

سنتز نانوکامپوزیت مغناطیسی مبتنی بر پلیمر قالب مولکولی و بررسی کارایی آن به

عنوان جاذب در آنالیز آنتی بیوتیک سفالکسین

شبنم پور کاظم، ملیحه امیرذهنی*

گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۷

تاریخ تصحیح: ۹۷/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۱۵

چکیده

هدف این مطالعه سنتز پلیمر قالب مولکولی با قدرت انتخابی سفالکسین می باشد. با انجام واکنش پلیمری شدن رادیکالی در حضور مولکول هدف: سفالکسین، مونومر عاملی: متاکریلیک اسید و اتصال دهنده عرضی: اتیلن گلیکول دی متاکریلات، شبکه‌ی سه بعدی پلیمرهای قالب مولکولی سنتز گردید. سپس طی فرایند استخراج، مولکول هدف جدا شده و بدین ترتیب شبکه پلیمری نانوحفره قالب دار شده تهیه شد. ویژگی پلیمرهای سنتز شده بوسیله طیف‌های مادون قرمز (FT-IR) و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج سفالکسین به روش استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده و اندازه‌گیری آن با تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام گرفت. بهینه‌سازی پارامترهای مختلف تاثیرگذار در استخراج، برای دستیابی به درصد بازیابی‌های بالا مورد مطالعه قرار گرفت. تحت شرایط بهینه، حد تشخیص ۰/۰۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، انحراف استاندارد نسبی ۳/۱۸٪ و منحنی کالیبراسیون در گستره ۰/۰۱-۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۹۶ تعیین شد. نتایج به دست آمده نشان دادند، این روش از بازده و تکرارپذیری بالا برای جداسازی و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز سفالکسین در نمونه‌های حقیقی برخوردار است.

کلمات کلیدی: پلیمر قالب مولکولی، سفالکسین، استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

۱- مقدمه

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و تخلیه‌ی آنها به محیط زیست پیامدهای جدی و خطرناکی به دنبال دارد، بنابراین اندازه‌گیری باقیمانده‌ی داروها در نمونه‌های محیطی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. سفالکسین با یک حلقه‌ی شش ضلعی دی هیدروتیازین و یک حلقه چهار ضلعی بتالاکتام در گروه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از نوع سفالوسپورین قرار گرفته است [۱]. این دارو با فرمول شیمیایی $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ و جرم مولکولی ۳۴۷/۳۹ گرم بر مول در درمان شماری از عفونت‌ها کاربرد دارد [۲]. حدود ۹۰-۳۰٪ آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن انسان و حیوانات متابولیزه نمی‌شوند و در نهایت از طریق ادرار و مدفوع به محیط زیست به شکل ترکیبات فعال وارد شده و به عنوان آلاینده‌های دارویی شناخته می‌شوند [۳]. کنترل آلاینده‌های دارویی در محیط زیست یکی از مسائل حاد زندگی امروزی بشمار می‌آیند [۴].

زندگی امروزی بشمار می‌آیند [۴] چرا که ورود آنها به طور مستقیم و غیرمستقیم به چرخه غذایی مقاومت دارویی و جهش میکروارگانیسم‌ها را ایجاد می‌کند که مخاطرات زیست محیطی و طبی زیادی را به دنبال دارد و ضروری است که تکنیک‌های موثر و کارآمدی برای اندازه‌گیری باقیمانده‌ی داروها در نمونه‌های محیطی به کار گرفته شود [۵].

با توجه به اهمیت اندازه‌گیری سفالکسین، استفاده از یک روش تجزیه‌ای حساس، تکرارپذیر و دقیق در نمونه‌های مختلف مورد نیاز است. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یکی از تکنیک‌های موثر و پرکاربرد در اندازه‌گیری داروها می‌باشد. با وجود کارایی بسیار بالای سیستم کروماتوگرافی، به علت پیچیدگی بافت نمونه‌های حقیقی و حد تشخیص پایین دستگاه، امکان اندازه‌گیری مستقیم دارو وجود ندارد، از این رو تعیین آنها در مقادیر کم نیازمند پیش‌تغلیظ قبل از اندازه‌گیری می‌باشد [۶]. یکی از راه‌های موثر برای این منظور روش استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده است که شکل جدیدی از استخراج فاز جامد براساس جاذب‌های مغناطیسی و جذب آنالیت‌ها تحت یک میدان مغناطیسی خارجی می‌باشد. پراکنده کردن جاذب‌های مغناطیسی به داخل محلول نمونه باعث افزایش سطح تماس آنالیت می‌شود. انتخاب جاذب مناسب جهت دستیابی به بیشترین بازایی و بالاترین فاکتور غنی‌سازی یک فاکتور حیاتی به شمار می‌رود [۷]. اخیراً استفاده از جاذب‌های مغناطیسی از جمله پلیمرهای قالب مولکولی مغناطیسی مورد توجه محققین قرار گرفته است.

پلیمریزاسیون توده‌ای در فرآیند قالب‌گیری مولکولی، آرایشی از مونومرهای دارای گروه‌های فعال در اطراف یک ترکیب هدف است که این آرایش به وسیله مونومرهای اتصال دهنده در محلول محکم و ثابت می‌شود. واکنش پلیمریزاسیون در حضور یک آغازگر انجام می‌گیرد. با جدا کردن مولکول هدف از ماتریکس پلیمری، جایگاه‌های اتصال اشغال نشده‌ای ایجاد می‌شود که قابلیت تشخیص و شناسایی را داشته و خاصیت انتخابی از پیش طراحی شده‌ای برای آن مولکول و ترکیبات مشابه آن به لحاظ ساختمانی از خود نشان می‌دهد که هیبرید آن با نانوذرات مغناطیسی، ایجاد پلیمرهای قالب مولکولی مغناطیسی می‌کند. این مولکول‌ها علاوه بر توانایی‌هایی نظیر نوع اتصال خاص، پایداری مکانیکی / شیمیایی، ظرفیت جذب بالا و سریع و کم‌هزینه بودن دارای موقعیت انتخابی خاصی بوده و گزینش‌پذیری مناسبی دارند، زیرا نسبت به مواد مشابه، برهمکنش قوی‌تری با مولکول هدف دارند [۸].

در این تحقیق ابتدا نانولوله‌های مغناطیسی دوپه شده با نانوذرات طلا بر پایه پلیمر قالب مولکولی سنتز شد. سپس شناسایی ساختار شیمیایی توسط طیف‌سنجی مادون قرمز و مشخصات مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد. کاربرد این ذرات سنتز شده به عنوان جاذب برای استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده مورد بررسی قرار گرفت و پارامترهای موثر بر روش استخراج بهینه شدند، روش پیشنهادی در استخراج سفالکسین از نمونه‌های حقیقی به کار گرفته شده و آنالیت مورد نظر توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آنالیز شد.

