

کاربرد روش استخراج فاز جامد انتخابی با استفاده از پلیمرهای قالب مولکولی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای اندازه‌گیری مقدارهای جزئی سلکوکسیب در نمونه‌های ادرار

سعیده انصاری، اعظم قربانی*⁺

گروه شیمی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده: در این پژوهش از یک پلیمر قالب مولکولی (MIP) برای اندازه‌گیری مقدارهای ناچیز سلکوکسیب در نمونه‌های ادرار به روش استخراج فاز جامد انتخابی (SPE) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای سنتز پلیمر قالب مولکولی به روش غیرکوالانسی از سلکوکسیب به عنوان مولکول هدف، متاکریلیک اسید (MAA) به عنوان مونومر عاملی، اتیلن گلیکول دی متاکریلات (EGDMA) به عنوان اتصال دهنده عرضی، آزوبیس ایزوبوتیرونیتریل (AIBN) به عنوان آغازگر و کلروفرم به عنوان حلال استفاده شد. همچنین پلیمر مولکول‌نگاری نشده (NIP) که تنها تفاوت آن با پلیمر قالب مولکولی در نبود مولکول هدف می‌باشد، برای مقایسه سنتز شد. ویژگی‌های پلیمرهای سنتز شده به وسیله طیف‌های فروسرخ (FT-IR) و تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفتند. شرایط بهینه‌سازی برای پارامترهای تأثیرگذار در استخراج دارو مانند pH سرعت جریان محلول‌های عبوری و شستشو، حجم حلال شوینده و مقدار گرم جاذب، برای دستیابی به درصد بازیابی‌های بالا، با استفاده از روش طراحی آزمایش و کمومتریکس مورد مطالعه قرار گرفت. ظرفیت فاز جامد برای پلیمر قالب مولکولی سنتز شده نیز با استفاده از هم‌دمای لانگمویر ۱۵/۰۶ میلی‌گرم بر گرم به دست آمد. حد تشخیص (LOD) و حد آشکارسازی (LOQ) روش تجزیه‌ای به ترتیب ۸ و ۲۶/۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر و همچنین میزان درصد بازیابی برای نمونه‌های ادرار در بازه ۱۰۲-۹۲/۶ درصد و انحراف استاندارد نسبی (RSD%) کمتر از ۴/۶۵٪ به دست آمد. نتیجه‌های به دست آمده نشان دادند، این روش از ظرفیت شناسایی، بازده و تکرارپذیری بالا برای جداسازی و اندازه‌گیری مقدارهای ناچیز سلکوکسیب در نمونه‌های ادرار برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: سلکوکسیب؛ استخراج فاز جامد؛ پلیمر قالب مولکولی؛ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا؛ بهینه‌سازی؛ طراحی آزمایش مرکب مرکزی.

KEYWORDS: Celecoxib; Solid-phase extraction; Molecularly imprinted polymer; High-performance liquid chromatography; Optimization; Central composite design.

مقدمه

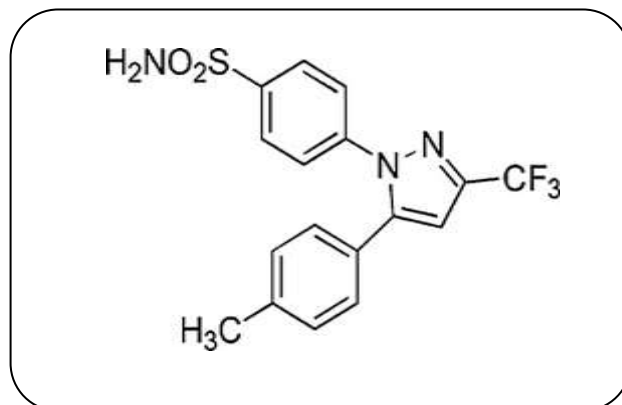
سلکوکسیب، ۴-[۵-(۴-متیل فنیل)-۳-(تری فلورو متیل)]-پیرازول-۱-یل [۱] بنزن سولفونامید شکل ۱، جزء داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAID) از نوع کوکسیب و از مهارکننده‌های اختصاصی و قوی آنزیم سیکلواکسیژناز (Cox-۲) است [۱].

+E-mail: a.ghorbani@iau-saveh.ac.ir

*عهدہ دار مکاتبات

یکی از روش‌های پیش تغلیظ مناسب برای حل این مشکل‌ها می‌باشد [۱۳، ۱۲]. این فناوری از نظر هزینه به صرفه، سریع و با بازبایی‌های قابل قبول می‌باشد. در سال‌های اخیر یکی از روش‌های پیشنهادی کاربردی بر پایه پلیمرهای قالب مولکولی، روش استخراج فاز جامد انتخابی با استفاده از پلیمر قالب مولکولی (MISPE) بوده است [۱۴]. امروزه از پلیمرهای قالب مولکولی به‌طور گسترده در استخراج و تصفیه آنالیت هدف از ماتریس‌های پیچیده مانند نمونه‌های زیستی، غذا و دارو استفاده می‌شود [۱۶-۱۴، ۱۲]. از جمله کاربردهای پلیمرهای قالب مولکولی در شاخه دارویی می‌توان به استخراج دارو از نمونه‌های قرص [۱۷]، پلاسمای خون [۱۸] و ادرار [۱۹] اشاره نمود. همچنین پلیمرهای قالب مولکولی در جداسازی کایرال [۲۰]، حسگرهای زیستی [۲۱] و استخراج فاز جامد [۲۲] استفاده می‌شوند؛ در سال‌های اخیر استفاده از آن‌ها در ستون‌های استخراجی به عنوان جاذب [۲۳] رشد چشمگیری داشته است. استفاده از این پلیمرها در روش MISPE نه تنها موجب پیش تغلیظ مولکول هدف می‌شود بلکه باعث حذف ترکیب‌های اضافی موجود در ماتریس نمونه نیز خواهد شد [۲۴].

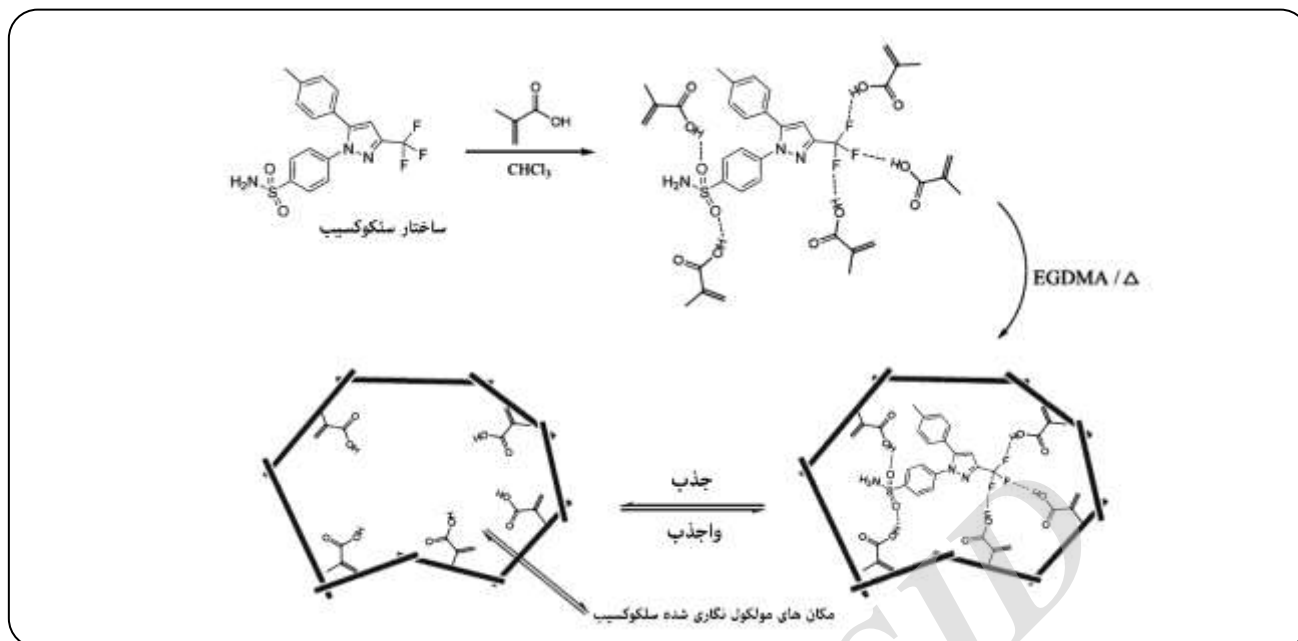
پلیمر قالب مولکولی از فرایند پلیمریزاسیون یک محلول شامل مونومر عاملی، اتصال دهنده عرضی و مولکول هدف به دست می‌آید. پیش از فرایند پلیمریزاسیون، مونومر عاملی و مولکول الگو به‌طور معمول با پیوندهای هیدروژنی، قطبی، هیدروفوبی یا یونی [۲۵] با یکدیگر واکنش می‌دهند. پس از پلیمریزاسیون، با عملیات شستشو، مولکول‌های نمونه از شبکه حذف و حفره‌ها در ماتریس پلیمری باقی می‌مانند که در اندازه، شکل، ساختار و ترکیب شیمیایی مکمل مولکول هدف می‌باشند. بنابراین زمانی که آنالیت دارای نمونه داخل ستون استخراج فاز جامد وارد می‌شود، پلیمر قادر خواهد بود عملیات جذب انتخابی مولکول‌های هدف را انجام دهد؛ سپس با انجام عملیات شوی ستون، فرایند واجذب نمونه رخ خواهد داد. بنابراین، پلیمر قالب مولکولی می‌تواند فرایند جذب انتخابی مولکول هدف را از نمونه‌هایی که در ستون استخراجی بارگذاری می‌شوند به خوبی انجام دهد. در این روش، واکنش‌های غیرکووالانسی مابین مولکول نمونه و مونومر به دست می‌آید. مولکول‌نگاری غیرکووالانسی به‌وسیله واکنش‌های ضعیفی مانند پیوندهای هیدروژنی، نیروهای واندروالس و واکنش‌های یونی یا هیدروفوبی مابین مولکول هدف و مونومرهای عاملی مشخص می‌شود [۲۶]. در شکل ۲ تصویر شماتیکی از فرایند قالب‌گیری پلیمر قالب مولکولی سلوکوکسیب نشان داده شده است.



شکل ۱- ساختار سلوکوکسیب

این دارو در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند استئوآرتریت، آرتریت روماتوئید، نقرس، آرتریت‌ها، دردهای گوناگون اندام‌ها، تب و... مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳، ۲]. آنزیم سیکلواکسیژناز باعث تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین می‌شود [۳]. حداقل دو ایزوفرم سیکلواکسیژناز Cox-۱ و Cox-۲ وجود دارد [۱]. تفاوت سلوکوکسیب با سایر مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز (مانند آسپرین، ناپروکسن و ایبوپروفن) در این است که سلوکوکسیب به‌صورت اختصاصی Cox-۲ در سلول‌های التهابی را مهار می‌کند. این دارو با مهار سیکلواکسیژناز تولید پروستاگلاندین‌ها را کاهش می‌دهد و با این روش اثر ضد درد و ضد التهابی خود را نشان می‌دهد. پژوهش‌های صورت گرفته نشان دادند که تنها ۲ ساعت پس از مصرف، فرایند دفع سلوکوکسیب به‌طور معمول از طریق ادرار و مدفوع صورت می‌گیرد [۴]. تاکنون برای آنالیز و اندازه‌گیری سلوکوکسیب در نمونه‌های دارویی [۵] و زیستی [۶] از روش‌های گوناگونی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با شناساگر UV [۸، ۷] و شناساگر فلورسانس [۹]، کروماتوگرافی مایع با اسپکتروفتومتری جرمی [۱۰]، اسپکتروفتومتری UV-Vis [۱۱] و روش‌های کمومتریکس [۱۱، ۲] استفاده شده است. بسیاری از روش‌های گزارش شده تاکنون با اشکال‌هایی مانند پیچیدگی روش، هزینه بالای ابزار مورد نیاز و قدرت شناسایی بسیار پایین روبرو بوده‌اند.

