

بهینه‌سازی چندمتغیره میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک فراصوت برای اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های غذایی و دارویی

حسن سرشتی^{۱*}، یحیی ایزدمش^۲ و سهیلا صمدی^۳

۱- دانشیار شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: فروردین ۱۳۹۲، بازنگری: اردیبهشت ۱۳۹۲، پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده: در این پژوهش، میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک فراصوت (USAEME) و تجزیه کروماتوگرافی گازی با آشکارساز یونش شعله‌ای (GC-FID) برای اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های عسل طبیعی، محلول دهان‌شویه، و آب آشامیدنی به‌کار گرفته شد. اثر عامل‌های مؤثر بر کارایی استخراج، شامل حجم حلال استخراج‌کننده، غلظت نمک، زمان اعمال فراصوت، و دمای امولسیون‌سازی به‌وسیله یک طرح فاکتوریل کامل بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که تمام این عامل‌ها مهم هستند. در مرحله بعد، با استفاده از یک طرح مرکب مرکزی کسری، مقدار بهینه عامل‌ها به صورت ۷۳ میکرولیتر برای حجم حلال استخراج، ۱.۵۰٪ (وزنی/حجمی) برای غلظت نمک، ۹ دقیقه برای زمان فراصوت، و ۴۵ °C برای دمای امولسیون‌سازی به‌دست آمد. در شرایط بهینه، ارقام شایستگی روش مشتمل بر حد آشکارسازی (LOD) ۰.۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (μg/ml)، گستره پویای خطی (LDR) در گستره غلظتی ۵۰-۰.۰۱ μg/ml، ضریب تعیین (R^2) برابر با ۰.۹۹۹۴، و انحراف استاندارد نسبی (RSD) ۱.۲۲٪ به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: میکرواستخراج امولسیون‌سازی به کمک فراصوت، طراحی آزمایش، کروماتوگرافی گازی، تیمول

مقدمه

نیز توصیف شده است [۲]. این ترکیب فراوان‌ترین جزء آویشن (*Thymus vulgaris*) است و ویژگی‌های ضد میکروبی آن به‌وسیله سنجش‌های *in vitro* و *in vivo* بررسی شده است و نتیجه‌ها حاکی از مؤثر بودن تیمول در برابر باکتری‌های فاسدکننده^۲ و پاتوژن‌های منتقله از راه غذا^۳ بوده است [۳].
متداول‌ترین روش‌های تجزیه‌ای که برای اندازه‌گیری تیمول به‌کار رفته‌اند عبارت‌اند از: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فرابنفش^۴ (HPLC-UV) [۱]، استخراج به کمک

تیمول^۱ (۲-ایزوپروپیل-۵-متیل فنول) یک فنول مونوترپن است که از اسانس گونه‌های متفاوت آویشن (مانند *Thymus vulgaris* L) به‌دست می‌آید، یا به‌وسیله روش‌های شیمیایی سنتز می‌شود. تیمول، به‌عنوان یک عامل ضدقارچ و ضدباکتری و همچنین عامل ضد سوزش در فرمولاسیون‌های بی‌حس‌کننده در زمینه‌های دارویی به‌کار رفته است [۱]. در پژوهش‌های انجام شده، اثرات ضد باکتری، ضد آماس و تب، ضد اسپاسم و سایر اثرات تیمول

1. Thymol 2. Spoilage bacteria 3. Pathogens food borne 4. High performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV)

کننده بر اثر پخش شدن به میزان بسیار زیادی افزایش می‌یابد. بنابراین، زمان لازم برای رسیدن به تعادل بین دو فاز آبی و آلی به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد [۱۵ و ۱۶]. در این پژوهش، میکرواستخراج فراصوت به کمک امولسیون‌سازی (USAEME) و GC-FID برای اندازه‌گیری تیمول در بعضی نمونه‌های حقیقی به کار گرفته شده است. برای تعیین عامل‌های مهم روش و بهینه‌سازی آن‌ها به ترتیب طرح‌های فاکتوریل کامل^{۱۱} و مرکب مرکزی کسری^{۱۲} به کار گرفته شده‌اند.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و معرف‌ها

تیمول، اتانول، کلروبنزن، تری کلرواتیلن، تتراکلرواتیلن، نرمال-هگزادکان، و ۱-دودکانول از کمپانی مواد شیمیایی مرک^{۱۳} آلمان خریداری شدند. نمونه‌های حقیقی شامل محلول دهان‌شویه از یک داروخانه در شهر تهران، عسل طبیعی از کوه‌های زاگرس (کازرون، استان فارس در جنوب ایران)، و آب آشامیدنی از دانشگاه تهران تهیه شدند. محلول اصلی استاندارد تیمول با غلظت $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ در اتانول مطلق تهیه و تا قبل از استفاده در 4°C ذخیره شد. سایر محلول‌های استاندارد مورد نیاز تیمول با رقیق سازی محلول اصلی تهیه شد.

تجهیزات دستگاهی

تجزیه کروماتوگرافی گازی (GC)، با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی مدل ۱۷ A شیمادزوی^{۱۴} ژاپن، با سامانه تزریق اسپلیت/اسپلیت‌لس^{۱۵} و یک آشکارساز FID انجام شد. دمای محفظه تزریق^{۱۶} و دمای آشکارساز در 250°C تنظیم شدند. تزریق نمونه‌ها، در حالت اسپلیت و با نسبت اسپلیت^{۱۷} ۱:۲۵ انجام شد. برای تجزیه کروماتوگرافی نمونه‌ها، از ستون موئین CBP-5 از جنس سیلیکا جوش خورده با طول ۲۵ متر، قطر داخلی ۰/۲۵

مایکروویو^۱ (MAE) با تجزیه [HPLC-UV] ۴، تقطیر با آب^۲ - میکرواستخراج حلال فضای فوقانی^۳ (HD-HSME) با GC-FID [۵]، میکرواستخراج فاز جامد فضای فوقانی^۴ (HS-SPME) با کروماتوگرافی گازی با آشکارساز یونش شعله‌ای^۵ GC-FID [۶]، اسپکتروفتومتری فرابنفش - مریی [۷]، استخراج مایع-مایع^۶ (LLE)، استخراج فاز جامد^۷ (SPE)، و تقطیر همراه با کروماتوگرافی گازی با آشکارساز یونش شعله‌ای GC-FID [۸]، و کروماتوگرافی مایع با آشکارسازی فلوریمتری^۸ [۹].

