

اندازه گیری الکتروشیمیایی ترامادول با استفاده از الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات وانادیم اکسید

ناهید توکلی*، نسرین سلطانی، عبدالمحمد عطاران، حسین صلواتی، سمیرا زمانی

دانشکده شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۲۵ تاریخ تصحیح: ۹۵/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۰۸

چکیده

در این تحقیق الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید جهت اندازه گیری داروی ترامادول استفاده گردید. جهت بررسی رفتار ترامادول در روش های مختلف الکتروشیمیایی از قبیل ولتامتری چرخه ای، ولتامتری پالس تفاضلی، اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی، کروماتوگرافی و کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت. رفتار الکتروشیمیایی ترامادول بر روی الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید و الکتروکد خمیر کربن اصلاح نشده مورد بررسی قرار گرفت. برخی از پارامترها از قبیل سرعت رویش، مقدار نانو ذرات وانادیم اکسید، اثر pH، تاثیر پله پتانسیل بر رفتار الکتروکد و ارتفاع ضریب بهینه گردید. دامنه خطی غلظت ترامادول در محدوده ۰/۱ تا ۵۵۰/۰ میکرو مولار و حد تشخیص ۰/۰۱۳ میکرو مولار به دست آمد. به منظور تعیین گزینش پذیری روش به بررسی تاثیر مزاحمت ها بر روی گونه های مختلف پرداخته شد. اندازه گیری ترامادول با الکتروکد فوق در نمونه های حقیقی همچون قرص و سرم خون بررسی گردید.

کلمات کلیدی: ترامادول، نانو ذرات وانادیم اکسید، الکتروکد خمیر کربن اصلاح شده.

۱- مقدمه

ترامادول یک داروی مسکن شبه تریاک است و یک نوع اپیوئید به حساب می آید. این دارو برای تسکین دردهای متوسط تا شدید تجویز می شود [۱ و ۲]. داروی ترامادول عملکردی شبیه به مواد مخدر دارد و در جوامع مختلف بسیار مورد سوء مصرف قرار گرفته است. از این رو تحقیقات بسیاری به منظور اندازه گیری و شناسایی این دارو، با روش های مختلف صورت گرفته است [۱]. این روش ها شامل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) [۳-۶]، کروماتوگرافی گازی (GC) [۷-۸]، کروماتوگرافی گازی [۹-۱۰]، الکتروفورز موئینه ای [۱۱]، اسپکتروفوتومتری [۱۲]، پتانسیومتری [۱۳]، کروماتوگرافی گازی - اسپکتروفوتومتری جرمی [۱۴] و الکتروشیمی [۱۵ و ۱۶] می باشد.

روش های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مخصوصاً HPLC به دلیل نیاز به آماده سازی نمونه (نظیر: استخراج و تشکیل کمپلکس) وقت گیر و دارای تجهیزات گران می باشند. بنابراین برای رفع این مشکلات، از روش های الکتروشیمیایی استفاده می شود که دارای مزایایی نظیر حساسیت زیاد، انتخاب گری، سادگی، تکرارپذیری و تجهیزات ارزان می باشند [۱۹-۱۷]. در سال ۲۰۱۰ اندازه گیری همزمانی ولتامتری ترامادول و استامینوفن با استفاده از نانو ذرات با الکتروود کربن شیشه ای اصلاح شده با نانو ذرات کربن با حد تشخیص ۱ میکرومولار در دامنه خطی ۱۰۰-۱۰ میکرومولار برای ترامادول و با حد تشخیص ۰/۵ میکرومولار در دامنه خطی ۱۰۰-۰/۱ میکرومولار برای استامینوفن توسط قربانی-بیدکره^۱ و همکارانش گزارش شده است [۱۶]. در سال ۲۰۱۳ الکترواکسایش و تعیین ترامادول در حضور دوپامین در پلی ۸و۱ دی آمینو نفتالن با الکتروود اصلاح شده پلاتین توسط هاسوت^۲ و همکارانش گزارش شده است. در این روش الکتروود پلاتین اصلاح شده با روش پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی آماده شد. برای تشخیص ترامادول از روش ولتامتری چرخه ای و ولتامتری موج مربعی استفاده گردید. این الکتروود اصلاح شده برای اندازه گیری ترامادول و دوپامین موثر بوده و نتایج به دست آمده رضایت بخش می باشد [۲۰]. در سال ۲۰۱۳ گزینش پذیری بالا ترامادول بر اساس مولکول پلیمری اصلاح شده الکتروود خمیر کربن با حد تشخیص ۰/۵ میکرومولار و در دامنه خطی ۱۰۰-۰/۱ میکرومولار برای ترامادول توسط سلیمانی^۳ و همکارانش گزارش شده است [۲۱]. وانادیم اکسید یک اکسید نیمه هادی معدنی با پایداری حرارتی خوب و سمیت کم می باشد. در سال های اخیر یکی از نانو ساختارهای وانادیم اکسید مورد بررسی قرار گرفته شد، که کاربرد زیادی در باتری های لیتیومی دارد. این باتری ها در حضور نانو ذرات وانادیم اکسید عملکرد و بازده مناسبی را از خود نشان می دهند. در سال ۱۹۹۱ بدور^۴ و همکارانش یون لیتیم را داخل وانادیم اکسید با فرآیند سل-ژل اندازه گیری کردند. در سال ۲۰۱۴ سورش^۵ و همکارانش از نانو ذرات وانادیم اکسید به عنوان الکتروود خمیر کربن شیشه ای اصلاح شده برای تعیین گزینشی دوپامین در سطح نانومولار استفاده گردید. خصوصیات نانو ذرات وانادیم اکسید دوپ شده با نیکل با روش های الکتروشیمیایی از قبیل ولتامتری چرخه ای و کروئوآمپرومتری نسبت به دوپامین بررسی شد. نانو ذرات وانادیم اکسید دارای خواص کاتالیتیکی، الکتریکی و نوری خوبی می باشند [۲۹-۲۲]. تحقیقات بسیاری به منظور اندازه گیری و شناسایی ترامادول صورت گرفته است. این تحقیقات چندین هدف را دنبال می کند از جمله [۱]:

(۱) یافتن یک روش ایده آل و کاربردی برای آنالیز این دارو در مراکز دارویی، پزشکی قانونی و آزمایشگاه ها

^۱Ghorbani-Bidkorbeh

^۲Hathoot

^۳Soleimani

^۴Baddour

^۵Suresh

۲) بررسی راه کارهایی برای جلوگیری از سوء مصرف ترامادول

۳) یافتن دلایلی برای توجیه اثرات جانبی ایجاد شده توسط این دارو

با توجه به اهمیت اندازه گیری ترامادول و کاربرد نانو ذرات در اصلاح الکترودها [۳۰-۳۲]، در این مقاله از الکترودهای کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید استفاده شد. رفتار الکتروشیمیایی ترامادول بر روی الکترودهای مورد بررسی قرار گرفت. الکترودهای پایدار، گزینش پذیری و حساسیت خوبی برخوردار است و قابلیت اندازه گیری ترامادول در نمونه های حقیقی را دارد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- دستگاه ها

در این تحقیق از دستگاه پتانسیواستات-گالوانواستات اتولب^۱ مدل PGSTAT 12 ساخت شرکت ECO-Chemie(Netherlands) جهت اندازه گیری های الکتروشیمیایی استفاده شد. به منظور ثبت ولتاموگرام ها از نرم افزار Nova 1.8 استفاده گردید برای اندازه گیری pH محلول ها، pH متر متروهم^۲ مدل ۷۴۴ به کار برده شد. جهت توزین مواد شیمیایی، از ترازوی دیجیتال تجزیه ای ۰.۰۰۰۱ g BEL.ITALY,IT1101551d استفاده شد.

