

میکرو استخراج فاز جامد پخشی دیمن هیدرینات و امپرازول با استفاده از اکسید گرافن اصلاح شده با پلی فنول‌های عصاره رزماری

سیده هدی موسوی، طاهره خزلی*

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

علی دانش فر

گروه شیمی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

چکیده: در این پروژه روشی ساده و کم هزینه برای استخراج همزمان دیمن هیدرینات و امپرازول از سرم خون، ادرار و نمونه‌های دارویی گزارش شده است. روش پیشنهادی مبتنی بر میکرو استخراج فاز جامد پخشی توسط جاذب اکسید گرافن اصلاح شده است. پلی فنول‌های عصاره رزماری در حضور اسید آمینه لیزین و فرمالدهید پلیمریزه می‌شوند و سطح اکسید گرافن را عامل دار می‌کنند. برای شناسایی کامپوزیت سنتز شده از طیف سنجی زیر قرمز - تبدیل فوریه (FT-IR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی - گسیل میدانی (FE-SEM)، پراش پرتو ایکس (XRD)، اسپکتروسکوپی پاشنده انرژی (EDS) و رامان استفاده شد. آنالیز همزمان دیمن هیدرینات و امپرازول به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فرابنفش/مرئی (HPLC-UV) انجام شد. نتایج ارزیابی کار منجر به دستیابی به محدوده خطی $1-400 \mu\text{g/L}$ ، حدود تشخیص $0.48-0.33 \mu\text{g/L}$ ، و ضرایب همبستگی (R^2) بیش از 0.9991 برای هر دو گونه شد. درصد بازیابی (بیش از $94/3$) به دست آمده از آنالیز نمونه‌های حقیقی سرم خون و ادرار نشان دهنده دقت بالای روش و عدم وجود اثر ماتریس می‌باشد. آزمون F برای مقایسه دقت و آزمون t برای مقایسه صحت روش پیشنهادی با روش‌های طیف‌سنجی فرابنفش/مرئی بر روی قرص دیمن هیدرینات و کپسول امپرازول استفاده شد و نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین پاسخ به دست آمده از دو روش وجود ندارد.

کلمات کلیدی: دیمن هیدرینات، امپرازول، میکرو استخراج فاز جامد پخشی، اکسید گرافن اصلاح شده

KEYWORDS: Dimenhydrinate, Omeprazole, Dispersive solid phase microextraction, Modified graphene oxide.

مقدمه

دی متیل-HY-پورین-۲، ۶-دی ان متشکل از نسبت‌های مساوی از نمک‌های دیفن هیدرامین و ۸-کلروتئوفیلین می‌باشد [۱ و ۲].

دیمن هیدرینات^۱ (شکل ۱- الف) با فرمول شیمیایی N_2N و N دی متیل اتان آمین؛ ۸-کلرو-۱، ۳-۲- بنزوهیدروکسیل

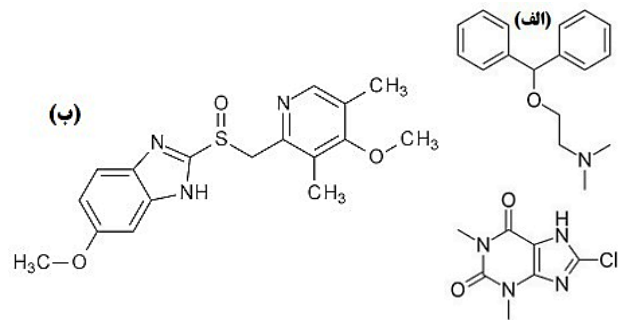
*E-mail: t.khezeli@ilam.ac.ir

* عهده‌دار مکاتبات

(۱) Dimenhydrinate (DIM)

اگرچه این روش‌های آماده سازی قدیمی از سادگی بهره می‌برند، اما امروزه استفاده از این روش‌ها به دلیل هزینه بالا، مصرف زیاد حلال‌های آلی، وقت گیر بودن فرآیند و عدم سازگاری با اصول ۱۲ گانه شیمی سبز کاهش چشمگیری داشته است [۱۹]. بنابراین ارائه روش‌هایی که برای اپراتور طاقت فرسا نباشد و مصرف حلال‌های آلی را به حداقل برساند و از طرفی بازده خوبی نیز داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد. از جمله روش‌های نوین استخراج می‌توان به میکرواستخراج مایع-مایع پخشی اشاره کرد که سادگی فرآیند، سریع بودن، کم هزینه بودن، بازیابی و پیش تغلیظ بالا از مهمترین ویژگی‌های بارز این روش می‌باشد [۲۰-۲۳]. اخیراً در میان روش‌های جدید، میکرواستخراج فاز جامد پخشی^۳ (D- μ SPE) توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است [۲۴ و ۲۵]. برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ *آناستاسیادس*^۴ و همکاران استخراج فاز جامد پخشی^۵ (DSPE) را ارائه کردند [۲۶]. D- μ SPE شامل دو مرحله جذب و واجذب است. در مرحله جذب، مقدار بسیار کمی از جاذب (در حد میلی گرم) با استفاده از یک همزن مغناطیسی، دستگاه ورتکس یا امواج فراصوت در نمونه آبی حاوی گونه‌های مورد نظر برای مدت زمان مشخصی پخش می‌شود تا استخراج انجام شود. تماس نزدیک بین ذرات جاذب و گونه‌ها سرعت فرآیند جذب را افزایش می‌دهد و منجر به کاهش زمان استخراج می‌شود. در مرحله واجذب، گونه‌های جذب شده با استفاده از یک حلال مناسب و معمولاً تحت شرایط فراصوت از روی جاذب شسته می‌شوند [۲۷]. D- μ SPE برای استخراج ترکیبات بیشمار از جمله آفت کش‌ها [۲۸]، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه [۲۹]، تری آزین‌ها [۳۰]، هیدروکربن‌های نیترو آروماتیک [۳۱] و غیره به کار رفته است. یکی از نکات کلیدی و چالش برانگیز در این روش انتخاب فاز جامد است که نقش جاذب را ایفا می‌کند. متاسفانه، در بسیاری از موارد سنتز و آماده سازی جاذب یک فرآیند وقت گیر است و نیاز به صرف انرژی و استفاده از مواد شیمیایی ویژه دارد [۲۷].

اغلب در D- μ SPE از سیلیس، آلومینا و سایر نانو مواد به عنوان پایه جاذب استفاده می‌شود. جالب توجه است که می‌توان با کمک واکنش‌های شیمیایی، پایه جاذب را عامل دار کرد و یک فاز جامد با ویژگی‌های مورد نظر محقق سنتز کرد. افزودن گروه‌های عاملی مانند هیدروکسی، آمین، آمید و کربوکسیلیک اسید شانس برهم کنش گونه با جاذب را از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی و جاذبه‌های الکترواستاتیکی افزایش می‌دهد. اکسید گرافن^۶ (GO) نیز به دلیل سطح ویژه زیاد،



شکل ۱- ساختار شیمیایی دیمن هیدرینات (الف) و امپرازول (ب).

دیمن هیدرینات متعلق به خانواده داروهای آنتی هیستامین است و اثرات ضد موسکارینی و آرام بخشی قابل توجهی دارد. این دارو معمولاً در پیشگیری و درمان تهوع در طول مسافرت استفاده می‌شود. کاربردهای دیگری برای دیمن هیدرینات از جمله درمان سرگیجه و حالت تهوع مرتبط با بیماری منیر و سایر اختلالات دهلیزی گزارش شده است [۳ و ۴]. امپرازول^۱ (شکل ۱-ب) که از نظر شیمیایی به عنوان ۵-متوکسی-۲-[[[۴-متوکسی-۳-دی-۵-متیل-۲-پیریدینیل) متیل] سولفنیل]-H₁ بنزیمیدازول تعریف می‌شود، یکی از اعضای مهم مهارکننده‌های پمپ پروتون است و از بنزیمیدازول مشتق شده است. امپرازول با اتصال کووالانسی به آنزیم H⁺/K⁺ ATPase واقع در غشای ترشحی سلول‌های جداری معده باعث ترشح اسید در مجرای معده می‌شود و به این ترتیب اسیدیته معده را کنترل می‌کند [۵-۸]. بیشترین غلظت دیمن هیدرینات در پلاسما خون بعد از مصرف ۲۵ میلی گرم از این دارو به ۱۴/۵ نانوگرم بر میلی لیتر می‌رسد [۹]. در آزمایشی که توسط فستن^۲ و همکاران روی خون ۵۶۷ نفر انجام گرفت، غلظت امپرازول در محدوده ۲۵-۸۰ ng/mL گزارش شد [۱۰]. بنابراین برای اندازه‌گیری این دارو در مقادیر ناچیز روش‌هایی با میزان پیش تغلیظ بالا مورد نیاز است. روش‌های دستگاهی مختلفی برای تعیین داروهای ذکر شده در نمونه‌های مختلف از جمله سرم خون انسان، ترکیبات دارویی و نمونه ادرار گزارش شده است که از جمله آنها می‌توان به روش‌هایی مانند اسپکتروفتومتری [۱۱ و ۱۲]، کروماتوگرافی [۱۳ و ۱۴] و الکتروشیمیایی [۱۵ و ۱۶] اشاره کرد. آنالیز مستقیم این دارو از ماتریس‌های پیچیده بیولوژیکی با مشکلاتی مواجه است. بنابراین سعی می‌شود با کمک روش‌های آماده سازی نمونه مشکل کار با ماتریس‌های پیچیده را حل نمود. استخراج‌های قدیمی مایع-مایع و استخراج فاز جامد از متداول‌ترین روش‌ها برای استخراج امپرازول و دیمن هیدرینات از نمونه‌های زیستی می‌باشند [۹، ۱۷ و ۱۸].

