

پیش تغلیظ و اندازه گیری دیازپام در نمونه‌های بیولوژیک و دارویی به روش میکرو

استخراج فاز جامد پخشی بر پایه نانو صفحات اکسید گرافن

نازیری میرزایی، ویدا رضایی، بهزاد آیباقی*

دانشکده شیمی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۳

تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۴/۰۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۸

چکیده

در این مقاله از اکسید گرافن به عنوان جاذب موثر در میکرواستخراج فاز جامد پخشی جهت پیش تغلیظ و اندازه گیری دیازپام استفاده شده است. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا جهت اندازه گیری آنالیت بکار برده شد. جهت اندازه گیری آنالیت استفاده شده است. آنالیزهای پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM) و FT-IR برای مشخصه یابی و تایید ویژگی های اکسید گرافن سنتز شده انجام شد. اثر متغیرهای مختلف بر پیش تغلیظ و اندازه گیری آنالیت مورد بررسی قرار گرفت و بهینه گردید. تحت شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون در محدوده $100 - ng mL^{-1}$ خطی (ضریب همبستگی 0.9998) و حد تشخیص روش پیشنهادی $0.20 ng mL^{-1}$ بدست آمد. مقادیر انحراف استاندارد نسبی ($n=8$) برای غلظت های $10 ng mL^{-1}$ و 80 به ترتیب 3.6% و 1.3% بدست آمد. این روش به عنوان روشی مناسب برای اندازه گیری دیازپام در نمونه های دارویی و پلاسمای خون مورد استفاده قرار گرفت.

کلمات کلیدی: دیازپام؛ میکرواستخراج فاز جامد پخشی؛ پیش تغلیظ؛ اکسید گرافن؛ HPLC.

۱- مقدمه

دیازپام یک داروی ضداضطراب، ضد تشنج، خواب آور، مسکن و شل کننده عضلات اسکلتی می باشد و معمولاً برای درمان اضطراب، بی خوابی، تشنج و صرع به کار می رود. استفاده ی نادرست و بیش از حد دیازپام منجر به وابستگی روانی یا اعتیاد دارویی می شود. در افرادی که الکل مصرف می کنند، میل به الکل را تشدید کرده و اثرات نامطلوب کوکائین و متامفتامین را افزایش می دهد [۱]. در صورت مصرف بیش از حد دیازپام، پس از گذشت مدت زمان ۴ ساعت علائمی چون خواب آلودگی، اغتشاشات ذهنی، افت فشار خون، اختلال در هماهنگی و تعادل، سرگیجه و اغما دیده می شود. دیازپام پس از جذب کامل و آسان از دستگاه گوارش، در کبد به میزان زیادی از طریق برداشت آلکیل از روی ازت و هیدروکسیله شدن دچار تغییرات شده و عمدتاً از طریق کلیه ها حذف می شود [۲]. دیازپام تاکنون به روشهای متفاوتی از قبیل مانند اسپکتروسکوپی فرابنفش - مرئی [۳-۶]، روش های فلوریمتری [۷،۸]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۹-۱۱]، کروماتوگرافی گازی [۱۲،۱۳]، کروماتوگرافی لایه نازک [۱۴]، روشهای پلاروگرافی [۱۵] و پتانسیومتری [۱۵] اندازه گیری شده است.

امروزه رقابت زیادی در زمینه بهبود حد تشخیص، افزایش دقت و کاهش هزینه‌ی روش‌های تجزیه‌ای وجود دارد. در نتیجه، یک مرحله آماده سازی و پیش تغلیظ جهت دستیابی به حد تشخیص پایین، رفع مزاحمت‌ها و تأمین یک روش قوی و تکرار پذیر که نسبت به بافت نمونه حساس نباشد لازم است. این روش‌های تجزیه‌ای باید از حلال‌های کمتری استفاده کرده و نمونه‌های تمیزتری را فراهم آورند تا دستگاه‌های تجزیه‌ای در مرحله نهایی کار بتوانند غلظت آنالیت را به درستی تعیین نمایند.

استخراج فاز جامد از جمله روش‌هایی است که برای استخراج و پیش تغلیظ نمونه‌های آلی و معدنی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است [۱۶-۱۸]. علیرغم تمام مزیت‌های برجسته روش استخراج فاز جامد این روش همچنان به مقادیر نسبتاً زیادی از حلال‌های معدنی یا آلی عمدتاً سمی و گران قیمت نیاز دارد. از این‌رو، اخیراً محققان شیمی تجزیه توسعه روش‌های میکرو استخراج فاز جامد را مد نظر قرار داده‌اند. از مزایای این روش‌ها می‌توان به سادگی و سرعت استخراج مناسب، فاکتور تغلیظ بالا، دستیابی به حد تشخیص پایین، کاهش حجم حلال استخراج کننده از میلی‌لیتر به میکرولیتر و قابلیت جفت شدن با سیستم‌های آنالیز اشاره کرد [۱۸]. یکی از روش‌های میکرو استخراج فاز جامد روش میکرو استخراج فاز جامد پخشی می‌باشد که به تازگی مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. در این روش مقدار کمی از یک فاز جامد مناسب در چند میلی‌لیتر محلول نمونه پخش گردیده و به سرعت نمونه را جذب می‌نماید در ادامه نمونه جذب شده به وسیله چند میکرولیتر از یک حلال مناسب واجذب گردیده و اندازه گیری می‌شود. در میکرو استخراج فاز جامد پخشی جاذب نقش مهمی داشته و اغلب از مواد نانو به عنوان جاذب استفاده می‌گردد. نانو صفحات اکسید گرافن (GO) به دلیل مساحت سطح زیاد، ظرفیت جذب بالا، هزینه کم و مقاومت شیمیایی و حرارتی بالا یکی از جاذب‌های مناسب برای میکرو استخراج فاز جامد پخشی می‌باشد [۱۹].

