JARC

علمی-پژوهشی

کاربرد روش ریزاستخراج فاز مایع پخشی به‌کمک همگن‌ساز در ترکیب با طیف‌سنجی تحرک یونی برای اندازه‌گیری مفنامیک اسید در نمونه‌های متفاوت

سما حیاتخواه[۱]، بهمن فرجمند[۲و*] و محمدرضا یافتیان[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. دانشیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳. استاد شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

دریافت: مهر ۹۹ بازنگری: اسفند ۹۹ پذیرش: فروردین ۱۴۰۰

20.1001.1.17359937.1400.15.3.11.0

چکیده

در این پژوهش، ترکیب دو روش ریزاستخراج فاز مایع پخشی به‌کمک همگن‌ساز و طیف‌سنج تحرک یونی به‌عنوان یک روش سریع و حساس برای اندازه‌گیری داروی مفنامیک اسید معرفی شده است. عامل‌های موثر بر روش مانند pH، قدرت یونی نمونه، سرعت و زمان همگن‌سازی، نوع و حجم حلال استخراجی بررسی و بهینه‌سازی شده‌اند. شرایط بهینه شامل به‌کارگیری حلال کلروفرم به حجم ۵۰ میکرولیتر، در زمان همگن‌سازی ۸ ثانیه با سرعت ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه، در pH برابر با ۵ و افزایش نمک برابر با ۰/۱۵ گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. مشخصه‌های تجزیه‌ای مرتبط با روش شامل ناحیه خطی، حدتشخیص، تکرارپذیری و ضریب غنی‌سازی، تحت شرایط بهینه ارزیابی شدند. منحنی واسنجی در ناحیه ۱۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر خطی بود. انحراف استاندارد نسبی روش در دو حالت درون‌روزی و بین‌روزی، به ترتیب ۸/۱ و ۹/۸ ٪، در غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمدند. حد تشخیص نیز برای داروی مورد مطالعه ۳/۱ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمد. بازیابی نسبی برای آب رودخانه در گستره ۹۸ تا ۱۰۷ ٪، برای ادرار در ناحیه ۸۹ تا ۱۰۳ ٪ و برای نمونه شیر در گستره ۹۰ تا ۱۱۱ ٪ به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریزاستخراج فاز مایع پخشی، همگن‌ساز، مفنامیک اسید، طیف‌سنجی تحرک یونی.

* عهده‌دار مکاتبات: farajmand@znu.ac.ir

مقدمه

مفنامیک اسید با نام آیوپاک ۲-[(۲و۳-دی‌متیل‌فنیل)-آمینو] بنزوئیک اسید، در دهه ۶۰ میلادی توسط پارک و دیویس[1] تهیه و به بازار عرضه شد و در دهه۸۰ میلادی عمومی شد [۱]. قرص مفنامیک اسید از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی و فاقد کورتون است که به‌منظور تسکین دردهایی مانند دندان درد، دردهای عضلانی، دردهای ناشی از قاعدگی و سردرد به وفور استفاده می‌شود. این دارو با مسدودکردن اثر آنزیم سیکلواُکسیژناز[2]، موجب کاهش ساخت ماده‌ای شیمیایی به نام پروستاگلاندین در بدن می‌شود. پروستاگلاندین مسئول ایجاد درد و التهاب در ناحیه آسیب دیده است. مصرف بیش از حد مفنامیک اسید می‌تواند موجب بروز مسمومیت، استفراغ خونی، خونریزی کلیه‌ها، تاری دید، خارش پوست و در نهایت منجر به مرگ شود. مصرف زیاد این دارو، موجب ورود آن به آب‌های سطحی و زیرزمینی و آلودگی محیط‌زیست نیز می‌شود. بنابراین، ارائه روشی مناسب در اندازه‌گیری این دارو در نمونه‌های زیست‌محیطی با اهمیت است. از سوی دیگر اندازه‌گیری این دارو در نمونه‌های زیست شناختی مانند ادرار و شیر مادر نیز می‌تواند میزان دفع این دارو به محیط‌زیست و یا ورود آن به بدن نوزاد در زنان شیرده را نشان دهد. با توجه به مقادیر ناچیز این دارو در این نمونه‌ها، استفاده از یک روش دستگاهی حساس در اندازه گیری آن با اهمیت است. روش‌های متنوع دستگاهی مانند روش‌های طیف‌سنجی [۲ و ۳]، روش‌های الکتروشیمیایی [۴]، روش‌های سوانگاری مانند سوانگاری مایع با عملکرد بالا (HPLC) [۵]، سوانگاری مایع/طیف‌سنجی جرمی متوالی (LC-MS/MS) [۶ و ۷]، سوانگاری گازی/طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) [۸ و ۹] و طیف‌سنجی تحرک یونی (IMS) [۱۰ و ۱۱] برای اندازه‌گیری مفنامیک اسید به‌کارگرفته شده‌اند. از بین این روش‌ها، گزارش‌های کمی در استفاده از روش طیف‌سنجی تحرک یونی، در نشریه‌های علمی است و این درحالی است که این روش ویژگی‌های بی‌همتایی مانند حدتشخیص پایین، سرعت بالای تجزیه و هزینه پایین دارد [۱۲]. این روش از نظر زیست‌محیطی نیز به دلیل عدم استفاده از حلال‌های سمی در مقایسه با روش سوانگاری مایع می‌تواند در راستای اهداف شیمی سبز عمل کند. در مورد اندازه‌گیری مفنامیک اسید در نمونه‌های زیست‌محیطی و زیست‌شناختی، به‌دلیل پیچیدگی بافت این نمونه‌ها، استفاده از یک روش آماده‌سازی نمونه به‌طور معمول لازم است. روش‌های سنتی استخراج مانند استخراج مایع–مایع [۲] و استخراج فاز جامد [۱۳] برای آماده سازی نمونه‌های حاوی مفنامیک اسید به‌کارگرفته شده‌اند. اما با توجه به اینکه این روش‌ها، حجم زیادی از حلال‌های سمی و یا جاذب‌های گران‌قیمت را به کار می‌گیرند، در دو دهه اخیر تمایل به استفاده از روش‌های ریزاستخراج[3] که در آن‌ها از حجم کمی از حلال یا جاذب استفاده می‌شود، افزایش یافته است. روش‌های ریزاستخراجی مانند ریزاستخراج فاز جامد [۱۴و ۱۵]، ریزاستخراج به کمک جاذب‌های دیسکی و میله‌ای [۸، ۹ و ۱۶]، ریزاستخراج فاز مایع به کمک فیبر توخالی [۱۷]، ریزاستخراج الکتروغشایی [۱۸ تا ۲۰]، ریزاستخراج فاز مایع پخشی و همگن [۲۱ تا ۲۳]، ریزاستخراج فیلم نازک [۲۴] و روش‌های ریزاستخراج ترکیبی [۲۵ و ۲۶] در آماده‌سازی نمونه‌های حاوی این دارو به‌کاررفته است. از بین این روش‌ها، روش ریزاستخراج فاز مایع پخشی از جمله روش‌های سریع و با بازده بالا استخراج است [۲۷]. در این روش حلال استخراج‌کننده به صورت قطره‌های ریزی در داخل بافت نمونه پراکنده و پس از پایان فرایند استخراج به کمک گریزانه از بافت نمونه جدا می‌شود. به‌علت پراکندگی حلال در بافت نمونه، سطح تماس بین دو فاز افزایش می‌یابد که منجر به افزایش سرعت و میزان

