



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>



Research Article

Determining the Amount of Pethidine Hydrochloride and Thebaine Alkaloids by Chemiluminescence Method

Massoud Karimi, Ali Mokhtari* , Ali Akbar Dehno Khalaji 

Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 09/May/2021

Revised: 04/Mar/2022

Accepted: 23/Nov/2022

Keywords:

Chemiluminescence,
Sensitizer, Narcotic,
Thebaine, Pethidine
hydrochloride,
Rhodamine 6G,
Ru(phen)₃²⁺

ABSTRACT

The aim of this work was finding new fluorescent dyes as sensitizers for chemiluminescence (CL) determination some of narcotics. In this way 6 different dyes including rhodamine 6G, brilliant blue, orange G, chromatrope, eosinY and [Ru(phen)₃]²⁺ and 14 drugs including pethidine hydrochloride, thebaine, dextromethorphan, acetaminophen, codeine, oxymorphone, oxycodone, morphine, pholcodine, naltrexone, buprenorphine, methadone, tramadol, diphenoxylate were investigated. In the preliminary experiments, we found that pethidine hydrochloride in CL system of [Ru(phen)₃]²⁺- Ce(IV) and thebaine in CL system of rhodamine 6G- Ce(IV) could be determined. After optimizing the important variables, linear dynamic range for pethidine hydrochloride and thebaine were 5.6×10^{-7} to 1.4×10^{-3} mol L⁻¹ and 1.0×10^{-5} to 4.0×10^{-4} mol L⁻¹ and limit of detection were 7.1×10^{-8} mol L⁻¹ and 4.3×10^{-6} mol L⁻¹, respectively. The percent of relative standard deviation for pethidine hydrochloride and thebaine were 5.7 and 4.0%, respectively.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2022.23378.1970>

© 2023 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Associate Professor of Analytical Chemistry. E-mail address: a.mokhtari@gu.ac.ir

How to cite this article: Karimi, M., Mokhtari, A., & Dehno Khalaji, A. (2023). Chemiluminescence determination of pethidine hydrochloride and thebaine alkaloides. *Applied Chemistry*, 18(68), 83-106. (in Persian)

تعیین مقدار آلکالوئیدهای پتیدین هیدروکلراید و تبائین به روش نورتابی شیمیایی

مسعود کریمی، علی مختاری*، علی اکبر دهنو خلجی

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۰۲/۱۹

تاریخ تصحیح: ۰۰/۱۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۰۱/۰۹/۰۲

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی چند نمونه رنگ فلئوئورسانس کننده به عنوان حساس کننده در تعیین مقدار مواد مخدر به روش نورتابی شیمیایی است. برای این منظور تعداد ۶ رنگ مختلف شامل ردامین 6G، برلینت بلو، اورنج G، کروماتروپ، ائوسین Y و دی کلرو تریس (۱۰-فئاترولین) روتنیوم (II) هیدرات $[Ru(phen)_3]^{2+}$ و تعداد ۱۴ ماده مخدر و ضد درد شامل پتیدین هیدروکلراید، تبائین، دکسترومتورفان، استامینوفن، کدئین، اکسی مورفون، اکسی کدون، مورفین، فولکدین، نالتراکسون، بوپرنورفین، متادون، ترامادول و دیفنوکسیلات مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی های اولیه مشخص شد ترکیب پتیدین هیدروکلراید در سیستم نورتابی شیمیایی $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Cerium(IV) و ترکیب تبائین در سیستم نورتابی شیمیایی ردامین 6G-Cerium(IV) قابل تعیین هستند. پس از بهینه سازی متغیرهای تاثیر گذار، ناحیه خطی و حد تشخیص برای پتیدین هیدروکلراید به ترتیب $5/6 \times 10^{-7}$ تا $1/4 \times 10^{-3}$ و $7/1 \times 10^{-4}$ مولار و برای تبائین 1×10^{-5} تا 4×10^{-4} و $4/3 \times 10^{-6}$ مولار محاسبه شد. درصد انحراف نسبی برای پتیدین هیدروکلراید و تبائین به ترتیب ۵/۷ و ۴/۰ درصد بدست آمد.

کلمات کلیدی: نورتابی شیمیایی، حساس کننده، مخدر، تبائین، پتیدین هیدروکلراید، ردامین 6G، $[Ru(phen)_3]^{2+}$.

۱- مقدمه

نورتابی شیمیایی عبارت است از نشر نور در یک واکنش شیمیایی. در روش نورتابی شیمیایی برخلاف فلئوئورسانس و فسفرسانس از هیچ منبع تابشی استفاده نمی شود که این امر باعث می شود نشر نور زمینه حاصل از منبع تابش حذف شود و تشخیص سطوح بسیار پائین نور امکان پذیر باشد؛ بنابراین می توان انتظار داشت که حد تشخیص در این روش ها بسیار پائین باشد (Littlejohn, 1994). سادگی دستگاه یکی از مهمترین مزایای روش نورتابی شیمیایی است ضمن اینکه در دستگاه نورتابی شیمیایی تکفامساز وجود ندارد؛ به همین دلیل نور حاصل از واکنش شیمیایی بدون تضعیف به آشکارساز می رسد (Vitha, 2018). اندازه گیری کمی در نورتابی شیمیایی به دو روش پیمانه ای و تزریق در جریان انجام می شود. در روش پیمانه ای همه مواد بجز اکسید کننده به داخل سل واکنش از جنس کوارتز منتقل می شوند. سپس اکسید کننده به داخل سل تزریق می شود و نور ایجاد شده نسبت به زمان رسم و ثبت می گردد. در روش تزریق در جریان مواد واکنش دهنده توسط پمپ به داخل سل واکنش تزریق می شوند. در این روش نمونه از طریق تزریق در جریانی از حلال حامل، وارد سل واکنش می شود و با دیگر واکنشگرها وارد واکنش می شود. یکی از کاربردهای نورتابی شیمیایی در تجزیه گازها، آلاینده های هوا و محیط زیست می باشد. به عنوان مثال برای آنالیز اکسیدهای نیتروژن، پراکسیدها، دی اکسید گوگرد (Tsuji, Stanley, Kricka, Maeda, & Matsumoto, 2005);

Azad, 2019) و آلاینده‌هایی نظیر مرکاپتان‌ها و دی‌متیل سولفید (Worsfold, Townshend, Poole, & Miró, 2019) استفاده شده است. همچنین از نورتابی شیمیایی برای شناسایی و تجزیه مواد بیولوژیکی نظیر اسیدهای نوکلئوتید DNA (Pavlov et al., 2004)، کمک در تشخیص برخی سرطان‌ها (Ram & Siar, 2005)، اندازه‌گیری آنزیم‌ها، سوپسترها و متابولیت‌ها برای شناسایی تغییرات غلظت کلسیم در سلول‌های زنده و رادیکال‌های اکسیژن نیز استفاده شده است (Cao, Yang, Sun, Zhang, & Gao, 2005; Francis & Adcock, 2005; Lara, García-, 2019; Campaña, & Aaron, 2010; Tsunoda & Imai, 2005; Worsfold et al., 2019).

پتیدین که در ابتدا مپریدین نامیده می‌شد جزو داروهای مخدر سنتزی است و برای اولین بار در سال ۱۹۳۹ برای درمان اختلالات حرکتی ناشی از مصرف روانگردان سنتز شد اما خیلی زود خواص ضد درد آن نیز کشف شد (Latta, Ginsberg, 2002 & Barkin). این ترکیب دارای قدرت کمتر و دوره اثرگذاری پائین‌تری از مورفین است (حدود یک دهم مورفین). یکی از موارد پرکاربرد این دارو کاهش لرزش پس از جراحی (مخصوصاً سزارین) است. همچنین از آن به عنوان داروی پیش‌بیهوشی و به منظور افزایش اثر داروهای هوشبر و به عنوان ضد درد، استفاده می‌کنند. طول مدت اثر پتیدین پس از تزریق یک ساعت است و مصرف بیش از اندازه آن می‌تواند باعث تشنج شود (Shahraki, Jabalameli, & Ghaedi, 2012).

تبائین یک نوع آلکالوئید است که از گیاهان گونه پاپاور براکت‌اتوم (خشخاش سیاه) بدست می‌آید. این گیاه در کوه‌های البرز، دامنه‌های دماوند در ناحیه پلور در سطح وسیع، بطور وحشی می‌روید و دارای مقادیر قابل توجهی آلکالوئید تبائین می‌باشد و در عین حال بدون مورفین و سایر آلکالوئیدهای مخدر و اعتیاد آور است. حلالیت تبائین در آب بسیار کم است اما به میزان ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در کلروفورم حل شده و محلول زرد رنگی ایجاد می‌کند. تبائین در تولید داروهای ضد درد نظیر بوپرنورفین، نالوکسون، اکسی‌کدون، اکسی‌مورفون و داروهای ترک اعتیاد کاربرد دارد (Guha, 2003). اتورفین و برخی از آنالوگ‌های آن که از تبائین تهیه می‌شوند، فعالیت بیشتری نسبت به مورفین دارند و در دامپزشکی برای بی‌هوش کردن حیوانات وحشی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ramanathan & Chandra, 1980).

تاکنون روش‌های محدود نورتابی شیمیایی برای تعیین مقدار تبائین و پتیدین پیشنهاد شده است از جمله در سال ۱۹۹۸ بارت و همکارانش، با روش الکتروفورز موئین (CE) ترکیبات کدئین، ۶-متوکسی کدئین و تبائین را از هم جداسازی و سپس با تکنیک نورتابی شیمیایی توسط حساس‌کننده $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ مقدار آنها را مشخص کردند. در این روش حد تشخیص برای تبائین $10^{-7} \times 10^{-7}$ مولار بدست آمد (Barnett, Hindson, Lewis, & Purcell, 1998). کاستین و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مشابه همین تحقیق را برای مخلوط آلکالوئیدهای مورفین، کدئین، اوری‌پاوین و تبائین انجام دادند با این تفاوت که از HPLC برای جداسازی آنها استفاده کردند و حد تشخیص تبائین $10^{-9} \times 10^{-9}$ مولار بدست آمد (Costin et al., 2007).

