

اندازه گیری همزمان مودافینیل و مشتقات آن توسط نانوذرات اکسید آهن پوشش داده شده با

نانوتیوب کربنی چنددیواره جفت شده با HPLC

نازیلا قلی پور^۱، مهدی رحیمی نصرآبادی^{۱*}، محمد حمزه‌ئی^۲، مهدی اخلاقی^۴

۱- مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

۲- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

۳- گروه شیمی، دانشگاه امام حسین، تهران

۴- مرکز تحقیقات پزشکی هسته‌ای، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

این مقاله روشی را برای اندازه‌گیری مقادیر جزیی داروی مودافینیل در محیط‌های آبی و پلاسما با استفاده از نانوذرات مغناطیسی پوشش‌دار و دستگاه HPLC ارائه می‌دهد. نانوذرات Fe_3O_4 به روش هم‌رسوبی سنتز و توسط نانولوله‌های کربنی چند دیواره پوشش‌دار شد. ساختار و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده با XRD، SEM و FT-IR بررسی شد. خواص پیش‌تغلیظ جذبی کامپوزیت برای جذب مودافینیل، مودافنیل‌آمیدسولفید و مودافنیل‌اسیدسولفید از محلول آبی و اندازه‌گیری آن با HPLC ارزیابی شد. عوامل مؤثر در کارایی روش، مانند مقدار جاذب، اثر pH، اثر نمک، نوع حلال شویش، مقدار حلال شویش، اثر بافر، زمان جذب، زمان استخراج مورد بهینه‌سازی شدند. این روش در محدوده $0.1-6 \text{ mg/L}$ برای آنالیت‌ها خطی بود. حد تشخیص، به ترتیب 0.021 ، 0.019 و 0.012 mg/L بود. همچنین انحراف استاندارد نسبی برای استخراج غلظت 2 mg/L از ترکیبات به ترتیب 0.93 ، 1.99 و 1.78% و فاکتورهای تغلیظ برای این ترکیبات به ترتیب 10.5 ، 90 و 85 بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز با HPLC، پیش‌تغلیظ، مودافینیل، نانوذرات مغناطیسی، نانولوله کربنی چنددیواره

واژه‌های کلیدی: نقاط کوانتومی، عوامل موثر، سنتز، محیط‌های آبی

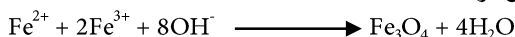
ایمیل نویسنده مسئول: rahimi@bmsu.ac.ir

۱-مقدمه

استخراج از حجم زیاد نمونه‌ها و (۷) امکان اصلاح سطح نانوذرات که باعث توانمندی در انتخابگری می‌شود [۷-۹]. یکی از کاربردهای بسیار مهم نانوذرات سوپر پارا مغناطیس در استخراج با فاز جامد است. در این روش، از نانوذرات به عنوان فاز جامد استفاده می‌شود. در مقایسه با ذراتی که قبلاً در استخراج با فاز جامد استفاده می‌شدند، نانوذرات به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت سطح به حجم بالایی دارند که ظرفیت استخراج و راندمان خیلی بزرگتری را فراهم می‌کند. یکی دیگر از مزایای نانوذرات این است که سطح آن‌ها می‌تواند به سادگی اصلاح شود و امکان استخراج گزینشی را ایجاد نماید. مزیت دیگری که استفاده از نانوذرات مغناطیسی فراهم می‌کند این است که نانوذرات مغناطیسی با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی جذب می‌شوند که این خاصیت، آن‌ها را برای استخراج نمونه در آنالیزهای شیمیایی مفید می‌سازد، زیرا نیازی به سانتریفیوژ کردن و فیلتراسیون نمونه بعد از استخراج نیست. شاید این مهمترین مزیت نانوذرات مغناطیسی حتی نسبت به نانوذرات دیگر است که گاهی برای این کار استفاده می‌شوند. ابتدا سطح نانوذرات با یک ماده‌ی فعال سطحی (سورفکتانت) پوشیده می‌شود و سپس نانوذرات به محلول مورد نظر اضافه می‌شوند، در این

نانوذرات پارامغناطیس می‌توانند کاربردهای زیادی شامل سم‌زدایی از سیال‌های بیولوژیکی، سنتز مواد آلی، به عنوان کاتالیزور، جداسازی‌های تجزیه‌ای، انتقال کنترل شده‌ی داروهای ضد سرطان و جداسازی‌های سلولی داشته باشند [۱-۳]. در هر یک از این کاربردها، نانوذرات باید اندازه، شکل، ویژگی‌های سطح و خواص مغناطیسی ویژه‌ای داشته باشند. نانوذرات مغناطیسی به دلیل داشتن یک سری ویژگی‌های خاص، می‌توانند به عنوان جاذب در جداسازی، استخراج، حذف و همچنین پیش‌تغلیظ گونه‌های مختلف آلی و معدنی به ویژه آلاینده‌های محیطی و داروها از نمونه‌های بیولوژیکی به کار گرفته شوند [۴-۶]. این ویژگی‌ها عبارتند از: (۱) سهولت سنتز نانوذرات، (۲) مساحت سطح به حجم زیاد به دلیل داشتن ابعاد نانومتری، (۳) خاصیت سوپرپارامغناطیسی که باعث می‌شود این ذرات به میدان مغناطیسی خارجی پاسخ دهند و در غیاب میدان خارجی خاصیت مغناطیسی خود را از دست بدهند، (۴) امکان استخراج ساده و سریع گونه‌های مختلف تنها به -کارگیری یک میدان مغناطیسی خارجی، (۵) عدم نیاز به مراحل فیلتراسیون و سانتریفیوژ کردن در طی فرآیند استخراج، (۶) توانایی