۲-۲- مواد مورد استفاده

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده دارای خلوص تجزیه ای بالا هستند. کلیه محلول ها با استفاده از آب مقطر یون زدایی شده تهیه شد. برای تهیه محلول های مورد نیاز تحقیق از مواد با خصوصیات مندرج در جدول (۱) استفاده شده است.

جدول ۱- لیست مواد شیمیایی مورد استفاده

ردیف	نام ماده شیمیایی	فرمول شیمیایی	درصد خلوص	جرم مولکولی	شرکت سازنده
۱.	پودر گرافیت	C	٪۱۰۰	۱۲/۰۱	مرک ^۳
۲.	روغن پارافین	-	٪۱۰۰	-	مرک
۳.	سدیم دی هیدروژن فسفات	NaH ₂ PO ₄	٪۹۹	۱۵۶/۰۱	مرک
۴.	دی سدیم هیدروژن فسفات	Na ₂ HPO ₄	٪۹۹	۳۵۸/۱۴	مرک
۵.	فسفریک اسید	H ₃ PO ₄	٪۸۵	۹۸	مرک
۶.	بوریک اسید	H ₃ BO ₃	٪۹۹	۶۱/۸۴	مرک
۷.	استیک اسید	C ₂ H ₄ O ₂	٪۱۰۰	۶۰/۰۵	مرک
۸.	سدیم هیدروکسید	NaOH	٪۹۹	۴۰	مرک
۹.	ترامادول	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	٪۹۹	۲۶۳	مرک
۱۰.	نانو ذره ی وانادیم اکسید	V ₂ O ₅	-	۱۸۱/۸۸	مرک
۱۱.	قرص ترامادول ۱۰۰ mg	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	-	۲۶۳	RAMA PHARMA HEALTHCARE

^۱Auto lab

^۲Metrohem

^۳Merck

۳- ساخت الکتروود خمیر کربن اصلاح شده

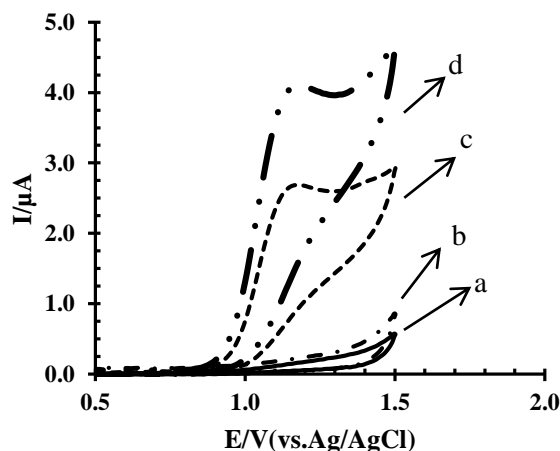
در ساخت الکتروود خمیر کربن اصلاح شده، ابتدا ۰/۵ گرم پودر گرافیت درون هاون چینی ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه ساییده شد. سپس مقدار ۰/۳ میلی لیتر پارافین افزوده، هم زده تا یک مخلوط همگن به دست آید. بعد از ۲۰ دقیقه به این مخلوط مقدار ۰/۰۴۵ گرم نانو ذره ی وانادیم اکسید اضافه گردید و مجدد عمل همگن سازی انجام گرفت. خمیر حاصل داخل سرنگ انسولین قرار گرفت و ارتباط الکتریکی با خمیر با قرار دادن یک سیم مسی در سرنگ برقرار شد.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- بررسی رفتار الکتروشیمیایی ترامادول در سطح الکتروود اصلاح شده

به منظور بررسی فعالیت الکتروکاتالیزوری الکتروود اصلاح شده توسط نانو ذرات وانادیم اکسید، پاسخ ولتامتری چرخه‌ای با ولتاموگرام چرخه‌ای الکتروود اصلاح نشده در محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات با $\text{pH}=8/0$ برای نمونه ترامادول در غیاب و در حضور $8/0 \times 10^{-4}$ مولار از گونه‌ی ترامادول مقایسه شد (شکل ۱).

در شکل ۱ رفتار ترامادول در سطح الکتروود اصلاح شده و اصلاح نشده در محلول ۰/۱ مولار فسفات با $\text{pH}=8/0$ برای نمونه ترامادول در حضور $8/0 \times 10^{-4}$ مولار ترامادول ولتاموگرام چرخه‌ای هر دو الکتروود در غیاب ترامادول نیز نشان داده شده است.

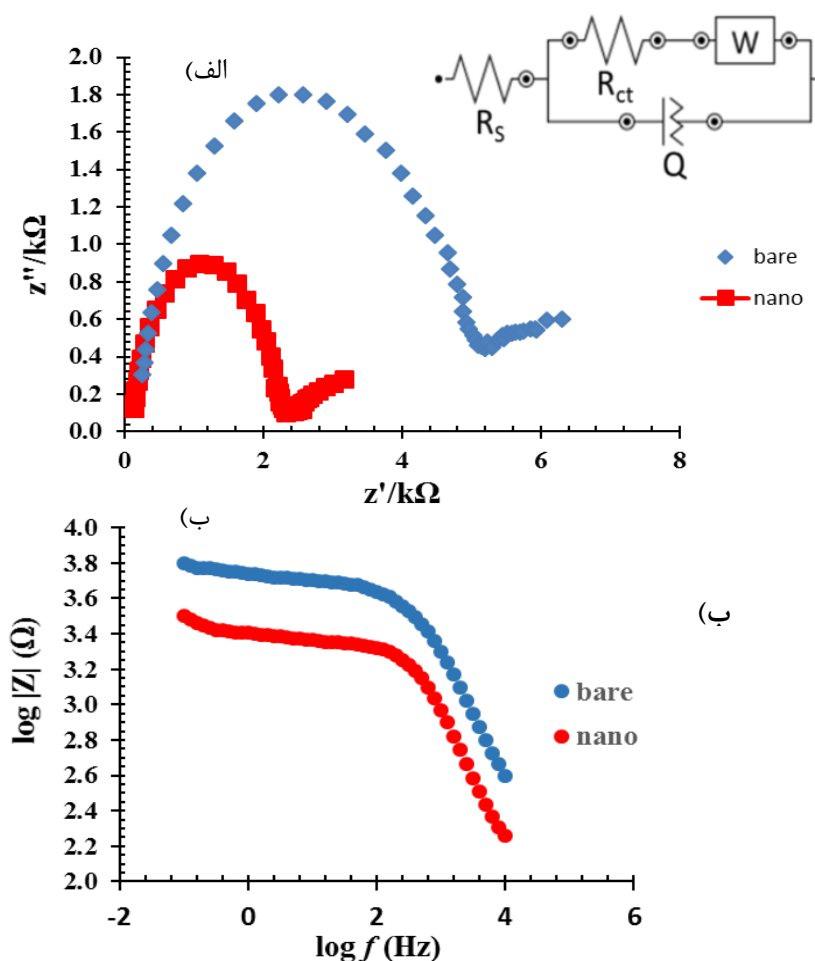


شکل ۱- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای مربوط به سطح الکتروود خمیر کربن اصلاح نشده (a)، اصلاح شده با نانوذرات وانادیم اکسید در غیاب دارو (b)، سطح الکتروود خمیر کربن اصلاح نشده در حضور دارو (c)، و در سطح الکتروود خمیر کربن اصلاح شده توسط نانو ذرات وانادیم اکسید در حضور دارو (d) در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار برای $8/0 \times 10^{-4}$ مولار ترامادول در $\text{pH}=8/0$.

بر اساس نتایج، شدت جریان اکسایش ترامادول در سطح الکتروود اصلاح شده تقریباً ۱/۵ برابر الکتروود اصلاح نشده است و همچنین شروع پیک اکسایش در پتانسیل‌های کمتر اتفاق افتاده است که نشان دهنده خاصیت الکتروکاتالیستی الکتروود جهت اکسایش ترامادول می‌باشد.

