اندازه‌گیری داروهای آلزایمر در نمونه‌های ادرار، پلاسما و پساب با استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبرهای توخالی سه فازی تلفیق شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

الهام آزارش، مریم رجبی*

سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده شیمی

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۶ تاریخ تصحیح:۹۸/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۴

چکیده

در مطالعه حاضر کاربرد روش میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبرهای توخالی سه فازی تلفیق شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای اندازه‌گیری هم‌زمان داروهای ضد آلزایمر ریواستیگمین و دونپزیل در نمونه‌های پلاسما، ادرار و پساب مورد بررسی قرار گرفته است. روش استخراجی بر پایه استفاده از غشای مایع استوار بوده و علاوه بر کاهش حجم حلال آلی مصرفی پیش تغلیظ و تمیز سازی فوق‌العاده‌ای ارائه می‌دارد. در این روش با تنظیم شرایط نمونه و فاز استخراجی آنالیت‌های تحت بررسی ابتدا به درون غشا استخراج و طی یک استخراج برگشتی و به صورت گزینشی به فاز پذیرنده نهایی باز-استخراج می‌گردند. به منظور آنالیز نهایی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده و پارامترهای مؤثر بر کارایی استخراج با روش یک متغیر در زمان بهینه شده‌اند. تحت شرایط بهینه محدوده خطی $۲ng\ mL^{-1}$-۱۰۰۰، حد تشخیص $۰/۰-۵/۷ng\ mL^{-1}$، انحراف استاندارد نسبی ۳/۵-۳/۱ و فاکتور غنی‌سازی ۲۲۲-۱۵۰ به‌دست‌آمده است. هم‌چنین نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه‌های حقیقی موید آن است که روش ارائه شده می‌تواند به‌عنوان یک روش ساده و مناسب برای تعیین داروهای آلزایمر در نمونه‌های بیولوژیکی و پساب مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی، ریواستیگمین، دونپزیل، پیش تغلیظ.

۱- مقدمه

آلزایمر یا زوال عقل یک نوع اختلال در عملکرد مغز بوده که به‌تدریج ایجادشده و پیشرفت می‌کند. این بیماری با از بین بردن سیناپس‌های نورون‌ها در بعضی نواحی مغز، موجب ازکار افتادن سلول‌ها در برخی نواحی سیستم عصبی می‌شود [۱]. ریواستیگمین و دونپزیل دو داروی اصلی بیماری آلزایمر می‌باشند. ازجمله عوارض جانبی ریواستیگمین و دونپزیل می‌توان به استفراغ، تهوع، خستگی، بی‌خوابی، بی‌اشتهایی، گیجی، زخم گوارشی، افسردگی، اختلالات کبدی، عفونت ادراری و عفونت مجاری تنفسی اشاره کرد. تشخیص و اندازه‌گیری داروهای ریواستیگمین و دونپزیل در مایعات بیولوژیکی بدن به‌منظور ارزیابی و درمان مناسب ضروری است. همچنین امروزه به دلیل قرارگیری داروها به‌عنوان طبقه جدیدی از آلودگی در آب‌ها، اندازه‌گیری

* **نویسنده مسئول :** دانشیار دانشکده شیمی، دانشگاه سمنان mrajabi@semnan.ac.ir

این ترکیبات به‌خصوص در فاضلاب کارخانه‌های دارویی به‌منظور جلوگیری از ورود به محیط‌زیست حائز اهمیت است [۲-۵]. اندازه‌گیری داروها در نمونه‌های پیچیده به دلایلی چون اثر ماتریس و ناسازگار بودن اکثر نمونه‌ها با دستگاه‌های اندازه‌گیری بسیار دشوار بوده و از طرفی سطح غلظتی داروها در مایعات بیولوژیکی بسیار کم و در بسیاری موارد کمتر از حدود تشخیص دستگاه‌ها می‌باشد. از این‌رو استفاده از روش‌های آماده‌سازی نمونه که قدرت تغلیظ و تمیز سازی بالایی داشته باشد ضرورت پیدا می‌کند [۶]. استخراج مایع مایع یک تکنیک کلاسیک آماده‌سازی نمونه برای استخراج و اندازه‌گیری داروها در ماتریس‌های پیچیده بوده که همواره مورد توجه قرار گرفته است [۷]. وجود مشکلاتی مانند مصرف زیاد حلال‌های سمی سبب شده تا نسخه کوچک شده‌ای از این روش تحت عنوان میکرواستخراج فاز مایع معرفی گردد [۸]. میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبرهای توخالی نوع نسبتاً جدیدی از میکرواستخراج فاز مایع است که توسط پدرسن و راسموسن معرفی گردیده [۹]. این روش بر مبنای غشا مایع حمایت شده عمل نموده و پیش تغلیظ و تمیز سازی فوق‌العاده‌ای مخصوصاً در حالت سه فازی ایجاد می‌نماید [۱۰]. در روش مذکور ابتدا حلال استخراجی درون جداره متخلخل فیبری از جنس پلی‌پروپیلن قرار می‌گیرد. تخلخل بالای جداره فیبر باعث قرارگیری یک فیلم نازک از حلال در دیواره شده که علاوه بر استفاده از مقدار کمی از حلال آلی سطح تماس بالایی را فراهم می‌سازد. با قرارگیری فیبر در درون محلول نمونه (فاز دهنده) و پس از گذشت مدت زمان بهینه شده گونه‌های مورد نظر از این محلول به درون غشا و نهایتا فاز پذیرنده قرارگرفته در فضای داخلی فیبر باز-استخراج می‌گردند [۱۱, ۱۲]. این روش علاوه بر استفاده از حجم کمی از حلال آلی دارای تمیز سازی و پیش تغلیظ فوق‌العاده‌ای بوده و امکان استخراج داروها از ماتریس‌های پیچیده را فراهم می‌سازد. با توجه به مزایای این روش و قابلیت بالای آن در استخراج و اندازه‌گیری داروها در بافت‌های پیچیده در پروژه حاضر از این روش به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری هم‌زمان داروهای ریواستیگمین و دونپزیل در نمونه‌های ادرار، پلاسما و پساب استفاده شده است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- دستگاهوری و مواد مورداستفاده