(کلراید، سولفات، نیترات و پرکلرات)، نسبت Fe^{2+}/Fe^{3+} دمای واکنش، مقدار pH و قدرت یونی محیط بستگی دارد. با این روش سنتز، در صورت ثابت بودن شرایط سنتز، کیفیت نانوذرات تولید شده کاملاً تکرار پذیر خواهد بود. واکنش کلی به این صورت نوشته می‌شود:



بر طبق ترمودینامیک، این واکنش در نسبت مولی ۲:۱ از Fe^{2+} به Fe^{3+} و محیط عاری از اکسیژن رسوب کاملی از Fe_3O_4 در ۱۴- pH=۹، تشکیل خواهد داد. در پایان نانوذرات حاصله توسط یک آهنربا از محلول جدا شده و چندین بار با آب دیونیزه شستشو داده شده و خشک شدند. در مرحله بعد Fe_3O_4 تولیدشده بوسیله نانولوله کربنی چند دیواره پوشانده شد. برای این کار ابتدا باید سطح نانولوله کربنی اصلاح گردد. به این منظور ۲ گرم نانولوله کربنی چند دیواره (MWCNT) به همراه ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۲۵٪ به مدت ۵ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد رفلکس شد. سپس محلول از صافی عبور داده شد و در مرحله بعد پس از خشک کردن کاغذ صافی، کربن‌ها از سطح آن جدا شده و به یک بالن به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر منتقل شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر مخلوط آب و اتانول به نسبت ۱:۱ اضافه شد (نسبت نانولوله کربنی به Fe_3O_4 ۱، به ۴ می‌باشد) (به ازای ۲ گرم نانولوله کربنی ۰/۵ گرم Fe_3O_4 اضافه گردید). محلول به مدت ۱ ساعت تحت التراسونیک قرار گرفت. مخلوط فوق با حداکثر سرعت ممکن استیرر، به مدت ۵ روز هم زده شد. بعد از این مدت بالن در معرض یک آهنربای قوی قرار گرفت تا نانوذرات مغناطیسی که با نانولوله کربنی چند دیواره پوشیده شده است از محلول جدا شود. مواد جدا شده در آون خشک گردید و در ادامه کار به عنوان فاز جاذب مورد استفاده قرار گرفت [۷، ۱۷]. از نانوذرات تهیه شده تست‌های SEM، XRD و FT-IR گرفته شد و نتایج حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۲- تهیه محلول‌های استاندارد و نمونه حقیقی

محلول‌های استاندارد اولیه داروها با غلظت ۵۰۰ ppm در حلال متانول با درجه خلوص HPLC تهیه شدند. همچنین محلول‌های استاندارد کاری به طور روزانه، با رقیق سازی مناسب محلول‌های استاندارد با آب یون‌زدایی شده تا غلظت مورد نظر تهیه شدند. همه‌ی محلول‌های استاندارد در یخچال نگهداری و هر ماه یکبار مجدداً تهیه شدند. نمونه‌های حقیقی آب از آب شهر، چاه و رودخانه جاجرود و همچنین نمونه پلاسما از خون انسان گرفته شد. برای انجام آزمایش در محیط حقیقی، ابتدا نمونه خون انسانی از بیمارستان تهیه شد و پلاسماي خون که مایعی زرد رنگ است با استفاده از سانتریفیوژ از آن جدا شد. در این تحقیق برای بررسی اثر بافت بر روش، از افزودن دستی مقادیر مختلف دارو به پلاسما استفاده شد. برای حذف مزاحمت‌ها، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر تری‌کلرو اسید استیک ۱ مولار به همراه ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک رقیق به پلاسما اضافه شد. ساختمان پروتئین‌ها و چربی‌ها شکسته شده و به سرعت رسوب می‌کنند. مخلوط بدست آمده، سانتریفیوژ شد و محلول شفاف رویی که حاوی

مرحله آنالیت‌های مورد نظر روی سطح این نانوذرات قرار می‌گیرند، در مرحله‌ی بعدی این نانوذرات به راحتی به کمک یک آهنربا از توده محلول جدا می‌شوند و سپس با یک شوینده‌ی مناسب شسته می‌شوند و آنالیت‌ها از سطح این نانوذرات جدا می‌شوند. در آخرین مرحله به راحتی نانوذرات به کمک یک آهنربا از آنالیت استخراج شده، جدا می‌شوند و غلظت آنالیت‌ها به کمک دستگاه‌های تجزیه‌ای مناسب اندازه‌گیری می‌شود [۱۴-۱۰].