۲- بخش تجربی

۲-۱ مواد شیمیایی

تمامی مواد شیمیایی دارای خلوص تجزیه‌ای بوده و حلال‌ها با خلوص HPLC استفاده شدند. محلول مادر ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ با حل کردن مقدار مناسب از پودر خالص آن در آب مقطر و رقیق‌سازی تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر تهیه گردید. سپس از طریق روش رقیق سازی متوالی سایر محلول‌ها تهیه شدند. محلول مادر Au (۰/۰۱ مولار)، از حل کردن ۰/۱۹۷ گرم $HAuCl_4.3H_2O$ در آب مقطر و رقیق‌سازی تا حجم ۵۰ میلی لیتر تهیه گردید. از آب مقطر دوبار تقطیر در طول آزمایش استفاده شد.

۲-۲ دستگاه‌ها

جداسازی و اندازه‌گیری داروی سفالکسین توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل ۶۰۰ series ساخت شرکت Perkin-Elmer امریکا انجام شد، این دستگاه به یک پمپ مدل ۲۰۰ series با چهار ورودی حلال و محل تزریق شامل یک لوپ با گنجایش ۲۰ میکرولیتر و آشکارساز UV-Vis مدل ۲۰۰ series در گستره طول موجی قابل تنظیم از ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر مجهز شده است. ستون فاز معکوس C_{18} (طول ۲۵۰ میلی متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی متر، ذرات پرکننده ۵ میکرومتر) استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل:آب با نسبت ۲۰:۸۰ استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک روی ۱ میلی لیتر بر دقیقه تنظیم و طول موج آشکارسازی ۲۶۲ نانومتر انتخاب گردید.

۲-۳ سنتز جاذب

۲-۳-۱ سنتز نانولوله‌های کربنی مغناطیسی (MCNTs) و عاملدار کردن (MCNTs-3-MPTS)

انحلال ۰/۱۵ گرم از $FeCl_3.6H_2O$ و ۰/۱۰۵ گرم $FeCl_2.4H_2O$ در ۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر تحت گاز N_2 در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انجام شد. ۰/۱۵ گرم از CNTs به محلول تحت اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه وارد نموده و با NH_3 غلیظ pH نهایی محلول در ۹ تنظیم گردید. برای رشد کریستال‌ها واکنش در دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت توسط همزن مغناطیسی انجام شد. MCNTs سنتز شده [۹] توسط دکانتاسیون جداسازی شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در آون خشک شد. سپس ۰/۱۵ گرم از آن در ۴۰ میلی لیتر $C_6H_5CH_3$ به مدت ۱ ساعت تحت همزن مغناطیسی پخش گردید و ۴/۵ میلی لیتر $SSiC_6H_{16}O_3$ به آن اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۸ ساعت تحت دمای ۱۰۳ درجه‌ی سانتی‌گراد رفلکس شد. نانولوله‌های کربنی مغناطیسی عاملدار سنتز شده [۱۰] به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در آون خشک شدند.

۲-۳-۲ سنتز نانو ذرات طلا و نانولوله‌های کربنی مغناطیسی دوبه شده با نانوذرات طلا (نانو کامپوزیت) (MCNTs@AuNPs)

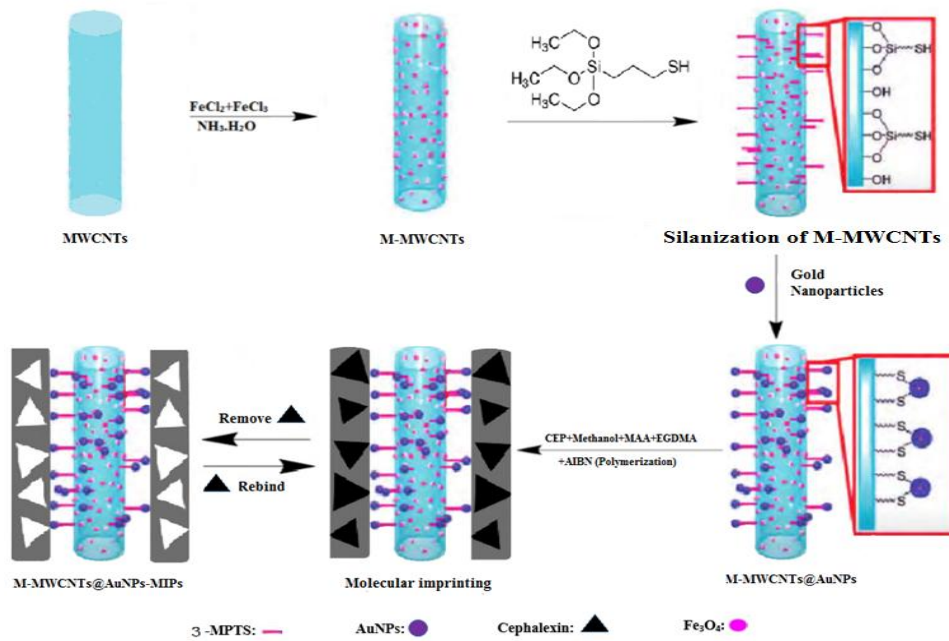
برای سنتز نانوذرات طلا (AuNPs) [۱۱]، ۴ میلی لیتر محلول ۰/۰۱ مولار Au با ۱۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر تا رسیدن دما به ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت هیتر و همزن مغناطیسی حرارت داده شد. سپس ۳/۵ میلی لیتر $C_6H_5Na_3O_7$ ۱٪ افزوده شد پس از تشکیل نانوذرات طلا محلول تحت دمای محیط قرار گرفت و یک حالت کلوئیدی تشکیل شد. جهت دوبه کردن نانوذرات طلا به نانوکامپوزیت مغناطیسی، نانولوله‌های مغناطیسی سیلانه شده با ۲۲/۵ میلی لیتر AuNPs به مدت زمان ۲ ساعت تحت همزن مغناطیسی قرار گرفت. محلول بی‌رنگ بدست آمده صاف شده و در آن تحت دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک گردید.

۲-۳-۲ سنتز نانوکامپوزیت-پلیمر قالب مولکولی (MCNTs@AuNPs-MIP)