انصافی و همکارانش، در سال ۲۰۰۹ با کمک روش‌های کمومتریکس، دو ترکیب تبائین و نوسکاپین را بطور همزمان با نورتابی شیمیایی در سیستم $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ -Cerium(IV) اندازه‌گیری کردند و حد تشخیص تبائین را $1/0 \times 10^{-7}$ مولار بدست آوردند (Ensaf, Hasanpour, Khayamian, Mokhtari, & Taei, 2010).

در سال ۲۰۰۰ سونگ و گیلیان از نورتابی الکتروشیمیایی برای تعیین مقدار پتیدین، آتروپین، هوماتروپین و کوکائین استفاده کردند و حد تشخیص برای پتیدین $6/8 \times 10^{-8}$ مولار بدست آمد (Song, Greenway, & McCreedy, 2001). در سال ۲۰۰۲ گرینوود و همکارانش آتروپین و پتیدین هیدروکلراید را بر پایه نورتابی شیمیایی و با سیستم آنالیز میکروتوتال (μ TAS) تعیین مقدار کردند و حد تشخیص $7/7 \times 10^{-8}$ مولار را برای پتیدین گزارش کردند. این گروه در این روش از $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ به عنوان حساس کننده استفاده کردند که به $[Ru(bipy)_3]^{3+}$ اکسید شده و سپس با پتیدین وارد واکنش می‌شود و نوری با طول موج حداکثر ۶۲۰ نانومتر تولید می‌کند (Greenwood, Merrin, McCreedy, & Greenway, 2002).

ترکیبات رنگی یا رنگدانه‌ها کاربردهای متفاوتی در شیمی تجزیه دارند. یکی از مهمترین کاربردها به عنوان شناساگر در تیتراسیون‌ها می‌باشد. به عنوان مثال می‌توان به فتالئین‌ها، متیل رد و متیل اورانژ اشاره کرد که در محیط اسیدی و بازی رنگ‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند (Sabnis, 2007). دسته دیگری از رنگ‌ها، رنگ‌هایی هستند که خاصیت فلئورسانس از خود نشان می‌دهند؛ مانند رُدامین 6G، رُدامین B، دی کلرو تریس ۱،۱۰-فنانترولین روتنیوم (II) ($[Ru(phen)_3]^{2+}$), کینین، ریبوفلاوین، زانتن، آئوسین Y و ... از این نوع رنگ‌ها می‌توان در نورتابی شیمیایی به عنوان حد واسط (فلوروفور) استفاده کرد (Adcock et al., 2011; Christie, 2014). بطور مثال از زانتن برای تعیین مقدار آزون در هوا استفاده شده است (Mikuška & Večeřa, 1998). همچنین رنگ‌هایی مانند ۴،۵-دی هیدروکسی فلئورسین، پیروگال رد، بروموپروگال رد در حضور کاتیون‌هایی مانند Co(II)، Fe(III) و Ni(II) به عنوان کاتالیزور، یک نورتابی قوی از خود نشان می‌دهند (G. Chen & Huang, 1988). از کمپلکس $Ru(phen)_3^{2+}$ برای اندازه‌گیری اگزالیک اسید (He & Gao, 1997)، کدئین (Rezaei, Khayamian, & Mokhtari, 2009) و DNA (Han, He, & Zeng, 1999)، و از رُدامین 6G برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی (Cui, Zhang, Myint, Ge, & Liu, 2006) استفاده شده است.

هنگام استفاده از رنگ‌های فلئورسانس کننده در واکنش‌های نورتابی شیمیایی، این امکان وجود دارد که درصدی از مولکول‌های رنگی بتوانند انرژی برانگیختگی خود را از واکنش شیمیایی کسب کنند و با نشر نور به حالت پایه باز گردند. بنابراین رنگ‌های فلئورسانس کننده را در برخی موارد می‌توان توسط یک واکنش شیمیایی برانگیخته نمود و نشر نور آنها را ثبت کرد. هدف از این تحقیق یافتن روش‌های نورتابی شیمیایی جدید جهت تعیین مقدار ترکیبات مخدر می‌باشد. برای این منظور تعدادی از ترکیبات دارویی مخدر در چند سیستم نورتابی شیمیایی شامل حساس کننده‌های رنگی رُدامین 6G، برلینت بلو، اورنج G،

کروماتروپ، ائوسین Y و $[Ru(phen)_3]^{2+}$ مورد بررسی قرار گرفتند. ترکیبات دارویی ضد درد و مخدر شامل پتیدین هیدروکلراید، تبائین، دکسترومتورفان، استامینوفن، کدئین، اکسی مورفون، اکسی کدون، مورفین، فولکدین، نالترکسون، بوپرنورفین، متادون، ترامادول و دیفنوکسیلات بودند. نتایج بررسی‌های اولیه و سوابق تحقیقاتی موجود و جدید بودن روش‌های نورتایی شیمیایی باعث شد تا سیستم ردامین 6G-Cerium(IV) برای ترکیب تبائین و سیستم $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Cerium(IV) برای داروی پتیدین هیدروکلراید انتخاب شوند. ضمن این‌که این دو ترکیب، در چند سیستم نورتایی متداول شامل $KMnO_4-H_2SO_4$ ، $KMnO_4-H_2SO_4-Na_2SO_3$ و $Luminol-H_2O_2$ نیز جهت مقایسه، مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- بخش تجربی

تمام مواد و واکنشگرهای مورد استفاده در این تحقیق از مواد شیمیایی با خلوص تجزیه‌ای می‌باشند و بدون هیچ‌گونه خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. در تمام مراحل برای تهیه محلول‌ها از آب دیونیزه استفاده شده است.

۲-۱- تهیه محلول‌های مورد نیاز

محلول‌های Cerium(IV) (Ce(IV))، از نمک سریم آمونیوم نترات تهیه شدند. محلول‌های Ce(IV) بایستی در محلول‌های اسیدی تهیه شوند از طرفی غلظت سولفوریک اسید نیز یک متغیر مهم و موثر بر شدت نورتایی شیمیایی است، به همین دلیل نمی‌توان مستقیماً یک محلول غلیظ از آن را تهیه و سایر محلول‌ها را از رقیق‌سازی آن به دست آورد. لذا جهت تهیه کلیه محلول‌های Ce(IV) اسیدی، ابتدا مقدار محاسبه شده از نمک سریم آمونیوم نترات توزین و به یک بالن ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس حجم محاسبه شده از سولفوریک اسید ۱/۰ مولار به آن اضافه شد. پس از انحلال کامل توسط اسید، با آب دیونیزه به حجم رسانده شد.

جهت تهیه محلول $10^{-3} \times 1/0$ مولار از کمپلکس $[Ru(phen)_3]^{2+}$ ، مقدار ۰/۰۷۲۷ گرم از کمپلکس به یک بالن ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و توسط آب دیونیزه به حجم رسانده شد.

جهت تهیه محلول با غلظت $10^{-3} \times 2/0$ مولار از ردامین 6G، مقدار ۰/۲۳۹۵ گرم از جامد آن به یک بالن ۲۵۰/۰ میلی‌لیتری منتقل و توسط آب دیونیزه به حجم رسانده شد. سایر محلول‌ها از رقیق‌سازی محلول اولیه تهیه گردید.

به منظور تهیه محلول اولیه تبائین (تماد، ایران) با غلظت $10^{-2} \times 1/0$ مولار، ۰/۳۱۱۴ گرم از استاندارد جامد آن توزین، و به بالن ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری منتقل شد. برای انحلال کامل تبائین ۲۰ میکرولیتر هیدروکلریدریک اسید به آن اضافه، سپس با آب دیونیزه به حجم رسانده شد.

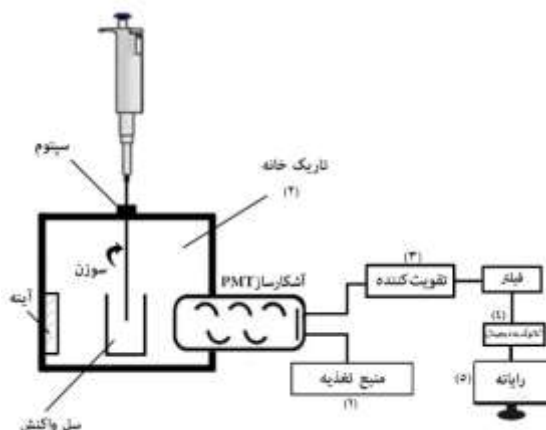
جهت تهیه محلول پتیدین هیدروکلراید با غلظت $10^{-3} \times 1/76$ مولار، مقدار ۰/۰۵۰۰ گرم از نمک پتیدین هیدروکلراید به یک بالن ۱۰۰/۰ میلی‌لیتری، منتقل و با آب دیونیزه به حجم رسانده شد. محلول‌های دیگر از طریق رقیق‌سازی این محلول بدست آمد.

۲-۲- آماده سازی آمپول پتیدین هیدروکلراید

آمپول های تجاری یک میلی لیتری از پتیدین هیدروکلراید محتوی ۵۰ میلی گرم از ماده دارویی از شرکت داروسازی ابوریحان تهیه شد. سپس محتویات یک عدد آمپول بطور کمی به یک بالن ۱۰۰/۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس محلول بدست آمده چندین بار رقیق سازی شد تا غلظت نهایی آن در محدوده خطی منحنی درجه بندی قرار گیرد.

۲-۳- ابزار اندازه گیری

دستگاه نورتابی شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق، در دانشگاه گلستان طراحی و ساخته شده است. سل این دستگاه از جنس کوارتز شفاف با طول مسیر یک سانتی متر که درون یک محفظه به نام اتاق تاریک قرار گرفته است تا از رسیدن نور محیط به آن جلوگیری شود. نور ایجاد شده در سل واکنش به واسطه یک آشکارساز PMT مدل FEU-118 که در نزدیک ترین فاصله از سل واکنش قرار داده شده اندازه گیری می شود. این آشکارساز خود به یک منبع تغذیه ولتاژ بالا (تا ۱۲۰۰ ولت) متصل می باشد. هنگام برخورد فوتون های نور با آشکارساز، جریانی در حد دهم میلی آمپر در مدار آشکارساز ایجاد می گردد و جریان ایجاد شده در آن ابتدا توسط یک تقویت کننده جریان به ولتاژ، به ولتاژ الکتریکی تبدیل می گردد و بعد این ولتاژ به سیستم تبدیل کننده آنالوگ به دیجیتال ۱۶ بیتی فرستاده می شود که این سیستم توسط یک پورت درگاه به رایانه متصل است. در نهایت پس از تبدیل ولتاژ مورد نظر به داده دیجیتال، این داده به صورت تابعی از زمان در نرم افزار مربوطه نمایش داده می شود و به صورت فایل اکسل در رایانه ثبت می گردد. در شکل ۱ نمای شماتیک دستگاه نورتابی شیمیایی نشان داده شده است.