داروهای مورد بررسی ریواستیگمین و دونپزیل از شرکت سیگما-آلدریچ (آمریکا) خریداری شده و حلال‌های استونیتریل، استون و متانول از شرکت امرتات شیمی (ایران) با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع تهیه گردیده است. حلال‌های استخراجی شامل دودکان و ان-تترادکان و هم‌چنین نمک سدیم کلرید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید و فسفریک اسید از شرکت مرک (آلمان) خریداری شده است. حلال ۱-اکتانول از شرکت فلوکا (بوخز سوئیس) تهیه گردیده و ترکیبات دیگر استفاده شده نیز دارای خلوص تجزیه‌ای بوده‌اند. فیبر توخالی (Q3/2 Accurel) ساخت شرکت ممبرانا (ووپرتال، آلمان)، از جنس پلی‌پروپیلن، دارای ضخامت ۲۰۰ میکرومتر، قطر داخلی ۶۰۰ میکرومتر و قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر بوده است. به منظور شناسایی و جداسازی

گونه‌های هدف از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا شرکت کناور مجهز به پمپ (K-1001)، گاز زدای (D-14163)، آشکارساز فرابنفش مدل (K-2600)، میکسر حلال (K-1500) و لوپ تزریق ۲۰ میکرولیتری استفاده شده است. ستون تجزیه‌ای ۲۵ سانتی‌متری C_{18} (قطر داخلی: ۴/۶ میلی‌متر- ابعاد ذرات پرکننده: ۵ میکرومتر) از شرکت MZ تهیه شده و از دستگاه UV 5 R Q-Direct (18.2M.cm-298°K) جهت تأمین آب با خلوص کروماتوگرافی مایع استفاده شده است.

۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌های حقیقی

نمونه پلاسمای انسانی از سازمان انتقال خون شهرستان سمنان تهیه و در دمای مناسب (۲۱°C-) در حالت انجماد نگهداری شده است. قبل از استفاده نمونه با قرارگیری در محیط به دمای اتاق رسیده و پس از ده بار رقیق‌سازی توسط روش ارائه‌شده موردبررسی قرارگرفته است. پس از جمع‌آوری نمونه از داوطلب، نمونه‌های ادرار در دمای مناسب (۴°C) نگهداری شده، قبل از استفاده نمونه با قرارگیری در محیط به دمای اتاق رسیده و پس از سه بار رقیق‌سازی بدون هیچ‌گونه عمل تصفیه و فیلتراسیون مطابق روش ارائه‌شده مورد بررسی قرارگرفته است. نمونه پساب از کارخانه‌های داروسازی در شهرک صنعتی سمنان تهیه و در ظروف مناسب نگهداری شده است. نمونه پساب بدون هیچ فرایند رقیق‌سازی و یا فیلتراسیون توسط روش ارائه‌شده مورد بررسی واقع شده است.

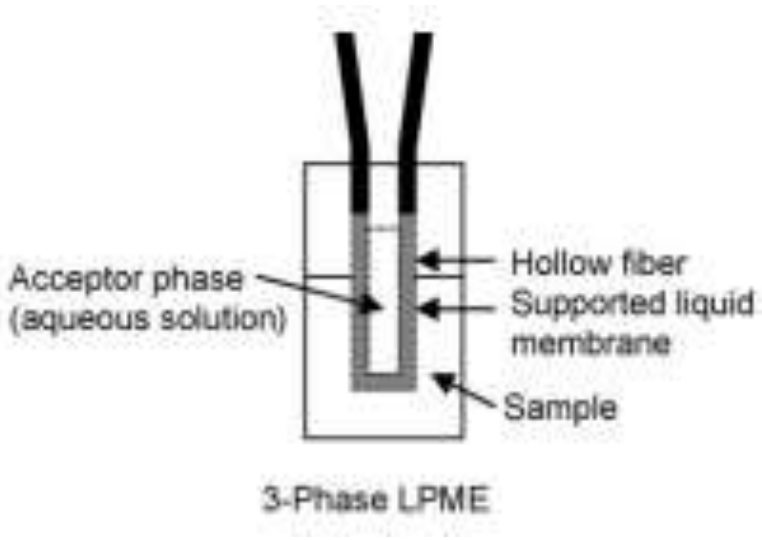
۲-۳- روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی

