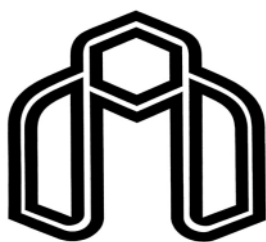


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد

اندازه گیری ال-سیستئین به روش تزریق در جریان پیوسته با آشکارساز

اسپکتروفتومتری

فرزانه حاجیان اسرمی

استاد راهنما:

دکتر منصور عرب چم جنگلی

استاد مشاور:

دکتر فاطمه مصدرالامور

بهمن ۱۳۹۲

ب

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم  
ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم  
خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم و در ناامیدی ماندم را  
کشیدی و لبریزم کردی از شوق  
الکون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد  
به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.....  
و تو ای مادر، ای شوق زیبایی نفس کشیدن  
ای روح مهربان، هستی ام  
تو رنگ شادی هایم شدی و لحظه ها را با تمام وجود از من دور کردی و  
عمری خشکی را با به جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش  
پیروزی را به من بچشانی

## مشکر و قدردانی

حمد و سپاس پروردگاریت را که لطف و کرم بی کرائش اینجانب را نیز در بر گرفت تا به وسع توان خویش گامی کوچک در گستره علم و معرفت بردارم.

اکنون که به یاری خداوند متعال، این دوره پر خاطره از دوران تحصیل را به پایان رسانده‌ام، به رسم ادب و احترام بر خود واجب می‌دانم از زحمات فراوان استاد توانمند جناب آقای دکتر منصور عرب جم جفلی که بارها به نیت و نظرات ارزنده و صبر و حوصله فراوان، نقش مهمی در به ثمر رساندن این کار داشته‌اند و بدون رهنمودهای ارزنده ایشان به پایان رساندن این تحقیق ممکن نبود مشکر و سپاسگزاری کنم. همچنین از خانم دکتر فاطمه مصدر الامور که در انجام این پایان نامه کمال همکاری را با بنده داشته‌اند مشکر و قدردانی می‌کنم. از کارکنان محترم دانشکده شیمی که همکاری‌های صمیمانه‌ای را با اینجانب داشته‌اند مشکر می‌نمایم.

در پایان از هم کلاسی‌های خوبم آقایان احمد قوچانی مقدم، حسن دانشی نژاد، حسین کوهستانی، سیامک ناظری دوسان عزیزم خانم‌ها منصوره فلاحتکار، فرزانه کجاف، لیلی حاجی اشرفی، نجمه حامدین زاده و تمام دانشجویان ورودی ۹۰ که در مراحل انجام این تحقیق کمک و همراه بنده بودند نهایت سپاسگزاری را داشته‌و برای همه این عزیزان آرزوی سلامتی و سعادت می‌نمایم.

## تعهد نامه

- اینجانب فرزانه حاجیان اسرمی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه اندازه گیری ال-سیستئین به روش تزریق در جریان پیوسته با آشکارساز اسپکتروفتومتری تحت راهنمایی دکتر منصور عرب چم جنگلی متعهد می شوم :
- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

## مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

در این پروژه یک روش تزریق در جریان پیوسته برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در آب و نمونه‌های سرم و ادرار ارائه شده است. این روش بر اساس اثر بازداری ال-سیستئین بر واکنش متاکرزول‌پرپیل و پتاسیم برومات که توسط یون برمید کاتالیز می‌شود، استوار است. در حضور ال-سیستئین یک زمان القایی در واکنش ظاهر می‌شود که زمان القایی متناسب با غلظت ال-سیستئین می‌باشد. واکنش به طریق اسپکتروفتومتری با اندازه‌گیری افزایش جذب متاکرزول‌پرپیل در طول موج ۵۲۵ نانومتر دنبال شد. اثر متغیرهای مهم شیمیایی و دستگاهی بر حساسیت روش مطالعه و به روش تک عاملی و طراحی فاکتوریل بررسی و بهینه شدند. منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۰۵۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی لیتر خطی بوده و حد تشخیص ( $S/N=3$ ) روش نیز ۰/۰۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر است. انحراف استاندارد نسبی برای ۶ بار اندازه‌گیری تکراری در غلظت‌های ۰/۵۰۰، ۵/۰۰ و ۱۲/۰ میکروگرم بر میلی لیتر ال-سیستئین به ترتیب ۲/۰۴، ۰/۶۶ و ۰/۳۳ درصد می‌باشد. این روش برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های آب، سرم و ادرار با موفقیت به کار گرفته شد.

## لغات کلیدی:

ال-سیستئین، زمان القایی، سینتیک، متاکرزول‌پرپیل، اسپکتروفتومتری، تزریق در جریان پیوسته،

طرح فاکتوریل

مقالات مستخرج از این پایان نامه که در همایش‌ها ارائه شده است:

- ❖ شانزدهمین کنگره شیمی ایران، دانشگاه یزد، شهریور ماه ۱۳۹۲
- ❖ چهارمین سمینار دوسالانه کمومتریکس ایران، دانشگاه شیراز، آذرماه ۱۳۹۲

## فهرست مطالب

| عنوان  | صفحه |
|--|------|
| <b>فصل اول</b> .....   | ۱    |
| ۱-۱-ال - سیستمین .....   | ۲    |
| ۲-۱- کاربردهای ال - سیستمین .....  | ۴    |
| ۳-۱- اهمیت اندازه گیری ال - سیستمین .....  | ۵    |
| ۴-۱- مروری بر کارهای انجام شده برای اندازه گیری ال - سیستمین .....                 | ۵    |
| <b>فصل دوم</b> .....   | ۱۱   |
| ۱-۲- روش های سینتیکی و کاربرد آنها در شیمی تجزیه .....                             | ۱۲   |
| ۱-۱-۲- تعریف سینتیک .....  | ۱۲   |
| ۲-۱-۲- سرعت واکنش ها .....   | ۱۲   |
| ۳-۱-۲- روش های اندازه گیری بر پایه تغییر سرعت واکنش های کاتالیز شده در محلول ..... | ۱۳   |
| ۱-۳-۱-۲- بازداری .....   | ۱۳   |
| ۲-۳-۱-۲- فعالسازی .....  | ۱۴   |
| ۴-۱-۲- اندازه گیری بر اساس زمان القائی .....                                       | ۱۵   |
| ۲-۲- انواع سیستم های تجزیه خودکار .....  | ۱۶   |
| ۱-۲-۲- تجزیه کننده های ناپیوسته (مجزا) .....                                       | ۱۶   |
| ۲-۲-۲- تجزیه کننده های رباتیک .....  | ۱۷   |
| ۳-۲-۲- تجزیه کننده های جریان پیوسته .....  | ۱۷   |
| ۳-۲- انواع روش های جریان پیوسته .....  | ۱۷   |
| ۱-۳-۲- روش آنالیز جریان منقطع .....  | ۱۷   |
| ۲-۳-۲- روش آنالیز تزریق در جریان پیوسته .....                                      | ۱۸   |
| ۱-۲-۳-۲- مزایای سیستم های تزریق در جریان غیر منقطع .....                           | ۱۹   |
| ۴-۲- پدیده پاشیدگی در FIA .....  | ۲۰   |
| ۵-۲- سیستم دستگاهی FIA .....   | ۲۱   |
| ۱-۵-۲- سیستم انتقال نمونه و واکنشگر .....  | ۲۱   |
| ۲-۵-۲- مارپیچ واکنش .....  | ۲۲   |
| ۳-۵-۲- سیستم تزریق نمونه .....   | ۲۲   |
| ۴-۵-۲- آشکارسازها .....  | ۲۳   |
| ۶-۲- مقایسه روش FIA با سایر روش های جریان پیوسته .....                             | ۲۳   |
| ۷-۲- روش های بهینه سازی پارامترها .....  | ۲۴   |
| ۱-۷-۲- روش تک عاملی (تک متغیره) .....  | ۲۵   |
| ۲-۷-۲- طراحی آزمایش .....  | ۲۵   |
| ۱-۲-۷-۲- اهداف یک طراحی آزمایش .....   | ۲۷   |



|            |   |
|------------|---|
| ۲۸.....    | ۲-۲-۷-۲- مزایای طراحی آزمایش  |
| ۲۸.....    | ۳-۲-۷-۲- راهنماها در طراحی آزمایش‌ها  |
| ۳۱.....    | ۴-۲-۷-۲- دسته بندی روش‌های طراحی آزمایش   |
| ۳۴.....    | ۵-۲-۷-۲- طرح فاکتوریل   |
| ۳۴.....    | ۶-۲-۷-۲- طرح پلاکت- برمن  |
| ۳۵.....    | ۷-۲-۷-۲- طرح‌های چند سطحی   |
| ۳۶.....    | ۸-۲-۷-۲- طرح باکس- بنکن   |
| ۳۹.....    | <b>فصل سوم</b>  |
| ۱-۳-۱..... | اندازه‌گیری سینتیکی- اسپکتروفتومتری تزریق در جریان پیوسته ال-سیستئین با استفاده از اثر بازداری آن بر واکنش برومات با متاکرزول پرپیل |
| ۴۰.....    | ۲-۳-۲- مواد شیمیایی، محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آنها   |
| ۴۱.....    | ۳-۲-۱- وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده  |
| ۴۲.....    | ۳-۲-۲- سیستم شیمیایی مورد استفاده   |
| ۴۴.....    | ۳-۲-۳- ثبت طیف جذبی   |
| ۴۶.....    | ۳-۲-۴- طیف‌زمانی  |
| ۴۷.....    | ۳-۲-۵- طراحی سیستم FIA  |
| ۴۹.....    | ۳-۳-۲- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سیستم واکنش  |
| ۵۰.....    | ۳-۳-۱- روش کار در بررسی و بهینه‌سازی متغیرها  |
| ۵۱.....    | ۳-۳-۲- بررسی اثر نوع اسید و مقدار بهینه آن  |
| ۵۶.....    | ۳-۳-۳- بررسی اثر غلظت پتاسیم برومات   |
| ۵۸.....    | ۳-۳-۴- بررسی اثر غلظت پتاسیم برمید  |
| ۶۰.....    | ۳-۳-۵- بررسی اثر غلظت متاکرزول پرپیل  |
| ۶۲.....    | ۳-۳-۶- بررسی اثر سرعت جریان حامل  |
| ۶۴.....    | ۳-۳-۷- بررسی اثر سرعت جریان واکنشگرها   |
| ۶۶.....    | ۳-۳-۸- بررسی اثر طول مارپیچ واکنش   |
| ۶۸.....    | ۳-۳-۹- بررسی اثر حجم نمونه تزریقی   |
| ۷۰.....    | ۳-۳-۱۰- نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان  |
| ۴-۳-۱..... | بررسی عوامل تأثیرگذار و بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر اندازه‌گیری ال-سیستئین با استفاده از طراحی آزمایش (DOE)                            |
| ۷۱.....    | ۳-۴-۱- ارزیابی عوامل مؤثر با استفاده از طرح پلاکت- برمن   |
| ۷۲.....    | ۳-۴-۱-۱- تعیین سطح عوامل  |
| ۷۳.....    | ۳-۴-۱-۲- طراحی آزمایش در طرح پلاکت- برمن  |
| ۷۴.....    | ۳-۴-۱-۳- تعیین عوامل مؤثر به وسیله DOE  |
| ۸۰.....    | ۳-۴-۲- بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر اندازه‌گیری ال-سیستئین  |
| ۸۱.....    | ۳-۴-۲-۱- اجرای طرح باکس- بنکن   |
| ۸۷.....    | ۳-۴-۲-۲- ارزیابی مدل  |

|     |   |
|-----|---|
| ۸۷  | ..... تحلیل واریانس ۳-۲-۴-۳   |
| ۸۹  | ..... بررسی باقیمانده‌ها ۵-۲-۴-۳  |
| ۹۳  | ..... منحنی‌های سطح پاسخ ۶-۲-۴-۳  |
| ۹۸  | ..... بررسی اثر دما ۵-۳   |
| ۱۰۰ | ..... بررسی اثر قدرت یونی ۶-۳   |
| ۱۰۴ | ..... شرایط بهینه حاصل ۷-۳  |
| ۱۰۵ | ..... بررسی مزاحمت‌ها ۸-۳   |
| ۱۰۷ | ..... منحنی کالیبراسیون ۹-۳   |
| ۱۱۲ | ..... حد تشخیص ۱۰-۳   |
| ۱۱۲ | ..... دقت و صحت روش ۱۱-۳  |
| ۱۱۳ | ..... کاربرد روش در اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های حقیقی ۱۲-۳                            |
| ۱۱۷ | ..... <b>فصل چهارم</b>  |
| ۱۱۸ | ..... اثر بازداری ال-سیستئین بر اکسیداسیون متاکرزول پرپل توسط برومات در حضور پتاسیم برمید ۱-۴ |
| ۱۱۸ | ..... ارقام شایستگی روش ۱-۱-۴   |
| ۱۱۹ | ..... مقایسه روش با سایر روش‌های موجود در اندازه‌گیری غلظت ال-سیستئین ۲-۱-۴                   |
| ۱۲۰ | ..... نتیجه‌گیری ۳-۱-۴  |
| ۱۲۰ | ..... آینده‌نگری ۴-۱-۴  |

## فهرست شکل ها

| عنوان  | صفحه |
|--|------|
| شکل (۱-۱): ساختار ال-سیستئین   | ۲    |
| شکل (۲-۱): ساختار ال-سیستین  | ۳    |
| شکل (۱-۲): مراحل آنالیز تزریق در جریان   | ۱۹   |
| شکل ۲-۲: آثار همرفت و نفوذ بر نیمرخ غلظت آنالیتها در آشکارساز                                  | ۲۰   |
| شکل ۳-۲: شمای یک کانال از پمپ با حرکت دودی   | ۲۱   |
| شکل ۴-۲: تزریق نمونه به لوپ و ورود نمونه به سیستم  | ۲۳   |
| شکل (۵-۲): مدل عمومی یک فرایند   | ۲۸   |
| شکل (۶-۲): نمودار انتخاب طرح   | ۳۳   |
| شکل (۷-۲): طراحی آزمایش در روش باکس-بنکن   | ۳۷   |
| شکل (۱-۳): ساختار متاکرزول پرپیل   | ۴۲   |
| شکل (۲-۳): طیف جذبی سیستم واکنش  | ۴۵   |
| شکل (۳-۳): بررسی اثر غلظت ال-سیستئین بر زمان بازداری   | ۴۷   |
| شکل (۴-۳): طرح سیستم FIA برای اندازه گیری ال-سیستئین   | ۴۸   |
| شکل (۵-۳): بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید بر روی اختلاف جذب                                      | ۵۲   |
| شکل (۶-۳): بررسی اثر غلظت نیتریک اسید بر روی اختلاف جذب  | ۵۳   |
| شکل (۷-۳): بررسی اثر غلظت هیدروکلریک اسید بر روی اختلاف جذب                                    | ۵۴   |
| شکل (۸-۳): بررسی اثر غلظت پتاسیم برومات بر روی اختلاف جذب                                      | ۵۷   |
| شکل (۹-۳): بررسی اثر غلظت پتاسیم برمید بر روی اختلاف جذب                                       | ۵۹   |
| شکل (۱۰-۳): بررسی اثر غلظت متاکرزول پرپیل بر روی اختلاف جذب                                    | ۶۱   |
| شکل (۱۱-۳): بررسی اثر سرعت جریان حامل بر روی اختلاف جذب  | ۶۳   |
| شکل (۱۲-۳): بررسی اثر سرعت واکنشگرها بر روی اختلاف جذب   | ۶۵   |
| شکل (۱۳-۳): بررسی اثر طول مارپیچ واکنش بر روی اختلاف جذب                                       | ۶۷   |
| شکل (۱۴-۳): بررسی اثر حجم نمونه تزریقی بر روی اختلاف جذب                                       | ۶۹   |
| شکل (۱۵-۳): نمودار پارتو اثر عامل ها بر اندازه گیری ال-سیستئین                                 | ۷۸   |
| شکل (۱۶-۳): نمودار احتمال نرمال اثر عامل ها بر اندازه گیری ال-سیستئین                          | ۷۹   |
| شکل (۱۷-۳): نمودار نیمه نرمال اثر عامل ها بر اندازه گیری ال-سیستئین                            | ۸۰   |
| شکل (۱۸-۳): نمودار باقیمانده ها برای پاسخ اندازه گیری ال-سیستئین                               | ۹۰   |
| شکل (۱۹-۳): نمودار باقیمانده ها به ترتیب زمان جمع آوری برای پاسخ اندازه گیری ال-سیستئین        | ۹۲   |
| شکل (۲۰-۳): پاسخ پیش بینی شده برای اندازه گیری ال-سیستئین در برابر باقیمانده ها                | ۹۳   |
| شکل (۲۱-۳): منحنی سطح پاسخ اندازه گیری ال-سیستئین در مقابل حجم نمونه تزریقی و غلظت نیتریک اسید | ۹۴   |
| شکل (۲۲-۳): منحنی سطح پاسخ اندازه گیری ال-سیستئین در مقابل غلظت برمید و غلظت نیتریک اسید       | ۹۴   |
| شکل (۲۳-۳): منحنی سطح پاسخ اندازه گیری ال-سیستئین در مقابل حجم تزریقی نمونه و غلظت برمید       | ۹۵   |

- شکل (۳-۲۴): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل حجم نمونه تزریقی و غلظت متاکرزول پرپل ۹۵.
- شکل (۳-۲۵): منحنی پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل غلظت متاکرزول پرپل و غلظت برومید ..... ۹۶
- شکل (۳-۲۶): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل غلظت متاکرزول پرپل و غلظت نیتریک‌اسید ۹۶.
- شکل (۳-۲۷): بررسی اثر دما بر روی اختلاف جذب ..... ۹۹
- شکل (۳-۲۸): بررسی اثر پتاسیم نترات تزریقی بر روی اختلاف جذب ..... ۱۰۱
- شکل (۳-۲۹): بررسی اثر قدرت یونی بر روی اختلاف جذب ..... ۱۰۳
- شکل (۳-۳۰): منحنی FIA مربوط به ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین ..... ۱۰۹
- شکل (۳-۳۱): منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین ..... ۱۰۹
- شکل (۳-۳۲): منحنی FIA مربوط به ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین ..... ۱۱۱
- شکل (۳-۳۳): منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین ..... ۱۱۱

## فهرست جدول ها

| عنوان   | صفحه |
|---|------|
| جدول (۳-۱): مواد شیمیایی مورد استفاده   | ۴۰   |
| جدول (۳-۲): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید بر روی اختلاف جذب                                      | ۵۲   |
| جدول (۳-۳): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت نیتریک اسید بر روی اختلاف جذب  | ۵۳   |
| جدول (۳-۴): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت هیدروکلریک اسید بر روی اختلاف جذب                                    | ۵۴   |
| جدول (۳-۵): نتایج حاصل از بررسی غلظت پتاسیم برومات بر روی اختلاف جذب  | ۵۷   |
| جدول (۳-۶): نتایج حاصل از بررسی غلظت پتاسیم برمید بر روی اختلاف جذب   | ۵۹   |
| جدول (۳-۷): نتایج حاصل از بررسی غلظت متاکرزول پرپل بر روی اختلاف جذب  | ۶۱   |
| جدول (۳-۸): نتایج حاصل از بررسی سرعت جریان حامل بر روی اختلاف جذب   | ۶۳   |
| جدول (۳-۹): نتایج حاصل از بررسی سرعت واکنشگرها بر روی اختلاف جذب  | ۶۵   |
| جدول (۳-۱۰): نتایج حاصل از بررسی اندازه ماریپیچ واکنش بر روی اختلاف جذب                                       | ۶۷   |
| جدول (۳-۱۱): نتایج حاصل از بررسی حجم لوپ تزریق بر روی اختلاف جذب  | ۶۹   |
| جدول (۳-۱۲): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان برای اندازه‌گیری ال - سیستئین                       | ۷۰   |
| جدول (۳-۱۳): تعیین سطح عوامل موثر بر اندازه‌گیری ال - سیستئین   | ۷۲   |
| جدول (۳-۱۴): طرح پلاکت - برمن با ۸ عامل و ۲ تکرار برای پاسخ اندازه‌گیری ال - سیستئین                          | ۷۴   |
| جدول (۳-۱۵): جدول ضرایب حاصل از طرح پلاکت - برمن  | ۷۵   |
| جدول (۳-۱۶): میزان اهمیت عوامل موثر در اندازه‌گیری ال - سیستئین   | ۷۷   |
| جدول (۳-۱۷): سطح عامل‌های موثر در طرح عاملی باکس - بنکن   | ۸۱   |
| جدول (۳-۱۸): مقادیر بهینه پارامترهای غیر موثر در اندازه‌گیری ال - سیستئین                                     | ۸۱   |
| جدول (۳-۱۹): طرح عاملی باکس - بنکن با ۴ عامل، ۲ تکرار و سه نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری ال - سیستئین           | ۸۲   |
| جدول (۳-۲۰): پارامترهای آماری برای طرح عاملی انجام شده برای پاسخ اندازه‌گیری ال - سیستئین                     | ۸۴   |
| جدول (۳-۲۱): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به اندازه‌گیری ال - سیستئین                                | ۸۸   |
| جدول (۳-۲۲): مقایسه شرایط بهینه‌سازی یک متغیر در زمان و طرح فاکتوریل  | ۹۷   |
| جدول (۳-۲۳): نتایج حاصل از بررسی اثر دما بر روی اختلاف جذب  | ۹۹   |
| جدول (۳-۲۴): نتایج حاصل از بررسی قدرت یونی بر روی اختلاف جذب  | ۱۰۱  |
| جدول (۳-۲۵): نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی بر روی اختلاف جذب  | ۱۰۳  |
| جدول (۳-۲۶): شرایط بهینه سیستم برای اندازه‌گیری ال - سیستئین  | ۱۰۴  |
| جدول (۳-۲۷): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری ال - سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر     | ۱۰۶  |
| جدول (۳-۲۸): اطلاعات مربوط به منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال - سیستئین | ۱۰۸  |
| جدول (۳-۲۹): اطلاعات مربوط به منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال - سیستئین | ۱۱۰  |

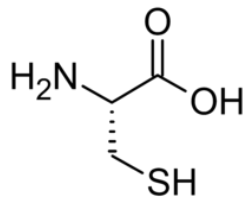
- جدول (۳-۳۰): بررسی دقت و صحت روش در شرایط منحنی کالیبراسون اول و منحنی کالیبراسیون دوم..... ۱۱۳
- جدول (۳-۳۱): نتایج حاصل از اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های حقیقی..... ۱۱۵
- جدول (۴-۱): مقایسه روش تزریق در جریان پیوسته برای اندازه‌گیری ال-سیستئین با روش‌های دیگر..... ۱۱۹

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱- ال - سیستئین<sup>۱</sup>

ال - سیستئین ماده‌ای جامد، بی رنگ، متبلور و به صورت کریستال‌های سفید یا پودری است که نقطه ذوب آن ۲۴۰ درجه سلسیوس بوده و دارای فرمول بسته  $C_3H_7NO_2S$  و فرمول گسترده زیر است:



شکل (۱-۱): ساختار ال - سیستئین

ال - سیستئین ماده‌ای محلول در آب و اندکی محلول در اتانول می‌باشد. نام دیگر این ترکیب ۲-آمینو-۳-مرکاپتوپروپانوئیک اسید می‌باشد [۱].

ال - سیستئین یک آلفا آمینواسید حاوی گروه غیرقطبی تیول است که مشارکت آن را در انواعی از واکنش‌های بیوشیمیایی فراهم می‌کند [۲]. همچنین گروه تیول در ال - سیستئین یک نقش کلیدی در فعالیت‌های بیولوژیکی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها بازی می‌کند [۱]. گروه تیول در این ترکیب، حساس به اکسیداسیون می‌باشد. زمانی که ال - سیستئین در معرض هوا قرار می‌گیرد تیول اکسید می‌شود که در اثر آن، ال - سیستئین به مشتق دی‌سولفیدش (شکل ۱-۲) بنام ال - سیستین<sup>۲</sup> تبدیل می‌شود که به خاطر تشکیل پیوند دی‌سولفید بین و درون مولکول‌های پروتئین [۳]، باعث استحکام اتصال بین اجزاء مختلف در یک مولکول پروتئین می‌شود، این عمل ساختمان مولکول پروتئین را در برابر تخریب

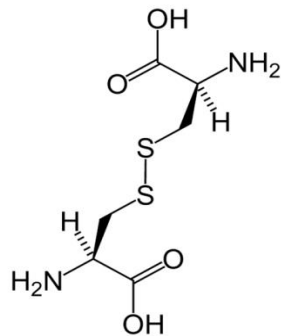
---

1- L-Cysteine

2- L-Cystine



توسط نیروی مکانیکی، حرارتی یا سایر نیروها مقاوم می‌سازد [۴]. ال-سیستئین و ال-سیستین ترکیبات مهمی در طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها مانند بافت بیولوژیکی، مایعات بدن، مواد غذایی و دارویی هستند [۳].



شکل (۱-۲): ساختار ال-سیستین

در دسته‌بندی آمینواسیدها، ال-سیستئین به عنوان یک آمینواسید غیرضروری طبقه‌بندی می‌شود که این به این معناست که تحت شرایط فیزیولوژیک طبیعی، مقدار کافی از این آمینواسید، از آمینواسید ضروری ال-متیونین و آمینواسید غیرضروری ال-سیرین از طریق واکنش سولفیداسیون ترانس تشکیل می‌گردد [۱]. با این حال علی‌رغم این که ال-سیستئین به عنوان یک اسیدآمینو غیرضروری طبقه‌بندی می‌شود در موارد نادر ممکن است برای نوزادان نارس، سالمندان و افراد مبتلا به بیماری‌های متابولیک خاص و یا افرادی که از بیماری سندرم سوءجذب رنج می‌برند ضروری باشد [۱]. همچنین این ترکیب به خاطر وجود تیول در ساختارش، در انواع کارکردهای مهم سلولی مثل پروتئین‌سازی، سم‌زدایی و سوخت‌وساز بدن دخیل است و همچنین به عنوان عامل محافظ رادیویی و نشانگر سرطان استفاده می‌شود [۵]. این آمینواسید به عنوان یک سایت فعال در توابع کاتالیزوری آنزیم خاص به نام سیستئین‌پروتئاز و در بسیاری از پپتیدها و پروتئین‌های دیگر شناخته شده است [۶].

ال- سیستمین برای سوخت و ساز مناسب تعدادی از مواد بیوشیمیایی ضروری مثل هپارین، بیوتین، اسیدلیپوئید، کوآنزیم A و گلوکاتیون حیاتی است [۷]. علاوه بر این نقش مهمی در ارتباط بین سلول‌های سیستم ایمنی بدن بازی می‌کند. همچنین به عنوان یک مدل برای نقش پیوند دی‌سولفید و گروه تیول پروتئین در انواع رسانه‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود [۶].

ال- سیستمین در اکثر غذاها با پروتئین بالا یافت می‌شود، از جمله:

ریکوتا، پنیر، ماست، گوشت خوک، سوسیس، اردک، سبوس گندم، شیرینی گرانولا، دانه‌های جو دو سر و همچنین سیر، پیاز، کلم بروکلی و فلفل قرمز یافت می‌شود [۱].

## ۱-۲- کاربردهای ال- سیستمین

ال- سیستمین کاربردهای زیادی دارد از جمله:

استفاده دارویی در برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و درمان جراحات‌های پوستی

در صنایع غذایی به عنوان آنتی‌اکسیدانت

در صنایع داروسازی در فرمولاسیون مواد مخدر [۵].

در آماده‌سازی‌های مختلف لوازم آرایشی و بهداشتی [۸].

به طور گسترده به عنوان مکمل در مواد غذایی و محصولات کشاورزی [۲].

### ۱-۳- اهمیت اندازه‌گیری ال - سیستئین

اختلالات متابولیسم ال - سیستئین شامل سیستینوز<sup>۱</sup> یک بیماری مغلوب تولید شده توسط نقص در حمل و نقل لیزوزوم و سیستینوریا<sup>۲</sup>، یک اختلال شایع ارثی حمل اسیدآمین است [۱۰]. سیستینوریا و بعضی بیماری‌های دیگر با غلظت بالایی از ال - سیستئین و ال - سیستین در ادرار (معمولا بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم برلیتر) مشخص می‌شود [۳]. افزایش سطح ال - سیستئین همچنین باعث اختلال در عملکرد طبیعی مغز می‌شود [۲].

از سوی دیگر کمبود ال - سیستئین باعث بسیاری از بیماری‌ها مانند: تصلب شرایین زودرس، سرطان خون، سرطان گردنه رحم، دیابت، عفونت، آب مروارید، بیماری‌های کبدی، ضایعات پوستی، رشد آهسته در کودکان، آلزایمر، پارکینسون، عواقب فوری بعد از سکته مغزی، ایدز، نواحی فاقد رنگدانه مو، بی حالی، ضعف و از دست دادن عضله و چربی است [۶، ۹، ۱۰].

بنابراین اندازه‌گیری ال - سیستئین در مطالعات دارویی، پزشکی و بیولوژیکی حایز اهمیت است که باعث تلاش برای ارائه روش‌های حساس برای تعیین ال - سیستئین شده است.

### ۱-۴- مروری بر کارهای انجام شده برای اندازه‌گیری ال - سیستئین

در زمینه اندازه‌گیری ال - سیستئین گزارش‌های زیادی وجود دارد که در اینجا به برخی از مهمترین آنها اشاره می‌شود:

---

1- Cystinosis

2- Cystinuria

در سال ۱۹۷۷ بوکپیت<sup>۱</sup> و همکارانش یک روش کمی برای اندازه‌گیری گلوکاتایون، ال-سیستئین و N-استیل سیستئین ترکیبات استامینوفن بدست آمده با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) گزارش دادند. در این روش کمترین مقداری ترکیبات تیول از استامینوفن که با دقت خوب از میکروزومال اندازه‌گیری شد، ۵ نانوگرم بوده است [۱۱].

در سال ۱۹۸۲ سانائ<sup>۲</sup> و همکارانش یک روش برای اندازه‌گیری پی‌درپی در مخلوط ال-سیستئین و ال-سیستین توسط تیتراسیون آمپرومتری با محلول استاندارد یدید پتاسیم توسط الکتروود سیمی پلاتین چرخشی در پتانسیل +۰/۶ ولت در مقابل SHE گزارش کردند. ال-سیستئین در محیط اسیدی حاوی برومید تیتر شد. سپس سدیم کلرید به محلول اضافه شد و تیتراسیون برای اندازه‌گیری ال-سیستئین ادامه پیدا کرد [۱۲].

در سال ۱۹۸۹ آنتونیا کاردوسو<sup>۳</sup> و همکارانش یک روش اتوماتیک جریان منقطع برای اندازه‌گیری روتین مقادیر میکروگرمی ال-سیستئین بر اساس اکسیداسیون آن با ۶,۲-دی‌کلروفنول ایندوفنول در یک محیط پایه‌ای ضعیف گزارش دادند. واکنش اکسیداسیون با اندازه‌گیری کاهش میزان جذب در طول موج ۵۱۶ نانومتر دنبال شده است. محدوده خطی روش در شرایط بهینه ۲ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد تشخیص روش ۳۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۳].

در سال ۱۹۹۹ یولاندا داکروز<sup>۴</sup> و همکارانش یک روش براساس استفاده از عصاره ریشه سیب‌زمینی شیرین به عنوان یک منبع پلی‌فنل اکسیداز برای تعیین ال-سیستئین در محصولات دارویی گزارش دادند. محدوده خطی روش  $۶/۰ \times ۱۰^{-۵}$  تا  $۰/۸ \times ۱۰^{-۴}$  مولار و حد تشخیص آن  $۴/۴ \times ۱۰^{-۶}$  مولار گزارش شده است [۱۴].

---

1- Buckpitt

2- Sanae Ikeda

3- Antonia Cardoso

4- Iolanda da Cruz Vieira

در سال ۲۰۰۱ نوریو تیشیما<sup>۱</sup> و همکارانش یک روش اسپکتروفتومتری برای تعیین همزمان آسکوربیک اسید و ال-سیستئین توسط سیستم تزریق در جریان مجهز به یک سلول جریان دو تایی در یک اسپکتروفتومتر دو پرتوی گزارش دادند، که در آن آهن (III) توسط آسکوربیک اسید یا ال-سیستئین در حضور ۱۰<sup>-۱</sup> فنانترویلین به آهن (II) کاهش می‌یافت و کمپلکس آهن (II) و فنانترویلین را ایجاد می‌کرد. در حضور مس (II) سرعت واکنش آهن (III) با ال-سیستئین به شدت افزایش می‌یافت در حالی که آسکوربیک اسید به مقدار کمی تحت تاثیر مس (II) قرار می‌گرفت. براساس تفاوت در سرعت بین دو واکنش، آسکوربیک اسید و ال-سیستئین به ترتیب در محدوده ۲×۱۰<sup>-۷</sup> تا ۴×۱۰<sup>-۵</sup> مولار و ۱×۱۰<sup>-۶</sup> تا ۹×۱۰<sup>-۵</sup> اندازه‌گیری شدند [۱۵].

در سال ۲۰۰۱ چوان زو<sup>۲</sup> و همکارانش یک روش تزریق در جریان با آشکارساز بی‌آپرومتری برای تعیین ال-سیستئین در مخلوط آمینواسیدها و ادرار انسان براساس اکسیداسیون الکتروسینتیکی ال-سیستئین بر روی الکتروود پلاتین گزارش دادند. دامنه خطی روش ۴/۰×۱۰<sup>-۷</sup> تا ۴/۰×۱۰<sup>-۵</sup> مولار و حد تشخیص آن ۱/۰×۱۰<sup>-۷</sup> مولار گزارش شده است [۱۶].

در سال ۲۰۰۲ توماس پرز رویز<sup>۳</sup> و همکارانش یک روش تزریق در جریان برای اندازه‌گیری انفرادی ال-سیستئین و ال-سیستین و مخلوطی از هر دو آنالیت توسعه دادند. این روش براساس واکنش ال-سیستئین با تریس(۲-بی‌پیریدیل) روتنیم<sup>۴</sup> (II) و پروکسی دی‌سولفات تحت تابش UV برای تولید نورتابی شیمیایی می‌باشد. ال-سیستین بعد از کاهش به ال-سیستین، در یک مینی‌ستون کاهنده مس پوشیده شده با کادمیوم در یک سیستم FIA اندازه‌گیری شد. گنجاندن یک شیر تزریق در سیستم اجازه می‌دهد دو آنالیت به صورت پی‌درپی اندازه‌گیری شود. نمودار کالیبراسیون بین

---

1- Norio Teshima

2- Chuan Zhao

3- Tomá's Pe' rez-Ruiz

4- tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)

$2 \times 10^{-6}$  تا  $5 \times 10^{-4}$  مولار برای ال-سیستئین و  $1 \times 10^{-6}$  تا  $2 \times 10^{-4}$  مولار برای ال-سیستین خطی گزارش شده است [۱۷].

در سال ۲۰۰۴ چوی وان لو<sup>۱</sup> و همکارانش یک روش ساده و راحت تزریق در جریان کوپل شده با نورتابی شیمیایی برای تعیین ال-سیستئین گزارش کردند که به میزان صد برابر حساس تر از روش‌های نورتابی شیمیایی که قبلا استفاده شده بود می‌باشد. محدوده خطی روش  $1/0 \times 10^{-6}$  تا  $1/0 \times 10^{-8}$  مولار و حد تشخیص آن  $5 \times 10^{-9}$  مولار گزارش شده است [۱۸].