در مقاله پیش رو یک روش ساده و مؤثر برای استخراج و پیش تغلیظ مقادیر بسیار اندک دیازپام در نمونه‌های دارویی و بیولوژیک، بر پایه میکرو استخراج فاز جامد پخشی در حضور جاذب موثر گرافن اکساید، پیشنهاد شده است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و روشها

به جز دیازپام که از شرکت Fabbrica Italiana Sintetici (FIS) تهیه شده سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. کلیه مواد دارای درجه خلوص تجزیه ای بوده و بدون هرگونه خالص سازی اضافی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه فاز متحرک، از آب و متانل با درجه خلوص HPLC استفاده شد.

برای تهیه محلول استاندارد $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ دیازپام، مقدار 0.10 گرم دیازپام در مقدار کمی متانول حل گردید و در بالن حجمی 100 میلی‌لیتری توسط متانل به حجم رسانده شد. محلول‌های روزانه، از رقیق کردن این محلول بوسیله آب مقطر تهیه گردید. برای تهیه بافر فسفات $\text{pH}=6$ جهت تنظیم pH محلول نمونه و فاز متحرک از محلول‌های 0.05 مولار اسید

فسفریک و هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار در آب با درجه خلوص HPLC استفاده شد. جهت تهیه بافر به ۱۰۰ میلی لیتر محلول فسفریک اسید ذکر شده هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه گردید تا pH محلول به ۶ برسد.

۲-۲- دستگاهها و ابزار

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا KNAUER مجهز به آشکارساز UV-Vis و ستون C₁₈ (۲۵۰ × ۴/۶ mm) برای اندازه گیری دیازپام مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب درصد فازهای متحرک به صورت متانول : بافر فسفات pH=۶ (۷۰:۳۰) و با سرعت جریان 1 mL.min⁻¹ بود. و تمام اندازه گیری ها در طول موج ۲۵۴ nm انجام شد. مقادیر pH با استفاده از pH متر ۷۸۰ Metrohm اندازه گیری شد. برای توزین از ترازوی Sartorius AG Germany با دقت ± ۰/۰۰۰۱ استفاده گردید. جداسازی دو فاز توسط دستگاه سانتریفیوژ HERMLE Z-300 صورت گرفت. پراکندگی دو فاز جامد و مایع توسط دستگاه ورتکس IKA GENIUS انجام شد.

۲-۳- تهیه نانو صفحات اکسید گرافن به عنوان جاذب

برای تهیه اکسید گرافن از روش هامر [۲۰] استفاده شد. بدین صورت که ۲/۰۰ گرم پودر گرافیت با ۵/۰۰ گرم NaCl به مدت ۱۰ دقیقه در هاون ساییده شده تا کاملاً یکنواخت گردد. نمک NaCl با شستشو دادن و صاف کردن به وسیله کاغذ صافی خارج شد. گرافیت باقی مانده در یک بالن ۵۰۰ میلی لیتری به همراه ۵۰ میلی لیتر H₂SO₄ غلیظ و ۱/۵ گرم نیترات سدیم به مدت ۲ ساعت هم زده شد. سپس ۱۰/۰۰ گرم KMnO₄ بطور تدریجی به مخلوط در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی گراد افزوده شد. سپس مخلوط حاصل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت هم زده شد. پس از این مدت ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به آرامی به مخلوط اضافه و در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگه داشته شد. فرایند با اضافه کردن ۲۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۲۰ میلی لیتر H₂O₂ ۳۰٪ کامل می گردد. به منظور خالص سازی، مخلوط حاصل چند بار با محلول HCl ۱/۰ مولار و آب دو بار تقطیر، شستشو داده شده و در نهایت در آون خلاء خشک گردید. سپس یک سوسپانسیون پایدار (۳/۰ mg mL⁻¹) از نانو صفحات اکسید گرافن، بوسیله پخش پودر سنتز شده در آب مقطر به کمک امواج اولتراسونیک (۶۰ دقیقه) بدست آمد.