1. Park & Davis
2. Cyclooxygenase
3. Microextraction

انتقال جرم نمونه می‌شود و در نتیجه بازده استخراج افزایش می‌یابد و در زمان کوتاهی فرایند استخراج تکمیل می‌شود [۲۱]. در فرم اولیه این روش، برای پراکنش حلال، حجم زیادی از یک حلال کمکی مانند متانول، استون یا استونیتریل به‌کارگرفته می‌شد که هم ازدید زیست‌محیطی چندان مطلوب نبود و هم منجر به کاهش بازده استخراج می‌شد، چون انحلال‌پذیری آنالیت‌ها در بافت نمونه افزایش می‌یافت. درنتیجه روش‌های دیگری برای پراکندگی حلال استخراجی پیشنهاد شده است که از جمله می‌توان به استفاده از امواج فراصوت، جریان هوا، اعمال دما و جریان گردابی اشاره کرد [۲۸]. یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر در گروه پژوهشی ما پیشنهاد شده است، استفاده از دستگاه همگن‌ساز برای پراکندگی حلال است [۲۹]. دستگاه همگن‌ساز یک سر پراکنش دارد که حاوی یک لوله ثابت بیرونی و یک چرخنده داخلی است، که سرعت‌های چرخش بین ۴۰۰۰ تا ۲۴۰۰۰ دور بر دقیقه دارد. چرخش سریع چرخنده منجر به مکش نمونه و حلال به داخل سر پراکنش و خروج سریع آن‌ها از داخل شیارهای آن می‌شود. این پدیده منجر به شکل‌گیری یک نامیزه در زمان بسیار کوتاهی خواهد شد. پژوهش‌های انجام گرفته بر همگن‌سازهای با دور بالا، نشان داده است که این روش می‌تواند منجر به بهبود بازده انتقال جرم نیز شود [۳۰]. در این پژوهش، تلاش شد که از روش ریزاستخراج فاز مایع پخشی به کمک همگن‌ساز برای استخراج مفنامیک اسید از نمونه‌های متفاوت استفاده شود. اثر عوامل متفاوت بر بازده استخراج نیز ارزیابی شد. در نهایت از روش بالا، تحت شرایط بهینه برای اندازه‌گیری مفنامیک اسید در نمونه‌های آب رودخانه، شیر مادر و ادرار استفاده شد. سرعت دفع دارو از بدن فردی که دارو مصرف کرده است، نیز موردارزیابی قرارگرفت.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و معرف‌های مورداستفاده

داروی مفنامیک اسید به‌عنوان آنالیت مورداستفاده در این پژوهش، با خلوص ۹۹/۹ ٪ از شرکت مرک تهیه شد. حلال‌های مورد استفاده شامل متانول، دی‌کلرواتان، دی‌برومومتان، تولوئن، تتراکلریدکربن و کلروفرم با خلوص ۹۹/۵ ٪ نیز از شرکت مرک خریداری شدند. به‌منظور تهیه بافرها و تنظیم قدرت یونی، استیک اسید و سدیم کلرید با خلوص ۹۹ ٪ از شرکت مرک تهیه شدند. سدیم هیدروکسید و تری‌کلرواستیک اسید با خلوص بیشتر از ۹۵ ٪ از شرکت فلوکا تهیه خریداری شدند. به‌منظور محلول‌سازی از آب بدون یون که در آزمایشگاه با کمک دستگاه آب‌گیری متعلق به شرکت زلالان (ایران) تهیه می‌شد، استفاده شد. محلول مادر از داروی مفنامیک اسید با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با حل‌کردن مقدار مناسب آن در متانول تهیه شد. سپس یک محلول واسطه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در متانول از محلول مادر تهیه شد. محلول‌های کاری استاندارد با رقیق‌کردن محلول واسطه پس از تنظیم pH و قدرت یونی، با آب بدون یون تهیه شدند.

دستگاه‌های مورد استفاده

برای پراکندگی حلال، دستگاه همگن‌ساز مدل T 18 پایه با نام تجاری T18 basic ULTRA-TURRAX به‌همراه سر پراکنش مدل S18N-10G فراورده شرکت فناوری آزمایشگاه آیکا[1] آلمان به‌کارگرفته شد. برای اندازه گیری داروی مفنامیک اسید از دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی تجاری مدلIMS-300 ساخت شرکت تاف‌فناورپارس (اصفهان) مجهز به منبع یونش مداوم تخلیه کرونا با هندسه صفحه به نقطه استفاده شد. این دستگاه مجهز به دو سامانه کاوند[2] مستقیم و تزریق مایع است. یون‌ها با اعمال تپ[3]

1. Ika
2. Probe
3. Pulse

الکتریکی در زمان ۳۰ میکروثانیه وارد لوله رانش شدند. زمان بین پالس‌ها ۲۰ میلی‌ثانیه بود. نیتروژن خالص (۹۹/۹ ٪) پس از حذف آب باقیمانده و سایر آلاینده‌ها به‌عنوان گاز حامل و گاز رانش به‌کارگرفته شد. سرعت جریان گاز رانش و حامل به ترتیب ۶۰۰ و ۸۰۰ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. همه آزمایش‌ها در فشار محیط انجام گرفت. دمای محفظه تزریق و لوله رانش به‌ترتیب در دمای C° ۲۶۰ و ۲۰۰ تنظیم شدند. ارتفاع پیک به‌عنوان علامت تجزیه‌ای به‌کارگرفته شد. برای ارزیابی نتیجه‌های به‌دست‌آمده از دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی از نرم افزارهای Picoscope و Vis-IMS استفاده شد. برای مقایسه، از روش استاندارد سوانگاری مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز فرابنفش–مرئی (HPLC/UV-Vis) استفاده شد. این دستگاه متعلق به شرکت GBC (استرالیا) بود که مجهز به یک گاززدای حلال مدل LC1460، یک پمپ مدل LC1150، یک شیر تزریق دستی مدل Rheodyne 7725 دارای حلقه[1] ۲۰ میکرولیتر و یک آشکارساز فرابنفش–مرئی مدل LC1205k بود. برای جداسازی از یک ستون مدل Hypersil C18 با طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و ابعاد ذره‌های ۵ میکرومتر متعلق به شرکت فناوری‌های Bonna-Agela (تیانجین، چین) استفاده شد. شویش به صورت تک توانی با کمک مخلوط حلال‌های آب، استیک اسید و استونیتریل به ترتیب با ترکیب درصد ۲۰، ۵ و ۷۵ با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام گرفت. آشکارسازی در طول موج ۲۸۵ نانومتر انجام شد.