به منظور حذف آلاینده‌ها دوازده سانتی‌متر از فیبر توخالی به مدت چند دقیقه درون استون قرارگرفته و سپس در دمای محیط تمام استون تبخیر گردیده است. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول نمونه با pH=۱۱ به درون ظرف مناسب واردشده و ظرف روی همزن مغناطیسی قرارگرفته است. مقدار ۸۰ میکرولیتر از حلال تترادکان توسط میکروسرنگ ۱۰۰ میکرو لیتری به درون فیبر توخالی به صورتی که منافذ دیواره فیبر کاملاً به حلال آغشته گردد وارد گردید. به منظور خروج حلال اضافی از فضای داخلی فیبر توسط سرنگ پر کننده منافذ چندین بار هوا به‌آرامی به داخل فیبر دمیده شده و پس از آن مقدار ۴۰ میکرولیتر از محلول پذیرنده با pH=۱ از یک سمت فیبر به درون محفظه لومن وارد و سمت دیگر فیبر توسط یک میکرو سرنگ خالی و بدون پیستون مهار می‌شود. فیبر به شکل U درون محلول نمونه قرار گرفته، همزن مغناطیسی با سرعت ۱۲۰۰ دور بر دقیقه شروع به چرخش کرده و فرآیند استخراج به مدت ۵۰ دقیقه به طول می‌انجامد. سپس فاز پذیرنده توسط سرنگ جمع‌آوری و مستقیماً به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق می‌گردد. شمایی از این روش در شکل ۱ قابل مشاهده است.

۳-بهینه‌سازی روش آنالیز

۳-۱- بهینه‌سازی شرایط دستگاه

جهت آنالیز نهایی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شده است و با توجه به استفاده از آشکارساز فرابنفش ابتدا طول‌موج بیشینه آنالیت‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV تعیین گردیده که برای این منظور طیف جذبی دو دارو در ناحیه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر بررسی و طبق نتایج به دست آمده طول‌موج ۲۱۰ نانومتر به‌عنوان طول‌موج بیشینه برای دو ترکیب انتخاب گردید. به منظور جداسازی دو داروی ریواستیگمین و دونپزیل، شویش تک توانی بهینه شامل ۷۰٪ بافر فسفاتی (۰/۰۵ مول بر لیتر، pH=۴) و ۳۰٪ استونیتریل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان فاز متحرک مناسب انتخاب گردید.



شکل ۱: سیستم میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی [۱۳].

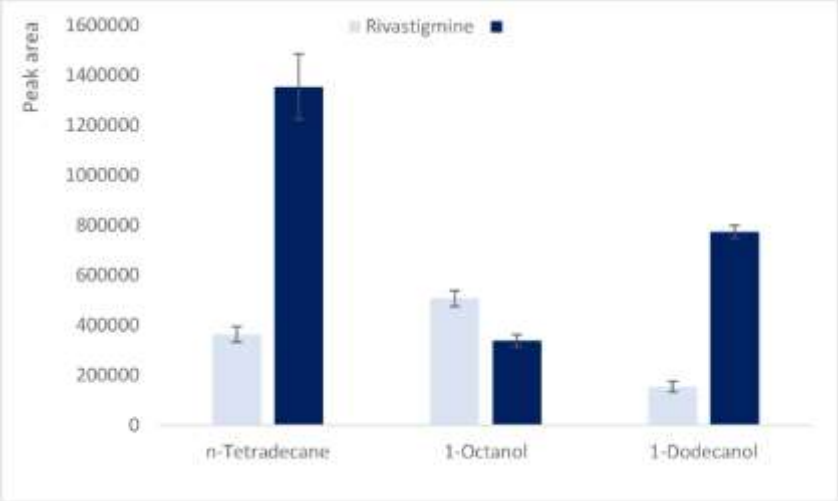
۳-۲- بهینه‌سازی شرایط و پارامترهای مؤثر بر کارایی استخراج

جهت دستیابی به حداکثر کارایی در استخراج داروهای تحت بررسی از نمونه‌های آبی پارامترهای مؤثر ازجمله: نوع حلال غشا، pH فاز دهنده، pH فاز پذیرنده، زمان استخراج، اثر نمک و سرعت هم زدن به روش یک متغیر در زمان مورد بررسی و بهینه‌سازی قرارگرفته است.

۳-۲-۱- اثر نوع حلال آلی بر کارایی استخراج

نوح حلال آلی مورداستفاده از تأثیرگذارترین پارامترها در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی می‌باشد. این حلال می بایست از قابلیت‌هایی چون غیرقابل امتزاج بودن با آب و یا داشتن حداقل میزان انحلال‌پذیری در آن را دارا باشد، قابلیت انحلال آنالیت‌های هدف را داشته تا استخراج مناسبی صورت پذیرد، در طول‌موج بیشینه گونه‌های موردنظر فاقد جذب بوده و با پیک آن‌ها هم‌پوشانی نداشته باشد، از نقطه‌جوش مناسبی به منظور جلوگیری از تبخیر در حین استخراج برخوردار بوده و برهم‌کنش

مناسبی با غشا ایجاد نماید. به این منظور حلال‌های ان-تترادکان، دودکان و ۱-اکتانول بررسی و نتایج در شکل۲ قابل مشاهده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده حلال تترادکان بیشترین سطح زیر پیک و بالاترین بازده استخراج را ارائه داشته و به‌عنوان حلال مناسب غشا مورداستفاده قرارگرفته است.



