



Semnan University



Research Article

# Application of Liquid Phase Microextraction Method Based on Deep Eutectic Solvents for Pre-Concentration and Spectrophotometric Determination of Purpurin Dye

Mojtaba Fathi, Hamid Reza Rajabi\* , Habibollah Khajehsharifi, Ali Gorjizadeh

Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Yasouj University, Yasouj, Iran

## PAPER INFO

### Article history:

Received: 22/Oct/2022

Revised: 16/Mar/2023

Accepted: 17/Apr/2023

### Keywords:

Liquid phase microextraction, Deep eutectic solvent, Separation, Pre-concentration, Purpurin.

## ABSTRACT

This research used a simple and efficient liquid-phase microextraction method based on deep eutectic solvents for preconcentration and spectrophotometric determination of purpurin (1, 2, and 4-trihydroxyanthraquinone) dye. The choline chloride-acetic acid DES with a molar ratio of 1:2 was synthesized and used with 1-Decanol as the extraction solvent. The influence of effective parameters on the extraction efficiency, including the type and volume of extracting solvents, pH of sample solution, the molar ratio of DES components, and sodium chloride salt concentration were studied, using the response surface method. The highest extraction percentage (>95%) was obtained at pH = 5.5, 550 mg/L of sodium chloride, 350 and 500  $\mu\text{L}$  of DES, and 1-Decanol solvents, respectively. The effect of different ions and dyes on the extraction efficiency was examined and the results indicated that the method has an acceptable selectivity. The present process was linear in the concentration range of  $5.0 \times 10^{-7}$  to  $2.0 \times 10^{-5}$  mol/L of purpurin, with a detection limit of  $2.7 \times 10^{-7}$  mol/L, preconcentration factor of 100, and a relative standard deviation of 3.13%. Finally, to test the applicability of the proposed method, it was investigated for the uptake of purpurin from various water samples, successfully.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.28461.2107>

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: [hr.rajabi@gmail.com](mailto:hr.rajabi@gmail.com)

How to cite this article: Fathi, M., Rajabi, H. R., Khajehsharifi, H., & Gorjizadeh Kohvadeh, A. (2024). Application of liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration and spectrophotometric determination of purpurin. *Applied Chemistry Today*, 19(70), 135-150. (in Persian)

## کاربرد روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر حلال‌های فرازودگداز برای پیش‌تغلیظ

### و اندازه‌گیری پورپورین

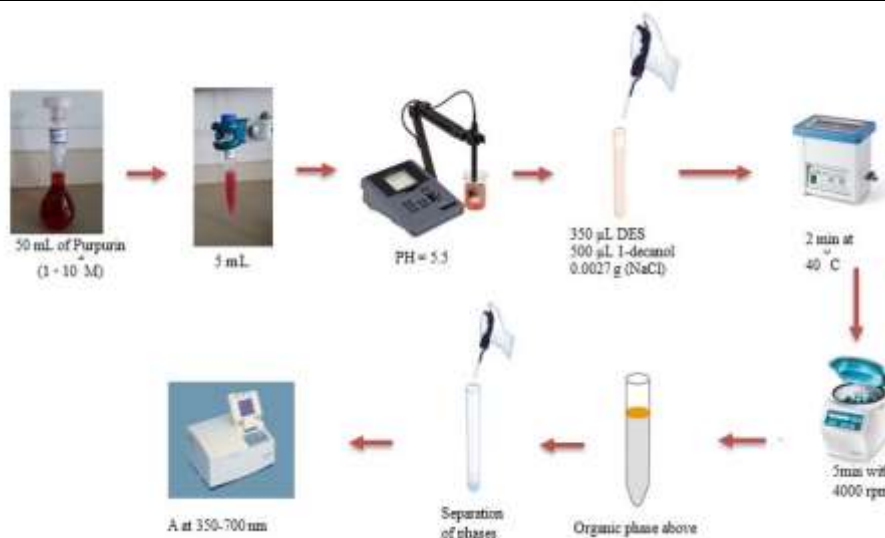
مجتبی فتحی، حمیدرضا رجیبی\*، حبیب‌الله خواجه شریفی، علی گرجی زاده

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۷/۳۰	<p>در این تحقیق، از یک روش ساده و کارآمد میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر حلال‌های فرازودگداز (DES) برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری ترکیب رنگی پورپورین (۱ و ۲ و ۴-تری هیدروکسی آنتراکینون) استفاده گردید. DES شامل کولین کلرید-اسید استیک با نسبت مولی ۱:۲ سنتتر و به همراه ۱-دکانول مورد استفاده قرار گرفتند. تأثیر پارامترهای مؤثر بر بازدهی استخراج شامل نوع و حجم حلال‌های استخراجی، pH محلول نمونه، نسبت مولی اجزای حلال فرازودگداز و غلظت نمک با استفاده از روش بهینه‌سازی سطح پاسخ مطالعه گردید. بیشترین درصد استخراج (۹۵٪) در شرایط بهینه <math>pH=5/5</math>، حجم ۳۵۰ میکرولیتر DES به همراه ۵۰۰ میکرولیتر حلال ۱-دکانول در حضور ۵۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نمک کلرید سدیم مشاهده شد. تأثیر حضور یون‌ها و رنگ‌های مختلف در شرایط بهینه بر بازدهی استخراج مطالعه و مشخص گردید که روش دارای انتخاب‌پذیری قابل قبولی می‌باشد. روش حاضر در دامنه‌ی غلظتی از <math>10^{-7} \times 5/0</math> تا <math>10^{-5} \times 2/0</math> مول بر لیتر رنگ پورپورین خطی بوده، دارای حد تشخیص <math>10^{-7} \times 2/7</math> مول بر لیتر، فاکتور پیش‌تغلیظ ۱۰۰ و انحراف استاندارد نسبی ۳/۱۳ درصد می‌باشد. در پایان برای بررسی کاربردپذیری روش پی‌شنهادی، بازیابی رنگ پورپورین از نمونه‌های آبی به صورت موفقیت‌آمیزی بررسی گردید.</p>
بازنگری مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵	
پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۱/۲۸	
<b>کلمات کلیدی:</b>	
میکرواستخراج فاز مایع، حلال فرازودگداز، جداسازی، پیش‌تغلیظ، پورپورین.	

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.28461.2107>

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



شکل ۱. شماتیک روش میکرواستخراج فاز مایع انجام شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری پورپورین.