روش استخراج مایع - مایع (LLE) به عنوان روشی معمول برای تصفیه نمونه‌ها با استخراج مناسب و بازبایی قابل پذیرش مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ ولی با وجود زمان‌بر بودن و مقدارهای زیاد حلال‌های مصرفی در این روش مشکل‌ساز هستند. از سویی، این روش در سطوح پایین غلظت آنالیت‌ها و ماتریس‌های پیچیده قابل استفاده نمی‌باشد [۱۲]. روش استخراج فاز جامد (SPE)



شکل ۲- تصویر شمایی قالب‌گیری مولکول هدف (سلوکسیب) در میان مونومر عاملی.

آزمایش‌های لازم برای پیش‌بینی شرایط بهینه در آزمایش را نسبت به روش‌های بهینه‌سازی سنتی کاهش دهد [۲۵]. در این مقاله، کاربرد روش استخراج فاز جامد انتخابی با استفاده از پلیمر قالب مولکولی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در اندازه‌گیری و پیش‌تغلیظ مقادارهای جزئی سلوکسیب در نمونه‌های ادرار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بهینه‌سازی عوامل اثرگذار مانند pH، سرعت جریان محلول‌های عبوری و شستشو، حجم حلال شوینده و مقدار گرم جاذب، برای اندازه‌گیری مقادارهای جزئی سلوکسیب به‌وسیله روش MISPE-HPLC/UV صورت پذیرفت.

بخش تجربی

مواد شیمیایی

ماده اولیه سلوکسیب از شرکت داروسازی ارسطو (ساوه، ایران) و آزوبیس ایزوبوتیرونیتریل (AIBN) از شرکت Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) خریداری شدند. بقیه مواد شیمیایی مورد استفاده مانند متاکریلیک اسید (MAA)، اتیلن گلیکول دی متاکریلات (EGDMA)، کلروفرم (CHCl_3)، استونیتریل (AcN)، متانول (MeOH)، استیک اسید (AcA)، هیدروکلریک اسید (HCl) و سود (NaOH) با درجه HPLC و از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) خریداری شدند.

برای انجام بهتر این روش و دستیابی به نتیجه‌های دلخواه می‌بایست شرایط فرایند بهینه‌سازی شود. پارامترهای تأثیرگذار و دارای برهمکنش با هم در روش MISPE امکان دستیابی به شرایط بهینه را دشوار می‌کنند. دو روش کلی در بهینه‌سازی و بررسی اثر عامل‌های گوناگون بر جداسازی کروماتوگرافی شامل روش‌های سنتی و روش‌های کمومتریکس می‌باشند. روش‌های بهینه‌سازی سنتی شامل مطالعه هر عامل به‌طور جداگانه هستند. این نوع بهینه‌سازی منجر به افزایش تعداد آزمایش‌ها شده و بسیار وقت‌گیر و پرهزینه است. در مواردی که برهمکنش بین عامل‌ها وجود داشته باشد، در عمل روش‌های سنتی کاربردی نیستند. در چنین مواردی می‌توان از روش‌های کمومتریکس برای حل مسئله استفاده نمود. برای این منظور و برای درک اثر مربوط به هر عامل و کلیه برهمکنش‌های چند عاملی ممکن که بر پاسخ مؤثرند، از طراحی‌های آزمایش گوناگون مانند طراحی فاکتوریل کامل استفاده می‌شود. یک طراحی فاکتوریل کامل دو سطحی نیاز به 2^p آزمایش دارد که در آن p تعداد عامل‌های تأثیرگذار است. به این ترتیب پس از اطمینان یافتن از وجود برهمکنش‌ها، اطلاعات کافی برای محاسبه یک مدل شامل عامل‌های اصلی، برهمکنش‌های عوامل و عبارات‌های توان دوم (یا بالاتر) مهیا می‌شود که برای دستیابی به شرایط بهینه می‌توان از یک طرح مرکب مرکزی (CCD) استفاده نمود. این طراحی می‌تواند تعداد

ابزار و دستگاه‌ها

از روش مولکول‌نگاری غیرکووالانسی استفاده شد. برای سنتز و فرایند پلیمریزاسیون پلیمر قالب مولکولی ابتدا ۰/۰۷۶ گرم سلوکسیب و ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم باهم مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه عملیات همگن سازی انجام شد. پس از آن ۶۸/۱۶۰ میکرولیتر متاکریلیک اسید به ترکیب افزوده و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه عملیات همگن سازی انجام شد تا تعادل بین مولکول‌های هدف (سلوکسیب) و مونومر عاملی (متاکریلیک اسید) برقرار و پیوندهای هیدروژنی تشکیل شود. سپس در یک استوانه مدرج، ۷۵۵/۱۲۰ میکرو لیتر اتیلن گلیکول دی متاکریلات و ۵ میلی‌لیتر کلروفرم باهم مخلوط، به ترکیب به دست آمده پیشین افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه عملیات همگن سازی انجام شد. در مرحله بعد عملیات گاززدایی با گاز نیتروژن به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد؛ سپس ۰/۰۱۶ گرم آزوبیس ایزوبوتیرونیتریل افزوده و گاززدایی انجام شد. سرانجام به منظور جلوگیری از ورود اکسیژن درب لوله آزمایش دارای ترکیب با پارافین بسته و به مدت ۲۴ ساعت در حمام روغن با دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا فرایند پلیمریزاسیون انجام شود. برای سنتز NIP نیز از همین روش و در غیاب مولکول هدف (سلوکسیب) استفاده شد.

شستشوی پلیمرها

عملیات شستشوی پلیمرهای به دست آمده با مخلوط متانول و استیک اسید به‌وسیله دستگاه سوکسله در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. در پایان برای اطمینان یافتن از خارج شدن کامل دارو از شبکه پلیمر، جذب با دستگاه UV اندازه‌گیری و سرانجام برای دستیابی به اسیدیته خنثی و خارج شدن استیک اسید و متانول باقیمانده، پلیمر چندین بار با آب دو بار تقطیر شسته شد. مقدار %RSD سنتز پلیمرها برای بررسی تکرارپذیری، ۳ درصد به دست آمد.

روش انجام فرایند MIP-SPE

فرایند استخراج شامل مراحل بارگذاری فاز جامد در ستون، عبور محلول شامل مولکول‌های هدف، شستشو، شویس و آماده‌سازی ستون برای آزمایش بعدی می‌باشد که در مجموع شامل فرایند جذب و واجذب مولکول‌های سلوکسیب است. در مرحله جذب، پلیمر قالب مولکولی سنتز شده درون یک ستون استخراجی قرار گرفت و پس از آن محلول عبوری با اعمال pH و سرعت جریان بهینه از ستون عبور داده شد.

تمام اندازه‌گیری‌ها به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Yong Lin HPLC system (YL9100, South Korea) شامل پمپ SP930D و شناساگر UV30D انجام شدند. ستون مورد استفاده در این روش از نوع (۵μm، Kromosil C₁₈ column (۲۵۰mm×۴.۶mm) بود و از نرخ جریان ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، تزریق‌های ۱۰ میکرولیتری و طول موج ۲۵۲ نانومتر استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده MeCN-KH₂PO₄ بود که پیش از مصرف با استفاده از یک فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر و گاززدایی شد. این سیستم در دمای محیط مورد استفاده قرار گرفت.

برای مطالعه ساختاری پلیمرهای سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Philips, XL-30, Almelo, Netherlands) استفاده شد. طیف‌های FT-IR نمونه‌ها بر روی یک طیف‌سنج Bruker-tensor 27 (Germany) ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای شناسایی و آنالیز نمونه‌ها از یک دستگاه UV دوپرتویی Perkin elmer-lambda 12 استفاده شد. برای پمپ کردن محلول‌های گوناگون به درون ستون استخراج از پمپ پریستالتیک Zistech nano-P566 استفاده شد. از pH متر Bante برای تنظیم میزان pH، از دستگاه (Millipore, Direct Q3, China) از دستگاه برای تقطیر آب و از ترازوی دیجیتال (And dj-vssoa) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم نیز برای وزن کردن مقدارهای مورد نیاز مواد استفاده شد. برای سنتز پلیمرها یک همزن مغناطیسی Alpha heating/stirrer، دستگاه اولتراسونیک Jinyvanbao به همراه گاز نیتروژن برای گاززدایی مورد استفاده قرار گرفتند.

انتخاب نسبت مولی بهینه برای سنتز پلیمرها

به منظور دستیابی به نسبت مولی بهینه برای سنتز پلیمرهایی با بهترین گزینش‌پذیری، نسبت‌های مولی گوناگون ۱:۳:۱۵، ۱:۴:۲۰، ۱:۵:۲۵ و ۱:۶:۳۰ بین مولکول هدف : مونومر عاملی : شبکه‌ساز مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای جذبی پلیمرهای به‌دست آمده به‌وسیله فاکتور مولکول‌نگاری، $IF = Q_{MIP}/Q_{NIP}$ ، تخمین زده شد که مقدار سلوکسیب جذب شده به‌وسیله پلیمر قالب مولکولی و مقدار سلوکسیب جذب شده به‌وسیله پلیمر مولکول‌نگاری نشده است.

آماده‌سازی پلیمرها

برای آماده‌سازی پلیمر قالب مولکولی و پلیمر مولکول‌نگاری نشده

مطالعه هم‌دمای جذب سطحی

برای تعیین ظرفیت فاز جامد، از هم‌دمای جذب سطحی استفاده شد. برای این منظور، ذره‌های پلیمر قالب مولکولی سنتز شده با توجه به مقدهای بهینه به دست آمده در ستون قرار گرفتند و غلظت‌های ۷۰-۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول سلوکسیب از ستون عبور داده شدند. محلول به دست آمده به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت و غلظت تعادلی داروی سلوکسیب در محلول‌های خروجی از ستون، از روی منحنی کالیبراسیون رسم شده به دست آمد. هم‌دمای لانگمویر و فروندلیچ برای تعیین ظرفیت فاز جامد مورد بررسی قرار گرفتند.

آماده‌سازی محلول‌های استاندارد و نمونه‌های ادرار

سلوکسیب در حلال‌های آلی نظیر متانول، اتانول و استونیتریل حل می‌شود و در دمای 20°C تا دو سال پایداری خود را حفظ می‌کند [۲]. محلول استوک (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سلوکسیب، با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم سلوکسیب در ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط متانول/آب مقطر (به نسبت حجمی ۷۵:۲۵) آماده شد و دور از معرض نور و در دمای 4°C نگهداری شد.