(۱) Omeprazole (OMP)

(۳) Dispersive μ -Solid-Phase Extraction (D-SPE)

(۵) Dispersive Solid-Phase Microextraction

(۲) Festen

(۴) Anastasiades

(۶) Graphene Oxide (GO)

مجهز به کنترل کننده سیستم SCL 10Avp، آشکارساز UV SPD10Avp در ۲۵۴ نانومتر (λ_{max} گونه‌ها)، پمپ LC 10Avp، شیر انژکتور با حلقه ۲۰ میکرولیتری و نرم افزار Class-VP انجام شد. جداسازی با استفاده از یک ستون Eurospher 100-5 C8 KNAUER (۴/۶ قطر داخلی $\times 150$ میلی متر؛ اندازه ذرات ۵ میکرومتر) که در دمای محیط ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری می شد به دست آمد. شویش ترکیبات به صورت ایزوکراتیک با استفاده از فاز متحرک متشکل از استونیتریل: آب (۵۰:۵۰؛ حجمی/حجمی) با سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد.

دستگاه ورتکس (Daihan Scientific، کره)، pH متر ۷۸۰ Metrohm (سوئیس)، سانتریفیوژ دیجیتال K280R Centurion Scientific (بریتانیا) و یک حمام اولتراسونیک مدل (BANDELIN) RK103H، آلمان) برای پراکندگی محلول نانو کامپوزیت در نمونه استفاده شد. شناسایی گروه‌های عاملی در مواد تهیه شده با استفاده از طیف سنج FT-IR (Bruker, Vertex 70) انجام شد. XRD مواد سنتز شده توسط پراش سنج PHILIPS PW1730 مجهز به آنتی کاتد مس ($\lambda_{CuK\alpha}=1.541838 \text{ \AA}$) در ولتاژ ۳۰ کیلو ولت از زاویه ۱۰ تا ۸۰ درجه ثبت شد. تصاویر FE-SEM و EDS توسط دستگاه FE-SEM مدل MIRA II از شرکت TESCAN انجام شد. طیف رامان با طیف سنج رامان TakRam N1-541 (تکسان، ایران) ثبت شد. اندازه‌گیری‌های جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Cary) UV-Vis با سل به طول ۱ سانتی‌متر انجام گرفت.

سنتز اکسید گرافن

طبق روش ارائه شده توسط *Fraga* و همکاران [۳۵]، برای سنتز GO، ۲۸ میلی لیتر H_2SO_4 غلیظ با یک گرم پودر گرافیت مخلوط شد و سپس ۳ گرم $KMnO_4$ به عنوان عامل اکسید کننده با دقت به مخلوط مذکور ضمن هم زدن ملایم اضافه شد تا مخلوط همگن حاصل شود. در طول افزودن $KMnO_4$ ، مخلوط در یک حمام یخ نگهداری شد. پس از آن، مخلوط به مدت ۳ ساعت در حمام آب با دمای ۳۵ درجه سلسیوس به هم زده شد. فرآیند اکسیداسیون با افزودن ۱۰ میلی لیتر H_2O_2 به پایان رسید. محصول نهایی ابتدا با محلول اسیدی (۲۵٪ HCl)، سپس با آب مقطر شسته شد و در آن (۵۰ درجه سلسیوس، ۱۲ ساعت) خشک شد.

سنتز اکسید گرافن - پلی فنول‌های رزماری (GO-polyphenols)

ابتدا برگ‌های خشک رزماری با استفاده از آسیاب خانگی پودر شد تا استخراج پلی فنول‌ها از رزماری سریعتر صورت گیرد. سپس ۵۰۰ میلی لیتر از نسبت مساوی اتانول به آب به ۵ گرم از پودر به دست آمده اضافه شد و مخلوط به مدت ۱ ساعت تحت اتمسفر نیتروژن

تحرك بالای انتقال الکترون، خواص حرارتی بالا و استحکام مکانیکی زیاد به عنوان یک جاذب کارآمد استفاده می‌شود [۳۲ و ۳۳].

در بسیاری از مقالات گزارش شده، از معرف‌های شیمیایی تجاری برای اصلاح سطح جاذب استفاده می‌شود که اغلب گران بوده و در دسترس همه محققین نیست. لذا در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از مواد زیستی برای اصلاح سطح جاذب‌ها افزایش یافته است. همانطور که می‌دانیم چای سبز، رزماری و بسیاری از گیاهان دیگر منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های پلی فنولی مانند اسید تانیک، کوئرستین، کافئیک اسید، روتین، گالیک اسید و غیره هستند. پلی فنول‌های طبیعی عموماً ارزان‌تر از پلیمرهای سنتزی هستند و به راحتی به دست می‌آیند. پلی فنول‌های طبیعی با داشتن حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های هیدروکسی فراوان، برای اصلاح سطح و افزایش برهم‌کنش بین گونه‌ها و جاذب از طریق جاذبه‌های الکترواستاتیکی، پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های π - π بسیار کارآمد هستند [۳۴].

در این مطالعه، پس از سنتز GO، سطح آن با کمک پلی فنول‌های طبیعی عصاره رزماری عامل دار شد. پلی فنول‌های رزماری در محل با افزودن اسید آمینه (لیزین) و فرمالدهید به عصاره رزماری پلیمریزه شده و همزمان سطح GO را عامل دار می‌کنند. در این پژوهش برای اولین بار کارایی جاذب (GO-polyphenols) در استخراج همزمان داروهای دیمن هیدرینات و امپرازول ارزیابی شد.

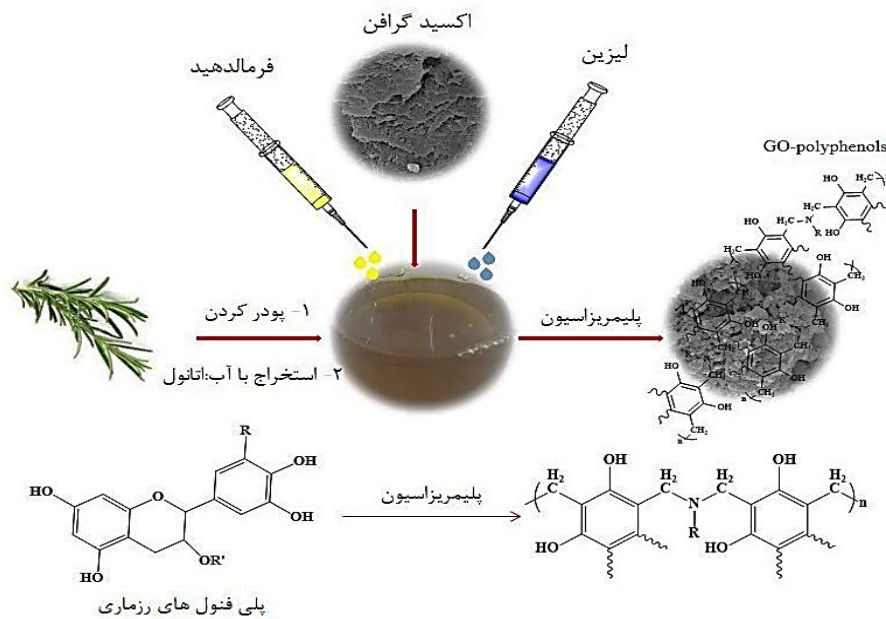
بخش تجربی

مواد و محلول‌ها

دیمن هیدرینات و امپرازول از شرکت Sigma-Aldrich (سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. حلال‌ها و واکنشگرها با خلوص آزمایشگاهی شامل آب، متانول، اتانول، استونیتریل، سدیم کلرید (NaCl)، کلریدریک اسید (HCl، ۳۷٪)، سدیم هیدروکسید (NaOH)، سولفوریک اسید (H_2SO_4 ، ۹۸٪)، پتاسیم پرمنگنات ($KMnO_4$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2 ، ۳۷٪)، پودر گرافیت (۹۹٪)، لیزین، و فرمالدهید در آب (حدود ۳۰٪) توسط Merck (آلمان) عرضه شد. محلول‌های ۱۰۰ mg/L دیمن هیدرینات و امپرازول روزانه با حل کردن داروها در اتانول و رقیق کردن آنها با آب دوبار تقطیر تهیه و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. رزماری خشک شده از یک خواروبار فروشی محلی واقع در شهرستان شیروان چرداول شهر ایلام خریداری شد. قرص دیمن هیدرینات (۵۰ میلی گرم) و کپسول امپرازول (۲۰ میلی گرم) به ترتیب از شرکت‌های داروسازی امین و اکسیر تهیه شدند.

دستگاه‌ها و تجهیزات

جداسازی دیمن هیدرینات و امپرازول توسط دستگاه HPLC شیمادزو



شکل ۲- مراحل سنتز نانوکامپوزیت GO-polyphenols

آن بر روی ۴ تنظیم شده بود، اضافه شد و مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد تا استخراج داروها انجام شود. پس از آن، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه به منظور جمع آوری جاذب سانتریفیوژ شد و فاز آبی بالایی تخلیه شد. مرحله شستشوی جاذب و واجذب گونه ها با افزودن ۷۵ میکرولیتر اتانول به جاذب ته نشین شده و هم زدن آن به مدت ۱۰ دقیقه به کمک دستگاه ورتکس انجام شد. پس از سانتریفیوژ، فاز شویشی حاوی داروهای استخراج شده به ظرف دیگری منتقل شد و ۲۰ میکرولیتر از آن به سیستم HPLC-UV تزریق شد.