۳-۲- امیدانس

امپدانس الکتریکی مقدار مقاومتی است که تحت یک اختلاف پتانسیل در برابر جریان الکتریکی ظاهر می‌شود. مقدار امپدانس یک عدد حقیقی یا مختلط است که بنا بر قانون اهم از نسبت ولتاژ به جریان به دست می‌آید. امپدانس با نماد Z نمایش داده می‌شود. مقدار Z' در محور X نماینده مقاومت الکتروود در برابر انتقال الکترون در سطح الکتروود است. نمودارهای نایکویست و بد حاصل از رسم نمودارهای طیف بینی الکتروشیمیایی امپدانس الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات و اصلاح نشده در شکل ۲ نشان داده شده است. مدار معادل جهت به دست آوردن پارامترهای الکتروشیمیایی از قبیل مقاومت انتقال بار (R_{ct}) و مقاومت محلول (R_s) در شکل ۲ الف نشان داده شده است و پارامترهای حاصل در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج جدول ۲ مقاومت الکتروود اصلاح نشده ۴/۹۵ کیلو اهم و مقاومت الکتروود اصلاح شده با نانوذرات اکسید وانادیم ۲/۲۱ کیلو اهم است. این نتایج بیانگر مقاومت کمتر برای انتقال الکترون در سطح الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید و در نتیجه افزایش شدت جریان گونه در سطح این الکتروود نسبت به الکتروود خمیر کربن اصلاح نشده است.



شکل ۲-الف) نمودار نایکویست و مدار معادل و ب) نمودار بد برای الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات وانادیم اکسید (nano) و الکتروود خمیر کربن ساده (bare) در محلول آهن (II) ۰/۱ مولار.

جدول ۲- پارامترهای الکتروشیمیایی حاصل از نمودار امپدانس برای الکتروود خمیر کربن ساده و الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات وانادیم-اکسید در محلول آهن(II) ۰/۱ مولار.

الکتروود	R_s (k Ω)	R_{ct} (k Ω)	Q (s $^n\Omega^{-1}$)	n
خمیر کربن ساده	۰/۱۲۵	۴/۹۵۰	۰/۳۵ $\times 10^{-6}$	۰/۸۱۵
خمیر کربن اصلاح شده	۰/۰۹۸	۲/۲۰۹	۰/۳۹ $\times 10^{-6}$	۰/۸۹۵

۳-۳- بهینه سازی متغیرهای شیمیایی و دستگاهی

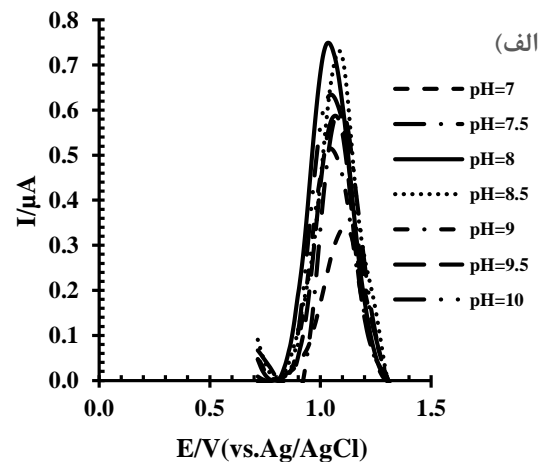
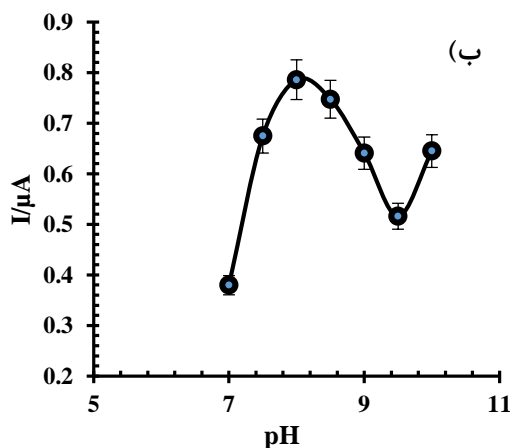
۳-۳-۱- اثر pH

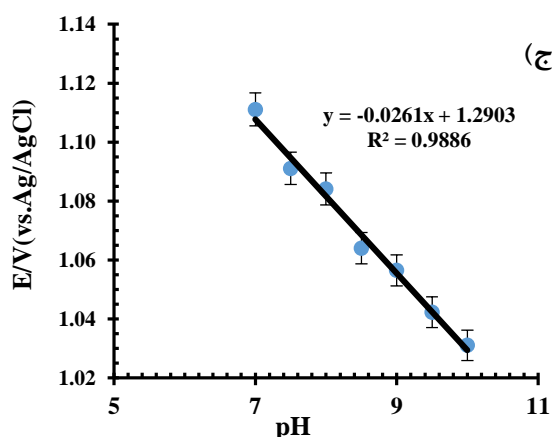
پس از انتخاب محلول بافر فسفات به عنوان بافر مناسب محلول‌هایی در محدوده pH=۲/۰-۱۰/۰ تهیه و با روش ولتامتری پالس تفاضلی توسط الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید، ولتاموگرام‌های مربوط ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داده که ترامادول در pH=۲/۰-۶/۵ جریان قابل قبولی ندارد، در حالی که در pH=۷/۰-۱۰/۰، جریان مناسبی برای ترامادول مشاهده شد. نتایج در شکل (۳-الف، ج) آورده شده است. شکل (۳-الف) و شکل (۳-ب) نشان می‌دهد که ترامادول در pH=۸/۰ ماکزیمم پاسخ تجزیه‌ای را دارد. لذا pH=۸/۰ به عنوان pH بهینه انتخاب گردید (شکل ۳، همان طور که در شکل (۳-ج) ملاحظه می‌گردد پتانسیل اکسایش ترامادول با افزایش مقادیر pH به سمت پتانسیل‌های منفی، میل کرده که نشان دهنده آن است که پروتون در فرآیند اکسایش شرکت داشته است. مقادیر این پتانسیل‌ها با pH، رابطه‌ی خطی داشته و از معادلات خطی زیر تبعیت می‌کند:

$$E_{pa}(V) = 1/2903 - 0/0261 \text{ pH}$$

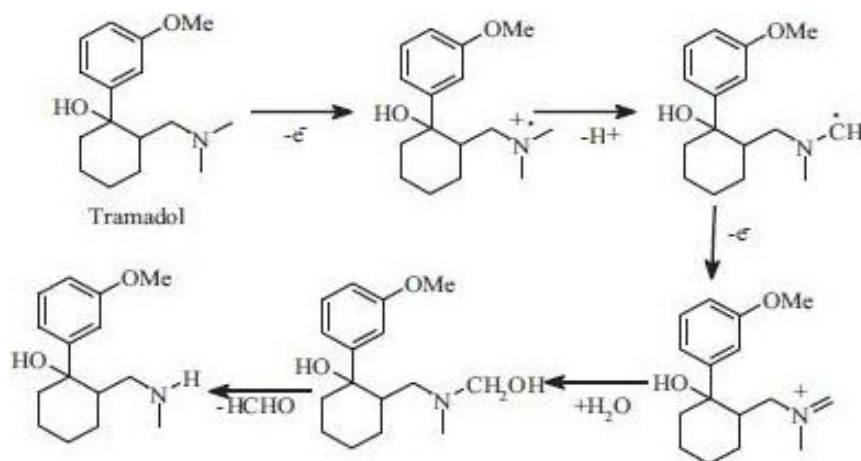
$$R^2 = 0.9886$$

(۱)





شکل ۳- الف) ولتاموگرام پالس تفاضلی مربوط به الکتروکدکس کربن اصلاح شده توسط وانادیم اکسید در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH های ۷/۰، ۷/۵، ۸/۰، ۸/۵، ۹/۰، ۹/۵، ۱۰/۰ حاوی 10^{-4} مولار ترامادول، ب) تاثیر pH بر روی جریان پیک اکسایش ترامادول ج) تاثیر pH بر روی پتانسیل اکسایش ترامادول.



