

# استخراج فاز جامد میکرو بر پایه نانو پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی سطحی و حلال

## عمیق سبز و بهینه سازی به روش طراحی ترکیب مرکزی برای اندازه گیری

### دیپیریدامول در نمونه های دارویی و بیولوژیکی

رویا میرزاجانی\*، سارا کرمی

اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه شیمی

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۱۵

تاریخ تصحیح: ۹۹/۰۳/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۳۰

#### چکیده

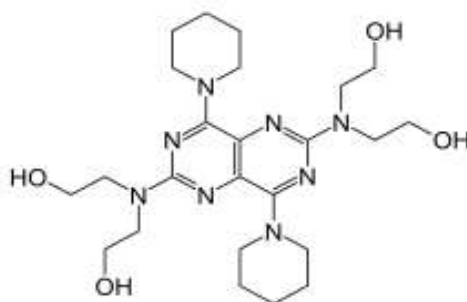
در این کار روش ساده و ارزان استخراج فاز جامد میکرو پختی با استفاده از نانو کامپوزیت پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی و حلال عمیق سبز با بهینه سازی به روش طراحی ترکیب مرکزی برای اندازه گیری گزینشی دیپیریدامول در نمونه های دارویی و بیولوژیکی ارایه شده است. نانو کامپوزیت سنتز شده به منظور افزایش کارایی استخراج با این نانو کامپوزیت امواج فراصوت در مراحل جذب و واجذب مورد استفاده قرار گرفت همچنین حلال عمیق سبز برای واجذب آنالیت به کار گرفته شد و اندازه گیری به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با دتکتورر ماوراء بنفش انجام شد. بهینه سازی همزمان پارامترهای موثر شامل مقدار جاذب ( $W$ )، حجم حلال واجذب ( $V$ ) و زمان واجذب ( $t$ ) به روش طراحی ترکیب مرکزی انجام شد. پس از بهینه سازی بیشترین ظرفیت جذب آنالیت بر روی جاذب نانو کامپوزیت مغناطیسی پلیمر قالب مولکولی برای دیپیریدامول  $2/82 \text{ mg g}^{-1}$  بود و محدوده خطی به دست آمده برای روش  $200 \mu\text{g L}^{-1} - 0/008$  بدست آمد. حد تشخیص و حد تعیین روش نیز به ترتیب معادل  $0/003 \mu\text{g L}^{-1}$  و  $0/009 \mu\text{g L}^{-1}$  حاصل شد. انحراف استاندارد نسبی روش با استفاده از تست درون روز برای غلظتهای ۵، ۵۰ و ۱۵۰ به ترتیب ۳/۲۶٪، ۲/۰۹٪ و ۳/۴۱٪ همچنین با تست بین روز برای همان سطوح غلظتی کمتر از ۴٪ به دست آمد. در نهایت این روش به صورت بسیار موفقیت آمیزی برای اندازه گیری دیپیریدامول در نمونه های پلاسما، سرم خون و قرص با انحراف استاندارد کمتر از ۴ درصد بکار گرفته شد.

**کلمات کلیدی:** دیپیریدامول؛ استخراج فاز جامد میکرو؛ نانو ذرات مغناطیسی؛ پلیمر قالب مولکولی؛ حلال اتکتیک عمیق؛ طراحی ترکیب مرکزی.

#### ۱- مقدمه

این دارو دارای نام شیمیایی ۲ و ۶ بیس (دی اتانول آمینو) و ۴ و ۸ دی پیپریدینو پیروپیریمیدو [d-۵ و ۴] دی پیروپیریمیدین می باشد. [۱] این داروی ضد تجمع پلاکت در بیمارانی که در معرض خطر آمبولی و سکت میباشند، همچنین افرادی که به خاطر مشکلات قلبی جراحی شده اند برای کاهش احتمال ایجاد لخته در جریان خون مورد استفاده قرار میگیرد. این دارو در ابتدا تحت عنوان ضد آنژین مورد استفاده قرار می گرفت. اما اکنون برای درمان لختگی خون در رگ ها استفاده می شود [۲].

داروی دیپیریدامول معمولاً همراه داروهای دیگری مانند آسپرین یا وارفارین مصرف می‌گردد و به شکل های قرص، کپسول، و تزریقی در دسترس قرار دارد. دیپیریدامول به طور انتخابی با گشاد کردن عروق کرونر، موجب افزایش جریان خون این عروق می‌شود. اثر گشادکننده عروق کرونر ناشی از مهار آدنوزین دامیناز سرم است که باعث تجمع آدنوزین می‌شود. آدنوزین یک گشادکننده قوی عروقی است. نیمه عمر این دارو ۱۰ ساعت می‌باشد و دفع این دارو از طریق صفرا و ادرار می‌باشد. عوارض جانبی و ناخواسته مصرف این دارو شامل: سردرد، سرگیجه، سنکوپ، گرگرفتگی، تهوع، استفراغ، راش و خستگی می‌باشد [۳]. در شکل ۱-۱، ساختار دیپیریدامول نشان داده شده است.



شکل ۱: ساختار شیمیایی دیپیریدامول

شیمی تجزیه نوین تکنیک‌های متعددی را برای تعیین آنالیت موردنظر در بافت‌های متفاوت ارائه می‌دهد. این دارو تاکنون با استفاده از روش‌های مختلف از جمله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۴]، اسپکتروفتومتری [۵]، طیف سنجی فلورسانس [۶] و ولتامتری [۷]، و سنسورهای شیمیایی [۸] در نمونه‌های مختلف اندازه‌گیری شده است. با وجود این محققین همواره اهدافی را دنبال می‌کنند که شامل کاهش یا حذف هدررفت مواد شیمیایی از جمله حلال، واکنشگر، مدیریت صحیح پسماند تجزیه‌ای، به حداقل رساندن انرژی مصرفی و اطمینان از ایمنی عملکرد می‌باشند. استخراج فاز جامد میکرو پخشی (D- $\mu$ - SPE Dispersive- micro- solid phase extraction) به عنوان یک جایگزین ارزشمند برای تکنیک استخراج فاز جامد کلاسیک توسعه یافت. این تکنیک شامل مزیت‌هایی از جمله: سرعت بالا، سهولت عملکرد، هزینه کم، کارایی بالا و ایمن بودن روش کار می‌باشد که برای آنالیز محدوده وسیعی از آنالیت‌ها در محیط‌های متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرد [۹]. در میان انواع جاذبه‌های مورد استفاده، در استخراج فاز جامد نانوذرات مغناطیسی به دلیل اینکه می‌توانند به راحتی به وسیله یک میدان مغناطیسی خارجی از بافت نمونه جداسازی شده، مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۰]. عیب اصلی نانوذرات مغناطیسی تجمع و اکسیداسیون راحت آن‌هاست. یک روش معمول برای غلبه بر این محدودیت پوشاندن سطح نانوذرات مغناطیسی با معرف‌های آلی مختلف می‌باشد. نانوذرات مغناطیسی پوشش داده شده پایداری و انتخاب‌پذیری بیشتری نسبت به نانوذرات مغناطیسی بدون پوشش را دارا می‌باشند [۱۱]. پلیمرهای قالب مولکولی از جمله موادی هستند که این منظور قابل استفاده‌اند و به عنوان فاز استخراج‌کننده انتخاب‌پذیری و تمایل بالای آن‌ها به ساختارهای شبیه مولکول الگو مورد استفاده در فرآیند