برای مطالعه بر روی توانایی روش پیشنهادی برای استخراج سلوکسیب از نمونه‌های زیستی، نمونه‌های ادرار مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های ادرار به ترتیب با محلول‌های استاندارد سلوکسیب با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسپایک و از ستون دارای پلیمر قالب مولکولی در شرایط بهینه عبور داده شدند. سلوکسیب جذب شده به وسیله پلیمر قالب مولکولی با حلال شوینده استیک اسید/ متانول (با نسبت حجمی ۹۰:۱۰) خارج شد. نمونه شاهد نیز بدون اسپایک محلول سلوکسیب مورد بررسی قرار گرفت. تمام آزمایش‌ها سه مرتبه انجام و میزان بازیابی میانگین گزارش شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای 10°C درجه سلسیوس نگهداری شدند. مقدهای درصد استخراج سلوکسیب از نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Recovery\%} = (C_{\text{founded}} - C_{\text{real}}) / C_{\text{added}} \times 100 \quad (2)$$

در این معادله، C_{founded} غلظت آنالیت به دست آمده، C_{real} غلظت واقعی آنالیت در نمونه و C_{added} غلظت اسپایک شده در نمونه می‌باشند.

سپس ستون با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شسته شد تا ناخالصی‌های موجود درون ستون حذف شوند. در مرحله آخر برای فرایند واجذب، به دلیل اینکه استیک اسید قابلیت جداسازی آسان مولکول‌های سلوکسیب و شکستن پیوندهای ضعیف هیدروژنی بوجود آمده بین مولکول‌های هدف و ساختار پلیمر را دارد و همچنین وجود متانول به همراه استیک اسید باعث خارج شدن مونومرهای عاملی واکنش نکرده باقی‌مانده در سامانه می‌شود (زیرا کلیه اجزای پلیمریزاسیون در متانول قابلیت انحلال را دارند)، ستون با حلال شوینده استیک اسید/ متانول (با نسبت حجمی ۹۰:۱۰) در شرایط بهینه شسته شد. در پایان میزان سلوکسیب محلول به دست آمده به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد.

روش طراحی آزمایش برای انجام بهینه‌سازی‌ها

به منظور طراحی آزمایش‌ها از نرم افزار Design Expert 7.0.0 Trial استفاده شد. در این پژوهش اثر ۵ عامل مؤثر بر درصد بازیابی سلوکسیب در روش MISPE مورد بررسی قرار گرفت. این عامل‌ها عبارت بودند از: pH، سرعت جریان محلول‌های عبوری و شستشو، حجم حلال شوینده و مقدار گرم جاذب. بر این اساس یک طراحی فاکتوریل کامل با ۲۵ آزمایش طراحی شد. همچنین ۴ نقطه مرکزی ستاره‌دار نیز به ۳۲ آزمایش پیشین افزوده شد. در مرحله بعدی آزمایش، از مقدهای $\alpha = 2 \pm$ نیز برای بررسی اثر آن بر روی نتیجه‌ها استفاده شد که منجر به افزودن ۱۰ آزمایش دیگر به تعداد آزمایش‌های پیشین شد. به همین دلیل این طرح مرکب مرکزی با ۴۶ آزمایش، ترکیبی از طرح فاکتوریل کامل و طرح ستاره‌ای است. جدول ۱ مقدهای گوناگون مورد نظر برای هر عامل را نشان می‌دهد.

معادله ریاضی مابین پاسخ و عامل‌های مورد نظر در طراحی آزمایش را می‌توان به وسیله مدل چندجمله‌ای مرتبه دوم زیر نمایش داد [۲۷]:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

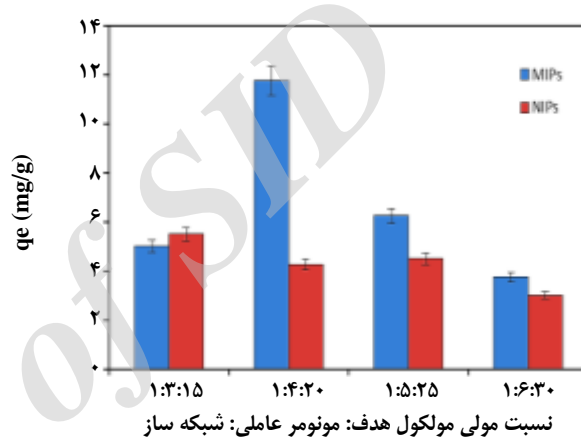
در این معادله Y پاسخ پیش‌بینی شده (درصد بازیابی)، X_i متغیرهای غیر وابسته، β پارامتر ثابت مدل طراحی شده، β_i ضریب‌های خطی، β_{ii} ضریب‌های توان دوم و β_{ij} ضریب‌های واکنش بین عامل‌ها هستند.

جدول ۱- مقادارهای پارامترهای گوناگون در طراحی آزمایش.

| $\alpha=2$ | | مقدار میانگین(۰) | بیشترین مقدار (+) | کمترین مقدار (-) | پارامترها |
|------------|------------|------------------|-------------------|------------------|---|
| + α | - α | | | | |
| ۱۳ | ۱ | ۷ | ۱۰ | ۴ | محلول عبوری pH |
| ۵ | ۱ | ۳ | ۴ | ۲ | سرعت جریان محلول عبوری (میلی لیتر بر دقیقه) |
| ۵ | ۱ | ۳ | ۴ | ۲ | سرعت جریان محلول شستشو (میلی لیتر بر دقیقه) |
| ۹ | ۱ | ۵ | ۷ | ۳ | حجم محلول شستشو (میلی لیتر) |
| ۶۰۰ | ۲۰۰ | ۴۰۰ | ۵۰۰ | ۳۰۰ | مقدار گرم جاذب (میلی گرم) |

SEM مربوط به MIP و NIP سنتز شده را در بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است، پلیمرهای سنتز شده دارای تخلخل‌های منظم و با اندازه‌های یکسان هستند. وجود حفره‌ها و تخلخل‌ها در شبکه‌ی پلیمر قالب مولکولی نسبت به پلیمر مولکول‌نگاری نشده منظم‌تر و به روشنی قابل دیدن می‌باشد که به دلیل خارج شدن مولکول‌های دارو از ساختار پلیمر است. ناهمواری سطح MIP نسبت به NIP یک برتری محسوب می‌شود؛ چرا که انتقال جرم مولکول‌های سلکوکسیب راحت‌تر صورت می‌گیرد و جذب سطحی افزایش می‌یابد.

طیف‌سنجی FT-IR روشی مناسب برای تعیین گروه‌های عاملی و پیوندهای موجود در ساختار پلیمرها و ابزاری مفید برای تشخیص اولیه فرایند اصلاح جاذب می‌باشد. طیف‌های FT-IR در ناحیه $4000-400\text{cm}^{-1}$ تهیه شدند. طیف‌های فروسرخ مربوط به سلکوکسیب، MIP شسته شده و شسته نشده و NIP در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به شکل می‌توان نتیجه گرفت که پیک مربوط به گروه کربونیل (C=O) در ناحیه 1636cm^{-1} ظاهر می‌شود، اما پس از واکنش پلیمریزاسیون با شبکه‌ساز و کاهش مزدوج شدن، این پیک به سمت 1730cm^{-1} جابه‌جا می‌شود؛ از این رو پیک قوی که در بازه‌ی 1732cm^{-1} ظاهر شده مربوط به گروه کربونیل است. در نتیجه پیوند هیدروژنی با گروه COOH متاکریلیک اسید، باند کششی مربوط به OH در 3447cm^{-1} در NIP به حدود 3448cm^{-1} در MIP شسته شده شیفت پیدا کرده است. شکل‌های (۵-ج و ۵-د) به ترتیب طیف‌های FT-IR مربوط به پلیمر قالب مولکولی پس و پیش از شستشو را نشان می‌دهند. از تفاوت‌های این دو طیف می‌توان به باند ارتعاشی کششی N-H مربوط به گروه SO_2NH_2 در 3422cm^{-1} و باندهای کششی متقارن و نامتقارن S=O به ترتیب در 1269cm^{-1} و 1325cm^{-1} اشاره کرد.



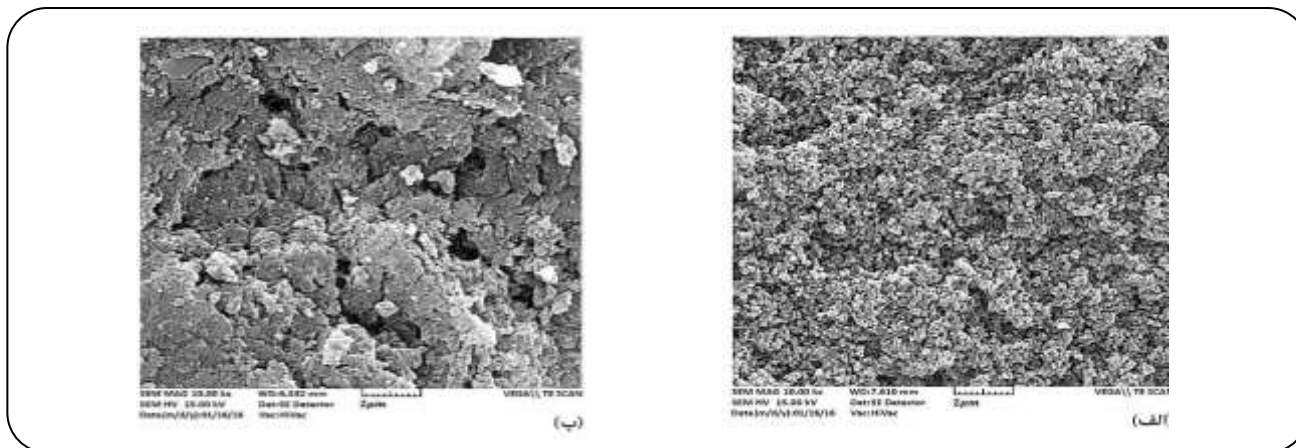
شکل ۳- ظرفیت‌های جذبی برای MIP و NIPهای سنتز شده با نسبت‌های مولی گوناگون برای مولکول هدف: مونومر عاملی: شبکه‌ساز.

نتیجه‌ها و بحث آماده‌سازی پلیمرها

برای دستیابی به پلیمرهایی با بیشترین میزان بازیابی برای سلکوکسیب، نسبت‌های مولی گوناگون ۱:۳:۱۵، ۱:۴:۲۰، ۱:۵:۲۵ و ۱:۶:۳۰ بین مولکول هدف: مونومر عاملی: شبکه‌ساز مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه‌های به‌دست آمده از پلیمرهای سنتز شده در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتیجه‌ها، می‌توان دید که پلیمر سنتز شده با نسبت مولی ۱:۴:۲۰ بیش‌ترین میزان ظرفیت جذبی را از خود نشان داد. مقدار فاکتور مولکول‌نگاری (IF) برای نسبت مولی بهینه انتخاب شده، ۲/۷۶ به‌دست آمد.