اگرچه با این روش‌ها نتیجه‌های تجزیه‌ای به نسبت خوبی می‌تواند به دست آید، اما بیشتر آن‌ها وقت‌گیر، خسته کننده، و هزینه‌بر هستند. افزون بر آن، آن‌ها شامل عملیات چند مرحله‌ای هستند و حلال‌های آلی به‌طور عمده سمی مصرف می‌کنند که برای سلامتی مضر است و منجر به تولید مواد زاید خطرناک می‌شوند [۱۰]. فن به نسبت جدید میکرو استخراج امولسیون‌سازی به کمک فراصوت^۹ USAEME که به وسیله رگیرو^{۱۰} و همکارانش در سال ۲۰۰۸ معرفی شد [۱۱]، برای استخراج و پیش تغلیظ آنالیت‌ها از ماتریس‌های متفاوت به کار گرفته شده است [۱۲ تا ۱۴]. در این روش، در حالی که نمونه در معرض امواج فراصوت قرار دارد، حلال استخراج کننده به وسیله یک میکروسرنگ به نمونه آبی افزوده می‌شود. در اثر انتشار امواج فراصوت در محلول، حلال استخراج کننده در داخل محلول آبی پخش می‌شود به گونه‌ای که محلول به حالت ابری در می‌آید. در این مرحله، آنالیت از محلول آبی در حلال آلی استخراج می‌شود. از آنجایی که اندازه ذرات پخش شده در حد میکرومتر است، بدون دخالت یک نیروی خارجی نمی‌توان آن‌ها را جمع آوری و از فاز آبی جدا کرد. بنابراین، محلول سانتریفیوژ می‌شود تا قطرات کوچک حلال استخراج کننده از محلول آبی جدا شده و سرانجام تجزیه شوند. اصول کلی این روش، مشابه روش استخراج مایع-مایع معمولی است با این تفاوت که سطح تماس مولکول‌های آب و حلال آلی استخراج

- | | | |
|--|--|--|
| 1. Microwave-assisted extraction | 2. Hydrodistillation | 3. Headspace solvent microextraction (HSME) |
| 4. Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) | 5. Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) | 6. Liquid-liquid extraction (LLE) |
| 7. Solid phase extraction (SPE) | 8. Fluorometric detection | 9. Ultrasonic-assisted emulsification microextraction (USAEME) |
| 10. Regueiro | 11. Full factorial design (FFD) | 12. Fractional central composite design |
| 13. Merck chemical company | 14. Shimadzu | 15. Split/splitless injection system |
| 16. Injection port | 17. Split ratio | |

حلال استخراج‌کننده از محلول آبی جدا شود. سپس، $0.5 \mu\text{l}$ از فاز ته‌نشین شده به وسیله میکروسرنج $1 \mu\text{l}$ برداشته و به GC تزریق شد.

ب- استخراج با حلال‌های سبک‌تر از آب

10 ml میلی‌لیتر از نمونه حاوی $5 \mu\text{g/ml}$ تیمول در یک لوله شیشه‌ای سانتریفوژ با حجم 12 ml ریخته شد و سپس در حمام فراصوت قرار گرفت. همزمان با اجرای فراصوت، $100 \mu\text{l}$ از حلال استخراج به وسیله میکروسرنج و به آرامی به درون محلول نمونه تزریق شد. در این‌جا، به منظور سهولت در جمع آوری فاز آلی پس از استخراج، از یک حلال آلی با نقطه ذوب به نسبت بالا مانند نرمال-هگزادکان استفاده شده است. در نتیجه، یک امولسیون شامل قطرات ریز حلال استخراج (به‌عنوان فاز پخش‌شده) در محلول آبی نمونه (فاز پیوسته) تشکیل شد. در این مرحله استخراج تیمول از فاز آبی به درون فاز آلی (حلال استخراج‌کننده) انجام می‌شود. سپس این محلول امولسیون به مدت 5 دقیقه و با سرعت 5000 دور بر دقیقه سانتریفوژ شد تا دو فاز آلی و آبی از یکدیگر تفکیک شوند. سپس، لوله حاوی این محلول به سرعت به درون یک حمام یخ منتقل و به مدت 3 دقیقه تحت سرما خنک شد تا حلال آلی (فاز بالای محلول آبی) به صورت یک قطره جامد در بالای محلول آبی شناور شود. سرانجام، این قطره جامد آلی به لوله دیگری منتقل و پس از اعمال حرارت تا دمای ذوب، $0.5 \mu\text{l}$ از آن به GC تزریق شد.

آماده‌سازی نمونه‌های حقیقی

نمونه عسل طبیعی: 2 گرم از عسل طبیعی (بدون موم) با 100 ml از آب مقطر رقیق شد و به مدت 3 دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت تا محلول همگنی به دست آید. سپس، فرایند استخراج بر روی 10 ml از این محلول طبق روش فوق اجرا شد. محلول دهان‌شویه: 1 ml از دهان‌شویه (ایرشا-تهران-ایران) به وسیله آب مقطر تا 100 ml رقیق شد و سپس فرایند استخراج بر روی 10 ml از این محلول طبق روش فوق اجرا شد.

میلی‌متر و ضخامت فیلم فاز ساکن (متیل 5% فنیل پلی سیلوکسان) 0.25 میکرومتر استفاده شد. از هلیوم خالص (99.999%) به‌عنوان فاز متحرک با جریان 1 میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه دمایی تجزیه، شامل دمای اولیه 60°C به مدت 1 دقیقه، سپس با سرعت $15^\circ\text{C}/\text{min}$ تا 250°C و در نهایت به مدت 5 دقیقه توقف در این دما بود. یک حمام فراصوت مدل Euronda ساخت ایتالیا با فرکانس $60-50$ کیلوهرتز و توان خروجی 350 وات برای امولسیون‌سازی حلال استخراج‌کننده در محلول نمونه مورد استفاده قرار گرفت. یک میکروسرنج 100 میکرولیتری (μl) هامپلتون برای تزریق حلال استخراج‌کننده به درون محلول نمونه (برای تشکیل امولسیون و استخراج)، و یک سرنج $1 \mu\text{l}$ هامپلتون برای تزریق نمونه به GC به کار گرفته شدند (هر دو میکروسرنج ساخت سوئیس).

روش استخراج

برای بررسی بازده استخراج به روش USAEME، از هر دو نوع حلال‌های آلی سنگین‌تر و سبک‌تر از آب استفاده شد. برای هر دو دسته از حلال‌ها سامانه فراصوت اعمال شد اما با توجه به چگالی متفاوت آن‌ها شیوه نهایی نمونه‌برداری از حلال استخراج شده متفاوت است که در زیر توضیح داده می‌شود.