شکل ۱. نمای شماتیک دستگاه نورتابی شیمیایی. اجزای دستگاه از ۱ تا ۵ به ترتیب شامل: منبع تغذیه ۱۲۰۰ ولتی، تاریک خانه، تقویت کننده (I to V)، تبدیل کننده آنالوگ به دیجیتال ۱۶ بیتی و رایانه. PMT: لوله فتوتکثیر کننده

۲-۴- روش کلی کار

روش انجام کلیه آزمایش ها و همچنین نحوه بهینه سازی پارامترهای مؤثر در همه اندازه گیری ها یکسان بود. ابتدا ۴۰۰ میکرو لیتر از محلول رنگ یا حساس کننده مانند $[Ru(phen)_3]^{2+}$ ، رُد آمین 6G، سدیم سولفیت و یا لومینول به سل واکنش منتقل شد.

سپس برای تست شاهد، ۴۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه توسط یک میکروپیپت به سل واکنش انتقال داده شد و سل در جایگاه مخصوص، درون تاریک خانه قرار گرفت. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اکسنده توسط میکروپیپت و یک سوزن استیل بلند به سل واکنش تزریق گردید. اکسنده یکی از ترکیبات $Ce(IV)$ ، پرمنگنات پتاسیم، پراکسید هیدروژن، سدیم پریدات یا پتاسیم فری سیانید بود. پس از ثبت پاسخ نورتابی شیمیایی برای نمونه شاهد، در ادامه همین شیوه برای نمونه‌های استاندارد و نمونه حقیقی تکرار شد، با این تفاوت که بجای آب دیونیزه، ۴۰۰ میکرولیتر محلول آنالیت یا نمونه مورد تجزیه به داخل سل واکنش منتقل شد. شدت نورتابی ایجاد شده پس از آشکارسازی، به صورت فایل اکسل ذخیره‌سازی گردید. در نهایت برای به دست آوردن پاسخ تجزیه‌ای، پاسخ‌های کلیه نمونه‌های استاندارد و نمونه حقیقی منهای پاسخ شاهد گردید.

۳- بحث و نتایج تحقیق

۳-۱- بررسی‌های اولیه مواد مخدر در سیستم‌های نورتابی شیمیایی

در آزمایشات اولیه تاثیر انواع مختلف از ترکیبات دارویی مخدر در سیستم‌های نورتابی شیمیایی پیشنهادی (حساس کننده رنگی - اکسنده) مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی‌ها از دو اکسنده مختلف شامل $Ce(IV)$ اسیدی و پتاسیم پرمنگنات اسیدی و ۱۴ داروی مخدر شامل پتیدین هیدروکلراید، تبائین، دکسترومتورفان، استامینوفن، کدئین، اکسی مورفون، اکسی کدون، مورفین، فولکدین، نالتراکسون، بوپرنورفین، متادون، ترامادول و دیفنوکسیلات و رنگ‌های رُدامین 6G، $[Ru(phen)_3]^{2+}$ ، برلینت بلو، ائوسین Y، اورنج G، ریبوفلاوین و کروماتروپ استفاده گردید. در این بررسی‌ها مشخص گردید که از بین حساس کننده‌های فوق، رُدامین 6G، با اکسنده $Ce(IV)$ اسیدی فقط برای ترکیب تبائین و کمپلکس $[Ru(phen)_3]^{2+}$ با اکسنده $Ce(IV)$ اسیدی برای ترکیبات فولکودین، اکسی کدون، تبائین، کدئین، دی فنوکسیلات و دکسترومتورفان و پتیدین هیدروکلراید مطابق جدول ۱ قابل بررسی می‌باشند.

جدول ۱. نشر نورتابی شیمیایی تعدادی از ترکیبات مخدر و آلکالوئیدی در سیستم

*دارو	سیستم نورتابی شیمیایی	شدت نورتابی شیمیایی نسبی	شدت حداکثر (A.U)	زمان وقوع شدت حداکثر (ثانیه)
اکسی کدون		۱۰۰	۱۱۱۸۴	۴/۴
فولکودین		۹۱/۹	۱۰۲۸۰	۴/۴
تبائین		۴۵	۵۰۴۰	۴/۲
کدئین	$[Ru(phen)_3]^{2+}$ - $Ce(IV)$	۴۱/۲	۴۶۰۶	۶/۱
فنوکسیلات دی		۳۲/۵	۳۶۳۵	۱۰
پتیدین		۹/۲	۱۰۲۶	۳/۸
دکسترومتورفان		۷/۱	۷۹۳	۲۷/۵
تبائین	$Ce(IV)$ - رُدامین 6G	۱۰۰	۲۰۵	۴/۲

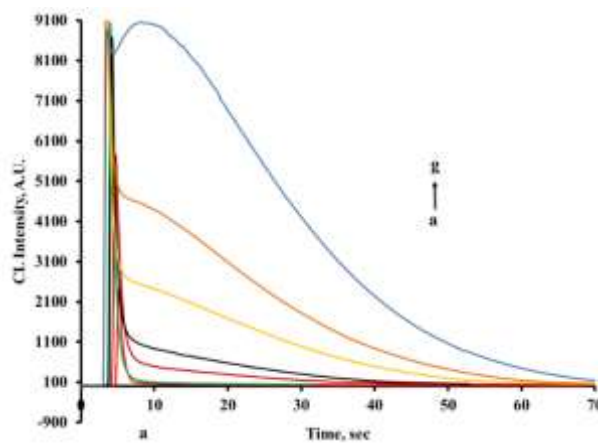
* غلظت تمام ترکیبات $4/0 \times 10^{-5}$ مولار می‌باشد.

با توجه به این که اندازه‌گیری نورتابی شیمیایی تبائین در سیستم ردامین 6G-Ce(IV) برای اولین بار پیشنهاد شده است، اندازه‌گیری این ترکیب برای ادامه کار انتخاب شد. از بین ترکیباتی که در سیستم $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Ce(IV) دارای پاسخ هستند ترکیب پتیدین با توجه به این که قبلا با یک کمپلکس روتنیوم و اکسندۀ متفاوت اندازه‌گیری شده است (Greenwood et al., 2002) برای ادامه کار انتخاب شد. داروهای فولکودین و دی‌فنوکسیلات نیز در این آزمایشگاه قبلا اندازه‌گیری شده اند (Delouei, Mokhtari, & Jamali, 2017). سایر ترکیبات نیز در سیستم $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Ce(IV) در تحقیقات گذشته بررسی شده‌اند (Bolton & Richter, 2001; D. Chen, Wang, Zhang, Ci, & Zhang, 2011; Gemba, Konishi, Sakata, & Okabayashi, 2004; Hara, Waraksa, Lean, Lewis, & Mallouk, 2000; Hong et al., 2012; Huang & Chen, 2002; Karim, Lee, Lee, Bae, & Choi, 2006; Liu & Huang, 2004; Mokhtari, Ghazaeian, Maghsoudi, Keyvanfard, & Emami, 2015; Mokhtari, Jafari Delouei, Keyvanfard, & Abdolhosseini, 2016; Ramachander, Williams, & Emele, 1977; Rezaei et al., 2009; Wallace & Bard, 1979; Xi, Ai, & He, 2003).

غیر از حساس‌کننده‌های فوق، برای یافتن بهترین سیستم نورتابی شیمیایی، ترکیبات تبائین و پتیدین در چند سیستم نورتابی متداول شامل $KMnO_4-H_2SO_4$, $KMnO_4-H_2SO_4-Na_2SO_3$ و $Luminol-H_2O_2$ نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد که در کلیه سیستم‌های یاد شده فوق، ترکیبات پتیدین هیدروکلراید و تبائین پاسخ متفاوتی را نسبت به شاهد ایجاد نکردند.

۳-۲- تعیین مقدار پتیدین هیدروکلراید در سیستم نورتابی شیمیایی $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Ce(IV)

پتیدین هیدروکلراید در سیستم نورتابی شیمیایی $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Ce(IV) دارای پاسخی در ثانیه ۳/۸ بعد از تزریق است و پیک آن بسته به غلظت بعد از حدود ۱۰ الی ۷۰ ثانیه به خط زمینه باز می‌گردد. در شکل ۲ پاسخ نورتابی شیمیایی چند غلظت مختلف از پتیدین هیدروکلراید نشان داده شده است.



شکل ۲. نمودار پروفایل زمانی ترکیب پتیدین هیدروکلراید، به ترتیب از a تا g: شاهد، غلظت ۷×10^{-7} ، $۵/۶ \times 10^{-۶}$ ، $۵/۶ \times 10^{-۵}$ ، $۱/۴ \times 10^{-۴}$ ، $۲/۸ \times 10^{-۴}$ و ۷×10^{-۴} میلی‌مولار

۳-۲-۱- بهینه‌سازی غلظت محلول $Ce(IV)$ ، سولفوریک اسید و کمپلکس $[Ru(phen)_3]^{2+}$

در این بررسی از محلول استاندارد دارو با غلظت $5/0 \times 10^{-5}$ مولار در آب دیونیزه استفاده گردید. برای تعیین متغیرهای موثر بر شدت نورتایی شیمیایی و گستره‌ی غلظتی موثر آن‌ها ابتدا آزمایش‌های اولیه بر روی متغیرهای غلظت $Ce(IV)$ و سولفوریک اسید از طریق روش یکی در یک زمان صورت گرفت. با توجه به تاثیر متقابل غلظت سولفوریک اسید و $Ce(IV)$ بر شدت نورتایی شیمیایی، غلظت $Ce(IV)$ و سولفوریک اسید بصورت همزمان بهینه‌سازی شد. در بررسی‌های اولیه گستره‌ی غلظتی موثر برای $Ce(IV)$ در محدوده‌ی $1/0 \times 10^{-4}$ مولار تا $3/0 \times 10^{-2}$ مولار و برای سولفوریک اسید در محدوده $0/1$ تا $1/0$ مولار بدست آمد. از این نتایج جهت مشخص نمودن محدوده غلظتی تاثیرگذار این دو متغیر در بهینه‌سازی همزمان آن‌ها استفاده شد. برای این منظور از طراحی آزمایش مکعب مرکز پر (CCD) با پنج سطح و روش رویه پاسخ (RSM) استفاده شد. در بررسی‌های فوق غلظت کمپلکس $[Ru(phen)_3]^{2+}$ $1/0 \times 10^{-3}$ مول برلیتر در نظر گرفته شد. در جدول ۲ نتایج بدست آمده برای آزمایش‌ها در طراحی CCD با $\alpha = 1/44$ ملاحظه می‌گردد.

