

اندازه‌گیری میزان متیلن بلو به عنوان آلاینده سمی در محیط‌های آبی با استفاده از روش ریزاستخراج الکتروغشایی: بهینه‌سازی با طراحی آزمایش

علی زراعتکارمقدم*، قادر بامری

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

چکیده: در شیمی تجزیه آماده‌سازی نمونه پیش از هرگونه اندازه‌گیری دستگاهی یکی از مهم‌ترین مرحله‌ها است. استخراج یکی از پرکاربردترین روش‌های آماده‌سازی نمونه است که باعث تغلیظ آنالیت و انتقال آن به محیطی با بستر ساده‌تر و تمیزتر می‌شود. در نتیجه در کار حاضر، روش ریزاستخراج الکتروغشایی همراه با تشخیص اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی برای تغلیظ و اندازه‌گیری میزان متیلن بلو در نمونه‌های ماهی پرورشی پیشنهاد شده است. غشا با استفاده از آگاروز و استیک اسید تهیه شده و نتیجه‌ها نشان دهنده موفقیت آمیز بودن فرایند ریزاستخراج بود. از طرح مرکب مرکزی برای مدل سازی و بهینه‌سازی روش استخراج و اندازه‌گیری پیشنهادی استفاده شده است. شرایط بهینه برای مرحله تغلیظ عبارت‌اند از: مقدار آگاروز ۵٪ (وزنی/حجمی)، مقدار استیک اسید ۰/۱٪ (حجمی/حجمی)، pH فاز دهنده و گیرنده به ترتیب ۸/۳ و ۲، ولتاژ اعمالی ۸۰ ولت، و زمان استخراج ۲۵ دقیقه. در شرایط بهینه، میزان دقت برحسب واحد انحراف استاندارد نسبی برابر با ۲/۳٪ و دامنه خطی $15/4 \times 10^{-3} \mu M$ - $1/560 \mu M$ یافت شد. حد تشخیص تئوری و عملی به ترتیب برابر با $4/7 \times 10^{-3} \mu M$ و $15/4 \times 10^{-3} \mu M$ بود. اعتبارسنجی روش با سایر روش‌های استخراج الکتروغشایی مقایسه شده است. روش پیشنهادی روشی سریع، حساس، نیاز به حجم کم نمونه و زمان استخراج کوتاه با دقت و صحت بالا را ارائه داد که به‌طور موفقیت‌آمیزی برای آنالیز مقدار متیلن بلو در نمونه‌های ماهی پرورشی کاربرد داشت.

واژگان کلیدی: ریزاستخراج الکتروغشایی، تغلیظ، اندازه‌گیری، متیلن بلو، بهینه‌سازی، طراحی آزمایش، ماهی پرورشی.

KEYWORDS: Electromembrane microextraction, Preconcentration, Determination, Methylene blue, Optimization, Experimental Design, Cultivated fish.

مقدمه

ضد قارچی در آبزیان نیز برای جلوگیری و درمان بیماری قارچی ساپروولگنیازیس، بیماری دهان قرمز و بیماری استخوانی در بدن باشد با این وجود تاثیرهای آن در طولانی مدت مضر بوده و در ترکیب‌های

متیلن بلو (MB) یک ترکیب آروماتیک چندحلقه‌ای است که دارای یک حلقه تiazین است و کاربردهای زیادی در زمینه‌های گوناگون مانند میکروبیولوژی، پزشکی و تشخیصی دارد [۱]. MB دارای فعالیت

*Email: a_zeraatkar_m@birjand.ac.ir

*عهدہ‌دار مکاتبات

(۱) Methylene blue

به یک فاز گیرنده^۸ (AP) واقع در روزنه توخالی استخراج می‌شوند [۲۵-۱۹]. نکته شایان توجه این است که روش EME از برتری‌های روش ریزاستخراج فاز مایع غشا فیبرتوخالی کلاسیک^۹ (HF-LPME) بهره می‌برد و به‌طور همزمان در مقایسه با HF-LPME به زمان استخراج کوتاه‌تر می‌رسد [۲۵]. روزنه‌های غشا مانع از ورود مولکول‌های بزرگ (به عنوان نمونه پروتئین‌ها) و ذرات جامد به غشا و سپس فاز گیرنده می‌شود. افزون بر این، اعمال میدان الکتریکی به جلوگیری از تداخل‌های گونه‌های مزاحم نیز کمک می‌کند، بنابراین هیچ مرحله آماده‌سازی پیش از انجام EME لازم نیست.

در این کار، ژل آگارز اصلاح شده با استیک اسید به عنوان غشا، به‌جای فیبر توخالی، برای فرایند EME بدون استفاده از هر نوع حلال آلی و یا حتی معرف‌های جفت‌کننده یون استفاده شده است. آگارز یک پلی‌ساکارید دریایی است که اغلب به عنوان یک بیوپلیمر در زمینه‌های گوناگونی استفاده می‌شود [۲۶]. ژل آگارز کاربردهای بی‌شماری در الکتروفورز ژلی، کشت بافت و داروسازی و فناوری‌های غذایی پیدا کرده است [۲۷، ۲۸]. ژل آگارز، در طیف گسترده‌ای از pH و دما بسیار پایدار است، که آن را به یک ماده ایده‌آل برای انتشار و انتقال الکتروسینتیکی ترکیب‌های گوناگون تبدیل کرده است [۲۱، ۲۲]. سازگاری با محیط زیست و پتانسیل استفاده از آن به عنوان غشا در EME از جمله ویژگی‌های ویژه این ماده است. از بهترین ویژگی‌های ژل آگارز این است که می‌توان غشا را با هزینه بسیار پایین ساخت و فرایند ساخت آن نیز در هر آزمایشگاهی به راحتی امکان‌پذیر است، زیرا تنها از مخلوطی از آگارز و آب برای ساخت ژل استفاده می‌شود. در این کار، فرایند EME بدون استفاده از حلال آلی و یا واکنش‌گر و تنها با استفاده از دو فاز آبی با pHهای متفاوت در دو طرف یک غشا ساخته شده با ژل آگارز انجام شد و MB که یک رنگ بازی است به عنوان آنالیت هدف با انتقال از فاز آبی دهنده به گیرنده استخراج و پیش‌تغلیظ شد.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌های مورد استفاده

رنگ MB یک رنگ کاتیونی با جرم مولکولی ۳۷۳/۹ گرم بر مول و طول موج جذب ۶۶۵ نانومتر می‌باشد [۲۹]. MB و استیک اسید

