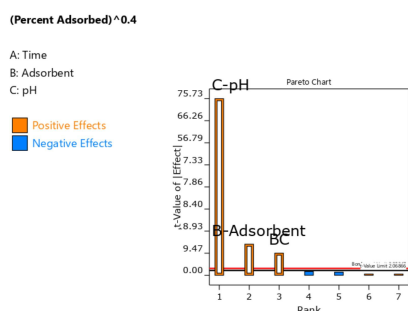
Std	Run	A:Temperature(°C)	B:Conc.salt (molar)	C:time(min)	D:volume (ml)	Desorption percent
۳	۱	۶۰	۱/۲	۵	۱	۴۷/۵
۱۴	۲	۱۰۰	۰/۸	۱۵	۳	۶/۴
۱۸	۳	۸۰	۱/۰	۱۰	۲	۶۳/۹
۱۱	۴	۶۰	۱/۲	۵	۳	۶/۱
۲	۵	۱۰۰	۰/۸	۵	۱	۴۲/۶
۷	۶	۶۰	۱/۲	۱۵	۱	۶۰/۱
۱۶	۷	۱۰۰	۱/۲	۱۵	۳	۵/۸
۱۲	۸	۱۰۰	۱/۲	۵	۳	۶/۴
۱۰	۹	۱۰۰	۰/۸	۵	۳	۶/۷
۱۳	۱۰	۶۰	۰/۸	۱۵	۳	۶/۶
۱۷	۱۱	۸۰	۱/۰	۱۰	۲	۶۵/۱
۹	۱۲	۶۰	۰/۸	۵	۳	۶/۲
۶	۱۳	۱۰۰	۰/۸	۱۵	۱	۶۵/۴
۵	۱۴	۶۰	۰/۸	۱۵	۱	۵۵/۵
۱	۱۵	۶۰	۰/۸	۵	۱	۴۷/۸
۸	۱۶	۱۰۰	۱/۲	۱۵	۱	۱۵۹/۸
۱۵	۱۷	۶۰	۱/۲	۱۵	۳	۶/۵
۴	۱۸	۱۰۰	۱/۲	۱۵	۱	۵۴/۸

جدول ۶- سطوح هر متغیر در هر آزمایش در مرحله بهینه‌سازی مربوط به واجذب تریگونلین از روی جاذب B/I/C بر اساس

اجراهای پیشنهادی نرم‌افزار Design Expert® 12

Std	Run	A: Temperature(°C)	B: Conc. salt (molar)	C: time (min)	Response (Desorbed %)
۱	۸	۶۰	۰/۸	۵	۴۷/۸
۲	۱	۱۰۰	۰/۸	۵	۴۲/۶
۳	۵	۶۰	۱/۲	۵	۴۷/۵
۴	۹	۱۰۰	۱/۲	۵	۵۵/۵
۵	۷	۱۰۰	۰/۸	۱۵	۶۵/۴
۶	۱۰	۱۰۰	۰/۸	۱۵	۶۰/۱
۷	۳	۶۰	۱/۲	۱۵	۵۴/۸
۸	۴	۱۰۰	۱/۲	۱۵	۶۵/۱
۹	۲	۸۰	۱/۲	۱۰	۴۷/۱
۱۰	۶	۸۰	۱/۰	۱۰	۶۵
۱۱	۱۱	۸۰	۱/۰	۱۰	۶۵

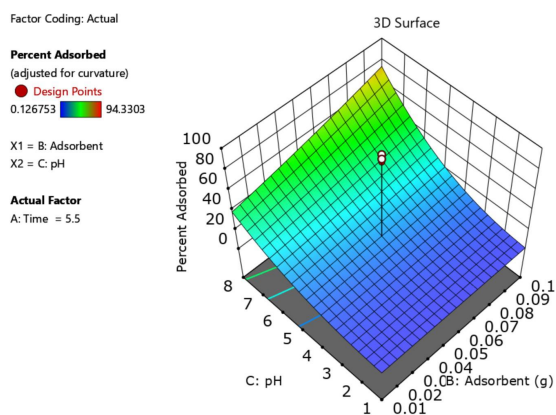
در نمودار پیش‌بینی شده در مقابل واقعی مقادیر پاسخ پیش‌بینی شده در مقابل واقعی برای کمک به تشخیص مقادیر یا گروهی از مقادیر که توسط مدل پیش‌بینی نشده است به کار می‌رود. با انتخاب هر نقطه دو مقدار X و Y نشان داده می‌شود که مشخص می‌شود تفاوت قابل ملاحظه‌ای ندارند (شکل ۱۱).