الف- استخراج با حلال‌های سنگین‌تر از آب

10 میلی‌لیتر (ml) از محلول نمونه حاوی 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر ($\mu\text{g/ml}$) تیمول در یک لوله شیشه‌ای سانتریفوژ با حجم 12 ml ریخته شد و سپس در حمام فراصوت قرار گرفت. همزمان با اجرای فراصوت، $100 \mu\text{l}$ از حلال استخراج به وسیله میکروسرنج و به آرامی به درون محلول نمونه تزریق شد. در نتیجه، یک امولسیون شامل قطرات ریز حلال استخراج‌کننده (فاز پخش‌شده) در محلول آبی نمونه (فاز پیوسته) تشکیل شد. در این مرحله، استخراج تیمول از فاز آبی به درون فاز آلی (حلال استخراج‌کننده) انجام می‌شود. در مرحله بعدی، این محلول به مدت 5 دقیقه و با سرعت 4500 دور بر دقیقه سانتریفوژ شد تا

نتیجه‌ها و بحث

انتخاب حلال استخراج کننده

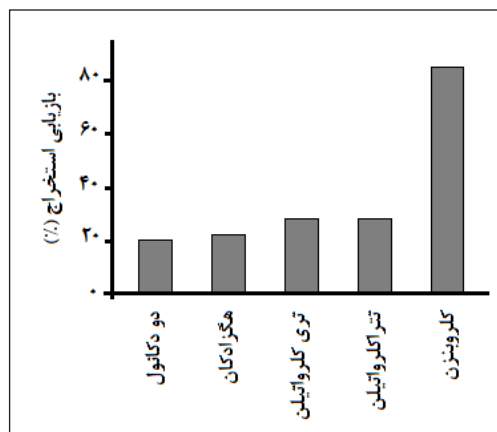
در انتخاب حلال استخراج کننده مناسب، امتزاج‌ناپذیری در آب، توانایی بالا در استخراج ترکیب‌های موردنظر، و سازگاری با سامانه تجزیه از مهم‌ترین ویژگی‌هایی است که در نظر گرفته شد [۱۱ و ۱۲]. بنابراین، حلال‌هایی مانند ۱-دودکانول با چگالی ۰/۸۳۱ گرم بر میلی‌لیتر (g/ml)، نرمال-هگزادکان با چگالی ۰/۷۵۳ g/ml، کلروبنزن با چگالی ۱/۱۱ g/ml، و تتراکلرواتیلن با چگالی ۱/۶۲۲ g/ml مورد آزمایش قرار گرفتند. براساس نتیجه‌های به‌دست آمده که در شکل ۱ نشان داده شده است، در بین این حلال‌ها، بالاترین بازده استخراج با استفاده از کلروبنزن به‌دست آمد. بنابراین، به‌عنوان حلال استخراج کننده مناسب در این پژوهش انتخاب شد.

می‌توان عامل‌های غیرمهم را حذف و بنابراین تعداد آزمایش‌های لازم برای بهینه‌سازی روش را کاهش داد. تعداد آزمایش‌ها، در یک طرح فاکتوریال کامل با استفاده از رابطه ۲^f محاسبه می‌شوند (f تعداد عامل‌های مورد آزمایش است). در این پژوهش، بر اساس مطالعه‌ها و آزمایش‌های اولیه، اثر ۴ عامل شامل حجم حلال استخراج‌کننده، غلظت نمک، زمان اعمال فراصوت، و دمای امولسیون‌سازی، بر بازده استخراج مؤثر تشخیص داده شدند. این عامل‌ها، نماد و سطوح (مقدارها) آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. بنابراین، در مجموع برای اجرای طرح فاکتوریال کامل، ۱۶ (= ۲^۴) آزمایش اجرا شد. در پژوهش حاضر، برای ارزیابی کارایی روش، بازیابی استخراج^۵ تیمول، که با معادله زیر به‌دست می‌آید، به‌عنوان نتیجه نهایی (پاسخ)^۶ در نظر گرفته شد.

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 \quad (1)$$

جدول ۱ عامل‌ها، نشانه‌ها و سطوح آن‌ها در طرح فاکتوریال کامل

عامل	نشانه	سطح	
		سطح پایین	سطح بالا
دمای امولسیون‌سازی (°C)	T	۲۵	۵۰
زمان فراصوت (دقیقه)	t	۵	۲۰
حجم حلال استخراج کننده (μL)	E	۵۰	۱۵۰
غلظت نمک (درصد وزنی/حجمی)	S	۰	۵



شکل ۱ اثر نوع حلال استخراج بر راندمان استخراج تیمول به‌وسیله روش USAEME

در این معادله، n_{sed} تعداد مول‌های آنالیت در فاز آلی، و n_0 تعداد مول‌های آنالیت در محلول آبی قبل از استخراج است. ماتریس طرح شامل تعداد آزمایش‌ها، سطوح هر عامل، و پاسخ‌های مربوط در جدول ۲ آورده شده است.

برای بررسی آماری داده‌ها و به منظور ارزیابی مدل به‌دست آمده، تحلیل آماری نتیجه‌ها به‌وسیله نرم افزار Design Expert 7.1.3 محاسبه و در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس تحلیل واریانس^۷ (ANOVA)، مقدار $F^۴$ ، که آزمونی برای مقایسه واریانس یک

شناسایی عامل‌های مهم

به‌طور معمول، برای غربالگری^۱ یا تعیین اثرات مهم، شامل عامل‌های (عامل‌های) مستقل، و برهم‌کنش‌های آن‌ها، از طرح‌های آزمایشی فاکتوریال دو سطحی کامل (و/یا کسری)^۲، استفاده می‌شود [۱۷]. این طرح‌ها در زیرمجموعه شاخه "طراحی آزمایش"^۳ علم کموتریکس^۴ قرار دارند. به‌وسیله طرح‌های مذکور

1. Screening
2. Two-level full (or fractional) factorial design
3. Experimental design
4. Chemometrics
5. Extraction recovery (ER)
6. Response
7. Analysis of variance (ANOVA)
8. F-value

جمله با واریانس باقی مانده است، برای مدل برابر با ۱۶/۹۰ است و نشان دهنده مهم بودن مدل پیشنهادی است، و تنها ۱/۹۸٪ احتمال دارد که F با این مقدار، ناشی از خطا (نوفه) باشد. در تحلیل واریانس، مقدار p (احتمال خطا) کمتر از ۰/۰۵۰ نشان می دهد که یک اثر (عامل مستقل، برهم کنش عامل ها، یا توان دوم عامل ها) مهم است و مقدارهای p بالاتر از ۰/۱۰۰ حاکی از غیرمهم بودن اثر موردنظر است. در مورد مدل حاضر و براساس جدول تحلیل واریانس، اثرات مهم شامل دو عامل مستقل زمان فراصوت (t) و حجم حلال استخراج کننده (E)، سه برهم کنش دوعاملی TS، tE، tS و سه برهم کنش سه عاملی TtE، TtS و TES هستند. بنابراین، ۴ عامل S، T، E، t و مهم و مؤثر بر بازده استخراج هستند.