معرض قرار گرفتن زیاد در برابر آن ممکن است باعث ایجاد عوارض جانبی سلامتی در انسان مانند استفراغ، شوک و نکروز بافت شود [۴]. روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۱ (HPLC) [۷-۵]، طیف‌سنجی فلورسانس [۸]، کروماتوگرافی موئینگی الکتروسرعتی [۹، ۱۰] و طیف‌سنجی نوری [۱۱، ۱۲] برای اندازه‌گیری انتخابی و حساس آن‌ها پس از جداسازی و یا تغلیظ استفاده می‌شود. روش‌های کروماتوگرافی جزو ابزارهای دقیق هستند، ولی از زمان‌بری مرحله‌های آماده‌سازی رنج می‌برند و از سویی در هر آزمایشگاهی در دسترس نبوده و کار با دستگاه نیاز به تخصص دارد. روش‌های مبتنی بر اسپکتروفتومتری ابزار کم و در دسترس دارند و از سادگی بهره می‌برند، ولی دارای نقص اصلی حساسیت پایین هستند و در نتیجه برای نمونه‌های دارای مقدارهای کم MB، و یا هر آنالیت دیگری، مناسب نیستند. در این میان، روش‌های آماده‌سازی اولیه نمونه‌ها شامل استخراج فاز جامد^۲ (SPE) [۱۱-۱۵] و استخراج مایع-مایع^۳ (LLE) [۱۶]، در استخراج رنگ‌های مصنوعی استفاده شده است. در روش‌های LLE و SPE می‌توان به یک سری معایب از جمله: پرهزینه بودن، زمان استخراج طولانی، نیاز به استفاده از ابزار دقیق و پیشرفته و مصرف زیاد حلال‌های آلی سمی در این روش‌ها اشاره کرد. در حقیقت فناوری‌های آماده‌سازی سنتی دارای اشکال‌هایی هستند که گفته شد. در نتیجه فناوری‌های ریزاستخراج معرفی شدند، که توجه ویژه‌ای به کاهش مقیاس‌ها در این فناوری‌های نوین، ساده‌سازی کارایی آن‌ها، به حداقل رساندن مصرف نمونه‌ها/واکنش‌گرها/حلال‌های سمی و همچنین هزینه‌های تمام شده است. از بین فناوری‌های ریزاستخراج، ریزاستخراج مایع-مایع پخشی^۴ (DLLME) [۱۷] بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است.

برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ میلادی، پدerson^۵ و همکاران یک سامانه ریزاستخراج جدید بنام ریزاستخراج الکتروغشایی^۶ (EME) توسعه دادند [۱۸]. این روش پیشنهادی دارای برتری‌هایی نسبت به سایر روش‌های ریزاستخراج از جمله، زمان استخراج کم و مصرف بسیار پایین حلال آلی است، به‌طوری که این روش در سال‌های اخیر نیز بسیار مورد توجه است [۱۹-۲۲]. به‌طور خلاصه در این روش، [۲، ۳]. باردار شده (مثبت یا منفی) موجود در فاز دهنده^۷ (DP) از روش یک حلال آلی (به دام افتاده در روزنه‌ها یک غشای پلیمری متخلخل)

(۱) High performance liquid chromatography (HPLC)

(۳) Liquid-liquid extraction (LLE)

(۵) Pederson

(۷) Donor phase (DP)

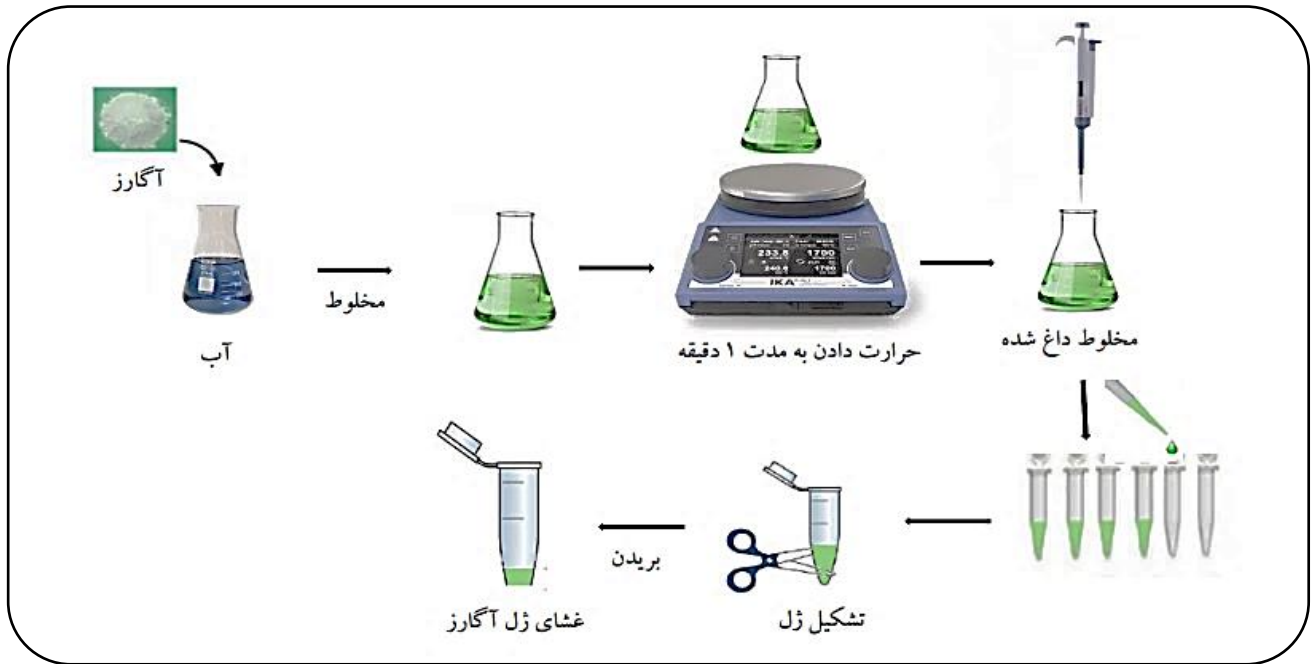
(۹) Hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME)

(۲) Solid phase extraction (SPE)

(۴) Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)

(۶) Electro-membrane extraction (EME)

(۸) Acceptor phase (AP)



شکل ۱ - تصویر شمایی فرایند آماده‌سازی غشا

فرایند ساخت غشا

شکل ۱ نمودار کلی مرحله‌های ساخت غشا را نشان می‌دهد. برای این منظور، ابتدا مقدار بهینه‌ای از آگارز را وزن کرده در آب مقطر با دمای ۸۰ درجه سلسیوس حل و سپس مقدار بهینه‌ای از استیک اسید به آن افزوده شد. پس از این که محلول شفاف شد، مقدار مشخص و بهینه‌ای از آن را توسط پیپت برداشته و وارد ظروف شیشه‌ای کرده و آن را در دمای صفر درجه سلسیوس داخل یخچال برای ۲ ساعت قرار داده تا غشا سفت شود. سپس انتهای ظروف شیشه‌ای برش داده شد و فضای بالایی آن به عنوان فاز گیرنده استفاده شد.

فرایند EME پیشنهادی برای استخراج رنگ MB

شکل ۲ تجهیزهای مورد استفاده برای اجرای روش EME پیشنهادی را نشان می‌دهد. محلول نمونه (۷ میلی‌لیتر با $\text{pH} = 7$) که دارای رنگ مورد نظر بود به یک سل شیشه‌ای وارد شده و ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر ($\text{pH} = 3$) با یک پیپت به داخل ظروف شیشه‌ای که دارای ژل به عنوان غشا بود وارد شده و الکتروود منفی (کاتد) به داخل ظروف شیشه‌ای و الکتروود مثبت (آند) به داخل ظرف دارای نمونه وارد شد. الکتروودها به صورت حلقه شکل بودند برای این که جریان الکتریکی بیش‌تری ایجاد کند و سرعت فرایند استخراج رنگ بالاتر رود. سپس، با استفاده از ولتاژ ۸۰ ولت و برای

استفاده شده در این پژوهش از نمایندگی‌های فروش فراورده‌ها شرکت مرک آلمان خریداری شده است. آگارز از شرکت سیناژن (تهران، ایران) تهیه شد. آب دو بار تقطیر شده^۱ از شرکت سرم‌سازی رازی خریداری شد و برای تهیه همه محلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. پیپت‌های انتقال از برند ورتهایم آلمان تهیه شدند. ظرف شیشه‌ای ۵ میلی‌لیتری با قطر داخلی و ارتفاع به ترتیب ۲/۵ و ۴/۵ سانتی‌متر به عنوان ظرف دارای نمونه استفاده شد. الکتروودهای مورد استفاده در این کار از جنس پلاتین با قطر ۰/۲ میلی‌متر تهیه شده از شرکت پارس پلاتین (تهران، ایران) بودند. الکتروودها به یک منبع تغذیه مدل PV-300 DC با ولتاژ قابل تنظیم در محدوده ۰-۶۶۵ ولت و خروجی جریان در محدوده ۰-۱ میلی‌آمپر ساخت شرکت پایاپژوهش (تهران، ایران) متصل شدند. در حین فرایند استخراج محلول نمونه توسط یک همزن مغناطیسی ساخت شرکت هایدولف (آلمان) با سرعت ۹۰۰ دور بر دقیقه همزده شد.