در سال ۲۰۰۶ رودریگو پوساری<sup>۲</sup> و همکارانش یک استراتژی ساده برای اندازه‌گیری ال-سیستئین با استفاده از آنالیز تزریق در جریان با آشکارساز الکتروشیمیایی گزارش کردند. محدوده پاسخ خطی بین  $1/0 \times 10^{-6}$  تا  $6/0 \times 10^{-6}$  مولار با یک تکرارپذیری خوب (انحراف استاندارد نسبی ۳/۲٪) و حساسیت ( $1/1 \mu A/\mu M$ ) مشاهده شد. روش توسعه یافته با موفقیت برای تعیین ال-سیستئین در یک نمونه غذایی مکمل تجاری مورد استفاده قرار گرفت [۱].

در سال ۲۰۰۶ جان‌رویز دیاز<sup>۳</sup> یک بیوسنسور آنزیمی چرخشی برای اندازه‌گیری گلوکاتیون و ال-سیستئین در سیستم تزریق در جریان ساختند که بهترین پاسخ برای ال-سیستئین در حدود  $pH=7$  به دست آمد. این روش می‌تواند در محدوده غلظتی ۰/۵ تا ۹۰ میکرو مولار برای اندازه‌گیری ال-سیستئین و محدوده غلظتی ۰/۴ تا ۹۰ میکرو مولار برای اندازه‌گیری گلوکاتیون مورد استفاده قرار گیرد. حد تشخیص روش برای ال-سیستئین و گلوکاتیون به ترتیب ۰/۷ و ۰/۳ نانو مولار می‌باشد [۹].

---

1- Choiwan Lau

2- Rodrigo Possari

3- Juan J.J. Ruiz-D'iaz

در سال ۲۰۰۶ جیان هوآ لیو<sup>۱</sup> و همکارش یک روش سینتیکی برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در یک سیستم تزریق در جریان با استفاده از واکنش کاتالیزوری مس (II) با ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰-تتراکیس(۴-ان-تری آمینو-فنیل) پورفیرین<sup>۲</sup> گزارش دادند. حد تشخیص این روش ۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده خطی آن ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر تا ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۹].

در سال ۲۰۰۷ رضایی و همکارش یک سیستم نورتابی شیمیایی جدید برای اندازه‌گیری ال-سیستئین توسط سیستم تزریق در جریان ابداع کردند. این روش براساس واکنش ال-سیستئین با  $Ru(phen)_3^{2+}$  و  $Ce(IV)$  برای ایجاد نورتابی شیمیایی می‌باشد. حدتشخیص روش ( $S/N=3$ )  $0.7 \times 10^{-7}$  مولار و انحراف استاندارد نسبی برای  $4.0 \times 10^{-6}$  مولار ال-سیستئین ( $n=10$ )  $3.5\%$  گزارش شده است [۲۰].

در سال ۲۰۰۸ کارگشا و همکارانش یک روش جدید و انتخاب‌پذیر برای اندازه‌گیری ال-سیستئین و ال-سیستین بر اساس اسپکترومتری مادون قرمز تبدیل فوریه گزارش کردند. منحنی کالیبراسیون این روش از ۶ تا ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر خطی می‌باشد [۳].

در سال ۲۰۱۲ علیرضا نمازاده اژیبه و همکارش یک الکتروود اصلاح شده زنولیتی جدید برای تعیین ولتامتری ال-سیستئین ساختند که این الکتروود شامل کبالت (II) و مبادله‌گر زنولیت Y به عنوان اصلاح‌کننده بافت خمیر کربن بوده است. محدوده خطی روش از  $1 \times 10^{-9}$  تا  $1 \times 10^{-3}$  مولار و حدتشخیص آن  $2/37 \times 10^{-10}$  مولار گزارش شده است. این روش برای نمونه‌های حقیقی از جمله سرم، خون، ادرار، قرص N-استیل سیستئین<sup>۳</sup> و خوراک پودر طیور مورد استفاده قرار گرفت [۲۱].

---

1- Jianhua Liu

2- 5,10,15,20-tetrakis (4-N-trimethylammino-phenyl) porphyrin

3- N-acetylcysteine

در سال ۲۰۱۲ شیائو لیو<sup>۱</sup> و همکارانش یک الکتروود شیشه کربن (GCE) اصلاح شده با پلی‌اریوکریم‌بلک T<sup>۲</sup> (PEBT) و نانوذرات طلا برای اندازه‌گیری همزمان ال-سیستئین و ال-تیورسین<sup>۳</sup> با استفاده از ولتامتری پالس دیفرانسیلی ساختند. طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی نشان می‌دهد که فیلم پلیمری PEBT با موفقیت در سطح GCE تشکیل شد. حد تشخیص روش برای ال-سیستئین ۸ نانومولار و برای ال-تیورسین ۱۰ نانومولار گزارش شده است [۲۲].

در سال ۲۰۱۳ اندری وی بولاتو<sup>۴</sup> و همکارانش یک سیستم تجزیه و تحلیل برای تعیین غلظت ال-سیستئین در مکمل‌های بیولوژیکی فعال و علوفه توسعه داد. این روش براساس یک واکنش ردوکس سریع بین ال-سیستئین و ۱۸-مولیبدو-۲-فسفات هتروپلی‌آنیون<sup>۵</sup> و تشخیص تشکیل هتروپلی‌آبی<sup>۶</sup> با اسپکتروفتومتر است. حد تشخیص روش برای ال-سیستئین ۰/۰۰۳ میلی‌مولار گزارش شده است [۲].

در این کار تحقیقاتی ال-سیستئین با استفاده از تکنیک تزریق در جریان پیوسته اندازه‌گیری شده است. تاکنون اندازه‌گیری ال-سیستئین توسط روش تزریق در جریان با استفاده از اثر بازداری آن بر واکنش متاکرزول‌پرپیل<sup>۷</sup> با برومات گزارش نشده است.

---

1- Xiao Liu

2- Eriochrome black T

3- L-tyrosine

4- Andrey V. Bulatov

5- 18-Molybdo-2-phosphaite heteropoly anion

6- Heteropoly blue

4- Meta Cresol Purple



فصل دوم

تئوری

## ۲-۱- روش‌های سینتیکی و کاربرد آن‌ها در شیمی تجزیه

### ۲-۱-۱- تعریف سینتیک

سینتیک شیمیایی علم مطالعه سرعت واکنش‌ها و بررسی تاثیر شرایط روی این سرعت‌ها می‌باشد. علم سینتیک علاوه بر تعیین سرعت واکنش‌ها، به مکانیسم آن‌ها نیز می‌پردازد. واضح است که چنین علم فراگیری، ارتباط‌های قوی و مستحکمی با سایر شاخه‌های علوم مانند دینامیک، مکانیک آماری و اسپکتروسکوپی دارد [۲۳].

### ۲-۱-۲- سرعت واکنش‌ها

هر واکنش شیمیایی با سرعت خاصی انجام می‌شود که این سرعت تابعی از شرایط انجام واکنش مانند دما، فشار، غلظت گونه‌های درگیر در واکنش، قدرت یونی و حضور یا عدم حضور کاتالیزور می‌باشد. بعضی واکنش‌ها با سرعت بسیار زیاد انجام می‌شوند در حالی که بعضی دیگر گرچه ممکن است از نظر ترمودینامیکی انجام‌پذیر باشند ولی می‌توان واکنشگرها را سال‌های طولانی در کنار یکدیگر قرار داد بدون این که واکنشی انجام شود، که این نشان از سینتیک بسیار کند واکنش دارد.

تعیین مقدار یک گونه معین به روش سینتیکی براساس اندازه‌گیری مستقیم یا غیرمستقیم سرعت واکنش آن گونه می‌باشد، که شامل اندازه‌گیری تغییر غلظت محلول یا واکنشگر به صورت تابعی از زمان می‌باشد. در طی انجام فرایند غلظت واکنش‌دهنده‌ها و محصولات و سرعت تغییر این غلظت‌ها نیز تغییر می‌کند و هنگامی که واکنش کامل می‌شود این سرعت به صفر می‌رسد [۲۴].

## ۲-۱-۳- روش‌های اندازه‌گیری بر پایه تغییر سرعت واکنش‌های کاتالیز شده در محلول

کاربرد مهم گسترش روش‌های تجزیه‌ای بر پایه تغییر سرعت واکنش‌های کاتالیز شده در اندازه‌گیری گونه‌های آلی است. تغییر سرعت واکنش‌های کاتالیز شده با این گونه‌ها امکان دستیابی به حد تشخیص‌های پایین و حساسیت‌های بالا را در روش‌های کاتالیزوری برای گونه‌هایی که معمولاً از نظر شیمیایی غیر کاتالیزوری‌اند فراهم می‌سازد.

تاثیر گونه‌های مختلف در تغییر اثرات کاتالیزوری و استفاده تجزیه‌ای آن‌ها به ویژه در مورد سیستم‌های کاتالیز شده با یون‌های فلزی مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های تجزیه‌ای مبتنی بر تغییر سرعت واکنش‌ها بر اساس دو پدیده متضاد هم هستند:

الف: بازداری<sup>۱</sup>

ب: فعال‌سازی<sup>۲</sup>

هر کدام از این پدیده‌ها می‌توانند برای اندازه‌گیری گونه تغییردهنده سرعت یا در بعضی موارد برای افزایش حساسیت بر اندازه‌گیری خود کاتالیزور فلزی به کار روند.

## ۲-۱-۳-۱- بازداری

بازدارنده‌ها گونه‌های شیمیایی هستند که با کاتالیزور ترکیب می‌شوند تا برخی از انواع کمپلکس‌ها را تشکیل دهند. این کمپلکس‌ها می‌توانند اثر کاتالیزوری کمتری نسبت به یون فلزی آزاد اعمال نمایند (بازداری جزئی) یا تشکیل کمپلکس کاتالیزور را کاملاً غیرفعال سازد (بازداری کامل). در هر دو

---

1- Inhibition

2- Activation

حالت تاثیر بر روی سرعت واکنش متناسب با غلظت بازدارنده است و می‌تواند برای اندازه‌گیری آن به کار رود.

روشی که معمولاً برای نشان‌دادن کاهش سرعت واکنش در سیستم‌هایی که حاوی مقادیر ثابتی از کاتالیزور هستند به کار می‌رود شامل اضافه‌کردن مقادیری از بازدارنده‌ها برای به دست آوردن منحنی‌های کالیبراسیون از طریق روش سرعت اولیه یا روش تانژانت می‌باشد. این روش حد تشخیص نسبتاً خوبی دارد اما دامنه خطی غلظت‌های قابل اندازه‌گیری محدود است [۲۵].

## ۲-۱-۳-۲- فعال‌سازی

فعال‌سازی، یک اصلاح اثر کاتالیزوری است که از دیدگاه تجزیه‌ای باعث حساسیت بهتر و حدتشخیص پایین‌تر در یک اندازه‌گیری کاتالیزوری می‌شود. در کاتالیز هموزن یک فعال‌کننده به صورت یک گونه‌شیمیایی تعریف می‌شود که واکنش‌شیمیایی را کاتالیز نمی‌کند ولی حضورش باعث افزایش قابل توجهی در سرعت واکنش می‌شود. فعال‌کننده‌ها بسته به نقش کاتالیزور، برهمکنش فعال‌کننده با کاتالیزور و مرحله‌ای از واکنش که به واسطه حضور فعال‌کننده متاثر می‌شود به سه گروه طبقه‌بندی می‌شود:

الف: فعال‌کننده‌هایی که بر روی برهمکنش کاتالیزور و یا کاتالیزور-واکنشگر موثرند.

ب: فعال‌کننده‌هایی که در تولید دوباره کاتالیزور شرکت می‌کنند.

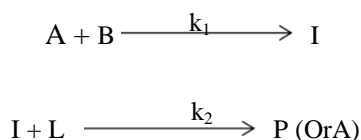
ج: فعال‌کننده‌هایی که به طور غیر مستقیم در فرآیندهای کاتالیزوری اثر می‌گذارند.

## ۲-۱-۴- اندازه‌گیری براساس زمان القائی

اندازه‌گیری براساس مدت زمان القائی می‌تواند برای برخی از واکنش‌های کاتالیزوری که در آنها فاصله زمانی بین مخلوط کردن واکنشگرها و ظاهرشدن تغییر در ترکیب شیمیایی سیستم کند است، به کار گرفته شود.

لندولت<sup>۱</sup> نخستین کسی بود که این رفتار را مشاهده کرد و این روش اندازه‌گیری اثر لندولت نامیده شد.

یک طرح ساده و عمومی برای واکنش‌های لندولت می‌تواند به صورت زیر نوشته شود:



که در آن  $k_1 < k_2$  است. به دلیل تفاوت سرعت دو واکنش، محصول I تنها وقتی می‌تواند تشخیص داده شود که واکنشگر L (واکنشگر لندولت) مصرف شده باشد. اگر یک کاتالیزور بتواند انرژی فعال‌سازی واکنش بین گونه‌های I و L را کاهش دهد، مدت زمان القائی می‌تواند برای تخمین غلظت کاتالیزور به کار رود. در بیشتر موارد رابطه زیر اساس اندازه‌گیری کاتالیزور را تشکیل می‌دهد:

$$[C] = \frac{\beta}{t_{ip}} \quad (1-2)$$

که در این رابطه [C] غلظت کاتالیزور بر حسب مول بر لیتر،  $t_{ip}$  مدت زمان القائی بر حسب ثانیه و  $\beta$  یک مقدار ثابت است [۲۶].

---

1- Landolt

اندازه‌گیری فنیل هیدرازین<sup>۱</sup> [۲۷]، تیوسیانات<sup>۲</sup> [۲۸] و همچنین اندازه‌گیری ال-سیستین در این پروژه از جمله روش‌هایی هستند که براساس افزایش مدت زمان القائی به کار گرفته شده‌اند.

## ۲-۲- انواع سیستم‌های تجزیه خودکار

سیستم‌های آنالیز خودکار را می‌توان به صورت زیر دسته‌بندی کرد.

۱- تجزیه‌کننده‌های ناپیوسته جریان<sup>۳</sup>

۲- تجزیه‌کننده‌های رباتیک جریان<sup>۴</sup>

۳- تجزیه‌کننده‌های جریانی پیوسته<sup>۵</sup> [۲۹]

### ۲-۲-۱- تجزیه‌کننده‌های ناپیوسته (مجزا)

در این تجزیه‌گرها هر نمونه درون یک ظرف ریخته می‌شود. سپس نمونه به صورت مکانیکی به نقاط مختلف تجزیه‌کننده منتقل می‌شود که در آنجا مراحل مختلف تجزیه مثل پذیرش نمونه، رقیق کردن، افزودن واکنشگرها، مخلوط کردن، گرم کردن و غیره انجام می‌شود. سرانجام نمونه‌ها به آشکارساز می‌رسند و علایم تجزیه‌ای ثبت می‌گردند [۳۰].

- 
- 2- Phenylhydrazine
  - 3- Thiocyanate
  - 3- Discrete Analyzer
  - 4- Robotic Analyzer
  - 5- Continous Flow Analyser

## ۲-۲-۲- تجزیه‌کننده‌های رباتیک

این تجزیه‌کننده‌ها با استفاده از یک ربات کوچک و بسیار دقیق که حرکاتش مانند یک انسان است عمل می‌کند معمولاً ربات توسط یک ریزپردازنده، برنامه‌ریزی می‌شود و نمونه و محصولات بدست آمده از مراحل مختلف را در بین مجموعه‌ای از ابزارها (رقیق‌کننده، استخراج‌کننده، سانتریفیوژ، گرمکنها) و دستگاه‌ها (ترازو، فتومتر و ...) جابجا می‌کند [۳۱].

## ۲-۲-۳- تجزیه‌کننده‌های جریان پیوسته

در تجزیه‌کننده جریان پیوسته، نمونه‌ها به طور متوالی از محفظه‌ای که درون آنها قرار دارند به درون یک لوله مکیده شده و در لوله به جلو رانده می‌شود تا مراحل تجزیه کامل گردد. مخلوط نهایی واکنش به سمت آشکارساز هدایت می‌شود و به محض رسیدن به آشکارساز، یک علامت تجزیه‌ای ایجاد می‌کند که در همان لحظه ثبت می‌شود. این علامت ذاتاً گذرا است و ارتفاع یا مساحت آن برای محاسبه غلظت جز مورد تجزیه به کار می‌رود [۳۲].

## ۲-۳- انواع روش‌های جریان پیوسته

### ۲-۳-۱- روش آنالیز جریان منقطع<sup>۱</sup>

برای اولین بار در دهه ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ تجزیه‌گرهای جریان منقطع برای اندازه‌گیری خودکار اوره و گلوکز در نمونه‌های خون به کار گرفته شدند در این تجزیه‌گرها، جریان به وسیله حباب‌های هوا

---

1- Segmented Flow Analysis

منقطع شده و نمونه توسط این جریان حمل شده و به سوی آشکارساز می‌رود به گونه‌ای که این حباب‌ها پیش از رسیدن به آشکارساز حذف می‌شوند [۳۳].

استفاده از سیستم‌های جدا شده به وسیله حباب‌های هوا علاوه بر اینکه دارای مزایایی می‌باشد دارای معایب زیر هستند:

۱- جریان منظم نیست و حالت ضربانی دارد زیرا هوا راحت‌تر از مایع درون لوله‌ها فشرده می‌شود.

۲- جریان قبل از آشکارساز باید حباب‌گیری شود.

۳- حباب‌های هوا در لوله‌های پلاستیکی، الکتروسیسته‌ساکن ایجاد کرده و در نتیجه بر پاسخ آشکارسازهای پتانسیومتری تاثیر می‌گذارند.

۴- جابجایی جریان یا متوقف کردن و دوباره به راه‌انداختن آن، با دقت خوبی قابل کنترل نیست.

با توجه به محدودیت‌های اشاره شده در بالا، روش‌های تجزیه‌جریانی منقطع با روش‌های جریان پیوسته (غیرمنقطع) یعنی روش تزریق در جریان (FIA) جایگزین شد [۳۴].

## ۲-۳-۲- روش آنالیز تزریق در جریان پیوسته<sup>۱</sup>

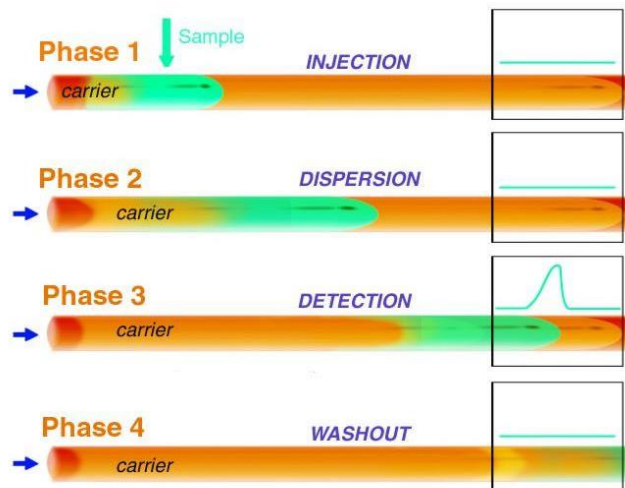
روش تزریق در جریان پیوسته یک روش جریانی پیوسته و غیرمنقطع می‌باشد که در اواسط دهه هفتاد به عنوان روشی برای آنالیز نمونه‌ها ارائه شد. بر خلاف روش جریان منقطع در این روش جریان- تجزیه‌ای کاملاً پیوسته بوده و نمونه مورد آزمایش در مسیر جریان حامل تزریق می‌شود. نمونه پس از تزریق با اجزا جریان حامل واکنش کرده و سپس به سمت آشکارساز برده می‌شود و در آنجا شدت

---

1- Flow injection analysis



جذب، پتانسیل الکترودی و یا هر خاصیت فیزیکی دیگری که در اثر عبور نمونه به طور پیوسته تغییر نماید مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد [۲۹].



شکل (۱-۲): مراحل آنالیز تزریق در جریان.

## ۱-۲-۳-۲- مزایای سیستم‌های تزریق در جریان غیرمنقطع

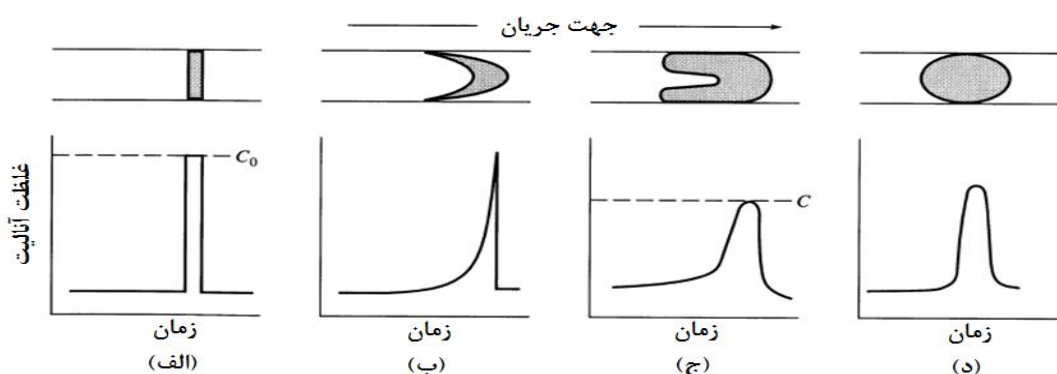
- ۱- انتخاب پذیری
- ۲- تکرار پذیری
- ۳- سرعت نمونه‌گیری بالا
- ۴- سادگی و انعطاف پذیری
- ۵- سرعت راه‌اندازی و خاموش‌شدن سریع
- ۶- مقرون به صرفه بودن [۳۵].

## ۴-۲ - پدیده پاشیدگی در FIA

هنگامی که محلول نمونه از محل تزریق به درون جریان حامل تزریق می‌شود ناحیه نمونه دارای نیمرخ غلظتی مستطیلی می‌باشد. وقتی نمونه از درون لوله‌ها به سمت دتکتور پیش می‌رود در جریان حامل پاشیده شده و پهنای ناحیه نمونه افزایش می‌یابد. پهن‌شدگی یا پاشیدگی در اثر دو فرآیند همرفت و انتشار ایجاد می‌گردد.

همرفت ناشی از جریان آرام است که در آن مرکز مایع سریعتر از بخش‌های مجاور حرکت می‌کند که نتیجه این امر ایجاد ناحیه نمونه سهمی شکل می‌باشد که در شکل (۲-۲-ب) نشان داده شده است. عامل دوم در پاشیدگی نمونه، پدیده انتشار است که به علت گرادیان غلظتی بین نمونه و جریان حامل به وجود می‌آید. انتشار به صورت موازی (محوری) و عمودی (شعاعی) نسبت به جریان حامل رخ می‌دهد که انتشار شعاعی نقش مهم تری در پاشیدگی نمونه دارد.

انتشار شعاعی سرعت خطی نمونه را در مرکز لوله کاهش می‌دهد در حالیکه سرعت خطی نمونه در کناره‌های لوله افزایش می‌یابد که ناحیه نمونه بدون تغییر بماند و از پاشیدگی نمونه‌ها به درون یکدیگر در جریان حامل جلوگیری می‌کند و در نتیجه آلودگی عرضی بین نمونه‌ها را حذف می‌کند [۳۶].



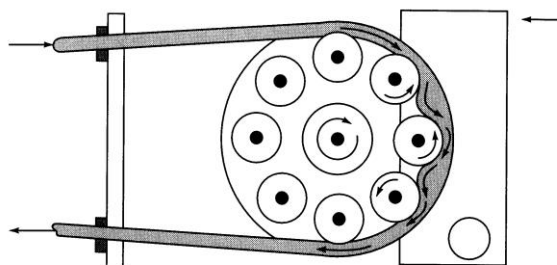
شکل ۲-۲: آثار همرفت و نفوذ بر نیمرخ غلظت آنالیت‌ها در آشکارساز (الف): بدون پاشیدگی، (ب): پاشیدگی به وسیله همرفت، (ج): پاشیدگی به وسیله همرفت و نفوذ شعاعی (د): پاشیدگی به وسیله نفوذ [۲۹].

## ۲-۵- سیستم دستگاهی FIA

اجزای اصلی یک تجزیه‌گر تزریق در جریان عبارتند از: یک واحد پیشران، مارپیچ واکنش، تزریق‌کننده نمونه و یک آشکارساز با یک سل جریان متصل به یک ثبات برای ثبت علامت تجزیه‌ای [۳۵].

## ۲-۵-۱- سیستم انتقال نمونه و واکنشگر

در دستگاه FIA از یک پمپ به عنوان واحد پیشران استفاده می‌شود که در آن یک سیال (مایع یا گاز) با حرکت دودی از درون لوله‌های پلاستیکی توسط غلتک‌هایی فشرده می‌شود و به سمت آشکارساز پمپ می‌گردد. یکی از رایج‌ترین پمپ‌هایی که در FIA استفاده می‌شود پمپ پرستالتیک<sup>۱</sup> است. همانگونه که در شکل (۲-۳) مشاهده می‌شود این پمپ شامل غلتک‌هایی است که در اطراف یک مدار حلقوی چرخان قرار دارند. لوله‌های حامل واکنشگرها یا جریان حامل بین غلتک‌ها و یک صفحه ثابت در بالا، قرار می‌گیرند. با چرخش مدار حلقوی غلتک‌ها لوله‌ها را فشرده کرده و جریانی در جهت چرخش مدار حلقوی ایجاد می‌گردد. سرعت جریان توسط سرعت موتور و قطر درونی لوله تنظیم می‌شود [۲۹، ۳۶].



شکل ۲-۳: نمودار نشان دهنده یک کانال از پمپ با حرکت دودی

1- Peristaltic Pump

## ۲-۵-۲- ماریپیچ واکنش<sup>۱</sup>

سیستم‌های با تزریق جریان اغلب حاوی یک قسمت ماریپیچ لوله‌ای هستند (نوعاً قطر پیچک حدود ۱ cm یا کمتر است) که هدف آن این است تا پاشیدگی محوری و مخلوط شدن شعاعی نمونه و واکنشگر را، که هر دو به پیک‌های متقارن‌تری منجر می‌شوند، افزایش دهد [۲۹].

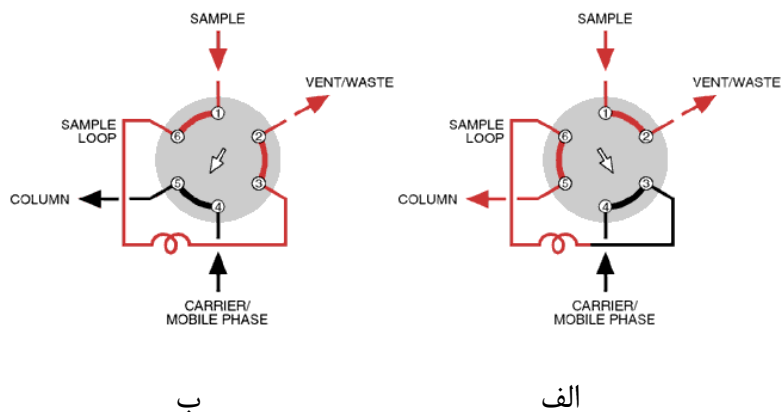
## ۲-۵-۳- سیستم تزریق نمونه

لوپ یا پیچه تزریق برای سیستم‌های جریان پیوسته مورد استفاده قرار می‌گیرد که حجم نمونه تزریقی با طول و قطر مناسب را کنترل می‌کند. حال چنانچه طول مسیر ورود نمونه، یعنی طول لوپ به کار گرفته شده طولانی شود موجب پخش شدن نمونه در درون معرف و از دست رفتن غلظت ماکزیمم در زمان رسیدن به سل خواهد شد که موجب خطا در اندازه‌گیری و ورود هر چه بیشتر پالس‌های پمپ به درون سیگنال می‌شود. و همچنین نباید بیش از حد کوتاه باشد بهترین طول مسیر را از طریق بهینه‌کردن باید به دست آورد.

لوپ تزریق دارای دو حالت باز و بسته می‌باشد که در حالت باز نمونه تزریقی از طریق شیر تزریق به درون جریان حامل تزریق می‌شود و حالت بسته که شیر تزریق بسته می‌شود و نمونه تزریقی به همراه جریان حامل به سمت پیچه تزریق حرکت می‌کند. نمایی از قسمت داخلی شیر که در دو حالت باز و بسته وجود دارد در شکل (۲-۴) نشان داده شده است.

---

1- Reaction coil



شکل ۲-۴: الف: تزریق نمونه به لوپ ب: ورود نمونه به سیستم [۳۷].

## ۲-۵-۴ آشکارسازها

تزریق کننده‌ها و آشکارسازهای به کار رفته در تجزیه با تزریق جریان از نظر شرایط عملکرد و نوع، مشابه آن‌هایی هستند که در HPLC به کار می‌روند [۲۹]. هر آشکارسازی که مجهز به یک سل جریان باشد می‌تواند در FIA استفاده شود. یک آشکارساز خوب باید تنها یک حجم کوچک مرده، استحکام بالا و پاسخ سریع داشته باشد [۳۵].

آشکارسازی در روش‌های با تزریق جریان به وسیله دستگاه‌های جذب و نشر اتمی، فلئورسان‌ها، سیستم‌های الکتروشیمیایی، شکست‌سنج‌ها، طیف نوسنج‌ها و نوسنج‌ها انجام شده است [۲۹].

## ۲-۶- مقایسه روش FIA با سایر روش‌های جریان پیوسته

تزریق در جریان پیوسته چندین مزیت نسبت به اندازه‌گیری‌های جریان پیوسته دیگر دارد که عبارتند از [۲۹]:

۱- سرعت تجزیه در روش FIA بالاست (به طور نوعی بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نمونه در روز).

۲- زمان بین تزریق و پاسخ آشکارساز کمتر از یک دقیقه است.

۳- فاصله زمانی بین شروع و پایان سیگنال کم است .

۴- به جز سیستم‌های تزریق، روش‌های FIA نیاز به تجهیزات ساده‌تری دارند و تجهیزات آن انعطاف‌پذیرتر می‌باشند.

## ۲-۷- روش‌های بهینه‌سازی پارامترها

روش‌های بهینه‌سازی روش‌هایی هستند که سطوحی از متغیرهای موثر در آزمایش را مشخص می‌نمایند. به طوری که در این سطوح از متغیرها، پاسخ<sup>۱</sup> بهینه ایجاد گردد. پاسخ تجزیه‌ای در فرآیند های تجزیه‌ای مختلف، متفاوت است. در برخی از موارد، هدف به دست آوردن شرایطی است که در آن پاسخ دستگاه حداکثر باشد مثلاً بیشترین مقدار جذب، شدت نشر و ... ایجاد شود. در موارد دیگر، هدف بهینه‌سازی، افزایش سیگنال به نوفه یا سیگنال به زمینه، ایجاد بهترین تفکیک و یا بدست آوردن حداقل پاسخ برای گونه‌های مزاحم می‌باشد. یک روش بهینه‌سازی خوب باید دو ویژگی داشته باشد. اول اینکه شرایط تجربی را مشخص نماید که در آن شرایط پاسخ بهینه یا نزدیک به بهینه ایجاد شود. دوم اینکه تا حد ممکن تعداد آزمایش‌های کمتری نیاز داشته باشد. روش‌های متفاوتی برای بهینه‌سازی متغیرها وجود دارد که از بین آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

۱- روش تک‌عاملی<sup>۲</sup>

۲- روش سیمپلکس<sup>۳</sup>

۳- روش طراحی فاکتوریال<sup>۴</sup>

۴- روش مربعات لاتین<sup>۱</sup>

---

1 -Response

2- One-at-a time

3- Simplex

4- Factorial design

در این پروژه از روش‌های تک‌عاملی و طراحی آزمایش (روش فاکتوریال) برای بهینه‌سازی متغیرها استفاده شده است. در این بخش به بررسی بیشتر این دو روش پرداخته خواهد شد [۳۸].

## ۲-۷-۱- روش تک‌عاملی (تک‌متغیره)

در این روش برای بهینه‌سازی یک متغیر، سایر متغیرها ثابت نگه داشته شده و متغیر مورد نظر تغییر داده می‌شود تا حداکثر پاسخ به دست آید. سایر متغیرها نیز به همین روش بهینه می‌شوند. مزیت روش بهینه‌سازی تک‌عاملی، سادگی آن است ولی این روش زمانی مفید بوده و کارایی دارد که برهم‌کنشی بین متغیرها وجود نداشته باشد. در صورت وجود برهم‌کنش، باید از سایر روش‌های بهینه‌سازی استفاده شود. برای مطالعه برهم‌کنش‌ها از روش طراحی آزمایش به وسیله طرح فاکتوریل استفاده می‌شود.

## ۲-۷-۲- طراحی آزمایش

در اکثر پژوهش‌ها نیمی از هزینه‌ها و وسایل صرف حل کردن مشکل بهینه‌سازی می‌شود. این یک دلیل اساسی برای لزوم طراحی آزمایش می‌باشد. طراحی آزمایش در سال ۱۹۲۰ توسط یک دانشمند انگلیسی به نام سر رونالد فیشر<sup>۲</sup> به عنوان روشی برای حداکثر کردن دانش بدست آمده از داده‌های تجربی ایجاد شد. اکثر آزمایش‌ها شامل چندین متغیر هستند که به منظور پیدا کردن شرایط بهینه و فهمیدن رابطه بین متغیرها و مشخصه‌ای از فرایند که مورد نظر است (پاسخ)، طراحی آزمایش انجام می‌شود. فیشر در سال ۱۹۲۵ میلادی نشان داد که روش تغییر یک متغیر در یک زمان، اطلاعاتی در

---

1- Latin Squer

2- Sir Ronald A. Fisher

مورد موقعیت نقطه بهینه وقتی بین متغیرها برهم‌کنش وجود دارد، نمی‌دهد و نقطه‌ای غیر از نقطه بهینه‌ی واقعی را نشان می‌دهد.

روش‌های بهینه‌سازی کلاسیک یا روش تغییر یک عامل در یک زمان، برای بهینه‌کردن چند عامل نه صرفاً به دلیل زمان بیشتر بلکه به دلیل ناتوان بودن در تشخیص صحیح نتیجه بهینه و به ویژه نادیده‌گرفتن برهم‌کنش موجود بین عوامل، نامناسب است. محدودیت این روش با استفاده از طرح‌های آماری برطرف می‌شود. این طرح‌های آماری برهم‌کنش بین عوامل مختلف را بررسی می‌کند [۳۹].