بهینه سازی عامل های مهم

برای بهبود کارایی روش و تعیین شرایط بهینه (مقدار بهینه عامل های مهم)، استفاده از مدل های درجه دوم (طرح های سطح پاسخ)^۲ که در آن ها بیش از دو سطح برای هر عامل در نظر گرفته می شود، متداول است. طرح مرکب مرکزی (CCD) یکی از پر کاربردترین طرح های سطح پاسخ برای این منظور است [۱۸ و ۱۹]. این طرح، برای نخستین بار به وسیله باکس و ویلسون [۲۰] معرفی شد. بنابراین، برای به دست آوردن شرایطی که در آن بهترین نتیجه ممکن به دست آید، در این پژوهش از یک طرح مرکب مرکزی ارتوگونال و چرخش پذیر استفاده شده است. چرخش پذیری، واریانس ثابتی از پاسخ تخمین زده شده برای تمام نقاط مشاهده شده که از نقطه مرکزی طرح در یک فاصله قرار دارند، فراهم می کند. همچنین، در یک طرح ارتوگونال، می توان هر عامل را مستقل از سایر عامل ها ارزیابی کرد. طرح مرکب مرکزی، شامل یک طرح فاکتوریال دو سطحی^۴ ($N_f = 2^f$)، یک طرح ستاره ($N_s = 2^f$)، مجموعه ای از نقاط تکراری است که بهتر است در مرکز طرح (N_0) باشند. مرکز طرح، به مجموعه ای از نقاط شامل مقدار مرکزی هر یک از عامل ها گفته می شود، و f تعداد عامل های مورد بررسی در

جدول ۲ ماتریس طرح فاکتوریال کامل

شماره آزمایش	T	t	E	S	پاسخ*
۱	-۱	-۱	۱	-۱	۶۸,۲۵
۲	-۱	-۱	-۱	-۱	۶۰,۳۵
۳	۱	-۱	-۱	۱	۷۷,۰۸
۴	۱	-۱	۱	۱	۷۷,۵۶
۵	۱	۱	-۱	-۱	۸۷,۰۰
۶	۱	۱	۱	-۱	۹۸,۰۴
۷	-۱	۱	۱	-۱	۹۵,۴۳
۸	۱	-۱	۱	-۱	۸۱,۰۷
۹	۱	۱	۱	۱	۹۷,۳۴
۱۰	-۱	-۱	-۱	-۱	۸۹,۴۶
۱۱	-۱	-۱	۱	۱	۸۹,۷۸
۱۲	۱	۱	-۱	۱	۶۵,۱۹
۱۳	-۱	-۱	۱	-۱	۸۸,۶۷
۱۴	-۱	۱	۱	۱	۹۱,۱۶
۱۵	-۱	۱	-۱	-۱	۹۲,۶۹
۱۶	۱	-۱	-۱	-۱	۹۱,۲۷

* بازیابی استخراج

جدول ۳ تحلیل واریانس طرح فاکتوریال کامل

منبع واریانس	مجموع مربع ها	درجه آزادی	میانگین مربع ها	F-value ^۱	p-value ^۲	درجه اهمیت
Model	۲۰۰۷,۱۳۷	۱۲	۱۶۷,۲۶۱	۱۶,۸۹۵	۰/۰۱۹۸	مهم
T	۰,۱۱۲	۱	۰,۱۱۲	۰,۰۱۱	۰,۹۲۱۸	نامهم
T	۴۰۶,۱۱۷	۱	۴۰۶,۱۱۷	۴۱,۰۲۲	۰/۰۰۷۷	مهم
E	۱۳۸,۱۸۰	۱	۱۳۸,۱۸۰	۱۳,۹۵۷	۰/۰۳۳۴	مهم
S	۶,۵۹۱	۱	۶,۵۹۱	۰,۶۶۵	۰,۴۷۴۳	نامهم
Tt	۹۷,۲۰۱	۱	۹۷,۲۰۱	۹,۸۱۸	۰/۰۵۱۹	نامهم
TE	۲۴,۸۱۷	۱	۲۴,۸۱۷	۲,۵۰۶	۰,۲۱۱۵	نامهم
TS	۵۱۴,۱۱۳	۱	۵۱۴,۱۱۳	۵۱,۹۳۱	۰/۰۰۵۵	مهم
tE	۱۵۵,۱۶۹	۱	۱۵۵,۱۶۹	۱۵,۶۷۴	۰/۰۲۸۸	مهم
tS	۱۹۴,۳۸۵	۱	۱۹۴,۳۸۵	۱۹,۶۳۵	۰/۰۲۱۴	مهم
TtE	۱۹۵,۸۹۳	۱	۱۹۵,۸۹۳	۱۹,۷۸۷	۰/۰۲۱۱	مهم
TtS	۱۳۳,۱۵۵	۱	۱۳۳,۱۵۵	۱۳,۴۵۰	۰/۰۳۵۱	مهم
TES	۱۴۱,۴۰۰	۱	۱۴۱,۴۰۰	۱۴,۲۸۳	۰/۰۳۲۵	مهم
Residual	۲۹,۶۹۹	۳	۹,۸۹۹			
Corrected Total ^۳	۲۰۳۶,۸۳۶	۱۵				

- ۱- آزمون برای مقایسه واریانس مدل با واریانس خطا
- ۲- احتمال مشاهده مقدار F در صورتی که فرض صفر صحیح باشد.
- ۳- اطلاعات کل تصحیح شده برای میانگین

1. p-value

2. Response surface

3. Box and Wilson

4. Two-level factorial design

جدول ۴ عامل‌ها، نشانه‌ها و سطوح آن‌ها در طرح مرکب مرکزی کسری

سطح					نشانه	عامل
+α	+1	۰	-1	-α		
۵۰	۴۵	۳۷	۳۰	۲۵	T	دمای امولسیون‌سازی (°C)
۲۰	۱۷	۱۲	۸	۵	t	زمان فراصوت (دقیقه)
۱۰۰	۸۳	۶۰	۳۶	۲۰	E	حجم حلال استخراج‌کننده (μl)
۵۰	۴۰	۲۵	۱۰	۰	S	غلظت نمک (درصد وزنی/حجمی)