۲-۴- روش کار

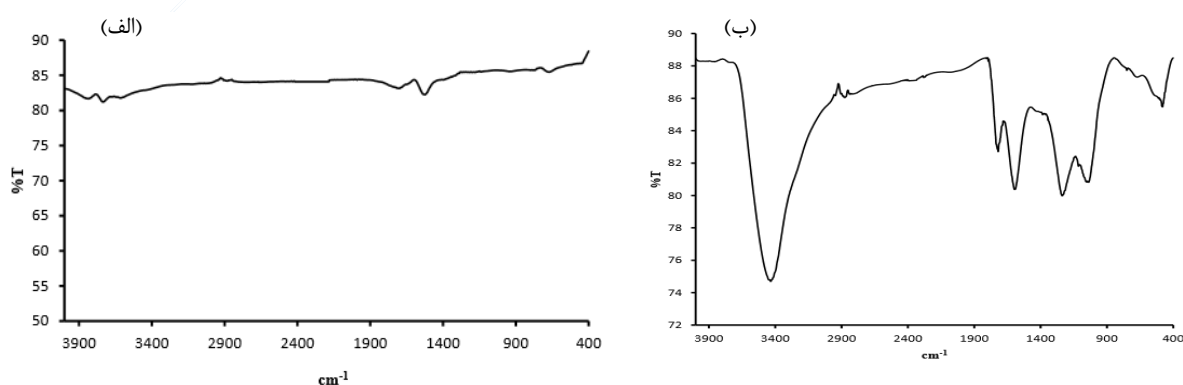
در بالن ۵ میلی لیتری مقدار مشخصی از دیازپام با غلظت مورد نظر به همراه ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۶ ریخته و بوسیله آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول فوق را همراه با ۶ میلی گرم از جاذب اکسید گرافن (۲ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده در بخش ۲-۳) به درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱/۵ دقیقه توسط دستگاه ورتکس تکان داده شد تا آنالیت هدف جذب شود. جهت لخته شدن سوسپانسیون، به لوله آزمایش فوق ۱ میلی لیتر محلول آلیکوات ۳۳۶ (w/v، ۰/۱) به عنوان

عامل لخته کننده افزوده و درون سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه و دور rpm ۳۵۰۰ قرار داده شد. سپس جهت تکمیل فرایند استخراج، پس از دکانته کردن به جاذب ته نشین شده ۱۰۰ میکرولیتر استونیتریل افزوده و به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه ورتکس تکان داده می شود تا واجذب آنالیت از سطح جاذب صورت گیرد. لوله آزمایش را مجدداً درون دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه و دور rpm ۳۵۰۰ گذاشته تا جاذب ته‌نشین شود. سپس ۲۰ میکرولیتر از فاز مایع استخراجی حاوی دیازپام توسط میکروسرنج کشیده و به دستگاه HPLC تزریق می‌گردد.

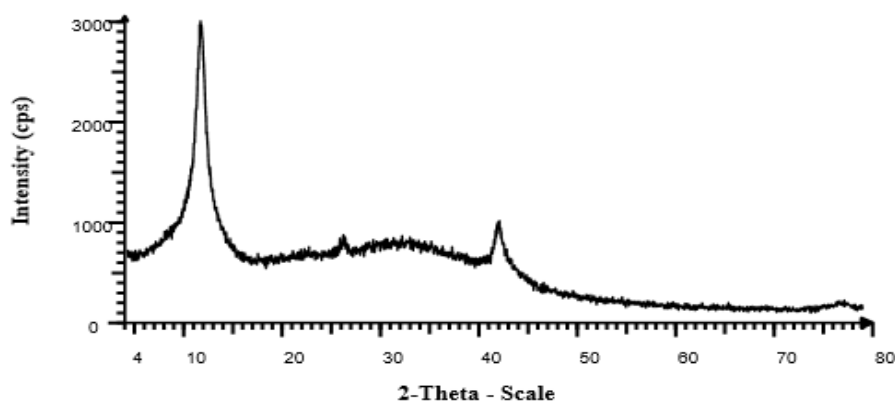
۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی اکسید گرافن

جهت اطمینان از تشکیل شدن اکسید گرافن از پودر حاصل طیف IR تهیه شد و با گزارشات قبلی مقایسه گردید [۲۱]. طیف‌های گرافیت و اکسید گرافن در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱-ب ملاحظه می‌شود با انجام فرایند اکسایش، ارتعاش پیوندهای کربن-اکسیژن شامل هیدروکسیل، اپوکسی، کربونیل و کربوکسیل ظاهر شده است. دو نوار ارتعاش کششی مربوط به پیوند C-O که متعلق به کربن متصل به گروه هیدروکسیل و کربوکسیل است، به ترتیب در ناحیه‌های ۱۰۴۱ و ۱۲۳۷ مشاهده می‌شود. نوار ارتعاش کششی مربوط به پیوند C=C متعلق به کربن‌های اکسید نشده در ناحیه ۱۵۹۵ و نوار ارتعاش کششی مربوط به پیوند C=O گروه کربوکسیل در ناحیه ۱۷۱۹ ملاحظه شد. همچنین یک ارتعاش قوی در ناحیه ۳۴۳۴ متعلق به ارتعاش کششی پیوند O-H نیز دیده شد که بیان‌گر تشکیل مقدار زیادی از گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار در نانو صفحات اکسید گرافن می‌باشد. با توجه به شکل ۱-الف در طیف IR مربوط به گرافیت هیچ نوار ارتعاشی مشاهده نشده است. همچنین طیف پراش پرتو ایکس (XRD) اکسید گرافن گرفته شد که در شکل ۲ نشان داده شده است. در الگوی پراش پرتو ایکس گرفته شده دو پیک مشخصه مربوط به اکسید گرافن در زاویه ۲θ برابر ۱۲/۰۱ و ۴۲/۲۴ درجه به وضوح مشاهده می‌شود که با مقادیر گزارش شده قبلی برای اکسید گرافن مطابقت دارد [۲۱].