طراحی آزمایش‌ها شامل یک آزمایش یا یک سری از آزمایش‌هایی می‌شود که در آن به طور آگاهانه در متغیرهای ورودی فرآیند تغییراتی ایجاد می‌گردد تا از این طریق میزان تغییرات حاصل در پاسخ خروجی فرآیند مشاهده و شناسایی شود [۴۰]. در واقع این روش یک چارچوب ریاضی محکم برای تغییر تمام متغیرهای وابسته، به صورت همزمان و در کمترین تعداد آزمایش فراهم می‌کند. در این روش خطاها به وسیله میانگین‌گیری کاهش یافته و فضای کاری به صورت موثری نقشه‌برداری شده و برهم‌کنش‌ها قابل مشاهده است. برای ضمانت اینکه متغیرهای غیرکنترل شده مثل رطوبت تأثیری روی آزمایش‌ها ندارند باید آنها به صورت تصادفی انجام شوند. البته توجه شود کلمه طراحی نشان می‌دهد که آزمایش‌ها به صورت اتفاقی انتخاب نمی‌شوند، بلکه کاملاً برنامه‌ریزی شده‌اند. در واقع طراحی در دو زمینه استفاده می‌شود [۳۹]:

۱- انجام مجموعه‌ای از آزمایش‌ها به منظور ایجاد مدل

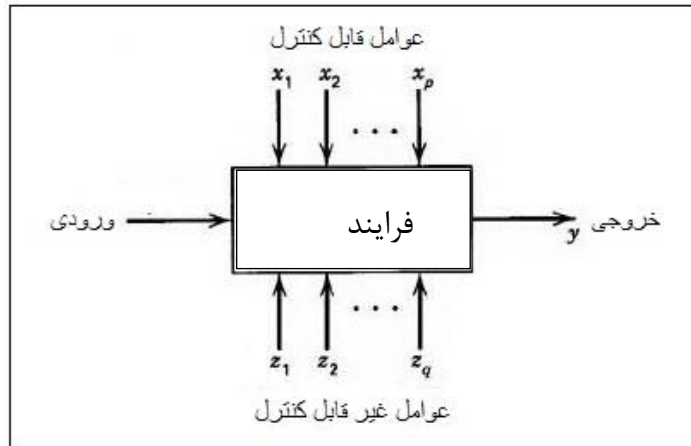
۲- برای بهینه‌سازی روش‌ها و فرآیندها



## ۲-۷-۲-۱- اهداف یک طراحی آزمایش

همان گونه که در شکل (۲-۵) نشان داده شده است فرایند را می‌توان ترکیبی از دستگاهها، روش‌ها و افراد تصور نمود که مواد ورودی را به یک محصول خروجی تبدیل می‌کنند. این محصول خروجی دارای یک یا چند مشخصه کیفی با پاسخ‌های قابل مشاهده است. بعضی از متغیرهای فرایند قابل کنترل ( $X_1, X_2, \dots, X_p$ ) و سایر آنها غیر قابل کنترل ( $Z_1, Z_2, \dots, Z_g$ ) هستند (گرچه آنها می‌توانند در شرایط آزمایش قابل کنترل باشند); در بعضی موارد این عامل‌های غیر قابل کنترل، عامل‌های اغتشاش<sup>۱</sup> نامیده می‌شوند. اهداف یک آزمایش ممکن است شامل موارد زیر گردد:

- ۱- تعیین متغیرهایی ( $X$ ها) که بیشترین اثر بر روی پاسخ یا  $Y$  دارند.
- ۲- تعیین مقادیر متغیرهایی ( $X$ ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند، به گونه‌ای که به مقدار بهینه واقعی خود نزدیک باشد.
- ۳- تعیین مقادیر متغیرهایی ( $X$ ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند، به گونه‌ای که تغییرپذیری کوچک باشد.
- ۴- تعیین مقادیر متغیرهایی ( $X$ ها) که بیشترین اثر را بر روی پاسخ دارند، به گونه‌ای که اثرات متغیرهای غیر قابل کنترل حداقل گردد [۴۰].



شکل (۲-۵): مدل عمومی یک فرایند [۴۰]

## ۲-۲-۷-۲- مزایای طراحی آزمایش

با توجه به مطالبی که ذکر شد، امتیازات روش برنامه ریزی شده و سازمان یافته طراحی آزمایش بر روش متداول تغییر یک متغیر در زمان عبارتند از:

- ۱- افزایش شانس انجام یک آزمایش موفق
- ۲- تسریع انجام آزمایشها و صرف زمان کمتر بخاطر انجام تعداد کمتر آزمایشها
- ۳- کاهش هزینهها به علت انجام تعداد کمتر آزمایشها
- ۴- با طراحی آزمایش، اطلاعات بیشتر و مفیدتری درباره سیستم مورد مطالعه بدست می آید، زیرا تاثیر پیوسته و همزمان تمام متغیرهای موثر در نظر گرفته می شود [۳۹].

## ۲-۲-۷-۳- راهنماها در طراحی آزمایشها

راهنماها در طراحی آزمایشها را می توان به صورت زیر خلاصه کرد [۴۰]:

- ۱- شناسایی و بیان مسئله
- ۲- انتخاب عوامل و تعیین سطح مناسب برای آنها

۳- انتخاب پاسخ مناسب

۴- انتخاب طرح آزمایش

۵- انجام آزمایش

۶- تحلیل داده‌ها

۷- نتیجه‌گیری

## ۱- شناسایی و بیان مسئله

در عمل، غالباً تشخیص اینکه یک مشکل یا مسئله را می‌توان از طریق طراحی آزمایش‌ها حل کرد، بسیار دشوار است. به همین علت شاید نتوان به طور واضح مسئله را بیان کرد. با این حال باید بدانیم که ارائه کلیه نظرات به طور کامل در مورد مسئله و اهداف آزمایش ضرورت دارد. معمولاً تهیه اطلاعات باید قشر وسیعی از افراد نظیر واحدهای مهندسی، کنترل کیفیت، بازاریابی و غیره همچنین مدیریت مشتریان و اپراتورها را در بر گیرد. غالباً بیان صریح و واضح مسئله و اهداف آزمایش در درک بهتر فرایند و حل مسئله کمک به سزایی خواهد داشت [۴۰].

## ۲- انتخاب عوامل و تعیین سطح مناسب برای آنها

شخص آزمایشگر باید عامل‌هایی که در آزمایش تغییر داده خواهند شد، دامنه‌های مربوط به تغییرات عامل‌ها و سطوح خاصی که برای انجام آزمایش در نظر گرفته خواهد شد را انتخاب نماید. به منظور انجام چنین کاری باید شناخت و دانش کافی در مورد فرایند وجود داشته باشد. معمولاً این شناخت ترکیبی از تجارب عملی و درک تئوری است. کلیه عواملی که ممکن است به گونه‌ای در آزمایش نقش مهمی داشته باشند باید مورد بررسی قرار گیرند تا از تاکید بیش از حد در مورد عامل‌هایی که ممکن است تحت نفوذ تجارب قبلی واقع گردند، مخصوصاً زمانی که در مراحل اولیه

آزمایش به سر می‌بریم و یا اینکه از عمر فرایند مدت زیادی نگذشته است، اجتناب نماییم. وقتی که هدف غربال عامل‌ها یا ویژگی شناسی فرایند باشد بهتر است که تعداد سطوح عامل مورد مطالعه کم در نظر گرفته شود (در اغلب موارد از دو سطح استفاده می‌شود) [۴۰].

### ۳- انتخاب پاسخ مناسب

در انتخاب متغیر پاسخ، شخص آزمایشگر باید اطمینان داشته باشد که متغیر انتخاب شده اطلاعات مفیدی را در مورد فرایند مورد مطالعه فراهم می‌نماید. در اغلب موارد میانگین یا انحراف معیار مشخصه اندازه‌گیری شده متغیر پاسخ خواهد بود. متغیرهای پاسخ چندگانه، زیاد غیرمعمول نیستند. کارایی ابزار اندازه‌گیری نیز عامل مهمی محسوب می‌شود. اگر ابزار اندازه‌گیری از کارایی خوبی برخوردار نباشد، آزمایش فقط به وجود اثرات بزرگ پی خواهد برد و یا اینکه آزمایش باید تکرار گردد [۴۰].

### ۴- انتخاب طرح آزمایش

اگر سه مرحله قبل به طور صحیح انجام گیرد، این مرحله نسبتاً ساده خواهد بود. انتخاب نوع طرح شامل انتخاب اندازه نمونه (تعداد دفعاتی که آزمایش باید تکرار شود)، تعیین ترتیب صحیح انجام آزمایش و تعیین محدودیت‌هایی نظیر بلوک بندی و غیره می‌گردد [۴۰].

## ۵- انجام آزمایش

وقتی آزمایش انجام می‌شود، باید فرایند انجام آن را به دقت تحت نظر گرفت تا اطمینان حاصل گردد که همه چیز طبق نقشه پیش می‌رود. وجود خطا در روش آزمایش در این مرحله معمولاً منجر به از بین رفتن صحت آزمایش می‌گردد. یکی از عوامل موفقیت، از پیش برنامه‌ریزی کردن است [۴۰].

## ۶- تحلیل داده‌ها

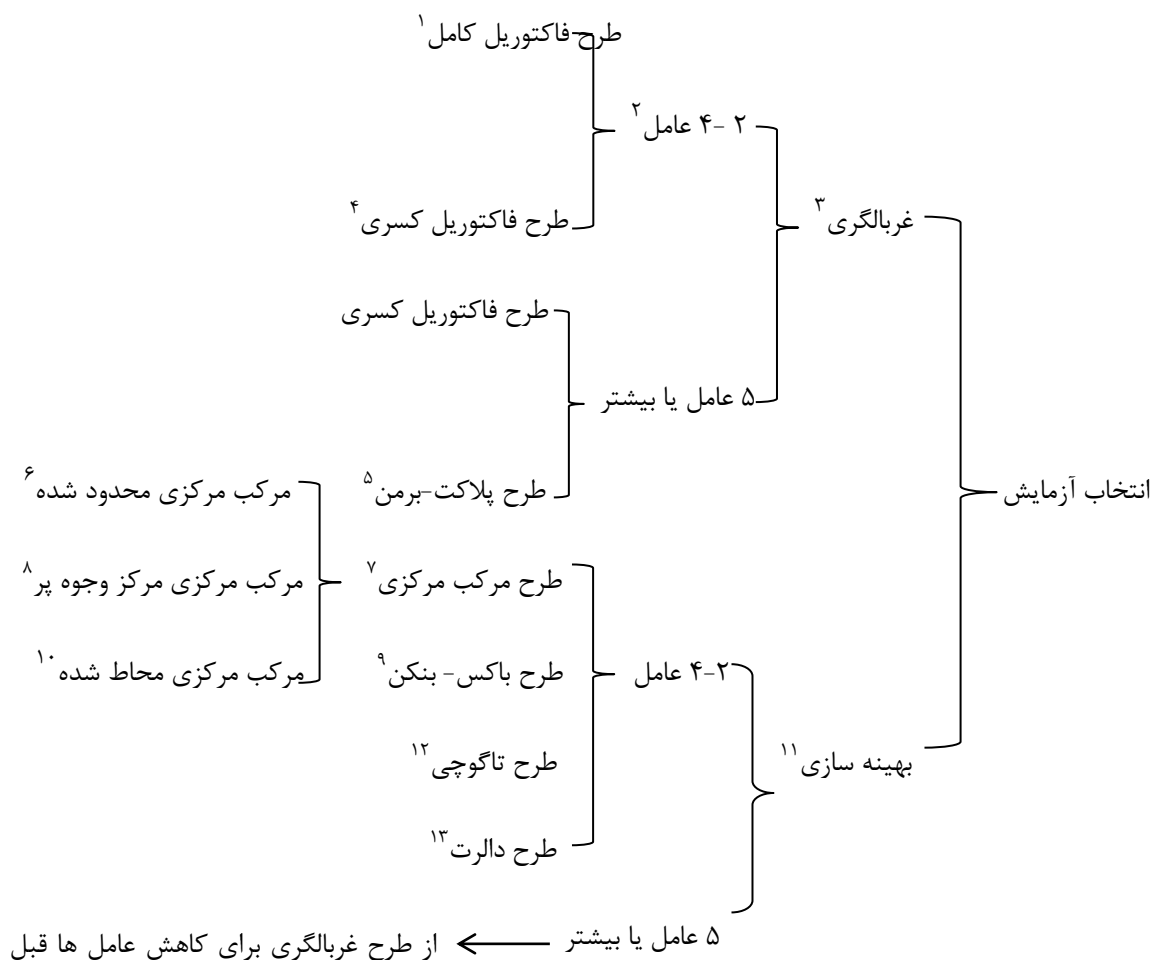
روش‌های آماری را باید برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده کرد تا نتایج حاصل معتبر و عاری از قضاوت‌های شخصی باشد. اگر آزمایش به طور صحیح طراحی و طبق برنامه اجرا شده باشد، آنگاه نوع روش‌های آماری مورد نیاز پیچیده نخواهد بود. امروزه نرم افزارهای مختلفی برای انجام محاسبات مورد نیاز وجود دارد. همچنین باید توجه داشت که روش‌های نموداری ساده نیز نقش مهمی در تعبیر و تفسیر داده‌ها ایفا می‌کنند. تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارزیابی صحت مدل نیز از اهمیت زیادی برخوردار است [۴۰].

## ۷- نتیجه‌گیری

وقتی داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند آنگاه شخص آزمایشگر باید بر اساس نتایج حاصل نتیجه‌گیری و پیشنهاداتی نیز ارائه کند [۴۰].

## ۲-۷-۴- دسته بندی روش‌های طراحی آزمایش

همان‌طور که در شکل (۲-۶) نشان داده شده است براساس هدف یک آزمایش، تمام طرح‌های آزمایشی به دو گروه عمده تقسیم‌بندی می‌شوند:



از بهینه سازی باید استفاده شود.

شکل (۲-۶): نمودار انتخاب طرح [۴۱]

- 1- Full factorial design
- 2- Factor
- 3- Screening
- 4- Fractional factorial design
- 5- Plackett-Burman design
- 6- Central composite circumscribed
- 7- Central composite design
- 8- Central composite face-centered
- 9- Box-Behnken design
- 10- Central composite inscribed
- 11- Optimization
- 12- Taguchi design
- 13- Doehlert design

طرح غربالگری برای تعیین عوامل مهم و اثر متقابل آنها از تمام عوامل بالقوه استفاده می‌شود. این نوع طرح‌ها، عوامل کیفی، کمی و ترکیب آنها را به طور همزمان بررسی می‌کند.

بهینه‌سازی یکی از جنبه‌های دیگر طراحی آزمایش است که شرایط مطلوب و تنظیمات یک آزمایش را تعیین می‌کند.

عامل، متغیری است که می‌تواند بر نتیجه آزمایش تأثیر بگذارد. این متغیرها می‌توانند تنها تعداد معدودی از مقادیر ممکن را داشته باشند که به آنها سطوح عامل<sup>۱</sup> گفته می‌شود و همچنین می‌تواند یک متغیر طبقه‌ای باشد (مانند کاتالیزور که حضور آن به عنوان سطح بالا و عدم حضور آن به عنوان سطح پایین در نظر گرفته می‌شود). و یا می‌تواند یک متغیر پیوسته باشد (مانند دما که توانایی پذیرش هر مقداری را به عنوان سطح بالا و پایین دارد). مشخصه‌ای از محصول یا فرایند که قرار است بهینه شود، پاسخ نامیده می‌شود. پاسخ‌ها را می‌توان متغیرهایی دانست که کارایی را توصیف می‌کنند. بنابراین دو نوع متغیر وجود دارد، عامل‌هایی که متغیرهای مستقل هستند ( $X_i$ ) و متغیرهای وابسته که همان پاسخ‌ها ( $y_i$ ) هستند.

$$(y_1, y_2, \dots, y_i) = f(x_1, x_2, \dots, x_i) \quad (1-2)$$

در اکثر موارد هر پاسخ بطور جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرد. لذا معادله به شکل زیر نشان

داده می‌شود:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (2-2)$$

مدلی که پاسخ را به اثرات عامل‌ها ربط می‌دهد تابع پاسخ<sup>۲</sup> و یا به دلیل ماهیت چند متغیره خود، رویه پاسخ<sup>۱</sup> نامیده می‌شود [۴۲].

---

1- Factor levels

2- Response function

## ۲-۷-۲-۵- طرح فاکتوریل

یک طرح فاکتوریل زمانی استفاده می‌گردد که ارزیابی اثرات چندین عامل مورد نظر باشد. در بعضی از طرح‌ها، عامل‌های مورد مطالعه همگی باهم تغییر می‌کنند. در حقیقت منظور از آزمایش فاکتوریل، آزمایشی است که در هر تکرار کامل آن کلیه ترکیبات سطوح عامل‌های مورد نظر بررسی می‌گردند. از محاسن این روش تعداد کم آزمایش‌ها برای گرفتن بیشترین اطلاعات است. انواع اصلی این طرح‌ها عبارتند از:

۱- طرح فاکتوریل کامل: در این طرح تمامی عوامل در کلیه سطوح مورد بررسی قرار می‌گیرند.

۲- طرح فاکتوریل کسری: در این طرح وقتی تعداد عوامل مورد بررسی از ۵ بیشتر می‌شود به

علت زیاد شدن تعداد آزمایش‌ها، کسری از آنها انتخاب می‌شود و مورد بررسی قرار می‌گیرد [۴۰].

## ۲-۷-۲-۶- طرح پلاکت - برمن<sup>۲</sup>

طراحی پلاکت- برمن که در سال ۱۹۴۶ توسط پلاکت<sup>۳</sup> و برمن<sup>۴</sup> ابداع شد، یک طراحی فاکتوریل ناقص دو سطحی است که برهم‌کنش‌های بین فاکتورها را در نظر نمی‌گیرد. در این طراحی که برای تعیین عوامل تأثیرگذار استفاده می‌گردد. با توجه به اطلاعات نرم افزار Minitab15 تعداد آزمایش‌ها در این طرح هنگامی که نقطه مرکزی و تکرار وجود نداشته باشد عددی بین ۱۲ تا ۴۸ است که می‌بایست مضربی از ۴ هم باشد. بطور مثال ۱۲، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۸ تعداد آزمایش‌های

---

1- Response surface

2- Placket-Burman design

3- Placket

4- Burman



تعریف شده در طرح پلاکت- برمن می‌باشد که در آن ماکزیمم عامل‌هایی که می‌توان در هر طراحی آزمایش بررسی کرد برابر است با:

$$f = N - 1 \quad (3-2)$$

$f$  = حداکثر تعداد عامل‌های مورد بررسی

$N$  = تعداد آزمایش‌های تعریف شده نرم افزار

هنگامی که در یک طرح پلاکت- برمن نقاط مرکزی و تکرار وجود داشته باشد تعداد آزمایش از معادله زیر بدست می‌آید:

$$\text{تعداد کل آزمایش} = (N + X) \times Y \quad (4-2)$$

$X$  = تعداد نقاط مرکزی

$Y$  = تعداد تکرارها

## ۲-۷-۲-۷- طرح‌های چند سطحی

ترسیم رویه‌های پاسخ، مستلزم مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورها و برهمکنش‌های موثر است. طرح‌های آزمایشی با بیش از دو سطح، جهت ایجاد مدل خمیده<sup>۱</sup> برای توصیف رابطه کمی پاسخ و فاکتورها به کار می‌روند. محدوده آزمایشی که طرح‌های چند سطحی متقارن توصیف می‌کنند، ممکن است کروی و یا مکعبی باشد. از جمله طرح‌های مکعبی می‌توان به طرح‌های فاکتوریل سه سطحی اشاره نمود. در طرح‌های مکعبی، اگرچه هر فاکتور در سه یا پنج سطح مورد مطالعه قرار

---

1-Curved models

می‌گیرد، اما تعداد آزمایش‌ها بسیار کمتر از طرح‌های فاکتوریل سه سطحی است. طرح‌های مرکب مرکزی با سه دسته طرح‌های مرکب مرکزی محدود شده (CCD)، مرکب مرکزی مرکز وجوه پر (CCF) و مرکب مرکز محاط شده (CCI) تقسیم می‌کنند. این تقسیم بندی بر اساس فاصله نقاط ستاره‌ای از نقطه مرکزی طرح که با پارامتر  $\alpha$  نمایش داده می‌شود، صورت می‌گیرد. در طرح‌های CCF،  $\alpha=1$  در نظر گرفته می‌شود. در حالی که مقدار این پارامتر در طرح‌های CCC و CCI به ترتیب بزرگتر و کوچکتر از یک است. از بین طرح‌های مرکب مرکزی، طرح‌های CCC و CCI، طرح‌های کروی و طرح CCF مکعبی می‌باشند.

## ۲-۷-۲-۸- طرح باکس - بنکن

این مدل در سال ۱۹۶۰ توسط باکس و بنکن ارائه شد. این طرح یک مدل مرتبه دوم سه سطحی و چرخش پذیر<sup>۱</sup> می‌باشد که برای مطالعه فاکتورهای متعدد مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعداد آزمایشات در این طرح از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$N = (2^k + 2k + C_p) \times Y \quad (5-2)$$

که  $k$  تعداد فاکتورها،  $C_p$  تعداد نقاط مرکزی و  $Y$  تعداد تکرارها می‌باشد.

شکل کلی این مدل به صورت یک معادله چندجمله‌ای درجه دوم می‌باشد که در زیر نشان داده

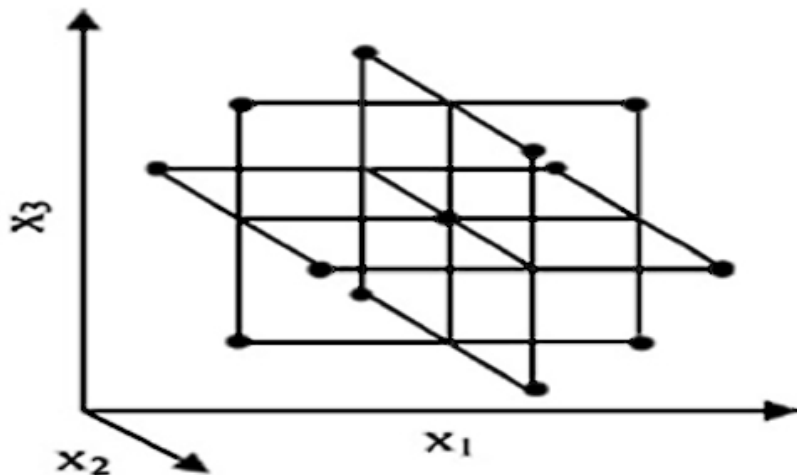
شده است:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (5-2)$$

---

1- Rotatable

که  $y$  پاسخ،  $X_i$  و  $X_j$  متغیرهای ورودی هستند که بر پاسخ تاثیر می‌گذارند،  $\beta_0$  مقدار ثابت،  $\beta_i$  ضریب خطی،  $\beta_{ii}$  ضریب برهم کنش دوتایی و  $\beta_{ij}$  ضریب برهم کنش بین  $X_i$  و  $X_j$  هستند. در شکل (۵-۲) نمایی از طرح باکس-بنکن آورده شده است [۳۹].



شکل (۲-۷): طراحی آزمایش در روش باکس-بنکن [۳۹]



فصل سوم

تجربی

### ۳-۱- اندازه‌گیری سینتیکی- اسپکتروفتومتری تزریق در جریان پیوسته

#### ال-سیستئین با استفاده از اثر بازداری آن بر واکنش برومات با متاکرزول پرپل

مطابق آنچه که در فصل اول درباره اهمیت اندازه‌گیری ال-سیستئین ذکر گردید و بر اساس مطالعات انجام شده، سیستم تزریق در جریان پیوسته برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های حقیقی به روش سینتیکی با آشکارسازی اسپکتروفتومتری طراحی و به کار گرفته شد. در این فصل نتایج تجربی حاصل از روش به کار برده شده ارائه خواهد شد.

### ۳-۲- مواد شیمیایی، محلول‌های مورد استفاده و طرز تهیه آنها

لیست مواد شیمیایی مورد استفاده به همراه شرکت سازنده آنها در جدول (۳-۱) آمده است.

جدول (۳-۱): مواد شیمیایی مورد استفاده

| نام ماده شیمیایی | فرمول              | درصد خلوص | شرکت سازنده      |
|------------------|--------------------|-----------|------------------|
| متاکرزول پرپل    | $C_{21}H_{18}O_5S$ | -         | مرک <sup>۱</sup> |
| پتاسیم برومات    | $KBrO_3$           | ۹۹/۸      | مرک              |
| پتاسیم برمید     | $KBr$              | ۹۹/۵      | مرک              |
| نیتریک اسید      | $HNO_3$            | ۶۳/۰۱     | مرک              |
| ال-سیستئین       | $C_3H_7NO_2S$      | ۱۰۰       | مرک              |
| پتاسیم نترات     | $KNO_3$            | ۹۸/۹      | مرک              |

در تهیه تمام محلول‌ها از مواد شیمیایی با خلوص تجزیه‌ای استفاده شد.

1- Merck

- ❖ محلول مادر ال- سیستئین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از حل کردن ۰/۰۱۰۰ گرم ال- سیستئین در آب مقطر در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد.
  - ❖ محلول مادر متاکرزول پرپل با غلظت  $10^{-3} \times 1/0$  مولار از حل کردن ۰/۰۳۸۲ گرم متاکرزول پرپل در ۲۵/۰ میلی لیتر اتانول و سپس رقیق کردن با آب مقطر در یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد.
  - ❖ محلول مادر نیتریک اسید با غلظت ۴/۰ مولار از رقیق کردن ۲۷/۷ میلی لیتر از نیتریک اسید غلیظ تجاری در یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شد.
  - ❖ محلول مادر ۰/۱۰ مولار پتاسیم برمید از حل کردن ۲/۹۶۰۳ گرم پتاسیم برمید در آب مقطر در یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد.
  - ❖ محلول مادر ۰/۱۰ مولار پتاسیم برومات از حل کردن ۴/۶۱۶۶ گرم پتاسیم برومات در آب مقطر در یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد.
- محلول های روزانه از رقیق کردن حجم های معینی از محلول های فوق تهیه شد.

### ۳-۲-۱- وسایل و دستگاه های مورد استفاده

برای ثبت طیف های جذبی ( $\Delta A$  یا اختلاف جذب) در ناحیه مرئی- ماوراء بنفش از یک اسپکتروفتومتر مرئی- ماوراء بنفش شیمادزو<sup>۱</sup> مدل UV-160 با یک جفت سل کوارتز ۱/۰ سانتی متری استفاده شد.

آزمایش های تزریق در جریان پیوسته با استفاده از دستگاه تزریق در جریان پیوسته که در آزمایشگاه طراحی و ساخته شده بود استفاده گردید. این دستگاه مجهز به اجزای زیر است:

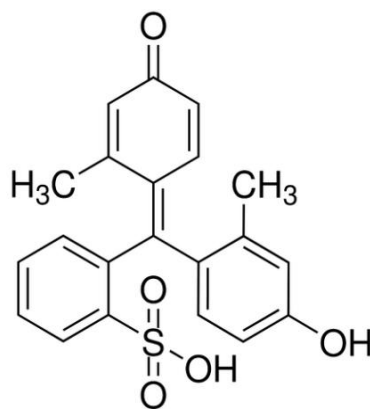
---

1- Shimadzu

- ۱- آشکارساز مرئی- ماوراء بنفش مدل SFD3210 ساخت کشور آلمان مجهز به سلول جریانی ۲۰ میکرولیتری و منبع نور تنگستن در ناحیه مرئی
- ۲- پمپ پرستالتیک مدل ۵۲۰۱ (شرکت هایدولف<sup>۱</sup>) مجهز به لوله‌های با جنس سیلیکون<sup>۲</sup> با قطرهای داخلی متفاوت و سرعت چرخش موتور قابل تنظیم برای تنظیم سرعت‌های متفاوت
- ۳- لوله‌های تفلونی با قطر داخلی ۰/۸ میلی‌متر برای مارپیچ واکنش و پیچه تزریق
- ۴- شیر تزریق<sup>۳</sup> شش راهه رهوداین<sup>۴</sup> مدل ۵۰۱۱ ساخت شرکت ساپلکو<sup>۵</sup> برای تزریق نمونه برای ثابت نگه‌داشتن دما از حمام آب حرارتی n- بیوتک<sup>۶</sup> مدل NB-۳۰ و برای ثبت زمان واکنش نیز از یک کرومومتر استفاده شد.

### ۳-۲-۲- سیستم شیمیایی مورد استفاده

متاکرزول پرپل یک ترکیب رنگی است که دارای ساختار گسترده زیر است:

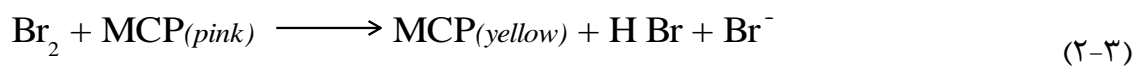
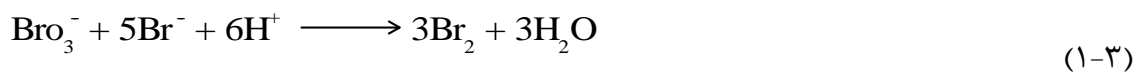


شکل (۳-۱): ساختار متاکرزول پرپل

- 1- Hidolph
- 2- Silicon
- 3- Injector Valve
- 4- Rheodyne
- 5- Supelco
- 6- n-Biotek



در دمای اتاق و در محیط اسیدی سرعت واکنش بین متاکرزول پرپیل و پتاسیم برومات کند است. در حضور یون برمید به علت واکنش یون برمید با یون برومات و تولید  $\text{Br}_2$  سرعت واکنش افزایش می‌یابد.  $\text{Br}_2$  تولید شده با متاکرزول پرپیل واکنش می‌دهد و آن را به یک ماده تقریباً بی‌رنگ تبدیل می‌کند و یک چرخه کاتالیزوری شکل می‌گیرد (واکنش‌های (۱-۳) و (۲-۳)). لذا با گذشت زمان در طول موج ۵۲۵ نانومتر جذب متاکرزول پرپیل کاهش می‌یابد. چرخه کاتالیزوری ایجاد شده به صورت زیر است [۴۳]:



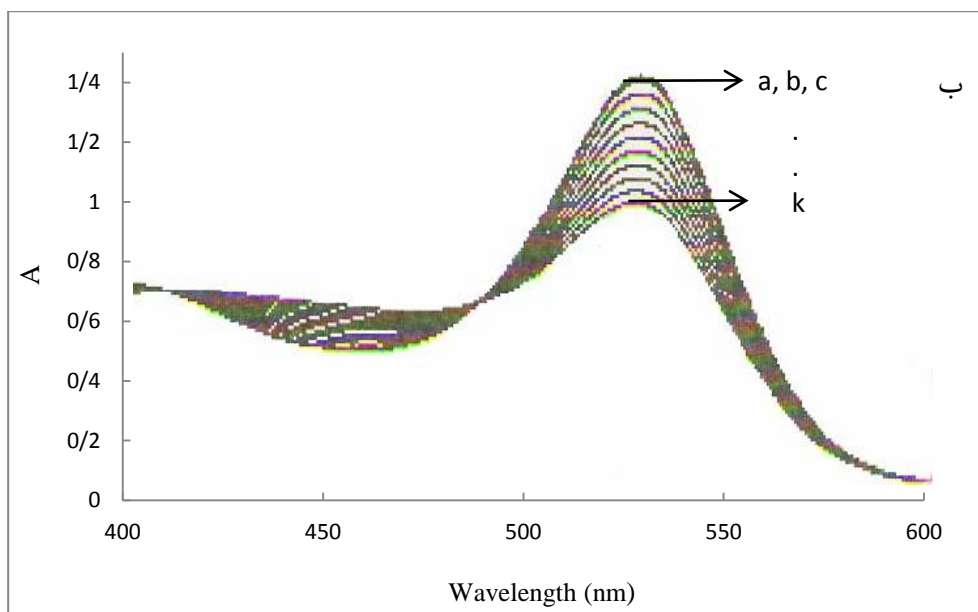
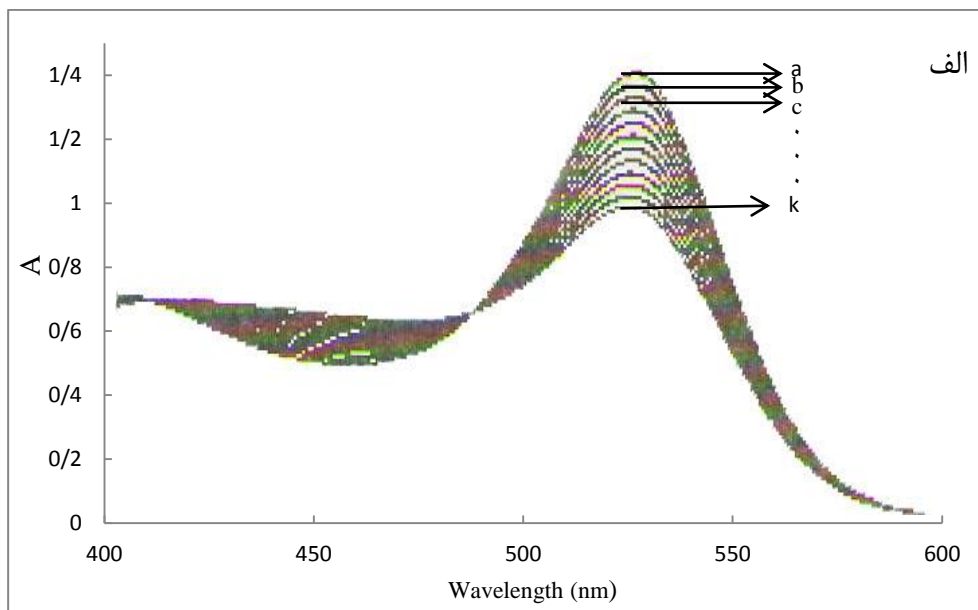
بررسی‌های اولیه نشان داد که حضور ال-سیستئین باعث توقف واکنش بی‌رنگ شدن متاکرزول پرپیل و ثابت ماندن جذب برای مدت زمانی مشخص می‌شود که به آن زمان القائی ( $t_{ip}$ ) می‌گویند. ایجاد زمان القائی در واکنش به علت واکنش ال-سیستئین با برومات مطابق واکنش زیر است [۴۴]:



### ۳-۲-۳- ثبت طیف جذبی

به منظور بررسی اثر ال-سیستئین بر سیستم متاکرزول پرپل-برومات-برمید در محدوده طول موجی ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر، ۱۲ طیف جذبی متوالی با فواصل زمانی ۱۵ ثانیه، از محلول نمونه و شاهد ثبت گردید. برای ثبت طیف جذبی محلول نمونه و شاهد به ترتیب زیر عمل شد:

به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول‌های ال-سیستئین ۱۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نیتریک‌اسید ۱/۲ مولار، متاکرزول پرپل  $۸/۰ \times 10^{-4}$  مولار و پتاسیم برمید  $۱/۲ \times 10^{-2}$  مولار اضافه گردید. محلول حاصل توسط آب مقطر تا حجم تقریبی ۸/۰ میلی‌لیتر رقیق شد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم برومات ۰/۰۱ مولار اضافه شد و با افتادن آخرین قطره کرومومتر روشن شد. پس از به حجم رساندن و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقدار معینی از محلول به سل دستگاه منتقل شد و پس از گذشت ۱۵ ثانیه از شروع واکنش در محدوده طول موجی ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر، ۱۲ طیف جذبی متوالی با فواصل زمانی ۱۵ ثانیه، ثبت گردید. برای ثبت طیف جذبی محلول شاهد نیز به همین صورت عمل شد با این تفاوت که ال-سیستئین اضافه نگردید که کهک طیف‌های مربوطه در شکل (۲-۳) آمده است. مقایسه دو طیف شاهد و نمونه نشان می‌دهد که با گذشت زمان، مقدار جذب شاهد در باند جذبی متاکرزول پرپل در طول موج ۵۲۵ نانومتر کاهش می‌یابد در حالی که حضور ال-سیستئین در نمونه باعث ثابت ماندن جذب برای مدت زمانی می‌شود. بنابراین تغییرات جذب در طول موج ۵۲۵ نانومتر می‌تواند برای پیگیری واکنش انجام شده مورد استفاده قرار گیرد.