آماده سازی نمونه های حقیقی

قبل از انجام روش D- μ SPE هیچ آماده سازی خاصی روی نمونه ادرار انسان (۵ میلی لیتر) انجام نشد و فقط نمونه صاف شد. برای رسوب دادن پروتئین های سرم خون، حجم مناسبی از استونیتریل (۳ میلی لیتر) به نمونه سرم خون (۱ میلی لیتر) اضافه شد و پس از رسوب دادن پروتئین ها، فاز بالایی با سانتریفیوژ جدا شد. پس از آماده سازی، حجم های مشخصی از محلول های استاندارد دیمن هیدرینات و امپرازول به هر دو نمونه حقیقی اضافه شد و سپس با آب یون زدایی شده به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد تا غلظت های مورد نیاز در محدوده منحنی کالیبراسیون حاصل شود. برای آماده سازی نمونه های دارویی، محتویات سه قرص دیمن هیدرینات (۵۰ میلی گرم به ازاء هر قرص) و کپسول امپرازول (۲۰ میلی گرم به ازاء هر کپسول) به طور دقیق وزن شده و به طور جداگانه

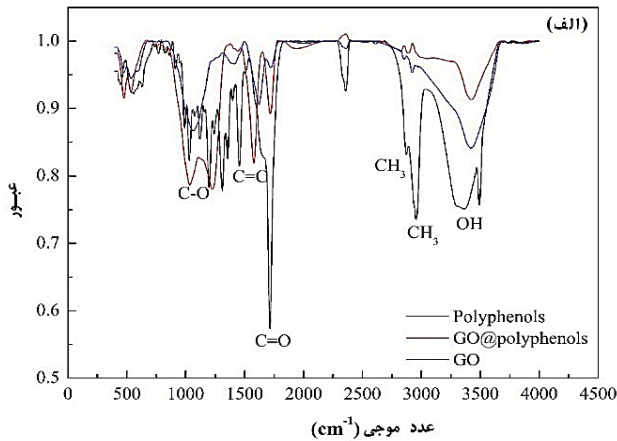
به منظور جلوگیری از اکسید شدن پلی فنول ها هم زده شد. عصاره شفاف رزماری پس از فیلتراسیون و سانتریفیوژ به دست آمد و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

GO-polyphenols از طریق پلیمریزاسیون درمحل پلی فنول های رزماری در حضور لیزین (یک اسید آمینه) و فرمالدهید تهیه شد. برای این منظور، مقدار مناسبی از GO در ۴۰ میلی لیتر عصاره رزماری به کمک امواج فراصوت پراکنده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر فرمالدهید و ۱ میلی لیتر محلول لیزین (۱۰ mg/mL) تهیه شده در آب یون زدایی شده (در طی ۲ ساعت تحت هم زدن مداوم در دمای اتاق به محلول قبلی اضافه شد. نتیجه واکنش بین لیزین، فرمالدهید و پلی فنول ها تولید الیگومرهای پلی فنولی حاوی پل های دی بنزیلامین و واحدهای بنزو کسازین است که منجر به پلیمریزاسیون در عصاره رزماری می شود [۳۴].

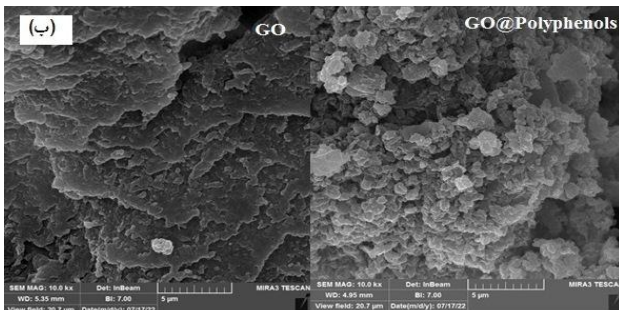
پس از پلیمریزاسیون، مخلوط حاصل برای جمع آوری GO-polyphenols به سانتریفیوژ منتقل شد. مواد واکنش نداده با شستشوی کامپوزیت با آب یون زدایی شده حذف شدند. محصول نهایی در دمای اتاق تحت اتمسفر نیتروژن خشک شد. برای مقایسه، پلی فنول های طبیعی رزماری به طور مشابه در غیاب نانوذرات GO سنتز شدند. شکل ۲ مراحل آماده سازی کامپوزیت نهایی را نشان می دهد.

روش میکرو استخراج فاز جامد پخشی

۷ میلی گرم از GO-polyphenols به ۲ میلی لیتر محلول استاندارد دیمن هیدرینات و امپرازول با غلظت ۲۰۰ μ g/L که pH



شکل ۳- الف- طیف FT-IR برای GO، پلی فنول های رزماری و GO-polyphenols



شکل ۳- ب- تصاویر FE-SEM برای GO و GO-polyphenols

شکل ۳- پ الگوی XRD نمونه های GO و GO-polyphenols را نشان می دهد. در مورد GO، پیک های واقع در حدود $2\gamma/3$ درجه و $43/2$ درجه به ترتیب به صفحات (۰۰۲) و (۱۰۰) تعلق دارند که با یافته های به دست آمده از مطالعات دیگر همخوانی دارند [۳۸]. بر اساس معادله دبی- شرر^۱ اندازه کریستال های GO معادل $97/62$ آنگستروم تخمین زده شد که به مقدار گزارش شده (۱۱۸ آنگستروم) در مرجع [۳۸] نزدیک است. همانطور که در الگوی XRD GO-polyphenols نشان داده شده است، شدت دو پیک مشخصه GO به دلیل ادغام پلی فنول ها کاهش یافت و نانوکامپوزیت نهایی ساختاری آمورف را نشان داد. از تکنیک EDS برای تعیین ترکیب شیمیایی نانو کامپوزیت GO-polyphenols استفاده شد. نتایج EDS (شکل ۳- ت) نشان دهنده ترکیب اتمی $52/43\%$ کربن، $4/21\%$ نیتروژن و $36/43\%$ اکسیژن برای GO-polyphenols است. وجود عنصر نیتروژن در نتایج EDS به دلیل اسید آمینه لیزین می باشد که در فرآیند پلیمریزاسیون در واکنش استفاده شده است.

در هاون پودر شدند. مقداری معادل یک قرص/یا کپسول وزن شده و به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس ترکیب متانول/آب (۵۰/۵۰: حجمی/حجمی) با آنها اضافه شد و هر یک به مدت ۱۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. در پایان محلول ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شده و قبل از اعمال روش D- μ SPE در یخچال نگهداری شدند.

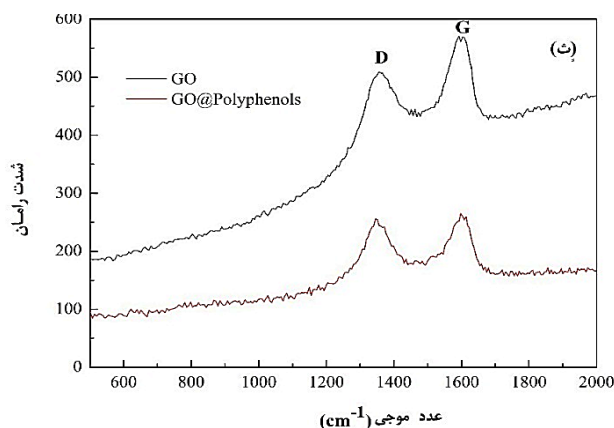
نتیجه ها و بحث

شناسایی مواد

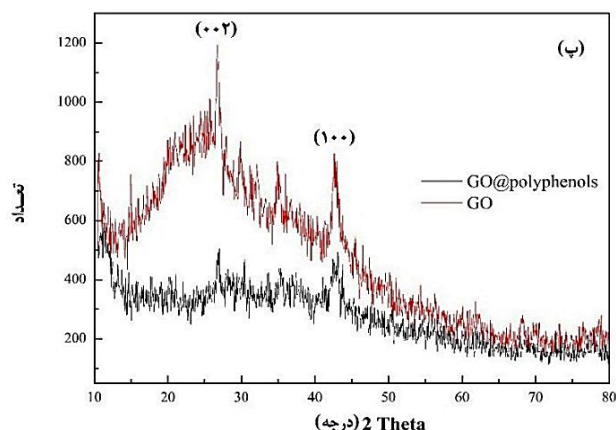
از FT-IR برای شناسایی گروه های عاملی، از FE-SEM برای تشخیص ریخت شناسی سطح، از EDS برای آنالیز عنصری، از اسپکتروسکوپی رامان برای تعیین ساختار اکسید گرافن و از XRD برای تشخیص ساختار کریستالی مواد سنتزی و GO-polyphenols استفاده شد. عصاره رزماری شامل مولکول های آلی مختلفی است که دارای گروه های آروماتیک و فنولی است. طیف FT-IR پلی فنول های عصاره رزماری خشک شده، GO و GO-polyphenols در شکل ۳- الف نشان داده شده است. طیف پلی فنول ها نوار پهنی را در $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ نشان می دهد که مربوط به کشش O-H الکل ها و/یا اسیدهای کربوکسیلیک است. پیک های واقع در 2929 cm^{-1} و 2854 cm^{-1} به کشش C-H گروه CH_3 - مربوط است. کشش C=C حلقه (1597 cm^{-1}) و کشش C-OH گروه های فنولی (1264 cm^{-1} و 1029 cm^{-1}) نیز مشاهده شد. پیک مشاهده شده در 1715 cm^{-1} به دلیل ارتعاشات نامتقارن کششی پیوند C=O اسید کربوکسیلیک است. نوارهای دیگر در $1500-1000\text{ cm}^{-1}$ متعلق به ارتعاشات حلقه های آروماتیک می باشد [۳۶]. در مورد GO، نوارهای 3422 cm^{-1} و 1621 cm^{-1} به ترتیب به دلیل ارتعاشات کششی و خمشی گروه های هیدروکسیل هستند. نوارهای کششی آلیفاتیک C-H در 2922 cm^{-1} و 2855 cm^{-1} قرار دارند. پیک های واقع در 1721 cm^{-1} و 1066 cm^{-1} به ترتیب به دلیل ارتعاش کششی C=O و C-O هستند [۳۷]. در طیف GO-polyphenols، تمام باندهای مشخصه مربوط به پلی فنول های رزماری و GO مشاهده شد، با این تفاوت که شدت آنها کاهش یافته و تغییر در عدد موجی آنها رخ داده است که نشان دهنده بارگذاری موفق پلی فنول ها بر سطح GO است.

تصاویر FE-SEM (شکل ۳- ب) نشان دهنده این است که GO ساختاری ورق مانند دارد. ریخت شناسی سطح GO پس از اصلاح توسط پلی فنول های رزماری تغییر کرد. همانطور که در شکل ۳- ب مشاهده می شود، پلی فنول ها به طور یکنواخت روی لایه های GO توزیع شده اند.