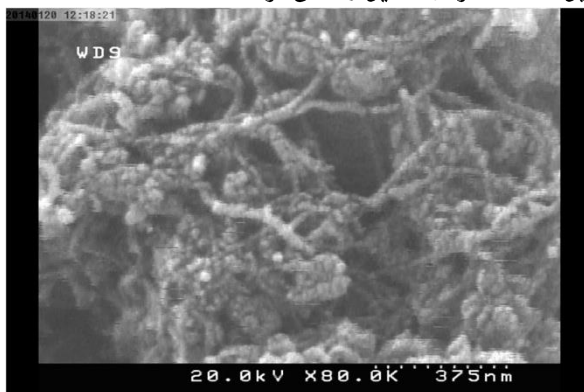
مودافینیل (با نام‌های مودالرت در انگلستان، آلرتک در کانادا، پروویجیل در ایالات متحده، مودا ویجیل در استرالیا) در سال‌های اخیر برای درمان خواب‌آلودگی کسانیکه دچار نارسایی هستند عرضه شده است. از این دارو در مناطق جنگی برای هوشیاری و جلوگیری از خواب‌آلودگی سربازان استفاده می‌شود. مکانیسم مودافینیل با سایر محرک‌ها متفاوت است، چون گیرنده‌های متعدد را تحریک نمی‌کند، بلکه ظاهراً روی مراکز مغز که مسئول بیدار نگه‌داشتن فرد هستند عمل می‌نماید. استفاده از این دارو برای درمان بسیاری از بیماری‌های دیگر که در آنها فرد ممکن است خواب‌آلود یا خسته باشد از جمله مالتیپل اسکلروز، افسردگی، بیماری پارکینسون و سرطان، شروع شده است. در ایالات متحده استفاده از این دارو برای درمان افرادی که خواب‌آلودگی آنها به علت اختلالات کار شیفتی است و درمان بیماران دچار آپنه خواب استفاده می‌کنند. استفاده از این دارو در درمان اختلال نقص توجه-بیش‌فعالی در کودکان و همینطور اختلالاتی که به طور عادی با محرک‌ها درمان نمی‌شوند، تحت پژوهش قرار دارد. این دارویی است که افراد را بدون فعال کردن سیستم عصبی سمپاتیک بیدار می‌کند. این دارو یک ترکیب جدید است که اعتیاد آور بودن آن تا به حال اثبات نشده است و عوارض جانبی کمی دارد. روش‌های مختلفی برای تعیین و ردیابی این دارو در محیط‌های آبی استفاده شده است [۱۵]. از جمله روش‌های مورد استفاده برای استخراج این دارو، تکنیک استخراج مایع-مایع، استخراج با فاز جامد و میکرو استخراج با فاز جامد می‌باشد. اما هر یک از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند طولانی بودن فرایند استخراج، استفاده زیاد از حلال‌های آلی و مقرون به صرفه نبودن هستند. بر همین اساس برای استخراج و پیش‌تخلیظ این دارو از محیط‌های آبی از تکنیک استخراج با فاز جامد مغناطیسی استفاده شده است [۱۶].

۲- مواد و روشها

۲-۱- سنتز و بررسی ویژگی‌های نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 با پوشش نانولوله کربنی

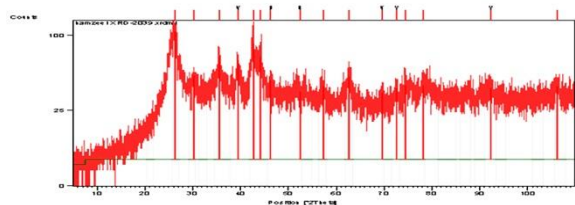
سنتز نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 با پوشش نانولوله کربنی در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول با استفاده از روش هم‌رسوبی نانوذرات مغناطیسی سنتز شدند. بدین ترتیب که مقدار ۶/۴۹ گرم از $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ و ۳/۱۸ گرم از $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ در ۴۷۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تحت گاز نیتروژن و هم‌زدن شدید حل شدند. سپس ۳۰ میلی‌لیتر از محلول ۲۵٪ وزنی آمونیاک به آرامی به محلول اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در حمام آبی ۶۰ درجه سانتیگراد تحت هم‌زدن شدید قرار گرفت. اندازه، شکل و ترکیب نانوذرات مغناطیسی تولید شده به میزان زیادی به نوع نمک‌های مصرفی

گسترده‌ای پوشش داده شده و نانوذرات مغناطیسی در مکان‌هایی از نانولوله‌های کربنی چند دیواره مستقر شده‌اند. بر اساس تصویر بدست‌آمده، اندازه ذرات برای نانوذره $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ براساس خط ترسیم شده در شکل‌های زیر بین ۱۰-۲۰ نانومتر تخمین زده می‌شود.



شکل ۱. تشکیل نانوذرات مغناطیسی با پوشش نانولوله کربنی

ساختار کریستالی نانوذرات مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ و Fe_3O_4 با استفاده از تکنیک XRD مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۲ الگوی پراش نانوذرات سنتز شده را نشان می‌دهد که کاملاً بر الگوی مگنتیت خالص با کارت ۰۰۱-۰۶۴۰ منطبق می‌باشد و تفاوت آشکاری بین نانوذرات Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ مشاهده نمی‌شود. نتایج نشان می‌دهد که پوشش لایه نانولوله‌های کربنی به صورت آمورف (بی‌شکل) است و فاز کریستالی نانوذرات Fe_3O_4 طی فرایند پوشش دهی تغییر نمی‌کند.



شکل ۲. الگوی XRD نانوذرات مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$

شکل ۳ طیف FT-IR نانو ذره سنتز شده در مرحله نهایی را نشان می‌دهد. مقایسه آن با طیفهای مرجع ارائه شده در مقالات قبلی نشان دهنده موفقیت آمیز بودن عامل‌دار شدن نانوذرات مغناطیسی می‌باشد. پیک‌های مشاهده شده در نواحی ۵۷۶، ۱۰۲۰، ۱۶۱۸، ۱۷۰۰، ۲۹۰۰ و cm^{-1} ۳۴۵۰ سنتز نانو ذره مغناطیسی با پوشش کربنی را تأیید می‌کنند. پیک مشاهده شده در ناحیه cm^{-1} ۵۷۶ حاصل ارتعاش پیوند Fe-O-Fe در ساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ و Fe_3O_4 است. پیک جذبی قوی در ناحیه ۱۷۰۰ و cm^{-1} ۱۶۱۸ در طیف $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ به ترتیب نشان دهنده فرکانس‌های کششی $\text{C}=\text{O}$ و $\text{C}=\text{C}$ که نشان دهنده پوشش روی Fe_3O_4 می‌باشد. پیک‌های ۱۰۲۰ و cm^{-1} ۱۳۰۰ متناسب با پیوند کششی C-OH و ارتعاش خمشی O-H می‌باشد. همچنین پیک‌های موجود در دامنه ۲۹۰۰ تا ۳۴۵۰ نتیجه ارتعاشات کششی O-H است.