جدول ۲. آزمایش‌های انتخاب شده و پاسخ آنها در طراحی CCD برای بهینه‌سازی غلظت $Ce(IV)$ و سولفوریک اسید در تعیین مقدار پتیدین هیدروکلراید

شماره آزمایش	$Ce(IV)$ غلظت (میلی مولار)	غلظت سولفوریک اسید (مولار)	پاسخ نورتایی شیمیایی ^a (S-B)
۱	۳۱	۰/۳۴	۲۷/۵
۲	۱۷	۰/۳۴	۱۰
۳	۱۷	۰/۱	۱۷۳
۴	۲۴	۰/۲۲	۱۱۰
۵	۱۷	۰/۳۴	۲۰
۶	۱۷	۰/۵۸	۱۵/۵
۷	۱۷	۰/۳۴	۱۳
۸	۲۴	۰/۴۶	۱
۹	۱۰	۰/۴۶	۳۳
۱۰	۱۰	۰/۲۲	۲۰۰
۱۱	۳	۰/۳۴	۲۱۸

^a S-B: به معنی پاسخ نمونه منهای شاهد است. نقطه مرکزی ۳ بار تکرار شده است.

نتایج فوق با استفاده از نرم افزار Design Expert آنالیز شد و در یک معادله درجه ۲ فیت شد. معادله زیر مدل فیت شده در نتایج طراحی آزمایش می‌باشد که ضرایب بی‌اهمیت آن با کمک فرضیه صفر حذف شده‌اند. در جدول ۳ ضرایب مهم این معادله ملاحظه می‌گردد.

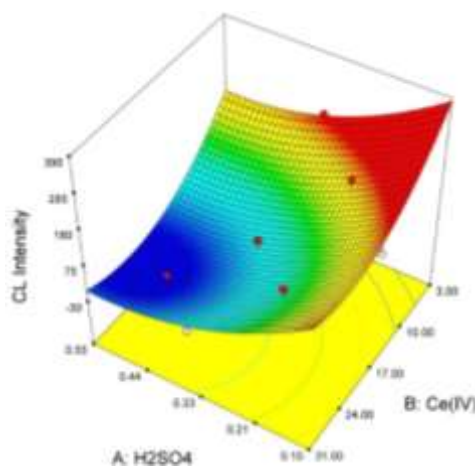
$$y = +648 - 1490C_{H_2SO_4} - 28.3C_{Ce} + 0.49C_{Ce}^2$$

$$R^2 = 0.9220$$

جدول ۳. جدول ANOVA برای تجزیه و تحلیل مدل رویه پاسخ

اهمیت	P-Value	F-Value	Source
مهم	۰/۰۰۲۷	۱۵/۱۵	مدل
مهم	۰/۰۰۱۸	۲۸/۳۲	C _{H2SO4} (A)
مهم	۰/۰۰۴	۲۰/۵۲	C _{Ce(IV)} (B)
مهم	۰/۰۱۷۳	۱۰/۶۱	B ²
غیر مهم	۰/۳۷۶۹	۱/۸۷	مقادیر فیت نشده

با استفاده از مدل فوق، همانگونه که در شکل ۳ نیز نشان داده شده است، غلظت‌های ۳/۰ میلی‌مولار Ce(IV) و ۰/۱ مولار سولفوریک اسید به عنوان غلظت‌های بهینه جهت ادامه کار انتخاب شدند.

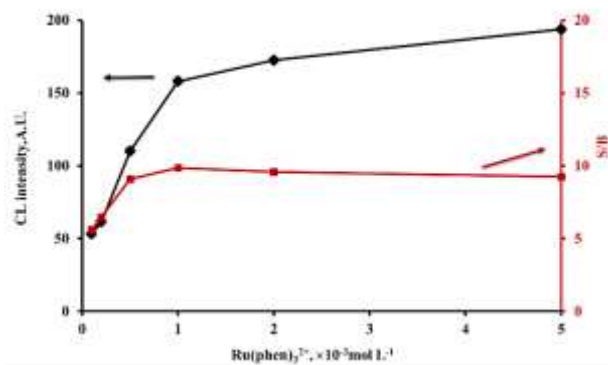


شکل ۳. بررسی همزمان اثر غلظت Ce(IV) و سولفوریک اسید بر میزان نشر نورتابی شیمیایی داروی پتیدین هیدروکلراید. (غلظت دارو $5/0 \times 10^{-5}$ مولار می‌باشد)

به منظور بهینه‌سازی تاثیر شدت نورتابی شیمیایی کمپلکس روتنیوم در غلظت‌های $5/0 \times 10^{-3}$ تا $1/0 \times 10^{-4}$ مول برلیتر در حضور سریم(IV) با غلظت ۳/۰ میلی‌مولار Ce(IV) و سولفوریک اسید با غلظت ۰/۱ مولار مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت محلول کمپلکس روتنیوم تا $1/0 \times 10^{-3}$ مول برلیتر، شدت نورتابی شیمیایی نیز به شدت افزایش می‌یابد. اما در غلظت‌های بالاتر، شدت نورتابی شیمیایی با شیب کمی افزایش می‌یابد. با توجه با اینکه شدت نور زمینه و رنگ محلول کمپلکس $[Ru(phen)_3]^{2+}$ نیز در غلظت‌های بالاتر از $1/0 \times 10^{-3}$ مول برلیتر با سرعت افزایش می‌یابد،

نسبت $\frac{\text{سیگنال}}{\text{زمینه}}$ تقریباً ثابت می‌ماند. بنابراین، غلظت $1/0 \times 10^{-3}$ مول برلیتر به عنوان غلظت بهینه برای کمپلکس $[Ru(phen)_3]^{2+}$

در نظر گرفته شد. علت تاثیر غلظت کمپلکس روتنیوم بر روی شدت نورتابی شیمیایی را می‌توان به نقش این ماده به عنوان حساس‌کننده در تولید نور مرتبط دانست.



شکل ۴. بررسی اثر غلظت کمپلکس $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ بر شدت نشر نورتایی شیمیایی داروی پتیدین هیدروکلراید و نسبت $\frac{\text{سیگنال}}{\text{زمینه}}$. (غلظت دارو، $\text{Ce}(\text{IV})$ و سولفوریک اسید به ترتیب $10^{-5} \times 5/0$ مولار، $3/0$ میلی مولار و $0/1$ مولار)

۳-۲-۲- مشخصه‌های تجزیه‌ای در تعیین مقدار پتیدین هیدروکلراید

جهت رسم منحنی درجه‌بندی برای پتیدین هیدروکلراید، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت آنالیت از طریق رقیق‌سازی محلول اولیه تهیه گردید. حداکثر پاسخ در $3/8$ ثانیه پس از تزریق ظاهر می‌شود. برای کاهش اثر عدم قطعیت در تزریق‌ها، شدت نورتایی شیمیایی در ثانیه ۱۵ پس از تزریق به عنوان پاسخ تجزیه‌ای در نظر گرفته شد.

در این روش برای پتیدین هیدروکلراید محدوده خطی بین $1/4 \times 10^{-3}$ - $5/6 \times 10^{-7}$ مولار به دست آمد. برای تعیین حد تشخیص روش با استفاده از فرمول $D.L = \frac{3\sigma_b}{m}$ که σ_b نشان‌دهنده انحراف استاندارد شاهد و m نشان دهنده شیب منحنی درجه‌بندی است، حد تشخیص برای پتیدین هیدروکلراید $7/1 \times 10^{-8}$ مولار بدست آمد. جهت تعیین دقت روش غلظت 5×10^{-5} مولار از پتیدین هیدروکلراید ۱۰ بار متوالی اندازه‌گیری شد و درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD) برابر ۵/۷ درصد به دست آمد.

۳-۲-۳- بررسی اثر مزاحمت تعدادی از گونه‌های همراه بر روی پتیدین هیدروکلراید

اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در تعیین مقدار پتیدین هیدروکلراید برای روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پتیدین هیدروکلراید $5/0 \times 10^{-6}$ مولار و غلظت مزاحمت‌ها $4/0 \times 10^{-3}$ مولار در نظر گرفته شد که مقدار مزاحمت ۸۰۰ برابر غلظت پتیدین هیدروکلراید است. محدوده قابل قبول از رابطه $\bar{x} \pm \frac{t_s}{\sqrt{n}}$ بدست آمد. اگر در حضور گونه مزاحم، پاسخ پتیدین خارج از این محدوده بود، گونه دارای اثر مزاحمت می‌باشد؛ بنابراین غلظت گونه مورد بررسی آنقدر کاهش داده شد تا پاسخ در گستره $\bar{x} \pm$ قرار گیرد. در این رابطه \bar{x} مقدار میانگین پاسخ مربوط به غلظت $5/0 \times 10^{-6}$ مولار است و S انحراف استاندارد مربوط به ۱۰ بار اندازه‌گیری تکراری غلظت $5/0 \times 10^{-6}$ مولار پتیدین است. طبق جدول مقدار t برای ۱۰ اندازه‌گیری ($n=10$) با ۹ درجه آزادی برابر ۲/۶۲ می‌باشد. نتایج در جدول ۵ نشان داده شده است. بیشترین نسبت غلظتی مزاحم به آنالیت که برای غلظت $5/0 \times 10^{-6}$

مولار پتیدین ایجاد مزاحمت نمی‌کرد، به عنوان حد مزاحمت قابل تحمل در نظر گرفته شد که این مقادیر در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴. بررسی اثر مزاحمت گونه‌های مختلف در تعیین غلظت $10^{-6} \times 5/0$ مولار از پتیدین هیدروکلراید