جدول ۵ ماتریس طرح مرکب مرکزی کسری

شماره آزمایش	T	t	E	S	پاسخ*
۱	۰	+α	۰	۰	۷۸,۵۸
۲	۰	۰	۰	۰	۸۴,۰۷
۳	۱	۱	۱	-۱	۶۵,۸۷
۴	-۱	۱	۱	۱	۸۱,۷۳
۵	۰	۰	۰	-α	۹۸,۰۵
۶	۱	۱	-۱	-۱	۶۵,۷۵
۷	-α	۰	۰	۰	۷۵,۲۰
۸	-۱	-۱	-۱	-۱	۶۸,۸۰
۹	-۱	۱	-۱	۱	۷۱,۳۳
۱۰	۰	۰	۰	۰	۹۰,۰۴
۱۱	-۱	-۱	۱	-۱	۶۲,۰۸
۱۲	۰	-α	۰	۰	۸۶,۸۹
۱۳	۰	۰	+α	۰	۹۳,۸۰
۱۴	۱	-۱	-۱	۱	۷۴,۲۴
۱۵	۰	۰	۰	+α	۸۲,۱۱
۱۶	۰	۰	۰	۰	۸۸,۳۷
۱۷	۰	۰	۰	۰	۸۹,۰۸
۱۸	۰	۰	-α	۰	۶۶,۷۷
۱۹	۱	۱	-۱	۱	۸۱,۱۱
۲۰	۰	۰	۰	+α	۷۸,۵۲
۲۱	۰	۰	۰	۰	۸۵,۸۴

* بازایی استخراج

طرح است. یک طرح مرکب مرکزی ارتوگونال و چرخش‌پذیر با محاسبه نقطه محوری α در طرح ستاره از معادله ۲ به دست می‌آید. در این‌جا، این مقدار برابر با ۲ ± است.

$$\alpha = \sqrt[4]{N_f} \quad (2)$$

جدول ۴ عامل‌های مهم، نشانه و سطوح آن‌ها برای طرح مرکب مرکزی را نشان می‌دهد. برای کاهش تعداد آزمایش‌ها یک طرح مرکب مرکزی کسری شامل یک طرح فاکتوریل کسری ($N_f = 2^{F-1}$) به کار گرفته شد. تعداد کل آزمایش‌ها برای اجرای این طرح از معادله زیر به دست می‌آید [۲۱]. بنابراین، با احتساب ۵ آزمایش تکرار در مرکز طرح، برابر با ۲۱ است. ماتریس طرح و پاسخ‌های مربوطه در جدول ۵ آمده است.

$$N = N_f + N_a + N_0 \quad (3)$$

بر اساس نتیجه‌های به دست آمده و با استفاده از نرم افزار Design Expert 7.1.3 یک مدل سطح پاسخ درجه دوم مبتنی بر مقدارهای F بالاتر و عدم تناسب^۱ کوچکتر که با داده‌های تجربی متناسب باشد انتخاب شد. این مدل که شامل ۴ اثر اصلی، دو برهم‌کنش دو عاملی، و دو اثر درجه دوم است، در فرم کدیندی^۲ شده در معادله ۴ نشان داده شده است.

$$y = b_0 + b_1 T + b_2 t + b_3 E + b_4 S + b_5 Tt + b_6 ES + b_7 T^2 + b_8 E^2 \quad (4)$$

$$b_0 = 88; b_1 = 0.63; b_2 = -0.29; b_3 = 4.11; b_4 = -4.74; b_5 = -10.48; b_6 = 2.98; b_7 = -3.94; b_8 = -2.73$$

در معادله ۵، y نشان‌دهنده بازایی استخراج (پاسخ)، b_0 عرض از مبدا، و b_1 تا b_8 ضرایبی هستند که مقدار مطلق آن‌ها میزان تأثیر جملات مدل را بر پاسخ نشان می‌دهد. ضرایب مثبت نشان می‌دهند که افزایش مقدار آن جمله بر پاسخ تأثیر مستقیم دارد، و ضرایب منفی مشخص می‌کنند که تغییرات جمله مورد نظر موجب تغییر پاسخ در جهت عکس می‌شود. که در آورده شده است، مقدار F مدل در جدول تحلیل واریانس (جدول ۶)، نشان‌دهنده مهم بودن مدل است. در اینجا، فقط احتمال ۰.۰۲٪ وجود دارد که مقدار F با این اندازه، ناشی از نوفه^۳ باشد.

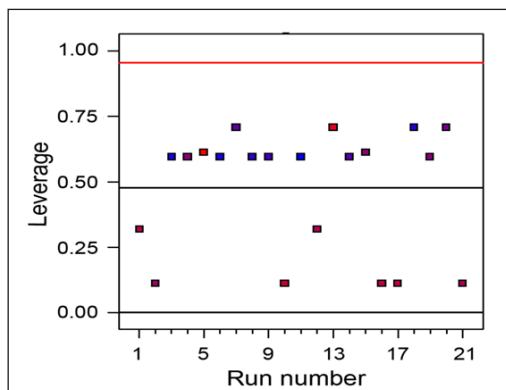
1. Lack of fit (lof)

2. Coded form

3. Noise

آزادی مدل است. انحراف استاندارد خطای تجربی برابر ۴٫۲۷ و ضریب تغییر^۱ مدل برابر با ۵٫۲۷٪ است. عدم تناسب (lof) معیار دیگری برای میزان اهمیت مدل است و عبارتست از مجموع مربع انحرافات وزن داده شده بین پاسخ میانگین در هر مقدار از عامل و مقدار متناسب آن است.

مقدار F (۴٫۱۷) برای dof، معتبر بودن مدل را تأیید می‌کند. Leverage معیار دیگری است که برای بیان کیفیت پیش‌بینی اطلاعات کمی پس از یک سری آزمایش به کار می‌رود [۲۲]. اگر Leverage یک نقطه برابر با یک باشد در این صورت مدل از آن نقطه عبور می‌کند. نقطه‌ای که Leverage بالا دارد مناسب نیست، زیرا اگر یک خطای غیرمنتظره همراه با آن نقطه اطلاعاتی وجود داشته باشد این خطا به شدت بر مدل اثر می‌گذارد [۲۳]. شکل ۲ نشان می‌دهد که تمام مقدارهای Leverage کوچک‌تر از ۰٫۷۵ هستند. بنابراین، هیچ نقطه نامناسب یا خطای غیرمنتظره‌ای در مدل وجود ندارد.



شکل ۲ نمودار Leverage برای مدل درجه دوم در طرح مرکب مرکزی

برای تفسیر گرافیکی برهم‌کنش‌ها استفاده از نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ توصیه شده است [۲۴ و ۲۵]. در این نمودارها برهم‌کنش‌هایی که بزرگ‌ترین ضریب‌های مطلق را در معادله مدل دارند برای نمودار سطح پاسخ انتخاب می‌شوند. به عبارت دیگر، تغییرهای پاسخ (یا نتیجه نهایی روش) نسبت به تغییرهای