(۱) Debye-Scherrer Equation



شکل ۳-ت- طیف های رامان GO و GO-polyphenols



شکل ۳-پ- الگوی XRD نمونه‌های GO و GO-polyphenols

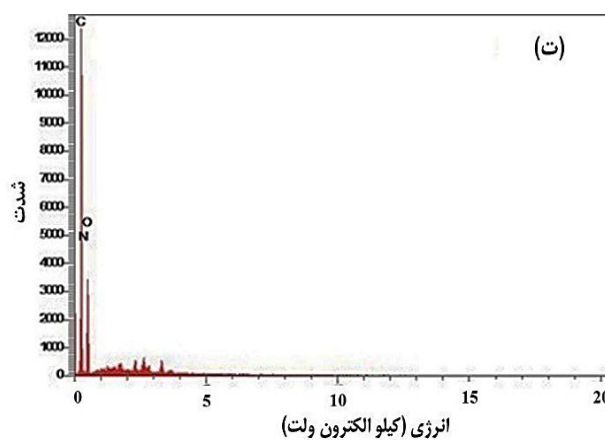
از آنجاییکه پلی فنول‌ها گروه‌های هیدروکسیل بیشتری نسبت به فنول دارند، بنابراین واکنش‌پذیری شیمیایی آنها بالاتر است و گزینه مناسبی برای واکنش تراکم مانیک می‌شوند [۴۱]. محصولات حاصل از واکنش تراکمی بین پلی فنول‌ها، لیزین و فرمالدهید از طریق پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی و برهم‌کنش‌های π - π دچار خودتجمعی شده و هسته‌های پلیمر را تشکیل می‌دهند [۴۲]. واکنش کلی بین سه جزء در شکل ۴ نشان داده شده است که توسط بی^۲ و همکاران گزارش شده است [۴۲]. در طی فرآیند واکنش، گروه‌های عاملی پلی فنول‌ها پلیمریزه شده با گروه‌های هیدروکسیل GO برهم‌کنش می‌کنند و سطح آن را می‌پوشانند.

بهینه‌سازی

به منظور بهینه‌کردن شرایط استخراج اثر عوامل مختلفی از جمله نوع و مقدار جاذب، pH و قدرت یونی محلول آبی، حجم حلال شوینده، زمان جذب و زمان واجذب بررسی شد. برای بهینه‌سازی هر عامل از روش یک متغیر در یک زمان استفاده شده است. این روش بهینه‌سازی به علت سادگی و عدم نیاز به آزمایش‌گر مسلط به کار با نرم افزارهای خاص کاربرد فراوانی دارد.

نوع جاذب

تأثیر نوع جاذب بر راندمان استخراج داروهای مذکور با مقایسه دو جاذب GO و GO-polyphenols مورد بررسی قرار گرفت. نتایج گزارش شده در شکل ۵ نشان می‌دهد که GO اصلاح شده به دلیل وجود گروه‌های عاملی بیشتر جاذب بهتری است و برهم‌کنش‌های بیشتری با دیمن هیدرینات و امپرازول دارد.



شکل ۳-ت- طیف EDS کامپوزیت GO-polyphenols

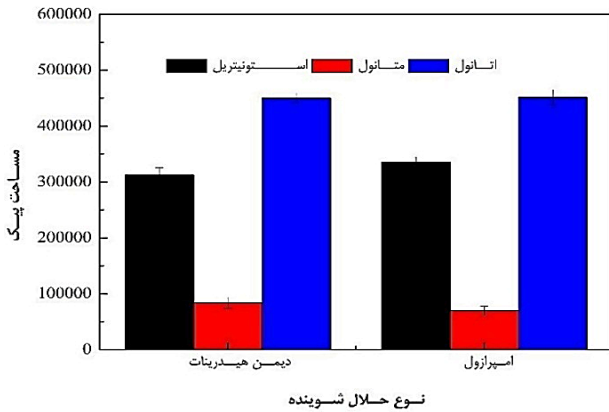
در طیف‌های رامان GO و GO-polyphenols (شکل ۳-ت)، نوار D حدود 1350 cm^{-1} و باند G حدود 1600 cm^{-1} ظاهر شده است. در GO-polyphenols باندهای G و D کمی به عدد موجی پایین‌تر از موقعیت GO منتقل شدند و کاهش شدت آنها بعد از اصلاح سطح با پلی فنول‌ها نیز مشاهده می‌شود. نسبت شدت نوار D (کربن‌هایی با هیبریداسیون sp^3) به نوار G (کربن‌هایی با هیبریداسیون sp^2) در GO معادل $0.89/1$ می‌باشد که با مرجع [۳۹] همخوانی دارد. این نسبت در GO-polyphenols معادل $1.01/1$ می‌باشد که نشان این واقعیت است که به علت پلیمریزه شدن پلی فنول‌ها در سطح GO تعداد اتم‌های کربن دارای هیبریداسیون sp^3 در کامپوزیت نهایی افزایش یافته است.

مکانیسم پلیمریزاسیون پلی فنول‌های عصاره رزماری

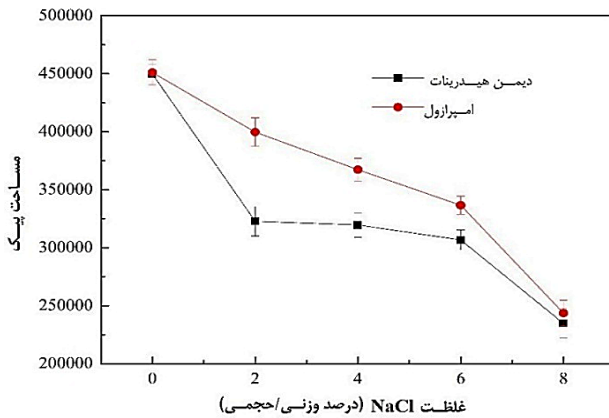
یاگچی^۱ و همکاران گزارش دادند که واکنش بین فنول، فرمالدهید و آمین‌های آلیفاتیک یا آروماتیک منجر به تشکیل پل‌های دی بنزیلامین و مونومرهای بنزوکسازین از طریق تراکم مانیک می‌شود [۴۰].

(۱) Yagci

(۲) Yi



شکل ۶- تاثیر نوع حلال شوینده بر کارایی استخراج امپرازول و دیمین هیدرینات. ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده، $\text{pH}=7$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، زمان واجذب ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.

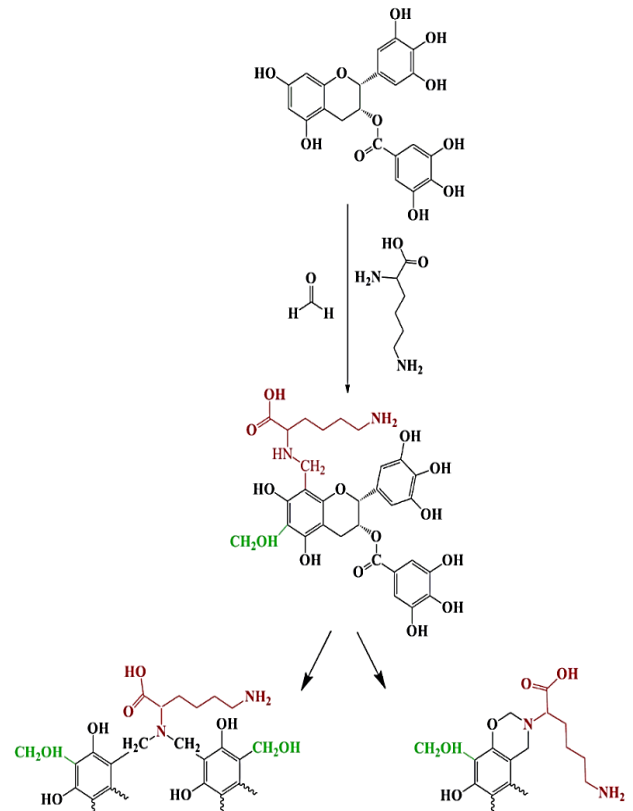


شکل ۷- تاثیر قدرت یونی فاز آبی بر کارایی استخراج امپرازول و دیمین هیدرینات. ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده اتانول، $\text{pH}=7$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، زمان واجذب ۱۰ دقیقه.

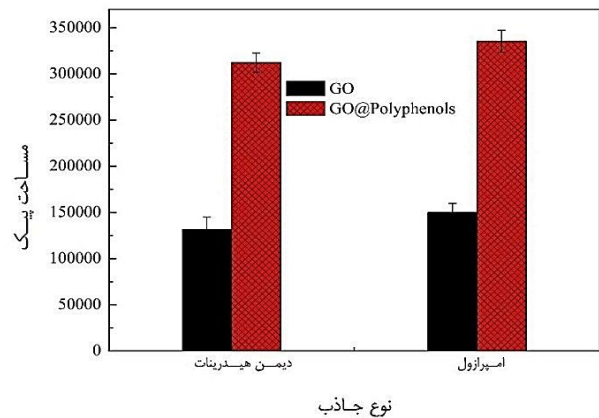
این ویژگی‌ها، واجذب گونه‌ها از GO-polyphenols با استفاده از حلال‌های سازگار با HPLC مانند اتانول، متانول و استونیتریل در شرایط استخراجی یکسان مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که کارایی شوینده اتانول بیشتر از استونیتریل و متانول است (شکل ۶).

اثر نمک

اثر قدرت یونی در روش‌های استخراجی متعددی بررسی شده است. غالباً افزایش نمک سبب کاهش حلالیت گونه‌های آبدوست در فاز آبی از طریق پدیده نمک زنی می‌شود و کارایی استخراج را افزایش می‌دهد [۴۳]. با این وجود، افزایش نمک ممکن است کارایی استخراج را به واسطه افزایش ویسکوزیته فاز آبی و کاهش سرعت انتقال جرم گونه از فاز آبی به فاز استخراج کننده کاهش دهد [۴۴]. برای بررسی اثر این عامل، در محدوده غلظت ۰ تا ۸٪ وزنی/حجمی به نمونه آبی حاوی گونه‌های هدف اضافه شد. نتایج شکل ۷ نشان می‌دهد که افزودن نمک



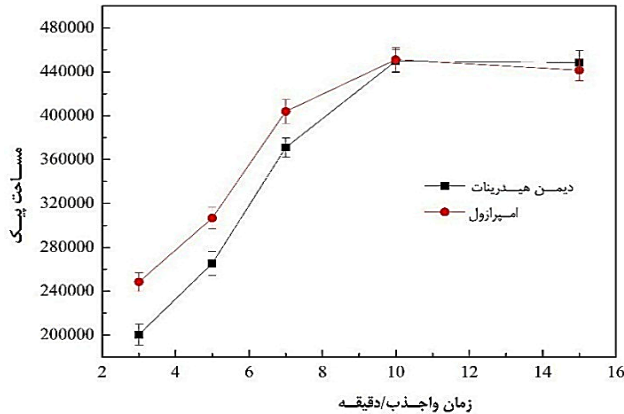
شکل ۴- مسیبه‌های واکنش برای پلیمریزاسیون پلی فنول‌های عصاره رزماری [۴۲].