روش ریزاستخراج فاز مایع پخشی به کمک همگن‌ساز

مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول آبی حاوی آنالیت که در pH برابر ۵ تنظیم شده بود و ۰/۱۵ گرم در هر میلی‌لیتر سدیم کلرید داشت، به داخل لوله ته‌مخروطی منتقل و سپس ۵۰ میکرولیتر از حلال کلروفرم به آن افزوده شد. فرایند پخش حلال به مدت ۸ ثانیه با سرعت ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه با دستگاه همگن‌ساز بر مخلوط به‌دست آمده انجام گرفت که در نتیجه آن یک محلول کدر داخل لوله تشکیل شد. سپس دو فاز به کمک گریزانه به‌مدت ۵ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه از یکدیگر جدا و مقدار ۱ میکرولیتر از حلال ته‌نشینی حاوی ترکیب هدف به دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی تزریق شد.

آماده‌سازی نمونه حقیقی

برای بررسی توانایی روش معرفی‌شده در تجزیه نمونه حقیقی، سه نمونه آب رودخانه زنجان‌رود، ادرار و شیر مادر بررسی شدند و روش تجزیه به‌صورت افزایش استاندارد چندتایی صورت گرفت. در مورد نمونه آب رودخانه، نمونه پس از پنج بار رقت و افزایش استاندارد در چند سطح غلظتی مورد استخراج تحت شرایط بهینه قرار گرفت. برای نمونه شیر به‌منظور پروتئین‌زدایی، محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ ٪ به نمونه افزوده شد. سپس مخلوط، به مدت ۱ دقیقه هم‌زده و تعلیقه به‌دست‌آمده ۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شد. در نهایت پروتئین رسوب داده شده به کمک دستگاه گریزانه (۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه) از نمونه جدا شد و سپس نمونه باقی‌مانده در شرایط بهینه، تحت فرایند ریزاستخراج قرار گرفت. در مورد نمونه ادرار، با توجه به ایجاد مزاحمت بافتی، تجزیه مستقیم دارو، امکان پذیر نشد، در نتیجه به‌منظور حذف مزاحمت‌های بافت ادرار، نمونه‌ها پس ازافزودن حجم مناسب از محلول استاندارد دارو و تنظیم pH نمونه، در یخچال قرار می‌گرفت، سپس رسوب به‌دست آمده جدا و مقدار ۱ میلی‌لیتر حلال دی‌اتیل اتر به محلول باقی‌مانده افزوده شد. پس از تکان‌دادن به مدت ۱ دقیقه، به‌منظورجدایش فاز آلی، مخلوط به‌مدت ۵ دقیقه گریزانه شد. حلال استخراجی پس از جداسازی با یک سرنگ، به داخل بالن حجمی منتقل شده و در داخل حمام آب گرم به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. سپس عمل ریزاستخراج، پس از تنظیم pH و قدرت یونی، بر نمونه انجام

1. Loop

گرفت. در مورد آماده‌سازی نمونه ادرار برای تجزیه به کمک سوانگاری مایع، نیز مراحل یادشده بر نمونه انجام گرفت و پس از تبخیر حلال دی‌اتیل اتر، حجم ۵۰ میکرولیتر از مخلوط حلالی استونیتریل و آب با نسبت ۷۵ به ۲۵ به آن افزوده شد و در نهایت مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه تزریق شد.

محاسبه‌ها و نرم افزارهای مورداستفاده

کمیت‌هایی مانند ضریب غنی‌سازی (EF) و درصد بازیابی نسبی (RR %) محاسبه شدند. ضریب غنی‌سازی برپایه معادله ۱ محاسبه شد که در این معادله $C_{s,initial}$ و $C_{a,final}$ غلظت اولیه در محلول آبی نمونه و غلظت نهایی در محلول آلی استخراج‌شده هستند. درصد بازیابی نسبی برای تجزیه نمونه‌های واقعی نیز با معادله ۲ به‌دست آمد که در آن‌ها $C_{founded}$، C_{real} و C_{added} به‌ترتیب غلظت آنالیت یافت‌شده در نمونه حقیقی پس از افزایش استاندارد، غلظت اولیه آنالیت موجود در نمونه و غلظت محلول استاندارد افزوده‌شده است.

$$EF = (C_{a,final}/C_{s,initial}) \quad (۱)$$

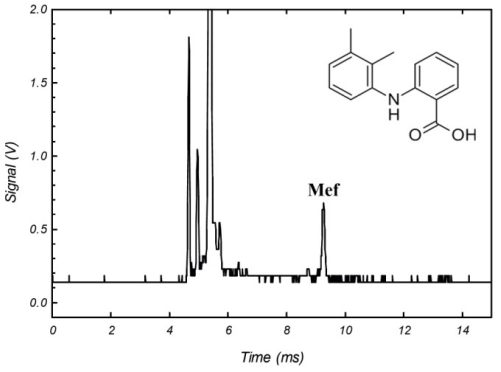
$$RR\ (\%) = \left((C_{found} - C_{real})/C_{added}\right) \times 100 \quad (۲)$$

برای ترسیم نمودارها و انجام محاسبه‌های آماری ساده مانند آزمون t و آزمون دانکن از نرم افزار Microsoft Excel 2013 و نوار ابزار XLSTAT 2016 استفاده شد.

نتیجه‌ها و بحث

بهینه‌سازی شرایط ریزاستخراج فاز مایع پخشی به کمک همگن‌ساز

در ابتدا برای تعیین موقعیت و شدت پیک مربوط به داروی موردمطالعه در طیف تحرک یونی، مقدار یک میکرولیتر از محلول متانولی استاندارد مفنامیک اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌صورت مستقیم به دستگاه تزریق شد که یک پیک در زمان رانش ۹٫۳ میلی‌ثانیه با ارتفاع ۰٫۶ ولت را نشان داد (شکل ۱). برای بهینه‌سازی روش در تعیین مفنامیک اسید، اثر عامل‌های متفاوت با روش یک عامل در هر زمان با دقت ارزیابی و بهینه‌سازی شد. همچنین، برای ارزیابی دقیق نتیجه‌ها، آزمون آماری دانکن نیز بر نتیجه‌ها انجام گرفت. این عامل‌ها شامل نوع و حجم حلال استخراج‌کننده، pH نمونه، قدرت یونی و شرایط همگن‌سازی است که در بخش‌های بعدی به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است.