گونه‌های بررسی شده	نسبت غلظتی (آنالیت/ مزاحم)
ساکارز، نشاسته، ریوفلاوین، CMC، روی کلراید، اسید مالئیک، ساکارز، گلوکز	۸۰۰
آمونیم کلراید، لاکتوز، کافئین، سدیم کلراید، اتانول ۱٪، منیزیم سولفات	۵۰۰
سدیم کربنات، سدیم بی کربنات، اوره، تیواوره، کلسیم کلراید	۱۰۰
تارتاریک اسید	۱۰
سدیم اگزالات، تری سدیم سیترات، آسکوربیک اسید	۰/۱

سدیم اگزالات، تری سدیم سیترات و آسکوربیک اسید جزو مهمترین مزاحمت‌ها در تعیین مقدار پتیدین می‌باشند. تحقیقات نشان داده است گونه‌هایی که دارای گروه‌های عاملی آمین نوع سوم، کربوکسیلیک اسید و تیولی هستند (Gerardi, Barnett, & Lewis, 1999; Mokhtari, Keyvanfard, & Emami, 2015; Mokhtari & Rezaei, 2011; Rezaei & Mokhtari, 2007)، همچنین سایر ترکیباتی که می‌توانند رادیکال‌های کاهنده تولید کنند (مانند آسکوربیک اسید) (X. Chen & SATo, 1994)، امکان تعیین آن‌ها در سیستم نورتابی شیمیایی $Ce(IV)-[Ru(phen)_3]^{2+}$ وجود دارد. بنابراین اگر غلظت آن‌ها به اندازه کافی زیاد باشد می‌توانند در تعیین مقدار پتیدین مزاحمت ایجاد کنند.

با توجه به حد تشخیص روش پیشنهادی در این تحقیق، کاربرد آن برای تعیین مقدار پتیدین در نمونه‌های آمپول و نمونه‌های خالص پیشنهاد شده است. در نمونه‌های آمپول پتیدین تنها از سدیم هیدروکسید برای تنظیم pH استفاده می‌شود (Codeine, Brands, ULC, & Brands) که مقادیر اندک آن، در سیستم نورتابی شیمیایی $Ce(IV)-[Ru(phen)_3]^{2+}$ مزاحمتی ایجاد نمی‌کند. بنابراین اثر مزاحمت سدیم اگزالات، تری سدیم سیترات و آسکوربیک‌اسید که در جدول ۴ گزارش شده است، بخاطر عدم حضور این گونه‌ها در نمونه‌های تزریقی کمتر حائز اهمیت است. با این حال برای حذف اثر مزاحمت آسکوربیک اسید، سدیم سیترات و سدیم اگزالات در سیستم نورتابی شیمیایی $[Ru(phen)_3]^{2+}$ روش‌های مختلفی از جمله استفاده از رزین‌های تبادل یونی (Waseem, Yaqoob, & Nabi, 2008)، استفاده از ستون شاهد (C.-Y. Wang & Huang, 2003)، رقیق سازی (Zhuang, Zhang, & Ju, 2005)، جدایش زمانی (time resolved CL) (Mokhtari, 2003) و تشکیل کمپلکس‌های پایدار با Fe(III) (که در حضور Ce(IV) اکسید نمی‌شوند و مزاحمتی ایجاد نمی‌کنند) (Knight & Greenway, 1995)، پیشنهاد شده است. به منظور گسترش کاربرد روش پیشنهادی، می‌توان از روش پیشنهادی در این تحقیق به عنوان آشکارساز دستگاه HPLC (Li et al., 2011) استفاده نمود.

۳-۲-۴- بررسی کاربرد روش در اندازه‌گیری پتیدین هیدروکلراید

برای بررسی کاربرد روش پیشنهادی، در اندازه‌گیری‌های دارویی، دو عدد آمپول پتیدین هیدروکلراید بطور مجزا مورد آنالیز قرار گرفت. برای این منظور پس از رسم منحنی درجه‌بندی، نمونه‌های آمپول آماده شده (مطابق بخش تجربی) مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج در جدول ۵ نشان داده شده است.

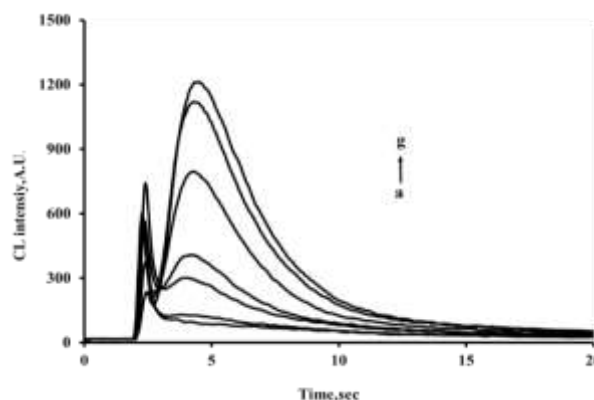
جدول ۵. نتایج سنجش آمپول پتیدین هیدروکلراید

درصد بازیابی	مقدار پیش بینی شده دارو توسط روش نورتابی شیمیایی* (mg/mL)	مقدار اسمی دارو (mg/mL)
۱۰۳/۲	۵۱/۶ ± ۵/۴	۵۰
۹۵/۴	۴۷/۷ ± ۴/۷	۵۰

* نتایج حاصل ۳ بار اندازه‌گیری تکراری

۳-۳- تعیین مقدار تبائین با استفاده از سیستم نورتابی شیمیایی ردآمین Ce(IV)- 6G

همانگونه که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود تبائین در سیستم نورتابی شیمیایی ردآمین Ce(IV)- 6G دارای قله‌ای در ثانیه ۲/۱ بعد از تزریق می‌باشد که در غلظت‌های بالاتر به خوبی مشهود است و پیک آن بعد از حدود ۱۰ تا ۲۰ ثانیه به خط زمینه باز می‌گردد. از پیک اول که هم در نمونه و هم در شاهد وجود دارد و حساسیت کمتری دارد صرفنظر شده است (زیرا اختلاف بین پیک نمونه‌ها و شاهد ناچیز است) لذا ارتفاع پیک دوم به عنوان پاسخ تجزیه‌ای در نظر گرفته شد. در شکل ۵ پاسخ‌های ایجاد شده توسط این دارو در غلظت‌های مختلف نشان داده شده است.

شکل ۵. پروفایل زمانی تبائین، به ترتیب از a تا g: شاهد، غلظت $2/0 \times 10^{-5}$ ، $4/0 \times 10^{-5}$ ، $8/0 \times 10^{-5}$ ، $2/0 \times 10^{-4}$ ، $4/0 \times 10^{-4}$ ، $8/0 \times 10^{-4}$ مول بر لیتر

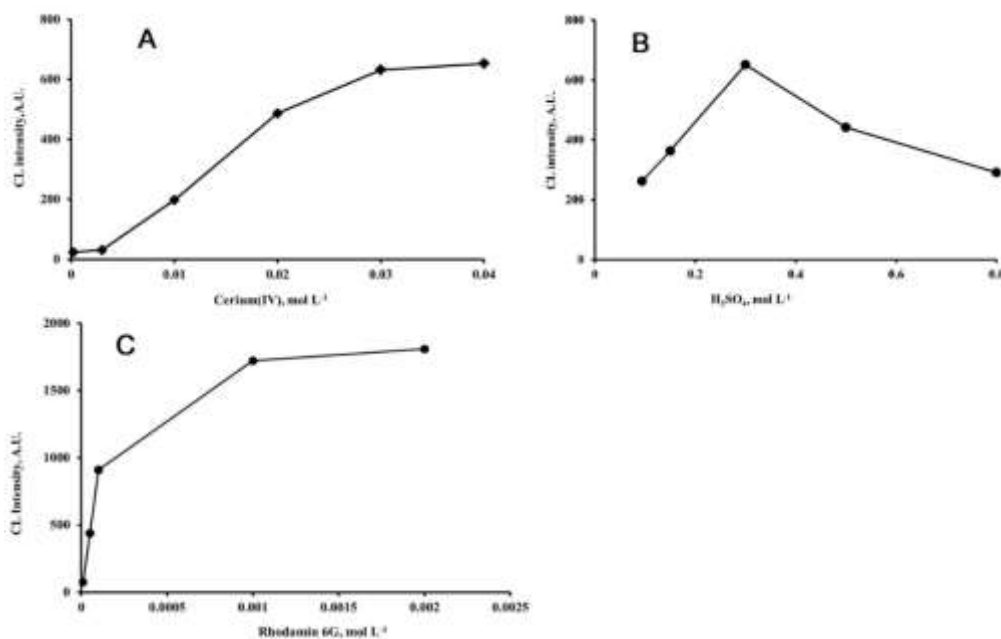
۳-۳-۱- بهینه‌سازی غلظت محلول Ce(IV)، محلول سولفوریک اسید و محلول ردآمین 6G

جهت بهینه‌سازی غلظت محلول Ce(IV) در اندازه‌گیری تبائین، تأثیر این واکنشگر در محدوده غلظت‌های $2/0 \times 10^{-4}$ تا $1/0 \times 10^{-3}$ مولار بر روی میزان نشر نورتابی شیمیایی آنالیت در حضور $0/3$ مولار از سولفوریک اسید و $1/0 \times 10^{-4}$ مولار از ردآمین

6G بررسی شد. مطابق شکل ۶ (A) با افزایش غلظت Ce(IV) تا $3/0 \times 10^{-2}$ مولار شدت نورتابی شیمیایی افزایش می‌یابد و بعد از آن با شیب کمی افزایش پیدا می‌کند. بنابراین، غلظت $3/0 \times 10^{-2}$ مولار از Ce(IV) به عنوان غلظت بهینه جهت ادامه کار انتخاب شد.

جهت بهینه‌سازی غلظت سولفوریک اسید در اندازه‌گیری تبااین تأثیر اسید در محدوده غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۸ مولار بر روی میزان نشر نورتابی شیمیایی آنالیت در حضور $3/0 \times 10^{-2}$ مولار از Ce(IV) و $1/0 \times 10^{-4}$ مولار از ردآمین 6G بررسی شد. همانگونه که در شکل ۶ (B) مشاهده می‌شود بیشترین میزان پاسخ در غلظت ۰/۳ مولار از سولفوریک اسید بدست آمد. لذا این غلظت برای ادامه کار به عنوان غلظت بهینه انتخاب گردید.

