Archive of SID

میکرواستخراج مایع – مایع پخشی برای پیش تغلیظ داروی فنتانیل از ماتریکس آبی و اندازه گیری آن با استفاده از اسپکتروسکوپی مرئی – فرابنفش

مهدی فرج زاده، کوروش ادیب
گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

مهدی رحیمی نصرآبادی*+
دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

چکیده: *در این پژوهش از روش میکرو استخراج مایع ـ مایع پخشی (DLLME) و به دنبال آن اسپکتروفتومتری UV-Vis برای پیش تغلیظ و اندازه گیری داروی فنتانیل در نمونه‌های آب، پلاسما و ادرار استفاده شد. ۱۰ mL از محلول نمونه آبی شامل داروی فنتانیل که به‌وسیله بافر فسفات در pH= ۱۰ تنظیم‌شده در یک لوله شیشه‌ای ۱۵ میلی‌لیتری ته مخروطی شکل قرار داده شد. سپس با استفاده از میکرو سرنگ، محلول کلروفرم حاوی آلیکوات ۳۳۶s به‌سرعت به محلول تزریق شد. محلولی ابری تشکیل شده و استخراج فراورده به درون قطره‌های ریز کلروفرم صورت گرفت. سپس این مخلوط به مدت‌زمان مشخص سانتریفیوژ شد و فاز آلی در لوله ته‌نشین شد. پس از حذف فاز آبی بالا یی، فاز آلی باقی‌مانده با یک میکرو سرنگ برداشته شد و جذب آن نسبت به محلول شاهد و در طول‌موج (۲۶۵ nm) خوانده شد. در این روش از حلال‌های پخش کننده مرسوم برای پراکندگی حلال استخراجی استفاده‌نشده، زیرا آلیکوات ۳۳۶s تزریقی به همراه کلروفرم، افزون بر ایجاد کاتیون همراه زوج یون، به‌عنوان پخش کننده برای تشکیل محلول ابری نیز نقش بازی می‌کند که نه‌تنها نتیجه‌های میکرو استخراج مایع مایع پخشی را به دنبال دارد، بلکه یک روش سبز نیز به‌حساب می‌آید. حد تشخیص این روش برای اندازه‌گیری فنتانیل برابر ۰/۰۰۲ mg/L و منحنی برسنجی در بازه غلظت ۰/۵۲-۰۱ mg/L خطی بود. انحراف استاندارد نسبی (n = ۷) برای استخراج فنتانیل ۲/۷ درصد و فاکتور پیش تغلیظ ۵۵/۵ محاسبه شدند. از برتری‌های این روش می‌توان به‌سادگی، سریع بودن، هزینه کم و فاکتور پیش تغلیظ بالا اشاره کرد. به‌طور تقریب در همه‌ی اندازه گیری‌های داروی فنتانیل انجام‌شده از دستگاه‌های پیچیده برای اندازه گیری آن‌ها استفاده شده است. برخی ارقام شایستگی این روش قابل مقایسه با روش‌های گزارش شده پیشین هستند.*

واژه‌های کلیدی: *پیش تغلیظ، میکرو استخراج مایع ـ مایع پخشی، فنتانیل، آلیکوت ۳۳۶s.*

KEYWORDS: *Pre-concentration, Dispersive liquid-liquid microextraction, Fentanyl, Aliquot 336s.*

* عهده دار مکاتبات
+E-mail: rahiminasrabadi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

طبق گزارش‌های سازمان محیط زیست (EPG) عامل‌های دارویی در محیط های آبی و پساب ها رشد چشمگیری دارند که تأثیر منفی بر روی زندگی موجودات و حفظ محیط زیست دارد [۱]. با توجه به این‌که باقی مانده این آلاینده‌ها در غلظت‌های خیلی کم در نمونه‌های زیست محیطی وارد می‌شوند، بنابراین ضرورت یک روش آماده‌سازی نمونه به منظور پیش تغلیظ پیش از اندازه‌گیری مقدارهای بسیار اندک آن‌ها در منابع گوناگون زیست محیطی، مورد توجه محققین است. داروی مورد بررسی در این پژوهش فنتانیل بوده است [۴-۲]. این دارو یکی از آگونیست های اوپیوئید (ضد درد) مخدر است که به‌عنوان داروی ضد درد پیش از جراحی، القای بیهوشی و حفظ آن و پیشگیری یا تسکین درد بی‌درنگ پس از انجام جراحی و کنترل دردهای مزمن سرطانی مصرف می‌شود. روش‌های گوناگونی تاکنون برای آشکارسازی و تعیین فنتانیل در نمونه‌های زیستی به‌کار رفته است که عبارتند از ایمنی سنجی پرتویی[۱] [۶، ۵]، کروماتوگرافی مایع با کار آیی بالا (HPLC) [۹ -۷]، کروماتوگرافی گازی (GC) [۱۳-۱۰]، کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی (LC/MS) [۱۶ - ۱۴]، ولتامتری[۲][۱۷]. در این پژوهش از روش میکرو استخراج مایع مایع پخشی (DLLME) [۱۸]، برای پیش تغلیظ و اندازه گیری فنتانیل استفاده شد. DLLME در واقع روش کوچک شده استخراج مایع ـ مایع[۳] (LLE) است که میزان مصرف حلال آلی در آن تا حد زیادی کاهش یافته است [۲۱-۱۹]. در این روش، مخلوط مناسبی از حلال‌های استخراجی و پخشی به‌سرعت و با استفاده از سرنگ درون نمونه آبی تزریق می‌شود. تشکیل قطره‌های ریزی از حلال استخراجی درون نمونه آبی محلول کدری با عنوان محلول ابری ایجاد می‌کند که سطح تماس بین فاز آبی و حلال استخراجی در آن بسیار زیاد است. بنابراین، انتقال آنالیت از نمونه آبی به حلال استخراجی بسیار تند انجام می‌شود. در ادامه محلول ابری سانتریفوژ شده و حلال آلی در انتهای لوله مخروطی شکل ته‌نشین می‌شود. تعیین آنالیت در فاز ته‌نشین شده با دستگاه‌های تجزیه‌ای گوناگونی انجام می‌گیرد. سادگی، سرعت، هزینه کم، فاکتور تغلیظ بالا و بازیابی زیاد از جمله مزایایی مهم این روش است [۲۳، ۲۲].