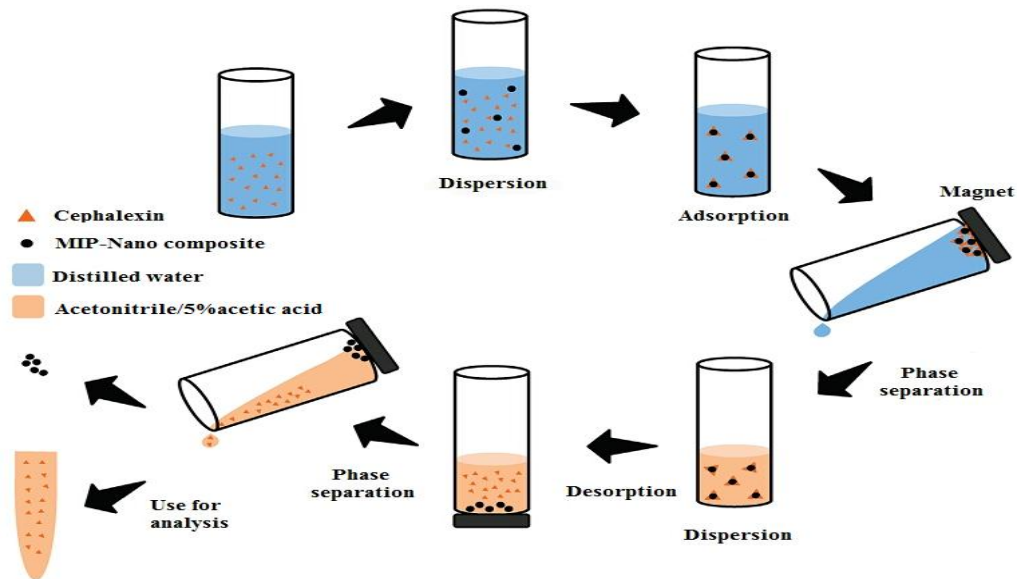
برای سنتز پلیمر قالب مولکولی، ۰/۱۸ گرم نانوکامپوزیت با ۴۰ میلی لیتر CH_3OH به مدت ۱۵ دقیقه تحت اولتراسونیک قرار گرفت. ۰/۲ میلی مول (۰/۰۷ گرم) مولکول هدف $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ به محلول سوسپانسیون افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت همزن مغناطیسی قرار گرفت. ۰/۰۷ میلی لیتر مونومر عاملی $C_4H_6O_2$ ، ۰/۷۷ میلی لیتر اتصال دهنده عرضی $C_{10}H_{14}O_4$ و ۱ گرم آغازگر $C_8H_{12}N_4$ به سوسپانسیون اضافه گردید. پلیمریزاسیون توسط حرارت‌دهی مخلوط فوق در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد شروع و پلیمریزاسیون در مدت ۲۴ ساعت تحت دمای فوق کامل گردید. برای حذف مولکول‌های سفالکسین از پلیمرهای قالب مولکولی سنتز شده، پلیمرها با محلول $COOHCH_3 - CH_3OH$ به نسبت حجمی (۳:۷) تحت شستشوی کامل قرار گرفتند. سپس ذرات پلیمر با CH_3OH خالص شسته شده و در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند. شکل ۱ تصویر شماتیکی از فرایند پلیمریزاسیون انجام شده را نشان می‌دهد.

۲-۴ استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده

۲۵ میلی لیتر محلول آبی حاوی سفالکسین با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر (pH= ۴) و نمک NaCl ۵٪ به بشر ریخته شد. سپس ۰/۰۱ گرم پلیمر قالب مولکولی به عنوان جاذب به محلول اضافه گردید. محلول حاصل در لوله آزمایش به منظور استخراج آنالیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت اولتراسونیک قرار گرفت. جاذب حاوی آنالیت توسط آهنربا جداسازی شد. سپس جاذب فوق در لوله آزمایش مجزا در مجاورت ۲/۵ میلی لیتر CH_3CN حاوی ۵٪ $COOHCH_3$ به عنوان حلال واجذبی قرار گرفت. جهت واجذبی، محلول بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد و جاذب از محلول توسط آهنربا جداسازی گردید. در نهایت محلول رویی به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت آنالیز تزریق شد. تصویر شماتیکی از فرایند استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱- تصویر شماتیک از فرآیند پلیمریزاسیون



شکل ۲- تصویر شماتیک از فرآیند استخراج فاز جامد مغناطیسی پخش شده

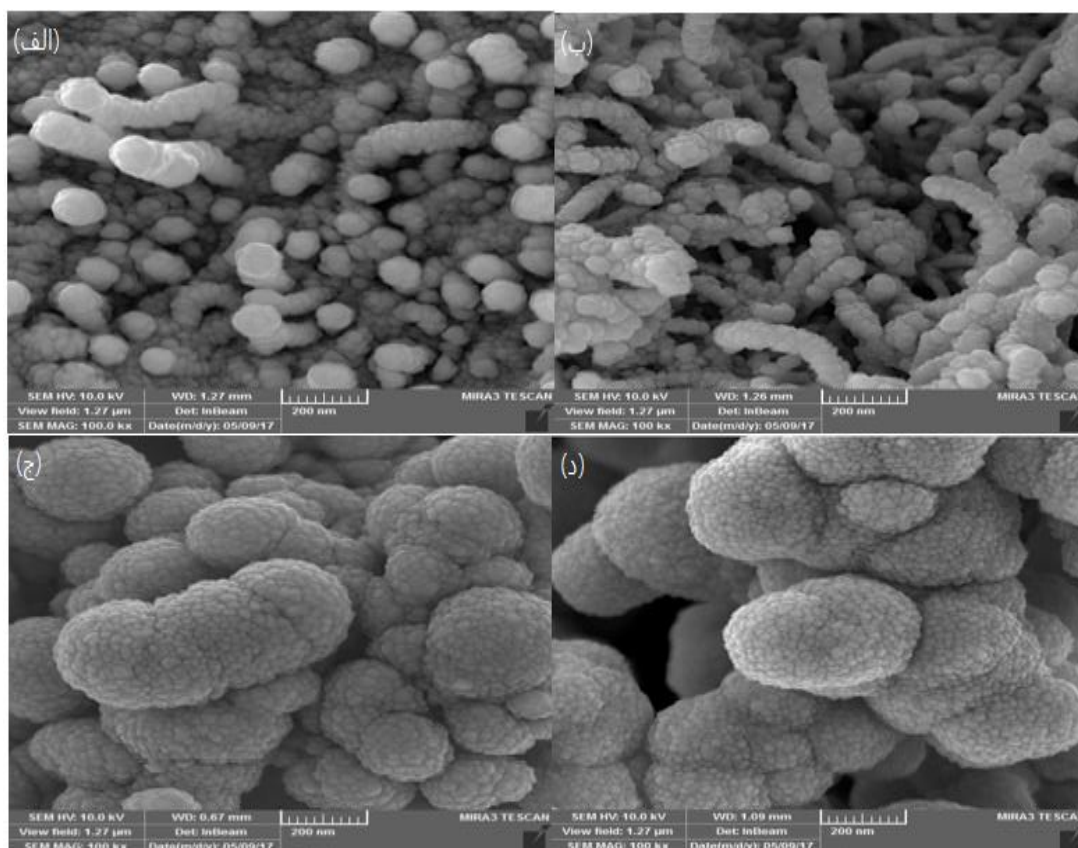
۳- بحث و نتایج

۳-۱ بررسی خصوصیات مراحل سنتز نانو کامپوزیت مغناطیسی-پلیمر قالب مولکولی

۳-۱-۱ بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مورفولوژی سطح نانولوله‌های کربنی مغناطیسی، سیلانه شده، دوپه شده و MIP سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۳-الف مشاهده می‌گردد که متوسط قطر نانولوله‌های بدست آمده در محدوده ۷۰-۱۰۰

نانومتر می‌باشد و سطح نانولوله‌های کربنی بخوبی توسط ذرات اکسید آهن پوشش داده شده است. در شکل ۳-ب تصاویر SEM نانولوله‌های کربنی مغناطیسی سیلانه شده را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود 3-MPTS سطوح نانولوله‌های مغناطیسی را پوشانده است. برای تثبیت نانوذرات مغناطیسی برهنه در برابر تخریب در طول یا بعد از فرآیندهای تولید از سیلیس استفاده شد. شکل ۳-ج پوشش یکنواخت نانوذرات طلا به سطح نانوکامپوزیت مغناطیسی MCNTs-3-MPTS را نشان می‌دهد.