بررسی ویژگی‌های ساختاری پلیمرهای سنتز شده

ساختار پلیمرهای سنتز شده به‌وسیله تصاویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۴ تصویرهای



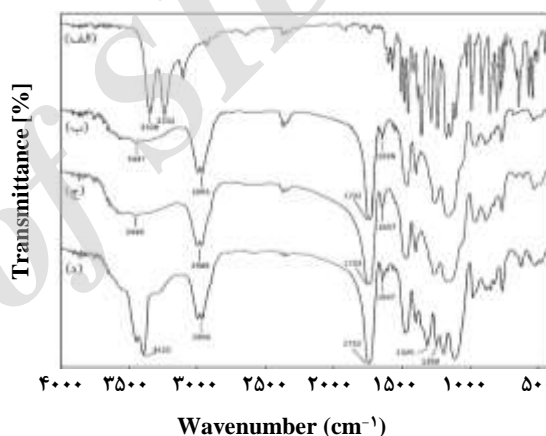
شکل ۴- تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روشی با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر برای (الف) پلیمر قالب مولکولی سلوکسیب (MIP) و (ب) پلیمر مولکول نگاری نشده سلوکسیب (NIP).

بهینه شوند. برای حصول اطمینان از شرایط درست بهینه‌سازی، از روش طراحی آزمایش استفاده شده است.

نتیجه‌های بهینه‌سازی با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی همان‌گونه که اشاره شد، در مجموع ۴۶ آزمایش بر اساس روش طراحی مرکب مرکزی انجام شد. پارامترهای اصلی، نمادها، سطوح و ماتریس طراحی آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. درصد بازیابی‌ها به همراه انحراف استاندارد نسبی مربوط به هر آزمایش نیز در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول ۴ نشان داده شده است، اثر فاکتورهای بحرانی، واکنش‌ها و بازده مدل به‌وسیله آنالیزهای ANOVA (سطح اطمینان ۹۵٪) مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه‌های آنالیز ANOVA مقدار پارامترهای P-value و F-value مربوط به مدل را به ترتیب کمتر از ۰/۰۰۰۱ و ۱۲۷۱/۶۸ گزارش داد که نشان از قابل قبول بودن طراحی مدل داشت. مقدار p-value برای مدل بایستی کمتر از ۰/۰۵ باشد [۲۷].

نتیجه‌های آنالیز ANOVA نشان داد که طراحی آزمایش مدل به خوبی انجام شده است. تحلیل داده‌ها منجر به یک معادله تجربی برای به‌دست آوردن مقدار درصد استخراج (ER%) به صورت زیر شد:

$$ER\% = +97.96 - 1.97X_1 - 2.88X_2 - 2.65X_3 + 1.01X_4 + 3.02X_5 + 0.43X_6X_7 + 0.38X_7X_8 + 0.17X_9 + 0.29X_1X_8 - 0.95X_2X_3 - 0.33X_3X_4 - 0.65X_4X_5 - 0.87X_6X_7 + 0.05X_7X_8 + 0.54X_8X_9 + 3.66X_1^2 + 2.52X_2^2 - 2.01X_3^2 - 2.35X_4^2 + 2.36X_5^2 \quad (3)$$



شکل ۵ - طیف‌های FTIR مربوط به (الف) سلوکسیب، (ب) پلیمر مولکول نگاری نشده، (ج) پلیمر قالب مولکولی سلوکسیب پس از شستشو و (د) پلیمر قالب مولکولی سلوکسیب قبل از شستشو.

پیک دوشاخه در حوالی 2900cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C-H می‌باشد. پیک متوسط تا تیزی در ناحیه 2360cm^{-1} در NIP و MIP مربوط به گروه نیتریل در آغازگر می‌باشد.

بهینه‌سازی شرایط آزمایش

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه سیستم‌های اندازه‌گیری در سال‌های اخیر، شرایط مربوط به آزمایش همچنان برای دستیابی به بهترین درصد استخراج باید بهینه شود. بنابراین تمام مراحل روش پیشنهادی، از قرار دادن پلیمر درون ستون گرفته تا مرحله عبور محلول شامل آنالیت، مرحله‌های شستشو و پارامترهای تأثیرگذار بر راندمان و نتیجه آزمایش می‌بایست

جدول ۲- طراحی آزمایش برای روش.

| پارامتر* آزمایش | پارامتر | | | | | پارامتر آزمایش | پارامتر | | | | | پارامتر آزمایش | پارامتر | | | | | | | | | | |
|--------------------|---------|---|---|---|---|-------------------|---------|---|---|---|---|-------------------|---------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | A | B | C | D | E | | A | B | C | D | E | | A | B | C | D | E | | | | | | |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۳ | + | + | - | + | + | ۲۵ | - | - | + | - | + | ۳۷ | +a | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۴ | + | + | - | - | - | ۲۶ | - | - | - | + | + | ۳۸ | -a | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۳ | + | + | + | + | + | ۱۵ | + | - | + | - | + | ۲۷ | - | - | - | - | - | ۳۹ | ۰ | +a | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۴ | + | + | + | + | - | ۱۶ | + | - | - | + | + | ۲۸ | - | + | + | - | - | ۴۰ | ۰ | -a | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵ | + | - | + | + | + | ۱۷ | + | - | - | + | - | ۲۹ | - | + | - | - | + | ۴۱ | ۰ | ۰ | +a | ۰ | ۰ |
| ۶ | + | + | + | - | + | ۱۸ | + | - | + | - | - | ۳۰ | - | - | + | - | - | ۴۲ | ۰ | ۰ | -a | ۰ | ۰ |
| ۷ | + | + | + | - | - | ۱۹ | - | + | + | - | + | ۳۱ | - | - | + | + | + | ۴۳ | ۰ | ۰ | ۰ | +a | ۰ |
| ۸ | + | - | + | + | - | ۲۰ | - | - | - | - | + | ۳۲ | - | + | + | + | - | ۴۴ | ۰ | ۰ | ۰ | -a | ۰ |
| ۹ | + | + | - | + | - | ۲۱ | - | - | + | + | - | ۳۳ | - | + | - | - | - | ۴۵ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | +a |
| ۱۰ | + | - | - | - | - | ۲۲ | - | + | + | + | + | ۳۴ | - | + | - | + | + | ۴۶ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | -a |
| ۱۱ | + | + | - | - | + | ۲۳ | - | - | - | + | - | ۳۵ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | | | | | | |
| ۱۲ | + | - | - | - | + | ۲۴ | - | + | - | + | - | ۳۶ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | | | | | | |

A) pH محلول عبوری، B) سرعت جریان محلول عبوری، C) سرعت جریان محلول شستشو، D) حجم محلول شستشو، E) مقدار گرم جاذب

جدول ۳- مقدارهای درصد بازیابی میانگین و انحراف استاندارد نسبی برای هر آزمایش در طراحی آزمایش.

| آزمایش | بازیابی % (میانگین، n=۳) | | آزمایش | بازیابی % (میانگین، n=۳) | | آزمایش | بازیابی % (میانگین، n=۳) | | آزمایش | بازیابی % (میانگین، n=۳) | |
|--------|-----------------------------|------|--------|-----------------------------|------|--------|-----------------------------|------|--------|-----------------------------|------|
| | ER% | SD% | | ER% | SD% | | ER% | SD% | | ER% | SD% |
| ۱ | ۹۴٫۲۸ | ۲٫۴۸ | ۱۳ | ۹۰٫۸۹ | ۴٫۴۳ | ۲۵ | ۸۶٫۲۸ | ۲٫۳۱ | ۳۷ | ۸۹٫۵۲ | ۱٫۴۱ |
| ۲ | ۹۵٫۴۵ | ۲٫۵۱ | ۱۴ | ۷۵٫۷۴ | ۱٫۵۶ | ۲۶ | ۹۷٫۵۰ | ۱٫۴۲ | ۳۸ | ۹۰٫۴۱ | ۲٫۵۳ |
| ۳ | ۷۷٫۱۹ | ۴٫۲۵ | ۱۵ | ۸۰٫۰۳ | ۲٫۳۸ | ۲۷ | ۹۱٫۶۱ | ۱٫۱۱ | ۳۹ | ۸۹٫۵۱ | ۱٫۲۷ |
| ۴ | ۷۵٫۰۸ | ۳٫۰۳ | ۱۶ | ۹۱٫۲۶ | ۲٫۱۱ | ۲۸ | ۷۳٫۱۶ | ۱٫۵۵ | ۴۰ | ۹۹٫۵۳ | ۲٫۵۰ |
| ۵ | ۸۷٫۳۰ | ۲٫۴۵ | ۱۷ | ۷۹٫۵۱ | ۴٫۵۲ | ۲۹ | ۸۴٫۹۰ | ۱٫۵۸ | ۴۱ | ۹۳٫۴۲ | ۲٫۱۴ |
| ۶ | ۷۷٫۵۳ | ۳٫۵۶ | ۱۸ | ۷۸٫۶۹ | ۲٫۵۸ | ۳۰ | ۷۵٫۲۲ | ۲٫۴۳ | ۴۲ | ۹۹٫۷۲ | ۲٫۲۸ |
| ۷ | ۷۳٫۸۸ | ۲٫۰۸ | ۱۹ | ۹۷٫۴۵ | ۱٫۲۸ | ۳۱ | ۸۷٫۱۳ | ۳٫۵۲ | ۴۳ | ۹۵٫۸۱ | ۱٫۴۱ |
| ۸ | ۷۸٫۸۲ | ۴٫۴۹ | ۲۰ | ۹۴٫۴۴ | ۲٫۷۹ | ۳۲ | ۷۴٫۴۶ | ۲٫۲۱ | ۴۴ | ۹۴٫۵۸ | ۱٫۰۳ |
| ۹ | ۷۸٫۶۳ | ۴٫۳۸ | ۲۱ | ۸۶٫۴۹ | ۳٫۳۸ | ۳۳ | ۷۵٫۲۸ | ۱٫۳۲ | ۴۵ | ۹۵٫۹۶ | ۲٫۶۵ |
| ۱۰ | ۸۱٫۳۵ | ۳٫۳۹ | ۲۲ | ۷۹٫۸۰ | ۲٫۷۱ | ۳۴ | ۹۰٫۶۲ | ۳٫۵۶ | ۴۶ | ۹۴٫۴۰ | ۲٫۴۲ |
| ۱۱ | ۷۹٫۶۰ | ۱٫۶۶ | ۲۳ | ۹۴٫۹۸ | ۱٫۲۵ | ۳۵ | ۹۴٫۶۶ | ۲٫۶۱ | | | |
| ۱۲ | ۹۱٫۱۶ | ۲٫۲۵ | ۲۴ | ۸۳٫۴۸ | ۱٫۵۴ | ۳۶ | ۹۴٫۱۳ | ۲٫۷۶ | | | |

جدول ۴- تحلیل واریانس (ANOVA) برای طراحی آزمایش مرکب مرکزی.