## ۱- مقدمه

تاکنون در زمینه‌ی کاربرد رنگ‌های طبیعی، مطالعات متعددی بر روی گیاه روناس<sup>۱</sup> گزارش شده است [۱ و ۲]. اغلب این مطالعات بر بهینه‌سازی روش‌های رنگرزی و بررسی خواص پایداری رنگ‌های بومی بر روی الیاف طبیعی<sup>۲</sup> تمرکز دارند. برخی تحقیقات تئوری نیز بر اساس رنگ‌آمیزی با رنگ‌های طبیعی انجام شده است [۳ و ۴]. پورپورین (۱ و ۲ و ۴-تری-هیدروکسی آنتراکینون)<sup>۳</sup>، رنگ‌دانه‌ی اصلی موجود در ریشه‌های روناس هندی (روپیا کوردیفولیا) است. ساختار آن مشابه ساختار رنگ‌های پراکنده می‌باشد. این رنگ به میزان کمی در آب انحلال‌پذیر است اما در الکل، اتر، استون و محلول در حال جوشاندن آلوم<sup>۴</sup> حل می‌شود. رنگ پورپورین در برابر گرما ناپایدار است [۵].

در فرآیند تجزیه‌ای، روش‌های جداسازی-پیش‌تغلیظ به عنوان روش‌های آماده‌سازی نمونه برای تعیین مقدار کم آنالیت در بافت پیچیده استفاده می‌شوند. مراحل آماده‌سازی نمونه شامل جداسازی و غنی‌سازی آنالیت هدف از بافت نمونه است [۶]. بنابراین اندازه‌گیری‌های دقیق‌تر می‌تواند با بکار بردن روش‌های جداسازی و پیش‌تغلیظ انجام شود [۷ و ۸]. با وجود تغییرات مهم در سیستم‌های اندازه‌گیری تجزیه‌ای و کاربرد آن‌ها در سال‌های اخیر، غالباً یک مرحله آماده‌سازی قبل از مرحله‌ی تشخیص دستگاهی، مورد نیاز است. برخی از روش‌های آماده‌سازی نمونه برای جداسازی و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها عبارتند از استخراج مایع-مایع [۹]، استخراج فاز جامد [۱۰] و استخراج نقطه‌ی ابری [۱۱].

در سال‌های اخیر با تکیه بر اصول شیمی سبز، روش‌های جدیدی مانند میکرواستخراج فاز مایع<sup>۵</sup> (LPME) از قبیل میکرواستخراج تک‌قطره<sup>۶</sup> (SDME)، میکرواستخراج فاز مایع فیبر توخالی<sup>۷</sup> (HF-LPME) و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی<sup>۸</sup> (DLLME) توسعه یافته است. روش‌های میکرواستخراج دارای مزایایی از قبیل سرعت بالا، فاکتور تغلیظ بالا (به دلیل نسبت بالاتر حجم نمونه به حجم فاز پذیرنده)، عملکرد آسان، مصرف کم حلال‌های آلی و سازگاری با محیط زیست است [۱۲]. در طول چند دهه‌ی اخیر به دلیل ضرورت گسترش روش تجزیه‌ای سبز و همچنین رفع مشکلات هزینه‌ی بالا و سمیت در استفاده از برخی حلال‌ها، نوع جدیدی از حلال‌های مایع یونی به عنوان حلال‌های فرازودگداز<sup>۹</sup> (DES) مورد توجه قرار گرفته اند [۱۳]. حلال‌های فرازودگداز به وسیله‌ی دو یا چند جزء اصلی سبز تشکیل می‌شوند که از طریق پیوند هیدروژنی بین مولکولی به همدیگر متصل می‌گردند. این حلال‌ها معمولاً در حالت مایع و دارای نقطه‌ی ذوب بین ۷۰-۲۵ درجه‌ی سانتیگراد هستند. مهمترین

<sup>1</sup> Madder

<sup>2</sup> Natural fibers

<sup>3</sup> 1,2,4 trihydroxyanthraquinone

<sup>4</sup> Boiling alum solution

<sup>5</sup> Liquid-phase microextraction (LPME)

<sup>6</sup> Single-drop microextraction (SDME)

<sup>7</sup> Hollow-fiber LPME (HF-LPME)

<sup>8</sup> Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)

<sup>9</sup> Deep eutectic solvents (DES)

ویژگی حلال‌های فرازودگداز، توانایی تهیه‌ی آن‌ها با قطبیت‌های مختلف برای استخراج آنالیت‌های دارای قطبیت‌های گوناگون است. این قطبیت قابل تنظیم، حلال‌های فرازودگداز را به عنوان حلال‌های ویژه‌ای برای میکرواستخراج فاز مایع در فرایند پیش‌تغلیظ می‌سازد [۱۴].

در این پروژه، از روش میکرواستخراج فاز مایع به عنوان یک روش آسان، اقتصادی، با پیش‌تغلیظ بالا مبتنی بر حلال فرازودگداز به عنوان حلال مناسب، ارزان و سبز برای جداسازی و پیش‌تغلیظ رنگ پورپورین از محلول آبی استفاده شد. پارامترهای مؤثر بر بازدهی استخراج بررسی و به روش چندعاملی طراحی باکس-بنکن<sup>۱</sup> بهینه‌سازی شد. کاربرد روش برای بازیابی و اندازه‌گیری پورپورین در نمونه‌های مختلف آبی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد شیمیایی و واکنشگرها

تمام مواد شیمیایی، رنگ‌ها، حلال‌ها و نمک نیترات و یا کلرید فلزات با بالاترین درجه‌ی خلوص از شرکت مرک<sup>۲</sup> تهیه شدند. کولین کلرید از شرکت سیگما آلدریج و پورپورین از شرکت فلوکا<sup>۳</sup> خریداری شد.

### ۲-۲- دستگاه‌های مورد استفاده

از دستگاه طیف‌سنج جذبی فرابنفش-مرئی مدل T80+ ساخت شرکت PG-Instruments Ltd انگلستان برای مطالعات طیف-های جذبی استفاده شد. اندازه‌گیری‌های pH محلول با استفاده از دستگاه pH متر مجهز به الکتروود شیشه‌ی ترکیبی ساخت شرکت Metrohm سوئیس انجام شد. همچنین دستگاه التراسونیک مدل KMH1-120W6501 ساخت شرکت Ltd چین مورد استفاده قرار گرفت.