بخش تجربی

دستگاه ها

مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش، در جدول ۱ داده شده است، سایر وسیله‌های مورد استفاده در این پروژه شامل: بشر، بالن ژوژه، استوانه مدرج، لوله‌آزمایش ته مخروطی، پیپت، میکرو سرنگ ۱۰۰μL و سرنگ ۵mL، پارافیلم و ظرف نمونه می‌باشند.

جدول ۱- دستگاه‌های مورد استفاده

ردیف	نام دستگاه	مدل دستگاه	شرکت سازنده
۱	UV/Visible	۴۵Lambda	شرکت آمریکایی Perkin Elmer
۲	pH/Ion meter	Metrohm781	Herisau
۳	ترازوی تجزیه‌ای	Mettler H33AR	شرکت آمریکایی Mettler
۴	دستگاه سانتریفیوژ	مدل ۲۰EBA با ماکزیمم ۶۰۰۰ دور در دقیقه	شرکت Zentrifugen hettich تولید شده در آلمان

مواد شیمیایی و واکنشگرها

همه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری شده و کلیه حلال‌ها دارای درجه خلوص تجزیه‌ای بودند.

نمونه‌های حقیقی

نمونه‌های حقیقی مورد بررسی در این مطالعه مشتمل بر آب شهر تهران، ادرار و پلاسما انتخاب شدند. برای انجام آزمایش در محیط حقیقی، نخست نمونه خون انسانی از بیمارستان تهیه شد و در آزمایشگاه بیمارستان سانتریفیوژ شد. گلبول‌های خون از پلاسما جدا شد. در این حالت بخش پلاسمای خون که مایعی زردرنگ است از آن جدا شده و برای ادامه کار به آزمایشگاه منتقل شد. در این مرحله محلول آنالیت با غلظت ۵ و ۲۵ میلی گرم بر لیتر بررسی شدند.

برای حذف مزاحمت‌ها، مقدار ۱۵۰ میکرو لیتر تری کلرو اسیداستیک ۱ مولار به همراه ۵۰ میکرو لیتر هیدروکلریک اسید رقیق به پلاسما افزوده شد. ساختمان پروتئین‌ها و چربی‌ها شکسته شده و به‌سرعت رسوب می‌کنند. سپس محلول سانتریفیوژ شده و محلول شفاف رویی که حاوی آنالیت است برداشته شده و با استفاده از بافر، pH محیط در ۱۰ تنظیم شده و مرحله‌های پیش تغلیظ و استخراج با استفاده از مقدارهای بهینه انجام شد.

تهیه محلول‌ها

محلول استوک اولیه فنتانیل با غلظت ۱۰۰۰ mg/L در متانول تهیه شد. محلول‌های سایر غلظت‌ها از این محلول اولیه

(۱) radioimmunoassay
(۲) Voltammetric
(۳) Liquid-Liquid Extraction

www.SID.ir

Archive of SID

و به صورت روزانه تهیه می‌شدند. همچنین محلول استوک بافر فسفات بین pH ۲-۱۲ تهیه شد، که بعد از بهینه‌سازی pH ۱۰ انتخاب شد. محلول آلیکوات ۳۳۶S در کلروفرم ((w/v)۱/٪۵) تهیه شد. برای تهیه بافرفسفات pH ۱۰ مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر فسفریک اسید در بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای ۲ گرم NaOH افزوده شده و سپس با آب مقطر به حجم رسانده شد و در ادامه با pH متر، pH با افزودن اسید یا باز قوی روی ۱۰ تنظیم شد.

روش استخراج

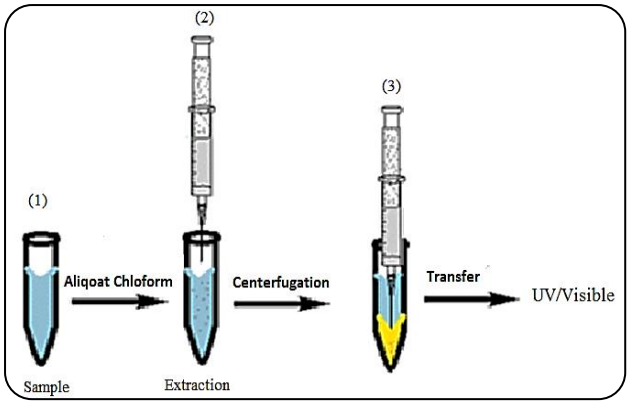
۱۰ *mL* از محلول نمونه آبی شامل داروی فنتانیل که به‌وسیله بافر فسفات در pH معادل ۱۰ تنظیم‌شده را دریک لوله شیشه‌ای ۱۵ میلی‌لیتری با انتهای مخروطی شکل قرار داده و سپس با استفاده از میکروسرنگ، مخلوط ۲۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم دارای آلیکوات ۳۳۶*s* ((*w/v*)۱/٪۵) به‌سرعت به محلول تزریق شد. به‌محض انجام تزریق، محلولی ابری ایجاد شد و به دنبال آن مخلوط حاصل درون لوله به‌صورت دستی به مدت ۵ ثانیه هم زده شد. در این مرحله استخراج حاصل به درون قطره‌های ریز کلروفرم صورت می‌پذیرد. سپس این مخلوط به مدت زمان ۴ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ *rpm* سانتریفیوژ شد و فاز آلی (۵μL ± ۱۵۵) در ته لوله سانتریفیوژ مخروطی ته‌نشین شد. پس از حذف فاز آبی فوقانی، فاز آلی باقی‌مانده با یک میکرو سرنگ کشیده شده و با استفاده از میکرو سل کوارتز جذب آن نسبت به محلول شاهد و در طول‌موج (۲۶۵ nm) خوانده شد. محلول شاهد نیز تحت شرایط تجزیه‌ای همانند ولی در نبود آنالیت تهیه شد. نمایش شمایی از روش کار DLLME در شکل ۱ ارایه شده است.