| معیار | مجموع مربعات | درجه آزادی | میانگین مربعات | F-value | P-value |
|-------------------------|--------------|------------|----------------|---------------------|---------|
| Model | ۱۱۳۱,۹۶ | ۲۰ | ۵۶,۶۰ | ۱۲۷۱,۶۸ | <۰,۰۰۰۱ |
| A | ۵۴۹,۴۶ | ۱ | ۵۴۹,۴۶ | ۲۹۶۰,۷۱ | <۰,۰۰۰۱ |
| B | ۱۰۴,۵۵ | ۱ | ۱۰۴,۵۵ | ۵۶۳/۳۳ | <۰,۰۰۰۱ |
| C | ۲۳,۹۸ | ۱ | ۲۳,۹۸ | ۱۲۹,۰۲ | <۰,۰۰۰۱ |
| D | ۴۲,۶۰ | ۱ | ۴۲,۶۰ | ۱۹۷,۲۱ | <۰,۰۰۰۱ |
| E | ۷,۱۳ | ۱ | ۷,۱۳ | ۳۸,۴۱ | ۰,۰۰۰۸ |
| AB | ۵۰,۰۶ | ۱ | ۵۰,۰۶ | ۲۶۹,۷۲ | <۰,۰۰۰۱ |
| AC | ۲۱,۷۱ | ۱ | ۲۱,۷۱ | ۱۱۷,۰۰ | <۰,۰۰۰۱ |
| AD | ۵,۱۸ | ۱ | ۵,۱۸ | ۲۷,۷۶ | ۰,۰۰۱۹ |
| AE | ۲,۱۲ | ۱ | ۲,۱۲ | ۸,۶۶ | ۰,۰۰۶۳ |
| BC | ۵,۱۵ | ۱ | ۵,۱۵ | ۲۷,۰۱ | ۰,۰۰۲۱ |
| BD | ۱,۹۱ | ۱ | ۱,۹۱ | ۷,۲۹ | ۰,۰۱۴۹ |
| BE | ۱,۰۸ | ۱ | ۱,۰۸ | ۴,۵۲ | ۰,۰۵۷۰ |
| CD | ۰,۹۸ | ۱ | ۰,۹۸ | ۴,۱۱ | ۰,۰۶۰۹ |
| CE | ۲۱۶,۵۳ | ۱ | ۲۱۶,۵۳ | ۹۰۴,۷۶ | <۰,۰۰۰۱ |
| DE | ۵,۱۸ | ۱ | ۵,۱۸ | ۲۵,۶۳ | ۰,۰۰۱۹ |
| A ² | ۱,۷۵ | ۱ | ۱,۷۵ | ۷,۳۵ | ۰,۰۲۰۶ |
| B ² | ۲۰,۹۷ | ۱ | ۲۰,۹۷ | ۹۸,۷۸ | ۰,۰۰۰۱ |
| C ² | ۰,۲۸ | ۱ | ۰,۲۸ | ۱,۵۱ | ۰,۲۶۴۶ |
| D ² | ۲,۲۳ | ۱ | ۲,۲۳ | ۹,۰۸ | ۰,۰۰۵۰ |
| E ² | ۱۴۳,۰۴ | ۱ | ۱۴۳,۰۴ | ۶۲۱,۱۶ | <۰,۰۰۰۱ |
| Lack of fit | ۲,۴۲ | ۲۲ | ۰,۱۱ | ۲,۲۴ | ۰,۲۳۱۱ |
| Pure error | ۰,۱۵ | ۳ | ۰,۰۵ | | |
| Total error | ۱۱۳۵,۶۴ | ۴۵ | | | |
| مشخصات وضعیت مدل | | | | | |
| Standard deviation | | ۰,۴۹ | | R-Squared | ۰,۹۹۷۲ |
| Mean | | ۸۶,۰۶ | | Adjust R-Squared | ۰,۹۹۲۲ |
| Coefficient Variation % | | ۰,۵۴ | | Predicted R-Squared | ۰,۹۷۸۳ |
| PRESS | | ۲۵,۱۲ | | Adequate Precision | ۹۱,۰۴۹ |

خواهد کرد. بنابراین سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه، به عنوان سرعت بهینه محلول عبوری مشخص و در ادامه از این سرعت استفاده شد.

تأثیر سرعت جریان محلول شستشو بر مقدار واجذب نمونه نیز بررسی شد. برای این منظور محلول شستشو با سرعت جریان‌های گوناگون از روی ستون عبور داده شد. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که در بازه‌ی سرعت ۲-۴ میلی لیتر بر دقیقه، درصد استخراج متأثر از سرعت جریان محلول شستشو می‌باشد. با توجه به شکل ۶ (ب، ه، ح، ط)، هرچه سرعت عبور محلول شستشو از روی جاذب کمتر باشد، میزان واجذب نمونه بیشتر می‌شود. سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه برای عبور محلول شستشو به عنوان سرعت بهینه مشخص شد. با افزایش سرعت جریان محلول شستشو به دلیل این که محلول شستشو فرصت کافی برای برهمکنش با فاز ساکن را نخواهد داشت راندمان جذب به شدت کاهش پیدا می‌کند و محلول شستشو با سرعت از روی فاز ساکن عبور کرده و فرصت کافی برای از بین بردن پیوندهای هیدروژنی بین مولکول سلوکسیب و متاکریلیک اسید را نخواهد داشت.

حجم حلال شوینده، پارامتر بعدی است که مورد مطالعه قرار گرفت. در این مرحله تأثیر حجم‌های گوناگون در بازه‌ی ۳-۷ میلی لیتر از محلول شستشو بر مقدار واجذب نمونه بررسی شد. نتیجه‌ها در شکل ۶ آورده شده است که نشان می‌دهد در حجم ۵ میلی لیتر از محلول شستشو، واجذب سلوکسیب بهینه می‌شود و در حجم‌های بالاتر به تقریب درصد استخراج ثابت باقی خواهد ماند.

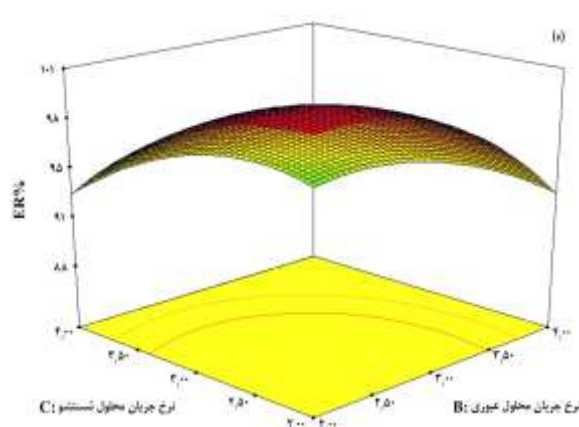
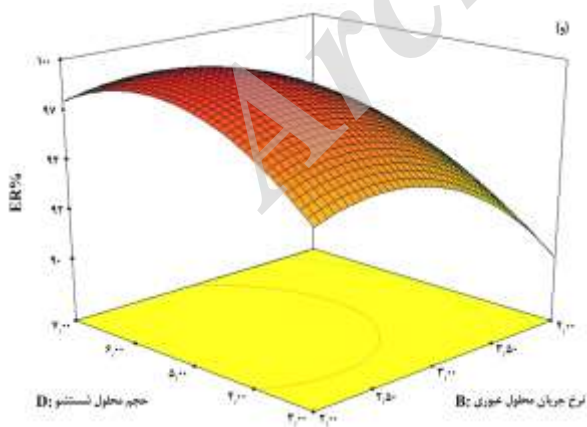
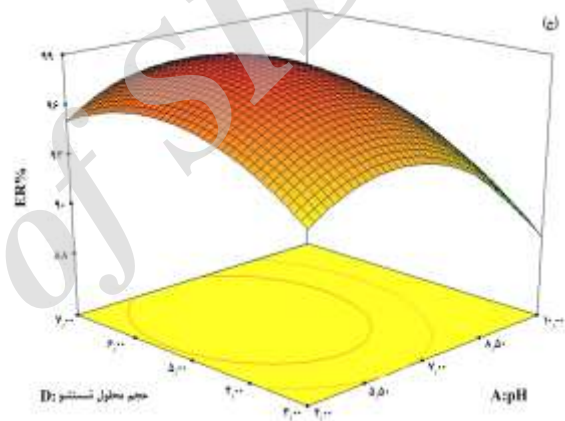
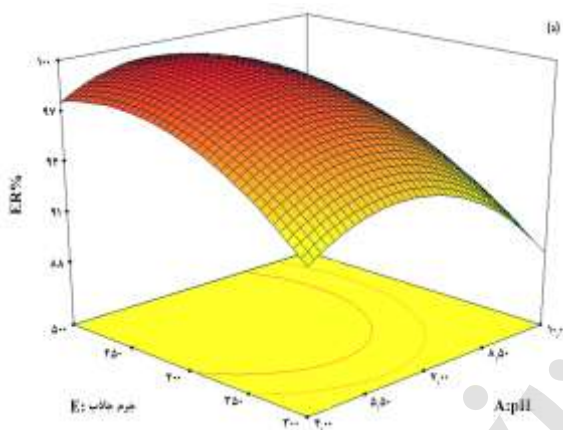
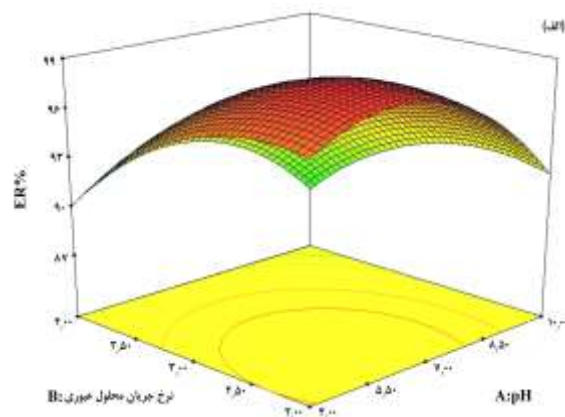
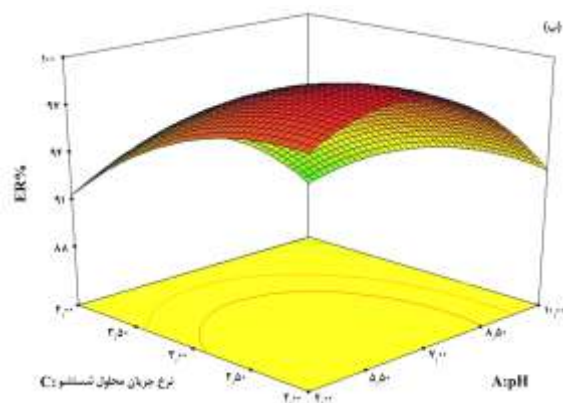
سرانجام به منظور بررسی اثر مقدار گرم جاذب بر روی درصد استخراج سلوکسیب، مقدارهای گوناگون جاذب در بازه‌ی ۳۰۰-۵۰۰ میلی گرم مورد مطالعه قرار گرفتند. نتیجه‌های به دست آمده از این بررسی در شکل ۶ نشان داده شده است. همان گونه که دیده شد با افزایش میزان گرم جاذب، میزان درصد استخراج نیز افزایش یافته و بهترین مقدار جاذب ۴۰۰ میلی گرم می‌باشد. با افزایش مقدار گرم جاذب در واقع سایت‌های فعال برای جذب مولکول‌های سلوکسیب بیشتر شده و جذب بیشتری صورت می‌گیرد؛ تا جایی که تقریباً تمام سلوکسیب در آن غلظت جذب شده (بسته به ظرفیت فاز جامد).