قالب‌زنی می‌باشد. پلیمرهای قالب مولکولی مغناطیسی، علاوه بر حفظ مزیت‌های MIP، از جمله انتخاب‌پذیری و کارایی بالا در استفاده به‌عنوان جاذب، خاصیت مغناطیسی خود را نیز حفظ کرده و بنابراین به‌راحتی می‌تواند به وسیله یک میدان مغناطیسی خارجی از محیط خارج شود [۱۲]. گذشته از این، در پلیمرهای قالب مولکولی مغناطیسی به دلیل مکان‌های فعال قرار گرفته شده روی سطح ماده، دستیابی آنالیت به حفره‌های انتخابی و همین‌طور خارج شدن از سطح در مقایسه با پلیمرهای قالب مولکول معمول، راحت‌تر می‌باشد. به دلیل این مزایا، پلیمرهای قالب مولکولی مغناطیسی به صورت وسیعی برای کاربرد در بیوتکنولوژی، تکنیک‌های استخراجی و توسعه سنسورها مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگرچه در روش  $D-\mu$ -SPE، انتخاب صحیح جاذب مورد استفاده برای مرحله جذب امری حیاتی می‌باشد، انتخاب حلال شوینده مناسب برای واجد کامل آنالیت از جاذب، نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. مایعات یونی، از طریق پیوندهای هیدروژنی و همچنین برهم-کنش‌های دوقطبی-دوقطبی با آنالیت، می‌توانند ظرفیت واجد روش استخراجی را افزایش دهند. Deep eutectic solvent (DESs)، حلال‌های سبزی هستند که متعلق به دسته مایعات یونی می‌باشند [۱۳]. DES از ترکیب گیرنده پیوند هیدروژنی مثل نمک آمونیوم چهارتایی و همچنین دهنده پیوند هیدروژنی شامل ترکیبات دارای گروه‌های عاملی از قبیل کربوکسیلیک اسید، اوره یا الکل‌ها حاصل می‌شود. نقطه ذوب ترکیب ایجاد شده بسیار کمتر از اجزای تشکیل دهنده می‌باشد که این امر باعث می‌شود این حلالها در دمای اتاق اکثراً به حالت مایع باشند [۱۴]. علاوه بر این، DES ها همچنین دارای چندین برتری نسبت به IL های معمولی هستند. استفاده از این حلال های سبز نسبت به بیشتر IL ها راحت تر میباشد زیرا مواد سمی با هوا و آب تشکیل نمی دهند. آنها نه تنها از مزایای مایعات یونی مانند، پایداری شیمیایی و فشار بخار پایین برخوردار هستند بلکه بسیاری از مزایای دیگر از جمله عدم سمیت و تجزیه پذیری، تنوع، مواد اولیه کم هزینه و راحتی تهیه را نیز دارا هستند. در سالهای اخیر، DES به طور گسترده ای در واکنش‌های آلی، الکتروشیمیایی، فرایند جداسازی و غیره مورد استفاده قرار می گیرد. بکار بردن این حلال‌های سبز در مقادیر بسیار کم به عنوان جایگزین برای حلال‌های سمی و آلاینده ی آلی و استفاده از خاصیت مغناطیسی جاذب پلیمر قالب مولکولی برای جداسازی در کنار گزینش پذیری بسیار خوب جاذب همگی از مزایای عمده این روش پیشنهادی می‌باشند. در این پژوهش، از طراحی آزمایش به روش ترکیب مرکزی برای بهینه سازی پارامترهای موثر بر استخراج فاز جامد میکرو پخشی دیپیریدامول با استفاده از نانو کامپوزیت مغناطیسی سنتز شده به کمک فراصوت و حلال های یوتکتیک عمیق برای اندازه گیری درنمونه های حقیقی استفاده میشود.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد و دستگاهها

داروی دیپیریدامول مورد استفاده در این کار و آغازگر ۲ و ۲ آزوبیس بوتیرونیتریل (AIBN) از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES)، متاکریلیک اسید (MAA) به عنوان مونومر عاملی، اتصال دهنده عرضی اتیلن گلایکول دی متاکریلات (EGDMA)، کولین کلراید، اوره، گلیسرول، اتیلن گلایکول و تمامی حلال ها از جمله: استونیتریل، استیک اسید، اتانول، آمونیوم هیدروکساید و فسفریک اسید از شرکت سیگما-آلدریج خریداری شدند. همچنین در تمامی مراحل از آب و سایر حلالهای دارای درجه HPLC استفاده گردید. محلول استاندارد ذخیره ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از دیپیریدامول، به این ترتیب تهیه شد که ابتدا ۵۰ میلی گرم از پودر خالص دیپیریدامول توزین شد و به وسیله حلال اتانول حل شد و در یک بالن ۵۰ میلی لیتری به وسیله اتانول به حجم رسانده شد. در این کار یک سیستم HPLC ساخت شرکت کناور آلمان شامل یک پمپ چهارحلاله، لوپ ۲۰ میکرولیتر، و آشکارساز UV مدل K-2501 و ستون فاز معکوس C18 (۲۵۰ mm × ۴/۶ mm) با سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت.

### ۲-۲- آمین دار کردن نانوذرات اکسید آهن با استفاده از ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES)

برای تهیه ی نانو کامپوزیت نهایی ابتدا نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن به روش ارایه شده در کار قبلی سنتز شد [۱۵] و پس از آن توسط ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان عاملدار گردید. به منظور آمین دار کردن نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن، ۰/۴ گرم از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در ۱۵۰ میلی لیتر مخلوط حلال اتانول و آب با نسبت ۱:۱ پخش شد. مخلوط توسط همزن مغناطیسی به شدت هم زده شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر APTES به صورت قطره قطره به آن افزوده شد. pH واکنش به وسیله افزودن آرام و تدریجی استیک اسید ۱ مولار به ۴ رسانده شد. واکنش تحت اتمسفر گاز نیتروژن قرار گرفت و به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد هم زده شد. رسوب حاصل به وسیله آهنربای خارجی جدا و سپس با استفاده از آب به دفعات زیاد (۱۰ بار) شست و شو شد تا زمانیکه pH آن به ۷ رسید و جهت خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و خشک گردید ماده سنتز شده  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$  میباشد.

### ۲-۳- تهیه نانو کامپوزیت مغناطیسی پلیمر قالب مولکولی برای دیپیریدامول $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 / MIP$

در این مرحله، از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن آمین دار شده، به منظور تهیه نانو کامپوزیت پلیمر قالب مولکولی ی را به دیپیریدامول به عنوان قالب استفاده شد. بدین منظور، مقدار ۰/۱ گرم از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن عامل دار شده را در ۳۰ میلی لیتر از استونیتریل پخش شد و ۰/۵ میلی مول از مولکول قالب (دیپیریدامول)، ۲ میلی مول MAA به عنوان مونومر عاملی، ۱۰ میلی مول EGDMA به عنوان اتصال دهنده عرضی و ۰/۰۶ گرم AIBN به عنوان آغازگر واکنش به

ترتیب به آن اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۸ ساعت درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس جهت خارج‌سازی مولکول قالب (دیپیریدامول) از پلیمر حاصل، این پلیمر چندین بار توسط حلال اتانول : استیک اسید با نسبت ۷ به ۳ شست‌وشو شد تا اینکه هیچ اثری از مولکول قالب در محلول حاصل از شست‌وشو مشاهده نشد. در ادامه برای مطالعات مقایسه ای نانوکامپوزیت غیر قالب مولکولی یا  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 / NIP$  نیز به همین روش و در غیاب مولکول قالب تهیه شد.