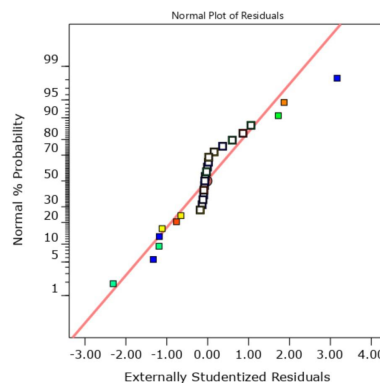
شکل ۸- نمودار پارتو به دست آمده از مرحله‌ی غربالگری جذب و در نظر گرفتن اثرات T-value. برای بررسی پارامترهای جذب سطحی

نمودار پارتو یک نمودار گرافیکی است که برای مدیریت انتخاب مدل برای طرح‌های فاکتوریل دو سطحی استفاده می‌شود. برای انتخاب اثرات آماری معنی‌دار از نمودار نیم نرمال اثرات استفاده می‌شود. دو حد T مختلف بر روی نمودار رسم شده است. بالاترین حد بر اساس مقدار T بحرانی استاندارد برای آزمایش تک تک اثرات است. با تغییر شرایط انتخاب شده برای مدل محدودیتها محاسبه می‌شود. حد بنفرونی در نمودار پارتو آستانه‌ای است که در بالای آن اثراتی ظاهر می‌شوند که قابل توجه هستند. اثرات زیر آستانه عوامل ناچیزی می‌باشند. برای نمودار نرمال داده‌ها هم برای جذب و هم واجذب که از توزیع نرمال پیروی می‌کند الگوی مشخصی وجود دارد که با انجام یک تابع انتقال بر روی متغیر وابسته و پاسخ مدل تجزیه و تحلیل بهتری به دست خواهد آمد.

نمودار باکس-کاکس ابزاری برای کمک به تشخیص مناسب‌ترین تابع انتقال توان به منظور اعمال بر پاسخ می‌باشد. پایین‌ترین نقطه در نمودار بهترین مقدار لاندا را نشان می‌دهد. هنگامی که نسبت حداکثر به حداقل پاسخ بزرگتر از ۳ باشد توانایی بیشتری در بهبود مدل با استفاده از تابع توانی وجود خواهد داشت. براساس شکل (۱۰) یک توان ۰/۴ بهترین نتیجه را برای مرحله‌ی جذب می‌دهد.