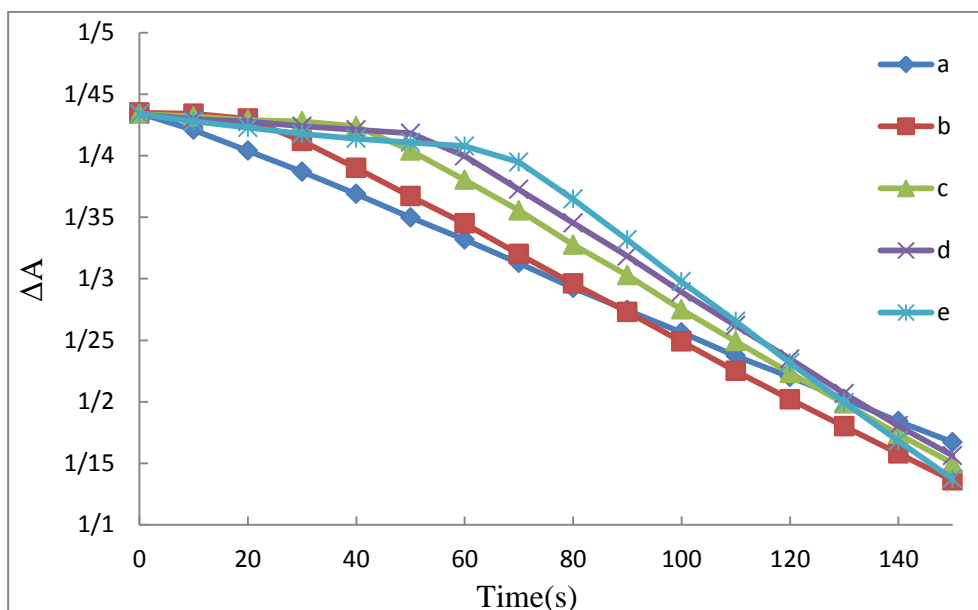
شکل (۳-۲): طیف جذبی سیستم واکنش

شرایط: پتاسیم برمید  $1/2 \times 10^{-3}$  مولار، نیتریک اسید  $0/12$  مولار، متاکرزول پرپل  $8/0 \times 10^{-5}$  مولار، پتاسیم برومات  $0/0010$  مولار، فاصله زمانی بین ثبت هر طیف ۱۵ ثانیه، دما  $25/0$  درجه سانتی گراد. الف) در غیاب ال-سیستئین ب) در حضور  $1/0$  میکروگرم بر میلی لیتر ال-سیستئین. a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k و l طیف‌های جذبی به ترتیب پس از ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۵، ۱۲۰، ۱۳۵، ۱۵۰، ۱۶۵ و ۲۲۰ ثانیه پس از شروع واکنش می‌باشند.

### ۳-۲-۴- طیف زمانی

به منظور بررسی اثر غلظت ال-سیستئین بر زمان القائی، در طول موج ۵۲۵ نانومتر و در فاصله زمانی ۰-۱۴۵ ثانیه داده‌های جذب بر حسب زمان در حضور چهار غلظت متفاوت از ال-سیستئین مطابق روش زیر ثبت شد:

به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۱/۰ میلی‌لیتر ال-سیستئین با غلظت‌های متفاوت، ۱/۰ میلی‌لیتر نیتریک‌اسید ۱/۲ مولار، ۱/۰ میلی‌لیتر متاکرزول پرپل  $۸/۰ \times ۱۰^{-۴}$  مولار و ۱/۰ میلی‌لیتر پتاسیم برمید  $۱/۲ \times ۱۰^{-۲}$  مولار اضافه گردید. محلول حاصل توسط آب مقطر تا حجم تقریبی ۸/۰ میلی‌لیتر رقیق شد. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم برومات  $۰/۰۱۰$  مولار اضافه شد و با افتادن آخرین قطره کرومومتر روشن شد. پس از به حجم رساندن و یکنواخت کردن محلول حاصل، مقدار معینی از محلول به سل دستگاه منتقل شد و در طول موج ۵۲۵ نانومتر در فاصله زمانی ۰-۱۴۵ ثانیه داده‌های جذب بر حسب زمان در غلظت‌های متفاوت ال-سیستئین رسم شد. همان‌طور که در شکل (۳-۳) نشان داده شده است، زمان القائی با افزایش غلظت ال-سیستئین افزایش می‌یابد.

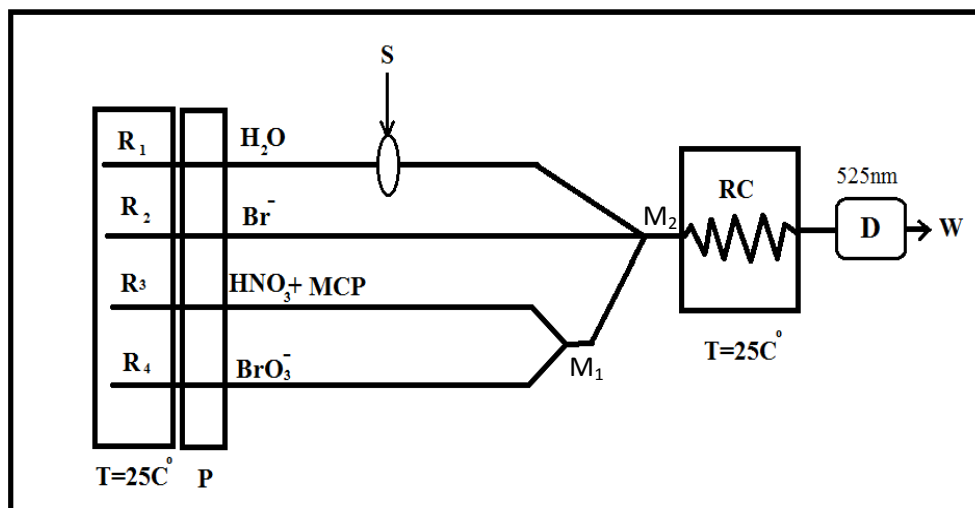


شکل (۳-۳): بررسی اثر غلظت ال-سیستئین بر زمان بازداری  
 شرایط: پتاسیم برمید  $1/2 \times 10^{-2}$  مولار، متاکرزول پرپل  $8/0 \times 10^{-5}$  مولار، نیتریک اسید  $0/12$  مولار، پتاسیم برومات  $0/010$  مولار، دمای  $25/0$  درجه سانتی‌گراد. a, b, c, d و e به ترتیب مربوط به ال-سیستئین با غلظت‌های  $0/0$  (نمونه شاهد)،  $0/5$ ،  $1/0$ ،  $1/5$  و  $2/5$  میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

### ۳-۲-۵- طراحی سیستم FIA

به منظور اندازه‌گیری ال-سیستئین با استفاده از ایجاد زمان القائی بر روی واکنش متاکرزول پرپل-برومات- برمید یک سیستم FIA مناسب طراحی گردید. در این طراحی سعی شد سیستم تا حد ممکن ساده و بدون پیچیدگی باشد. سیستم طراحی شده و همچنین چگونگی اختلاط واکنشگرها و تزریق نمونه در شکل (۳-۴) نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود در سیستم طراحی شده آب مقطر به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک ( $R_1$ ) و واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید، مخلوط نیتریک اسید همراه با متاکرزول پرپل و پتاسیم برومات به ترتیب از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) توسط پمپ پریستالتیک پمپ شدند. پس از اختلاط واکنشگرها در نقاط  $M_1$  و  $M_2$  و عبور از ماریپیج واکنش (RC) محلول به سمت آشکارساز حرکت کرده تا جذب ثابتی در طول موج  $525$  نانومتر ایجاد شود. محلول نمونه حاوی ال-سیستئین توسط سیستم تزریق در نقطه

(S) به جریان آبی تزریق شد. در اثر واکنش ال-سیستئین با برومات، غلظت برومات کاهش یافته و در نتیجه سرعت واکنش (۲-۳) کم می‌شود و مقدار کمتری متاکرزول پرپیل مصرف می‌شود و متاکرزول پرپیل بیشتری (نسبت به حالتی که ال-سیستئین وجود ندارد) به آشکارساز می‌رسد و اختلاف جذب آن در طول موج ۵۲۵ نانومتر افزایش می‌یابد. میزان افزایش جذب به عنوان سیگنال تجزیه‌ای ثبت می‌شود که با غلظت ال-سیستئین متناسب است.



شکل (۳-۴): طرح سیستم FIA برای اندازه‌گیری ال-سیستئین

R<sub>1</sub>: جریان حامل (آب مقطر)، R<sub>2</sub>: پتاسیم برمید، R<sub>3</sub>: مخلوط نیتریک‌اسید و متاکرزول پرپیل، R<sub>4</sub>: پتاسیم برومات، P: پمپ پرستالتیک، S: نمونه تزریقی حاوی ال-سیستئین، RC: ماریپج واکنش، D: آشکارساز، W: فاضلاب

### ۳-۳- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سیستم واکنش

به منظور فراهم نمودن بهترین حساسیت و در نتیجه بهترین حد تشخیص، متغیرهای مؤثر بر سرعت واکنش و در نتیجه زمان بازداری ال-سیستئین بر واکنش برومات با متاکرزول پرپیل، مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی پارامترهای مؤثر، ابتدا از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان استفاده گردید. در این روش همه متغیرها ثابت در نظر گرفته می‌شدند و فقط پارامتری که باید بهینه شود، تغییر داده می‌شد. سپس به دلیل برهمکنش واکنشگرها با یکدیگر از روش بهینه‌سازی طراحی فاکتوریل استفاده گردید که در این روش همه متغیرهای غلظتی همزمان با هم تغییر داده شدند و بهینه شدند. پارامترهای بررسی شده عبارتند از:

۱- نوع اسید

۲- غلظت اسید

۳- غلظت پتاسیم برومات

۴- غلظت پتاسیم برمید

۵- غلظت متاکرزول پرپیل

۶- سرعت جریان حامل (آب)

۷- سرعت جریان واکنشگرها

۸- طول مارپیچ واکنش

۹- حجم تزریقی نمونه

۱۰- دما

۱۱- قدرت یونی

عامل‌های ۱ الی ۹ ابتدا توسط روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با توجه به مقادیر بهینه، این عوامل توسط روش طرح فاکتوریل برهمکنش بین آنها مشخص گردید و در انتها نیز پارامترهای دما و قدرت یونی در شرایط بهینه طرح فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفتند.

### ۳-۳-۱- روش کار در بررسی و بهینه‌سازی متغیرها

کلیه محلول‌های مورد استفاده و مارپیچ واکنش قبل از هر آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه به حمام آب ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید و برای انجام تمام اندازه‌گیری‌ها به ترتیب زیر عمل شد:

با توجه به سیستم طراحی شده که در شکل (۳-۴) نشان داده شده است، آب‌مقطر به عنوان جریان‌حامل از کانال شماره یک ( $R_1$ ) و واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید، مخلوط نیتریک‌اسید همراه با متاکرزول‌پرپیل و پتاسیم برومات با غلظت‌های معین به ترتیب از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) توسط پمپ پریستالتیک پمپ شدند. پس از اختلاط واکنشگرها و عبور از مارپیچ واکنش ( $RC$ ) محلول به سمت آشکارساز حرکت کرده تا جذب ثابتی در طول موج ۵۲۵ نانومتر ایجاد شود. محلول نمونه حاوی ال-سیستئین با غلظت مشخص توسط سیستم تزریق به طور متوالی سه بار در نقطه ( $S$ ) به جریان آبی تزریق شد. تزریق ال-سیستئین سبب بازداری واکنش برومات با متاکرزول‌پرپیل شده و باعث افزایش جذب مخلوط واکنشگرها در طول موج ۵۲۵ نانومتر گردید که میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد.



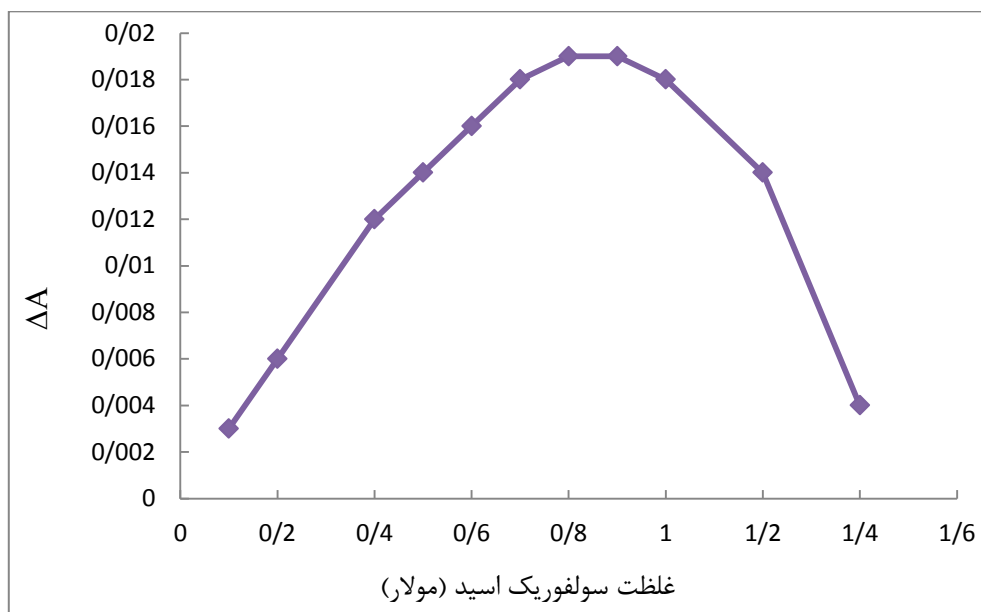
### ۲-۳-۳- بررسی اثر نوع اسید و مقدار بهینه آن

در دمای ثابت ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۹۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر اثر سه اسید متفاوت سولفوریک، نیتریک و هیدروکلریک اسید مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر نوع اسید بر روی سیگنال جذبی به ترتیب زیر عمل شد:

در این بررسی آب مقطر به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت ۳۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید  $5/0 \times 10^{-3}$  مولار و مخلوط متاکرزول‌پرپل  $1/85 \times 10^{-4}$  مولار با اسیدهای مورد بررسی به صورت مجزا در هر آزمایش به ترتیب سولفوریک، نیتریک و هیدروکلریک‌اسید با غلظت‌های مختلف و پتاسیم برومات ۰/۰۲۵ مولار به ترتیب از کانال‌های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) توسط پمپ پرستالتیک با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب در طول موج ۵۲۵ نانومتر محلول نمونه حاوی ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط سیستم تزریق در نقطه (S) به جریان آبی تزریق و هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد. تزریق ال-سیستئین سبب بازداری واکنش برومات با متاکرزول‌پرپل شده و باعث افزایش جذب مخلوط واکنشگرها در طول موج ۵۲۵ نانومتر گردید که میزان افزایش جذب نیز توسط ثبات ثبت شد. میانگین نتایج حاصل از این بررسی در جدول‌های (۲-۳)، (۳-۳) و (۴-۳) و شکل‌های (۳-۵)، (۳-۶) و (۳-۷) آمده است.

جدول (۳-۲): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید بر روی اختلاف جذب

| غلظت سولفوریک اسید (مولار) | اختلاف جذب |
|----------------------------|------------|
| ۰/۱۰                       | ۰/۰۰۳      |
| ۰/۲۰                       | ۰/۰۰۶      |
| ۰/۴۰                       | ۰/۰۱۲      |
| ۰/۵۰                       | ۰/۰۱۴      |
| ۰/۶۰                       | ۰/۰۱۶      |
| ۰/۷۰                       | ۰/۰۱۸      |
| ۰/۸۰                       | ۰/۰۱۹      |
| ۰/۹۰                       | ۰/۰۱۹      |
| ۱/۰                        | ۰/۰۱۸      |
| ۱/۲                        | ۰/۰۱۴      |
| ۱/۴                        | ۰/۰۰۴      |

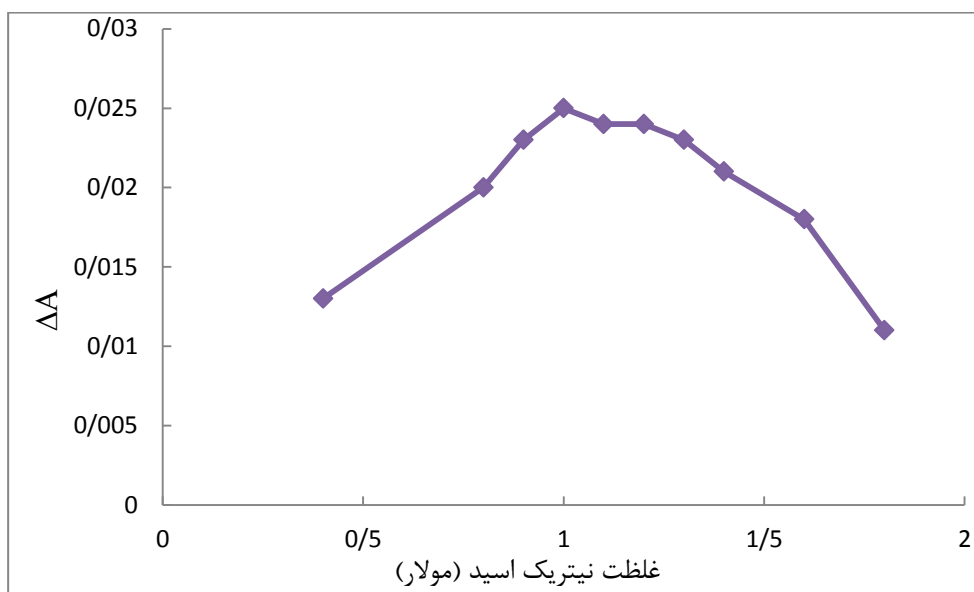


شکل (۳-۵): بررسی اثر غلظت سولفوریک اسید بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، پتاسیم برومات ۰/۰۲۵ مولار، پتاسیم برمید  $۵/۰ \times ۱۰^{-۳}$  مولار، متاکرزول پرپیل  $۱/۸۵ \times ۱۰^{-۴}$  مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول ماریچ ۹۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۰/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

جدول (۳-۳): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت نیتریک اسید بر روی اختلاف جذب

| غلظت نیتریک اسید (مولار) | اختلاف جذب |
|--------------------------|------------|
| ۰/۴۰                     | ۰/۰۱۳      |
| ۰/۸۰                     | ۰/۰۲۰      |
| ۰/۹۰                     | ۰/۰۲۳      |
| ۱/۰                      | ۰/۰۲۵      |
| ۱/۱                      | ۰/۰۲۴      |
| ۱/۲                      | ۰/۰۲۴      |
| ۱/۳                      | ۰/۰۲۳      |
| ۱/۴                      | ۰/۰۲۱      |
| ۱/۶                      | ۰/۰۱۸      |
| ۱/۸                      | ۰/۰۱۱      |

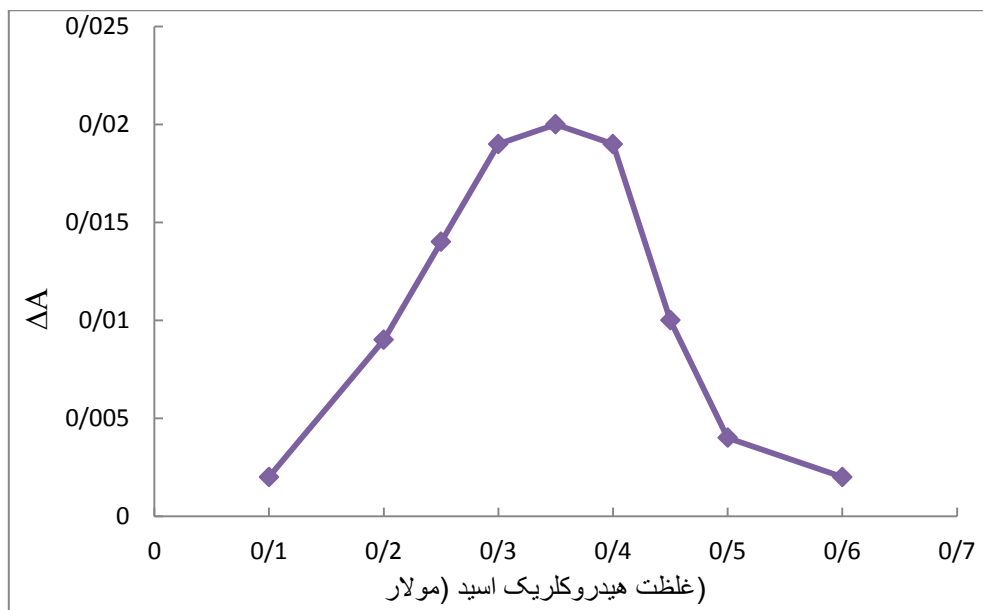


شکل (۳-۶): بررسی اثر غلظت نیتریک اسید بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستمین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، پتاسیم برومات ۰/۰۲۵ مولار، پتاسیم برمید  $۵/۰ \times ۱۰^{-۳}$  مولار، متاکرزول پرپل  $۱/۸۵ \times ۱۰^{-۴}$  مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ ۹۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۰/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

جدول (۳-۴): نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت هیدروکلریک اسید بر روی اختلاف جذب

| غلظت هیدروکلریک اسید (مولار) | اختلاف جذب |
|------------------------------|------------|
| ۰/۱۰                         | ۰/۰۰۲      |
| ۰/۲۰                         | ۰/۰۰۹      |
| ۰/۲۵                         | ۰/۰۱۴      |
| ۰/۳۰                         | ۰/۰۱۹      |
| ۰/۳۵                         | ۰/۰۲۰      |
| ۰/۴۰                         | ۰/۰۱۹      |
| ۰/۴۵                         | ۰/۰۱۰      |
| ۰/۵۰                         | ۰/۰۰۴      |
| ۰/۶۰                         | ۰/۰۰۲      |



شکل (۳-۷): بررسی اثر غلظت هیدروکلریک اسید بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال-سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، پتاسیم برومات ۰/۰۲۵ مولار، پتاسیم برمید  $۵/۰ \times ۱۰^{-۳}$  مولار، متاکرزول پریل  $۱/۸۵ \times ۱۰^{-۴}$  مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول ماریچ ۹۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۰/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین تغییرات جذب و در نتیجه بیشترین حساسیت در غلظت‌های ۰/۹ مولار سولفوریک‌اسید، ۱/۰ مولار نیتریک‌اسید و ۰/۳۵ مولار هیدروکلریک‌اسید مشاهده می‌شود. لذا به دلیل اینکه یون نیترات نسبت به یون کلرات و سولفات واکنش‌پذیری کمتری داشته و احتمال واکنش آن با کاتیون‌های موجود در نمونه‌های حقیقی (در نتیجه ایجاد مزاحمت) کمتر است، به عنوان اسید بهینه انتخاب گردید.

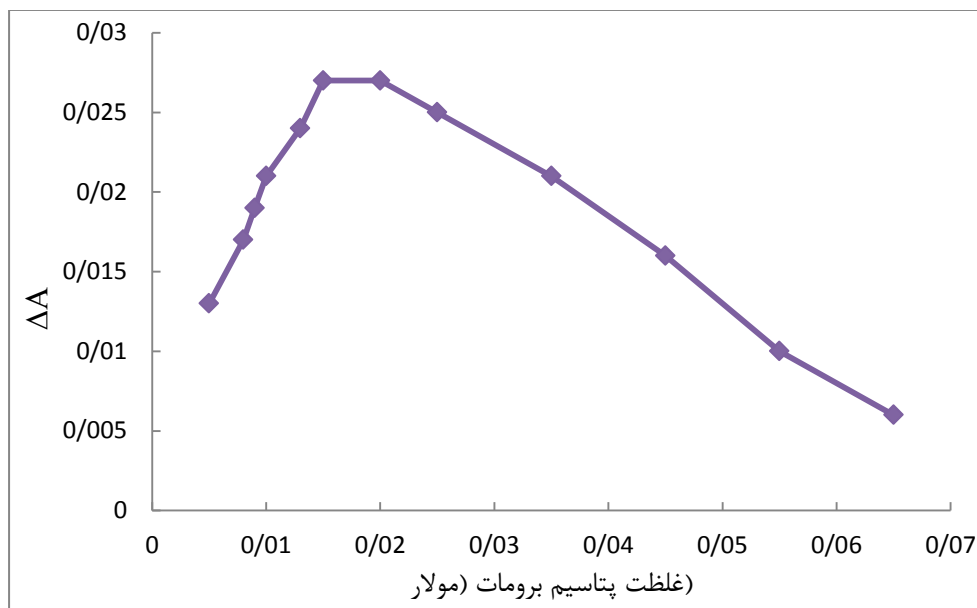
همچنین با توجه به نتایج بدست آمده از جدول (۳-۳) و شکل (۳-۶) می‌توان گفت که با افزایش غلظت اسید، به دلیل افزایش خاصیت اکسیدکنندگی، سرعت واکنش تولید برم افزایش می‌یابد و متناسب با آن جذب نمونه شاهد کاهش می‌یابد. لذا سیگنال تجزیه‌ای افزایش یافته و بیشترین سیگنال تجزیه‌ای نیز در غلظت ۱/۰ مولار از نیتریک‌اسید مشاهده می‌شود. با افزایش بیشتر غلظت اسید به دلیل کاهش اثر بازداري ال-سیستئین، سیگنال تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. بنابراین غلظت ۱/۰ مولار نیتریک‌اسید به عنوان غلظت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

### ۳-۳-۳- بررسی اثر غلظت پتاسیم برومات

در این بررسی اثر غلظت پتاسیم برومات بر روی سیگنال تجزیه‌ای در ناحیه غلظتی ۰/۰۰۵۰ تا ۰/۰۶۵ مولار در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۹۵ سانتی‌متر، حجم تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۴) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید  $۵/۰ \times ۱۰^{-۳}$  مولار، مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپل  $۱/۸۵ \times ۱۰^{-۴}$  مولار و پتاسیم برومات با غلظت‌های متفاوت به ترتیب از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک ( $R_1$ ) با سرعت ۳۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب در ۵۲۵ نانومتر محلول نمونه حاوی ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محل (S) به سیستم تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۵) و شکل (۳-۸) آمده است. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که با افزایش غلظت پتاسیم برومات سرعت واکنش تولید برم افزایش می‌یابد و متناسب با آن جذب شاهد کاهش می‌یابد لذا سیگنال تجزیه‌ای و در نتیجه حساسیت افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر غلظت پتاسیم برومات اثر بازداری ال-سیستئین کاهش یافته، در نتیجه سیگنال تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. لذا غلظت ۰/۰۲۰ مولار پتاسیم برومات به عنوان غلظت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

جدول (۳-۵): نتایج حاصل از بررسی غلظت پتاسیم برومات بر روی اختلاف جذب

| غلظت پتاسیم برومات (مولار) | اختلاف جذب |
|----------------------------|------------|
| ۰/۰۰۵۰                     | ۰/۰۱۳      |
| ۰/۰۰۸۰                     | ۰/۰۱۷      |
| ۰/۰۰۹۰                     | ۰/۰۱۹      |
| ۰/۰۱۰                      | ۰/۰۲۱      |
| ۰/۰۱۳                      | ۰/۰۲۴      |
| ۰/۰۱۵                      | ۰/۰۲۷      |
| ۰/۰۲۰                      | ۰/۰۲۷      |
| ۰/۰۲۵                      | ۰/۰۲۵      |
| ۰/۰۳۵                      | ۰/۰۲۱      |
| ۰/۰۴۵                      | ۰/۰۱۶      |
| ۰/۰۵۵                      | ۰/۰۱۰      |
| ۰/۰۶۵                      | ۰/۰۰۶      |



شکل (۳-۸): بررسی اثر غلظت پتاسیم برومات بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستمین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، پتاسیم برمید  $۵/۰ \times 10^{-3}$  مولار، متاکرزول پرپل  $۱/۸۵ \times 10^{-4}$  مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول ماریچ ۹۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۰/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

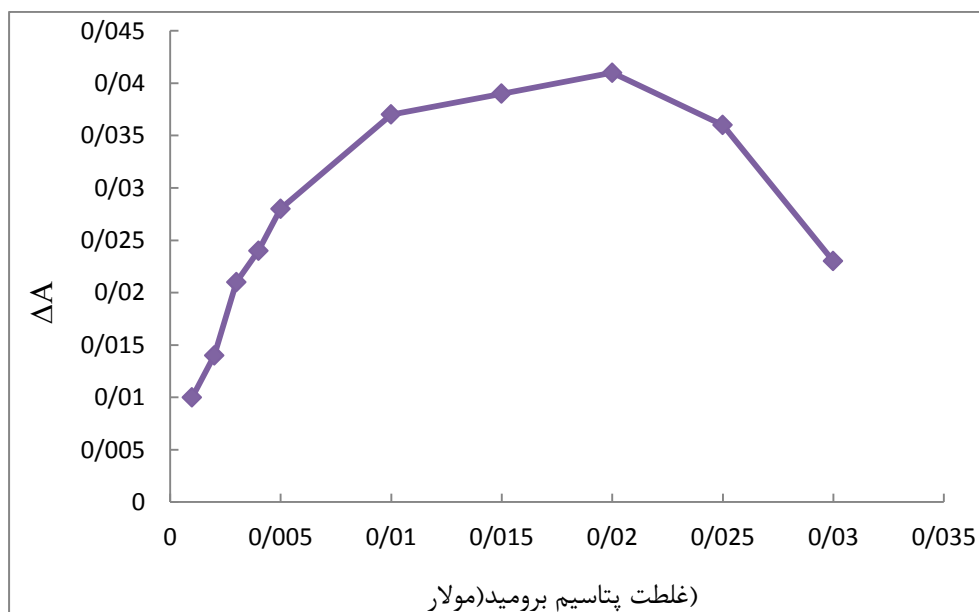
### ۳-۳-۴ - بررسی اثر غلظت پتاسیم برمید

در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۹۵ سانتی‌متر، حجم تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، اثر غلظت پتاسیم برمید بر روی سیگنال تجزیه‌ای در ناحیه غلظتی  $1/0 \times 10^{-3}$  تا  $3/0 \times 10^{-2}$  مولار مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۴) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید در ناحیه غلظتی  $1/0 \times 10^{-3}$  تا  $3/0 \times 10^{-2}$  مولار، مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول‌پرپل  $1/85 \times 10^{-4}$  مولار و پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار به ترتیب از کانال‌های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت ۳۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب در ۵۲۵ نانومتر محلول نمونه حاوی ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سیستم تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۶) و شکل (۳-۹) آمده است. نتایج بدست آمده بیانگر این هستند که با افزایش غلظت پتاسیم برمید تا  $2/0 \times 10^{-2}$  مولار سرعت واکنش تولید برم افزایش می‌یابد و متناسب با آن جذب شاهد کاهش می‌یابد، لذا سیگنال تجزیه‌ای (اختلاف جذب) و در نتیجه حساسیت افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر غلظت پتاسیم برمید به دلیل اثر کاتالیزوری برمید میزان بازداری ال-سیستئین کاهش می‌یابد، لذا سیگنال تجزیه‌ای نیز کاهش می‌یابد. بنابراین غلظت  $2/0 \times 10^{-2}$  مولار پتاسیم برمید که در آن بیشترین سرعت واکنش شاهد و کمترین سرعت واکنش در حضور ال-سیستئین وجود دارد، به عنوان غلظت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.



جدول (۳-۶): نتایج حاصل از بررسی غلظت پتاسیم برمید بر روی اختلاف جذب

| غلظت پتاسیم برمید (مولار) | اختلاف جذب |
|---------------------------|------------|
| ۰/۰۰۱                     | ۰/۰۱۰      |
| ۰/۰۰۲                     | ۰/۰۱۴      |
| ۰/۰۰۳                     | ۰/۰۲۱      |
| ۰/۰۰۴                     | ۰/۰۲۴      |
| ۰/۰۰۵                     | ۰/۰۲۸      |
| ۰/۰۱۰                     | ۰/۰۳۷      |
| ۰/۰۱۵                     | ۰/۰۳۹      |
| ۰/۰۲۰                     | ۰/۰۴۱      |
| ۰/۰۲۵                     | ۰/۰۳۶      |
| ۰/۰۳۰                     | ۰/۰۲۳      |



شکل (۳-۹): بررسی اثر غلظت پتاسیم برمید بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستمین ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $1/85 \times 10^{-4}$  مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ ۹۵ سانتیمتر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت.

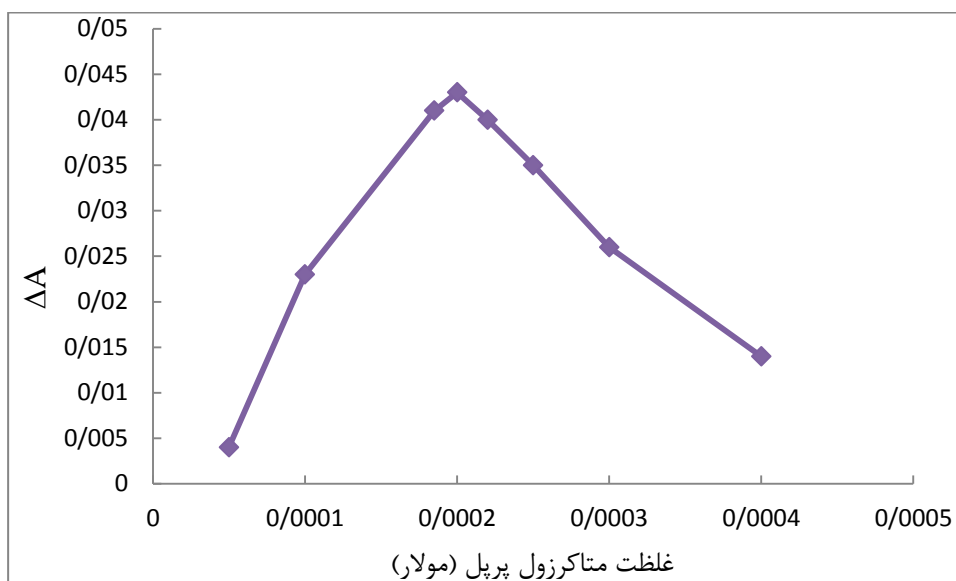
### ۳-۳-۵- بررسی اثر غلظت متاکرزول پرپل

در دمای ثابت ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۹۵ سانتی‌متر، حجم تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر اثر غلظت متاکرزول پرپل بر روی سیگنال تجزیه‌ای در ناحیه غلظتی  $۵/۰ \times ۱۰^{-۵}$  تا  $۴/۰ \times ۱۰^{-۴}$  مولار مورد بررسی قرار گرفت و مطابق روش زیر عمل شد:

از کانال شماره یک ( $R_1$ ) آب مقطر به عنوان جریان حامل با سرعت ۳۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) به ترتیب پتاسیم برمید  $۲/۰ \times ۱۰^{-۲}$  مولار، مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با غلظت‌های متفاوت از متاکرزول پرپل و پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب محلول نمونه حاوی ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۷) و شکل (۳-۱۰) آمده است. نتایج بدست آمده بیانگر این هستند که با افزایش غلظت متاکرزول پرپل تا  $۲/۰ \times ۱۰^{-۴}$  مولار سرعت واکنش (۳-۲) افزایش می‌یابد و متناسب با آن جذب شاهد کاهش می‌یابد لذا سیگنال تجزیه‌ای و در نتیجه حساسیت افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر غلظت متاکرزول پرپل به دلیل کاهش میزان اثر بازداری ال-سیستئین، سیگنال تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. بنابراین غلظت  $۲/۰ \times ۱۰^{-۴}$  مولار متاکرزول پرپل به عنوان غلظت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

جدول (۳-۷): نتایج حاصل از بررسی غلظت متاکرزول پرپل بر روی اختلاف جذب

| غلظت متاکرزول<br>پرپل (مولار) | اختلاف جذب |
|-------------------------------|------------|
| $5/0 \times 10^{-5}$          | ۰/۰۰۴      |
| $1/0 \times 10^{-4}$          | ۰/۰۲۳      |
| $1/85 \times 10^{-4}$         | ۰/۰۴۱      |
| $2/0 \times 10^{-4}$          | ۰/۰۴۳      |
| $2/2 \times 10^{-4}$          | ۰/۰۴۰      |
| $2/5 \times 10^{-4}$          | ۰/۰۳۵      |
| $3/0 \times 10^{-4}$          | ۰/۰۲۶      |
| $4/0 \times 10^{-4}$          | ۰/۰۱۴      |



شکل (۳-۱۰): بررسی اثر غلظت متاکرزول پرپل بر روی اختلاف جذب

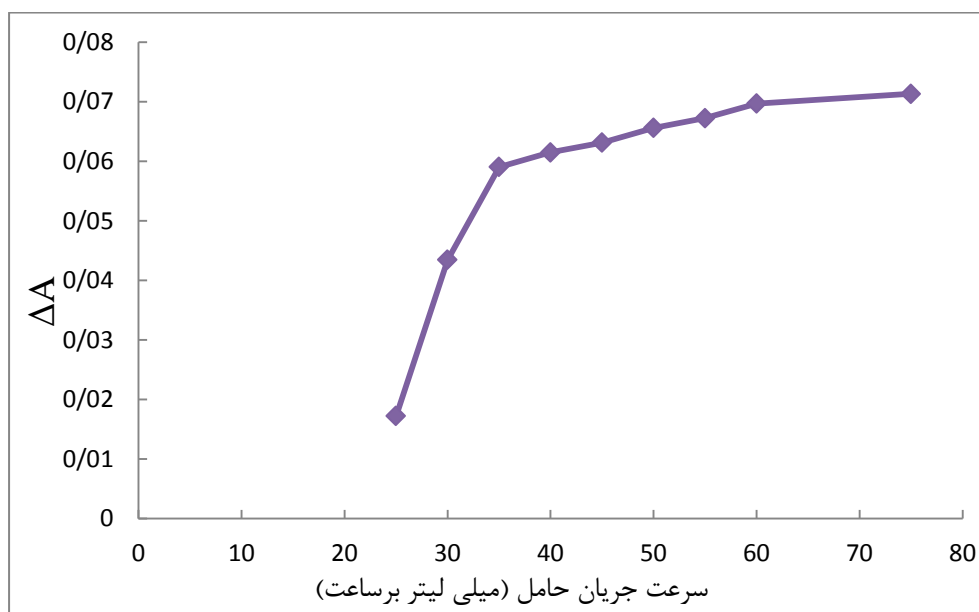
شرایط: ال-سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، اندازه مارپیچ ۹۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت.