شکل ۲. تأثیر حلال غشا بر کارایی استخراج در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی. شرایط استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی با pH=۱۱ و غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت‌های هدف، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی با pH=۱، سرعت هم‌زدن ۱۲۰۰دور بر دقیقه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه.

۲-۲-۳- اثر pH فازهای دهنده و گیرنده بر کارایی استخراج

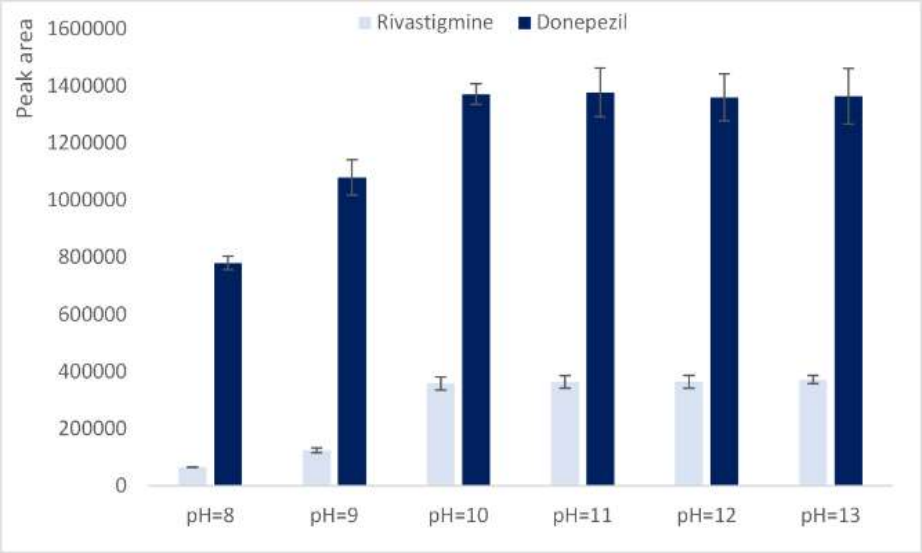
همان‌طور که مورد اشاره واقع گردید میکرواستخراج مایع بر پایه غشا شامل دو مرحله بوده که در مرحله نخست به منظور استخراج گونه‌های موردنظر به حلال آلی قرارگرفته در غشا می‌بایست آنالیت‌ها در فرم مولکولی و خنثی خود قرار گیرند. درحالی‌که در مرحله دوم و استخراج برگشتی آنالیت‌های هدف از حلال غشا به درون فاز پذیرنده آبی تبدیل گونه‌ها به فرم یونی می‌تواند بسیار مؤثر باشد. برای این منظور، با توجه به pK_a داروهای مورد بررسی، مناسب است که فاز دهنده در محدوده pH بازی و فاز پذیرنده در محدوده pH اسیدی قرار گیرند.

به منظور بررسی اثر pH فاز دهنده بر کارایی استخراج pH محلول نمونه در محدوده ۱۳-۸ تغییر داده‌شده و نتایج به‌دست‌آمده در شکل۳ قابل‌مشاهده می‌باشد. همچنین اثرگذاری pH فاز دهنده بر کارایی استخراج نیز با تغییر غلظت اسید در فاز پذیرنده، در محدوده ۱-۱۰×۲-۵-۱۰×۱ مول بر لیتر مورد بررسی قرارگرفته و نتایج در شکل۴ قابل‌مشاهده می‌باشد.

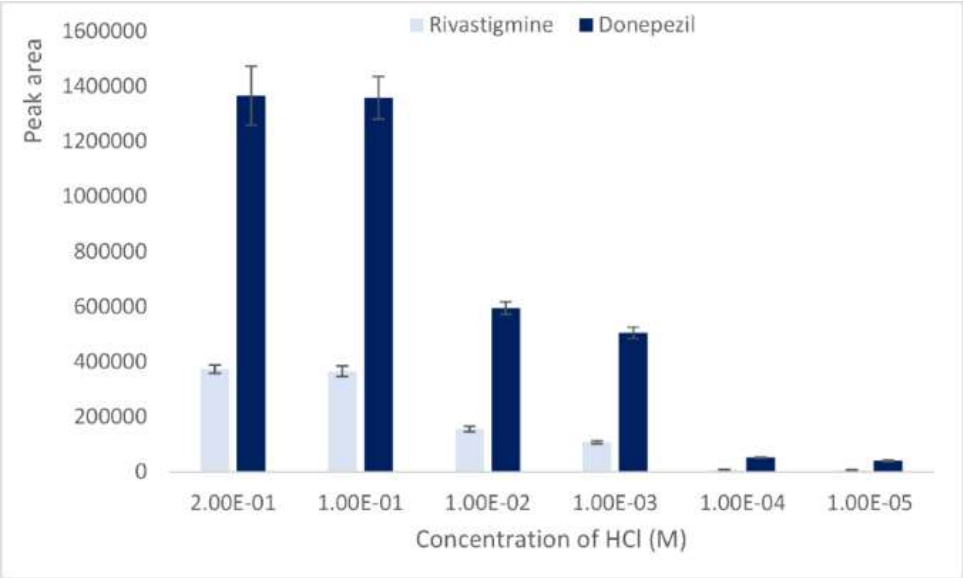
۳-۲-۳- اثر زمان بر کارایی استخراج

در روش تحت بررسی زمان تأثیر مستقیمی بر بازده استخراج داشته و هر دو مرحله استخراج تا لحظه تعادل وابسته به زمان می‌باشند. به منظور دست‌یابی به شرایط بهینه زمان‌های ۱۰ تا ۶۰ دقیقه موردبررسی قرارگرفته و با توجه به نتایج به‌دست‌آمده (شکل۵) تا زمان ۵۰ دقیقه بازدهی استخراج با افزایش زمان استخراج افزایش چشمگیری داشته است درحالی‌که در زمان‌های