شکل ۱ طیف تحرک یونی محلول ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر داروی مفنامیک اسید

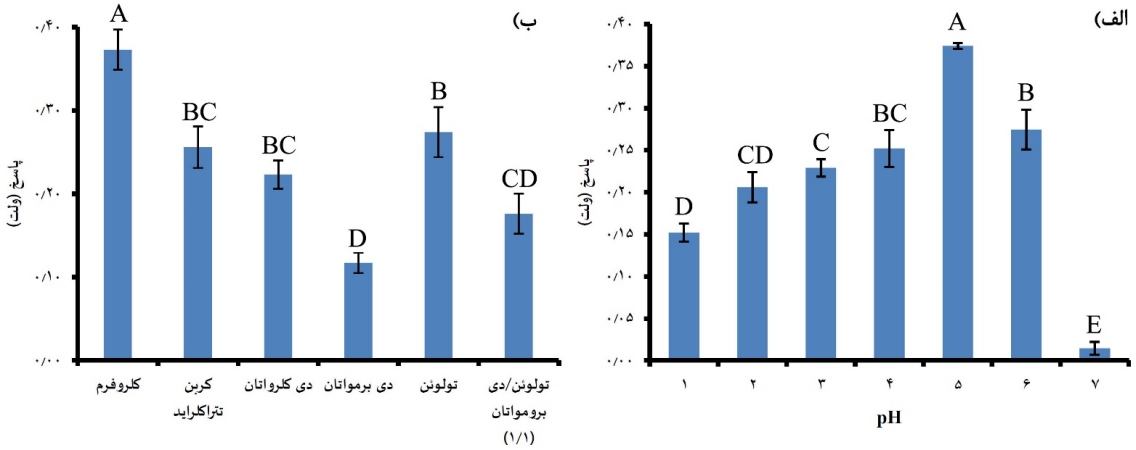
اثر pH نمونه

یکی از متغیرهایی که بر استخراج آنالیت‌ها، به‌ویژه آنالیت‌های با توانایی یونش موثر است، pH محلول حاوی آن‌ها است. برای این منظور، pH محلول نمونه در گستره بین ۱ تا ۷ بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود، pH برابر با ۵ بیشترین پاسخ را دارد. بهبود پاسخ می‌تواند به این دلیل باشد که با توجه به ویژگی اسیدی (pKa برابر با۳٫۸۹)، انتظار بر این است که این ترکیب در pHهای کم به فرم مولکولی تبدیل شود و مقدار استخراج آن افزایش یابد. اما همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان پاسخ

تجزیه‌ای در pHهای کمتر از ۵، روند کاهشی از خود نشان می‌دهد. می‌توان این رخداد را به تخریب دارو در pHهای پایین نسبت داد.

اثر نوع حلال استخراج کننده

انتخاب یک حلال استخراج‌کننده مناسب در روش‌های ریزاستخراج از اهمیت زیادی برخوردار است. حلال استخراج‌کننده باید ویژگی‌هایی مانند حلالیت کم و غیرقابل امتزاج‌بودن با فاز آبی و از سوی دیگر سازگاری مناسبی با دستگاه تجزیه‌ای موردنظر نیز داشته باشد. بهتر است حلال‌های با چگالی بالا انتخاب شوند تا جداسازی آن‌ها از فاز آبی با سهولت بیشتری انجام گیرد. برای دستیابی به این اهداف، حلال‌های کلروفرم، دی‌بروموموتان، تولوئن، دی‌کلرواتان، کربن تتراکلرید و مخلوط برخی از آن‌ها انتخاب شدند و استخراج محلول نمونه با این حلال‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در شکل ۲-ب مشاهده می‌شود، بیشترین استخراج مربوط به حلال کلروفرم است که به‌عنوان حلال بهینه انتخاب شد.



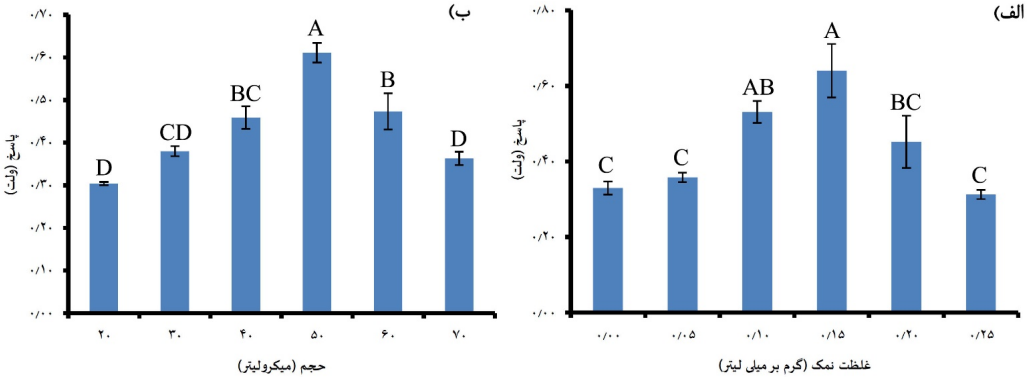
شکل ۲ تاثیر pH بر پاسخ تجزیه‌ای مفنامیک اسید (الف) (شرایط آزمایش: ۳ میلی‌لیتر نمونه با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، حلال استخراج‌کننده: کلروفرم به حجم ۵۰ میکرولیتر با سرعت همگن‌سازی ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان همگن‌سازی ۱۰ ثانیه) و تاثیر نوع حلال استخراج‌کننده بر پاسخ تجزیه‌ای مفنامیک اسید (ب) (شرایط آزمایش: ۳ میلی‌لیتر از محلول حاوی مفنامیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در pH برابر با ۵، ۵۰ میکرولیتر از حلال استخراج‌کننده با سرعت همگن‌سازی ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان همگن‌سازی ۱۰ ثانیه)