شکل ۴- مکانیسم اکسایش ترامادول [۱]

با توجه به مطالب ذکر شده اکسایش ترامادول و دخالت یونهای H^+ ، باعث تغییر پتانسیل اکسایش می‌گردد. به طوری که با کاهش pH و افزایش غلظت یونهای H^+ ، واکنش اکسایش در پتانسیل‌های مثبت‌تر انجام می‌گیرد. براساس معادله‌ی نرنست، رابطه‌ی بین E_p و pH به صورت زیر می‌باشد:

$$E_p = E^0 + (0.0591/n) \log [(Ox)^a/(R)^b] - (0.0591 m/n) pH \quad (2)$$

a و b نشان دهنده ضرایب واکنش دهنده‌ها و محصولات در معادله‌ی واکنش، n و m نیز به ترتیب بیانگر تعداد الکترون و پروتون مبادله شده در واکنش می‌باشد. در مورد گونه ترامادول تعداد الکترون مبادله شده دو می‌باشد. شیب به دست آمده از معادله (۱) برای گونه ترامادول برابر $26/1 \text{ mV/pH}$ است. با استفاده از روابط ۱ و ۲ نسبت m/n تقریباً برابر $1/2$ است که نشان می‌دهد تعداد پروتون مبادله شده برابر یک است که این نتیجه با آنچه قبلاً گزارش شده است مطابقت دارد [۱]. مکانیسم اکسایش ترامادول در شکل (۴) نشان داده شده است.

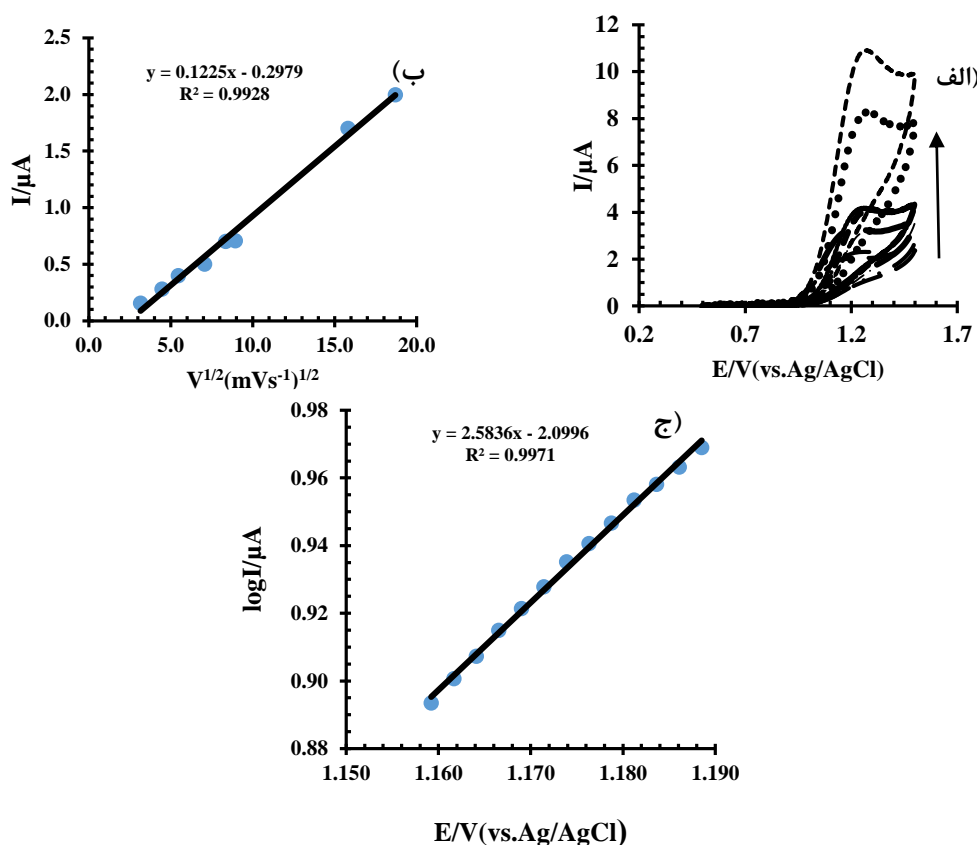
۳-۳-۲- بررسی اثر سرعت روبش پتانسیل بر رفتار الکتروشیمیایی ترامادول با استفاده از الکتروود خمیر کربن

اصلاح شده توسط وانادیم اکسید

با استفاده از نحوه‌ی تاثیر سرعت روبش پتانسیل بر روی ولتاموگرام‌های چرخه‌ای گونه‌ی ترامادول می‌توان نفوذی یا جذبی بودن واکنش این گونه را بر روی الکتروود اصلاح شده بررسی نمود. بدین منظور ولتاموگرام‌های چرخه‌ای در سرعت‌های اسکن متفاوت در محدوده ۱۰ تا ۳۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه رسم شد و نتایج در شکل (۴-الف) گزارش شده است. طبق شکل (۴-ب) یک رابطه‌ی خطی بین شدت جریان و مجذور سرعت روبش پتانسیل وجود دارد که این نشان دهنده‌ی آن است که گونه تحت فرآیند نفوذ است. به منظور به دست آوردن اطلاعات در مورد مرحله‌ی تعیین کننده‌ی سرعت، از معادله تافل با استفاده از داده‌های مربوط به قسمت صعودی منحنی جریان پتانسیل برای گونه‌ی ترامادول و شیب منحنی لگاریتم بر حسب پتانسیل استفاده شد. بر اساس شکل (۴-ج) مقدار شیب نمودار $\text{Log}I_p$ بر حسب E_p ، به دست آمد. با استفاده از شیب تافل و با توجه به اینکه فرآیند انتقال دو الکترونی برای گونه ترامادول در مراحل تعیین کننده‌ی سرعت اتفاق می‌افتد ضریب انتقال الکترون از رابطه ۳ محاسبه گردید.

$$\text{slop} = (1-\alpha) nF / 2.303 RT \quad (3)$$

در این معادله R ثابت عمومی گازها ($K^{-1}R=8.314J \text{ mol}^{-1}$) و n تعداد الکترون‌های شرکت کننده در واکنش، F ثابت فارادی ($F=96500 \text{ Cmol}^{-1}$) و T بر حسب (K) می‌باشند با توجه به رابطه‌ی ۳ مقدار ضریب انتقال الکترون برای ترامادول برابر 0.92 به دست آمد.



شکل ۴- الف) ولتاموگرام‌های چرخه‌ای مربوط به محلول ترامادول 10^{-4} مولار در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=8/0$ در سطح الکتروکد خیمیر کربن اصلاح شده با سرعت‌های روبش ۱۰/۰ تا ۳۵۰/۰ میلی ولت بر ثانیه، ب) تغییرات جریان الکتروکاتالیزوری نسبت به ریشه دوم سرعت روبش پتانسیل (ج) نمودار تافل به دست آمده از منحنی جریان- پتانسیل ثبت شده در سرعت‌های روبش ۱۰/۰ تا ۳۵۰/۰ میلی ولت بر ثانیه.