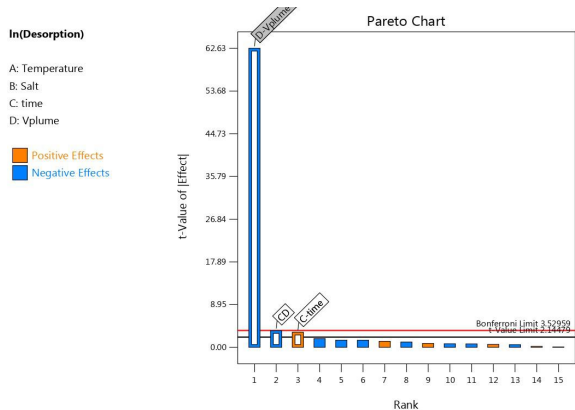


شکل ۹- نمودار نرمال باقیمانده‌ها برای جذب سطحی تریگونلین بر روی جاذب

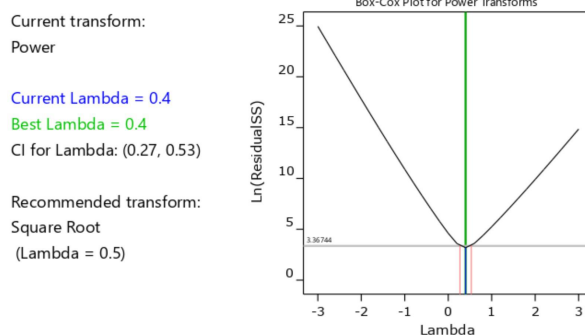


شکل ۱۲- نمودار سه بعدی و بررسی متغیرهای موثر بر عمل جذب سطحی

شکل ۹- نمودار نرمال باقیمانده‌ها برای جذب سطحی تریگونلین بر روی جاذب

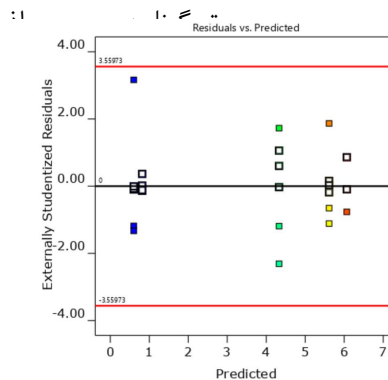
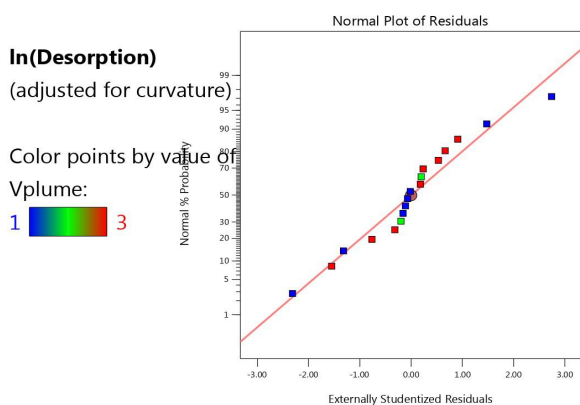


شکل ۱۰- نمودار باکس-کاکس برای جذب سطحی



شکل ۱۳- نمودار پارتو و در نظر گرفتن اثرات T-value برای بررسی پارامترهای واجذب

شکل ۱۰- نمودار باکس-کاکس برای جذب سطحی



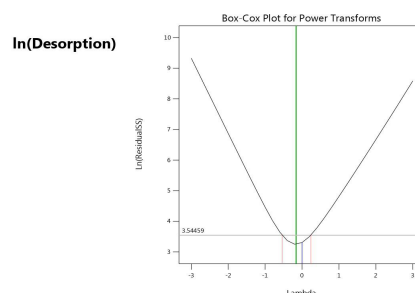
شکل ۱۴- نمودار نرمال باقیمانده‌ها برای عمل واجذب

شکل ۱۱- نمودار باقیمانده‌ها در مقابل پیش‌بینی شده‌ها برای عمل جذب سطحی

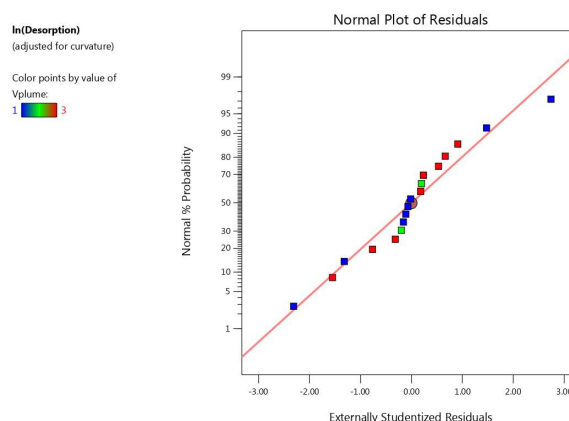
۱۰۰ درجه سانتی‌گراد؛ زمان واجذب، ۱۵ دقیقه؛ غلظت و حجم حلال واجذب، ۰/۸ مولار سدیم کلرید و ۱ میلی-لیتر.