آنالیت است برداشته شد. اسیدیته محلول با استفاده از یک بافر، در $\text{pH}=7$ تنظیم شده و مراحل پیش تغلیظ و استخراج مانند قبل با استفاده از مقادیر بهینه انجام گردید.

۳-۲- شرایط دستگاه HPLC

از سیستم HPLC ساخت شرکت Knauer (آلمان)، متشکل از یک پمپ EA4300F SMART LINE با درجه تزریق C18 (250 × 4.6 mm) 10μm، با ستون RHEODYNE 7725 i (perfectsill Target ODS-3) و شناساگر UV-Vis مدل S-260 استفاده شده است. بررسی داده‌های کروماتوگرافی با استفاده از نرم افزار chrom gate v3.1.7 انجام گرفت. برای آنالیز ترکیبات پیش تغلیظ شده، از دستگاه HPLC با فاز متحرک ۸۰٪ متانول و ۲۰٪ مخلوط آب و اسید استیک (۹۸٪ آب + ۲٪ اسید استیک) استفاده شد.

۴-۲- انتخاب طول موج مناسب UV

انتخاب درست طول موج جذب در سیستم آنالیز HPLC با آشکارساز UV اثر مهمی بر گزینش پذیری روش آنالیز دارد. برای پیدا کردن طول موج مناسب (با بالاترین جذب)، ابتدا مقدار ۴۰ میکرولیتر از مخلوط استاندارد دارو با غلظت ۵۰ ppm، توسط دتکتور دستگاه HPLC مورد آنالیز قرار گرفت و طول موج مناسب برای آنالیز داروها با بالاترین درصد جذب در ۲۲۰ نانومتر انتخاب گردید.

۵-۲- روش استخراج

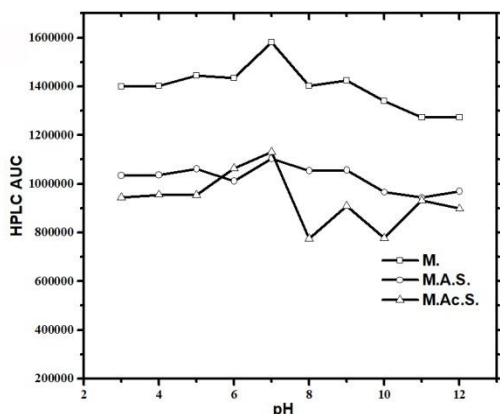
شرایط اولیه برای استخراج و پیش‌تغلیظ به شرح زیر انتخاب شد [۱۸]:

- ابتدا محلولی با غلظت ۲، ۵، ۱۰ و ۵۰ ppm از داروی مودافینیل و مشتقاتش تهیه شد.
- حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول تهیه شده به یک بشر منتقل شد.
- مقدار ۰/۴ گرم از جاذب به بشر حاوی محلول اضافه شد.
- بشر حاوی محلول و جاذب، به منظور انتقال آنالیت از فاز آبی به فاز جامد، به مدت ۲۰ دقیقه تحت هم زدن شدید قرار گرفت.
- نانوذرات مغناطیسی حاوی آنالیت تحت میدان مغناطیسی خارجی آهنربا از حلال جدا و باقیمانده محلول دور ریخته شد.
- در نهایت آنالیت‌ها با ۲ میلی لیتر از حلال شویش متانول، تحت امواج اولتراسونیک به مدت ۳ دقیقه از فاز جامد به فاز آلی منتقل شده و آماده تزریق به دستگاه گردید.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- بررسی خواص و ویژگیهای نانوذرات سنتز شده

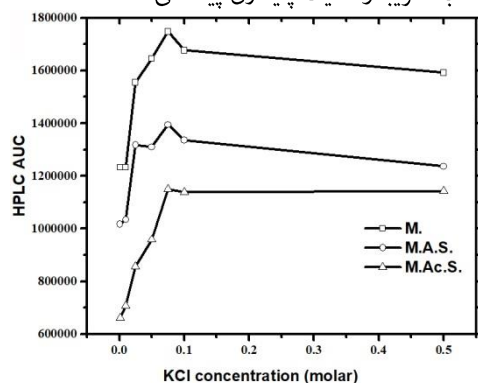
برای مطالعه خواص مواد نانوساختاری و تعیین اندازه و شکل آنها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شده است. شکل ۱، تصویر SEM مربوط به نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT}$ نشان داده شده است. تصویر SEM مربوطه نشان دهنده تشکیل نانوذرات مغناطیسی با پوشش نانولوله‌های کربنی می‌باشد. از این تصویر می‌توان فهمید که لایه کربنی بر روی سطح نانوذرات به طور



نمودار ۱. نتایج حاصل از تاثیر pH بر جذب مودافینیل و مشتقات آن (M): مودافینیل، M. A.S.: مودافینیل آمید سولفید و M.Ac.S.: مودافینیل اسید سولفید

۳-۲-۲- بررسی اثر غلظت نمک بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

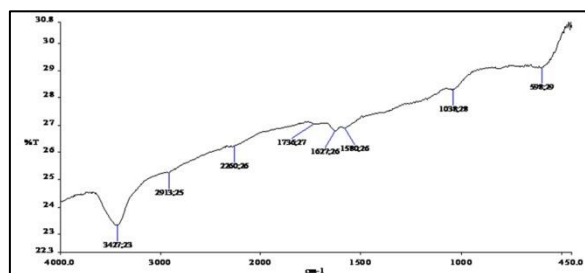
ابتدا مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از نمک KCl تهیه شد تا در طول آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گیرد. آزمایش‌های جدید در pH=7 (با افزودن تامپون فسفات با غلظت ۱ مولار) با مقادیر مختلف نمک انجام شد. نمودار ۲ نشان می‌دهد با افزایش میزان نمک به تدریج میزان جذب افزایش می‌یابد، اما پس از غلظت ۰/۰۷۵ مولار جذب تقریباً وضعیت پایداری پیدا می‌کند.