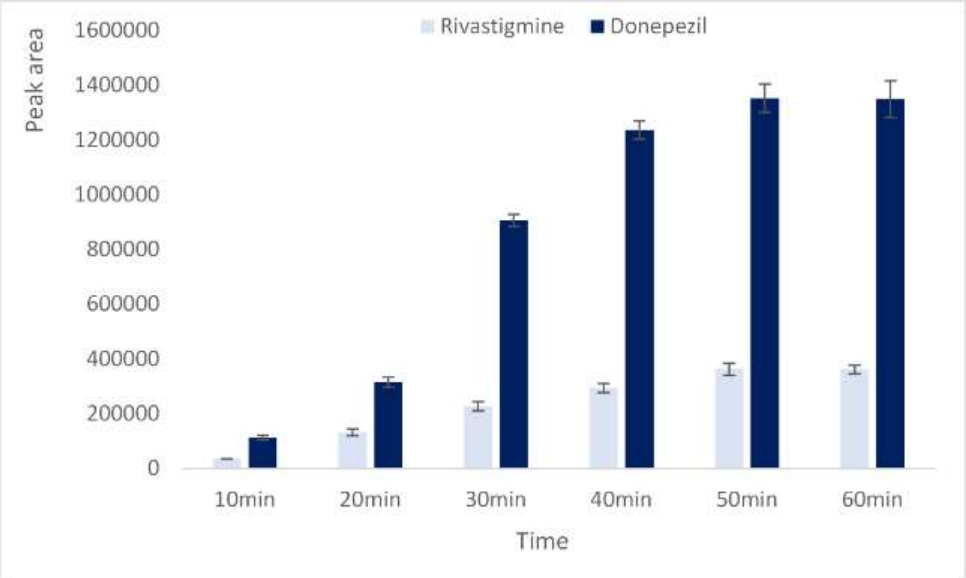
بیشتر تغییر چندانی در کارایی استخراج مشاهده نمی‌شود. ازاین‌رو زمان ۵۰ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه در استخراج داروهای ریواستیگمین و دونپزیل انتخاب شده است.



شکل ۳. تأثیر pH فاز دهنده بر کارایی استخراج در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی. شرایط استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت‌های هدف، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی با pH=۱، سرعت هم‌زدن ۱۲۰۰دور بر دقیقه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، حلال استخراجی ان-تترادکان.



شکل ۴. اثر غلظت HClبر کارایی استخراج در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی. شرایط استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی با pH=۱۱ و غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت‌های هدف، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی، سرعت هم‌زدن ۱۲۰۰دور بر دقیقه، زمان استخراج ۶۰ دقیقه، حلال استخراجی ان-تترادکان.



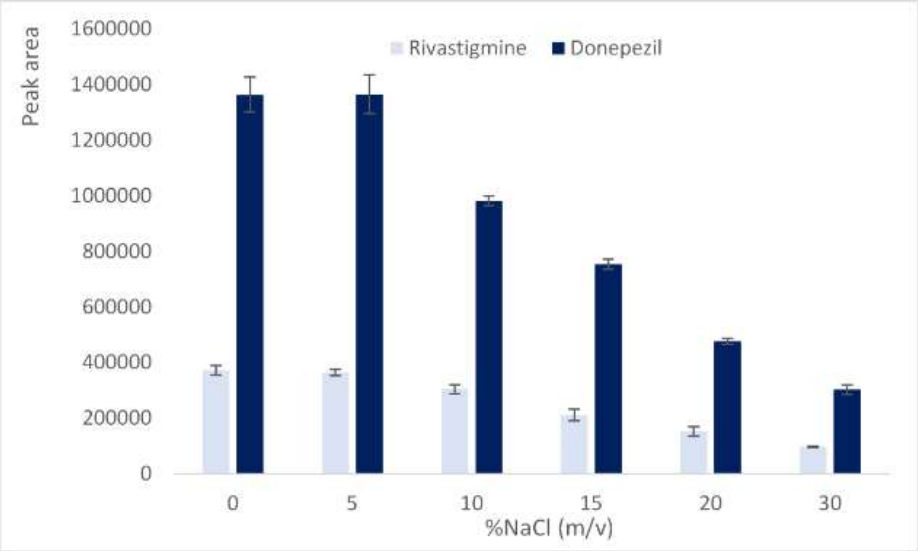
شکل ۵. تأثیر زمان‌بر کارایی استخراج در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی. شرایط استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی با pH=۱۱ و غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت‌های هدف، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی با pH=۱، سرعت هم‌زدن ۱۲۰۰دور بر دقیقه ، حلال استخراجی ان-تترادکان.