## مقایسه پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر با سایر روش‌ها

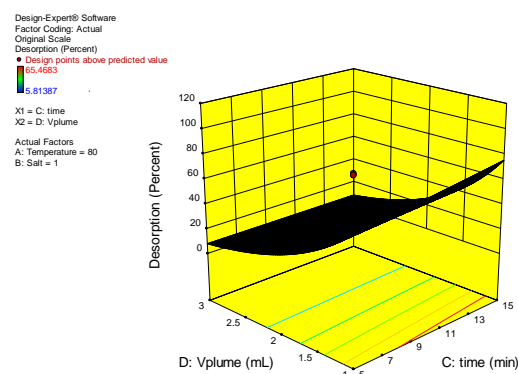
در جدول (۷) مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده قبلی مقایسه شده است. همچنین جاذب‌های متفاوتی شامل بنتونیت و بتاسیکلودکسترین نیز برای اندازه‌گیری مواد مختلف به کار برده شده‌اند. تاکنون جاذب بنتونیت/بتاسیکلودکسترین/نانوذرات آهن برای اندازه‌گیری تریگونلین به کار برده نشده بود. این روش یک روش انتخابی و موثر با کاربردهای بی‌شمار است. ذرات رسی اصلاح شده با کاتیون‌هایی از آلومینیم، آهن، لانتانیم یا افزایش می‌دهند. کاتیون‌ها به عنوان پایه‌ها و ستون‌های بین لایه‌های رسی هستند و بنابراین مساحت سطحی، حجم روزه و تخلخل را افزایش می‌دهند. مواد معدنی رسی به دلیل هزینه پایین، توزیع گسترده و خواص فیزیکوشیمیایی بالا (به طور مثال مساحت سطحی ویژه بالا، توانایی تبادل یونی، پایداری مکانیکی و ساختار لایه-ای<sup>۱</sup>) به عنوان مناسب‌ترین مواد شناخته شده‌اند.



شکل ۱۵- نمودار باکس - ساکس برای عمل واجذب تریگونلین



شکل ۱۶- نمودار باقیمانده‌ها در مقابل پیش‌بینی شده‌ها برای عمل واجذب



شکل ۱۷- منحنی سه‌بعدی برای بررسی تغییرات پاسخ نسبت به دو متغیر برای واجذب تریگونلین توسط نانوکامپوزیت B/I/C در شرایط بهینه

در نهایت شرایط بهینه جذب و واجذب به دست آمده از طراحی آزمایش عبارت بودند از: pH محلول، ۴/۵؛ زمان جذب، ۵ دقیقه؛ مقدار جاذب، ۰/۰۵ گرم؛ دمای واجذب،

<sup>1</sup> Lamillar



جدول ۷- مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده قبلی

Pre-analysis Method	Recovery%	Apparatus	Reference
Isotope dilution analysis	98.5-104.5	LC-MS/MS	[19]
Protein Predication	-	UPLC	[20]
Liquid-liquid extraction	73.52	UPLC-MS/MS	[21]
Liquid-liquid extraction	84.9	HPLC-MS	[22]
Magnetic Solid phase Extraction	106	HPLC	Present study

تکرار آزمایش محاسبه و مقدار انحراف استاندارد نسبی به ترتیب برابر با ۴/۴۷، ۳/۱۲، ۲/۸۰، ۳/۱۳ و ۱/۰۶ درصد تعیین شد که نشان‌دهنده دقت بالای روش پیشنهادی می‌باشد.

### آنالیز نمونه پلاسما

به منظور بررسی کارایی روش ارائه شده در اندازه‌گیری تریگونلین در نمونه‌ی حقیقی، نمونه‌ی پلاسمای خون تهیه گردید و تحت شرایط بهینه‌ی جذب و واجذب انجام و در نهایت به دستگاه HPLC تزریق گردید. نتیجه این بررسی در جدول (۸) خلاصه شده است. همان‌گونه که مشخص است استخراج با نانوجاذب مغناطیسی دقت و صحت مناسبی را برای اندازه‌گیری آنالیت مورد نظر تامین می‌کند.