جهت بهینه‌سازی محلول ردآمین 6G در اندازه‌گیری تبااین تأثیر این محلول در محدوده غلظت‌های $1/0 \times 10^{-5}$ تا $2/0 \times 10^{-3}$ مولار بر روی میزان نشر نورتابی شیمیایی آنالیت در حضور Ce(IV) با غلظت $3/0 \times 10^{-2}$ مولار در سولفوریک اسید ۰/۳ مولار بررسی شد. همانگونه که در شکل ۶ (C) مشاهده می‌شود بیشترین میزان نشر نورتابی شیمیایی در غلظت $1/0 \times 10^{-3}$ مولار از ردآمین 6G بدست آمد و در غلظت بالاتر، شدت نورتابی شیمیایی تأثیر محسوسی نداشته لذا این غلظت به عنوان غلظت بهینه جهت ادامه کار انتخاب گردید.



شکل ۶ نمودار بهینه‌سازی (A) غلظت محلول Ce(IV)، (B) محلول سولفوریک اسید و (C) محلول ردآمین 6G برای تبااین

۳-۳-۲- مشخصه‌های تجزیه‌ای در تعیین مقدار تبااین

جهت رسم منحنی درجه‌بندی برای تبااین، محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت آنالیت، از طریق رقیق‌سازی محلول اولیه تهیه گردید. حداکثر پاسخ در ثانیه ۲/۱ بعد از تزریق به عنوان پاسخ تجزیه‌ای در نظر گرفته شد.

ناحیه خطی برای تبائین در گستره $4/0 \times 10^{-4}$ - $1/0 \times 10^{-5}$ مولار بدست آمد. برای تعیین حد تشخیص روش با استفاده از

فرمول $D.L = \frac{3\sigma_b}{m}$ که σ_b نشان دهنده انحراف استاندارد شاهد و m نشان دهنده شیب منحنی درجه بندی است، حد

تشخیص برای تبائین $4/3 \times 10^{-6}$ مولار بدست آمد. جهت تعیین دقت روش، غلظت $1/0 \times 10^{-4}$ مولار از تبائین ۱۰ بار متوالی

اندازه گیری شد و درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای این غلظت برابر ۴/۰٪ بدست آمد.

۳-۳-۳- بررسی اثر مزاحمت تعدادی از گونه های همراه بر روی تعیین مقدار تبائین

اثر مزاحمت گونه های مختلف در تعیین مقدار تبائین برای روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. غلظت تبائین

$8/0 \times 10^{-5}$ مولار و غلظت مزاحمتها $4/0 \times 10^{-3}$ مولار در نظر گرفته شد. مقدار مزاحمت ۵۰ برابر غلظت تبائین است. محدوده

قابل قبول از رابطه $\bar{x} \pm \frac{tS}{\sqrt{n}}$ بدست آمد. اگر در حضور گونه مزاحم، پاسخ نورتابی شیمیایی خارج از این محدوده بود، گونه دارای

اثر مزاحمت می باشد؛ بنابراین غلظت گونه مورد بررسی آنقدر کاهش داده می شد تا پاسخ در گستره $\bar{x} \pm \frac{tS}{\sqrt{n}}$ قرار گیرد. در این

رابطه \bar{x} مقدار میانگین پاسخ مربوط به غلظت $8/0 \times 10^{-5}$ مولار است و S انحراف استاندارد مربوط به ۱۰ بار اندازه گیری تکراری

غلظت $8/0 \times 10^{-5}$ مولار است. طبق جدول مقدار t برای ۱۰ اندازه گیری ($n=10$) با ۹ درجه آزادی برابر ۲/۶۲ می باشد. بیشترین

نسبت غلظتی مزاحم به آنالیت که برای غلظت $8/0 \times 10^{-5}$ مولار تبائین ایجاد مزاحمت نمی کرد، به عنوان حد مزاحمت قابل

تحمل در نظر گرفته شد که این مقادیر در جدول ۶ نشان داده شده است.

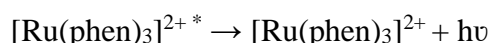
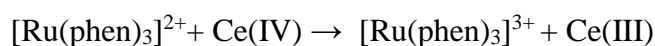
جدول ۶ بررسی اثر مزاحمت گونه های مختلف در تعیین غلظت $8/0 \times 10^{-5}$ مولار از تبائین

غلظتی (آنالیت) / مزاحم	گونه های نسبت بررسی شده
۵۰	ساکارز، سدیم کربنات، نشاسته، لاکتوز، ریوفلاوین، سدیم بی کربنات، CMC، کلسیم کلراید، کافئین، اوره، تیواوره، سدیم کلراید، روی کلراید، اسید تارتاریک، آمونیوم کلراید، اسید مالئیک، اتانول
۲۰	سدیم اگزالات
۱۰	تری سدیم سیترات
۱	آسکوربیک اسید

۳-۴- مکانیسم واکنش های نورتابی شیمیایی

۳-۴-۱- مکانیسم نورتابی شیمیایی در سیستم $[Ru(phen)_3]^{2+} - Ce(IV)$

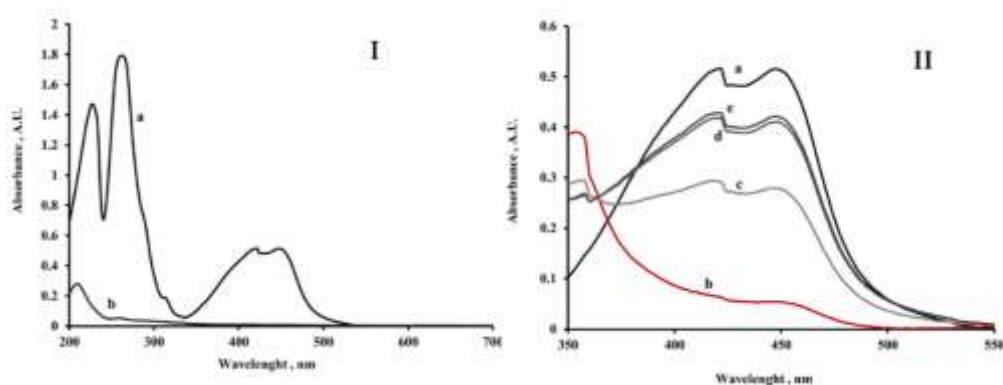
معمولا مکانیسم نورتابی شیمیایی مربوط به کمپلکس های $Ru(II)$ به صورت زیر بیان می گردد.



در این فرآیند ابتدا کمپلکس Ru(III) تشکیل می‌شود سپس در واکنش با آنالیت با نشر نور به حالت پایه خود برمی‌گردد. در حالتی که هیچ آنالیتی وجود نداشته باشد واکنش بین $[Ru(phen)_3]^{2+}$ و Ce(IV) نشر نورتایی شیمیایی کمی تولید می‌کند که به عنوان پاسخ شاهد یا زمینه در نظر گرفته می‌شود.

کمپلکس Ru(II) پس از واکنش با محلول Ce(IV) اسیدی عمدتاً به کمپلکس Ru(III) تبدیل می‌شود. اما با توجه به قابلیت اکسندگی بالا می‌تواند مولکول‌های آب را با سرعت کمی اکسید نموده (Hara et al., 2000) و خود مجدداً به کمپلکس Ru(II) تبدیل شود. لذا هنگام اختلاط، تغییر رنگ نارنجی به سبز اتفاق می‌افتد که بدلیل اکسایش Ru(II) به Ru(III) است (Hong et al., 2012) و پس از مدتی حدود چند دقیقه دوباره به رنگ نارنجی بازمی‌گردد. این فرآیند از طریق اسپکتروفوتومتر UV-Vis نیز بررسی شد. در شکل ۷ (I) طیف UV-Vis مربوط به a: کمپلکس Ru(II) و b: Ce(IV) اسیدی نشان داده شده است.

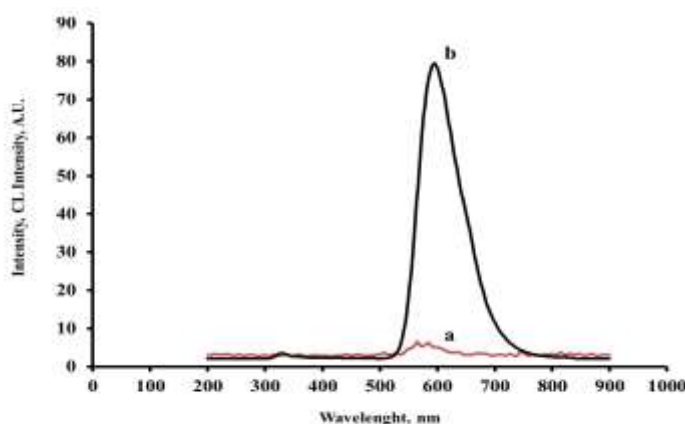
همانطور که در شکل ۷ (I) مشاهده می‌شود کمپلکس Ru(II) در ناحیه بین ۳۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر دارای جذب است. اما محلول Ce(IV) اسیدی، در این ناحیه جذبی ندارد لذا تغییرات جذب در این ناحیه را می‌توان مربوط به تغییرات غلظت کمپلکس Ru(II) دانست. در شکل ۷ (IIa) جذب مربوط به محلول کمپلکس Ru(II) است و طیف (IIb): جذب کل محلول را پس از تزریق Ce(IV) اسیدی به محلول کمپلکس Ru(II) نمایش می‌دهد. همانطور که در شکل ۷ منحنی IIb دیده می‌شود، با اضافه شدن محلول Ce(IV)، جذب در ناحیه ۳۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر به شدت کاهش می‌یابد؛ اما پس از گذشت ۱۶۰ ثانیه به مرور، جذب مخلوط فوق افزایش می‌یابد (منحنی c) که دلیل آن تشکیل مجدد کمپلکس Ru(II) می‌باشد. به مرور زمان، افزایش غلظت کمپلکس Ru(II) ادامه می‌یابد تا اینکه پس از گذشت ۳۲۰ ثانیه (منحنی e) کمپلکس Ru(II) به یک غلظت تعادلی می‌رسد و تغییرات غلظت آن نسبت به زمان ناچیز می‌شود.