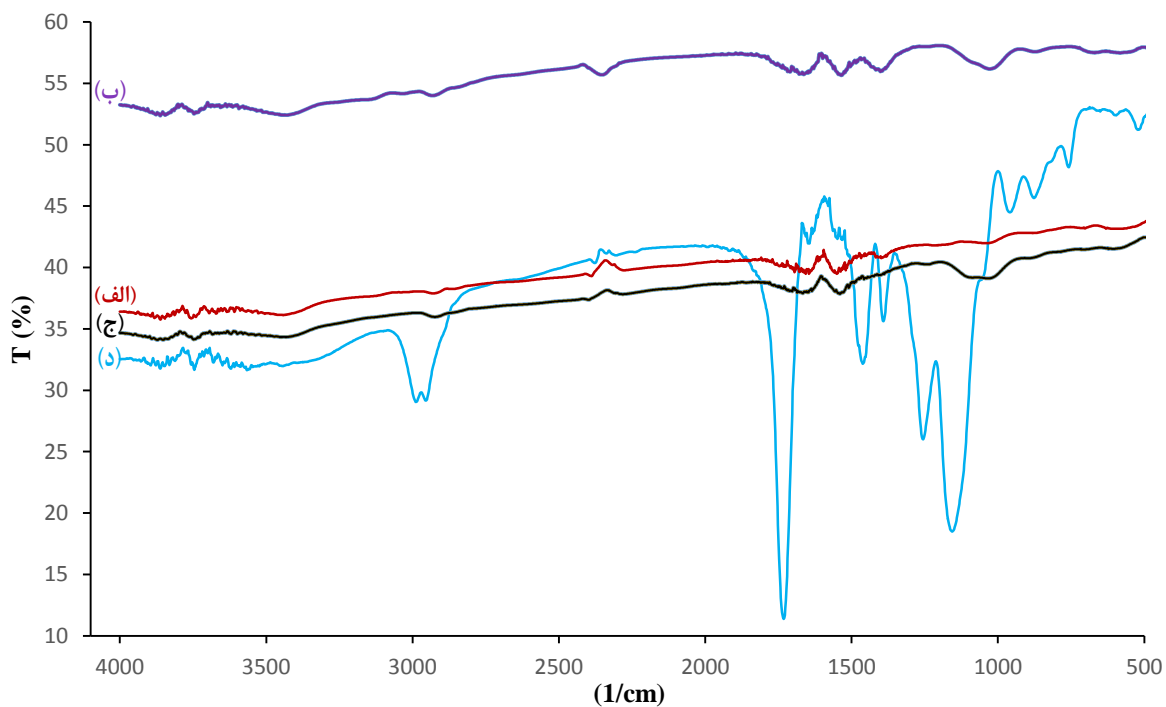
شکل ۳- تصاویر SEM مربوط به مراحل سنتز جاذب (الف) MCNTs (ب) MCNTs-3-MPTS (ج) MCNTs@AuNPs (د) MCNTs@AuNPs-MIP

حضور AuNPs باعث پایداری، تقویت و استحکام نانو کامپوزیت و همچنین باعث توسعه و پیشرفت انتقال الکترون می‌شود که به رسانایی بالا و سطح ویژه‌ی بزرگ نانوذرات طلا نسبت داده می‌شود. شکل ۳-د نانوکامپوزیت پوشش داده شده با MIP را نشان می‌دهد.

۳-۱-۲ بررسی طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)

برای شناسایی گروه‌های عاملی مراحل مختلف سنتز از طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه استفاده شد [۱۲]. در شکل ۴-الف پیک های موجود در فرکانس‌های $556/38 \text{ cm}^{-1}$ ، $1650/95 \text{ cm}^{-1}$ ، $2935/46 \text{ cm}^{-1}$ و $3446/56 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به پیوند (Fe - O)، (C = C -)، $(\text{C-H}) \text{ sp}^3$ و $(\text{C-H}) \text{ sp}^2$ می‌باشد [۱۳]. در شکل ۴-ب پیک‌های موجود در فرکانس‌های $435/88 \text{ cm}^{-1}$ ، $873/69 \text{ cm}^{-1}$ و $1027/99 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به ارتعاشات خمشی، ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن شبکه

(Si - O - Si) می‌باشند. پیک با فرکانس $2933/53 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده ارتعاشات متقارن و نامتقارن (Si - OCH_3) می‌باشد. همچنین، به ترتیب پیک‌هایی با فرکانس $723/26 \text{ cm}^{-1}$ ، $977/84 \text{ cm}^{-1}$ و $2352/99 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده پیوند خمشی (Si - O)، پیوند کششی (Si - OH) و پیوند کششی (Si - C) می‌باشد. پیک با فرکانس $1242/07 \text{ cm}^{-1}$ نیز نشان دهنده ارتعاش کششی پیوند (Si - O - C) و پیک ضعیف با فرکانس $2381/92 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند (-SH) می‌باشد [۱۳].



شکل ۴- تصاویر FT-IR مربوط به مراحل سنتز جاذب (الف) MCNTs (ب) MCNTs-3-MPTS (ج) MCNTs@AuNPs (د) MCNTs@AuNPs-MIP

در شکل ۴-ج پیک ضعیف با فرکانس $2381/92 \text{ cm}^{-1}$ موجود در طیف FT-IR نانولوله‌های کربنی مغناطیسی سیلان شده، در طیف FT-IR نانولوله‌های مغناطیسی دوپه شده با نانوذرات طلا کاملاً محو شده است که علت آن اتصال نانوذرات طلا به سطح نانولوله‌های کربنی مغناطیسی از طریق پیوند کوالانسی و پیوند (Au - S) می‌باشد. در شکل ۴-د پیک‌ها با فرکانس $1155/28 \text{ cm}^{-1}$ و $1257/50 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب نشان دهنده پیوند (C - O - C) و (C - O) می‌باشند. پیک با فرکانس $3442/70 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به کربوکسیلیک اسید می‌باشد و پیک با فرکانس $2987/53 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات متقارن و نامتقارن (C - H) می‌باشد. پیک با فرکانس $1731/96 \text{ cm}^{-1}$ که تمام پیک‌های قبلی را پوشانده است مربوط به کربونیل پلیمر می‌باشد [۱۴].