### ارقام شایستگی روش

به منظور معتبرسازی روش، ارقام شایستگی آن شامل حد تشخیص، محدوده خطی، دقت و صحت مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده‌ی خطی روش در گستره‌ی غلظتی برابر ۰/۰۵-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ضریب همبستگی  $(r^2=0/9998)$ ، حد تشخیص (LOD) و حد کمی‌سازی (LOQ) به ترتیب ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بازده استخراج ۱۱۴ درصد به دست آمد. درصد بازبافت بدست آمده قابل قبول و جهت تعیین مقدار کمی تریگونلین در نمونه‌ی پلاسما کافی می‌باشد. انحراف استاندارد نسبی به عنوان معیاری از دقت روش محاسبه شد. جهت تعیین انحراف استاندارد نسبی، غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تریگونلین انتخاب شد و فرآیند استخراج سه بار متوالی تکرار شد. انحراف استاندارد و میانگین برای این سه بار

جدول ۸- نتایج مربوط به آنالیز نمونه حقیقی (n=3)

نمونه	مقدار اضافه شده (µg/ml)	مقدار به دست آمده (µg/ml)	بازده %
پلاسما	-	-	
پلاسمای آلوده به تریگونلین	۰/۵۰	۰/۵۳	۱۰۶

بین ذرات، نیروهای واندروالسی و سطح انرژی بالا است که منجر به افت واکنش‌پذیری در سیستم‌های عادی می‌گردد [۲۳].

کاربرد نانوذرات آهن در ترکیب با مواد رسی بر حل مشکلاتی مانند تجمع نانوذرات در محلول آبی کمک می‌کند. توانایی جذب سطحی برای کاتیون‌ها، داروها و رنگ‌ها به وسیله بتاسیکلودکسترین تایید شده‌اند.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه کامپوزیت نانوذرات آهن/ بنتونیت/ بتا سیکلودکسترین سنتز شد و همچنین ساختار آن مورد بررسی قرار گرفت. این ترکیب به عنوان یک جاذب استخراج فاز جامد مغناطیسی برای استخراج تریگونلین از پلاسما انتخاب گردید. مهم‌ترین مشکل نانوذرات آهن خالص تمایل به تجمع به دلیل جذب مغناطیسی قوی در

4- Laila O, Murtaza I, Abdin MZ, Ahmad S, Khan MS. Development and validation of a high-performance thin-layer chromatography based method for the quantification of trigonelline in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. 2019; 32(2):95-102.

5- Perrone D, Donangelo CM, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food chemistry*. 2008;110(4): 1030-5.

6- Cheng Z-X, Jin-Jun W, Zhong-Qiu L, Na L. Development of a hydrophilic interaction chromatography-UPLC assay to determine trigonelline in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Chinese journal of natural medicines*. 2013;11(2):164-70.

7- Zhang J, Liu D, Meng X, Shi Y, Wang R, Xiao D, et al. Solid phase extraction based on porous magnetic graphene oxide/ $\beta$ -cyclodextrine composite coupled with high performance liquid chromatography for determination of antiepileptic drugs in plasma samples. *Journal of Chromatography A*. 2017;1524:49-56.

8- Midttun Ø, Ulvik A, Nygård O, Ueland PM. Performance of plasma trigonelline as a marker of coffee consumption in an epidemiologic setting. *The American journal of clinical nutrition*. 2018;107(6):941-7.

9- Wen C, Lin C, Cai X, Ma J, Wang X. Determination of sec-O-glucosylhamaudol in rat plasma by gradient elution liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2014;944:35-8.

10- Shi L-n, Lin Y-M, Zhang X, Chen Z-l. Synthesis, characterization and kinetics of bentonite supported nZVI for the removal

سیکلودکسترینها الیگوساکاریدهای حلقوی هستند که حفره بیرونی آبدوست و داخلی آب‌گریز دارند [۲۴].