اثر قدرت یونی

افزودن نمک و تغییر قدرت یونی نمونه، یکی از عامل‌های موثر در مقدار استخراج است. برای استخراج داروی مفنامیک اسید، مقدارهای متفاوت سدیم کلرید در گستره صفر تا ۰/۲۵ گرم بر میلی‌لیتر به محلول آبی مورداستخراج افزوده شد. همان‌طورکه در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود، مقدار استخراج از صفر تا ۰/۱۵ روند افزایشی داشته است. این پدیده را می‌توان به اثر نمک‌زنی نسبت داد. اما کاهش پاسخ تجزیه‌ای شاید به این علت است که پس از افزودن نمک، گران‌روی محلول افزایش می‌یابد و بنابراین، سرعت نفوذ آنالیت به داخل حلال استخراجی کم می‌شود. درنتیجه، کارایی استخراج اندکی کمتر خواهد شد و پاسخ کمتری مشاهده می‌شود. بنابراین، حجم ۰/۱۵ گرم بر میلی‌لیتر از سدیم کلرید به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

اثر حجم حلال

حجم حلال استخراجی استفاده شده، می‌تواند بر تکرارپذیری نتیجه‌ها و بازده استخراج موثر باشد. بنابراین، حجم حلال استخراجی در گستره ۲۰ تا ۷۰ میکرولیتر از کلروفرم بررسی شد. همان‌طورکه در شکل ۳–ب مشاهده می‌شود با افزایش حجم حلال از ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر مقدار استخراج افزایش می‌یابد که ممکن است به این علت باشد که با افزایش حجم حلال استخراجی سطح تماس افزایش یافته و حلال دردسترس برای آنالیت بیشتر شده است. با افزایش بیشتر حجم حلال استخراج روند کاهشی را نشان می‌دهد که به‌احتمال رقیق‌سازی منجر به کاهش بازده استخراج شده است. بنابراین، حجم ۵۰ میکرولیتر به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

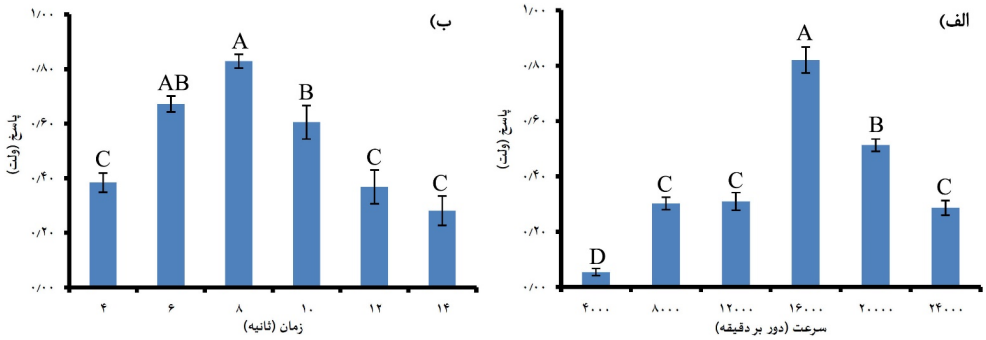


شکل ۳ تاثیر قدرت یونی بر پاسخ تجزیه‌ای مفنامیک اسید (الف) (شرایط آزمایش: ۳ میلی‌لیتر از محلول حاوی مفنامیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در pH برابر با ۵ و ۵۰ میکرولیتر از حلال کلروفرم با سرعت همگن‌سازی ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان همگن‌سازی ۱۰ ثانیه) و تاثیر حجم حلال بر پاسخ تجزیه‌ای مفنامیک اسید (ب) (شرایط آزمایش: ۳ میلی‌لیتر از محلول حاوی مفنامیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در pH برابر با ۵، ۰/۱۵گرم بر میلی‌لیتر سدیم کلرید با سرعت همگن‌سازی ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان همگن‌سازی ۱۰ ثانیه)

شرایط همگن‌سازی

سرعت و زمان همگن‌سازی عامل‌هایی هستند که می‌توانند بر بازده استخراج تأثیر بگذارند. با توجه به قابلیت دستگاه همگن‌ساز برای تنظیم سرعت‌های متفاوت همگن‌سازی، سرعت‌های ۴۰۰۰ تا ۲۴۰۰۰ دور بر دقیقه بررسی شدند. همان‌گونه که در شکل ۴–الف مشاهده می‌شود، با افزایش سرعت همگن‌ساز تا ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه استخراج نیز افزایش یافته است که به‌احتمال به‌دلیل پراکندگی بهتر حلال در سرعت‌های بالاتر است و با کوچک شدن اندازه قطرها، سطح تماس نیز افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر سرعت همگن‌ساز، کاهش در پاسخ مشاهده می‌شود که این پدیده شاید مربوط به تبخیر حلال ناشی از گرمای تولیدشده در محیط و خروج آن از ظرف استخراج است. عامل دیگری که بر بازده فرایند استخراج تاثیر دارد، زمان همگن‌سازی است. برای این منظور زمان‌های ۴ تا ۱۴ ثانیه بررسی شدند. نتیجه‌های به‌دست‌آمده در شکل ۴–ب آورده شده است. با توجه به شکل، افزایش زمان تا ۸ ثانیه منجر به افزایش بازده استخراج می‌شود. این مشاهده ممکن است به این دلیل باشد که با افزایش زمان همگن‌سازی، آنالیت زمان بیشتری برای استخراج به فاز آلی را تا رسیدن به تعادل دارد، ولی زمان‌های بیشتر از ۸ ثانیه، روند نزولی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد، افزایش زمان همگن‌سازی

موجب تبخیر حلال آلی در اثر ایجاد گرما خواهد شد و مقدار حلال در دسترس آنالیت کاهش می‌یابد، در نتیجه می‌تواند بر استخراج و در نهایت علامت تجزیه‌ای مشاهده شده اثر گذارد. ازاین‌رو، ۸ ثانیه به‌عنوان زمان بهینه همگن‌سازی انتخاب شد.