نمونه‌های استاندارد و حقیقی

محلول مادر^۲ (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از رنگ MB تهیه شد. همه محلول‌های استاندارد مورد نیاز به صورت روزانه از این محلول مادر تهیه شده و رقیق می‌شدند. pH نمونه‌ها با استفاده از محلول‌های کلریدریک اسید (HCl) و سود (NaOH) ۱/۰ مولار تنظیم شد.

(۱) Doubly distilled water (DDW)

(۲) Stock

بگذارند. در نتیجه این پارامترها با هدف دستیابی به بهترین عملکرد استخراج، فرایند بهینه‌سازی در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول، سه پارامترهای مقدار آگارز، مقدار اسید استیک و ولتاژ اعمال شده توسط روش بهینه‌سازی یک فاکتور در زمان مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد، سه پارامتر دیگر که از درجه اهمیت بالاتری برخوردار بودند و به‌طور خاص‌تری روی پدیده استخراج موثرند یعنی زمان استخراج، pH فاز دهنده و pH فاز گیرنده با استفاده از طرح کامپوزیت مرکزی^۱ (CCD) مدل‌سازی و بهینه‌سازی شدند.

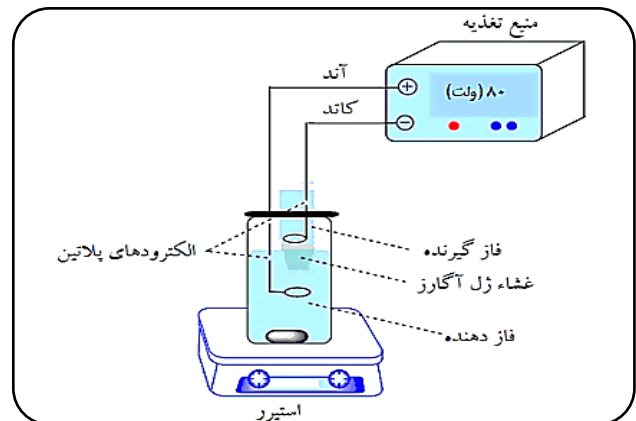
آزمایش‌های اولیه

برای بررسی تأثیر مقدار آگارز ساختار غشا در زمان استخراج، مقدارهای گوناگونی از آگارز در بازه ۷-۲ درصد (وزنی/حجمی) مورد آزمایش قرار گرفت (شکل ۳).

نتیجه‌ها نشان داد که مقدار ۵ درصد (وزنی/حجمی) برای آگارز در غشا بهینه است. مقدارهای آگارز کمتر از ۵ درصد (وزنی/حجمی) منجر به تشکیل یک غشا ناپایدار که در طول فرایند استخراج از بین رفته می‌رود، می‌شود. از طرفی مقدارهای بیش از ۵ درصد (وزنی/حجمی) آگارز در غشا، زمان استخراج را افزایش می‌دهد که این پدیده به دلیل سفتی ساختار غشایی است و انتقال MB از روش غشا را دشوار می‌سازد. از طرف دیگر تهیه غشا در این حالت به دلیل جامد شدن سریع ژل کار ساده‌ای نیست. بنابراین مقدار ۵ درصد (وزنی/حجمی) به عنوان مقدار بهینه آگارز در مرحله آماده‌سازی غشا انتخاب شد.

در مرحله بعد، تأثیر استیک اسید به عنوان یک ماده اصلاح‌کننده غشا بر زمان استخراج سامانه در دامنه ۰/۵-۰/۰۵ درصد (حجمی/حجمی) مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها این بررسی نشان داد که افزودن استیک اسید با افزایش استحکام یونی ژل غشایی همراه است و باعث کاهش زمان استخراج و همچنین افزایش کارایی می‌شود. کمترین زمان استخراج در مقدار ۰/۱۰ درصد (حجمی/حجمی) به دست آمد. مقدارهای بالای استیک اسید می‌تواند اثر استخراج را کاهش دهد، که شاید به دلیل دام انداختن آنالیت در غشا است و این باعث کندشدن حرکت آنالیت در طول غشا می‌شود.

ولتاژ اعمال شده به عنوان پارامتر سوم، در بازه ۲۰-۹۰ ولت برای مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که راندمان استخراج با افزایش ولتاژ از ۴۰ به ۸۰ ولت، به دلیل بهبود شار آنالیت افزایش یافته است. اما، در ولتاژهای بالاتر، تشکیل حباب به دلیل پدیده



شکل ۲ - شکل شماتیک از طرح پیشنهادی EME

مدت زمان ۳۰ دقیقه فرایند استخراج رنگ، در حالی که محلول نمونه با سرعت ۹۰۰ دور بر دقیقه می‌چرخید، انجام شد. پس از کامل شدن فرایند استخراج، فاز گیرنده با استفاده از پمپ جمع‌آوری و با دستگاه طیف‌سنج نوری فرابنفش-مرئی (UV-Vis) برای اندازه‌گیری در طول موج ۶۶۸ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است که با توجه به حجم پایین فاز گیرنده از یک سل ۵۰ میکرولیتری در دستگاه طیف‌سنج نوری استفاده شد.

آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

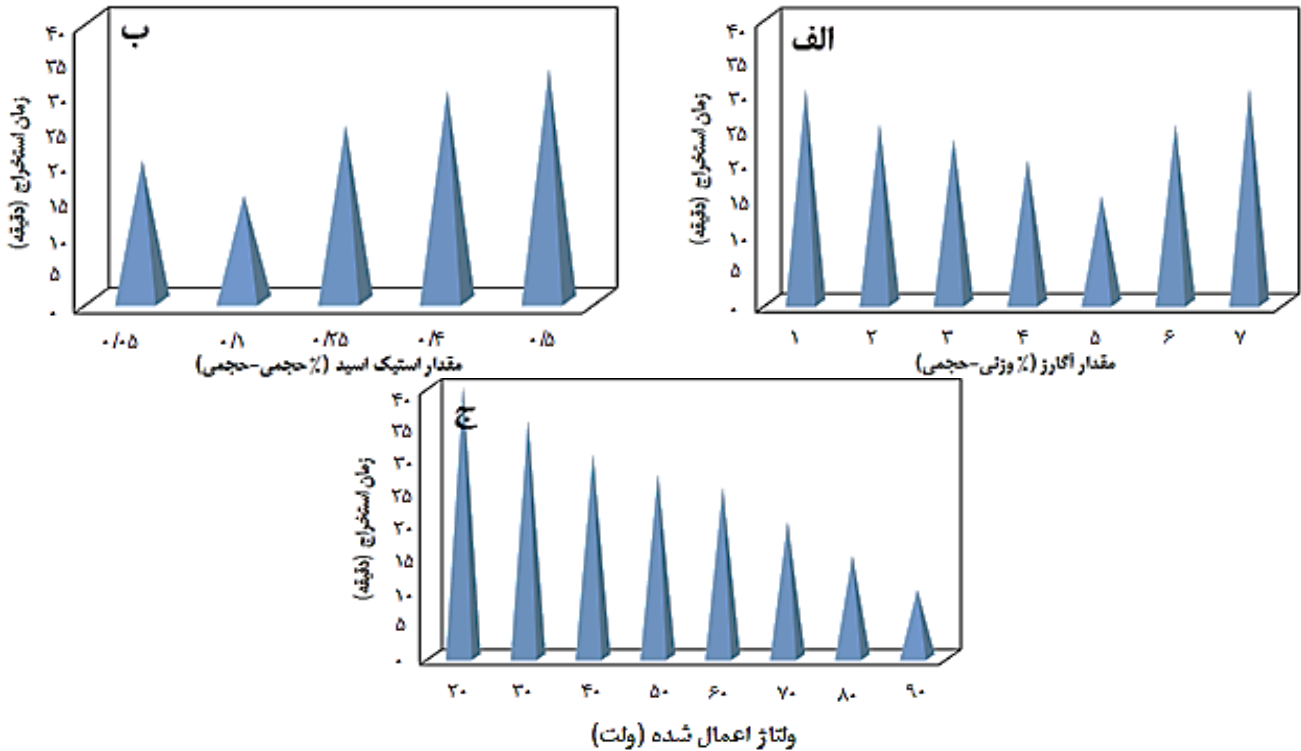
ابتدا نمونه‌های ماهی قزل‌آلا و تیلاپیا به‌صورت فریز شده از بازار خریداری شدند و سپس با همزن به‌طور کامل خرد شد. در ادامه مقدار ۶ گرم از آن را برداشته و داخل لوله سانتریفوژ بزرگ ریخته و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر حلال استونیتریل اضافه و برای مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت گذاشته و سپس برای ۱۰ دقیقه روی دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ و فاز حلال استونیتریل را جدا و زیر هود گذاشته تا استونیتریل آن تبخیر شود. سپس به ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه با pH برابر با ۸/۳ اضافه کرده تا باقی‌مانده‌ها در آب حل شوند و از این محلول به عنوان فاز دهنده استفاده و آزمایش‌های مربوطه انجام شدند.

نتیجه‌ها و بحث

فرایند بهینه‌سازی

همان‌گونه که پیش‌بینی می‌شد و براساس آزمایش‌های اولیه، پارامترهایی از جمله مقدار آگارز و استیک اسید در ساختار غشا، ولتاژ اعمال شده به الکترودها، زمان استخراج، pH فاز دهنده و گیرنده و قدرت یونی محلول دارای نمونه می‌توانند بر بازده استخراج تأثیر

(۱) Central composite design (CCD)



شکل ۳ - بررسی تأثیر الف) مقدار آگارز، ب) مقدار استیک اسید در ساختار غشا و ج) ولتاژ روی زمان استخراج

فاکتورهای اصلی برای CCD به همراه ماتریس طراحی به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

مدل به‌دست آمده از آنالیز نتایج و ضرایب رگرسیون مربوط به آن در جدول ۳ ارائه شده است. میزان تطابق مدل به‌دست آمده از طراحی آزمایش با نتیجه‌های تجربی با استفاده از ضریب همبستگی (R^2) بیان می‌شود. برای داشتن یک تطابق خوب میزان R^2 می‌بایست بیش‌تر از ۰/۸ باشد. همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان R^2 قابل قبولی برای مدل به‌دست آمده است که بیانگر کارایی مدل در پیش‌بینی نتیجه‌های آزمایشگاهی می‌باشد. همچنین آنالیز واریانس مربوط به نتیجه‌های به‌دست آمده انجام شد. بر اساس این نتایج مدل به‌دست آمده مشکل انطباق نداشتن ندارد و کاملاً معنادار می‌باشد.

از آنالیز واریانس (ANOVA) برای ارزیابی مدل و برآورد اهمیت تأثیرات و برهمکنش‌های مهم یا اصطلاحات مدل استفاده شد (جدول ۳). مقدار F برابر با ۴/۹۷ نشانگر اهمیت مدل است. تنها ۰/۰۱ احتمال وجود دارد که "مقدار F مدل" به دلیل نویز اتفاق بیفتد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ برای یک پارامتر اهمیت آن را نشان می‌دهد. مدل چند جمله‌ای مرتبه دوم با نتیجه‌ها قابل قبول آماری، یعنی مقدارها بالاتر از F و R و انطباق نداشتن (LOF) به عنوان یک مدل سطح پاسخ رضایت‌بخش و متناسب با داده‌های تجربی در نظر گرفته شد.

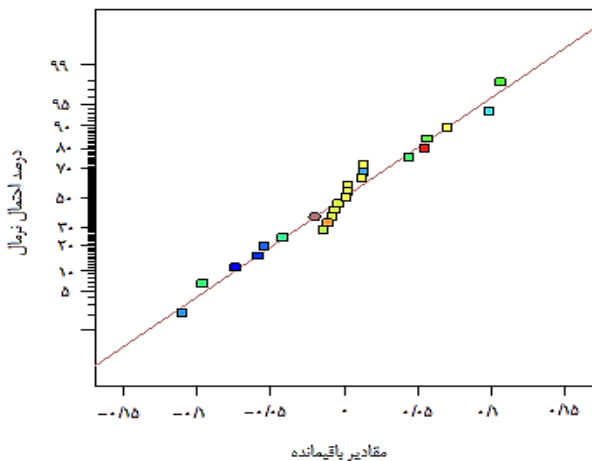
الکترولیز و افزایش در حجم فاز پذیرنده به دلیل افزایش پدیده الکتروفورز، ناپایداری در مهاجرت MB را در پی دارد که منجر به کاهش راندمان استخراج و تکرارپذیری می‌شود [۳۰]. بنابراین، ۸۰ ولت به عنوان ولتاژ اعمال شده انتخاب شده است.

طراحی مرکب مرکزی

در این مرحله از روش‌های بهینه‌سازی آماری استفاده شده است تا برهمکنش احتمالی بین متغیرها با حداقل تعداد اجرا و برای ارزیابی تأثیر هر یک از عامل‌ها در سطوح گوناگون سایر فاکتورها انجام شود. CCD به عنوان یک روش آماری قدرتمند برای تعیین برهمکنش چندین متغیر و تأثیر آن بر پاسخ، به طور هم‌زمان مورد استفاده قرار گرفت. در همین راستا، نرم‌افزار نسخه آزمایشی ۱۰ Design Expert به عنوان ابزار طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است و این نرم‌افزار پیشنهاد می‌کند که ۲۳ آزمایش برای بهینه‌سازی سه پارامتر یعنی زمان استخراج و pH فاز دهنده و پذیرنده مورد نیاز است. از آن جا که مدت زمان زیادی برای انجام این آزمایش‌ها لازم است، تمام مرحله‌های اجرا شده در سه روز متوالی به سه بلوک تقسیم شده و انجام شدند. در این کار، نقاط مرکزی برای به‌دست آوردن تخمین خوبی از خطاهای آزمایشی تکرار شد. نمادها و سطح