سیکلودکسترینها قادر به افزایش پایداری نانوذرات مغناطیسی در آب بوده و پراکندگی در محیط آبی را برای مدت طولانی تر بهبود می‌دهند. سیکلودکسترینها همراه با مولکول‌های آلی، معدنی، بیولوژیکی و دارویی به کار برده می‌شوند و با مولکول‌های میزبان کمپلکس تشکیل می‌دهند [۲۵]. در مطالعات قبلی تکنیک استخراج مایع-مایع [۲۱-۲۲]، رسوب‌گذاری پروتئین [۲۰] و آنالیز رقیق سازی ایزوتوپی [۱۹] برای استخراج تریگونلین در نمونه‌های بیولوژیکی گزارش شده است. روش فعلی دارای مزیت‌های مهمی مانند تمایل ویژه به آنالیت و استفاده از حلال‌های اقتصادی و کم هزینه است که نسبت به حلال‌های آلی گران قیمت ارجحیت دارد و بازده مطلوب‌تری را داراست. پس از به‌دست آوردن شرایط بهینه، استخراج تریگونلین از نمونه پلاسما موجود با روش HPLC توسعه داده شد.

## References

1- Mohamadi N, Sharififar F, Pournamdari M, Ansari M. A review on biosynthesis, analytical techniques, and pharmacological activities of trigonelline as a plant alkaloid. *Journal of dietary supplements*. 2018; 15(2):207-22.

2- Hosseini Z, Hassanloo T, Kowsari M, Majidian M. Trigonelline as an anti-diabetic metabolite increased in inoculated fenugreek by *Trichoderma*. *Advanced Research in Microbial Metabolites and Technology*. 2019;2(1):65-75.

3- Lorigooini Z, Dehsahraei KS, Bijad E, Dehkordi SH, Amini-Khoei H. Trigonelline through the attenuation of oxidative stress exerts antidepressant-and anxiolytic-like effects in a mouse model of maternal separation stress. *Pharmacology*. 2020;105 (5-6):289-99.

- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles for potential use in epilepsy disorder. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:6481.
- 18- Khoobi M, Khalilvand-Sedagheh M, Ramazani A, Asadgol Z, Forootanfar H, Faramarzi MA. Synthesis of polyethyleneimine (PEI) and  $\beta$ -cyclodextrin grafted PEI nanocomposites with magnetic cores for lipase immobilization and esterification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2016;91(2):375-84.
- 19- Lang R, Yagar EF, Eggers R, Hofmann T. Quantitative investigation of trigonelline, nicotinic acid, and nicotinamide in foods, urine, and plasma by means of LC-MS/MS and stable isotope dilution analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(23):11114-21.
- 20- Cheng Z-X, Jin-Jun W, Zhong-Qiu L, Na L. Development of a hydrophilic interaction chromatography-UPLC assay to determine trigonelline in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Chinese journal of natural medicines*. 2013;11(2):164-70.
- 21- Pang H-Q, Tang Y-P, Cao Y-J, Tan Y-J, Jin Y, Shi X-Q, et al. Comparatively evaluating the pharmacokinetic of fifteen constituents in normal and blood deficiency rats after oral administration of Xin-Sheng-Hua Granule by UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2017;1061:372-81.
- 22- Caporaso N, Whitworth MB, Grebby S, Fisk ID. Non-destructive analysis of sucrose, caffeine and trigonelline on single green coffee beans by hyperspectral imaging. *Food Research International*. 2018;106:193-203.
- 23- Abd Malek NN, Jawad AH, Abdulhameed AS, Ismail K, Hameed B. New magnetic Schiff's base-chitosan-glyoxal/fly ash/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> biocomposite for the removal of Cr (VI) from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*. 2011;171(2):612-7.
- 11- Khan, K.A., Suidan, M.T. and Cross, W.H., "Anaerobic activated carbon filter for the treatment of phenol-bearing wastewater." *J. Water Pollut. Control Fed.*, 1519-1532, 1981.
- 12- Faraji, M., Yamini, Y., Rezaee, M., "Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications", *J. Iran. Chem. Soc.*, 7, 1-37, 2010.
- 13- Márquez-Sillero I, Cárdenas S, Valcárcel M. Determination of water-soluble vitamins in infant milk and dietary supplement using a liquid chromatography online coupled to a corona-charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*. 2013;1313:253-8.
- 14- Shahwan T, Üzümlü Ç, Eroğlu AE, Lieberwirth I. Synthesis and characterization of bentonite/iron nanoparticles and their application as adsorbent of cobalt ions. *Applied Clay Science*. 2010;47(3-4):257-62.
- 15- Abdolmohammad-Zadeh H, Talleb Z. Magnetic solid phase extraction of gemfibrozil from human serum and pharmaceutical wastewater samples utilizing a  $\beta$ -cyclodextrin grafted graphene oxide-magnetite nano-hybrid. *Talanta*. 2015;134:387-93.
- 16- Mohamadi N, Sharififar F, Pournamdari M, Ansari M. Determination of trigonelline in human plasma by magnetic solid-phase extraction: a pharmacokinetic study. *Nanomedicine*. 2020;16(4):323-33.
- 17- Hashemian M, Ghasemi-Kasman M, Ghasemi S, Akbari A, Moalem-Banhangi M, Zare L, et al. Fabrication and evaluation of novel quercetin-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-