شکل ۷. (I) طیف جذب فرابنفش-مرئی. a: کمپلکس Ru(II) و b: Ce(IV). (II) طیف جذب فرابنفش-مرئی کمپلکس Ru(II): a. کمپلکس Ru(II) با غلظت 5×10^{-5} مولار. b تا e: طیف مخلوط Ce(IV) - $[Ru(phen)_3]^{2+}$ در فاصله‌های زمانی ۸۰ ثانیه‌ای. شرایط آزمایش: غلظت کمپلکس Ru(II) 5×10^{-5} مولار، غلظت Ce(IV) $1/5 \times 10^{-4}$ مولار و سولفوریک اسید $1/0 \times 10^{-2}$ مولار.

آمین‌های نوع سوم پس از اکسایش می‌توانند رادیکال کاتیون‌های ناپایدار تولید نمایند که قابلیت احیای کمپلکس Ru(III) را دارند و باعث تسریع در فرآیند برگشت کمپلکس Ru(III) به کمپلکس Ru(II) می‌شوند (Wallace & Bard, 1979). فرآیند دریافت الکترون‌ها از کمپلکس Ru(III) از طریق هم‌پوشانی اوربیتال‌های π لیگاند فنانتروپین در کمپلکس Ru(III) با اوربیتال رادیکال آنالیت اتفاق می‌افتد و الکترون به اوربیتال π^* لیگاند فنانتروپین وارد می‌شود (Bolton & Richter, 2001; Wallace & Bard, 1979). انتقال این الکترون‌ها از اوربیتال‌های π^* به اوربیتال‌های حالت پایه فلز Ru موجب نشر نور در حدود ۶۰۰ نانومتر می‌شود. برای اینکه مشخص شود آیا نشر نور از کمپلکس Ru(III) اتفاق افتاده است یا خیر می‌توان از مطابقت طیف فلوئورسانس این ترکیب با طیف نورتابی شیمیایی آن استفاده نمود.

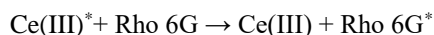
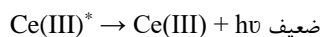
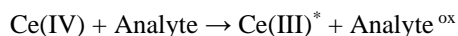
در شکل ۸(a)، طیف‌های بدست آمده از نورتابی شیمیایی در سیستم Ru(II)-Ce(IV)-Pethidine و ۸(b) طیف فلوئورسانس کمپلکس Ru(II) نشان داده شده است و همانگونه که مشخص است، نشر نورتابی شیمیایی با فلوئورسانس کمپلکس Ru(II) مطابقت دارد و در سایر نواحی طیفی، نشر نورتابی شیمیایی ملاحظه نمی‌شود. به همین دلیل می‌توان گفت کمپلکس Ru(II) تنها نشرکننده در این سیستم می‌باشد. بنابراین مکانیسم ذکر شده در ابتدای این بخش، در مورد واکنش پتیدین هیدروکلراید در سیستم $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -Ce(IV) نیز صادق است.



شکل ۸ a: طیف نورتابی شیمیایی محلول $[Ru(phen)_3]^{2+}$ و b طیف فلوئورسانس محلول $[Ru(phen)_3]^{2+}$. شرایط آزمایش: محلول $[Ru(phen)_3]^{2+}$ با غلظت 5×10^{-5} مولار

۳-۴-۲- مکانیسم نورتابی ردآمین 6G-Ce(IV)

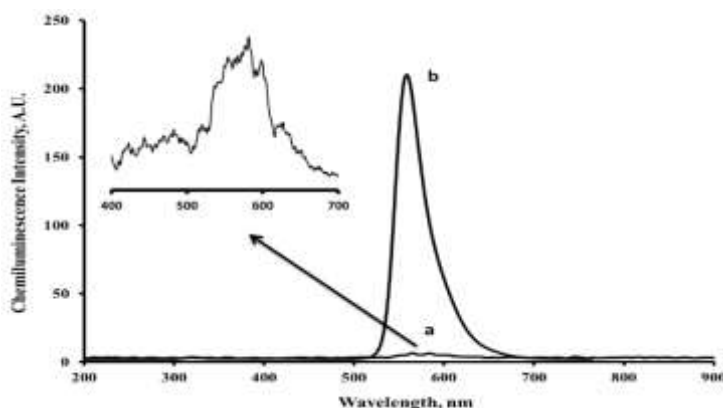
مکانیسم نورتابی شیمیایی سیستم ردآمین 6G-Ce(IV) در اکثر مطالعات بصورت زیر بیان شده است (D. Chen et al., 2011; Huang & Chen, 2002; Li et al., 2011; Liu & Huang, 2004; J. P. Wang, Li, & Luo, 2008).





طبق معادلات فوق، در اثر واکنش محلول Ce(IV) اسیدی با آنالیت، آنالیت اکسید شده و Ce(III) تشکیل می‌شود. درصدی از Ce(III) های تولید شده در این واکنش بصورت برانگیخته (Ce(III)^*) خواهند بود. Ce(III)^* می‌تواند با نشر نور بسیار ضعیف یا از طریق آسایش گرمایی به حالت پایه‌ی خود برگردد منتهی در حضور $\text{Rdamim } 6G$ ، انرژی از Ce(III)^* به $\text{Rdamim } 6G$ منتقل می‌شود و $\text{Rdamim } 6G^*$ تشکیل می‌شود. در مرحله بعد، $\text{Rdamim } 6G^*$ هنگام بازگشت به حالت پایه نشر نورتایی شیمیایی در طول موج حدود ۶۰۰ نانومتر تولید می‌کند.

برای تایید مکانیسم فوق می‌توان طیف فلوئورسانس $\text{Rdamim } 6G$ را با طیف نورتایی شیمیایی بدست آمده از واکنش $\text{Rdamim } 6G - \text{Ce(IV)}$ - تبائین مقایسه نمود. مقایسه دو طیف یاد شده می‌تواند در تایید یا رد مکانیسم فوق موثر باشد. در شکل ۹(a) طیف نورتایی شیمیایی و ۹(b) طیف فلوئورسانس $\text{Rdamim } 6G$ نشان داده شده است. همانگونه که مشخص است هر دو طیف پیک نشری یکسانی را در محدوده ۶۵۰-۵۲۰ نانومتر نشان می‌دهند. این امر نشان دهنده این است که انتقالات الکترونی در پدیده نورتایی شیمیایی بین $\text{Rdamim } 6G - \text{Ce(IV)}$ - تبائین با انتقالات الکترونی در فلوئورسانس $\text{Rdamim } 6G$ یکسان است. لذا مکانیسم فوق بصورت کلی تایید می‌شود. اما جزئیات و مسیر واکنش‌ها نیاز به بررسی بیشتر دارد.



شکل ۹. a: طیف نورتایی شیمیایی محلول $\text{Rdamim } 6G$ و b: طیف فلوئورسانس محلول $\text{Rdamim } 6G$

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق، از سیستم‌های نورتایی شیمیایی $[\text{Ru(phen)}_3]^{2+}$ با Ce(IV) اسیدی و $\text{Rdamim } 6G$ با Ce(IV) اسیدی در محیط آبی به ترتیب برای تعیین مقدار داروهای پتیدین هیدروکلراید و تبائین استفاده شد. این ترکیبات با استفاده از روش نورتایی شیمیایی به شیوه‌ی پیمان‌های اندازه‌گیری شدند. اثر مزاحمت گونه‌های مختلف بر روی پتیدین هیدروکلراید و تبائین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای بهینه‌سازی غلظت عامل اکسنده‌ی اسیدی در اندازه‌گیری پتیدین هیدروکلراید از روش طراحی آزمایش و رویه پاسخ استفاده شد. سادگی و کم هزینه بودن دستگاه مورد استفاده و حساسیت بالای روش و پاسخ سریع از مزایای روش‌های نورتایی شیمیایی پیشنهادی در این تحقیق است.

۵- تقدیر و تشکر

این پژوهش با استفاده از اعتبارات دانشگاه گلستان انجام شده است.

۶- فهرست منابع و مآخذ

- [1] Adcock, J. L., Barrow, C. J., Barnett, N. W., Conlan, X. A., Hogan, C. F., & Francis, P. S. (2011). Chemiluminescence and electrochemiluminescence detection of controlled drugs. *Drug testing and analysis*, 3(3), 145-160 .
- [2] Azad, M. A. K., Ohira, S.-I., & Toda, K. (2006). Single column trapping/separation and chemiluminescence detection for on-site measurement of methyl mercaptan and dimethyl sulfide. *Analytical chemistry*, 78(17), 6252-6259 .
- [3] Barnett, N., Hindson, B., Lewis, S., & Purcell, S. (1998). Determination of codeine, 6-methoxycodine and thebaine using capillary electrophoresis with tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) chemiluminescence detection. *Analytical Communications*, 35(10), 321-324 .
- [4] Bolton, E., & Richter, M. M. (2001). Chemiluminescence of Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II): a glowing experience. *Journal of Chemical Education*, 78(1), 47 .
- [5] Cao, W., Yang, J. H., Sun, C. X., Zhang, Z. J., & Gao, Q. F. (2005). Flow-injection-chemiluminescence method for the determination of penicillin G potassium. *Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence*, 20(4-5), 238-242 .
- [6] Chen, D., Wang, H., Zhang, Z., Ci, L., & Zhang, X. (2011). Chemiluminescence determination of cefotaxime sodium with flow-injection analysis of cerium (IV)-rhodamine 6G system and its application to the binding study of cefotaxime sodium to protein with on-line microdialysis sampling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1), 553-557 .
- [7] Chen, G., & Huang, C. (1988). A study of the chemiluminescence of some acidic triphenylmethane dyes. *Talanta*, 35(8), 625-631 .
- [8] Chen, X., & SATo, M. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in soft drinks and apple juice using tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) electrochemiluminescence. *Analytical sciences*, 11(5), 749-754 .
- [9] Christie, R. (2014). *Colour chemistry*: Royal society of chemistry.
- [10] Codeine, P., Brands, A. C., ULC, H. N. Z., & Brands, C. Medicines Adverse Reactions Committee .
- [11] Costin, J. W., Lewis, S. W., Purcell, S. D., Waddell, L. R., Francis, P. S., & Barnett, N. W. (2007). Rapid determination of Papaver somniferum alkaloids in process streams using monolithic column high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytica chimica acta*, 597(1), 19-23 .