۳-۳-۳- بررسی تأثیر پله پتانسیل بر رفتار الکتروکد

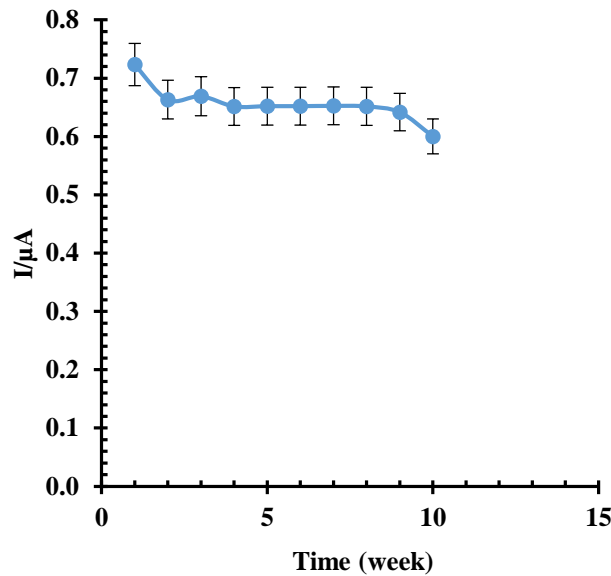
به منظور بررسی اثر پله پتانسیل بر حساسیت روش، محلول‌های 10^{-4} مولار ترامادول در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار در مقدار pH بهینه تهیه گردیدند. سپس پله پتانسیل در محدوده پتانسیل ۵/۰ تا ۱۰/۰ میلی ولت تغییر داده شد و ولتاموگرام‌های حاصل ثبت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، پله پتانسیل بهینه برای گونه ترامادول ۵/۰ میلی ولت انتخاب گردید.

۳-۳-۴- بررسی ارتفاع ضربان

به منظور بررسی اثر ارتفاع ضربان بر جریان اکسایش گونه‌ی ترامادول، با اعمال پله پتانسیل مناسب، ارتفاع ضربان در محدوده ۴۰ تا ۱۰۰ میلی ولت تغییر داده شد و ولتاموگرام‌های حاصل ثبت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، ارتفاع ضربان برای گونه ترامادول ۵۰ میلی ولت انتخاب گردید.

۳-۴- بررسی پایداری و تکرارپذیری الکتروود

جهت بررسی پایداری الکتروود اصلاح شده، ولتاموگرام‌های مربوط به گونه ترامادول با کمک الکتروود خمیر کربن اصلاح شده به مدت ۱۰ هفته، هر هفته یک بار، به طور متوالی رسم گردید. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که الکتروود مورد نظر از پایداری خوبی برخوردار است (شکل ۵).



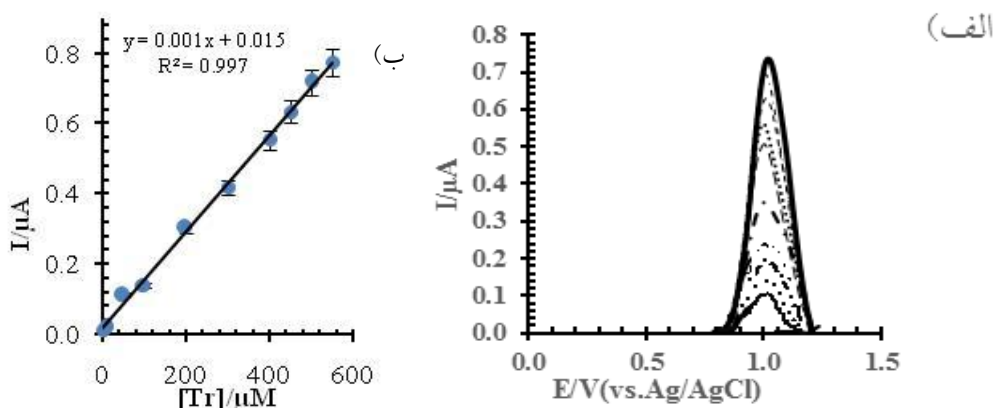
شکل ۵- بررسی پایداری الکتروود خمیر کربن اصلاح شده در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار برای اندازه‌گیری محلول $8/0 \times 10^{-4}$ مولار ترامادول در $pH=8/0$.

برای اندازه‌گیری محلول $8/0 \times 10^{-4}$ مولار ترامادول در $pH=8/0$ برای بررسی تکرارپذیری الکتروود اصلاح شده، ولتاموگرام‌های مربوط به ترامادول با کمک الکتروود خمیر کربن اصلاح شده به تعداد ۱۵ بار به‌طور متوالی رسم گردید و در نهایت با توجه به شدت جریان‌های به دست آمده انحراف استاندارد نسبی^۱ پاسخ الکتروود محاسبه گردید. مقادیر RSD پاسخ الکتروود در محلول $8/0 \times 10^{-4}$ مولار ترامادول ۲/۲۵ درصد به دست آمد.

۳-۵- منحنی کالیبراسیون

شکل (۶) منحنی کالیبراسیون مربوط به گونه ترامادول را نشان می‌دهد. جهت بررسی منحنی کالیبراسیون از روش ولتامتری پالس تفاضلی در سرعت روبش ۳۰/۰ میلی ولت بر ثانیه و پنجره پتانسیل (۱/۵-۰) جهت بررسی در غلظت‌های مختلف استفاده گردید.

^۱Relative Standard Divation



شکل ۶- الف) ولتاموگرام پالس تفاضلی در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با الکتروود خمیر کربن اصلاح شده، در pH=۸/۰ با غلظت‌های ۰/۱، ۱/۰، ۵/۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۳۰/۰، ۴۰/۰، ۴۵/۰، ۵۰/۰، ۵۵/۰ میکرو مولار ترامادول، (ب) تغییرات جریان اندازه گیری شده بر حسب غلظت ترامادول.

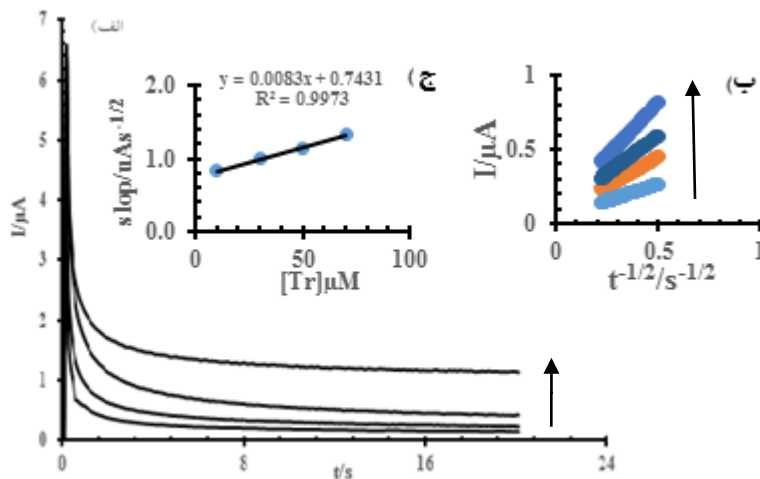
نمودار رسم شده در شکل (۶) نشان می‌دهد که تغییرات جریان ولتاموگرام‌های رسم شده بر حسب غلظت ترامادول در محدوده ۰/۱ تا ۵۵۰/۰ میکرو مولار خطی می‌باشد.