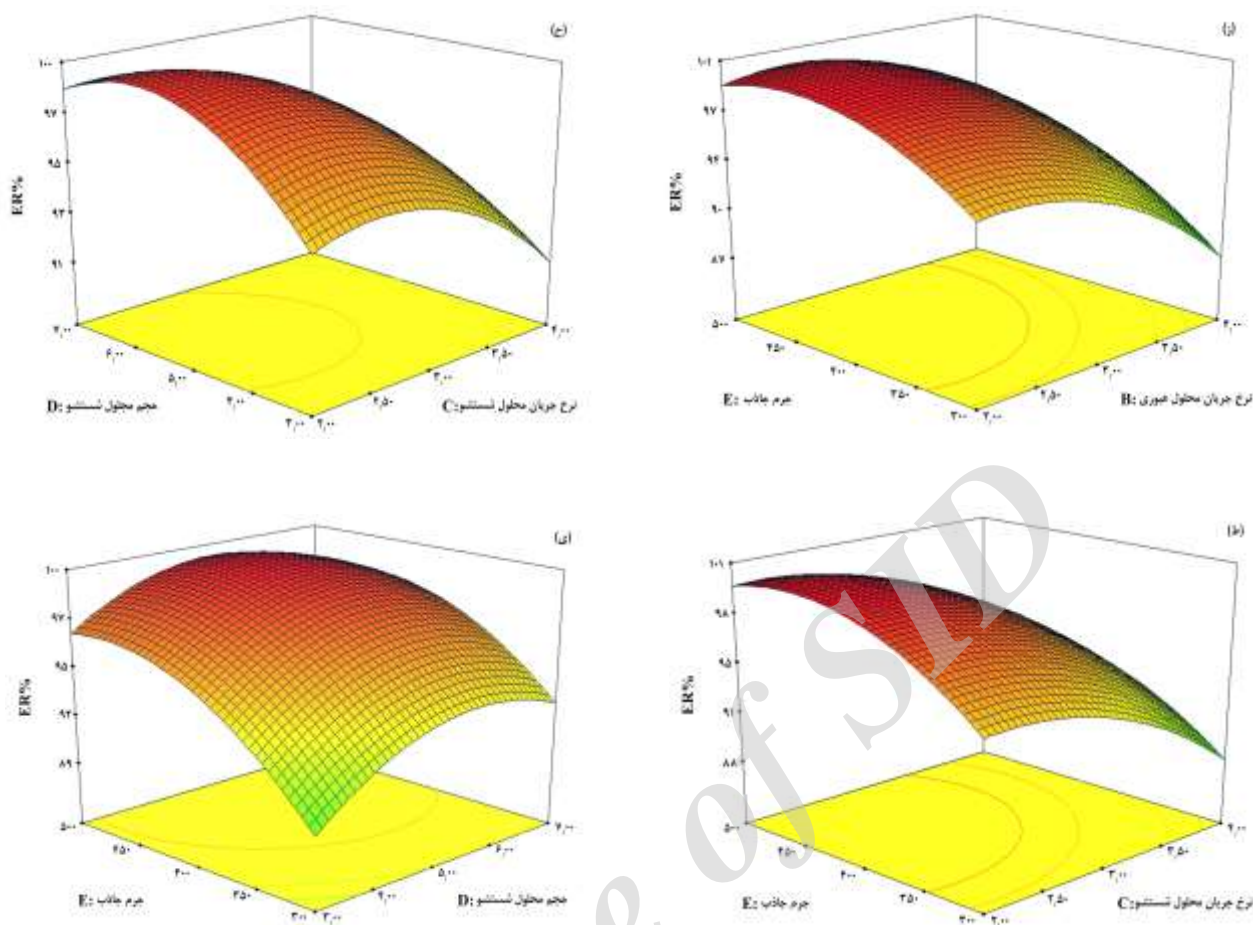
مقایسه بین MIP و NIP

به منظور مقایسه عملکرد پلیمرهای سنتت شده MIP و NIP، دو ستون دارای مقدارهای بهینه پلیمر قالب مولکولی و پلیمر مولکول نگاری نشده در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفتند.

همان گونه که اشاره شد، برای طراحی آزمایش ۵ عامل اثرگذار مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی اثر میزان pH محلول عبوری، مقدارهای pH در بازه‌ی ۴ تا ۱۰ مورد بررسی قرار گرفتند. به دلیل جایگیری درست آنالیت در شبکه پلیمر، pH می‌بایست در مقدار بهینه آن تنظیم شود. در این شرایط پیوند هیدروژنی با پلیمر بهتر ایجاد می‌شود. با توجه به نمودارهای سطح نشان داده شده در شکل ۶ (الف، ب، ج، د) می‌توان به این نتیجه رسید که در pHهای اسیدی نسبت به pHهای بازی، MIP و دارو هر دو پروتونه می‌شوند، بنابراین به شرایط پیوند هیدروژنی نزدیک می‌شویم و درصد استخراج افزایش می‌یابد. این افزایش در pH=۵ به بیشترین میزان خود می‌رسد. در pHهای بازی به دلیل دپروتونه شدن سطح MIP و سلوکسیب و در نتیجه دافعه‌ی الکتروستاتیکی، درصد استخراج کاهش می‌یابد.

پارامتر بعدی که مورد مطالعه قرار گرفت، سرعت جریان محلول عبوری بود. تأثیر سرعت جریان عبور نمونه بر مقدار جذب گونه در بازه‌ی سرعت ۲-۴ میلی لیتر بر دقیقه بررسی شد. نتیجه‌ها نشان می‌دهد، میزان جذب سلوکسیب به سرعت عبور نمونه مربوط است. با توجه به شکل ۶ (الف، ه، و، ز) می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش سرعت عبور نمونه از روی جاذب، میزان جذب کاهش می‌یابد. با کاهش سرعت به دلیل اینکه فاز عبوری سلوکسیب زمان کافی برای برهمکنش با فاز جامد را دارد، بازداری بیشتر می‌شود. ستون استخراجی در این مرحله عملکردی همانند ستون‌های تجزیه‌ای در کروماتوگرافی مایع را دارد. در ستون‌های کروماتوگرافی مایع زمان با سرعت حرکت فاز متحرک و انتخاب صحیح فاز ساکن کنترل می‌شود؛ به این صورت که هرچه سرعت حرکت فاز متحرک کمتر و تمایل گونه با فاز ساکن بیشتر باشد، ثابت توزیع گونه و زمان بازداری بیشتر شده و سرعت حرکت خطی گونه کمتر می‌شود و از لحاظ نظری جداسازی بهتر صورت می‌گیرد؛ اما در عمل زمانی که سرعت حرکت خطی گونه‌ها کمتر می‌شود باند گونه دچار پهن شدن می‌شود و پیک‌ها پهن شده، درهم فرو می‌روند و باعث بوجود آمدن خطا در اندازه‌گیری‌های تجزیه‌ای می‌شوند. همان گونه که گفته شد ستون استخراجی پلیمر قالب مولکولی در این مرحله عملکردی همانند ستون‌های تجزیه‌ای کروماتوگرافی را دارد با این تفاوت که در این جا با کم کردن سرعت، مشکل پهن شدن باند گونه دیگر وجود ندارد؛ زیرا در این مرحله هدف تغلیظ می‌باشد و هر چه سرعت کمتر شود گونه فرصت بیشتری برای برهمکنش با فاز ساکن پیدا





شکل ۶- نمودارهای سطح برای طراحی مرکب مرکزی (الف) pH-نرخ جریان محلول عبوری، (ب) pH-نرخ جریان محلول شستشو، (ج) pH-حجم محلول شستشو، (د) pH-جرم جاذب، (ه) نرخ جریان محلول عبوری-نرخ جریان محلول شستشو، (و) نرخ جریان محلول عبوری-حجم محلول شستشو، (ز) نرخ جریان محلول عبوری-جرم جاذب، (ح) نرخ جریان محلول شستشو-حجم محلول شستشو، (ط) نرخ جریان محلول شستشو-جرم جاذب، (ی) حجم محلول شستشو-جرم جاذب

بسیار مهمی در پیش‌بینی مدل‌سازی و تحلیل و طراحی سیستم‌های جذبی بازی می‌کند. هم‌دمای جذبی نیز نقش به‌سزایی در بررسی نظری و بیان پارامترهای ترمودینامیکی دارد. در این پژوهش برای بررسی ظرفیت جذبی سلوکوکسیب در پلیمرهای MIP و NIP، از هم‌دماهای جذب سطحی لانگمویر و فروندلیچ استفاده شد. هم‌دمای لانگمویر نشان می‌دهد که مقدار سلوکوکسیب جذب شده با افزایش غلظت آن تا نقطه اشباع افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر تا زمانی که محل‌های در دسترس موجودند، جذب سطحی با افزایش غلظت سلوکوکسیب افزایش پیدا می‌کند، اما زمانی که این مکان‌ها اشغال شدند افزایش بیش‌تر غلظت سلوکوکسیب موجب افزایش مقدار جذب سلوکوکسیب بر روی جاذب نمی‌شود.

درصد استخراج برای پلیمر قالب مولکولی و پلیمر مولکول نگاری نشده به ترتیب ۹۶٪ و ۱۴٪ به‌دست آمد. پلیمر قالب مولکولی به دلیل وجود مکان‌های مولکول‌نگاری شده نسبت به NIP، از درصد استخراج بالاتری برخوردار است. این نتیجه‌ها نشان داد که سنتز پلیمرهای قالب مولکولی به خوبی انجام شده است و این پلیمرها توانایی استخراج انتخابی مولکول‌های هدف (سلوکوکسیب) را دارند.

بررسی هم‌دماهای جذب سطحی MIP و NIP

به منظور استخراج کامل مولکول‌های دارو از محلول مورد نظر، بررسی ظرفیت جاذب بسیار مهم است. هم‌دمای تعادلی نقش

جدول ۵ - ثابت‌های هم‌دمای جذب سطحی لانگمویر و فروندلیچ برای جذب سلوکسیب.

| پارامتر هم‌دمای جذب | a | b | n | ضریب رگرسیون | |
|------------------------|----------|-------|-------|--------------|-------|
| | | | | | |
| MIP | لانگمویر | ۱/۴۹۸ | ۰/۰۹۹ | --- | ۰/۹۳۱ |
| | فروندلیچ | ۱/۴۲۲ | --- | ۱/۴۷ | ۰/۸۸۹ |
| NIP | لانگمویر | ۰/۲۲۰ | ۰/۰۹۰ | --- | ۰/۹۸۴ |
| | فروندلیچ | ۰/۳۱۷ | --- | ۲/۰۴ | ۰/۹۰۰ |

برهمکنش‌های غیر گزینشی روی جاذب قرار می‌گیرد، می‌تواند به صورت گزینش‌پذیر نیز درون حفره‌های تعبیه شده در جاذب MIP قرار گیرد و منجر به بروز رفتار هم‌دمای لانگمویر و جذب سطحی تک لایه روی یک سطح همگن می‌شود، در صورتی که در جاذب NIP فقط از طریق برهمکنش‌های غیر گزینشی روی جاذب قرار می‌گیرد.

ویژگی‌های تجزیه‌ای روش

ویژگی‌های تجزیه‌ای روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. معادله کالیبراسیون $y = 30.99x + 37.0086$ با ضریب همبستگی ۰/۹۹۷ در گستره غلظتی ۰/۰۵-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که y جذب در ۲۵۲nm و x غلظت سلوکسیب در محلول نمونه بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است. ویژگی‌های تجزیه‌ای روش شامل حد تشخیص (LOD)، حد آشکارسازی (LOQ) و انحراف استاندارد نسبی (RSD%) به ترتیب ۸ و ۲۶/۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱/۱۲٪ به دست آمد.