#### ۴-۲-تهیه حلال های شوینده سبز

جهت دست یابی به حلال شوینده مناسب، سه نوع DES سنتز گردید و عملکرد آنها برای استخراج دیپیریدامول با  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2/MIP$  با یکدیگر مقایسه شد. سه نوع DES عبارت اند از: ترکیب کولین کلراید با اوره (DES1)، ترکیب کولین کلراید با اتیلن گلیکول (DES2) و ترکیب کولین کلراید با گلیسرول (DES3). به منظور سنتز هر کدام از حلالها، ۱مول از دهنده پیوند هیدرژنی و ۲ مول از پذیرنده توزین و سپس درون ظرف شیشه‌ای کوچک ترکیب شدند و درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. مواد مخلوط فوق پس از ذوب شدن از آون خارج شده و بعد از سرد شدن به عنوان حلال شوینده مورد استفاده قرار گرفت [۱۳].

#### ۵-۲-روش کار کلی

جهت پیش تغلیظ دیپیریدامول، ۵ میلی لیتر محلول دیپیریدامول (۱۰ میکروگرم بر لیتر) را به لوله آزمایش انتقال داده و مقدار ۴/۳ میلی گرم از جاذب به آن افزوده شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در برابر امواج فراصوت قرار داده شد تا آنالیت بر روی جاذب بارگیری شود و عمل استخراج انجام گردد. در مرحله بعد باقی‌مانده محلول به مدت ۵ دقیقه در معرض یک آهنربای مغناطیسی خارجی قوی (۱/۴ تسلا) قرار گرفت تا جاذب مغناطیسی کاملاً ته‌نشین و جدا شود سپس محلول رویی سرریز شد و جاذب از آن جدا گردید. در ادامه برای واجذب آنالیت جذب شده بر روی جاذب مقدار ۱۶۵/۹ میکرولیتر از محلول شوینده (ترکیبی از نسب حجمی ۷:۳ از بافر فسفات و DES2) به آن اضافه گردید و به مدت ۱۸/۴۰ دقیقه در برابر امواج فراصوت قرار گرفت. در این مرحله محلول پیش تغلیظ شده به کمک آهنربای مغناطیسی خارجی از جاذب جامد جدا شد. جهت تزریق محلول پیش تغلیظ شده به HPLC، ابتدا به منظور حذف ذرات معلق، محلول را به وسیله سرنگ از فیلتر سرسرنگی عبور داده و مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. سطح زیر پیک دیپیریدامول در کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه، به عنوان تابعی از غلظت آن اندازه گیری شد.

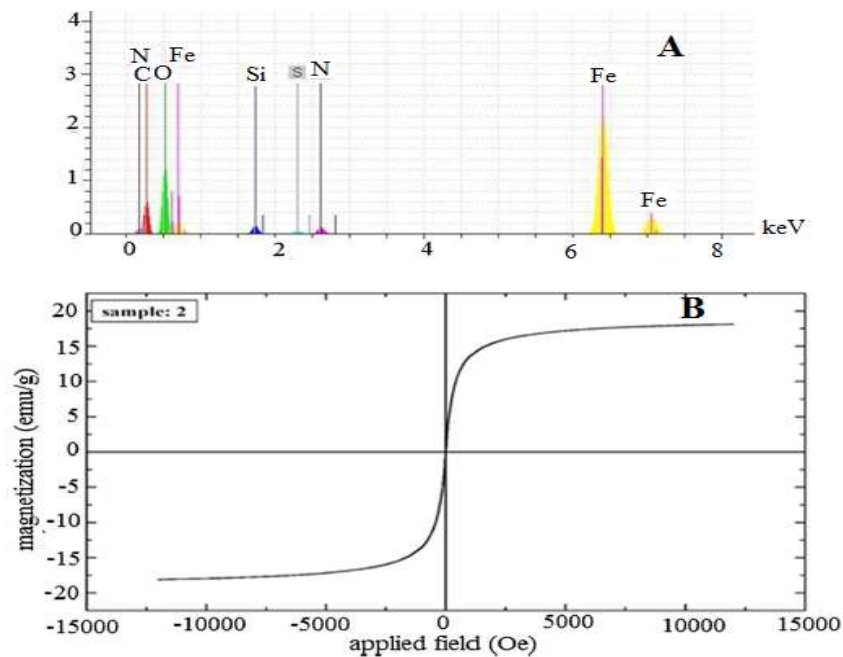
## ۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- طیف FT-IR گرفته شده از سه ترکیب  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$ 

برای مشخصه یابی مواد سنتزی در ابتدا طیف FT-IR هر سه ترکیب  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  /  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  گرفته شد با توجه به پیکهای مربوط گروههای عاملی مشاهده شده سنتز این ترکیبات مورد تایید قرار گرفت. نانوذرات مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  از طریق مشاهده باند Fe-O در حدود  $582/46 \text{ Cm}^{-1}$  تایید شد است. در طیف مربوط به ترکیب،  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  وجود پیک هایی در اعداد موجی  $802/23 \text{ Cm}^{-1}$  و  $1095/3 \text{ Cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن Si-O-Si به خوبی سیلان دار شدن نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن را نشان میدهد و مشاهده ی پیکهایی در  $1606/40$  و محدوده  $2800-3000$  به ترتیب مربوط به ارتعاشات خمشی و کششی پیوندهای N-H متصل به پیوند C-H گروه های متیل و متیلن مربوط به APTES میباشد و اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  را با APTES به خوبی نشان میدهد. در طیف FT-IR ترکیب نانو کامپوزیت  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  علاوه بر مجموع پیکهای فوق وجود پیکی در عدد موجی  $1730/10$  نشان دهنده اتصال گروه کربونیل EGDMA روی سطح  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  و اثبات کننده پلیمریزاسیون میباشد.