نمودار ۲. نتایج حاصل از تاثیر غلظت نمک بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

۳-۲-۳- بررسی اثر تامپون بر جذب مودافینیل و مشتقات آن
برای تهیه تامپون فسفات، ابتدا محلول NaH_2PO_4 و Na_2HPO_4 با غلظت ۱ مولار تهیه شدند. سپس برای رسیدن به pH مورد نظر به مقدار لازم با هم مخلوط شدند. pH مطلوب در آزمایش‌ها برابر با ۷ است و برای تهیه آن، ۳۹ میلی‌لیتر NaH_2PO_4 با ۶۱ میلی‌لیتر Na_2HPO_4 مخلوط شد. نمونه به همراه نمک و جاذب به محلول افزوده شد و سپس بافر افزوده شد. در ادامه، بعد از جذب شدن نمونه در جاذب، و انجام مراحل جداسازی و جاذب در حلال، آنالیز با انجام شد. همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت تامپون تا ۰/۰۷۵ مولار شدت جذب نیز افزایش می‌یابد و پس از آن، روند نسبتاً ثابتی دارد.

حضور گروه‌های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل هم تاییدی بر پوشش کربنی سطح نانوذرات Fe_3O_4 است و هم باعث می‌شوند تا سطح آبدوست شود. بنابراین نانوذرات اصلاح شده می‌توانند به صورت پایدار در محلول پراکنده شده و برای کارهای آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند. سطح آبدوست باعث کاهش جذب برگشت ناپذیر آنالیت روی جاذب می‌شود، که به این ترتیب بر مشکل واجذب سطحی مواد کربنی تا حد معینی رفع می‌شود [۱۹، ۲۰].



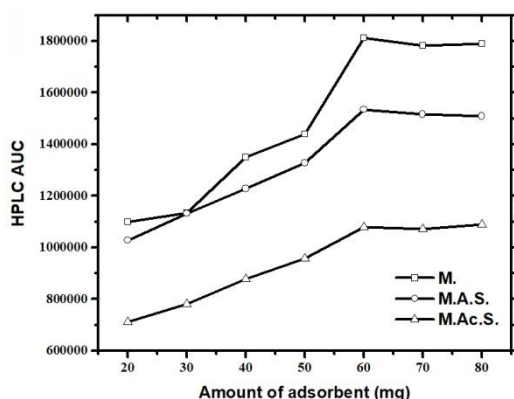
شکل ۳. طیف FT-IR تهیه شده مربوط به مگنت اصلاح شده با نانولوله کربنی

۳-۲-۳- بهینه سازی و ارزیابی شرایط استخراج

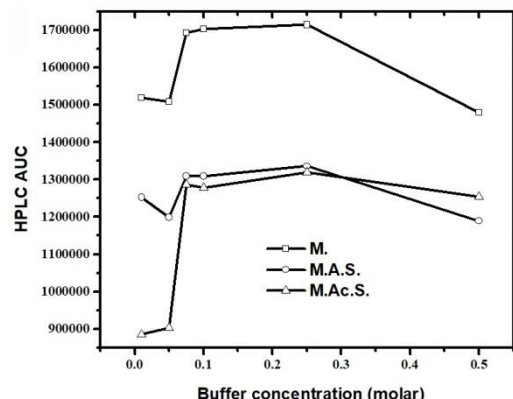
آزمایش با شرایط مختلف pH، زمان جذب، زمان واجذب، میلی‌گرم جاذب، غلظت نمک و غلظت تامپون انجام شده و شرایط بهینه در آزمایش تعیین گردید [۲۱، ۲۲، ۲۳]. ابتدا محلول اصلی با غلظت ۵۰۰ ppm با حل کردن مقدار ۵ میلی گرم از هر نمونه جامد دارو شامل (مودافینیل، مودافینیل آمید سولفید و مودافینیل اسید سولفید) در ۱۰ میلی لیتر متانول تهیه گردید. سپس برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه اصلی، نمونه ای با غلظت ۵۰ ppm آماده و مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲-۳-۱- بررسی اثر pH بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

برای بررسی اثر pH، نمونه با غلظت ۵ ppm به محلول حاوی آب و نمک اضافه شد. با استفاده از اسید HCl و باز NaOH، محلول در شرایط مختلف اسیدی و بازی قرار گرفت، جاذب افزوده شد و محلول پس از هم‌زدن و قرار گرفتن در معرض آهنربا و جدا شدن جاذب حاوی آنالیت، با حلال شستشو و التراسونیک گردید. سپس از صافی عبور داده شد و آماده تزریق به دستگاه HPLC شد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، بالاترین جذب در حدود pH=7 صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه مودافینیل دارای خواص قلیایی می‌باشد، علت ثبات نسبی جذب در pHهای مختلف را می‌توان به پایداری زیاد این ترکیب و مشتقاتش نسبت داد که در طیف وسیعی از pH بدون تغییر باقی مانده است، که طبعاً این داروها باید پس از مصرف بتوانند شرایط pH مختلف بدن مانند معده که اسیدی و روده که قلیایی می‌باشد را تحمل کنند. بنابراین pH=7 به عنوان pH بهینه انتخاب و در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



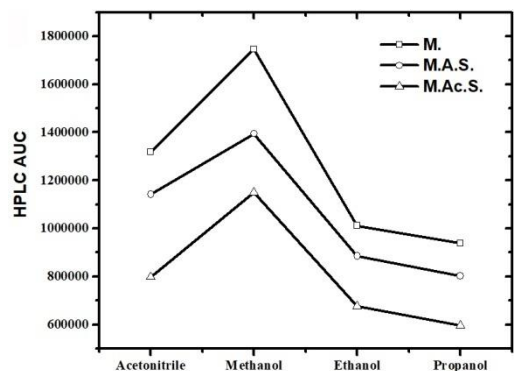
نمودار ۵. تاثیر مقدار جاذب بر جذب مودافینیل و مشتقات آن