شکل ۴ تاثیر سرعت همگن‌ساز بر پاسخ مفنامیک اسید (الف) (شرایط آزمایش: ۳ میلی‌لیتر از محلول حاوی مفنامیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در pH برابر با ۵، ۵۰ میکرولیتر از حلال استخراج‌کننده، ۰/۱۵ گرم بر میلی‌لیتر سدیم کلرید و زمان همگن‌سازی ۱۰ ثانیه) و اثر زمان همگن‌سازی بر میزان استخراج داروی مفنامیک اسید (ب) (شرایط آزمایش: ۳ میلی‌لیتر از محلول حاوی مفنامیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در pH برابر با ۵ و ۵۰ میکرولیتر از حلال استخراج‌کننده، ۰/۱۵ گرم بر میلی‌لیتر سدیم کلرید با سرعت همگن‌سازی ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه)

ویژگی‌های تجزیه‌ای روش و مقایسه با سایر روش‌ها

برای ارزیابی اعتبار روش برخی ویژگی‌های تجزیه‌ای همانند گستره خطی روش، دقت، حدتشخیص و ضریب غنی‌سازی تحت شرایط بهینه بررسی شدند. در ابتدا برای بررسی گستره خطی روش، غلظت‌های متفاوتی از محلول‌های استاندارد داروی مفنامیک اسید در گستره ۱۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر تهیه شد و با روش حاضر و تحت شرایط بهینه استخراج و به کمک دستگاه طیف‌سنج تحرک‌یونی موردارزیابی قرار گرفتند. نمودار واسنجی آن‌ها، شامل علامت تجزیه‌ای بر حسب غلظت داروها با انجام سه بار تکرار رسم شدند. نتیجه‌های مربوط در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. همان‌گونه‌که مشاهده می‌شود، نتیجه‌های به‌دست‌آمده برای مفنامیک اسید به‌طور تقریبی در گستره ۱/۵ مرتبه بزرگی خطی عمل می‌کند. برای بررسی دقت روش، انحراف استاندارد نسبی درون‌روزی و بین‌روزی در یک سطح غلظتی ۵۰ میکروگرم بر لیتر برای داروی مفنامیک اسید با ۵ بار تکرار در ۵ روز متفاوت محاسبه شد. مقدار دقت درون‌روزی و بین‌روزی به ترتیب ۸/۱ و ۹/۸ ٪ به‌دست آمدند. حدتشخیص روش، معادل با غلظتی است که بتواند نسبت نشانک به نوفه‌ای (S/N) برابر با ۳ را به‌وجود آورد. این مقدار برای مفنامیک اسید برابر با ۳/۱ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمد. با معادله ۱ مقدار ضریب غنی‌سازی میانگین برای داروی مفنامیک اسید برابر ۲۶۳ به‌دست‌آمد. مقایسه روش ارایه‌شده در این پژوهش با روش‌های پیشنهادی گزارش‌شده در تجزیه داروی مفنامیک اسید در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، روش ارایه‌شده در این پژوهش دارای حدتشخیص و دقت قابل مقایسه با سایر روش‌ها است، ولی از دید زمان تجزیه، این روش در کوتاهترین زمان ممکن، امکان تجزیه دارو را فراهم می‌کند. از سوی دیگر، حجم حلال مصرفی نیز بسیار ناچیز و قدرت غنی‌سازی روش نیز در مقایسه با سایر روش‌ها بهتر است.

جدول ۱ ویژگی‌های تجزیه‌ای روش ارایه‌شده در این پژوهش

ناحیه خطی روش (µg/l)	ضریب تعیین (R^2)	حدتشخیص (µg/l)	حدکمی (µg/l)	انحراف استاندارد نسبی (n=۵) (٪)		ضریب غنی‌سازی
				داخل روزی	بین روزی	
۱۰–۵۰۰	۰٫۹۹۱۴	۳٫۱	۱۰	۸٫۱	۹٫۸	۲۶۳

جدول ۲ مقایسه روش ارایه‌شده در این پژوهش با سایر روش‌های معرفی‌شده در سال ۲۰۱۹ در اندازه‌گیری مفنامیک اسید.

روش	حدتشخیص (µg/l)	حدکمی (µg/l)	دقت (٪)	نوع و حجم حلال آلی	زمان‌های آماده‌سازی و تجزیه	ضریب غنی‌سازی	نمونه های حقیقی	ناحیه خطی	مرجع
ریزاستخراج فاز مایع به کمک جریان گردبی–سوانگاری مایع با عملکرد بالا (VA-LPME-HPLC[I])	۱٫۳	۴٫۶	۴٫۲	سیال مغناطیسی (۶۰ µl) متانول (۵۰ µl)	۷ دقیقه و زمان تجزیه ذکر نشده است.	۱۸۴	ادرار	۵–۹۰۰	[۵]
ریزاستخراج فاز جامد داخل لوله‌ای با واپایش الکتروشیمیایی–سوانگاری مایع با عملکرد بالا (EC-PIT-SPME-HPLC[II])	۰٫۰۸	۰٫۳	۵٫۶	متانول (۸۰ µl)	۲۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه	–	ادرار و پلاسما	۰٫۳–۲۰۰	[۱۵]
ریزاستخراج جذبی میله‌ای–سوانگاری مایع با عملکرد بالا (BAME-HPLC[III])	۰٫۰۲	۰٫۰۸	۹٫۷	متانول (۱۰۰ µl)	۹۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه	۲۵۰	نمونه‌های آبی	۰٫۳۵–۱۰۰۰	[۱۶]
ریزاستخراج فیلم نازک–سوانگاری مایع با عملکرد بالا (TFME-HPLC[IV])	۰٫۰۵	۰٫۱۵	۶٫۱	متانول (۳۵۰ µl)	۳۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه	–	ادرار و پلاسما	۰٫۲–۲۰۰	[۲۴]
ریزاستخراج فاز مایع برپایه غشا و نامیزه‌سازی دو مرحله‌ای–سوانگاری مایع با عملکرد بالا (MD-LPME-HPLC[V])	۰٫۵	۲	۷٫۸	دی‌هگزیل اتر (۴۰۰ µl)	کمتر از ۵ دقیقه و ۲۰ دقیقه	۴۷	ادرار و پساب	۲–۲۰۰۰	[۲۵]
ریزاستخراج فاز مایع پخشی به کمک همگن‌ساز–طیف‌سنجی تحرک یونی (HA-DLPME-IMS[VI])	۳٫۱	۱۰	۹٫۸	کلروفرم (۵۰ µl)	۰٫۱۳ دقیقه و کمتر از ۱ دقیقه	۲۶۳	ادرار، آب رودخانه و شیر	۱۰–۵۰۰	پژوهش حاضر

I Vortex Assisted Liquid Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatography
II Electrochemicaly Controled Packed In-Tube Solid Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatography
III Bar Adsorbtive Microextraction-High Performance Liquid Chromatography
IV Thin Film Microextraction-High Performance Liquid Chromatography
V Membrane Based Dual Emulsification Liquid Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatography
VI Homogenizer Assisted Dispersive Liquid Phase Microextraction-Ion Mobility Spectrometry

تجزیه نمونه حقیقی

برای ارزیابی قابلیت روش مورد نظر در تجزیه نمونه حقیقی، نمونه‌های آب رودخانه زنجان‌رود، ادرار و شیر بررسی شدند. بدین منظور از روش افزایش استاندارد چندتایی استفاده شد. در ارزیابی اولیه، داروی مفنامیک اسید در سه نمونه حقیقی موردبررسی، مشاهده نشد. سپس غلظت‌هایی در گستره ۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر برای داروی مفنامیک اسید به نمونه‌های حقیقی افزوده شد و در نهایت، نتیجه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای محاسبه درصد بازیابی نسبی، معادله ۲ به‌کار گرفته شد. نتیجه‌ها در جدول ۳ آورده شده‌اند.