۳-۲- آنالیز VSM و EDX نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$ 

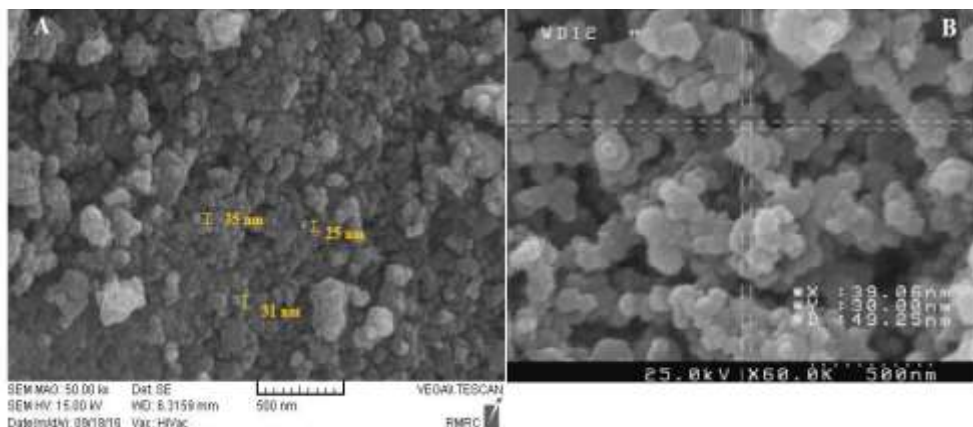
به منظور آنالیز عنصری جاذب سنتز شده، تجزیه EDX انجام شد. شکل (۲-A). همانطور که در شکل مشاهده می شود وجود پیکهای N و Si مربوط به مرحله سیلان و آمین دار کردن سطح نانوذرات آهن می باشد. وجود پیک کربن و البته افزایش شدت آن نسبت به ماده  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  (تصویر EDX آورده نشده) و همچنین کاهش پیکهای مربوط به آهن ناشی از پوشش دار شدن نانوذرات آهن مغناطیسی اکسید آهن (تصویر EDX آورده نشده) تشکیل پلیمر را اثبات میکند. تصویر VSM برای پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی سنتز شده در شکل (۲-B) وجود قدرت مغناطیسی قابل ملاحظه ی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  را پس از پلیمریزاسیون به خوبی نشان می دهد که این امر دور از انتظار نیست، البته با انجام شدن پلیمریزاسیون مقداری از قدرت مغناطیسی نانو ذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  که حدود  $60 \text{ emu}$  میباشد کم شده است ولی همچنان به اندازه ی کافی بالا میباشد که به سهولت در مرحله جداسازی مغناطیسی جاذب از محلول قابل استفاده است.



شکل ۲: آنالیز (A) EDX ; (B) VSM

### ۳-۳- آنالیز SEM مغناطیسی اکسید آهن ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) و نانو کامپوزیت مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$

برای بررسی ریخت شناسی و اندازه ابعاد نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) و نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  سنتز شده، توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی بالا، از آنها تصاویر SEM تهیه شد. در شکل A-۳، در تصاویر SEM تهیه شده برای نانوذرات اکسید آهن مشاهده می شود که سایز ذرات سنتز شده بین ۲۵ تا ۳۹ نانومتر گزارش شده است تصویر SEM تهیه شده از نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  در شکل B-۳، نشان می دهد که سطح پلیمر به خوبی دارای خلل و فرج هایی است که باعث افزایش مساحت سطح پلیمر و بهبود کارایی آن می شود، همچنین ابعاد پلیمر سنتز شده کمتر از ۵۰ نانومتر می باشد.



شکل ۳: تصویر SEM (A) نانوذرات مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و (B) نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$

#### ۴-۳- بهینه‌سازی نوع و شرایط حلال واجذب

جهت مقایسه عملکرد سه نوع DES، ابتدا هر کدام از آنها به تنهایی به عنوان حلال واجذب به کار برده شدند، سپس مخلوط آنها با بافر های با pH های مختلف برای واجذب آنالیت از روی جاذب مورد بررسی قررگرفت و در نهایت ترکیب درصد بافر به DES با روش یک متغیر در زمان بهینه گردید. نتایج در شکل ۴-A نشان داد که مساحت پیک مربوط به پیش تغلیظ با استفاده از حلال سنتز شده با کولین کلراید و اتیلن گلیکول (DES2) به عنوان حلال شوینده دارای بالاترین مساحت پیک می‌باشد که می‌توان نتیجه گرفت که DES2 دارای بالاترین توانایی واجذب آنالیت از جاذب می‌باشد. بنابراین در ادامه از DES2 به عنوان DES بهینه استفاده شد. مطالعات نشان داد که واجذب با استفاده از بافر فسفات با pH ۳ دارای بالاترین مساحت پیک است (شکل ۴-B) که نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که در pH ۳ بیشترین پیش تغلیظ آنالیت صورت می‌گیرد. این می‌تواند به این دلیل باشد که داروهایی که خصلت بازی ضعیفی دارند در محیط‌های اسیدی بسیار محلول هستند بنابراین حداکثر حلالیت DIP در محیط اسیدی با  $pH = 1-3$  می‌باشد و با افزایش مقدار pH به مقادیر بالاتر ( $pKa = 6.8$ ) دیپیریدامول به شکل مولکولی با قابلیت انحلال کمتر در می‌آید و در ضمن توانایی اتصال پلیمر قالب مولکولی به دیپیریدامول در این pH ها به علت تغییر فرم مولکول مهمان و میزبان کمتر می‌شود. بنابراین در ادامه جهت بهینه کردن نوع بافر مورد استفاده برای واجذب آنالیت از روی جاذب، چهار نوع بافر فسفات، سیترات، استات و بوراکس با pH ۳ به عنوان حلال شوینده مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بافر فسفات دارای بالاترین توانایی در واجذب آنالیت از جاذب می‌باشد. جهت بهینه کردن نسبت بافر به DES مورد استفاده برای واجذب آنالیت از روی جاذب، نسبت‌های حجمی مختلفی از بافر به DES به عنوان حلالی شوینده در مرحله واجذب مورد استفاده قرار گرفتند همانطور که در شکل ۴-C مشاهده می‌شود، نسبت حجمی ۷:۳ از بافر فسفات به DES2 دارای بالاترین مساحت پیک است که نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که حلال شوینده با این نسبت از بافر فسفات و DES2 دارای بالاترین توانایی در پیش تغلیظ آنالیت از جاذب می‌باشد و این ترکیب درصد به عنوان حلال برای واجذب دیپیریدامول از سطح کامپوزیت  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2/MIP$  مورد استفاده قرار گرفت.