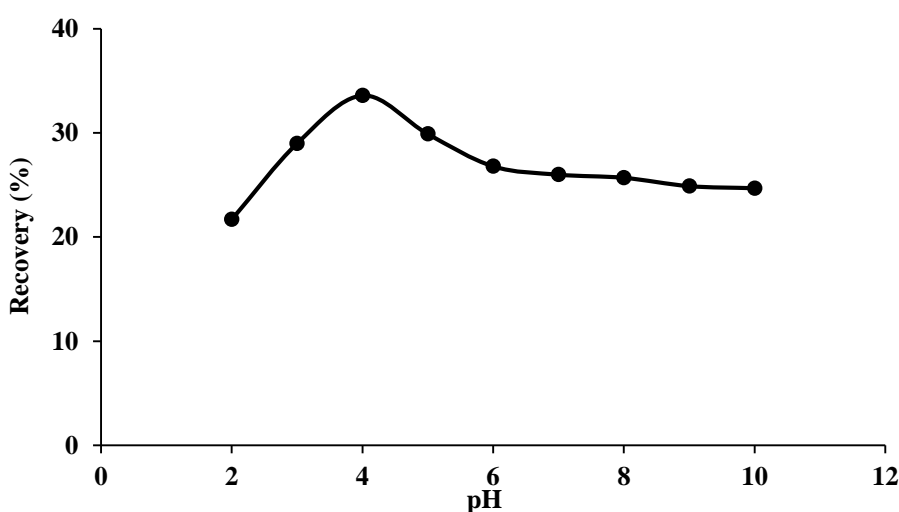
۲-۳ بررسی و بهینه‌سازی عوامل موثر بر فرآیند استخراج آنتی‌بیوتیک سفالکسین

استخراج مستلزم استفاده از شرایطی است که بیش‌ترین درصد بازیابی را امکان‌پذیر سازد. لذا، در کار حاضر پارامترهای متعددی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی‌ها از روش بهینه‌سازی تک پارامتری (یک پارامتر در یک زمان) استفاده شد. هدف از بهینه‌سازی این پارامترها، حصول بهترین شرایط کاری است که براساس آن حساسیت اندازه‌گیری و راندمان استخراج افزایش

یابد، حد تشخیص روش بهبود پیدا کرده و تا حد امکان کم شود. در این بررسی‌ها از روش بهینه‌سازی تک پارامتری (یک پارامتر در یک زمان) استفاده شد.

۳-۲-۱ بهینه‌سازی pH استخراج

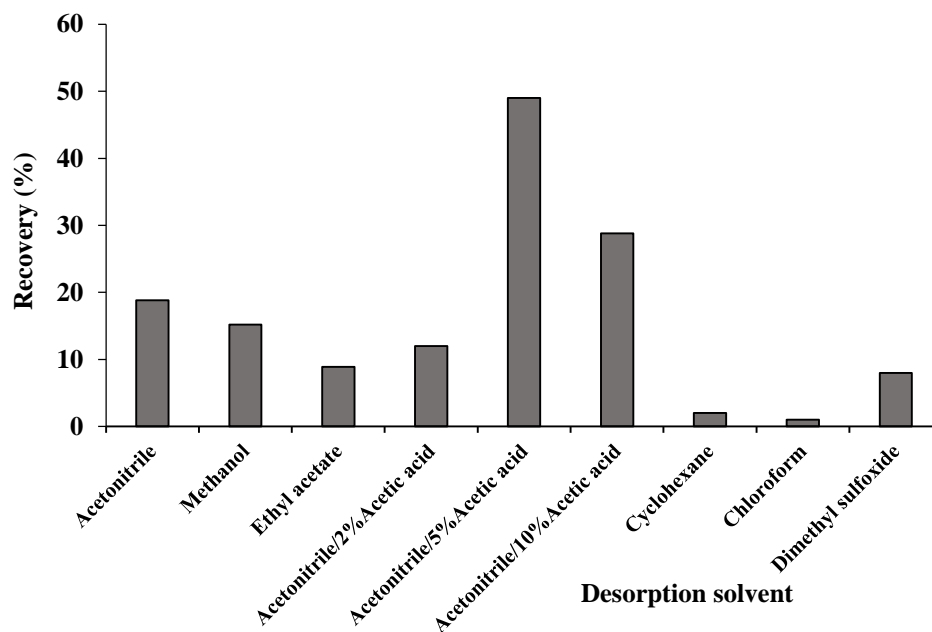
مولکول‌های سفالکسین طبیعتی آمفوتریک داشته و دارای نقطه ایزوالکتریک برابر با ۴/۳ است. بالاترین بازدهی استخراج سفالکسین در pH برابر ۴ بوده که به pH نقطه ایزوالکتریک نزدیک است و این بیان می‌کند که مولکول‌های سفالکسین در حالت خنثی بر روی جایگاه‌های فعال روی سطح جاذب جذب شده‌اند. طبق شکل ۵، در pHهای ۲ و ۳ بخش عمده‌ی مولکول‌های سفالکسین پروتونه هستند (اتم‌های نیتروژن، گروه‌های آمین و آمید) در این شرایط نیروهای دافعه بین گروه‌های پروتونه و سطح دارای بار مثبت جاذب بازدهی استخراج را کاهش می‌دهد. ملاحظه می‌شود با افزایش pH از ۲ تا ۴ بازدهی استخراج افزایش پیدا کرده است، این روند به دلیل تغییر گروه‌های کربوکسیل موجود در ساختار مولکولی سفالکسین به کربوکسیلات بوده که متعاقب آن جاذبه بین مولکول‌های آنیونی سفالکسین و سطح دارای بار مثبت جاذب افزایش یافته و بنابراین بازدهی استخراج افزایش یافته است. از سوی دیگر کاهش بازدهی استخراج در pHهای قلیایی می‌تواند ناشی از دافعه بین جفت الکترون‌های آزاد آمین، آمید و کربوکسیلات و سطح دارای بار منفی جاذب باشد [۱۵].



شکل ۵- تاثیر pH بر بازیابی سفالکسین، ۲۵ میلی‌لیتر نمونه شامل ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سفالکسین، ۱۰ میلی‌گرم پلیمر قالب مولکولی

۳-۲-۲ بهینه‌سازی حلال واجذبی

انتخاب یک شوینده مناسب در عملکرد تجزیه‌ای فرآیند استخراج از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. حلال واجذبی انتخاب شده باید با فاز جامد سازگاری داشته و به آن آسیبی نرساند و توانایی بالایی برای استخراج ترکیبات داشته باشد.

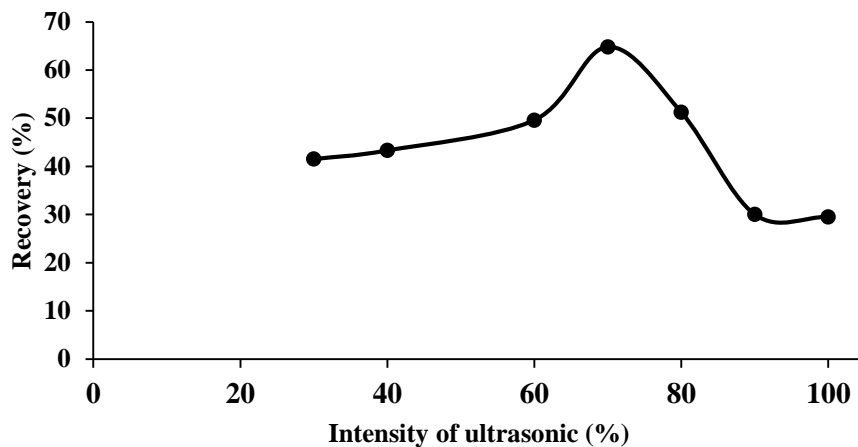


شکل ۶- تاثیر حلال واجذبی بر بازیابی سفالکسین، ۲۵ میلی لیتر نمونه شامل ۲ میکروگرم بر میلی لیتر سفالکسین، ۱۰ میلی گرم پلیمر قالب مولکولی، $pH=4$