جدول ۳ - آنالیز واریانس برای طرح مرکب مرکزی

ملاحظات	مقدار P	مقدار F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	روز
			۰/۲۳	۲	۰/۴۶	
مدل	معنی دار	۴/۹۷	۰/۶۷	۹	۶/۰۵	
A	معنی دار	۰/۰۴۸۰	۰/۹۳	۱	۰/۱۳	
B	معنی دار	۰/۰۰۱۵	۹/۴۸	۱	۱/۲۸	
C	معنی دار	۰/۰۰۱۴	۱۸/۰۸	۱	۲/۴۵	
AB	بی معنی	۰/۱۲۴۹	۲/۷۶	۱	۰/۳۷	
AC	بی معنی	۰/۳۷۵۱	۰/۸۵	۱	۰/۱۲	
BC	بی معنی	۰/۲۹۱۹	۱/۲۳	۱	۰/۱۷	
A ²	معنی دار	۰/۰۱۵۹	۸/۱۱	۱	۱/۱۰	
B ²	بی معنی	۰/۱۱۸۵	۲/۸۷	۱	۰/۳۹	
C ²	بی معنی	۰/۳۵۲۴	۰/۹۴	۱	۰/۱۳	
باقی مانده	-	-	۰/۱۴	۱۱	۱/۴۹	
عدم برازش	بی معنی	-	۰/۲۴	۵	۱/۱۸	
خطای محض	-	-	۰/۰۵۱	۶	۰/۳۰	
کل	-	-	-	-	۸/۰۱	
R ²	-	-	۰/۹۵۹۸	-	-	



شکل ۴ - نمودار احتمال نرمال در مقابل مقادیر باقی مانده

آن را به دلیل افزوده شدن جمله‌های غیرمهم در مدل غیرقابل اعتماد دانست. دو پارامتر مهم دیگر برای ارزیابی مدل، R^2 تنظیم شده (R_{adj}^2) و R^2 پیش‌بینی (R_{pred}^2) است. مقدار R_{adj}^2 با ۰/۸۶۹۵، برای تعداد جمله‌های موجود در مدل مناسب است و با افزایش تعداد جمله‌ها در مدل کاهش می‌یابد. مقدار R_{pred}^2 نیز بالاتر از ۰/۸ بود. برای تأیید اعتبار مدل نهایی، مانند شکل ۴، نمودار احتمال نرمال در مقابل مقادیر باقی مانده رسم شده است. همه نقطه‌های

جدول ۱ - سطوح کمینه و بیشینه برای طراحی آزمایش استخراج MB

فاکتور	منفی آلفا	سطح کمینه	مرکز	سطح بیشینه	مثبت آلفا
A: pH فاز گیرنده	۱/۳	۲/۰	۳/۰	۴/۰	۴/۷
B: pH فاز دهنده	۶/۳	۷/۰	۸/۰	۹/۰	۹/۶
C: زمان (min)	۳	۱۰	۲۰	۳۰	۳۷

جدول ۲ - آزمایش‌های طراحی شده به روش طرح مرکب مرکزی برای

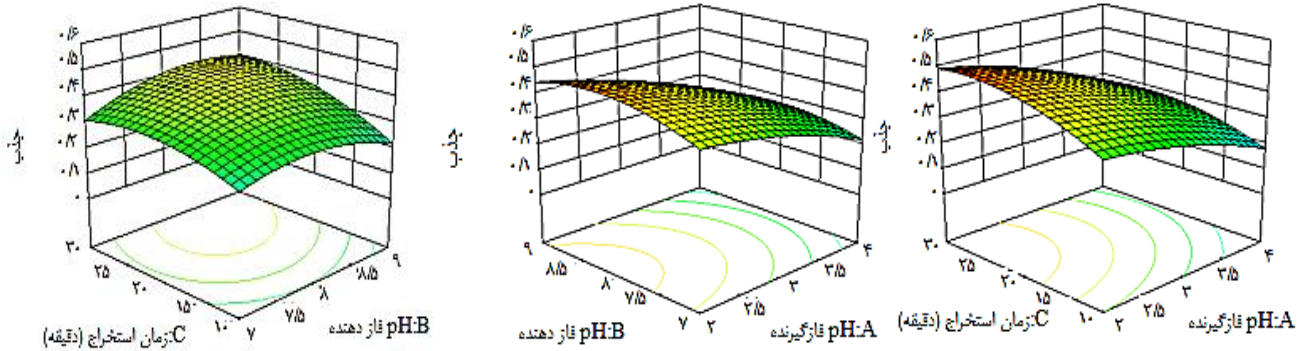
بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر EME

اجرا	روز آزمایش	pH فاز گیرنده	pH فاز دهنده	زمان (دقیقه)
۱	۱	۳	۸	۲۰
۲	۱	۳	۸	۲۰
۳	۱	۴	۹	۱۰
۴	۱	۴	۷	۳۰
۵	۱	۳	۸	۲۰
۶	۱	۲	۹	۳۰
۷	۱	۲	۷	۱۰
۸	۲	۳	۸	۲۰
۹	۲	۳	۸	۲۰
۱۰	۲	۴	۹	۳۰
۱۱	۲	۳	۸	۲۰
۱۲	۲	۲	۹	۱۰
۱۳	۲	۲	۷	۳۰
۱۴	۲	۴	۷	۱۰
۱۵	۳	۴/۷	۸	۲۰
۱۶	۳	۳	۸	۳
۱۷	۳	۳	۶/۳	۲۰
۱۸	۳	۳	۹/۷	۲۰
۱۹	۳	۳	۸	۳۷
۲۰	۳	۳	۸	۲۰
۲۱	۳	۳	۸	۲۰
۲۲	۳	۱/۳	۸	۲۰
۲۳	۳	۳	۸	۲۰

این مدل در معادله ۱ نشان داده شده است که متشکل از دو اثر اصلی، دو اثر متقابل دو عاملی و سه اثر خمیدگی به شرح زیر است.

$$\text{جذب} = ۱/۷۵ + ۰/۰۹A - ۰/۳۱B + ۰/۴۲C - ۰/۲۲AB + ۰/۱۲AC + ۰/۱۴BC - ۰/۲۶A^2 - ۰/۱۶B^2 + ۰/۰۹C^2 \quad (۱)$$

مقدار R^2 که اندازه‌گیری مقدار تغییر در میانگین طبق مدل می‌باشد ۰/۹۵۹۸ بود. لازم به ذکر است که می‌توان مقدار R^2 را این با بالا بردن تعداد جملات مدل افزایش داد، بنابراین می‌توان مقدار



شکل ۵ - منحنی‌های پاسخ سطحی برای مدل ارایه شده برای استخراج MB

غلظت کل یون‌ها در فاز دهنده به غلظت کل یون‌ها در فاز گیرنده تعریف می‌شود [۲۰، ۲۱، ۳۰]. در واقع با افزایش میزان غلظت یون‌های دیگر، شدت رقابت بین گونه‌های یونی MB و یون‌های مزاحم برای مهاجرت از فاز دهنده به سمت فاز گیرنده و عبور از غشا افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش تعداد یون‌های عبوری از غشا احتمال تخریب غشا و افزایش الکترولیز زیادتر می‌شود و این فرایند تأثیرات ناخواسته‌ای را بر روی راندمان و تکرارپذیری استخراج خواهد داشت. بنابراین انتظار داریم با کاهش χ ، شار آنالیت و میزان استخراج افزایش یابد. از طرفی حضور دیگر یون‌ها در محلول نمونه می‌تواند با یون آنالیت رقابت کرده و اثر منفی بر روی استخراج بگذارد. این بررسی با استفاده از مقادیر ۲ و ۵٪ (وزنی/حجمی) نمک پتاسیم کلرید در فاز دهنده انجام گرفت. شایان یادآوری است که در بررسی اثر نمک نباید از غلظت‌های بالا استفاده شود، زیرا این عمل می‌تواند منجر به تخریب ناگهانی غشا، ایجاد جرقه بین الکترودهای پلاتینی و حتی قطع الکترودها از محل ایجاد جرقه و صدمه به منبع اعمال پتانسیل شود. بررسی کارایی مهاجرت MB در حضور نمک بررسی شد و همان‌گونه که انتظار می‌رفت، افزودن نمک، بازده استخراج و در نتیجه مقدار سیگنال جذب را کاهش داد. این موضوع به دلیل افزایش χ است.