شکل ۱: طیف IR (الف) گرافیت و (ب) اکسید گرافن

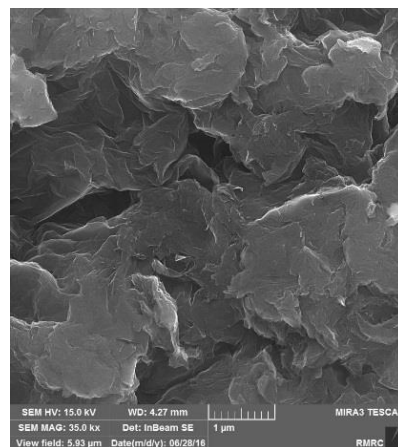
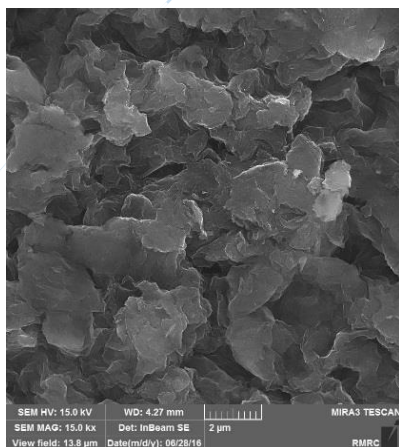


شکل ۲: طیف پراش پرتو ایکس اکسید گرافن

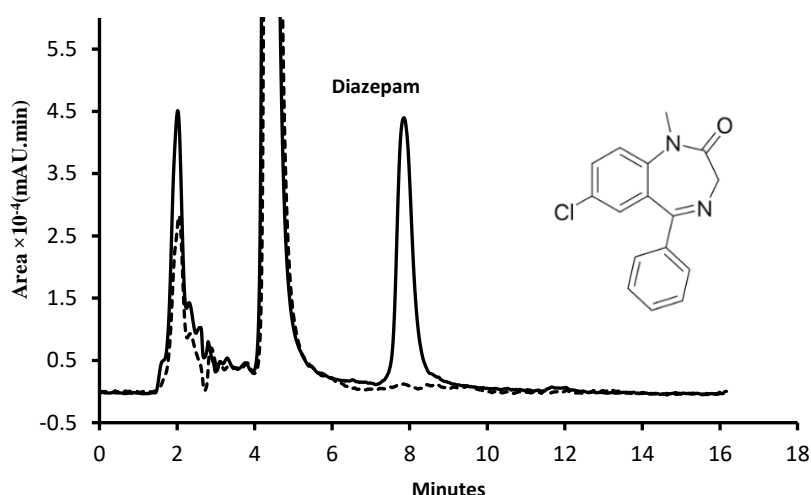
جهت بررسی مورفولوژی نانوصفحات اکسید گرافن، تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM) از پودر حاصل گرفته شد، که در شکل ۳ نشان داده شده است. تصاویر بدست آمده ساختار صفحه‌ای نانو صفحات اکسید گرافن را به خوبی نشان می‌دهند.

۳-۲- بهینه سازی شرایط

غلظت دیازپام پس از استخراج بو سیله تزریق به دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. در شکل ۴ کروماتوگرام محلول 100 ng mL^{-1} داروی دیازپام بعد از میکرواستخراج فاز جامد پخشی با استفاده از اکسید گرافن نشان داده شده است. پیک استخراجی دیازپام در زمان بازداری ۸ دقیقه مشاهده می‌شود. همچنین پیک مربوط به محلول شاهد نیز در شکل با نقطه‌چین مشخص شده است. به منظور دستیابی به بیشترین بازده استخراج، عوامل تجربی مهمی که می‌توانند بر قابلیت استخراج اثرگذار باشند، مانند نوع و حجم حلال استخراجی، pH محلول آنالیت، نوع بافر، حجم بافر، زمان جذب، زمان واجذب، مقدار جاذب و حجم حلال آلی مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۳: تصاویر SEM نانوصفحات اکسید گرافن



شکل ۴: کروماتوگرام دیازپام پس از پیش تغلیظ

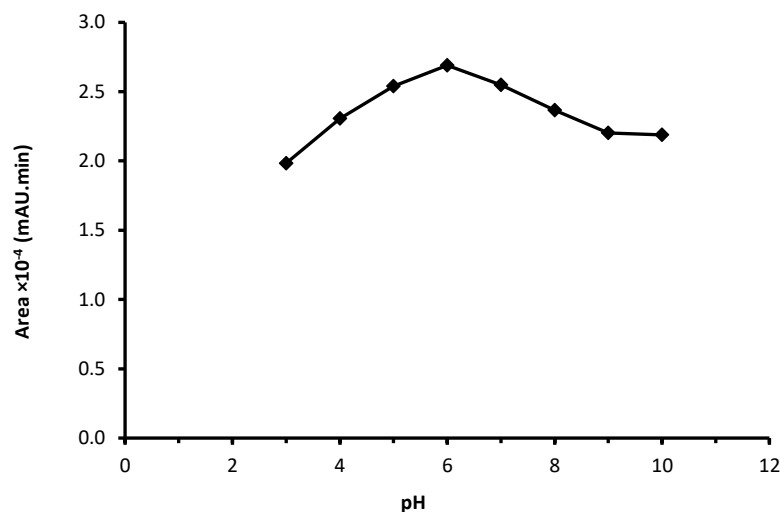
۱-۲-۳- انتخاب حلال واجذب

یکی از پارامترهای مهم در روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی انتخاب حلال واجذب مناسب است. حلال مورد استفاده در این روش باید توانایی واجذب بیشترین مقدار ترکیب مورد نظر را داشته باشد. در این تحقیق، برای انتخاب حلال استخراجی مناسب، در شرایط یکسان، حلالهای متانول استونیتریل و استون مورد بررسی قرار گرفتند که از میان آنها استونیتریل به دلیل نتایج و کارایی استخراجی بهتر به عنوان حلال واجذب انتخاب شد.