25- Huang X, Yi C, Fan Y, Zhang Y, Zhao L, Liang Z, et al. Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles grafted with single-chain antibody (scFv) and docetaxel loaded β-cyclodextrin potential for ovarian cancer dual-targeting therapy. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;42:325-32.

anionic azo dye: An optimized process. *International journal of biological macromolecules*. 2020;146:530-9.

24- Kudr J, Haddad Y, Richtera L, Heger Z, Cernak M, Adam V, et al. Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications. *Nanomaterials*. 2017;7(9):243.

## Extraction of Trigonelline from Pasma Using a New Magnetic Composite Through the Application of Experimental Design

Mahdieh Abbasi Meymand<sup>1</sup>, Maryam Kazemipour\*<sup>2</sup>, Mehdi Ansari<sup>3</sup>, Mehdi Shahidi<sup>4</sup>

1- PhD student, Department of Chemistry, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

2- Professor, Department of Chemistry, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

3- Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4- Associate Professor, Department of Chemistry, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Corresponding author: m.kazemipour@iauk.ac.ir

Received: 27/9/2022, Accepted: 8/12/2022

### Abstract

Bentonite- $\beta$ -cyclodextrin-iron nanoparticles (Ben- $\beta$ CD-INP) composite was synthesized, characterized, and utilized like an innovative magnetic solid-phase extraction (MSPE) adsorbent to separate and preconcentrate nicotinic acid *N*-methylbetaine (NAMB). Experiment conditions to find important variables of NAMB adsorption on the Ben- $\beta$ CD-INP were A: time, B: Adsorbent amount, C: pH, and for desorption were A: temperature, B: concentration, C: time, and D: Volume. The adsorbent contributes significantly in the extraction process. The INP in the nanocomposite makes it easy to remove the adsorbent with the help of a magnet. Scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), transmission electron microscopy (TEM), vibrating sample magnetometry (VSM), and X-ray diffraction (XRD) were used to characterize the synthesized adsorbent. Experimental design was used to optimize the factors affecting extraction. trigonelline in plasma samples was extracted and evaluated by a reversed-phase HPLC–UV method. The findings have shown that MSPE was able to extract NAMB efficiently. The developed HPLC–UV procedure for the determination of NAMB in human plasma, showed linear relationship in the concentration interval of 0.05-10 $\mu$ g/mL ( $r=0.9998$ ) with the limit of detection (LOD), the limit of quantitation (LOQ) and recovery (%) of 0.005, 0.018  $\mu$ g/mL, and 114%, respectively. The procedure was successfully used to determine the concentration of trigonelline in human plasma. This study offers a promising hybrid nano-biomaterial adsorbent in biomedical nanotechnology to selective measurement of the drug or supplements such as trigonelline from plasma.

**Keywords:** Trigonelline,  $\beta$ -Cyclodextrin, Bentonite, Magnetic Solid-Phase Extraction, Plasma