نتیجه‌ها و بحث

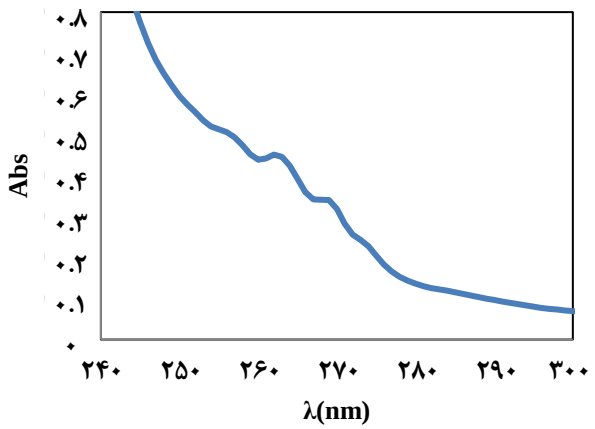
در این پژوهش، برای اندازه‌گیری کمی از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Visible استفاده شد. طیف جذبی ناحیه فرابنفش فاز آلی پس از DLLME برای چندین غلظت فنتانیل ثبت شد. طول‌موج پیشینه جذب فنتانیل برابر ۲۶۵ به‌دست آمد (شکل ۲) و به همین منظور در همه مطالعه‌های بعدی، همه اندازه‌گیری جذبی در این طول‌موج انجام شد.

بررسی پارامترها و بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر بر اندازه‌گیری

به منظور پیدا کردن شرایط مناسب برای اندازه‌گیری داروی فنتانیل به روش میکرو استخراج مایع ـ مایع پخشی، پارامترهای



شکل ۱: روش DLLME برای اندازه‌گیری فنتانیل



شکل ۲: طیف جذبی داروی فنتانیل 10^{-5}مولار

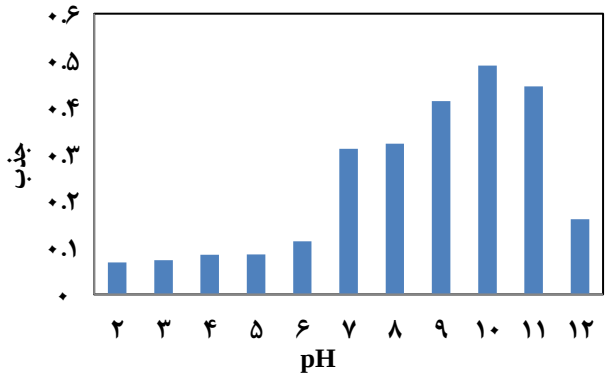
تجربی متفاوتی با استفاده از محلول استاندارد این دارو مورد مطالعه قرار گرفته و بهینه شد. در این پژوهش از روش تغییر یک متغیر در زمان برای بهینه نمودن پارامترها استفاده‌شده و شایان ذکراست که بهینه‌سازی در غلظت ثابت ۵ mg/*L* ازفنتانیل انجام‌شد.

بررسی اثر pH

اولین پارامتر مورد بررسی pH است. روشن است که میزان تشکیل کمپلکس به‌وسیله گروه‌های کی لیت دهنده به pH محیط وابسته است. بنابراین بررسی این اثر ضروری است. برای بررسی اثر pH نخست نمونه‌هایی با غلظت ۵ mg/L در گستره pH های ۲ تا ۱۲ تهیه شد. pH محلول‌ها با استفاده از محلول رقیق سود و کلریدریک اسید در مقدارهای موردنظر تنظیم شد. از نتیجه‌های به دست آمده مشخص شد، با افزایش pH تا رسیدن به pH ۱۰ بازده استخراج افزایش می‌یابد و سپس در گستره pH ۱۰ تا ۱۱ تقریباً ثابت می‌ماند. بنابراین به‌وسیله بافر فسفات، برای آزمایش‌های بعدی pH روی ۱۰ برای داروی فنتانیل تنظیم شد.

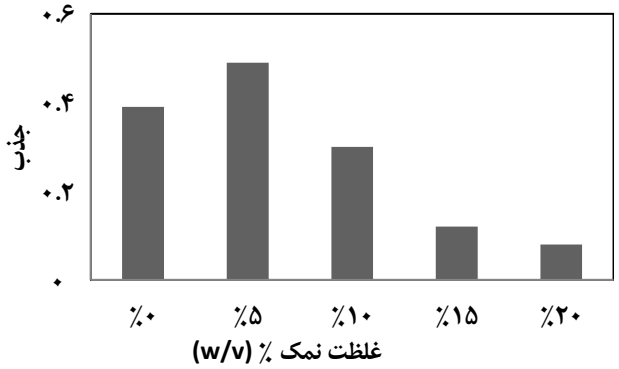
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- نمودار بهینه‌سازی pH داروی فنتانیل

شرایط استخراج: حجم محلول آبی، ۱۰ mL ؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶S، (۲۰۰µL)؛ حلال استخراج‌کننده، کلروفرم؛ غلظت آلیکو ات ۳۳۶S، (۱٪/۵)(w/v))؛ زمان سانتریفیوژ، ۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ، ۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)؛۳ دقیقه



شکل ٤- نمودار بهینه‌سازی قدرت یونی برای داروی فنتانیل

شرایط استخراج: حجم محلول آبی، ۱۰ mL ؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶S، (۲۰۰µL)؛ pH= ۱۰ ، غلظت آلیکوات ۳۳۶S؛ (۱/۵٪(w/v))، زمان سانتریفیوژ،۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ،۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه

بررسی اثر قدرت یونی

به طورکلی با افزایش میزان نمک قدرت یونی محلول افزایش می‌یابد، این امر سبب می‌شود تا انحلال‌پذیری حلال استخراجی و آنالیت هدف در محلول آبی کاهش یابد که برای دست‌یابی به بازده استخراج بالا مفید است. از سوی دیگر با افزایش قدرت یونی حجم فاز ته‌نشین شده نسبت به حالت بدون استفاده از نمک افزایش می‌یابد، که موجب کاهش غلظت آنالیت و فاکتور تغلیظ می‌شود. در نتیجه یافتن قدرت یونی مناسب برای دست‌یابی به بالاترین بازده استخراج از اهمیت بالایی برخوردار است. اثر کاهش حلالیت ترکیب‌های آلی در فازهای آبی، به‌وسیله افزودن نمک را اثر نمک زنی می‌نامند. به‌منظور بررسی اثر قدرت یونی بر روش DLLME مقدارهای گوناگون محلول پتاسیم نیترات برای فنتانیل به نمونه‌های آبی افزوده شد درحالی‌که سایر پارامترهای آزمایش ثابت نگه‌داشته شدند. نتیجه‌ها نشان دادند که میزان جذب با افزایش قدرت یونی افزایش می‌یابد اگرچه در قدرت‌های یونی بالاتر میزان جذب کاهش، سپس به‌طور نسبی ثابت می‌ماند. سرانجام غلظت ۵٪ نمک پتاسیم نیترات برای فنتانیل به‌عنوان غلظت بهینه نمک انتخاب شد.