۳-۶- اکسایش الکتروکاتالیزوری ترامادول به روش کروئوآمپرومتری

در شکل (۷) کروئوآمپروگرام‌های ترامادول بررسی گردیده است. کروئوآمپرومتری، مانند دیگر روش‌های الکتروشیمیایی برای بررسی فرآیندهای الکتروشیمیایی الکترودهای اصلاح شده به کار می‌رود. در این قسمت به منظور به دست آوردن ضریب نفوذ D برای ترامادول، اکسایش الکتروکاتالیزوری ترامادول توسط الکتروود اصلاح شده به روش کروئوآمپرومتری مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا کروئوآمپروگرام‌های ترامادول در غلظت‌های متفاوت به دست آمد (شکل ۷ - الف). سپس نمودارهای I_p بر حسب $t^{-1/2}$ مطابق شکل (۷- ب) رسم گردید. پس از آن رسم منحنی شیب نمودار $(I - t^{-1/2})$ بر حسب غلظت‌های مختلف و با استفاده از معادله کاترل (۴) ضریب نفوذ D برای ترامادول محاسبه گردید (شکل ۷- ج).

$$I = nFAD^{1/2}C \pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (4)$$

در رابطه (۴) D ضریب نفوذ (cm^2s^{-1})، C غلظت گونه‌ها در محلول ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$)، A مساحت سطح الکتروود (cm^2) و n تعداد الکترون‌های شرکت کننده در واکنش می‌باشد. تحت شرایط کنترل شده نفوذ، منحنی I_p بر حسب $t^{-1/2}$ خطی خواهد بود. مقدار ضریب نفوذ ترامادول با توجه به رابطه (۴) $3/32 \times 10^{-5}$ به دست آمد.



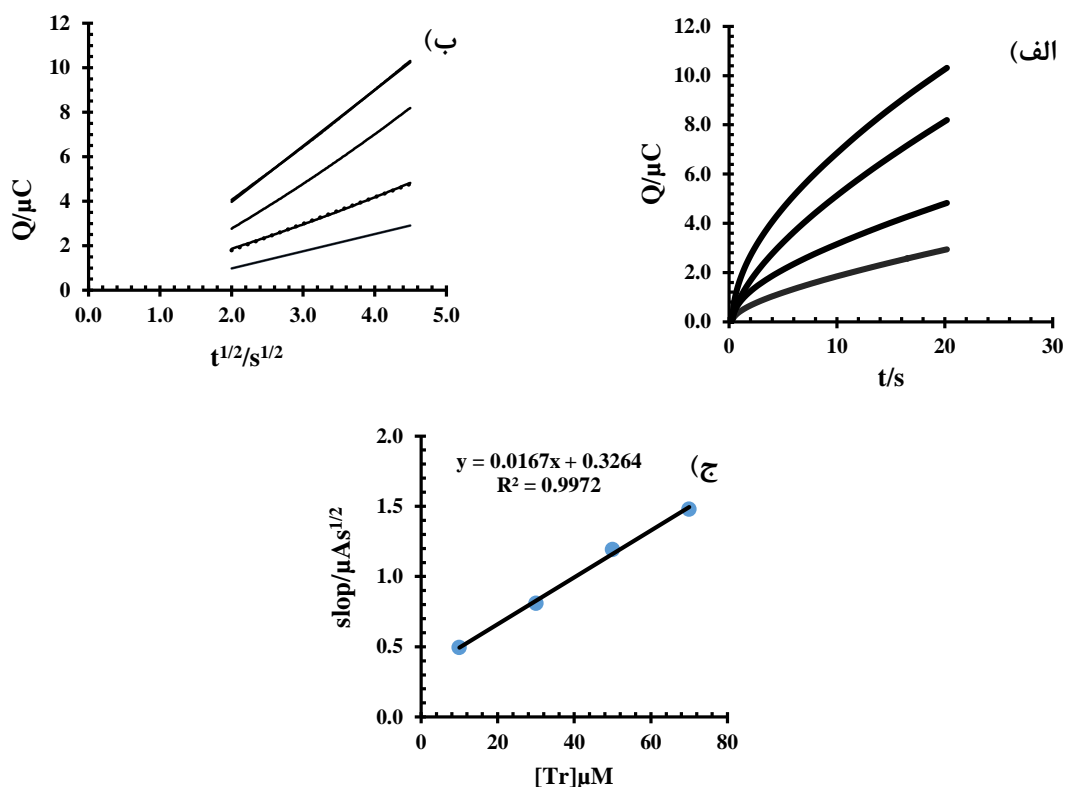
شکل ۷- الف) کروئوآمپروگرام‌های حاصل از محلول‌های با غلظت‌های ۱/۰، ۳۰/۰، ۵۰/۰، ۷۰/۰ میکرومولار ترامادول، در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۸/۰ (ب) نمودار I بر حسب $t^{-1/2}$ برای غلظت‌های مختلف ترامادول در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۸/۰ (ج) نمودار شیب منحنی $I-t^{-1/2}$ بر حسب غلظت ترامادول در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۸/۰.

۷-۳- اکسایش الکتروکاتالیزوری ترامادول به روش کروئوکولومتری

در شکل (۸) کروئوکولوگرام‌های ترامادول مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور تایید داده‌های به دست آمده از روش کروئوآمپرومتری مقدار ضریب نفوذ مربوط به ترامادول با استفاده از روش کروئوکولومتری نیز محاسبه گردید. کروئوکولوگرام محلول ترامادول با غلظت‌های مختلف در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۸/۰ در سطح الکتروود کربن اصلاح شده در شکل (۸-الف) نشان داده شده است. با استفاده از این منحنی‌ها، نمودار Q بر حسب $t^{1/2}$ و نمودار شیب منحنی‌های $Q-t^{1/2}$ بر حسب غلظت‌های مختلف ترامادول رسم گردید (شکل ۸-ب)، (شکل ۸-ج). براساس شیب نمودار و با استفاده از معادله (۵) ضریب نفوذ ترامادول محاسبه گردید.

$$Q = 2nFAD^{1/2}\pi^{-1/2}t^{1/2}C \quad (5)$$

در این معادله D ضریب نفوذ (cm^2s^{-1})، C غلظت گونه‌ها در محلول ($molcm^{-3}$)، A مساحت سطح الکتروود (cm^2) و تعداد الکترون‌های شرکت کننده در واکنش می‌باشد. با توجه به شکل ۸-ج مقدار ضریب نفوذ با روش کروئوکولومتری برابر $4/85 \times 10^{-5}$ به دست آمد که با مقدار ضریب نفوذ با استفاده از روش کروئوآمپرومتری مطابقت دارد.



شکل ۸-الف) کروماتوگرافهای حاصل از محلول‌های با غلظت‌های ۱۰/۰، ۳۰/۰، ۵۰/۰، ۷۰/۰ میکرومولار ترامادول، در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=۸/۰$ نمودار Q بر حسب $t^{1/2}$ برای غلظت‌های مختلف ترامادول در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=۸/۰$ نمودار شیب منحنی-های $Q-t^{1/2}$ بر حسب غلظت ترامادول در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=۸/۰$.

۳-۸- بررسی اثر مزاحمت‌ها

به منظور تعیین گزینش‌پذیری روش و بررسی اثر مزاحمت‌ها، اثر گونه‌های مختلف بر اندازه‌گیری گونه ترامادول مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که هر بار محلول‌هایی با غلظت مشخص از ترامادول به درون سل دستگاه منتقل گردید و جریان پیک اکسایش آن‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایشات ۵ بار تکرار گردید و میانگین و انحراف استاندارد آن به دست آمد. در مرحله بعد جریان مربوط به فرآیند اکسایش دارو در حضور چند گونه انتخابی اندازه‌گیری شد. در صورتی که جریان حاصل حدود ۵٪ تغییر نسبت به جریان پیک دارو داشته باشد، مزاحمتی ایجاد نمی‌کند ولی اگر از مقدار بیان شده بیشتر شد، آن گونه در اندازه‌گیری دارو مزاحم می‌باشد. نتایج حاصل در جدول (۳) نشان داده شده است.