نمودار ۳. نتایج حاصل از تاثیر تامپون بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

۴-۲-۳- بررسی تاثیر نوع حلال شستشو بر واجذب مودافینیل و مشتقات آن

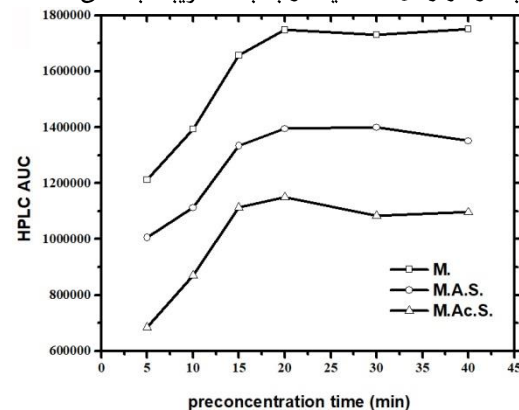
یکی از عوامل تاثیرگذار بر کارایی روش بکار رفته، نوع حلال مورد استفاده برای مرحله واجذب می باشد. برای بررسی اثر نوع حلال بر بهره واجذب، پس از همزدن و جذب نمونه توسط جاذب، توسط میدان مغناطیسی خارجی آب سرریز از فاز جامد جدا و جاذب حاوی آنالیت توسط حلالهای مختلف تحت التراسونیک شستشو داده شد تا نمونه از فاز جامد به فاز آلی منتقل شود. نمودار ۶ نشان می دهد، مناسب ترین حلال برای شستشو که منجر به بیشترین واجذب می شود، متانول است.



نمودار ۶. تاثیر حلال های مختلف بر واجذب مودافینیل و مشتقات آن

۴-۲-۳- بررسی اثر مدت زمان همزدن بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

محلول پس از افزودن نمونه، مدت زمان های متفاوتی همزده شد تا میزان جذب نمونه توسط جاذب در زمان های مختلف همزدن بررسی شود. نمونه ها بعد از جداسازی، واجذب در حلال با HPLC آنالیز شد. همانطوری که در نمودار ۴ مشاهده می شود با افزایش زمان همزدن، میزان جذب نمونه توسط جاذب افزایش می یابد، و در زمان ۲۰ دقیقه و به بعد تقریباً ثابت می ماند.



نمودار ۴. تاثیر زمان همزدن بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

۵-۲-۳- بررسی تاثیر مقدار جاذب بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

در مرحله بعدی آزمایش برای بررسی تاثیر مقدار جاذب بر جذب، مقادیر متفاوتی از $Fe_3O_4/MWCNT$ به عنوان فاز جامد مورد استفاده قرار گرفت تا مقدار بهینه آن در آزمایش ها تعیین شود. ابتدا نمونه با غلظت ۵ ppm اضافه شد. سپس نمک و تامپون با مقادیر بهینه شده افزوده شد. سپس جاذب با مقادیر مختلف افزوده شد. بعد از جذب نمونه توسط فاز جامد در شرایط بهینه مشخص شده و واجذب در متانول به وسیله HPLC آنالیز شد. همانطور که در نمودار ۵ مشاهده می شود با افزایش مقدار جاذب تا ۶۰ میلی گرم از جاذب، جذب نمونه افزایش یافته و تقریباً به حداکثر مقدار خود می رسد.

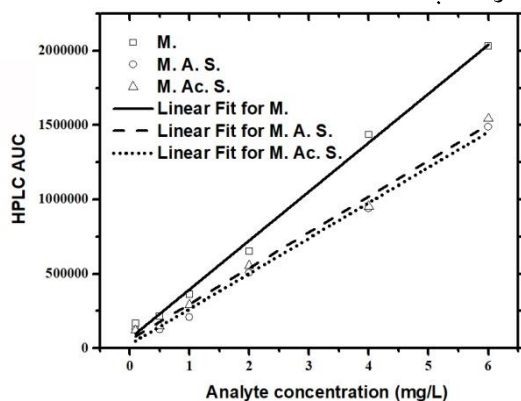
۷-۲-۳- بررسی تاثیر مقدار حلال شستشو بر واجذب مودافینیل و مشتقات آن

در مرحله واجذب، جاذب که حاوی آنالیت است با حلال متانول تحت التراسونیک شستشو داده می شود تا نمونه از فاز جامد به فاز آلی منتقل شود. اثر مقدار حلال متانول بر بهره واجذب و پاسخ دتکتور HPLC بررسی شد. تاثیر مقادیر مختلف حلال مورد استفاده در شرایط بهینه شده تا این مرحله از آزمایش در نمودار ۷ مشاهده می شود. با افزایش مقدار حلال شستشو مقدار پاسخ دتکتور UV-Vis افزایش می یابد و در مقدار ۲ میلی لیتر بالاترین پاسخ مشاهده می شود اما پس از آن مجدداً کاهش می یابد. علت این است که مقدار زیاد حلال شویش (بیشتر از ۲ میلی لیتر) موجب افزایش مقدار واجذب نشده است و تنها باعث رقیق شدن نمونه شده است.

مودافنیل اسید سولفید به ترتیب برابر (۱/۰۸) (% $1/0.8$) 758077 ± 8191 و (۱/۲۱) (% $1/21$) 468101 ± 5671 و (۱/۱۳) (% $1/13$) 47337 ± 5347 بود.