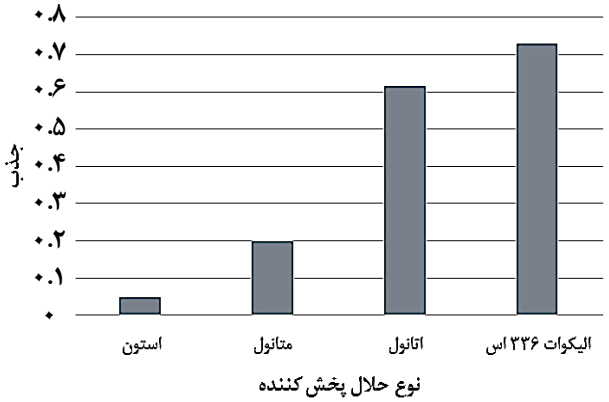
بررسی اثر حلال پخش شونده

حلال پخش شونده باید امتزاج‌پذیری مناسبی را با فاز آلی و حلال استخراج‌کننده داشته باشد تا بتواند حلال استخراج‌کننده را به‌منظور تشکیل یک محلول ابری به‌صورت قطره‌های ریز در فاز آبی پخش کند در این حالت مساحت سطح بین حلال استخراج‌کننده و فاز آبی به مقدار زیاد افزایش‌یافته و بازدهی استخراج افزایش می‌یابد.

به‌طورمعمول در روش‌های میکرو استخراج مایع ـ مایع پخشی (DLLME) از حلال‌های پخش‌کننده‌ای مانند استون، متانول واستونیتریل استفاده می‌گردد، ولی در این روش از حلال‌های پخش‌کننده مرسوم برای پراکندگی حلال استخراجی استفاده‌نشده، زیرا آلیکوات ۳۳۶S تزریقی به همراه کلروفرم، افزون بر ایجاد کاتیون همراه جفت زوج یون، به‌عنوان حلال پخش‌کننده جهت تشکیل محلول ابری نیز نقش بازی می‌کند که نه‌تنها نتیجه‌های میکرو استخراج مایع مایع پخشی را به دنبال دارد، بلکه یک روش سبز نیز به حساب می‌آید. در ادامه حلال‌های پخش‌کننده آلی معمول در روش (DLLME) با آلیکوات ۳۳۶S مورد مقایسه قرار گرفتند. بنابراین مجموعه‌ای از محلول‌های نمونه‌های دارای غلظت یکسان ۵ mg/L داروی فنتانیل با تزریق ۲۰۰ µL حلال کلروفرم دارای آلیکوات ۳۳۶S آزمایش شدند. آنالیز فاز ته‌نشین شده نشان می دهد که میزان جذب در صورت استفاده از ۲۰۰ µL کلروفرم دارای آلیکوات ۳۳۶S عملکرد بهتری در پخش‌کنندگی حلال استخراج‌کننده در محیط آبی و ایجاد محیط ابری پایدارتر و بهتر نسبت به حلال‌های پخش‌کننده آلی مثل متانول، اتانول، استون را دارد. ایجاد یک محیط ابری بهتر و پایدارتر به معنای کوچک‌تر شدن قطره‌های حلال پخش‌کننده در محیط آبی است بنابراین در این حالت سطح تماس بین فاز آبی و حلال استخراج‌کننده و درنتیجه بازدهی استخراج افزایش‌یافته و طیف جذبی بالاتری دیده می‌شود. بنابراین آلیکوات ۳۳۶S که نقش تولید زوج یون و عامل پخش‌کننده را بازی می‌کند به‌جای حلال آلی پخش‌کننده انتخاب شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- نمودار بهینه‌سازی حلال پخش‌کننده

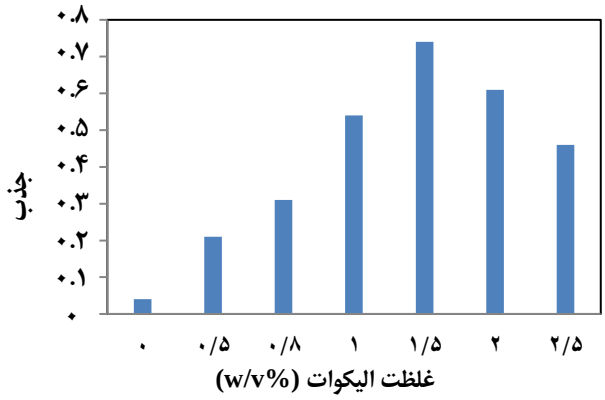
شرایط استخراج: حجم محلول آبی،mL ۱۰؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶s، (۲۰۰µL)؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵٪(w/v)، غلظت آلیکو ات ۳۳۶s؛ (۱/۵٪(w/v))، زمان سانتریفیوژ،۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ،۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه؛pH=۱۰

بررسی غلظت آلیکوات ۳۳۶s در کلروفرم (%w/v)

تزریق آلیکوات ۳۳۶S به همراه حلال استخراج‌کننده موجب یک محلول پایدار ابری می‌شود، بنابراین به‌سرعت بین حلال استخراج‌کننده و فاز آبی تعادلی تشکیل می‌شود. بر طبق این پدیده انتقال سریع آنالیت از فاز آبی به حلال استخراج‌کننده رخ می‌دهد. درنتیجه مطالعه اثر مقدار آلیکوات ۳۳۶S روی استخراج داروی فنتانیل خیلی مهم است، زیرا نقش تولید زوج یون و عامل پخش‌کننده را بازی می‌کند. به همین منظور، محلول‌هایی با مقدارهای گوناگون از غلظت آلیکوات ۳۳۶S تهیه شد، به‌طوری‌که غلظت آلیکوات ۳۳۶S در کلروفرم در بازه‌ی ۰/۰ تا ۲/۵٪(w/v) متغیر بود. سپس مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از این محلول‌ها به یک مجموعه محلول همانند داروی فنتانیل تزریق شد. سپس محلول ابری سانتریفیوژ و مقدار جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis خوانده شد. نتیجه‌های این بررسی نشان می‌دهد که جذب فاز آلی با غلظت آلیکوات ۳۳۶S تا ۱/۵٪(w/v) افزایش می‌یابد و پس از آن به‌تقریب ثابت می‌ماند. بنابراین غلظت ۱/۵٪(w/v) به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده و حجم آن