جدول ۳- بررسی اثر گونه‌های مزاحم در اندازه‌گیری $10^{-4} \times 8/0$ مولار ترامادول توسط الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید

گونه مورد بررسی	نسبت مولی غلظت گونه مزاحم به غلظت داروی مورد اندازه گیری
یون‌های پتاسیم-یدید	۲۵۰
گلایسین	۲۰۰
بوریک اسید	۳۰۰
آسکوربیک اسید	۴۰۰
یون‌های سدیم-کلرید	۲۰۰
یون‌های کلسیم-کربنات-منیزیم-نیترات	۳۰۰
گلوکز	۴۰۰
تیروزین	۵۰
اوریک اسید	۲۰۰
L-لوسین	۶۰۰
دوپامین	۷۰۰
گلوکاتیون	۱۰۰
تریپتوفان	۱۲۰

نتایج نشان داده شده در جدول (۳) حاکی از آن است که تمام گونه‌های بررسی شده مزاحمتی برای ترامادول ایجاد نمی‌کنند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که الکتروود اصلاح شده از گزینش‌پذیری بسیار خوبی برخوردار می‌باشد و از آن به خوبی می‌توان جهت اندازه‌گیری ترامادول در نمونه‌های حقیقی استفاده نمود.

۳-۹- کاربرد روش

۳-۹-۱- اندازه‌گیری ترامادول در نمونه‌های دارویی و حقیقی (سرم خون انسان) با استفاده از روش افزایش استاندارد

جهت بررسی کارایی روش، میزان ترامادول موجود در قرص ترامادول ۱۰۰ میلی گرمی با روش افزایش استاندارد اندازه‌گیری شد. برای این منظور غلظت مشخصی از دارو تهیه گردید توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار pH محلول روی ۸ تنظیم شد سپس جریان با استفاده از روش پالس تفاضلی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ترامادول در سرم خون، ابتدا سرم خون رقیق شد، سپس محلولی از نمونه سرم خون به همراه بافر فسفات با pH مشخص، تهیه گردید و به سل دستگاه منتقل شد. منحنی کالیبراسیون رسم گردید و پس از آن میزان بازیابی ترامادول اندازه‌گیری شد. نتایج این بررسی‌ها در جدول (۴) ارائه شده است. نتایج به دست آمده برای اندازه‌گیری ترامادول با استفاده از الکتروود اصلاح شده نسبت به روش HPLC با حدود اطمینان ۹۵ درصد تطابق خوبی دارد. تست F انجام شد و تفاوت معنی داری بین دو روش اندازه‌گیری در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده نشد.

جدول ۴- نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترامادول در نمونه‌های دارویی و حقیقی (سرم خون انسان)

تست t_b	اندازه‌گیری به روش HPLC ^a	درصد بازیابی	غلظت ترامادول اندازه‌گیری شده (میکرومولار) ^a	غلظت ترامادول افزوده شده (میکرومولار)	نمونه
1.2	۴۹/۶±۰/۰۸	-	۴۹/۸±۰/۱	-	
1.5	۶۷/۶±۰/۱۲	۹۸/۴	۶۸/۹±۰/۰۲	۲۰	قرص ترامادول ۱۰۰ میلی گرمی
1.9	۸۷/۱±۰/۱۸	۹۸/۳	۸۸/۵±۰/۰۳	۴۰	
	-	-	-	-	
1.6	۵۹/۱±۰/۱۵	۹۹/۶	۵۹/۸±۰/۰۲	۶۰	سرم خون
2.1	۱۱۹/۳±۰/۰۳	۹۸/۹	۱۱۸/۷±۰/۰۴	۱۲۰	

^a میانگین ۵ اندازه‌گیری ± انحراف استاندارد^b مقادیر t اندازه‌گیری شده ($t_{4,0.05}=2.13$)**۳-۱۱- نتیجه‌گیری**

از الکتروکدکس کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید به همراه روش‌های ولتامتری چرخه‌ای، ولتامتری پالس تفاضلی، امیدانسن برای اندازه‌گیری ترامادول استفاده گردید. جهت رسیدن به حداکثر حساسیت، تاثیر عوامل مختلف شیمیایی و دستگاهی بررسی شد. با استفاده از الکتروکدکس اصلاح شده، ترامادول با حد تشخیص ۰/۰۱۳ میکرو مولار قابل اندازه‌گیری می‌باشد. این روش همچنین از دقت بسیار خوبی برخوردار است. از روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری ترامادول موجود در نمونه‌های دارویی و حقیقی استفاده گردید. نتایج حاصل از آزمون‌های بازیابی نشان می‌دهند که روش پیشنهادی در مورد نمونه‌های دارویی و حقیقی کاربرد دارد. بررسی انجام شده در مورد پایداری الکتروکدکس کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید نشان می‌دهد، الکتروکدکس مورد نظر از پایداری نسبتاً خوبی برخوردار است. علاوه بر موارد فوق، سادگی و سهولت انجام آزمایش‌ها، ارزان و در دسترس بودن لوازم و امکانات و زمان کم لازم برای انجام آزمایش‌ها از مزایای این روش می‌باشد. خصوصیات این الکتروکدکس در مقایسه با تعدادی از الکتروکدهای گزارش شده بهتر می‌باشد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه برخی از خصوصیات الکتروودهای اصلاح شده مختلف برای تعیین ترامادول با الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات وانادیم اکسید

الکتروود	روش	دامنه خطی (μM)	حد تشخیص (μM)	مرجع
الکتروود خمیر کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو ذرات کربنی	ولتامتری پالس تفاضلی	۱۰-۱۰۰۰	۱	[۱۶]
الکتروود خمیر کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو ذرات طلا و Dowex50wx2	ولتامتری موج مربعی جذبی	۰/۰۳-۴۲	۰/۰۱۱	[۳۳]
نانو ذرات طلا افزایش یافته به نانو لوله‌های کربنی	ولتامتری پالس تفاضلی	۱۰-۴۵۰	۰/۰۷	[۳۴]
نانو-MIP	ولتامتری موج مربعی	۰/۰۱-۲۰	۰/۰۰۴	[۳۵]
الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با مولکول پلیمری	ولتامتری پالس تفاضلی	۰/۱-۱۰۰۰	۰/۵	[۲۱]
ترکیب گرافن / NiFe ₂ O ₄	ولتامتری موج مربعی	۰/۰۱-۹	۰/۰۰۳	[۱]
الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات وانادیم اکسید	ولتامتری پالس تفاضلی	۰/۱-۵۵۰	۰/۰۱۳	کار حاضر

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه پیام نور اصفهان و دانشگاه پیام نور دلجان صمیمانه تشکر می‌نمایند.

مراجع

- [1] A. Afkhami, H. Khoshshafar, H. Bagheri, T. Madrakian, Preparation of NiFe₂O₄ /graphene nanocomposite and its application as a modifier or the fabrication of an electrochemical sensor for the simultaneous determination of tramadol and acetaminophen, *Anal. Chim. Acta*, **11** (2014) 50-59.
- [2] ASheibani, NHaghpaizir, Application of ion mobility spectrometry for the determination of tramadol in biological samples, *J. Food Drug Anal*, **22** (2014) 500-504.
- [3] S. H. Gan, R. Ismail, Validation of a high-performance liquid chromatography method for tramadol and o-desmethyltramadol in human plasma using solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B. Sci.*, **759** (2001) 325-335.