تعیین ارقام شایستگی

در شرایط بهینه یعنی غلظت آگارز، ۵٪ (وزنی/حجمی)، غلظت استیک اسید، ۰/۱٪ (حجمی/حجمی)، ولتاژ اعمالی، ۸۰ ولت، زمان استخراج ۲۵ دقیقه، pH محلول دهنده، ۸/۳، pH محلول پذیرنده ارقام شایستگی روش تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری MB شامل بازه دینامیکی خطی^۱ (LDR) همراه با حد تشخیص تئوری^۲ (LOD)

بسیار نزدیک به یک خط مستقیم هستند که نشان‌دهنده ثابت بودن خطاها و توزیع نرمال آن‌ها با میانگین صفر است. این نشان می‌دهد که هیچ خطای مشخصی وجود ندارد و همه خطاهای باقی‌مانده به علت خطای تصادفی است.

منحنی‌های سه‌بعدی سطح پاسخ رسم شده براساس مدل ارایه شده در شکل ۵ نشان داده شده است. بر این اساس، کاهش pH فاز گیرنده افزایش سیگنال جذبی رنگ در طول موج بیشینه ۶۶۸ nm را در پی دارد که نشان‌دهنده افزایش بازده استخراج MB است. همچنین افزایش pH دهنده تا حدود ۸/۳ و زمان استخراج تا ۲۵ دقیقه نیز افزایش سیگنال تجزیه‌ای MB را در پی دارد. در واقع در محلول نمونه pH به گونه‌ای تنظیم شده است تا اطمینان به دست آید که همه آنالیت MB به طور کامل یونیده شده‌اند و در طی اعمال اختلاف پتانسیل الکتریکی، MB با بار مثبت از الکتروود آند (مثبت) فاز دهنده دور شده و شروع به مهاجرت الکتریکی به سمت الکتروود کاتد (منفی) که در فاز گیرنده قرار دارد می‌کنند. سرانجام، شرایط بهینه بر اساس مدل نهایی متناسب با عملکرد مطلوب مورد ارزیابی قرار گرفت. دلخواه بودن دامنه مطلوب را برای هر پاسخ منعکس می‌کند. در بهینه‌سازی، هدف مورد نظر برای پاسخ به بیشینه مقدار انتخاب شده و فاکتورها در بازه انتخاب شده اند. بهینه‌سازی غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert 10، نسخه آزمایشی انجام شد. نقطه‌های تعیین شده روش بهینه ۲۵ دقیقه برای زمان استخراج، ۸/۳ برای pH محلول دهنده و ۲ برای pH محلول پذیرنده بود.

اثر نمک

مطابق بررسی‌های گذشته غلظت بالای گونه‌های یونی مقدار موازنه یونی χ^2 را در سامانه افزایش داده و باعث کاهش عبور آنالیت از غشا می‌شود [۲۰، ۲۱، ۳۰، ۳۱]. موازنه یونی به صورت نسبت

(۱) Linear Dynamic Range (LDR)

(۲) Limit of Detection (LOD)

جدول ۴ - ویژگی‌های تحلیلی روش استخراج الکتروغشایی برای تعیین MB در نمونه های ماهی

R ²	حساسیت تجزیه‌ای (m/S)	حساسیت برسنجی (m)	LOD (μM)	LOQ (μM)
۰/۹۹۵۶	۵۶/۲	۰/۵۰۶	۴/۷×۱۰ ^{-۳}	۱۵/۴×۱۰ ^{-۳}

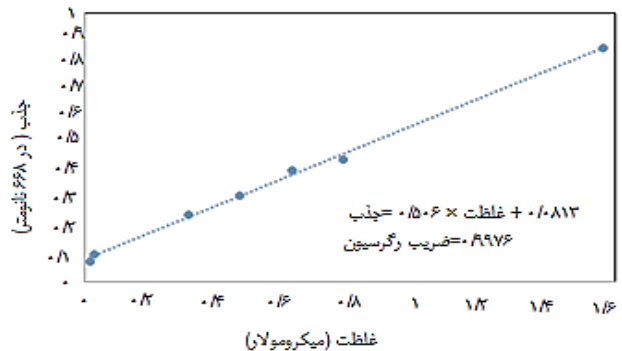
جدول ۵ - مقایسه روش EME ارایه شده با سایر روش‌های تجزیه‌ای گزارش شده

مرجع	نمونه حقیقی	LOD (μM)	DLR (μM)	دقت (RSD%)	pH نمونه	روش اندازه‌گیری	آماده‌سازی
[۳۲]	آب و پساب	۱/۶×۱۰ ^{-۳}	۰/۰۰۵-۱/۸۷۶	۳/۳	۸/۰	HPLC-UV/Vis ^۱	HF-LPME
[۱۵]	میگو	۱/۵۶×۱۰ ^{-۳}	۳/۶-۱۳/۲۵ (×۱۰ ^{-۳})	۷/۳-۱۰/۹	۴/۵	HPLC-MS ^۲	SPE
[۱۷]	آب و پساب	۰/۰۲۲	۰/۱۰-۰/۶۶۶	۳	-	UV/Vis	DLLME
[۳۳]	ماهی	۹/۴×۱۰ ^{-۳}	۰/۰۳۱-۰/۱۵۶	۵-۱۲	۴/۵	HPLC-UV/Vis	-
[۳۴]	آب	۰/۶۹	۲/۲۷-۷/۸۲	۷/۴	۱۰/۵	UV-Vis	-
کارحاضر	ماهی	۴/۷×۱۰ ^{-۳}	۰/۰۱۵-۱/۵۶۰	۲/۳	۸/۳	UV-Vis	EME

ارایه شده در کار حاضر است. از دیگر برتری‌های این روش در مقایسه با سایر گزارش‌ها، سادگی و عدم پیچیدگی روش است به طوری که در مقایسه با روش HF-LPME بسیار ساده‌تر است. بنابراین روشن است که روش ریزاستخراج الکتروغشایی در کنار سادگی، حساسیت بالا و تکرارپذیری قابل قبول، حد تشخیص عالی و فاکتورهای تغلیظ بسیار خوبی را ارایه می‌دهد. افزون بر این در مقایسه با LLE و SPE مصرف حلال آلی به کمترین میزان کاهش یافته است و مشکل‌های مربوط به جداکردن و انتخاب یک حلال امتزاج‌ناپذیر با آب در مورد روش LLE و حلال شویش مناسب در مورد SPE وجود ندارد. در معادله با روش DLLME نیز مشکل جمع‌آوری فاز پخش شده بایستی با استفاده از ساتریفوژ و صرف زمان طولانی جبران شود که در کنار زمان صرف شده برای استخراج وقت‌گیر خواهد بود. همچنین در مقایسه با روش HF-LPME چون نیازی به استفاده از فیبر توخالی نیست مشکل‌های مربوط به اثر حافظه حذف می‌شود. مقایسه LOD و DLR برای روش EME با سایر روش‌هایی که تنها از UV-Vis برای اندازه‌گیری استفاده کرده‌اند (مرجع‌های [۱۷،۳۳]) برتری چشمگیری را نشان می‌دهد. در مورد مرجع‌های [۱۵،۳۳] با این که این کارها LODهای پایین‌تری را گزارش کرده‌اند ولی استفاده از HPLC بر پیچیدگی کار آنها افزوده است. ضمن این که دستگاه‌هایی مانند HPLC و مخصوصاً LC-MS در هر آزمایشگاهی در دسترس نیست.