۳-۲-۱- منحنی کالیبراسیون و ارقام شایستگی روش

در شرایط بهینه منحنی کالیبراسیون برحسب سطح زیر پیک دارو در نمونه تغلیظ شده نسبت به تغییر غلظت داروی مودافینیل و مشتقات آن رسم گردید. با توجه به نتایج گزارش شده در نمودار ۹ محدوده خطی برای اندازه گیری ۰/۱ تا ۶ mg/l با ضرایب همبستگی ۰/۹۹۴، ۰/۹۹۳ و ۰/۹۹۹ برای مودافینیل، مودافینیل آمید سولفید و مودافینیل اسید سولفید بدست آمد. مقادیر حد تشخیص نیز به ترتیب ۰/۰۲۱، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۱۲ mg/L و محاسبه شدند. همچنین انحراف استاندارد نسبی با آنالیز ۶ نمونه به ترتیب برای سه دارو در غلظت ۲ mg/L برابر با ۰/۹۳، ۰/۹۹ و ۱/۷۸ % و همچنین فاکتور تغلیظ روش پیشنهادی به ترتیب ۴۳، ۴۲/۵ و ۴۰ بدست آمد.



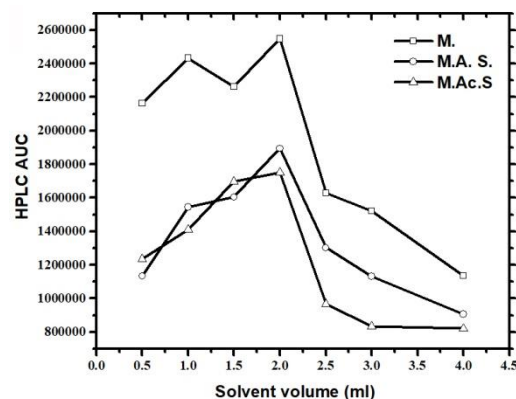
نمودار ۹. منحنی‌های کالیبراسیون مودافینیل، مودافینیل آمید سولفید و مودافینیل اسید سولفید

۳-۲-۱۱- آنالیز نمونه حقیقی

در نهایت جهت بررسی کارایی و دقت روش پیشنهاد شده در استخراج گونه‌های مورد نظر در شرایط حقیقی، استخراج از بافت نمونه‌های واقعی انجام شد. بدین منظور داروهای مورد نظر با غلظت ۲ mg/L به آب رودخانه جاجرود و همچنین نمونه پلاسما اضافه شد. ابتدا نمونه آب رودخانه و پلاسما بدون اضافه کردن آنالیت و سپس با اضافه کردن آنالیت و عمل پیش تغلیظ در شرایط بهینه، به دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا تزریق شد که نتایج آن در جدول ۳ و شکل ۶ آمده است. میزان درصد بازیابی در نمونه‌ها از ۱۰۱/۵-۹۷ درصد می‌باشد که نشان‌دهنده کاربردی بودن روش پیشنهادی هست.

جدول ۱. اندازه‌گیری آنالیت‌ها در نمونه‌های حقیقی

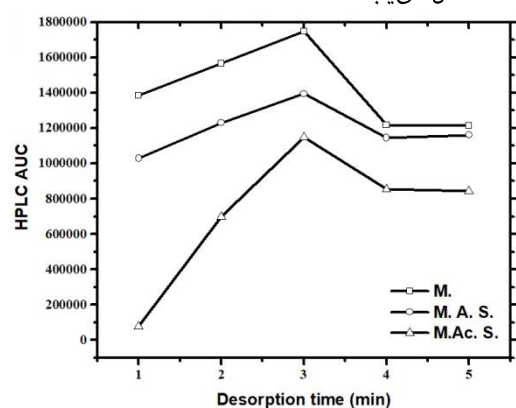
نمونه واقعی	مقدار (آنالیت اضافه شده ppm)			آنالیت بازیافت شده (ppm)			درصد بازیافت		
	M	M.A.S	M.Ac.S	M	M.A.S	M.Ac.S	M	M.A.S	M.Ac.S
آب رودخانه	-	-	-	2.0	2.01	2.01	101.	100.5	100.6
ه	2	2	2	2	2.01	2.01	5	-	-
پلاسما	2	2	2	1.9	1.97	1.94	99	98.5	97
				8	-	-	-	-	-



نمودار ۷. تاثیر مقادیر مختلف حلال بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

۳-۲-۸- بررسی تاثیر تغییر زمان واجذب بر جذب مودافینیل و مشتقات آن

پس از افزودن نمونه به مقدار ۵ ppm و اعمال شرایط بهینه مشخص شده، پس از هم‌زدن و جداسازی فاز جاذب از محلول توسط میدان مغناطیسی خارجی، شستشوی فاز جامد در مدت زمان‌های مختلف تحت امواج التراسونیک انجام گرفت تا تاثیر مدت زمان التراسونیک بر مقدار واجذب آنالیت تعیین شود. مدت زمانهای مختلف واجذب در نمودار ۸ مشاهده می‌شود. مدت زمان واجذب آنالیت که توسط دستگاه التراسونیک اعمال می‌شود بر مقدار پاسخ دتکتور HPLC تاثیر دارد. با افزایش زمان التراسونیک تا سه دقیقه پاسخ HPLC افزایش می‌یابد، اما پس از آن دوباره مقداری از آنالیت جذب فاز جامد شده و پاسخ HPLC کاهش می‌یابد.