### ۲-۳- روش کار

#### ۲-۳-۱- سنتز حلال فرازودگداز

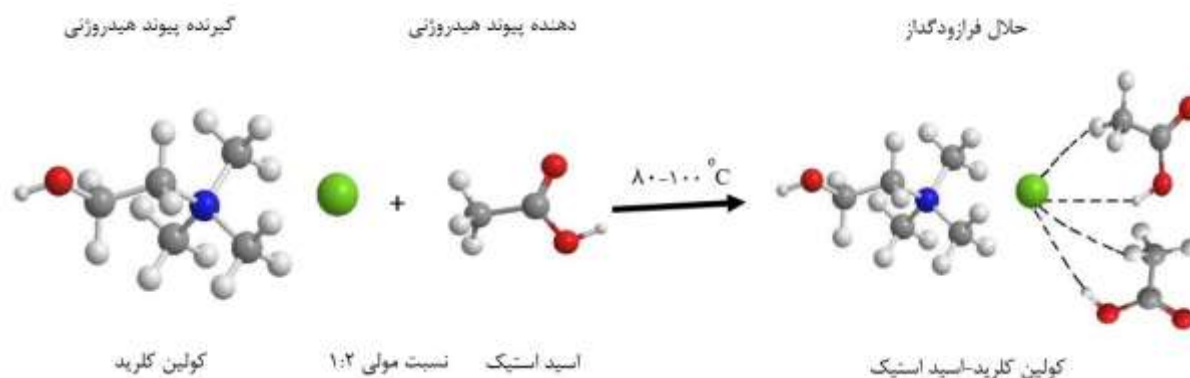
مقدار ۳/۰ میلی‌مول کولین کلرید به عنوان گیرنده‌ی پیوند هیدروژنی (۴۲۹/۰ گرم) را همراه با ۳/۰ میلی‌مول از دهنده‌های مختلف پیوند هیدروژنی شامل اسید استیک (۱۷۱/۰ گرم)، اسید اگزالیک (۳۷۸/۰ گرم)، اتیلن گلیکول (۱۶۸/۰ گرم) و اوره (۱۸۱/۰ گرم) با نسبت مولی ۱:۱ به یک لوله‌ی آزمایش منتقل و در حمام روغن با دمای ۸۰ تا ۱۰۰ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار داده تا مایع شفاف همگن تشکیل شود. سپس DES تهیه شده در آزمایش میکرواستخراج فاز مایع مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به درصد بازده‌های استخراج، حلال DES شامل کولین کلرید-اسید استیک به عنوان نوع DES بهینه انتخاب شد. سپس نسبت مولی اجزای سازنده‌ی این نوع DES مورد بررسی قرار گرفت. بر

<sup>۱</sup> Box behnken design (BBD)

<sup>۲</sup> Merck

<sup>۳</sup> Fluka

اساس نتایج به دست آمده، نسبت مولی ۱:۲ کولین کلرید-اسید استیک به عنوان نسبت بهینه انتخاب گردید. روش تهیه‌ی DES متشکل از کولین کلرید-اسید استیک در شکل (۲) به صورت شماتیک نشان داده شده است. همچنین طیف جذبی و مادون قرمز حلال سنتز شده در اطلاعات ضمیمه‌ی مقاله آورده شده است.



شکل ۲. شماتیک روش تهیه‌ی حلال فرازودگداز کولین کلرید-اسید استیک با نسبت مولی ۱:۲ [۱۵].

### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری پورپورین به روش میکرواستخراج فاز مایع

ابتدا ۵ میلی‌لیتر محلول پورپورین با غلظت  $10^{-4} \times 1/0$  مولار در  $\text{pH}=5/5$  تنظیم گردید. سپس با دستگاه اسپکتروفوتومتری UV-Vis جذب اولیه‌ی آن  $A_{0}$  قرائت شد. در مرحله‌ی بعد ۳۵۰ میکرولیتر DES و ۵۰۰ میکرولیتر ۱-دکانول به عنوان حلال استخراجی به محلول آبی تزریق گردید. سپس به مدت ۲ دقیقه در حمام التراسونیک با دمای ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفت و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ گذاشته شد. سپس ۵ دقیقه در حمام یخ، سرد شد تا جدایی فازها صورت گیرد. فاز آبی باقیمانده و فاز آلی حاوی آنالیت، از هم جدا شد. برای گرفتن طیف جذبی، فاز آلی استخراجی به میکروسول کوارتز منتقل و با دستگاه اسپکتروفوتومتر طیف آن ثبت گردید.

### ۳- بحث و نتیجه‌گیری

#### ۳-۱- بهینه‌سازی عوامل مؤثر

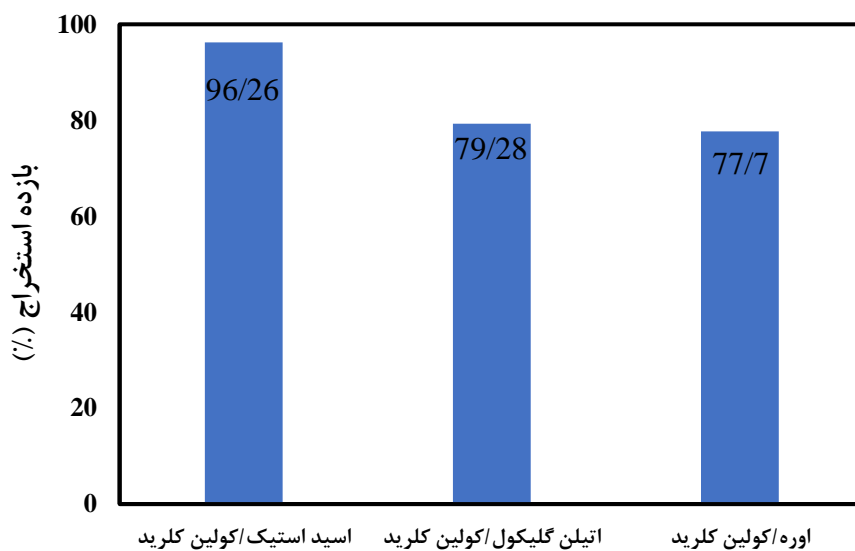
در این پژوهش برای بهینه‌سازی پارامترهای مهم از قبیل نوع و حجم حلال‌های استخراجی،  $\text{pH}$  محلول نمونه، نسبت اجزای حلال استخراجی DES و غلظت نمک بر میزان استخراج پورپورین از روش طراحی آزمایش با استفاده از نرم‌افزار دبیزاین اکسپرت<sup>۱</sup> استفاده شد. اثر پارامترهای مؤثر بر میکرواستخراج پورپورین در مرحله‌ی غربالگری با استفاده از طراحی فاکتوریل کامل<sup>۲</sup> و در مرحله‌ی بهینه‌سازی به کمک طراحی باکس-بنکن بررسی شد. به این صورت که چهار فاکتور  $\text{pH}$ ، حجم حلال استخراجی DES، حجم حلال استخراجی ۱-دکانول و غلظت نمک در سه سطح مورد بررسی قرار گرفت [۱۶].

<sup>1</sup> Design expert

<sup>2</sup> Full factorial design (FFD)

## ۳-۱-۱- اثر نوع حلال استخراج کننده

اثر سه نوع حلال استخراجی فرازودگاز بر بازدهی استخراج پورپورین از محلول‌های  $10^{-4} \times 1/0$  مولار آبی تثبیت شده در ۵/۵ = pH مورد بررسی قرار گرفت. بازده‌های استخراجی نشان می‌دهد که بهترین نوع حلال استخراجی، DES شامل کولین کلرید-اسید استیک با بازدهی استخراجی (۹۶/۲۶ درصد) است. همچنین بازدهی استخراج برای حلال استخراجی شامل کولین کلرید-اتیلن گلیکول (۷۹/۲۸ درصد) و کولین کلرید-اوره (۷۷/۷۰ درصد) می‌باشد (شکل ۳). بنابراین DES شامل کولین کلرید-اسید استیک به عنوان حلال استخراجی بهینه انتخاب شد که در مراحل بعدی بهینه‌سازی و ادامه‌ی آزمایش‌ها از این نوع حلال به همراه ۱-دکانول استفاده گردید. بازده‌های استخراجی سه نوع حلال DES بکار رفته در روش مذکور به صورت نمودار میله‌ای در شکل (۳) نمایش داده شده است.