### ۳-۳-۶- بررسی اثر سرعت جریان حامل

در این بررسی اثر سرعت جریان حامل بر روی سیگنال تجزیه‌ای در محدوده ۲۵/۰-۷۵/۰ میلی لیتر بر ساعت در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۹۵ سانتی‌متر، حجم تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۳) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار، مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار و متاکرزول پرپیل  $۲/۰ \times ۱۰^{-۴}$  مولار و پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار به ترتیب از کانال‌های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت‌های متفاوت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب محلول نمونه حاوی ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثابت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۸) و شکل (۳-۱۱) آمده است. نتایج حاصل نشان می‌دهند که با افزایش سرعت جریان حامل تا ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت به دلیل اینکه جذب شاهد کاهش می‌یابد، سیگنال تجزیه‌ای و در نتیجه حساسیت روش افزایش می‌یابد. در ناحیه ۳۵/۰ تا ۷۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت به دلیل اینکه جذب شاهد تقریباً ثابت است، سیگنال تجزیه‌ای روند افزایشی کمتری داشته است. لذا سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت به دلیل نویز کمتر در خط پایه و تنظیم بهتر سرعت جریان به عنوان سرعت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

جدول (۳-۸): نتایج حاصل از بررسی سرعت جریان حامل بر روی اختلاف جذب

| سرعت جریان حامل (ml/h) | اختلاف جذب |
|------------------------|------------|
| ۲۵                     | ۰/۰۱۷      |
| ۳۰                     | ۰/۰۴۳      |
| ۳۵                     | ۰/۰۵۹      |
| ۴۰                     | ۰/۰۶۱      |
| ۴۵                     | ۰/۰۶۳      |
| ۵۰                     | ۰/۰۶۵      |
| ۵۵                     | ۰/۰۶۷      |
| ۶۰                     | ۰/۰۷۰      |
| ۷۵                     | ۰/۰۷۱      |



شکل (۳-۱۱): بررسی اثر سرعت جریان حامل بر روی اختلاف جذب

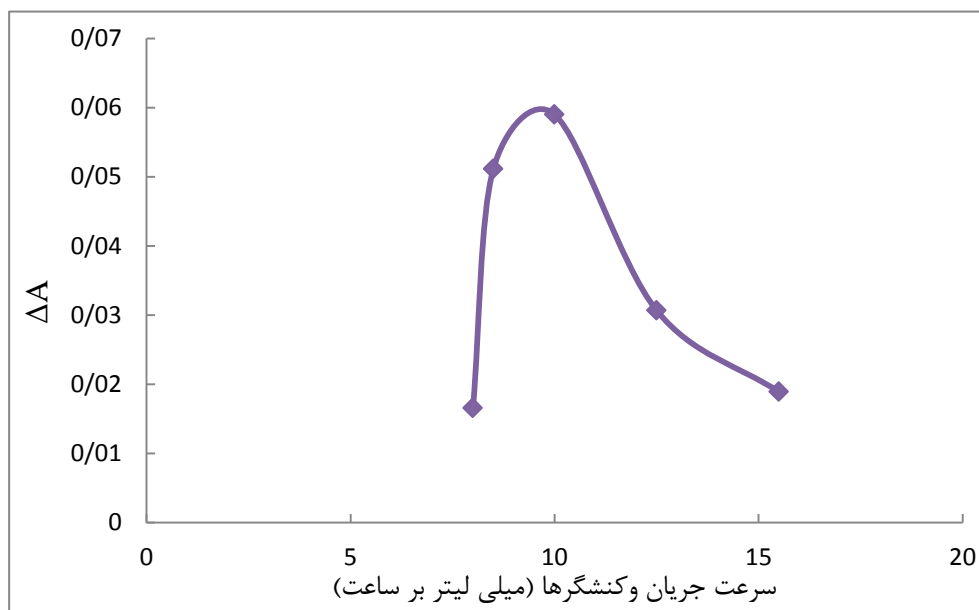
شرایط: ال - سیستمین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $۲/۰ \times 10^{-4}$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ ۹۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

### ۳-۳-۷- بررسی اثر سرعت جریان واکنشگرها

در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۹۵ سانتی‌متر، حجم تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر اثر سرعت جریان واکنشگرها بر روی سیگنال تجزیه‌ای در محدوده ۸/۰-۱۵/۵ میلی‌لیتر بر ساعت مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۳) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار و مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار و متاکرزول پرپل  $۲/۰ \times ۱۰^{-۴}$  مولار و پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار به ترتیب از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) با سرعت‌های متفاوت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک ( $R_1$ ) با سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب، محلول ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سیستم تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۹) و شکل (۳-۱۰) آمده است. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت با افزایش سرعت جریان واکنشگرها جذب شاهد کاهش می‌یابد لذا سیگنال تجزیه‌ای (اختلاف جذب) و در نتیجه حساسیت روش افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر سرعت جریان واکنشگرها اثر بازداری ال-سیستئین کاهش یافته و در نتیجه سیگنال تجزیه‌ای کاهش می‌یابد. لذا سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت به عنوان سرعت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

جدول (۳-۹): نتایج حاصل از بررسی سرعت واکنشگرها بر روی اختلاف جذب

| سرعت واکنشگرها (ml/h) | اختلاف جذب |
|-----------------------|------------|
| ۸                     | ۰/۰۱۷      |
| ۸/۵                   | ۰/۰۵۱      |
| ۱۰                    | ۰/۰۵۹      |
| ۱۲/۵                  | ۰/۰۳۱      |
| ۱۵/۵                  | ۰/۰۱۹      |



شکل (۳-۱۲): بررسی اثر سرعت واکنشگرها بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $۲/۰ \times 10^{-4}$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ ۹۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت.

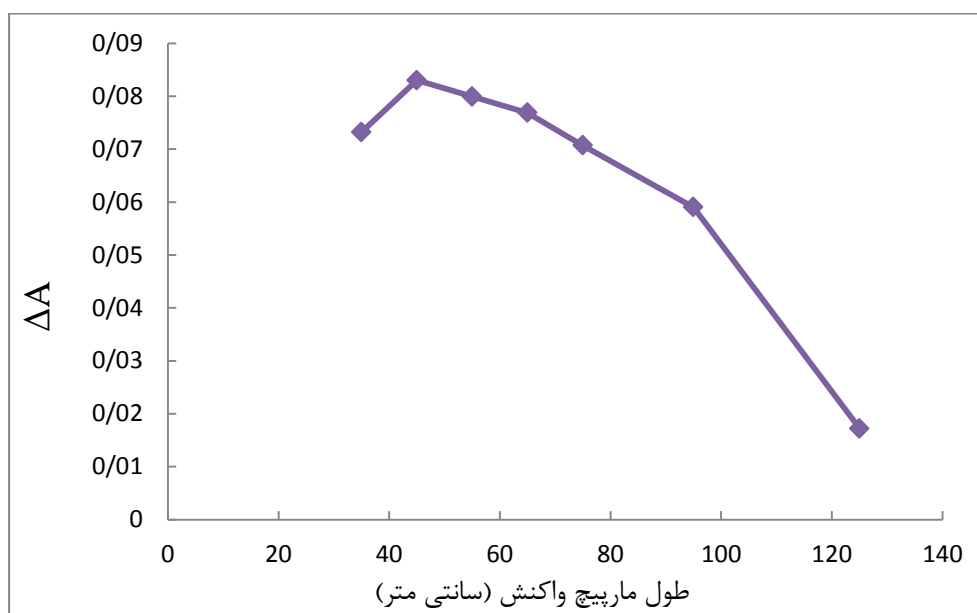
### ۳-۳-۸- بررسی اثر طول ماریپیچ واکنش

به منظور ایجاد پاشیدگی محوری و مخلوط شدن شعاعی نمونه و واکنشگر که منجر به پیک‌های متقارن‌تری می‌شوند از ماریپیچ واکنش استفاده شد. در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر اثر طول ماریپیچ واکنش بر روی سیگنال تجزیه‌ای در گستره ۱۲۵-۳۵ Cm مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۴) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار و مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپیل  $10^{-4} \times 2/0$  مولار و پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار به ترتیب از کانال-های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. در هر آزمایش طول ماریپیچ واکنش تغییر داده شد و پس از ثابت شدن جذب، محلول ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۱۰) و شکل (۳-۱۲) آمده است. انتظار می‌رود که با افزایش طول ماریپیچ واکنش به دلیل افزایش زمان انجام واکنش و کاهش جذب شاهد، حساسیت افزایش یابد در حالی که ماریپیچ‌های بلندتر باعث پهن‌شدگی پیک‌ها و همچنین کاهش اثر بازداری ال-سیستئین شده و در نتیجه حساسیت کاهش می‌یابد. این دو اثر معکوس باعث شده است که با افزایش طول ماریپیچ واکنش تا ۴۵ سانتی‌متر شکل (۳-۱۲) حساسیت به میزان اندکی افزایش یافته و در ماریپیچ‌های واکنش بلندتر کاهش یابد. لذا طول ماریپیچ واکنش ۴۵ سانتی‌متر به عنوان طول ماریپیچ بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد تا علاوه بر حساسیت بالا، سرعت آنالیز نیز افزایش یابد.



جدول (۳-۱۰): نتایج حاصل از بررسی اندازه ماریپیج واکنش بر روی اختلاف جذب

| طول ماریپیج واکنش (سانتی متر) | اختلاف جذب |
|-------------------------------|------------|
| ۳۵                            | ۰/۰۷۳      |
| ۴۵                            | ۰/۰۸۳      |
| ۵۵                            | ۰/۰۸۰      |
| ۶۵                            | ۰/۰۷۷      |
| ۷۵                            | ۰/۰۷۰      |
| ۹۵                            | ۰/۰۵۹      |
| ۱۲۵                           | ۰/۰۱۷      |



شکل (۳-۱۳): بررسی اثر طول ماریپیج واکنش بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستمین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپیل  $۲/۰ \times ۱۰^{-۴}$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، حجم نمونه تزریقی ۲۲۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

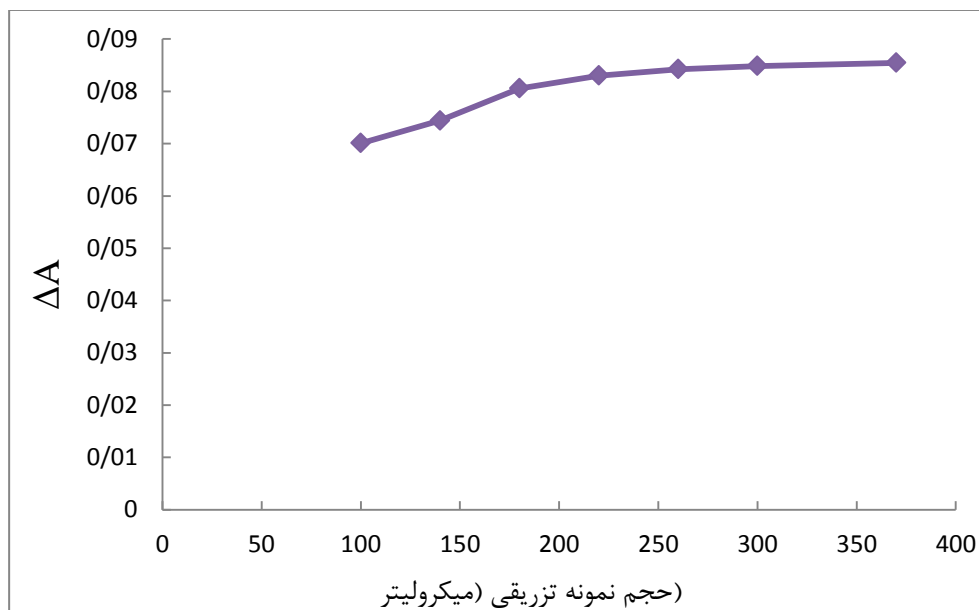
### ۳-۳-۹- بررسی اثر حجم نمونه تزریقی

لوپ تزریق برای اندازه‌گیری نمونه‌های با حجم کم مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور بررسی اثر حجم نمونه تزریقی بر روی سیگنال تجزیه‌ای در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول ماریپیج واکنش ۴۵ سانتی‌متر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر از لوپ‌هایی با حجم‌های متفاوت در گستره ۱۰۰ تا ۳۷۰ میکرولیتر استفاده شد و مطابق روش زیر عمل شد:

ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید ۰/۲۰ / مولار و مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپل  $۱۰^{-۴} \times ۲/۰$  مولار و پتاسیم برومات ۰/۲۰ مولار به ترتیب از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) با سرعت‌های متفاوت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک ( $R_1$ ) با سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب در هر آزمایش توسط لوپ‌هایی با طول متفاوت، حجم مشخصی از محلول ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک ( $R_1$ ) تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۱۱) و شکل (۳-۱۳) آمده است. نتایج نشان می‌دهد با افزایش حجم لوپ تا ۲۲۰ میکرولیتر مقدار ال-سیستئین وارد شده بیشتر شده، متناسب با آن اثر بازداری نیز بیشتر شده و سیگنال تجزیه‌ای افزایش می‌یابد ولی با افزایش حجم لوپ به علت ثابت شدن جذب نمونه شاهد، تغییر چندانی در سیگنال تجزیه‌ای مشاهده نمی‌شود. لذا لوپ با حجم ۲۲۰ میکرولیتر به عنوان حجم تزریقی نمونه بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

جدول (۳-۱۱): نتایج حاصل از بررسی حجم لوپ تزریق بر روی اختلاف جذب

| طول لوپ (cm) | حجم لوپ (μL) | اختلاف جذب |
|--------------|--------------|------------|
| ۲۰           | ۱۰۰          | ۰/۰۷۰      |
| ۲۸           | ۱۴۰          | ۰/۰۷۴      |
| ۳۶           | ۱۸۰          | ۰/۰۸۱      |
| ۴۴           | ۲۲۰          | ۰/۰۸۳      |
| ۵۲           | ۲۶۰          | ۰/۰۸۴      |
| ۵۹           | ۳۰۰          | ۰/۰۸۵      |
| ۷۴           | ۳۷۰          | ۰/۰۸۵      |



شکل (۳-۱۴): بررسی اثر حجم نمونه تزریقی بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال - سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $2/0 \times 10^{-4}$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۲۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ واکنش ۴۵ سانتی متر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

### ۳-۳-۱۰- نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان

نتایج به دست آمده در بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر عملکرد سیستم به روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان در جدول (۳-۱۲) نشان داده شده است.

جدول (۳-۱۲): نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان برای اندازه‌گیری ال - سیستمین

| نوع اسید                    | نیتریک اسید          |
|-----------------------------|----------------------|
| طول موج (nm)                | ۵۲۵                  |
| غلظت نیتریک اسید (M)        | ۱/۰                  |
| غلظت پتاسیم برومات (M)      | ۰/۰۲۰                |
| غلظت پتاسیم برمید (M)       | ۰/۰۲۰                |
| غلظت متاکرزول پرپیل (M)     | $۲/۰ \times ۱۰^{-۴}$ |
| سرعت جریان واکنشگرها (mL/h) | ۱۰/۰                 |
| سرعت جریان حامل (mL/h)      | ۳۵/۰                 |
| طول مارپیچ واکنش (cm)       | ۴۵                   |
| حجم نمونه تزریقی ( $\mu$ L) | ۲۲۰                  |

### ۳-۴- بررسی عوامل تأثیرگذار و بهینه سازی عوامل مؤثر بر اندازه‌گیری

#### ال- سیستمین با استفاده از طراحی آزمایش<sup>۱</sup> (DOE)

هدف از بکارگیری تکنیک‌های مختلف طراحی آزمایش‌ها، شناسایی عوامل مؤثر در فرآیند و تعیین مقادیر بهینه می‌باشد. با کمک تکنیک‌های DOE می‌توان اولاً متغیرهایی که بیشترین تأثیر را در خروجی دارند، تعیین کرد. ثانياً متغیرهای ورودی مؤثر را به گونه‌ای تعیین کرد که مقادیر پاسخ را به مقدار بهینه واقعی خود نزدیک کرده، تغییرپذیری آنها را کوچک نموده و تأثیر عوامل غیرقابل کنترل را بر متغیر پاسخ مینیمم نمود. بدین منظور از روش غربالگری طرح پلاکت- برمن برای ارزیابی عوامل مؤثر و همچنین از روش بهینه‌سازی طرح باکس- بنکن برای بدست آوردن مقادیر بهینه عوامل مؤثر استفاده شده است.

#### ۳-۴-۱- ارزیابی عوامل مؤثر با استفاده از طرح پلاکت- برمن

همانطور که در قسمت‌های قبل دیده شده است عواملی نظیر: غلظت نیتریک‌اسید، غلظت پتاسیم برمید، غلظت متاکرزول‌پرپیل، غلظت پتاسیم برومات، سرعت جریان حامل، سرعت جریان واکنشگرها، طول مارپیچ واکنش و حجم نمونه تزریقی در میزان پاسخ آشکارساز و حساسیت روش مؤثر می‌باشند. از طرف دیگر احتمال برهمکنش متغیرها وجود دارد و در نتیجه شرایط حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان نمی‌تواند شرایط بهینه واقعی باشد. بنابراین لازم است اثر عوامل مؤثر بر حساسیت به روش‌های بهینه‌سازی همزمان مورد بررسی قرار گیرد در این پروژه از طرح فاکتوریل برای بررسی برهمکنش‌ها و بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر حساسیت استفاده گردید. بهینه‌سازی به روش طرح

فاکتوریل مستلزم یافتن مهمترین عوامل موثر بر حساسیت و بهینه‌سازی آنها می‌باشد. در ادامه، مراحل انجام کار در بهینه‌سازی همزمان متغیرها به روش طرح فاکتوریل آورده شده است.

### ۳-۴-۱-۱- تعیین سطح عوامل

برای بررسی و تشخیص عوامل مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، طرح پلاکت- برمن انتخاب گردید. در این طرح سطوح بالا و پایین هر عامل توسط اطلاعات بدست آمده از روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان مشخص شد. سطوح انتخاب شده برای عوامل در جدول (۳-۱۳) آورده شده است.

جدول (۳-۱۳): تعیین سطح عوامل موثر بر اندازه‌گیری ال-سیستئین

| عامل                        | علامت                | سطح بالا (+) | سطح پایین (-) |
|-----------------------------|----------------------|--------------|---------------|
| غلظت نیتریک اسید (M)        | Nitric Acid(NA)      | ۱/۰          | ۰/۴           |
| غلظت پتاسیم برمید (M)       | KBr                  | ۰/۰۱۵        | ۰/۰۰۳         |
| غلظت متاکرزول پرپل (M)      | MCP                  | ۰/۰۰۰۲۵      | ۰/۰۰۰۱۵       |
| غلظت پتاسیم برومات (M)      | KBrO <sub>3</sub>    | ۰/۰۱۵        | ۰/۰۰۵         |
| سرعت جریان حامل (mL/h)      | Carrier Flow(CF)     | ۴۰           | ۲۵            |
| سرعت جریان واکنشگرها (mL/h) | Reactant Flow(RF)    | ۱۲/۵         | ۸/۵           |
| طول مارپیچ واکنش (cm)       | Coil length(CL)      | ۹۵           | ۴۵            |
| حجم نمونه تزریقی (μL)       | Injection volume(IV) | ۳۷۰          | ۱۴۰           |

در این آزمایش میزان پاسخ آشکارساز، افزایش جذب در اثر تزریق محلول یک میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین به عنوان متغیر پاسخ انتخاب گردید.

### ۳-۴-۱-۲- طراحی آزمایش در طرح پلاکت- برمن

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور تعیین تاثیرگذارترین عوامل بر روی اندازه‌گیری ال-سیستئین از نرم افزار Minitap 15 برای ایجاد طرح پلاکت- برمن و پردازش داده‌ها استفاده شد. همانطور که در بخش ۲-۷-۲-۶ بیان شد تعداد آزمایش‌ها هنگامی که ۸ عامل مورد بررسی باشد و دو تکرار نیز وجود داشته باشد ۲۴ آزمایش می‌باشد. طرح آزمایش برای تمام عامل‌ها که شامل: غلظت نیتریک اسید، غلظت پتاسیم برمید، غلظت متاکرزول‌پرپیل، غلظت پتاسیم برومات، سرعت جریان حامل، سرعت جریان واکنشگرها، طول مارپیچ واکنش و حجم نمونه تزریقی هستند، در دو سطح و با دو تکرار انجام شدند. جدول (۳-۱۴) خلاصه این طرح را نشان می‌دهد. تمامی ۲۴ آزمایش در شرایط نشان داده شده در طرح پلاکت- برمن انجام گردید و سیگنال‌های تجزیه‌ای (افزایش جذب) برای تزریق محلول ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین ثبت شدند که سیگنال‌های حاصله نیز در جدول (۳-۱۴) آورده شده است.

جدول (۳-۱۴): طرح پلاکت- برمن با ۸ عامل و ۲ تکرار برای پاسخ اندازه‌گیری ال - سیستمین

| شماره آزمایش | غلظت نیتریک اسید (M) | غلظت پتاسیم برمید (M) | غلظت متاکرزول پریل (M) | غلظت پتاسیم برومات (M) | سرعت جریان حامل (mL/h) | سرعت جریان واکنشگرها (mL/h) | طول کویل (cm) | حجم نمونه تزریقی (μL) | پاسخ (ΔA) |
|--------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------|-----------|
| ۱            | -                    | +                     | +                      | -                      | +                      | -                           | +             | +                     | ۰/۰۱۱     |
| ۲            | +                    | +                     | -                      | +                      | +                      | +                           | -             | +                     | ۰/۰۶۲     |
| ۳            | +                    | +                     | -                      | -                      | -                      | -                           | +             | +                     | ۰/۰۴۱     |
| ۴            | +                    | +                     | -                      | -                      | -                      | -                           | +             | +                     | ۰/۰۴۵     |
| ۵            | -                    | +                     | +                      | +                      | -                      | +                           | +             | -                     | ۰/۰۱۸     |
| ۶            | +                    | -                     | +                      | +                      | +                      | -                           | +             | -                     | ۰/۰۱۷     |
| ۷            | +                    | -                     | +                      | +                      | +                      | -                           | +             | -                     | ۰/۰۱۷     |
| ۸            | -                    | +                     | +                      | +                      | -                      | +                           | +             | -                     | ۰/۰۲۲     |
| ۹            | +                    | -                     | -                      | +                      | +                      | +                           | +             | -                     | ۰/۰۱۲     |
| ۱۰           | +                    | -                     | +                      | +                      | -                      | -                           | -             | +                     | ۰/۰۱۱     |
| ۱۱           | +                    | -                     | +                      | +                      | -                      | -                           | -             | +                     | ۰/۰۱۱     |
| ۱۲           | +                    | +                     | +                      | -                      | -                      | +                           | -             | -                     | ۰/۰۱۴     |
| ۱۳           | -                    | -                     | -                      | -                      | -                      | -                           | -             | -                     | ۰/۰۰۷     |
| ۱۴           | -                    | +                     | -                      | +                      | +                      | -                           | -             | -                     | ۰/۰۱۲     |
| ۱۵           | -                    | -                     | -                      | +                      | -                      | +                           | +             | +                     | ۰/۰۱۱     |
| ۱۶           | +                    | -                     | +                      | -                      | +                      | +                           | +             | -                     | ۰/۰۱۱     |
| ۱۷           | -                    | -                     | +                      | -                      | +                      | +                           | -             | +                     | ۰/۰۰۹     |
| ۱۸           | -                    | -                     | -                      | -                      | -                      | -                           | -             | -                     | ۰/۰۱۲     |
| ۱۹           | +                    | +                     | +                      | -                      | -                      | +                           | -             | -                     | ۰/۰۱۸     |
| ۲۰           | -                    | +                     | -                      | +                      | +                      | -                           | -             | -                     | ۰/۰۱۹     |
| ۲۱           | +                    | +                     | -                      | +                      | +                      | +                           | -             | +                     | ۰/۰۶۲     |
| ۲۲           | -                    | -                     | -                      | +                      | -                      | +                           | +             | +                     | ۰/۰۱۲     |
| ۲۳           | -                    | -                     | +                      | -                      | +                      | +                           | -             | +                     | ۰/۰۱۷     |
| ۲۴           | -                    | +                     | +                      | -                      | +                      | -                           | +             | +                     | ۰/۰۱۱     |

### ۳-۱-۴-۳ - تعیین عوامل موثر به وسیله DOE

در این قسمت با استفاده از نرم افزار Minitap 15 مسئله تحلیل شده و عوامل موثر به ترتیب

اهمیت تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از تحلیل به قرار زیر است:



جدول (۳-۱۵): جدول ضرایب حاصل از طرح پلاکت- برمن

| عبارت             | اثر       | ضریب خطای         |                        | T     | ارزش P |
|-------------------|-----------|-------------------|------------------------|-------|--------|
|                   |           | ضریب <sup>۲</sup> | استاندارد <sup>۱</sup> |       |        |
| NA                | ۰/۰۱۳۳۳۳  | ۰/۰۰۶۶۶۷          | ۰/۰۰۱۹۹۰               | ۳/۳۵  | ۰/۰۰۴  |
| KBrO <sub>3</sub> | ۰/۰۰۵۵۰۰  | ۰/۰۰۲۷۵۰          | ۰/۰۰۱۹۹۰               | ۱/۳۸  | ۰/۱۸۷  |
| KBr               | ۰/۰۱۵۶۶۷  | ۰/۰۰۷۸۳۳          | ۰/۰۰۱۹۹۰               | ۳/۹۴  | ۰/۰۰۱  |
| MCP               | -۰/۰۱۰۸۳۳ | -۰/۰۰۵۴۱۷         | ۰/۰۰۱۹۹۰               | -۲/۷۳ | ۰/۰۱۶  |
| CF                | ۰/۰۰۳۱۶۷  | ۰/۰۰۱۵۸۳          | ۰/۰۰۱۹۹۰               | ۰/۸۰  | ۰/۴۳۹  |
| RF                | ۰/۰۰۴۵۰۰  | ۰/۰۰۲۲۵۰          | ۰/۰۰۱۹۹۰               | ۱/۱۳  | ۰/۲۷۶  |
| CL                | -۰/۰۰۲۱۶۷ | -۰/۰۰۱۰۸۳         | ۰/۰۰۱۹۹۰               | -۰/۵۴ | ۰/۵۹۴  |
| IV                | ۰/۰۱۰۳۳۳  | ۰/۰۰۵۱۶۷          | ۰/۰۰۱۹۹۰               | ۲/۶۰  | ۰/۰۲۰  |

در این جدول که ضرایب رگرسیونی نشان داده شده است که در ادامه به تفسیر آنها پرداخته

می‌شود.

اثر: مقدار اثر هر متغیر از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$\text{Effect} = \frac{2[\sum(y^+) - \sum(y^-)]}{N} \quad (۴-۳)$$

که در آن N تعداد کل آزمایش‌ها،  $y^+$  پاسخ‌هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح بالا و  $y^-$  پاسخ‌هایی که در آن متغیر مورد بررسی در سطح پایین خود است، می‌باشند. مقدار مثبت هر اثر نشان‌دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ افزایش می‌یابد و همچنین مقدار منفی یک اثر نشان‌دهنده آن است که با افزایش سطح یک متغیر از پایین به بالا مقدار پاسخ کاهش می‌یابد.

1- Standard Error Coefficient

2- Coefficient

ضریب: مقدار ضریب هر متغیر از تقسیم اثر هر متغیر بر دو بدست می‌آید.

$$\text{ضریب} = \frac{\text{اثر}}{2} \quad (5-3)$$

ضریب خطای استاندارد: همچنین برای هر ضریب یک انحراف استاندارد تخمین ضرایب رگرسیون گزارش شده که نشان‌دهنده اندازه خطای تجربی (تصادفی) است که روی ضریب تاثیر می‌گذارد. مقدار آن مثبت است و مقدار کوچکتر آن نشان‌دهنده برآورد دقیق‌تر است.

آماره T: مقدار T گزارش شده در جدول نشان می‌دهد که ضریب در برابر خطای استاندارد چقدر بزرگ است. مفهوم آن چیزی شبیه نسبت سیگنال به نویز می‌باشد. مقدار T از تقسیم کردن هر ضریب بر خطای استاندارد به دست می‌آید.

$$T = \frac{\text{ضریب}}{\text{ضریب خطای استاندارد}} \quad (6-3)$$

ارزش P: برای تعیین اهمیت عامل‌ها، میزان احتمال (ارزش P) کمتر از ۰/۰۵ ( $P < 0.05$ ) به عنوان نقطه حد در نظر گرفته شد. بنابراین عامل‌ها با ارزش P کمتر ۰/۰۵ به عنوان عامل موثر در پاسخ و عامل‌های با ارزش P بیشتر از ۰/۰۵ به عنوان عامل غیرموثر بر پاسخ می‌باشند. مقدار P در مطالعات پلاکت- برمن برای هر یک از عامل‌های اندازه‌گیری ال - سیستئین در جدول (۳-۱۶) نشان داده شده است.

جدول (۳-۱۶): میزان اهمیت عوامل موثر در اندازه‌گیری ال - سیستمین

| عامل                 | ارزش P | اثر عامل |
|----------------------|--------|----------|
| نیتریک اسید          | ۰/۰۰۴  | موثر     |
| پتاسیم برومات        | ۰/۱۸۷  | غیر موثر |
| پتاسیم برومید        | ۰/۰۰۱  | موثر     |
| متاکرزول پرپیل       | ۰/۰۱۶  | موثر     |
| سرعت جریان حامل      | ۰/۴۳۹  | غیر موثر |
| سرعت جریان واکنشگرها | ۰/۲۷۶  | غیر موثر |
| طول ماریپیج واکنش    | ۰/۵۹۴  | غیر موثر |
| حجم تزریقی نمونه     | ۰/۰۲۰  | موثر     |

همچنین نمودارهایی که می‌تواند در تعیین عامل‌های اصلی کمک کنند، نمودارهای پارتو<sup>۱</sup>، نمودار احتمال نرمال<sup>۲</sup> و نمودار نیمه نرمال<sup>۳</sup> می‌باشند.

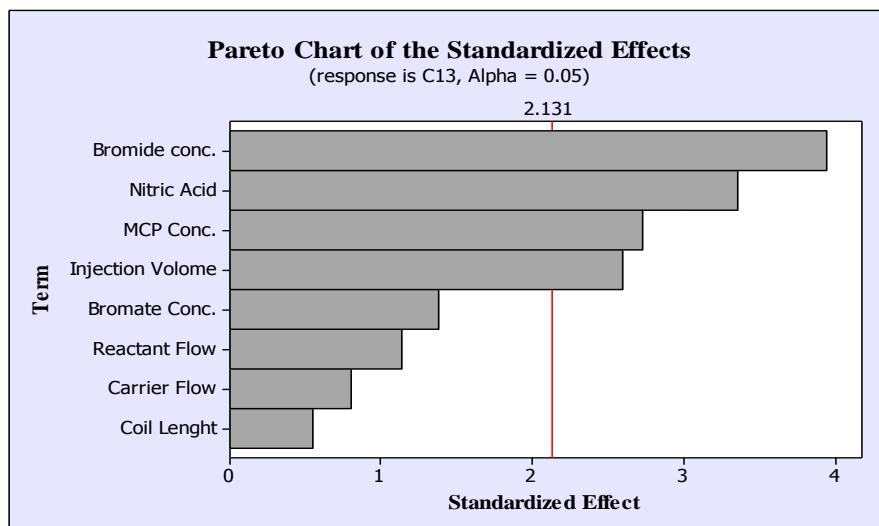
**نمودار پارتو:** نموداری است که در آن از آزمون T-test استفاده شده است تا اختلاف معنادار اثرات با صفر تعیین گردد. در این نمودار یک خط مبنا وجود دارد که همان T بحرانی جدول می‌باشد. مقدار عددی این خط مبنا براساس درجه آزادی طبق رابطه (۳-۷) در سطح اطمینان ۹۵٪ از جدول T محاسبه می‌شود. عامل‌هایی که مقدار T آنها سمت راست خط مبنا قرار گرفته‌اند دارا اثر معنادار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند. نمودار پارتو برای پاسخ افزایش جذب در شکل (۳-۱۵) نشان داده شده است. همانطور که نمودار نشان می‌دهد، متغیرهای غلظت نیتریک اسید، پتاسیم برومید، متاکرزول پرپیل و حجم نمونه تزریقی به عنوان عوامل موثر می‌باشند.

$$(۳-۷) \quad \text{تعداد کل برهمکنش‌ها} - (۱ - \text{تعداد کل آزمایش‌ها در طرح}) = \text{درجه آزادی}$$

1- Pareto

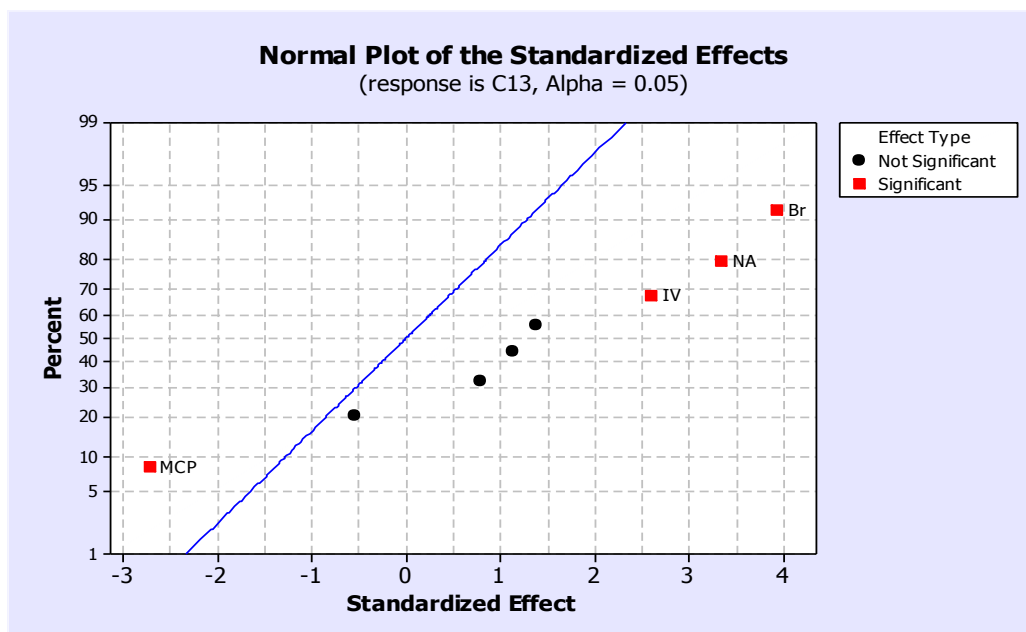
2- Normal Probability Plot

3- Half Normal Plot



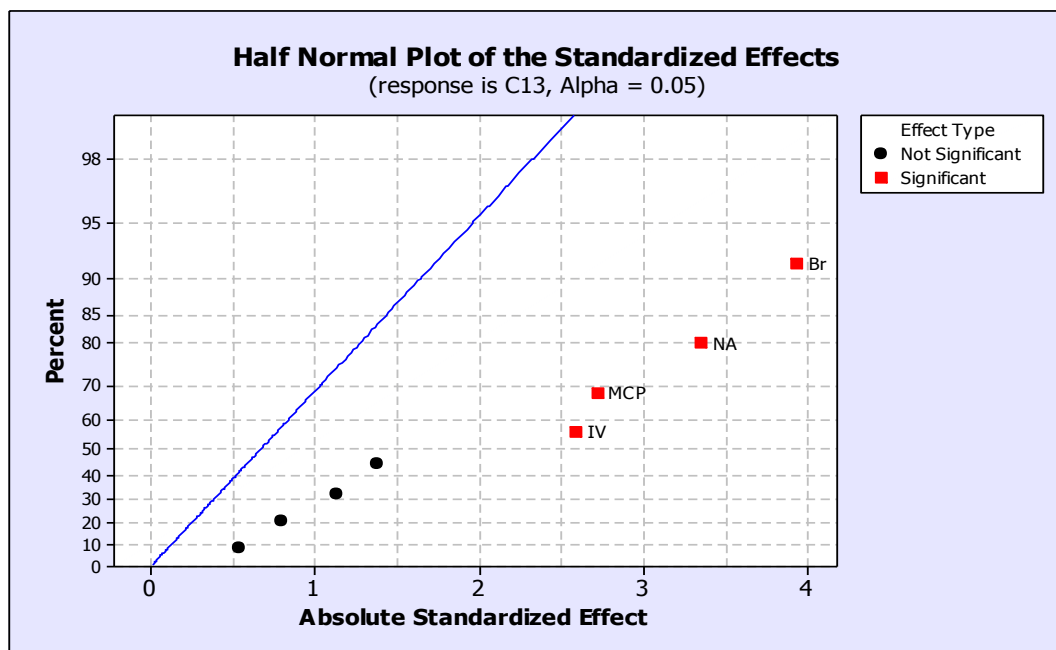
شکل (۳-۱۵): نمودار پارتو اثر عامل ها بر اندازه گیری ال - سیستمین

**نمودار احتمال نرمال:** در این نمودار نقاطی مشاهده می‌شوند که نشان‌دهنده اثر هر متغیر می‌باشند. به طوریکه که هر چه این نقاط از خط مبنا فاصله بیشتری داشته باشند دارای اثر بزرگتری هستند و میزان اهمیت آنها نیز بیشتر است. در این نمودار متغیرهایی که دارای اثرات مهم یا معنی‌دار هستند با رنگ قرمز مشخص می‌شوند. نمودار احتمال نرمال علاوه بر مشخص کردن میزان اهمیت متغیرها، مثبت یا منفی بودن اثر هر متغیر را نیز نشان می‌دهند به این صورت که نقاطی که در سمت راست خط برآزش قرار دارند دارای اثر مثبت و نقاطی که در سمت چپ آن قرار دارند دارای اثر منفی می‌باشند. همانطور که در شکل (۳-۱۶) مشاهده می‌شود متغیرهای: غلظت پتاسیم برمید، غلظت نیتریک‌اسید، حجم نمونه تزریقی و غلظت متاکرزول پرپل به عنوان عامل‌های مهم شناسایی شدند که سه عامل اول دارای اثر مثبت و عامل آخر دارای اثر منفی می‌باشد.