۴-۲-۳- اثر نمک بر کارایی استخراج

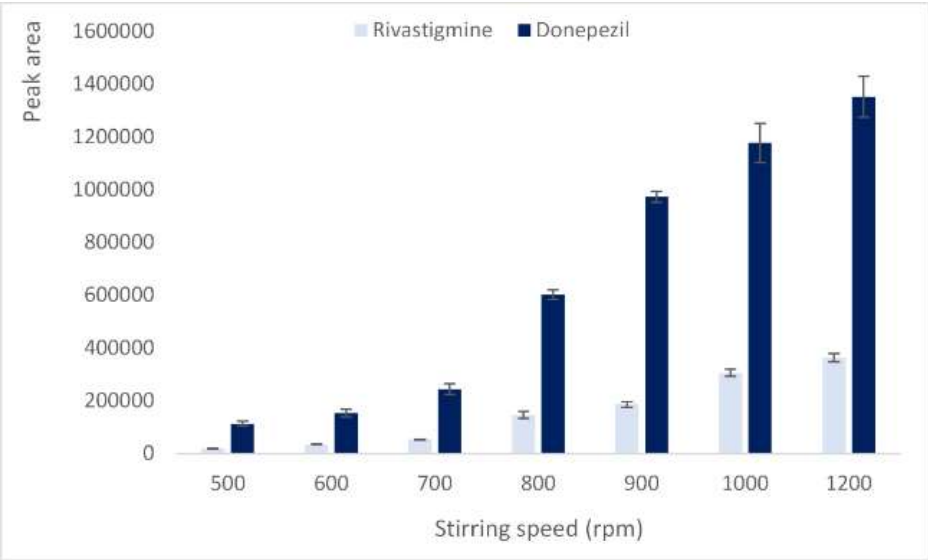
قدرت یونی محلول نمونه از جمله عوامل اثرگذاری است که می‌تواند بر کارایی استخراج موثر باشد. این پارامتر می‌تواند اثری سه‌گانه بر استخراج داشته به طوری که ممکن است در نتیجه پدیده Salting out سبب افزایش کارایی و یا در نتیجه پدیده Salting in مسبب کارایی استخراج گردد. همچنین این احتمال نیز وجود دارد که کارایی استخراج درنتیجه تغییر قدرت یونی محیط تغییری نداشته باشد. به منظور بررسی این پارامتر از نمک سدیم کلرید استفاده شده و با افزودن مقادیر مناسب از این نمک (در محدوده ٪۳۰-۰) به محلول نمونه، اثرگذاری قدرت یونی بر استخراج آنالیت‌های تحت مطالعه مورد بررسی واقع شده و نتایج در شکل۶ قابل مشاهده است. مطابق نتایج به‌دست‌آمده با افزایش میزان قدرت یونی محلول نمونه از مقدار کارایی استخراج کاسته شده است.

۵-۲-۳- اثر سرعت هم‌زدن بر کارایی استخراج

هم زدن محلول نمونه تأثیر مهمی در سرعت انتقال جرم، به‌ویژه در نمونه‌های ویسکوز دارد. در این روش هم‌زدن نمونه با استفاده از چرخش مگنت توسط یک همزن مغناطیسی انجام‌شده و به منظور بررسی اثر سرعت هم‌زدن نمونه بر کارایی استخراج، سرعت چرخش‌های ۱۲۰۰-۵۰۰ دور بر دقیقه برای مگنت مورداستفاده بررسی‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده در شکل۷ قابل‌مشاهده بوده و نتایج نشان‌دهنده آن است که هم‌زدن نمونه اثری آشکار بر کارایی استخراج داشته و با افزایش سرعت چرخش مگنت بر کارایی استخراج به‌طور محسوسی افزوده می‌گردد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین میزان هم‌زدن قابل حصول توسط دستگاه مورداستفاده یعنی ۱۲۰۰ دور بر دقیقه به‌عنوان مقدار بهینه تعیین‌شده است.



شکل ۶. تأثیر قدرت یونی بر کارایی استخراج در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی. شرایط استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی با pH=۱۱ و غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت‌های هدف، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی با pH=۱، سرعت هم‌زدن ۱۲۰۰دور بر دقیقه ، زمان استخراج ۵۰ دقیقه، حلال استخراجی ان-تترادکان.



شکل ۷. تأثیر سرعت هم‌زدن بر کارایی استخراج در روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی. شرایط استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی با pH=۱۱ و غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت‌های هدف، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی با pH=۱، زمان استخراج ۵۰ دقیقه، حلال استخراجی ان-تترادکان.

۳-۳- ارقام شایستگی روش میکرواستخراج بر پایه فیبر توخالی سه فازی

به منظور مطالعه ارقام شایستگی روش میکرواستخراج بر پایه فیبر توخالی سه فازی در استخراج داروهای ریواستیگمین و دونپزیل پارامترهایی چون محدوده خطی، حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، دقت، فاکتور غنی‌سازی و بازیابی موردبررسی واقع شده است. به منظور تعیین محدوده خطی روش برای اندازه‌گیری داروهای تحت بررسی در نمونه‌های آبی تحت شرایط بهینه غلظت‌های مختلفی از دو دارو در آب با خلوص کروماتوگرافی مایع تهیه شده و پس از استخراج توسط روش بهینه شده توسط