شکل ۳. اثر نوع حلال استخراج کننده‌ی DES با نسبت ۱:۱ بر میزان استخراج پورپورین بر اساس درصد بازدهی استخراجی حاصل از طیف‌های جذبی. (شرایط: ۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی آبی با غلظت  $10^{-4} \times 1/0$  مولار، ۳۰۰ میکرولیتر حلال DES، ۶۰۰ میکرولیتر حلال ۱-دکانول و pH=۹/۸۸).

## ۳-۱-۲- اثر نسبت اجزای حلال استخراج کننده

پس از اینکه DES شامل کولین کلرید-اسید استیک به عنوان حلال بهینه انتخاب گردید، نسبت مولی اجزای تشکیل‌دهنده‌ی آن نیز بهینه شد. برای این منظور نسبت‌های مولی ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳ و ۲:۱ کولین کلرید-اسید استیک تهیه شدند. نتایج نشان داد که برای نسبت مولی ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ بازدهی استخراج به ترتیب ۹۶/۲۶، ۱۰۰ و ۹۸/۸۹ درصد به دست آمد. لازم به ذکر است که نسبت مولی ۲:۱ در مرحله‌ی تشکیل DES ناموفق بود. لذا نسبت ۱:۲ کولین کلرید-اسید استیک به عنوان حلال بهینه انتخاب گردید.

۳-۱-۳ نمودار پارتو<sup>۱</sup>

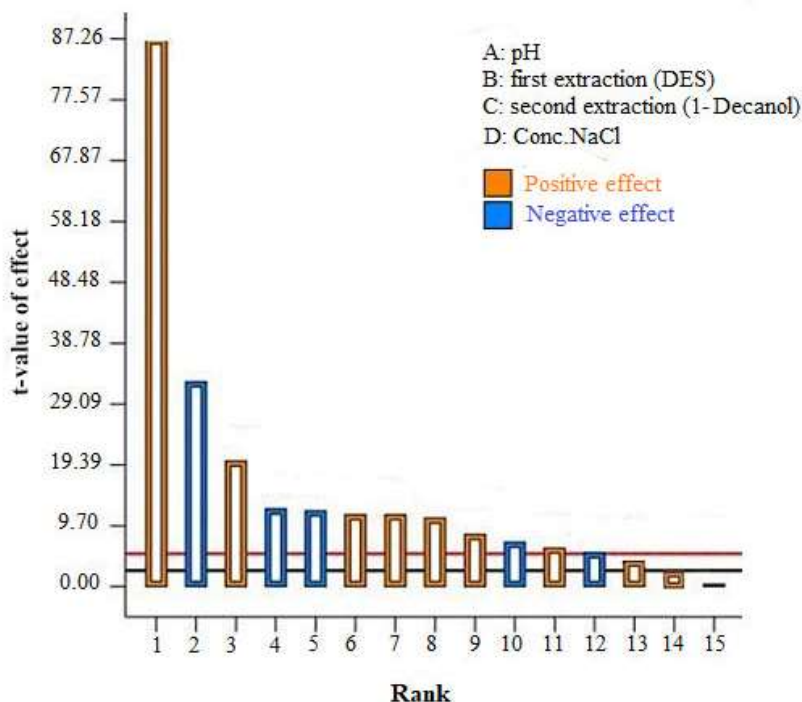
انتخاب سطح متغیرها برای کدگذاری در جدول (۱) ارائه شده است. در نمودار پارتو طول هر نوار متناسب با تأثیر فاکتور مربوطه است. وقتی یک اثر از خط مرجع عبور کند، در سطح اطمینان ۹۵ درصد به عنوان اثر معنی‌داری در نظر گرفته می‌شود. پاسخ‌های حاصل از جدول طراحی غربالگری به وسیله نمودار پارتو مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل (۴) اثر pH، اثر حجم حلال‌های استخراجی DES و ۱-دکانول، اثر غلظت نمک و اثر برهمکنش بین متغیرهای مختلف از خط مرجع، که بیانگر حدود اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد، عبور کرده است. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که تأثیر این متغیرها بر پاسخ آزمایش معنی‌دار بوده است. علاوه بر این، علامت‌های مثبت و منفی بیانگر این هستند که پاسخ سیستم از پایین‌ترین سطح به بالاترین سطح فاکتور مربوطه به ترتیب افزایش یا کاهش می‌یابد. نمودار پارتو نشان می‌دهد که هر چهار فاکتور مورد مطالعه در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار می‌باشند. حجم DES، حجم ۱-دکانول و غلظت نمک دارای اثر مثبت هستند. یعنی از پایین‌ترین سطح این فاکتورها به بالاترین سطح آن‌ها کارایی استخراج افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر مساحت پیک بیشتری به دست می‌آید. پارامتر pH دارای اثر منفی است. یعنی افزایش آن باعث کاهش کارایی استخراج می‌گردد.

پس از مرحله غربالگری مشخص شد که هر چهار فاکتور مورد بررسی بر روی نتایج مؤثر می‌باشند. بنابراین برای مرحله بهینه‌سازی از طراحی باکس-بنکن استفاده شد که با ۳۰ اجرا و ۶ نقطه‌ی مرکزی مدل‌سازی گردید. شرایط بهینه‌ی آزمایش و مقادیر بهینه‌ی هر یک از پارامترهای بررسی شده در روش میکرواستخراج فاز مایع به صورت جدول (۲) گزارش شده است.

جدول ۱. متغیرهای انتخاب شده برای طراحی و سطح آن‌ها.

سطح			فاکتورها
-۱	۰	۱	
۱	۵/۵	۱۰	pH :A
۲۰۰	۳۵۰	۵۰۰	B: حجم حلال استخراجی DES (میکرولیتر)
۲۰۰	۵۰۰	۸۰۰	C: حجم حلال استخراجی ۱- دکانول (میکرولیتر)
۱۰۰	۵۵۰	۱۰۰۰	D: غلظت نمک (میلی گرم بر لیتر)

<sup>۱</sup> Pareto chart



شکل ۴. نمودار پارتو حاصل از طرح فاکتوریل کامل برای میکرواستخراج پورپورین. A: pH فاز آبی، B: حجم حلال DES (میکرولیتر)، C: حجم حلال ۱-دکانول (میکرولیتر)، D: غلظت نمک (میلی گرم بر لیتر).