جدول ۶ تحلیل واریانس طرح مرکب مرکزی کسری

منبع واریانس	مجموع مربع‌ها	درجه آزادی	میانگین مربع‌ها	F-value	p-value	درجه اهمیت
مدل	۱۸۹۰٫۳۷	۹	۲۱۰٫۰۴	۱۱٫۵۱	۰٫۰۰۰۲	مهم
T	۵٫۴۳	۱	۵٫۴۳	۰٫۳۰	۰٫۵۹۶۳	-
T	۰٫۰۱	۱	۰٫۰۱	۰٫۰۰	۰٫۹۸۰۸	نامهم
E	۲۳۰٫۶۹	۱	۲۳۰٫۶۹	۱۲٫۶۴	۰٫۰۰۴۵	مهم
S	۱۲۷٫۰۴	۱	۱۲۷٫۰۴	۶٫۹۶	۰٫۰۲۳۱	مهم
Tt	۳۶۳٫۷۹	۱	۳۶۳٫۷۹	۱۹٫۹۳	۰٫۰۰۱۰	مهم
ES	۷۱٫۲۲	۱	۷۱٫۲۲	۳٫۹۰	۰٫۰۷۳۹	-
T ^۲	۲۰۳٫۱۵	۱	۲۰۳٫۱۵	۱۱٫۱۳	۰٫۰۰۶۶	مهم
E ^۲	۹۷٫۴۵	۱	۹۷٫۴۵	۵٫۳۴	۰٫۰۴۱۳	مهم
TtS	۳۸۳٫۰۵	۱	۳۸۳٫۰۵	۲۰٫۹۸	۰٫۰۰۰۸	مهم
Residual	۲۰۰٫۸۰	۱۱	۱۸٫۲۵			
Lack of Fit	۱۷۶٫۶۰	۷	۲۵٫۲۳	۴٫۱۷	۰٫۰۹۲۹	-
Pure Error	۲۴٫۱۹	۴	۶٫۰۵			
Corrected total	۲۰۹۱٫۱۷	۲۰				

ضریب تعیین (R^2) که معیاری از میزان تغییر در اطراف میانگین مدل است برابر با ۰٫۹۰۴۰ است که از معادله ۵ به دست آمده است:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{resid}}{SS_{model} + SS_{Total}} \quad (5)$$

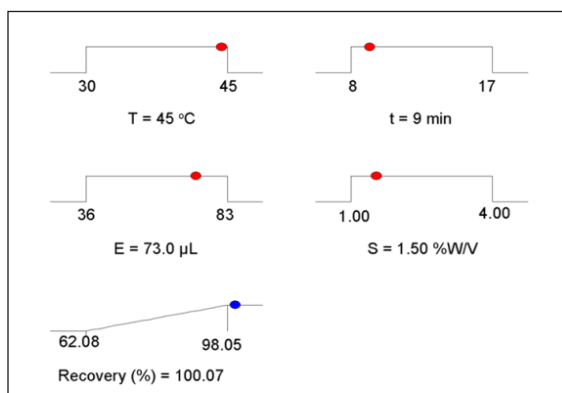
در این معادله، SS_{resid} مجموع مربعات باقی‌مانده، و SS_{model} مجموع مربع‌های مدل است. عامل مهم دیگر برای ارزشیابی مدل، $adj-R^2$ است. این عامل به عنوان معیاری از تغییرات در اطراف میانگین در نظر گرفته می‌شود. مقدار این عامل با افزایش تعداد جملات مدل کاهش می‌یابد. با استفاده از معادله ۶ مقدار این عامل برابر با ۰٫۸۲۵۴ به دست آمده است.

$$adj - R^2 = 1 - \left[\frac{SS_{resid}}{df_{resid}} \right] / \left[\frac{SS_{resid} - SS_{model}}{df_{resid} + df_{model}} \right] \quad (6)$$

در این معادله، df_{resid} درجه آزادی باقی‌مانده، و df_{model} درجه

1. Coefficient of variance (CV)

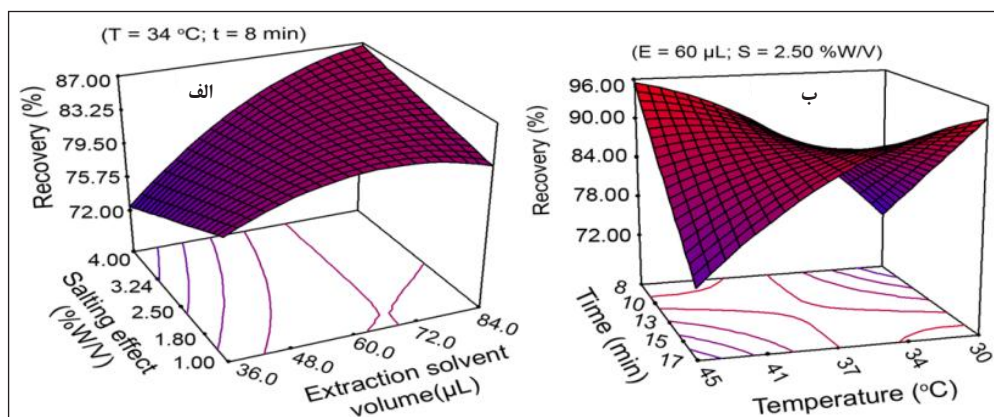
برای به‌دست آوردن مقادیرهای بهینه عامل‌های مهم با استفاده از بخش بهینه‌سازی نرم افزار Design Expert 7.1.3 انتخاب شد. فرایند بهینه‌سازی، با مقدار کوچکی از یک تابع پنالتی^۱ در یک سراسیبهی سیمپلکس^۲ (Nelder-Mead) الگوی چندبعدی جست‌وجو برای به حداقل یا حداکثر رساندن تابع هدف شروع می‌شود [۲۶]. بنابراین، نقطه بهینه عامل‌ها شامل ۷۳ میکرولیتر برای حجم استخراج حلال استخراج کننده، ۱/۵٪ برای غلظت نمک، و ۴۵ °C برای دمای امولسیون‌سازی و ۹ دقیقه برای زمان امولسیون‌سازی است (شکل ۴).



شکل ۴ نمایش شماتیک مقادیرهای بهینه عامل‌ها، پاسخ، و سطوح مربوط

دو عامل برهم‌کنش‌کننده روی نمودار رسم می‌شود درحالی‌که سایر عامل‌ها در یک سطح ویژه (به‌طور معمول نقطه مرکزی) ثابت نگاه داشته می‌شوند. بنابراین، با توجه به معادله مدل (معادله ۵) دو برهم‌کنش tT (زمان-دما) و ES (حجم حلال استخراج کننده-غلظت نمک) برای رسم منحنی‌های سطح پاسخ مناسب تشخیص داده شدند.