به منظور انتخاب یک شوینده مناسب، ۲۵ میلی لیتر محلول نمونه حاوی ۲ میکروگرم بر میلی لیتر سفالکسین به داخل ظرف منتقل نموده، ۱۰ میلی گرم جاذب مغناطیسی در آن ریخته و pH حدود ۴ تنظیم شد. به منظور مطالعه فرایند واجذبی، ۲/۵ میلی لیتر از شوینده‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶)، که از بین شوینده‌های آزمایش شده، استونیتریل حاوی ۵٪ استیک اسید در مقایسه با دیگر حلال‌ها بیشترین واجذب را داشت.

۳-۲-۳ بهینه‌سازی شدت اولتراسونیک

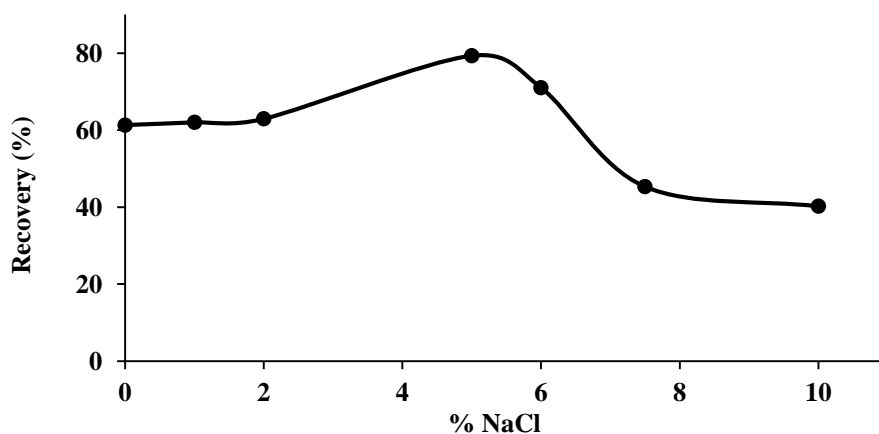
مطابق شکل ۷ در خصوص بررسی تاثیر شدت اولتراسونیک در استخراج، امواج اولتراسونیک با فرکانس ثابت ۳۷ کیلوهرتز در دمای محیط تحت شدت‌های صوت مختلف قرار گرفت. با افزایش شدت صوت تا ۷۰٪، درصد بازیابی به خاطر افزایش سرعت و برخورد موثر جاذب و آنالیت افزایش می‌یابد اما در شدت‌های بالای ۷۰٪ بدلیل افزایش بیش از حد سرعت، برخوردها و جهت‌گیری‌های موثر و کارا کاهش می‌یابد.



شکل ۷- تاثیر شدت اولتراسونیک بر بازیابی سفالکسین، ۲۵ میلی لیتر نمونه شامل ۲ میکروگرم بر میلی لیتر سفالکسین، ۱۰ میلی گرم پلیمر قالب مولکولی، pH=۴، ۲/۵ میلی لیتر حلال واجذبی استونیتریل حاوی ۵٪ استیک اسید

۳-۲-۴ بهینه‌سازی نیروی یونی محلول

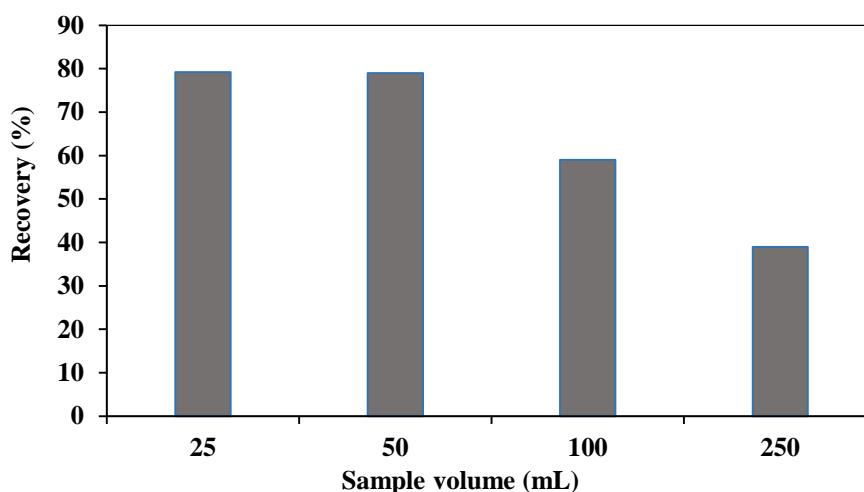
در بررسی اثر افزایش نمک بر استخراج به نمونه‌های آبی حاوی آنالیت، درصدهای مختلفی از نمک سدیم کلرید در محدوده‌ی ۰٪ تا ۱۰٪ اضافه شد و استخراج با ثابت نگه‌داشتن سایر پارامترها انجام شد که نتایج آن در شکل ۸ نشان داده شده است. به طور معمول اثر مثبت افزایش نمک تا ۵٪ منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود، به این صورت که با افزایش نمک NaCl به محیط، یونهای نمک مولکول‌های آب را درگیر کرده و متعاقباً یونهای آنالیت که کاملاً آبیوشی شده‌اند تا حدی آزاد شده و به راحتی به درون جاذب منتقل می‌شوند. به عبارت دیگر نمک باعث کاهش حلالیت آنالیت در فاز آبی می‌شود. علاوه بر اثر ذکر شده، نمک می‌تواند به گونه‌ای دیگر نیز در استخراج تأثیر داشته باشد که به اثر کاهشی نمک معروف است. این اثر برخلاف اثر اول، باعث کاهش راندمان استخراج در حضور بیش از ۵٪ نمک می‌گردد. در واقع با افزایش غلظت نمک ویسکوزیته‌ی توده محلول افزایش می‌یابد و باعث کاهش سرعت نفوذ آنالیت‌ها از توده محلول به جاذب خواهد شد.