جدول ۲. شرایط بهینه‌ی به دست آمده از میکرواستخراج فاز مایع پورپورین.

پارامتر	مقدار بهینه
نوع حلال استخراجی DES	کولین کلرید-استیک اسید
نسبت اجزای کولین کلرید-اسید استیک	۱:۲
pH فاز آبی	۵/۵
حجم حلال استخراجی DES	۳۵۰ میکرولیتر
حجم حلال استخراجی ۱-دکانول	۵۰۰ میکرولیتر
غلظت نمک سدیم کلرید	۵۵۰ میلی گرم بر لیتر

### ۳-۱-۴- آنالیز واریانس (ANOVA)

برای تجزیه و تحلیل پاسخ‌های به دست آمده، از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. با توجه به جدول آنالیز واریانس، F-value برابر ۲۸/۷۶ می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن مدل است. همچنین P-value کمتر از ۰/۰۵ بیانگر معنی‌دار بودن متغیر بر پاسخ تجزیه‌ای می‌باشد که کمتر از ۰/۰۰۰۱ مشخص شده است. ضریب همبستگی ( $R^2$ ) برای مدل ارائه شده ۰/۹۷۶۷ می‌باشد که حاکی از توانمندی نسبتاً مناسب مدل برای برازش داده‌های تجربی است و بیانگر ارتباط بین پاسخ و عوامل مستقل می‌باشد. ضریب همبستگی Adjusted  $R^2$  برابر ۰/۹۴۲۷ میزان معنادار بودن مدل مورد استفاده را نشان می‌دهد. پارامتر دیگر Predicted  $R^2$  است که میزان توانایی مدل در پیش‌بینی را مشخص می‌نماید. مقدار عدم برازش (Lack of Fit) به دست آمده در مرحله‌ی بهینه‌سازی ۰/۱۲۸۰ می‌باشد که حاکی از مناسب بودن نتایج حاصل شده است.



## ۵-۱-۳- نمودار همبستگی بین مقادیر پیش‌بینی شده با مقادیر آزمایشی

نمودار مقادیر آزمایشی درصد میکرواستخراج رنگ پورپورین در برابر مقادیر محاسبه شده از معادله‌ی چندجمله‌ای درجه‌ی دوم (معادله شماره ۱) بیانگر همبستگی خوب (بالاتر از ۰/۹۹) بین داده‌های به دست آمده و پیش‌بینی شده است. این معادله ارتباط بین پاسخ تجزیه‌ای (بازدهی استخراج) و متغیرهای معنی‌دار در مرحله‌ی بهینه‌سازی را نشان می‌دهد.

(۱)

$$\%ER = +100.32 - 6.19A + 0.5000B + 21.89C + 1.85D + 2.18AC + 3.28AD - 7.32BC - 8.60BD - 7.89A^2 - 4.04B^2 - 22.87C^2 - 10.91D^2 + 11.44A^2C - 7.86AD^2 + 15.36BC^2 - 8.98BD^2$$

در معادله بالا، جملات با علامت مثبت دارای اثر مثبت و جملات با علامت منفی دارای اثر منفی می‌باشند. بزرگتر بودن ضریب جملات این معادله‌ها نشان دهنده‌ی این است که چنین فاکتورهایی بر روی میکرواستخراج و پیش‌تغلیظ پورپورین تأثیر بیشتری دارند.

## ۶-۱-۳- نمودارهای سطح پاسخ

نتایج حاصل از مدل مورد بررسی را می‌توان به وسیله‌ی نمودارهای سه‌بعدی تفسیر کرد. این نمودارها اثر دو فاکتور را به طور همزمان نشان می‌دهند. انحنای نمودارهای سه‌بعدی در مورد عوامل بررسی شده، بیانگر برهمکنش بین آن‌ها می‌باشد. با توجه به راهنمای رنگ‌ها، در نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی، رنگ قرمز بیانگر بیشترین بازده و رنگ آبی بیانگر کمترین بازده است. در این نمودارها، پارامترهای مؤثر روی محورهای X و Y قرار دارند و پاسخ بر روی محور Z رسم شده است.

## ۱-۶-۳- برهمکنش pH و ۱-دکانول

با افزودن مقدار مناسبی از محلول‌های اسید هیدروکلریک یا سدیم هیدروکسید به نمونه، pH محلول آبی پورپورین در محدوده‌ی ۱ تا ۱۰ تثبیت شد. نمودار سطح پاسخ برای برهمکنش متغیرهای pH فاز آبی و حلال استخراجی ۱-دکانول به صورت سه‌بعدی در شکل (۵-الف) نمایش داده شده است. با توجه به نمودارها، بازدهی استخراج در pHهای بالا کاهش می‌یابد ولی در pHهای اسیدی و پایین‌تر از خنثی، بازدهی بالایی از استخراج مشاهده می‌شود و بیشترین بازدهی استخراجی در pH=۵/۵ می‌باشد. از طرفی با افزایش حجم حلال استخراجی ۱-دکانول، بازدهی استخراج نیز افزایش می‌یابد ولی در مقادیر پایین حجم ۱-دکانول، بازدهی استخراجی کاهش پیدا می‌کند. با توجه به وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار رنگ پورپورین، این ترکیب دارای دو  $pK_a$  با مقادیر ۴/۷ و ۹/۵ است [۱۷]. اثر pH بر روی کارایی استخراج را می‌توان به ساختار شیمیایی رنگ پورپورین و ثابت‌های اسیدی آنالیت و اجزای حلال استخراجی نسبت داد.