آنالیز نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی کارایی روش معرفی شده برای آنالیز نمونه‌های



شکل ۶ - منحنی برسنجی خطی میزان جذب به عنوان سیگنال تجزیه‌ای پس از فرایند EME بر حسب غلظت‌های گوناگون از محلول MB تحت شرایط بهینه

و حد تشخیص عملی^۳ (LOQ) تعیین شدند. لازم به ذکر است که LOD و LOQ روش به ترتیب به صورت ۳ و ۱۰ برابر انحراف استاندارد سیگنال شاهد تقسیم بر شیب منحنی برسنجی تعیین شد. همان‌گونه که در شکل ۶ و جدول ۴ نشان داده شده است، معادله بین سیگنال تجزیه‌ای و غلظت رنگ MB در بازه ۰/۰۱۵-۱/۵۶ μM خطی است. حد تشخیص تئوری و عملی به ترتیب برابر با ۴/۷×۱۰^{-۳} و ۱۵/۴×۱۰^{-۳} μM بود. میزان دقت برابر با ۲/۳ به دست آمد.

مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌های تجزیه‌ای

در جدول ۵ بررسی اجمالی را برای اندازه‌گیری MB در نمونه‌های گوناگون با سایر روش‌های تجزیه‌ای انجام پذیرفته است که نشان‌دهنده بازه خطی و حد تشخیص قابل پذیرش روش EME

(۱) HPLC coupled with UV-Vis detection

(۳) Limit of quantification (LOQ)

(۲) HPLC coupled with mass spectrometer detection

جدول ۶ - نتیجه‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری MB در نمونه‌های ماهی

نمونه ماهی	غلظت اضافه شده (μM)	غلظت به‌دست آمده (μM)	انحراف استاندارد نسبی (%)	بازیابی (%) ^۱
قزل‌آلا	۰	تشخیص داده نشد	-	-
	۰/۰۳۱	۰/۰۲۹	۵/۱	۹۳/۵
	۰/۱۵۶	۰/۱۶۲	۳/۶	۱۰۳/۸
	۰/۳۱۲	۰/۳۳۸	۱/۴	۱۰۸/۳
تیلاپیا	۰	تشخیص داده نشد	-	-
	۰/۰۳۱	۰/۰۲۲	۶/۵	۷۱/۰
	۰/۱۵۶	۰/۱۰۹	۴/۱	۶۹/۹
	۰/۳۱۲	۰/۲۹۱	۱/۵	۹۳/۳

فیبر توخالی است. از دیگر برتری‌های روش EME ارابه شده، ضخامت قابل تنظیم غشا، ساخت آسان و عملکرد ساده با حجم فاز پذیرنده قابل تنظیم است. غشای توسعه یافته ارزان و بدون استفاده از حلال آلی است. این نوع استخراج می‌تواند به عنوان یک شیوه ساده و جدید از EME برای اندازه‌گیری انواع رنگ‌های اسیدی و بازی در نمونه‌های گوناگون در نظر گرفته شود. علاوه بر این، برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی پارامترهای درگیر از طراحی مرکب مرکزی استفاده شد. این روش بهینه‌سازی از روش یک فاکتور در زمان معتبرتر است. روش پیشنهادی ما دارای LOD و LOQ کم با بازه خطی گسترده است. همچنین، روش EME ارابه شده با موفقیت برای آنالیز MB در نمونه‌های ماهی به کار رفت.

حقیقی، آزمایش‌ها برای اندازه‌گیری رنگ MB در نمونه‌های ماهی قزل‌آلا و تیلاپیا انجام پذیرفت.

آزمایش‌ها به این صورت انجام شد: ابتدا آزمایش‌های سه بار تکرار این نمونه‌ها بدون اضافه کردن رنگ انجام شد که نتیجه‌ها نشان‌دهنده عدم وجود MB در نمونه بود. در ادامه به نمونه به ترتیب غلظت‌های ۰/۰۳۱ و ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۳ μM از رنگ به محلول دارای ماهی اضافه و فرایند EME و سپس اندازه‌گیری با UV-Vis انجام شد. میانگین جذب UV-Vis برای ماهی قزل‌آلا و تیلاپیا به ترتیب در بازه‌ی ۰/۰۲۷۹ تا ۰/۴۲۴۷ و ۰/۰۲۹۳ تا ۰/۴۱۵۲ به‌دست آمدند (جدول ۶).

نتیجه‌گیری

کاربرد ژل آگارز اصلاح شده با استیک اسید به عنوان غشایی برای استخراج رنگ MB در روش EME مورد بررسی قرار گرفت. کار با این نوع ترکیب غشایی آسان‌تر از روش‌های EME مبتنی بر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴

مراجع

- [1] Kolekar Y.M., Pawar S.P., Gawai K.R., Lokhande P.D., Shouche Y.S., Kodam K.M., *Decolorization and Degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10, by Bacillus Fusiformis KMK5 Isolated from the Textile Dye Contaminated Soil, Bioresour. Technol.*, **99(18)**: 8999–9003 (2008).
- [2] Xu Y.J., Tian X.H., Zhang X.Z., Gong X.H., Liu H.H., Zhang H.J., Huang H., Zhang L.M., *Simultaneous Determination of Malachite Green, Crystal Violet, Methylene Blue and the Metabolite Residues in Aquatic Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, J. Chromatogr. Sci.*, **50(7)**: 591–597 (2012).
- [3] Oz M., Lorke D.E., Hasan M., Petroianu G.A., *Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System, Med. Res. Rev.*, **31(1)**: 93–117 (2011).