شکل (۳-۱۶): نمودار احتمال نرمال اثر عامل ها بر اندازه گیری ال سیستئین

**نمودار نیمه نرمال:** نمودار نیمه نرمال نیز مانند نمودار احتمال نرمال، میزان اهمیت عامل ها را نشان می دهد یعنی نقاطی که از خط مبنا فاصله بیشتری دارند دارای اهمیت بیشتری هستند و نقاط دارای اثر مهم با رنگ قرمز مشخص می شوند. اما تفاوتی که نمودار نیمه نرمال با نمودار احتمال نرمال دارد این است که، در این نمودار مثبت یا منفی بودن اثرات مشخص نمی شود و تمامی عامل ها در سمت راست خط مبنا قرار می گیرند.



شکل (۳-۱۷): نمودار نیمه نرمال اثر عامل‌ها بر اندازه‌گیری ال - سیستین

### ۳-۴-۲- بهینه‌سازی عوامل موثر بر اندازه‌گیری ال - سیستین

با توجه به نتایج مشاهده شده در قسمت‌های قبل، چهار عامل: غلظت نیتریک‌اسید، غلظت برمید، غلظت متاکرزول پرپیل و حجم نمونه تزریقی به عنوان مهم‌ترین عوامل موثر بر میزان پاسخ اندازه‌گیری ال - سیستین تعیین شدند. در این قسمت برای تعیین مقادیر بهینه هر کدام از این عوامل از روش بهینه‌سازی باکس - بنکن استفاده شد. در این طرح هر عامل در سه سطح بالا، میانی و پایین مورد بررسی قرار می‌گیرد. در جدول (۳-۱۷) مقادیر متغیرها در سه سطح بالا، میانی و پایین نشان داده شده است. انتخاب این سطوح با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان انتخاب گردید.

جدول (۳-۱۷): سطح عامل‌های موثر در طرح عاملی باکس- بنکن

| عامل                   | سطح پایین (-) | سطح میانی (۰) | سطح بالا (+) |
|------------------------|---------------|---------------|--------------|
| غلظت نیتریک اسید (M)   | ۰/۴۰          | ۰/۷۰          | ۱/۰          |
| غلظت پتاسیم برمید (M)  | ۰/۰۰۳         | ۰/۰۰۹         | ۰/۰۱۵        |
| غلظت متاکرزول پرپل (M) | ۰/۰۰۰۱۵       | ۰/۰۰۰۲۰       | ۰/۰۰۰۲۵      |
| حجم تزریقی نمونه (μL)  | ۱۴۰           | ۲۵۵           | ۳۷۰          |

همچنین لازم به ذکر است که در تمام آزمایش‌هایی که بر اساس طرح باکس- بنکن انجام می‌شود سایر عوامل غیرموثر در مقدارهای بهینه‌ای که از روش یک متغیر در یک زمان بدست آمده‌اند ثابت باقی می‌مانند. مقدار بهینه عوامل غیر موثر در جدول (۳-۱۸) نشان داده شده است.

جدول (۳-۱۸): مقادیر بهینه پارامترهای غیر موثر در اندازه‌گیری ال-سیستئین

| عامل        | غلظت پتاسیم برومات | سرعت جریان حامل | سرعت جریان واکنشگرها | طول ماریپچ واکنش |
|-------------|--------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| مقدار بهینه | ۰/۰۲۰ M            | ۳۵ ml/h         | ۱۰ ml/h              | ۴۵ cm            |

### ۳-۴-۲-۱- اجرای طرح باکس - بنکن

برای طراحی آزمایش‌ها به منظور بررسی برهمکنش بین عوامل و همچنین برای تعیین مقدار بهینه هر عوامل در اندازه‌گیری ال-سیستئین از نرم افزار Minitap 15 برای ایجاد طرح باکس- بنکن و پردازش داده‌ها استفاده شد. همانطور که در بخش ۲-۷-۲-۷ بیان شد تعداد آزمایش‌ها هنگامی که در طرح باکس- بنکن ، ۴ عامل در یک بلوک با ۲ بار تکرار و سه نقطه مرکزی مورد بررسی قرار گیرد برابر با ۵۴ آزمایش می‌باشد. در جدول (۳-۱۹) طرح و سیگنال‌های ثبت شده در آزمایش‌های موجود در طرح باکس- بنکن آمده است.

جدول (۳-۱۹): طرح عاملی باکس- بنکن با ۴ عامل، ۲ تکرار و سه نقطه مرکزی برای اندازه‌گیری ال-سیستئین

| شماره<br>آزمایش | غلظت نیتریک‌اسید<br>(M) | غلظت پتاسیم برمید<br>(M) | غلظت متاکرزول‌پرپیل<br>(M) | حجم نمونه تزریقی<br>( $\mu$ L) | پاسخ<br>( $\Delta A$ ) |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------|
| ۱               | +۱                      | ۰                        | -۱                         | ۰                              | ۰/۰۵۴                  |
| ۲               | -۱                      | -۱                       | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۰۷                  |
| ۳               | ۰                       | -۱                       | -۱                         | ۰                              | ۰/۰۱۸                  |
| ۴               | +۱                      | ۰                        | +۱                         | ۰                              | ۰/۰۳۸                  |
| ۵               | ۰                       | ۰                        | -۱                         | -۱                             | ۰/۰۲۷                  |
| ۶               | -۱                      | ۰                        | -۱                         | ۰                              | ۰/۰۰۹                  |
| ۷               | ۰                       | ۰                        | -۱                         | +۱                             | ۰/۰۳۱                  |
| ۸               | +۱                      | ۰                        | ۰                          | -۱                             | ۰/۰۴۸                  |
| ۹               | ۰                       | +۱                       | -۱                         | ۰                              | ۰/۰۴۴                  |
| ۱۰              | +۱                      | -۱                       | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۲۵                  |
| ۱۱              | +۱                      | +۱                       | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۷۱                  |
| ۱۲              | ۰                       | ۰                        | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۲۵                  |
| ۱۳              | -۱                      | +۱                       | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۱۵                  |
| ۱۴              | -۱                      | ۰                        | ۰                          | +۱                             | ۰/۰۱۲                  |
| ۱۵              | ۰                       | -۱                       | ۰                          | +۱                             | ۰/۰۱۳                  |
| ۱۶              | ۰                       | +۱                       | ۰                          | -۱                             | ۰/۰۱۴                  |
| ۱۷              | +۱                      | ۰                        | ۰                          | +۱                             | ۰/۰۴۷                  |
| ۱۸              | ۰                       | +۱                       | +۱                         | ۰                              | ۰/۰۴۴                  |
| ۱۹              | ۰                       | -۱                       | +۱                         | ۰                              | ۰/۰۱۴                  |
| ۲۰              | ۰                       | ۰                        | +۱                         | -۱                             | ۰/۰۲۳                  |
| ۲۱              | ۰                       | ۰                        | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۲۵                  |
| ۲۲              | -۱                      | ۰                        | ۰                          | -۱                             | ۰/۰۱۴                  |
| ۲۳              | ۰                       | ۰                        | +۱                         | +۱                             | ۰/۰۲۷                  |
| ۲۴              | ۰                       | +۱                       | ۰                          | +۱                             | ۰/۰۳۴                  |
| ۲۵              | -۱                      | ۰                        | +۱                         | ۰                              | ۰/۰۱۵                  |
| ۲۶              | ۰                       | ۰                        | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۲۸                  |
| ۲۷              | ۰                       | -۱                       | ۰                          | -۱                             | ۰/۰۱۶                  |
| ۲۸              | ۰                       | -۱                       | -۱                         | ۰                              | ۰/۰۱۷                  |
| ۲۹              | ۰                       | ۰                        | -۱                         | -۱                             | ۰/۰۲۵                  |
| ۳۰              | -۱                      | ۰                        | -۱                         | ۰                              | ۰/۰۱۲                  |
| ۳۱              | ۰                       | +۱                       | ۰                          | -۱                             | ۰/۰۲۸                  |
| ۳۲              | +۱                      | ۰                        | ۰                          | -۱                             | ۰/۰۴۲                  |
| ۳۳              | ۰                       | ۰                        | ۰                          | ۰                              | ۰/۰۲۱                  |



ادامه جدول (۳-۱۹)

|    |    |    |    |    |       |
|----|----|----|----|----|-------|
| ۳۴ | +  | ۰  | -۱ | ۰  | ۰/۰۶۶ |
| ۳۵ | ۰  | -۱ | ۰  | -۱ | ۰/۰۱۰ |
| ۳۶ | -۱ | ۰  | ۰  | -۱ | ۰/۰۱۰ |
| ۳۷ | ۰  | -۱ | ۰  | +  | ۰/۰۲۰ |
| ۳۸ | ۰  | +  | +  | ۰  | ۰/۰۳۱ |
| ۳۹ | ۰  | ۰  | ۰  | ۰  | ۰/۰۲۵ |
| ۴۰ | ۰  | ۰  | +  | -۱ | ۰/۰۲۲ |
| ۴۱ | +  | +  | ۰  | ۰  | ۰/۰۷۰ |
| ۴۲ | ۰  | -۱ | +  | ۰  | ۰/۰۱۱ |
| ۴۳ | -۱ | ۰  | +  | ۰  | ۰/۰۱۳ |
| ۴۴ | -۱ | ۰  | +  | +  | ۰/۰۲۱ |
| ۴۵ | ۰  | ۰  | ۰  | ۰  | ۰/۰۲۰ |
| ۴۶ | ۰  | +  | -۱ | ۰  | ۰/۰۳۷ |
| ۴۷ | ۰  | +  | ۰  | +  | ۰/۰۳۴ |
| ۴۸ | -۱ | +  | ۰  | ۰  | ۰/۰۱۶ |
| ۴۹ | +  | ۰  | ۰  | +  | ۰/۰۵۰ |
| ۵۰ | +  | ۰  | +  | ۰  | ۰/۰۳۹ |
| ۵۱ | -۱ | ۰  | ۰  | +  | ۰/۰۱۲ |
| ۵۲ | -۱ | -۱ | ۰  | ۰  | ۰/۰۱۱ |
| ۵۳ | +  | -۱ | ۰  | ۰  | ۰/۰۲۱ |
| ۵۴ | ۰  | ۰  | -۱ | +  | ۰/۰۳۵ |

نتایج تجربی بدست آمده از انجام آزمایشات با روش ANOVA تحلیل و بررسی شدند که در این بررسی اثرات خطی، درجه دوم و برهمکنشها در نظر گرفته شدند جدول (۳-۲۰) ضرایب رگرسیونی را نشان می‌دهد. همانطور که قبلا اشاره شد ضرایب با ارزش P کوچک به طور معنی‌داری از صفر بزرگترند.

جدول (۳-۲۰): پارامترهای آماری برای طرح عاملی انجام شده برای پاسخ اندازه‌گیری ال - سیستمین

| عبارت    | ضریب       | ضریب خطای استاندارد | T      | P     |
|----------|------------|---------------------|--------|-------|
| Constant | ۰/۰۲۴۰۰۰   | ۰/۰۰۱۸۴۵            | ۱۳/۰۰۹ | ۰/۰۰۰ |
| NA       | ۰/۰۱۷۷۰۸   | ۰/۰۰۰۹۲۲            | ۱۹/۱۹۷ | ۰/۰۰۰ |
| KBr      | ۰/۰۱۰۶۲۵   | ۰/۰۰۰۹۲۲            | ۱۱/۵۱۴ | ۰/۰۰۰ |
| MCP      | -۰/۰۰۳۰۸۳  | ۰/۰۰۰۹۲۲            | -۳/۳۴۳ | ۰/۰۰۲ |
| IV       | ۰/۰۰۲۲۵۰   | ۰/۰۰۰۹۲۲            | ۲/۴۳۹  | ۰/۰۱۹ |
| NA×NA    | ۰/۰۰۵۵۲۱   | ۰/۰۰۱۳۸۴            | ۳/۹۹۰  | ۰/۰۰۰ |
| KBr×KBr  | -۰/۰۰۰۴۷۹  | ۰/۰۰۱۳۸۴            | -۰/۳۴۶ | ۰/۷۳۱ |
| MCP×MCP  | ۰/۰۰۲۵۸۳   | ۰/۰۰۱۳۸۴            | ۱/۸۶۷  | ۰/۰۶۶ |
| IV×IV    | -۰/۰۰۱۰۴۲  | ۰/۰۰۱۳۸۴            | -۰/۷۵۳ | ۰/۴۵۶ |
| NA×KBr   | ۰/۰۱۰۲۵۰   | ۰/۰۰۱۵۹۸            | ۶/۴۱۵  | ۰/۰۰۰ |
| NA×MCP   | -۰/۰۰۰۶۲۵۰ | ۰/۰۰۱۵۹۸            | -۳/۹۱۲ | ۰/۰۰۰ |
| NA×IV    | ۰/۰۰۰۸۷۵   | ۰/۰۰۱۵۹۸            | ۰/۵۴۸  | ۰/۵۸۷ |
| KBr×MCP  | ۰/۰۰۰۵۰۰   | ۰/۰۰۱۵۹۸            | ۰/۳۱۳  | ۰/۷۵۶ |
| KBr×IV   | ۰/۰۰۲۳۷۵   | ۰/۰۰۱۵۹۸            | ۱/۴۸۶  | ۰/۱۴۵ |
| MCP×IV   | -۰/۰۰۱۰۰۰  | ۰/۰۰۱۵۹۸            | -۰/۶۲۶ | ۰/۵۳۵ |

با حذف اثراتی که معنی‌دار نیستند و با استفاده از ضرایب داده شده در جدول (۳-۲۰) ساده‌ترین

مدل برای اندازه‌گیری ال - سیستمین به روش تزریق در جریان به صورت زیر پیشنهاد می‌شود که در

آن R% همان متغیر پاسخ می‌باشد.

$$R\% = 0.24000 + 0.17708 \text{ NA} + 0.10625 \text{ KBr} - 0.03083 \text{ MCP} + 0.02250 \text{ IV} + 0.05521 \text{ NA} \times \text{NA} + 0.10250 \text{ NA} \times \text{KBr} - 0.06250 \text{ NA} \times \text{MCP} \quad (۳-۸)$$

$$R^2 = 93/92\%$$

$$R^2_{\text{adj}} = 91/73\%$$

معادله (۳-۸) برای مقادیر کدگذاری شده می‌باشد. ارتباط بین مقادیر کدگذاری و مقادیر واقعی با

رابطه زیر نشان داده می‌شود.

$$X_i = \{X_i - [(X_{low} - X_{high})/2]\} / [(X_{high} - X_{low})/2] \quad (9-3)$$

$X_i$  عامل کدگذاری شده، همان عامل در واحد اصلی خودش می‌باشد.  $X_{low}$  و  $X_{high}$  سطوح بالا و پایین عامل می‌باشند. معادله (۱۰-۳) برای مقادیر کدگذاری نشده می‌باشد.

$$R\% = 0.233774 - 0.0123091 NA - 3/18675 KBr - 103/986 MCP + 4/57861 IV + 0.613426 NA \times NA + 5/69444 NA \times KBr - 416/667 NA \times MCP \quad (10-3)$$

**ضریب تعیین:** به عنوان یک شاخص برای بیان دقت خط رگرسیون برآورده شده، به کار می‌رود و نشان‌دهنده نسبت تغییرات متغیر وابسته توضیح داده شده توسط متغیر مستقل است. هر چه  $R^2$  به صد نزدیک‌تر باشد، مدل قوی‌تر است و بهتر می‌تواند پاسخ را پیش بینی کند.

رابطه ریاضی مربوط به ضریب تعیین به صورت زیر است.

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (11-3)$$

که  $SSR$  طبق رابطه (۱۲-۳) بیانگر مجموع مربعات انحراف مقادیر پیش بینی شده متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن است.

$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (12-3)$$

$SST$  طبق رابطه (۱۳-۳) نشانگر مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از میانگین مقادیر آن است.

$$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (13-3)$$

$SSE^1$  نیز مبین مجموع مربعات انحراف مقادیر واقعی متغیر وابسته از مقادیر پیش‌بینی شده برای آن است.

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (14-3)$$

بنابراین با توجه به روابط فوق می‌توان نوشت:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (15-3)$$

طبق رابطه (۱۵-۳) اگر تمام مشاهدات بر روی خط برازش شده قرار گرفته باشند، یعنی به ازای تمام نقاط  $y_i = \hat{y}_i$  باشد، مقدار  $R^2$  برابر یک می‌شود و هرگونه انحرافی از این حالت باعث می‌شود که مقدار  $R^2$  از یک کوچکتر شود. مقدار ضریب تعیین ( $R^2$ ) برای پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستین ۹۳/۹۲ درصد می‌باشد که نشان می‌دهد ۹۳/۹۲ درصد تغییرات در متغیر وابسته می‌تواند توسط متغیر مستقل توضیح داده شود.

**ضریب تعیین تصحیح شده<sup>۲</sup>:** ضریب تعیین تصحیح شده یک از پارامترهایی است که در ارزیابی و مقایسه مدل‌های مختلف با تعداد متفاوت متغیر پیشگو استفاده می‌شود و از آنجایی که  $R^2$  (ضریب تعیین) تعداد پارامترهای موجود در مدل را به حساب نمی‌آورد، بدین منظور از ضریب تعیین تصحیح شده طبق رابطه زیر برای انتخاب مدل برتر استفاده می‌شود.

$$R_{adj}^2 = 1 - \frac{n-1}{n-p-1} \cdot \frac{SSE}{SST} = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-p-1} \quad (16-3)$$

که در این رابطه  $p$  تعداد متغیرهای مستقل و  $n$  تعداد ترکیبات مورد بررسی می‌باشد.

---

1- Sum Square Error

2 -Adjusted determination coefficient

### ۳-۴-۲-۲- ارزیابی مدل

برای اطمینان از اینکه مدل بدست آمده، مدل مناسبی است که توانایی پیشگویی نمونه‌های مختلفی از یک جمعیت را داراست، باید مدل را ارزیابی کرد. در ارزیابی مدل فرضیات زیر باید محقق شود.

۱- پاسخ حاصل به خوبی با مدل توضیح داده شود.

۲- داده پرت وجود نداشته باشد.

۳- توزیع باقی مانده‌ها نرمال باشد.

۴- واریانس همگون باشد.

۵- تغییرات خطاها مستقل باشد.

برای ارزیابی مدل بدست آمده از روش تحلیل واریانس و بررسی باقی مانده‌ها استفاده گردید که در این ارزیابی‌ها از طریق شاخص‌های کمی است که به وسیله آنها صحت نتایج ارائه شده توسط مدل مورد سنجش قرار می‌گیرند.

### ۳-۴-۲-۳- تحلیل واریانس

با در نظر گرفتن عوامل اصلی، مدل ریاضی برای پاسخ مربوط به اندازه‌گیری ال-سیستئین طبق معادله (۳-۱۰) پیشنهاد شده است. برای بررسی صحت مدل ارائه شده به صورت معادله درجه دوم، تحلیل واریانس انجام شد که نتایج در جدول (۳-۲۱) نشان داده شده است.

با توجه به نتایج به دست آمده، مقدار  $P$  مربوط به عدم برازش<sup>۱</sup> مدل بیشتر از ۰/۰۵ می‌باشد که نشان می‌دهد بین مدل و داده‌های تجربی تطابق خوبی دارد.

---

1- Lack-of-fit

جدول (۳-۲۱): تحلیل واریانس برای مدل پیشنهادی مربوط به اندازه‌گیری آل - سیستمین

| Source         | DF | Seq SS   | Adj SS   | Adj MS   | F      | P     |
|----------------|----|----------|----------|----------|--------|-------|
| Regression     | ۱۴ | ۰/۰۱۲۲۹۹ | ۰/۰۱۲۲۹۹ | ۰/۰۰۰۷۸۹ | ۴۳/۰۲  | ۰/۰۰۰ |
| Linear         | ۴  | ۰/۰۱۰۵۸۵ | ۰/۰۱۰۵۸۵ | ۰/۰۰۲۶۴۶ | ۱۲۹/۵۸ | ۰/۰۰۰ |
| Square         | ۴  | ۰/۰۰۰۵۰۰ | ۰/۰۰۰۵۰۰ | ۰/۰۰۰۱۲۵ | ۶/۱۲   | ۰/۰۰۱ |
| Interaction    | ۶  | ۰/۰۰۱۲۱۴ | ۰/۰۰۱۲۱۴ | ۰/۰۰۰۲۰۲ | ۹/۹۱   | ۰/۰۰۰ |
| Residual Error | ۳۹ | ۰/۰۰۰۷۹۶ | ۰/۰۰۰۷۹۶ | ۰/۰۰۰۰۲۰ | -      | -     |
| Lack-of-Fit    | ۱۰ | ۰/۰۰۰۳۵۰ | ۰/۰۰۰۳۵۰ | ۰/۰۰۰۰۳۵ | ۲/۲۸   | ۰/۰۷۵ |
| Pure Error     | ۲۹ | ۰/۰۰۰۴۴۶ | ۰/۰۰۰۴۴۶ | ۰/۰۰۰۰۱۵ | -      | -     |
| Total          | ۵۳ | ۰/۰۱۳۰۹۶ | -        | -        | -      | -     |

آماره **F**: آزمون F یا آزمون فیشر در واقع آزمون معنی‌دار بودن آماری در تحلیل رگرسیون ساده و چند متغیره است و برابر با نسبت میانگین مربعات رگرسیون (*MSR*) به میانگین مربعات باقیمانده‌ها (*MSE*) است. بیان ریاضی آن به صورت زیر می‌باشد:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/df_m}{SSE/df_{res}} \quad (۱۷-۳)$$

$$df_m = p \quad , \quad df_{res} = n - p - 1$$

$df_m$  درجه آزادی مدل،  $p$  تعداد متغیرهای مستقل مدل،  $n$  تعداد کل ترکیبات مربوط به مدل (تعداد کل آزمایش‌ها)،  $df_{res}$  درجه آزادی باقیمانده‌ها است. و  $SSR$ ،  $SSE$  در روابط قبل توضیح داده شد.

4- Adjusted Mean Square

5- Adjusted Sum of Square

6- Degrees of Freedom

### ۳-۴-۲-۵- بررسی باقی مانده‌ها

آنچه که در ابتدا برای انجام هر رگرسیون بایستی در نظر گرفته شود فرض های زیربنایی است که تحلیل ها براساس آن ها انجام می پذیرد. این نکته ای بسیار مهم است که متاسفانه اکثرا در تحلیل ها مورد غفلت قرار می گیرد و نتایج آنرا دچار خدشه می سازد. فرض های زیربنایی برای یک الگوی رگرسیون به صورت زیر است که در آن  $\varepsilon$  نشان دهنده خطایمدل است:

۱- جمله خطا  $\varepsilon$  دارای میانگین صفر است.

۲- جمله خطا  $\varepsilon$  دارای واریانس ثابت است.

۳) جمله خطا  $\varepsilon$  ناهمبسته اند.

۴) جمله خطا  $\varepsilon$  دارای توزیع نرمال است.

اگر الگوی برازش داده شده مناسب باشد باید باقی مانده‌ها، فرض های بیان شده فوق را تایید کنند. باقی مانده ( $R_i$ ) در واقع همان خطای تصادفی در پیش بینی است که برابر با اختلاف بین مقدار مشاهده شده و مقدار پیش بینی شده با مدل است، یعنی  $R_i = y_i - \hat{y}_i$  به عبارت دیگر باقی مانده اندازه ای از تغییرپذیری متغیر پاسخ است که بوسیله الگوی رگرسیون بیان نمی شود.

باقی مانده‌ها را می توان نماینده خطاهای الگو در نظر گرفت و از این روی هر انحراف از فرض های چهارگانه رگرسیون در مورد خطاها باید در باقی مانده‌ها دیده شود. برای یک مدل آماری صحیح این مقدار باید کوچک و توزیع آن نرمال باشد.

یک راه مناسب برای این که ببینیم الگوی رگرسیون تا چه اندازه برای برازش به داده‌ها خوب است، رسم نمودار باقی مانده‌ها می باشد.

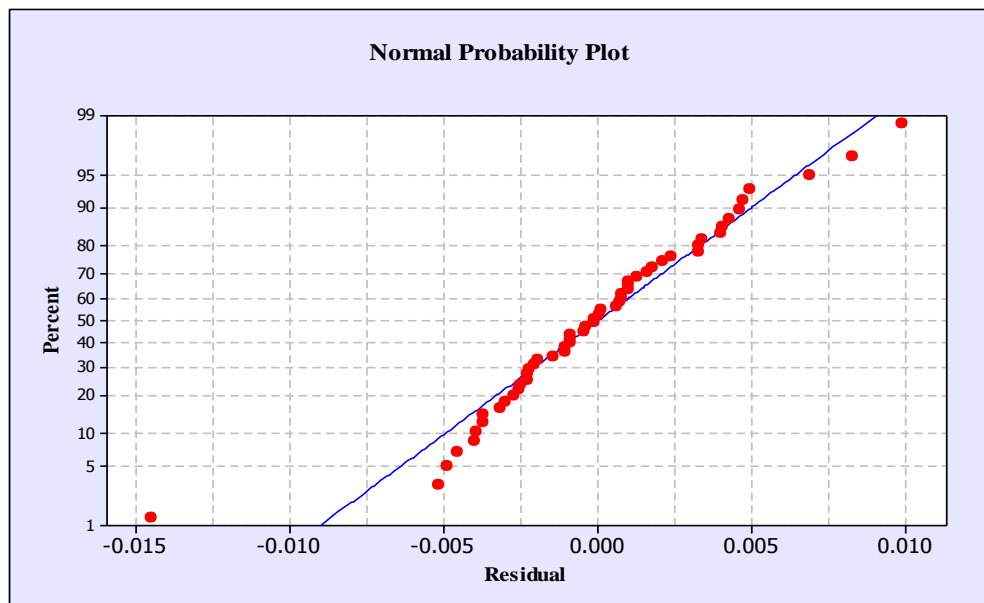
## نمودار احتمال نرمال:

از آنجایی که در محاسبه‌ی آماره‌های  $t$  و  $F$  برای آزمون‌های رگرسیون و همچنین در محاسبه فواصل اطمینان، از فرض نرمال بودن خطاها استفاده می‌کنیم لذا انحراف‌های بزرگ از توزیع نرمال می‌تواند روی صحت و اعتبار نتایج بدست آمده تاثیر زیادی بگذارد. علاوه بر این در صورتی که خطاها از توزیع‌های با دنباله‌های باریک‌تر یا پهن‌تر از توزیع نرمال پیروی کنند، ممکن است برآزش کمترین توان‌های دوم نسبت به تغییر کوچکی در داده‌ها حساس باشد. یک روش ساده برای بررسی فرض نرمال بودن رسم نمودار احتمال نرمال مانده‌ها است. اگر  $R_i$  به صورت صعودی مرتب کرده و  $R_i$  ها را در مقابل احتمال تجمعی

$$P_i = \frac{(i-1/n)}{n} \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (18-3)$$

رسم کنیم، نقاط باید روی یک خط راست قرار گیرند.

نمودار مربوط به توزیع باقی‌مانده‌ها و بررسی نرمال بودن این توزیع در شکل (۱۸-۳) نشان داده شده است. در اینجا مقدار  $P$  بزرگتر از  $0.05$  است که نشان می‌دهد توزیع باقی‌مانده‌ها نرمال است.



شکل (۱۸-۳): نمودار باقی‌مانده‌ها برای پاسخ اندازه‌گیری ال - سیستمین



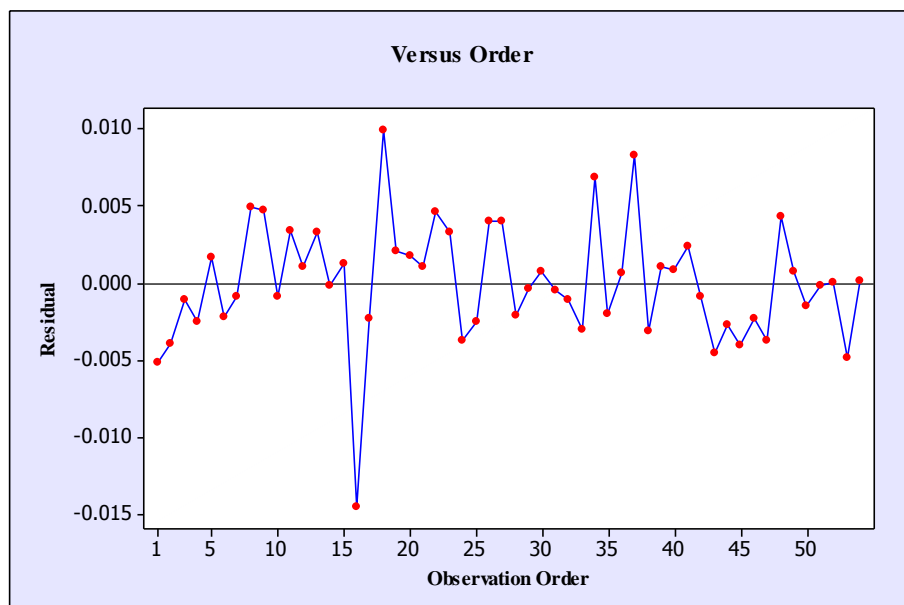
## نمودار باقی مانده در برابر ترتیب زمان:

در بررسی همبستگی بین باقی مانده‌ها، رسم نمودار باقی مانده‌ها نسبت به ترتیب زمان جمع‌آوری داده‌ها مفید است. آزمایش‌هایی که گرایش به داشتن باقی مانده‌های مثبت یا منفی دارند حکایت از همبستگی مثبت می‌کنند. این دلالت بر تخطی از پذیره‌ی استقلال خطاها می‌کند که تصادفی کردن آزمایش‌ها بطور صحیح گامی مهم در حصول استقلال است. گاهی اوقات مهارت آزمایشگر ممکن است با پیشرفت آزمایش تغییر کند و یا ممکن است فرایند تحت مطالعه دستخوش پیش‌آمد شده یا پرخطا شود. این موضوع اغلب نتیجه تغییر در واریانس خطای تصادفی نسبت به زمان است و غالباً منتهی به نموداری برای باقی مانده‌ها نسبت به زمان می‌شود، که در یک طرف پراکندگی بیشتری نسبت به طرف دیگر نشان می‌دهد. اگر این نمودار طرح خاصی نداشته باشد مبین فرض وجود استقلال خطا است. در صورتی که مانده‌ها در برابر زمان سیر افزایشی داشته باشند، نشان دهنده آن است که واریانس‌ها ثابت نبوده و به مرور زمان افزایش می‌یابد. وجود یک روند غیرخطی در نمودار باقی مانده‌ها بیانگر آن است که الگوی برازش داده شده نمی‌تواند مناسب باشد در این صورت دو امکان وجود دارد:

۱- نیاز به یک یا چند جمله‌ی اضافی در الگو احساس می‌شود.

۲- الگو نیاز به یک تبدیل مناسب مانند تبدیل لگاریتم یا توان دوم و... روی متغیر(های) پیشگو دارد.