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جداسازی و مورد اندازه‌گیری واقع شده است. مطابق نتایج به‌دست‌آمده روش تحت بررسی محدوده خطی برابر با ۴-۱۰۰۰ $ng\ mL^{-1}$ برای داروی ریواستیگمین و محدوده خطی ۲-۱۰۰۰ $ng\ mL^{-1}$ برای داروی دونپزیل ارائه می‌دارد. به منظور تعیین حدود تشخیص و اندازه‌گیری روش از روش تجربی استفاده نموده که مطابق آن حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش عبارت از غلظتی از آنالیت است که سیگنال متناظر با آن به ترتیب سه و ده برابر نویز باشد (S/N=10, S/N=3). بر این اساس روش حد تشخیصی برابر ۰/۷ $ng\ mL^{-1}$ برای داروی ریواستیگمین و ۰/۵ $ng\ mL^{-1}$ برای داروی دونپزیل ارائه داشته است و حد اندازه‌گیری برای داروهای ریواستیگمین و دونپزیل به ترتیب برابر ۴ $ng\ mL^{-1}$ و ۲ است. انحراف استاندارد نسبی فاکتور مناسبی به منظور بیان دقت روش است. جهت بررسی تکرارپذیری روش پنج محلول تکراری حاوی غلظت‌های۱۰۰ نانوگرم بر لیتر از محلول نمونه آماده شده و تحت شرایط بهینه و در طول یک روز توسط روش استخراج و به دستگاه کروماتوگرافی مایع جهت آنالیز تزریق شده است. همچنین به منظور بررسی تکثیر پذیری روش نیز پنج محلول تکراری حاوی غلظت‌های ۱۰۰ نانوگرم بر لیتر از محلول نمونه آماده شده و تحت شرایط بهینه طی پنج روز توسط روش استخراج و به دستگاه کروماتوگرافی مایع جهت آنالیز تزریق گردید. نتایج به‌دست‌آمده (جدول ۱) نشان می‌دهد که روش RSD هایی در محدوده ۳/۱ تا ۴/۰ را در اندازه‌گیری داروهای ریواستیگمین و دونپزیل ارائه می‌دارد. جهت محاسبه بازیابی و فاکتور غنی‌سازی استخراج آنالیت‌های هدف از سه محلول حاوی غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از هریک از آنالیت‌های هدف انجام شده و نتایج حاصل نشان‌دهنده آن است که روش درصد بازیابی ۶۰ درصدی برای دارو ریواستیگمین و ۸۹ درصدی برای دارو دونپزیل ارائه دارد. همچنین بررسی فاکتور تغلیظ‌های به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که فاکتور تغلیظ برابر با ۱۵۰ برای دارو ریواستیگمین و ۲۲۲ برای دارو دونپزیل حاصل شده است.

۸-۳- کاربرد روش در نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی قابلیت کاربرد روش در نمونه‌های حقیقی، نمونه‌های پیچیده‌ای مانند پلاسما، ادرار و پساب موردبررسی قرار گرفته است. آماده‌سازی ابتدایی نمونه‌ها مطابق موارد ارائه‌شده در بخش ۲-۲ انجام شده و نتایج حاصل از استخراج و اندازه‌گیری آنالیت‌های هدف در نمونه‌های ذکرشده در جدول۲ ارائه‌شده است. جهت بررسی وجود و یا عدم وجود داروهای موردبررسی در نمونه‌های حقیقی هرکدام از نمونه‌ها توسط روش میکرواستخراج فاز مایع بر پایهِ فیبر توخالی سه فازی مورد مطالعه واقع شده و نتایج حاصل از استخراج و آنالیز فاز نهایی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان دهنده عدم حضور یا کمتر بودن غلظت آنالیت‌های هدف نسبت به حد تشخیص روش می‌باشد.

جدول۱: ارقام شایستگی روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی.

Analyte	LOD[a]	LDR[b]	R^{2c}	RSD%[d] (n = 5) Intra-day (Inter-day)	ER%[e]	EF
Rivastigmine	0.7	4-1000	0.995	3.5 (3.9)	60	150
Donepezil	0.5	2-1000	0.996	3.1 (4.0)	89	222

به منظور بررسی اثرگذاری بافت نمونه بر بازدهی استخراج مقدار مشخصی از داروهای موردبررسی به هرکدام از نمونه‌ها اضافه شده و فرایند استخراج بر روی هرکدام انجام و فاز استخراجی به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردیده است. نتایج حاصل بیانگر عدم تأثیر معنادار بافت نمونه پلاسما و ادرار و پساب بر کارایی استخراج داروهای ریواستیگمین و دونپزیل توسط روش میکرواستخراج فاز مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی تلفیق شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می‌باشد. کروماتوگرام نوعی حاصل از استخراج آنالیت‌های هدف از نمونه ادرار و جداسازی و اندازه‌گیری آنها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در شکل۸ قابل مشاهده می باشد.