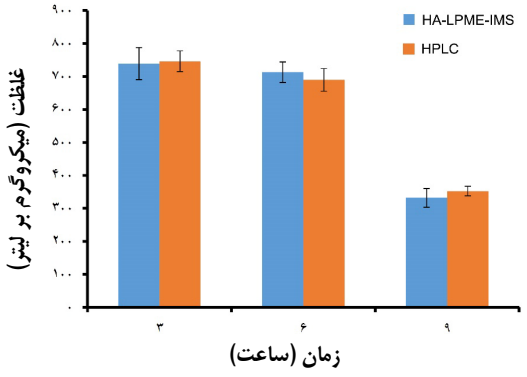
جدول ۳ بازیابی نسبی در اندازه‌گیری مفنامیک اسید در نمونه‌های حقیقی متفاوت

غلظت مفنامیک اسید افزوده‌شده (µg/l)	نمونه حقیقی مورد مطالعه					
	شیر		ادرار		آب رودخانه	
	یافت شده (µg/l)	بازیابی نسبی (٪)	یافت شده (µg/l)	بازیابی نسبی (٪)	یافت شده (µg/l)	بازیابی نسبی (٪)
۰/۰۰	دیده نشد	–	دیده نشد	–	دیده نشد	–
۵۰	۵۲/۵	۱۰۵	۴۹/۴	۹۹	۵۳/۶	۱۰۷
۱۰۰	۸۹/۸	۹۰	۱۰۲/۷	۱۰۳	۹۷/۷	۹۸
۲۰۰	۱۹۰/۳	۹۵	۱۷۷/۶	۸۹	۱۹۶/۰	۹۸
۵۰۰	۵۵۵/۲	۱۱۱	۵۰۱/۱	۱۰۰	۵۱۵/۲	۱۰۳

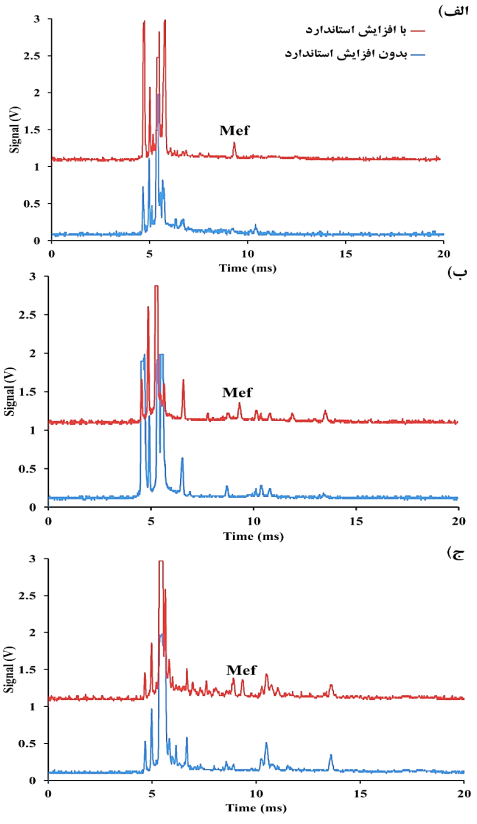
همان‌گونه که مشاهده می‌شود مقادیر مربوط به درصد بازیابی نسبی در گستره قابل قبولی قرار دارد. همچنین، طیف‌های تحرک یونی مربوط به هریک از نمونه‌های حقیقی، پیش و پس از افزایش استاندارد در شکل ۵ آورده شده است.

اعتبارسنجی روش و سینتیک دفع دارو

برای اعتبارسنجی روش و بررسی توانایی روش ارایه‌شده در مطالعه سینتیک دفع دارو، نمونه‌های ادرار در بازه‌های زمانی ۳ ساعته پس از مصرف خوراکی دارو توسط یک فرد داوطلب سالم و جوان با سن ۲۵ سال جمع‌آوری و سپس همزمان با روش استاندارد سوانگاری مایع با عملکرد بالا و هم با روش پیشنهادی در این پژوهش، اندازه‌گیری شد. نتیجه‌های به‌دست آمده در شکل ۶ آورده شده است. آزمون t در مورد نتیجه‌ها در ۳ زمان نمونه‌گیری نشان داد که مقادیر t محاسبه شده (۰/۲۲، ۰/۸۷ و ۱/۱۱) در مقایسه با مقادیر t بحرانی (۳/۱۸ و ۲/۷۸)، مقادیر کمتری دارند و این نشان‌دهنده همخوانی نتیجه‌ها با یکدیگر است.



شکل ۶ اندازه‌گیری مقدار دفع دارو از نمونه ادرار با روش حاضر و روش سوانگاری مایع در بازه‌های زمانی سه ساعته (HPLC: سوانگاری مایع با عملکرد بالا، HA-LPME-IMS: ریزاستخراج فاز مایع پخشی به کمک همگن‌ساز–طیف‌سنجی تحرک یونی)



شکل ۵ طیف تحرک یونی از نمونه‌های حقیقی: آب رودخانه (الف)، ادرار (ب) و شیر (ج)، پیش و پس از افزودن استاندارد مفنامیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، روش ریزاستخراج فاز مایع پخشی به کمک همگن‌ساز برای استخراج داروی پرمصرف مفنامیک اسید از نمونه‌های متفاوت، مورد استفاده قرار گرفت. این روش استخراجی، در مقایسه با سایر روش‌ها مزیت سرعت و بازده بالای استخراج را دارد. از سوی دیگر برای تجزیه نهایی دارو از روش طیف‌سنجی تحرک‌یونی استفاده شد که روشی بسیار حساس و پرسرعت است. منحنی واسنجی در ناحیه ۱۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر خطی بود. مقدار انحراف استاندارد نسبی روش در دو حالت درون‌روزی و بین‌روزی، به ترتیب ۸/۱ و ۹/۸ ٪، در غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمدند. حدتشخیص نیز برای داروی مورد مطالعه ۳/۱ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمد. بنابراین، ترکیب این دو روش می‌تواند به‌عنوان یک ابزار قوی برای تجزیه داروی مفنامیک اسید در نمونه‌های زیست‌محیطی و زیست‌شناختی که نیاز به مقادیر حدتشخیص پایین دارند، ارایه شود. بازیابی نسبی برای آب رودخانه در گستره ۹۸ تا ۱۰۷ ٪، برای ادرار در گستره ۸۹ تا ۱۰۳ ٪ و برای نمونه شیر در گستره ۹۰ تا ۱۱۱ ٪ به‌دست آمد. این روش در مقایسه با روش‌های سوانگاری مایع که از روش‌های معمول برای اندازه‌گیری داروها به حساب می‌آید، از هزینه کمتری نیز برخوردار است.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه زنجان به خاطر حمایت مالی از این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

مراجع

[1] Pringsheim, T.; Davenport, W. J.; Dodick, D.; Neurology 70, 1555-1563, 2008.