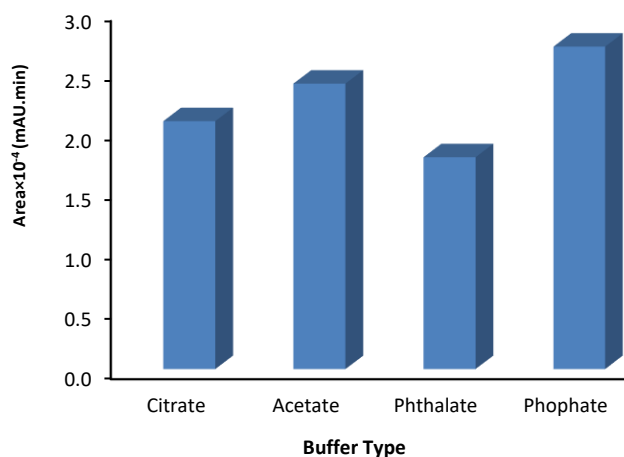
۲-۲-۳- بهینه‌سازی pH و نوع بافر

به منظور بررسی تاثیر pH بر کارایی روش میکرواستخراج ارایه شده، اثر pH محلول، در گستره ۱۰/۰-۳/۰ مورد بررسی قرار گرفت. تنظیم pH به وسیله افزایش محلول‌های رقیق اسید کلریدریک و سدیم هیدروکسید به محلول آنالیت انجام شد. نتایج به دست آمده در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به داده‌های حاصل، pH=۶ به عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید. تحت شرایط بهینه (pH=۶) اتم نیتروژن موجود در ساختار دیازپام پروتونه شده و بار مثبت می‌گیرد و گروه‌های کربوکسیلیک موجود بر روی سطح نانو صفحات اکسید گرافن دی‌پروتونه گشته و بار منفی می‌گیرند در این شرایط دو گونه قابلیت تشکیل زوج یون داشته و کارایی استخراج ماکزیمم است. در pH<۶ با افزایش غلظت یون هیدرونیوم گروه‌های کربوکسیلیک موجود بر روی سطح نانو صفحات اکسیدگرافن پروتونه شده و بار منفی خود را از دست می‌دهد و در pH>۶ به دلیل کاهش غلظت یون هیدرونیوم دیازپام دی‌پروتونه شده و بار مثبت خود را از دست می‌دهد. این پدیده‌ها موجب اختلال در تشکیل زوج یون گردیده و باعث کاهش کارایی استخراج میگردد.

در یک آزمایش دیگر اثر نوع بافر (pH=۶) بر کارایی روش پیشنهادی مورد بررسی گردید. نتایج به دست آمده (شکل ۶) نشان داد که بیشترین بازدهی استخراج بوسیله ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۶ به دست می‌آید.



شکل ۵: تاثیر pH محلول آنالیت بر استخراج دیازپام



شکل ۶: تاثیر نوع بافر بر کارایی استخراج

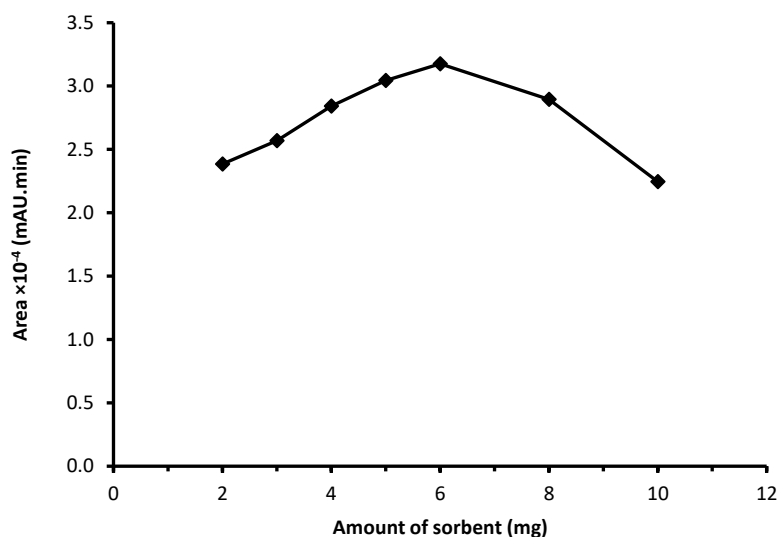
۳-۲-۳- بهینه سازی زمان جذب و واجذب

اصولا کوتاه بودن زمان استخراج نشان دهنده کارایی و توانمندی روش بوده و یک مزیت کلیدی برای آن روش محسوب می‌شود. زمان جذب در این روش عبارت است از مدت زمانی که جاذب بوسیله ورتکس در محلول پراکنده گردیده و آنالیت هدف را جذب می‌کند. این زمان بیانگر سرعت انتقال آنالیت از محلول نمونه به سطح جاذب می‌باشد. در این مرحله، سعی گردید برای کوتاه شدن زمان آنالیز کمترین زمان لازم جهت انتقال حداکثر آنالیت مورد نظر از درون محلول نمونه به سطح جاذب به عنوان زمان بهینه در نظر گرفته شود. جهت بررسی تأثیر زمان استخراج، در شرایط یکسان زمان‌های مختلف در بازه

۵-۵/۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در زمانهای بیش از ۱ دقیقه، زمان جذب تاثیر معنا داری بر راندمان استخراج ندارد که به خاطر سرعت بالای جذب آنالیت بر روی جاذب می‌باشد. در نتیجه جهت اطمینان از جذب کمی آنالیت و حصول نتایج تکرار پذیر زمان ۱/۵ دقیقه به عنوان زمان بهینه انتخاب گردید. در آزمایشی دیگر مدت زمانی که لازم است تا آنالیت توسط حلال واجذب (استونیتریل) از سطح جاذب جدا شود (زمان واجذب) بهینه گردید. بدین منظور در شرایط یکسان زمان‌های متفاوتی جهت واجذب آنالیت در محدوده ۵-۵/۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده زمان ۲ دقیقه به عنوان زمان بهینه انتخاب گردید.