اندازه‌گیری میزان سلوکسیب در نمونه‌های ادرار

کاربرد پلیمر قالب مولکولی سنتز شده در جذب انتخابی سلوکسیب به وسیله روش پیشنهادی MISPE-HPLC/UV در نمونه‌های ادرار مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های آزمایش در جدول ۶ نشان داده شده است. مقدارهای درصد بازیابی قابل پذیرشی از نمونه‌ها در بازه ۱۰۲-۹۲/۶۰ به دست آمد. این نتیجه‌ها نشان دادند که روش پیشنهادی فوق توانایی اندازه‌گیری مقدارهای جزئی سلوکسیب در نمونه‌های ادرار را دارد. قابلیت تکرارپذیری و دقت روش با استفاده از پارامتر انحراف استاندارد نسبی (RSD%) نشان داده شده است. کروماتوگرام‌های HPLC مربوط به نمونه شاهد و نمونه ادرار اسپایک شده با محلول ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلوکسیب در شکل ۸ نشان داده شده است.

مقدار آنالیتی که در حالت تعادل در واحد جرم جاذب سطحی (q_e) می‌شود توسط معادله (۴) محاسبه می‌شود [۲۸]:

$$q_e = (C_0 - C_e) V / m \quad (4)$$

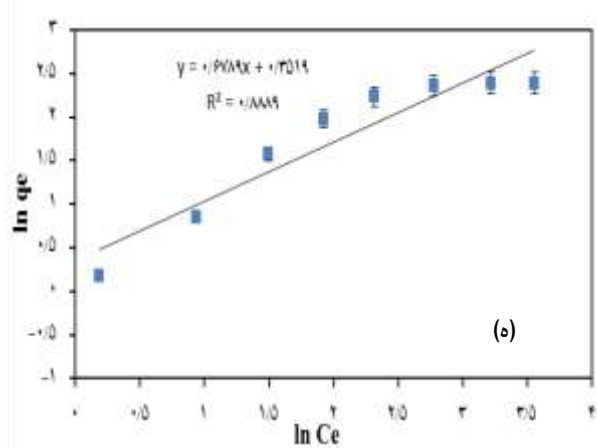
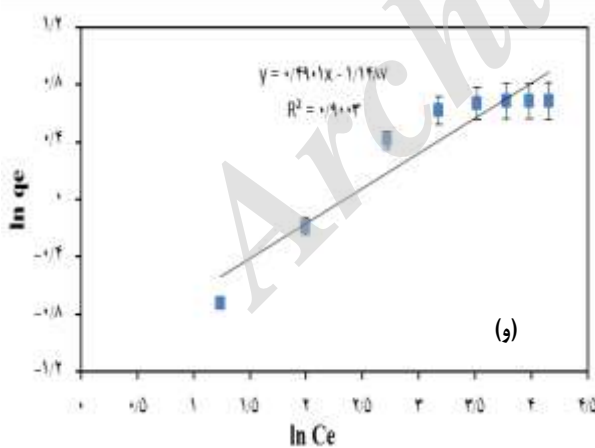
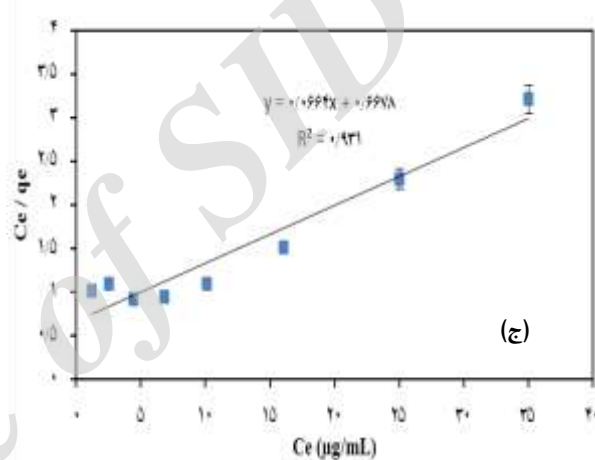
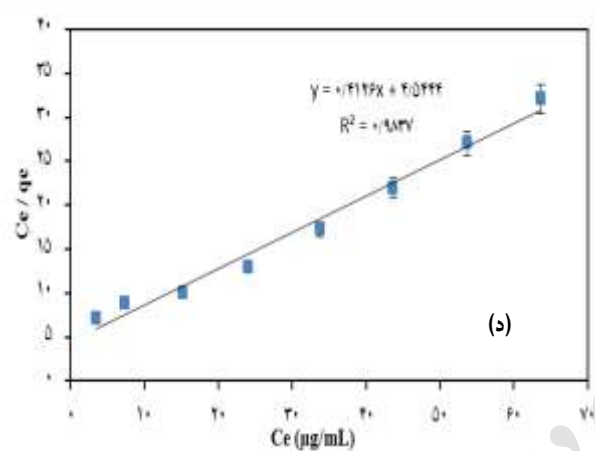
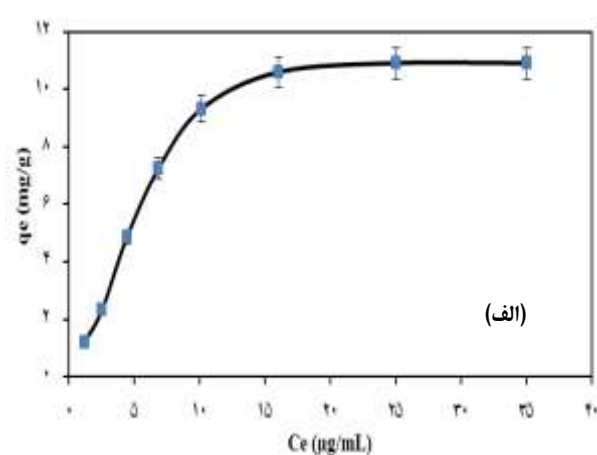
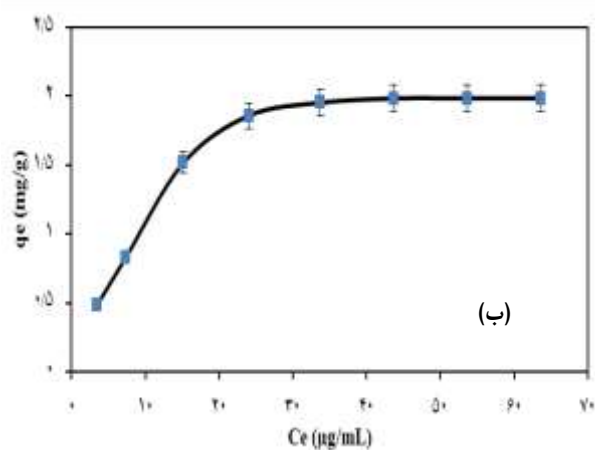
که در این فرمول، V حجم محلول آنالیت بر حسب لیتر، C_0 و C_e به ترتیب غلظت اولیه و تعادلی آنالیت بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر و m جرم جاذب بر حسب گرم می‌باشند و به صورت q_e در برابر C_e رسم می‌شوند. نمودار q_e در مقابل C_e برای جذب سلوکسیب بر روی پلیمرهای MIP و NIP در شکل ۷ نشان داده شده است.

معادله‌های مربوط به هم‌دمای جذب سطحی لانگمویر و فروندلیچ به ترتیب در معادله‌های (۵) و (۶) آورده شده است [۳۰، ۲۹]:

$$q_e = \frac{a C_e}{1 + b C_e} \quad (5)$$

$$q_e = a C_e^{1/n} \quad (6)$$

در روابط فوق a ، b و n پارامترهای هم‌دمای هستند. نمودارهای خطی شده برای هر یک از این هم‌دمای در شکل ۷ نشان داده شده است. بر اساس شیب و عرض از مبدأ این نمودارها، پارامترهای گوناگون این هم‌دمای به دست آمدند که در جدول ۵ نشان داده شده‌اند. مقدارهای R^2 در فرم خطی برای معادله لانگمویر در مقایسه با فروندلیچ بیش‌تر به ۱ نزدیک است، که نشان دهنده تطابق بیش‌تر داده‌های تجربی با هم‌دمای لانگمویر نسبت به هم‌دمای فروندلیچ می‌باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده، دیده می‌شود که داده‌های تجربی بیش‌تر با هم‌دمای لانگمویر مطابقت داشته و بیشینه ظرفیت جذبی در غلظت‌های مورد بررسی برای MIP، ۱۵/۰۶ میلی‌گرم بر گرم و برای NIP، ۲/۴۲ میلی‌گرم بر گرم می‌باشد. نتیجه‌های تجربی به دست آمده به خوبی با ساختار جاذب MIP سنتز شده مطابقت دارد؛ زیرا همان گونه که پیش‌تر اشاره شد با توجه به این که روی جاذب MIP مکان‌های مشخصی برای جذب سلوکسیب تعبیه شده است، دارو افزون بر این که در اثر



شکل ۷- (الف) منحنی همدمای جذبی برای MIP، (ب) منحنی همدمای جذبی برای NIP، (ج) نمودار همدمای لانگمویر خطی شده برای MIP، (د) نمودار همدمای لانگمویر خطی شده برای NIP، (ه) نمودار همدمای خطی شده فروندلیچ برای MIP، (و) نمودار همدمای خطی شده فروندلیچ برای NIP.

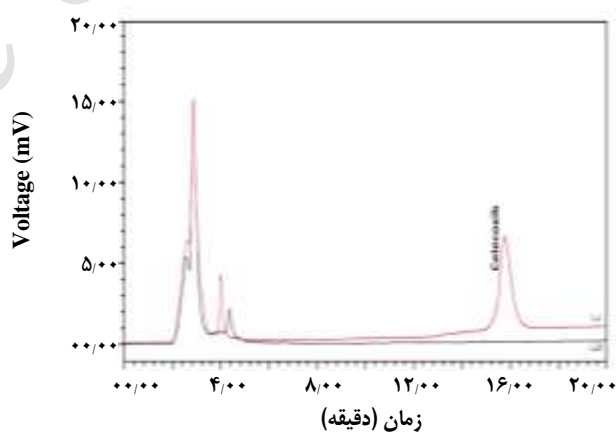
جدول ۶- درصد بازیابی‌های بدست آمده برای سلوکسیب در نمونه‌های ادرار.

| غلظت اضافه شده (µg/mL) | غلظت به‌دست آمده (µg/mL) | بازیابی (%) | RSD (%) (n=3) | |
|------------------------|--------------------------|-------------|---------------|-----------|
| | | | intra-day | inter-day |
| ۰ | ۰ | --- | --- | --- |
| ۱ | ۱,۰۲ | ۱۰۲ | ۲,۲۴ | ۴,۴۵ |
| ۱۰ | ۹,۹۳ | ۹۹,۳۰ | ۲,۱۶ | ۳,۰۶ |
| ۲۰ | ۱۹,۶۷ | ۹۸,۳۵ | ۱,۸۵ | ۲,۶۵ |
| ۵۰ | ۴۶,۳۰ | ۹۲,۶۰ | ۲,۷۲ | ۱,۸۷ |
| ۱۰۰ | ۹۵,۱۹ | ۹۵,۱۹ | ۲,۸۴ | ۴,۶۵ |

جدول ۸ - خلاصه نتیجه‌های پژوهش‌های انجام شده قبلی برای اندازه‌گیری سلوکسیب و مقایسه آنها با نتیجه‌های روش پیشنهادی.