- [4] M. Nobilis, J. Kopecky, J. Kyetina, High-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its o-desmethylated metabolite in blood plasma application to a bioequivalence study in humans, *J. Chromatogr. A*, **949** (2002) 11-22.
- [5] B. N. Patel, N. Sharma, M. Sanyal, P. S. Shrivastav, An accurate rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite o-desmethyl tramadol in human plasma by LC-MS/MS, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **49** (2009) 354-366.
- [6] A. Curticepean, D. Muntean, M. Curticepean, M. Dogaru, C. Vari, Optimized HPLC for tramadol and o-desmethyl tramadol determination in human plasma, *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **70** (2008) 1304-1312.
- [7] C. Moore, S. Rana, C. Coulter, Determination of meperidine tramadol and oxycodone in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **850** (2007) 370-375.
- [8] A. A. Y. El-Sayed, K. M. Mohamed, A. Y. Nasser, J. Button, D. W. Holt, Simultaneous determination of tramadol, o-desmethyltramadol and N-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **926** (2013) 9-15.
- [9] R. Becker, W. Lintz, R. Becker, W. Lintz, Determination of tramadol in human serum by capillary gas chromatography with nitrogen-selective detection, *J. Chromatogr. B. Sci.*, **377** (1986) 213-220.
- [10] S. T. Ho, J. J. Wang, W. J. Liaw, C. M. Ho, J. H. Li, Determination of tramadol by capillary gas chromatography with flame ionization detection: Application to human and rabbit pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. B. Sci.*, **736** (1999) 89-96.
- [11] W. D. Cao, J. F. Liu, H. B. Qiu, Simultaneous determination of tramadol and lidocaine in urine by end column capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection, *Electroanal.*, **14** (2002) 1571-1576.
- [12] H. E. Abdellatef, J. Pharm. Kinetic Spectrophotometric determination of tramadol hydrochloride in pharmaceutical formulation, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **29** (2002) 835-842.
- [13] H. M. AbuShawish, S. M. Saadeh, A. R. Al-Dalou, N. A. Ghalwa, A. A. A. Assi, Optimization of tramadol PVC membrane electrodes using miscellaneous plasticizers and ion-pair complexes, *Mater. Sci. Eng.*, **31** (2011) 300-306.
- [14] E. Ghasemi, Optimization of solvent bar microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry for preconcentration and determination of tramadol in biological samples, *J. Chromatogr. A*, **17** (2012) 48-53.
- [15] E. M. P. J. Garrido, J. M. P. J. Garrido, F. Borges, C. Delerue-Matos, Development of electrochemical methods for determination of tramadol analytical application to pharmaceutical dosage forms, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **32** (2002) 975-981.

- [16] F. Ghorbani-Bidkorbeh, S. Sharokhian, A. Mohammadi, R. Dinavand, Simultaneous voltammetric determination of tramadol and acetaminophen using carbon nanoparticles modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta*, **55** (2010) 2752-2759.
- [17] B. Uslu, S. A. Ozkan, Electro analytical methods for the determination of pharmaceuticals a review of recent trends and developments, *Anal. Lett.*, **44** (2011) 2644-2702.
- [18] N. Sanvicens, I. Mannelli, J. Salvador, E. Valera, M. Marco, Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology, *TrAC Trend Anal. Chem.*, **30** (2011) 541-553.
- [19] H. Bagheri, A. Afkhami, Y. Panahi, H. Khoshsafar, A. Shirzadmehr, Facile stripping voltammetric determination of haloperidol using a high performance magnetite/carbon nanotube paste electrode in pharmaceutical and biological samples, *Mater. Sci. Eng. C*, **37** (2014) 264-270.
- [20] A. A. Hathoot, M. E. Fahmy, M. A. Azem, Electrooxidation and determination of tramadol in the presence of dopamine at poly 1,8-diaminonaphthalen derivative modified platinum electrode, *J. Int. Chem. Mater. Sci.*, **1** (2013) 2327-5553.
- [21] M. Soleimani, M. G. Afshar, A. Shafaat, G. A. Crespo, High-selective tramadol sensor based on modified molecularly imprinted polymer carbon paste electrode with multiwalled carbon nanotubes, *Electroanal.*, **25** (2013) 1159-1168.
- [22] L. Jourdain, M. Bonnat, J. L. Souquet, Electrochemical measurement of the diffusion coefficient of silver in thin films of $V_2O_5-P_2O_5$ of glass, *Solid State Ionics*, **18 & 19** (1986) 461-466.
- [23] R. Baddour, J. P. Pereira-Ramos, R. Messina, J. Perichon, A thermodynamic structural and kinetic study of the electrochemical lithium intercalation into the xerogel $V_2O_5 \cdot 1.6 H_2O$ in a propylene carbonate solution, *J. Electroanal. Chem.*, **314** (1991) 81-101.
- [24] Z. Lu, M. D. Levi, G. Salitra, Y. Gofer, E. Levi, D. Aurbach, Basic electroanalytical characterization of lithium insertion in thin, well-crystallized V_2O_5 films, *J. Electroanal. Chem.*, **491** (2000) 211-221.
- [25] C. Navone, R. Baddour-Hadjean, J. P. Pereira-Ramos, R. Salot, A kinetic study of electrochemical lithium insertion in oriented V_2O_5 thin films prepared by RF sputtering, *Electrochim. Acta*, **53** (2008) 3329-3336.
- [26] R. Baddour-Hadjean, C. Navone, J. P. Pereira-Ramos, In situ Raman micro spectrometry investigation of electrochemical lithium intercalation into sputtered crystalline V_2O_5 thin films, *Electrochim. Acta*, **54** (2009) 6674-6679.
- [27] S. Zhan, Y. Wei, X. Bie, C. Wang, F. Du, G. Chen, F. Hu, Structural and electrochemical properties of Al^{3+} doped V_2O_5 nanoparticles prepared by an oxalic acid assisted soft chemical method, *J. Alloy. Compd.*, **502** (2010) 92-96.

[28] Z. Zhu, X. Sun, Y. Wang, Y. Zeng, W. Sun, X. Huang, Materials chemistry and Physics electrochemical horseradish peroxide as biosensor based on dextran-ionic liquid-V₂O₅ nanobelt composite material modified carbon ionic liquid electrode, *Mater.Chem. Phys.*, **124**(2010)488-492.

[29] R. Suresh, K.Giribabu, R. Manigandan, S. P. Kumar, S. Munusamy, S. Muthamizh, A. Stephen, V.Narayanan, New electrochemical sensor based on Ni-doped V₂O₅ nanoplates modified glassy carbon electrode for selective determination of dopamine at nanomolar level, *Sensor Actuat. B-Chem.*, **202**(2014)440-447.

[۳۰] مشهدی آقای م، محمد علی تهرانی ر (۲۰۱۵) اندازه گیری آمپرومتری گلوکز به کمک نانو حسگر بدون آنزیمی بر پایه الکتروود خمیرگرافیتی اصلاح شده با کامپوزیت نانوسلولوز/نانوذرات اکسید مس/گرافن اکساید. شیمی کاربردی ۱۰ (۳۵):۳۵-۴۶.

[۳۱] ناصری مقدم ه، فورچیان ها (۲۰۱۶) کارایی نانوکامپوزیت گرافن-سیستئین جهت تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز در سطح الکتروود کربنی. شیمی کاربردی ۱۱ (۴۰):۷۵-۸۴.

[۳۲] بقایری م، ملکی ب، فرهادی س (۲۰۱۶) ساخت یک زیست حسگر الکتروشیمیایی حساس به هیدروژن پراکساید با استفاده از هموگلوبین تثبیت شده بر روی نانوکامپوزیت حاصل از آلیاژهای آهن-نیکل و نانولوله های کربنی چنددیواره. شیمی کاربردی ۱۱ (۳۸):۱۰۱-۱۲۲.

[33] B. J. Sanghavi, A. K. Srivastava, Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and tramadol using Dowex50wx2 and gold nanoparticles modified glassy carbon paste electrode, *Anal. Chim. Acta*, **706** (2011) 246-254.

[34] N. F. Ataa, R. A. Ahmed, H. M. A. Amin, A. Galal, Monodispersed gold nanoparticles decorated carbon nanotubes as an enhanced sensing platform for nanomolar detection of tramadol, *Electroanal.*, **24** (2012) 2135- 2146.

[35] A. Afkami, H. Ghaedi, T. Madrakian, M. Ahmadi, H. Mahmood-Kashani, Fabrication of a new electrochemical sensor based on a new nano-molecularly imprinted polymer for highly selective and sensitive determination of tramadol in human urine samples, *Biosens. Bioelectron.*, **44** (2013) 34-40.