(۱) Recovery

- [4] Razmara R.S., Daneshfar A., Sahrai R., [Determination of Methylene Blue and Sunset Yellow in Wastewater and Food Samples Using Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction](#), *J. Ind. Eng. Chem.*, **17(3)**: 533–536 (2011).
- [5] Talebianpoor M.S., Khodadoust S., Rozbehi A., Akbartabar Toori M., Zoladl M., Ghaedi M., Mohammadi R., Hosseinzadeh A.S., [Application of Optimized Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Determination of Melatonin by HPLC-UV in Plasma Samples](#), *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **960**: 1–7 (2014).
- [6] Wang Z., Zhang L., Li N., Lei L., Shao M., Yang X., Song Y., Yu A., Zhang H., Qiu F., [Ionic Liquid-Based Matrix Solid-Phase Dispersion Coupled with Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction of Synthetic Dyes in Condiments](#), *J. Chromatogr. A*, **1348**: 52–62 (2014).
- [7] Tatebe C., Zhong X., Ohtsuki T., Kubota H., Sato K., Akiyama H., [A Simple and Rapid Chromatographic Method to Determine Unauthorized Basic Colorants \(Rhodamine B, Auramine O, and Pararosaniline\) in Processed Foods](#), *Food Sci. Nutr.*, **2(5)**: 547–556 (2014).
- [8] Alesso M., Bondioli G., Talfo M.C., Luconi M.O., Fernández L.P., [Micelles Mediated Separation Fluorimetric Methodology for Rhodamine B Determination in Condiments, Snacks and Candies](#), *Food Chem.*, **134(1)**: 513–517 (2012).
- [9] Hillaert S., De Beer T.R.M., De Beer J.O., Van den Bossche W., [Optimization and Validation of a Micellar Electrokinetic Chromatographic Method for the Analysis of Several Angiotensin-II-Receptor Antagonists](#), *J. Chromatogr. A*, **984(1)**: 135–146 (2003).
- [10] Zhang S., Yang X., Yin X., Wang C., Wang Z., [Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Sweeping Micellar Electrokinetic Chromatography for the Determination of Some Neonicotinoid Insecticides in Cucumber Samples](#), *Food Chem.*, **133(2)**: 544–550 (2012).
- [11] Mitra S., [Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry](#), *John Wiley & Sons*, (2004).
- [12] Boyac E., Rodriguez-Lafuente A., Gorynski K., Mirnaghi F., Souza-Silva E.A., Hein D., Pawliszyn J., [Sample preparation with Solid Phase Microextraction and Exhaustive Extraction Approaches: Comparison for Challenging Cases](#), *Anal. Chim. Acta*, **873**: 14–30 (2015).
- [13] Das C., Rungta M., Arya G., DasGupta S., De S., [Removal of Dyes and Their Mixtures from Aqueous Solution using Liquid Emulsion Membrane](#), *J. Hazard. Mater.*, **159(2–3)**: 365–371 (2008).
- [14] Pandit P., Basu S., [Dye and Solvent Recovery in Solvent Extraction Using Reverse Micelles for the Removal of Ionic Dyes](#), *Ind. Eng. Chem. Res.*, **43(24)**: 7861–7864 (2004).
- [15] Ghorbani M., Aghamohammadhassan M., Chamsaz M., Akhlaghi H., Pedramrad T., [Dispersive Solid Phase Microextraction](#), *Trends Anal. Chem.*, **118**: 793–809 (2019).
- [16] Sarafraz-Yazdi A., Amiri A., [Liquid Phase Microextraction](#), *Trends Anal. Chem.*, **29**: 1–14 (2010).
- [17] Rezaee M., Assadi Y., Millani M.R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., [Determination of Organic Compounds in Water using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction](#), *J. Chromatogr., A*, **1116**: 1–9 (2006).

- [18] Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., [Electrokinetic Migration across Artificial Liquid Membranes: New Concept for Rapid Sample Preparation of Biological Fluids](#), *J. Chromatogr. A*, **1109(2)**: 183–190 (2006).
- [19] Atarodi A., Chamsaz M., Moghaddam A.Z., Tabani H., [Introduction of Fullerene as a New Carrier in Electromembrane Extraction for the Determination of Ibuprofen and Sodium Diclofenac as Model Acidic Drugs in Real Urine Samples](#), *Chromatographia*, **80**: 881–890 (2017).
- [20] Atarodi A., Chamsaz M., Moghaddam A.Z., Tabani H., [Introduction of High Nitrogen Doped Graphene as a New Cationic Carrier in Electromembrane Extraction](#), *Electrophoresis*, **37(9)**: 1191–1200 (2016).
- [21] Tabani H., Khodaei K., Varanusupakul P., Alexovič M., [Gel Electromembrane Extraction: Study of Various Gel Types and Compositions toward Diminishing the Electroendosmosis Flow](#), *Microchem. J.*, **153**: 104520–104527 (2020).
- [22] Rahimi A., Nojavan S., Tabani H., [Inside Gel Electromembrane Extraction: A Novel Green Methodology for the Extraction of Morphine and Codeine from Human Biological Fluids](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **184**: 113175–113183 (2020).
- [23] Gjelstad A., Andersen T.M., Rasmussen K.E., Pedersen-Bjergaard S., [Microextraction Across Supported Liquid Membranes Forced by PH Gradients and Electrical Fields](#), *J. Chromatogr. A*, **1157(1–2)**: 38–45 (2007).
- [24] Tabani H., Fakhari A.R., Shahsavani A., [Simultaneous Determination of Acidic and Basic Drugs Using Dual Hollow Fibre Electromembrane Extraction Combined with CE](#), *Electrophoresis*, **34(2)**: 269–276 (2013).
- [25] Fakhari A.R., Tabani H., Nojavan S., [Miniaturized Hollow Fibre Assisted Liquid-Phase Microextraction and Gas Chromatography for Determination of Trace Concentration of Sufentanil and Alfentanil in Biological Samples](#), *Drug Test. Anal.*, **5(2)**: 589–595 (2013).
- [26] Pernodet N., Maaloum M., Tinland B., [Pore Size of Agarose Gels by Atomic Force Microscopy](#), *Electrophoresis*, **18(1)**: 55–58 (1997).
- [27] Rahbani J., Behzad A.R., Khashab N.M., Al-Ghoul M., [Characterization of Internal Structure of Hydrated Agar and Gelatin Matrices by Cryo-SEM](#), *Electrophoresis*, **34(3)**: 405–408 (2013).
- [28] Ream J.A., Lewis L.K., Lewis K.A., [Rapid Agarose Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay for Quantitating Protein: RNA Interactions](#), *Anal. Biochem.*, **511**: 36–41 (2016).
- [29] Doğan M., Özdemir Y., Alkan M., [Adsorption Kinetics and Mechanism of Cationic Methyl Violet and Methylene Blue Dyes onto Sepiolite](#), *Dye. Pigment.*, **75(3)**: 701–713 (2007).
- [30] Gjelstad A., Rasmussen K.E., Pedersen-Bjergaard S., [Electromembrane Extraction of Basic Drugs from Untreated Human Plasma and Whole Blood under Physiological pH Conditions](#), *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**: 921–928 (2009).
- [31] Middelthon-Bruer T.M., Gjelstad A., Rasmussen K.E., Pedersen-Bjergaard S., [Parameters Affecting Electro Membrane Extraction of Basic Drugs](#), *J. Sep. Sci.*, **31(4)**: 753–759 (2008).

- [32] Badiee H., Zanjanchi M.A., Zamani A., Fashi A., [Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Based on the Use of a Rotating Extraction Cell: A Green Approach for Trace Determination of Rhodamine 6G and Methylene Blue Dyes](#), *Environ. Pollut.*, **255(2)**: 113287–113297 (2019).
- [33] Turnipseed S.B., Roybal J.E., Plakas S.M., Pfenning A.P., Hurlbut J.A., Long A.R., [Determination of Methylene Blue in Channel Catfish \(*Ictalurus Punctatus*\) Tissue by Liquid Chromatography with Visible Detection](#), *J. AOAC Int.*, **80(1)**: 31–35 (1997).
- [34] Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez-Olea J., Luzón G., Lechuga M., [Simplified Spectrophotometric Method Using Methylene Blue for Determining Anionic Surfactants: Applications to the Study of Primary Biodegradation in Aerobic Screening Tests](#), *Chemosphere*, **65(2)**: 278–285 (2006).