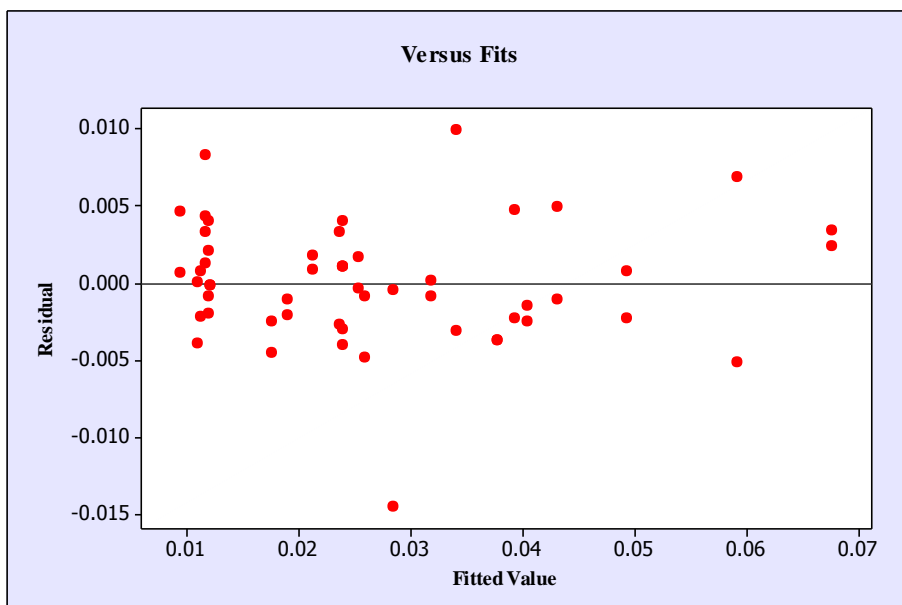
با توجه به شکل (۳-۱۹) همبستگی کمی بین داده‌ها مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده استقلال خطاهاست.



شکل (۳-۱۹): نمودار باقی‌مانده‌ها به ترتیب زمان جمع آوری برای پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستین

### نمودار باقی‌مانده‌ها در مقابل مقادیر برازش شده:

رسم نمودار مانده‌ها  $R_i$  ها ( $i=1,2,\dots,n$ ) در مقابل مقادیر برازش شده متناظر یعنی  $\hat{y}_i$  ها در پی بردن به انواع متداول مناسب نبودن الگو مفید است. اگر مدل برازش شده مناسب باشد این نمودار بایستی نسبت به نقطه  $R_i = 0$  متقارن بوده و نقاط حول این نقطه به طور یکنواخت پراکنده شده باشند. این وضعیت ثابت بودن واریانس خطاها را نشان می‌دهد. نمودار مربوطه در شکل (۳-۲۰) نشان می‌دهد که نمودار باقی‌مانده‌ها از الگوی خاصی برخوردار نیست و بی‌ساختار می‌باشد.



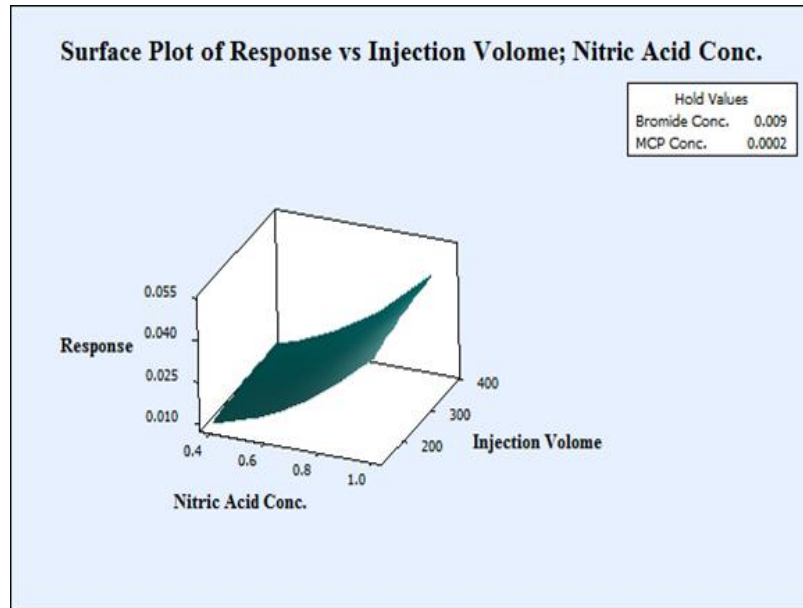
شکل (۳-۲۰): پاسخ پیش‌بینی شده برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در برابر باقی‌ماندها

### ۳-۴-۲-۶- منحنی‌های سطح پاسخ<sup>۱</sup>

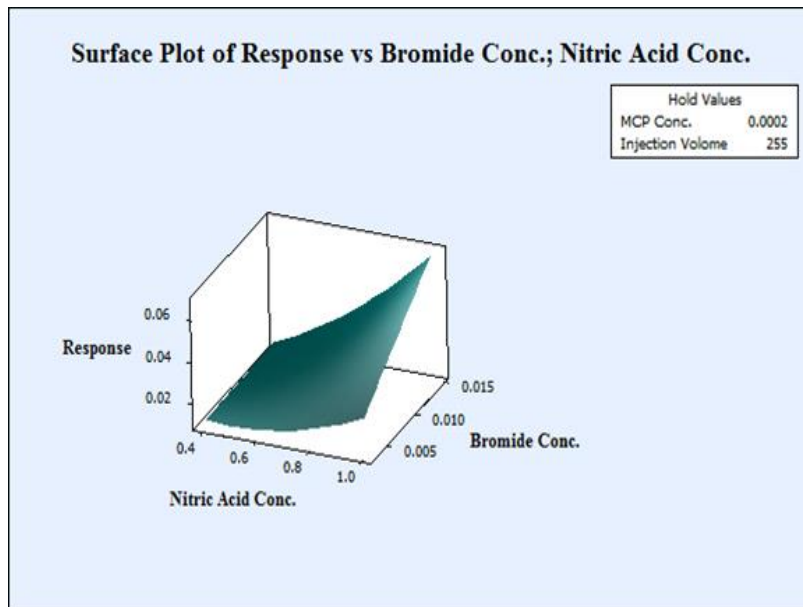
تجسم فضایی معادله پیش‌بینی شده می‌تواند بوسیله منحنی پاسخ سطحی بدست آید. این نمایش گرافیکی، یک سطح  $n$  بعدی در فضای  $(n+1)$  بعد است. معمولاً نمایش ۲ بعدی یک طرح ۳ بعدی را می‌توان رسم کرد. بنابراین اگر ۳ یا تعداد بیشتری متغیر وجود داشته باشد، تنها اگر یک یا تعداد بیشتری از متغیرها ثابت نگه داشته شوند رسم منحنی پاسخ ممکن می‌شود. شکل‌های (۳-۲۱) تا (۳-۲۶) این منحنی‌ها را برای اندازه‌گیری ال-سیستئین نشان می‌دهند.

---

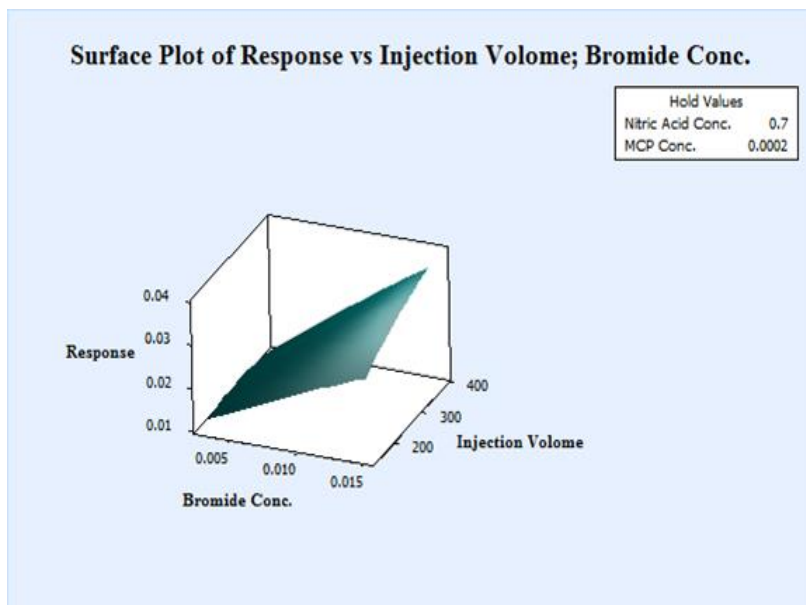
1- Surface response plot



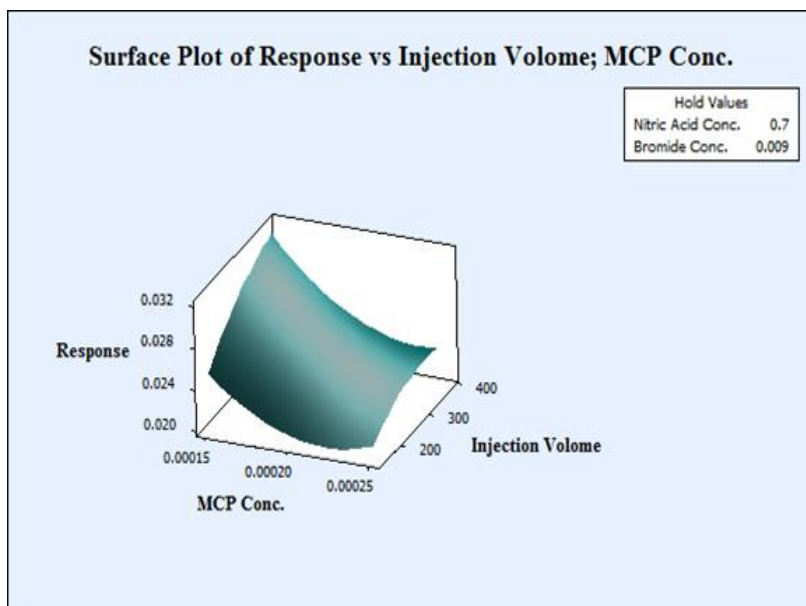
شکل (۳-۲۱): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل حجم نمونه تزئقی و غلظت نیتریک‌اسید



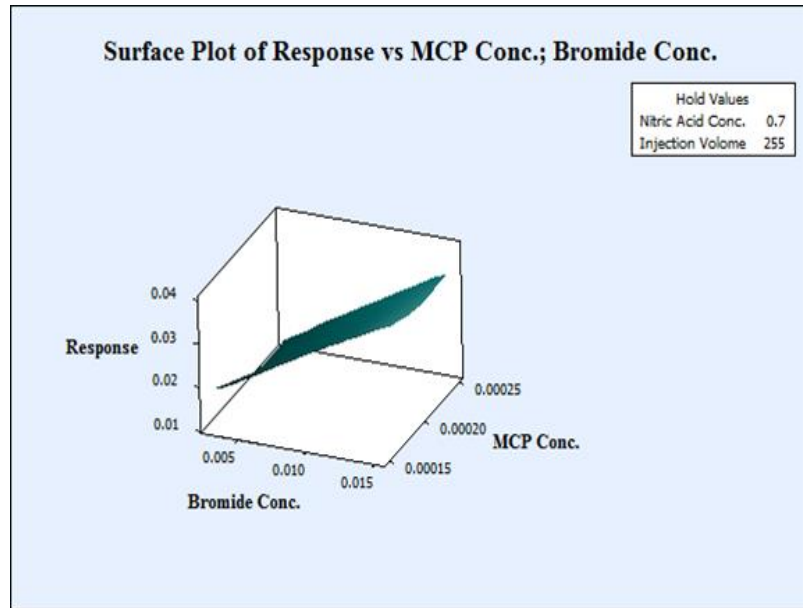
شکل (۳-۲۲): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل غلظت برمید و غلظت نیتریک‌اسید



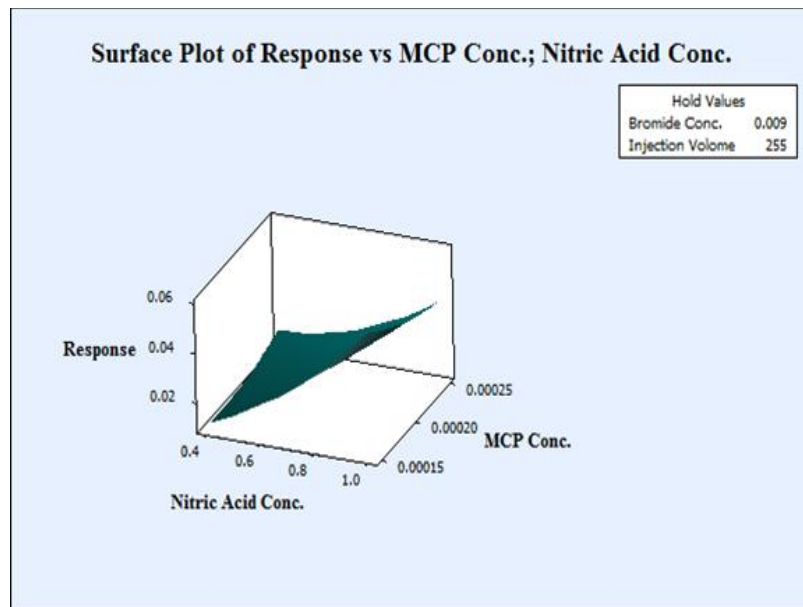
شکل (۳-۲۳): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل حجم تزریقی نمونه و غلظت برمید



شکل (۳-۲۴): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل حجم نمونه تزریقی و غلظت متاکروزول پرپل



شکل (۳-۲۵): منحنی پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل غلظت متاکرزول پرپیل و غلظت برومید



شکل (۳-۲۶): منحنی سطح پاسخ اندازه‌گیری ال-سیستئین در مقابل غلظت متاکرزول پرپیل و غلظت نیتریک‌اسید

با توجه به مدل ریاضی پیشنهادی، شرایط بهینه اندازه‌گیری ال-سیستئین با استفاده از نرم‌افزار Minitab محاسبه شد. نتایج در جدول (۳-۲۲) گزارش شده است. در شرایط بهینه می‌توان به حساسیت بهتری برای اندازه‌گیری ال-سیستئین دست پیدا کرد. مقایسه این نتایج، با نتایج حاصل از روش تغییر یک عامل در زمان نشان می‌دهد که شرایط بهینه بدست آمده از روش طرح آزمایش با استفاده از مدل باکس-بنکن، تا حدودی متفاوت از شرایط بهینه حاصل از روش تغییر یک عامل در زمان است که نشان‌دهنده این است که بین عوامل موثر بر سیگنال اندازه‌گیری ال-سیستئین برهمکنش وجود داشته است و در نتیجه شرایط بدست آمده از روش طرح آزمایش به مقادیر بهینه واقعی نزدیک‌تر است.

جدول (۳-۲۲): مقایسه شرایط بهینه‌سازی یک متغیر در زمان و طرح فاکتوریل

| عامل                        | مقادیر بهینه یک متغیر در یک زمان | مقادیر بهینه طرح فاکتوریل |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| نیتریک اسید (M)             | ۱/۰                              | ۱/۰                       |
| پتاسیم برومات (M)           | ۰/۰۲۰                            | ۰/۰۲۰                     |
| پتاسیم برومید (M)           | ۰/۰۲۰                            | ۰/۰۱۵                     |
| متاکرزول پرپیل (M)          | ۰/۰۰۰۲                           | ۰/۰۰۰۱۵                   |
| سرعت جریان حامل (ml/h)      | ۳۵/۰                             | ۳۵/۰                      |
| سرعت جریان واکنشگرها (ml/h) | ۱۰/۰                             | ۱۰/۰                      |
| طول ماریپیج واکنش (cm)      | ۴۵                               | ۴۵                        |
| حجم تزریقی نمونه (μl)       | ۲۲۰                              | ۳۷۰                       |
| پاسخ (ΔA)                   | ۰/۰۸۲                            | ۰/۰۹۵                     |

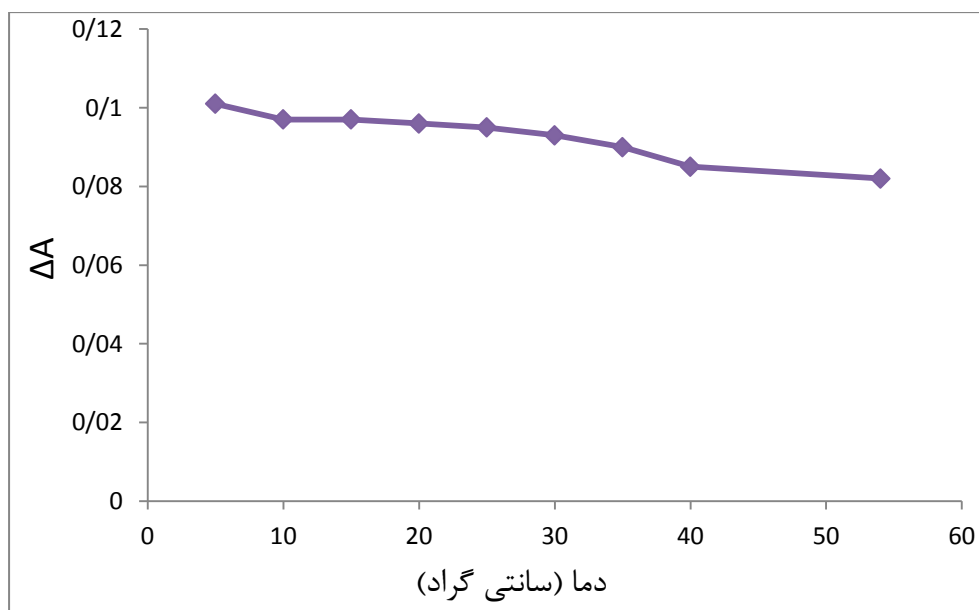
### ۳-۵- بررسی اثر دما

اثر دما بر روی سیگنال تجزیه‌ای در شرایط بهینه حاصل از روش طرح آزمایش، در محدوده دمایی ۴۵/۰-۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول ماریپیچ واکنش ۴۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۴) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، مخلوط نیتریک‌اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپیل  $10^{-4} \times 1/5$  مولار و پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار به ترتیب از کانال‌های دو ( $R_2$ )، سه ( $R_3$ ) و چهار ( $R_4$ ) با سرعت ثابت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک ( $R_1$ ) با سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. سپس برای اندازه‌گیری سیگنال تجزیه‌ای در هر دما ابتدا تمام محلول‌ها به حداقل ۳۰ دقیقه در حمام آب در دما مورد نظر قرار داده شدند تا دمایی محلول‌ها به دمایی مورد نظر برسند. پس از ثابت شدن جذب، محلول ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک ( $R_1$ ) تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۳) و شکل (۳-۲۷) آمده است. همانطوری که شکل (۳-۲۷) نشان می‌دهد با افزایش دما، سیگنال تجزیه‌ای به دلیل دایمر شدن ال-سیستئین و تبدیل آن به ال-سیستئین کاهش می‌یابد [۳]. از آنجایی که تنظیم دمای ۲۵ درجه به دلیل دمایی محیط بودن آسان‌تر می‌باشد، لذا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.



جدول (۳-۲۳): نتایج حاصل از بررسی اثر دما بر روی اختلاف جذب

| اختلاف جذب | دما (C°) |
|------------|----------|
| ۰/۱۰۱      | ۵        |
| ۰/۰۹۷      | ۱۰       |
| ۰/۰۹۷      | ۱۵       |
| ۰/۰۹۶      | ۲۰       |
| ۰/۰۹۵      | ۲۵       |
| ۰/۰۹۳      | ۳۰       |
| ۰/۰۹۰      | ۳۵       |
| ۰/۰۸۵      | ۴۰       |
| ۰/۰۸۲      | ۵۴       |



شکل (۳-۲۷): بررسی اثر دما بر روی اختلاف جذب

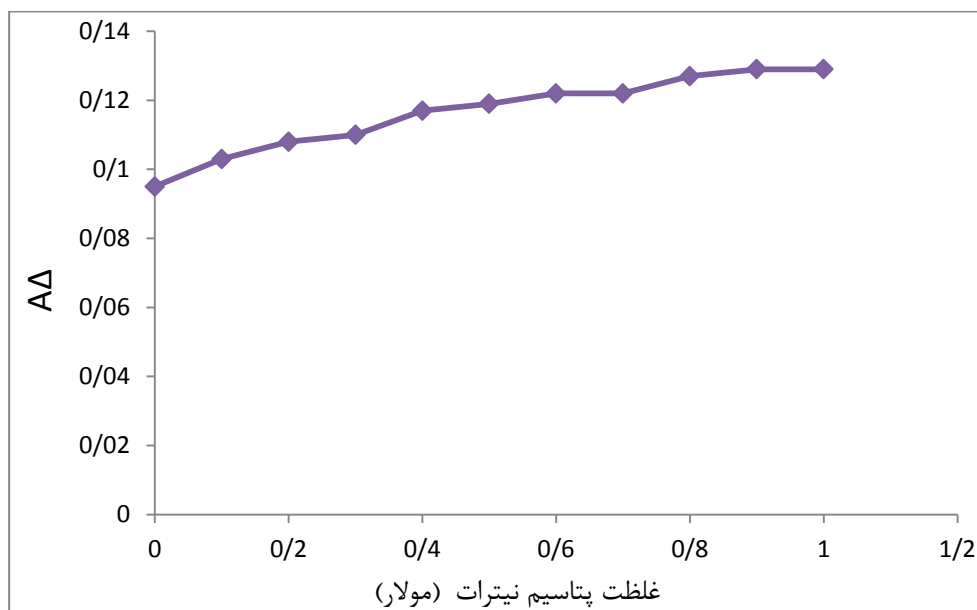
شرایط: ال-سیستین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $10^{-4} \times 1/5$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول ماریچ ۴۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

### ۳-۶- بررسی اثر قدرت یونی

اثر قدرت یونی بر روی سیگنال تجزیه‌ای در محدوده غلظتی ۱۰/۰ تا ۱/۰ مولار پتاسیم نیترات در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۴۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۴) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار، مخلوط نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپیل  $10^{-4} \times 1/5$  مولار به ترتیب از کانال‌های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب، محلول نمونه حاوی مخلوط ال-سیستین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و پتاسیم نیترات با غلظت‌های متفاوت به کانال شماره یک تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۴) و شکل (۳-۲۸) آمده است. با توجه به نتایج حاصل با افزایش غلظت پتاسیم نیترات به دلیل کاهش سرعت واکنش شاهد، سیگنال تجزیه‌ای افزایش می‌یابد به گونه‌ای که با تزریق محلول پتاسیم نیترات به تنهایی سیگنال جذبی مشاهده می‌شود. در ناحیه ۰/۰۶ تا ۱/۰ مولار پتاسیم نیترات سیگنال جذبی ثابت شد.

جدول (۳-۲۴): نتایج حاصل از بررسی قدرت یونی بروی اختلاف جذب

| غلظت پتاسیم نیترات (مولار) | اختلاف جذب |
|----------------------------|------------|
| ۰                          | ۰/۰۹۵      |
| ۰/۱۰                       | ۰/۱۰۳      |
| ۰/۲۰                       | ۰/۱۰۸      |
| ۰/۳۰                       | ۰/۱۱۱      |
| ۰/۴۰                       | ۰/۱۱۷      |
| ۰/۵۰                       | ۰/۱۱۹      |
| ۰/۶۰                       | ۰/۱۲۲      |
| ۰/۷۰                       | ۰/۱۲۲      |
| ۰/۸۰                       | ۰/۱۲۷      |
| ۰/۹۰                       | ۰/۱۲۹      |
| ۱/۰                        | ۰/۱۲۹      |



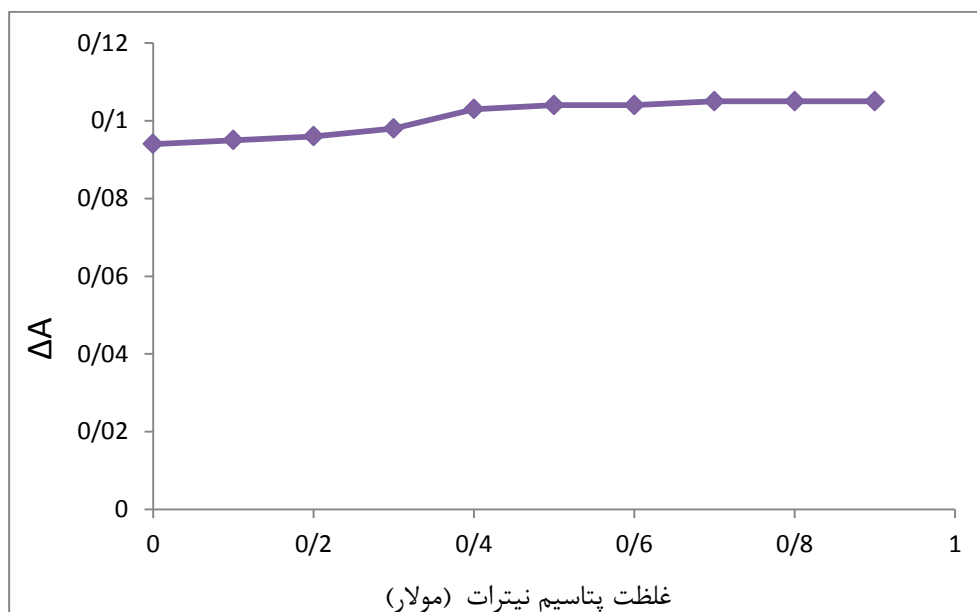
شکل (۳-۲۸): بررسی اثر پتاسیم نیترات تزریقی بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال-سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $1/5 \times 10^{-4}$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، طول ماریپیج واکنش ۴۵ سانتی‌متر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت.

به منظور تثبیت قدرت یونی برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های حقیقی، پتاسیم نیترات با غلظت ۰/۸۰ مولار مخلوط با پتاسیم برومات از کانال دو (R۴) پمپ شدند و اثر قدرت یونی در محدوده غلظتی ۰/۱۰ تا ۰/۹۰ مولار پتاسیم نیترات مخلوط با ال-سیستئین تزریقی در شرایط ثابت دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد، طول مارپیچ واکنش ۴۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر و در طول موج ۵۲۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که مطابق شکل (۳-۴) ابتدا واکنشگرها شامل: پتاسیم برمید با غلظت ۰/۰۱۵ مولار و نیتریک اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپیل  $1/5 \times 10^{-4}$  مولار و مخلوط پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار همراه با پتاسیم نیترات با غلظت ۰/۸۰ مولار به ترتیب از کانال‌های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) با سرعت ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و آب به عنوان جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت پمپ شدند. پس از ثابت شدن جذب، محلول نمونه حاوی مخلوط ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و پتاسیم نیترات با غلظت‌های متفاوت به کانال شماره یک تزریق شد. هر نمونه سه بار متوالی تزریق شد و میزان افزایش جذب توسط ثبات ثبت شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۵) و شکل (۳-۲۹) آمده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که سیگنال تجزیه‌ای تا غلظت ۰/۹۰ مولار از پتاسیم نیترات (بیشترین غلظت آزمایش شده) مستقل از قدرت یونی می‌باشد.

جدول (۳-۲۵): نتایج حاصل از بررسی اثر قدرت یونی بر روی اختلاف جذب

| غلظت پتاسیم نیترات (مولار) | اختلاف جذب |
|----------------------------|------------|
| ۰                          | ۰/۰۹۴      |
| ۰/۱۰                       | ۰/۰۹۵      |
| ۰/۲۰                       | ۰/۰۹۶      |
| ۰/۳۰                       | ۰/۰۹۸      |
| ۰/۴۰                       | ۰/۱۰۳      |
| ۰/۵۰                       | ۰/۱۰۴      |
| ۰/۶۰                       | ۰/۱۰۴      |
| ۰/۷۰                       | ۰/۱۰۵      |
| ۰/۸۰                       | ۰/۱۰۵      |
| ۰/۹                        | ۰/۱۰۵      |



شکل (۳-۲۹): بررسی اثر قدرت یونی بر روی اختلاف جذب

شرایط: ال-سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $1.5 \times 10^{-4}$ ، پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، طول مارپیچ ۴۵ سانتی متر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

### ۳-۷- شرایط بهینه حاصل

با توجه به نتایج به دست آمده در بررسی و بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر عملکرد سیستم شرایط بهینه زیر در رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت که در جدول (۳-۲۲) نشان داده شده است.

جدول (۳-۲۶): شرایط بهینه سیستم برای اندازه‌گیری ال-سیستئین

| پارامتر                     | مقدار بهینه          |
|-----------------------------|----------------------|
| نوع اسید                    | نیتریک اسید          |
| طول موج (nm)                | ۵۲۵                  |
| غلظت نیتریک اسید (M)        | ۱/۰                  |
| غلظت پتاسیم برومات (M)      | ۰/۰۲۰                |
| غلظت پتاسیم برمید (M)       | ۰/۰۱۵                |
| غلظت متاکرزول پرپل (M)      | $۱/۵ \times ۱۰^{-۴}$ |
| سرعت جریان واکنشگرها (mL/h) | ۱۰/۰                 |
| سرعت جریان حامل (mL/h)      | ۳۵/۰                 |
| طول مارپیچ واکنش (cm)       | ۴۵                   |
| حجم نمونه تزریقی (μL)       | ۳۷۰                  |
| دما (°C)                    | ۲۵/۰                 |
| غلظت پتاسیم نترات (M)       | ۰/۸۰                 |

### ۳-۸- بررسی مزاحمت‌ها

یکی از مهم‌ترین مراحل در توسعه یک روش تجزیه‌ای بررسی مزاحمت احتمالی گونه‌های مختلف در اندازه‌گیری گونه مورد نظر به منظور استفاده از آن در تجزیه نمونه‌های حقیقی است. به منظور تعیین میزان گزینش‌پذیری روش، اثر گونه‌های مختلف بر روی سیگنال حاصل از تزریق محلول ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد. اثر مزاحمت گونه‌های (آنیون‌ها و کاتیون‌ها) مختلف در شرایط بهینه غلظتی و دستگامی ذکر شده در جدول (۳-۲۶)، مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی مزاحمت‌ها در حالی که واکنشگرها شامل پتاسیم برمید، مخلوط نیتریک‌اسید همراه با متاکرزول‌پرپیل و مخلوط پتاسیم برومات همراه با پتاسیم نترات در شرایط غلظتی بهینه جدول (۳-۲۶) به ترتیب از کانال‌های دو (R<sub>2</sub>)، سه (R<sub>3</sub>) و چهار (R<sub>4</sub>) و جریان حامل از کانال شماره یک (R<sub>1</sub>) با سرعت‌های بهینه پمپ می‌شدند، ابتدا شش بار محلول ال-سیستئین با غلظت ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال یک (R<sub>1</sub>) تزریق و سیگنال مربوطه ثبت شد و میانگین ( $\bar{x}$ ) و انحراف استاندارد (s) سیگنال‌های جذبی (در غیاب گونه مزاحم) محاسبه گردید. سپس هر گونه مزاحم به میزان هزار برابر وزنی ال-سیستئین تهیه و سپس به صورت مخلوط با ال-سیستئین به سیستم تزریق شد و سیگنال مربوطه ثبت گردید. اگر سیگنال جذبی در این حالت، در محدوده  $\bar{x} \pm 3s$  باشد به این معناست که یون مورد نظر با نسبت موجود، مزاحم نیست؛ در غیر این صورت نسبت گونه مزاحم به ال-سیستئین مرتبا کم می‌شد تا مزاحمت مشاهده نشود. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۳-۲۷) آمده است. با توجه به نتایج این جدول مشخص گردید که بسیاری از گونه‌های مورد بررسی حتی هنگامی که به میزان هزار برابر ال-سیستئین حضور داشتند مزاحم نبودند. یون  $Ag^+$  به دلیل واکنش با  $Br^-$  و تشکیل رسوب AgBr مزاحمت ایجاد می‌کند. گونه‌های تیواوره و گلوکاتایون به دلیل واکنش با  $BrO_3^-$  اکسید شده و باعث می‌شوند  $Br_2$  کمتری با متاکرزول‌پرپیل واکنش دهد و از این طریق باعث کاهش

سرعت واکنش شاهد شده و سیگنال جذبی را افزایش می‌دهند. اثر مزاحمت برای یون‌های  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  با اضافه کردن ۱/۰ میلی‌لیتر محلول EDTA با غلظت ۸۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محلول ال-سیستئین (بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری) به ترتیب تا سطح ۸۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت و مزاحمت  $Ag^+$  با اضافه کردن ۱/۰ میلی‌لیتر پتاسیم کلرید با غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محلول ال-سیستئین (بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری) و سپس صاف کردن محلول توسط کاغذ صافی، تا ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت.

جدول (۳-۲۷): نتایج حاصل از بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری ال-سیستئین ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

| حد مجاز غلظت گونه به غلظت ال-سیستئین | گونه‌های مورد بررسی  |
|--------------------------------------|--|
| ۱۰۰۰                                 | تارتاریک‌اسید، اوره، $Co^{2+}$ ، $Al^{3+}$ ، $Ca^{2+}$ ، $Zn^{2+}$ ، $K^+$ ، $Pb^{2+}$ ، $Ba^{2+}$ ، $SO_4^{2-}$ ، فرمات، اگزالات، سیتریک‌اسید، استات، گلوکز |
| ۸۰۰                                  | EDTA، $Cd^{2+}$ ، فرمات  |
| ۵۰۰                                  | $Hg_2^{2+}$  |
| ۴۰۰                                  | $PO_4^{3-}$ ، $F^-$ ، $CN^-$   |
| ۳۰۰                                  | $Ni^{2+}$  |
| ۱۰۰                                  | $S_2O_5^{2-}$ ، $Cr^{3+}$  |
| ۸۰                                   | $Hg^{2+}$ ، $Mn^{2+}$ ، $Cl^-$   |
| ۱                                    | $Fe^{3+}$ ، $Fe^{2+}$ ، $Cr^{6+}$ ، $Ag^+$ ، گلوکوناتیون   |



### ۳-۹- منحنی کالیبراسیون

پس از دستیابی به شرایط بهینه برای اندازه‌گیری ال-سیستئین، منحنی کالیبراسیون رسم گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون مطابق روش زیر عمل شد:

در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی یعنی پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، مخلوط نیتریک‌اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپل  $10^{-4} \times 1/5$  مولار، مخلوط پتاسیم برومات ۰/۰۲۰ مولار و پتاسیم نترات ۰/۸ مولار، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جریان حامل ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، طول مارپیچ واکنش ۴۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر و دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد پس از ثابت شدن جذب در طول موج ۵۲۵ نانومتر، محلول‌های استاندارد ال-سیستئین در محدوده غلظتی ۲/۵۰ - ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک به طور متوالی سه بار تزریق شد و سیگنال مربوطه در طول موج ۵۲۵ نانومتر ثبت شد. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۳-۲۸) مشخص شد که در شرایط بهینه در محدوده غلظتی ۲/۰-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت ال-سیستئین وجود دارد. نتایج حاصل در شکل‌های (۳-۳۰)، (۳-۳۱) و جدول (۳-۲۸) نشان داده شده است.