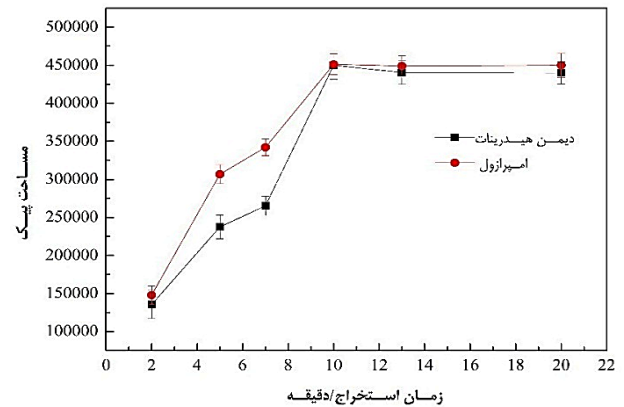
شکل ۵- تاثیر نوع جاذب بر کارایی استخراج امپرازول و دیمین هیدرینات. شرایط استخراج: ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده استونیتریل، $\text{pH}=7$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، زمان واجذب ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.

نوع حلال شوینده

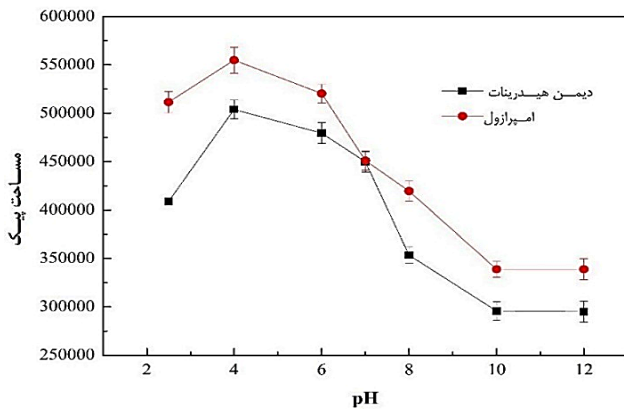
انتخاب حلال شوینده مناسب برای واجذب کامل گونه‌ها از سطح جاذب بسیار مهم است. میزان حلالیت گونه‌ها در حلال شوینده و سازگار بودن آن با دستگاه کروماتوگرافی از جمله مواردی هستند که باید در انتخاب حلال شوینده به آن‌ها توجه شود. با در نظر گرفتن



شکل ۹- تاثیر زمان واجذب بر کارایی استخراج امپرازول و دیمن هیدرینات. ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده اتانول، $\text{pH}=7$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.



شکل ۱۰- تاثیر زمان استخراج بر کارایی استخراج امپرازول و دیمن هیدرینات. ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده اتانول، $\text{pH}=7$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان واجذب ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.



شکل ۱۱- تاثیر pH فاز آبی بر کارایی استخراج امپرازول و دیمن هیدرینات. ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده اتانول، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، زمان واجذب ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.

اثر pH نمونه آبی

بهینه کردن pH محلول آبی نمونه، به خاطر تاثیری که این فاکتور بر شکل گونه و کارایی استخراج دارد بسیار مهم است. برای انتقال موثر گونه‌ها از محلول آبی به فاز استخراج کننده، گونه‌ها باید به فرم مولکولی یا یونی باشند. تغییر pH محیط باعث می‌شود گونه به شکل مولکولی یا یونی تغییر کند و در نتیجه برهمکنش آن با جاذب تغییر نماید. برای بررسی اثر pH بر کارایی استخراج، pH نمونه آبی با افزایش محلول‌های هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار در محدوده ۲/۵ تا ۱۲ تنظیم شد. در شکل ۱۱ تغییرات سیگنال تجزیه‌ای با تغییر pH نمونه آبی از ۲/۵ به ۱۲ قابل مشاهده است. برای هر دو ترکیب بهترین پاسخ در $\text{pH}=4$ حاصل شد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش pH تا مقدار ۴ کارایی استخراج افزایش می‌یابد و پس از آن با افزایش مقدار pH کارایی استخراج به شدت کاهش یافته است. با توجه به ثابت‌های اسیدی برای

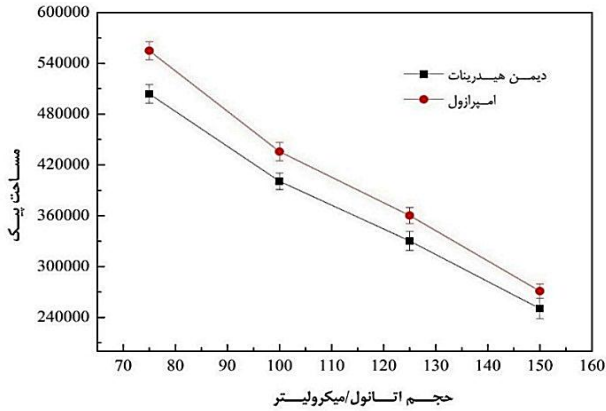
به علت افزایش ویسکوزیته فاز آبی و تاثیر منفی آن بر سرعت انتقال جرم گونه‌ها سبب کاهش کارایی استخراج شده است. بنابراین از افزودن نمک در مراحل بعدی بهینه‌سازی خودداری شد.

زمان استخراج

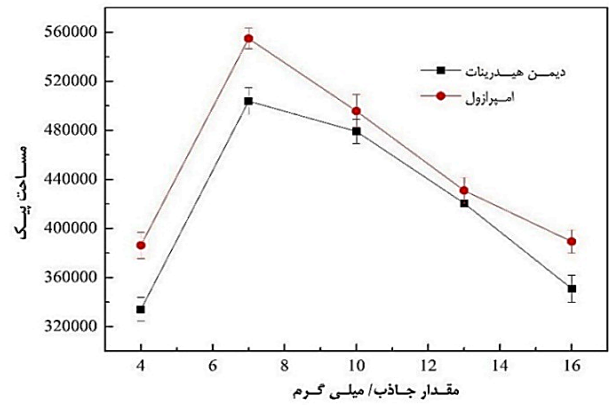
یکی از عوامل موثر برای بهبود راندمان استخراج در $\text{D}-\mu\text{SPE}$ ، داشتن زمان کافی برای جذب گونه‌ها توسط جاذب است. هرچه میل ترکیبی گونه‌ها به جاذب بیشتر باشد، تعادل بین فازها سریعتر اتفاق می‌افتد و زمان استخراج کوتاه تر می‌شود. برای این منظور زمان‌های استخراج ۲ تا ۲۰ دقیقه برای بررسی اثر این عامل انتخاب شد. نتایج شکل ۸ نشان می‌دهد با افزایش زمان استخراج از ۲ تا ۱۰ دقیقه راندمان استخراج نیز افزایش یافته زیرا با گذشت زمان گونه‌ها شانس بیشتری برای برهم کنش با جاذب دارند. پس از ۱۰ دقیقه به تعادل رسیدن فرآیند استخراج سبب شده که تغییر محسوسی در نتایج مشاهده نشود.

زمان واجذب

این مرحله از بهینه‌سازی برای واجذب گونه‌ها از فاز استخراج کننده با کمک یک حلال شوینده مناسب در یک بازه زمانی مشخص مورد مطالعه قرار گرفت. انتخاب دقیق این دو عامل در بهبود راندمان استخراج بسیار موثر است. در این مرحله، کارایی اتانول به عنوان حلال شوینده در واجذب گونه‌ها در ۳ تا ۱۵ دقیقه به چالش کشیده شد. نتایج نشان می‌دهد که راندمان استخراج تا ۱۰ دقیقه افزایش یافته و پس از آن تغییر محسوسی در نتایج حاصل نشده است (شکل ۹). در زمان‌های بیشتر از ۱۰ دقیقه روند تغییرات تقریباً ثابت شده است که نشان دهنده برقراری تعادل در فرآیند واجذب می‌باشد.



شکل ۱۲- تاثیر حجم حلال شوینده بر کارایی استخراج دیمین امپرازول و هیدرینات. حلال شوینده اتانول، $pH=4$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، زمان واجذب ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.



شکل ۱۱- تاثیر مقدار جاذب بر کارایی استخراج امپرازول و دیمین هیدرینات. ۷۵ میکرولیتر حلال شوینده اتانول، $pH=4$ ، ۷ میلی گرم جاذب، زمان استخراج ۱۰ دقیقه، زمان واجذب ۱۰ دقیقه و غلظت سدیم کلرید = درصد وزنی/حجمی.

زیرا حجم نهایی اتانول جمع آوری شده کمتر از حجم مورد نیاز برای تزریق به دستگاه HPLC بود.