۴-۲-۳- بهینه‌سازی مقدار جاذب

مقدار گرم جاذب از فاکتورهای مؤثر روی بازده استخراج می‌باشد. در صورتی که مقدار فاز ساکن کم باشد، آنالیت به خوبی روی فاز ساکن جذب نمی‌شود. از طرف دیگر، وجود مقدار اضافی از فاز ساکن ممکن است از جدا شدن آنالیت نگه داشته شده به وسیله حجم کمی از شوینده جلوگیری کند. بدین جهت مقادیر متفاوتی از جاذب به محلول نمونه اضافه شد و با ثابت نگه داشتن سایر شرایط استخراج، مساحت سطح زیر پیک دیازپام برای محلول‌های حاصل اندازه‌گیری و نتایج ثبت گردید. با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۷) مقدار ۶ mg به عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید.



شکل ۷: تأثیر مقدار جاذب بر استخراج دیازپام

۵-۲-۳- بهینه‌سازی مقدار عامل لخته کننده

در این تحقیق از آلکوات ۳۳۶ (متیل تری اکتیل آمونیوم کلرید) به عنوان عامل لخته ساز استفاده گردید. ترکیب مذکور یک نمک چهارتایی آمونیوم بوده و به عنوان یک سورفکتانت کاتیونی شناخته می‌شود این ترکیب می‌تواند با بار منفی گروه‌های

کربوکسیل موجود بر روی سطح نانو صفحات اکسید گرافن زوج یون تشکیل داده و منجر به لخته شدن و در نتیجه ته نشین شدن سریع آنها می‌گردد. برای بررسی تاثیر مقدار عامل لخته کننده بر نتایج مقادیر مختلفی از آلیکوات در محدوده ۰/۲-۲ میلی لیتر (w/v، ۰/۱) به مخلوط نمونه و جاذب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ و مرحله واجذب نتایج حاصل ثبت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار آلیکوات افزوده شده تاثیر معناداری بر روی سیگنال بدست آمده ندارد و تنها سرعت ته نشین شدن نانو صفحات اکسید گرافن را افزایش می‌دهد لذا ۱ میلی لیتر از محلول آلیکوات (w/v، ۰/۱) به عنوان حداقل مقدار لازم که برای لخته شدن GO مناسب است انتخاب گردید.

۶-۲-۳- بهینه سازی حجم حلال واجذب کننده

یکی دیگر از فاکتورهایی که روی کارایی استخراج تاثیر می‌گذارد حجم حلال آلی واجذب کننده است. جهت بررسی این فاکتور، مقدار حلال واجذب کننده در محدوده ۱۰۰-۳۵۰ میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده با افزایش حجم حلال واجذب کننده، مساحت زیر پیک گروماتوگرافی کاهش می‌یابد که این مسأله را می‌توان به دلیل رقیق شدن گونه استخراجی در حجم جمع آوری شده بیشتر حلال واجذب توجیه نمود. آزمایشات انجام شده نشان داد که حجمهای کمتر از ۱۰۰ میکرولیتر را نمی‌توان توسط میکرو سرنگ به صورت دقیق و تکرار پذیر جمع آوری نمود بنابراین بر اساس نتایج حاصل، حجم ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب گردید.

۷-۲-۳- اثر مزاحمت سایر یون ها

یکی از پارامترهای کلیدی که به شناخت توانایی روش تجزیه‌ای پیشنهادی کمک می‌کند، بررسی عملکرد روش در حضور گونه‌ها دیگر می‌باشد. با بررسی مزاحمت‌ها می‌توان به میزان گزینش پذیری یک روش پی‌برد. در واقع قابلیت روش، باید در حدی باشد که در میان انبوهی از گونه‌ها دیگر با غلظت‌های متفاوت بتواند آنالیت مورد نظر را به درستی اندازه‌گیری نماید. جهت بررسی این پارامتر، مزاحمت گونه‌های متفاوت بر استخراج 50 ng mL^{-1} دیازپام مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی اگر گونه مورد نظر بیش از ۵٪ خطا در اندازه‌گیری دیازپام ایجاد نماید، مزاحم تلقی می‌گردد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۱ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که روش ارائه شده در این مقاله از گزینش پذیری نسبتاً بالایی برخوردار می‌باشد.