## ۲-۶-۱-۳- برهمکنش pH و نمک کلرید سدیم

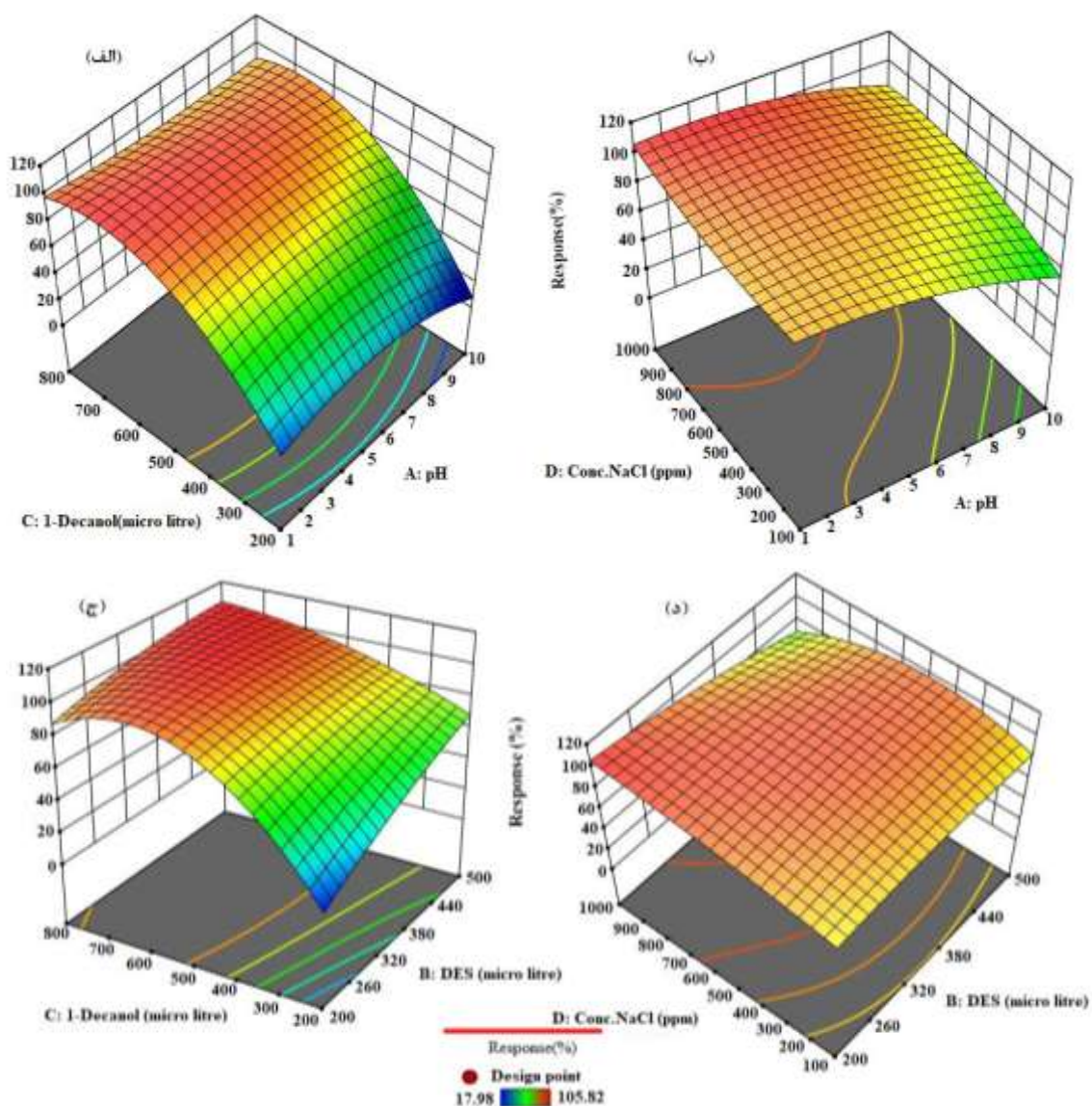
نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ برای برهمکنش متغیرهای pH فاز آبی و نمک کلرید سدیم در شکل (۵-ب) نشان داده شد. نتایج بیانگر این است که برای pHهای قلیایی بازدهی استخراج کاهش می‌یابد ولی برای pHهای اسیدی و کمتر از خنثی، بازدهی استخراج بالایی به دست می‌آید. بنابراین pH اسیدی ۵/۵ به عنوان pH بهینه انتخاب شد. افزایش نمک به محلول مورد بررسی، ممکن است بر روی فرآیند استخراج و بازدهی استخراجی مؤثر بوده، که این می‌تواند به دلیل پدیده‌های خروج نمک<sup>۱</sup> و ورود نمک<sup>۲</sup> باشد. در پدیده‌ی خروج نمک، یون‌های نمک اضافه شده، توسط مولکول‌های حلال احاطه می‌شوند؛ بنابراین حلالیت آنالیت در فاز آبی کاهش می‌یابد و گونه‌ی مورد نظر راحت‌تر می‌تواند به فاز آلی منتقل گردد. بنابراین نمک باعث تسهیل خروج آنالیت به درون فاز آلی می‌شود و بازدهی استخراجی افزایش می‌یابد [۱۸]. اما در پدیده‌ی ورود نمک، افزایش قدرت یونی در نتیجه‌ی افزودن نمک، حلالیت آنالیت در فاز آبی افزایش پیدا می‌کند. بنابراین باعث جلوگیری از استخراج آنالیت به درون فاز آلی شده و بازدهی استخراج کاهش می‌یابد. در آزمایش‌های انجام شده با توجه به رنگ قرمز و انحنای نمودار، افزایش نمک کلرید سدیم باعث افزایش بازدهی استخراج می‌شود.

## ۳-۶-۱-۳- برهمکنش حلال‌های DES و ۱-دکانول

نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ برای برهمکنش متغیرهای شامل حلال‌های استخراجی DES و ۱-دکانول به صورت شکل (۵-ج) مشخص شده است. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که حجم‌های کم مانند ۲۰۰ میکرولیتر برای هر دو نوع حلال استخراجی، حتی در pH بهینه، منجر به کاهش بازدهی استخراج می‌گردد. در نهایت حجم ۳۵۰ میکرولیتر برای DES و حجم ۵۰۰ میکرولیتر برای ۱-دکانول به عنوان مقادیر بهینه انتخاب شدند. با توجه به رنگ و انحنای نمودار، با افزایش هر یک از حلال‌های مذکور بازدهی استخراج پورپورین در روش میکرواستخراج فاز مایع افزایش می‌یابد.

<sup>1</sup> Salting-out

<sup>2</sup> Salting-in



شکل ۵. نمودارهای سطح پاسخ برای برهمکنش بین متغیرهای مؤثر بر فرآیند میکرواستخراج پورپورین. الف: pH و ۱-دکانول. ب: pH و کلرید سدیم. ج: حلال‌های DES و ۱-دکانول. د: حلال DES و نمک کلرید سدیم. حجم حلال‌های DES و ۱-دکانول (میکرولیتر)، غلظت نمک (mg/L).