انتخاب حلال استخراج‌کننده مناسب در روش DLLME برای ایجاد استخراج کارآمد، بسیار ضروری است. حلال استخراج‌کننده در روش DLLME باید دارای ویژگی‌های خاصی ازجمله فراریت کم، حلالیت کم در آب، دانسیته بیش‌تر از آب و قابلیت بالا برای استخراج ترکیب هدف باشد. بر اساس این شرایط موردنیاز، کربن تتراکلرید، کلروبنزن، کلروفرم و ۱و۲- دی کلرواتان به‌عنوان حلال استخراج‌کننده انتخاب شدند. به‌همین منظور به یک مجموعه محلول



شکل ٦- بررسی غلظت آلیکوات ۳۳٦s در کلروفرم

شرایط استخراج: حجم محلول آبی،mL ۱۰؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶s، (۲۰۰µL)؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵٪(w/v)، زمان سانتریفیوژ،۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ،۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه؛pH=۱۰

شکل ۷- بهینه‌سازی حلال استخراج‌کننده

شرایط استخراج: حجم محلول آبی،mL ۱۰؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶s، (۲۰۰µL)؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵٪(w/v)، غلظت آلیکو ات ۳۳۶s؛ (۱/۵٪(w/v))، زمان سانتریفیوژ،۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ،۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه؛pH=۱۰

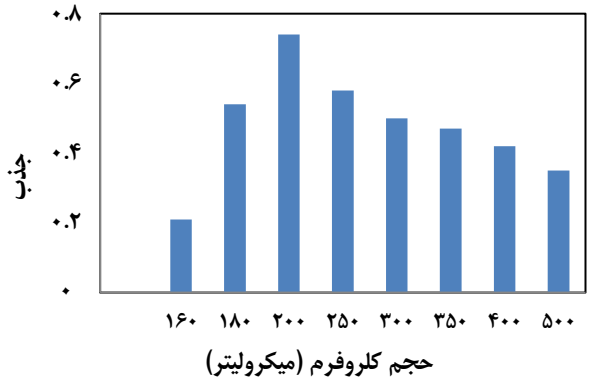
دارای داروی فنتانیل که در محیط بازی pH ۱۰ در شرایط بهینه تهیه‌شده بودند حجم‌های متفاوتی از این حلال‌های استخراج‌کننده شامل مقدارهای ثابت از آلیکوات ۳۳۶S تزریق شد تا فاز ته‌نشین شده‌ای حدود ۱۸۰ میکرولیترحاصل شود. محلول ابری و سامانه دوفازی با به کار بردن حلال کلروفرم و ۱ و ۲- دی کلر واتان به‌دست آمد درحالی‌که این پدیده در مورد کلروبنزن و تتراکلریدکربن به‌خوبی دیده نشد. درنتیجه کلروفرم انتخاب شد، زیرا در این مورد جذب فاز ته‌نشین بزرگ‌تر وتکرارپذیرتر می باشد.

بررسی اثر حجم محلول کلروفرم دارای آلیکوات ۳۳۶s(w/v)۱/۵٪

مقدار حلال به‌کاررفته درروش DLLME به‌طور مستقیم بر روی حجم فاز ته‌نشین شده تأثیر می‌گذارد و موجب تغییر

www.SID.ir

Archive of SID

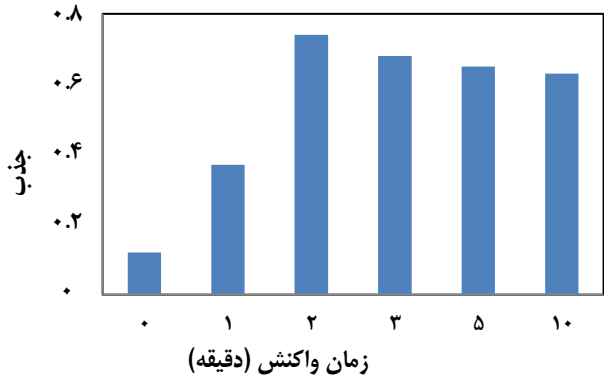


شکل۸- بررسی اثر حجم محلول کلروفرم دارای آلیکوات ۳۳۶s(w/v)٪۱/۵
شرایط استخراج: حجم محلول آبی،mL ۱۰؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵ ٪(w/v)، غلظت آلیکوات ۳۳۶s (w/v)٪ ۱/۵، زمان سانتریفیوژ،۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ،۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه؛pH=۱۰

چشمگیری در فاکتور تغلیظ می‌شود. به همین منظور به یک مجموعه محلول همانند با شرایط آزمایش بهینه‌شده بودند، حجم‌های متفاوتی از کلروفرم حاوی آلیکوات ۳۳۶s(w/v)٪ ۱/۵ در بازه‌ی ۵۰۰ ـ ۱۵۰ میکرو لیتر تزریق شد. سپس محلول ابری حاصل سانتریفیوژ شد و پس از جداسازی فاز آلی ته‌نشین شده، مقدار جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible خوانده شد. شایان ذکر است با تزریق حجم‌های کم‌تر از ۱۵۰ میکرو لیتر، حجم کمی از فاز آلی به دست می‌آمد به‌نحوی‌که امکان خواندن جذب فاز ته‌نشین شده با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مجهز به میکرو سل وجود نداشت. از نتیجه‌های به دست آمده مشخص شد که جذب فاز آلی با افزایش حجم کاهش می‌یابد که این امر را می‌توان به علت اثر رقت و کاهش غلظت گونه‌های استخراج‌شده در فاز ته‌نشین شده نسبت داد. به همین دلیل برای به دست آوردن فاکتور تغلیظ بالا و حد تشخیص کم، ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم حاوی آلیکوات ۳۳۶s (w/v)٪ ۱/۵ به‌عنوان مقدار بهینه در آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