[2] Kormosha, Z.A.; Matviichuka, O.Y.; Bazel, Y.R.; J. Anal. Chem. 69, 960-964, 2014.

[3] Hashemi, M.; Zohrabi, P.; Torkejokar, M.; Sep. Purif. Technol. 176, 126-133, 2017.

[4] Shetti, N.P.; Nayak, D.S.; Malode, S.J.; Kakarla, R.R.; Shukla, S.S.; Aminabhavi, T.M.; Anal. Chim. Acta 1051, 58-72, 2019.

[5] Dila, E.A.; Ghaedia, M.; Asfaram, A.; Talanta 202, 526-530, 2019.

[6] Xu, J.; Huang, S.; Wu, R.; Jiang, R.; Zhu, F.; Wang, J.; Ouyang, G.; Anal. Chem. 87, 3453-3459, 2015.

[7] Ohcho, K.; Saito, K.; Kataoka, H.; Environ. Chem. 18, 511-520, 2008.

[8] Manzo, V.; Honda, L.; Navarro, O.; Ascar, L.; Richter, P.; Talanta 128, 486-492, 2014.

[9] Manzo, V.; Ulisse, K.; Rodríguez, I.; Pereira, E.; Richter, P.; Anal. Chim. Acta 889, 130-137, 2015.

[10] Ameli, A.; Kalhor, H.; Alizadeh, N.; J. Sep. Sci. 36, 1797-1804, 2013.

[11] Abedi, H.; Ebrahimzadeh, H.; J. Sep. Sci. 38, 1358-1364, 2015.

[12] Mohammadnejad, M.; Ansari, N.; Journal of Applied Research in Chemistry 11(4), 101-109, 2017.

[13] Beiraghi, A.; Pourghazi, K.; Amoli-Diva, M.; Razmara, A.; J. Chromatogr. B 945– 946, 46-52, 2014.

[14] Kahkha, M.R.R.; Kaykhaii, M.; Afarani, M.S.; Sepehri, Z.; Anal. Methods 8, 5978-5983, 2016.

[15] Asiabi, H.; Yamini, Y.; Shamsayei, M.; Talanta 185, 80-88, 2018.

[16] Abujaber, F.; Ahmad, S.M.; Neng, N.R.; Martín-Doimeadios, R.C.R.; Bernardo, F.J.G.; Nogueira, J.M.F.; J. Chromatogr. A 1600, 17-22, 2019.

[17] Cha, Y.B.; Myung, S.W.; Bull. Korean Chem. Soc. 34, 3444-3450, 2013.

[18] Seidi, S.; Yamini, Y.; Rezazadeh, M.; Esrafili, A.; J. Chromatogr. A 1243, 6-13, 2012.

[19] Rezazadeh, M.; Yamini, Y.; Seidi, S.; Arjomandi-Behzad, L.; J. Chromatogr. A 1324, 21-28, 2014.

[20] Fotouhi, L.; Seidi, S.; Yamini, Y.; Hosseini, E.; Anal. Methods 7, 2848-2854, 2015.

[21] Bazregar, M.; Rajabi, M.; Yamini, Y.; Asghari, A.; Hemmati, M.; Anal. Chim. Acta 917, 44-52, 2016.

[22] Park, S.Y.; Myung, S.W.; Bull. Korean Chem. Soc. 36, 2901-2906, 2015.

[23] Fotouhi, L.; Seidi, S.; Shahsavari, F.; J. Iran. Chem. Soc. 13, 1289-1299, 2016.

[24] Ghani, M.; Haghdoostnejad, K.; Anal. Chim. Acta 1097, 94-102, 2020.

[25] Moradi, P.; Asghari, A.; J. Sep. Sci. 42, 897-905, 2019.

[26] Rezaei, F.; Yamini, Y.; Moradi, M.; Ebrahimpour, B.; Talanta 105, 173-178, 2013.

[27] Shiri, F.; Hashemi, B.; Fazlipour, I.;Nejati-Yazdinejad, M.; Journal of Applied Research in Chemistry 12(3), 79-86, 2018.

[28] Sereshti, H.; Khorram, P.; Nouri, N.; Sep. Purif. Rev. 48, 159-178, 2019.

[29] Javadi, T.; Farajmand, B.; Yaftian, M.R.; Zamani, A.; J. Chromatogr. A 1614, 1-7, 2020.

[30] Zhang, J.; Xu, S.; Li, W.; Chem. Eng. Process. Process Intensif. 57-58, 25-41, 2012.

JARC

Application of homogenizer assisted dispersive liquid-phase microextraction in combination with ion mobility spectrometry for the determination of mefenamic acid in different samples

Sama Hayatkhah[1], Bahman Farajmand[2,*], Mohammad Reza Yaftian[3]

1. M.Sc. Student in Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, the University of Zanjan, Iran.
2. Associate Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, the University of Zanjan, Iran.
3. Professor of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, the University of Zanjan, Iran.

Abstract: In this study, the combination of homogenizer assisted dispersive liquid-liquid microextraction and ion mobility spectrometry was introduced as a rapid and sensitive method for determination of mefenamic acid. Effective parameters of the method such as pH, ionic strength of the sample, homogenization rate and time, and type and volume of extraction solvent were investigated and optimized. Optimal conditions were obtained by applying 50 µl chloroform solvent at 8 second homogenization for 16000 rpm at pH equal to 5 and addition of 0.15 g/ml salt. The analytical performances of the method including linear range, and detection limit, repeatibility, and enrichment factor were evaluated under optimal conditions. The calibration curve was linear in the range of 10 to 500 µg/l. The inter-day and intra-day relative standard deviations were 9.8% and 8.1%, respectively. The limit of detection for the analyte was 3.1 µg/l. Relative recoveries were obtained in the range of 98 to 107 % for river water, 89 to 103 % for urine, and 90 to 111 % for milk samples.

Keywords: Dispersive liquid phase microextraction, Homogenizer, Mefenamic acid, Ion mobility spectrometry.

*** Corresponding author Email:** farajmand@znu.ac.ir