- [12] Cui, H., Zhang, Q., Myint, A., Ge, X., & Liu, L. (2006). Chemiluminescence of cerium (IV)–rhodamine 6G–phenolic compound system. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 181(2-3), 238-245 .
- [13] Delouei, N. J., Mokhtari, A., & Jamali, M. R. (2017). Determination of pholcodine in syrups and human plasma using the chemiluminescence system of tris (1, 10 phenanthroline) ruthenium (II) and acidic Ce (IV). *Luminescence*, 32(3), 387-393 .
- [14] Ensafi, A. A., Hasanpour, F., Khayamian, T., Mokhtari, A., & Taei, M. (2010). Simultaneous chemiluminescence determination of thebaine and noscapine using support vector machine regression. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(2), 867-871 .
- [15] Francis, P. S., & Adcock, J. L. (2005). Chemiluminescence methods for the determination of ofloxacin. *Analytica chimica acta*, 541(1-2), 3-12 .
- [16] Gemba, Y., Konishi, M., Sakata, T., & Okabayashi, Y. (2004). Determination of Oxycodone and Its Metabolite, Noroxycodone, in Human Plasma by HPLC with Post-column Chemiluminescence Detection Using Electrogenerated Tris (2, 2'-Bipyridyl) ruthenium (III). *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 27(10), 1611-1626 .
- [17] Gerardi, R. D., Barnett, N. W., & Lewis, S. W. (1999). Analytical applications of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (III) as a chemiluminescent reagent. *Analytica chimica acta*, 378(1-3), 1-41 .
- [18] Greenwood, P. A., Merrin, C., McCreedy, T., & Greenway, G. M. (2002). Chemiluminescence μ TAS for the determination of atropine and pethidine. *Talanta*, 56(3), 539-545 .
- [19] Guha, M. (2003). The Encyclopedia of Addictive Drugs. *Reference Reviews*, 17(7), 50-51 .
- [20] Han, H.-Y., He, Z.-K., & Zeng, Y.-E. (1999). A direct chemiluminescence method for the determination of nucleic acids using Ru (phen) 32+–Ce (IV) system. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 364, 782-785 .
- [21] Hara, M., Waraksa, C. C., Lean, J. T., Lewis, B. A., & Mallouk, T. E. (2000). Photocatalytic water oxidation in a buffered Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium complex-colloidal IrO₂ system. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104(22), 5275-5280 .
- [22] He, Z., & Gao, H. (1997). Simultaneous determination of oxalic and tartaric acid with chemiluminescence detection. *Analyst*, 122(11), 1343-1346 .
- [23] Hong, D., Jung, J., Park, J., Yamada, Y., Suenobu, T., Lee, Y.-M., Fukuzumi, S. (2012). Water-soluble mononuclear cobalt complexes with organic ligands acting as precatalysts for efficient photocatalytic water oxidation. *Energy & Environmental Science*, 5(6), 7606-7616 .
- [24] Huang, Y., & Chen, Z. (2002). Chemiluminescence of chlorpromazine hydrochloride based on cerium (IV) oxidation sensitized by rhodamine 6G. *Talanta*, 57(5), 953-959 .
- [25] Karim, M. M., Lee, S. H., Lee, H. S., Bae, Z. U., & Choi, K. H. (2006). A batch chemiluminescence determination of enoxacin using a Tris-(1, 10-phenanthroline) ruthenium (II)–cerium (IV) system. *Journal of Fluorescence*, 16, 535-540 .

- [26] Knight, A. W., & Greenway, G. M. (1995). Electrogenated chemiluminescent determination of pyruvate using tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II). *Analyst*, 120(10), 2543-2547 .
- [27] Lara, F. J., García-Campaña, A. M., & Aaron, J.-J. (2010). Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems—A review. *Analytica chimica acta*, 679(1-2), 17-3 .
- [28] Latta, K. S., Ginsberg, B., & Barkin, R. L. (2002). Meperidine: a critical review. *American journal of therapeutics*, 9(1), 53-68 .
- [29] Li, Y., Zhang, Z., Li, J., Li, H., Chen, Y., & Liu, Z. (2011). Simple, stable and sensitive electrogenerated chemiluminescence detector for high-performance liquid chromatography and its application in direct determination of multiple fluoroquinolone residues in milk. *Talanta*, 84(3), 690-695 .
- [30] Littlejohn, D. (1994). JD Ingle Jr., and SR Crouch, Spectrochemical analysis: Prentice Hall, New Jersey, 1988 (ISBN 0-13-826876-2). xv+ 590 pp. price£ 24.95. In: Elsevier.
- [31] Liu, W., & Huang, Y. (2004). Cerium (IV)-based chemiluminescence of phentolamine sensitized by rhodamine 6G. *Analytica chimica acta*, 506(2), 183-187 .
- [32] Mikuška, P & Večeřa, Z. (1998). Application of gallic acid and xanthene dyes for determination of ozone in air with a chemiluminescence aerosol detector. *Analytica chimica acta*, 374(2-3), 297-302 .
- [33] Mokhtari, A., Ghazaeian, M., Maghsoudi, M., Keyvanfard, M., & Emami, I. (2015). Simple chemiluminescence determination of ketotifen using tris (1, 10 phenanthroline) ruthenium (II)-Ce (IV) system. *Luminescence*, 30(7), 1094-1100 .
- [34] Mokhtari, A., Jafari Delouei, N., Keyvanfard, M., & Abdolhosseini, M. (2016). Multiway analysis applied to time-resolved chemiluminescence for simultaneous determination of paracetamol and codeine in pharmaceuticals. *Luminescence*, 31(6), 1267-1276 .
- [35] Mokhtari, A., Keyvanfard, M., & Emami, I. (2015). Simultaneous chemiluminescence determination of citric acid and oxalic acid using multi-way partial least squares regression. *RSC Advances*, 5(37), 29214-29221 .
- [36] Mokhtari, A., Keyvanfard, M., Emami, I., Delouei, N. J., Pishkhani, H. F., Ebrahimi, A., & Karimian, H. (2016). Determination of Aspirin Using Chemiluminescence System of Tris (1, 10 phenanthroline) Ruthenium (II)-Cerium (IV). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27, 566-574 .
- [37] Mokhtari, A., & Rezaei, B. (2011). Chemiluminescence determination of chlorpromazine and fluphenazine in pharmaceuticals and human serum using tris (1, 10-phenanthroline) ruthenium (II). *Analytical Methods*, 3(4), 996-1002 .
- [38] Pavlov, V., Xiao, Y., Gill, R., Dishon, A., Kotler, M., & Willner, I. (2004). Amplified chemiluminescence surface detection of DNA and telomerase activity using catalytic nucleic acid labels. *Analytical chemistry*, 76(7), 2152-2156 .

- [39] Ram, S., & Siar, C. (2005). Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 34(5), 521-527 .
- [40] Ramachander, G., Williams, F. D., & Emele, J. F. (1977). Determination of dextrophan in plasma and evaluation of bioavailability of dextromethorphan hydrobromide in humans. *Journal of pharmaceutical sciences*, 66(7), 1047-1048 .
- [41] Ramanathan, V., & Chandra, P. (1980). Recovery of thebaine and cryptopine from Indian opium. *Bull Narc*, 32(2), 49-63 .
- [42] Rezaei, B., Khayamian, T., & Mokhtari, A. (2009). Simultaneous determination of codeine and noscapine by flow-injection chemiluminescence method using N-PLS regression. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(2), 234-239 .
- [43] Rezaei, B., & Mokhtari, A. (2007). A simple and rapid flow injection chemiluminescence determination of cysteine with Ru (phen) 32+Ce (IV) system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(2), 359-363 .
- [44] Sabnis, R. W. (2007). *Handbook of acid-base indicators*: CRC Press.
- [45] Shahraki, A. D., Jabalameli, M., & Ghaedi, S. (2012). Pain relief after cesarean section: Oral methadone vs. intramuscular pethidine. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(2), 143 .
- [46] Song, Q., Greenway, G. M., & McCreedy, T. (2001). Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) electrogenerated chemiluminescence of alkaloid type drugs with solid phase extraction sample preparation. *Analyst*, 126(1), 37-40 .
- [47] Tsuji, A., Stanley, P. E., Kricka, L. J., Maeda, M., & Matsumoto, M. (2005). Bioluminescence And Chemiluminescence: Progress And Perspectives-Proceedings Of The 13th International Symposium .
- [48] Tsunoda, M., & Imai, K. (2005). Analytical applications of peroxyoxalate chemiluminescence. *Analytica chimica acta*, 541(1-2), 13-23 .
- [49] Vitha, M. F. (2018). *Spectroscopy: Principles and instrumentation*: John Wiley & Sons.
- [50] Wallace, W. L., & Bard, A. J. (1979). Electrogenerated chemiluminescence. 35. temperature dependence of the ECL efficiency of Ru (bpy) 2+ in acetonitrile and evidence for very high excited state yields from electron transfer reactions. *J. Phys. Chem*, 83, 1350-1357 .
- [51] Wang, C.-Y., & Huang, H.-J. (2003). Flow injection analysis of glucose based on its inhibition of electrochemiluminescence in a Ru (bpy) 32+—tripropylamine system. *Analytica chimica acta*, 498(1-2), 61-68 .
- [52] Wang, J. P., Li, N. B., & Luo, H. Q. (2008). Chemiluminescence determination of ferulic acid by flow-injection analysis using cerium (IV) sensitized by rhodamine 6G. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(1), 204-208 .

- [53] Waseem, A., Yaqoob, M., & Nabi, A. (2008). Flow-injection method for the determination of iodide/iodine using Ru (bpy) 3^{3+} -NADH chemiluminescence detection. *Luminescence*, 23(5), 316-320 .
- [54] Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. F., & Miró, M. (2019). *Encyclopedia of analytical science*: Elsevier.
- [55] Xi, J., Ai, X., & He, Z. (2003). Chemiluminescence determination of barbituric acid using Ru (phen) 3^{2+} -Ce (IV) system. *Talanta*, 59(5), 1045-1051 .
- [56] Zhuang, Y., Zhang, D., & Ju, H. (2005). Sensitive determination of heroin based on electrogenerated chemiluminescence of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) immobilized in zeolite Y modified carbon paste electrode. *Analyst*, 130(4), 534-540.