شکل ۸- تاثیر درصد نمک بر بازیابی سفالکسین، ۲۵ میلی لیتر نمونه شامل ۲ میکروگرم بر میلی لیتر سفالکسین، ۱۰ میلی گرم پلیمر قالب مولکولی، pH=۴، ۲/۵ میلی لیتر حلال واجذبی استونیتریل حاوی ۵٪ استیک اسید، ۷۰٪ شدت اولتراسونیک

۵-۲-۳ تعیین حد نهایی رقت

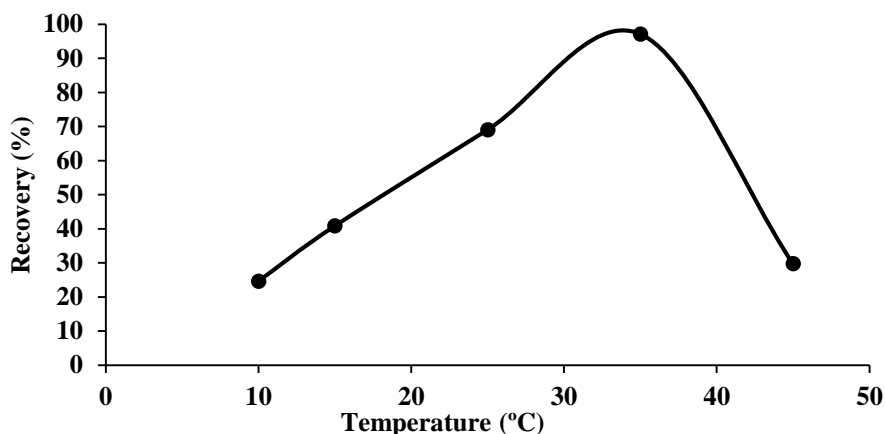
منظور از حد نهایی رقت، بیشترین حجمی از نمونه است، که بتوان مقدار معینی از آنالیت را بطور کمی از آن استخراج و بازیافت نمود. با ثابت نگه داشتن مقدار آنتی بیوتیک در حجم‌های مختلف، بیشترین حجم قابل کاربرد بدست می‌آید. برای بررسی این پارامتر، حجم‌های مختلف نمونه آبی (۲۵-۲۵۰ میلی‌لیتر) حاوی ۲ میکروگرم سفالکسین در شرایط بهینه استخراج شد و شکل ۹ بر حسب راندمان درصد رسم گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، راندمان استخراج تا حجم ۵۰ میلی‌لیتر ثابت و پس از آن کاهش می‌یابد.



شکل ۹- تاثیر حجم نمونه بر بازیابی سفالکسین، محلول حاوی ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سفالکسین، ۱۰ میلی‌گرم پلیمر قالب مولکولی، pH=۴، ۲/۵ میلی‌لیتر حلال واجذبی استونیتریل حاوی ۵٪ استیک اسید، ۷۰٪ شدت اولتراسونیک، نمک NaCl ۵٪

۶-۲-۳ تاثیر دما

تاثیر دما بر کارایی استخراج سفالکسین در محدوده‌ی دمایی ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. دماهای مختلف توسط دستگاه اولتراسونیک تنظیم شد و استخراج با ثابت نگه‌داشتن سایر پارامترها انجام شد. ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه با بیشترین درصد بازیابی ۹۷٪ برای سفالکسین انتخاب شد که در شکل ۱۰ نشان داده شده است.



شکل ۱۰- تاثیر دما بر بازیابی سفالکسین، ۲۵ میلی لیتر نمونه شامل ۲ میکروگرم بر میلی لیتر سفالکسین، ۱۰ میلی گرم پلیمر قالب مولکولی، pH=۴، ۲/۵ میلی لیتر حلال واجذبی استونیتریل حاوی ۵٪ استیک اسید، ۷۰٪ شدت اولتراسونیک، نمک NaCl ۵٪

۳-۳ بررسی مزاحمت‌ها

مطابق جدول ۱ به منظور اندازه‌گیری سفالکسین با روش پیشنهادی تاثیر برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در محلول اندازه‌گیری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۲۵ میلی لیتر سفالکسین با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر در حضور ۵ میلی لیتر از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به صورت مجزا با غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پیش تغلیظ، استخراج و اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه ساختار و طول موج‌های ماکسیمم آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با هم متفاوت هستند و زمان‌های بازداری آنها نیز با هم اختلاف دارند، بازداری‌های آنتی‌بیوتیک‌های مذکور روی فاز ساکن اکتادسیل سیلان متفاوت بوده و آنتی‌بیوتیک‌ها مزاحمت جدی ایجاد نمی‌کنند.

جدول ۱) حد مزاحمت برخی از گونه‌های همراه در اندازه‌گیری سفالکسین

حد مزاحمت (نسبت جرمی گونه‌های مزاحم به آنالیت)	گونه‌های مزاحم
۱۰۰۰	Ceftriaxone, Ceftazidime, Cefazolin, Cefixime, Amoxicillin

۳-۴ ارقام شایستگی روش

در بررسی هر روش تجزیه‌ای، معیارهای شایستگی روش از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند. فاکتور تغلیظ، گستره خطی، حد تشخیص و تکرارپذیری (انحراف استاندارد نسبی) از جمله معیارهای شایستگی یک روش می‌باشند [۱۶]. روش‌های تجزیه‌ای بایستی تکرارپذیر بوده، گستره خطی زیاد و حدتشخیص پایین داشته باشند و برای تجزیه نمونه‌های حقیقی قابل استفاده باشند. برای محاسبه ارقام شایستگی، استخراج‌ها در شرایط بهینه انجام شدند و آنالیز دارو با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا صورت گرفت که نتایج آن در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲- ارقام شایستگی روش پیشنهادی

فاکتور تغلیظ	انحراف استاندارد نسبی		حد تشخیص		ضریب همبستگی	محدوده خطی ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	(n=۵)	(%)	(n=۵)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
۱۰	۳/۱۸		۰/۰۰۵		۰/۹۹۶	۰/۰۱-۱۵

۳-۵ نمونه‌های حقیقی

جهت بررسی روش پیشنهادی برای استخراج سفالکسین در نمونه‌های حقیقی با ماتریس پیچیده، نمونه‌های آب شهر، ادرار و کپسول سفالکسین مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۳- نتایج بدست آمده برای اندازه‌گیری سفالکسین در نمونه‌های حقیقی با روش پیشنهادی

نمونه	غلظت افزوده شده ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	غلظت بدست آمده ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	درصد بازیابی (R %)	t تجربی بدست آمده
آب شهر	۰/۰	کمتر از حد تشخیص	-	-
	۲	$۲/۰۳ \pm ۰/۰۶$	۱۰۱/۸	۰/۸۶
کپسول	۰/۰	$۱۰/۸ \pm ۰/۲۴$	-	-
	۲	$۱۳ \pm ۰/۴۳$	۱۰۷/۵	۴/۰
ادرار	۰/۰	کمتر از حد تشخیص	-	-
	۲	$۲/۰۰ \pm ۰/۰۸$	۱۰۰	۰/۰

^a میانگین سه اندازه‌گیری \pm انحراف استاندارد $t(P=۰/۰۵)=۳/۴$ بحرانی

برای بررسی صحت روش از روش افزایش استاندارد استفاده شد که نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است. آنالیز آماری این نتایج با آزمون t نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان مقادیر اضافه شده و یافت شده وجود ندارد. بنابراین روش پیشنهادی از صحت و دقت کافی برخوردار است و جهت به کارگیری در نمونه‌های حقیقی مناسب می‌باشد.

۳-۶ مقایسه روش پیشنهادی با دیگر روش‌های گزارش شده

در جدول ۴ داده‌های روش پیشنهادی با داده‌های مربوط در پژوهش‌های مشابه دیگر مقایسه شده است که برتری *MCNTs@AuNPs-MIP* بکار گرفته شده در این پژوهش را بیان می‌کند.