ارزیابی روش

ارقام شایستگی مانند محدوده خطی، حد تشخیص^۲، حد کمی^۳، درصد انحراف استاندارد نسبی^۴ (RSD)، دقت، فاکتور غنی سازی^۵ و بازیابی استخراج^۶ برای ارزیابی روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور برآورد گستره خطی، ۱۱ محلول استاندارد با غلظت‌های دقیقاً مشخصی از دیمین هیدرینات و امپرازول در محدوده ۱-۴۰۰ $\mu\text{g/L}$ تهیه و بعد از استخراج توسط با $D-\mu\text{SPE}$ به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق و مساحت پیک به دست آمده به ازای هر کدام از غلظت‌ها ثبت شد. منحنی‌های کالیبراسیون برای هر دو گونه از محدوده‌ی غلظت ۱ تا ۴۰۰ $\mu\text{g/L}$ با ضریب همبستگی $R^2 > 0.9991$ خطی بود. حد تشخیص و حد کمی با در نظر گرفتن ۳ و ۱۰ برابر انحراف استاندارد تکرار آزمایش در کمترین غلظت منحنی کالیبراسیون (S_b) و جای گذاری شیب منحنی‌های کالیبراسیون (m) در فرمول‌های زیر به ترتیب در محدوده ۰/۳۳-۰/۴۸ $\mu\text{g/L}$ و ۱/۶۱-۱/۱۲ $\mu\text{g/L}$ به دست آمد.

$$\text{LOD} = \frac{3S_b}{m}, \quad \text{LOQ} = \frac{10S_b}{m}$$

فاکتور غنی سازی بر اساس معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{EF} = \frac{C_f}{C_i}$$

در این معادله C_i و C_f به ترتیب غلظت نهایی گونه‌ها بعد از استخراج و غلظت اولیه آنها در فاز آبی می‌باشد.

امپرازول ($pK_{a1}=4/77$ و $pK_{a2}=9/29$) و دیمین هیدرینات ($pK_a=8/87$)، این ترکیبات بازهای ضعیف به شمار رفته و در محیط اسیدی پروتون دار می‌شوند. از طرفی مطالعات انجام شده توسط چن^۱ و همکاران نشان می‌دهد که پلی فنول‌ها در محیط‌های آبی دارای پتانسیل زتای منفی می‌باشند [۳۴]. با توجه به این شواهد بیشترین برهم کنش بین آنالیت‌های دارای بار مثبت و جاذب دارای منفی در $pH=4$ رخ داده است. براین اساس برای رسیدن به بیشترین میزان استخراج $pH=4$ به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

مقدار جاذب

عامل دیگری که مورد مطالعه قرار گرفت اثر مقدار جاذب از ۴ تا ۱۶ میلی گرم بود. با توجه به شکل ۱۱، بهترین بازه استخراج در مقدار ۷ میلی گرم از GO-polyphenols بدست آمد. در مقادیر کمتر از ۷ میلی گرم، به علت کافی نبودن سطح قابل دسترس جاذب برای گونه‌ها کارایی استخراج کم بوده است. در مقادیر بیش از ۷ میلی گرم، به علت تجمع نانو کامپوزیت، پخش آن‌ها در محلول آبی نمونه به خوبی صورت نگرفته و در نتیجه کارایی استخراج کاهش یافته است.

اثر حجم حلال شوینده

عامل نهایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت اثر حجم حلال شوینده بود. بنابراین حجم‌های ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میکرولیتر از اتانول بررسی و نتایج به دست آمده در شکل ۱۲ گزارش شده است. حجم ۷۵ میکرولیتر اتانول به عنوان بهینه انتخاب شد، زیرا در حجم‌های بالاتر به علت رقیق شدن گونه‌ها راندمان استخراج کاهش یافته است. حجم‌های کمتر از ۷۵ میکرولیتر از حلال شوینده مورد بررسی قرار نگرفت.

(۱) Chen

(۳) Limit of Quantification (LOQ)

(۵) Enrichment Factor (EF)

(۲) Limit of Detection (LOD)

(۴) Relative Standard Deviation (RSD)

(۶) Extraction Recovery (ER)

جدول ۱- ارقام شایستگی روش D-μSPE امپرازول و دیمین هیدرینات.

معادله خط	درصد بازیابی استخراج	فاکتور غنی سازی	حد کمی (μg/L)	حد تشخیص (μg/L)	ضریب همبستگی (R ²)	گستره خطی (μg/L)	نام ترکیب
$Y=1981/6X + 3134/8$	۹۴/۵	۶۳	۱/۱۲	۰/۳۳	۰/۹۹۹۸	۱-۴۰۰	دیمین هیدرینات
$Y=2118/1X + 24765/0$	۹۸/۰	۶۵	۱/۶۱	۰/۴۸	۰/۹۹۹۱	۱-۴۰۰	امپرازول

جدول ۲- میزان بازیابی امپرازول و دیمین هیدرینات از نمونه‌های حقیقی.

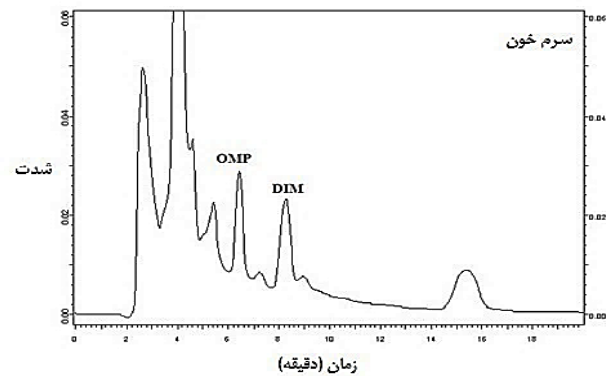
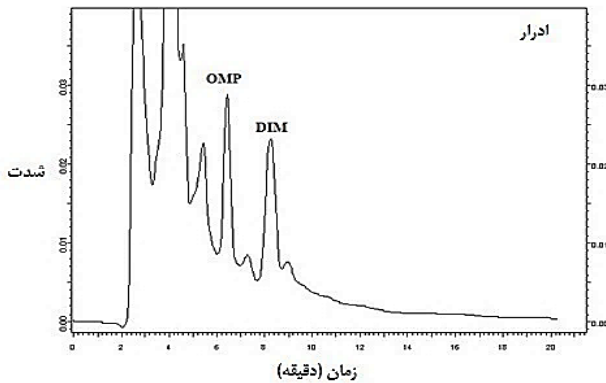
نمونه	مقدار اضافه شده (μg/L)	انحراف استاندارد ± مقدار به دست آمده (μg/L)		انحراف استاندارد نسبی (%) بازیابی (%)	
		امپرازول	دیمین هیدرینات	امپرازول	دیمین هیدرینات
ادرار	۲۵	۲۴/۳۵ ± ۰/۸۲	۲۳/۷۰ ± ۰/۸۵	۹۷/۴ (۳/۳)	۹۴/۸ (۳/۶)
	۲۰۰	۲۰۳/۴۰ ± ۹/۱۵	۱۹۱/۰ ± ۵/۱۵	۱۰۱/۷ (۴/۵)	۹۵/۵ (۲/۷)
	۳۵۰	۳۴۶/۵۰ ± ۱۰/۷۴	۳۴۷/۵۵ ± ۱۳/۵۵	۹۹/۰ (۳/۱)	۹۹/۳ (۳/۹)
سرم خون	۲۵	۲۳/۵۷ ± ۰/۹۶	۲۴/۱۵ ± ۰/۹۹	۹۴/۳ (۴/۱)	۹۶/۶ (۴/۱)
	۲۰۰	۲۰۴/۲۰ ± ۴/۹۰	۱۹۴/۶۰ ± ۷/۳۹	۱۰۲/۱ (۲/۴)	۹۷/۳ (۳/۸)
	۳۵۰	۳۴۶/۸۵ ± ۱۵/۶۱	۳۵۲/۸۰ ± ۱۵/۵۲	۹۹/۱ (۴/۵)	۱۰۰/۸ (۴/۴)

درصد بازیابی استخراج نیز طبق معادله زیر محاسبه شد:

$$\%ER = \frac{n_f}{n_i} = \frac{C_f \times V_f}{C_i \times V_i} = EF \times \frac{V_f}{V_i} \times 100$$

که در این معادله n_i تعداد مول گونه در فاز آبی و n_f تعداد مول گونه در حلال شوینده است. V_i و V_f به ترتیب به حجم نهایی فاز شوینده و حجم اولیه فاز آبی اشاره دارند. بر این اساس مقدار فاکتور غنی سازی برای امپرازول و دیمین هیدرینات به ترتیب ۶۵ و ۶۳ محاسبه شد. درصد بازیابی استخراج نیز در محدوده ۹۸/۰-۹۴/۵٪ به دست آمد. در جدول ۱ ارقام شایستگی روش D-μSPE برای امپرازول و دیمین هیدرینات گزارش شده است.

برای ارزیابی قابلیت کاربرد روش پیشنهادی در نمونه‌های حقیقی، این روش برای اندازه‌گیری امپرازول و دیمین هیدرینات در دو نمونه حقیقی ادرار و سرم خون به کار برده شد. در این روش به هریک از نمونه‌های حقیقی که مراحل آماده سازی آنها انجام شده بود، مقداری از محلول استاندارد امپرازول و دیمین هیدرینات در سه سطح غلظتی (۲۵، ۲۰۰ و ۳۵۰ μg/L) که از غلظت‌های بالا، پایین و میانه منحنی کالیبراسیون انتخاب شدند، اضافه شد و سپس بازیابی و اندازه‌گیری گونه‌ها انجام شد. آزمایشات در هر سطح غلظتی به منظور محاسبه انحراف استاندارد و انحراف استاندارد نسبی ۳ بار تکرار شد. بر اساس نتایج نشان داده شده در جدول ۲ میزان بازیابی برای ترکیبات مورد نظر از نمونه‌های حقیقی بیش از ۹۴/۳٪ و خطای نسبی کمتر از ۴/۵٪ بود. در شکل ۱۳ کروماتوگرام نمونه ادرار و سرم خون بعد از افزودن محلول‌های استاندارد دیمین هیدرینات و امپرازول و اعمال روش D-μSPE گزارش شده است. در این کروماتوگرام پیک امپرازول و دیمین هیدرینات به ترتیب در زمان‌های بازداری ۶/۱ و ۸/۳ دقیقه ظاهر شده اند.



شکل ۱۳- کروماتوگرام نمونه ادرار و سرم خون بعد از افزودن محلول‌های استاندارد دیمین هیدرینات (DIM) و امپرازول (OMP) در سطح غلظتی ۵۰ μg/L و استخراج با D-μSPE.