#### ۴-۵- بهینه‌سازی زمان التراسونیک در مرحله استخراج آنالیت

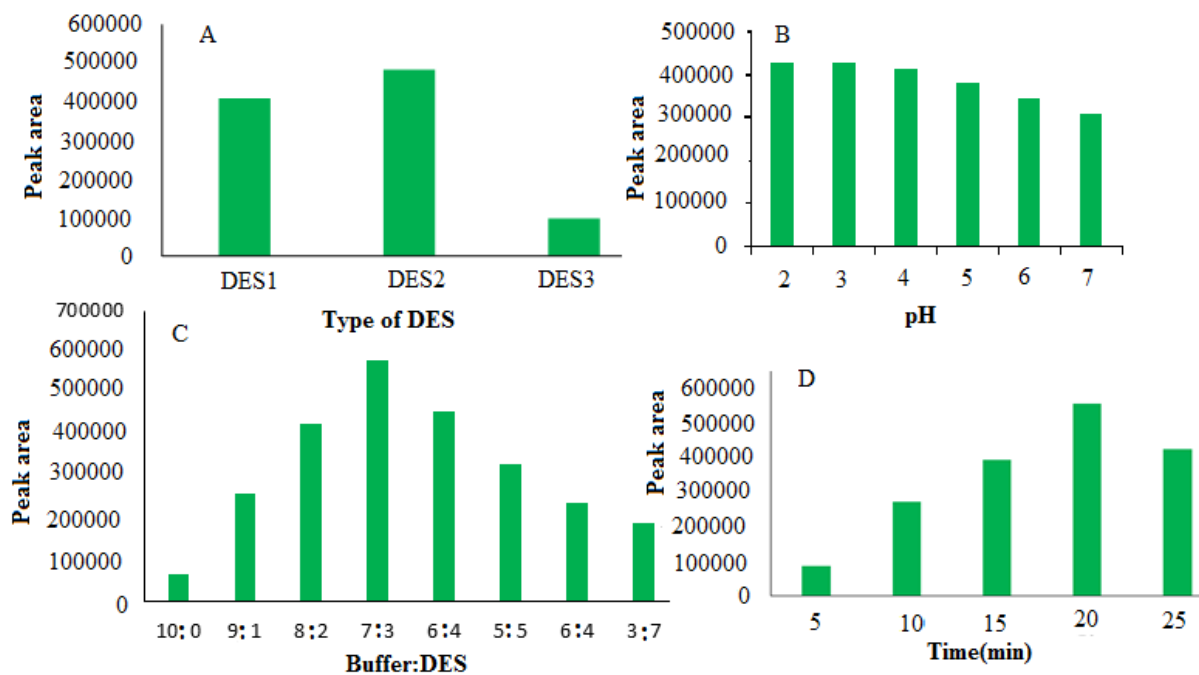
زمان جذب آنالیت بر روی جاذب یکی از مراحل بحرانی استخراج می‌باشد که نیاز به بهینه سازی دارد. به نحوی که در کوتاهترین زمان تماس آنالیت با جاذب بیشترین مقدار آن روی فاز استخراج کننده بازدارد شود. از روشهای مختلفی از جمله میتوان استفاده از همزن مغناطیسی، سانتریفیوژ و امواج فرا صوت برای همزدن و برقراری تماس آنالیت و جاذب استفاده میشود. در اینکار به منظور کاهش زمان تماس و افزایش کارایی استخراج هر سه روش مذکور مورد بررسی قرار گرفتند و



مشخص شد که بهترین کارایی استخراج با استفاده از امواج فرا صوت حاصل میشود بنابراین مدت زمان در معرض امواج فرا صوت بودن در مرحله استخراج بهینه گردید. به همین دلیل نمونه ها در مرحله استخراج با استفاده از روش یک متغیر در یک زمان در گستره ۲۵-۵ دقیقه در برابر امواج فرا صوت قرار داده شدند. همانطور که در شکل ۴-D مشاهده می شود بیشترین میزان جذب آنالیت در زمان ۲۰ دقیقه بدست می آید. بنابراین زمان ۲۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه انتخاب گردید.

### ۳-۶- بررسی اثر وزن جاذب، حجم شوینده و زمان واجذب به طور همزمان

پس از بهینه سازی پارامترهای نوع و ترکیب حلال واجذب به روش یک متغیر در زمان، در ادامه بهینه سازی سایر پارامترها از قبیل وزن جاذب، حجم شوینده و زمان واجذب روش طراحی ترکیب مرکزی مربوط به روش رویه پاسخ [۱۷] برای بهینه کردن مورد استفاده قرار گرفت. برنامه آماری مورد استفاده Minitab 16.2.2 می باشد. در مطالعات اولیه انجام شده کمترین و بیشترین مقدار موثر تقریبی هر فاکتور مشخص شد. جدول ۱ مقادیر سطوح بالا و سطوح پایین مربوط به هر فاکتور را نشان می دهد



شکل ۴: بررسی تاثیر (A) نوع حلال شوینده (B) pH بافر (C) نسبت حجم Buffer / DES (D) زمان التراسونیک

جدول ۱- محدوده آزمایش متغیرهای مورد مطالعه

نماد	سطوح			فاکتورها
	-۱	۰	+۱	
w	۵	۱۰	۱۵	وزن جاذب (mg)
v	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	حجم شوینده (μL)
t	۵	۱۲/۵	۲۰	زمان واجذب (min)

برنامه با توجه به طرح انتخابی و براساس سطوح فاکتورها ۲۰ آزمایش را طراحی کرد از تعداد ۲۰ آزمایش، در ۶ آزمایش هر ۳ فاکتور در سطوح مرکزی خود قرار دارند. وجود این ۶ نقطه برای بررسی تکرارپذیری روش و همچنین بررسی وجود انحنای در مدل طراحی شده می‌باشد. از ۱۴ آزمایش باقی‌مانده، ۶ آزمایش مربوط به مقادیر تحت تأثیر فاکتور  $\alpha$  می‌باشد و ۸ آزمایش دیگر نیز شامل مقادیر سطوح بالا و پایین هر کدام از فاکتورها می‌باشد. با توجه به طراحی برنامه، ۲۰ آزمایش تحت شرایط تعیین شده انجام شدند. سطح زیر پیک پس از استخراج فاز جامد میکرو پخشی دیپیریدامول با استفاده از نانو کامپوزیت مغناطیسی سنتز شده به کمک فراصوت و حلال‌های یوتکتیک عمیق به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. برای بررسی تمام اثرات احتمالی فاکتورها از جمله تمامی برهم‌کنش‌های موجود در رابطه غیرخطی با توان دوم فاکتورها، از بین مدل‌های موجود برای پردازش که شامل مدل‌هایی با اثرات خطی، خطی-درجه دوم، خطی-برهم‌کنش‌ها و درجه دوم کامل می‌باشد، مدل درجه دوم کامل انتخاب شد و پاسخ‌های بدست آمده بر اساس آزمایش‌های انجام شده، روی این مدل برازش شدند. این مدل بصورت زیر تعریف می‌شود [۱۸]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

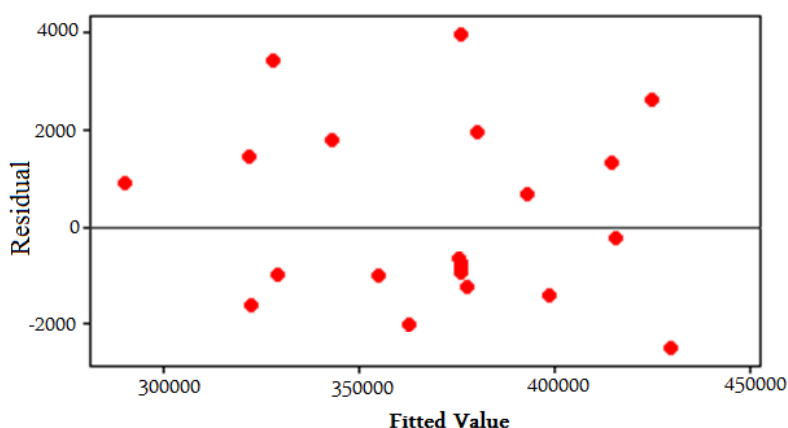
مدل ریاضی طراحی شده:

$$\%R = 375883 + 21664 w - 32097 v + 9035 t - 6054 w^2 - 23 v^2 + 5220 t^2 + 11880 wv - 9268 wt + 1128 vt$$