جدول ۴- مقایسه روش‌های گزارش شده مشابه با روش پیشنهادی در این پژوهش

تکنیک استخراج	تکنیک آنالیز	آنالیت	انحراف استاندارد %	حد تشخیص	بازیابی %	مرجع
HPLC-UV	d- SPE	Cephalexin	۳/۱۸	۵ (ng/mL)	۱۰۰-۱۰۷/۵	کار حاضر
HPLC-DAD	ultrasound-assisted matrix d- SPE	12 β -lactam antibiotics	<۱۲/۷	۶/۳-۱۵/۳ ($\mu\text{g/kg}$)	۸۵/۰-۱۱۵/۷	[۱۷]
DLLME-UHPLC MS/MS	SPE	10 antibiotics	۲/۰-۹/۶	۰/۸۰-۱/۶۷ (ng/ mL)	۶۴/۱۶-۹۹/۸	[۱۸]
HPLC-DAD	SPE	Pharmaceuticals	۷/۵-۱۷/۰	۰/۷۰-۳/۹۰ (ng/ mL)	۵۸/۷-۱۰۰/۹	[۱۹]

LC-MS/MS	SPE with C ₁₈ -Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ microspheres	Cephalexin, cefazolin, cefoperazone	۴/۷-۱۱/۳	۰/۰۶-۰/۰۹ (ng/ mL)	۸۵-۱۱۵	[۲۰]
HPLC-DAD	Online SPE using mixed-MIPs	Tetracycline, chlortetracycline oxytetracycline, doxycycline	<۴	۰/۸-۱/۳ (μg/kg)	۹۱/۶-۱۰۷/۶	[۲۱]
UHPLC-DAD	d- SPE	11 sulfonamide antibiotics	۴۰-۱۱۰	۰/۰۳ (ng/mL)	۶۱-۱۱۰	[۲۲]
UHPLC-MS/MS	salting-out assisted LLE	15 β-lactam antibiotics	<۷/۵	۰/۲-۲/۷ (μg/kg)	۷۹-۹۳	[۲۳]
HPLC-PDA	SPE	11 antibacterial drugs	<۱۰	۰/۱-۱/۹ (μg/kg)	۶۲/۶-۹۹/۶	[۲۴]

۴- نتیجه گیری

برای اندازه گیری داروی سفالکسین به عنوان یکی از آنتی بیوتیک های پر مصرف، از روش استخراج فاز جامد مغناطیسی پخشی بر پایه ی نانوکامپوزیت-پلیمر قالب مولکولی (MCNTs@AuNPs-MIP) به عنوان یک جاذب مغناطیسی جهت پیش تغلیظ و استخراج مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی که این جاذب ماهیت نانو ذره ای دارد و از سطح تماس بالایی برخوردار است، لذا بسیار مناسب برای استخراج انواع مختلفی از نمونه ها می باشد. برای این منظور پارامترهای موثر بر فرآیند استخراج آنالیت بررسی و بهینه شدند و نتایج نشان داد که در محلول آبی با pH=۴، ۳۵ درجه سانتی گراد، حلال واجذبی استونیتریل: ۵٪ استیک اسید، شدت اولتراسونیک ۷۰٪ و با ۵٪ نمک سدیم کلرید بیشترین میزان استخراج دارو بدست می آید. از سوی دیگر ظرفیت جذب به عنوان یک فاکتور مهم مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس بررسی های انجام شده بیشترین مقدار ظرفیت جذب ۳۱۰ میلی گرم بر گرم بدست آمد. روش ارائه شده دقت خوبی در تعیین و شناسایی سفالکسین از خود نشان می دهد. کیفیت و تکرارپذیری خوب جاذب باعث می شود که استخراج داروی سفالکسین توسط این جاذب، دارای حدتشخیص پایین و گستره خطی خوبی باشد.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از حمایت دانشگاه آزاد تبریز- گروه شیمی و شرکت داروسازی دانا تشکر می نمایند.

۶- منابع

- [1] P. Campins-Falco, and A. Sevillano-Cabeza, *Mikrochim. Acta*, **126** (1997) 207.
- [2] B. Thirumagal, S. Malik and A. Balasubramaniam, *The pharmacist*, **3** (2008) 27.
- [3] H. Liu, W. Liu, J. Zhang, C. Zhang, L. Ren, Y. Li, *J. Hazard. Mater*, **185** (2011) 1528.
- [4] D. Moreno-González, and R. Rodríguez-Ramírez, *Talanta*, **167** (2017) 493.
- [5] A. Beltran, N. Fontanals, R. M. Marc, P.A.G. Cormack, F. Borrull, *J. Sep. Sci*, **32** (2009) 3319.
- [6] B. Manoochehr, A. Laleh, F. Mohammad, *J. Of Applied Chemistry*, **26** (1392) 29, in Persian.
- [7] B. Socas-Rodríguez, and J. Hernández-Borges, *Anal. Sep. Sci*, **6** (2015) 1525.

- [8] R.J. Ansell, K. Mosbach, *Analyst*, **123** (1998) 1611.
- [9] R. Yu, C.F. Jiang, W. Chu, M.F. Ran, W.J. Sun, *Chin. Chem. Lett*, **28** (2017) 302.
- [10] E. Waidely, A.O. Al-Youbi, and R.M. Leblanc, *Anal. Chem*, **89** (2017) 9459.
- [11] P.C. Pandey, G. Pandey, A. Walcarius, *Mater. Sci. Eng*, **79** (2017) 45.
- [12] P. Donald, L. Gary, K. George, *An Attitude to Spectrometry*, (1378) 20.
- [13] X. Wu, Y. Li, and X. Zhu, *Talanta*, **162** (2017) 57.
- [14] S. Tawfik A, A. Shilpi, G. Vinod K, *Applied Catalysis B: Environmental*, **106** (2011) 46.
- [15] N. Ajoudanian, A. Nezamzadeh-Ejehieh, *Mater. Sci. Semicond. Process*, **36** (2015) 162.
- [16] D. Skog, D. West, E. Haller, E. Crochet, *Principles of Analytical Chemistry*, (1388) 117.
- [17] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, L.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci*, **35** (2012) 1.
- [18] N. Liang, P. Huang, X. Hou, Z. Li, L. Tao, L. Zhao, *Anal Bioanal Chem*, **408** (2016) 1701.
- [19] M.P. Dragana, A. Danijela, T. Dijana, B. Sandra, *J. Sep. Sci*, **36** (2013) 3042.
- [20] X. Liu, Y. Yu, and G. Duan, *Food Chem*, **150** (2014) 206.
- [21] T. Jing, and Y. Zhou, *J. Sep. Sci*, **34** (2011) 1469.
- [22] A.V. Herrera-Herrera, and M.A. Rodríguez-Delgado, *Talanta*, **116** (2013) 695.
- [23] D. Moreno-González, and A.M. García-Campaña, *Talanta*, **167** (2017) 493.
- [24] Y. Feng, and M. Davis, *J. Soils Sediments*, **16** (2016) 2242.