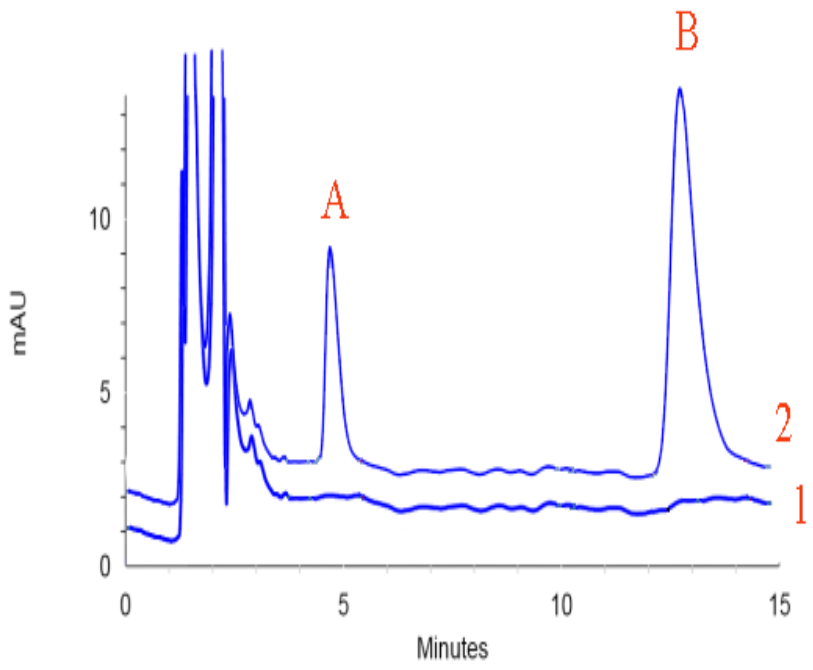
۴- نتیجه‌گیری

در پروژه انجام شده از روش میکرواستخراج مایع بر پایه فیبر توخالی سه فازی به منظور اندازه‌گیری داروهای ریواستیگمین و دونپزیل از نمونه‌های پلاسما، ادرار و پساب استفاده شده است. تحت شرایط بهینه ذکرشده محدوده خطی بین ۲-۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، حد تشخیص بین ۰/۷-۰/۵، انحراف استاندارد نسبی ۳/۵-۳/۱ و فاکتور غنی‌سازی ۲۲۲-۱۵۰ به‌دست‌آمده است. نتایج حاصل، بیانگر فاکتور غنی‌سازی و تمیزسازی بالای این روش است. همچنین سادگی استفاده و هزینه پایین فیبرهای توخالی این روش را به‌عنوان روشی ساده، ارزان و پرکاربرد تائید می‌کند.

جدول۲: نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های پلاسما، ادرار و پساب.

Sample		Rivastigmine	Donepezil
Plasma	Initial [a]	N.d.[b]	N.d.
	Added [c]	100.0	100.0
	Found [d]	96.2	98.1
	RR% *[e]	96	98
	RSD% (n = 3)	4.2	3.9
urine	Initial	N.d.	N.d.
	Added	25.0	25.0
	Found	23.9	24.1
	RR%	96	96
	RSD% (n = 3)	4.0	4.2
Wastewater	Initial	N.d.	N.d.
	Added	25.0	25.0
	Found	26.1	24.1
	RR%	104	96
	RSD% (n = 3)	4.1	4.0

[a] Concentration of analytes (ng mL^{-1}).
[b] Not detected.
[c] Spiked concentration (ng mL^{-1}).
[d] Concentration of analytes (ng mL^{-1}) in the sample after spiking target analytes.
[e] Relative recovery.



شکل ۸. کروماتوگرام حاصل از استخراج نمونه ادرار، دو دارو (A) ریواستیگمین و (B) دونپزیل، (۱) بدون افزودن آنالیت. (۲) افزودن آنالیت با غلظت ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر. تحت شرایط بهینه استخراج: فاز دهنده ۱۰ میلی‌لیتری با pH=۱۱، فاز پذیرنده ۴۰ میکرو لیتر محلول آبی با pH=۱، سرعت همزدن ۱۲۰۰دور بر دقیقه، زمان استخراج ۵۰ دقیقه، حلال استخراجی ان-تترادکان.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان از گروه شیمی دانشگاه سمنان جهت حمایت‌های مالی و معنوی کار پژوهشی حاضر صمیمانه تقدیر و تشکر می نمایند.

۶- مراجع

[1] S. Dennis J, Physiological reviews, **81** (2001) 741.

[2] P. Suresh,Sh. Kuldeep,M. Ramesh,S. S Kumar, Biomedical Chromatography, **28** (2014) 1431.

[3] A. Claudete, F. Christian, J. Alvaro, R. José Carlos, C. Maria Eugênia, L. Fernando Mauro, Journal of Chromatographic Science, **44** (2006) 340.

[4] A. Alireza, S. Zahra, B. Mohammad, R. Maryam, B. Leila, Microchemical Journal, **130** (2017) 122.

[5] F. Amir, M. Bakhshali, J. Mehdi, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **168** (2016) 235.

[6] B. Behruz,A. Alireza, R. Maryam, Journal of Applied Chemistry, **29** (2014) 51.

[7] R. Mohammad,K. Faezeh, B. Manoochehr, H. Majid, Journal of Applied Chemistry, **41** (2017) 99.

[8] R. Maryam, G. Mehri, , Journal of Applied Chemistry, **27** (2013) 21.

[9] X. Li, B. Chanbasha, L. Hian Kee, Journal of Chromatography A, **1152** (2007) 184.

[10] L. Hoi Sim Nancy, S. Mui Tiang, Ba. Chanbasha, L. Hian Kee, Journal of Chromatography a, **1196** (2008) 125.

[11] M. Minhui, C. Frederick F, Analytical Chemistry, **71** (1999) 388.

[12] S. Hamid Reza, Y. Yadollah, A. Reza, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **45** (2007) 769.

[13] P. Stig, R. Knut Einar, Journal of Chromatography A, **1184** (2008) 132.