۳-۳- ارقام شایستگی روش

پارامترهای تجزیه‌ای روش از قبیل حد تشخیص (LOD)، درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%)، ضریب همبستگی نمودار کالیبراسیون (r) و محدوده خطی جهت نشان دادن میزان اعتبار روش محاسبه گردید. در شرایط بهینه، منحنی کالیبراسیون روش در رنج غلظتی $1-100 \text{ ng mL}^{-1}$ خطی می‌باشد. معادله خط منحنی کالیبراسیون $C = 1966/2$

$A = 1050$ بوده و ضریب خطی آن $0/9998$ می‌باشد که در آن C غلظت دیازپام بر حسب $ng mL^{-1}$ و A مساحت سطح زیر پیک کروماتوگرافی بر حسب $mAU.min$ می‌باشد. حد تشخیص ($n=8$) روش $0/20 ng mL^{-1}$ به دست آمد که نشان دهنده حساسیت بالای روش در اندازه‌گیری دیازپام می‌باشد. تکرار پذیری روش نیز با محاسبه درصد انحراف استاندارد نسبی ($n=8$) بررسی شد که برای دو غلظت $10 ng mL^{-1}$ و 80 به ترتیب $3/6\%$ و $1/3\%$ بدست آمد.

جدول ۱: اثرگونه‌های مزاحم بر اندازه‌گیری دیازپام

گونه‌های مزاحم (X)	$\frac{[X]}{[A]}$
$K^+, Na^+, Zn^{2+}, SO_4^{2-}, Fe^{2+}, Br^-, S^{2-}, Sn^{2+}, Hg^{2+}, SCN^-, CH_3COO^-, Fe^{3+}, Urea, Cl^-, F^-, Ni^{2+}, Ca^{2+}$	*1000
$Cu^{2+}, Mg^{2+}, Pb^{2+}, Cr^{3+}, Cd^{2+}$	750
Al^{3+}, Ag^+	500

* حداکثر نسبت بررسی شده 1000 می‌باشد

۳-۴- فاکتور غنی‌سازی و شاخص مصرفی

فاکتور غنی‌سازی (EF) عبارت است از نسبت غلظت آنالیت در فاز تغلیظ شده (C_p) به غلظت اولیه آنالیت در نمونه (C_o).
 $EF = C_p / C_o$ [۲۲]. بر پایه این تعریف فاکتور غنی‌سازی روش ۴۶ بدست آمد.

شاخص مصرفی (CI) فاکتور دیگری است که برای بیان کیفیت روشهای پیش تغلیظ به کار می‌رود. شاخص مصرفی عبارت است از حجم از نمونه (mL) که فاکتور غنی‌سازی به میزان یک واحد تغییر دهد و بوسیله رابطه $CI = V_s / EF$ محاسبه میگردد [۲۳]، که در اینجا V_s حجم نمونه بر حسب میلی‌لیتر بوده و EF فاکتور غنی‌سازی روش میباشد. بر اساس این تعریف شاخص مصرفی روش $0/11$ میلی‌لیتر بدست آمد.

۳-۵- آنالیز نمونه‌های حقیقی

برای بررسی توانایی روش پیشنهادی جهت استخراج و اندازه‌گیری دیازپام در نمونه‌های حقیقی، این روش برای اندازه‌گیری دیازپام در نمونه‌های قرص و پلاسما مورد استفاده قرار گرفت.

برای آنالیز نمونه قرص، ۳ عدد قرص دیازپام (دارو سازی لقمان) حاوی ۲ میلی‌گرمی دیازپام در هاون خرد شده و مقدار معادل وزن یک عدد قرص از آن در ۳۰ میلی‌لیتر متانول حل گردید و پس از صاف کردن توسط کاغذ صافی، در یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد. پس از چند مرحله رقیق سازی با آب دوبار تقطیر محلولهایی با غلظتهای ذکر شده در جدول ۲ تهیه گردید و بوسیله روش پیشنهادی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج حاصل مقدار دیازپام در هر قرص $2/01 \pm 0/02$ بدست آمد.

برای اندازه‌گیری مقدار دیازپام در پلاسما از روش افزایش استاندارد استفاده شد. برای این منظور مقادیر مختلفی از دیازپام با سه غلظت اولیه متفاوت به پلاسما افزوده و روش پیشنهادی برای بازیابی دیازپام مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: اندازه‌گیری دیازپام در نمونه‌های حقیقی

نمونه حقیقی	غلظت دیازپام بر حسب ng mL^{-1}		درصد بازیابی
	اضافه شده	یافت شده	
قرص دیازپام	۰	$20/1 \pm 0/2^a$	-
	۲۰	$39/7 \pm 1/7$	۹۸/۰
	۴۰	$58/6 \pm 1/9$	۹۶/۳
	۶۰	$80/8 \pm 2/3$	۱۰۱/۲
پلاسما	۲۰	$19/8 \pm 0/8$	۹۹/۰
	۴۰	$40/2 \pm 1/0$	۱۰۰/۵
	۶۰	$60/2 \pm 1/3$	۱۰۰/۳

انحراف استاندارد \pm میانگین سه اندازه‌گیری ^a

۳-۶- مقایسه روش پیشنهادی با روش‌های گزارش شده پیشین

کارایی تجزیه‌ای روش میکرو استخراج فاز جامد پخشی بر پایه نانو صفحات اکسید گرافن برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری دیازپام با برخی از روش‌های گزارش شده قبلی مقایسه شد و نتایج در جدول ۳ خلاصه شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، روش پیشنهادی از نظر بسیاری از پارمترهای تجزیه‌ای از قبیل گستره خطی، ضریب همبستگی و حد تشخیص قابل مقایسه با (یا حتی بهتر از) بسیاری از روش‌های قبلی می‌باشد.