نمودار ۸. تاثیر مدت زمان واجذب بر جذب نهایی مودافینیل و مشتقات آن

۳-۲-۹- انحراف استاندارد نسبی (RSD)

برای تعیین انحراف استاندارد نسبی (RSD)، که شاخصه‌ی تکرار پذیری آزمایش می‌باشد، تعداد ۶ آزمایش با غلظت یکسان نمونه و در شرایط بهینه مقدار جاذب برابر با ۶۰ میلی‌گرم، غلظت بافر و نمک برابر با ۰/۰۷۵ مولار، مدت زمان جذب و واجذب به ترتیب برابر ۲۰ و ۳ دقیقه، pH محلول برابر با ۷ و مقدار حلال شویش در مرحله واجذب برابر با ۳ میلی‌لیتر از متانول انجام گرفت. تکرارپذیری روش به صورت ((درصد انحراف از میانگین) انحراف از میانگین $\pm$ میانگین) برای مودافینیل، مودافینیل آمید سولفید و

۴. نتیجه گیری

در این تحقیق، روشی برای پیش‌تخلیظ و استخراج داروی مودافینیل و مشتقات آن با فاز جامد بر پایه استفاده از نانوذرات مغناطیسی پوشانده شده با نانو لوله‌های کربنی چنددیواره، به عنوان جاذب ارائه شد. آنالیز نهایی ترکیبات پیش‌تخلیظ شده با دستگاه HPLC و دتکتور UV انجام گرفت. سنتز نانوذرات مغناطیسی پوشیده با نانولوله‌های کربنی آسان بوده و دارای کارایی بالایی برای استخراج گونه‌هایی که خاصیت آبگریز دارند، می‌باشد. ویژگی‌هایی از قبیل سطح به حجم بالا، امکان استخراج ساده و سریع گونه‌های مختلف با بکارگیری یک میدان مغناطیسی خارجی، عدم نیاز به مراحل فیلتراسیون و سانتریفیوژ طی فرآیند استخراج، توانایی استخراج از حجم زیاد محلول حاوی نمونه‌ها، استفاده از این مواد را به عنوان جاذب متمایز کرده است. در شرایط بهینه، ارقام شایستگی نشان دهنده‌ی توانایی روش مذکور در اندازه‌گیری مقادیر ناچیز داروی مودافینیل و مشتقات آن در محیط‌های آبی و پلاسما است. استفاده از این جاذب می‌تواند باعث کاهش هزینه‌ها شود و به عنوان یک تکنیک مناسب در مراکز آنالیز مورد استفاده قرار گیرد.

۵. منابع

- [11] S.-B. Qin, Y.-H. Fan, X.-X. Mou, X.-S. Li, S.-H. Qi, J. Chromatogr. A, 1568, 29–37, (2018).
- [12] Y. Huang, J. Peng, X. Huang, J. Chromatogr. A, 1546, 28–35, (2018).
- [13] N. Al-Afy, H. Sereshti, A. Hijazi, H. Rashidi Nodeh, J. Chromatogr. B, 1092, 480–488, (2018).
- [14] A. Rahimi, M. A. Zanjanchi, S. Bakhtiari, M. Dehsaraei, Food Chem., 262, 206–214, (2018).
- [15] N. Kates, Can. Fam. Physician, 51, 53–9, (2005).
- [16] J. K. Buitelaar, S. A. Montgomery, B. J. van Zwieten-Boot, European College of Neuropsychopharmacology Consensus Committee, Eur. Neuropsychopharmacol., 13, 297–304, (2003).
- [17] F. Ahmadi, M. Rajabi, F. Faizi, M. Rahimi-Nasrabadi, B. Maddah, Int. J. Environ. Anal. Chem., 94, 1123–1138, (2014).
- [18] P. A. Montano, G. K. Shenoy, E. E. Alp, W. Schulze, J. Urban, Phys. Rev. Lett., 56, 2076–2079, (1986).
- [19] L. Shi, Y. He, Y. Huang, B. Jiang, Energy Convers. Manag., 149, 401–408, (2017).
- [20] M. Rahimi-Nasrabadi, S. M. Pourmortazavi, Z. Rezvani, K. Adib, M. R. Ganjali, Mater. Manuf. Process., 30, 34–40, (2015).
- [21] Y. Yamini, M. Safari, M. Shamsayei, J. Pharm. Anal., 8, 250–257, (2018).
- [22] H. Alinezhad, A. Amiri, M. Tarahomi, B. Maleki, Talanta, 183, 149–157, (2018).
- [1] M. Pastor-Belda, L. Marín-Soler, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A, 1564, 102–109, (2018).
- [2] N. Li, H.-L. Jiang, X. Wang, X. Wang, G. Xu, B. Zhang, L. Wang, R.-S. Zhao, J.-M. Lin, TrAC Trends Anal. Chem., 102, 60–74, (2018).
- [3] A. Azzouz, S. K. Kailasa, S. S. Lee, A. J. Rascón, E. Ballesteros, M. Zhang, K.-H. Kim, TrAC Trends Anal. Chem., (2018).doi:10.1016/J.TRAC.2018.08.009
- [4] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R. M. Peña-Creciente, Anal. Chim. Acta, 1002, 1–17, (2018).
- [5] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R. M. Peña-Creciente, J. Otárola-Jiménez, Anal. Chim. Acta, 892, 10–26, (2015).
- [6] I. Vasconcelos, C. Fernandes, TrAC Trends Anal. Chem., 89, 41–52, (2017).
- [7] L. Liang, X. Wang, Y. Sun, P. Ma, X. Li, H. Piao, Y. Jiang, D. Song, Talanta, 179, 512–519, (2018).
- [8] L. Chen, M. Zhang, F. Fu, J. Li, Z. Lin, J. Chromatogr. A, 1567, 136–146, (2018).
- [9] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepaska, M. de la Guardia, J. Namienik, TrAC Trends Anal. Chem., 73, 19–38, (2015).
- [10] M. Musa, W. A. Wan Ibrahim, F. Mohd Marsin, A. S. Abdul Keyon, H. Rashidi Nodeh, Food Chem., 265, 165–172, (2018).