برای ارزیابی میزان دقت روش، هر یک از اندازه‌گیری‌ها بین روز و در یک روز با انجام آزمایش‌های مکرر بر روی غلظت‌های ۱۵ و ۲۰۰ μg/L در سه روز متوالی و سه بار در یک روز محاسبه شد، که منجر به RSD کمتر از ۵/۴۴٪ شد (جدول ۳).

جدول ۳- بررسی دقت بین روز و دقت در یک روز برای استخراج امپرازول و دیمن هیدرینات در ۳ اندازه‌گیری.

تکرارپذیری	نام ترکیب	غلظت ($\mu\text{g/L}$)	انحراف استاندارد \pm مقدار به دست آمده ($\mu\text{g/L}$)	انحراف استاندارد نسبی (%)
دقت بین روز	امپرازول	۱۵	14.7 ± 0.8	۵/۴۴
		۲۰۰	196.9 ± 9.3	۴/۷۲
	دیمن هیدرینات	۱۵	14.2 ± 0.6	۴/۲۲
		۲۰۰	194.7 ± 7.9	۴/۰۶
دقت در یک روز	امپرازول	۱۵	13.9 ± 0.6	۴/۳۱
		۲۰۰	198.6 ± 6.6	۳/۳۲
	دیمن هیدرینات	۱۵	14.4 ± 0.7	۴/۸۶
		۲۰۰	197.5 ± 5.8	۲/۹۳

جدول ۴- مقایسه روش استخراج مطرح شده (D- μSPE) با روش‌های اسپکتروسکوپی.

پارامتر	قرص دیمن هیدرینات (۵۰ میلی گرم)		کپسول امپرازول (۲۰ میلی گرم)	
	روش مطرح شده (D- μSPE)	روش مرجع [۴۵]	روش مطرح شده (D- μSPE)	روش مرجع [۴۶]
مقدار یافت شده	۴۹/۸	۴۹/۵	۲۰/۱	۱۹/۹
بازایی (%RSD)	(۲/۸) ۹۹/۶	(۳/۲) ۹۹/۰	(۴/۱) ۱۰۰/۵	(۳/۷) ۹۹/۵
تعداد تکرار	۳	۳	۳	۳
t-test	(۲/۷) ۰/۲۴		(۲/۷) ۰/۳۱	
F-test	(۳۹/۰۰) ۱/۳۰		(۳۹/۰۰) ۱/۲۲	

جدول ۵- مقایسه روش D- μSPE با سایر روش‌ها.

پارامتر	مرجع [۴۷]	مرجع [۱۷]	مرجع [۴۸]	مرجع [۴]	روش مطرح شده
گستره خطی	$2.0 - 0.4 \mu\text{g/mL}$	$50.0 - 1 \text{ ng/mL}$	$50.0 - 25 \text{ ng/mL}$	$1 - 25 \mu\text{g/mL}$	$400 - 1 \mu\text{g/L}$
حد تشخیص	$0.05 \mu\text{g/mL}$	-	0.1 ng/mL	$0.189 \mu\text{g/mL}$	$0.33 - 0.48 \mu\text{g/L}$
ضریب تعیین	۰/۹۹۹۶	> ۰/۹۹۰	۰/۹۹۹	۰/۹۹۹۹	> ۰/۹۹۹۱
درصد بازایی	۹۵/۹۵	$100.77 - 96.65$	۹۸-۹۴	۱۰۰/۸	> ۹۴/۳
%RSD	۱/۰۹	۴/۲۵	$2.70 - 2.50$	۰/۳۹	< ۵/۴۴
گونه	دیمن هیدرینات	امپرازول	امپرازول	دیمن هیدرینات	دیمن هیدرینات و امپرازول

کاربرد روش D- μSPE برای نمونه‌های دارویی

برای مقایسه دقت و صحت روش مطرح شده مقدار امپرازول در کپسول و مقدار دیمن هیدرینات در قرص دارویی با دوز مشخص تخمین زده شد و با نتایج حاصل از روش‌های اسپکتروسکوپی فرابنفش/مرئی مراجع [۴۵ و ۴۶] مقایسه شد. مطابق دستورالعمل ارائه شده در این مراجع، ۲۰ قرص دیمن هیدرینات و یا محتویات ۲۰ کپسول امپرازول به دقت توزین و سپس پودر شد. وزنی معادل یک قرص و یا یک کپسول توزین و به بالن‌های حجم سنجی جداگانه (۱۰۰ میلی لیتر) منتقل شد و هر بالن تا خط نشانه با کلریدریک اسید ۰/۱ مولار به حجم رسانده شد. بالن‌های حاوی نمونه به مدت چند دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفتند و سپس محتویات آنها با استفاده از کاغذ صافی صاف شد و در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی فرابنفش/مرئی تعیین مقدار صورت گرفت. داده‌های به دست آمده از روش‌های فرابنفش/مرئی

با روش D- μSPE با استفاده از آزمون‌های t (t-test) و F (F-test) مقایسه و نتایج در جدول ۴ گزارش شد. از نتایج t-test و F-test می‌توان نتیجه گرفت که در سطح اطمینان ۹۵٪ اختلاف معنی‌داری بین دو روش وجود ندارد.

مقایسه روش D- μSPE با سایر روش‌ها

در جدول ۵ مقادیر گستره خطی، حد تشخیص، ضریب همبستگی، درصد بازایی و %RSD روش مطرح شده در این پژوهش و مراجع [۴۷، ۱۷، ۴، ۴۸] گزارش شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود گستره خطی و حد تشخیص روش D- μSPE نسبت به روش مطرح شده در مراجع [۴ و ۴۷] بهتر است و در مقایسه با مراجع [۱۷ و ۴۸] تقریباً مشابه است. از سایر مزیت‌های D- μSPE می‌توان به سادگی، زمان استخراج کوتاه و هزینه پایین روش اشاره کرد.

نتیجه گیری

در این پروژه، از یک روش ساده، کم هزینه و دوست دار محیط زیست برای تهیه جاذب پلیمریزه شده GO-polyphenols استفاده شده است. نتایج آزمون های شناسایی نشان می دهد که سطح GO با موفقیت توسط پلی فنول های عصاره رزماری عامل دار شده است. استفاده از پلی فنول های طبیعی برای اصلاح سطح بسیار ارزان تر از پلیمرهای سنتزی می باشد. جاذب سنتز شده در روش D- μ SPE برای استخراج داروهای دیمن هیدرینات و امپرازول از سرم خون، ادرار و نمونه های دارویی بکار رفت. روش مطرح شده از کارایی استخراج، تکرارپذیری و تکثیرپذیری قابل قبولی برای اندازه گیری داروهای نامبرده از بافت های مختلف برخوردار است. با توجه به حضور مقادیر ناچیز

امپرازول و دیمن هیدرینات در نمونه های زیستی، روش مطرح شده در این پروژه از حساسیت و پیش تغلیظ مناسب مناسب برای تشخیص داروهای مذکور برخوردار است.

قدردانی

نویسندگان از حمایت دانشگاه ایلام تشکر می کنند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳

مراجع

- [1] Doge U., Eger K., [A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Dimenhydrinate and Related Substances-Identification of an Unknown Impurity](#), *Pharmazie*, **62**: 174-178 (2007)
- [2] ONeil M.J., ["The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological"](#), 14th ed., Merck, Whitehouse station, N.J., (2006).
- [3] Brayfield A., ["Martindale: The Complete Drug Reference"](#), 38th ed., Pharmaceutical Press, London, (2014).
- [4] Edrees F.H., Saad A.S., Alsaadi M.T., Amind N.H., Abdelwahab N.S., [Experimentally Designed Chromatographic Method for the Simultaneous Analysis of Dimenhydrinate, Cinnarizine and Their Toxic Impurities](#), *RSC Adv.*, **11**: 1450-1460 (2021).
- [5] Bosch M.E., Sanchez A.J.R., Rojas F.S., Ojeda C.B., [Analytical Methodologies for the Determination of Omeprazole: an Overview](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**: 831-844 (2007).
- [6] Sweetman S.C., ["Martindale-the Complete Drug Reference"](#), 34th ed., Pharmaceutical Press, Landon, UK, (2009).
- [7] ONeil M.J., ["The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological"](#), 15th ed., RSC, Cambridge, UK, (2013).
- [8] Langtry H.D., Wilde M.I., [Omeprazole. A Review of its Use in Helicobacter Pylori Infection, Gastro-Oesophageal Reflux Disease and Peptic Ulcers Induced by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs](#), *Drugs* **56**(3): 447-486 (1998).
- [9] Tavares V., Macedo C.C., Montanhez L., Barros F.A.P., Meurer E.C., Campos D.R., Coelho E.C., Calaffati S.A., Pedrazzoli Jr. J., [Determination of Dimenhydrinate in Human Plasma by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry: Application to a Relative Bioavailability Study](#), *J. Chromatogr. B* **853**: 127-132 (2007).