جدول ۳: مقایسه ویژگی‌های تجزیه‌ای روش پیشنهادی با روش‌های گزارش شده قبلی

منبع	بازیابی نسبی (%)	RSD (%)	رنج خطی (ng mL^{-1})	حد تشخیص (ng mL^{-1})	دستگاه	روش استخراج
[۱۲]	۱۰۵-۹۴	۸/۱۱-۳/۳	۵/۱۰۰۰-۰	۰/۵	GC-FID	SPME ^۱
[۲۴]	۹۵/۶	۲/۶-۶۳/۱۹	۱۵۰۰۰-۱۸۰	۵۲	HPLC-UV	VADSPE ^۲
[۲۵]	۱۰۰-۹۰	۱۹/۹	۱۰۰۰۰-۵۰	۵۰	PS-MS ^۴	LLE ^۳
[۱۱]	۹۲/۹۶-۳/۴	۴/۸	۶/۱۰۰۰۰-۰	۱/۵	HPLC-UV	DNUM ^۵
[۱۳]	-	<۱۵	۱۰/۱۰۰۰۰-۰	-	GC-MS	SPME
روش پیشنهادی	۹۶/۱۰۱-۳/۲	۱/۳-۳/۶	۱/۱۰۰۰-۰	۰/۲	HPLC-UV	DSPME

^۱ Solid phase microextraction

^۲ Vortex assisted dispersive solid phase microextraction

^۳ Liquid-liquid extraction

^۴ Paper spray mass spectrometry

^۵ Dispersive nanomaterial-ultrasound assisted microextraction

۴- نتیجه گیری

اکسید گرافن به عنوان جاذب در فرآیند میکرو استخراج فاز جامد پخشی به طور موفقیت آمیزی جهت پیش تغلیظ دیازپام در نمونه های پلاسما و قرص مورد استفاده قرار گرفت. روش پیشنهادی به دلیل مزایایی همچون دقت، گزینش پذیری، تکرارپذیری و حد تشخیص مطلوب، مصرف کم جاذب، زمان استخراج کوتاه، مصرف کم حلال آلی و در نتیجه سازگاری با محیط زیست، مورد توجه می باشد. از طرفی میکرو استخراج فاز جامد پخشی بر پایه گرافن اکساید روش مناسبی برای اندازه گیری غلظتهای ناچیز دیازپام در نمونه‌های دارویی و بیولوژیکی می باشد. نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه‌های پلاسما و قرص تایید کننده مطلب فوق است.

۵- قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه دامغان از این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

۶- مراجع

- [1] R. Balon, *Psychother. Psychosom.* **82** (2013) 353.
- [2] S.S. Chung, C. Schusse, Antiepileptic drugs, in: H.-H. Frey, D. Janz (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [3] R.D. Bautista, A.I. Jiménez, F. Jiménez, J.J. Arias, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15** (1996) 183.
- [4] W.F. El-Hawary, Y.M. Issa, A. Talat, *Int. J. Biomed. Sci.* **3** (2007) 50.
- [5] S.M. Khalile, M.A. Zayed, S.M. Abd Allah, *Egypt. J. Chem.* **47** (2004) 1.
- [6] C.F. Ferreyra, C.S. Ortiz, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29** (2002) 811.
- [7] J. Dolejsova, P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20** (1999) 357.
- [8] A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, *Anal. Chim. Acta.* **591** (2007) 112.
- [9] M.S. Aurora Prado, M. Steppe, M.F.M. Tavares, E.R.M. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37** (2005) 273.
- [10] S.N. Muchoh, B.R. Ogutu, C.R. Newton, G.O. Kokwar, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **761** (2001) 255.
- [11] A.A. Pebdani, S. Khodadoust, M.S. Talebianpoor H.R. Zargar, V. Zarezade *J. Chromatogr. B* **1008** (2016) 146.
- [12] R. Alizadeh, M. Salami, S. Seidi, *Microchim. Acta* (2018) DOI: 10.1007/s00604-018-2850-2.
- [13] M. H. De. Oliveira, M. E. C. Queiroz, D. Carvalho, S. M. Silva, F. M. Lanc, *Chromatographia* **62** (2005) 215.
- [14] M. Bakavoli, M. Kaykhaii, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31** (2003) 1185.
- [15] M.G. Garcia, A. Garcia, I. Gonzalez, *Talanta.* **40** (1993) 1775.

- [16] M. Rezaee1, F. Khalilian, M. Bahmani, M. Hosseinian, *JAC* **41** (2017) 99.
- [17] A. Mollahosseini, S. Abbasi, *JAC* **47** (2017) 263.
- [18] H. Saberi, T. Golbabazade, N. Amel, E. Asghari, Sh. Yousefzade, *JAC* **40** (2016) 133.
- [19] G. Islas, I.S. Ibarra, P. Hernandez, J.M. Miranda, A. Cepeda, *Int. J. Anal. Chem.* **2017** (2017) 1.
- [20] W.S. Hummers, R.E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 1339.
- [21] D.C. Marcano, D. V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, *ACS Nano.* **4** (2010) 4806.
- [22] H.M. Al-Saidi, A.A.A. Emara, *J. Saudi Chem. Soc.* **18** (2014) 745.
- [23] V.A. Lemos, J.S. Santos, P.X. Baliza, **17** (2006) 30.
- [24] F. Samadi, A.S. Yazdi, Z. Es' hagh, *J. Chromatogr. B* **1092** (2018) 58.
- [25] C. de Paula, M. Jurisch, E. Piccin, R. Augusti, *Drug Test. Anal.* (2018) **DOI: 10.1002/dta.2395**.