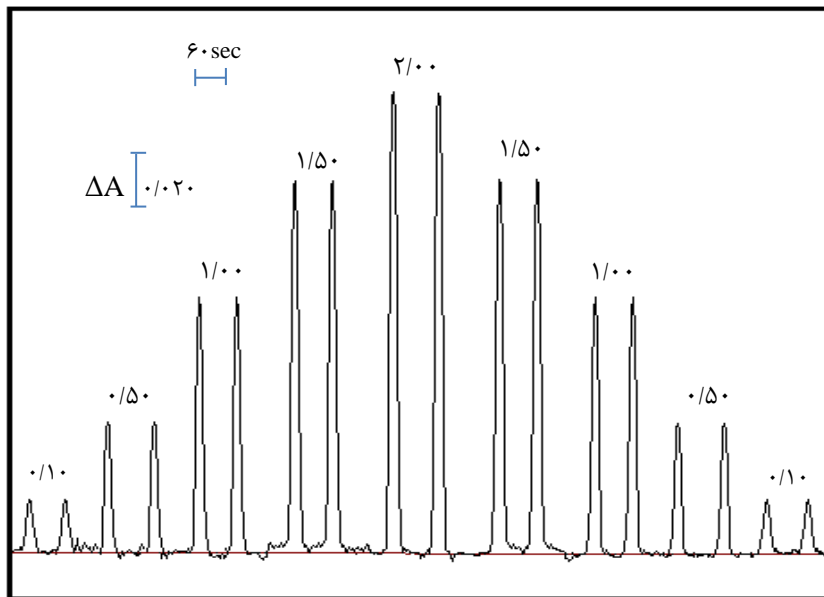
سپس به منظور افزایش ناحیه خطی روش شرایط بهینه تغییر داده شد، به طوری که غلظت ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین در شرایط دوم کمترین پاسخ تجزیه‌ای را دارا باشد. این کار به دلیل پیوستگی دو ناحیه کالیبراسیون انجام شده است. با تغییر شرایط بهینه غلظتی و در شرایط ثابت دستگاهی یعنی پتاسیم برمید ۰/۰۲۵ مولار، مخلوط نیتریک‌اسید ۱/۰ مولار همراه با متاکرزول پرپل  $10^{-4} \times 3$  مولار، مخلوط پتاسیم برومات ۰/۰۴ مولار همراه با پتاسیم نترات ۰/۸۰ مولار، سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جریان حامل ۳۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت، طول مارپیچ واکنش ۴۵ سانتی‌متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر و دمای ۲۵/۰ درجه سانتی‌گراد

محلول‌های استاندارد از ال-سیستئین در محدوده غلظتی ۲/۰-۱۶/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کانال شماره یک تزریق شد و سیگنال مربوطه در طول موج ۵۲۵ نانومتر ثبت شد. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۳-۲۹) مشخص شد که در شرایط ذکر شده محدوده غلظتی ۲/۰-۱۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین رابطه خطی بین سیگنال اندازه‌گیری شده و غلظت ال-سیستئین وجود دارد. نتایج حاصل در شکل‌های (۳-۳۰)، (۳-۳۱) و جدول (۳-۲۹) نشان داده شده است.

معادله منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت  $\Delta A = 0.00816 C_{L-Cy} + 0.0089$  و در ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت  $\Delta A = 0.0201 C_{L-Cy} - 0.0011$  است. که در آن  $\Delta A$  اختلاف جذب و  $C_{L-Cy}$  غلظت ال-سیستئین بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

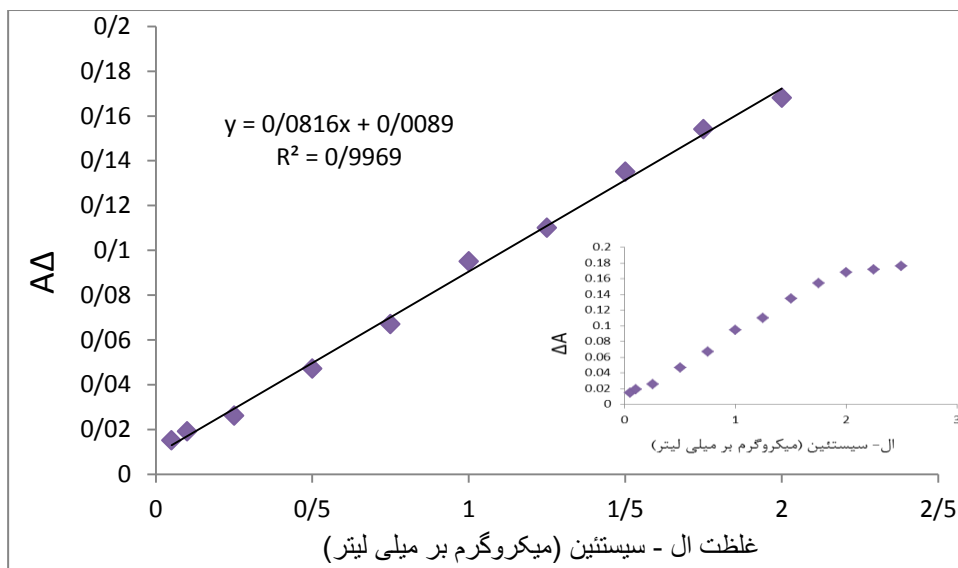
جدول (۳-۲۸) اطلاعات مربوط به منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-سیستئین

| $C_{L-Cy}$ (ppm) | $\Delta A$ |
|------------------|------------|
| ۰/۰۵             | ۰/۰۱۵      |
| ۰/۱۰             | ۰/۰۱۹      |
| ۰/۲۵             | ۰/۰۲۵      |
| ۰/۵۰             | ۰/۰۴۵      |
| ۰/۷۵             | ۰/۰۶۴      |
| ۱/۰۰             | ۰/۰۹۰      |
| ۱/۲۵             | ۰/۱۰۵      |
| ۱/۵۰             | ۰/۱۲۸      |
| ۱/۷۵             | ۰/۱۴۶      |
| ۲/۰۰             | ۰/۱۵۹      |
| ۲/۲۵             | ۰/۱۶۳      |
| ۲/۵۰             | ۰/۱۶۷      |



Time (second)

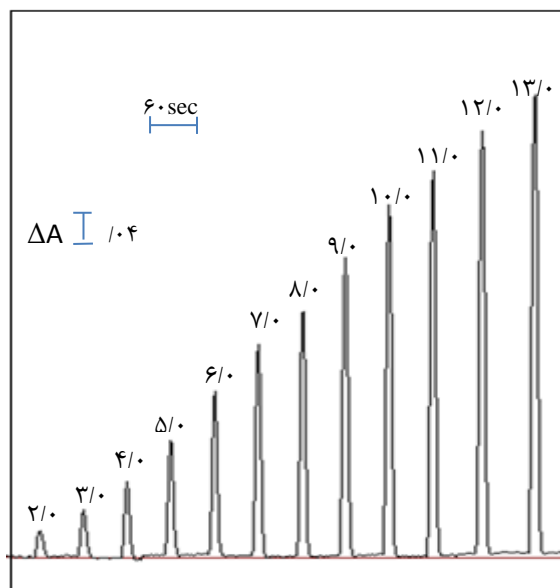
شکل (۳-۳): منحنی FIA مربوط به ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آل-سیستین شرایط: نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپل  $10^{-4} \times 1/5$  مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، پتاسیم نیترات ۰/۸۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، طول مارپیچ ۴۵ سانتی متر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت و سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت



شکل (۳-۳۱): منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۰۵ تا ۲/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آل-سیستین در شرایط: نیتریک اسید ۱/۰۰ مولار، متاکرزول پرپل  $10^{-4} \times 1/5$  مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۲ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۱۵ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ واکنش ۴۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت و سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

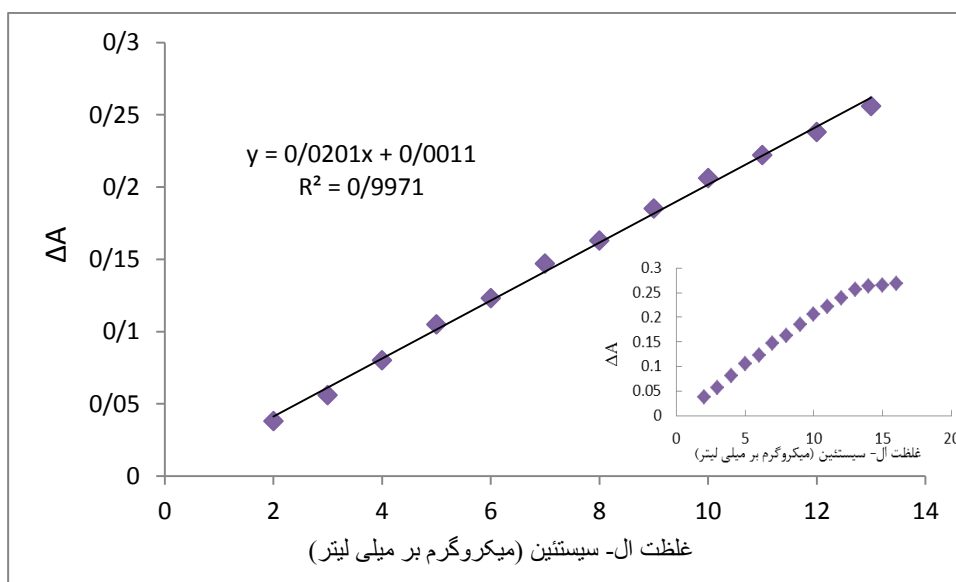
جدول (۳-۲۹) اطلاعات مربوط به منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی لیتر آل-سیستئین

| $C_{L-cy}$ (ppm) | $\Delta A$ |
|------------------|------------|
| ۲/۰              | ۰/۰۳۸      |
| ۳/۰              | ۰/۰۵۶      |
| ۴/۰              | ۰/۰۸۰      |
| ۵/۰              | ۰/۱۰۵      |
| ۶/۰              | ۰/۱۲۳      |
| ۷/۰              | ۰/۱۴۷      |
| ۸/۰              | ۰/۱۶۳      |
| ۹/۰              | ۰/۱۸۵      |
| ۱۰/۰             | ۰/۲۰۶      |
| ۱۱/۰             | ۰/۲۲۲      |
| ۱۲/۰             | ۰/۲۳۸      |
| ۱۳/۰             | ۰/۲۵۶      |
| ۱۴/۰             | ۰/۲۶۳      |
| ۱۵/۰             | ۰/۲۶۵      |
| ۱۶/۰             | ۰/۲۶۸      |



Time (second)

شکل (۳-۳۲): منحنی FIA مربوط به ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی لیتر ال-سیستئین شرایط: نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپیل  $۳/۰ \times 10^{-4}$  مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۴۰ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۲۵ مولار، پتاسیم نیترات ۰/۸۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ ۴۵ سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت و سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.



شکل (۳-۳۳): منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۲/۰ تا ۱۳/۰ میکروگرم بر میلی لیتر ال-سیستئین در شرایط: نیتریک اسید ۱/۰ مولار، متاکرزول پرپیل  $۳ \times 10^{-4}$  مولار، پتاسیم برومات ۰/۰۴۰ مولار، پتاسیم برمید ۰/۰۲۵ مولار، پتاسیم نیترات ۰/۸۰ مولار، دمای ۲۵/۰ درجه سانتی گراد، طول موج ۵۲۵ نانومتر، طول مارپیچ ۴۵ واکنش سانتی متر، حجم نمونه تزریقی ۳۷۰ میکرولیتر، سرعت جریان آب ۳۵/۰ میلی لیتر بر ساعت و سرعت جریان واکنشگرها ۱۰/۰ میلی لیتر بر ساعت.

### ۳-۱۰- حد تشخیص

برای تعیین حد تشخیص این روش از معادله (۳-۷) استفاده شد. در این رابطه  $S_b$  انحراف استاندارد سیگنال شاهد و  $m$  شیب منحنی کالیبراسیون است. برای تخمین انحراف استاندارد شاهد به این صورت عمل شد که ابتدا نویز پیک به پیک<sup>۱</sup> با توجه به اختلاف بین حداکثر و حداقل نوسانات خط مبنا اندازه‌گیری گردید. از آنجایی که نویز پیک به پیک حدود پنج برابر نویز<sup>۲</sup> rms (انحراف استاندارد شاهد) می‌باشد مقدار انحراف استاندارد سیگنال شاهد،  $۰/۰۰۴۳$  به دست آمد. با توجه به شیب منحنی کالیبراسیون ( $m=۰/۰۷۶$ ) و معادله (۳-۷) حد تشخیص روش  $۰/۰۳۲$  میکروگرم بر میلی‌لیتر ال - سیستین به دست آمد.

$$\text{LOD} = \frac{3S_b}{m} \quad \text{معادله (۳-۱۹)}$$

### ۳-۱۱- دقت و صحت روش

برای مطالعه دقت و صحت روش محلول استاندارد از ال - سیستین با غلظت  $۰/۵۰$  میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده دامنه خطی منحنی کالیبراسیون اول و محلول‌های استاندارد از ال - سیستین با غلظت  $۵/۰$  و  $۱۲/۰$  میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده دامنه خطی منحنی کالیبراسیون دوم انتخاب شد. به این منظور ۶ تزریق تکراری از محلول‌های انتخاب شده در شرایط منحنی کالیبراسیون اول و منحنی کالیبراسیون دوم به سیستم انجام شد و سیگنال جذبی مربوطه ثبت شد. پس از ثبت سیگنال‌ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت مربوط به میانگین سیگنال‌ها اندازه‌گیری شد. سپس انحراف استاندارد و انحراف استاندارد نسبی غلظت محاسبه گردید.

---

1- Peak to peak noise

2- Root mean square

مقدار t بحرانی در سطح اطمینان ۹۵٪ برای ۶ اندازه‌گیری، ۲/۵۷ می‌باشد. همچنین بررسی آزمون t نشان می‌دهد که بین مقدار ال-سیستئین اندازه‌گیری شده و مقدار ال-سیستئین واقعی موجود در محلول، اختلاف معناداری وجود نداشته و روش دارای خطای سیستماتیک (یا خطای معین) نمی‌باشد. مقادیر RSD نشان دهنده دقت خوب روش است. درصد بازیابی به ترتیب نشان دهنده دقت و صحت خوب روش است. جدول (۳-۳۰) دقت و صحت روش را در شرایط منحنی کالیبراسیون اول و منحنی کالیبراسیون دوم نشان می‌دهد.

جدول (۳-۳۰): بررسی دقت و صحت روش در شرایط منحنی کالیبراسیون اول و منحنی کالیبراسیون دوم

| غلظت ال-سیستئین<br>(میکروگرم بر میلی‌لیتر) | میزان ال-سیستئین اندازه‌گیری شده*<br>(میکروگرم بر میلی‌لیتر) | %RSD<br>(n = ۶) | نتایج آزمون t | درصد بازیابی |
|--|--|-----------------|---------------|--------------|
| ۰/۵۰                                       | ۰/۴۹ ± ۰/۰۱  | ۲/۰۴            | ۱/۱۲          | ۹۸/۰         |
| ۵/۰۰                                       | ۴/۹۹ ± ۰/۰۳  | ۰/۶۴            | ۰/۱۵          | ۹۹/۸         |
| ۱۲/۰۰                                      | ۱۱/۹۸ ± ۰/۰۴   | ۰/۳۳            | ۱/۲۲          | ۹۹/۸         |

### ۳-۱۲- کاربرد روش در اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های حقیقی

برای بررسی کارایی روش پیشنهادی به منظور استفاده در نمونه‌های حقیقی با بافت‌های مختلف، این روش برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه آب شهر شاهرود و همچنین دو نمونه سرم و ادرار با اعمال شرایط روش پیشنهادی به کار گرفته شد. برای انجام این بررسی، ابتدا به حجم مشخصی از آب شهر عامل‌های رفع مزاحمت اضافه گردید و با کاغذ صافی صاف شد و سپس به نمونه آب شهر مقادیر مشخصی از محلول ال-سیستئین افزوده شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون، غلظت ال-سیستئین در نمونه‌های آب اندازه‌گیری شد. هراندازه‌گیری سه بار تکرار شد که نتایج آن در

جدول (۳-۳۱) آورده شده است. مقادیر  $t$  و درصدهای بازیابی نشان دهنده صحت خوب روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری ال-سیستئین در نمونه‌های آب می‌باشد.

نحوه آماده سازی سرم به این صورت است که ابتدا ۱/۲ میلی لیتر استونیتریل به ۲ میلی لیتر سرم به منظور جداکردن پروتئین‌های موجود در آن اضافه گردید، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد [۴۵]. سپس ۱/۰ میلی لیتر از محلول رویی سرم در لوله آزمایش برداشته شد و در بالن حجمی ۲۵/۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد. در انتها یک میلی لیتر از محلول رقیق شده برداشته شد و به روش افزایش استاندارد در بالن‌های حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری در شرایط ناحیه کالیبراسیون اول به روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. هر اندازه‌گیری سه بار تکرار شد که نتایج آن در جدول (۳-۳۱) آورده شده است.

نحوه آماده سازی ادرار به این صورت بود که ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و ناخالصی‌های آن جدا گردید. سپس ۵/۰ میلی لیتر از محلول رویی آن برداشته و در بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد. در انتها ۱/۰ میلی لیتر از محلول آماده شده برداشته شد و به روش افزایش استاندارد در بالن‌های حجمی ۱۰/۰ میلی لیتری در شرایط ناحیه کالیبراسیون دوم به روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. هر اندازه‌گیری سه بار تکرار شد که نتایج آن در جدول (۳-۳۱) آورده شده است. مقدار ال-سیستئین در افراد سالم کمتر از ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است [۳].



جدول (۳-۳۱): نتایج حاصل از اندازه‌گیری آل - سیستین در نمونه‌های حقیقی

| نمونه           | آل - سیستین<br>اضافه شده (میلی -<br>گرم بر لیتر) | آل - سیستین اندازه -<br>گیری شده* (میلی -<br>گرم بر لیتر) | %RSD<br>(n=3) | نتایج آزمون<br>t | درصد بازیابی | میکروگرم بر میلی لیتر<br>آل - سیستین در<br>نمونه اولیه |
|-----------------|--|---|---------------|------------------|--------------|--|
| آب<br>شهرشاهرود | -  | < LOD   | -             | -                | -            | -  |
|                 | ۰/۳۰   | ۰/۳۱ ± ۰/۰۲   | ۶/۴۵          | ۱/۰              | ۱۰۳/۳        | -  |
|                 | ۰/۶۰   | ۰/۶۱ ± ۰/۰۱   | ۱/۹۶          | ۱/۶۶             | ۱۰۱/۶۶       | -  |
|                 | ۱/۲۰   | ۱/۲۱ ± ۰/۰۱   | ۱/۲۴          | ۰/۰۶             | ۱۰۰/۴۱       | -  |
|                 | ۱/۸۰   | ۱/۸۱ ± ۰/۰۱   | ۰/۲۷          | ۲/۰              | ۱۰۰/۵        | -  |
| سرم             | -  | ۰/۵۶  | -             | -                | -            | ۱۴۰/۰  |
|                 | ۰/۳  | ۰/۸۴ ± ۰/۰۲   | ۲/۲۵          | ۱/۸۲             | ۹۷/۶۷        | -  |
|                 | ۰/۷  | ۱/۲۶ ± ۰/۰۳   | ۲/۰۶          | ۰/۱۳             | ۱۰۰/۰        | -  |
|                 | ۱/۰  | ۱/۵۷ ± ۰/۰۱   | ۰/۵۷          | ۱/۵۳             | ۱۰۰/۶۴       | -  |
| ادرار           | -  | ۲/۱   | -             | -                | -            | ۴۲۰/۰  |
|                 | ۱/۰  | ۳/۰۷ ± ۰/۰۴   | ۱/۲۳          | ۱/۳۶             | ۹۹/۰۳        | -  |
|                 | ۲/۰  | ۴/۱۲ ± ۰/۰۵   | ۱/۲۸          | ۰/۶۵             | ۱۰۰/۴۸       | -  |
|                 | ۳/۰  | ۵/۱۴ ± ۰/۰۹   | ۱/۷۳          | ۰/۷۷             | ۱۰۰/۷۸       | -  |

\* مقدار میانگین ± انحراف استاندارد سه اندازه‌گیری تکراری



فصل چهارم:

بحث و نتیجه گیری

#### ۴-۱- اثر بازداری ال - سیستئین بر اکسیداسیون متاکرزول پرپل توسط برومات

در حضور پتاسیم برمید

#### ۴-۱-۱- ارقام شایستگی روش

نتایج حاصل از بررسی منحنی کالیبراسیون در جدول (۳-۲۸) و (۳-۲۹) نشان می‌دهد که در محدوده غلظتی ۱۳-۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال - سیستئین، بین غلظت ال - سیستئین و سیگنال تجزیه‌ای رابطه خطی وجود دارد. معادلات مربوطه و مقادیر ضریب همبستگی در بخش (۳-۹) آمده است.

مقدار انحراف استاندارد نسبی برای ۶ اندازه‌گیری تکراری غلظت‌های ۰/۵۰، ۵/۰ و ۱۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۲/۰۴، ۰/۶۴ و ۰/۳۳ درصد می‌باشد که نشان دهنده دقت خوب روش است. مقادیر درصد بازیابی نشان داده شده در جدول (۳-۲۳) بیانگر صحت روش است. مقدار حدتشخیص روش ۰/۰۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

نتایج نشان داده شده در جدول (۳-۲۴) بیان می‌کند که بیشتر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در اندازه‌گیری ال - سیستئین مزاحم نیستند و روش از انتخابگری بالایی برخوردار است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ال - سیستئین در نمونه‌های حقیقی در جدول (۳-۲۴) آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که روش پیشنهادی دقت و صحت خوبی در اندازه‌گیری ال - سیستئین در نمونه‌های حقیقی دارد.

سرعت اندازه‌گیری نمونه با روش پیشنهادی ۱۲۰ نمونه بر ساعت است.

## ۴-۱-۲- مقایسه روش با سایر روش‌های موجود در اندازه‌گیری غلظت آل - سیستئین

در این بخش، روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری آل - سیستئین با برخی روش‌های دیگر که در آن‌ها آل - سیستئین با استفاده روش‌های مختلف اندازه‌گیری شده مقایسه شده است. روش پیشنهادی نسبت به تمام روش‌های گزارش شده از لحاظ ارقام شایستگی، هزینه روش، پیچیدگی، جنبه‌های زیست محیطی و سرعت دارای برتری می‌باشد. در مقایسه با روش‌های غیر سینتیکی که پیچیده و هزینه‌بر هستند و در برخی از آن‌ها به علت استفاده از حلال‌های آلی مشکل آلودگی محیط زیست وجود دارد، روش‌های سینتیکی - اسپکتروفتومتری معمولاً دارای حساسیت بالاتری می‌باشند. روش ارائه شده دارای سرعت نمونه‌گیری بالایی است و نمونه‌های زیادی را می‌توان در زمان کوتاهی اندازه‌گیری کرد. جدول (۴-۱) مقایسه بین روش پیشنهادی با سایر روش‌های اندازه‌گیری آل - سیستئین را نشان می‌دهد.

جدول (۴-۱): مقایسه روش تزریق در جریان پیوسته برای اندازه‌گیری آل - سیستئین با روش‌های دیگر

| روش اندازه گیری                         | حد تشخیص (میکروگرم بر میلی لیتر) | ناحیه خطی (میکروگرم بر میلی لیتر)           | مرجع         | سال  |
|---|----------------------------------|---|--------------|------|
| جریان متوقف - آمپرومتری                 | ۰/۳                              | ۲-۳۲  | ۱۳           | ۱۹۸۹ |
| جریان تزریقی                            | ۰/۵۳۳                            | ۷/۲۶-۹/۶۹                                   | ۱۴           | ۱۹۹۹ |
| جریان تزریقی - اسپکتروفتومتری           | ۰/۰۲۴                            | ۰/۱۲۱-۱۰/۹۰                                 | ۱۵           | ۲۰۰۱ |
| جریان تزریقی - بی امپرومتری             | ۰/۰۱۲                            | ۰/۰۴۸-۴/۸۴                                  | ۱۶           | ۲۰۰۱ |
| جریان تزریقی                            | -                                | ۰/۲۴-۶۰/۵۸                                  | ۱۷           | ۲۰۰۲ |
| جریان تزریقی - نورتابی شیمیایی          | $۶/۰۵ \times 10^{-۴}$            | $۱/۲۱ \times 10^{-۳} - ۱/۲۱ \times 10^{-۱}$ | ۱۸           | ۲۰۰۴ |
| اسپکتروفتومتری مادون قرمز تبدیل فوری    | -                                | ۶-۳۰۰                                       | ۳            | ۲۰۰۸ |
| ولتامتری                                | $۲/۸۷ \times 10^{-۵}$            | $۱/۲۱ \times 10^{-۲} - ۱/۲۱ \times 10^{-۴}$ | ۲۱           | ۲۰۱۲ |
| سینتیکی - اسپکتروفتومتری - جریان تزریقی | ۰/۰۳۲                            | ۰/۰۵-۰/۱۳                                   | روش پیشنهادی | ۲۰۱۴ |

#### ۴-۱-۳- نتیجه‌گیری

برای اولین بار ال-سیستئین توسط روش تزریق در جریان پیوسته با استفاده از اثر بازداری آن بر واکنش متاکرزول‌پرپل اندازه‌گیری شده است. روش پیشنهادی به راحتی در آزمایشگاه‌های معمولی و با صرف هزینه اندک قابل انجام و کنترل است و هیچ گونه مشکل آلودگی محیط زیست را به همراه ندارد و سرعت نمونه‌گیری روش بالا است.

#### ۴-۱-۴- آینده‌نگری

- ۱- اندازه‌گیری مقادیر کم ال-سیستئین در نمونه‌های آب و نمونه‌های بیولوژیکی مانند پلاسما و نمونه‌های دارویی با روش پیشنهادی و بسط واکنشگرهای جدیدتر و استفاده از اکسندهای بهتر.
- ۲- اندازه‌گیری نمونه‌هایی با خصوصیات مشابه ال-سیستئین که سبب بازداری واکنش متاکرزول پرپل با پتاسیم برومات می‌شود.

## منابع و مراجع:

- [1]. R. Possari, R. F. Carvalhal, R. K. Mendes, L. T. Kubota (2006) "Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold" **Analytica Chimica Acta**, 575, 2, pp 172-179.
- [2]. A. V. Bulatov, A. V. Petrova, A. B. Vishnikin, L. N. Moskvina (2013). " Stepwise injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active supplements and fodders" **Microchemical Journal**, 110, 0, pp 369-373.
- [3]. K. Kargosha, S. H. Ahmadi, M. Zeeb, S. R. Moeinossadat (2008) "Vapour phase Fourier transform infrared spectrometric determination of l-cysteine and l-cystine" **Talanta**, 74, 4, pp 753-759.
- [4]. بختیاری س، محمدنژاد اروق ج، خوشدل ع و نژاوند س، (۲۰۰۷)، "بیوشیمی بالینی هنری ۲۰۰۷ با اطلس رنگی" موسسه انتشاراتی اندیشه رفیع
- [5]. N. Maleki, A. Safavi, F. Sedaghati, F. Tajabadi (2007) "Efficient electrocatalysis of l-cysteine oxidation at carbon ionic liquid electrode" **Analytical Biochemistry**, 369, 2, pp 149-153.
- [6]. S. Ge et al., (2012) "Electrochemical biosensor based on graphene oxide–Au nanoclusters composites for l-cysteine analysis" **Biosensors and Bioelectronics**, 31, 1, pp 49-54..
- [7]. L.-P. Liu, Z.-J. Yin, Z.-S. Yang, (2010) "A l-cysteine sensor based on Pt nanoparticles /poly(o-aminophenol) film on glassy carbon electrode" **Bioelectrochemistry**, 79, 1, pp 84-89.
- [8]. A. A. Ensafi, S. Behyan, (2007) "Sensing of l-cysteine at glassy carbon electrode using Nile blue A as a mediator" **Sensors and Actuators B: Chemical**, 122, 1, pp 282-288.
- [9]. J. J. J. Ruiz-Díaz et al., (2006) "Enzymatic rotating biosensor for cysteine and glutathione determination in a FIA system" **Talanta**, 68, 4, pp 1343-1352.
- [10]. C. de Carvalho Castro e Silva, M. C. Breitzkreitz, M. Santhiago, C. C. Corrêa, L. T. Kubota, (2012) "Construction of a new functional platform by grafting poly(4-vinylpyridine) in multi-walled carbon nanotubes for complexing copper ions aiming the amperometric detection of l-cysteine" **Electrochimica Acta**, 71, 0 , pp 150-158.
- [11]. A. R. Buckpitt, D. E. Rollins, S. D. Nelson, R. B. Franklin, J. R. Mitchell, (1977) "Quantitative determination of the glutathione, cysteine, and N-acetyl cysteine conjugates of acetaminophen by high-pressure liquid chromatography" **Analytical Biochemistry**, 83, 1, pp 168-177.
- [12]. S. Ikeda, H. Satake, (1982) "Studies on analytical methods by amperometric titration using a rotating platinum electrode: Part 47. Successive Determination of L-

Cysteine and L-Cystine by Amperometric Titration" **Analytica Chimica Acta**, 142, 0, pp 289-292.

[13]. A. Cardoso, M. Silva, D. Perez-Bendito, (1989) " Automatic stopped-flow determination of l-cysteine" **Talanta**, 36, 9, pp 963-965.

[14]. I. d. C. Vieira, O. Fatibello-Filho, (1999) " L-Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure" **Analytica Chimica Acta** , 399, 3, pp 287-293.

[15]. N. Teshima, T. Nobuta, T. Sakai, (2001) "Simultaneous flow injection determination of ascorbic acid and cysteine using double flow cell" **Analytica Chimica Acta**, 438, 1-2, pp 21-22 .

[16]. C. Zhao, J. Zhang, J. Song, (2001) Determination of l-Cysteine in Amino Acid Mixture and Human Urine by Flow-Injection Analysis with a Biamperometric Detector. **Analytical Biochemistry** 297, 170.

[17]. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, (2002) "Flow injection chemiluminescent method for the successive determination of l-cysteine and l-cystine using photogenerated tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (III)" **Talanta**, 58, 5, pp 987-994.

[18]. C. Lau, X. Qin, J. Liang, J. Lu, (2004) "Determination of cysteine in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis with a chemiluminescence detector" **Analytica Chimica Acta**, 514,1 , pp 45-49.

[19]. J. Liu, J.-i. Itoh, (2006) "Kinetic determination of cysteine on flow injection system by utilizing catalytic complexation reaction of Cu(II) with 5,10,15,20-tetrakis (4-N-trimethylamino-phenyl) porphyrin" **Talanta** 70,4, pp 791-796.

[20]. B. Rezaei, A. Mokhtari, (2007) " A simple and rapid flow injection chemiluminescence determination of cysteine with Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Ce(IV) system" **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 66, 2 , pp 359-363.

[21]. A. Nezamzadeh-Ejehieh, H.-S. Hashemi, (2012) "Voltammetric determination of cysteine using carbon paste electrode modified with Co(II)-Y zeolite" **Talanta**, 88, 0, pp 201-208.

[22]. X. Liu, L. Luo, Y. Ding, Z. Kang, D. Ye, (2012) "Simultaneous determination of L-cysteine and L-tyrosine using Au-nanoparticles/poly-eriochrome black T film modified glassy carbon electrode" **Bioelectrochemistry**, 86,0, pp 38-45.

[23] . غ .ع . پارسا، ب . نجفی، (۱۳۸۷) "سینتیک شیمیایی (مبانی و کاربردها)"، چاپ اول، مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان.

[24]. D. Perez. Bendito, M. Silva. (1988) "*Kinetic methods in analytical chemistry*" Ellishorwood, chichester.



[25]. E. B. Sandell, I.M. Kolthoff. (1934) **Journal of American Chemical Society** , 56, pp 1426.

[26]. H. A. Mottola. (1998) "**Kinetic Aspects of analytical chemistry**", Johan Wiley and sons.

[27]. M. Arab Chamjangali, G. Bagherian, S. Ameri. (2009) "A new induction period based reaction rate method for determination trace amounts of phenylhydrazine in water samples" **Journal of Hazardous Materials**, 166, pp 701–705.

[28]. M. Arab Chamjangali, G. Bagherian, N. Salek-Gilani. (2007) "Determination of trace amounts of thiocyanate by a new kinetic procedure based on an induction period" **Spectrochimica Acta A** , 67, pp 1252–1256.

[29]. ا. اسکوگ، (۱۳۸۷) "**اصول تجزیه دستگاهی**"، جلد سوم، ترجمه ع.سلاجقه، چاپ سوم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران

[30]. Christian, G.D., O'Reilly, J.E., **Instrumental Analysis**, Prentice & Hall, New Jersey, pp. 854-879, 1986

[31]. معصومی ع، (۱۳۷۴) "**شیمی دستگاهی**"، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

[32]. Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Widmer, H.M., **Analytical Chemistry**, Wiley-VCH, Berlin, pp. 321-338, 1998.

[33]. عرب چم جنگلی م، (۱۳۸۱)، رساله دکتری: "ارائه روشهای تزریق در جریان پیوسته (FIA) با آشکارسازی اسپکتروفتومتری برای اندازه گیری مقادیر ناچیز روتنیم (III)، یدات، پدیدات، هیدرازین، آهن (II) و آهن (III)"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[34]. بگری امینه م، (۱۳۸۰)، پایان نامه ارشد: "اندازه گیری مقادیر کم روتنیم (III) و اسکوربیک اسید به روش تزریق در جریان پیوسته (FIA)"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[35]. T. Ghous (1999) "Flow injection analysis" **Journal of chemical society**, 21, pp 375-381.

[36]. Harvey, D., **Modern Analytical Chemistry**, McGraw-Hill, New York, pp.649-659, 2000.

[37]. قوچانی مقدم ا، (۱۳۹۱) ، پایان نامه ارشد: "ارابه یک روش اتوماتیک تزریق در جریان پیوسته برای اندازه گیری تیواوره بر اساس زمان القایی"، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود

[38]. ج. ان. میلر، (۱۳۸۸) "**آمار و کمومتری کس برای شیمی تجزیه**"، ترجمه م.گلایی، انتشارات دانشگاه تبریز، چاپ سوم.

- [39]. کوچک پور ح، (۱۳۹۱)، پایان‌نامه ارشد: "استفاده از روش‌های طراحی آزمایش در بهینه‌سازی شرایط آنالیز ترکیبات آلی فرار موجود در نمونه‌های آب رودخانه بابلرود با روش فضایی فوقانی ایستا-کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی"، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران
- [40]. Montgomery, D.C., **Design and analysis of experiments**, Canada, pp1-12, 1991
- [41]. K.M. Sharif, M.M.Rahman , j. Azmir ,A.Mohamed ,(2014) "Experimental design of supercritical fluid extraction" **Journal of Food Engineering**,124, pp 105–116
- [42]. Morgan, E.D., **Chemometrics: Experimental Design**, london ,1995
- [43]. H. Reuben, Simoyi, R. Irving, Epstein, K. Kenneth, (1994) " Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Thiourea by Bromate in Acidic Solution " **The Journal of Physical Chemistry**, 98, pp 551-557.
- [44]. Idris, S. O. Ibrahim, A. P. Iyun, J. F. Mohammed, Y, (2010) " Kinetics and Mechanism of Oxidation of L - Methionine by Potassium Bromate in Aqueous Hydrochloric Acid Medium" , **Applied Sciences Research**, 2, 5, pp355-362
- [45]. Mu. Naushad, V.K. Gupta, S.M. Wabaidur , Z. A. Alothman (2013) "Simultaneous Determination of Benserazide and Levodopa in Pharmaceutical Tablet, Human Serum and Urine Sample by Differential Pulse Voltammetry Using Modified Glassy Carbon Electrode" **International Journal of Electrochemical Science**,8,pp297 – 311.

## Abstract

In this study, a flow injection method was described for determination of L-Cysteine in water, human serum and urine. The method is based on the inhibition effect of L-Cysteine on the reaction between Meta Cresol Purple (MCP) and potassium bromate that catalyzed by bromide ions. In the presence of L-Cysteine an induction period was appeared in the reaction system, which is proportional to the L-Cysteine concentration. The reaction was monitored spectrophotometrically by measuring the change in absorbance of MCP at 525 nm. The chemical and FIA variables were studied and optimized using the univariate and Factorial design optimization methods. Under the optimum conditions, L-Cysteine can be determined in the range of 0.0500-13.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The limit of detection ( $3\sigma$ ) for L-Cysteine was 0.032  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The relative standard deviation for six replicate determination of 0.500, 5.00 and 12.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  L-Cysteine were 2.04%, 0.66% and 0.33%, respectively. The proposed method was applied to determine of L-Cysteine in water, human serum and urine sample with satisfactory results.

## Keywords

L-Cysteine, Induction period, Kinetics, Meta Cresol Purple, Spectrophotometry, FIA, Factorial design



Shahrood University of Technology

**Flow injection determination of L-Cysteine based on  
spectrophotometric Detector**

Farzaneh Hajian Asrami

Supervisor:

Dr. Mansour Arab Chamjangali

Advisor:

Dr. Fatemeh Masdarolomoor

2014 January