شکل ۳-الف تأثیر هم‌زمان دو عامل E و S بر بازیابی استخراج تیمول نشان می‌دهد. تأثیر حجم حلال استخراج کننده بر بازده استخراج به‌صورت منحنی درجه دوم است و با افزایش حجم کلروبنزن از ۳۶ به ۸۴ μL بازیابی استخراج نیز افزایش می‌یابد. بنابراین، افزایش E موجب می‌شود مقدار بیشتری از تیمول از فاز آبی به درون فاز آلی (کلروبنزن) استخراج شود. از سوی دیگر، تأثیر نمک بر بازده استخراج به‌صورت خطی است به‌گونه‌ای که در مقادیرهای بزرگ‌تر E با افزایش غلظت نمک بازیابی افزایش می‌یابد اما در مقادیرهای کوچک‌تر E رویه برعکس است. شکل b₃ تأثیر دو عامل زمان فراصوت و دمای امولسیون‌سازی بر بازده استخراج را به نمایش می‌گذارد. در دماهای بالا با افزایش زمان امولسیون‌سازی بازیابی کاهش می‌یابد، اما این رفتار با کاهش دما به تدریج تغییر می‌کند و اثر برعکس را در دماهای پایین نشان می‌دهد. روند مشابهی می‌تواند برای تغییر T در سطوح پایین‌تر و بالاتر t به ترتیب دیده شود.



شکل ۳ نمودار سه بعدی: الف) حجم حلال استخراج کننده (E) و غلظت نمک (S)، ب) دمای امولسیون‌سازی (T) و زمان اعمال فراصوت (t)

1. Penalty function

2. Downhill simplex

آورده شده است. طبق اطلاعات جدول، حد آشکارسازی و گستره خطی روش ارایه شده در این پژوهش بهتر از سایر روش‌های ذکر شده در جدول ۷ است. دقت روش نیز بهتر از سایر روش‌ها و قابل مقایسه با روش HPLC-UV است. افزون بر آن، زمان استخراج نسبت به سایر روش‌های پیش‌تخلیظ تیمول کمتر است.

تجزیه نمونه‌های حقیقی

برای مطالعه اثرات ماتریس و بررسی گزینش‌پذیری روش حاضر، نمونه‌های حقیقی شامل عسل طبیعی، محلول دهان‌شویه، و آب آشامیدنی مورد آزمایش قرار گرفتند. با اجرای تجزیه عسل طبیعی و آب آشامیدنی، هیچ اثر قابل آشکارسازی از تیمول مشاهده نشد. در مرحله بعد، مقدار مشخصی از محلول استاندارد $1 \mu\text{g/ml}$ تیمول به نمونه‌ها افزوده (اسپایک) شد و دوباره روش به‌طور کامل بر روی تمام نمونه‌ها اجرا شد. این روش بر روی هر نمونه سه بار تکرار شد. بازیابی‌های نسبی به‌دست آمده و انحراف استاندارد نسبی برای نمونه‌های حقیقی در جدول ۸ آورده شده است. هم‌چنین کروماتوگرام‌های به‌دست آمده از تجزیه GC عسل طبیعی، محلول دهان‌شویه، و آب آشامیدنی اسپایک شده در شکل‌های ۵-الف، ب و ج نشان داده شده‌اند.

ارزشیابی عملکرد روش

ارقام شایستگی تجزیه‌ای روش، شامل عامل پیش‌تخلیظ، حد آشکارسازی، گستره پویای خطی، و بازیابی استخراج نسبی، برای استخراج تیمول از 10 ml محلول آبی تحت شرایط بهینه بررسی و نتیجه‌های زیر به‌دست آمد. حد آشکارسازی با استفاده از معادله ۷ برابر با $0.001 \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد.

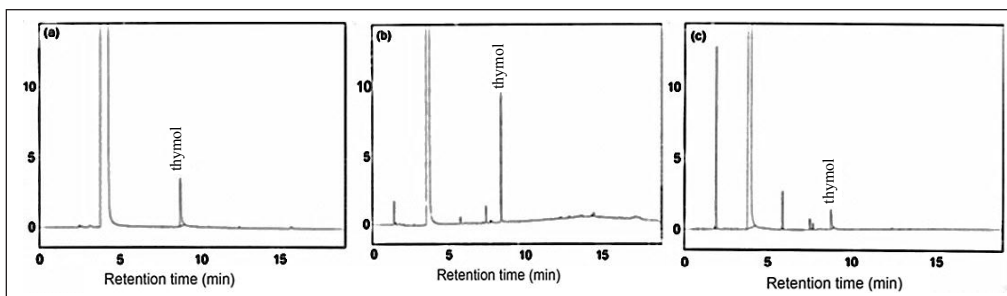
$$\text{LOD} = \frac{3S_b}{m} \quad (7)$$

در معادله فوق، LOD، حد آشکارسازی، S_b ، انحراف استاندارد سیگنال شاهد، و m ، شیب منحنی درجه‌بندی است. حد اندازه‌گیری کمی (LOQ) که به‌عنوان 10 برابر حد آشکارسازی تعریف می‌شود برابر $0.01 \mu\text{g/ml}$ است. منحنی درجه‌بندی با استفاده از 8 محلول استاندارد تیمول با غلظت‌های در گستره $0.1-50 \mu\text{g/ml}$ رسم و ضریب تعیین (R^2) آن برابر 0.9994 به‌دست آمد. دقت روش بر مبنای انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای 5 تکرار در نقاط مرکزی عامل‌ها برابر 1.22% بود. بازیابی نسبی و عامل غنی‌سازی روش به‌ترتیب برابر 96.4% و 383 محاسبه شد. مقایسه اجمالی روش حاضر با سایر پژوهش‌های انجام شده قبلی برای استخراج و اندازه‌گیری تیمول در جدول ۷

جدول ۷ ارقام شایستگی روش و مقایسه آن با سایر روش‌های انجام شده برای استخراج و اندازه‌گیری تیمول

مرجع	روش بهینه‌سازی	R^2 ۵	RR ^۴ (%)	عامل پیش‌تخلیظ	زمان (دقیقه)	RSD (%) ^۳	LDR ^۲	LOD ^۱	روش تجزیه	روش پیش‌تخلیظ
							($\mu\text{g ml}^{-1}$)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
پژوهش حاضر	DOE ^۶	۰.۹۹۹۴	۹۶.۴	۳۸۳	۹	۱.۲	۰.۰۱-۵۰	۰.۰۰۱	GC-FID	USAEME
[۱]	OAT ^۷	۰.۹۹۹۹	۹۹.۶-۱۰۰.۱	-	-	۰.۱۱-۰.۷۴	۱-۵۰	۱ نانوگرم	HPLC-UV	-
[۴]	OAT	-	-	-	۴۵	-	-	-	HPLC-UV	MAE
[۵]	DOE	۰.۹۹۴۴	۸۹-۱۰۱	-	۳۰	۶/۳۷	۶.۲۵-۸۱.۲۵	۱.۸۷	GC-FID	HD-HSME
[۶]	OAT	۰.۹۹۳۰	۵	-	۳۵	≤ 20	۰.۰۰۸۱-۰.۲۰۳۵	-	GC-FID	SPME
[۷]	OAT	۰.۹۹۷۰	-	-	۱۰	-	۰.۵-۱۰	-	UV-Vis	LLE
[۸]	OAT	۰.۹۹۹۰	۹۶-۱۰۶	-	۳۰	۱.۴	۰.۱-۱۰۰	۰.۰۵	GC-FID	SPE,HD, LLE
[۹]	OAT	۰.۹۹۹۹	۹۸	-	-	۲.۵	۰/۰۰۸-۰/۲	۰/۰۰۱۷	LC-FD	-