| RSD% | درصد بازیابی (%) | حد آشکارسازی (ng/mL) | حد تشخیص (ng/mL) | معادله کالیبراسیون | دامنه غلظت (µg/mL) | پژوهشگر | روش اندازه‌گیری |
|------|------------------|----------------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| ۳,۸۰ | ۸۹ | ۲۶۲ | ۸۶ | $y=48415x+54359$ | ۰,۲۷-۸۰ | Baboota et al. [۳۱] | HPLC |
| ۱,۵۸ | ۹۵ | ۸۸ | ۲۶ | $y=0.495x+0.11$ | ۱-۲۰ | Saha et al. [۳] | UV |
| ۲,۵۶ | ۹۷ | ۷۵ | ۲۵ | $y=53740x+31444$ | ۱۰۰-۱۰۰۰ | Saha et al. [۳] | LC |
| ۴,۹۰ | ۸۸ | ۷ | ۲,۱ | $y=0.00188x-0.0013$ | ۰,۰۰۶-۸ | Ptáček et al. [۳۲] | LC-MS |
| ۱,۱۲ | ۹۲,۶۰-۱۰۲ | ۲۶/۷ | ۸ | $y=3099x+30086$ | ۰,۰۵-۱۰۰ | MIP-SPE-HPLC | |

گرفته شدند. به منظور دستیابی به شرایط بهینه آزمایش و حصول بالاترین درصد استخراج، پارامترهای موثر بر روش MISPE به کمک طراحی آزمایش مرکب مرکزی به دقت مورد بررسی قرار گرفتند. روش پیشنهادی MISPE-HPLC/UV در شرایط بهینه، ویژگی‌های تجزیه‌ای قابل قبولی مانند دقت بالا، شناساگری انتخابی بالا، درصد بالای بازیابی، گستره وسیع غلظتی و حد تشخیص مناسبی را از خود نشان داد. نتیجه‌های به‌دست آمده در مورد اندازه‌گیری سلوکسیب به‌وسیله این روش و نتیجه‌های برخی پژوهش‌های انجام شده به‌وسیله روش‌های دیگر، به منظور بررسی و مقایسه، در جدول ۸ آورده شده است. با توجه به نتیجه‌ها در مقایسه با دیگر روش‌ها، روش پیشنهادی از سادگی، انتخابگری بالا، تطابق با اصول زیست محیطی، ایمنی و تکرارپذیری بالا برخوردار است. در نتیجه، به دلیل وجود عامل پیش تغلیظ بالا و حفره‌های خاص با شناساگری انتخابی مناسب، از این پلیمر سنتز شده می‌توان در جداسازی و اندازه‌گیری مقدارهای جزئی سلوکسیب در نمونه‌ها در حد نانوگرم بر میلی‌لیتر استفاده نمود.



شکل ۸ - کروماتوگرام‌های مربوط به (الف) نمونه شاهد و (ب) نمونه ادرار اسپایک شده با محلول ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلوکسیب.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، ذره‌های پلیمر قالب مولکولی با استفاده از روش غیرکووالانسی سنتز و به عنوان جاذب در روش استخراج فاز جامد به منظور پیش تغلیظ و اندازه‌گیری مقدارهای جزئی سلوکسیب در نمونه‌های ادرار به کار

قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و آقای مجید کریمی به دلیل حمایت‌هایشان در انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱

مراجع

- [1] Chawla G., Piyush G., Thilagavathi S., [Characterization of Solid-State Forms of Celecoxib](#), *Eur. J. Pharm. Sci.*, **20**: 305-317 (2003).
- [2] Arabi M., Ghaedi M., Ostovan A., Tashkhourian J., Asadallahzadeh H., [Synthesis and Application of Molecularly Imprinted Nanoparticles Combined Ultrasonic Assisted for Highly Selective Solid Phase Extraction Trace Amount of Celecoxib from Human Plasma Samples Using Design Expert \(DXB\) Software](#), *Ultrason. Sonochem.*, **33**: 67-76 (2016).
- [3] Saha R.N., Sajeev C., Jadhav P.R., Patil S.P., Srinivasan N., [Determination of Celecoxib in Pharmaceutical Formulations Using UV Spectrophotometry and Liquid Chromatography](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**(3-4): 741-751(2002).
- [4] Gong L., Thorn C.F., Bertagnolli M.M., Grosser T., Altman R.B., Klein T.E., [Celecoxib Pathways: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics](#), *Pharmacogenet. Genomics*, **22**(4): 310-318 (2012).
- [5] Hamama A.K., Ray J., O. Day R., Brien E., Anne J., [Simultaneous Determination of Rofecoxib and Celecoxib in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography](#), *J. Chromatogr. Sci.*, **43**: 351-354 (2005).
- [6] Zhang M., Moore G.A., Gardiner S.J., Begg E.J.J., [Sensitive Method for the Determination of Amsulosin in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection](#), *J. Chromatogr. B.*, **830**: 245-253 (2006).
- [7] Zarghi A., Shafaati A., Foroutan S.M., Khoddam A., [Simple and Rapid High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Celecoxib in Plasma Using UV Detection: Application in Pharmacokinetic Studies](#), *J. Chromatogr. B.*, **835**: 100-104 (2006).
- [8] Störmer E., Bauer S., Kirchheiner J., Brockmüller J.R., Roots I., [Simultaneous Determination of Celecoxib, Hydroxylcelecoxib, and Carboxycelecoxib in Human Plasma Using Gradient Reversed-Phase Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection](#), *J. Chromatogr. B.*, **783**: 207-212 (2003).
- [9] Schonberger F., Heinkele G., Murdter T.E., Brenner S., Klotz U., Hofmann U., [Simple and Sensitive Method for the Determination of Celecoxib in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection](#), *J. Chromatogr. B.*, **768**: 255-260 (2002).
- [10] Ptáček P., Klíma J., Macek J., [Determination of Celecoxib in Human Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry](#), *J. Chromatogr. B.*, **899**: 163-166 (2012).

- [11] Chandran S., Jadhav P.R., Kharwade P.B., Saha R.N., [Rapid and Sensitive Spectrofluorometric](#), *Indian J. Pharm. Sci.*, **68**: 20-42 (2006).
- [12] Ansari S., Karimi M., [Recent configurations and progressive uses of magnetic molecularly imprinted polymers for drug analysis](#), *Talanta*, **167**: 470-485 (2017).
- [13] Bräutigam L., Vetter G., Tegeder I., Heinkele G., Geisslinger G., [Determination of Celecoxib in Human Plasma and Rat Microdialysis Samples by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry](#), *J. Chromatogr. B.*, **761**: 203-212 (2001).
- [14] Ansari S., [Application of magnetic molecularly imprinted polymer as a versatile and highly selective tool in food and environmental analysis: Recent developments and trends](#), *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **90**: 89-106 (2017).
- [15] Ansari S., Karimi M., [Challenges and Trends in Trace Determination of Drug Analysis Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Microextraction Technology](#), *Talanta*, **164**: 612-625 (2016).
- [16] Xu S., Li J., Chen L., [Molecularly Imprinted Polymers by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Precipitation Polymerization for Preconcentration of Atrazine in Food Matrices](#), *Talanta*, **85**: 282-289 (2011).
- [17] Ansari S., Karimi M., [Novel developments and trends of analytical methods for drug analysis in biological and environmental samples by molecularly imprinted polymers](#), *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **89**: 146-162 (2017).
- [18] Rao R.N., Maurya P.K., Khalid S., [Development of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Extraction Followed by Liquid Chromatographic Determination of Sitagliptin in Rat Plasma and Urine](#), *Talanta*, **85**: 950-957 (2011).
- [19] Lei Y., Xu G., Wei F., Yang J., Hu Q., [Preparation of a Stir Bar Coated with Molecularly Imprinted Polymer and its Application in Analysis of Dopamine in Urine](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **94**: 118-124 (2014).
- [20] Elijan A., Fu Q., Fang Q., [In Situ Polymerization Preparation of Chiral Molecular Imprinting Polymers Monolithic Column for Amlodipine and its Recognition Properties Study](#), *J. Polym. Res.*, **17**: 401-409 (2010).
- [21] Arvand M., Asadi Samie H., [A Biomimetic Potentiometric Sensor Based on molecularly Imprinted Polymer for the Determination of Memantine in Tablets](#), *Drug Test Anal.*, **5**(6): 461-467 (2013).
- [22] Omidi F., Behbahani M., Sadeghi Abandansari H., Sedighi A., [Application of Molecular Imprinted Polymer Nanoparticles as a Selective Solid phase Extraction for Preconcentration and Trace Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the Human Urine and Different Water Samples](#), *J. Environ. Health Sci. Eng.*, **12**: 137-138 (2014).
- [23] Du J.J., Gao R.X., Yu H., Li X.J., Mu H., [Selective Extraction of Dimethoate from Cucumber Samples by Use of Molecularly Imprinted Microspheres](#), *J. Pharm. Anal.*, **5**(3): 200-206 (2015).

- [24] Cormack P.A.G., Elorza A.Z., [Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterization](#), *J. Chromatogr. B.*, **804**: 173-182 (2004).
- [25] Koohpaei A.R., Shahtaheri S.J., Ganjali M.R., Rahimi Forushani A., Golbabaei F., [Application of Multivariate Analysis to the Screening of Molecularly Imprinted Polymers \(MIPs\) for Ametryn](#), *Talanta*, **75**(4): 978-986 (2008).
- [26] Garcia R., Cabrita M.J., Costa Freitas A.M., [Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food-A Highly Selective and Innovative Approach](#), *Am. J. Anal. Chem.*, **2**: 16-25 (2011).
- [27] Kolaei M., Dashtian K., Rafiee Z., Ghaedi M., [Ultrasonic-Assisted Magnetic Solid Phase Extraction of Morphine in Urine Samples by New Imprinted Polymer-Supported on MWCNT-Fe3O4-NPs: Central Composite Design Optimization](#), *Ultrason. Sonochem.*, **33**: 240-248 (2016).
- [28] Liu Q.S., Zheng T., Li N., Wang P., Abulikemu G., [Modification of Bamboo-Based Activated Carbon Using Microwave Radiation and its Effects on the Adsorption of Methylene Blue](#), *Appl. Surf. Sci.*, **256**: 3309-3315 (2010).
- [29] Najafi M., Yousefi Y., Rafati A.A., [Synthesis, Characterization and Adsorption Studies of Several Heavy Metal Ions on Amino-Functionalized Silica Nano Hollow Sphere and Silica Gel](#), *Sep. Purif. Tech.*, **85**: 193-205 (2012).
- [30] Jin Y., Row K.H., [Adsorption Isotherm of Ibuprofen on Molecular Imprinted Polymer](#), *Korean J. Chem. Eng.*, **22**(2): 264-267 (2005).
- [31] Baboota S., Faiyaz S., Ahuja A., Ali J., Shafiq S., Ahmad S., [Development and Validation of A Stability-Indicating HPLC Method for Analysis of Celecoxib \(CXB\) in Bulk Drug and Microemulsion Formulations](#), *Acta Chromatographica*, **18**: 116-124 (2007).
- [32] Ptáček P., Klíma J., Macek J., [Determination of Celecoxib in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem mass Spectrometry](#), *J. Chromatogr. B.*, **899**: 163-166 (2012).