چنانچه در معادله بالا مشاهده می‌شود مقدار پارامترهای وزن جاذب و حجم شوینده می‌توانند بیشترین اثر را بر پیش‌تغلیظ دیپیریدامول داشته باشد. به‌نظر می‌رسد موثرترین برهم‌کنش مربوط به تأثیر متقابل فاکتورهای وزن جاذب و حجم شوینده است. میزان معنی‌دار بودن تأثیر هر یک از پارامترها و یا برهم‌کنش متغیرها با هم بوسیله تحلیل واریانس بررسی می‌شود. قابل توجه است که تحلیل واریانس اهمیت آماری پارامترها را با استفاده از آزمون آماری فیشر (F-test) ارزیابی می‌کند [۱۹]. چنانچه مقدار آماره F محاسبه شده برای هر پارامتر از مقدار بحرانی موجود در جدول برای سطح اطمینان ۹۵٪ بزرگتر باشد تأثیر متغیر قابل توجه است. همچنین متغیری که مقدار P آن کمتر از ۰/۰۵ باشد دارای تأثیر قابل توجهی است [۲۰]. متغیرهایی که دارای تأثیر معنی‌داری نمی‌باشند از معادله حذف شده و معادله جدید به صورت زیر می‌باشد:

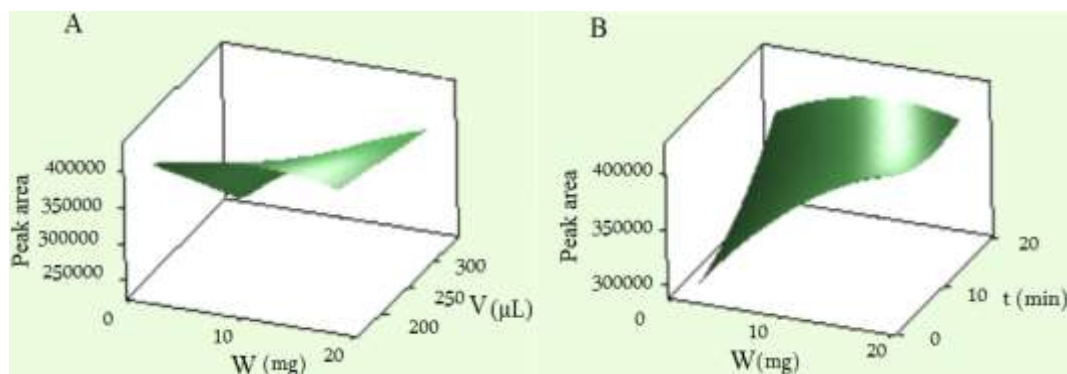
$$\%R = 375883 + 21664 w - 32097 v + 9035 t - 6054 w^2 + 5220 t^2 + 11880 wv - 9268 wt$$

برای تأیید مناسب بودن مدل طراحی شده نیز پارامتر Lack of fit مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پارامتر به عنوان معیاری برای میزان fit نشدن داده‌ها به مدل در نظر گرفته می‌شود. مقدار این پارامتر برای مدل طراحی شده  $1/51$  بدست آمد که مقدار پایینی است و بنابراین به خوبی قابل قبول می‌باشد. پارامتر دیگری که برای بررسی مناسب بودن مدل مورد استفاده قرار می‌گیرد مقدار باقی‌مانده‌ها می‌باشد. مقدار باقی‌مانده در واقع بیانگر اختلاف موجود بین مقادیر مساحت پیک‌های پیش‌بینی شده و تجربی می‌باشد. شکل ۵، نشان می‌دهد که باقی‌مانده‌ها کاملاً بی‌شکل و بدون ساختار نسبت به مقادیر برازش شده پخش شده اند در واقع می‌توان گفت بین مساحت پیک و باقی‌مانده‌ها وابستگی وجود ندارد که بیانگر مناسب بودن مدل است. شکل ۶، منحنی رویه پاسخ مربوط به تاثیر وزن جاذب حجم شوینده و وزن جاذب- زمان واجذب می‌باشد نتایج بیانگر بر هم کنش بین حجم حلال واجذب و زمان واجذب با وزن جاذب می‌باشد در حجم شوینده ثابت، با افزایش وزن جاذب مساحت پیک بیشتر می‌شود. تا زمانی که تاثیر وزن جاذب به مقدار ثابتی رسیده، و همچنین در مقدار کم وزن جاذب با افزایش زمان واجذب مساحت پیک افزایش می‌یابد. از مطالعات بالا این نتیجه حاصل می‌شود که میزان پیش‌تغلیظ دیپیریدامول توسط پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی شده به تأثیر هر سه پارامتر وزن جاذب، حجم حلال واجذب و زمان التراسونیک واجذب بستگی دارد.



شکل ۵: رابطه بین مقادیر باقی مانده و مقادیر پیش بینی شده

نمودارهای اپتیمم برای پارامترهای نشان می‌دهد برای رسیدن به مقدار بهینه میزان مطلوبیت ترکیبی پارامترها برابر یک می‌باشد. مفهوم این عبارت این است که تا زمانی که این پارامتر به یک نزدیک است سطوح به کار رفته متغیرها در وضعیت بهینه خود برای رسیدن به مساحت پیک مناسب تعریف شده، قرار دارند. نتایج مشخص کرد، وزن جاذب  $4/3$  میلی‌گرم، حجم شوینده  $165/9$  میکرولیتر و زمان واجذب  $18/4$  دقیقه مقادیر بهینه می‌باشد. بنابراین ادامه کار تحت این شرایط انجام شد.



شکل ۳: تأثیر متقابل (A) وزن جاذب و حجم شوینده (B) وزن جاذب و زمان واجذب بر روی استخراج دیپیریدامول

#### ۴- ارقام شایستگی و ارزیابی روش

منحنی کالیبراسیون بدست آمده برای دیپیریدامول در محدوده غلظتی ۲۰۰-۰/۰۰۸ میکروگرم بر لیتر خطی بود و معادله خط آن به این صورت  $y = 20842x + 153186$  می باشد. در این رابطه،  $x$  غلظت دیپیریدامول بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر و  $y$  سطح زیر پیک می باشد.  $r$  بدست آمده برای منحنی نیز ۰/۹۹۸۶ می باشد. حد تشخیص و حد اندازه گیری روش نیز بر اساس روابط  $3S_b/m$  و  $10S_b/m$  به ترتیب معادل  $0.0027 \mu\text{g L}^{-1}$  و  $0.0087 \mu\text{g L}^{-1}$  بدست آمد. در ادامه برای بررسی دقت روش مقادیر انحراف استاندارد نسبی درون روز و بین روز در سه سطح غلظتی ۵، ۵۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر لیتر از محدوده خطی منحنی کالیبراسیون برای ۵ تکرار در یک روز و ۵ روز متوالی محاسبه گردیدند. پس از آماده سازی نمونه ها با غلظت های مشخص شده، استخراج میکرو پخشی دیپیریدامول به روش طراحی شده به وسیله نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  انجام و انحراف استانداردهای درون روز و بین روز هر دو کمتر از ۴٪ بدست آمد که این مقادیر موید دقت بسیار خوب روش ارایه شده برای استخراج و اندازه گیری آنالیت می باشد. همچنین در اینکار فاکتور پیش تغلیظ معادل با نسبت غلظت داروی دیپیریدامول قبل و بعد از استخراج نسبت شیب منحنی های کالیبراسیون بعد و قبل از پیش تغلیظ تعریف میشود. بر اساس آزمایشهای انجام شده مقدار این فاکتور معادل ۴۲۳ بدست آمد.