۱- حد آشکارسازی ۲- گستره خطی پویا ۳- انحراف استاندارد نسبی ۴- بازیابی نسبی ۵- ضریب تعیین ۶- طراحی آزمایش ۷- یک متغیر در یک زمان



شکل ۵ کروماتوگرام‌های GC-FID برای (الف) آب آشامیدنی اسپایک شده با تیمول، (ب) عسل طبیعی، و (ج) محلول دهان‌شویه

به‌کارگیری طراحی آزمایش، مزیت مشاهده برهم‌کنش عامل‌ها و هم‌چنین بهینه‌سازی عامل‌ها با اجرای کمترین تعداد آزمایش‌ها است. نتیجه‌ها نشان داد که عامل‌های مهم شامل حجم حلال استخراج کننده، غلظت نمک، زمان و دمای اعمال فراصوت هستند. به‌کارگیری این روش تحت شرایط بهینه برای تجزیه نمونه‌های حقیقی نشان داد که هیچ اثر ماتریس قابل‌توجهی بر نتیجه‌ها مشاهده است. بنابراین، اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های با ماتریس‌های مشابه می‌تواند به راحتی به وسیله منحنی درجه‌بندی با استفاده از استانداردهای تیمول تهیه شده در آب مقطر انجام شود. به‌طور کلی نتیجه‌ها نشان می‌دهد که روش ارائه شده در این پژوهش، ساده، سریع، کم‌هزینه، و دوست‌دار محیط زیست است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر فن‌های استخراج مانند LLE، SPME، و SPE برای اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های با ماتریس‌های مشابه باشد.

جدول ۸ نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه نمونه‌های حقیقی

نمونه حقیقی	غلظت اولیه ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	غلظت افزوده شده ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	بازیابی نسبی (%)	RSD (%)
عسل طبیعی	<0.001	1	91.12	4.9
محلول دهان‌شویه	≈ 2.00	1	90.00	6.0
آب آشامیدنی	<0.001	1	98.04	1.4

نتیجه‌گیری

روش حاضر، USAEME-GC-FID، برای استخراج و اندازه‌گیری تیمول از نمونه‌های عسل طبیعی، محلول دهان‌شویه، و آب آشامیدنی به‌کار گرفته شد. در این پژوهش، برای تعیین عامل‌های مؤثر و بهینه‌سازی روش به‌ترتیب از طرح‌های فاکتوریال کامل و مرکب مرکزی کسری استفاده شده است.

مراجع

- [1] Thompson, R.D.; Carlson, M.; J. Pharm. Biomed. Anal., 7, 1199-1206, 1989.
- [2] Beer, A.M.; Lukanov, J.; Sagorchev, P.; Phytomedicine, 14, 65-69, 2007.
- [3] Del Nobile, M.A.; Conte, A.; Incoronato, A.L.; Panza, O.; J. Food Eng., 89, 57-63, 2008.
- [4] Gujar, J.G.; Wagh, S.J.; Gaikar, V.G.; Sep. Purif. Technol., 70, 257-264, 2010.
- [5] Kiyandpour, V.; Fakhari, A.R.; Alizadeh, R.; Asghari, B.; Jalali-Heravi, M.; Talanta, 79, 695-699, 2009.
- [6] Kohlert, C.; Abel, G.; Schmid, E.; Veit, M.; J. Chromatogr. B., 767, 11-18, 2002.
- [7] Backheet, E.Y.; Phytochem. Anal., 9, 134-140, 1998.
- [8] Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Jimenez, J.J.; Gonzalez, M.J.; Higes, M.; J. Chromatogr. A., 954, 207-215, 2002.

- [9] Vinas, P.; Soler-Romera, M.J.; Hernandez-Cordoba, M.; Talanta; 69, 1063-1067, 2006.
- [10] Anthemidis, A.N.; Themelis, D.G.; Staris, J.A.; Talanta, 54, 37-43, 2001.
- [11] Regueiro, J.; Llompert, M.; Garcia-Jares, C.; Garcia-Montegudo, J.C.; Cela, R.; J. Chromatogr. A., 1190, 27-38, 2008.
- [12] Saleh, A.; Yamini, Y.; Faraji, M.; Rezaee, M.; Ghambarian, M.; J. Chromatogr. A., 1216, 6673-6679, 2009.
- [13] Fontana, A.R.; Patil, S.H.; Banerjee, K.; Altamirano, J.C.; J. Agric. Food Chem., 58, 4576-4581, 2010.
- [14] Ozcan, S.; Tor, A.; Aydin, M.E.; Water Res., 43, 4269-4277, 2009.
- [15] Ma, J.J.; Du, X.; Zhang, J.W.; Li, J.C.; Wang, L.Z.; Talanta, 80, 980-984, 2009.
- [16] Ozcan, S.; Tor, A.; Aydin, M.E.; Anal. Chim. Acta, 647, 182-188, 2009.
- [17] Sereshti, H.; Karimi, M.; Samadi, S.; J. Chromatogr. A., 1216, 198-204, 2009.
- [18] Rosa, P.A.J.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R.; J. Chromatogr. A., 1141, 50-60, 2007.
- [19] Goncalves, C.; Carvalho, J.J.; Azenha, M.A.; Alpendurada, M.F.; J. Chromatogr. A., 1110, 6-14, 2006.
- [20] Stalikas, C.; Fiamegos, Y.; Sakkas, V.; Albanis, T.; J. Chromatogr. A., 1216, 175-189, 2009.
- [21] Angelopoulos, P.; Evangelaras, H.; Koukouvinos, C.; Stat. J.; Plan. Infer., 139, 2010-2013, 2009.
- [22] Brereton, R.G.; Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2003.
- [23] Jalali-Heravi, M.; Parastar, H.; Ebrahimi-Najafabadi, H.; J. Chromatogr. A., 1216, 6088-6097, 2009.
- [24] Bianchi, F.; Careri, M.; Mangia, A.; Mattarozzi, M.; Musci, M.; J. Chromatogr. A., 1196, 41-45, 2008.
- [25] Zhou, Y.; Song, J.Z.; Choi, F.F.K.; Wu, H.F.; Qiao, C.F.; Ding, L.S.; Gesang, S.L.; Xu, H.X.; J. Chromatogr. A., 1216, 7013-7023, 2009.
- [26] Montgomery, D.C.; Design and Analysis of Experiments, 5th ed., Wiley, New York, USA, 2001.