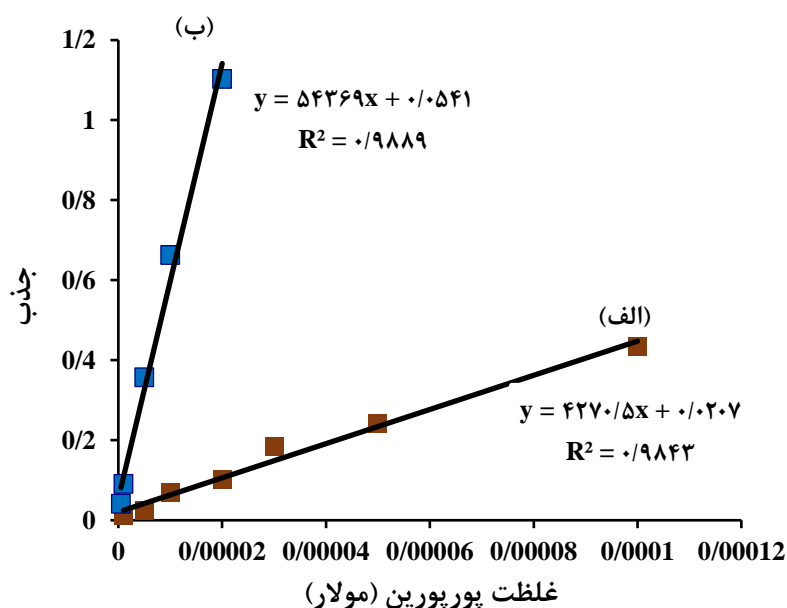
### ۳-۱-۶-۴- برهمکنش حلال DES و نمک کلرید سدیم

نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ برای برهمکنش متغیرهای حلال استخراجی DES و نمک کلرید سدیم به صورت شکل (۵-د) مشخص شده است. با توجه به رنگ قرمز و انحنای نمودار، حجم حلال DES با بازدهی استخراج رابطه‌ی مستقیم دارد و با افزایش آن، بازدهی استخراج پورپورین به فاز آلی افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که اثر غلظت نمک بر روی کارایی استخراج مؤثر بوده که احتمالاً به دلیل پدیده‌ی خروج نمک، افزایش بازدهی استخراج مشاهده می‌گردد. با توجه به نتایج به دست آمده، غلظت ۵۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مقدار بهینه‌ی نمک در روش میکرواستخراج فاز مایع پورپورین برای ادامه‌ی کار انتخاب گردید.

## ۳-۲- ارزیابی آماری داده‌های تجزیه‌ای

به منظور ارزیابی میزان کارایی روش میکرواستخراج فاز مایع در استخراج پورپورین، ارقام شایستگی روش پیشنهادی شامل محدوده‌ی غلظتی خطی، معادله‌ی خط، ضریب همبستگی، فاکتور پیش‌تغلیظ، فاکتور بهبود، دقت و حد تشخیص در شرایط بهینه محاسبه شد. برای بررسی دامنه‌ی خطی روش، پورپورین موجود در محلول‌هایی با غلظت مختلف تهیه و میکرواستخراج در شرایط بهینه انجام شد. بعد از خواندن شدت جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر، منحنی کالیبراسیون رسم شد. مطابق نمودار به دست آمده، منحنی کالیبراسیون در محدوده‌ی غلظتی  $5/0 \times 10^{-7}$  تا  $2/0 \times 10^{-5}$  مولار خطی بوده و دارای ضریب همبستگی عالی  $R^2 = 0/9889$  می‌باشد. معادله‌ی خطی منحنی کالیبراسیون به صورت  $y = 54369x + 0/0541$  است که در آن  $y$  جذب محلول و  $x$  به عنوان غلظت پورپورین برحسب مول بر لیتر می‌باشد. معادله‌ی منحنی کالیبراسیون قبل از فرایند میکرواستخراج به صورت  $y = 4270/5x + 0/0207$  به دست آمد. در این روش فاکتور پیش‌تغلیظ، با تقسیم حجم آستانه (بیشترین حجم آبی نمونه) بر حجم نهایی فاز آلی برابر با ۱۰۰ به دست آمد. فاکتور بهبود نیز با تقسیم شیب منحنی کالیبراسیون پس از میکرواستخراج به شیب منحنی کالیبراسیون قبل از میکرواستخراج برابر ۱۲/۷۳ محاسبه شد. انحراف استاندارد نسبی (دقت) برای ۵ بار اندازه‌گیری پورپورین ۳/۱۳ درصد و حد تشخیص روش  $(LOD = 3S_b/m)$  ۰/۲۷ میکرومولار به دست آمد. نمودارهای منحنی کالیبراسیون قبل و بعد از میکرواستخراج در شکل (۶) نمایش داده شده است.

در جدول (۳) مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری مقادیر کم رنگ پورپورین آورده شده است که این مشخصات داده‌های منطقی و مناسبی می‌باشند.



شکل ۶. نمودارهای منحنی کالیبراسیون رنگ پورپورین قبل از میکرواستخراج (الف) و بعد از میکرواستخراج (ب).

جدول ۳. مشخصات تجزیه‌ای روش میکرواستخراج فاز مایع در اندازه‌گیری و پیش‌تغلیظ پورپورین.

مشخصات تجزیه‌ای	داده‌ها
معادله‌ی رگرسیون	$y = 54369x + 0.0541$
دامنه‌ی غلظت	$2 \times 10^{-5}$ تا $5 \times 10^{-7}$
ضریب همبستگی ( $R^2$ )	0/9889
فاکتور پیش‌تغلیظ	100
فاکتور بهبود	12/73
انحراف استاندارد نسبی (%)	3/13
حد تشخیص (میکرو مولار)	0/27

### ۳-۳- بررسی اثر مزاحمت‌ها

به منظور بررسی گزینش‌پذیری روش، میکرواستخراج محلول‌های ۱۰۰/۰ میکرو مولار پورپورین با حضور غلظت ۱۰۰ برابر آنالیت از ۱۷ نوع یون مزاحم شامل:  $K^+$ ،  $Ni^{2+}$ ،  $Co^{2+}$ ،  $NO_3^-$ ،  $SO_4^{2-}$ ،  $Mg^{2+}$ ،  $F^-$ ،  $Pb^{2+}$ ،  $Cu^{2+}$ ،  $Mn^{2+}$ ،  $I^-$ ،  $Cd^{2+}$ ،  $Al^{3+}$ ،  $Ag^+$ ،  $Br^-$ ،  $CH_3COO^-$  و  $Ba^{2+}$  و نیز در حضور غلظت دوبرابری از چهار نوع رنگ اتیل اورانژ، سانسیت یلو، متیلن بلو، فنول فتالین در شرایط بهینه صورت گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده تنها دو یون آلومینیوم و ید، توانستند در این حد غلظتی باعث تغییر بیش از ۵ درصدی سیگنال شوند. بنابراین روش مورد بررسی دارای انتخاب‌پذیری مناسبی می‌باشد.

### ۳-۵- تجزیه‌ی نمونه‌های حقیقی

برای ارزیابی دقت و صحت روش پیشنهادی، از این روش برای بازیابی و اندازه‌گیری رنگ پورپورین با غلظت‌های مختلف در نمونه‌های آبی استفاده شد. برای اندازه‌گیری پورپورین در سه نمونه‌ی آب شهر یاسوج، آب شهر گچساران و آب معدنی پیوار، مقادیر مشخص از محلول استاندارد پورپورین به نمونه‌های آبی مورد نظر اضافه و میکرواستخراج پورپورین به روش افزایش استاندارد انجام شد. جدول (۴) نتایج حاصل از این بررسی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل شده، روش پیشنهادی برای بازیابی رنگ در نمونه‌های اشاره شده مناسب است. نمودار طیف‌سنج جذبی فرابنفش-مرئی مربوط به تمام نمونه‌های حقیقی در اطلاعات ضمیمه آورده شده است.