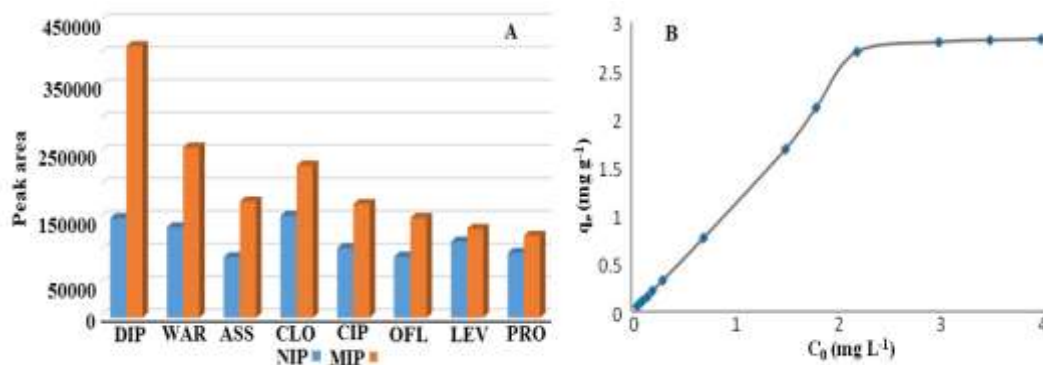
#### ۵- بررسی گزینش پذیری و ظرفیت جاذب

در سنتز پلیمرهای قالب مولکولی گزینش پذیری جاذب یک پارامتر اساسی می باشد که هر چه بالاتر باشد مزاحمت عوامل ناخواسته درون بافت نمونه های حقیقی در تعیین آنالیت کمتر خواهد بود و کارایی روش برای کاربرد در نمونه های پیچیده افزایش می یابد. بدین منظور برای بررسی خصوصیات گزینش پذیری جاذب تعدادی از داروها با ساختارهای مشابه و یا متفاوت با دیپیریدامول برای مقایسه در نظر گرفته شدند محلول ۳ میلی گرم بر میلی لیتر هر کدام از آنها تهیه گردید و تحت شرایط بهینه، یک بار با استفاده از نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$  و یک بار با استفاده از کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{NIP}$  به عنوان جاذب، پیش تغلیظ انجام شد. در شکل A-۷، تفاوت گزینش پذیری نانو

کامپوزیت مغناطیسی  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2/MIP$  نسبت به هر کدام از داروهای در نظر گرفته شده به خوبی مشاهده می-شود. نتایج نشان میدهد که، میزان استخراج توسط جاذب MIP به طور قابل توجهی بالاتر از NIP میباشد. این بدلیل این است که مولکولهای آنالیت راحت تر به حفرات حک شده در کامپوزیت قالب مولکولی وارد میشوند. اما بر هم کنشهای بین دیپیریدامول و  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2/MIP$  بطور عمده پیوندهای هیدروژنی، تعاملات دو قطبی- قطبی و برهمکنشهای الکترواستاتیک میباشد. اگرچه، ترکیبات دیگری که از نظر اندازه، شکل و نوع گروههای عاملی هیچ شباهتی به مولکول الگو و هدف ندارند به طور عمده توسط یک مکانیسم غیر اختصاصی جذب می شوند. در قسمت بعدی میزان ظرفیت جاذب نانو کامپوزیت مغناطیسی  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2/MIP$  برای جذب آنالیت دیپیریدامول مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که همانطور که در شکل ۷-B مشخص است غلظتهای مختلفی از آنالیت در گستره ۴/۰ - ۰/۰۰۵ میکروگرم بر لیتر تهیه شد و برای مدت زمان ۳۰ دقیقه به عنوان زمان تعادل در تماس با جاذب قرار داده شد. پس از انجام کامل فرایند استخراج مقدار آنالیت باقیمانده محاسبه شد و سپس به منظور بررسی ظرفیت جاذب از رابطه زیر استفاده گردید [۲۱].

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (1)$$

در این رابطه  $q_e$  ( $mg\ g^{-1}$ ): ظرفیت جاذب؛  $C_0$  ( $mg\ L^{-1}$ ): غلظت اولیه؛  $C_e$  ( $mg\ L^{-1}$ ): غلظت تعادلی؛  $V$  (L): حجم اولیه محلول و  $m$  (g): وزن جاذب میباشد. ظرفیت جاذب معادل ۲/۸۰ میلی گرم از آنالیت به ازای هر گرم از جاذب بدست آمد.



شکل ۷- بررسی (A) گزینش پذیری و (B) ظرفیت جاذب

## ۶- مطالعه صحت روش پیشنهادی

به منظور ارزیابی صحت روش و بررسی کارایی روش در نمونه های حقیقی، استخراج میکرو پخشی دیپیریدامول به روش طراحی شده به وسیله نانو کامپوزیت مغناطیسی  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2/MIP$  سنتز شده در نمونه های حقیقی پلاسما، سرم و نمونه قرص دیپیریدامول ۷۵ میلی گرمی پس از آماده سازی نمونه ها انجام شد [۱۵]. این بررسی با استفاده از روش

افزودن استاندارد صورت گرفت به همین منظور غلظتهای ۵، ۵۰ و ۱۵۰ میکرو گرم بر لیتر از آنالیت به حجمهای مشخصی از نمونه های حقیقی آماده شده افزوده شد. اندازه گیری ها به روش پیشنهادی صورت گرفت و شکل ۸ کروماتوگرام های مربوط به نمونه های اسپایک نشده را نشان میدهد. درصد های بازیابی با استفاده از رابطه زیر در رنج ۱۰۲-۹۳ بدست آمدند.

$$R(\%) = \frac{(C_{\text{found}} - C_{\text{real}})}{C_{\text{added}}} \times 100$$

که در معادله فوق  $C_{\text{real}}$  مقدار واقعی گونه در نمونه حقیقی می باشد.  $C_{\text{found}}$  مقدار اندازه گیری شده است و  $C_{\text{added}}$  مقدار اضافه شده می باشد. درصد های بازیابی بدست آمده به خوبی صحت روش ارایه شده را نشان میدهد. غلظت آنالیت اندازه گیری شده برای نمونه های حقیقی پلاسما و سرم به ترتیب  $0.34$  و  $0.31$   $\mu\text{g L}^{-1}$  می باشد.

جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه نمونه سرم و پلاسما با روش استخراج میکرو پختی دیپیریدامول با جاذب نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$

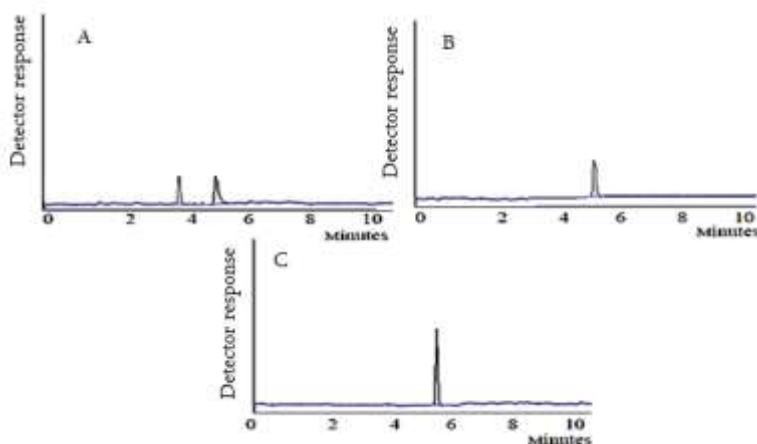
نمونه	Added ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Found ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	درصد بازیابی (%)	Ref. HPLC method [22]	RSD (%)
پلاسما*	۰	۰/۳۴	۰	۰/۳۵	۰
۱	۵	۵/۴۹	۱۰۲/۰	۵/۳۳	۳/۳
۲	۵۰	۴۹/۳۵	۹۸/۰	۴۹/۴۷	۲/۹
۳	۱۵۰	۱۴۵/۳۹	۹۷/۰	۱۴۵/۳۸	۳/۱
سرم*	۰	۰/۳۱	۰	۰/۳۳	۰
۱	۵	۴/۹۶	۹۳/۱	۴/۹۹	۲/۸
۲	۵۰	۴۷/۲۱	۹۳/۶	۴۷/۱۹	۲/۳
۳	۱۵۰	۱۴۸/۶۵	۹۸/۸	۱۴۸/۷۲	۲/۶

\*نمونه مربوط به یک بیمار مرد ۶۰ ساله، پس از یک هفته مصرف قرص ۲۵ میلی گرمی دیپیریدامول و در فواصل ۶ ساعتی

جدول ۳- داده های به دست آمده از آنالیز نمونه حقیقی قرص با روش استخراج میکرو پختی دیپیریدامول با جاذب نانو کامپوزیت مغناطیسی  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{MIP}$

نمونه	Added ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Found ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	درصد بازیابی (%)	Ref. HPLC method [22]	RSD (%)
قرص	۰	۹/۸	۰	۹/۷	۰
۱	۵	۱۴/۳۳	۹۲/۰	۱۴/۳۵	۴/۳
۲	۵۰	۶۰/۹	۱۰۱/۱	۶۰/۸	۴/۵
۳	۱۵۰	۱۵۶/۵۶	۹۸/۵	۱۵۶/۵۸	۵/۳

طبق محاسبات صورت گرفته، دوز قرص ۷۵ میلی گرمی دیپیریدامول از طریق این روش ۷۳/۵۰ میلی گرم به دست آمد.



شکل ۸ - کروماتوگرام مربوط به نمونه های اسپایک نشده (A) سرم (B) (پلازما C) قرص

## ۷- نتیجه گیری

در این پژوهش، ابتدا یک نانوکامپوزیت مغناطیسی پلیمر قالب مولکولی برای انالیت هدف تهیه شد. پس از آن طراحی آزمایش به روش ترکیب مرکزی برای بهینه سازی پارامترهای موثر بر استخراج فاز جامد میکرو پخشی دیپیریدامول با استفاده از نانو کامپوزیت مغناطیسی سنتز شده به کمک حلال های اتکتیک عمیق برای اندازه گیری در نمونه های حقیقی استفاده گردید. بکار بردن حلال های سبز در مقادیر بسیار کم به عنوان جایگزین برای حلال های سمی و آلاینده ی آلی و استفاده از خاصیت مغناطیسی جاذب برای جداسازی در کنار گزینش پذیری بسیار خوب جاذب همگی از مزایای عمده این روش پیشنهادی میباشند. این روش همچنین دارای حساسیت، صحت، دقت و تکرار پذیری بسیار خوبی میباشد. از دیگر مزایای این روش میتوان قابلیت کاربرد آن در نمونه های حقیقی با مقادیر بسیار کم و میکرو از قبیل نمونه های مختلف بیولوژیکی مثل نمونه خون یا پلازما را نام برد.

## ۸- تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تأمین هزینه های این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

## ۹- مراجع

- [1] M.Javanbakht, F. Fathollahi, F. Divsar, M. R.Ganjali & P. Norouzi, *Sens. Actuators B* **182** (2013) 362.
- [2] M. Rouhi, E. Pourbasheer, M. R. Ganjali, *Monatshefte für Chemie-Chemical* **146** (2015) 1593.
- [3] T. Qin, F. Qin, N. Li, S. Lu, W. Liu, F. Li, *Biomed. Chromatogr.* **24** (2010) 268.
- [4] N. Wang, F. Xu, Z. Zhang, C. Yang, X. Sun, J. Li, *Biomed. Chromatogr.* **22** (2008) 149.

- [5] M. S. Bahbouh, A. A. Salem, Y. M. Issa, *Microchim. Acta.* **128** (1998) 57.
- [6] A. F. Shoukry, N. T. Abdel Ghani, Y. M. Issa, O. A. Wahdan, *Anal. lett.* **34** (2001) 1689.
- [7] L. Wang, Z. Zhang, *Sens. Actuators B*, **133** (2008) 40.
- [8] R. Mirzajani, E. Arefiyan, *J. Braz. Chem. Soc.* **30** (2019) 1874
- [9] R. Mirzajani, N. Pourreza, J. Burromandpiroze, *Ultrason. Sonochem.*, **40** (2018) 101.
- [10] R. Mirzajani, M. Bagheban, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **96** (2016) 576.
- [11] Y. Li, C. Dong, J. Chu, J. Qi, X. Li, *Nanoscale* **3** (2011) 280.
- [12] R. Mirzajani, F. Kardani, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **122** (2016) 98.
- [13] P. Makoś, E. Słupek, J. Gębicki, *Microchem. J.* **152** (2020) 104384
- [14] M. mokhtarpor, Hemayat Shekaari, M. Taghi zafarani moatar, *J. of Applied Chemistry*, **15** (54) (2020) 289, in Persian.
- [15] R. Mirzajani, A. Keshavarz, *J. Iran. Chem. Soc.* **19** (2019) 2291
- [16] A. Asfaram, M. Ghaedi, S. Hajati, A. Goudarzi, *RSC. Adv.* **32** (2016) 418–503.
- [17] Gh. Rezanejade Bardajee, S. Azimi, M. Bagheri Agha Seyed Sharifi, *Microchem. J.* **133** (2017) 385.
- [18] A. Keramat, R. Zare-Dorabei, *Ultrason. Sonochem.* **38** (2017) 421.
- [19] E. Jannatdost, A. Tavakoli, R. Emamalisabzi, F. Kheiri, *J. of Applied Chemistry*, **15** (55) (2020) 81, in Persian.
- [20] F. Zhu, X. Yan, S. Liu, *Anal. Methods*, **7** (2015) 8740.
- [21] B. Feng, R.Y. Hong, L.S. Wang, L. Guo, H.Z. Li, J. Ding, Y. Zheng, D.G. Wei, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **328** (2008) 52.
- [22] J.A.M. Pulgarin, A.A. Molina, P.F. Lopez, *Anal. Biochem.* **245** (1997) 8.