بررسی اثر زمان استخراج

به فاصله زمانی بین تزریق مخلوط حلال‌ها و آغاز سانتریفیوژ کردن زمان استخراج گفته می‌شود. اثر این عامل متغیر بر روی یک مجموعه محلول همانند با شرایط بهینه‌شده مورد مطالعه قرار گرفت. بدین شکل که نخست عمل تزریق صورت گرفته و پس از گذشت زمان مورد نظر محلول ابری سانتریفیوژ شد و پس از جداسازی فاز آلی از فاز آبی، جذب فاز ته‌نشین شده خوانده شد. نتیجه‌های این بررسی نشان داد که زمان در استخراج تأثیر چشمگیری بر کارایی استخراج داروی فنتانیل ندارد و این اثبات می‌کند که فرآیند



شکل ۹-: اثر زمان ماندن محلول واکنش پیش از تزریق
شرایط استخراج: حجم محلول آبی،mL ۱۰؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶s، (۲۰۰µL)؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵٪(w/v)، غلظت آلیکوات ۳۳۶s؛ (۵٪(w/v))۱٪، زمان سانتریفیوژ،۴ دقیقه؛ دور سانتریفیوژ،۴۰۰۰؛ pH=۱۰

استخراج به زمان وابسته نبوده و خیلی تند است، زیرا مساحت سطح تماس زیادی بین حلال استخراج‌کننده و فاز آبی وجود دارد و این‌یک برتری مهم از روش پیشنهادی است.

بررسی زمان واکنش

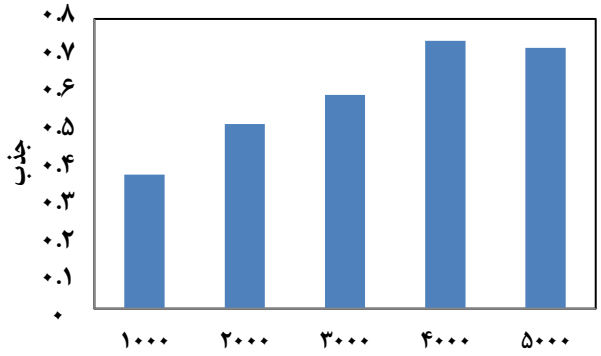
در ادامه مرحله‌های بهینه‌سازی زمان نگهداری واکنش پیش از انجام تزریق مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور چندین محلول همانند دارای داروی فنتانیل وبافرفسفات pH۱۰ تهیه‌شده و در بازه‌ی زمانی ۱۵ ـ ۱ دقیقه نگه‌داشته شد و سپس تزریق صورت گرفت و در انتها بقیه فرآیند استخراج همانند شرایط بهینه‌شده دنبال شد. نتیجه‌های جذب فاز ته‌نشین شده مربوط به زمان‌های متفاوت در شکل ۹ آورده شده است. نتیجه‌های نشان داد از زمان ۲ دقیقه به بعد میزان جذب فاز ته‌نشین شده برای داروی فنتانیل به‌تقریب ثابت است، ازاین‌رو، ۲ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه انتخاب شد.

بررسی اثر سرعت و زمان سانتریفیوژ

در این پژوهش اثر سرعت و زمان سانتریفیوژ نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتیجه‌های نشان داد که بازده استخراج با افزایش سرعت سانتریفیوژ از ۴۰۰۰rpm ـ ۱۰۰۰ افزایش می‌یابد. از این رو سرعت سانتریفیوژ را برای آزمایش‌های بعدی روی ۴۰۰۰ rpm تنظیم شد. از سوی دیگر بازده استخراج در برابر زمان سانتریفیوژ در گستره زمانی ۱۰ ـ ۱ دقیقه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتیجه‌های نشان داد با افزایش زمان سانتریفیوژ سیگنال جذبی نخست افزایش و سپس ثابت می‌ماند. این رفتار ناشی از متفاوت بودن اندازه قطرات تشکیل‌شده در این فناوری است. براثر سانتریفیوژ نخست ذره‌هایی که دارای اندازه

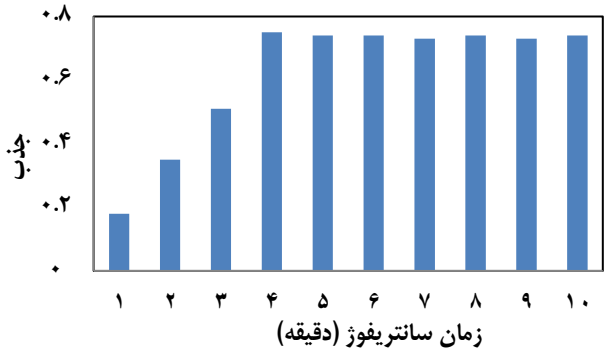
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰- بهینه‌سازی اثر بررسی سرعت سانتریفیوژ

شرایط استخراج: حجم محلول آبی، ۱۰ mL؛ حجم حلال حاوی آلیکوات ۳۳۶s، (۲۰۰μL)؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵٪(w/v)، زمان سانتریفیوژ؛۴ دقیقه؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه؛pH=۱۰



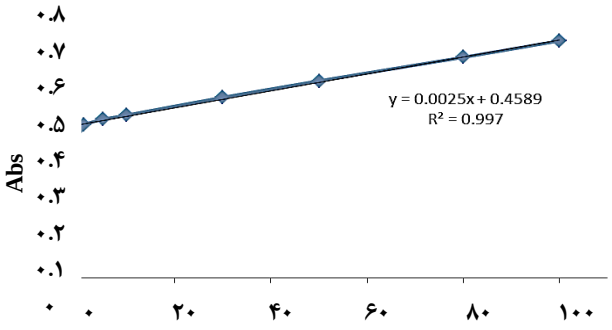
شکل ۱۱- بهینه‌سازی اثر زمان سانتریفیوژ

شرایط استخراج: حجم محلول آبی، ۱۰ mL؛ حجم حلال دارای آلیکوات ۳۳۶s، (۲۰۰μL)؛ غلظت نمک پتاسیم نیترات؛۵٪(w/v)؛ دور سانتریفیوژ؛۴۰۰۰؛ بررسی زمان واکنش (بازی شدن)،۳ دقیقه؛pH=۱۰

بزرگ‌تری هستند ته‌نشین می‌شوند ذرات کوچک‌تر باقی می‌مانند. بنابراین در آزمایش‌هایی که زمان سانتریفیوژ آن‌ها کم است تنها ذره‌های درشت‌تر که درمجموع سطح تماس کم‌تری را با فاز آبی دارند در راندمان استخراج تأثیر می‌گذارند، درحالی‌که با بالا بودن زمان سانتریفیوژ ذرات بسیار ریزی که درمجموع دارای سطح تماس بیش‌تری هستند عمل استخراج را بهتر انجام می‌دهند نیز ته‌نشین شده و موجب بالا رفتن راندمان استخراج می‌شوند. همچنین برای بالا بردن سرعت کار (یک فاکتور مهم درکارهای تجزیه‌ای) زمان سانتریفیوژ برای آزمایش‌های بعدی برای داروی فنتانیل روی ۴ دقیقه تنظیم شد.