جدول ۴. نتایج اندازه‌گیری پورپورین در نمونه‌های آبی به روش افزایش استاندارد.

نمونه‌ها	اضافه شده به نمونه (مولار)	پیدا شده در نمونه (مولار)	درصد بازدهی استخراج (%)
آب شهر یاسوج	---	زیر حد تشخیص	---
	$1/0 \times 10^{-5}$	$9/86 \times 10^{-6}$	98/57
	$2/0 \times 10^{-5}$	$1/90 \times 10^{-5}$	95/08
آب شهر گچساران	---	زیر حد تشخیص	---
	$1/0 \times 10^{-5}$	$9/60 \times 10^{-6}$	95/99
	$2/0 \times 10^{-5}$	$1/93 \times 10^{-5}$	96/46
آب معدنی پیوار	---	زیر حد تشخیص	---
	$1/0 \times 10^{-5}$	$9/52 \times 10^{-6}$	95/26
	$2/0 \times 10^{-5}$	$1/81 \times 10^{-5}$	90/39

## ۳-۶- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، از روش میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر حلال‌های فرازودگداز به منظور پیش‌تغلیظ و استخراج پورپورین استفاده شد. روش مذکور به عنوان یک روش جدید برای استخراج مقادیر کم رنگ مورد نظر کارآمد می‌باشد. استفاده از حلال‌های فرازودگداز به عنوان جایگزین حلال‌های سمی و گران، از نظر سبز بودن و جنبه‌های اقتصادی مفید می‌باشد. استفاده از حجم کم حلال فرازودگداز و ۱-دکانول (به ترتیب ۳۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر)، بازدهی استخراج بالا، محدوده‌ی خطی وسیع، فاکتور تغلیظ خوب، حد تشخیص پایین، سادگی، مدت‌زمان کوتاه، ارزان بودن، سبز بودن و سازگاری با محیط زیست از مزیت‌های روش مذکور می‌باشند. مزیت‌های دیگر این روش شامل دستیابی آسان به فاز استخراجی، گزینش پذیری بالا و کاربردپذیری خوب در نمونه‌های حقیقی است.

## ۴- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه یاسوج از این تحقیق کمال تشکر را دارند.

## ۵- مراجع

- [1] Singh, S., Jahan, S., & Gupta, K. C. (1993). Optimization of procedure for dyeing of silk with natural dye madder roots (*Rubia cordifolia*). *Colourage*, 40(8), 33-36.
- [2] Katti, M. R., Kaur, R., & Shrihari, N. (1996). Dyeing of silk with mixture of natural dyes. *Colourage*, 43(12), 37-40.
- [3] Shimizu, Y., Dohmyou, M., Nakajima, T., & Kimura, M. (1991). Dyeing of oxyanthraquinones on silk. *Journal of Home Economics of Japan*, 42(7), 629-633.
- [4] Gupta, D. B., & Gulrajani, M. L. (1993). Studies on dyeing with natural dye Juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone). *Indian J. Fibre Text. Res.*, 18, 202-206.
- [5] Gupta, D., Kumari, S., & Gulrajani, M. (2001). Dyeing studies with hydroxyanthraquinones extracted from Indian madder. Part 2: Dyeing of nylon and polyester with nordamncanthal. *Coloration technology*, 117(6), 333-336.
- [6] Samadifar, M., Yamini, Y., & Khataei, M. M. (2023). Magnetically solid-phase extraction of diazinon and chlorpyrifos pesticides in vegetables using magnetic covalent triazine-based framework incorporated chitosan nanocomposite. *Journal of Food Composition and Analysis*, 118, 105158.
- [7] Setayeshfar, I., Rajabi, H. R., & Khani, O. (2022). Application of flow injection analysis-solid phase extraction based on ion-pair formation for selective preconcentration of trace amount of anti-HIV drug. *Microchemical Journal*, 177, 107245.
- [8] Rezaei, M., Rajabi, H. R., Bavarsad-Esfandiari, N., Shokrollahi, A., & Setayeshfar, I. (2022). Vortex-assisted dispersive micro-solid phase extraction based on nanostructured imprinted polymer: A

- comparison study between spectrophotometric and solution scanometric techniques. *Journal of Chromatography B*, 1199, 123262.
- [9] Mayahi, J., & Rajabi, H. R. (2017). Comparison study on separation of morin: ultrasound assisted molecularly imprinted polymeric nanoparticles-solid phase extraction versus solidification of floating organic-drop assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *New Journal of Chemistry*, 41(23), 14236-14245.
- [10] Fereidoonipour, F., & Rajabi, H. R. (2017). Development of flow injection analysis-solid phase extraction based on ion imprinted polymeric nanoparticles as an efficient and selective technique for preconcentration of zinc ions from aqueous solution. *New Journal of Chemistry*, 41(17), 8828-8836.
- [11] Tiwari, S., Sharma, N., & Saxena, R. (2016). On-line speciation of chromium using a modified chelating resin and determination in industrial water samples by flame atomic absorption spectrometry. *New Journal of Chemistry*, 40(2), 1412-1419.
- [12] Ahmadi, R., Azooz Ebaa, A., Yamini, Y., and Ramezani, A. M., "Liquid-liquid microextraction techniques based on in-situ formation/decomposition of deep eutectic solvents." *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 161, (2023): 117019.
- [13] Kardani, F., Mirzajani, R., Tamsilian, Y., Kiasat, A., & Farajpour, F. B. (2023). A novel immunoaffinity column based metal-organic framework deep eutectic solvents@ molecularly imprinted polymers as a sorbent for the solid phase extraction of aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 from cereals samples. *Microchemical Journal*, 187, 108366.
- [14] Tabani, H., Bameri, A. E., Abedi, H., Hatefi, R., Gorjizadeh, A., & Moghaddam, A. Z. (2021). Introduction of nitrogen doped graphene nanosheets as efficient adsorbents for nitrate removal from aqueous samples. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19, 1875-1886.
- [15] Tomé, L. I., Baiao, V., da Silva, W., & Brett, C. M. (2018). Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today*, 10, 30-50.
- [16] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- [17] Miliani, C., Romani, A., & Favaro, G. (2000). Acidichromic effects in 1, 2-di- and 1, 2, 4-tri-hydroxyanthraquinones. A spectrophotometric and fluorimetric study. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 13(3), 141-150.
- [18] Bazregar, M., Rajabi, M., Yamini, Y., Arghavani-Beydokhti, S., & Asghari, A. (2018). Centrifugeless dispersive liquid-liquid microextraction based on salting-out phenomenon followed by high performance liquid chromatography for determination of Sudan dyes in different species. *Food chemistry*, 244, 1-6.