- [10] Festen H.P.M., Thijs J.C., Lamers C.B.H.W., Jansen J.M.B.J., Pals G., Frants R.R., Defize J., Meuwissen S.G.M., [Effect of Oral Omeprazole on Serum Gastrin and Serum Pepsinogen I Levels](#), *Gastroenterology* **87**: 1030-1034 (1984).
- [11] Wahbi A.-A.M., Abdel-Razak O., Gazy A.A., Mahgoub H., Moneeb M.S., [Spectrophotometric Determination of Omeprazole, Lansoprazole and Pantoprazole in Pharmaceutical Formulations](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**: 1133-1142 (2002).
- [12] Lamie N.T., Yehia A.M., [Development of Normalized Spectra Manipulating Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Dimenhydrinate and Cinnarizine Binary Mixture](#), *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **150**: 142-50 (2015).
- [13] Zhang W., Hana F., Guo P., Zhao H., Lina Z. (John), [Simultaneous Determination of Tolbutamide, Omeprazole, Midazolam and Dextromethorphan in Human Plasma by LC-MS/MS-A High Throughput Approach to Evaluate Drug-Drug Interactions](#), *J. Chromatogr. B* **878**: 1169-1177 (2010).
- [14] Belal T.S., Abdel-Hay K.M., Clark C.R., [Selective Determination of Dimenhydrinate in Presence of Six of its Related Substances and Potential Impurities Using a Direct GC/MS Method](#), *J. Adv. Res.*, **7**: 53-58 (2016).
- [15] Afkhami A., Bahiraei A., Madrakian T., [Application of Nickel Zinc Ferrite/Graphene Nanocomposite as a Modifier for Fabrication of a Sensitive Electrochemical Sensor for Determination of Omeprazole in Real Samples](#), *J. Colloid and Interface Sci.*, **495**: 1-8 (2017).
- [16] Freitas J.M., Oliveira T. da C., Silva P.L., Gimenes D.T., Munoz R.A.A., Richter E.M., [Development of a Simple and Fast Electrochemical Method for Screening and Stoichiometric Determination of Dimenhydrinate](#), *Electroanalysis* **26**: 1905-1911 (2014).
- [17] Wang Z., Sun W., Lin Z.-F., Sun R., Huang C.-K., Ye W.-J., Dong Y.-Y., Zhang X.-D., Chen R.-J., [A UHPLC-MS/MS Method Coupled with Liquid-Liquid Extraction for the Quantitation of Phenacetin, Omeprazole, Metoprolol, Midazolam and their Metabolites in Rat Plasma and its Application to the Study of Four CYP450 Activities](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **163**: 204-210 (2019).
- [18] Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Sanz A., Bravo E., Galera R., [Determination of Omeprazole, Hydroxyomeprazole and Omeprazole Sulfone Using Automated Solid Phase Extraction and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**: 100-106 (2006).
- [۱۹] مرادی، نادر؛ صارمی، مینا؛ استخراج و اندازه‌گیری مقدارهای ناچیز پالادیوم با استفاده از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی لوله باریک و اسپکتروفوتومتری، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۴۰(۴)**: ۲۶۱ تا ۲۷۲ (۱۴۰۰).
- [۲۰] جعفری، محمدتقی؛ جعفریان محمدی، سید مسعود؛ شرافتمند، حسین؛ اندازه‌گیری آفت کش دیازینون در نمونه‌های سیب و آب زیرزمینی به روش ریزاستخراج مایع - مایع پخشی جفت شده با طیف سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون تخلیه کرونا، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۳۶(۲)**: ۷۱ تا ۸۶ (۱۳۹۶).

- [۲۱] شکوفی، نادر؛ همدمعلی، امیر؛ توسعه روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی / اسپکترومتری ترمال لنز لیزری برای اندازه‌گیری مقادیرهای کم کادمیوم در نمونه‌های آب و دارو، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۳۸: ۱۹۵ تا ۲۰۶ (۱۳۹۸).
- [۲۲] لرکی، آرش؛ اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری تتربیل پس از پیش تغلیظ به روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴) ۳۹: ۱۲۷ تا ۱۳۶ (۱۳۹۹).
- [۲۳] رضایی، محمد؛ پور جاوید، محمدرضا؛ بررسی استخراج و جداسازی توریم با استفاده از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۱) ۴۱: ۲۷۵ تا ۲۸۳ (۱۴۰۱).
- [24] Ghorbani M., Agha Mohammad Hassan M., Chamsaz M., Akhlaghi H., Pedramrad T., *Dispersive Solid Phase Microextraction, TrAC Trends Anal. Chem.*, **118**: 793–809 (2019).
- [25] Scigalski P., Kosobucki P., *Recent Materials Developed for Dispersive Solid Phase Extraction, Molecules* **25**: 4869 (2020).
- [26] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J., *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int.*, **86**: 412-431 (2003).
- [27] Khezeli T., Daneshfar A., *Development of Dispersive Micro-Solid Phase Extraction Based on Micro and Nano Sorbents, TrAC Trend Anal. Chem.*, **89**: 99-118 (2017).
- [28] Gal an-Cano F., Lucena R., Cardenas S., Valcarcel M., *Dispersive Micro-Solid Phase Extraction with Ionic Liquid-Modified Silica for the Determination of Organophosphate Pesticides in Water by Ultra-Performance Liquid Chromatography, Microchem. J.*, **106**: 311-317 (2013).
- [29] Reyes-Gallardo E.M., Lucena R., Cardenas S., Valcarcel M., *Magnetic Nanoparticles-Nylon 6 Composite for the Dispersive Micro Solid Phase Extraction of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Water Samples, J. Chromatogr. A* **1345**: 43-49 (2014).
- [30] Jimenez-Soto J.M., Cardenas S., Valcarcel M., *Dispersive Micro Solid-Phase Extraction of Triazines from Waters Using Oxidized Single-Walled Carbon Nanohorns as Sorbent, J. Chromatogr. A* **1245**: 17-23 (2012).
- [31] Reyes-Gallardo E.M., Lasarte-Aragones G., Lucena R., Cardenas S., Valcarcel M., *Hybridization of Commercial Polymeric Microparticles and Magnetic Nanoparticles for the Dispersive Micro-Solid Phase Extraction of Nitroaromatic Hydrocarbons from Water, J. Chromatogr. A* **1271**: 50-55 (2013).
- [۳۲] مقدسی، عبدالرضا؛ کرمی، سیما؛ بنده علی، سمانه؛ اصلاح غشاهای نانو تصفیه توسط نانو ذره‌های آهن اکسید و گرافن اکسید، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴) ۴۰: ۷۵ تا ۸۷ (۱۴۰۰).
- [۳۳] پورستار مرجانی، احمد؛ اصلاح گرافن اکسید به روش پلیمریزاسیون درجا و استفاده از آن به عنوان نانو ذره موثر در بهبود ویژگی‌های مکانیکی نانوکامپوزیت پلی متیل متاکریلات، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴) ۳۸: ۴۳ تا ۵۲ (۱۳۹۸).

- [34] Chen G., Yi Z., Chen X., Tong Q., Ran Y., Ma L., Li X., [Polymerization-Induced Self-Assembly of Tea Polyphenols into Open-Mouthed Nanoparticles for Active Delivery Systems and Stable Carbon Bowls](#), *ACS Appl. Nano Mater.*, **4**: 13510–13522 (2021).
- [35] Fraga T.J.M., Silva M. P., Freire E.M.P. de L., Almeida L.C., Sobrinho M.A. da M., Ghislandi M.G., Marilda N.C., [Amino-Functionalized Graphene Oxide Supported in Charcoal from the Gasification of Furniture Scraps: From One-Pot Synthesis to Wastewater Remediation](#), *Chem. Eng. Res. Des.*, **180**: 109-122 (2022).
- [36] Oueslati M.H., Tahar L.B., Harrath A.H., [Synthesis of Ultra-Small Gold Nanoparticles by Polyphenol Extracted from *Salvia Officinalis* and Efficiency for Catalytic Reduction of p-Nitrophenol and Methylene Blue](#), *Green Chem. Lett. Rev.*, **13**: 18-26 (2020).
- [37] Gul W., Alrobei H., [Effect of Graphene Oxide Nanoparticles on the Physical and Mechanical Properties of Medium Density Fiberboard](#), *Polymers* **13**: 2-15 (2021).
- [38] Kaushal A., Dhawan S.K., Singh V., [Determination of Crystallite Size, Number of grapheme Layers and Defect Density of Graphene Oxide \(GO\) and Reduced Graphene Oxide \(RGO\)](#), *AIIP Conf. Proc.*, **2115(1)**: 030106 (2019).
- [39] Kim C.C., Park O.K., Lee J.H., Ku B.C., [Layer-by-Layer Assembled Graphene Oxide Films and Barrier Properties of Thermally Reduced Graphene Oxide Membranes](#), *Carbon Lett.*, **14**: 247-250 (2013).
- [40] Yagci Y., Kiskan B., Ghosh N.N., [Recent Advancement on Polybenzoxazine-A Newly Developed High Performance Thermoset](#), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **47**: 5565–5576 (2009)
- [41] Yi Z., Chen G., Chen X., Sun Z., Ma X., Su W., Deng Z., Ma L., Ran Y., Tong Q., Li X., [Modular Assembly of Versatile Nanoparticles with Epigallocatechin Gallate](#), *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **8**: 9833–9845 (2020).
- [42] Yi Z., Chen G., Chen X., Ma X., Cui X., Sun Z., Su W., Li X., [Preparation of Strong Antioxidative, Therapeutic Nanoparticles Based on Amino Acid-Induced Ultrafast Assembly of Tea Polyphenols](#), *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**: 33550–33563 (2020).
- [43] Hefter G., [Ion Solvation in Aqueous-Organic Mixture](#), *Pure App. Chem.*, **77**: 605-617 (2005).
- [44] Zhang Y., Lee H.K., [Ionic Liquid-based Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Ultraviolet Filters in Environmental Water Sample](#), *Anal. Chim. Acta* **750**: 120-126 (2012).
- [45] Rivai H., Hasanah R., Azizah Z., [Development and Validation of Omeprazole Analysis Methods in Capsules with Absorbance Methods and Areas under Curves Methods with UV-Vis Spectrophotometry](#), *J. Pharm. Sci. Med. (IJPSM)*, **33**: 21-32 (2018).
- [46] Rivai H., Nofera N.S., Azizah Z., [Development and Validation of Dimenhydrinate Analysis Method in Tablet with Absorbance Method and Method of Area under Curve with Ultraviolet Spectrophotometry](#), *Sch. Acad. J. Pharm. (SAJP)*, **7(3)**: 155-163 (2018).

- [47] Abdelwahab N.S., Edrees F.H., Alsaadi M.T., Amin N.H., Saad A.S., [Simultaneous Estimation of Dimenhydrinate, Cinnarizine and their Toxic Impurities Benzophenone and Diphenylmethylpiperazine; in Silico Toxicity Profiling of Impurities](#), *RSC Adv.*, **10**: 37439-37448 (2020).
- [48] Ahmed H., Wahbi A.-A., Elmongy H., Amini A., Koyi H., Branden E., Abdel-Rehim M., [Determination and Pharmacokinetics of Omeprazole Enantiomers in Human Plasma and Oral Fluid Utilizing Microextraction by Packed Sorbent and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry](#), *Int. J. Anal. Chem.*, **19**: 1-8 (2021).