منحنی برسنجی و ارقام شایستگی روش

در شرایط بهینه منحنی برسنجی برحسب تغییرات جذب فاز ته‌نشین شده نسبت به تغییر غلظت داروی فنتانیل رسم شد.



شکل ۱۲- منحنی برسنجی برای اندازه‌گیری داروی فنتانیل

جدول ۲- پارامترهای تجزیه ای مهم روش برای اندازه گیری فنتانیل

پارامتر	گستره
محدوده‌ی خطی (میلی گرم در لیتر)	۰/۰۱ تا ۵۲ mg/L
ضریب همبستگی (r^2)	۰/۹۹۷
حد تشخیص (میلی گرم در لیتر)	۰/۰۰۲ mg/L
درصد انحراف استاندارد نسبی (تعداد تکرار = ۷)	۲/۷
فاکتور پیش تغلیظ	۵۵/۵

با توجه به نتیجه‌های گزارش شده در شکل ۱۲ بازه‌ی خطی برای اندازه گیری فنتانیل از ۵۲ mg/L تا ۰/۰۱ می باشد. که حد تشخیص برابر۰/۰۰۲ mg/L طبق رابطه (۱) به‌دست آمد همچنین مقدار ضریب همبستگی(r_2) برای بازه‌ی یاد شده برابر ۰/۹۹۷ می‌باشد که بیانگر ارتباط خطی مناسب بین غلظت فنتانیل با شدت جذب آن می باشد.

$$LOD= {}^{3}S_b \ /b \qquad (۱)$$

اندازه گیری فنتانیل در نمونه‌های حقیقی

مطالعه اثر مزاحمت‌ها

برای ارزیابی گزینش پذیری روش ارایه‌شده در اندازه‌گیری داروی فنتانیل، بررسی مزاحمت‌های احتمالی تعدادی از کاتیون‌ها و آنیون‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. به همین منظور به محلول‌هایی حاوی ۵ mg/L داروی فنتانیل، مقدارهای گوناگونی از گونه‌های مزاحم احتمالی افزوده شد. سپس در شرایط بهینه اندازه گیری روی این محلول‌ها انجام شد و جذب فاز ته‌نشین شده اندازه‌گیری شد. نتیجه‌های به‌دست آمده با نتیجه محلول‌های همانند فنتانیل و بدون حضور گونه مزاحم مقایسه شد و درصورتی‌که یون مورد مطالعه بیش‌تر از٪۵± خطا در اندازه‌گیری داروی فنتانیل ایجاد کند به‌عنوان گونه مزاحم در نظر گرفته می‌شود. نتیجه‌های این بررسی در جدول شماره (۳) داده شده است همان‌گونه که از داده‌های این جدول برمی‌آید، روش موردنظر به دلیل مزاحمت نداشتن بسیاری از گونه‌ها، از گزینش پذیری خوبی برخوردار است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- اثر مزاحمت گونه‌های گوناگون بر اندازه‌گیری فنتانیل

یون مزاحم/فنتانیل	گونه‌های موردبررسی
۱۰۰۰	Ca^{2+},Cl^{-},NO_3^{-},K^{+},Na^{+},Mg^{2+}
۵۰	$C_6H_{12}O_6$ (گلوکز)
۸۰	$C_6H_8O_6$ (آسکوربیک اسید)
۳۰	$C_5H_4N_4O_3$ (اوریک اسید)

اندازه‌گیری داروی فنتانیل در نمونه حقیقی

به‌منظور اثبات تأیید و کارایی روش در نمونه‌های حقیقی، مقدار داروی فنتانیل در سه نمونه آب شیر، ادرار و پلاسما اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه دو غلظت اندازه گیری شد که نتیجه‌های به همراه دقت روش در جدول (۴) خلاصه شده است.. به‌منظور بررسی صحت و دقت روش و مناسب بودن آن به نمونه مقدارهای مشخص داروی موردنظر اضافه گردید و عمل استخراج و بازیابی آنالیت ها از این محلول‌ها صورت گرفت، میزان درصد بازیابی در نمونه‌ها از ٪۱۰۳ ـ ۹۴ می‌باشد که نشان‌دهنده کاربردی بودن روش پیشنهادی هست. بنابراین DLLME می‌تواند با موفقیت برای پیش تغلیظ داروی فنتانیل در نمونه‌های آبی به کار رود.

نتیجه گیری

در این پژوهش روش DLLME جفت شده با اسپکتروفتومتری UV-Vis میکرو حجمی برای اندازه‌گیری مقدارهای کم داروی فنتانیل

جدول٤- اندازه‌گیری فنتانیل در نمونه ادرار، آب و پلاسما

نمونه	فنتانیل اضافه شده (mg/L)	فنتانیل یافت شده (mg/L)	درصد بازیابی (٪)
آب شرب شهری	۵	۴/۰±۹/۳	۹۸
	۲۵	۲۵/۱±۸/۹	۱۰۳/۴
ادرار	۵	۴/۰±۷/۶	۹۴
	۲۵	۲۴/۰±۴/۹	۹۷/۸
پلاسما	۵	۴/۰±۷/۵	۹۴
	۲۵	۲۳/۱±۸/۸	۹۵/۴

در نمونه‌های ادرار، آب و پلاسما ارایه شد. در این روش از حلال پخش‌کننده مرسوم برای پراکندگی حلال استخراجی استفاده نشد، زیرا آلیکوات **۳۳۶S** تزریقی به همراه کلروفرم، افزون بر ایجاد کاتیون همراه برای تشکیل زوج یون، به‌عنوان پخش‌کننده برای تشکیل محلول ابری نیز نقش بازی می‌کند. از برتری‌های این روش می‌توان به‌سادگی، سریع بودن، هزینه کم، فاکتور پیش تغلیظ بالا اشاره کرد. به‌تقریب در همه پژوهش‌هایی که درزمینه اندازه‌گیری داروی فنتانیل انجام‌شده از دستگاه‌های پیچیده برای اندازه‌گیری آن‌ها استفاده‌شده است. از داده‌های موجود می‌توان گفت برخی ارقام شایستگی این روش قابل‌مقایسه با روش‌های گزارش‌شده پیشین هستند و در عین حال روش ارایه شده روشی ساده تر و با هزینه کم‌تر می باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۵

مراجع

[1] Fernández P., González C., Pena M.T., Carro A.M., Lorenzo R.A., A rapid Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by Ultra-Performance Liquid Chromatography for the Simultaneous Determination of Seven Benzodiazepines in Human Plasma Samples, *Analytica Chimica Acta*, 767: 88-96 (2013).

[2] Bathari R., Bhalotra A.R., Anand R., & Kumar V., A Randomised Trial to Compare the Effect of Addition of Clonidine or Fentanyl to Hyperbaric Ropivacaine for Spinal Anaesthesia for Knee Arthroscopy, *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*, **21**(5): 138-142 *(2015)*..

[3] Lötsch J., Walter C., Parnham M. J., Oertel B. G., Geisslinger G. Pharmacokinetics of Non-Intravenous Formulations of Fentanyl, *Clinical pharmacokinetics*, **52**(1): 23-36 (2013).

[4] Stiller R.L., Scierka A.M., Davis P.J., Cook D.R. A Brief Technical Communication: Detection of Fentanyl in Urine, *Forensic Science International*, **44**(1): 1-6 (1990).

www.SID.ir

Archive of SID

[5] Henderson G.L., Harkey M.R., Jones A.D.; Rapid Screening of Fentanyl (China White) Powder Samples by Solid-Phase Radioimmunoassay, *Journal of Analytical Toxicology*, **14**(3): 172-175 (1990).

[6] Portier E.J., de Blok K., Butter J.J., van Boxtel C.J., Simultaneous Determination of Fentanyl and Midazolam Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **723**(1): 313-318 (1999).

[7] Saraji M., Khalili Boroujeni M., Hajialiakbari Bidgoli A.A., Comparison of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Hollow Fiber Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of Fentanyl, Alfentanil, and Sufentanil in Water and Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**(7): 2149-58 (2011).

[8] Bista S.R., Lobb M., Haywood A., Hardy J., Tapuni A., Norris R., Development, Validation and Application of an HPLC–MS/MS Method for the Determination of Fentanyl and Nor-Fentanyl In Human Plasma and Saliva, *Journal of Chromatography B*, **960**: 27-33 (2014).

[9] Blanco M.E., Encinas E., González O., Rico E., Vozmediano V., Suárez E., Alonso R.M., Quantitative Determination of Fentanyl in Newborn Pig Plasma and Cerebrospinal Fluid Samples by HPLC-MS/MS, *Drug Testing and Analysis* **7**(9): 804-811 (2015).

[10] Watts V., Caplan Y., Determination of Fentanyl in Whole Blood at Subnanogram Concentrations by Dual Capillary Column Gas Chromatography with Nitrogen Sensitive Detectors and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, **12**(5): 246-254 (1988).

[11] Wang C., Li E., Xu G., Wang H., Gong Y., Li P., Liu S., He Y., Determination of Fentanyl in Human Breath by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Microchemical Journal*, **91**(2): 149-152 (2009).

[12] Raikos N., Theodoridis G., Alexiadou E., Gika H., Argiriadou H., Parlapani H., Tsoukali H., Analysis of Anaesthetics and Analgesics in Human Urine by Headspace SPME and GC, *Journal of Separation Science* **32**(7): 1018-1026 (2009).

[13] Gardner M.A., Sampsel S., Jenkins W.W., Owens J.E., Analysis of Fentanyl in Urine by DLLME–GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology*, **39**(2): 118-125 (2014).

[14] Day J., Slawson M., Lugo R.A., Wilkins D., Analysis of Fentanyl and Norfentanyl in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using Electrospray Ionization, *Journal of Analytical Toxicology*, **27**(7): 513-516 (2003).

[15] Coopman V., Cordonnier J., Pien K, Van Varenbergh D., LC–MS/MS Analysis of Fentanyl and Norfentanyl in a Fatality Due to Application of Multiple Durogesic® Transdermal Therapeutic Systems, *Forensic Science International* **169**(2): 223-227 (2007).

[16] Ahrens B.D., Kucherova Y, Butch A.W., Detection of Stimulants and Narcotics by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Sports Doping Control, *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis*, 247-263 (2016).

www.SID.ir

Archive of SID

[17] Guo H., Hu N., Lin S., Adsorptive Stripping Voltammetric Properties of Fentanyl at Hg Electrode, *Talanta*, **41**(11): 1929-1932 (1994).

[18] Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M.R.M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction, Journal of Chromatography A, **1116**(1): 1-9 (2006)..

[19] Harvey SD, Fellows R.J., Cataldo D.A., Bean R.M., Analysis of the Explosive 2, 4, 6-Trinitrophenylmethylnitramine (Tetryl) in Bush Bean Plants, *Journal of Chromatography A*, **630** (1-2): 167-177 (1993).

[20] Rezaee M., Yamini Y., Faraji M., Evolution of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method, *Journal of Chromatography A*, **1217** (16): 2342-2357 (2010).

[21] Anthemidis A.N., Ioannou K.I.G., Recent Developments in Homogeneous and Dispersive Liquid–Liquid Extraction for Inorganic Elements Determination. A Review, *Talanta*, **80** (2): 413-421 (2009).

[22] Zang X.H.., Wu Q.H., Zhang M.Y., Xi G.H., Wang G.Z., Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **37** (2): 161-168 (2009).

[23] Mohammadi S.Z., Afzali D., Taher M.A., Baghelani Y.M., Ligandless Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Separation of Trace Amounts of Silver Ions in Water Samples and Flame Atomic Absorption Spectrometry Determination. *Talanta* 80, no. 2 (2009): 875-879.

[24] Hennion M.C., Pichon V., Solid-Phase Extraction of Polar Organic Pollutants from Water, *Environmental Science & Technology*, **28**(13): 576A-583A (1994).

www.SID.ir